

東海大學食品科學研究所

Graduate Institute of Food Science

Tunghai University

科技組碩士論文

Master Thesis of Technology Section

指導教授 (Advisor) :

蘇正德教授 (Jeng-De Su, Professor)

高良薑乙酸乙酯萃取物之抗氧化成分及調節血糖作用

Studies on Antioxidative Components and Hypoglycemic

Regulation of Ethyl Acetate Extracts from

*Alpinia officinarum* Rhizome

研究生：郭柏村 (Po-Tsun Kuo) 撰

中華民國一百年十一月

November, 2011

## 謝誌

研究所的求學生涯在此即將畫下休止符，這段期間經歷了不少喜怒哀樂與難忘的回憶，甘苦與共的夥伴一起打拼的日子，所有一切過程歷歷在目。許多貴人協助讓我今日的學業有成，內心滿懷感恩。感謝恩師 蘇正德教授於實驗、論文及生活上辛勤的指導與照顧，與您相處的時光畢生難忘，謹以卷首致上最大的謝意。

文稿初成，承蒙 王進崑教授、蔡正宗教授、江文德教授及盧錫祺博士對學生論文詳加審閱及斧正，使論文更趨完整。特別感謝盧錫祺博士於細胞實驗的指導。感恩謝長奇博士提供流式細胞儀的協助。感謝系上所有師長與助教於專業領域上的知識傳授，在此致上衷心之謝意。

在學期間，感謝學長姐念穎、舒瑜、美燕、曉捷、育玫、敬義、麗娟、志剛、慧文的關懷與實驗技術的傳授與協助。感謝同窗好友網存、永翰、青蓉、豪駿、怡樺、沂璉、展維、韋任、百秀的一路相挺，有你們真好。感謝學弟妹怡慧、欣怡、建宏、昭伶、佳伶、如裕、曜寬、俊麟、鈺萍、鈺欣、昭緯在實驗、論文及口試的幫忙。特別感謝夥伴善存、怡慧學妹在最後關鍵的時刻拉我一把。正因為有了你們才豐富了我在學生涯，多彩多姿的生活與回憶。

最後我要感謝親愛的爸爸、媽媽、哥哥、姐姐對我的支持，不論在經濟及精神上，給予我無後顧之憂以及勇往直前的力量。感謝神明指引我正確的道路。將此論文獻給我最親愛的家人。

郭柏村 謹致於  
東海大學食品科學研究所  
食品分析暨食品化學實驗室  
中華民國一百年十一月

# 目錄

	頁數
目錄.....	I
圖目錄.....	V
表目錄.....	IX
附目錄.....	X
中文摘要.....	XI
英文摘要.....	XIII
第一章、前言.....	1
第二章、文獻回顧.....	2
2-1 高良薑背景介紹.....	2
2-1-1 植物介紹.....	2
2-1-2 高良薑之傳統功效.....	2
2-1-3 高良薑之生理活性.....	3
2-2 糖尿病.....	5
2-2-1 糖尿病主要類型.....	7
2-2-2 胰島素與血糖之維持恆定.....	9
2-2-3 胰島素抗性.....	10
2-2-4 以細胞模式探討胰島素阻抗性之改善.....	10
2-3 高血糖與活性氧族群.....	12
2-3-1 活性氧族群.....	12
2-3-2 高血糖誘導活性氧之生成機制.....	15
2-3-3 抗氧化系統.....	26
2-3-4 抗氧化劑與糖尿病.....	35
2-4 高血糖與醣解酵素.....	37

2-4-1 $\alpha$ -澱粉酶與 $\alpha$ -葡萄糖苷酶.....	37
2-4-2 醣解酵素活性之抑制對於高血糖之改善.....	37
2-5 糖尿病之治療.....	40
第三章、研究動機與實驗架構.....	43
3-1 研究動機.....	43
3-2 實驗架構.....	44
第四章、材料與方法.....	45
4-1 實驗材料.....	45
4-2 實驗試藥與溶劑.....	45
4-2-1 抗氧化試驗之試藥.....	45
4-2-2 酵素試驗之試藥.....	45
4-2-3 細胞培養之試藥.....	46
4-2-4 成分分析試驗之溶劑.....	46
4-3 實驗設備.....	47
4-3-1 化學試驗之儀器設備.....	47
4-3-2 細胞測定之儀器設備.....	47
4-4 實驗方法.....	48
4-4-1 樣品萃取.....	48
4-4-2 總酚含量測定.....	49
4-4-3 總類黃酮含量測定.....	49
4-4-4 硫氰酸鐵法測定.....	50
4-4-5 總抗氧化能力測定.....	51
4-4-6 抗氧化成分之萃取、分離及純化.....	51
4-4-7 $\alpha$ -amylase 抑制能力測定.....	55
4-4-8 $\alpha$ -glucosidase 抑制能力測定.....	56
4-4-9 細胞培養.....	57

4-4-10 XTT assay 細胞毒性測定.....	58
4-4-11 FL83B 細胞之葡萄糖擬似物 2-NBDG 攝入量分析.....	59
4-4-12 細胞內肝醣合成量分析.....	62
4-4-13 蛋白質定量.....	62
4-4-14 統計分析.....	63
第五章、結果.....	64
5-1 高良薑乙酸乙酯萃取物抗氧化成分之分離純化.....	64
5-1-1 高良薑萃取物之產率.....	64
5-1-2 高良薑萃取物之總酚類化合物含量.....	64
5-1-3 高良薑萃取物之總類黃酮含量.....	64
5-1-4 高良薑萃取物之脂質自氧化抑制能力.....	66
5-1-5 高良薑乙酸乙酯萃取物抗氧化成分之分離與純化.....	68
5-1-5-1 乙酸乙酯萃取物之矽膠液相管柱層析.....	68
5-1-5-2 區分物 C 之 XAD-2 液相管柱層析.....	68
5-1-5-3 區分物 C-3 之 HPLC 分析.....	72
5-1-5-4 純化物質之結構鑑定.....	77
5-1-5-5 高良薑乙酸乙酯萃取物之純化物質抗氧化性.....	105
5-2 高良薑乙酸乙酯萃取物區分物及純化物質之調節血糖作用.....	107
5-2-1 高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質對於醣解酵素之抑制效果...107	
5-2-1-1 純化物質對 $\alpha$ -amylase 之抑制作用.....	107
5-2-1-2 純化物質對 $\alpha$ -glucosidase 之抑制作用.....	107
5-2-2 高良薑乙酸乙酯萃取物區分 C-3 對 FL83B 細胞之調節 血糖作用.....	109
5-2-2-1 高良薑乙酸乙酯萃取物區分 C-3 對於 FL83B 細胞之毒性...109	
5-2-2-2 不同濃度區分 C-3 對於正常態 FL83B 細胞之 2-NBDG 攝入量之影響.....	111

5-2-2-3 20ppm 區分 C-3 對於正常及胰島素阻抗性 FL83B 細胞 之 2-NBDG 攝入量之影響.....	111
5-2-2-4 高良薑乙酸乙酯萃取物區分 C-3 對於 FL83B 細胞內 肝糖合成量之影響.....	112
第六章、討論.....	116
6-1 高良薑抗氧化性比較.....	116
6-2 高良薑對醣解酵素抑制作用.....	117
6-3 高良薑對胰島素阻抗之改善.....	119
6-4 綜合討論.....	120
第七章、結論.....	123
第八章、參考文獻.....	124
第九章、附錄.....	138

## 圖目錄

圖次	頁數
圖一、中藥材高良薑之圖片.....	2
圖二、高糖誘發粒線體產生過量超氧陰離子 $O_2^{\cdot-}$ 而活化導致 高血糖傷害之途徑.....	16
圖三、醛糖還原酶與多元醇代謝途徑.....	18
圖四、六醣胺代謝途徑.....	20
圖五、高糖誘發 PKC 活化機制.....	22
圖六、高糖誘發 PKC 活化之效應.....	23
圖七、AGEs 前驅物造成細胞損傷之三種方式.....	25
圖八、細胞內抗氧化酵素之防禦系統.....	28
圖九、不同型態抗壞血酸與自由基之反應.....	29
圖十、類黃酮之基本結構圖.....	32
圖十一、高良薑各種溶劑萃取物之製備.....	48
圖十二、高良薑乙酸乙酯萃取物抗氧化成分之純化流程圖.....	54
圖十三、XTT 試劑之反應式.....	59
圖十四、2-NBDG 結構式.....	59
圖十五、正常組及阻抗組 FL83B 細胞添加高良薑乙酸乙酯萃取物 之區分 C 之加樣方式.....	61
圖十六、高良薑各種溶劑萃取物之總酚含量.....	65
圖十七、高良薑各種溶劑萃取物之總類黃酮含量.....	67
圖十八、高良薑各種溶劑萃取物利用硫氰酸鐵法檢測其抗氧化性....	67
圖十九、高良薑乙酸乙酯萃取物之矽膠液相管柱層析圖.....	69
圖二十、高良薑乙酸乙酯萃取物各沖提區分之硫氰酸鐵法抗氧化 性測定.....	70
圖二十一、高良薑乙酸乙酯萃取物區分 C 之 XAD-2 液相管柱層	

析圖.....	70
圖二十二、高良薑乙酸乙酯萃取物區分 C 各沖提區分之硫氰酸 鐵法抗氧化性測定.....	71
圖二十三、高良薑乙酸乙酯萃取物區分 C-3 之分析型 HPLC 圖.....	73
圖二十四、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 1 之分析型 HPLC 圖.....	74
圖二十五、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 2 之分析型 HPLC 圖.....	74
圖二十六、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 3 之分析型 HPLC 圖.....	75
圖二十七、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 4 之分析型 HPLC 圖.....	75
圖二十八、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 5 之分析型 HPLC 圖.....	76
圖二十九、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 6 之分析型 HPLC 圖.....	76
圖三十、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 1 之紫外光-可見 光譜圖.....	79
圖三十一、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 1 之 $^1\text{H}$ -核磁共振 光譜圖.....	80
圖三十二、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 1 之 $^{13}\text{C}$ -核磁共振 光譜圖.....	81
圖三十三、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 2 之紫外光-可見 光譜圖.....	84
圖三十四、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 2 之 $^1\text{H}$ -核磁共振 光譜圖.....	85
圖三十五、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 2 之 $^{13}\text{C}$ -核磁共振 光譜圖.....	86
圖三十六、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 3 之紫外光-可見 光譜圖.....	89
圖三十七、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 3 之 $^1\text{H}$ -核磁共振 光譜圖.....	90



圖三十八、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 4 之紫外光-可見光譜圖.....	93
圖三十九、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 4 之 $^1\text{H}$ -核磁共振光譜圖.....	94
圖四十、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 4 $^{13}\text{C}$ -核磁共振光譜圖.....	95
圖四十一、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 5 之紫外光-可見光譜圖.....	98
圖四十二、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 5 之 $^1\text{H}$ -核磁共振光譜圖.....	99
圖四十三、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 6 之紫外光-可見光譜圖.....	102
圖四十四、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 6 之 $^1\text{H}$ -核磁共振光譜圖.....	103
圖四十五、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 6 之 $^{13}\text{C}$ -核磁共振光譜圖.....	104
圖四十六、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質之總抗氧化力.....	106
圖四十七、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質之 $\alpha$ -amylase 抑制率... ..	108
圖四十八、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質之 $\alpha$ -glucosidase 抑制率.....	108
圖四十九、不同濃度之高良薑乙酸乙酯萃取物區分 C-3 對於 FL83B 細胞之毒性.....	110
圖五十、高良薑乙酸乙酯萃取物之區分 C-3 對於 FL83B 細胞之 2-NBDG 攝入量影響.....	110
圖五十一、高良薑乙酸乙酯萃取物區分 C-3 對於高糖誘導產生胰	

島素阻抗性 FL83B 細胞之 2-NBDG 攝入量影響.....	114
圖五十二、添加高良薑乙酸乙酯萃取物之區分 C-3 時 FL83B 細胞之肝醣合成量.....	114
圖五十三、添加高良薑乙酸乙酯萃取物之區分 C-3 時高糖誘導 胰島素阻抗 FL83B 細胞之肝醣合成量.....	115

## 表目錄

表次	頁數
表一、糖尿病之診斷標準.....	6
表二、可能具糖尿病風險患者之診斷標準.....	6
表三、AIC與平均血漿葡萄糖值之對比.....	6
表四、妊娠性糖尿病篩檢.....	8
表五、活性氧族群.....	12
表六、自由基及活性氧之主要來源.....	14
表七、類黃酮之抗氧化性.....	33
表八、植物中因抗氧化能力對糖尿病產生正面作用.....	36
表九、類黃酮對大鼠小腸 $\alpha$ -glucosidase 與豬胰臟 $\alpha$ -amylase 之 抑制率.....	39
表十、植物中具有降血糖功能之活性物質.....	41
表十一、高良薑各種溶劑萃取物之產率.....	65

## 附目錄

次序	頁數
附錄一、沒食子酸之標準曲線.....	138
附錄二、槲皮酮之標準曲線.....	138
附錄三、Trolox 之標準曲線.....	139

## 中文摘要

糖尿病與胰島素分泌不足或作用缺失相關，高血糖使體內產生過多活性氧，而造成氧化壓力上升及相關併發症發生。抗氧化物質對於活性氧所引發疾病之調控，亦扮演相當重要角色。中藥材薑科 (*Zingiberaceae*) 植物高良薑 (*Alpinia officinarum*) 之根莖，在先前研究證實具有良好的抗氧化、抗癌、抗炎、鎮痛、止吐等作用，但對於血糖調控之相關研究卻相當少，因此本研究探討高良薑之抗氧化性並評估對血糖調控之能力，期望高良薑對於糖尿病之改善具有潛在價值。

研究第一部分涵蓋自高良薑根莖萃取純化活性成份，進行結構鑑定及抗氧化活性分析，包括總酚類含量、總類黃酮含量、抑制脂質自氧化能力、總抗氧化能力等。從高良薑乙酸乙酯萃取物中分離出六種具有強抗氧化性之純化物質，經由可見光-紫外線吸光、液相層析質譜及核磁共振等光譜分析進行結構鑑定，其化學成分鑑定為 1-hydroxy-7-(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-3-heptanone (1)、3,6-furan-7-(4'-hydroxy-4'-methoxyphenyl) -1-phenylheptane (3) 等兩種 diacryheptanoids，5,7-dihydroxy-flavanone (2)、galangin-3-methylether (4)、galangin (5) 及 kaempferol-4'-methylether (6) 等四種類黃酮。純化物質(1-6)利用 TEAC 法分析總抗氧化力，結果得知其抗氧化性分別為每毫克 8.55(1)、3.33(2)、7.35(3)、3.32(4)、11.46(5)及 9.20(6) mM trolox 當量。第二部分為血糖調控之探討，抑制  $\alpha$ -amylase 及  $\alpha$ -glucosidase 可降低碳水化合物的消化分解速率及葡萄糖吸收，減緩餐後高血糖現象。高良薑乙酸乙酯萃取物之純化物質 1-6 對於醣解酵素皆有不同程度的抑制效果。 $\alpha$ -amylase 抑制效果以純化物質 1 及 4 效果較佳，當樣品濃度 0.1 mg/mL，其抑制率分別為 56.63 及 51.02%。 $\alpha$ -glucosidase 抑制效果以純化物質 4 及 6 較佳，當樣品濃度 0.1 mg/mL，其抑制率分別為 25.99 及 28.09%。肝臟可雙向調控葡萄糖之合成及分解而為維

持血糖恆定之重要臟器，流式細胞分析顯示，高糖誘導之小鼠肝臟 FL83B 細胞，顯著降低攝入葡萄糖類似物 2-NBDG，而添加高良薑乙酸乙酯萃取物之區分 C-3 則顯著提高正常態及胰島素抵抗態細胞之 2-NBDG 攝入量，同時肝醣合成量也有增強。綜上所述，高良薑乙酸乙酯萃取物不僅具有強抗氧化性，對於血糖之調控也具有良好效果。

## Abstract

Diabetes is associated with deficiencies in insulin secretion or action. Excess reactive oxygen species are built up with chronic hyperglycemia, and are subsequently contributing to oxidative stress and complications. Antioxidants have important roles in disorders involving oxidative stress. Rhizome of *Alpinia officinarum*, an herbaceous plant of *Zingiberaceae* family, has long been used in traditional Chinese medicine. Previous studies have demonstrated that *A. officinarum* have antioxidant, anticancer, anti-nociceptive, anti-inflammatory and antiemetic activities. However, possible roles of *A. officinarum* in hypoglycemic regulation have not yet been explored. In the present study, antioxidative components of *A. officinarum* were identified, and their hypoglycemic activities were then investigated.

The first part of this study covered extraction, fractionation, and structural analysis of active compounds from *A. officinarum* rhizome. Corresponding antioxidant activities were then determined, including total phenolic content, total flavonoid content, ferric thiocyanate assay and trolox equivalent antioxidant capacity. Six compounds with strong antioxidant activity were obtained (**1-6**) from ethyl acetate extract of *A. officinarum* rhizome by using silica gel, XAD-2 and HPLC chromatographies and their structure identified by UV-visible spectrometry, liquid chromatography-mass spectra,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR instrumental analyses. The isolated components were identified to be two diacryheptanoids, 1-hydroxy-7-(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-3-heptanone (**1**), and 3,6-furan-7-(4'-hydroxy-4'-methoxyphenyl)-1-phenylheptane (**3**) and four flavonols, 5,7-dihydroxy-flavanone (**2**),

galangin-3-methylether (**4**), galangin (**5**), and kaempferol-4'-methylether (**6**). The antioxidant activity of components **1-6** was 8.55(**1**), 3.33(**2**), 7.35(**3**), 3.32(**4**), 11.46(**5**) and 9.20(**6**) mM trolox equivalent. In the second part of this study, possible hypoglycemic activities of *A. officinarum* rhizome were examined. Inhibiting  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase may delay breaking carbohydrates into glucose, there by suppress postprandial hyperglycemia. Among six components isolated from *A. officinarum* rhizome, compound 1 and 4 gave the highest inhibition rates against  $\alpha$ -amylase, which were 56.63 and 51.02% respectively. Compound **4** and **6** were most efficient in inhibiting  $\alpha$ -glucosidase, with inhibition rates of 25.99 and 28.89%. Liver plays pivotal roles in glucose homeostasis by regulating glucose metabolism and mobilization. As revealed by flow cytometry, treating murine FL83B hepatocytes with high concentration of glucose significantly reduced the uptake of glucose analogue 2-NBDG. C-3 fraction of acetyl acetate extract of *A. officinarum* rhizome restored 2-NBDG uptake of FL83B cells under normal or insulin resistant states. Concurrent increase of glycogen content suggested that glycogen synthesis was also enhanced by the acetyl acetate extract. Our results indicate that the acetyl acetate extract of *A. officinarum* rhizome possesses profound antioxidant and hypoglycemic activities *in vitro*.



# 第一章、前言

隨著都市化、工業化發展，人類生活環境、行為與生活型態和過去比較有明顯改變，再加上生活越來越富裕，國人多趨向於缺乏運動、高油脂及高熱量飲食等不當生活習慣，因此產生了許多生活習慣病(life style diseases)。根據行政院衛生署 2009 年最新統計資料，2008 年糖尿病位居國人十大死因第五位，全球罹患糖尿病人口數大約一億七千萬人，估計到西元 2030 年糖尿病患將增加一倍以上(Wild et al., 2004)。糖尿病、肥胖、高血壓及高血脂合稱致命四重奏(deadly quartet)被認為是心血管疾病的重要危險因子(Isomaa, 2003)。許多證據顯示胰島素阻抗性可能是這些危險因子的共同致病機轉，所以適當控制血糖，降低胰島素阻抗性，是預防這些疾病惡化的重要步驟。糖尿病患者控制病情的首要之務就是控制血糖，使血糖調節到一定濃度，以避免併發症的發生。基本上，血糖調節的三大方法：(1)膳食療法、(2)運動療法、(3)藥物療法。其中以膳食療法最為重要，據估計約 50% 以上的患者可以因良好的膳食攝取方式而改善病情。如果沒有適當的膳食療法配合，藥物也無法充分發揮其作用，因此開發具有調節血糖的藥物和保健食品相當具有市場潛力與重要性。如何針對不同作用機制，例如刺激胰島素分泌、改善胰島素阻抗性、增進末梢組織葡萄糖的利用或抑制醣類在腸道內的吸收等，使用適當細胞株實驗或動物模式，以篩選、評估產品之調節血糖功效，將是非常重要的環。

## 第二章 文獻回顧

### 2-1 高良薑背景介紹

#### 2-1-1 植物介紹



圖一、中藥材高良薑之圖片。

高良薑(*Alpinia officinarum* Hance)為薑科(*Zingiberaceae*)多年生草本植物之根莖。又名良薑、南薑、藍薑、中國生薑，主產於廣東、廣西、台灣等地。栽培於氣候溫暖、土壤濕潤之氣候，疏鬆而肥沃的紅土壤為宜，3~9月均可栽培，以3、4月為佳。夏末秋初採挖生長4~6年的根莖，根莖呈圓柱狀，彎曲，多分歧，長4~6公分，直徑1~1.5，表面紅棕色，有縱皺紋與灰棕色波狀環節，每節長0.5~1公分，下側面有圓形的細根殘痕。質堅硬，不易折斷，斷面紅黃色或棕紅色，較粗糙，帶纖維性，氣芳香，味辛辣，除去地上莖、鬚根及殘留鱗片，經洗淨、切段、曬乾後生用。

#### 2-1-2 高良薑之傳統功效

高良薑在傳統藥理作用上具有促進消化液分泌幫助消化、保護胃黏膜、具有抗潰瘍、保肝、利膽、抗炎、解熱、抗菌、鎮痛、鎮吐、壯陽及催情作用。應用於治療消化不良症、腸胃不適、胃痛、鼻子過敏、過敏性鼻炎、改善過敏性體質、感冒咳嗽、久咳不癒、手腳冰冷等效果。其醇萃物能興奮血管運動中樞、呼吸中樞。咀嚼生薑可升高

血壓。生高良薑水亦可防止血吸蟲孵化及殺滅血吸蟲作用。

### 2-5-3 高良薑之生理活性

#### (1) 抗氧化作用

Ly 等人(2003)從高良薑甲醇萃取物中分離出具有強抗氧化性的 7 種 phenylpropanoids 類物質，其抑制脂質自氧化能力強於  $\alpha$ -生育醇。另有研究發現高良薑甲醇萃取物，對於  $H_2O_2$  所造成的細胞氧化傷害具有保護效果(Lee *et al.*, 2003)。Zhang 等人(2010)經由還原力測定、DPPH 自由基清除能力及硫氰酸鐵法分析高良薑甲醇萃取物及揮發油的抗氧化性，亦發現其具有良好之抗氧化性。Wang 等人(2011)，利用還原能力測定、清除超氧陰離子自由基能力、清除  $\cdot OH$  自由基能力及清除 DPPH 自由基能力，分析兩種品種高良薑(*Alpinia officinarum*)與大高良薑(*Alpinia galangal*)之類黃酮萃取物抗氧化性，結果顯示，兩品種的類黃酮萃取物都具有很好的抗氧化性，但兩者的抗氧化能力亦存在些許的差異，以大高良薑之抗氧化力略大於高良薑。

#### (2) 抑制黑色素生成作用

研究發現高良薑經 80% 丙酮萃取物與分離出 4 種 diarylheptanoids 的物質與兩種 flavonols，對於受茶鹼刺激而 theophylline-stimulated 誘導之小鼠黑色素瘤細胞具有抑制黑色素生成作用，其抑制黑色素生成之  $IC_{50}$  值介於  $10\sim 48\mu M$ 。其分離出的成分中 7-(4"-hydroxy-3"-methoxyphenyl)-1-phenylhept-4-en-3-one、kaempferide、galangin 具有顯著抑制酪胺酸酶之 mRNA 表現量(Matsuda *et al.*, 2009)。

### (3) 抑菌作用

高良薑煎煮液對炭疽桿菌、 $\alpha$ -或 $\beta$ -溶血性鏈球菌、白喉及類白喉桿菌、肺炎球菌、金黃色葡萄球菌、枯草桿菌、結核桿菌等皆有不同程度的抗菌作用(中藥大辭典，2003)。

### (4) 抗炎、鎮痛作用

80%乙醇萃取物對於藥物誘發大鼠之急性炎症之影響，結果顯示，對於卡拉膠誘發之關節炎造成的水腫之現象具有減緩之效果，且對RAW 264.7 細胞具有抑制一氧化氮生成效果；此外，也顯示出抑制慢性抗風濕、抗鎮痛活性、抗精神病之效果(Lee *et al.*, 2009)。另外也有研究指出高良薑 80%丙酮萃取物對於脂多醣誘導的巨噬細胞可以抑制一氧化氮的生成，進而降低發炎之作用(Matsuda *et al.*, 2006)。

### (5) 抗癌作用

高良薑甲醇與二氯甲烷萃取物對於肺癌細胞具有抑制生長的效果，其 IC<sub>50</sub> 分別為 13.3 與 5.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Lee and Houghton, 2005)。高良薑乙醇萃取物中分離出 4 種 diarylheptanoids 物質對於人類肝癌細胞株(HepG2)、乳腺癌細胞株(MCF-7)、中樞神經癌細胞株(SF-268)具有抑癌效果，其 IC<sub>50</sub> 介於 6-60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (An *et al.*, 2008)。

### (6) 抗凝血作用

高良薑乙醚萃取物純化出的三種 diarylheptanoids 物質，是一種有效的血小板活化因子拮抗劑，能抑制血小板凝集，具有一定的抗凝血作用(Fan *et al.*, 2007)。

## 2-1 糖尿病

糖尿病為全球流行性的慢性疾病之一，且罹患糖尿病人口數有不斷上升的趨勢，根據統計，在 2000 年全世界約有一億七千萬人罹患糖尿病，未來預估在 2030 年前會增加一倍至三億六千六百萬(Wild, 2004)。糖尿病為屬於一種新陳代謝異常之疾病，好發於中老年人，但偶爾也會發生於兒童、青少年或孕婦，主要原因為體內胰島素缺乏或胰島素分泌功能有缺陷，對糖的利用能力減低，而造成高血糖現象，超過所訂定的血糖標準便判定為糖尿病。罹患糖尿病的人，由於身體不能充分利用葡萄糖，所以血中葡萄糖濃度偏高，並有尿中含糖現象。多喝、多尿、多吃(三多)、疲倦等為主要症狀；有時候會有手腳麻痺、視覺模糊、皮膚傷口不易癒合、女性會陰部發癢等症狀。糖尿病最可怕的地方在於它有許多併發症，急性併發症譬如酮酸血症、高血糖高滲透壓昏迷等；慢性併發症譬如視網膜病變、神經病變、動脈硬化症等，以上症狀已證實與糖化作用有相當大的關聯性，且如及時無適當處置，可能導致器官完全失能等後遺症甚或死亡(Singh, 2001；林，2003)。

根據 2011 年美國糖尿病學會(American Diabetes Association, ADA)所公布，可藉由測量糖化血色素(glycated hemoglobin, A1C)換算血漿葡萄糖濃度(表三)、空腹血糖值(fasting plasma glucose, FPG)、葡萄糖耐受性試驗(Oral Glucose Tolerance Test, OGTT)及隨機血糖值等四種不同方式來評估是否已罹患糖尿病(表一)。

表一、糖尿病之診斷標準

Table 1 Criteria for the diagnosis of diabetes

A1C $\geq$ 6.5%: The test should be performed in a laboratory using a method that is NGSP certified and standardized to the DCCT assay.*	Or
FPG $\geq$ 126 mg/dl (7.0 mmol/l): Fasting is defined as no caloric intake for at least 8 h.*	Or
2-h plasma glucose $\geq$ 200 mg/dl (11.1 mmol/l) during an OGTT: The test should be performed as described by the World Health Organization, using a glucose load containing the equivalent of 75 g anhydrous glucose dissolved in water.*	Or
In a patient with classic symptoms of hyperglycemia or hyperglycemic crisis, a random plasma glucose $\geq$ 200 mg/dl (11.1 mmol/l).	

\*In the absence of unequivocal hyperglycemia, result should be confirmed by repeat testing. (ADA, 2011)

表二、可能具糖尿病風險患者之診斷標準

Table 2 Categories of increased risk for diabetes (prediabetes)\*

FPG 100–125 mg/dl (5.6–6.9 mmol/l): IFG	Or
2-h plasma glucose in the 75-g OGTT 140–199 mg/dl (7.8–11.0 mmol/l): IGT	Or
A1C 5.7–6.4%	

IFG: impaired fasting glucose ; IGT: impaired glucose tolerance

\*For all three tests, risk is continuous, extending below the lower limit of the range and becoming disproportionately greater at higher ends of the range. (ADA, 2011)

表三、A1C與平均血漿葡萄糖值之對比

Table 3 Correlation of A1C with average glucose

A1C (%)	Mean plasma glucose	
	mg/dl	mmol/l
6	126	7.0
7	154	8.6
8	183	10.2
9	212	11.8
10	240	13.4
11	269	14.9
12	298	16.5

These estimates are based on ADAG data of ~2,700 glucose measurements over 3 months per A1C measurement in 507 adults with type 1, type 2, and no diabetes. The correlation between A1C and average glucose was 0.92 . A calculator for converting A1C results into estimated average glucose (eAG), in either mg/dl or mmol/l, is available at [http:// professional.diabetes.org/eAG](http://professional.diabetes.org/eAG). (ADA, 2011)

## 2-2-1 糖尿病主要類型

### (1) 第一型糖尿病

第一型糖尿病主要是因為胰臟內的 $\beta$ 細胞受到自身免疫抗體的破壞，導致無法分泌胰島素(Zimmet *et al.*, 2001)，並間接造成體內醣類、脂肪與蛋白質代謝的紊亂。當血液循環中缺乏胰島素，糖分就無法進入細胞，造成血糖濃度升高。此種類型疾病多發生在兒童期或青少年期，患者需長期依賴胰島素的注射以維持血糖的平衡，所以又稱胰島素依賴型(insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM)或幼年型(early-onset diabetes)糖尿病，其約佔糖尿病患人口數5~10%。目前並無有效方法可以預防或治癒第一型糖尿病。不過抑制醣類消化吸收的物質對患者飯後血糖升高有減緩的功能。

### (2) 第二型糖尿病

第二型糖尿病在所有類型中最常見，約佔所有糖尿病患者九成以上，又稱非胰島素依賴型(non-insulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM)或成人型(adult-onset diabetes)糖尿病。前期患者不需每天依賴注射胰島素，可藉由飲食改善、規律運動或口服藥物來控制體內血糖濃度，後期則需補充胰島素。第二型糖尿病還有一項很重要的特徵為胰島素阻抗性(insulin resistance)，患者初期時胰島素分泌量相對的不足，無法有效調節肝臟、肌肉及脂肪細胞等代謝，胰臟補償性的增加胰島素的分泌量，進而產生高胰島素症狀(hyperinsulinaemia)。由於胰臟長期過量產生胰島素，最終因負荷不了而損傷 $\beta$ 細胞，導致胰島素分泌功能有缺陷，造成低胰島素症狀(hypoinsulinaemia)，演變成需要補充胰島素，最終發生功能失調而形成的二型糖尿病(Prentki and Nolan, 2006)。第二型糖尿病不是自體免疫系統的疾病，其形成原因複雜，主要由於現代人生活習慣改變，攝取過多的營養及運動量不足，

所以罹患第二型糖尿病患者通常伴隨著肥胖現象，然而肥胖人口的年齡層不斷下降，兒童及青少年中發生第二型糖尿病之情形有普遍增加的趨勢(Poitout and Roberson, 2002)。另有研究顯示，第二型糖尿病患者，隨著 BMI (body mass index)值的上升，胰島素阻抗性、 $\beta$ 細胞胰島素分泌功能及肝臟內生性葡萄糖的產生比例上升(Duman *et al.*, 2003)。

### (3) 妊娠性糖尿病

指婦女懷孕前沒有糖尿病，懷孕時期卻出現高血糖症狀，約發生於4%的孕婦，而大部分於生產後消失。其形成原因為懷孕時過多荷爾蒙分泌，使身體產生胰島素的阻抗性與高血糖現象。妊娠性糖尿病婦女，高達60%在15年內會得到糖尿病(林，2003)。醫師建議在懷孕24~28週及產後6~12週之間，可接受妊娠糖尿病篩檢(表四)。

表四、妊娠性糖尿病篩檢

Table 4 Screening for and diagnosis of gestational diabetes mellitus

---

Perform a 75-g OGTT, with plasma glucose measurement fasting and at 1 and 2 h, at 24–28 weeks of gestation in women not previously diagnosed with overt diabetes. The OGTT should be performed in the morning after an overnight fast of at least 8 h. The diagnosis of GDM is made when any of the following plasma glucose values are exceeded:

- FPG  $\geq$  92 mg/dl (5.1 mmol/l)
  - 1 h  $\geq$  180 mg/dl (10.0 mmol/l)
  - 2 h  $\geq$  153 mg/dl (8.5 mmol/l)
- 

GDM: Gestational diabetes mellitus (ADA, 2011)

### (4) 準糖尿病期

準糖尿病期患者是指體內血液葡萄糖濃度高於正常值，但尚未達到糖尿病的標準，而患者長期處在高血糖狀態，亦會增加罹患心血管、中風等疾病之風險。對於準糖尿病期患者，ADA也有一定的規範(表



二)，如不加以控制通常在 10 年內會發展成第二型糖尿病(Kaufman, 2002)。此類型患者可透過飲食控制及適當的運動等方式控制血糖，以延緩或預防第二型糖尿病的發生。

### 2-2-2 胰島素與血糖之維持恆定

碳水化合物經消化吸收後，最後以葡萄糖型式進入血液循環中，胰臟β細胞所分泌的胰島素隨著血液循環到體內各組織器官，並刺激各組織對血液中葡萄糖之吸收，葡萄糖於細胞內進行醱解作用(glycolysis)後，進入 TCA 循環產生能量，成為各組織能量來源。當能量足夠時，多餘的葡萄糖轉變成肝醣(glycogen)或三酸甘油酯(triglyacylglycerol)等型式儲存能量。當血糖濃度不足時，肝臟進行肝醣分解(glycogenolysis)及糖質新生作用(gluconeogenesis)，產生葡萄糖；脂肪組織也會經由脂解作用(lipolysis)產生游離脂肪酸(free fatty acid)，成為能量的主要來源，並維持血糖之正常濃度(Crawford and Contran, 1999；Bessesen, 2001)。

胰島素為體內調節代謝的荷爾蒙之一，主要作用是促進醱類、脂肪及蛋白質之合成與儲存，並抑制其分解與釋放至血液循環中。胰島素的分泌主要是因為血糖濃度升高，刺激胰臟β細胞膜上的葡萄糖轉運蛋白(glucose transporter；Glut 2)，將胞外葡萄糖運送至胞內，經由代謝後產生 ATP。當細胞內 ATP/ADP 比值上升，使鉀離子通道關閉，而細胞內鉀離子濃度上升使細胞膜去極化，誘發對膜電位敏感的鈣離子通道打開，使胞外鈣離子流入，進而促進細胞進行顆粒性外吐作用(granule exocytosis)，導致胰島素釋放至血液，作用於各組織細胞上，促使葡萄糖轉運蛋白由細胞內小體微泡(intracell intracellular endosome vesicle)移往細胞膜上，將葡萄糖帶入細胞內，而降低血糖濃度(Darnell

*et al.*, 1990)。胰島素作用的三個重要臟器為肝臟、肌肉及脂肪，其中肝臟是維持血糖平衡的最重要組織，藉由葡萄糖帶入或釋出的調節來維持血糖的平衡(Nordlie *et al.*, 1999；Zierath, 2003)。

### 2-2-3 胰島素阻抗性與發炎反應

胰島素阻抗性是指血液循環中之胰島素調節體內能量代謝的能力下降，也就是細胞對胰島素的反應不佳，導致胰島素與受器結合後無法使葡萄糖轉運蛋白移動到細胞膜，讓葡萄糖進入細胞提供營養(Zick, 2001)。雖然造成胰島素阻抗性的分子機制尚未完全明瞭，但是有部分證據指出其與低程度的發炎反應有關，而此種發炎狀態與糖尿病及心血管疾病亦有所關聯(Hsueh *et al.*, 2003；Hotamisligil, 2006；Shoelson *et al.*, 2006)。長期營養過剩會使巨噬細胞滲透到脂肪組織中，導致局部發炎反應而形成胰島素阻抗性(Weisberg *et al.*, 2003；Xu *et al.*, 2003)。胰島素阻抗性所造成的影響有肝臟葡萄糖製造的增加、末梢組織對葡萄糖攝入能力減低、異常的脂肪分解等，造成大量葡萄糖產生並釋出至血液中，隨著胰島素阻抗性加劇以及胰臟分泌胰島素之能力逐漸喪失，導致高血糖病症發作，所以胰島素阻抗性被認為是糖尿病發生的重要病因之一(Lillioja *et al.*, 1993；Reaven *et al.*, 1993；Bessesen, 2001)。除了糖尿病之外，胰島素阻抗性也被認為是高血壓、高血脂及心血管疾病等，慢性代謝疾病之危險因子(Kahn and Flier, 2000)。

### 2-1-4 以細胞模式探討胰島素阻抗性之改善

體內血糖之維持恆定，依靠胰臟 $\beta$ 細胞分泌胰島素，並刺激與胰島素作用的三個重要的下游臟器肝臟、肌肉及脂肪細胞，促進血糖攝入胞內並加以利用；因此常以肝臟細胞(FL83B)、骨骼肌肉細胞

(C2C12)、脂肪細胞(3T3-L1)為研究平台，利用體外方式誘導細胞產生胰島素阻抗性，進而探討有效成分對胰島素阻抗細胞之影響(Cheng *et al.*, 2008；吳，2011)。肝臟可調控葡萄糖之合成及分解雙向路徑，而為維持血糖恆定之重要臟器，故從中選取不需分化之小鼠肝臟 FL83B 細胞作為高良薑乙酸乙酯萃取物區分 C-3 對改善胰島素阻抗性之探討，觀察其是否可增加肝細胞對葡萄糖之吸收，降低血液中葡萄糖含量，達到預防第二型糖尿病之成效。

目前應用於偵測胰島素刺激對葡萄糖攝入細胞內之情形，所使用之方式有放射線同位素標記(e.g., [<sup>3</sup>H]-, [<sup>14</sup>C]-, or [<sup>18</sup>F]-2-deoxy-D-glucose)或螢光標記(e.g., 2-NBDG)等方式 (Huang *et al.*, 2009；Zou *et al.*, 2005)。Huang (2009)等人研究，以腫瘤壞死因子 TNF- $\alpha$  導小鼠肝臟 FL83B 細胞產生胰島素阻抗性，顯著降低放射線標記之葡萄糖攝入，再以酚酸、咖啡酸、肉桂酸分別添加，探討胰島素阻抗細胞對於放射線標記之葡萄糖攝取影響。然而放射線處理之安全性始終有所疑慮，所以本實驗選用流式細胞儀偵測螢光標記之葡萄糖替代品 2-NBDG，來觀測其攝入小鼠肝臟 FL83B 細胞之情況，進一步分析是否有提高胰島素敏感性或降低胰島素阻抗性，促進肝細胞對葡萄糖的代謝利用，增加葡萄糖帶入肝細胞而合成肝醣之能力。

## 2-3 高血糖與活性氧族群

### 2-3-1 活性氧族群

所謂的活性氧族群(reactive oxygen species ; ROS)即是指含氧的高反應分子(Niki, 1992)，它的種類繁多而大致可分為自由基類與非自由基類，如表五所示。活性氧族群具有開啟氧化之能力，進而產生更多自由基，對生物體造成嚴重的氧化傷害(Sheldon, 2003)，其中以 $\cdot\text{OH}$ 毒性最強，可以輕易通過細胞膜而到達細胞核與DNA反應，造成DNA突變。另有研究指出ROS間接誘發脂質氧化反應產生之中間代謝產物，會造成蛋白質損傷、細胞老化、突變癌化甚至死亡(Shigenage *et al.*, 1989 ; Rikans *et al.*, 1997 ; Moskovitz *et al.*, 2002)。

表五、活性氧族群

Table 5 Reactive oxygen specie

Radicals		nonradicals	
Hydroxyl	$\cdot\text{OH}$	Peroxynitrite	$\text{ONOO}^-$
Alkoxy	$\text{L(R)O}\cdot$	Hypoxchlorite	$^-\text{OCl}$
Hydroperoxyl	$\text{HOO}\cdot$	Hydroperoxide	$\text{L(R)OOH}$
Peroxyl	$\text{L(R)OO}\cdot$	Singlet oxygen	$^1\Delta\text{O}_2$
Nitric oxide	$\cdot\text{NO}$	Hydrogen peroxide	$\text{H}_2\text{O}_2$
Superoxide	$\text{O}_2^-\cdot$		

(Abuja and Albertini, 2001)

活性氧族群的來源大致可分為外在及內在兩方面。外在來源包括環境污染物、香菸、離子輻射及化學藥劑等所誘發體內產生之ROS，細胞行呼吸作用所產生的ROS為主要內在來源(Morrissey and O'Brien, 1998)如表六所示。人體內之自由基的產生大約可分為四類，第一類來自生合成(biosynthesis)，此類自由基在人體內會因生理需求

而由胺基酸合成，為人體不可或缺，例如：一氧化氮自由基( $\cdot\text{NO}$ )，乃由 L-arginine 在一氧化氮合成酶(NO synthase)的作用下所產生，其不但是人類神經系統傳遞訊息的分子，更對人體免疫系統有所貢獻。第二類來自新陳代謝(metabolism)，這些自由基的產量多寡會因人而異，通成需依賴酵素催化才代謝的機轉中形成，其中最主要的為超氧自由基、羥自由基等(Halliwell, 1994)。第三類由外來物質所引起，包括空氣或水污染，某些藥物、農藥或防腐劑，或食入燒焦肉類中的多環碳氫化合物(如 benzo  $[\alpha]$  pyrene 或 benzanthracene 等)等，進而對人體產生危害。第四類由不良生活習慣引起，包括長時間情緒緊張，或抽菸使身體依質暴露在充滿外生性及內生性自由基環境中，因而造成傷害(Maxwell, 1992)。

表六、自由基及活性氧之主要來源

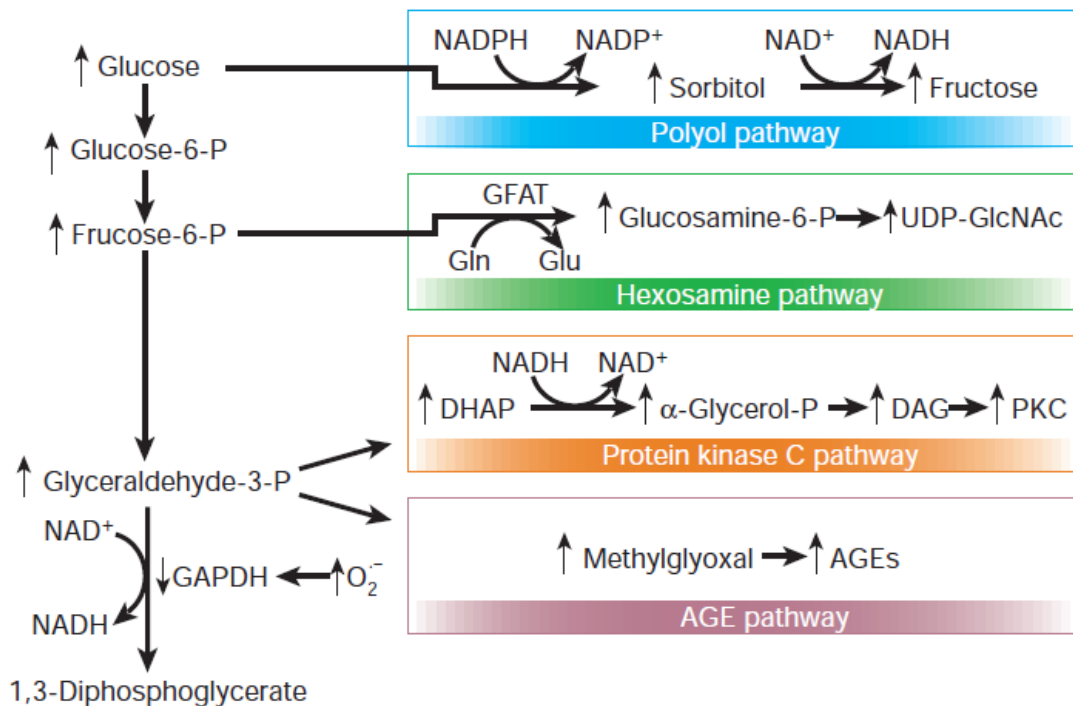
Table 6 The major sources of free radicals and reactive oxygens

