

台東縣長濱鄉八桑安部落白玉蝸牛刺激分泌物活性研究

呂佩倫*、連紋乾、黃啟瑞、朱力民、楊繼江、李俊霖

摘要

最近幾年發現有關天然物質的研究增加可改進及刺激皮膚的再生，在這方面，白玉蝸牛(*Achatina fulica* "white")的分泌物用在美妝產品上，令人耳目一新，然而，蝸牛分泌物萃取非常不容易，使的天然活體蝸牛萃取液變得更為珍貴，雖然蝸牛面膜的相關研究與產品眾多，但是白玉蝸牛品種與生長環境影響其分泌物的各式生物活性不盡相同。本研究選自好山好水無空氣污染的臺東縣長濱鄉阿美族八桑安部落(Pasongan) 養殖的白玉蝸牛品系(白玉長濱一號)，研究蝸牛萃取液其生物活性分析，實驗結果如下，尿囊素: 2394.0mg/L、乙醇酸: 11269.0 mg/L、16.8% DPPH 自由基清除能力、多醣含量 16.15 mg/mL，以人類皮膚細胞驗證此品系蝸牛蛋白質體萃取液體對於人體皮膚細胞是安全的。此研究結果幫助我們了解使用此品系的白玉蝸牛可以開發成有潛力的美妝產品，提高食用蝸牛其附加價值，達到永續綠色養殖農畜業的經營。

關鍵字：白玉蝸牛、DPPH、HPLC、細胞實驗、尿囊素、乙醇酸

呂佩倫(通訊作者)，國立臺東大學生命科學系副教授。Email: peiluen@nttu.edu.tw

連紋乾，國立臺東縣立蘭嶼高級中學校長、國立雲林科技大學技術及職業教育研究所博士候選人。
Email: kendor168@gmail.com

黃啟瑞，財團法人石材暨資源產業研究發展中心研究員、經濟部東部深層海水創新研發中心研究員、
國立臺東大學生物醫學碩士學位學程兼任助理教授。Email: crhuang.ksn@gmail.com

朱力民，國立臺東大學綠色與資訊科技學士學位學程教授。Email: lmchu@nttu.edu.tw

楊繼江，國立臺東大學生物醫學碩士學位學程教授、國立臺東大學醫農食研究中心主任。Email: cyang@nttu.edu.tw

李俊霖，國立臺東大學生命科學系教授、國立臺東大學東部生物經濟中心主任。Email: clee@nttu.edu.tw

投稿日期:2021年9月15日;修改日期:2021年9月23日;通過日期:2021年9月26日。

Study On The Secretion Stimulation Activity of White Jade Snail From Pasongan Tribe, Changbin Township, Taitung

Pei-Luen Lu*, Wen-Chian Lian, Chi-Rui Huang, Li-Ming Chu, Chi-Chiang Yang, Chun-Lin Lee

Abstract

In recent years, it has been discovered that the increase in research on natural substances can improve and stimulate skin regeneration. In this regard, the secretion of *Achatina fulica* "white" is refreshing when used in beauty products. However, the extraction of snail secretion is very difficult, making the natural live snail extract more precious. Although there are many related researches and products of snail mask, the variety and growth environment of white jade snails affect the various biological activities of their secretions. This study was selected from the white jade snail strain (White Changbin No. 1) cultivated by the Pasongan tribe (Pasongan) of the Amis in Changbin Township, Taitung County, where there is no air pollution. Study the biological activity of snail extract, the experimental results are as follows, Allantoin: 2394.0mg/L, Glycolic acid: 11269.0 mg/L, 16.8% DPPH free radical scavenging ability, polysaccharide content: 16.15 mg/mL, and this strain of snail protein extract is safe for human skin cells verified by human skin cells. The results of this research help us understand that the White Jade snails strain can be developed into potential beauty products, increase the additional value of edible snails, and achieve sustainable green farming and livestock operations.

Keyword: White Jade Snail (*Achatina fulica* "white")、DPPH、HPLC、Cell culture、Allantoin、Glycolic Acid

Pei-Luen Lu (Corresponding Author), Associate Professor, Department of Life Science, National Taitung University. E-mail: peiluen@nttu.edu.tw

Wen-Chian Lian, President, Taitung County Lanyu High School ; PhD candidate, Graduate School of Technological and Vocational Education, National Yunlin University of Science and Technology. Email: kendor168@gmail.com

Chi-Ruei Huang, Researcher, Stone & Resources Industry R&D Center; Researcher, Eastern Taiwan Deep Water Innovation & Research Center; Adjunct Assistant professor, interdisciplinary of Biomedicine, National Taitung University. Email: crhuang.ksn@gmail.com

Li-Ming Chu, Director, Interdisciplinary of Green and Information Technology, National Taitung University. E-mail: lmchu@nttu.edu.tw

Chi-Chiang Yang, Director, Interdisciplinary of Biomedicine, National Taitung University; Biomedicine and Agriculture Study Center, National Taitung University. E-mail: cyang@nttu.edu.tw

Chun-Lin Lee, Professor, Department of Life Sciences, National Taitung University; Director, East Bio-Economic Center, National Taitung University. E-mail: cllee@nttu.edu.tw

壹、前言

從遠古時代開始，蝸牛分泌粘液就已被用於醫學上，以減輕疼痛，燒傷，其他損傷和各種疾病(Bonnemain 2005; Pitt et al., 2015)。近年來，對蝸牛分泌物的研究證實，粘液中含有尿囊素和乙醇酸等天然成分，對人體皮膚具有有益和治療作用(Iguchi et al., 1982; Wilson 1968)。尿囊素是嘌呤在哺乳動物中的最終分解代謝產物，長期以來一直用於化妝品和藥物中，沒有顯示出毒性或不良副作用(Chen 1996; Fujiwara and Noguchi 1995)。根據美國食品藥品監督管理局 (FDA) 的報導，尿囊素是一種安全有效的皮膚保護活性化合物，劑量範圍為 0.5–2.0% (Thornfeldt 2005)。乙醇酸是用於皮膚護理化妝品的最廣泛使用的 α -羥基酸，用於治療包括光化性角化病，角化過度和脂溢性濕疹在內的皮膚疾病(Spellman and Pincus 1998)。乙醇酸及其常見的鹽(salts)和酯(esters)可安全地用於化妝品中，濃度 $\leq 10\%$ ，最終 pH ≥ 3.5 (Cosmetic Ingredient Review Expert Panel 1998)。

