

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)

甘草中具醣解酵素抑制活性萃取物及純化物質  
之調節葡萄糖恆定作用

Regulating Glucose Homeostasis by Glycosidases Inhibitory  
Extracts and Isolated Components from Licorice

研究生：王瑄閔 (Hsuan-Min Wang) 撰

中華民國一百年十一月

November, 2011

# 謝誌

時間過得好快，轉眼間，在東海研究所生涯即將畫下句點，首先感謝恩師 蘇正德教授在研究所兩年來悉心指導與鼓勵，讓學生在學術研究以及待人處世上受益良多，並於論文撰稿期間詳閱斧正，使論文得以順利完成，師恩浩瀚，謹以卷首致上最大的謝意。

文稿初成，復蒙 王進崑博士、江文德博士、盧錫祺博士、蔡正宗博士對學生論文詳加審閱及斧正，使論文趨於完整。

研究期間，感謝學長姐綱存、柏村、青蓉、怡樺、永翰在實驗技術上的指導與幫忙；摯友蕙芳、芯瑜、小薇、玫春的鼓勵；研究所同學芄萱、佳華、菁羽、建廷、俊麟、希奇以及學弟妹欣怡、建宏、昭伶、彥蘋、鈺萍、瑋翔等人在實驗上的協助及陪伴，一起慶生、出遊、聚餐、夜保分享生活中的喜、怒、哀、樂，因為有你們，使我的研究所生涯才能如此的多采多姿，也帶給我滿滿的回憶。

最後，更感謝我的父母以及男友在求學階段的支持，不斷的鼓勵開導我，讓我無後顧之憂的完成學業，真的好愛你們，最後謹以此論文獻給我最親愛的師長、家人以及朋友，I Love You!

王瑄閔 謹致於

東海大學食品科學研究所

中華民國一百年十一月

# 摘要

本研究以原產於中國大陸內蒙古地區之甘草 (licorice, *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. rhizomes) 為材料，經不同溶劑萃取，選擇對醣解酵素  $\alpha$ -amylase 及  $\alpha$ -glucosidase 活性最佳抑制能力的 50% 乙醇萃取物及其純化活性成分，利用小鼠 FL83B 肝細胞株進行細胞試驗，探討不同濃度甘草萃取物及純化物質對細胞之毒性以及對細胞葡萄糖擬似物攝入量及肝醣合成量之促進活性。首先將甘草分別以乙醇、50% 乙醇以及熱水萃取，測定各萃取物對醣解酵素活性的抑制能力。結果顯示 50% 乙醇萃取物對兩種酵素具較佳抑制效果，對  $\alpha$ -amylase 及  $\alpha$ -glucosidase 抑制率分別為 15.64% 及 51.05%。以此萃取物依序經 Amberlite XAD-7、Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 及 HPLC 等液相層析分離純化後，以紫外-可見光吸光、質譜及 <sup>1</sup>H、<sup>13</sup>C 核磁共振等光譜分析，鑑定出主要組成分為 4'-hydroxy-flavanone-7-O-glucoside (1)、4-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl- 2', 4'-dihydroxy-chalcone (2)、4',7-dihydroxy flavanone (3)、ononin (4)、7-hydroxy-4'-methoxy-isoflavone (5) 等 5 種類黃酮。其中以純化物質 2、3、5 的含量較多，而醣解酵素抑制活性測試結果顯示，純化物質 2 的抑制率最佳，因此被選擇進行後續之細胞試驗。在 XTT 細胞毒性測試中，添加 200 ppm 甘草萃取物以及純化物質 2 均未對小鼠肝臟 FL83B 細胞產生毒性。在添加 50、100 及 200 ppm 甘草 50% 乙醇萃取物及其純化物質 2 時，葡萄糖擬似物(2-NBDG)細胞的帶入量及細胞內肝醣合成量均提升。本研究結果初步顯示甘草 50% 乙醇萃取物可能藉由降低腸胃道中醣解酵素作用及增加肝中葡萄糖帶入與儲存，協助細胞調節葡萄糖之恆定性。

關鍵詞：甘草、降血糖、 $\alpha$ -澱粉酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶、查爾酮、類黃酮、FL83B 細胞

# Abstract

Licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) is a legume that is mainly grown in southern Asia and Europe. Licorice, also known as sweet root, is one of the most widely used medicinal herbs in traditional oriental medicine, where it has been used to treat bronchitis, coughs, arthritis, adrenal insufficiency and allergies. In this study, the active components were isolated and identified from the 50% ethanol licorice extract, and were tested for their hypoglycemic activities *in vitro*. 50% ethanol licorice extracts showed strong inhibitory properties against both  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. The extract was further separated successively by Amberlite XAD-7, Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN, and reversed HPLC chromatographies to obtain five components. The isolated components were identified as 4'-hydroxy-flavanone-7-O-glucoside (1), 4-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-2',4'-hydroxy-chalcone (2), 4',7-dihydroxyflavanone (3), ononin (4) and 7-hydroxy-4'-methoxy-isoflavone (5) by MS, UV, and <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-NMR analyses. Among them, the isolated component 2 showed the most contents and the strongest inhibitory activities toward  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase, with inhibition rates of 52.55% and 31.00% at the concentration of 1mg/ml. Hypoglycemic activities of the 50% ethanol licorice extract and isolated component 2 were further verified in a murine FL83B hepatocyte line. Both the 50% ethanol licorice extract and isolated component 2 had no inhibitory effects on the growth of FL83B cells at the concentration of 200 ppm by the XTT assays. In the presence of the extract or isolated component, uptake of glucose analogue 2-NBDG was significantly enhanced when FL83B cells were rendered resistant to insulin by a prior incubation with high concentration of glucose. Glycogen contents both in normal and in insulin resistant cells were also increased by adding the 50% ethanol licorice extract or isolated component 2 in a dose-dependent manner. Our results demonstrated the 4-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl- 2',4'- hydroxy-chalcone from licorice may inhibit  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase, and promotes glucose uptake and storage in hepatocytes, implying a hypoglycemic activity *in vivo*.