Intrinsic Source	Extrinsic Source
Electron transport chain of mitochondria	Red-ox substrate
Electron transport chain of microsome	Paraquat
Oxidase	Medication oxidation
Xanthine oxidase	Smoking
Indoleamine dioxygenase	Ion irradiation
Tryptophane dioxygenase	Sun light
Galactose oxidase	Food processing
Lipoxygenase	
Monoamine oxidase	
Phagoytic cells	
Neutrophiles	
Monocytes	
Eosinophiles	
Endothelial cell	
Auto oxidation-reduction	
Fe <sup>2+</sup>	

(Morrissey and O'Brien, 1998)

### 2-3-2 高血糖誘導活性氧之生成機制

糖尿病患中發現體內各種組織之 ROS 有明顯增加的現象，體內若長期維持高血糖，葡萄糖會自我氧化產生過多的 ROS，並消耗體內的抗氧化因子，且會使體內蛋白質產生醣化作用，造成細胞損傷，蛋白質醣化過程亦會產生大量 ROS，再度加強蛋白質醣化作用。而在惡性循環之下，導致體內抗氧化系統失衡與不可逆轉之糖尿病所誘發的各種併發症有很大的相關性(Dandona *et al.*, 1996；Baynes *et al.*, 1999；Nishikawa *et al.*, 2000；Brownlee, 2001)。人體內在持續高血糖的情況下，粒線體中超氧陰離子  $O_2^{\cdot-}$  的增加可能是導致糖尿病各種併發症發生的源頭(Korshunov *et al.*, 1997；吳, 2004；Jezek *et al.*, 2005)，圖二表示高糖誘發粒線體產生過量  $O_2^{\cdot-}$ ，而活化導致高血糖傷害之途徑(Brownlee, 2001)。高糖環境下，葡萄糖會透過主要四條途徑，包括：多元醇途徑、己醣胺代謝途徑、PKC 活化效應及後期醣化終產物，而伴隨著 ROS 之生成，造成組織損傷。以下針對四種路徑加以說明。



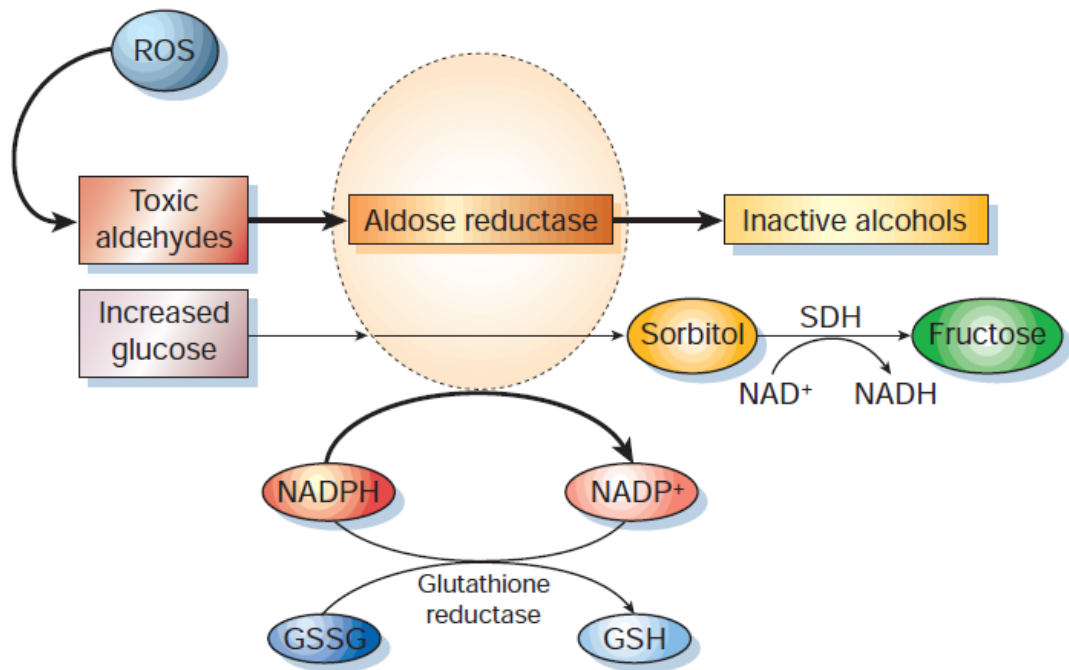
圖二、高糖誘發粒線體產生過量超氧陰離子  $O_2^{\cdot -}$  而活化導致高血糖傷害之途徑。

Fig. 2 Potential mechanism by which hyperglycaemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates four pathways of hyperglycaemic damage. Excess superoxide partially inhibits the glycolytic enzyme GAPDH, thereby diverting upstream metabolites from glycolysis into pathways of glucose overutilization. This results in increased flux of dihydroxyacetone phosphate (DHAP) to DAG, an activator of PKC, and of triose phosphates to methylglyoxal, the main intracellular AGE precursor. Increased flux of fructose-6-phosphate to UDP-N-acetylglucosamine increases modification of proteins by O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) and increased glucose flux through the polyol pathway consumes NADPH and depletes GSH. (Brownlee, 2001)



### (一)高血糖與多元醇代謝途徑

細胞內的葡萄糖經由醛糖還原酶(aldose reductase)催化下，藉由 NADPH 來還原生成山梨糖醇(sorbitol)，山梨糖醇去氫酶(sorbitol dehydrogenase; SDH)還原  $\text{NAD}^+$ ，並將山梨糖醇氧化形成果糖(fructose)的路徑稱為多元醇路徑。圖三所示為醛糖還原酶與多元醇代謝途徑，醛糖還原酶對葡萄糖之親合性較低，在正常血糖濃度下僅有少量葡萄糖走向多元醇途徑；反之在高血糖情況下，有活化多元醇途徑使得山梨糖醇堆積，造成細胞內滲透壓改變、增加  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  比值及 NADPH 含量減少，影響細胞膜正常代謝而改變膜原本的功能，導致腎臟、周邊神經、視網膜及水晶體等組織傷害(Brownlee, 2001；Nishikawa *et al*, 2000；Yamagishi and Imaizumi, 2005)。山梨糖醇的氧化作用會提升細胞內  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  比值，而抑制醣解代謝酵素 GAPDH 之活性，使 triose phosphate 累積，進而產生 methylglyoxal (MG) 及 diacylglycerol (DAG, PKC 活化物質)。此途徑也會被高糖誘導之 ROS 生成及 DNA 斷裂所活化，而活化的雙羰基化合物(dicarbonyls)，會促進醣化作用(glycation)及後期醣化終產物(advanced glycation end products, AGEs)之形成，且梅納反應中醣類與蛋白質也造成 ROS 之生成(Well-Knecht *et al.*, 1995)。麩胱甘肽還原酶(glutathione reductase)之輔因子 NADPH 若消耗過多，會降低 GSH 之生成，且在糖尿病模式老鼠中也發現眼睛水晶體之多元醇途徑造成氧化壓力升高及減少 GSH 之含量，而利用醛糖還原酶抑制劑(aldose reductase inhibitor)可有效預防 NADPH 之消耗。多元醇的最終產物果糖不易代謝，而且比葡萄糖更容易與蛋白質進行醣化作用，形成後期醣化終產物對身體產生傷害(Brownlee, 2001)。因此，高糖會同時伴隨著醣化作用及氧化壓力，引起更多的併發症。

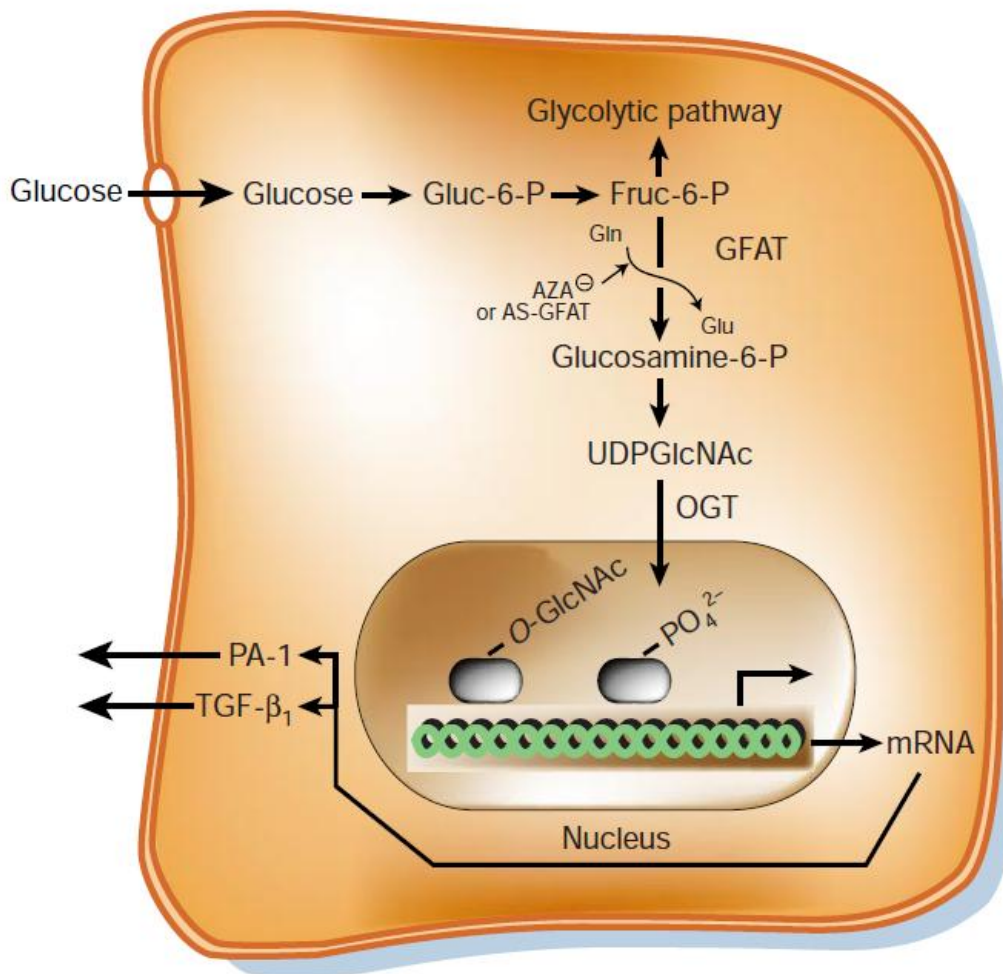


圖三、醛糖還原酶與多元醇代謝途徑。

Fig. 3 Aldose reductase and the polyol pathway. Aldose reductase reduces aldehydes generated by reactive oxygen species (ROS) to inactive alcohols, and glucose to sorbitol, using NADPH as a co-factor. In cells where aldose reductase activity is sufficient to deplete reduced glutathione (GSH), oxidative stress is augmented. Sorbitol dehydrogenase (SDH) oxidizes sorbitol to fructose using  $\text{NAD}^+$  as a co-factor. (Brownlee, 2001)

## (二)高血糖與己醣胺/六碳醣胺代謝途徑

正常的生理狀態下，只有少量 1-3% 葡萄糖會經由己醣胺途徑進行代謝，然而當細胞內葡萄糖含量升高會使得 fructose-6-phosphate 經由酵素 glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT) 催化生成 glucosamine-6-phosphate 再經由 *O*-GlcNAc transferase 轉換成 UDP-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc)。此產物的累積會幫助 proteoglycan 合成及形成 *O*-linked glycoprotein，而 *O*-GlcNAc 會修飾轉錄因子而導致基因轉錄之改變(圖四)。在血管平滑肌細胞中高血糖可透過調節轉錄因子 Sp1 的結合位置而促進胰島素阻抗性相關轉錄因子 PAI (plasminogen activator inhibitor-1)、TGF- $\alpha$  (transforming growth factor- $\alpha$ )、TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) 之活性的增加。研究發現肝臟、脂肪及肌肉組織中過度表現之 GFAT 會造成胰島素阻抗性(Marshall *et al.*, 1991 ; Brownlee *et al.*, 2001)。在老鼠及人類中注射 glucosamine 後，發現會干擾胰島素及  $\beta$  細胞對葡萄糖的敏感性(Monauni *et al.*, 2000)。另外，glucosamine 會誘導  $H_2O_2$  之增加，然而加入抗氧化劑 N-acetylcysteine 可降低 GFAT 之表現。因此，高血糖所誘發之己醣胺途徑會改變許多基因之表現及蛋白質功能異常，使細胞對胰島素產生阻抗性，進而促使糖尿病慢性併發症發生(Brownlee *et al.*, 2001 , Buse, 2006)。

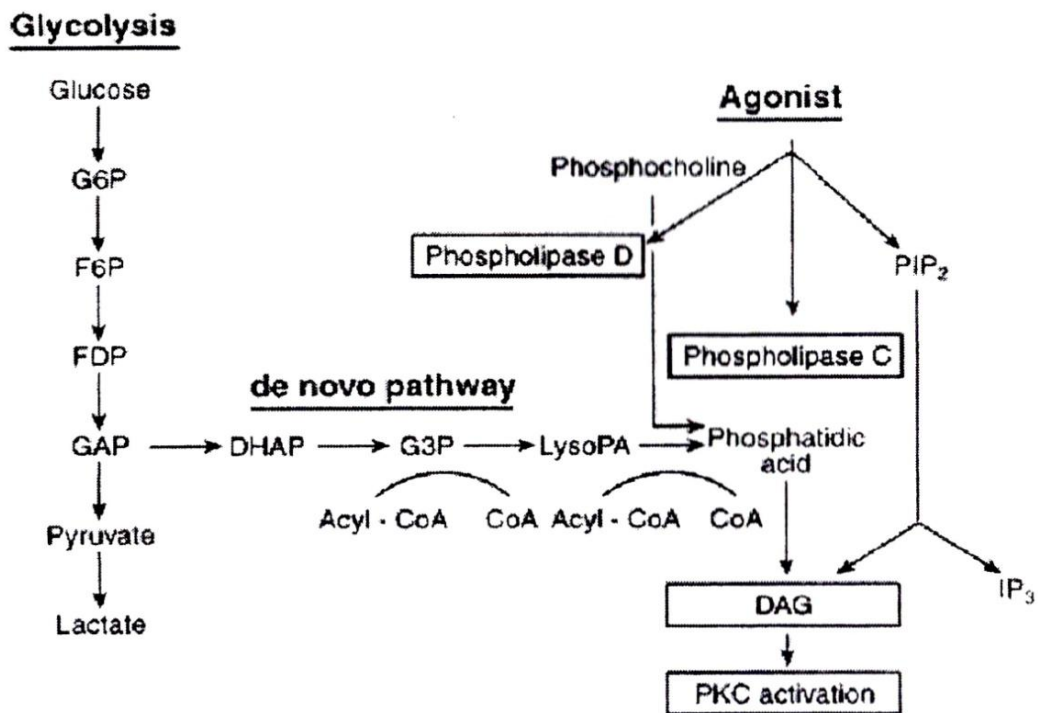


圖四、己糖胺代謝途徑。

Fig. 4 The hexosamine pathway. The glycolytic intermediate fructose-6-phosphate (Fruc-6-P) is converted to glucosamine-6-phosphate by the enzyme glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT). Intracellular glycosylation by the addition of N-acetylglucosamine (GlcNAc) to serine and threonine is catalysed by the enzyme O-GlcNAc transferase (OGT). Increased donation of GlcNAc moieties to serine and threonine residues of transcription factors such as Sp1, often at phosphorylation sites, increases the production of factors as PAI-1 and TGF-b1. AZA, azaserine; AS-GFAT, antisense to GFAT. (Brownlee, 2001)

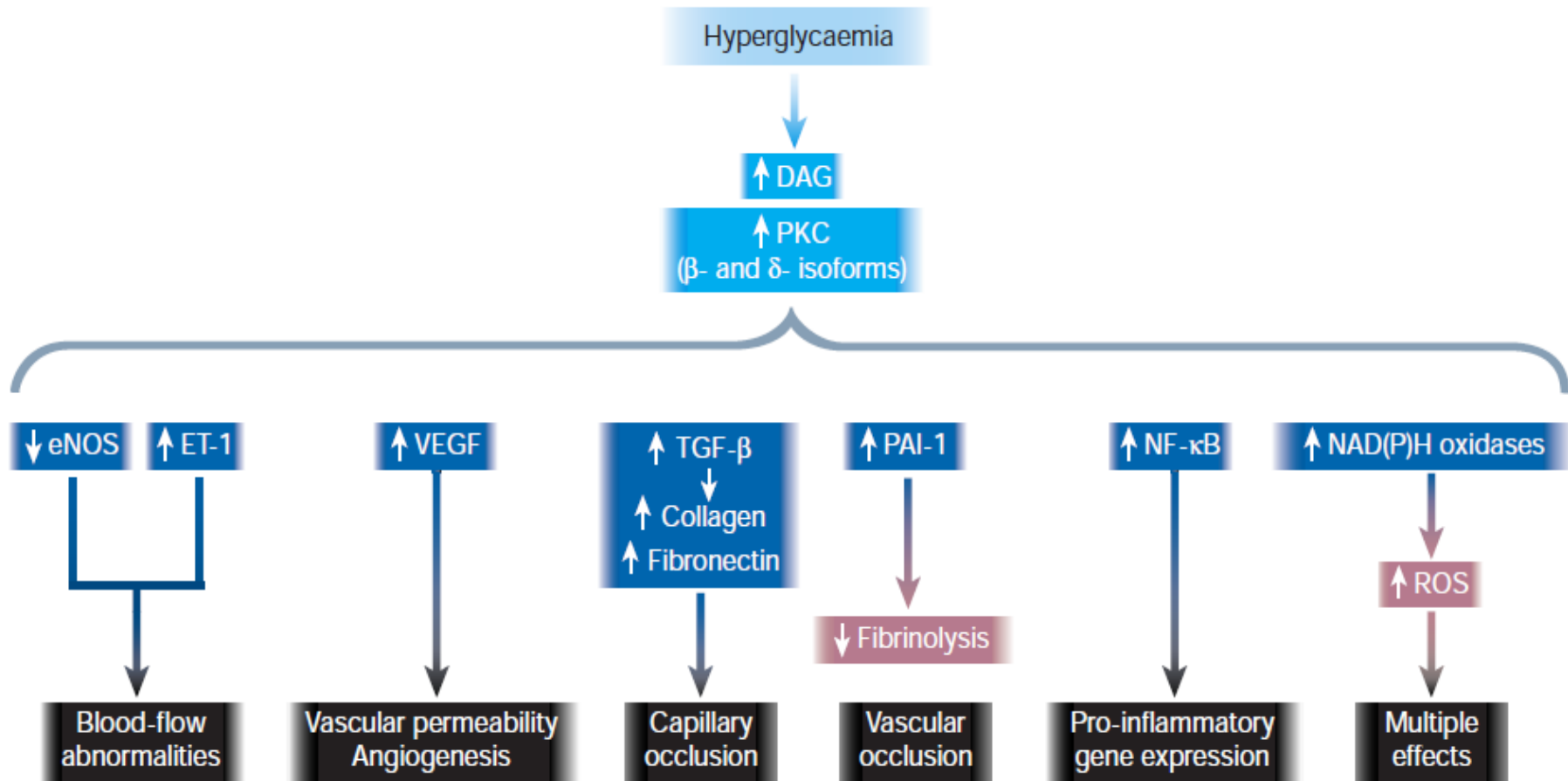
### (三)高血糖與 protein kinase C (PKC)之活化

PKC 參與許多細胞的訊息傳遞過程，已知 PKC 的活化會影響細胞增生及分化、腫瘤成長、基因表現及造成血管受損等。PKC 至目前為止至少有有十一種異構物，其中有九種可藉由第二傳訊者 DAG 來活化。DAG 的主要來源為糖解代謝產物中間產物 DHAP (dihydroxyacetone phosphate)，經由 DAG 合成途徑及 phosphocholine (PC)水解而來(圖五)。AGEs 與細胞表面接受體(AGEs receptor, RAGE)的鍵結及多元醇途徑的活化，都可激活 PKC 之表現(Brownlee, 2001)。糖尿病動物及人體實驗發現，DAG 之增加造成糖尿病併發症相關組織，包括肝臟、肌肉、視網膜、心臟、腎小球等胰島素敏感性降低。研究指出高糖誘導血管或內皮細胞，會經由活化 NADPH oxidase 生成 ROS，當以 PKC 抑制劑處理後，發現 ROS 會降低，因此當 PKC 受到抑制時，會降低由高糖所引起之氧化壓力(Inoguchi *et al.*, 2000)。PKC 之活化也會提升 NAD(P)H 氧化酵素、NF- $\kappa$ B 等因子之表現，引發不同生理效應(圖六)。



圖五、高糖誘發 PKC 活化機制。(Koya and King, 1998)

Fig. 5 Mechanisms of hyperglycemia-induced protein kinase C (PKC) activation.



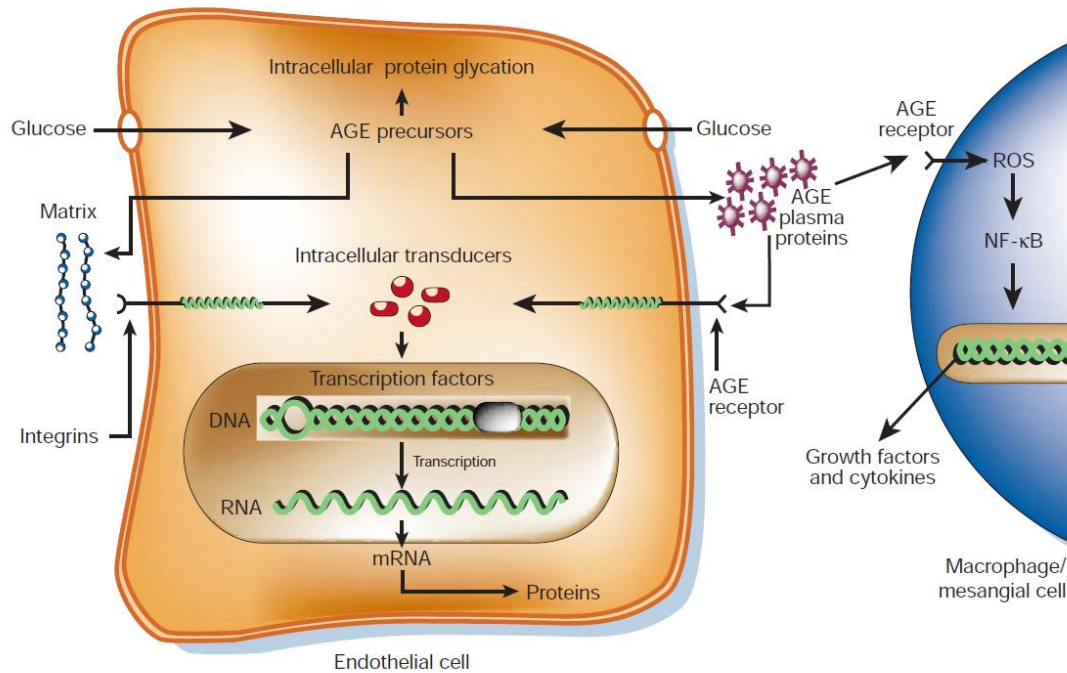
圖六、高糖誘發 PKC 活化之效應。

Fig. 6 Consequences of hyperglycaemia-induced activation of protein kinase C (PKC). Hyperglycaemia increases diacylglycerol (DAG) content, which activates PKC, primarily the  $\beta$ - and  $\delta$ -isoforms. Activation of PKC has a number of pathogenic consequences by affecting expression of endothelial nitric oxide synthetase (eNOS), endothelin-1 (ET-1), vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), and by activating NF- $\kappa$ B and NAD(P)H oxidases. (Brownlee, 2001)

#### (四)高血糖與後期醣化終產物

蛋白質的非酵素性醣化作用(glycation)中，葡萄糖或其他還原性的醣分子的酮基官能基，與蛋白質分子上的胺基之間脫水形成一個西夫鹼(Schiff base)，造成分子重新排列成 Amadori product，而氧化 Amadori product 會生成具有毒性、抗原性的不可逆物質—後期醣化終產物(AGEs)，而長期存在人體內。由於 AGE 產生組織內自由基的速率比沒有經過醣化反應的蛋白質快很多，因此 AGEs 對糖尿病引起的併發症有很大的相關性，譬如動脈硬化症、腎衰竭、白內障、阿茲海默等(劉，2008)。正常人體內的 AGEs 生成是相當緩慢的，因此大多是半衰期(half-life)較長的蛋白質容易產生 AGEs 堆積現象(Reddy and Beyaz, 2006)。三種胞內雙羰基化合物 glyoxal、3-deoxyglucosone、methylglyoxal 為 AGEs 前驅物，可與細胞內外的蛋白質形成 AGEs (Imanaga *et al.*, 2000)。細胞內 AGEs 前驅物可透過 3 種方式造成細胞傷害(圖七)：(1)細胞內蛋白質因 AGEs 修飾而改變原來的功能；(2)經 AGEs 前驅物修飾之細胞外基質(matrix)與其他基質相互作用，並與細胞上之基質接受體(integrins)結合而誘發訊號傳導途徑；(3)血漿蛋白質經 AGEs 修飾後與內皮細胞、mesangial cell 及巨噬細胞上之 AGE 接受體結合，於細胞內產生 ROS 而活化 NF- $\kappa$ B 導致異常的基因表現(劉，2008)。因此當體內葡萄糖含量過高可能透過此途徑，造成過多的 ROS 生成，引發疾病的產生。





圖七、AGEs 前驅物造成細胞損傷的三種方式。

Fig. 7 Mechanisms by which intracellular production of advanced glycation end-product (AGE) precursors damages vascular cells. Covalent modification of intracellular proteins by dicarbonyl AGE precursors alters several cellular functions. Modification of extracellular matrix proteins causes abnormal interactions with other matrix proteins and with integrins. Modification of plasma proteins by AGE precursors creates ligands that bind to AGE receptors, inducing changes in gene expression in endothelial cells, mesangial cells and macrophages. (Brownlee, 2001)

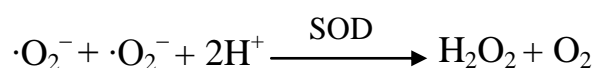
### 2-3-3 抗氧化系統

ROS 會對細胞造成氧化傷害，然而生物體內自有一套完整的抗氧化防禦系統可供保護細胞，降低 ROS 對細胞之傷害(圖八)，其大致可分為酵素性抗氧化作用(enzymetic antioxidation)及非酵素性抗氧化作用(non- enzymetic antioxidation) (Valko *et al.*, 2007)。酵素性抗氧化作用包括：超氧歧化酶(SOD)、麩胱甘肽過氧化酶(GPx)、麩胱甘肽還原酶(GR)、觸媒(CAT)、一氧化氮合成酶(NOS)等；而主要非酵素性抗氧化作用成分則包括維生素 C (ascorbic acid)、維生素 E ( $\alpha$ -tocopherol)、麩胱甘肽 (glutathione)、類胡蘿蔔素 (carotenoids)、多酚類 (polyphenols)等。

#### (一) 酵素性抗氧化作用

##### A. 超氧歧化酶(superoxide dismutase, SOD)

Superoxide dismutase 將超氧陰離子轉變為過氧化氫( $H_2O_2$ )及氧分子，以減輕超氧陰離子對細胞所造成的傷害 (Beyer, 1994)，其反應式如下：

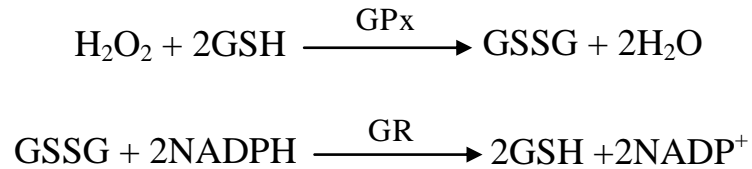


SOD 可分成三類：(1) Cu-Zn SOD，(2) Mn SOD，(3) Fe SOD。Cu-Zn SOD 主要存在於真核生物之細胞質、溶酶體、細胞核及粒線體的內外膜間(Fridovich, 1995)；Mn SOD 一般則存在於真核生物之粒線體內；Fe SOD 則主要存在於原核生物和植物葉綠體中。

##### (B) 麩胱甘肽過氧化酶(glutathione peroxidase, GPx)

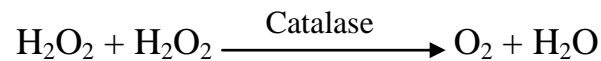
Glutathione peroxidase 一般多存在於血液、肝臟、粒線體及細

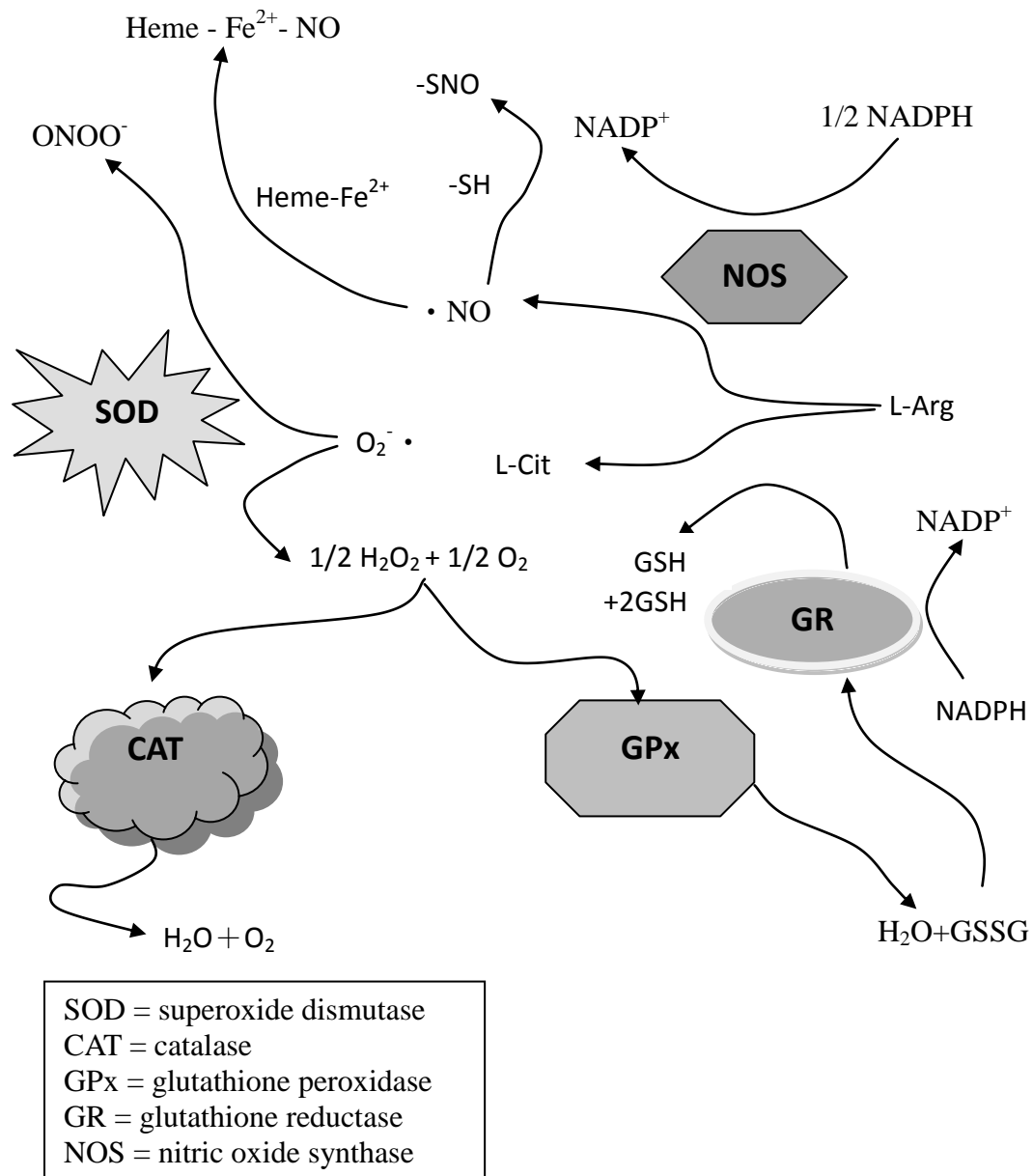
胞質中，需要硒 (selenium)作為 cofactor (Jacob, 1994)。其作用機制是將還原態的 glutathione (GSH)氧化為氧化態的 glutathione (GSSG)來清除過氧化氫。另有 glutathione reductase (GR)以 NADPH 為還原力來源，催化 GSSG 再生成 GSH，其反應式如下：



(C) 觸酶(catalase)

Catalase 屬於  $\text{Fe}^{3+}$ —heme protein，大多存在於 peroxisomes 內，能將過氧化氫( $\text{H}_2\text{O}_2$ )催化為水分子( $\text{H}_2\text{O}$ )與氧分子( $\text{O}_2$ )，然而在許多細胞內如內皮細胞、神經細胞等，其 catalase 含量不足以清除體內所產生的過氧化氫，因此必須依賴 GSH-Px 來清除過氧化氫，以保護細胞不受氧化傷害(Meyer and Isaksen, 1995)。其反應式如下：





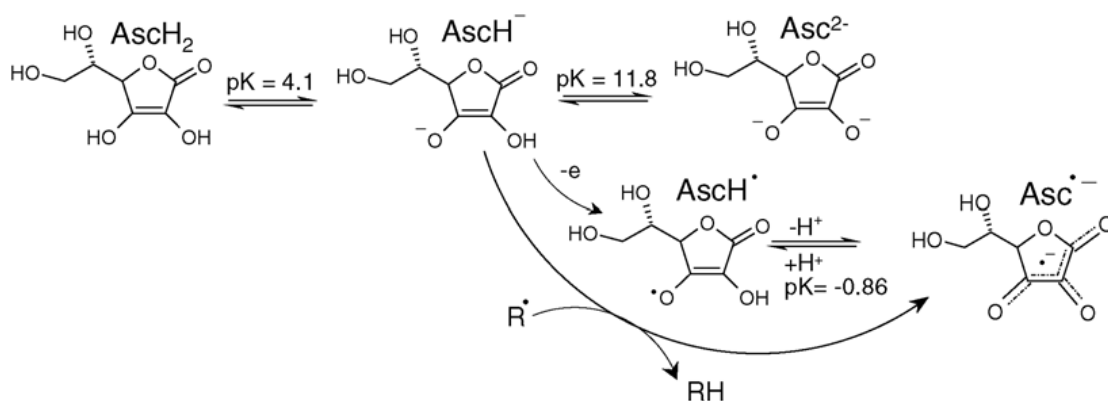
圖八、細胞內抗氧化酵素之防禦系統。

Fig. 8 Cellular antioxidative enzymatic defense system. (Mruka *et al* , 2002)

## (二)非酵素性抗氧化作用

### A.維生素 C (抗壞血酸，ascorbic acid)

抗壞血酸為一種水溶性物質，存在於體內水溶性部分如血漿與細胞間質內。其抗氧化機制在於其 C-2 和 C-3 上有兩個羥基 (hydroxyl group)，可提供質子來穩定自由基，本身轉變為半脫氫抗壞血酸(semidehydroascorbic acid) (Beyer, 1994)。圖九表示不同型態的抗壞血酸與自由基的反應。若在細胞內，可再經由麩胱甘肽或 NADPH 還原再生成具抗氧化活性的還原態(Jacob and Burri, 1996)。此外，抗壞血酸可還原生育醇恢復至抗氧化狀態，因此在細胞內可以此種相乘性的抗氧化作用預防膜和脂蛋白受到氧化性傷害(Aruoma, 1994, Beyer, 1994)。但若抗壞血酸在體內血漿中的濃度過高，或組織受傷後環境中有較高濃度金屬離子，抗壞血酸反而產生促氧化作用，進而導致活性氧分子如羥自由基的生成(Halliwell *et al*, 1995)。



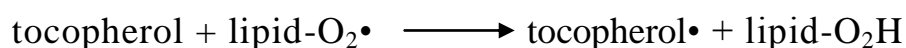
圖九、不同型態抗壞血酸與自由基之反應。

Fig. 9 Various forms of ascorbic acid and its reaction with radicals (R•).

(Valko *et al*, 2006)

## B. 維生素E (生育醇, tocopherol)

生育醇為一脂溶性維生素，是目前使用最廣泛的抗氧化劑。tocopherol可分為四型( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ )，其中以 $\gamma$ 型在自然界中分佈最多(Kamal-Eldin and Appelqvist, 1996)。當生育醇遭受到脂質自由基攻擊時，會將酚基上的質子轉移給脂質過氧化的peroxyl and alkoxy radicals，本身形成共振結構而呈穩定的狀態，進而阻斷自由基連鎖反應及生物體膜上脂質的過氧化反應(Burton, 1994; Fang *et al.*, 2002)。抗氧化機制如下：



因此，生育醇可抑制活性氧分子誘導產生脂質過氧化自由基，並且避免生物膜上不飽和脂肪酸的過氧化、血漿中極低密度脂蛋白的氧化及對細胞 DNA 和蛋白質的傷害(Topinka *et al.*, 1989)。

## C. 類胡蘿蔔素(carotenoids)

Carotenoids 具有多重共軛雙鍵之長鏈多烯結構，可抑制單旋態氧及捕捉過氧化自由基，以終止自由基連鎖反應。例如  $\beta$ -胡蘿蔔素( $\beta$ -carotene)因具有共軛雙烯(conjugated dienes)結構，可與過氧化自由基作用形成穩定的共振結構，來抑制脂質過氧化反應的發生(Aruoma, 1999)。Carotenoids 的自由基清除能力視其結構而定，如結構上共軛雙鍵長度及  $\beta$ -ionone 環上銜接之官能基種類，當共軛雙鍵數較多，則自由基清除能力便較強(Anguelova and Warthsen, 2000)，例如茄紅素(lycopene)含有 11 個共軛雙鍵，其中又以順式結構者具有較強的清除自由基及終止單旋態氧的能力。

#### D. 麩胱甘肽(glutathione, GSH)

GSH 是由麩胺酸(glutamic acid)、半胱胺酸(cysteine)及甘胺酸(glycine)等三種胺基酸所組成，其廣泛存在於動植物與微生物細胞中，是細胞內含量最豐富之小分子硫化物，在細胞抗氧化系統中為一個重要之成分(Sen, 1997; Barry and John, 1999; Wu *et al.*, 2003)。其抗氧化機制是將 GSH 的 cysteine 具有高度親核性(nucleophilic)的側鏈硫氫基(sulfhydryl group)，提供電子給活性氧或自由基分子將其還原，氧化後形成之 GS•可與 GS•形成 GSSG，進一步再藉由 NADPH-dependent glutathione reductase 還原為 GSH，以終止自由基連鎖反應，並降低活性氧對細胞的傷害(Maarten, 1999)。

#### E. 多酚類(polyphenols)

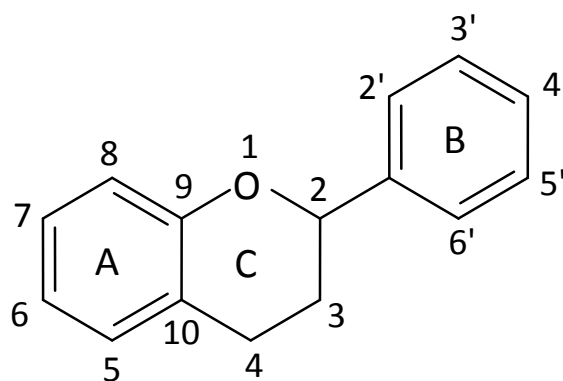
Polyphenols 為植物中廣泛存在的成分，已知種類至少超過 8000 種，其酚型構造上帶有數個羥基，此羥基與體內的抗氧化作用有關，主要包括酚酸(phenolic acids)、類黃酮(flavonoids)及鞣質(tannins)等，以下就幾種主要酚類化合物做介紹：

##### E-1. 類黃酮(flavonoids)

類黃酮是由三個環狀結構的 diphenyl propane(C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)型式所構成(圖十)，屬於多酚類化合物(polyphenolic compounds)的一種，廣泛存在於植物組織中，尤其是葉、花、果實、種子等。依其結構差異性可分為黃酮(flavones)、黃酮醇(flavonols)、黃烷酮(flavanones)、黃烷醇(flavanols)、異黃酮(isoflavones)、黃烷酮醇(flavanonols)、花青素配質(anthocyanidins)及查酮(chalcones)等八大類(表七)。

大多數類黃酮會與醣類形成配醣體以醣苷(glycosides)的形式存在，經過酸、鹼及熱水解後可產生配質(aglycones)和醣基，而 flavonoid glycosides 的抗氧化性比 flavonoid aglycone 來得弱，顯示醣化作用會影響類黃酮的化學、物理及生物特性(Rice-Evans *et al.*, 1996；Scalbert and Williamson, 2000)。

類黃酮的抗氧化性與其結構有很大的關係：(1)若在 A 環上 5、7 位置有羥基，則能延長此類結構的共軛系統。(2)若在 B 環上 3、4 位置有鄰位雙羥基(ortho-dihydroxy)，則對過渡金屬離子( $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ )有螯合作用，間接抑制脂質過氧化反應的發生。(3)若在 C 環上的 2、3 位置有雙鍵與 4 位置上有酮基，則會與 B 環形成共軛結構。(4)若在 A、C 環上 2、5 位置有羥基與 C 環上 4 位置有酮基，則會形成分子內氫鍵，具有清除自由基與螯合金屬離子的能力。



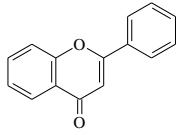
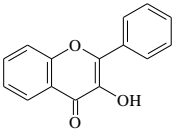
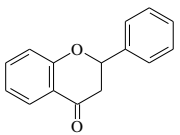
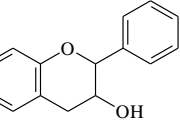
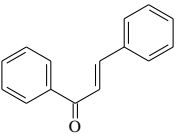
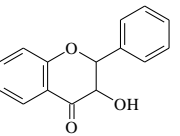
圖十、類黃酮之基本結構圖。

Fig. 10 Structure of flavonoid. (Cook and Samman, 1996)



表七、類黃酮之抗氧化性

Table 7 The antioxidative activities of flavonoids

類黃酮類別	抗氧化性特徵
 黃酮 (flavones)	*此結構為在 C 環有 2,3 double bond, 4-oxofu, 但沒有 3-OH。 *B 環上-OH 越多, A 環在 C5 及 C7 上有-OH, 抗氧化性越強。 *抗氧化性: lutein > apigenin > chrysin
 黃酮醇 (flavonols)	*此結構為在 C 有 2,3 double bond, 4-oxofu 且有 3-OH。 *B 環上-OH 越多, A 環在 C5 及 C7 上有-OH, 抗氧化性越強。 *抗氧化性: quercetin > myricetin > morin > kaempferol
 黃烷酮 (flavanones)	*抗氧化性: taxifolin > naringenin > hesperitin > hesperidin > naringin 和 OH 的數目及取代位置有關。 *其抗氧化性小於 flavonols 及 flavanones。
 異黃酮 (isoflavones)	*genistin, daidzein 屬之。 *抗氧化性差, 在天然產物中此類結構較少。 *orthodihydroxyl 的結構。
 黃烷醇 (flavanols)	*此類結構由於 C 環為飽和的 heterocyclic 環, 在 AB 環間無法電子非定域化, 抗氧化性較具相同-OH 的 flavones 及 flavonols 差。 *抗氧化性: catechin-gallate > catechin
 查酮 (chalcones)	*butein, phloretin, phloridzin 屬之。 *從甘草的成分可分離出具有抗氧化性的物質 lichenalchone A。 *具有潛在抗氧化性, dihydrochalcone > chalcone
 花青素配質 (anthocyanidins)	*抗氧化性: cyanidin > cyanidine-3-β-D-glucoside *Cyanidin 以 flavylium cation 的形式存在時抗氧化性較佳 (pH2 > pH4 > pH7), B 環結構影響抗氧化性。 *Cyanidin=dephindin > malvidin > pelargonidin
 黃烷酮醇 (flavanonols)	*抗氧化性類似 flavanones, 與 OH 的數目及取代位置有關。 *taxifolin, fustin 屬之。

(Cook and Samman, 1996)

## E-2 酚酸(phenolic acids)

酚酸依其結構大致可分為苯甲酸(benzoic acid)與肉桂酸(cinnamic acid)兩大類，兩者之羥基衍生物廣泛存在於植物中，且雙羥基衍生物之抗氧化性優於單羥基衍生物，如 3,4-二羥基肉桂酸(caffeic acid)在多種抗氧化系統中皆顯示出強抗氧化力(Milic *et al.*, 1998)，若第二個羥基位於苯環的鄰位或對位上，其抗氧化性會增強。此外，研究顯示許多酚酸如 ferulic acid、caffeic acid 等皆具有抑制低密度脂蛋白(LDL)氧化的能力(Bros *et al.*, 1990)。