食用蝸牛作為食品和飼料的原料是在世界範圍內不斷增長，白玉蝸牛由一般我們所看到的非洲大蝸牛白子化（變種）而來，也因身體雪白如玉，於是有了這個美麗的名字。少了黑色素的白玉蝸牛除了體色不同，肉質更柔軟 Q 彈，也少了黑蝸牛會有的體味，很適合烤、炒、炸等製成各式料理，這種蝸牛的年產量也在增長增長了 4.8%，蝸牛的主要生產國是摩洛哥（1.5 萬噸），西班牙（6.5 萬噸），印度尼西亞（5.9 萬噸），中國（2.9 萬噸），羅馬尼亞（2.0 萬噸），佔四分之三以上全球產量，世界蝸牛（海蝸牛除外）市場報告指出到 2025 年的分析和預測將遠遠超過 2017 年的世界食用蝸牛統計量 (2021)。非洲大蝸牛 (*Achatina fulica*)，它是可食用蝸牛的主要種類之一，被視為奢侈品，尤其是在法國，西班牙，荷蘭，比利時和葡萄牙由於其特殊的感官品質和營養含量高 (Paszkiewicz et al., 2015)。較早報告表明，非洲大蝸牛包括白子化的白玉蝸牛的粘液含有幾種有用的物質，包括乙醇酸、尿囊素、彈力蛋白、抗菌肽 (mytimacin) 和卵磷脂 (Manosalva, 2005; Ferrer and Valenzuela, 2006; Kantawonget al., 2016)。

蝸牛粘液主要用於化妝品，但也存在於輔助製藥和膳食補充劑，通常最終產品中原料的濃度為高度可變，介於 10% 到 90% 之間 (Bonnemain 2005; Trapella et al., 2018)。因此，負責任的活性物質因為蝸牛粘液的有益作用將以不同比例存在，蝸牛黏液是非常複雜的基質，受到生物學和環境的高度影響因素(Trapella et al., 2018)。了解這些因素如何影響產品質量至關重要原材料，以確保有效，標準化的產品。儘管蝸牛粘液是世界各國幾種化妝品和藥品中的一種成分，如蝸牛面膜，但化學成分和生物學作用的

全面表徵仍然缺失(Trapella et al., 2018)。蝸牛的分泌物或蝸牛粘液是一種粘液，覆蓋了動物的整個外表面，並由位於蝸牛腳(足腺)水平的特定唾液表皮腺分泌 (Greistorfer, S. et al. 2017)。此分泌物對動物的生命具有不同的功能，具有粘著性，潤膚性，保濕性，潤滑性，保護性甚至修復性(Newar and Ghatak 2015)。為了維持所有這些生物活性，蝸牛粘液具有復雜且科學界尚未完全明白的組成 (Greistorfer, S. et al. 2017)。該粘液中存在的活性物質使其成為獨特的天然產物，目前尚無法在實驗室中人工合成與合成化合物複製(Trapella et al., 2018)。

蝸牛粘液是通常被認為具有健康特性的活性物質混合物，可用於治療皮膚疾病(Lai et al., 2011)。多醣及其衍生物具有幾種特殊的生物學特性消炎，抗輻射，降血脂等功能脂質水平，作為抗凝劑，活性氧清除劑，和生物反應調節劑，具體取決於相應的化學結構 (Liu et al., 2017)。蝸牛養殖在許多國家中都是非常重要的產業，有趣的是，蝸牛粘液被認為是許多疾病的傳統療法，可用於治療瘡癤，皸紋，妊娠紋，胃灼熱等，它的特性歸因於乙醇酸、尿囊素，蛋白質，維生素，彈性蛋白和膠原蛋白以及未知其他化合物含量高(Bonnemain 2005; Pitt et al., 2015)。世界上有成千上萬種蝸牛，它們生活在不同的地方不同生物和環境條件下的棲息地類型，蝸牛黏液的組成將取決於其種類和環境條件與蝸牛的棲息地 (Kim et al., 1996; Lee et al., 2003)。

臺東縣長濱鄉的八桑安 Pasongan 部落，是阿美族原稱阿美族「八桑安」社，戰後更名發音類似的「白桑安」。依據《番社案內》(新港支廳，1934：無頁碼)一書的記載：白桑安社是在光緒 10 年(1884)左右，自花蓮大港口方面移居而來的阿美族所建立的，遷移的原因可能是由於不堪泰雅族與布農族侵襲，或是為了尋求更廣大的耕地。而社名的起因則不詳。按照安倍明義的說法，此社大約是在光緒 14 年(1888)，由烏石鼻分出來的聚落。而部落的命名具有「草割除後聚落才成立」的意思，パソガン (Pasongan) 就是指割草築屋之意(交通部觀光局 2015)。阿美族本來就有食用非洲大蝸牛的習慣，八桑安部落擁有一種特別的白玉蝸牛品種，希望能了解這品系的蝸牛其刺激後分泌物生物活性與抗氧化能力，測試此品系蝸牛刺激後分泌物的細胞安全性，初步了解白玉長濱蝸牛一號品系的功能，未來可以開發成有經濟價值臺東長濱原住民特色美妝產品。

貳、研究方法

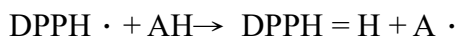
1.實驗材料:

購自台東縣長濱鄉八桑安部落宏成蝸牛農場行的白玉蝸牛白玉長濱一號品系 (*Achatina fulica* "white" changbin no 1)。

使用自行研發的萃取方法萃取蝸牛蛋白質體萃取液體，萃取完畢後蝸牛依舊存活，使該蝸牛休息七天後再重複萃取步驟，每次每隻約可獲得 2 毫升分泌物。所獲得的蝸牛分泌物，以 0-4 度 C 9000x 離心 30 分鐘，取上清液通過無菌篩孔，然後以無菌狀態冰凍於-20 度 C 冷凍冰櫃，供後續使用。蝸牛萃取液體採用冷凍低溫乾燥儀器冷凍乾燥成白色濃縮粉末狀保存供後續使用或是採用熱風 40 度乾燥機烘乾後乾燥成白色濃縮粉末狀保存供後續使用。