Key word: Licorice, *Glycyrrhiza uralensis*, hypoglycemic activity,  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, chalcone, flavonoid, FL83B cell

# 目錄

中文摘要	I
英文摘要	II
圖次	VI
表次	IX
壹、前言	01
貳、文獻整理	02
2.1 甘草之簡介	02
2.1.1 甘草中藥化學成分	03
2.1.2 甘草生物活性成分	04
2.1.3 甘草之藥理作用	06
2.1.4 甘草之副作用	07
2.2 糖尿病	08
2.2.1 後期糖化終產物(AGEs)與糖尿病	10
2.2.2 糖尿病症狀	12
2.2.3 第一型糖尿病(胰島素依賴型, IDDM)	12
2.2.4 第二型糖尿病(非胰島素依賴型, NIDDM)	13
2.2.5 妊娠性糖尿病( gestational diabetes mellitus, GDM )	13
2.2.6 其他特異型糖尿病	13
2.2.7 糖尿病藥物治療	14
2.2.8 糖尿病所引起的併發症	18
2.2.9 糖尿病的檢查項目	19
2.3 $\alpha$ -澱粉酶 ( $\alpha$ -amylase, EC 3.2.1.1)	20
2.4 $\alpha$ -葡萄糖苷酶 ( $\alpha$ -glucosidase, EC 3.2.1.20)	20
2.5 自由基與活性氧	21
2.5.1 自由基與活性氧種類	21

2.5.2 自由基及活性氧來源-----	23
2.5.3 脂質氧化作用-----	26
2.6 自由基與糖尿病-----	29
2.7 抗氧化機制與抗氧化劑-----	30
2.7.1 抗氧化作用機制-----	31
2.7.2 天然抗氧化劑-----	34
2.7.3 人工合成抗氧化劑-----	35
2.8 多酚化合物(Polyphenol compounds) -----	35
2.8.1 酚酸(Phenolic acids) -----	35
2.8.2 類黃酮(Flavonoids)-----	35
2.9 小鼠肝臟FL83B細胞-----	40
參、 材料與方法-----	42
3.1 實驗材料-----	42
3.2 實驗儀器與藥品-----	42
3.2.1 儀器設備-----	42
3.2.2 化學試劑-----	43
3.2.3 溶劑-----	46
3.2.4 液相管柱層析充填劑-----	46
3.3 實驗架構-----	47
3.4 實驗方法-----	48
3.4.1 抗氧化性檢測-----	48
3.4.2 醣解酵素抑制活性檢測-----	51
3.4.3 甘草調節血糖成分之分離純化及結構鑑定-----	52
3.4.4 細胞降血糖功效測定-----	54
3.5 統計分析-----	56
肆、 結果與討論-----	57

4.1 甘草調解血糖成分之萃取、分離及純化-----	57
4.1.1 甘草調節血糖成分之萃取-----	57
4.1.2 XAD-7 液相管柱層析-----	60
4.1.3 Cosmosil 75 C <sub>18</sub> -OPN 液相管柱層析-----	66
4.1.4 活性成分之高效液相層析-----	69
4.2 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質之結構鑑定-----	75
4.3 純化物質之醣解酵素抑制活性-----	97
4.4 甘草 50% 乙醇萃取物及純化物質對小鼠肝臟 FL83B 細胞之血糖調節作用 -----	99
4.4.1 甘草 50% 乙醇萃取物及純化物質對 FL83B 細胞之毒性-----	99
4.4.2 甘草 50% 乙醇萃取物及純化物質對 FL83B 細胞葡萄糖擬似物 2-NBDG 攝入百分率之影響-----	102
4.4.3 甘草 50% 乙醇萃取物及純化物質對 FL83B 細胞肝醣合成量之影響 -----	110
伍、 結論-----	116
陸、 參考文獻-----	117
柒、 附錄-----	125

圖 2-1 乾燥之甘草-----	03
圖 2-2 光甘草定化學結構-----	03
圖 2-3 甘草類黃酮和三萜類化合物成分之化學結構-----	04
圖 2-4 甘草酸之化學結構-----	05
圖 2-5 胰臟β細胞粒線體控制胰島素分泌機制-----	09
圖 2-6 胰島素之代謝調控-----	10
圖 2-7 後期糖化終產物生成圖-----	11
圖 2-8 高血糖誘發之氧化壓力及其所致的生理影響-----	11
圖 2-9 根據不同藥理作用部位治療高血糖-----	17
圖 2-10 氧分子之氧化還原及激發狀態-----	22
圖 2-11 活性氧來源及其對細胞的影響-----	23
圖 2-12 脂質自氧化連鎖反應-----	27
圖 2-13 油脂自氧化的反應階段-----	28
圖 2-14 不飽和脂肪酸自氧化反應中最初氫過氧化物的形成-----	28
圖 2-15 肝醣合成路徑-----	30
圖 2-16 自由基清除劑之抗氧化作用機制-----	33
圖 2-17 苯甲酸及肉桂酸衍生物之結構圖-----	37
圖 2-18 類黃酮基本結構圖-----	37
圖 2-19 類黃酮衍生物之化學結構-----	38
圖 2-20 FL83B 細胞株之生長型態-----	41
圖 3-1 甘草糖解酵素抑制活性成分之純化及調節血糖作用實驗流程圖-----	47
圖 3-2 硫氰酸鐵法測定流程圖-----	49
圖 3-3 DPPH 自由基清除作用之反應式-----	50
圖 3-4 葡萄糖之呈色反應-----	51
圖 3-5 XTT 反應機制-----	55
圖 4-1 甘草不同溶劑萃取物對 $\alpha$ -amylase 及 $\alpha$ -glucosidase 之抑制活性百分率	



-----	59
圖 4-2 甘草不同溶劑萃取物之 DPPH 自由基清除能力-----	60
圖 4-3 甘草 50% 乙醇萃取物之 XAD-7 液相管柱層析圖-----	62
圖 4-4 XAD-7 液相管柱層析區分物對 $\alpha$ -amylase 及 $\alpha$ -glucosidase 之抑制活性 百分率-----	64
圖 4-5 甘草 50% 乙醇萃取物沖提區分之抗氧化性-----	65
圖 4-6 甘草 50% 乙醇萃取物之 Cosmosil 75 C <sub>18</sub> -OPN 液相管柱層析圖-----	67
圖 4-7 Cosmosil 75 C <sub>18</sub> -OPN 液相管柱層析區分物對 $\alpha$ -amylase 及 $\alpha$ -glucosidase 之抑制活性百分率-----	68
圖 4-8 甘草 50% 乙醇萃取物沖提區分 IV-1 之分析型高效液相層析圖-----	70
圖 4-9 甘草 50% 乙醇萃取物沖提區分 IV-1 之製備型高效液相層析圖-----	70
圖 4-10 甘草 50% 乙醇萃取物沖提區分 IV-1-(1) 之分析型高效液相層析圖---	71
圖 4-11 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 <b>1</b> 之分析型高效液相層析圖-----	71
圖 4-12 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 <b>2</b> 之分析型高效液相層析圖-----	72
圖 4-13 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 <b>3</b> 之分析型高效液相層析圖-----	72
圖 4-14 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 <b>4</b> 之分析型高效液相層析圖-----	73
圖 4-15 甘草 50% 乙醇萃取物沖提區分 IV-5 之分析型高效液相層析圖-----	73
圖 4-16 甘草 50% 乙醇萃取物沖提區分 IV-5 之製備型高效液相層析圖-----	74
圖 4-17 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 <b>1</b> 之結構-----	76
圖 4-18 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 <b>1</b> 之紫外光-可見光光譜圖-----	77
圖 4-19 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 <b>1</b> 之 <sup>1</sup> H-核磁共振光譜圖-----	78
圖 4-20 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 <b>2</b> 之結構-----	80
圖 4-21 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 <b>2</b> 之紫外光-可見光光譜圖-----	81
圖 4-22 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 <b>2</b> 之 <sup>1</sup> H-核磁共振光譜圖-----	82
圖 4-23 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 <b>2</b> 之 <sup>13</sup> C-核磁共振光譜圖-----	83
圖 4-24 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 <b>3</b> 之結構-----	85
圖 4-25 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 <b>3</b> 之紫外光-可見光光譜圖-----	86
圖 4-26 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 <b>3</b> 之 <sup>1</sup> H-核磁共振光譜圖-----	87