## E-3 鞣質(單寧, tannins)

Tannin 廣泛存在於多種植物性食品及動物飼料中，一般可分為 hydrolyzable 及 condensed tannins (proanthocyanidins, 原花青素)。植物中的 tannin 大多屬於 hydrolyzable tannins，其分子量約 500-3000 dalton，分子量低於 500 dalton 或高於 3000 dalton 是不具功能的 tannins (Bate and Swain, 1962)。其抗氧化性在於苯環上之 hydroxyl group，可清除自由基防止脂質過氧化 (Yokozawa *et al.*, 2000)，且容易與過渡金屬離子  $Fe^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$  螯合，所形成的  $Fe^{2+}$ -Tannin 複合物可防止羥自由基的氧化傷害(George *et al.*, 1999; Lodovici *et al.*, 2001)。其反應式如下：



此外，亦有研究指出 tannins 與其水解物如鞣酸 (tannic acid)、沒食子酸 (gallic acid) 及鞣花酸 (ellagic acid) 等具有抗致突變性 (Huang *et al.*, 1985; Horn and Vargas, 2003)。

#### 2-3-4 抗氧化劑與糖尿病

糖尿病病患體內由於長期處於高血糖狀態，會誘發前面所提到的四種高糖誘導 ROS 生成機制，所以從減低醱化反應的角度抑制氧化的發生，可以達到保護細胞的效果。預防粒線體的氧化壓力損傷也被認為是治療糖尿病的一種策略(Green *et al.*, 2004)。由於主要分泌胰島素的胰島  $\beta$  細胞內抗氧化酵素含量較低，對於高糖所引發之 ROS 也較為敏感(Lenzen *et al.*, 1996；Tiedge *et al.*, 1997)，因此會影響胰島  $\beta$  細胞調控胰島素基因之表現而導致其無法正常分泌胰島素。人體的細胞雖然容易受 ROS 攻擊，但可透過體內的許多抗氧化酵素 SOD、catalase 及 GPx 等來清除(Ceriello, 2003)。研究指出，第一型糖尿病患血漿中的抗氧化能力比一般健康的人低 16%，而以鏈佐黴素(streptozotocin, STZ)誘導的糖尿病鼠中發現，其腎臟內抗氧化酵素 SOD 及 catalase 有降低之趨勢(Vessby *et al.*, 2002)。另有文獻指出，糖尿病人即糖尿病鼠體內維生素 C、E 及  $\beta$ -胡蘿蔔素有明顯不足之現象，而具有抗氧化功能之維生素可以降低糖尿病鼠及糖尿病患體內之氧化壓力(Rahimi *et al.*, 2005)。許多研究也運用植物中的抗氧化成分於糖尿病及其併發症之治療，且具有良好的效果，如表八所示。

表八、具抗氧化能力對糖尿病產生正面作用之植物

Table 8 Plant with positive effects in diabetes by their antioxidant properties

Scientific name	Target	Active ingredients	Mechanism of action and/or effects
<i>Anoectochilus formosanus</i>	STZ-induced diabetic rats	—	↓renal LP, ↑renal GSH, activity of kidney catalase
<i>Trifolium alexandrinum</i>		flavonoids	scavenging free radicals, ↓LP, ↑hepatic GSH
<i>Viburnum dilatatum</i>		cyaniding 3-sambubioside	scavenging free radical, ↓LP
Ever green shrubs such as <i>Larrea divaricata</i>		nordihydroguaiaretic acid	xanthine oxidase inhibition, ion chelation, scavenging free radicals, ↓systolic BP, prevention of renal morphological alteration, improvement in renal function
<i>Aralia elata</i>		—	aldose reductase inhibition, anticataractogenic activity
<i>Viscum album</i>		—	↓biomarker of oxidative stress, ↑GSH in heart & kidney
Many plants		quercetin	ion chelation, scavenging free radicals, ↓LP
<i>Fomes fomentarius</i>		—	alteration of SOD, CAT, and GSH-Px activities, ↓biomarker of oxidative stress
<i>Allium sativum</i>		s-allyl cysteine sulfoxide	↑GST, ↑SOD in liver & kidney, ↓LP
<i>Eugenia jambolana</i>		flavonoids	scavenging free radical
<i>Aloe vera</i>		—	↑GSH, SOD, CAT, GSH-Px, and GST in liver & kidney, ↓LP
<i>Scoparia dulcis</i>		—	↑GSH, SOD, CAT, GSH-Px, and GST, ↓LP
<i>Juglans regia</i>	Type 2 diabetic mice	pedunculagin	↓biomarker of oxidative stress
Plants like <i>ferula assa-foetida</i>	STZ-induced diabetic mice and KK-Ay mice	ferulic acid	scavenging free radicals, ↓LP
<i>Vitis vinifera</i>	alloxan-induced diabetic rats	proanthocyanidins	scavenging free radicals, ↑pancreatic GSH, ↓LP
<i>Cassia fistula</i>		—	↑SOD, CAT, GSH-Px and GR activities in the cardiac tissues, ↓LP in heart
<i>Allium cepa</i>		s-methyl cysteine sulfoxide	scavenging free radicals
<i>Allium sativum</i>		s-allyl cysteine sulfoxide	scavenging free radicals, ↓LP
<i>Panax ginseng</i>	Type 2 diabetic rats	—	scavenging free radicals, prevention of erectile dysfunction
<i>Panax ginseng</i>	alloxan-induced diabetic rabbits	—	lipid lowering effect

STZ = streptozocin, LP = lipid peroxidation, GSH = reduced glutathione, BP = blood pressure, GSH-Px = glutathione peroxidase, GR = glutathione reductase, SOD = superoxide dismutase, CAT = catalase (STZ- and alloxan-induced diabetes are models of type 1 diabetes mellitus, KK-Ay is a model of type 2 diabetes mellitus). (Rahimi *et al.*, 2005)

## 2-4 高血糖與醣解酵素

碳水化合物分為單醣、雙醣及多醣類，為人體能量的主要來源。食物中澱粉多糖經由唾液腺與胰臟分泌的澱粉酶先行消化分解成較小分子糊精、寡醣、雙醣，最後再經由小腸上皮細胞所分泌的葡萄糖苷酶水解成葡萄糖，才能被人體吸收及利用，並使血糖升高(林, 2003)。使用醣解酵素抑制劑可有效延緩碳水化合物的消化與葡萄糖的吸收，改善餐後高血糖之現象(Tadera *et al.*, 2003)。

### 2-4-1 $\alpha$ -澱粉酶與 $\alpha$ -葡萄糖苷酶

#### (一) $\alpha$ -澱粉酶( $\alpha$ -amylase)

$\alpha$ -amylase 為內切型醣解酵素，主要存在哺乳動物之唾液及胰液中，可將多醣之  $\alpha$ -1,4-glycosidic linkage 水解成葡萄糖、麥芽糖或糊精。 $\alpha$ -澱粉酶廣泛存在於微生物、植物與動物組織中，動物的唾液和胰臟也皆能分泌  $\alpha$ -澱粉酶 (Aquino *et al.*, 2003 ; Vaseekaran, *et al.*, 2010)。

#### (二) $\alpha$ -葡萄糖苷酶( $\alpha$ -glucosidase)

$\alpha$ -glucosidase 屬於外切型醣解酵素，主要存在小腸上皮細胞表面的絨毛刷緣(brush border)中，可將多醣經由此酵素催化並釋放非還原端的 D-葡萄糖，其包括 glucoamylase、sucrase、maltase 及 isomaltase 等酵素，通稱為  $\alpha$ -葡萄糖苷酶(Frandsen and Svensson, 1998; 李, 2006 ; Shobana *et al.*, 2009)。

### 2-4-2 醣解酵素之抑制作用對於高血糖症狀之改善

$\alpha$ -amylase 抑制劑及  $\alpha$ -glucosidase 抑制劑，可延緩多醣水解成葡萄糖之速率，進而降低葡萄糖之吸收，以減緩飲食後所造成之血糖急速上升，維持血糖之穩定(Baron, 1998 ; McCue and Shetty, 2004 ;

Fred-Jaiyesimi *et al.*, 2009)。使用醣解酵素抑制劑後，因食物消化吸收受到延遲，一部分未被消化完全的食物到達結腸，引發腸道菌的產氣發酵，因而在病患中出現腹鳴、下痢與頻頻排氣等腸胃不適之副作用，但投予適當之劑量與持續服藥後，此副作用會逐漸降低。(Yee & Fong, 1996; Fujisawa *et al.*, 2005; Fred-Jaiyesimi *et al.*, 2009)。所以尋找天然的醣解酵素抑制劑，有助於改善糖尿病患者餐後高血糖之症狀，也可補足因胰島素分泌不足，而無法即時調降血糖之問題，並且讓一直忙於分泌胰島素的 $\beta$ 細胞得以短暫歇息，受傷的細胞能夠有機會恢復，不再因飲食後大量葡萄糖進入血液而需疲於分泌更多量胰島素(胡，2002)。

Tadera (2006)等人研究指出，類黃酮化合物對於 $\alpha$ -glucosidase與 $\alpha$ -amylase具有良好的抑制作用，其中花青素、異黃酮及黃酮醇類對於酵母菌萃取的 $\alpha$ -glucosidase抑制之 $IC_{50}$ 值皆小於 $15\mu M$ ；再將16種類黃酮以 $0.5mM$ 當作反應濃度，對大鼠腸道的 $\alpha$ -glucosidase及豬胰臟的 $\alpha$ -amylase之抑制率作測定。如表九所示，發現以黃酮醇及黃酮類之抑制效果最佳，其中類黃酮類化合物對於 $\alpha$ -amylase之抑制率皆大於 $\alpha$ -glucosidase。Tadera等人進一步從類黃酮結構分析，推測B環上C3'、C4'及C5'三個取代之OH基數目越多，其抑制效果越好；C2與C3之間是雙鍵、3-OH、4-CO、5-OH對於酵素抑制都具有提升之作用。另有文獻指出，測定兒茶素類對 $\alpha$ -glucosidase之抑制能力中，以化合物epigallocatechin-3-O-gallate之 $IC_{50}$ 值 $40\mu M$ 為佳，其與galloyl group之數目有關(Matsui *et al.*, 2007)。

表九、類黃酮對大鼠小腸  $\alpha$ -glucosidase 與豬胰臟  $\alpha$ -amylase 之抑制率

Table 9 Inhibitory activity of flavonoid against rat small intestinal  $\alpha$ -glucosidase and porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase

Flavonoid	$\alpha$ -Glucosidase		$\alpha$ -Amylase		Flavonoid	$\alpha$ -Glucosidase		$\alpha$ -Amylase	
	Inhibition <sup>a,b</sup> (%)	Inhibition <sup>a,b</sup> (%)	IC <sub>50</sub> <sup>a,c</sup> (mM)	Inhibition <sup>a,b</sup> (%)		Inhibition <sup>a,b</sup> (%)	IC <sub>50</sub> <sup>a,c</sup> (mM)	Inhibition <sup>a,b</sup> (%)	Inhibition <sup>a,b</sup> (%)
Flavonol					Isoflavone				
Myricetin	29	64	0.38		Daidzein	0	19	>0.50	
Quercetin	28	50	0.50		Genistein	2	33	>0.50	
Kaempferol	8	18	>0.50		Flavan-3-ol				
Fisetin	26	33	>0.50		Catechin	1	4	>0.50	
Flavone					Epicatechin	5	14	>0.50	
Luteolin	19	61	0.36		Epigallocatechin	7	5	>0.50	
Apigenin	3	21	>0.50		Epigallocatechin	32	21	>0.50	
Baicalein	16	31	>0.50		gallate				
Flavanone					Anthocyanidin				
Naringenin	1	5	>0.50		Cyanidin	6	37	>0.50	
Hesperetin	2	16	>0.50						

The activity of rat small intestinal  $\alpha$ -glucosidase was estimated by measuring glucose liberated from maltose, and that of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase by measuring *p*-nitrophenol from BPNPG7. Experimental details are described in “Materials and Methods.”

<sup>a</sup> The result was an average of three determinations.

<sup>b</sup> Inhibition by 0.50 mM flavonoid.

<sup>c</sup> Concentration of flavonoid required for 50% inhibition of the enzyme activity under the assay conditions. (Tadera *et al.*, 2006)

## 2-5 糖尿病之治療

糖尿病是相當錯綜複雜之慢性代謝疾病，其所引發之併發症也相當多，如糖尿病的腎病變、視網膜病變、神經性病變及心血管疾病等。研究證實有效控制糖尿病患者的血糖濃度，對於第一型或第二型糖尿病患的慢性併發症具有延緩或減弱的效果(劉，2008)。目前針對糖尿病患之降血糖的策略有(1)刺激胰島素分泌(2)改善胰島素阻抗性(3)增進末梢組織葡萄糖的利用(4)抑制醣類在腸道內的吸收(5)調節脂質代謝(6)抑制肝臟內生葡萄糖產生及(7)保護 $\beta$ 細胞，以達到降血糖之目的(陳，2002)。

第一型糖尿病患者，需每天注射胰島素以補足胰臟無法製造之胰島素，另有研究顯示，補充 $\alpha$ -glucosidase 抑制劑，有助於改善其飯後血糖急速上升之情形。第二型糖尿病患者血糖過高之情況，主要透過飲食控制、規律作息、壓力紓解、體重控制、定期運動並搭配藥物的幫助才能達到適度的血糖調控(Ceriello, 1998; Cheng and Fantus, 2005)。降血糖的藥物類型有磺醯尿素類(sulfonylurea)、雙胍類、 $\alpha$ -glucosidase 抑制劑、胰島素阻抗性改善劑等，這些藥物雖然有效，但也伴隨副作用之產生，只能治標性的減輕部分因糖尿病所照成的代謝紊亂，無法治本的改善身體中根本的生化損傷(胡，2002)。目前已有許多植物或其萃取物被證實有益於糖尿病之改善或治療，表十所示為植物中具有降血糖功能之活性物質，主要包括：生物鹼(alkaloids)、配醣體(glycosides)、多醣類、二硫化物及其他物質，這些植物可作為製造口服降血糖藥物的來源，或是以食物添加物之方式搭配現有藥物治療。



表十、植物中具有降血糖功能之活性物質

植物	食用地區	具活性部位	活性物質	活性物質分類	驗證模式
川烏	東方	根部	Aconitan A	多醣類	糖尿病小鼠
洋蔥	亞歐洲中東	球莖	Alkyldisulfides	二硫化物	糖尿病大鼠
大蒜	亞歐洲中東	球莖	Alkyldisulfides	二硫化物	健康兔
蒟蒻	東方	塊莖	Glucomanan	多醣類	IDDM 與 NIDDM 病患
知母	東方	地下莖	Anemaran A	多醣類	糖尿病小鼠
日日春	亞歐非澳	葉	Alkaloids	生物鹼	健康大鼠
山藥	東方	根	Dioscoran C	多醣類	糖尿病小鼠
麻黃	東方	地上部	Ephedran A	多醣類	糖尿病小鼠
法國紫丁香	歐洲	葉	Guanidine	Guanidine	NIDDM 病患
靈芝	東方	子實體	Ganoderan A	多醣類	糖尿病小鼠
苦瓜	亞歐非	地上部	Glycoside and alkaloids	多醣類和 生物鹼	NIDDM 病患
高麗人蔘	東方	根	Panaxans	多醣類	糖尿病小鼠
甘蔗	東方	莖	Saccharan C	多醣類	糖尿病小鼠
葫蘆巴	亞洲歐洲	種子	Trigonelline	生物鹼	糖尿病動物
覆盆子	歐洲北美	葉	Neomyrtillin	配醣體	糖尿病病患
黃鐘花	非洲中東	葉	Alkaloids	生物鹼	糖尿病兔子
西洋參	東方	根	Quinquefolans	多醣類	糖尿病小鼠
叢豆	亞洲	種子與豆莢	Galatomannan	多醣類	IDDM 與 NIDDM 病患
埃及羽扇豆	中東	種子	Quinolizidine alkaloids	生物鹼	糖尿病大鼠
孟加拉榕	亞洲	樹皮	Glycoside	配醣體	健康鼠
來吉果	美非洲	未熟果	Hypoglycins	Hypoglycins	IDDM 與 NIDDM 病患
五加皮	東方	根	Eleutherans	多醣類	糖尿病小鼠
紅瓜	亞洲	葉	Alkaloids	生物鹼	NIDDM 病患

(胡，2002)

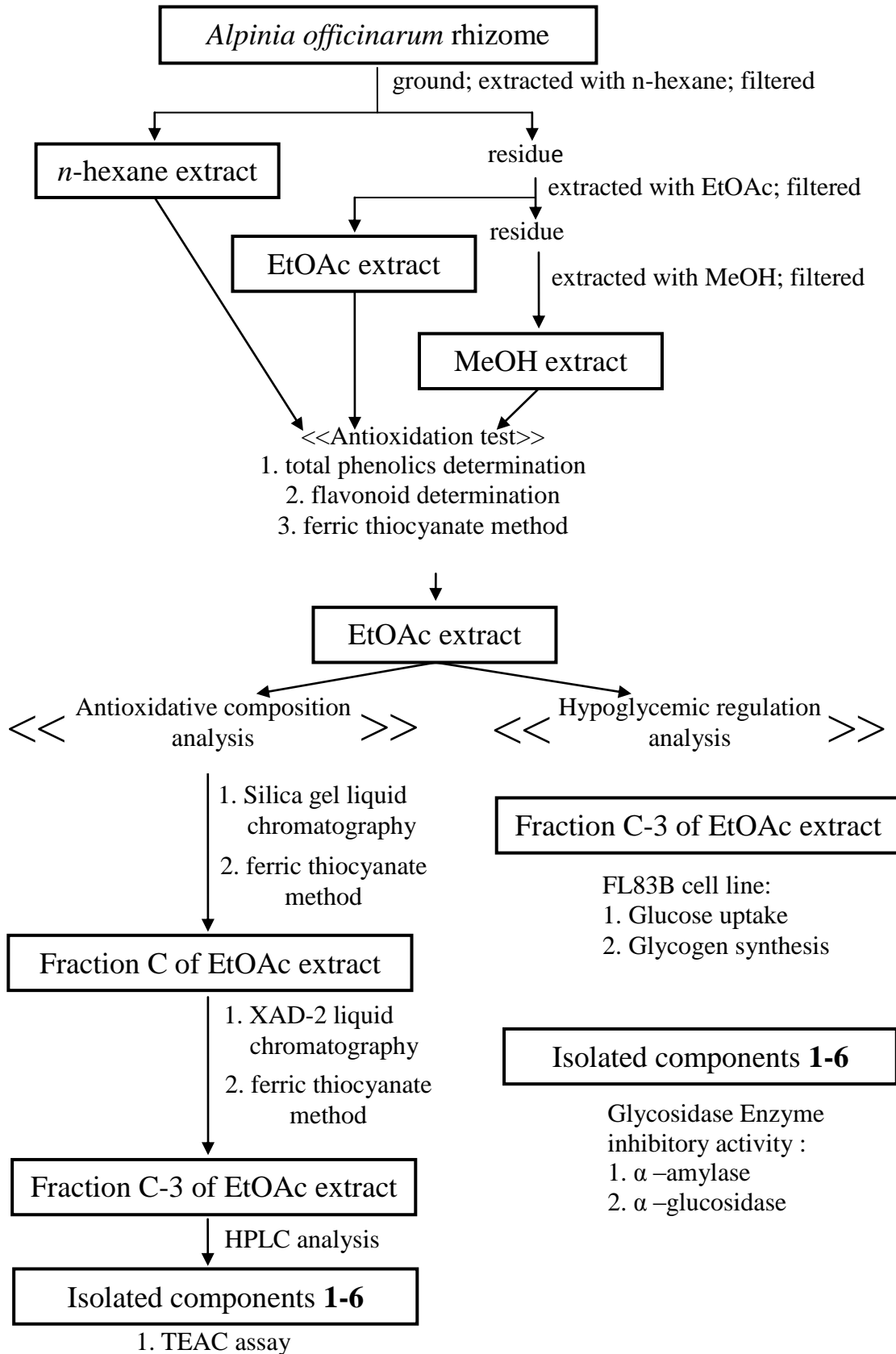
現今的糖尿病用藥大部分都有其副作用，如過敏、腸胃不適、體重增加和肝臟損傷等。因此尋找一個天然而無副作用的植物或食物來協助或治療糖尿病，使其更有效控制血糖、改善胰島素阻抗性等效用，並降低糖尿病併發症之發生機率，為現今研究糖尿病的重要方向。

## 第三章、研究動機與實驗架構

### 3-1 研究動機

糖過多會增加體內自由基讓糖尿病的發生機會增加。由於長期高血糖，葡萄糖會自我氧化產生過多的自由基，並消耗體內中和自由基毒素的抗氧化因子，然而高血糖會使體內蛋白質產生糖化作用，造成細胞損傷，蛋白質糖化過程中亦會產生大量自由基，再度加強蛋白質糖化作用，導致體內抗氧化系統失衡，造成不可逆轉的併發症，譬如：心血管疾病、腎功能衰竭、神經病變、視網膜病變等(Ceriello, 2003；Rahimi et al, 2005)。許多研究亦證實抗氧化劑可降低高血糖所引起之氧化壓力，降低脂質過氧化及蛋白質糖化的產生，進而減少細胞損傷及疾病的發生。由於人工合成的抗氧化劑可能造成動物肝、腎損傷及致癌性，所以近年來相當熱烈的研究自然界中尋找更安全有效的的抗氧化劑來取代合成的抗氧化劑。中藥材薑科(*Zingiberaceae*)植物高良薑(*Alpinia officinarum*)之根莖，在先前研究證實具有良好的抗氧化、抗癌、抗炎、鎮痛、止吐等作用，但對於血糖調控之相關研究卻相當少，因此本研究探討高良薑之抗氧化性並評估對血糖調控之能力，期望高良薑對於糖尿病之改善具有潛在價值。

### 3-2 實驗架構



## 第四章、材料與方法

### 4-1 實驗材料

本實驗樣品為中藥材高良薑(*Alpinia officinarum* rhizome)產地為中國四川省，購自台中市沙鹿區德成中藥行，購買量 3.5 公斤，樣品利用磨粉機磨碎成粉末以備用。

### 4-2 實驗試藥與溶劑

#### 4-2-1 抗氧化試驗之試藥

Ammonium thiocyanate ( $\text{NH}_4\text{SCN}$ )購自關東化學公司 (Tokyo, Japan)；iron(II) chloride tetrahydrate ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )、potassium phosphate, monobasic ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )、購自林純藥工業公司(Osaka, Japan)；2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS)、butyl hydroxyl anisole (BHA)、Folin-Ciocalteu's phenol reagent、linoleic acid、peroxidase from horseradish (116 units/mg solid)、 $\alpha$ -tocopherol 購自 Sigma 公司(St. Louis, MO, USA)；hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )、sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )購自 Riedel-de Haën 公司(Seelze, Germany)；6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-2,2-dicarboxylic acid (trolox)、gallic acid 購自 Aldrich 公司(Milwaukee, WI, USA)；aluminium nitrate ( $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ )購自 Merck 公司(Germany)

#### 4-2-2 酵素試驗之試藥

Potassium phosphate, monobasic ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )、sodium chloride ( $\text{NaCl}$ )購自久島藥品公司(Osaka, Japan)、disodium hydrogenphosphate, anhydrous ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )、starch 購自和光純藥工業公司(Wako, Japan)、sodium carbonate, anhydrous ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )購自片山試藥公司(Katayama, Japan)、sodium hydroxide ( $\text{NaOH}$ )購自聯工化學公司(Hsinchu, Taiwan)、

$\alpha$ -amylase from *Aspergillus oryzae*、 $\alpha$ -glucosidase from bakers yeast、4-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside (pNPG)、3,5-dinitrosalicylic acid (DNSA)均購自 Sigma 公司(St. Louis, MO, USA)

#### 4-2-3 細胞培養之試藥

Kaighn's modification of Ham's F12 medium、insulin、ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、nonidet P-40 substitute (NP-40)、sodium deoxycholate、propidium iodide (PI)購自 Sigma公司(St. Louis, MO, USA)；胎牛血清 (charcoal/dextran treated fetal bovine serum, FBS)、trypsin-EDTA、trypan blue購自 Biological Industries公司(Kibbutz, Israel)；2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxyglucose(2-NBDG)購自 Invitrogen公司(OR, USA)；Sodium bicarbonate ( $\text{NaHCO}_3$ )購自 久島藥品公司(Osaka, JAPAN)；monopotassium phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )、disodium hydrogen phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )購自 Mallinckrodt Baker公司 (NJ, USA)；sodium chloride (NaCl)購自 Amresco公司(OH, USA)；potassium chloride (KCl)購自 林純藥工業公司(Osaka, Japan)；tris-(hydroxymethyl)-aminomethane、sodium dodecyl sulphate (SDS)購自 Bio-Rad公司(CA, USA)；BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit購自 Pierce Biotechnology公司(IL, USA)；

#### 4-2-4 成分分析試驗之溶劑

工業級 ethyl acetate、*n*-hexane、methanol 購自 李長榮公司(Taiwan)；acetone、*n*-hexane、methanol 購自 SK Chemicals 公司(Korea)；ethyl acetate 購自 ECHO 公司(Taiwan)；chloroform 購自 Merck 公司(Germany)；chloroform- $\text{D}_3$ 、DMSO- $\text{D}_6$ 、methanol- $\text{D}_4$  購自 CIL 公司(Andover, MA, USA)

### 4-3 實驗設備

#### 4-3-1 化學試驗之儀器設備

##### (1) 充填式膠體液相層析管柱

Silica gel 60 樹脂(70-230 mesh)購自 Merck 公司(Germany)

XAD-2 樹脂(20-60 mesh)購自 Sigma 公司(St. Louis, MO, USA)

##### (2) 光二極矩高效液相層析儀(HPLC)

液相層析儀(L-7100)購自 Hitachi 公司(Japan)

光二極體陣列層析器(L-7450A) 購自 Hitachi 公司(Japan)

層析控制與資料處理器(D-7000) 購自 Hitachi 公司(Japan)

以下高效層析液相管柱 Develosil ODS-HG-5 (250×4.6 mm) 、

Develosil ODS-HG-5 (250×20 mm) 、 Develosil RP-Aqueous

(250×4.6 mm) 、 Develosil RP-Aqueous (250×20 mm)均購自

Nomura 公司(Japan)

##### (3) 旋轉式減壓濃縮機(EYELA N-1)購自 Rikkakikai(Tokyo, Japan)

##### (4) 紫外-可見光吸光光譜儀(U-2001)購自 Hitachi 公司(Japan)

##### (5) 核磁共振光譜儀(VXR-300/51)

$^1\text{H-NMR}$  以 300MHz、 $^{13}\text{C-NMR}$  以 75MHz 檢測。

#### 4-3-2 細胞測定之儀器設備

##### (1) CO<sub>2</sub> 恆溫培養箱(HEPA CLASS100) 購自 Thermo 公司( USA)

##### (2) 加熱恆溫循環槽(WB212-B1) 購自 Kansin 公司(USA)

##### (3) 血球計數器(hemocytometra) 購自 Superior 公司(Germany)

##### (4) 無菌操作檯購自 Bellco 公司(USA)

##### (5) 倒立螢光顯微鏡(IX-71) 購自 Olympus 公司(Japan)

##### (6) 液態氮貯存桶(LS-750) 購自 Taylor-Wharton 公司(Germany)

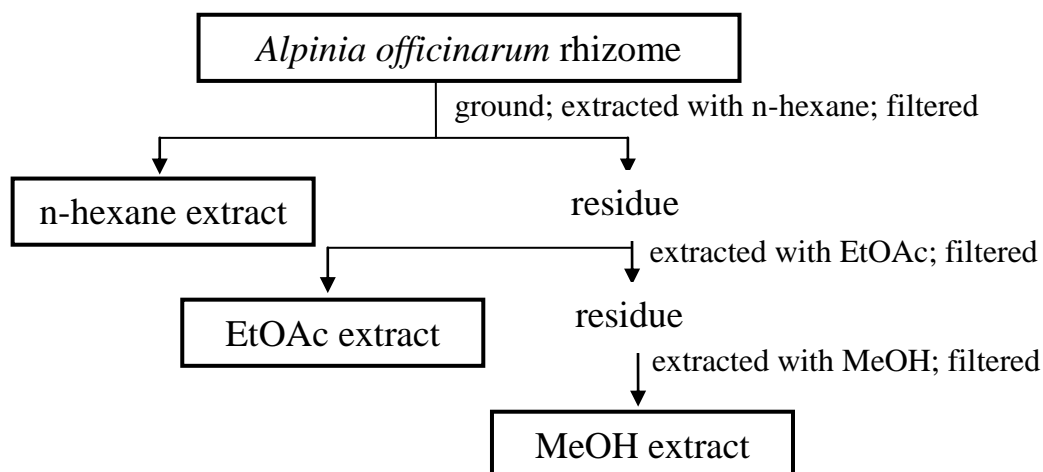
##### (7) 震盪機(Vortex-2 genie)購自 Scientific Industries 公司(USA)

- (8) 流式細胞儀(FACScan) 購自 Becton Dickinson 公司(USA)
- (9) 酵素免疫分析儀 ELISA reader (MRXII) 購自 Dynex 公司(USA)。
- (10) 桌上型離心機(UFO-2100) 購自 Pantech 公司(Taiwan)
- (11) 高速低溫離心機 (Centrifuge 5810R) 購自 Eppendorf 公司(USA)

#### 4-4 實驗方法

##### 4-4-1 樣品萃取

使用浸漬萃取方法，將 3,337 g 乾燥中藥高良薑粉末，依序使用 15L 的工業級正己烷、乙酸乙酯、甲醇於室溫下分別重複萃取三次，以抽氣過濾收集上清液，所獲得之三種萃取液在低於 40°C 下以旋轉式減壓濃縮機濃縮至適當體積，並計算產率後充氮儲藏於 4°C 冰箱備用。高良薑各種溶劑萃取及製備流程如圖十一所示。



圖十一、高良薑各種溶劑萃取物之製備。

Fig. 11 The solvent extracts prepared from *Alpinia officinarum* rhizome.



#### 4-4-2 總酚含量測定(total phenolic compounds determination)

原理：Folin-Ciocalteu's phenol reagent 與酚類化合物之 OH 基反應，並產生由黃變藍之顏色變化，並檢測波長 735nm 之吸光值，當吸光值越高代表所含多酚類化合物含量越多。

參照 Julkunen-Titto (1985) 之方法，將 50 $\mu$ l 樣品及不同濃度之 gallic acid 標準品，加入 1mL H<sub>2</sub>O 及 500 $\mu$ l Folin-Ciocalteu's phenol reagent，用力搖勻混合，再加入 2.5mL 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>，混合均勻，於室溫下靜置 20 分鐘，以分光光度計檢測波長 735nm 下之吸光值。另外再以不添加 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 之試驗當作空白對照組。製作標準曲線(附錄一)，以換算相對之 gallic acid 當量，以 mg gallic acid equivalent/ g 高良薑萃取物。

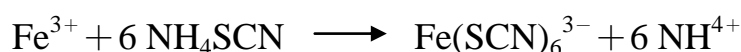
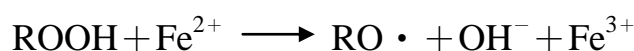
#### 4-4-3 總類黃酮含量測定(Flavonoid determination)

原理：類黃酮化合物於鹼性條件下可與硝酸鋁形成穩定的紅色錯合物，並檢測波長 415nm 之吸光值，當吸光值越高代表所含總類黃酮化合物含量越多。

參照唐(1996)和鍾(2003)等人之方法，將 250 $\mu$ l 樣品及不同濃度之 quercetin 標準品，加入 10% 硝酸鋁及 1M 醋酸鉀各 50 $\mu$ l，再加入 1.4mL 去離子水，混合均勻，於室溫下反應 40 分鐘，以分光光度計檢測波長 415nm 下之吸光值。另外再以不添加硝酸鋁之試驗當作空白對照組。製作標準曲線(附錄二)，以換算相對之 quercetin 當量，以 mg quercetin equivalent/ g 高良薑萃取物。

#### 4-4-4 硫氰酸鐵法測定(ferric thiocyanate assay)

原理：當油脂氧化程度越高，氫過氧化物生成愈多。氫過氧化物與  $\text{FeCl}_2$  反應使  $\text{Fe}^{2+}$  氧化成  $\text{Fe}^{3+}$ ， $\text{Fe}^{3+}$  再與硫氰酸根形成穩定的紅色錯化合物，並檢測波長 500nm 之吸光值，當吸光值越高代表油脂氧化程度越高。其反應式如下：



$\text{Fe}(\text{SCN})_6^{3-}$  : red pigment complex at  $\lambda_{\text{max}}$  500 nm

##### (1) 1/30M PBS (phosphate buffer saline) 製備

0.2M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50mL、0.2N NaOH 30mL 及去離子水 100mL，以 0.2N NaOH 調整 pH 值至 7.0，定量至 200mL 備用。

##### (2) 亞麻油酸(Linoleic acid)製備

Linoleic acid, approx. 60% 經充氮、減壓蒸餾以提高純度，再分裝於 2mL 指形瓶中儲存於  $-20^\circ\text{C}$  冷凍庫備用，每隔兩個月重新蒸餾再製。

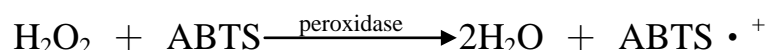
參照滿田(1967)及蘇(1991)等人之方法，將 200 $\mu\text{l}$  樣品(mg/mL)、 $\alpha$ -tocopherol (mg/mL)及 BHA (mg/mL)、10mL 1.3% 亞麻油酸甲醇溶液、10mL 1/30M pH7.0 PBS 及 4.8mL 去離子水，置於具有磨砂瓶蓋之 50mL 三角錐形瓶及  $40^\circ\text{C}$  循環式恆溫烘箱內反應，每隔 24 小時取出進行顯色反應與比色分析。

取出上述反應基質 200 $\mu\text{l}$ ，加入 9.4mL 75% 甲醇，再依序加入 200 $\mu\text{l}$  (38.8mg  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  / 10 mL 3.5% HCl) 氯化亞鐵及 200 $\mu\text{l}$  (3g

NH<sub>4</sub>SCN / 7mL dist. H<sub>2</sub>O) 硫氰酸銨，混合均勻，於室溫下反應 3 分鐘，以分光光度計檢測波長 500nm 下之吸光值。

#### 4-4-5 總抗氧化能力測定(Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)

原理: horseradish peroxidase 會催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 及 ABTS 反應形成 ABTS ·<sup>+</sup>，此為穩定的藍綠色自由基物質，其在波長 734nm 有極大吸光值。當樣品具有抗氧化能力時，則能減少 ABTS ·<sup>+</sup>，導致吸光值下降。當吸光值愈低，代表樣品之抗氧化能力愈強。其反應式如下：



參照 Miller(1993)及 Arnao(1996)等人之方法，將 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS)、peroxidase 與 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 混合均勻，使最終系統濃度分別為 100μM、4.4 unit/mL 與 50μM，於 30°C 下避光反應 1 小時，其形成穩定的藍綠色 ABTS ·<sup>+</sup>，加入 250μl 樣品 (mg/mL) 及不同濃度之 trolox 標準品，混合均勻，於室溫下反應 10 分鐘，以分光光度計檢測波長 734nm 下之吸光值。製作標準曲線，以換算相對之 trolox 當量，以 mM trolox equivalent/ mg sample 表示。

#### 4-4-6 抗氧化成分之萃取、分離及純化

高良薑之正己烷、乙酸乙酯、甲醇萃取物，利用硫氰酸鐵法測定之結果顯示，以乙酸乙酯萃取物顯現強抗氧化性，經總酚和總類黃酮含量分析發現其內亦含多量總酚和總類黃酮，故擬選取乙酸乙酯萃取物進行抗氧化成分之分析。高良薑乙酸乙酯萃取物之抗氧化成分之分離與純化流程如圖十二所示。

### (1) 矽膠充填式膠體液相管柱層析

首先以 Silica gel 填充於玻璃管柱(700× 45 mm)，再將具強抗氧化性之高良薑乙酸乙酯萃取物懸浮於正己烷充填至管柱最頂層，其沖提條件依序為正己烷：乙酸乙酯(v/v)=100：0、80：20、60：40、40：60、20：80、0：100、乙酸乙酯：甲醇(v/v)=50：50 混合溶劑，沖提液以每瓶 200mL 為收集單位，並以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，偵測波長 270nm 之吸光值對收集瓶作圖進行區分。而後利用硫氰酸鐵法檢測各區分濃縮物之抗氧化性。

### (2) XAD-2 液相管柱層析

使用 XAD-2 充填於玻璃管柱(700× 45 mm)，再將具強抗氧化性高良薑乙酸乙酯萃取物沖提區分 C 懸浮於正己烷後充填至管柱最頂層，並進行第二次矽膠管柱層析，其沖提液條件依序是水：甲醇(v/v)=100：0、80：20、60：40、40：60、0：100、乙酸乙酯：甲醇(v/v)=50：50 之混合溶劑，沖提液以每 200mL 為收集單位，並以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，偵測波長 270nm 之吸光值對收集瓶作圖進行區分，而後利用硫氰酸鐵法檢測各區分濃縮物之抗氧化性。將抗氧化性高的區分 C-3，利用高效液相層析儀(high performance liquid chromatography, HPLC)分析各成分。

### (3) HPLC 分析

將上述具強抗氧化性成分之區分 C-3 利用高效液相層析進行分析，先以分析型高效液相層析找尋分離條件，再依其沖提條件套用於製備型高效液相層析，重複分離抗氧化成分。將經高效液相層析分離純化單一波峰之各成分濃縮後，進行結構鑑定。高效液相層析條件敘

述如下：

(3-1) 分析型高效液相層析【純化物質 1、2、3、4、5、6】

管 柱：Develosil RP-Aqueous (C30-UG)

(250×4.6 mm，日本 Nomura 公司)

沖提液：H<sub>2</sub>O：MeOH：三氟醋酸 (v/v) = 24.9：75：0.1

流 速：1 mL/min

偵測器：270 nm

(3-2) 製備型高效液相層析【純化物質 1、2、3、4、5、6】

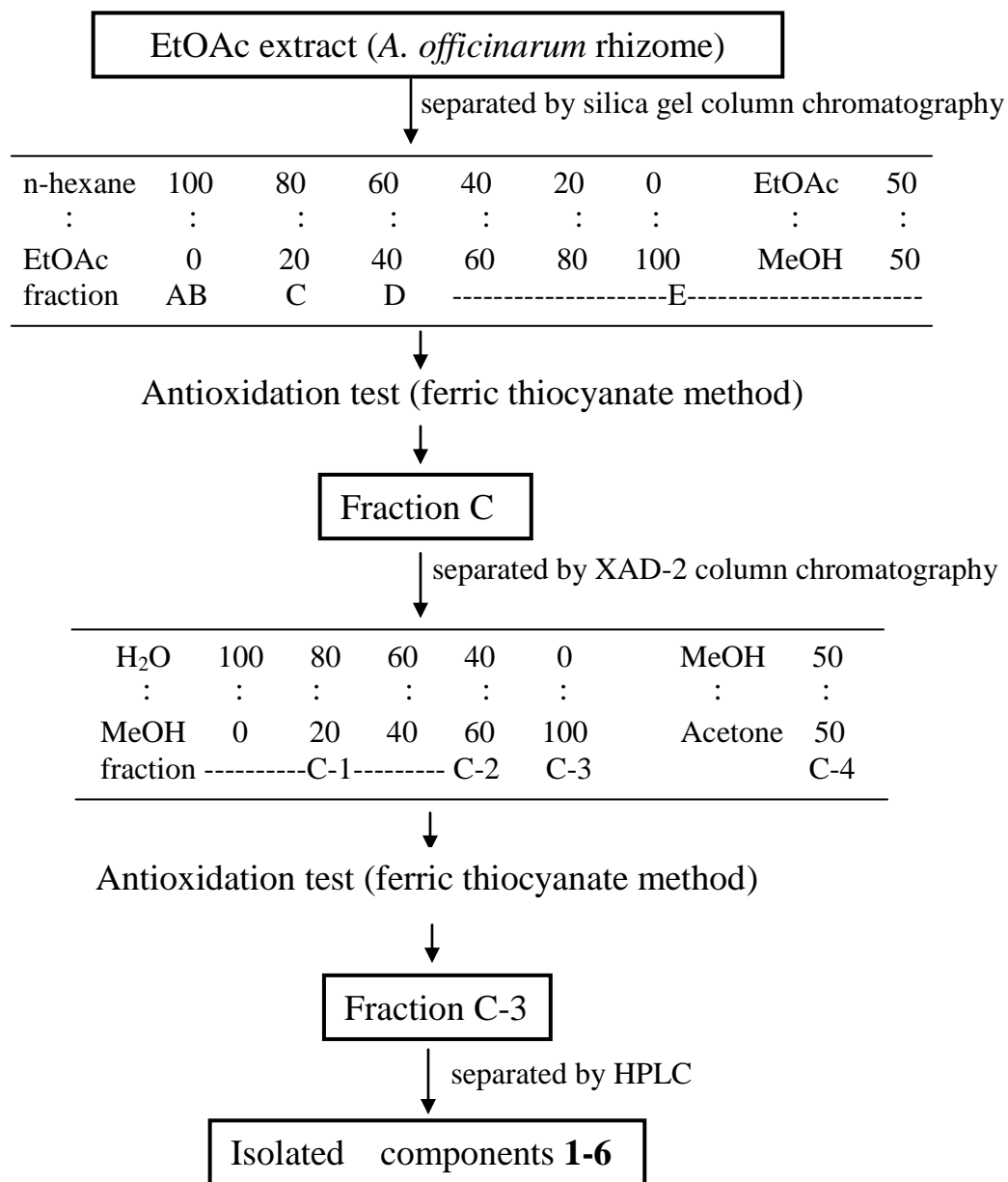
管 柱：Develosil RP-Aqueous (C30-UG)

(250×20 mm，日本 Nomura 公司)

沖提液：H<sub>2</sub>O：MeOH：三氟醋酸 (v/v) = 24.9：75：0.1

流 速：4.5 mL/min

偵測器：270 nm



圖十二、高良薑乙酸乙酯萃取物抗氧化成分之純化流程圖。

Fig. 12 The antioxidative components isolated from EtOAc extract of *A. officinarum* rhizome.