2.DPPH 自由基清除能力分析

根據 Vulić 研究的方法進行 DPPH 自由基清除能力分析並進行修改測定蝸牛蛋白質體萃取液體抗氧化能力。DPPH 為脂溶性，是一個穩定的自由基，具有深色結晶粉末，可溶於甲醇或乙醇中會呈現藍紫色，當加入萃取物可以和 DPPH 自由基直接反應，這時呈現藍紫色的 DPPH 溶液顏色會轉成黃色，表示加入的萃取物具有捕捉 DPPH 自由基的能力，而呈現的顏色愈淡，則是捕捉 DPPH 自由基的能力愈強，此萃取物的抗氧化能力越好，其在 517 nm 有極大的吸光值。



取 0.0394 g DPPH 與 70 % 乙醇配置成 100 mL 以製備 DPPH 溶液。將 0.01 mL 的樣品與 0.19 mL DPPH 混合，並在室溫下在暗處靜置 10 分鐘。在 517 nm 處通過分光光度法測量吸光度。使用維生素 C 作為標準曲線。通過以下計算 DPPH 還原的百分比：

$$\% \text{ DPPH reduction} = (1 - A_s / A_c) \times 100$$

A_c = 對照的吸光度。

A_s = 樣品的吸光度。

3. 尿囊素 HPLC 定量分析法

根據 Mubarak et al., (2013)方法，取尿囊素對照用標準品約 10 mg，精確稱定，分別置於 10 mL 容量瓶中，以去離子水溶解並定容，作為標準原液。臨用時取適量各標準原液混合，以去離子水稀釋至尿囊素 5~100 $\mu\text{g/mL}$ ，供作標準溶液。

精確量取檢液及尿囊素標準溶液各 10 μL ，分別注入高效液相層析儀中，將裝好的 solvent 使用超音波震盪 30 分鐘。將震完的 solvent 與 HPLC 的保存 solvent 進行更換。開啟 HPLC 機器並與電腦連線。使用幫浦機器進行 purge，每個 solvent 需 purge 5 分鐘。設定條件 (詳細條件如下)。將幫浦流速調到 0.2 mL/min 並依方向裝上管柱。裝好後將流速調到 0.8 mL/min 進行流洗 1 小時。流洗時準備樣本與設定 sample table，並將準備好的樣本依位置放入樣本盤中。流洗完成後開啟 acquire data 並測試 noise test 必須小於 50。測試完成後即可進行樣本測定。

依下列條件進行液相層析，就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間 及吸收圖譜比較鑑別之，並依下列計算式求出檢體中尿囊素之含量(%)：

$$\text{檢體中尿囊素之含量(\%)} = CV/M \times 10^{-4}$$

C：由標準曲線求得檢液中尿囊素之濃度($\mu\text{g/mL}$)

V：檢體最後定容之體積(mL) M：取樣分析檢體之重量(g)

高效液相層析測定條件：光二極體陣列檢出器：波長 210 nm。層析管：Ascentis[®] C18, 5 μm ，內徑 4.6 mm \times 25 cm。移動相溶液之調製：取乙腈與去離子水以 50：50 (v/v)之比例混合，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液。流速：1.0 mL/min。溫度 20 度。

4. 乙醇酸 HPLC 定量分析法

根據 Mubarak et al., (2013)方法，分別取適量乙醇酸對照用標準品，精確稱定，以去離子水溶解並定容，供作標準原液。使用時再以去離子水稀釋至 25~500 $\mu\text{g/mL}$ 。

精確量取檢液及乙醇酸標準溶液各 20 μL ，分別注入高效液相層析儀中，將裝好的 solvent 使用超音波震盪 30 分鐘。將震完的 solvent 與 HPLC 的保存 solvent 進行更換。開啟 HPLC 機器並與電腦連線。使用幫浦機器進行 purge，每個 solvent 需 purge 5 分鐘。設定條件 (詳細條件如下)。將幫浦流速調到 0.2 mL/min 並依方向裝上管柱。裝好後將流速調到 0.8 mL/min 進行流洗 1 小時。流洗時準備樣本與設定 sample table，並將準備好的樣本依位置放入樣本盤中。流洗完成後開啟 acquire data 並測試 noise test 必須小於 50。測試完成後即可進行樣本測定。

依下列條件進行液相層析，就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間 及吸收圖譜比較鑑別之，並依下列計算式求出檢體中乙醇酸之含量(%)：

$$\text{檢體中乙醇酸之含量(\%)} = CV/M \times 10^{-3}$$

C：由標準曲線求得檢液中乙醇酸之濃度($\mu\text{g/mL}$)

V：檢體最後定容之體積(mL) M：取樣分析檢體之重量(g)

高效液相層析測定條件：光二極體陣列檢出器：波長 215 nm。層析管：Ascentis[®] C18, 5 μ m，內徑 4.6 mm \times 25 cm。移動相溶液之調製：0~10 min: 取乙腈與去離子水以 50:50 (v/v) 之比例混合，10~13 min: 乙腈與去離子水以 35:65 (v/v) 之比例混合，13~25 min: 乙腈與去離子水以 50:50 (v/v) 之比例混合，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液。流速：1.0 mL/min。溫度 30 度。

5. 分泌物萃取物多醣含量分析 (phenol-sulfuric acid method)

先使用 50% sulfuric acid 進行蝸牛萃取液體酸化分解作用 12-16 小時，然後取 sample 10 mL 加入 30 mL 95% ethanol 靜置於 4°C 12 hr，使用離心機 1350 \times g 15 min 去除上清液，再以 75% ethanol 靜置於 4°C 12 hr，進行第二次沉澱，利用離心機 1350 \times g 15 min 去除上清液，將樣品於 60°C 乾燥後，加 10 mL DDW 回溶並做後續試驗 (Masuko et al., 2005; Nielsen 2010)。