圖 4-27 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 3 之 $^{13}\text{C}$ -核磁共振光譜圖-----	88
圖 4-28 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 4 之結構-----	90
圖 4-29 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 4 之紫外光-可見光光譜圖-----	91
圖 4-30 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 4 之 $^1\text{H}$ -核磁共振光譜圖-----	92
圖 4-31 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 5 之結構-----	94
圖 4-32 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 5 之紫外光-可見光光譜圖-----	94
圖 4-33 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 5 之 $^1\text{H}$ -核磁共振光譜圖-----	95
圖 4-34 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質對 $\alpha$ -amylase 及 $\alpha$ -glucosidase 之抑制活 性百分率-----	98
圖 4-35 不同濃度甘草 50% 乙醇萃取物對 FL83B 細胞存活率之影響-----	100
圖 4-36 不同濃度 4-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-2',4'-dihydroxy-chalcone 對 FL83B 細胞存活率之影響-----	101
圖 4-37 甘草 50% 乙醇萃取物對於 FL83B 細胞 2-NBDG 攝入百分率之影響 -----	103
圖 4-38 甘草 50% 萃取物對胰島素阻抗性 FL83B 細胞 2-NBDG 攝入百分率 之影響-----	105
圖 4-39 甘草 50% 乙醇萃取物純化物 4-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-2',4'-dihydroxy- chalcone 對 FL83B 細胞 2-NBDG 攝入百分率之影響-----	107
圖 4-40 甘草 50% 乙醇萃取物純化物 4-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-2',4'-dihydroxy- chalcone 對胰島素阻抗性 FL83B 細胞 2-NBDG 攝入百分率之影響-----	109
圖 4-41 不同濃度甘草 50% 乙醇萃取物對 FL83B 細胞肝醣合成量之影響---	111
圖 4-42 不同濃度甘草 50% 乙醇萃取物對胰島素阻抗性 FL83B 細胞肝醣合成 量之影響-----	113
圖 4-43 不同濃度純化物質 4-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl -2',4'-dihydroxy-chalcone 對 FL83B 細胞肝醣合成量之影響-----	114
圖 4-44 不同濃度純化物質 4-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl -2',4'-dihydroxy-chalcone 對胰島素阻抗性 FL83B 細胞肝醣合成量之影響-----	115

表次	頁碼
表 2-1 活性氧族群-----	22
表 2-2 導致生活習慣病、癌症、老化的五種自由基-----	24
表 2-3 天然抗氧化物質及其來源-----	34
表 2-4 類黃酮衍生物之抗氧化性-----	39
表 4-1 不同溶劑甘草萃取物之萃取率-----	58
表 4-2 不同溶劑甘草萃取物之總多酚、總類黃酮含量-----	58
表 4-3 甘草 50% 乙醇萃取物經 XAD-7 液相層析後各沖提區分之產率-----	63
表 4-4 Cosmosil 75 C <sub>18</sub> -OPN 液相管柱層析區分 IV 各沖提區分之產率-----	68
表 4-5 利用 HPLC 定量純化物質 IV-1、IV-5 所得純化物質含量及產率-----	97

## 壹、前言

糖尿病是國人近三十年來由於生活水準提高逐漸增加罹患率，也是十大死因之一的慢性疾病，根據 98 年衛生署統計資料顯示，糖尿病位居國人十大死因之第五位(行政院衛生署，2011)，病患的年齡層也有慢慢年輕化的趨勢，由於糖尿病無法治癒，新的患者持續發生，導致發病率持續累積並增加。控制此病情的首要之務就是控制血糖含量，使血糖調節到一定的濃度，以避免各種嚴重併發症的發生。

血糖調節主要有三大方法:(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。此外，在進行藥物療法的同時，膳食療法也需要適當的配合，否則藥物療法也將無法發揮其功能，因此，尋求具調節血糖功效之保健食材已成為一項重要的課題。

常用傳統中藥甘草(licorice, *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. rhizomes) 屬於豆科植物，又可稱為蜜草、甜草、靈通等，甘草原本是起源於中歐，但現在已橫跨歐洲及亞洲各地，其根也被用於藥物上。甘草的使用歷史悠久，它是傳統中醫中一個很重要的草本植物，已知具抗過敏、抗潰瘍、解毒、抗發炎、免疫調節及抗病毒等保健功效。為了因應糖尿病患者的需求，大陸市場上早已推出一靈驗複方甘草-白芍(0.66g-3.3g)的甘芍降血糖片(每天服用三次，每次 4-8 片，李，2007)，但文獻上對甘草、白芍調節血糖有效成分的研究相當少見；因此，本研究擬以傳統煎藥(熱水萃取)以及泡酒方式(酒精萃取)進行其一主要藥材甘草的萃取，並以醣解酵素抑制作用作為篩選平台，進行活性成分之分離、純化及結構鑑定。甘草萃取物及純化物質亦將針對小鼠肝臟 FL83B 細胞進行細胞實驗，並探討其對細胞生理活性及醣類轉換之調節機制。