#### (4) 純化物質之結構鑑定

4-4-8  $^1\text{H}$ -及  $^{13}\text{C}$ -核磁共振 ( $^1\text{H}$ -及  $^{13}\text{C}$ -NMR) 光譜測定敘述如下：

將純化之樣品溶 methanol- $d_4$  與 methyl sulfoxide- $d_6$  中，以 VXR-300/51 型核磁共振光譜儀 ( $^1\text{H}$ -NMR 以 300MHz， $^{13}\text{C}$ -NMR 以 75MHz) 測定，獲得其  $^1\text{H}$ -及  $^{13}\text{C}$ -NMR 光譜。光譜解析以  $\delta$  表示化學位移 (chemical shift)，並以 TMS (tetramethylsilane) 充當比較基準點，s 表示單線峰 (singlet)，d 表示雙線峰 (doublet)，t 表示三線峰 (triplet)，q 表示四線峰 (quartet)，b 表示寬線峰 (broad)，m 表示多重線峰 (multiplet)；同時進行紫外-可見光譜及質譜分析，再綜合進行光譜解析及結構鑑定。

#### 4-4-7 $\alpha$ -amylase 抑制能力測定

##### (1) 0.2M PBS (phosphate buffer saline) 製備

0.2M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  與  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  以 4.5 比 5.5 的比例混合，加入 6mM NaOH，調整至 pH 6.9 備用。

參考 Ali (2006) 及 巫 (2009) 等人之方法並加修飾，取  $\alpha$ -amylase 溶於 0.1M PBS， $\alpha$ -amylase 活性為 5U/mL。取 100 $\mu\text{l}$  酵素液，加入 100 $\mu\text{l}$  樣品，混合均勻，於 37 $^\circ\text{C}$  下反應 10 分鐘，加入 800 $\mu\text{l}$  1% starch (溶於 PBS) 並混合均勻，於 37 $^\circ\text{C}$  下反應 3 分鐘，再加入 200 $\mu\text{l}$  5% 3,5-dinitrosalicylic acid (DNSA) 使酵素失活而中止反應，混合均勻，於 90 $^\circ\text{C}$  下反應 10 分鐘，冷卻至室溫，以分光光度計檢測波長 540nm 下之吸光值，此為實驗組之吸光值。控制組則以 0.1M PBS 取代樣品。而背景組則只有樣品之吸光值。抑制率之計算方式如下：

$$\text{抑制率(\%)} = 100\% - \left[ \frac{(A_S - A_B)}{(A_C - A_{CB})} \times 100\% \right]$$

$A_C$ (控制組)：酵素+buffer+基質

$A_S$ (實驗組)：酵素+樣品+基質

$A_B$ (背景組)：buffer+樣品+基質

$A_{CB}$ (控制背景組)：buffer+buffer+基質

#### 4-4-8 $\alpha$ -glucosidase 抑制能力測定

##### (1) 0.1M PBS (phosphate buffer saline) 製備

0.1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  與 0.1M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  以 1 比 1 的比例混合，再調整 pH 值至 6.8 備用。

參考 Shim(2003)及林(2008)等人之方法並稍加修飾，取  $\alpha$ -glucosidase (21unit/mg)溶於 0.1M PBS， $\alpha$ -glucosidase 活性為 1U/mL。取 20 $\mu$ l 酵素液，加入 100 $\mu$ l 樣品，再加入 380 $\mu$ l 0.53mM 4-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside (pNPG)於 37 $^{\circ}$ C 下反應 20 分鐘後，加入 500 $\mu$ l 0.1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  混合均勻，使酵素失活而中止反應，以分光光度計檢測波長 400nm 下之吸光值，此為實驗組織之吸光值。控制組則以 0.1M PBS 取代樣品。而背景組則只有樣品之吸光值。抑制率之計算方式如下：

$$\text{抑制率(\%)} = \left[ \frac{A_C - (A_S - A_{CB})}{A_C} \right] \times 100\%$$

$A_C$ (控制組)：酵素+基質+buffer 之吸光值

$A_S$ (實驗組)：酵素+基質+樣品之吸光值

$A_{CB}$ (背景組)：buffer+buffer+樣品之吸光值



#### 4-4-9 細胞培養

##### (1) 細胞株

本實驗所使用小鼠 FL83B 肝細胞株 (mouse hepatocyte cell line ; BCRC number 60325)，屬於貼附型細胞，購自食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心(Bioresource Collection Research Center, Hsinchu, Taiwan)。

##### (2) PBS (phosphate buffer saline) 製備

稱取 0.4g KCl、0.06g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.35g  $\text{NaHCO}_3$ 、8g NaCl、0.048g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  以去離子水定量至 1L，置入血清瓶中，經高溫高壓滅菌後儲存於室溫備用。

##### (3) 細胞培養液製備

將 F12K medium 粉末及 1.8g  $\text{NaHCO}_3$  完全溶解於 900mL 二次水，於無菌操作檯中以 0.22 $\mu\text{m}$  過濾膜過濾後分裝於滅菌之血清瓶中，儲存於 4°C 冰箱備用。添加 10% FBS 於 F12K medium 中，製備成 FL83B 細胞株之培養液。

##### (4) 細胞株之解凍與保存

細胞解凍：由液態氮桶取出一小管含冷凍之 FL83B 細胞之小試管，置於 37°C 水浴槽中迅速加熱解凍，以 75% 酒精擦拭管外部後移入無菌操作檯，將細胞液置於培養皿中，緩慢加入 10mL 含 10% FBS 之 F12K medium，輕輕搖動使細胞與培養液混合均勻，於 37°C、5%  $\text{CO}_2$  之培養箱中，培養 24 小時後更換新的培養液，待細胞生長至約 8 分滿時，進行繼代培養。

細胞保存：將待保存之 FL83B 細胞於培養皿中生長約 8 分滿，以 PBS 清洗 1~2 次，加入 2mL 1X trypsin-EDTA，置於 37°C 培養箱反應 3~5 分鐘，再加入 6mL 含 10% FBS 之 F12K medium，終止 trypsin-EDTA 之作用，將所有細胞液收集於 50mL 離心管中，以血球計數器計數細胞，再以 1000rpm 及 15°C 離心 7 分鐘，爾後復懸成  $1.5 \times 10^6$  cell/mL，於 -20°C 放置 30 分鐘，再移至 -80°C 放置 overnight，最後儲存於液態氮桶。

#### (5) 細胞株的培養

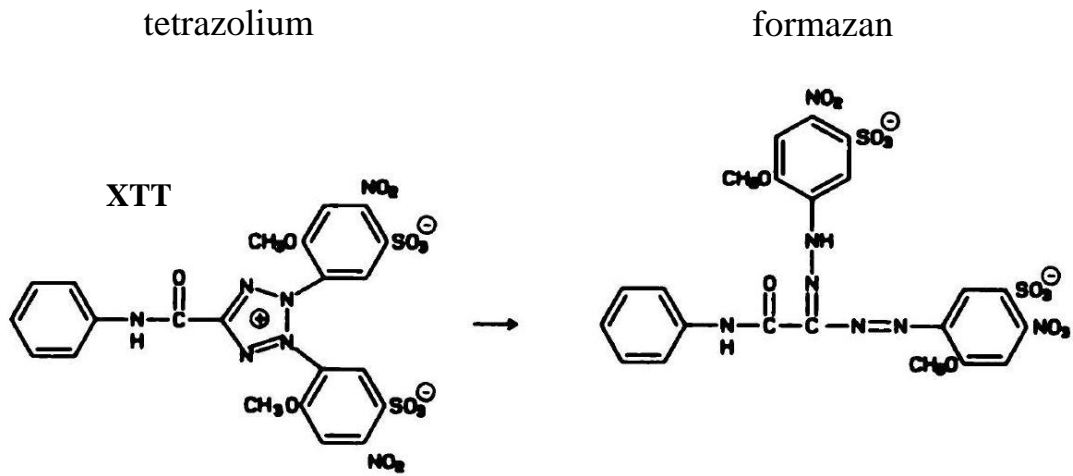
FL83B 細胞培養於含 10% FBS 之 F12K medium 與 37°C 含 5% CO<sub>2</sub> 之 37°C 培養箱中，利用倒立螢光顯微鏡觀察細胞，待細胞生長約 8 分滿即進行繼代培養。繼代時先用 PBS 清洗，加入 2mL 1X trypsin-EDTA，置於 37°C 培養箱反應 3~5 分鐘，再加入 6mL 含 10% FBS 之 F12K medium，終止 trypsin-EDTA 之作用，將細胞於培養基中打散，而後該細胞懸浮液回鋪於新的培養皿中，並注入新的細胞培養液至 10mL，細胞培養液約 1~2 天更換一次。

#### 4-4-10 XTT assay 細胞毒性測定

原理：利用細胞粒線體中琥珀酸去氫酶(succinate-tetrazolium reductase) 將 XTT 的 tetrazolium 環打斷，形成一橘紅色之 formazan 化合物，檢測波長 540~570nm 下之吸光值，其值與存活細胞數目成正比。其反應式如圖十三所示。

以  $2 \times 10^5$  cell/well 將 FL83B 細胞培養於 96 孔盤中 24 小時，加入不同濃度之待測樣品培養 24 小時後，移去培養基並以 PBS 清洗。加入 XTT 試劑 50  $\mu$ L (XTT reagent : activation reagent = 50 : 1) 混合均勻，於 37 °C 反應 2 小時，以酵素免疫分析儀檢測波長 540~570nm 下

之吸光值。



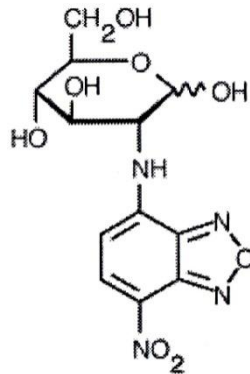
圖十三、XTT 試劑之反應式。

Fig. 13 Structures of XTT tetrazolium and formazan. (Scudiero, 1988)

#### 4-4-11 FL83B 細胞之葡萄糖擬似物 2-NBDG 攝入量分析

##### (1) 葡萄糖擬似物(2-NBDG)

2-NBDG為一種葡萄糖衍生物，分子量為342.26 (Yoshioka *et al.*, 1996)。結構為2-【N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino】-2-deoxy-D-glucose。可於487 nm下受到激發，於542nm釋出螢光。於避光環境下以PBS配製濃度為29.2mM，儲存於-20°C冰箱備用。



圖十四、2-NBDG 結構式。

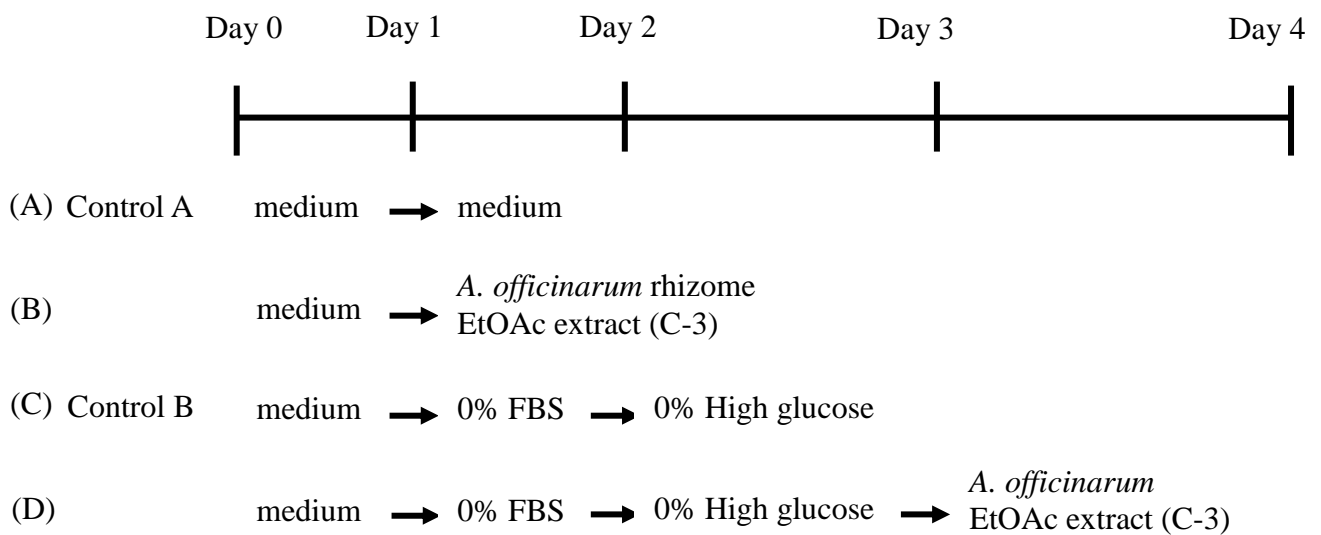
## (2) 人類胰島素溶液製備

取10 mg 粉末加入10 mL滅菌水及100  $\mu$ L acetic acid混合均勻後，以0.22  $\mu$ m 濾膜過濾，即配製濃度為1mg/mL。保存於-20°C 冰箱備用。添加至細胞前，再以培養基稀釋至5 $\mu$ g/mL。

## (3) 誘導 FL83B 細胞產生胰島素阻抗性

參考吳(2011)之方法，將 FL83B 細胞培養至八分滿，更換不含血清之培養基 24 小時，再加入 60mM 之 glucose 處理細胞，培養 24 小時，細胞即產生胰島素阻抗性。

取細胞濃度  $1 \times 10^5$  cell/well 小鼠肝臟細胞 FL83B 培養於 12 孔盤，經過不同處理後(圖十五)，加入含有 5 $\mu$ g/mL 胰島素與 2-NBDG 反應 1 小時，以 PBS 清洗，加入 150 $\mu$ l 1X trypsin-EDTA，置於 37°C 培養箱反應 3~5 分鐘，再依序加入 300 $\mu$ l FBS、50 $\mu$ l PBS 及 6 $\mu$ l PI(mg/mL)，將細胞收集於流式管中，以流式細胞儀檢測 2-NBDG 帶入 FL83B 細胞之情況。



圖十五、正常組及阻抗組 FL83B 細胞添加高良薑乙酸乙酯萃取物之區分 C 之加樣方式。將細胞鋪盤貼壁後，將細胞分為四組分別為(A)控制組(B)樣品組(C)高糖誘導阻抗組(D)高糖阻抗添加樣品組，然後以葡萄糖擬似物之攝入確定樣品對於正常態及阻抗態細胞之影響。

Fig 15 The addition of ethyl acetate extract of *A. officinarum* rhizome in normal (A, - ; B+) and resistant (C,- ; D+) FL83B cells.

#### 4-4-12 細胞內肝醣合成量分析

原理：利用蒽酮-硫酸法分析肝醣含量，多醣遇濃硫酸脫水生成的糠醛或其衍生物，可與蒽酮試劑發生縮合反應，生成藍綠色化合物，檢測波長 620nm 下之吸光值，當吸光值越高代表胞內多醣含量越多。吸收值與多醣含量呈線性關係。其測定較為靈敏及微量，可測定至 0.05 $\mu$ g 之肝醣含量。

參考並修改 Lawrence(1961)及吳(2011)等人之方法，取細胞濃度  $1 \times 10^5$  cell/well 小鼠肝臟 FL83B 細胞培養於 6cm dish，加入不同濃度高良薑乙酸乙酯萃取物之區分 C 處理正常及阻抗細胞 24 小時後，以 500 $\mu$ l trypsin 將細胞切下，再加入 1mL PBS 將細胞收於 15mL 離心管，取 100 $\mu$ l 細胞液進行蛋白質定量，而後加入 500  $\mu$ l 30 % KOH 混合均勻，於 100 $^{\circ}$ C 水浴 20 分鐘，再加入 8mL 95% 酒精，放至 -20 $^{\circ}$ C 冰箱 24 小時，再以 4000rpm 離心 15 分鐘，除去上清液，再置於烘箱中將酒精完全蒸發，將沉澱物復溶於 500 $\mu$ l 二次水中，加入 1 mL 0.2% anthron reagent，置於 100  $^{\circ}$ C 水浴 20 分鐘，最後以分光光度計檢測波長 620nm 下之吸光值。

#### 4-4-13 蛋白質定量

原理：利用蛋白質定量套組 BCA<sup>TM</sup> 進行定量。BCA (Bicinchoninic acid) 在試劑中是以水溶性鈉鹽存在，其對亞銅離子 ( $\text{Cu}^+$ ) 具靈敏，穩定且具高專一性，當在鹼性環境下，蛋白質會使試劑中的二價銅離子還原為單價亞銅離子，此時兩分子的 BCA 會對單價亞銅離子進行螯合並呈色為藍紫色，並檢測波長 562nm 之吸光值，當吸光值越高代表所含總蛋白質濃度愈高。

將 FL83B 細胞所抽取之蛋白，序列稀釋至適當的稀釋倍數後，取出 10  $\mu$ l 稀釋樣品與 200  $\mu$ l 的試劑(Reagent A : B = 49 : 1)混合均勻

於於 37 °C 下反應 30 min，再以 ELISA reader 檢測波長 562 nm 之吸光值。由 BSA 標準品得到標準曲線即可估算出細胞中總蛋白質濃度( $\mu\text{g/mL}$ )。

#### 4-4-14 統計分析

實驗結果所得之數據均為三重複，以平均值  $\pm$  標準偏差 (Mean  $\pm$  SD) 表示，並採用 Statistical Analysis System (SAS) 9.0 版之統計軟體進行變異數分析 (ANOVA) 與 Duncan's multiple range test 分析，比較組間的顯著差異程度。

## 第五章、結果

### 5-1 高良薑乙酸乙酯萃取物抗氧化成分之分離純化

#### 5-1-1 高良薑萃取物之產率

本實驗使用浸漬萃取方法，將 3,337 g 乾燥中藥高良薑粉末，依序使用 15 公升的正己烷、乙酸乙酯、甲醇於室溫下進行萃取，所得的萃取液利用旋轉式減壓濃機在低於 40°C 下濃縮，即獲得正己烷、乙酸乙酯及甲醇萃取物，再進行總酚、總類黃酮含量及抑制脂質自氧化能力測定。三種溶劑萃取物之產率如表十一所示，以甲醇萃取物的產率最高，約有 8.71%，其次為乙酸乙酯萃取物 3.55%，而正己烷萃取物約 2.13%。

#### 5-1-2 高良薑萃取物之總酚類化合物含量

由文獻得知植物之多酚類化合物對於抗氧化性與其生物活性扮演重要之角色(Castelluccio *et al.*, 1995; Kalt *et al.*, 1999)，Folin-Ciocalteu's assay 為一種廣泛應用於測量總酚類化合物的方法，Folin-Ciocalteu's phenol reagent 可作用於酚類化合物結構上的 OH 基，並產生由黃變藍的呈色反應(Julkunen-Titto, 1985)。本實驗以 gallic acid 作為標準品，換算相對 gallic acid 之量。將三種溶劑(正己烷、乙酸乙酯、甲醇)萃取物，進行總酚類化合物含量分析，從實驗結果(圖十六)顯示乙酸乙酯萃取物約為甲醇萃取物的 1.73 倍與正己烷萃取物的 2.86 倍。高良薑三種萃取物中，乙酸乙酯萃取物具有最高的總酚含量。

#### 5-1-3 高良薑萃取物之總類黃酮含量

類黃酮(flavonoids)屬於酚類化合物之類物質，存在於許多蔬菜、水果中，類黃酮化合物於鹼性條件下可與硝酸鋁形成穩定的黃色錯合

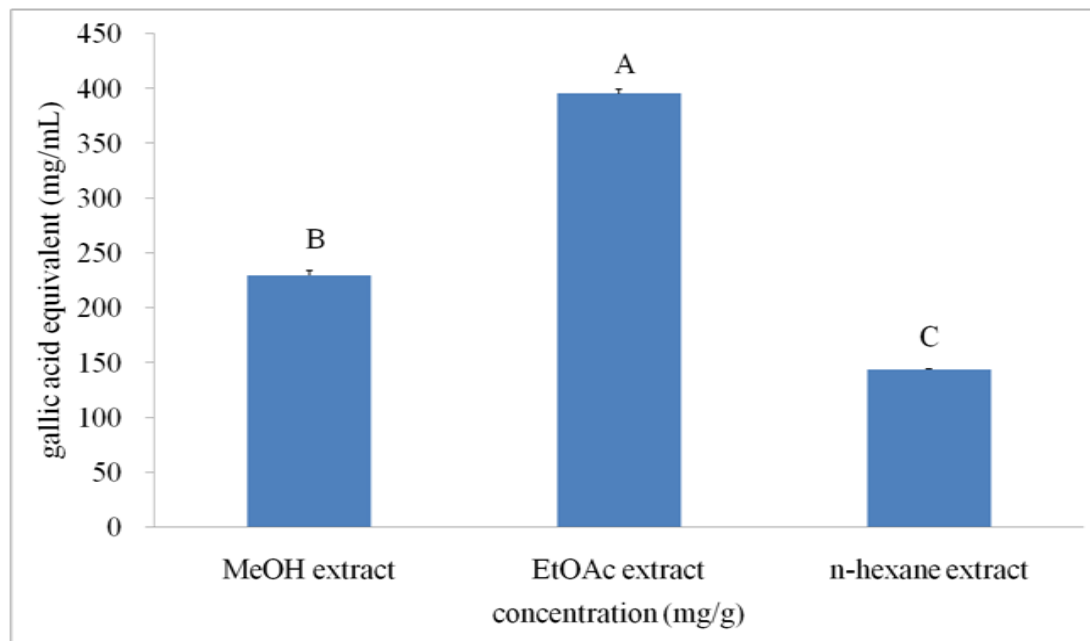


表十一、高良薑三種溶劑萃取物之產率

Table 11 Yields of three solvent extracts from *A. officinarum* rhizome.

Extract	Weight (g)	Yield (%) <sup>a</sup>
n-hexane	71.07	2.13
EtOAc	118.46	3.55
MeOH	290.65	8.71
Total	480.18	14.39

<sup>a</sup>. Sample weight : 3,337 g



圖十六、高良薑三種溶劑萃取物之總酚含量。

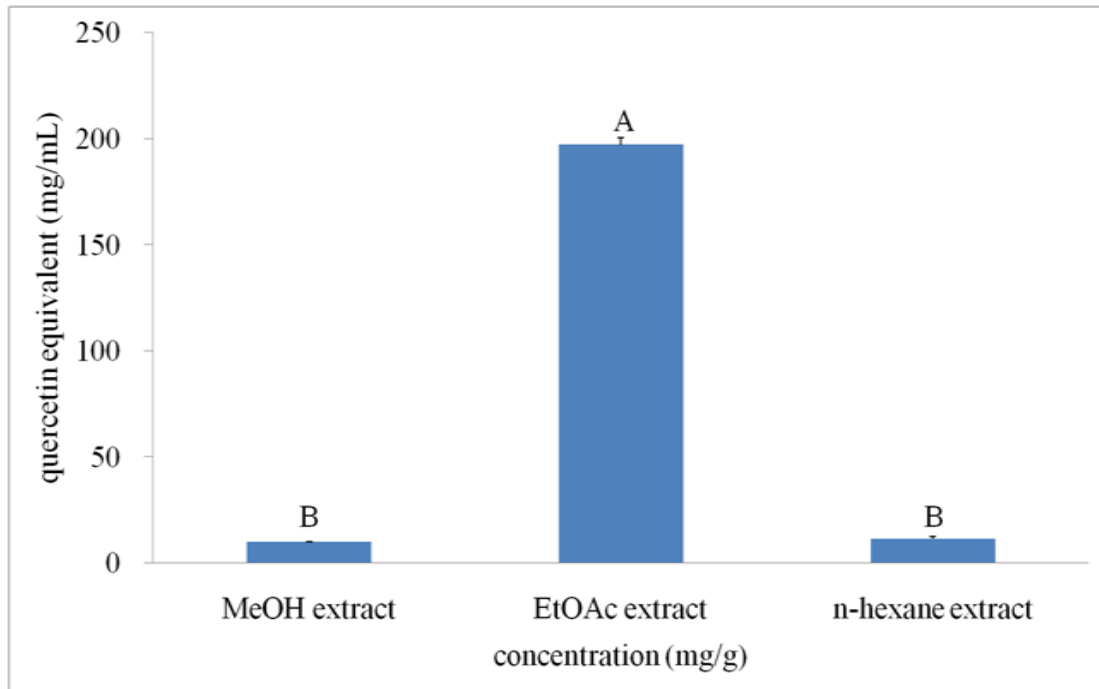
Fig. 16 The total phenolic compound contents of three solvent extracts from *A. officinarum* rhizome. Bars represent means $\pm$ SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

物(唐等人, 1996; 鍾, 2003)。本實驗以 quercetin 作為標準品, 換算相對 quercetin 之量。將三種溶劑(正己烷、乙酸乙酯、甲醇)萃取物, 進行總類黃酮化合物含量分析, 從實驗結果(圖十七)顯示高良薑乙酸乙酯萃取物具有最高的總類黃酮含量, 約為正己烷與甲醇萃取物的 19 倍。

#### 5-1-4 高良薑萃取物之脂質自氧化抑制能力 (ferric thiocyanate assay)

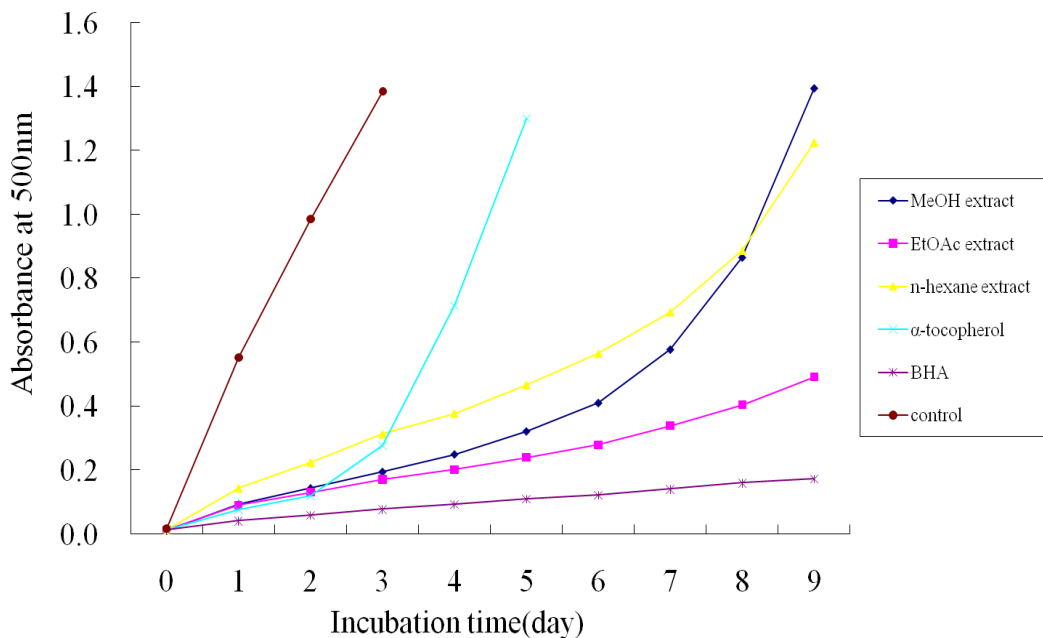
本實驗利用硫氰酸鐵法檢測三種溶劑(正己烷、乙酸乙酯、甲醇)萃取物之抗氧化性(圖十八)。油脂自氧化過程中會產生脂質過氧化物, 脂質過氧化物會使二價鐵氧化成三價鐵, 三價鐵再與硫氰酸根反應生成紅色錯合物(滿田等人, 1967; 蘇等人, 1991), 經由每天偵測其抑制脂質自氧化能力所形成之趨勢來判定其抗氧化性。抗氧化性檢測結果顯示, 抗氧化能力強至弱依序為 BHA、乙酸乙酯萃取物、甲醇萃取物、正己烷萃取物、 $\alpha$ -生育醇、對照組。三種萃取物中, 以高良薑乙酸乙酯萃取物之抗氧化性最好, 具有趨近於 BHA 且強於  $\alpha$ -生育醇之抗氧化性。

綜合總酚含量、總類黃酮含量及抑制脂質自氧化能力分析, 結果都顯示高良薑乙酸乙酯萃取物具有最好的抗氧化性, 因此選取高良薑乙酸乙酯萃取物進行以下一系列的分離、純化及結構鑑定。



圖十七、高良薑三種溶劑萃取物之總類黃酮含量。

Fig. 17 The total flavonoid contents of three solvent extracts from *A. officinarum* rhizome. Bars represent means $\pm$ SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.



圖十八、高良薑三種溶劑萃取物利用硫氰酸鐵法檢測其抗氧化性。

Fig. 18 Antioxidative activities of three solvent extracts from *A. officinarum* rhizome by ferric thiocyanate assay.

### 5-1-5 高良薑乙酸乙酯萃取物抗氧化成分之分離與純化

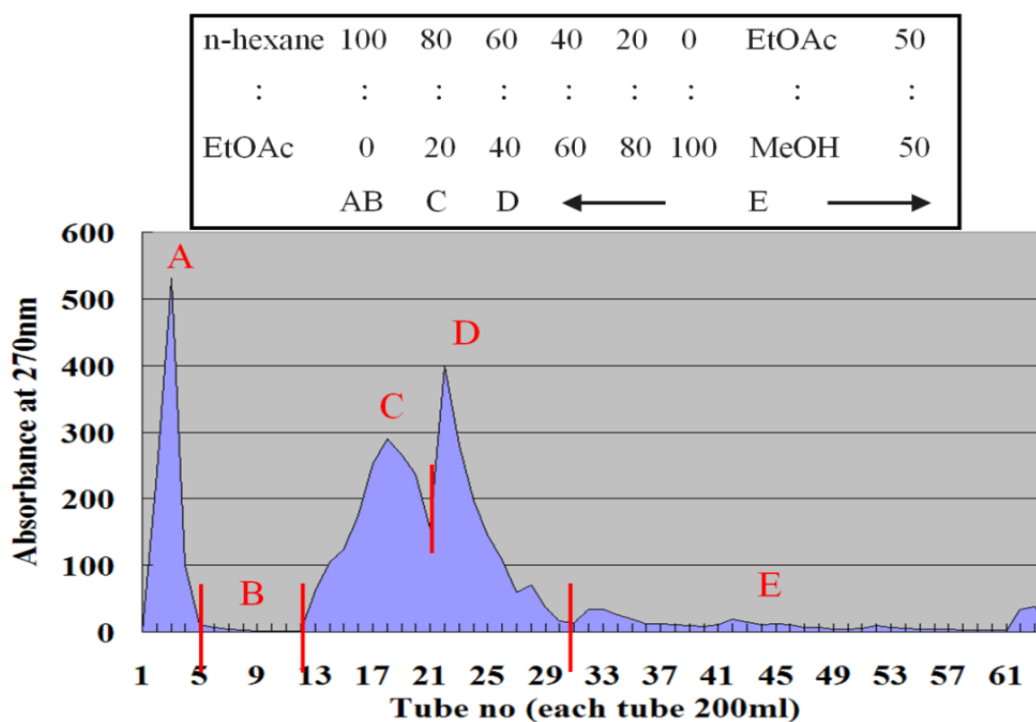
#### 5-1-5-1 乙酸乙酯萃取物之矽膠液相管柱層析

高良薑乙酸乙酯萃取物預先以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，因其在波長 270nm 具有最大吸收值，故選取 270nm 為液相管柱層析物質之偵測波長。首先將 silica gel 充填於玻璃管柱(700 × 45 mm)進行第一次液相管柱層析，其沖提條件依序為正己烷：乙酸乙酯(v/v)=100：0、80：20、60：40、40：60、20：80、0：100、乙酸乙酯：甲醇(v/v)=50：50 之混合溶劑，沖提液以每瓶 200mL 為收集單位，以波長 270nm 之吸光值對收集瓶做圖，共取 5 個區分，將 5 個區分物依序命名為區分 A、B、C、D、E(圖十九)。各區分約佔乙酸乙酯萃取物的百分比分別為 26.86%、0.52%、20.31%、33.73%、18.58%。將 5 個區分物進行硫氰酸鐵法之抗氧化性檢測結果顯示(圖二十)，抗氧化能力為 BHA > 區分 C > 區分 E > 區分 D > 區分 A > 區分 B >  $\alpha$ -生育醇 > 對照組，五個區分物中，以區分 C 具有最好的抗氧化性，且抗氧化能力趨近於 BHA，因此將區分 C 進行更進一步分析。

#### 5-1-5-2 區分物 C 之 XAD-2 液相管柱層析

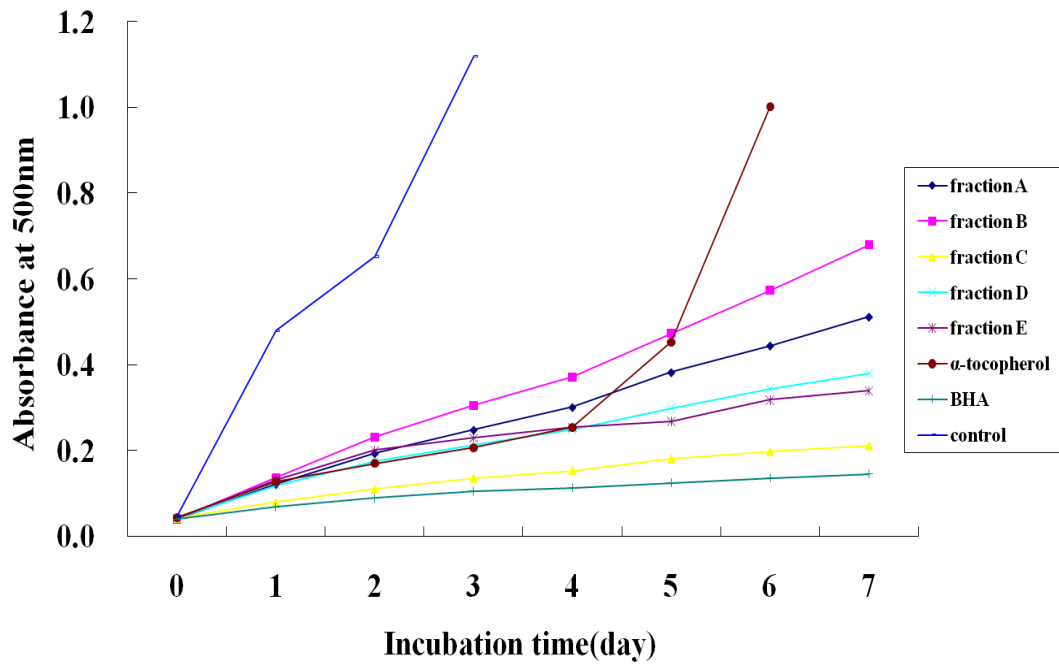
如同上述，預先以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，因其在波長 270nm 具有最大吸收值，故選取 270nm 為偵測波長。將上述區分 C 置入充填著 XAD-2 膠體之玻璃管柱(700 × 45 mm)進行第二次液相管柱層析，其沖提條件依序為水：甲醇(v/v)=100：0、80：20、60：40、40：60、0：100、乙酸乙酯：甲醇(v/v)=50：50 之混合溶劑，沖提液以每瓶 200mL 為收集單位，以波長 270nm 之吸光值對收集瓶做圖，共取 4 個區分將 4 個區分物依序命名為區分 C-1、C-2、C-3、C-4(圖二十一)。各區分約佔乙酸乙酯萃取物區分 C 的百分比分別為 0.28%、1.31%、93.69%、4.72%。將 4 個區分物進行硫氰酸鐵法之抗氧化性

檢測結果顯示(圖二十二)，其抗氧化能力為 BHA > 區分 C-3 > 區分 C-4 ≥ 區分 C-1 > α-生育醇 > 區分 C-2 > 對照組，其中區分 C-3 之抗氧化能力依然強於 α-生育醇且趨近於 BHA，所以選擇區分 C-3 做更進一步之 HPLC 分離及純化其內主要的抗氧化成分。

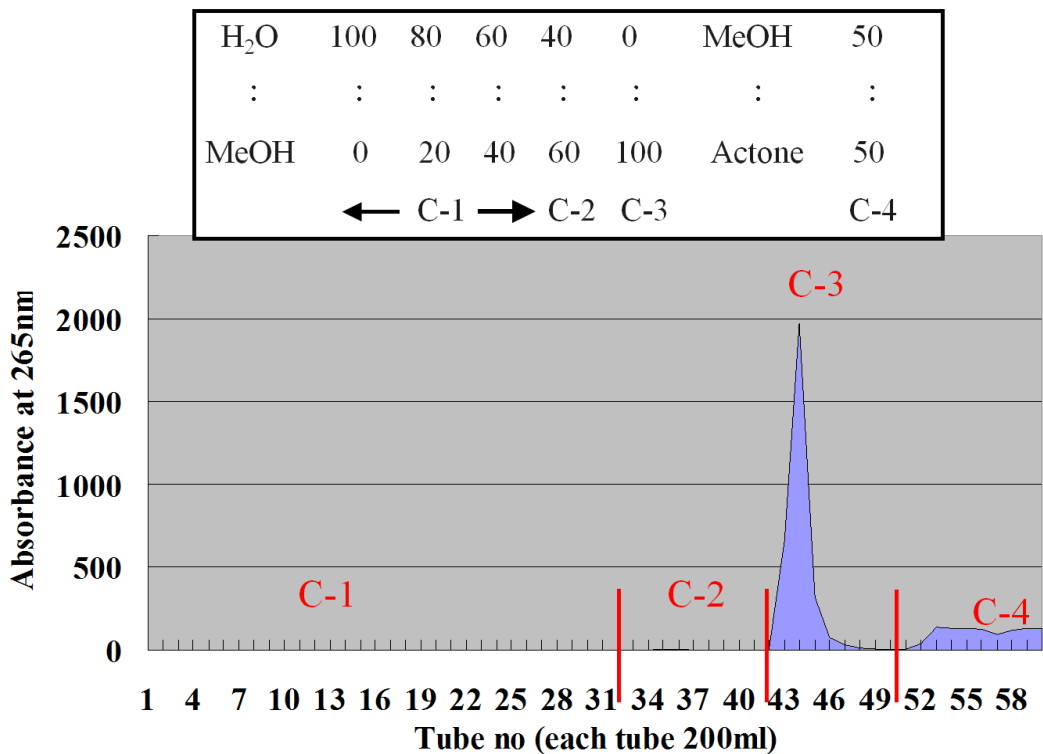


圖十九、高良薑乙酸乙酯萃取物之矽膠液相管柱層析圖。

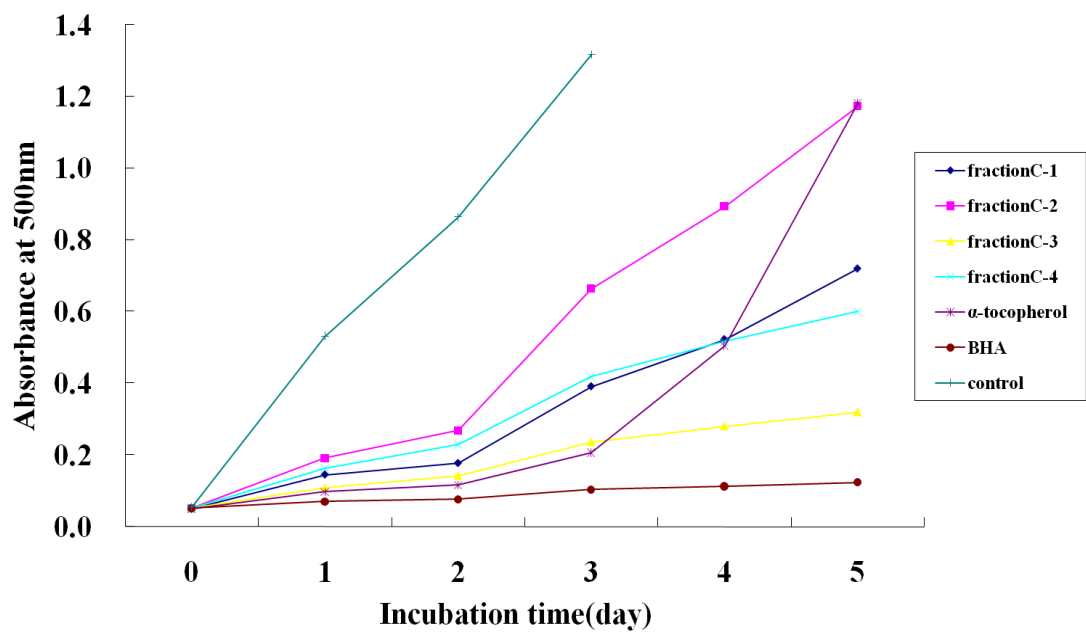
Fig. 19 Silica gel liquid chromatogram of eluted fraction from EtOAc extract of *A. officinarum* rhizome.



圖二十、高良薑乙酸乙酯萃取物各沖提區分之硫氰酸鐵法抗氧化性測定。  
 Fig. 20 Antioxidative activities of eluted fraction from EtOAc extract of *A. officinarum* rhizome by ferric thiocyanate assay.



圖二十一、高良薑乙酸乙酯萃取物區分 C 之 XAD-2 液相管柱層析圖。  
 Fig. 21 XAD-2 liquid chromatogram of eluted fraction C from EtOAc extract of *A. officinarum* rhizome.



圖二十二、高良薑乙酸乙酯萃取物區分 C 各沖提區分之硫氰酸鐵法抗氧化性測定。

Fig. 22 Antioxidative activities of eluted fraction from fraction C of EtOAc extract of *A. officinarum* rhizome by ferric thiocyanate assay.

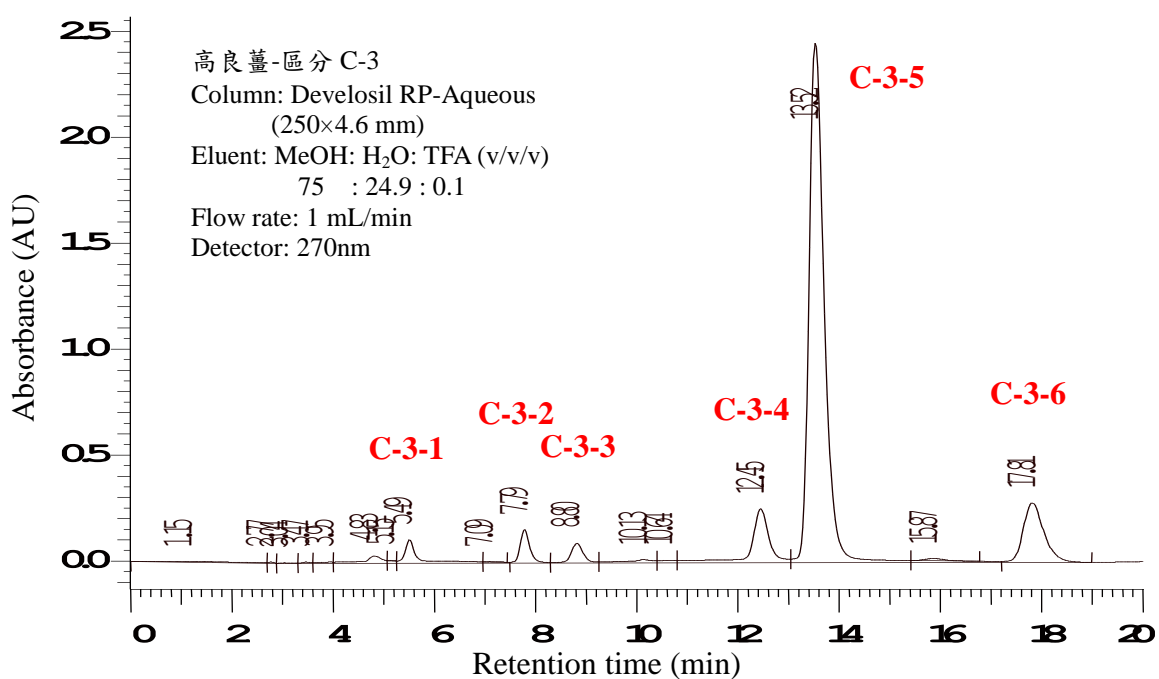
### 5-1-5-3 區分物 C-3 之 HPLC 分析

首先將高良薑乙酸乙酯萃取物區分 C-3，預先以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，因其在波長 270nm 具有極大吸收值，依舊選取 270nm 為偵測波長。將高良薑乙酸乙酯萃取物之區分 C-3 濃縮至乾，爾後溶於甲醇中，並經由 0.45 $\mu$ m 之過濾膜過濾後進行 HPLC 分析。區分 C-3 先以分析型高效液相層析儀找尋比較良好的分離條件為去離子水：甲醇：三氟醋酸(v/v/v)=24.9：75：0.1，流速 1mL/min，偵測波長為 UV 270nm，管柱為 Develosil RP-Aqueous (C30-UG)結果顯示於(圖二十三)，將圖中 6 個主要波峰，依序命名為區分 C-3-1、C-3-2、C-3-3、C-3-4、C-3-5 及 C-3-6，再利用相同的移動相與波長條件，流速為 4.5 mL/min 之製備型高效液相層析儀進行分離，同樣具有 6 個主要波峰，重複收集層析圖上滯留時間相同波峰之沖提區分，從上述區分中獲得到純化物質 1、2、3、4、5、6 (圖二十四、二十五、二十六、二十七、二十八、二十九)。將 6 種純化物質進行 UV、MS、<sup>1</sup>H-NMR 及 <sup>13</sup>C-NMR 的光譜測定，經光譜解析後進行結構鑑定。

從 HPLC 光譜圖中，分析區分 C-3 中 6 種純化物質所佔之百分比分別為 3.03%(1)、2.84%(2)、2.11%(3)、8.37%(4)、69.02%(5)、10.58%(6)，其中以純化物質 5 所佔比例最高。HPLC 分離與純化過程中，為了使區分 C-3 能完全溶解，所以添加了少許氯仿，結果反而不利於純化物質 4、5、6 之分離，其波峰之間有難以分開之現象，即使添加酸也無法將其分離。文獻中指出從高良薑萃取物中分離出 galangin、3-O-methyl galangin、kaempferide 及 diarylheptanoids 等物質(Matusuda, 2006；Tao, 2006；An, 2010)，其中有些物質為立體異構物，所以推測可能區分 C-3 可能具有立體異構物或結構類似之物質，使用一般傳統常用之 C<sub>18</sub> 管柱可能較不容易進行物質之分離，所以選用對於立體異

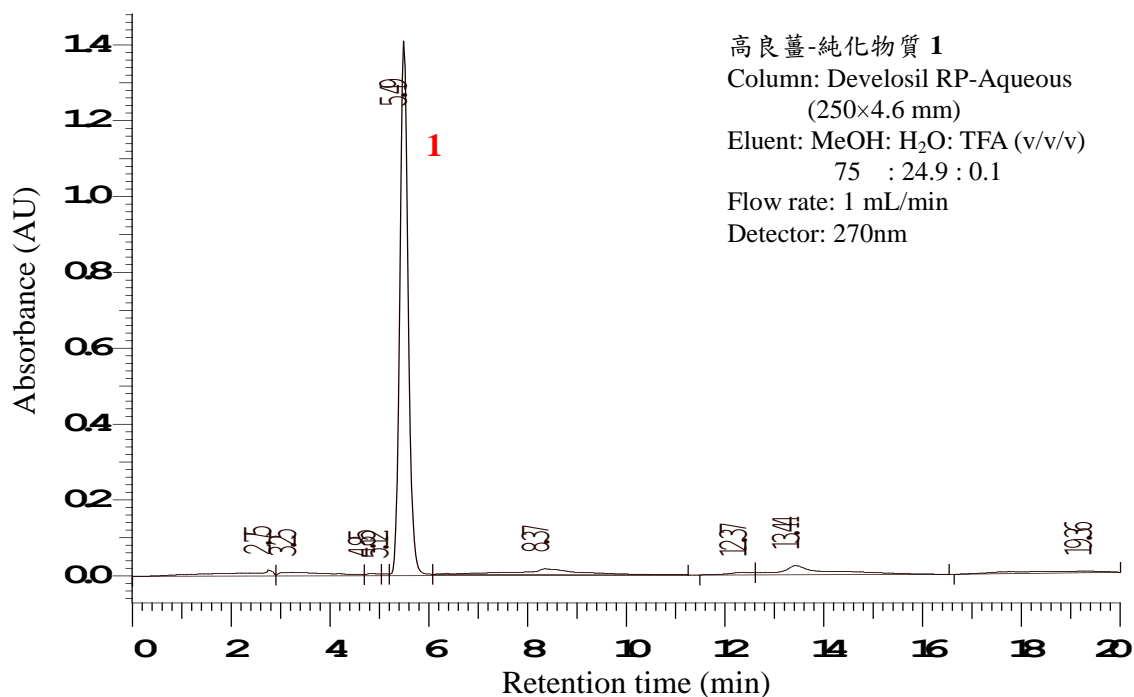


構物具有高選擇性特點之 C<sub>30</sub> 長烷基鏈管柱來進行分離與純化，結果順利從區分 C-3 中分離出六種具強抗氧化性之物質。



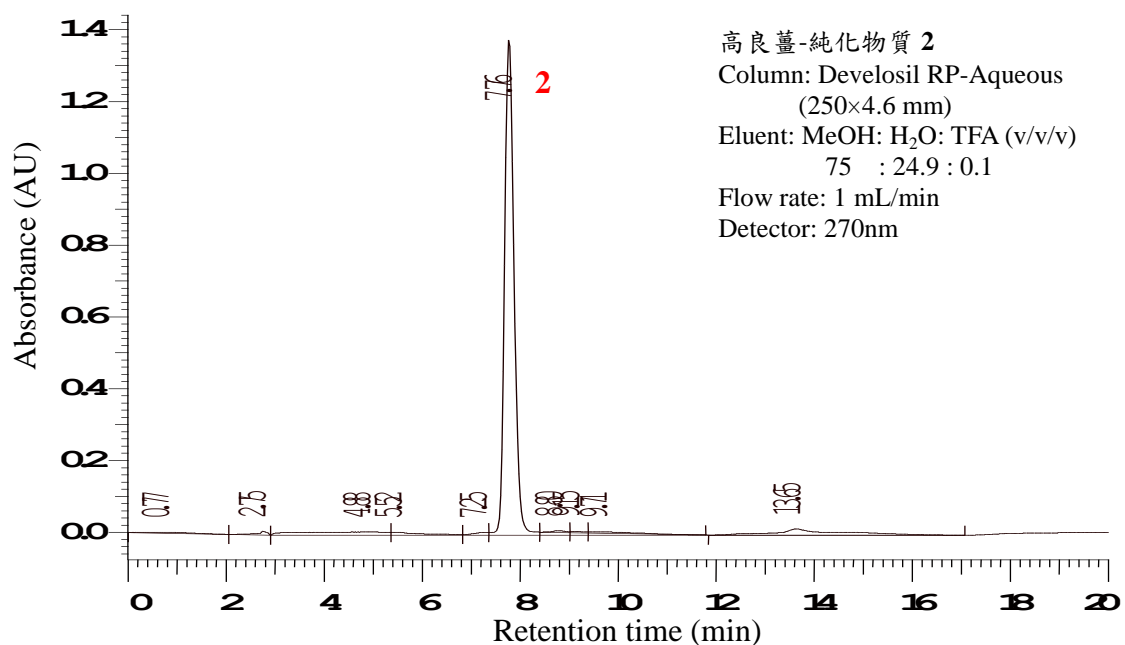
圖二十三、高良薑乙酸乙酯萃取物區分 C-3 之分析型 HPLC 圖。

Fig. 23 Analytical HPLC chromatogram of isolated component from C-3 fraction of EtOAc extract of *A. officinarum* rhizome.