取 0.5 mL sample 加入 0.5 mL 5% phenol 再加入 2.5 mL sulfuric acid 靜置 10 min，混合後在 25°C 反應 30 min，以分光光度計檢測 490 nm 吸光值，利用葡萄糖做標準曲線，回推樣品中的多醣含量。葡萄糖粉末先在 60°C 烘箱供三天以除去多餘水分再使用。Phenol 選購白色結晶無飽和的純 Phenol (Masuko et al., 2005; Nielsen 2010)。

6. 細胞試驗評估萃取物生物安全性

利用 CCD-966SK 皮膚細胞株，培養在 F-12K medium (內含 5% fetal bovine serum、2 mM glutamine、50 U/mL penicillin、25 mM HEPES 與 2.5g/L sodium bicarbonate)，在 37°C 下 5% CO₂ 培養箱中培養，繼代方式以 trypsin-EDTA 將細胞懸浮、一週繼代 2~3 次 (Cory et al., 1991)。

以含有 FBS medium 將細胞數固定為 3×10^6 平均加入 96-well 或 6-well 後培養 24 hr，加入試驗物質後加入以不同濃度配製成的 H₂O₂ 之 F-12K free-serum medium 總體積，培養 24 hr 與 48 hr，進行 MTT 試驗。本試驗可以知道萃取物對正常皮膚細胞的傷害影響並進行安全性評估，進而求得萃取物的細胞毒性範圍 (Cory et al., 1991)。

7. 安全殺菌方法

利用孔徑 0.22 μ m millipore membrane 生物性濾膜，將蝸牛蛋白質體腺分泌物萃取液進行安全殺菌過濾。將無菌的微孔濾膜。用無菌的尖細鑷子夾住，放在無菌的微孔

濾膜裝置中。將無菌的微孔濾膜裝置由下底口套在無菌的容器上。用塑膠注射筒吸取要滅菌的溶液。注射筒口插入微孔濾膜過濾裝置之上蓋口。擠壓注射筒的推管，使溶液流經微孔濾膜流入無菌容器中。

8. 統計分析

資料統計與分析將所取得的各項數據利用 Excel 建檔，用於後續資料的分析，最後使用統計軟體 SPSS 22 version (IBM-Corp 2013) 做下列分析。本實驗數據均三重複，結果以平均值 \pm 誤差值 (mean \pm SD) 表示。數據利用 OriginPro7.0 之單因子變異數分析 (One - way ANOVA) 進行統計分析， $P > 0.05$ 即為顯著差異。