## 貳、文獻整理

### 2.1 甘草之簡介

甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. (圖 2-1)別名美草、蜜甘<本經>、路草<別壺>、靈通<紀事珠>、甜草<中國藥植志>等，記載始於神農本草經，甘草的根與根莖因具有消炎、抗病毒、抗過敏、抗氧化、對胃的保護作用及抗腫瘤等功效，廣泛被應用於中草藥中，故中藥古書謂甘草為「眾草藥之主，經方少有不用者」，故甘草有其「十方九草」之美譽，其甜度約為蔗糖之 170 倍(Hashemi *et al.*, 2009)，因此食品中常被用來當作調味劑，甜度主要來源為其內甘草酸成分，約佔 10–25% (Isbrucker and Burdock, 2006)。其根部亦含具生物活性的醣類(約 18%)、黃酮類、皂苷、澱粉、胺基酸、膠以及精油等化合物 (Mamata and Palash, 2008)。

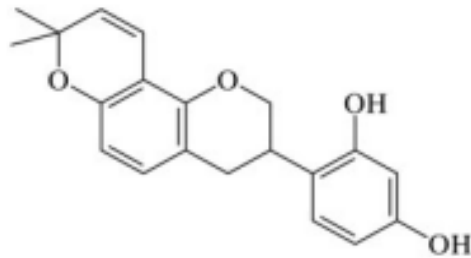
甘草為豆科多年生草本植物，高約 30-70 厘米，高達 1 米。根莖圓柱狀，主根甚長、粗大，外皮為紅褐色至暗褐色。莖直立，梢帶木質，披白色短毛及腺鱗或腺狀毛。分布於中國華北、東北、西北以及中亞、南歐地區(Yen, 1996)，主要生長於乾旱的荒漠草原裡。甘草除上述主要品種外，尚有以下同屬植物亦入藥用：

- (1) 光果甘草 *Glycyrrhiza glabra* L.，又名歐甘草。其特徵為局部披有白霜和疏柔毛，不具腺毛，小葉長橢圓形或狹長卵型。莢果長圓形，扁而直或略彎曲，分布新疆。文獻指出此品種甘草中的光甘草定(glabridin)(圖 2-2)含量最多，為上百種食用植物中最有效的降脂素材(潘，2011)。
- (2) 黃甘草 *Glycyrrhiza kansuensis* Chang et Peng，其特徵莖上部披微毛或近無毛，莢果略作鐮狀彎曲、膨脹，具腺毛，分布甘肅。
- (3) 脹果甘草 *Glycyrrhiza inflata* Batal.，其特徵小葉 3-5 片，稀達 7 片，下面中臍無毛，莢果長圓形而直、膨脹，分布新疆、甘肅等地。



圖 2-1 乾燥之甘草。

Fig. 2-1 Dry licorice.



(Kang *et al.* 2004)

圖 2-2 光甘草定化學結構。

Fig. 2-2 Chemical structure of glabridin.

### 2.1.1 甘草中藥化學成分

甘草的根和莖含三萜皂苷甘草酸(glycyrrhizic acid)，即甘草甜素(glycyrrhizin)，是甘草次酸(glycyrrhetic acid, glycyrrhetic acid)的二葡萄糖醛酸苷，為甘草的甜味成分(中草藥大辭典，1996)。從甘草中可分離出多種黃酮成分，有甘草素(liquiritigenin，即 4',7'-二羥基雙氫黃酮)、異甘草素(isoliquiritigenin，2,4,4'-三羥基查爾酮)、甘草苷(liquiritin，即甘草素 4'- $\beta$ -葡萄糖甙)、新甘草苷(neoliquiritin)、新異甘草苷(neoisoliquiritin)、異甘草素-4- $\beta$ -葡萄糖- $\beta$  洋元鞣糖苷(licurazid)等。

甘草屬的根尚含有甘草西素(Licoricidin)，即 3',6-二異戊烯基-2',4',5-三羥基-7-甲氧基異黃酮、甘草醇(Glycyrol)、5-O-甲基甘草醇和異甘草醇、雌激素類物質等。圖 2-3 為部分甘草化合物之結構式(Wang and Yang，2007)

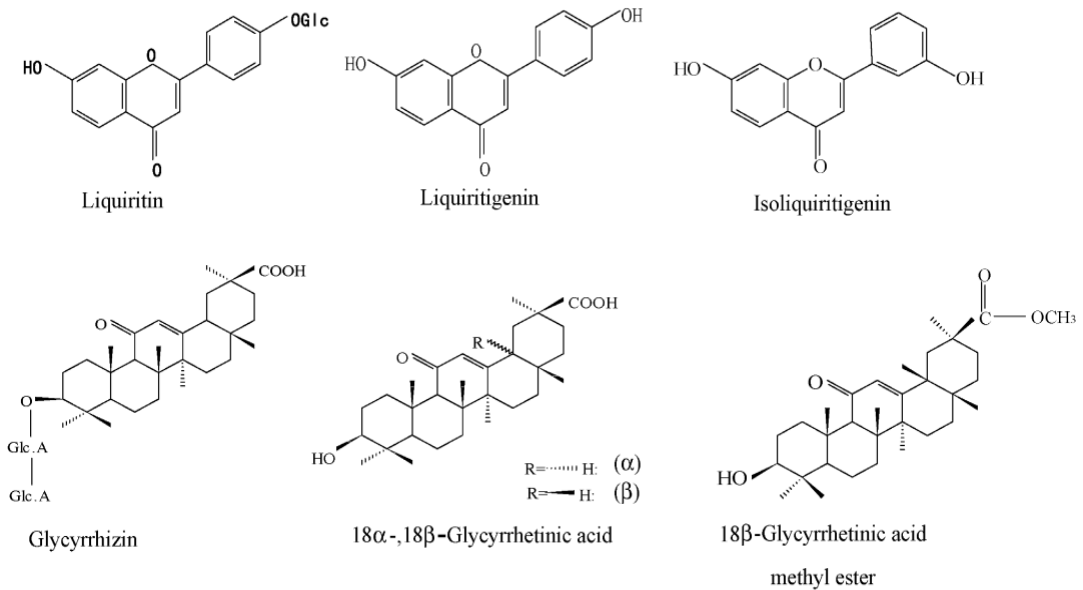
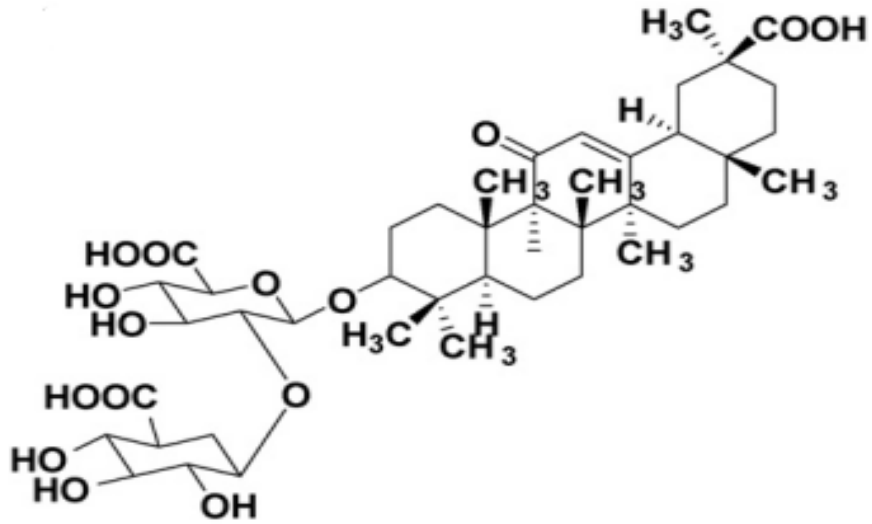


圖 2-3 甘草類黃酮和三萜類化合物成分之化學結構。

Fig. 2-3 Chemical structures of flavonoids and triterpenoids in licorice.