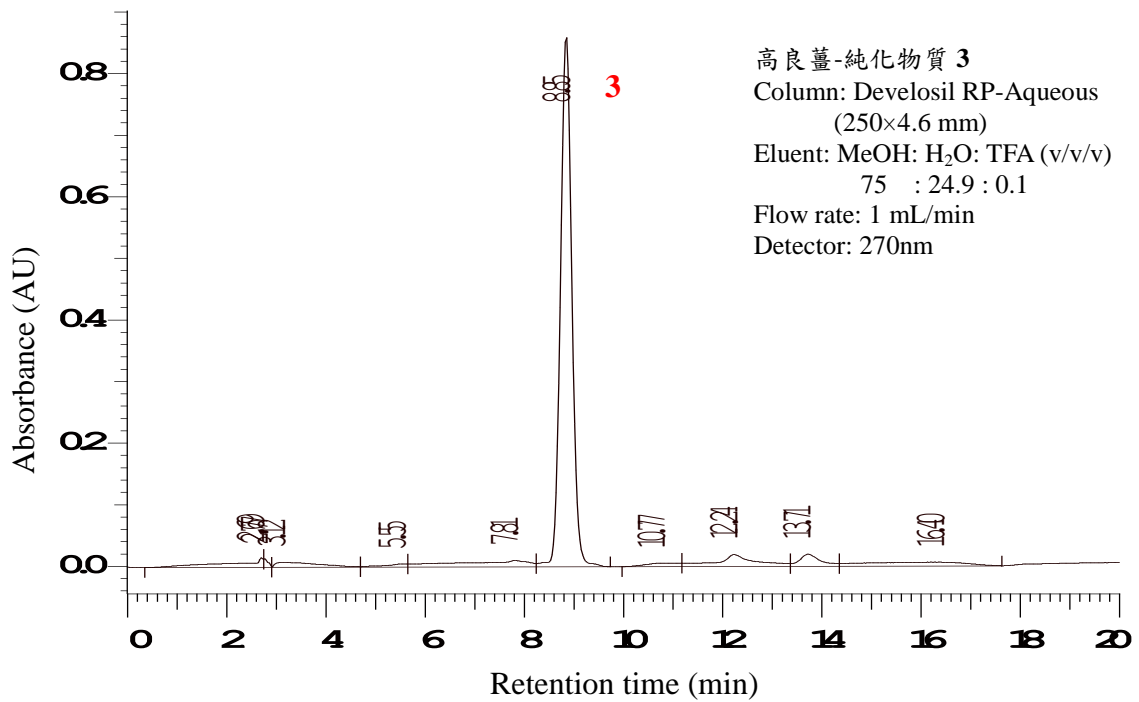
圖二十四、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 1 之分析型 HPLC 圖。

Fig. 24 Analytical HPLC chromatogram of isolated component 1 from EtOAc extract of *A. officinarum* rhizome.



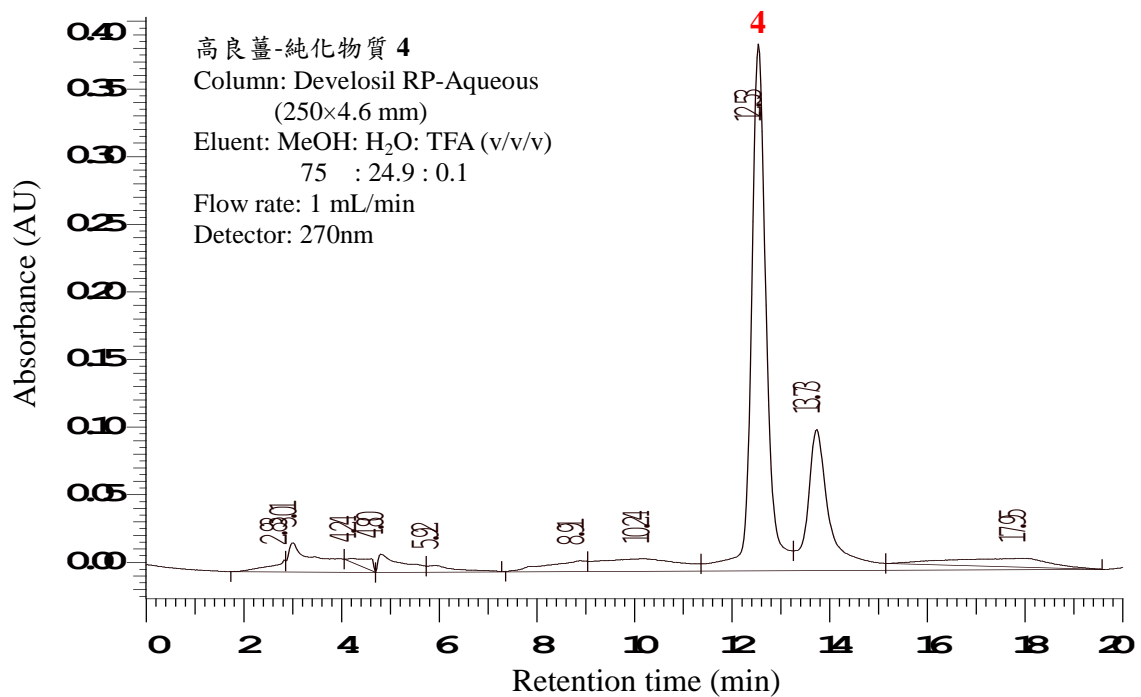
圖二十五、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 2 之分析型 HPLC 圖。

Fig. 25 Analytical HPLC chromatogram of isolated component 2 from EtOAc extract of *A. officinarum* rhizome.



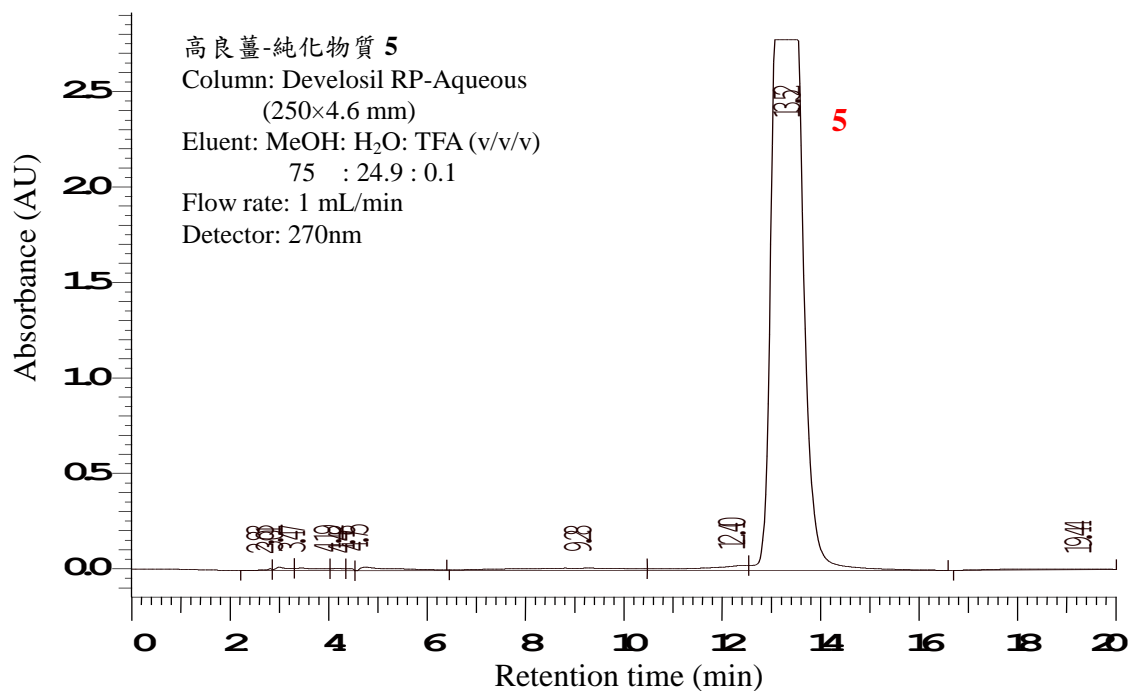
圖二十六、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 3 之分析型 HPLC 圖。

Fig. 26 Analytical HPLC chromatogram of isolated component 3 from EtOAc extract of *A. officinarum* rhizome.



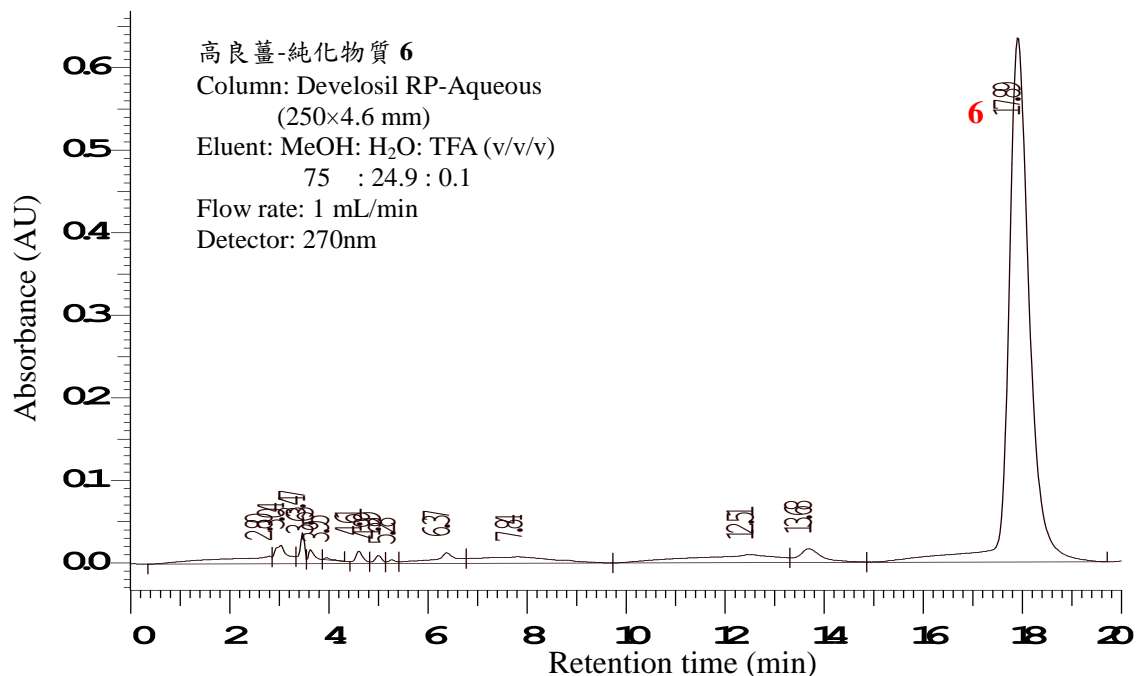
圖二十七、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 4 之分析型 HPLC 圖。

Fig. 27 Analytical HPLC chromatogram of isolated component 4 from EtOAc extract of *A. officinarum* rhizome.



圖二十八、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 5 之分析型 HPLC 圖。

Fig. 28 Analytical HPLC chromatogram of isolated component 5 from EtOAc extract of *A. officinarum* rhizome.



圖二十九、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 6 之分析型 HPLC 圖。

Fig. 29 Analytical HPLC chromatogram of isolated component 6 from EtOAc extract of *A. officinarum* rhizome.

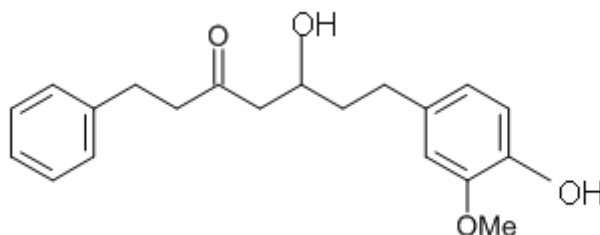
#### 5-1-5-4 純化物質之結構鑑定

##### (1) 純化物質 1 之結構鑑定

純化物質 1 為黃色油狀物，由 UV-Visible 吸光光譜顯示  $\lambda_{\max}(\text{MeOH})$  204, 283nm (圖三十)，顯示出苯環衍生物之特徵吸光光譜。204nm 為苯環 K-band 的特徵吸收帶，283nm 為苯環 R-band 的吸收帶。從氫譜  $^1\text{H-NMR}$  光譜圖可判斷化學位移  $\delta$  具有三組質子波訊， $\delta$  1.68, 2.55, 2.58, 2.60, 2.81 為飽和碳上質子波訊， $\delta$  3.81 為  $-\text{OCH}_3$  之質子波訊， $\delta$  6.61(1H, d,  $J=1.8\text{Hz}$ , H-2') 為苯環 2'-H 之波訊， $\delta$  6.72(1H, d,  $J=1.8, 7.8\text{Hz}$ , H-6') 為苯環 6'-H 之波訊， $\delta$  6.95(1H, d,  $J=7.8\text{Hz}$ , H-5') 為苯環 5'-H 之波訊。這三組波訊為典型 ABX 耦合質子波訊， $\delta$  7.13-7.23 為苯環單取代的 5 個質子波訊(圖三十一)。

$^{13}\text{C-NMR}$  光譜低磁場領域亦顯示 1, 3, 4 三取代及單取代的兩組苯環碳原子波訊。 $\delta$  211.47 為酮基碳原子波訊，高磁場領域  $\delta$  30.93, 31.92, 32.39, 40.53, 51.20 為飽和烷基之碳原子波訊， $\delta$  68.22 推測為接上 OH 基之烷基碳原子波訊。綜合以上光譜解析，並比對文獻(Itokawa, 1981; Zhang, 2010; Sun, 2008)，純化物質 1 的結構鑑定為 1-hydroxy-7-(4''-hydroxy-3''-methoxyphenyl)-3- heptanone。經由老鼠實驗證實 1-hydroxy-7-(4''-hydroxy-3''-methoxyphenyl)-3- heptanone 具有抗發炎之效果，其抑制 50% 劑量為  $1.8 \mu\text{mol/ear}$  (Yasukawa, 2008)。

**1: 1-hydroxy-7-(4''-hydroxy-3''-methoxyphenyl)-3-heptanone**



**Structure of 1**

UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) nm: 204, 283

LC-MS (m/z): 327[M+H]<sup>+</sup>

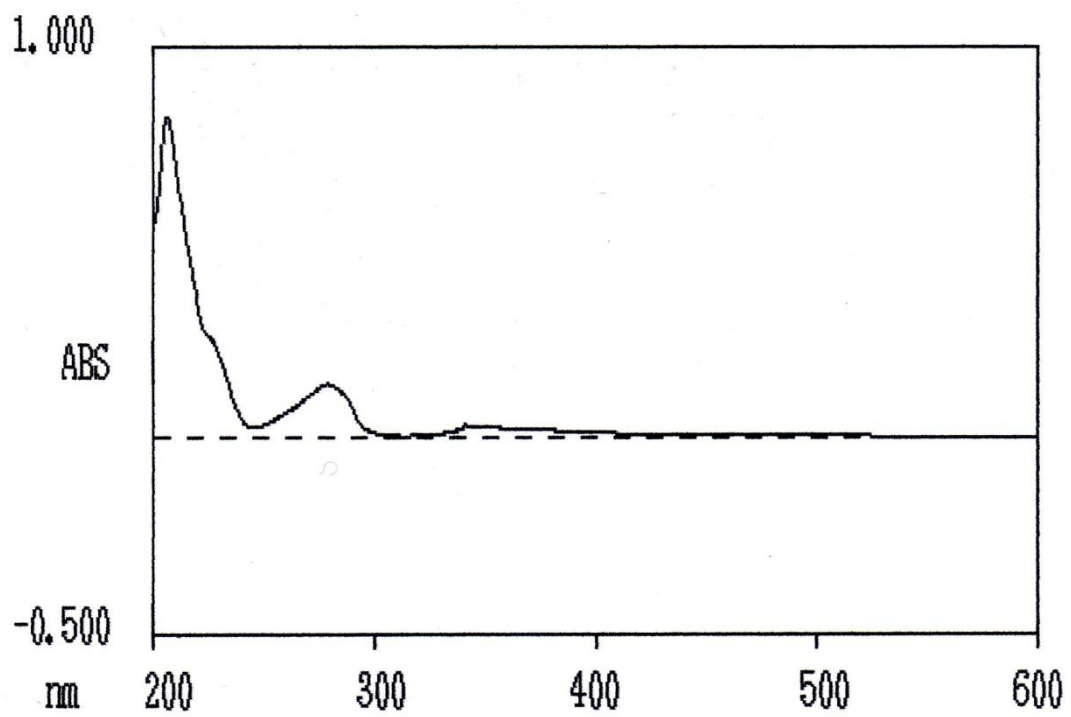
Formula: C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>

<sup>1</sup>H-NMR(300MHz, methanol-d<sub>4</sub>):  $\delta$

1.68(2H, m, H-6), 2.55(1H, m, H-7b), 2.58(2H, m, H-4), 2.60(1H, m, H-7a), 2.81(4H, m, H-1 and H-2), 3.81(3H, s, OCH<sub>3</sub>), 4.00(1H, m, H-5), 6.61(1H, d, J=1.8Hz, H-2''), 6.72(1H, d, d, 1.8, 7.8Hz, H-6''), 6.95(1H, d, J=7.8Hz, H-5''), 7.13-7.23(5H, m, 1-phenyl protons)

<sup>13</sup>C-NMR(75MHz, methanol-d<sub>4</sub>):  $\delta$

30.53(C-1), 31.92(C-7), 32.39(C-6), 40.53(C-2), 51.20(C-4), 56.33(OCH<sub>3</sub>), 68.22(C-5), 113.13(C-2''), 116.09(C-5''), 121.78(C-6''), 126.99(C-4''), 129.33(C-2', 6'), 129.41(C-3', 6'), 130.29(C-1''), 142.52(C-1'), 145.51(C-4''), 148.82(C-3''), 211.47(C-3)



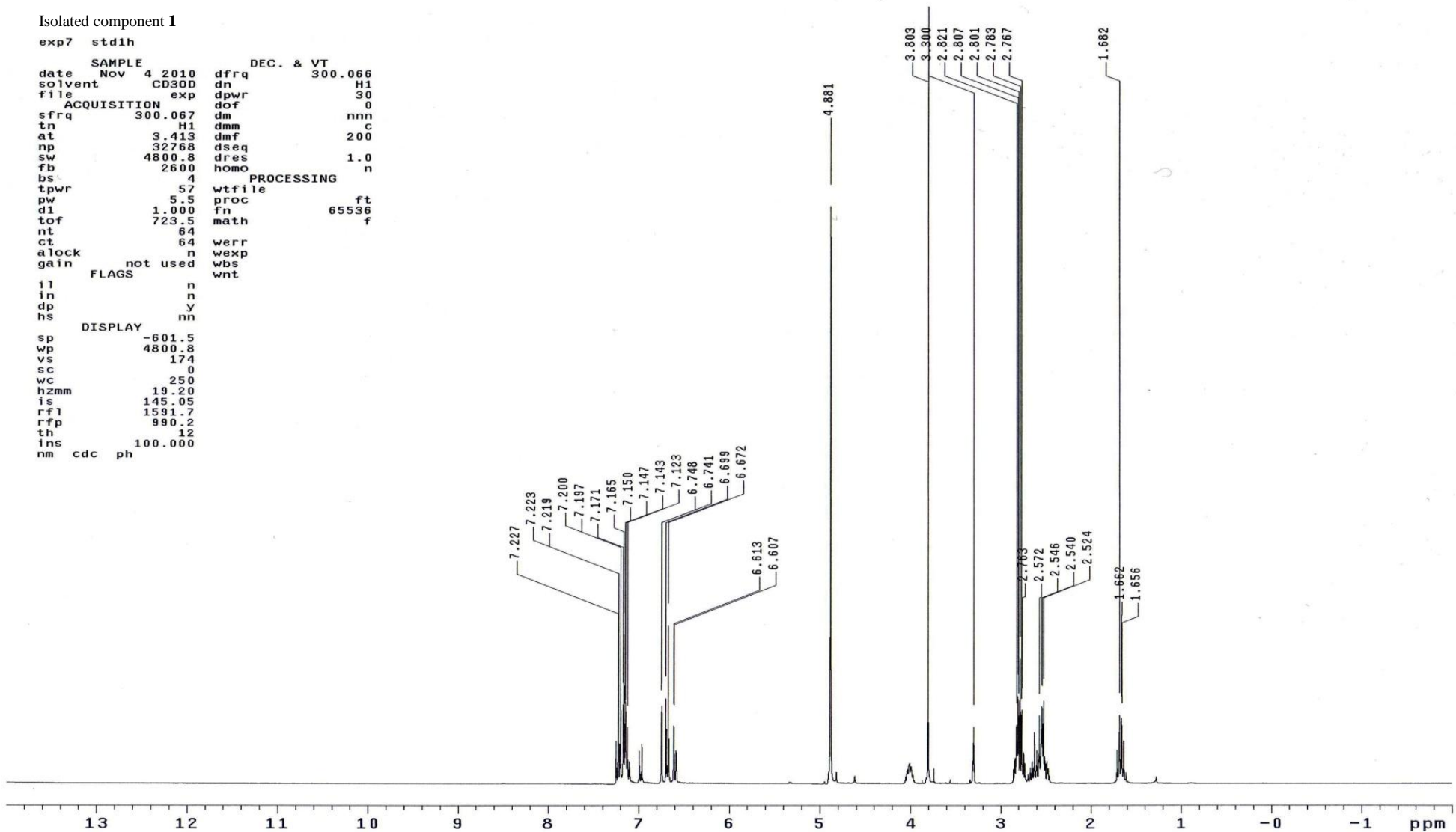
圖三十、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 **1** 之紫外光-可見光譜圖。

Fig. 30 UV-visible spectrum for the isolated component **1** from EtOAc extract of *A. officinarum* rhizome.

Isolated component 1

```

exp7 std1h
SAMPLE
date Nov 4 2010 dfrq 300.066
solvent CD300 dn H1
file exp dpwr 30
ACQUISITION dof 0
sfrq 300.067 dm nmm
tn H1 dmm c
at 3.413 dmf 200
np 32768 dseq
sw 4800.8 dres 1.0
fb 2600 homo
bs 4
tpwr 57 wtfile
pw 5.5 proc ft
d1 1.000 fn 65536
tof 723.5 math f
nt 64
ct 64 werr
alock n wexp
gain not used wbs
FLAGS wnt
il n
in n
dp y
hs nn
DISPLAY
sp -601.5
wp 4800.8
vs 174
sc 0
wc 250
hzmm 19.20
is 145.05
rf1 1591.7
rfp 990.2
th 12
ins 100.000
nm cdc ph
  
```



圖三十一、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 1 之  $^1\text{H}$ -核磁共振光譜圖。

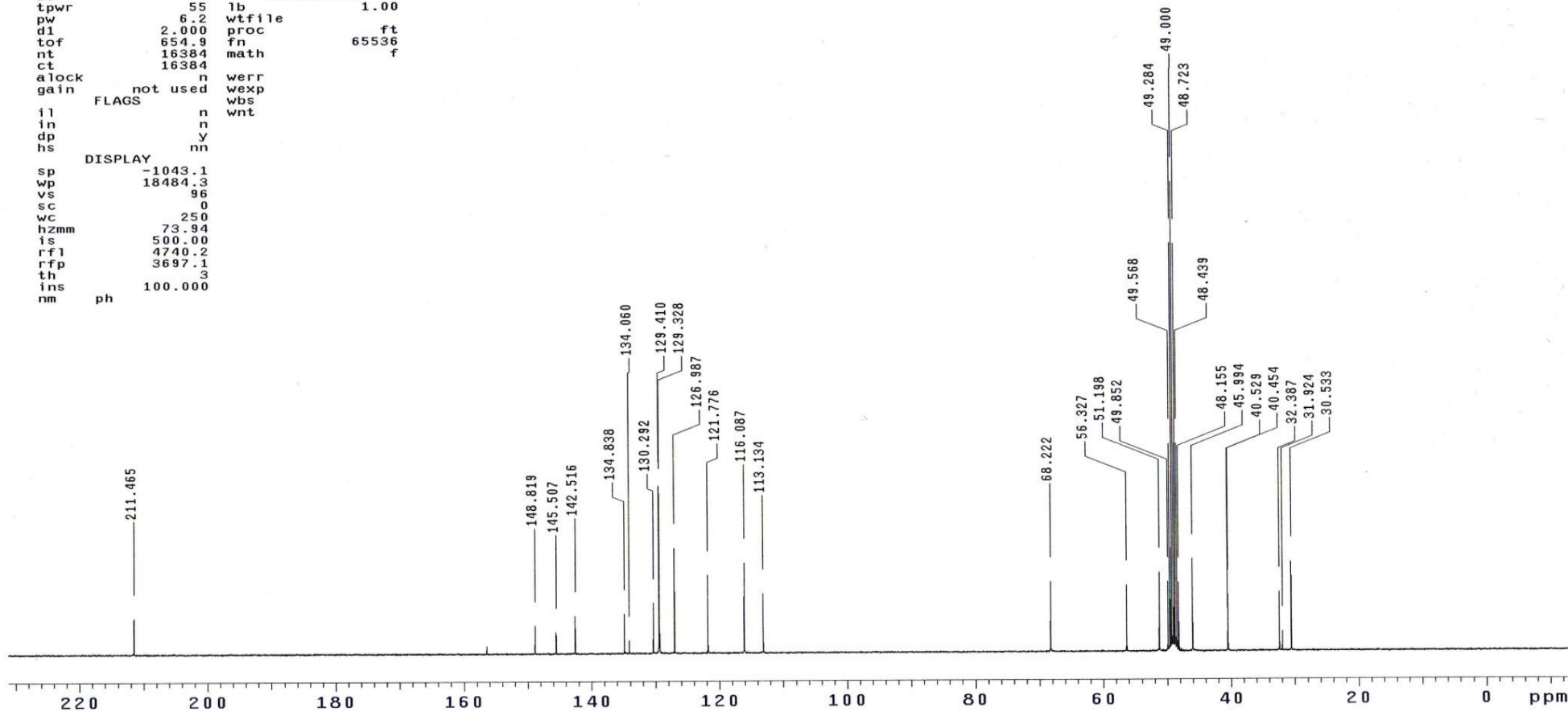
Fig. 31  $^1\text{H}$ -NMR spectrum for the isolated component 1 from EtOAc extract of *A. officinarum* rhizome.



Isolated component 1

```

exp1 std13c
SAMPLE
date Nov 17 2010 dfrq 300.066
solvent CD3OD dn H1
file exp dpwr 41
ACQUISITION dof 0
sfrq 75.460 dm yyy
tn C13 dmm w
at 0.886 dmf 7407
np 32768 dseq
sw 18484.3 dres 1.0
fb 10200 homo n
bs 4
tpwr 55 lb 1.00
pw 6.2 wtfile
dl 2.000 proc
tof 654.9 fn 65536
nt 16384 math f
ct 16384
alock n werr
gain not used wexp
FLAGS wbs
il n wnt
in n
dp y
hs nn
DISPLAY
sp -1043.1
wp 18484.3
vs 96
sc 0
wc 250
hzmm 73.94
is 500.00
rfl 4740.2
rfp 3697.1
th 3
ins 100.000
nm ph
  
```



圖三十二、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 1 之  $^{13}\text{C}$ -核磁共振光譜圖。

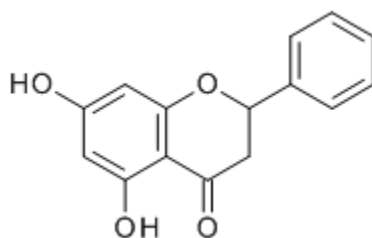
Fig. 32  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum for the isolated component 1 from EtOAc extract of *A. officinarum* rhizome.

## (2) 純化物質 **2** 之結構鑑定

純化物質 **2** 為白色粉末，由 UV-Visible 吸光光譜  $\lambda_{\max}(\text{MeOH})$  212, 285, 337nm(圖三十三)，顯示出類黃酮 A 環及 B 環化合物之特徵吸光光譜。 $^1\text{H-NMR}$  光譜上  $\delta$  2.76(1H, d, d,  $J=3.0, 17.1\text{Hz}$ ),  $\delta$  3.80(1H, d, d,  $J=12.6, 17.1\text{Hz}$ ),  $\delta$  5.45(1H, d, d,  $J=3.0, 12.6$ ), 顯示 flavanone H-2ax, H-2eq 及 H-3 互為耦合的質子波訊， $\delta$  5.89(1H,  $J=2.1\text{Hz}$ ),  $\delta$  5.93 則為 A 環上 H-6 與 H-8 的質子波訊， $\delta$  7.38-7.48(5H, m) 則為 B 環上的 5 個質子波訊(圖三十四)。

$^{13}\text{C-NMR}$  光譜亦支持  $^1\text{H-NMR}$  光譜的推論，綜合以上光譜解析，並比對文獻(Harbone, 1994)推測 **2** 的結構為 5, 7-dihydroxy- flavanone。研究指出 5, 7-dihydroxy- flavanone 具有抑菌、抗氧化、抗發炎、抗癌等活性(Gao et al., 2008 ; Santos et al., 1998 ; Sala et al., 2003 ; Pepeljnjak et al., 1985)。

**2: 5, 7-dihydroxy-flavanone**



**Structure of 2**

UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) nm: 212, 285, 337nm

LC-MS (m/z): 257[M+H]<sup>+</sup>

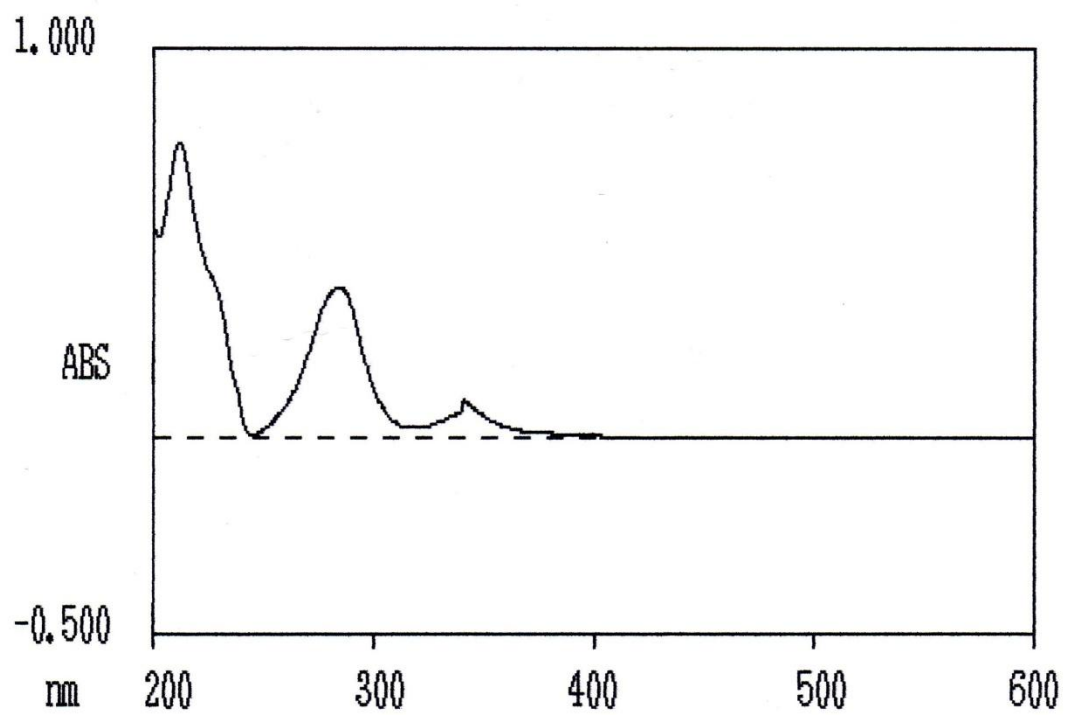
Formula: C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>

<sup>1</sup>H-NMR(300MHz, methanol-d<sub>4</sub>):  $\delta$

2.76(1H, d, d, J=3.0, 17.1Hz, H-3 ax), 3.08(1H, d, d, J=12.6, 17.1Hz, H-3 eq), 5.45(1H, d, d, J=3.0, 12.6, H-2), 5.89(1H, J=2.1Hz, H-6), 5.93(1H, J=2.1Hz, H-8), 7.38(3H, m, H-3', 4' 5'), 7.48(2H, m, H-2', 6')

<sup>13</sup>C-NMR(75MHz, methanol-d<sub>4</sub>):  $\delta$

44.71(C-3), 80.95(C-2), 96.72(C-8), 97.67(C-6), 103.85(C-10), 127.84(C-2', 6'), 130.19, 130.11(C-3', 4', 5'), 140.93(C-1'), 165.15(C-9), 165.98(C-5), 168.97(C-7), 197.79(C-4)



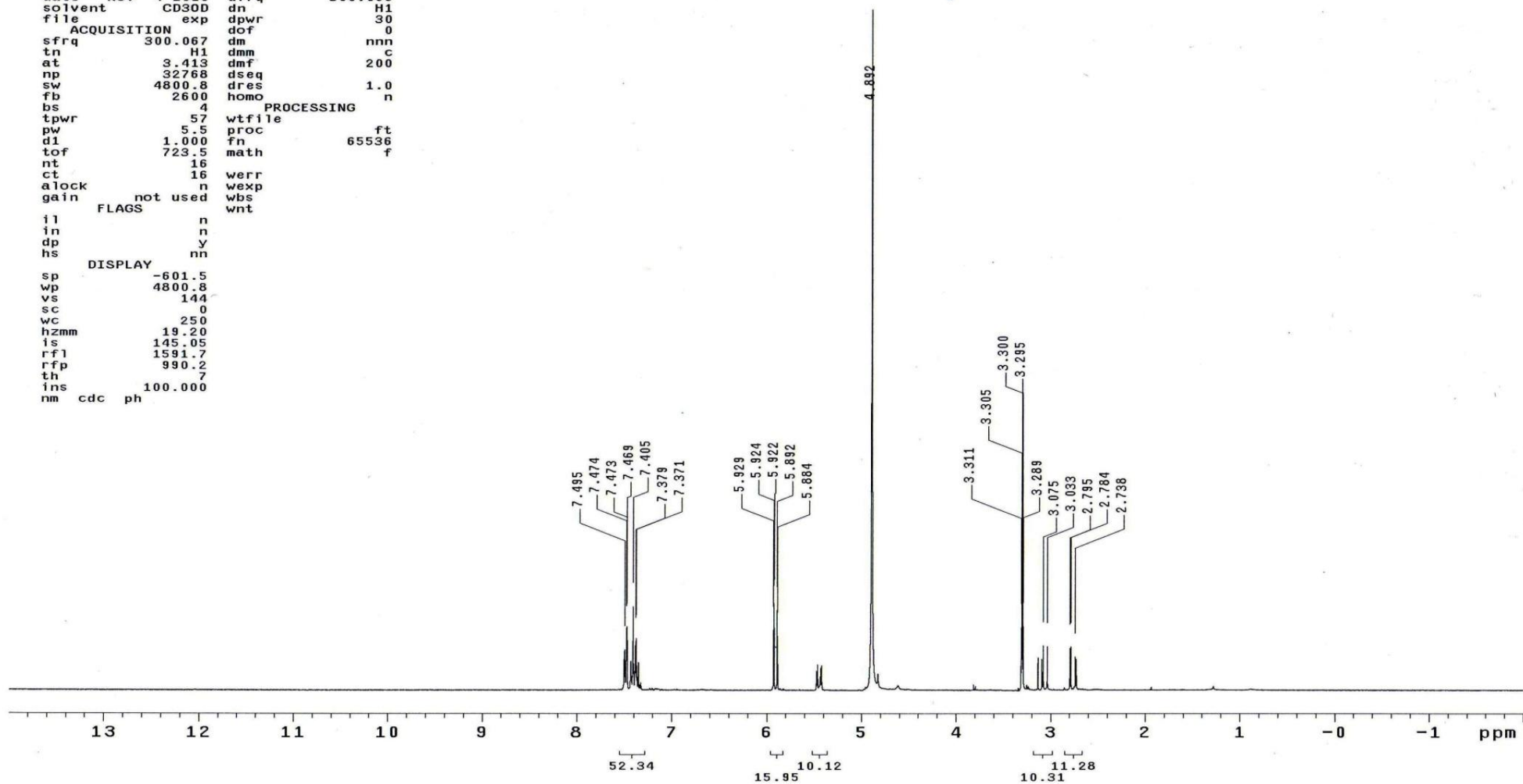
圖三十三、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 2 之紫外光-可見光譜圖。

Fig. 33 UV-visible spectrum for the isolated component 2 from EtOAc extract of *A. officinarum* rhizome.

Isolated component 2

exp1 std1h

```
SAMPLE DEC. & VT
date Nov 4 2010 dfrq 300.066
solvent CD3OD dn H1
file exp dpwr 30
ACQUISITION dof 0
sfrq 300.067 dm nnn
tn H1 dmm c
at 3.413 dmf 200
np 32768 dseq
sw 4800.8 dres 1.0
fb 2600 homo n
bs 4 PROCESSING
tpwr 57 wtfile
pw 5.5 proc ft
d1 1.000 fn 65536
tof 723.5 math f
nt 16
ct 16 werr
alock n wexp
gain not used wbs
FLAGS wnt
il n
in n
dp y
hs nn
DISPLAY
sp -601.5
wp 4800.8
vs 144
sc 0
wc 250
hzmm 19.20
is 145.05
rfl 1591.7
rfp 990.2
th 7
ins 100.000
nm cdc ph
```



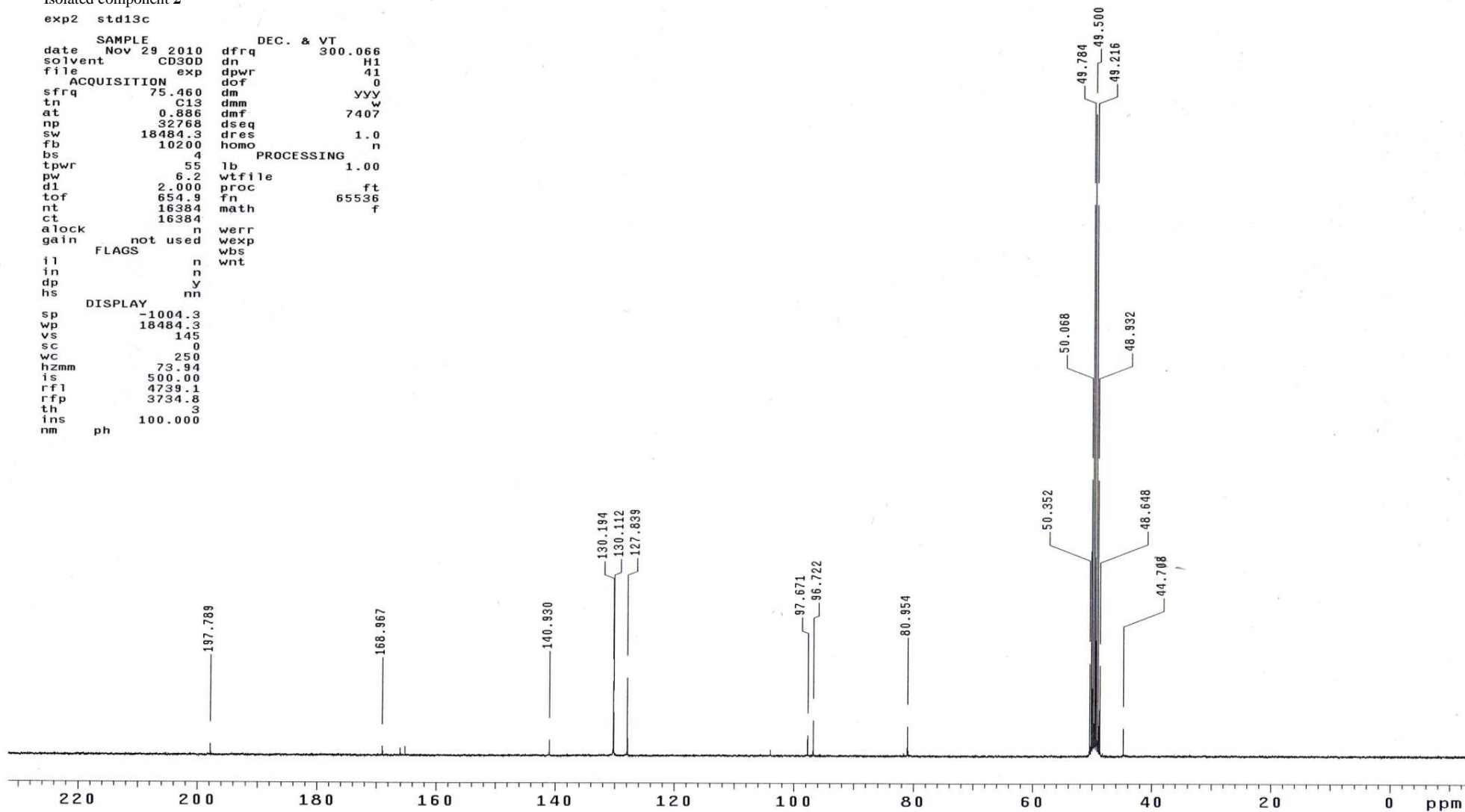
圖三十四、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 2 之  $^1\text{H}$ -核磁共振光譜圖。

Fig. 34  $^1\text{H}$ -NMR spectrum for the isolated component 2 from EtOAc extract of *A. officinarum* rhizome.