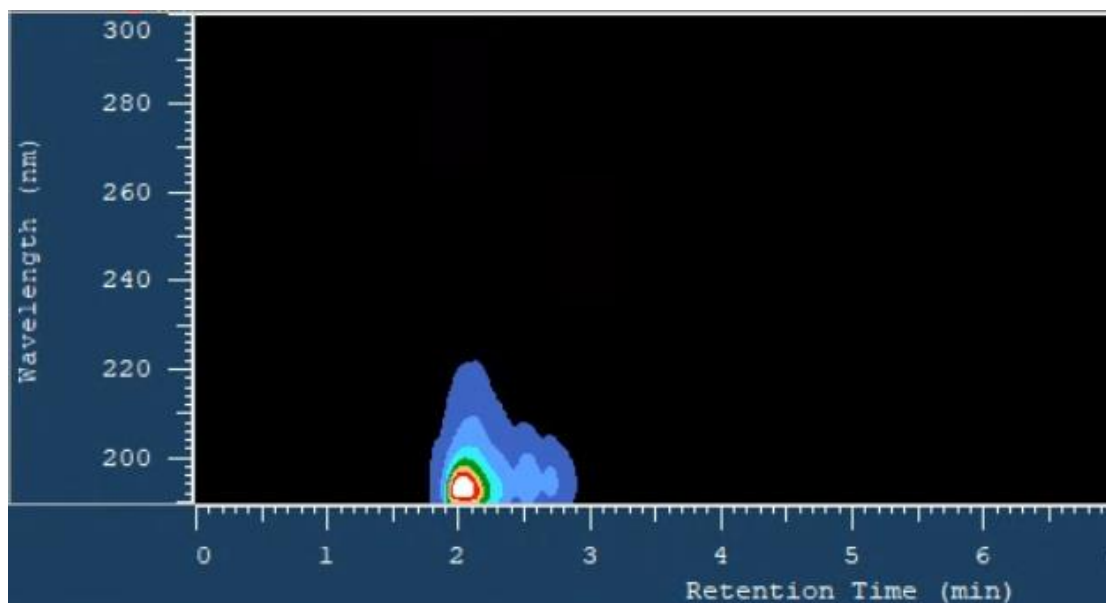
9. 動物倫理

本計畫使用的動物為無脊椎動物，蝸牛萃取完畢之後都還會安全活著。

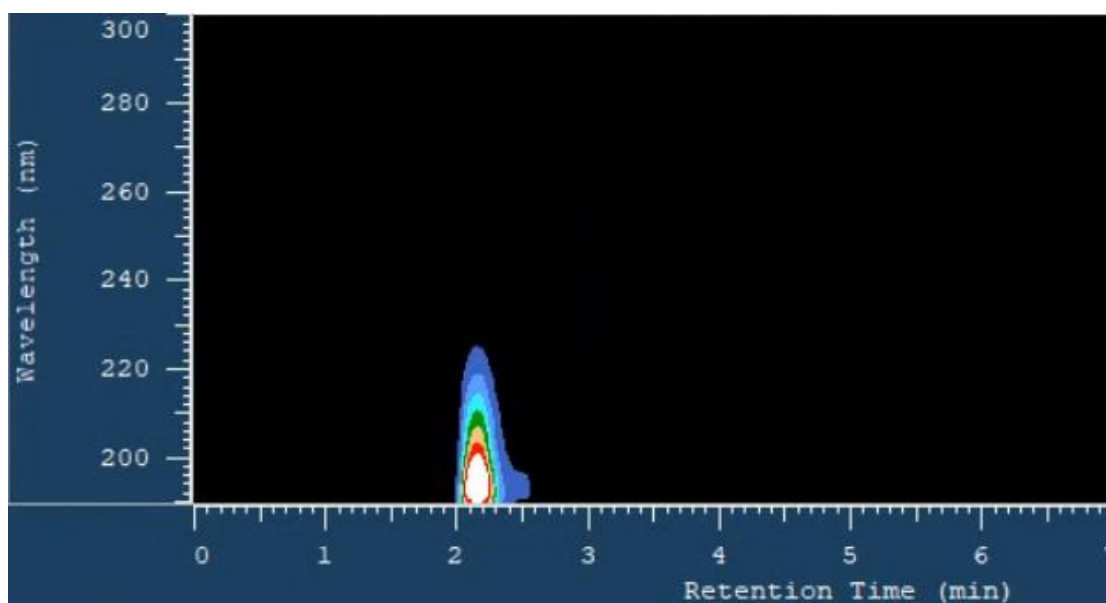
參、結果與討論

本實驗期望能透過 HPLC、細胞實驗、DPPH 與多醣體分析的方法來得知了解台東縣長濱鄉阿美族八桑安部落白玉蝸牛白玉長濱一號品系，並提供對於該品系活體刺激後分泌物相關活性測定分析第一手資料，以提供後續研究與發展的建議。

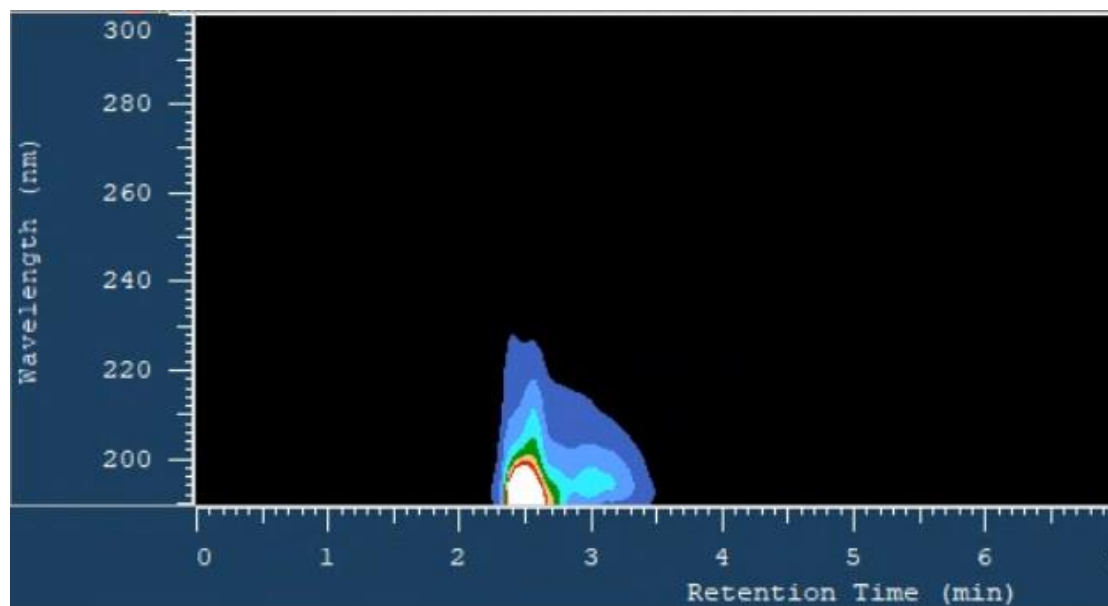
經由高效液相層析 HPLC 實驗結果得知，白玉蝸牛白玉長濱一號品系尿囊素定量結果為 $2394.0 \pm 744.8 \text{mg/L}$ (圖一與圖二)，乙醇酸定量結果為 $11269.0 \pm 867.2 \text{mg/L}$ (圖三與圖四)，此品系的蝸牛蛋白質體萃取液的尿囊素跟乙醇酸與其他蝸牛相關文獻相比差不多 (Mubarak et al., 2013)，皆具有尿囊素與乙醇酸指標性產物。



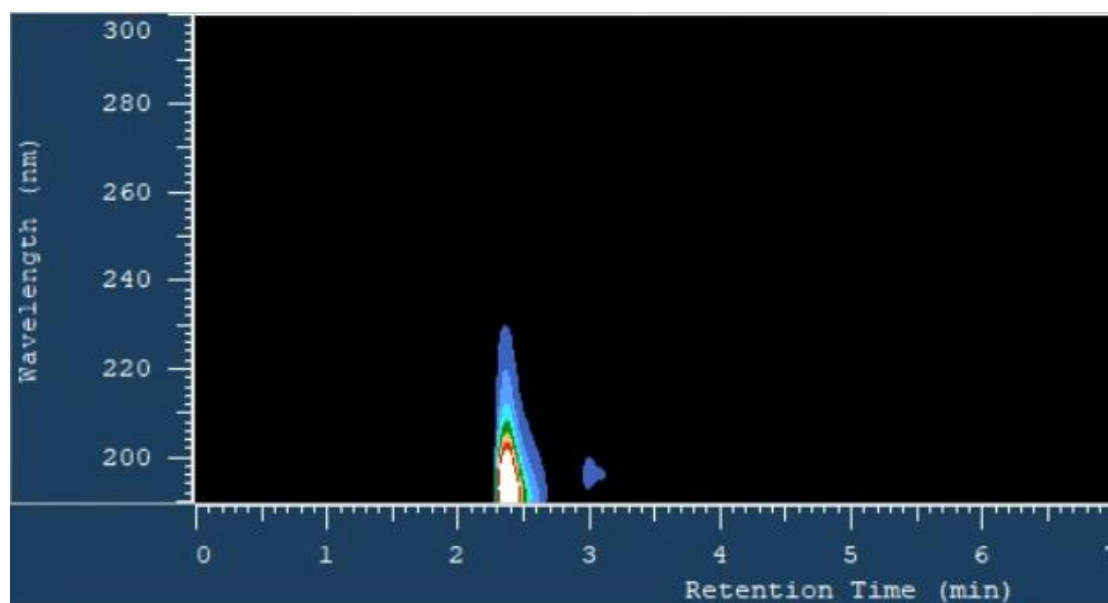
圖一：尿囊素樣本 HPLC-DAD 層析圖譜，白色到藍色代表濃度高低，白色濃度最高，向外依序降低，深藍色為濃度最低，白色是波峰位置。