### 2.1.2 甘草生物活性成分

研究表明，甘草中含有許多生物活性化合物，包含三萜類化合物以及黃酮類物質 (Wang and Yang, 2007)，主要存在於甘草根表皮以內的部分。目前為止從甘草中分離出的化合物有甘草甜素、甘草次酸、甘草苷、異甘草苷、新甘草苷、新異甘草苷、甘草素、異甘草素以及甘草西定、甘草醇、異甘草醇、7-甲基香豆精、傘形花內酯等數十種化合物，但這些成分和含量通常會隨甘草的種類、種植區域、採收時間等因素的不同而異。而在有關甘草研究文獻，最常被探討的單一化合物為甘草酸(圖 2-4)，為混合鈣、鈉以及鉀鹽甘草酸結合成的一種糖苷類物質，具有三個羧基和五個羥基，於水溶液中呈弱酸性，具有抗發炎、提升免疫力、抗潰瘍等功效，在體內及臨床證實甘草酸每日允許劑量的範圍為 0.229 mg glycyrrhizin/ kg body weight /day (Isbrucker and Burdock, 2006)。



(Baek *et al.* , 2008)

圖 2-4 甘草酸之化學結構。

Fig. 2-4 Chemical structure of glycyrrhizic acid.



### 2.1.3 甘草之藥理作用

中醫認為甘草能緩及止痛、潤肺止渴、消熱解毒。炙用，治脾胃虛弱、食欲不振、疲倦、咳嗽、心悸；生用，治喉嚨腫痛、癰疽瘡瘍、潰瘍、解毒等(鄭，2006)。

#### (1) 類似腎上腺皮質激素作用(epinephrine-like action)

甘草甜素之鉀鹽、銨鹽、甘草次酸均有去氧皮質酮類似的作用，能使多種實驗動物尿量及鈉的排出減少，鉀排出增加，血鈉上升，血鈣降低，腎上腺皮質小球帶萎縮，但大量或長期服用甘草，會引起水腫、高血壓、低血鉀等症狀。(杜，2002)

#### (2) 抗發炎作用(anti-inflammation)

甘草中甘草酸成分具有抗發炎功效，炙用甘草之乙醇萃取物可抑制小鼠巨噬細胞被脂多醣(LPS)誘導一氧化氮(NO)分泌和 prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)釋放而產生發炎反應，亦能降低發炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 以及 IL-1 $\beta$  於小鼠巨噬細胞的濃度 (Cho *et al.*，2010)。

#### (3) 解毒作用(detoxification)

甘草能消除或減少組織胺、水和氯醛、汞等毒性，對河豚毒素、蛇毒均有效，主要解毒成分為甘草甜素的吸附作用，其解毒機制與活性碳相似，甘草甜素水解後產生葡萄糖醛酸結合解毒，與有毒物質於肝臟中結合成 glucuronide 而排出體外 (蒲，2007；楊，2008；高，1982)。

#### (4) 鎮咳作用(antitussive activity)

一般認為甘草於口服後能覆蓋發炎咽部的黏膜而減少刺激，而發揮其鎮咳的功效。Anderson 和 Smith (1961) 以 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid 及其衍生物對豬和貓等動物施予口服及靜脈注射(劑量 1mg/kg)，發現 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid 及其衍生物的止咳效果幾乎與可待因(codeine)有相同的療效。

#### (5) 抗潰瘍作用(anti-ulcer care)

甘草的抗潰瘍成分-甘草甜素能增加胃黏膜細胞的“己醯胺”成分，提高胃黏膜的防禦能力，延長為上皮細胞的壽命，加速潰瘍癒合能力。另外，質子幫浦(proton pump)局部存在於胃黏膜層，做為胃酸分泌過程中質子的提供者。而甘草甜素能抑制胃基底黏膜層質子幫浦酵素的活性，進而抑制質子的釋放及胃酸的生成，因此可有效減緩胃潰瘍症狀(黃等，1992)。

#### (6) 治皮膚病(skin diseases)

甘草甜素之水解產物甘草次酸化學結構有類似腎上腺皮質素的作用，有抗炎、抗毒素、抗過敏等作用，能抑制組織胺釋放，故對一些皮膚病有治療效果。另外，用甘草煎水冷濕敷皮損處，對急性濕疹、過敏性皮膚炎及其他皮膚炎引起之紅腫、糜爛等症狀都有良好的療效(包，2009)。

#### (7) 保肝功能

可降低由四氯化碳誘發產生肝細胞變性和壞死程度，降低血清轉氨酶活性，提高肝細胞內 DNA 含量，促進肝細胞的再生，對肝炎病毒有抑制的作用(蒲，2008)。

### 2.1.4 甘草之副作用

甘草雖然應用廣泛，但亦有不可用之方面。甘草“味甘”，凡是甘味之藥物，起作用都較遲緩，不能治療急症，會妨礙消化功能，加重各種“濕症”的症狀，此外，甘味還會導致腎氣受損，這些方面皆不可應用甘草(楊，2008)；而在 1996 年《中醫雜誌》提到甘草可引起低鉀血症，並指出甘草致低血鉀症的機理，有以下五點：(1)甘草次酸具有促腎上腺皮質激素的作用、(2)甘草次酸能增強醛固酮的活性、(3)甘草次酸能抑制肝臟 5 $\alpha$  及 5 $\beta$  甾類還原酶活性、(4)甘草次酸與鹽皮質激素受體結合而發揮作用、(5)甘草次酸對 II- $\beta$  羥基類固醇脫氫酶(II- $\beta$ -OHS)的抑制作用。所以在使用甘草時，須注意使用之劑量，大劑量應用會出現副作用，因而造成其他症狀出現。甘草不得連續服用三個月，每次使用不宜超過 10g，且甘草不宜與海藻、大戟、甘遂、芫花同用(王，2011；王、侯、許，2009)。