Isolated component 2

exp2 std13c

date	Nov 29 2010	dfrq	300.066
solvent	CD3OD	dn	H1
file	exp	dpwr	41
ACQUISITION			
sfrq	75.460	dof	0
tn	C13	dm	yyy
at	0.886	dmm	w
np	32768	dmf	7407
sw	18484.3	dseq	1.0
fb	10200	dres	1.0
bs	4	homo	n
PROCESSING			
tpwr	55	1b	1.00
pw	6.2	wfile	
d1	2.000	proc	ft
tof	654.9	fn	65536
nt	16384	math	f
ct	16384		
alock	not used	n	werr
gain	not used	n	wexp
FLAGS			
il	n	n	wbs
in	n	n	wnt
dp	y		
hs	nn		
DISPLAY			
sp	-1004.3		
wp	18484.3		
vs	145		
sc	0		
wc	250		
hzmm	73.94		
is	500.00		
rfl	4739.1		
rfl	3734.8		
th	3		
ins	100.000		
nm	ph		



圖三十五、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 2 之  $^{13}\text{C}$ -核磁共振光譜圖。

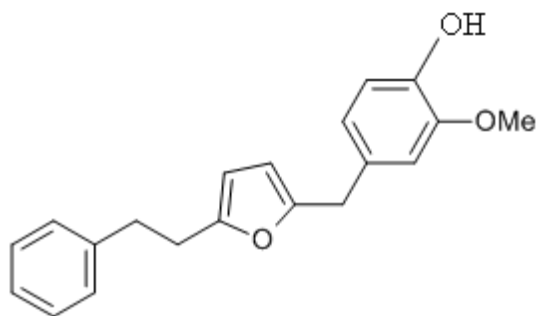
Fig. 35  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum for the isolated component 2 from EtOAc extract of *A. officinarum* rhizome.

### (3) 純化物質 **3** 之結構鑑定

純化物質 **3** 為黃色結晶，由 UV-Visible 吸光光譜  $\lambda_{\max}(\text{MeOH})$  227, 279nm (圖三十六)，顯示出具苯環化合物之特徵吸光光譜。227nm 為苯環 K-band 的吸收帶，279nm 為苯環 R-band 的吸收帶。從  $^1\text{H-NMR}$  光譜圖高磁場領域  $\delta$  2.52, 2.60, 2.86 為烷基飽和碳上三個質子波訊， $\delta$  3.80 為接在苯環上-OCH<sub>3</sub> 的三個質子波訊， $\delta$  6.10(2H, d, J=3.8Hz) 為 furan 環上 H-3, H-4 的質子波訊， $\delta$  6.60(1H, d, J=7.8Hz)、 $\delta$  6.67(1H, d, J=1.8Hz) 及  $\delta$  6.97(1H, d, J=1.8, 7.8Hz) 為苯環 1, 3, 4 取代 ABX 耦合質子波訊，另外一組  $\delta$  7.15-7.22 為芳香族單取代之質子波訊(圖三十七)。

綜合以上光譜資訊，並比對純化物質 **1** 及之光譜資訊文獻(An, 2010)推測 **3** 的結構為 3,6-furan-7-(4''-hydroxy-4''-methoxyphenyl)-1-phenylheptane。

**3: 3,6-furan-7-(4''-hydroxy-4''-methoxyphenyl)-1-phenylheptane**



**Structure of 3**

UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) nm: 202, 227, 279

LC-MS (m/z): 309[M+H]<sup>+</sup>

Formula: C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>

<sup>1</sup>H-NMR(300MHz, methanol-d<sub>4</sub>):  $\delta$

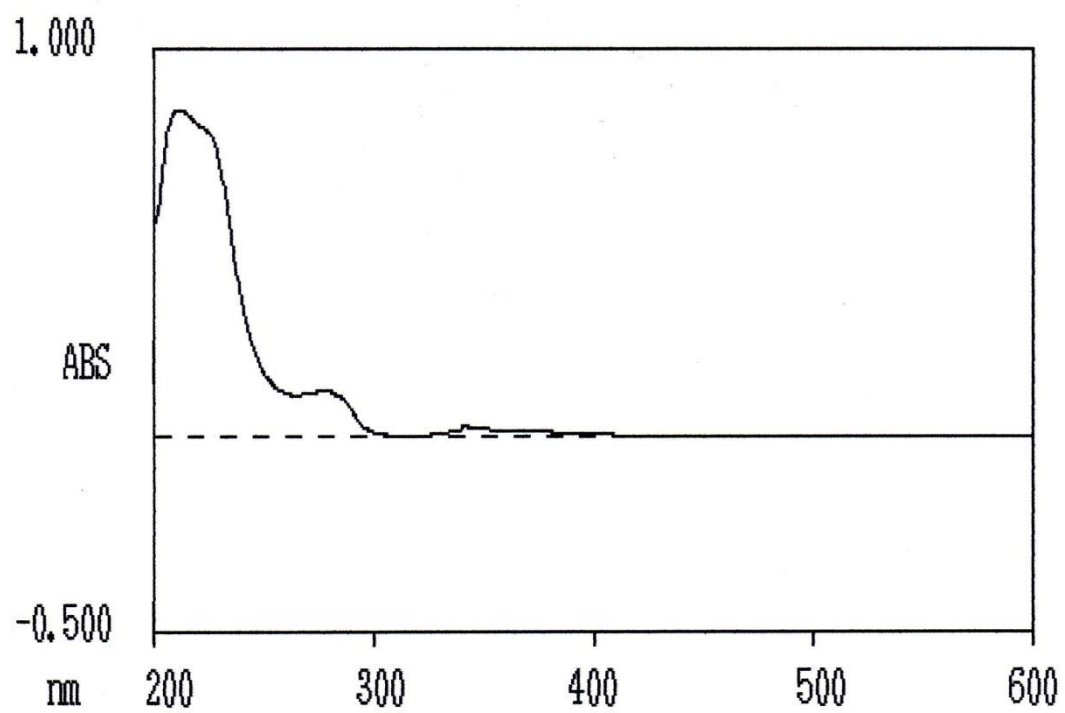
2.52(2H, m, H-3), 2.60(2H, m, H-2), 2.86(2H, s, H-7), 3.80(1H, s, OCH<sub>3</sub>),

6.08(2H, d, J=3.8Hz, H-3, H-4 of furan), 6.60(1H, d, J=7.8Hz, H-5'),

6.67(1H, d, J=1.8Hz, H-2'), 6.97(1H, d, J=1.7, 7.8Hz, H-6''),

7.15-7.22(5H, m, protons of phenyl)





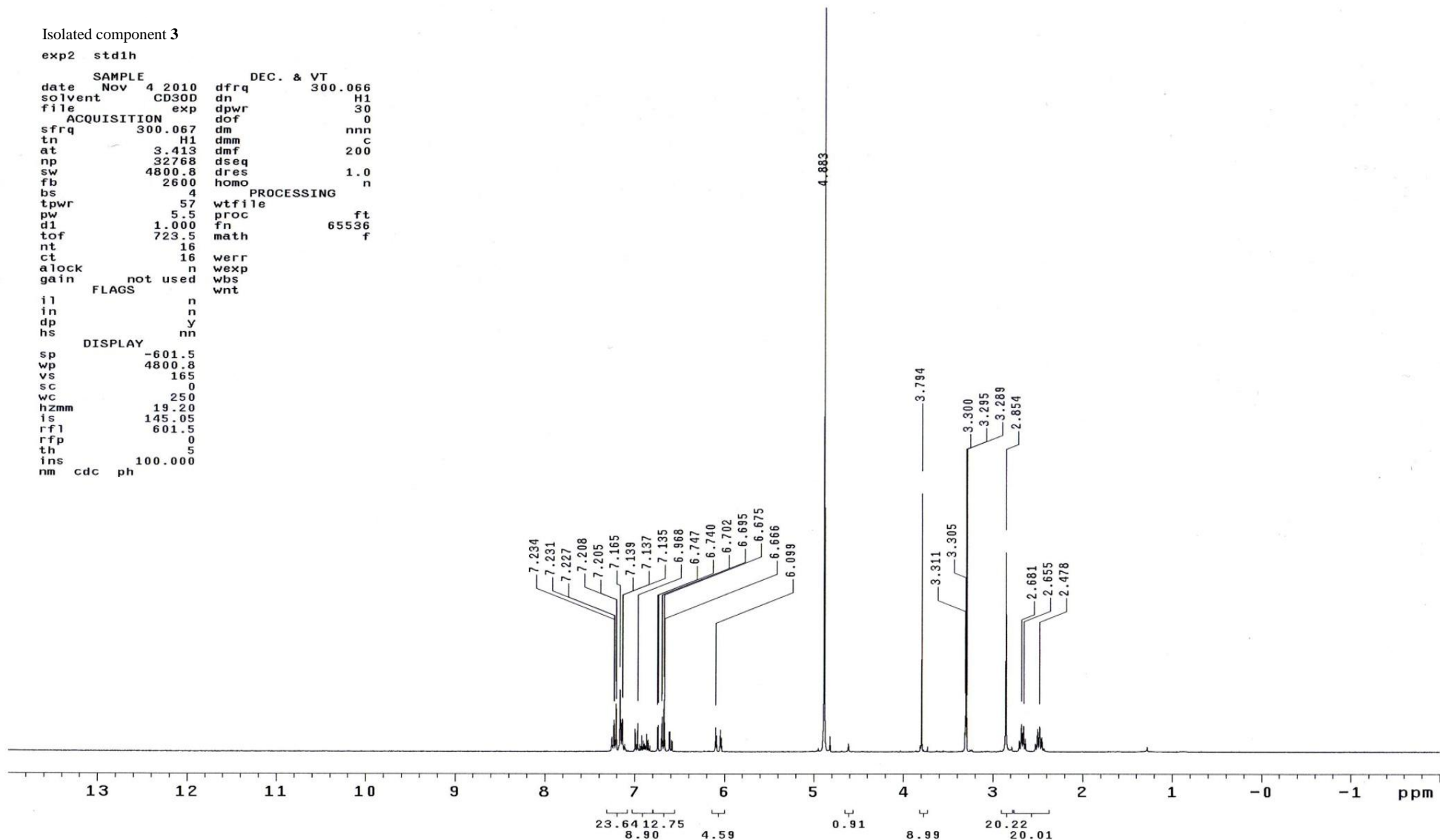
圖三十六、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 **3** 之紫外光-可見光譜圖。

Fig. 36 UV-visible spectrum for the isolated component **3** from EtOAc extract of *A. officinarum* rhizome.

Isolated component 3

```

exp2 std1h
SAMPLE
date Nov 4 2010 dfrq 300.066
solvent CD300 dn H1
file exp dpwr 30
ACQUISITION dof 0
sfrq 300.067 dm nnn
tn H1 dmm c
at 3.413 dmf 200
np 32768 dseq
sw 4800.8 dres 1.0
fb 2600 homo n
bs 4
PROCESSING
tpwr 57 wtfile
pw 5.5 proc ft
d1 1.000 fn 65536
tof 723.5 math f
nt 16
ct 16 werr
alock not used n wexp
gain not used wbs
wnt
FLAGS
il n
in n
dp y
hs nm
DISPLAY
sp -601.5
wp 4800.8
vs 165
sc 0
wc 250
hzmm 19.20
is 145.05
rf1 601.5
rfp 0
th 5
ins 100.000
nm cdc ph
  
```



圖三十七、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 3 之 <sup>1</sup>H-核磁共振光譜圖。

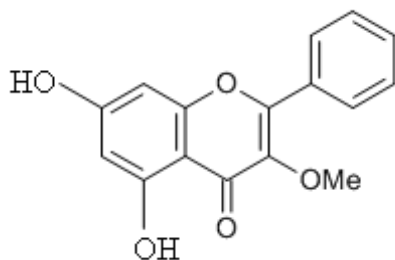
Fig. 37 <sup>1</sup>H-NMR spectrum for the isolated component 3 from EtOAc extract of *A. officinarum* rhizome.

#### (4) 純化物質 4 之結構鑑定

純化物質 4 為黃色粉末，由 UV-Visible 吸光光譜(圖三十八)  $\lambda_{\max}(\text{MeOH})$  266, 312, 340nm，推測亦為類黃酮的結構 266.2nm 為 A 環吸收帶，323.5, 344.1(sh) 為 B 環吸收帶，查詢文獻得知與 apiin 相當接近(Harborne *et al.*, 1975)。由  $^1\text{H-NMR}$  光譜較高磁場  $\delta$  3.75(3H, s) 推測為接在不飽和鍵結上  $-\text{OCH}_3$  的三個質子波訊， $\delta$  6.22(1H, d,  $J=2.1\text{Hz}$ , H-6) 與  $\delta$  6.40(1H, d,  $J=2.1\text{Hz}$ , H-8) 互相偶合，推測為 H-6 及 H-8 之質子波訊， $\delta$  7.44-7.96 則為苯環上單取代的五個質子波訊，另外，在更低磁場領域  $\delta$  12.68(1H) 顯示有接在苯環上 OH 之質子波訊(圖三十九)； $^{13}\text{C-NMR}$  光譜 15 個碳原子亦支持  $^1\text{H-NMR}$  光譜的推論外， $\delta$  60.04 亦顯示接在不飽和鍵結上  $\text{C3-OCH}_3$  之碳原子波訊。

綜合以上光譜資訊，並比對文獻(Ferraro, 1981; Tao, 2006) 推測純化物質 4 的結構為 galangin-3-methylether。已有研究指出 galangin-3-methylether 具有抑制胰脂肪酶的效果，為一種降血脂劑(Shin *et al.*, 2003)。

#### 4: Galangin-3-methylether



Structure of 4

UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) nm: 266, 312, 340sh

LC-MS (m/z): 285[M+H]<sup>+</sup>

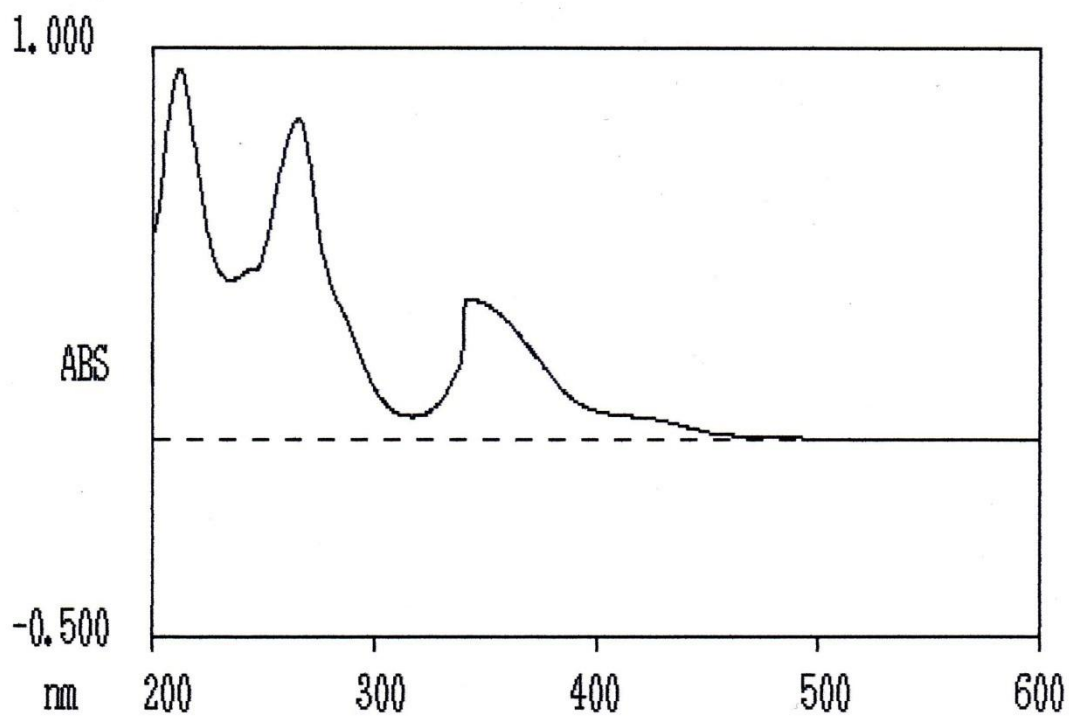
Formula: C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>

<sup>1</sup>H-NMR(300MHz, methanol-d<sub>4</sub>:chloroform-d<sub>3</sub>=5:1):  $\delta$

3.75(3H, s, OCH<sub>3</sub>), 6.22(1H, d, J=2.1Hz, H-6 ), 6.40(1H, d, J=2.1Hz, H-8), 7.44(3H, m, H-3',4', 5'), 7.96(2H, d, J=8.7Hz, H-2', 6'), 12.68(1H, OH)

<sup>13</sup>C-NMR(75MHz, methanol-d<sub>4</sub>:chloroform-d<sub>3</sub>=5:1):  $\delta$

60.04(3-OMe), 93.85(C-8), 98.72(C-6), 104.46(C-10), 128.18(C-2', 6'), 128.74(C3', 5'), 130.04(C4'), 131.05(C-1'), 138.76(C-3), 155.20(C-2), 156.57(C-9), 161.26(C-5), 164.41(C-7), 178.12(C-4)



圖三十八、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 4 之紫外光-可見光譜圖。

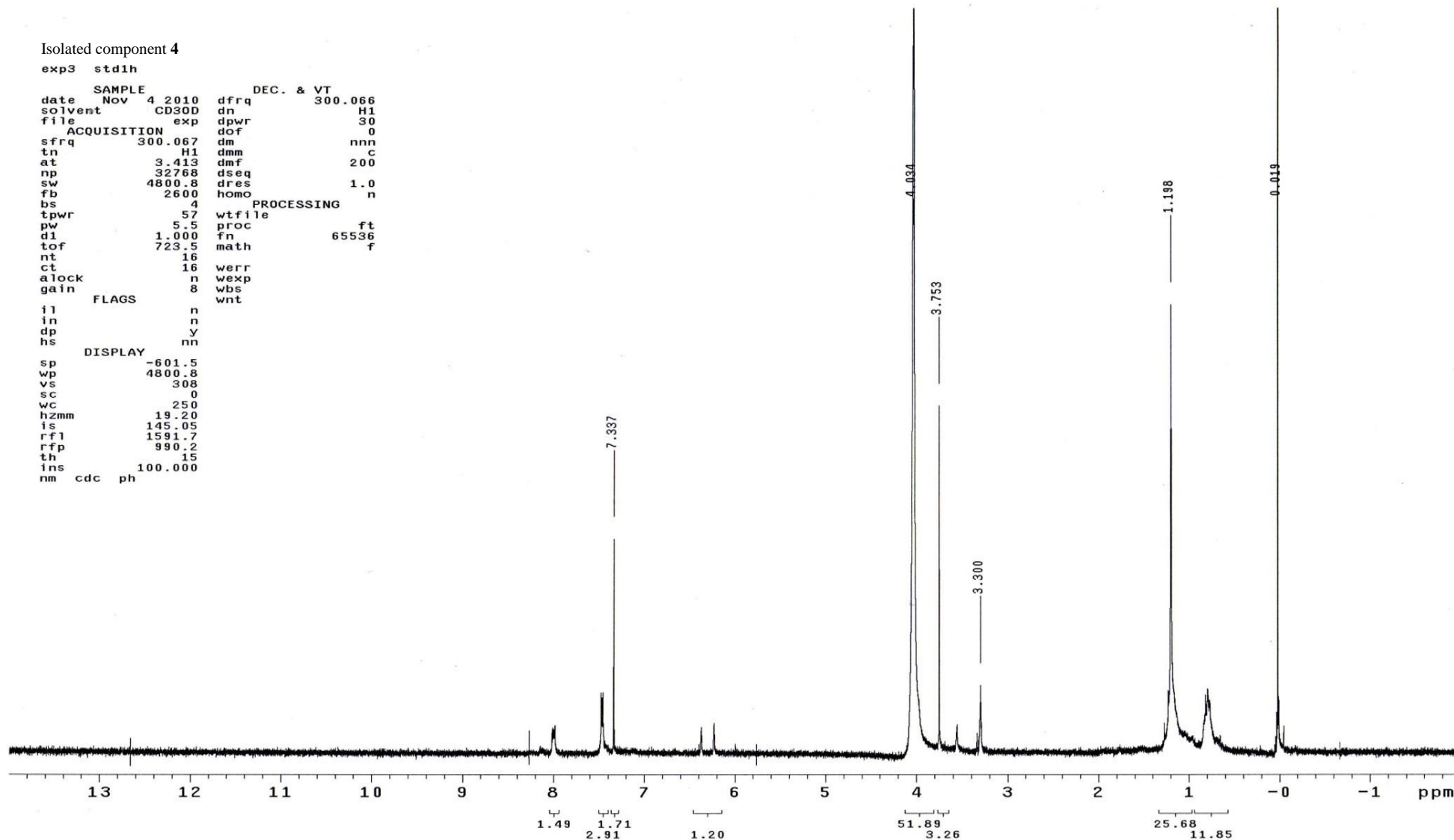
Fig. 38 UV-visible spectrum for the isolated component 4 from EtOAc extract of *A. officinarum* rhizome.

Isolated component 4

exp3 std1h

```

SAMPLE          DEC. & VT
date Nov 4 2010 dfrq 300.066
solvent CD3OD   dn      H1
file      exp  dpwr    30
ACQUISITION    dof     0
sfrq 300.067   dm      nnn
tn      H1     dmm     c
at      3.413  dmf     200
np      32768  dseq
sw      4800.8 dres    1.0
fb      2600   homo
bs      4      PROCESSING
tpwr    57     wtfile
pw      5.5    proc     ft
d1      1.000  fn      65536
tof     723.5  math    f
nt      16
ct      16     werr
alock   n     wexp
gain    8     wbs
        n     wnt
        n
        n
        y
        nn
DISPLAY
sp      -601.5
wp      4800.8
vs      308
sc      0
wc      250
hzmm    19.20
is      145.05
rfl     1591.7
rfp     990.2
th      15
ins     100.000
nm cdc ph
    
```



圖三十九、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 4 之 <sup>1</sup>H-核磁共振光譜圖。

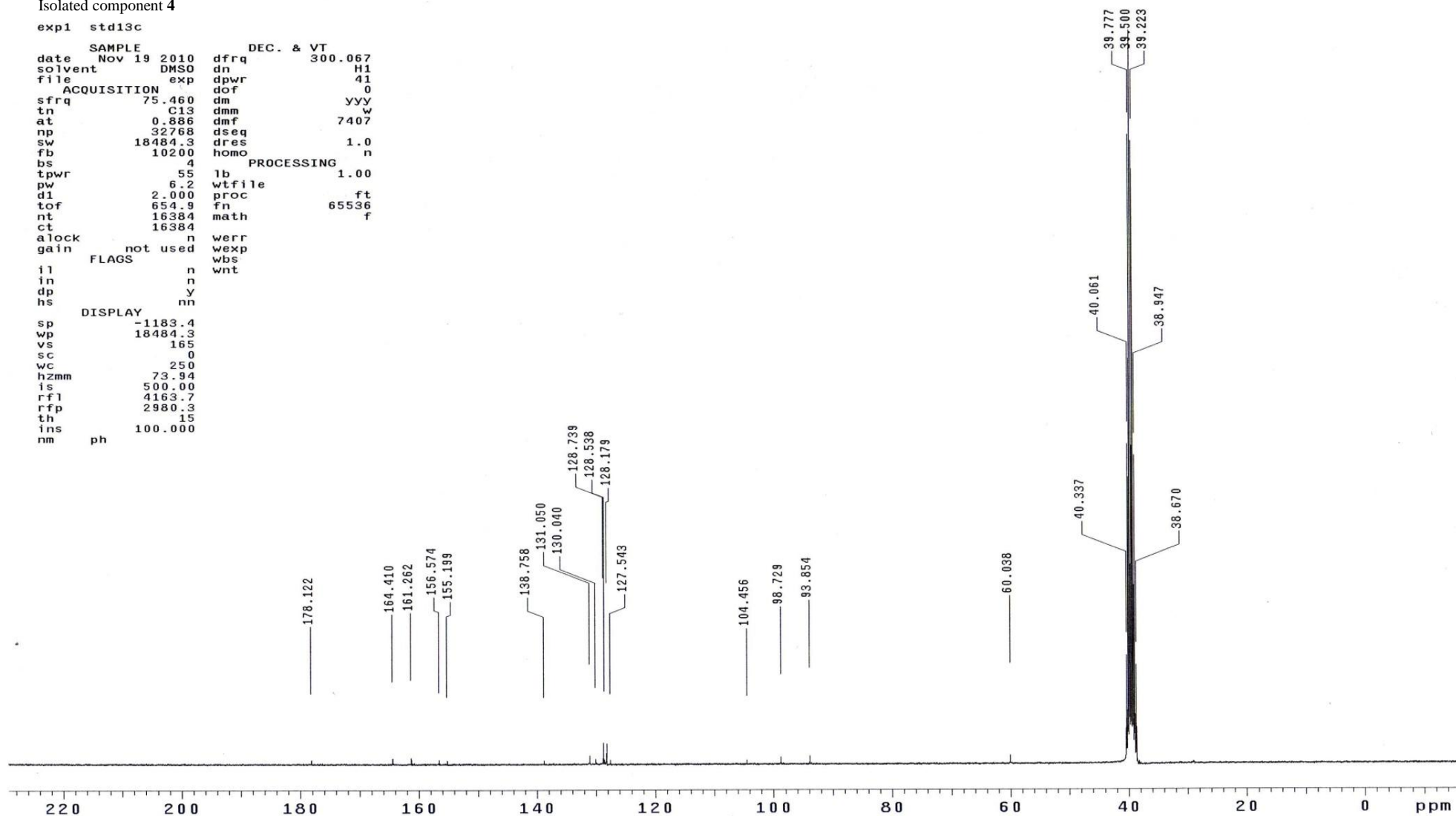
Fig. 39 <sup>1</sup>H-NMR spectrum for the isolated component 4 from EtOAc extract of *A. officinarum* rhizome.

Isolated component 4

exp1 std13c

```

SAMPLE          DEC. & VT
date Nov 19 2010 dfrq 300.067
solvent DMSO      dn H1
file exp         dpwr 41
ACQUISITION    dof 0
sfrq 75.460     dm YYY
tn C13          dmm w
at 0.886       dmf 7407
np 32768       dseq
sw 18484.3     dres 1.0
fb 10200      homo n
bs 4          PROCESSING
tpwr 55       lb 1.00
pw 6.2        wtfile
d1 2.000     proc ft
tof 654.9    fn 65536
nt 16384     math f
ct 16384
alock n       werr
gain not used wexp
FLAGS        wbs
il n         wnt
in n
dp y
hs nn
DISPLAY
sp -1183.4
wp 18484.3
vs 165
sc 0
wc 250
hzmm 73.94
is 500.00
rfl 4163.7
rfp 2980.3
th 15
ins 100.000
nm ph
    
```



圖四十、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 4 <sup>13</sup>C-核磁共振光譜圖。

Fig. 40 <sup>13</sup>C-NMR spectrum for the isolated component 4 from EtOAc extract of *A. officinarum* rhizome.

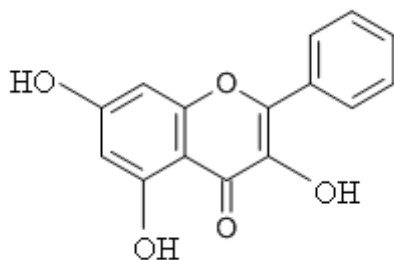
### (5) 純化物質 **5** 之結構鑑定

純化物質 **5** 為黃色粉末，由 UV-Visible 吸光光譜(圖四十一)  $\lambda_{\max}(\text{MeOH})$  267, 305, 359nm，顯示同樣具有 flavonoid A 環及 B 環之特徵吸收。由  $^1\text{H-NMR}$  光譜顯示與純化物質 **4** 極相近的質子波訊， $\delta$  6.17(1H, d,  $J=2.0\text{Hz}$ )與  $\delta$  6.40(1H, d,  $J=2.0\text{Hz}$ )分別為 H-6, H-8 的質子波訊， $\delta$  7.49-8.20 為單取代苯環上的五個質子波訊，唯一欠缺的是  $\delta$  3.75(3H, s)- $\text{OCH}_3$  的三個質子波訊，因此可推論為純化物質 **4** 的去甲基衍生物。

綜合以上光譜資訊，並比對文獻(Facundo, 2003 ; Bergonzi, 2007) 推測 **5** 的結構為 galangin。Galangin 為高良薑主要成分之一，已有研究指出其具有抗致突變性、抗氧化及清除自由基、抑制四氯化碳所造成肝損傷、抑制一氧化氮的生成、調節代謝酵素活性等(Shih et al., 2000 ; Heo et al., 1996 ; Wall et al., 1988 ; Cholbi et al., 1991 ; Imamura et al., 2000 ; Matsuda et al., 2006)。



**5: galangin**



**Structure of 5**

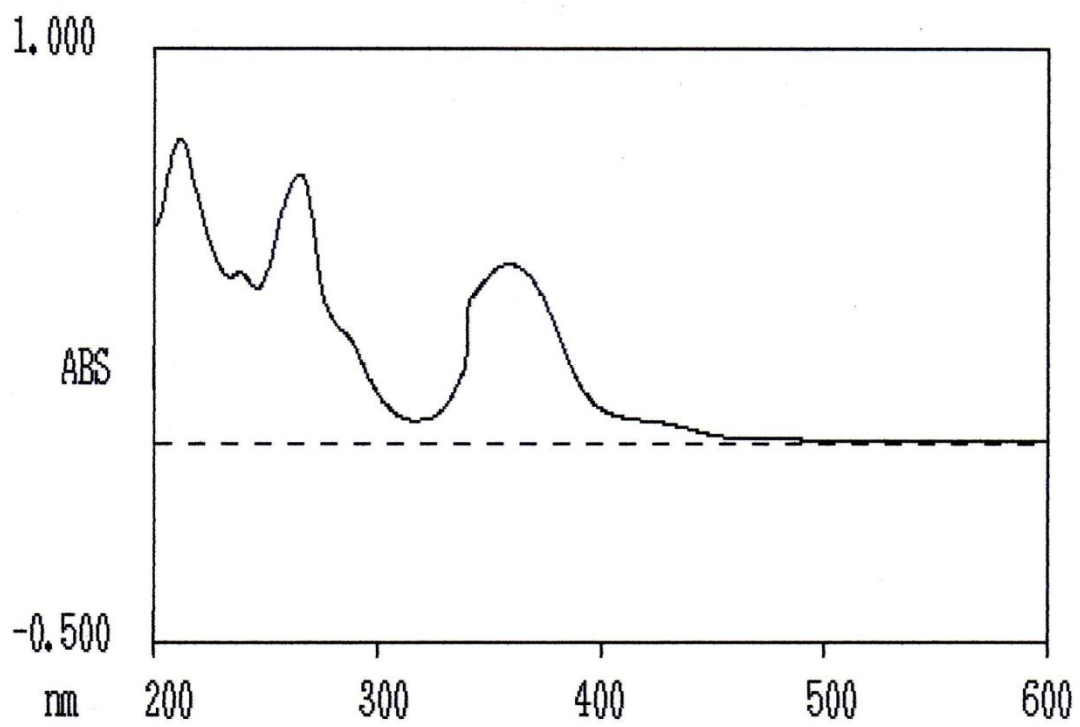
UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) nm: 267, 305sh, 359

LC-MS (m/z): 271[M+H]<sup>+</sup>

Formula: C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>

<sup>1</sup>H-NMR(300MHz, methanol-d<sub>4</sub>:chloroform-d<sub>3</sub>=5:1):  $\delta$

6.17(1H, d, J=2.0Hz, H-6), 6.40(1H, d, J=2.0Hz, H-8), 7.49(3H, m, H-3', 4', 5'), 8.20(2H, d, d, J=1.5, 8.0Hz, H-2', 6')

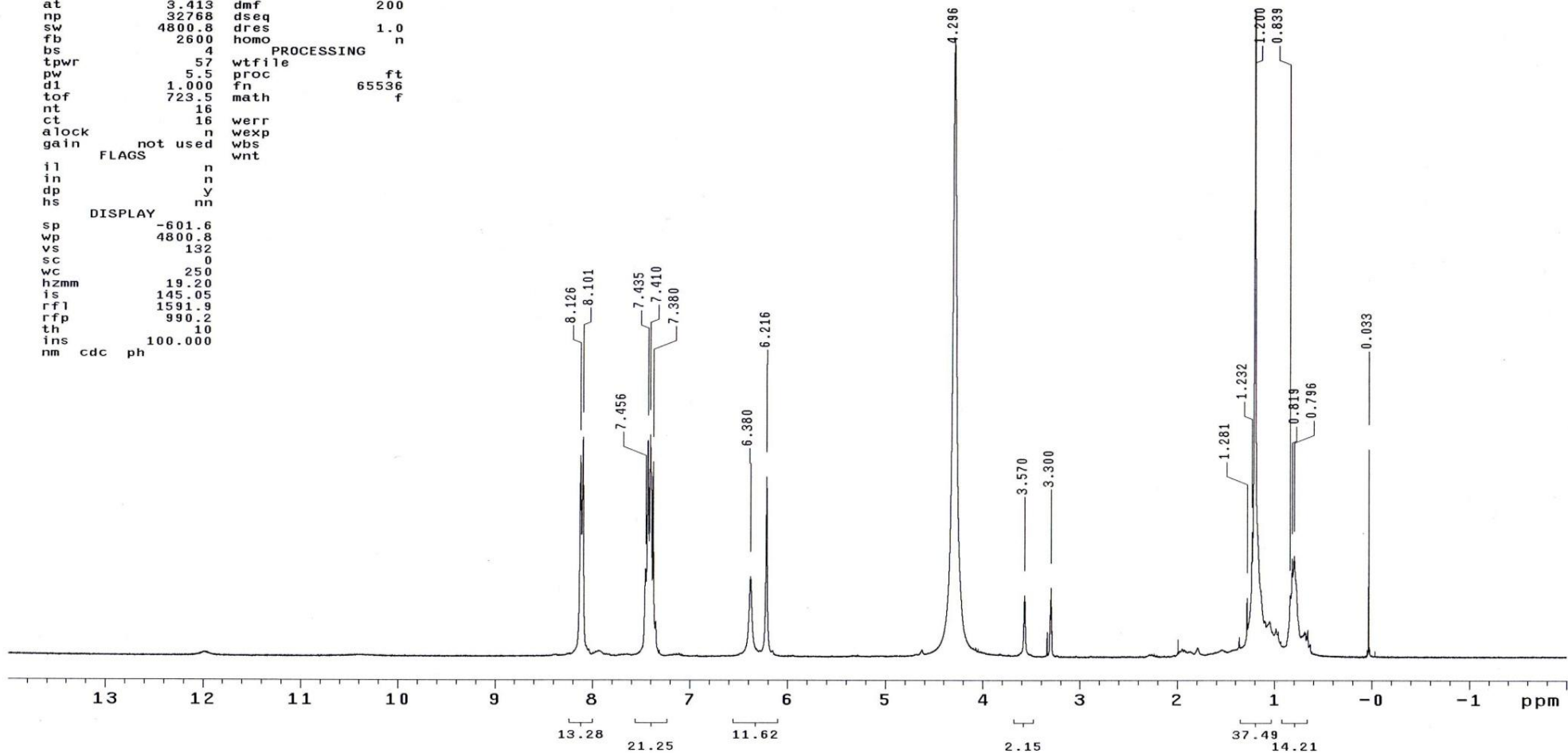


圖四十一、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 **5** 之紫外光-可見光譜圖。

Fig. 41 UV-visible spectrum for the isolated component **5** from EtOAc extract of *A. officinarum* rhizome.

Isolated component 5

```
exp1 std1h
SAMPLE
date Nov 4 2010 dfrq 300.066
solvent CD3OD dn H1
file exp dpwr 30
ACQUISITION dof 0
sfrq 300.067 dm nnn
tn H1 dmm c
at 3.413 dmf 200
np 32768 dseq
sw 4800.8 dres 1.0
fb 2600 homo n
bs 4
tpwr 57 wtfile
pw 5.5 proc ft
dl 1.000 fn 65536
tof 723.5 math f
nt 16 werr
ct 16 wexp
alock n wbs
gain not used wnt
FLAGS
il n
in n
dp y
hs nn
DISPLAY
sp -601.6
wp 4800.8
vs 132
sc 0
wc 250
hzmm 19.20
is 145.05
rfl 1591.9
rfp 990.2
th 10
ins 100.000
nm cdc ph
```



圖四十二、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 5 之  $^1\text{H}$ -核磁共振光譜圖。

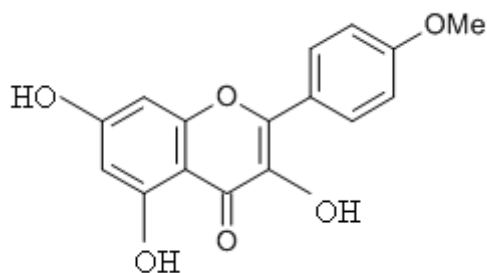
Fig. 42  $^1\text{H}$ -NMR spectrum for the isolated component 5 from EtOAc extract of *A. officinarum* rhizome.

#### (6) 純化物質 **6** 之結構鑑定

純化物質 **6** 為黃色粉末，由 UV-Visible 吸光光譜(圖四十三)  $\lambda_{\max}(\text{MeOH})$  266, 364nm，顯示為 flavonoid A 環及 B 環之特徵吸收。由  $^1\text{H-NMR}$  光譜上較高磁場領域上  $\delta$  3.84(3H, s)推測為接在苯環上 OCH<sub>3</sub> 的三個質子波訊， $\delta$  6.22(1H, s,  $J=2.1\text{Hz}$ , H-6)與  $\delta$  6.40(1H, d,  $J=2.1\text{Hz}$ , H-8)為間位質子互為偶合 H-6 與 H-8 的質子波訊。 $\delta$  6.98(2H, d,  $J=8.7\text{Hz}$ , H-3', 5')與  $\delta$  8.12(2H, d,  $J=8.7\text{Hz}$ , H-2', 6')則為 flavonol B 環 *p* 二取代之互為偶合的二個質子波訊。 $^{13}\text{C-NMR}$  光譜亦支持  $^1\text{H-NMR}$  光譜的推論外， $\delta$  55.37 亦顯示鍵結在芳香環上-OCH<sub>3</sub> 的碳原子波訊。

綜合以上光譜資訊，並比對文獻(Chauhan, 1979)推測 **6** 的結構為 kaempferol-4'-methylether。已有文獻指出 kaempferol-4'- methylether 具有抑制巨噬細胞之一氧化氮產生，其在 30  $\mu\text{M}$  下即有顯著抑制效果(Matsuda, 2006)。

**6: kaempferol-4'-methylether**



**Structure of 6**

UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) nm: 266, 364

LC-MS (m/z): 301[M+H]<sup>+</sup>

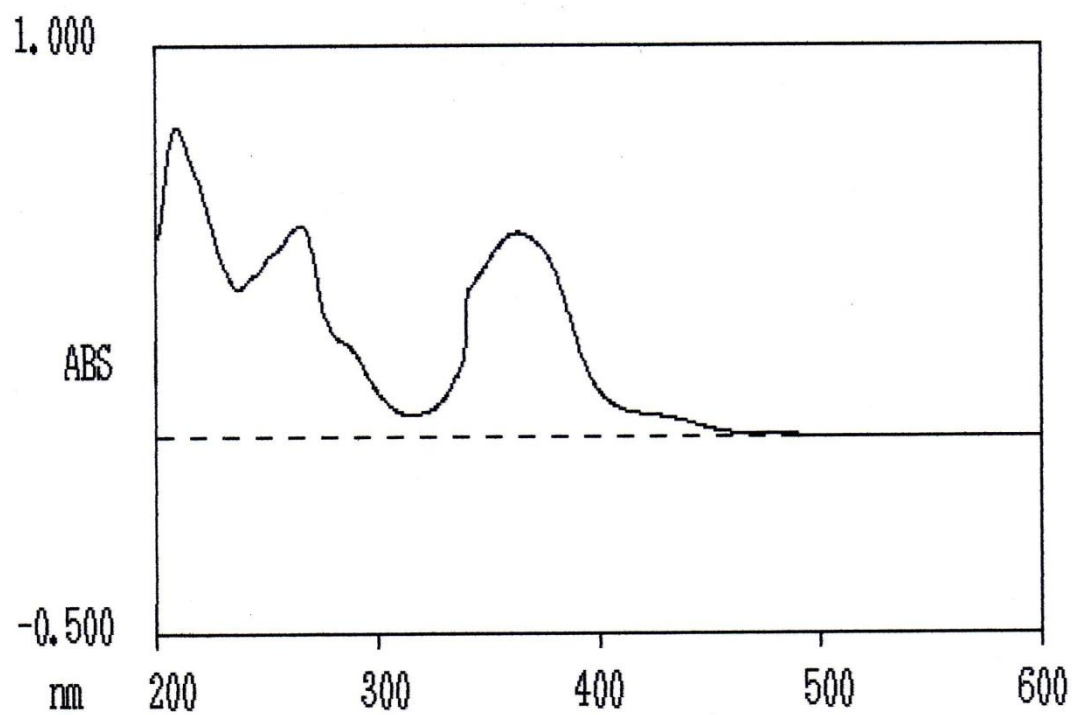
Formula: C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>

<sup>1</sup>H-NMR(300MHz, methanol-d<sub>4</sub>:chloroform-d<sub>3</sub>=5:1):  $\delta$

6.22(1H, s, J=2.1Hz, H-6), 6.40(1H, d, J=2.1Hz, H-8), 6.98(2H, d, J=8.7Hz, H-3', 5'), 8.12(2H, d, J=8.7Hz, H-2', 6')

<sup>13</sup>C-NMR(75MHz, methanol-d<sub>4</sub>:chloroform-d<sub>3</sub>=5:1):  $\delta$

55.37(OCH<sub>3</sub>), 93.54(C-6), 98.26(C-6), 103.10(C-10), 114.04(C-3', 5'), 123.26(C-1), 129.33(C-2', 6'), 136.07(C-3), 146.23(C-2), 156.23(C-9), 160.47(C-5, C-4), 164.01(C-7), 175.99(C-4)



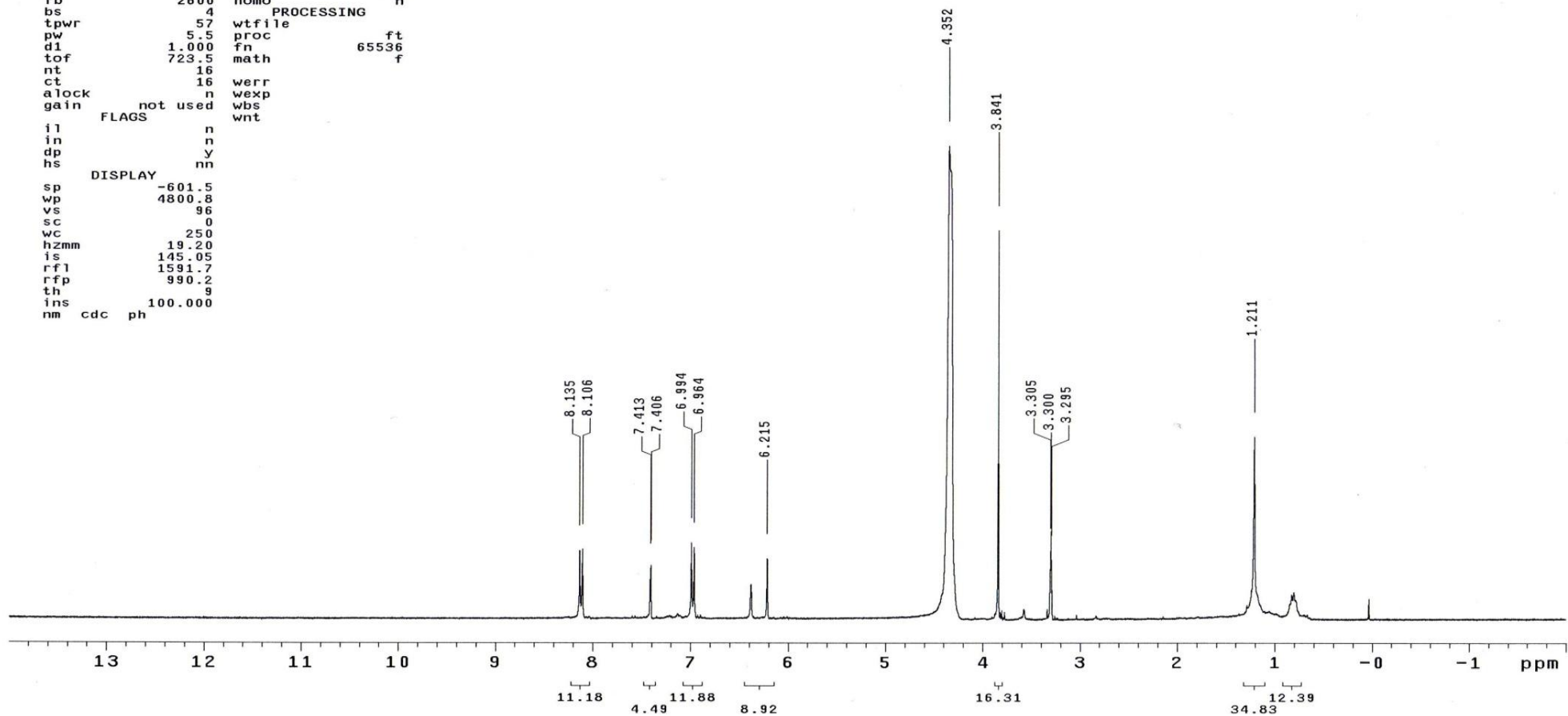
圖四十三、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 **6** 之紫外光-可見光譜圖。

Fig. 43 UV-visible spectrum for the isolated component **6** from EtOAc extract of *A. officinarum* rhizome.