圖二：尿囊素標準品 HPLC-DAD 層析圖譜，白色到藍色代表濃度高低，白色濃度最高，向外依序降低，深藍色為濃度最低，白色是波峰位置。



圖三：乙醇酸樣本 HPLC-DAD 層析圖譜，白色到藍色代表濃度高低，白色濃度最高，向外依序降低，深藍色為濃度最低，白色是波峰位置。



圖四：乙醇酸標準品 HPLC-DAD 層析圖譜，白色到藍色代表濃度高低，白色濃度最高，向外依序降低，深藍色為濃度最低，白色是波峰位置。

經由清除 DPPH 自由基能力實驗得知，此品系蝸牛蛋白質體腺萃取液具有抗氧化能力，16.8% DPPH 自由基清除能力。 α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH, C₁₈H₁₂N₅O₆) 為抗氧化研究時，常被用作檢測抗氧化劑提供氫原子之能力。新鮮配製的 DPPH 甲醇溶液於波 517nm 會有最大吸收值，當 DPPH 被還原時，此吸收值會降低或消失，因此可經由測定其吸收值來評估待測試樣品之清除自由基的能力

(Shimada et al., 1992; Bruton 1994)。

由於，蝸牛蛋白質體腺萃取液體乙醇萃取物均優於其他兩種溶劑萃取物，故採用乙醇為萃取溶劑進行後續處理(表一)。乙醇萃取物之 DPPH 自由基清除能力如表一，顯示蝸牛蛋白質體腺萃取液體萃取物在 5 mg/mL 的濃度下，其清除 DPPH 自由基能力介於 31.58-24.08%之間，蝸牛蛋白質體腺萃取液體乙醇萃取物在 10 mg/mL 的濃度下，其清除 DPPH 自由基能力介於 70-50%之間萃取時間上與清除自由基的關係如表一，三種萃取方法皆具統計學上的顯著差異。萃取一小時與萃取 24 小時的抗氧化能力相當，因此往後皆採萃取一小時即可(表二)。

表一、蝸牛蛋白質體腺萃取液體不同溶劑萃取物之 DPPH 自由基清除能力

樣品 (mg/ml)	DPPH 自由基清除能力 (%)		
	乙醇萃取	水萃取	甲醇萃取
10	70.09±0.10 ^{ax}	67.15±0.10 ^{ay}	50.71±0.10 ^{az}
5	31.58±0.21 ^{bx}	29.63±0.10 ^{by}	24.08±0.10 ^{bz}
3	21.92±0.21 ^{cx}	20.69±0.21 ^{cy}	16.99±0.21 ^{cz}
2	19.25±0.01 ^{dx}	18.22±0.21 ^{dy}	14.62±0.10 ^{dz}
1	14.70±0.21 ^{ex}	13.70±0.21 ^{ey}	11.13±0.10 ^{ez}

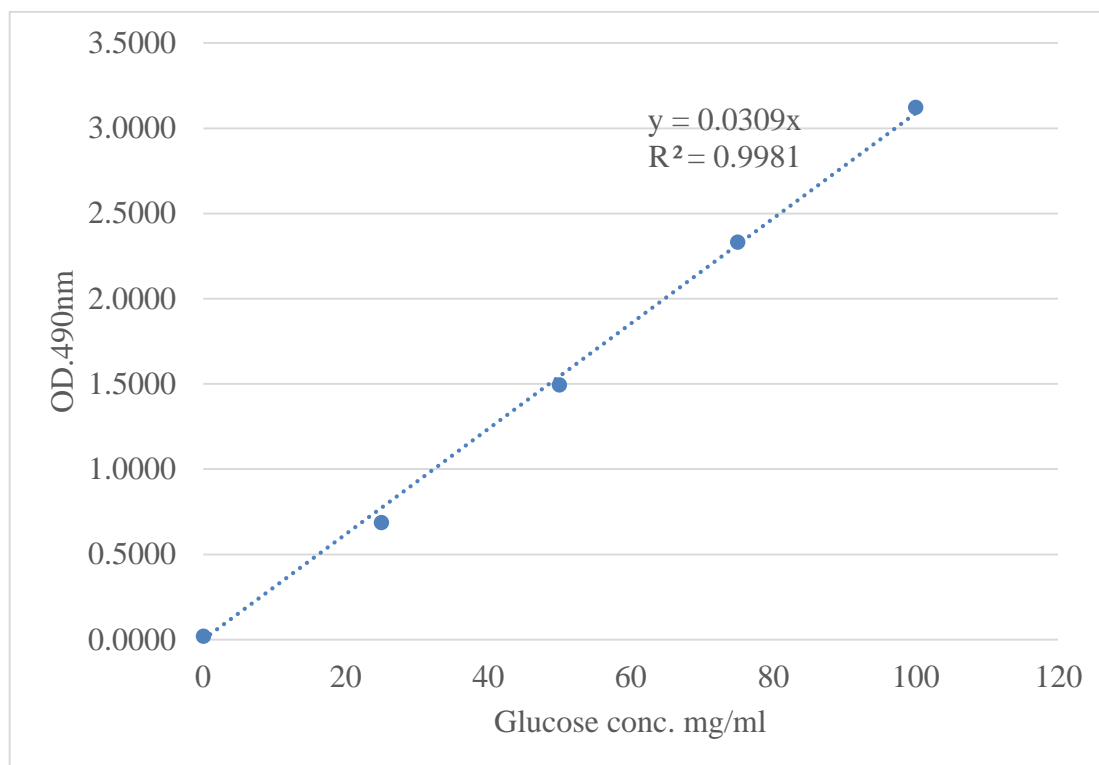
*每組樣品皆三重複，不同的英文字母上標 (a-e, x-z) 表示具有統計學上顯著差異 p<0.05。