## 2.2 糖尿病 (diabetes)

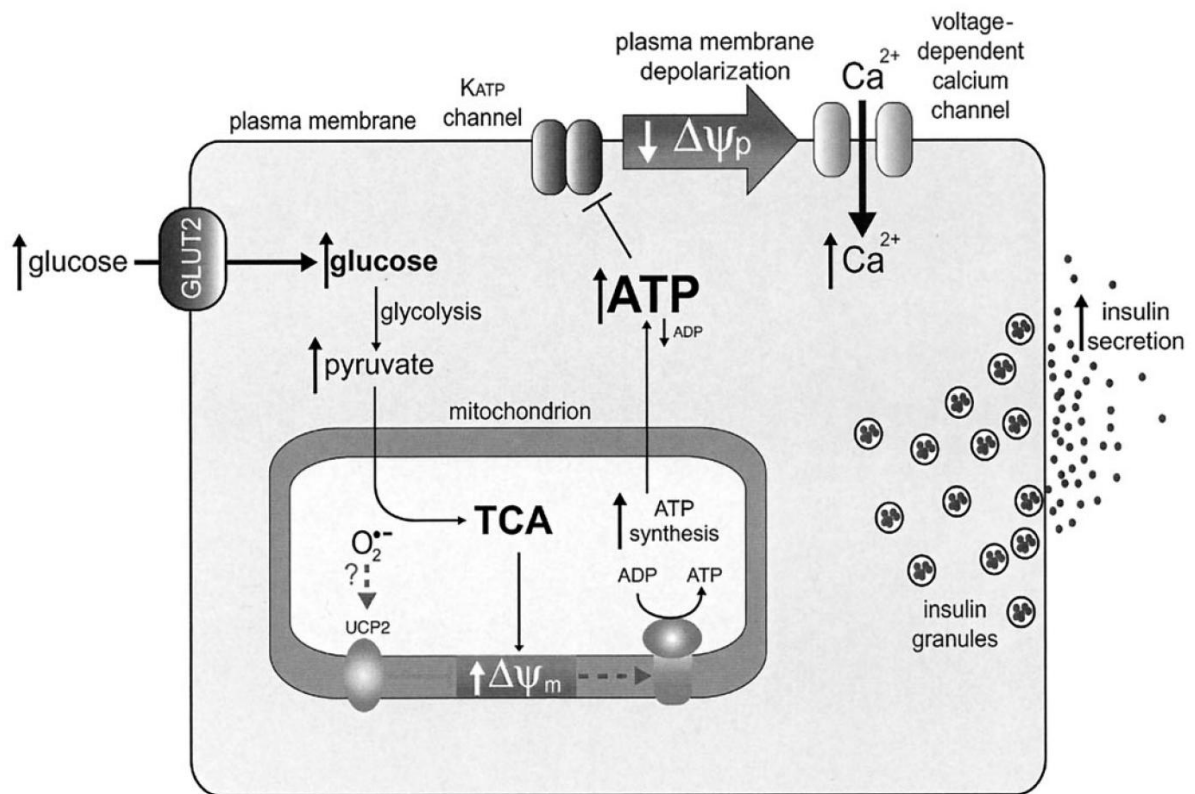
糖尿病是一種胰島素分泌不足或胰島素作用缺失所導致的一種醣類代謝的慢性疾病，身體在正常的情況下，食物在胃腸道被消化分解後轉變成葡萄糖，以葡萄糖型式進入血液循環，成為各器官組織能量的主要來源，此時胰臟會刺激蘭氏小島β細胞釋出胰島素(圖 2-5)，胰島素可幫助分解後的葡萄糖進入身體各組織細胞，轉變成能量，或貯存在肝、肌肉以及脂肪細胞中，以肝醣或三酸甘油脂等型式儲存能量(圖 2-6)。葡萄糖的利用主要受到胰島素的調控，胰島素的分泌量受血糖升高的刺激而增加，促使各組織細胞內的葡萄糖攜帶體移至細胞膜上將葡萄糖帶入細胞內，進而降低血糖濃度，當胰臟沒有辦法產生足夠的胰島素，或是身體的細胞對胰島素產生阻抗性，葡萄糖就無法進到細胞內，而留在血液裡，血液裡的葡萄糖濃度就會升高，此時胰島素對肝醣分解及醣質新生作用的抑制減弱，因而產生大量的葡萄糖並釋放至血液中，若血糖濃度高過 180mg/dL，腎臟無法回收，便會由尿液排出，糖尿病之名就是由此而來。在胰島素分泌不足的同時，脂肪組織的脂解作用增加產生大量游離脂肪酸，肝臟中的酮體 (ketone body)生成，當酮體生成率大過於末梢組織的利用率時，則會形成酮酸血症 (ketoacidosis) (李，2002)，造成酮酸中毒現象。目前，調節血糖的方法有(1)刺激胰島素分泌、(2)改善胰島素阻抗性、(3)抑制醣類在腸道內的吸收、(4)保護β細胞等。

依據世界衛生組織(World Health Organization, WHO, 1999)訂定之標準，符合以下任何一個條件，即可診斷為糖尿病：

- 隨機測得的血糖(所謂隨機血糖是指無論空腹與否)  $\geq 200\text{mg/dl}$ ，同時合併出現糖尿病典型症狀(包括多喝、多尿、多吃、體重下降等症狀。)
- 空腹 8 小時靜脈血漿糖值  $\geq 126\text{g/dl}$ 。
- 空腹靜脈血糖  $\leq 140\text{mg/dl}$ ，但口服 75g 葡萄糖耐量試驗(Oral glucose tolerance test, OGTT)，2 小時後的靜脈血漿糖值  $\geq 200\text{mg/dl}$ 。但如果 2 小時的靜脈血糖介於 140 至 200mg/dl 間，加上試驗過程中有一次血糖是