Isolated component 6

```

exp2 std1h
SAMPLE
date Nov 4 2010 dfrq DEC. & VT 300.066
solvent CD3OD dn H1
file exp dpwr 30
ACQUISITION dof 0
sfrq 300.067 dm nnn
tn H1 dmm c
at 3.413 dmf 200
np 32768 dseq
sw 4800.8 dres 1.0
fb 2600 homo n
bs 4
tpwr 57 wtfile
pw 5.5 proc ft
d1 1.000 fn 65536
tof 723.5 math f
nt 16
ct 16 werr
alock n wexp
gain not used wbs
FLAGS wnt
il n
in n
dp y
hs nn
DISPLAY
sp -601.5
wp 4800.8
vs 96
sc 0
wc 250
hzmm 19.20
is 145.05
rf1 1591.7
rfp 990.2
th g
ins 100.000
nm cdc ph
  
```



圖四十四、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 6 之  $^1\text{H}$ -核磁共振光譜圖。

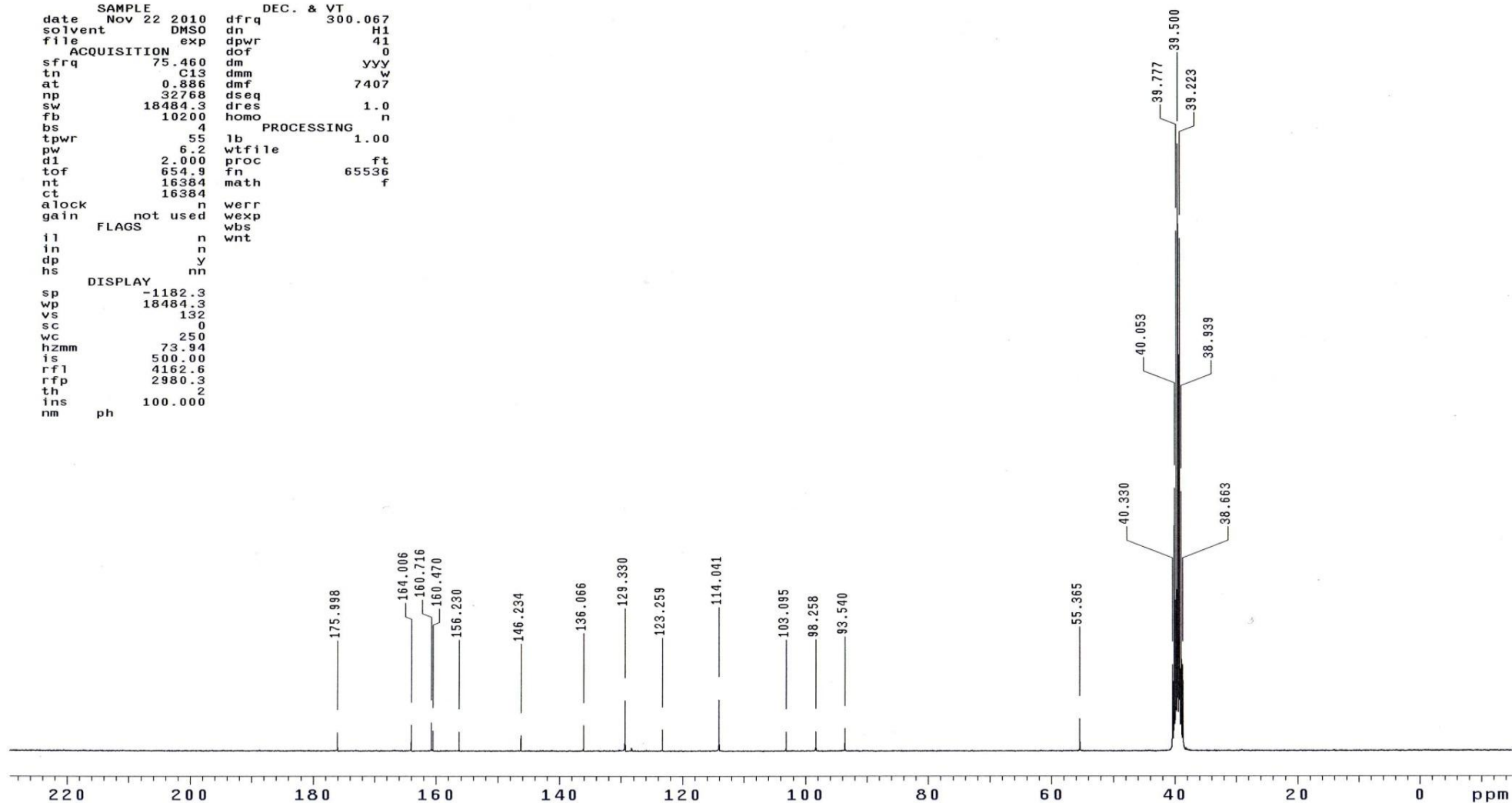
Fig. 44  $^1\text{H}$ -NMR spectrum for the isolated component 6 from EtOAc extract of *A. officinarum* rhizome.

Isolated component 6

exp2 std13c

```

SAMPLE
date Nov 22 2010 dfrq DEC. & VT 300.067
solvent DMSO dn H1
file exp dpwr 41
ACQUISITION dof 0
sfrq 75.460 dm YVY
tn C13 dmm w
at 0.886 dmf 7407
np 32768 dseq
sw 18484.3 dres 1.0
fb 10200 homo n
bs 4
tpwr 55 lb PROCESSING 1.00
pw 6.2 wtfile
d1 2.000 proc ft
tof 654.9 fn 65536
nt 16384 math f
ct 16384
a lock n werr
gain not used wexp
FLAGS n wbs
il n wnt
in n
dp y
hs nn
DISPLAY
sp -1182.3
wp 18484.3
vs 132
sc 0
wc 250
hzmm 73.94
is 500.00
rfl 4162.6
rfp 2980.3
th 2
ins 100.000
nm ph
    
```



圖四十五、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質 6 之  $^{13}\text{C}$ -核磁共振光譜圖。

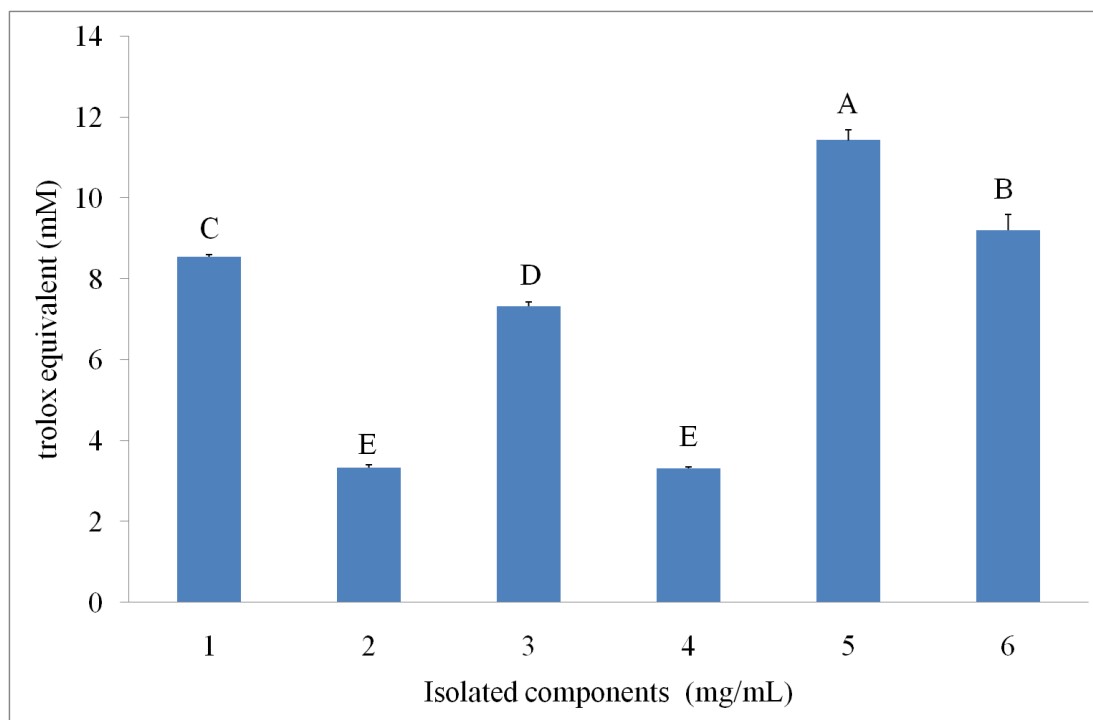
Fig. 45  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum for the isolated component 6 from EtOAc extract of *A. officinarum* rhizome.



#### 5-1-5-5 高良薑乙酸乙酯萃取物之純化物質抗氧化性

高良薑乙酸乙酯萃取物經由 HPLC 分離純化後，再利用各種光譜分析法，鑑定出 6 種純化物質分別為 1-hydroxy-7-(4''-hydroxy-3''-methoxyphenyl)-3- heptanone (1)、5, 7-dihydroxy-flavanone (2)、3,6-furan-7-(4''-hydroxy-4''-methoxyphenyl)-1-phenylheptane (3)、galangin-3-methylether (4)、galangin (5) 及 kaempferol-4'-methylether (6)。高良薑乙酸乙酯萃取物中 6 種純化物質利用 TEAC 法分析總抗氧化力，利用 peroxidase 會催化 ABTS 與 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 形成藍綠色穩定的 ABTS<sup>+</sup>·陽離子自由基，當抗氧化物質與 ABTS<sup>+</sup>·結合後會使吸光值下降，以檢測抗氧化力強弱程度。本實驗以 trolox 作為標準品，換算相對當量。從實驗結果(圖四十六)可以得知 1-6 的抗氧化性分別為 8.55(1)、3.33(2)、7.35(3)、3.32(4)、11.43(5) 及 9.20 mM trolox 當量/mg(6)，其抗氧化力強弱依序為純化物質 5 > 6 > 1 > 3 > 2 > 4。

文獻中指出，高反應性之活性氧所造成的化學變化，能改變胞內胞器及脂質過氧化之發生，導致糖尿病及其相關代謝疾病，然而活性氧之清除對於改善糖尿病及其所造成的全身性代謝疾病可能發揮關鍵作用(Rahimi, 2005)。所以本實驗將具有強抗氧化性的高良薑萃取物區分 C-3 及純化物質 1-6 進行評估調節血糖之作用，進而達到改善糖尿病之效果。



圖四十六、高良薑乙酸乙酯萃取物之純化物質的總抗氧化力以 trolox 當量表示。

Fig. 46 The antioxidative activities in terms of trolox equivalent of isolated components from EtOAc extract of *A. officinarum* rhizome. Bars represent means $\pm$ SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

## 5-2 高良薑乙酸乙酯萃取物區分物及純化物質之調節血糖作用

### 5-2-1 高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質對於醣解酵素之抑制效果

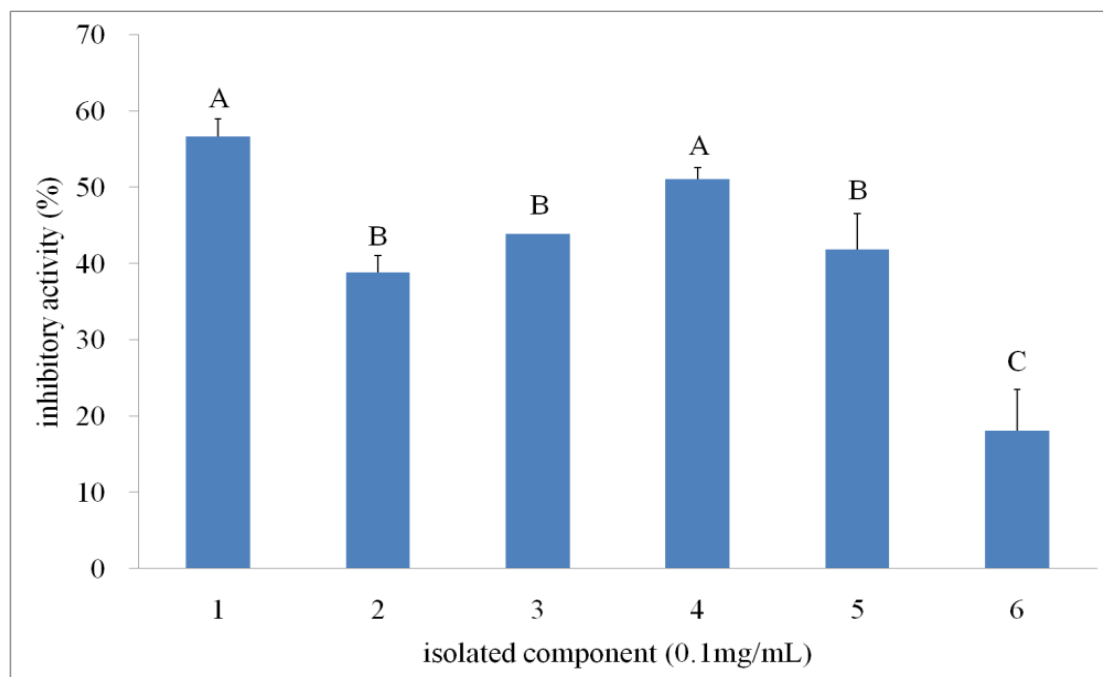
#### 5-2-1-1 純化物質對 $\alpha$ -amylase 之抑制作用

$\alpha$ -amylase 之抑制具有延緩多糖分解成小分子糊精、寡糖、雙糖之效果，有助緩和飯後血糖之急速上升，進而改善糖尿病患飯後高血糖之病症。本試驗將上述 6 種純化物質進行  $\alpha$ -amylase 抑制能力分析(圖四十七)，結果 0.1mg/ mL 濃度下對  $\alpha$ -amylase 抑制率強至弱依序為 56.63%(1) > 51.02%(4) > 38.78%(2) > 43.88%(3) > 41.84%(5) > 18.11%(6)。其中以 1-hydroxy-7-(4''-hydroxy-3''-methoxyphenyl)-3-heptanone(1)、galangin-3-methylether(4)對  $\alpha$ -amylase 抑制率大於 50%，且顯著高於其他純化物質。

#### 5-2-1-2 純化物質對 $\alpha$ -glucosidase 之抑制作用

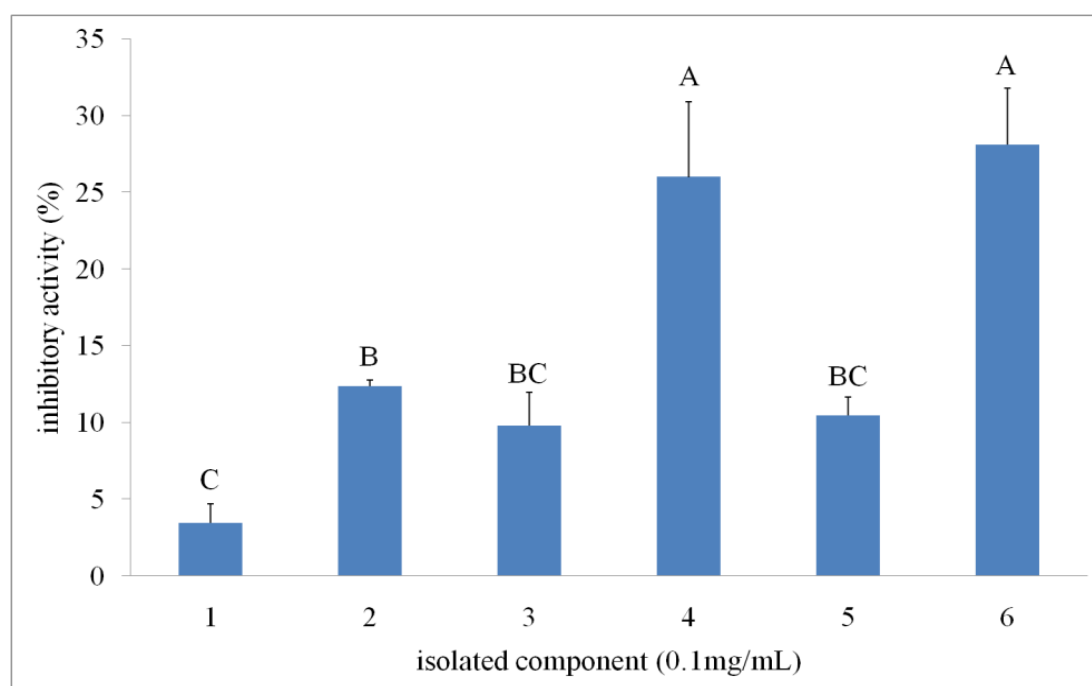
抑制  $\alpha$ -glucosidase 能降低多糖或寡糖水解成葡萄糖之速率，降低葡萄糖之吸收，同樣有助於維持血糖之恆定。將上述 6 種純化物質進行  $\alpha$ -glucosidase 抑制能力分析(圖四十八)，結果得知 0.1mg/ mL 濃度下對  $\alpha$ -glucosidase 抑制率強至弱依序為 28.09%(6) > 25.99%(4) > 12.35%(2) > 10.42%(5) > 9.87%(3) > 3.47%(1)。其中以 galangin-3-methylether(4)、kaempferol-4'-methylether(6)對  $\alpha$ -glucosidase 抑制率大於 25%，且顯著高於其他純化物質。

綜合以上數據，純化物質 1-6 對於  $\alpha$ -amylase 及  $\alpha$ -glucosidase 都具有不等之抑制作用，其中以純化物質 galangin-3-methylether(4)對兩種酵素都呈現良好之抑制率。文獻指出(Tadera, 2006)類黃酮化合物對  $\alpha$ -amylase 及  $\alpha$ -glucosidase 具有良好之抑制效果，且  $\alpha$ -amylase 抑制率大於  $\alpha$ -glucosidase 與實驗結果相符。



圖四十七、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質之  $\alpha$ -amylase 抑制率。

Fig. 47 Inhibition on  $\alpha$ -amylase for isolated components from EtOAc extract of *A. officinarum* rhizomes. Bars represent means $\pm$ SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.



圖四十八、高良薑乙酸乙酯萃取物純化物質之  $\alpha$ -glucosidase 抑制率。

Fig. 48 Inhibition on  $\alpha$ -glucosidase for isolated components from EtOAc extract of *A. officinarum* rhizomes. Bars represent means $\pm$ SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

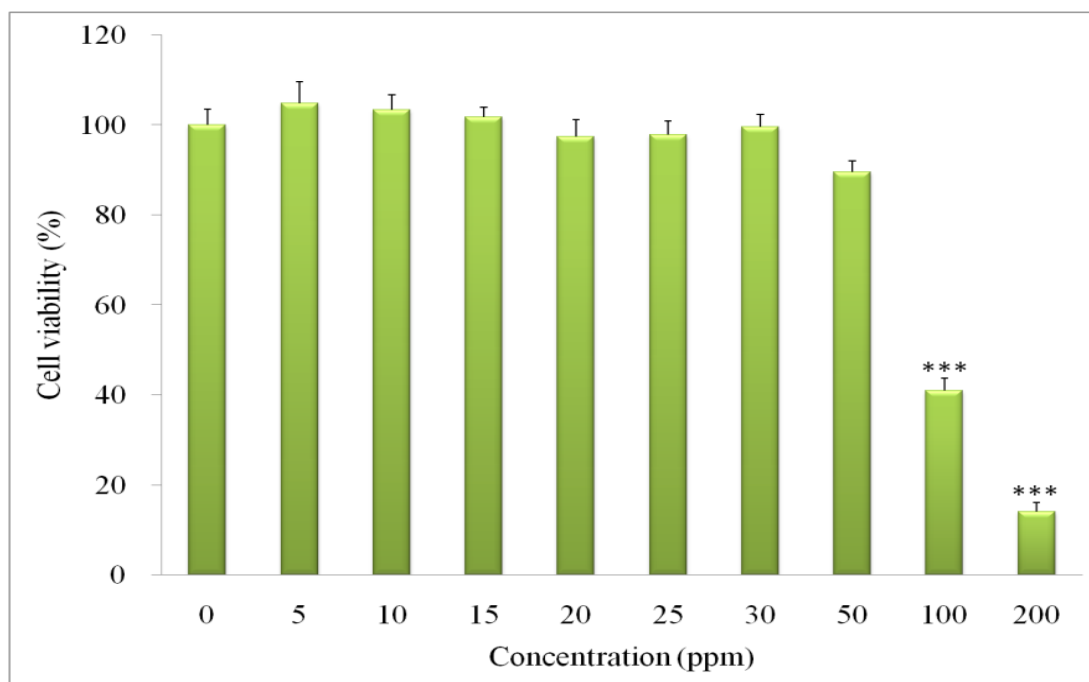
### 5-2-2 高良薑乙酸乙酯萃取物區分 C-3 對 FL83B 細胞之調節血糖作用

高良薑區分 C-3 中主要六種具強抗氧化物質，經醣解酵素抑制能力測試，皆具有不同程度抑制效果，而能降低醣類分解速率及末梢組織對葡萄糖的吸收。由於分離純化出的物質量較少，而選用較大量的區分物 C-3 及葡萄糖擬似物 2-NBDG 利用流式細胞分析 FL83B 細胞對葡萄糖代謝的探討，更進一步達到適當調控血糖之目的。

#### 5-2-2-1 高良薑乙酸乙酯萃取物區分 C-3 對於 FL83B 細胞之毒性 (XTT assay)

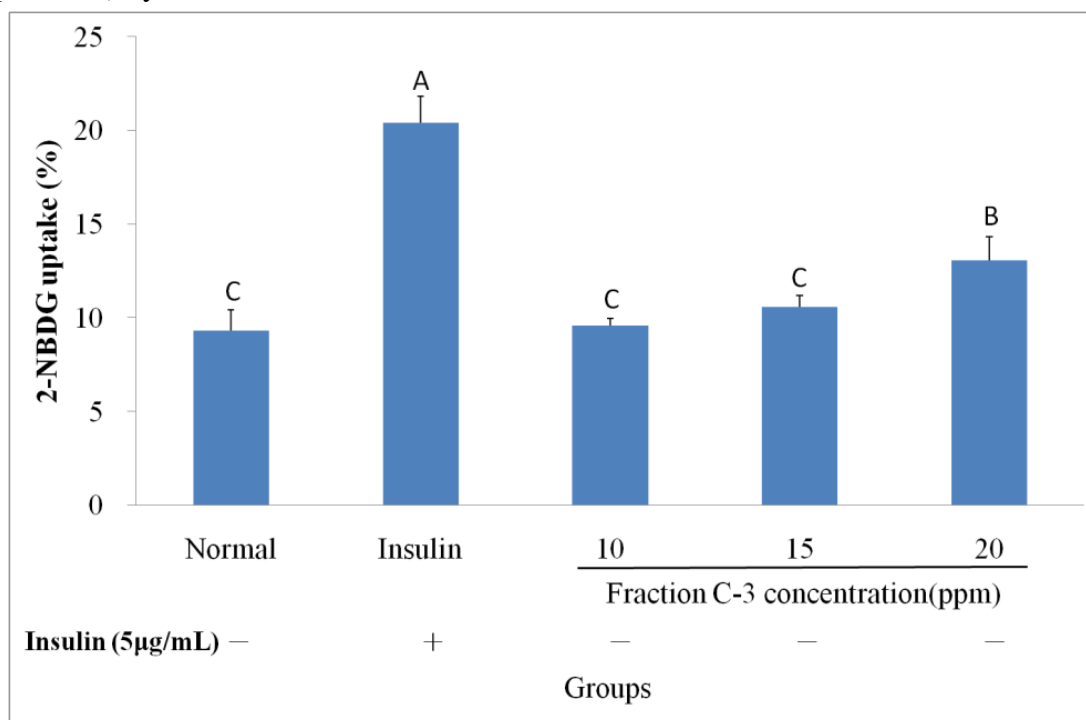
本實驗測定高良薑乙酸乙酯萃取物之區分 C-3 對於正常 FL83B 小鼠肝細胞存活率的影響，進而了解其是否對於細胞具有毒殺作用。首先將 FL83B 細胞添加不同濃度之區分物 C-3，分別為 5、10、15、20、25、30、50、100、200 ppm，作用 24 小時後，以 XTT 進行分析。結果得知(圖四十九)，添加量達 50 ppm 即有顯著之毒殺效果。因其在低濃度下具有毒殺作用，再經由重複試驗後，選取一個安全之濃度 20ppm 以下進行後續實驗，以探討高良薑乙酸乙酯萃取物之區分 C-3 是否具有調節血糖之作用。

經由 HPLC 光譜圖中得知，分析高良薑乙酸乙酯萃取物之區分 C-3 中 6 種純化物質所佔之百分比分別為 3.03%(1)、2.84%(2)、2.11%(3)、8.37%(4)、69.02%(5)、10.58%(6)，其中 galangin(5)佔區分 C-3 將近七成比例。將區分 C-3 依 6 種純化物質等比例換算相對莫爾濃度約為 154 $\mu$ M。文獻(Matsuda, 2009)中顯示 80% 丙酮萃取物之乙酸乙酯區分對於老鼠 B16 黑色素瘤細胞之存活率測試結果顯示，10 $\mu$ g/mL 即具有細胞毒殺之作用，存活率為 89.5%，30 $\mu$ g/mL 濃度下其存活率僅剩 56%。galangin 在 10 $\mu$ M 濃度下即有顯著死亡，其存活



圖四十九、不同濃度之高良薑乙酸乙酯萃取物區分 C-3 對正常 FL83B 細胞之存活率之影響。

Fig. 49 Effect of fraction C-3 of EtOAc extract from *A. officinarum* rhizome on cell viability in normal FL83B cells. Bars represent means±SD, n=3. Means are significantly different from control (\*\*\*,  $p < 0.005$ ) by t-test.



圖五十、高良薑乙酸乙酯萃取物之區分 C-3 對正常 FL83B 細胞之 2-NBDG 攝入量影響。

Fig. 50 Effect of fraction C-3 of EtOAc extract from *A. officinarum* rhizome on 2-NBDG uptake in normal FL83B cells. Bars represent means±SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

率為 89.6%，在 100 $\mu$ M 濃度下存活率僅剩 46.7%，顯示高良薑乙酸乙酯萃取物中的主成分 galangin 對正常及癌細胞都具有相當毒性。

#### 5-2-2-2 不同濃度區分 C-3 對於正常態 FL83B 細胞之 2-NBDG 攝入量之影響

本實驗將 FL83B 細胞鋪盤後，添加 10、15 及 20 ppm 之不同濃度高良薑區分物 C-3，經 2-NBDG 其置 1 小時後，以流式細胞儀進行螢光測定，探討對正常 FL83B 細胞葡萄糖擬似物攝入量(2-NBDG uptake)之影響。結果如圖五十所示，經 5 $\mu$ g/mL 胰島素處理之 FL83B 細胞，其 2-NBDG 攝入量為正常組的 2.19 倍，而添加 20 ppm 樣品組顯著提升 2-NBDG 攝入量為正常組的 1.40 倍。添加 10ppm 及 15ppm 樣品組相較正常組雖無顯著提升效果，但 2-NBDG 的攝入量也有上升之趨勢，故選取 20ppm 的樣品濃度，探討樣品對高糖誘導之胰島素阻抗性細胞作用。

#### 5-2-2-3 20ppm 區分 C-3 對於正常及胰島素阻抗性 FL83B 細胞之 2-NBDG 攝入量之影響

研究指出高糖會干擾許多細胞之胰島素訊息傳遞，如肝、肌肉及脂肪細胞等，進而影響細胞對於葡萄糖攝入及代謝之能力。本實驗以 F12K 培養將原有 7mM 葡萄糖，額外添加 60mM 葡萄糖處理 24 小時，使 FL83B 細胞誘導形成胰島素阻抗性(吳，2011)，再進一步添加樣品與胰島素處理，觀察其葡萄糖擬似物 2-NBDG 攝入細胞之情形。整合探討之結果如圖五十一所示，將細胞分為正常及阻抗組同時鋪盤後，進行不同條件處理，並添加 20ppm 之高良薑乙酸乙酯萃取物區分 C-3，與 2-NBDG 反應 1 小時，以流式細胞儀進行螢光測定。正常態添加胰島素組與樣品組相較於控制組之 2-NBDG 顯著上升為 2.19 及 1.40 倍，

表示添加樣品雖比不上添加胰島素之效果，但有助於增加 2-NBDG 攝入量。正常態添加樣品與胰島素共同處理組，相較於控制組與胰島素組皆顯著上升成為 3.43 及 1.57 倍，表示樣品與胰島素共同處理下，更進一步提升 2-NBDG 攝入量。高糖添加胰島素組相較於正常態添加胰島素組之 FL83B 細胞，葡萄糖擬似物 2-NBDG 攝入量顯著下降 0.76 倍，反映 FL83B 細胞之胰島素阻抗性；而阻抗性細胞添加 20ppm 樣品後 2-NBDG 帶入量顯著上升 1.43 倍，表示 C-3 對於此高糖誘導之胰島素阻抗性有改善效果。

綜合以上結果得知，添加 20ppm 高良薑乙酸乙酯萃取物之區分 C 處理正常性及阻抗性之 FL83B 細胞皆有助於 2-NBDG 之攝入，且樣品與胰島素共同處理下，具有加成作用，使更多 2-NBDG 攝入細胞內。

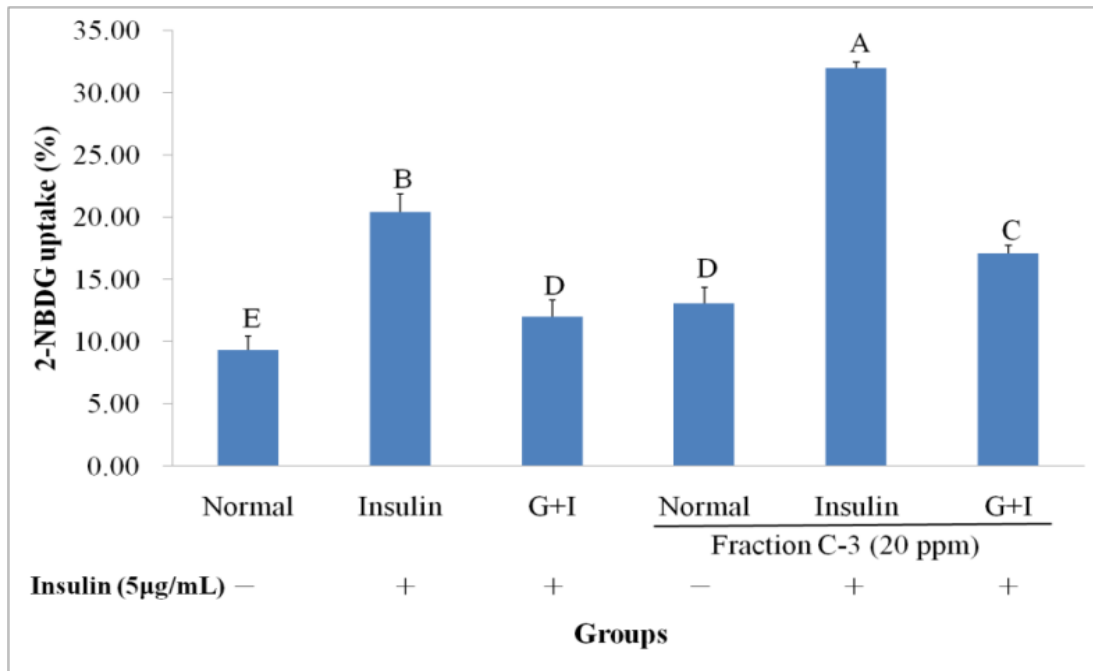
#### 5-2-2-4 高良薑乙酸乙酯萃取物區分 C-3 對於 FL83B 細胞內肝醣合成量之影響

偵測肝醣含量可反應肝醣合成與分解雙向途徑的平衡情形，若肝醣生成量有提高之趨勢，可推測肝醣合成量大於分解量，有促進細胞外葡萄糖帶入肝臟細胞內合成肝醣，進而降低血糖濃度。將細胞鋪盤添加不同濃度之高良薑乙酸乙酯萃取物區分 C-3 處理後，抽取其胞內肝醣，以蔥酮試劑進行縮合反應，分析細胞內肝醣合成量，並以蛋白質作為內部對照。由圖五十二所示，正常態 FL83B 經不同濃度樣品處理(10、15、20ppm)及胰島素處理與控制組相比，肝醣含量皆有上升之趨勢，其中 20ppm 之肝醣含量顯著上升為 2.34 倍，推論添加此高良薑乙酸乙酯萃取物之區分 C-3 能促進正常態 FL83B 細胞之肝醣合成量。而高糖誘導產生胰島素阻抗態細胞，添加不同濃度之高良薑



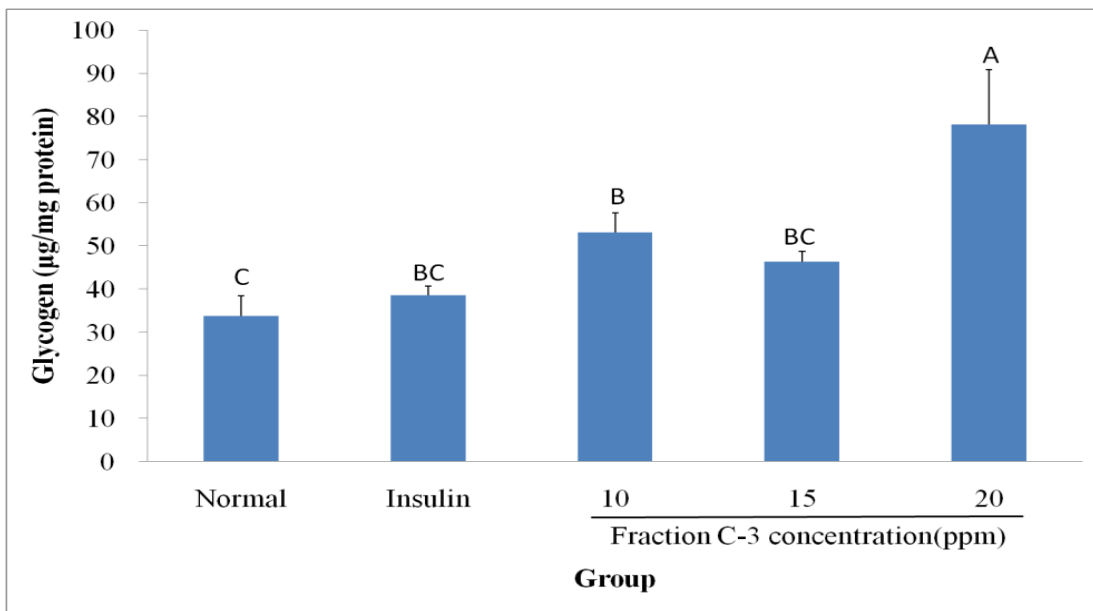
乙酸乙酯萃取物區分 C-3 處理，其肝醣合成量如圖五十三所示，細胞經高糖阻抗組與控制組相比顯著下降為 0.57 倍；添加不同濃度樣品後，有些微提升肝醣含量之趨勢。由實驗結果推論高良薑乙酸乙酯萃取物之區分 C-3，能些微回升阻抗態 FL83B 細胞之肝醣合成能力。

綜合以上結果得知，添加高良薑乙酸乙酯萃取物之區分 C-3 無論對正常性或阻抗性 FL83B 細胞之肝醣合成量均有增加之趨勢。流式細胞儀顯示，高糖處理之小鼠肝臟 FL83B 細胞，顯著降低攝入葡萄糖類似物 2-NBDG，而添加高良薑乙酸乙酯萃取物之區分 C-3，可顯著提高正常性及胰島素阻抗性細胞之 2-NBDG 攝入量，同時肝醣合成能力也有增強之現象。正常性細胞添加高良薑乙酸乙酯萃取物之區分 C-3 對於醣類代謝調控較阻抗性細胞佳。綜合二方面結果，預期 C-3 萃取物可透過增加攝入胞外葡萄糖及合成肝醣而降低胞外葡萄糖，有助於葡萄糖恆定。因 galangin(5)含量為高良薑乙酸乙酯萃取物區分 C-3 之近七成，推測其在調節血糖作用上扮演重要的角色。



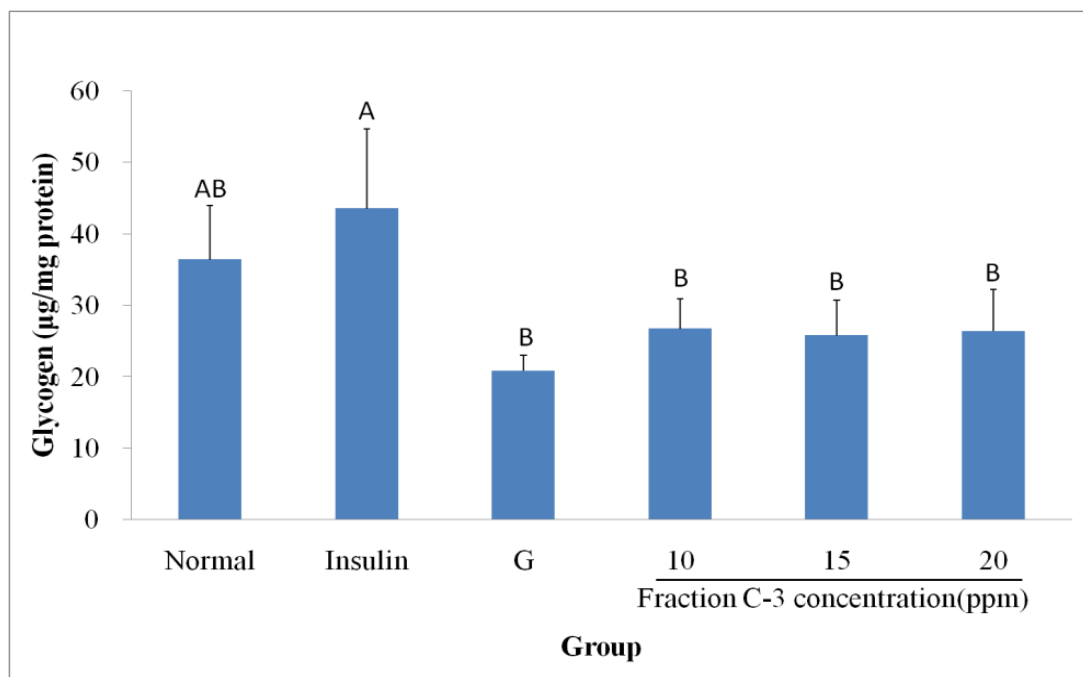
圖五十一、高良薑乙酸乙酯萃取物區分 C-3 對高糖誘導產生胰島素阻抗性 FL83B 細胞之 2-NBDG 攝入量影響。控制組(Normal group)、正常態添加胰島素組(insulin group)、高糖添加胰島素組(G+I group)。

Fig. 51 Effect of fraction C-3 of EtOAc extract from *A. officinarum* rhizome on 2-NBDG uptake of high glucose-induced insulin resistant FL83B cells. Bars represent means±SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.



圖五十二、添加高良薑乙酸乙酯萃取物之區分 C-3 時對正常 FL83B 細胞中肝糖合成量之影響。

Fig. 52 Effect of fraction C-3 of EtOAc extract from *A. officinarum* rhizome on glycogen storage in normal FL83B cells. Bars represent means±SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.