表二、蝸牛蛋白質體腺萃取液體不同萃取時間之乙醇萃取物 DPPH 自由基清除能力

樣本 (mg/ml)	DPPH 自由基清除能力 (%)	
	萃取時間 24 小時	萃取時間 1 小時
10	70.29±0.10 ^a	70.09±0.10 ^a
5	32.09±0.10 ^b	31.58±0.21 ^b
3	22.74±0.21 ^c	21.92±0.21 ^c
2	21.20±0.10 ^c	19.25±0.02 ^d
1	16.78±0.41 ^e	14.72±0.22 ^f

*每組樣品皆三重複，不同的英文字母上標 (a-f) 表示具有統計學上顯著差異 p<0.05。

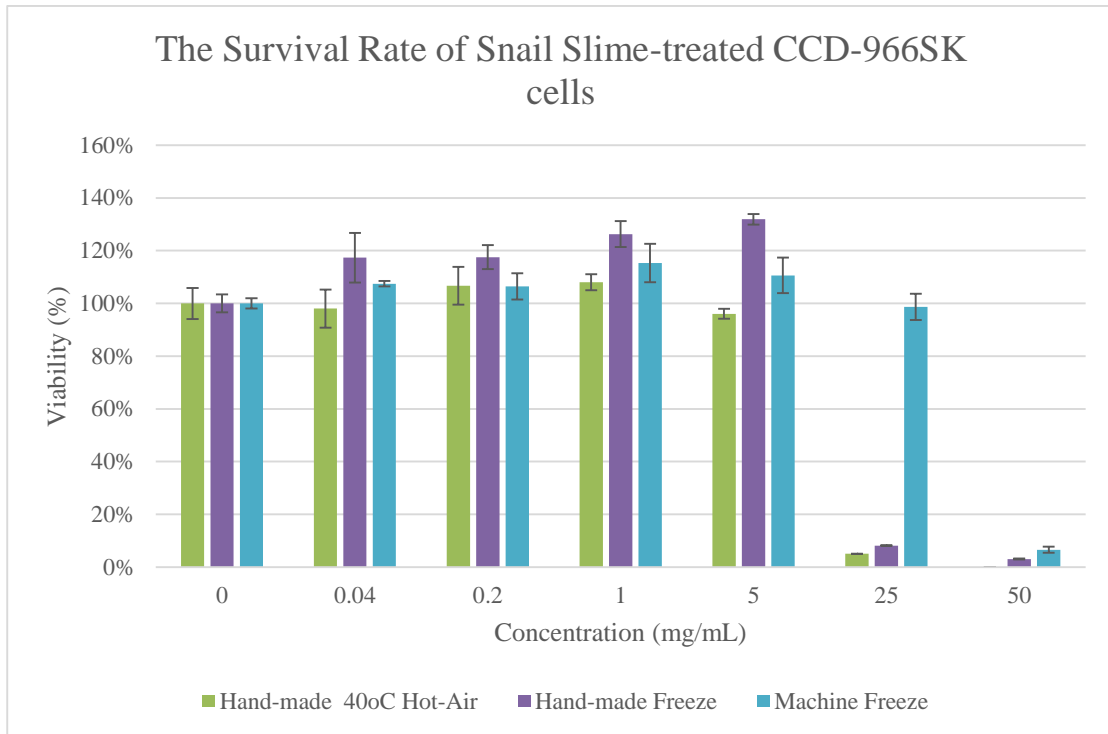
本實驗採用葡萄糖作為苯酚硫酸法的標準品。結果得到的總多醣體之含量約為 16.15 ± 0.12 mg/mL (圖五)，無論是用熱風乾燥方法或是冷凍乾燥方法所得到的總多醣體無統計學上顯著差異。



圖五：苯酚硫酸法標準曲線，葡萄糖為標準品。

如圖六所示。以蝸牛蛋白質體萃取液粉末對細胞的毒性而言，在濃度 5mg/mL 以下，無論何種乾燥方式或溫度，對細胞不具毒性。然而在濃度 25mg/mL 以上，蝸牛蛋白質體萃取液粉末溶液對細胞具有毒性，除了由我們自行研發的機器萃取後冷凍乾燥的組別之外。

經由實驗證實，蝸牛蛋白質體萃取液對於皮膚細胞沒有傷害的作用，且經實驗比較，使用我們自行研發的蝸牛萃取機器，其萃取物對於皮膚細胞的使用上更具又安全性。40°C 熱風乾燥方式與漸進式冷凍乾燥法比較結果，並無明顯差異。



圖六: 蝸牛蛋白質體萃取液細胞存活率分析。灰色為人工萃取後熱風乾燥方法，黃色為人工萃取後冷凍乾燥方法，藍色為機械萃取方法。

總結: 本研究完成蝸牛萃取液成分分析，完成細胞實驗安全性驗證，以人類皮膚細胞驗證蝸牛蛋白質體萃取液體對於人體皮膚細胞是安全的，而且使用我們研發出來蝸牛萃取機器更為優秀，完成以學理根據作為基礎進行研發，白玉蝸牛品系(白玉長濱一號)經實驗證明安全性佳，臺東白玉蝸牛產品未來可望具有創新作為。