200mg/dl 或以上；就可說是葡萄糖耐受不良(impaired glucose tolerance, IGT)，為糖尿病前驅現象。

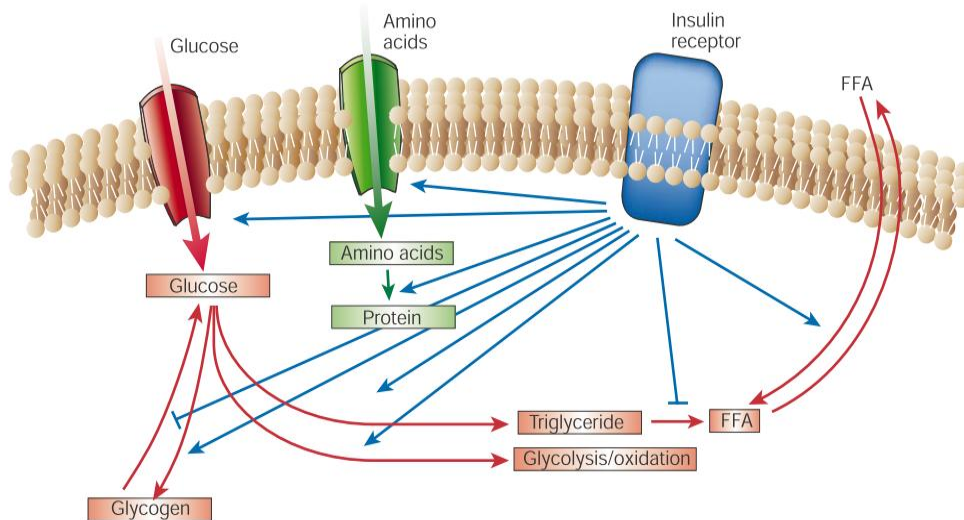
糖尿病在醫學領域裡的共識是大致上分為四大類來研究以及處置，分別是第一型糖尿病（type 1 diabetes）、第二型糖尿病（type 2 diabetes）、其他特殊型糖尿病（other specific types diabetes）以及妊娠性糖尿病（gestational diabetes mellitus, GDM）。



(Green *et al.* , 2004)

圖 2-5 胰臟  $\beta$  細胞粒線體控制胰島素分泌機制。

Fig. 2-5  $\beta$  cell inducing insulin secretion mechanism.



(Saltiel and Kahn, 2001)

圖 2-6 胰島素之代謝調控。

Fig. 2-6 The regulation of metabolism by insulin.

### 2.2.1 後期糖化終產物(AGEs)與糖尿病

蛋白質的糖化作用發生為蛋白質的胺基與碳水化合物的還原糖先進行縮合反應，再經過一連串的轉化作用形成後期糖化終產物(advanced glycation end products, AGEs)(圖 2-7)，此一反應不需酵素參與的非酵素褐變作用，故亦屬於梅納反應(Maillard reaction)的一種。

糖尿病患因長期血糖控制不佳，在高血糖的狀態下，提供糖化與氧化反應極為有利的環境(Brownlee, 2001)，此時葡萄糖會產生自氧化作用而產生具有破壞性的活性氧(reactive oxygen species, ROS)，並可能會加速粒線體傳遞鏈產生過多的 ROS 或使蛋白質發生糖化反應，形成後期糖化終產物。AGEs 是一種不穩定的複合物，在老化和糖尿病產生過程會過度形成(Wautier and Guillausseau, 2001)，為造成高血糖與許多組織病變有關的可能原因(Dyer, 1993; McCance *et al.*, 1993)。

過多 ROS 的產生，破壞體內的氧化還原平衡性，造成氧化壓力，而這些 ROS 可能活化了某些訊息傳遞，導致胰島素發生阻抗性(圖 2-8)，並破

壞胰島素分泌(Evans *et al.*, 2003)，進而造成糖尿病併發症的發生，由此可知抗氧化物質可能在防止糖尿病併發症上扮演一重要的角色。

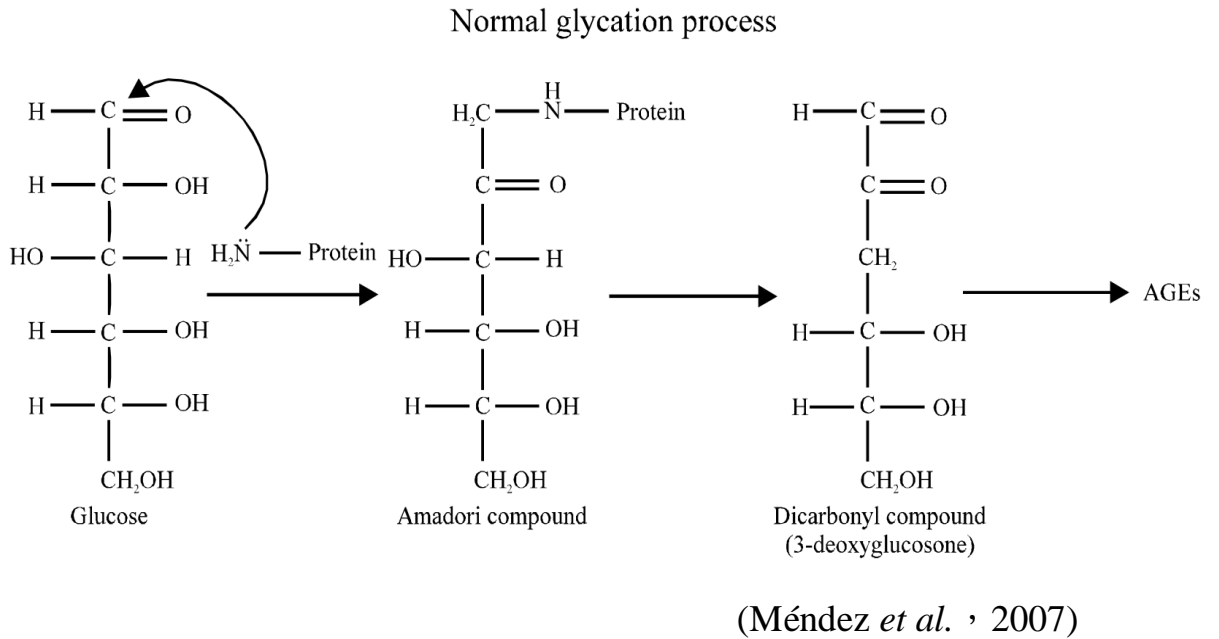
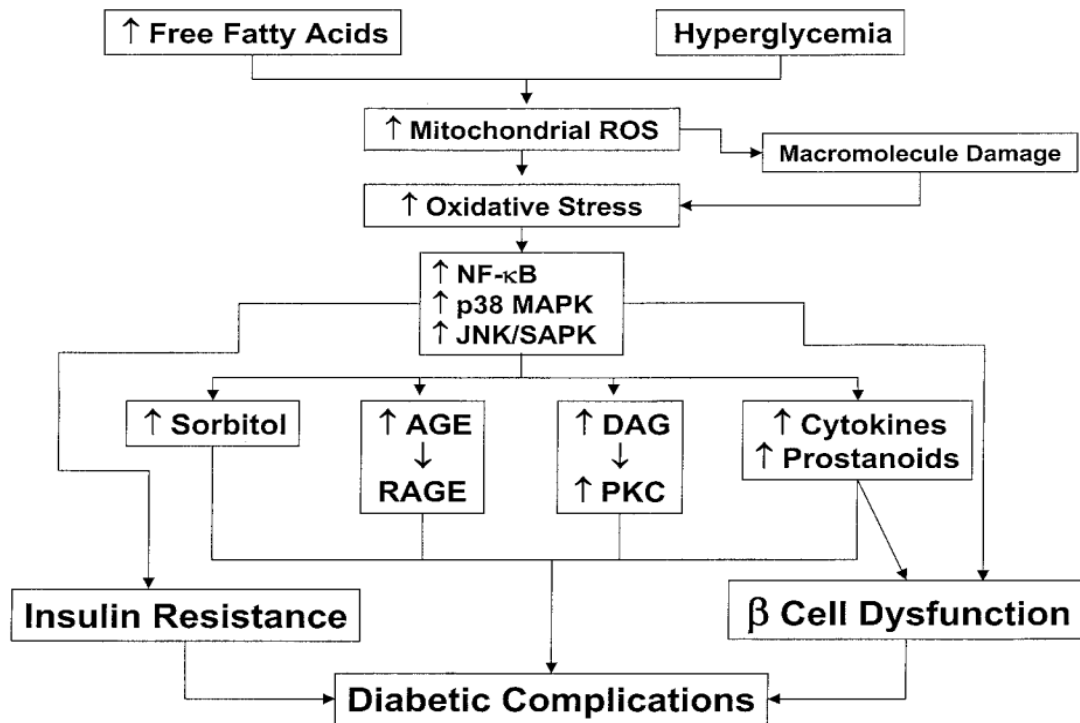