圖五十三、添加高良薑乙酸乙酯萃取物之區分 C-3 時對高糖誘導胰島素阻抗 FL83B 細胞中肝醣合成量之影響。

Fig. 53 Effect of fraction C-3 of EtOAc extract from *A. officinarum* rhizome on glycogen storage in high glucose-induced insulin resistant FL83B cells. Bars represent means±SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

## 第六章、討論

### 6-1 高良薑抗氧化性比較

本實驗將中藥材高良薑利用液相層析分離及鑑定出六種具有強抗氧化性的化合物，分別為兩種雙苯庚烷類化合物

1-hydroxy-7-(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-3-heptanone (1)及 3,6-furan-7-(4'-hydroxy-4'-methoxyphenyl)-1-phenylheptane (3)，與四種類黃酮化合物 5,7-dihydroxy-flavanone (2)、galangin-3-methyl ether (4)、galangin (5)及 kaempferol-4'-methyl ether (6)。六種化合物經由總抗氧化力(TEAC)測定顯示，其分別相當於 8.55(1)、3.33(2)、7.35(3)、3.32(4)、11.43(5)及 9.20 mM trolox 當量/mg(6)。研究指出茜草根之正己烷與乙酸乙酯萃取物中分離出具有強抗氧化性的化合物，當樣品濃度為 1mM 時，mollugin、furomollugin 分別相當於 16.07 及 2.91 mM trolox 當量，其中 mollugin 有強於 BHA 14.3 mM trolox 當量(林，2009)。研究指出咖啡果肉中具有強抗氧化的成分 Apigetrin 其相當於 0.16mM trolox 當量，有優於  $\alpha$ -生育醇 0.09mM trolox (古，2006)。高良薑乙酸乙酯萃取物中分離出具有強抗氧化的 galangin 為乙酸乙酯萃取物中分離出 6 種具強抗氧化性化合物中最大量，且具有最強抗氧化力，換算莫爾濃度在 1 mM 即相當於 3.70 mM trolox 當量。由總抗氧化力測結果與文獻相比(林，2009)，BHA 強於 galangin 3.86 倍，與硫氰酸鐵法結果有些微差異，可能是因為硫氰酸鐵法為抑制脂質自氧化的檢測方式，於脂溶性物質之抗氧化物質呈現較佳的抑制效果；而總抗氧化力以 Trolox 為標準品，較適合親水性的抗氧化物質而造成差異。文獻中指出抗氧化劑可消除糖尿病所產生之氧化壓力及脂質過氧化所造成的細胞損傷，例如脂溶性的維生素 E 與親水性的維生素 C 可能利用協同的方式降低氧化壓力，中斷脂質過氧化的連鎖反應及自由基的產生。許多具有抗氧化成分之植物，經由動物實驗證實有改善糖尿

病鼠的作用，可能透過降低自由基與脂質過氧化並提升體內抗氧化酵素活性達到改善的效果(Rahimi, 2005)。另有文獻中指出糖尿病患者由於長期高血糖，葡萄糖自氧化產生過多的自由基，消耗體內抗氧化因子，並使體內蛋白質產生糖化，造成細胞損傷，蛋白質糖化過程中又會產生大量自由基，再度加強蛋白質糖化作用，導致體內抗氧化系統失衡與疾病的產生(Ceriello, 2003)。所以具有強抗氧化性的高良薑乙酸乙酯萃取物可能有助於改善糖尿病及心血管疾病的發生，其中 galangin 抗氧化性最強且含量最高，如有改善效果可能扮演關鍵的作用。

## 6-2 高良薑對醣解酵素抑制作用

抑制醣解酵素  $\alpha$ -glucosidase 及  $\alpha$ -amylase 可減緩碳水化合物水解成葡萄糖之速率，以改善糖尿病患者飯後血糖急速上升之情形，其中類黃酮化合物具有良好的抑制效果。研究指出類黃酮化合物於樣品濃度 200 $\mu$ M 下，對於酵母菌所產之  $\alpha$ -glucosidase 的抑制率為 24-94%；類黃酮化合物於 500 $\mu$ M 濃度下，對於大鼠小腸  $\alpha$ -glucosidase 抑制率為 0-32%；豬胰臟  $\alpha$ -amylase 之抑制率為 4-64%(Tadera, 2006)。由本實驗結果得知(圖 47-48)，其中有 4 種類黃酮化合物與兩種雙苯庚烷類化合物，在樣品濃度約 300 $\mu$ M 下，對  $\alpha$ -glucosidase 抑制率為 3-28%； $\alpha$ -amylase 抑制率為 18-56%，皆呈現良好的抑制效果。其中類黃酮化合物對於  $\alpha$ -amylase 之抑制能力大於  $\alpha$ -glucosidase 與文獻相符合，由於不同來源之酵素，其活性之間有差異，故無法直接相比較。

Tadera (2006) 等人，使用數種不同類黃酮化合物結構之間的些微差距，來推論對於造成  $\alpha$ -glucosidase 及  $\alpha$ -amylase 抑制率不同之影響結果顯示類黃酮抑制  $\alpha$ -glucosidase 活性來源可能為 C 環的不飽和鍵結、3-OH、4-CO 及 B 環上 OH 取代基越多；抑制  $\alpha$ -amylase 活性來

源可能為 2,3 雙鍵、5-OH 及 B 環上的取代基越多。本實驗結果顯示類黃酮化合物亦具有良好的抑制率，其中 galangin-3-methyl ether (4) 在  $\alpha$ -glucosidase 及  $\alpha$ -amylase 皆呈現較佳的抑制效果，經由文獻推測其抑制活性來源為 2,3 雙鍵、4-CO、3-OCH<sub>3</sub> 及 5-OH。由於 galangin-3-methyl ether (4) 及 galangin (5) 在結構的差異為 C-3 位置取代基不同，固推論 galangin-3-methyl ether > galangin (3-OCH<sub>3</sub> > 3-OH)。再將 galangin (5) 及 kaempferol-4'-methyl ether (6) 相比，其在結構上的差異為 4'-OCH<sub>3</sub> 之有無，對於  $\alpha$ -amylase 而言，galangin > kaempferol-4'-methyl ether (4'-OCH<sub>3</sub>)；對於  $\alpha$ -glucosidase 來說 kaempferol-4'-methyl ether (4'-OCH<sub>3</sub>) > galangin，相較於文獻顯示大鼠小腸  $\alpha$ -glucosidase 及豬胰臟  $\alpha$ -amylase 之抑制率，Baicalein > Apigenin (4'-OH)，結構上差異為 4'-OH 之有無；酵母菌之  $\alpha$ -glucosidase 之抑制率，Apigenin (4'-OH) > Baicalein，其可能為酵素來源所造成之差異。由於本實驗的  $\alpha$ -amylase 來自於 *Aspergillus oryzae*， $\alpha$ -glucosidase 來自於 bakers yeast，所以實驗結果也與文獻結果相似。

酵素抑制可分為競爭型抑制、不競爭型抑制及非競爭型抑制，主要利用酵素動力學參數測試方法進行，使用不同濃度的抑制劑與不同濃度基質做反應，並檢測其抑制率。再將基質濃度與酵素抑制劑濃度濃度用雙倒數作圖，可得到 Lineweaver-Burk Plot，並且可以得到 Km 與 Vmax。當 Km 與 Vmax 的數值都變小時，於雙倒數作圖時呈現平行狀況則代表為不競爭型抑制機制；當 Km 的數值變大，Vmax 的數值不變時，於雙倒數作圖時呈現交集於 Y 軸的狀況則代表為競爭型抑制機制，當 Km 的數值不變，Vmax 的數值變小時，於雙倒數作圖時呈現交集於 X 軸的狀況則代表為非競爭型抑制機制(王，2011)。由於高良薑中分離出的 6 種純化物質並無與基質相似的結構，推測其對於  $\alpha$ -glucosidase 及  $\alpha$ -amylase 應該不屬於競爭型抑制作用；至於到底為不

競爭型抑制或非競爭型抑制，目前資料無法推斷，需進一步實驗才能得知。

### 6-3 高良薑對胰島素阻抗之改善

本實驗以小鼠肝臟 FL83B 細胞為研究平台，利用高糖誘導胰島素阻抗性產生，進一步添加高良薑萃取物之區分 C-3，探討對於胰島素阻抗性之改善。吳(2011)研究指出，以 67mM 之高糖刺激 FL83B 細胞，模擬體內產生胰島素阻抗之生理機制，經由流式細胞儀分析，顯著降低葡萄糖擬似物 2-NBDG 攝入量而誘導阻抗。胰島素阻抗導致胰島素傳訊路徑 phosphatidylinositol-3 kinase (P13K) 等因子受阻，而降低葡萄糖的吸收及刺激血管內皮細胞產生一氧化氮，並增加氧化壓力及促進血管發炎等作用，導致代謝症候群的發生(Hsueh, 2001)。文獻指出在肥胖小鼠的脂肪細胞中，過度表達腫瘤壞死因子 tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )，與糖尿病及慢性炎症之間有所關聯，而 TNF- $\alpha$  為一種促發炎因子，會干擾許多胰島素信號傳遞，造成胰島素阻抗、脂肪肝及糖尿病等病症(Hotamisligil, 2006)。文獻指出脂肪細胞過度產生促發炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)、visfatin, and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 等，可激活巨噬細胞而形成胰島素阻抗(Sheolson, 2006)。所以降低發炎作用，可能改善肝臟細胞的胰島素阻抗性，有助於胞外葡萄糖攝入胞內，促進肝糖的合成作用，對於血糖調控就有很重要的影響力。

目前應用於偵測胰島素刺激對葡萄糖攝入細胞內之情形，所使用之方式有放射線同位素標記(e.g., [ $^3\text{H}$ ]-, [ $^{14}\text{C}$ ]-, or [ $^{18}\text{F}$ ]-2-deoxy-D-glucose)等方式(Huang *et al*, 2009)，以液體閃爍計數器分析放射性葡萄糖分子攝入胞內之情形，然而放射線處理之安全性始終有所疑慮。本研究使用葡萄糖衍生之螢光物質 2-NBDG，由 D-glucosamine 與

NBD-Cl合成產生，目前已有文獻使用2-NBDG來評估活細胞而非死細胞之*Escherichia coli*對葡萄糖攝入之影響(Yoshioka, 1996)。Zou(2005)等人研究指出，為首位結合2-NBDG與流式細胞儀來檢測哺乳動物細胞對葡萄糖攝入胞內而累積與代謝之影響，為一種敏感且迅速而非放射線檢測方法，可作為抗糖尿病藥物的篩選方法。

本實驗利用FL83B細胞為平台，以2-NBDG及流式細胞儀分析，葡萄糖攝入情況。結果顯示高良薑乙酸乙酯萃取物之區分C-3對於2-NBDG攝入量有增加(圖50-51)，其中20ppm濃度下，顯著提升正常及高糖誘導胰島素抵抗FL83B細胞之2-NBDG攝入量，表示濃度20ppm區分C-3有促進胞外葡萄糖攝入胞內，而降低胞外葡萄糖濃度，而調降血糖濃度。胰島素抵抗性改善來源，可能為區分C-3中具有大量的抗發炎物質所導致，其中以galangin所佔的量最多達69%，影響最大。

肝醣含量可反應肝醣合成與分解雙向途徑之平衡點。結果顯示區分C-3對於肝醣儲存量有提升之趨勢，表示肝醣合成量大於分解量，可降低胞外葡萄糖濃度。結果顯示(圖52-53)，20 ppm濃度下對正常FL83B細胞肝醣儲存量之改善效果大於胰島素抵抗細胞。

#### 6-4 綜合討論

綜合以上結果推論，高良薑乙酸乙酯萃取物中強抗氧化成分，以galangin所佔的比例最大，抗氧化力也最強，且galangin也為高良薑代表性的成分之一，其產率約為0.47%。六種純化物質對於醣解酵素 $\alpha$ -glucosidase及 $\alpha$ -amylase皆有不同程度的抑制作用，可減緩碳水化合物水解成葡萄糖之速率，降低末梢組織對葡萄糖的利用，改善糖尿病患飯後血糖急速上升之情形，對於血糖調節具有效用，其中以kaempferol-4'-methyl ether對兩種醣解酵素呈現較佳的抑制率，其所



佔比例為 6 種純化物質中第三高，產率約為 0.06%。經由流式細胞儀分析 FL83B 細胞對 2-NBDG 攝入量及肝醣儲存量之結果顯示，20 ppm 區分 C-3 濃度下，有促進胞外葡萄糖帶入胞內，並儲存成肝醣，而降低胞外葡萄糖濃度，於細胞膜式下有調節血糖之作用。區分 C-3 對於胰島素阻抗也具有改善的效果，可能具有預防第二型糖尿病發生之作用，改善胰島素阻抗性的來源，可能為區分 C-3 中的抗發炎物質、降低胞內的氧化壓力及提升胞內的抗氧化酵素活性等，而 galangin 可能扮演關鍵的角色。

## 第七章、結論

1. 高良薑三種正己烷、乙酸乙酯及甲醇萃取物，經由抗氧化性測試，顯示高良薑乙酸乙酯萃取物具有最好的抗氧化性。
2. 高良薑乙酸乙酯萃取物，利用各種液相管柱層析及光譜分析鑑定出 1-hydroxy-7-(4''-hydroxy-3''-methoxyphenyl)-3- heptanone (1)、5,7-dihydroxy-flavanone(2)、3,6-furan-7-(4''-hydroxy-4''-methoxyphenyl)-1-phenylheptane (3)、galangin-3-methylether (4)、galangin (5)及 kaempferol-4'-methylether (6)等 6 種純化物質。
3. 純化物質 1-6 利用總抗氧化力(TEAC)檢測其抗氧化性，結果顯示為每毫克樣品分別相當於 8.55(1)、3.33(2)、7.35(3)、3.32(4)、11.43(5)及 9.2(6)mM 之 trolox 當量。
4. 將六種純化物質進行醣解酵素抑制效果測試，結果顯示當樣品濃度 0.1 mg/mL，對  $\alpha$ -amylase 抑制率分別為 56.63(1), 38.78(2), 43.88(3), 51.02(4), 41.84(5), 18.11%(6)；對  $\alpha$ -glucosidase 抑制率分別為 3.47(1), 12.35(2), 9.87(3), 25.99(4), 10.42(5), 28.09%(6)，其中純化物質 4 高良薑素(galangin)在  $\alpha$ -amylase、 $\alpha$ -glucosidase 抑制率上皆呈現良好的效果。
5. 高良薑乙酸乙酯萃取物之區分 C-3，在未對正常小鼠肝臟 FL83B 細胞產生毒性的濃度下，使用流式細胞儀及葡萄糖擬似物 2-NBDG 觀測葡萄糖進入細胞之情況。結果顯示其區分 C-3 在 20 ppm 即有助於正常態 FL83B 細胞攝入 2-NBDG。區分 C-3 之濃度 20 ppm 與胰島素共同作用下，皆更勝於單獨使用胰島素組，推測其對胰島素有加成效果，進而更提升 FL83B 細胞對於 2-NBDG 之吸收。
6. 高良薑乙酸乙酯萃取物之區分 C-3，於 20 ppm 濃度與胰島素共同作用於阻抗性 FL83B 細胞，相較於阻抗性細胞單獨使用胰島素的

情況下，添加高良薑區分 C-3 有顯著提高細胞之葡萄糖擬似物 2-NBDG 攝入量，但尚無法恢復至正常狀態。

7. 高良薑乙酸乙酯萃取物之區分 C-3，對正常態及胰島素阻抗性小鼠肝臟 FL83B 細胞之肝醣合成量，皆有上升的趨勢，表示肝醣合成能力也有增強之現象。
8. 純化物質 5 galangin 含量為高良薑乙酸乙酯萃取物之區分 C-3 佔 69.02%，推測其在區分 C-3 調節血糖作用上扮演重要的角色。
9. 未來將進一步利用西方轉漬法探討胰島素傳訊分子、葡萄糖轉運分子及酵素之表現，以瞭解肝臟細胞中改善胰島素阻抗性之可能作用機制，並藉以研發具調節血糖之保健食品。

## 第八章、參考文獻

- 王玉虹。2011。茉莉脂氧合酶抑制劑的特性。高雄海洋科技大學 水產食品科學研究所 碩士論文
- 中藥大辭典。2003。江蘇新醫學院編。上海科學技術出版社。
- 古為榮。2006。咖啡果肉抗氧化及揮發性成份之研究。東海大學 食品科學系 碩士論文。
- 李旻。2006。綠藻中  $\alpha$ -glucosidase 抑制物之分離與特性鑑定。靜宜大學 食品營養學系碩士論文。台中。
- 巫熒。2009。綠藻水解物對  $\alpha$ -葡萄糖苷酶與  $\alpha$ -澱粉酶之抑制與活性物質的純化。海洋大學 食品科學系 碩士論文。
- 吳青蓉。2011。黃金銀耳酸性多醣對 FL83B 小鼠肝臟細胞具胰島素增敏功效。東海大學 食品科學系 碩士論文。
- 吳崇榮。2004。糖尿病慢性併發症的致病機轉和未來展望。台灣醫界 47(6): 13-18。
- 林宏達。2003。認識糖尿病。台灣糖尿病協會。
- 林建谷。2008。綠藻萃取物與細胞壁組成之分離、鑑定與抑制糖苷酵素活性。靜宜大學 食品科學系 碩士論文。
- 林念穎。2009。茜草根正己烷及乙酸乙酯萃取物之抗氧化成分。東海大學 食品科學系 碩士論文。
- 胡智伯。2002。口服降血糖製劑與天然調節血糖物質。食品工業。34(6): 19-37。食品工業發展研究所菌種中心/國家衛生研究院細胞庫。細胞株資料單。生資中心編號: BCRC 60325。細胞株名稱: FL83B。細胞株來源: ATCC CRL-2390。組織來源: Liver, Mouse。
- 唐孟成、賈之慎、朱祥瑞和呂順霖。1996。春秋桑葉中黃酮類化合物總量及提取方法比較。浙江農業大學學報 22(4): 394-398。
- 陳紀樺。2002。血糖調節機制及功效評估。食品工業 34(6): 2-17。
- 滿田久輝, 安本教傳, 岩見公和。1967。抗氧化成分對亞麻油酸之自氧化的影響。營養與糧食 19: 210-214。
- 劉毓蕙。2008。後期醱化終產物與活性氧在糖尿病併發症中的角色。食品工業 40(1): 27-35。

- 鍾玉玲。2003。海巴戟天葉、莖及果實粗萃物的抗氧化活性之比較。嘉南藥理科技大學 生物科技研究所 碩士論文。
- 蘇正德、蔡文騰、張基煌、蘇女淳。1991。茶湯與茶渣兒茶酚含量及抗氧化性之調查研究。食品科學 18: 234-248。
- Abuja, P. M., Albertini, R. 2001. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin. Chim. Acta.* 306: 1-17.
- Ali, H., Houghton, P. J., Soumyanath A. 2006.  $\alpha$ -Amylase inhibitory activity of some malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *Journal of Ethnopharmacology* 107: 449–455.
- American diabetes association (ADA). 2011. Standard of medical care in diabetes-2011. *Diabetes Care*, Supplement 1, 34: S11-S61
- Anguelova, T., Warthsen, J. 2000. Degradation of lycopene,  $\alpha$ -carotene, and  $\beta$ -carotene during lipid peroxidation. *J. Food Sci.* 65: 71-75.
- An, N., Zou, Z.-M., Tian, Z., Luo X.-Z., Yang, S.-L., Xu, L.-Z. 2008  
Diarylheptanoids from the rhizomes of *Alpinia officinarum* and their anticancer activity. *Fitoterapia* 79: 27–31.
- An, N., Zhang, H.-W., Xu, L.-Z., Yang, Zhong-mei Zou, Z.-M. 2010. New diarylheptanoids from the rhizome of *Alpinia officinarum* hance. *Food Chemistry* 119: 513–517.
- Aquino, A., Jorge, J., Terenzi, H. and Polizeli, M. 2003. Studies on a thermostable  $\alpha$ -amylase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61:323-328.
- Arnao, M. B., Cano. A., Hernadez-Ruiz, J., Carcia-Canovas, F. and Acosta, M. 1996  
Inhibition by L-ascorbic acid and other antioxidants of 2,2'-azino-bis (3-ethylbiazoline-6-sulfonic acid) oxidation catalyzed by peroxidase: a new approach for determining total antioxidant status of food. *Analy. Biochem.* 236: 255-261.
- Aruoma, O. I. 1994. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food and Chemical Toxicology* 32: 671-683.

- Baron, A.D. 1998. Postprandial hyperglycaemia and  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *Diabetes Research and Clinical Practice* 40 Suppl.: S51-S55.
- Barry, H., John, M. C. 1999. Free radicals in biology and medicine. Oxford Scienc.
- Bate, S., Swain, E. C. 1962. Comparative biochemistry, Vol. 3, Mason, H. S. and Florkin, M., Eds., Academic Press, New York. 764.
- Baynes, J. W. and Thorpe, S. R. 1999. Role of oxidative stress in diabetic complication: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 48: 1-9.
- Bergonzi, M. C., Bilia, A. R., Bari, L. D., Mazzi, G., and Vincieri, F. F. 2007. Studies on the interactions between some flavonols and cyclodextrins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 17: 5744–5748.
- Bessesen, D. H. 2001. The role of carbohydrates in insulin resistance. *J. Nutr.* 131: 2782S-2786S
- Beyer, R. E. 1994 The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: interaction with vitamin E and coenzyme Q. *J. Bioenerg. Biomembr.* 26(4):349-58.
- Bros, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M. 1990. Flavonoids as antioxidants : Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* 186: 343-355.
- Brownlee, M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complication. *Nature* 414: 813-820
- Burton, G. W. 1994. Vitamin E: molecular and biological function. *Pro. Nutr. Soc.* 53: 251-262.
- Buse, M. G. 2006. Hexosamines, insulin resistance, and complications of diabetes: current status. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 290: E1-E8
- Ceriello, A. 1998. The emerging role of post-prandial hyperglycaemic spikes in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetic Medicine* 15: 188–193.
- Ceriello, A. 2003. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a “causal” antioxidant therapy. *Diabetes Care* 26: 1589-1596.
- Chauhan, J. S., Srivastava, S. K. and Srivastava, S. D. 1979. Two glycoflavanones from the roots of *Cleome viscosa* Ind. *J. Chem.* 17(b): 300-302.

- Cheng, A. Y. Y., Fantus, I. G. 2005. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Cmaj*. 172: 213-226.
- Cheng, H. L., Huang, H. K., Chang, C. I., Tsai, C. P., Chou, C. H. 2008. A cell-based screening identifies compounds from the stem of *Momordica charantia* that overcome insulin resistance and activate AMP-activated protein Kinase. *J. Agric. Food Chem.* 56: 6835-6843
- Cholbi, M.R., Paya, M., Alcaraz, M.J. 1991. Inhibitory effects of phenolic compounds on CCl<sub>4</sub>-induced microsomal lipid peroxidation. *Experientia* 47: 195– 199.
- Cook, N. C., Samman, S. 1996. Flavonoids: Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.* 7: 66-76.
- Crawford, J. M., Cotran, R. S. 1999. The pancreas. Cortran, R. S., Kumar, V., and Collins, T. (ed), Pathologic basis of disease. 6<sup>th</sup>. Ch 20.
- Dandona, P., Thusu, K., Cook, S., Snyder, B., Makowski, J., Armstrong, D., and Nicotera, T. 1996. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet* 347: 444-445.
- Darnell, J., Lodish, H. and Baltimore, D. 1990. Cell-to-cell signaling: Hormones and receptors. In Molecular cell biology, Ch. 19. Scientific American Books, Inc. New York.
- Duman, B. S., Turkoglu, C., Gunay, D., Cagatay, P., Demiroglu, C. and Buyukdevrim, A. 2003. The interrelationship between insulin secretion and action in type 2 diabetes mellitus with different degrees of obesity: evidence supporting central obesity. *Diabetes Nutr. Metab.* 16: 243-250.
- Facundo, V. A., Morais, S. M. 2003 Constituents of *Piper aleyreanum* (Piperaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 31: 111-113.
- Fan, G.-J., Kang, Y.-H., Han, Y. N., Han, B. H. 2007. Platelet-activating factor (PAF) receptor binding antagonists from *Alpinia officinarum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 17: 6720–6722
- Fang, Y. Z. 2002. Free radicals and nutrition. In: Fang, Y. Z., Zheng, R. L.,(Ed.). Theory and application of free radical biology. Beijing: Scientific Press: 647.
- Ferraro, G. E., Norbedo, C., Coussio, J. D. 1981 Polyphenols from *Achyrocline*

- satureioides*. *Phytochemistry*. 20(8): 2053-2054.
- Frandsen, T.P. and Svensson, B. 1998. Plant  $\alpha$ -glucosidases of the glycoside hydrolase family 31. Molecular properties, substrate specificity, reaction mechanism, and comparison with family members of different origin. *Plant Molecular Biology* 37: 1–13.
- Fred-Jaiyesimi, A., Kio, A. and Richard, W. 2009.  $\alpha$ -Amylase inhibitory effect of  $3\beta$ -olean-12-en-3-yl (9Z)-hexadec-9-enoate isolated from *Spondias mombin* leaf. *Food Chemistry* 116: 285–288.
- Fridovich, I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutase. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 97-112.
- Fujisawa, T., Ikegami, H., Inoue, K., Kawabata, Y. and Ogihara, T. 2005. Effect of two  $\alpha$ -glucosidase inhibitors, voglibose and acarbose, on postprandial hyperglycemia correlates with subjective abdominal symptoms. *Metabolism-Clinical and Experimental* 54: 387-390.
- Gao, M., Zhang, W.-C., Liu, Q.-S., Hu, J.-J., Liu, G.-T., Du, G.-H. 2008. Pinocembrin prevents glutamate-induced apoptosis in SH-SY5Y neuronal cells via decrease of *bax/bcl-2* ratio. *European Journal of Pharmacology* 591: 73–79.
- George, K. B., Lopes, Herbert, M., Scschulman and Marcelo, H. L. 1999. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1472: 142-152.
- Green, K., Brend, M. D., and Murphy, M. P. 2004. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes* 53: S110-S118.
- Halliwell, B. 1994. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence?. *Lancet* 344: 721-723.
- Halliwell, B., Murcia, M. A., Chirico, S., Aruoma, O. I. 1995. Free radicals and antioxidants in food and *in vivo*: what they do and how they work. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35: 7-20.
- Harbone, J. B. 1994. The flavonoids: advances in research since 1986. Chapman & Hall, London, UK.
- Heo, M.Y., Lee, J.H., Sohn, S.J., Au, W.W. 1996. Anticlastogenic effects of galangin



- against mitomycin C-induced micronuclei in reticulocytes of mice. *Mutation Research* 360: 37– 41.
- Horn, R. C., Vargas, V. M. 2003. Antimutagenic activity of extracts of natural substances in the Salmonella/microsome assay. *Mutagenesis*. 18: 113-118.
- Hotamisligil, G. S. 2006 Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444:860-867.
- Hsueh, W. A. and Law, R. 2003. PPAR $\gamma$  and Atherosclerosis. Effects on cell growth and movement. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21: 1891-1895.
- Huang, D. W., Shen, S. C., Wu J. S. B. 2009. Effect of caffeic acid and cinnamic acid on glucose uptake in insulin-resistant mouse hepatocytes. *J. Agric. Food Chem.* 57: 7687-7692.
- Huang, M. T., Chang, R. L., Wood, A. W., Newmark, H. L., Sayer, J. M., Yagi, H., Jerina, D. M., Conney, A. H. 1985. Inhibition of the mutagenicity of bay-region diol-epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by tannic acid, hydroxylated anthraquinones and hydroxylated cinnamic acid derivatives. *Carcinogenesis* 6: 237-242.
- Imamura, Y., Migita, T., Uriu, Y., Otagiri, M., Okawara, T. 2000. Inhibitory effects of flavonoids on rabbit heart carbonyl reductase. *Journal of Biochemistry* 127: 653–658.
- Imanaga, Y., Sakata, N., and Takebayashi, S. 2000. *In vivo* and *in vitro* evidence for the glycooxidation of low density lipoprotein in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 150: 343-355.
- Inoguchi, T., Li, P., Umeda, F., Yu, H. Y., Kakimoto, M., Imamura, M., Aoki, T., Etoh, T., Hashimoto, T., Naruse, M., Sano, H., Utsumi, H., Nawata, H. 2000. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 49: 1939-1945
- Isomaa, B. 2003. A major health hazard: The metabolic syndrome. *Life Sci.* 73: 2395-2411.
- Itokawa, H., Morita, M., Mihashi, S. 1981. Two new diarylheptanoids from *Alpina officinarum* hance. *Chem. Pharm. Bull.* 29(8): 2383-2385.

- Jacob, R. A., Burri, B. J. 1996. Oxidative damage and defense. *American Journal of Clinical Nutrition*. 63: 985S–990S.
- Jacob, R. A. 1994. Nutrition, health and antioxidants. *Inform* 11: 1271-1275.
- Jezek P. and Hlavata L. 2005. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol* 37:2478-2503.
- Julkunen-Titto, R. 1985. Phenolic constituents in the leaves of Northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics. *J. Agric. Food Chem.* 33: 213-217.
- Kahn, B. B., Flier, J. S. 2000. Obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106: 473-481.
- Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L. A. 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31: 671-701.
- Kaufman, F. 2002. Stop diabetes in its tracks. *Nurs. Manage.* Suppl: 2-6.
- Korshunov, S. S., Skulachev, V. P. and Starkov A. A. 1997. High protonic potential actuates a mechanism of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Letters* 416: 15-18.
- Koya, D., King, G. L. 1998. Protein kinase C activation and the development of diabetic complication. *Diabetes* 47: 859-866.
- Lawrence, 1961. Microdetermination of glycogen with anthrone reagent. Department of Anatomy, University of Kansas, Received for publication April 21.
- Lee, C. C., Houghton P. 2005. Cytotoxicity of plants from Malaysia and Thailand used traditionally to treat cancer. *Journal of Ethnopharmacology* 100: 237–243.
- Lee, J., Kim, K. A., Jeong, S., Lee, S., Park, H. J., Kim, N. J., Lim, S. 2009. Anti-inflammatory, anti-nociceptive, and anti-psychiatric effects by the rhizomes of *Alpinia officinarum* on complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 126: 258–264.
- Lee, S. E., Hwang, H. J., Ha, J.-S., Jeong, H.-S., Kim, J. H. 2003. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Life Sciences* 73: 167–179.
- Lenzen, S., Drinkgern, J. and Tiedge, M. 1996. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic. Biol. Med.* 20: 463-466.

- Lillioja, S., Mott, D. M., Spraul, M., Ferraro, R., Foley, J. E., Ravussin, E., Knowler, W. C., Bennett, P. H., Bogardus, C. 1993. Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin dependent diabetes mellitus: Prospective studies of Pima Indians. *N. Engl. J. Med.* 329: 1988-1992.
- Lodovici, M., Guglielmi, F., Casalini, C., Meoni, M., Cheynier, V., Dolaro. 2001. Antioxidant and radical scavenging properties *in vitro* of polyphenolic extracts from red wine. *Eur. J. Nutr.* 40: 74-77.
- Ly, T.N., Shimoyamada, M., Kato, K., Yamauchi, R. 2003. Isolation and characterization of some antioxidative compounds from the rhizomes of smaller galanga (*Alpinia officinarum* hance). *J. Agric. Food Chem.* 51: 4924-4929.
- Maarten, F. C.M., Petra, L. M., Wilbert, H. M., Eric, A. P. 1999. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction a review. *European Journal of Obs. Gynecol. Reprod. Biol.* 82: 171-184.
- Marshall, S., Bacote, V., Traxinger, R. R. 1991. Complete inhibition of glucose-induced desensitization of the glucose transport system by inhibitors of mRNA synthesis evidence for rapid turnover of glutamine: Fructose-6-phosphate amidotransferase. *J. Bio. Chem.* 266: 10115-10161.
- Matsuda, H., Ando, S., Kato, T., Morikawa, T., Yoshikawa, M. 2006. Inhibitors from the rhizomes of *Alpinia officinarum* on production of nitric oxide in lipopolysaccharide-activated macrophages and the structural requirements of diarylheptanoids for the activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14: 138–142.
- Matsuda, H., Nakashima, S., Oda, Y., Nakashima, S., Yoshikawa, M. 2009. Melanogenesis inhibitors from the rhizomes of *Alpinia officinarum* in B16 melanoma cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17: 6048–6053.
- Matsui, T., Oki, T., and Osajima, Y. 2007.  $\alpha$ -glucosidase inhibitory profile of catechins and theaflavins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 99-105.
- Maxwell, L., Gavin, J. 1992. Anti-oxidant therapy improves microvascular ultrastructure and perfusion in postischemic myocardium. *Microvasc. Res.* 43: 255-266.

- McCue, P. and Shetty, K. 2004. Inhibitory effects of rosmarinic acid extracts on porcine pancreatic amylase *in vitro*. *Asia Pacific of Clinical Nutrition* 13: 101-106.
- Meyer, A. S., Isaksen, A. 1995. Application of enzymes as food antioxidants. *Trends in Food Sci. and Tech.* 6: 300-304.
- Milic, B. L., Djilas, S. M., Canadanovic-Brunet, J. M. 1998. Antioxidative activity of phenolic compounds on the metal-ion breakdown of lipid peroxidation system. *Food Chem.* 61: 443-447.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C. A., Davies, M. J., Gopinathan, V. and Milner, A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant capacity and its application to neonates. *Clin. Sci.* 84: 407-412.
- Monauni, T., Zenti, M. G., Cretti, A., Daniels, M. C., Targher, G., Caruso, B., Caputo, M., McClain, D., Del Prato, S., Giaccari, A., Muggeo, M., Bonora, E., Bonadonna, R. C. 2000. Effects of glucosamine infusion on insulin secretion and insulin action in humans. *Diabetes* 49: 929-935.
- Morrissey, P. A., O'Brien, N.M. 1998. Dietary antioxidants in health and disease. *Int. Dairy J.* 8: 463-472.
- Moskovitz, J., Yim, M. B., Chock, P. B. 2002. Free radicals and disease. *Arch. Biochem. Biophys.* 397(2): 354-359.
- Mruka, D. D., Silvestrinib, B., Moa, M. Y., Chenga, C. Y. 2002. Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception.* 67: 305-311.
- Niki, E., 1992. Active oxygens and free radicals in biology. *Yukagaku* 41(9): 768-773.
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X. L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M. A., Beebe, D., Oates, P. J., Hammes, H. P., Giardion, I., Brownlee, M. 2000. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404: 787-790.
- Nordlie, R.C., Fostem, J.D. 1999. Regulation of glucose production by the liver. *Annurev. Nutr.* 19: 379-406.

- Pepeljnjak, S., Jalsenjak, I., Maysinger, D. 1985. Flavonoid content in propolis extracts and growth inhibition of *Bacillus subtilis*. *Pharmazie* 40: 122–123.
- Poitout, V., Robertson, R. P. 2002. Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes—a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology* 143: 339–342.
- Prentki, M., Nolan, C. J. 2006. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.* 116: 1802–1812.
- Rahimi, R., Nikfar, S., Larijani, B., and abdollahi, M. 2005. A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomed. Pharmacother.* 59: 365–373.
- Reaven, G. M., Chen, Y. D., Hollenbeck, C. B., Sheu, W. H., Ostrega, D., Polonsky, K. S. 1993. Plasma insulin C-peptide, and proinsulin glucose tolerance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76: 44–48.
- Reddy, V. P., and Beyaz, A. 2006. Inhibitor of the maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. *Drug Discov. Today* 11: 646–654
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20: 933–956.
- Rikans, L. E., Hornbrook, K. R. 1997. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim. Biophys. Acta.* 1362: 116–127.
- Sala, A., Recio, M.C., Schinella, G.R., Manez, S., Giner, R.M., Cerda-Nicolas, M., Rosi, J.L. 2003. Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. *Eur. J. Pharmacol.* 461: 53–61.
- Santos, A.C., Uyemura, S.A., Lopes, J.L., Bazon, J.N., Mingatto, F.E., Curti, C. 1998. Effect of naturally occurring flavonoids on lipid peroxidation and membrane permeability transition in mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* 24: 1455–1461.
- Scalbert, A., Williamson, G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130: 2073–2085.
- Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofzinger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D., Boyd, M. 1988. Evaluation of soluble

- tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research* 48:4827-4833.
- Sen, C. K. 1997. Nutritional biochemistry of cellular glutathione. *Nutrl. Biochem.* 8: 660-672.
- Sheldon, R., Pinnell, M. D., Durham, N. C. 2003. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *J. Am. Acad. Dermatol.* 48: 1-19.
- Shigenaga, M. K., Gimeno, C. J., Ames, B. N. 1989. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of *in vivo* oxidative DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 86: 9697-9701.
- Shih, H., Pickwell, G.V., Qutrochi, L.C. 2000. Differential effects of flavonoid compounds on tumor promoter-induced activation of the human CYP1A1 enhancer. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 373: 287–294.
- Shim, Y.-J., Doo, H.-K., Ahn, S.-Y., Kim, Y.-S., Seong, J.-K., Park, I.-S., Min, B.-H. 2003. Inhibitory effect of aqueous extract from the gall of *Rhus chinensis* on alpha-glucosidase activity and postprandial blood glucose. *Journal of Ethnopharmacology* 85: 283–287.
- Shin, J.-E., Han, M.J., Kim, D.-H., 2003. 3-Methylethergalangin isolated from *Alpinia officinarum* inhibits pancreatic lipase. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 26: 854–857.
- Shobana, S., Sreerama, Y.N. and Malleshi, N.G. 2009. Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet (*Eleusine coracana* L.) seed coat phenolics: Mode of inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic amylase. *Food Chemistry* 115: 1268–1273.
- Shoelson, S. E., Lee, J. and Goldfine, A. B. 2006. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 116:1793-1801.
- Singh, R., Barden, A., Mori, T., Beilin, L. 2001. Advanced glycation end-products: A review. *Diabetologia* 44: 129-146.
- Sun, Y., Matsubara, H., Kitanaka, S. and Yasukawa, K. 2008. Diarylheptanoids from the Rhizomes of *Alpinia officinarum*. *Helvetica Chimica Acta* 91: 118-123.
- Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K. and Matsuoka, T. 2006. Inhibition of

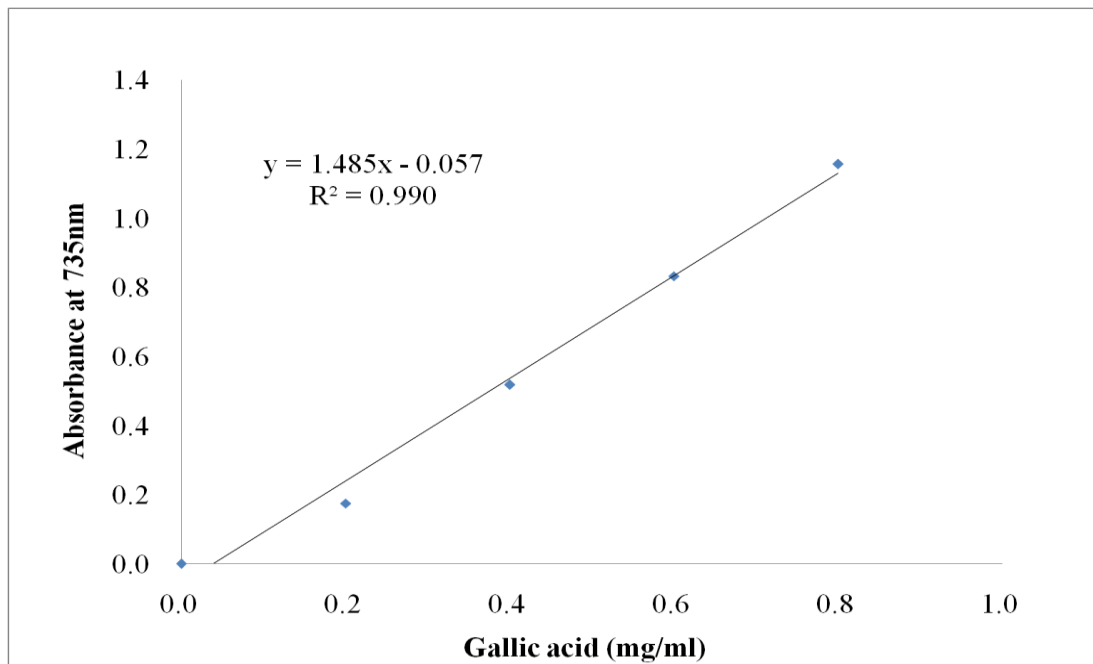
- $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase by flavonoids. *J Nutr Sci Vitaminol* 52: 149–153.
- Tao, L., Wang, Z.-T., Zhu, E.-Y., Lu, Y.-H., Wei, D.-Z. 2006. HPLC analysis of bioactive flavonoids from rhizome of *Alpinia officinarum*. *South African Journal of Botany* 72: 163-166.
- Tiedge, M., Lortz, S., Drinkgern, J. and Lenzen, S. 1997. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cell. *Diabetes* 46: 1733-1742.
- Topinka, J., Bincova, B., Sram, R. J., Erin, A. N. 1989. The influence of  $\alpha$ -tocopherol and pyritinol on oxidative DNA damage and lipid peroxidation in human lymphocytes. *Mutat Res.* 255: 131.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. and Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:44-84.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160: 1-40.
- Vaseekaran, S., Balakumar. S., Arasaratnam, V. 2010. Isolation and identification of a bacterial strain producing thermostable  $\alpha$ - Amylase. *Tropical Agricultural Research* 22(1): 1-11.
- Vessby, J., Basu, S., Mohsen, R., Berne, C. and Vessby, B. 2002. Oxidative stress and antioxidant status in type 1 diabetes mellitus. *J. Intern. Med.* 251: 69-76.
- Wall, M.E., Wani, M.C., Manikumar, G., Abraham, P., Taylor, H., Hughes, T.J., Warner, J., McGiveney, R. 1988. Plant antimutagenic agents. 2. Flavonoids. *Journal of Natural Products* 51: 1084–1091.
- Wang, B. B., Niu, F. G., Duan, Y. F. 2011. Comparison of Antioxidant Activity of Total Flavonoids from *Alpinia officinarum* Hance and *Alpinia galangal* Willd. *Food Science* 32(7): 117-120.
- Weisberg, S. P., McCann D., Desai, M., Rosenbaum M., Leibel R. L. and Ferrante A. W. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin Invest* 112: 1796-1808.

- Wells-Knecht, K. J., Zyzak, D. V., Litchfield, J. E., Thorpe, S. R., Baynes, J. W. 1995. Mechanism of autoxidative glycosylation: Identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry* 34: 3720-3790.
- Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., King, H. 2004. Global prevalence of diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27: 1047-1035.
- Wu, G., Fang, Y. Z., Yang, S., Lupton, J. R., Turner, N. D. 2003. Glutathione metabolism and its implications for health. *Nutr. Sci.* 18: 489-492.
- Xu, H., Barnes G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., Sole, J., Nichol, A., Ross J. S., Tartaglia, L. A. Chen, H. 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin Invest* 112: 1821-1830.
- Yamagishi, S. and Imaizumi, T. 2005. Diabetic vascular complications: pathophysiology, biochemical basis and potential therapeutic strategy. *Curr. Pharm. Des.* 11: 2279-2299
- Yasukawa, K., Sun, Y., Kitanaka, S., Tomizawa, N., Miura, M., Motohashi, S. 2008. Inhibitory effect of the rhizomes of *Alpine officinarum* on TPA-induced inflammation and tumor promotion in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *J. Nat. Med.* 62: 374-378.
- Yee, HS., Fong, NT. 1996. A preview of the safety and efficacy of acarbose in diabetes mellitus. *Pharmacotherapy* 16: 792-805.
- Yokozawa, T., Cho, E. J., Hara, Y., Kitaani, K. 2000. Antioxidative activity of green tea treat with radical initiator 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride. *J. Agric. Food Chem.* 48: 5068-5073.
- Yoshioka, K. Takahashi, H. Homma, T. Saito, M. Oh, K. B. Nemoto, Y. Matsuoka, H. 1996. A novel fluorescent derivative of glucose applicable to the assessment of glucose uptake activity of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1289: 5-9.
- Zhang, B.-B., Dai, Y., Liao, Z.-X., Ding, L.-S. 2010. Three new antibacterial active diarylheptanoids from *Alpinia officinarum*. *Fitoterapia* 81: 948-952.



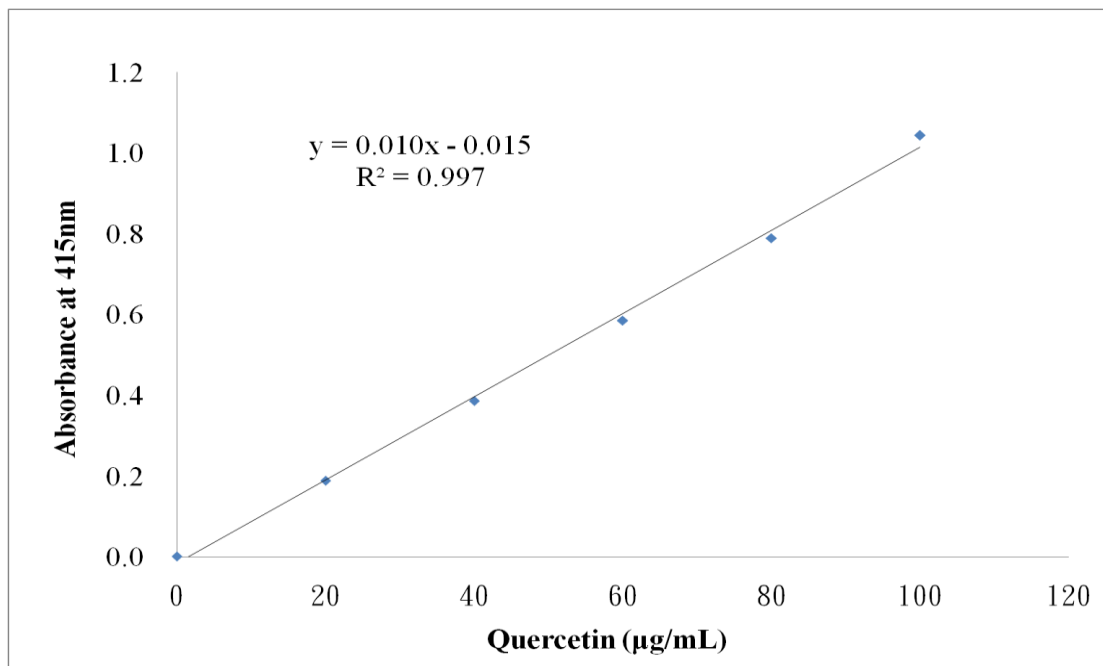
- Zang, J., Dou, J., Zhang, S., Liang, Q., Meng, Q. 2010. Chemical composition and antioxidant properties of the essential oil and methanol extracts of rhizoma *Alpinia officinarum* from China *in vitro*. *African Journal of Biotechnology* 9(28): 4414-4421.
- Zick, Y. 2001. Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling. *Trends in Cell Biology* 11(11): 437-441.
- Zierath, JR, Kawano Y. 2003. The effect of hyperglycaemia on glucose disposal and insulin signal transduction in skeletal muscle. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 17: 385-398.
- Zimmet, P., Alberti, K. G., Shaw, J. 2001. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414: 782-787.
- Zou, C., Wang, Y., Shen, Z. 2005. 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement. *J. Biochem. Biophys. Methods* 64: 207–215.

## 第九章、附錄



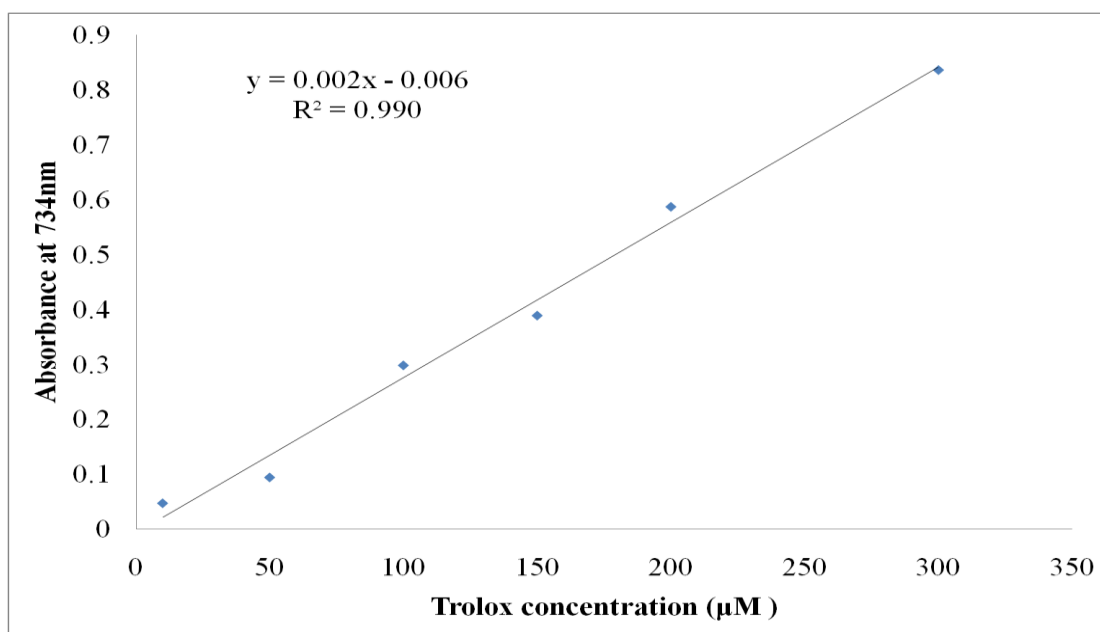
附錄一、沒食子酸之標準曲線。

Appendix 1 Standard curve of gallic acid.



附錄二、槲皮酮之標準曲線。

Appendix 2 Standard curve of quercetin.



附錄三、Trolox 之標準曲線。

Appendix 3 Standard curve of trolox.