致謝

感謝 109 年度臺東縣地方產業創新研發推動計畫 (地方型 SBIR) 與宏成蝸牛農產行研究經費的支持。

參考文獻

- 交通部觀光局(2015)。地名檢索系統 <http://gissrv4.sinica.edu.tw/search/> 《豐年祭之旅》
1998。交通部觀光局出版。Accessed on Feb. 10, 2021.
- Bonnemain, B. (2005) Helix and Drugs: Snails for Western Health Care From Antiquity to the Present. *drugs. Helix, Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2 : 25-28.
- Chen, X.B. , W. Matuszewski, J. and J. Kowalczyk. (1996) Determination of allantoin in biological, cosmetic, and pharmaceutical samples. *AOAC Int.* 79: 628-635.
- Cosmetic Ingredient Review Expert Panel, (1998) Annual Review of Cosmetic Ingredient Safety Assessments. *Int. J. Toxicol.* 17 (Suppl. 1) 5.
- Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG (1991). "Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture". *Cancer Communications.* 3 (7): 207–12.
- Ferrer, R. y. and Valenzuela, M. A. (2006). Determinación y cuantificación de alantoina en baba de caracol *Helix aspersa* Müller mediante electroforesis capilar. Resumen. XLIX reunión anual de la Sociedad de biología de Chile. *Biological Research.* 39(4B).
- Fujiwara, S and T. Noguchi, J. (1995) Degradation of purines: only ureidoglycollate lyase out of four allantoin-degrading enzymes is present in mammals. *Biochem.* 312: 315-318.
- Greistorfer, S. et al. (2017) Snail mucus - glandular origin and composition in *Helix pomatia*. *Zoology.* 122, 126–138.
- Kantawong, F., Thaweean, P., Mungkala, S., Tamang, S., Manaphan, R., Wanachantararak, P., Chumnanpuen, P. (2016). Mucus of *Achatina fulica* stimulates mineralization and inflammatory response in dental pulp cells. *Turkish Journal of Biology,* 40(2), 353–359.
- Kim, Y.S. ;Y.Y. Jo, I.M. Chang, T. Toida, Y. Park, and R.J. Linhardt, Carbohydrates, lipids, and other natural products: A new glycosaminoglycan from the giant African snail *Achatina fulica*. (1996) *J. Biol. Chem.,* 271, 11750-11755.
- Iguchi, S.M., T. Aikawa, J.J. Matsumoto, *Comp. Biochem. Physiol.* 72 (1982) 571.
- Lai, W. W., Hsiao, Y. P., Chung, J. G., Wei, Y. H., Cheng, Y. W., Yang, J. H. 2011. Synergistic phototoxic effects of glycolic acid in a human keratinocyte cell line. *Journal of Dermatological Science* 64: 191-198.
- Lee, Y.S., H.O. Yang, K.H. Shin, H.S. Choi, S.H. Jung, Y.M. Kim, D.K. Oh, R.J. Linhardt, and Y.S. Kim, (2003) Suppression of tumor growth by a new glycosaminoglycan isolated from the African giant snail *Achatina fulica*, *Eur. J. Pharmacol.,* 465, 191-198.
- Liu, J., Shang, F., Yang, Z., Wu, M., & Zhao, J. (2017). Structural analysis of a homogeneous polysaccharide from *Achatina fulica*. *International Journal of Biological Macromolecules,* 98, 786–792.

- Manosalva, C. (2005). Desarrollo, implementacin y validacin de una metodologa analtica por HPLC para la identificacin y cuantificacin de alantona en baba de caracol chileno (*Helix aspersa* Miller). Tesis Escuela de Qumica y Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.
- Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S.I., and Y.-C. Lee. (2005) Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format, *Analytical Biochemistry*, 339(1), 69-72.
- Mubarak, M. A. S. E., Lamari, F. N., and Kontoyannis, C. (2013) Simultaneous determination of allantoin and glycolic acid in snailmucus and cosmetic creams with high performance liquidchromatography and ultraviolet detection Mohamed. *Journal of Chromatography A*, 1322: 49-53.
- Newar, J. & Ghatak, (2015) A. Studies on the Adhesive Property of Snail Adhesive Mucus. *Langmuir*. 31, 12155–12160.
- Nielsen S.S. (2010) Phenol-Sulfuric Acid Method for Total Carbohydrates. In: Nielsen S.S. (eds) Food Analysis Laboratory Manual. Food Science Texts Series. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1463-7_6
- Shimada, K., K. Fujikawa, K. Yahara (1992). Antioxidative Properties of Xanthan on the Autoxidation of Soybean Oil in Cyclodextrin Emulsion, *Agric. Food Chem*, 40 : 945-948.
- Bruton G. W. (1994) . Vitamin : molecular and biological function, *Proc Nutr Soc.*, 53 : 251-262.
- Spellman, M.C. and S.H. Pincus. (1998) Efficacy and safety of azelaic acid and glycolic acid combination therapy compared with tretinoin therapy for acne. *J. Clin. Ther.* 20: 711-721.
- Paszkiwicz, W., Kozyra, I., & Rzeżutka, A. (2015). A refinement of an international standard method (ISO/TS 15216–2: 2013) to allow extraction and concentration of human enteric viruses from tissues of edible snail species. *Food Analytical Methods*, 8(3), 799–806.
- Pitt, S. J., Graham, M. A., Dedi, C. G., Taylor-Harris, P. M. & Gunn, A. Antimicrobial properties of mucus from the brown garden snail *Helix aspersa*. *Br. J. Biomed. Sci.* 72, 174–181, quiz 208 (2015).
- Thornfeldt, C. (2005) Cosmeceuticals containing herbs: fact, fiction, and future. *Dermatol. Surg.* 31 (2005) 873-880.
- Trapella, C., Rizzo, R., Gallo, S. et al. (2018) HelixComplex snail mucus exhibits pro-survival, proliferative and pro-migration effects on mammalian fibroblasts. *Sci Rep* 8, 17665. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35816-3>
- Vulić, J. J., Tumbas, V. T., Savatović, S. M., Đilas, S. M., Četković, G. S., & Čanadanović-Brunet, J. M. (2011). Polyphenolic content and antioxidant activity of the four berry fruits pomace extracts. *Acta periodica technologica*, (42), 271-279.

呂佩倫*、連紋乾、黃啟瑞、朱力民、楊繼江、李俊霖 台東縣長濱鄉八桑安部落白玉蝸牛刺激分泌物
活性研究

Wilson, R.A. (1968) An investigation into the mucus produced by *Lymnaea truncatula*, the snail host of *Fasciola hepatica*. *Comp. Biochem. Physiol.* 24, 629.

Wojdyło, A., Figiel, A., & Oszmianski, J. (2009). Effect of drying methods with the application of vacuum microwaves on the bioactive compounds, color, and antioxidant activity of strawberry fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(4), 1337-1343.

World (2021). World - Snails (Except Sea Snails) - Market Analysis, Forecast, Size, Trends and Insights. IndexBox.
<https://www.researchandmarkets.com/reports/4701330/world-snails-except-sea-snails-market>