圖 2-7 後期糖化終產物生成圖。

Fig. 2-7 Generate of advanced glycation end products.



(Evans *et al.*, 2002)

圖 2-8 高血糖誘發之氧化壓力及其所致的生理影響。

Fig. 2-8 Hyperglycemia induced oxidative stress and its caused physiological effects.

### 2.2.2 糖尿病症狀

大多數的糖尿病初期並不會出現特殊的症狀，患者常常無法自覺健康已經受到危害，當以下列症狀被察覺時，高血糖已經存在有一段時間了，並且對身體也已經造成了傷害。

1. 容易疲倦。
2. 三多一少：吃多、喝多、尿多以及體重減少，患者會因喉嚨乾渴而大量飲水，進而增加尿量，如廁的頻率也因此增加。
3. 視覺模糊:糖尿病患者引起視力降低、看書疲勞，此症狀引起的視力降低，即使變換眼鏡亦無法改善視力。
4. 手腳發麻: 出現多發性神經病變，侵犯至四肢末梢神經時，會造成四肢麻木、刺痛感與觸覺遲頓。
5. 傷口不易癒合:糖尿病患者會降低對細菌的抵抗力，易患化膿症、傷口不易治療等症狀，而身體潮濕的部分也易引起黴菌。
6. 陰部搔癢:因尿中含有糖分，容易使細菌繁殖並附著(本田，2004)。

### 2.2.3 第一型糖尿病(胰島素依賴型，IDDM)

胰島素依賴型(insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM)糖尿病起源於濾過性病原菌的感染或自己免疫的原因而侵害蘭氏小島 $\beta$ 細胞，而導致胰島素的製造不足(或甚至是完全無法製造)，佔國人糖尿病患1-2%左右。絕大部分的原因都是因為免疫系統的原因所造成的 $\beta$ -細胞破壞，歸類於type 1a型。少數找不出免疫系統問題但仍造成 $\beta$ -細胞破壞的，則歸類於type 1b型。

第一型糖尿病通常發生於幼年或是青少年(稱之為幼年型糖尿病)以及無法藉膳食療法、運動療法來改善，必須靠胰島素治療(或是稱胰島素依賴型糖尿病)。疾病正式發病後，病人最終需要注射胰島素，否則會有酮酸血症或是生命危險。此外，此類型糖尿病患由於無法充分利用葡萄糖產生能量，只好分解脂質與蛋白質來生產能量，所以第一型糖尿病患身材多半清瘦。

#### 2.2.4 第二型糖尿病(非胰島素依賴型，NIDDM)

糖尿病患當中，第二型糖尿病約佔有 90-95%，常見於肥胖者病患，此類型糖尿病病患體內雖然可製造胰島素，但血糖濃度仍會上升，其發病原因主要是體內細胞對胰島素產生一個阻抗的現象，胰島素無法發揮其功效，致使在血液中循環的葡萄糖無法進入細胞被當作能量，此類型糖尿病發生年齡層約在 40 歲以後，亦可稱為成年型糖尿病，而此類病患除非是重症，否則不必做胰島素治療，而採用膳食療法、運動療法、口服降血糖藥物治療即可，因此亦被稱為非胰島素依賴型糖尿病。

#### 2.2.5 妊娠性糖尿病 (gestational diabetes mellitus, GDM)

婦女在懷孕時才第一次發現罹患糖尿病，就稱做妊娠性糖尿病 (gestational diabetes mellitus, GDM)，婦女應在懷孕 24-28 週時做 GDM 篩檢，初步檢查為在喝過 50 公克葡萄糖沖泡之糖水後一小時驗血，其血漿糖值若超過 140mg/dl，應進一步依照 O'Sullivan 及 Mahan 的辦法，進行 100 公克葡萄糖耐量試驗。此時孕婦在空腹及喝糖水後每隔一小時抽血一次，前後共三小時，若四次檢測有兩次超過判定標準(0、1、2、3 小時值分別為 105、190、165、145mg/dl)，就可診斷為 GDM，若母體的血糖控制不良時，胎兒容易引起畸形、巨嬰兒、流產、新生兒的低血糖等。

#### 2.2.6 其他特異型糖尿病

導致糖尿病發生的其他可能原因如下：

- (1)  $\beta$  細胞功能基因缺陷
- (2) 胰島素作用基因缺陷
- (3) 外分泌胰臟的疾病
- (4) 內分泌病變
- (5) 藥物或化學物質引起
- (6) 感染
- (7) 不尋常形式的免疫媒介性的糖尿病 (WHO, 1999)。



## 2.2.7 糖尿病藥物治療

目前國內通用口服降血糖藥物(oral hypoglycemic agent, OHA)主要有兩類:磺醯胺尿素類(sulfonylureas, SU)及雙胍類(biguanides)，大部分應用在非胰島素依賴型糖尿病患上，這兩類 OHA 作用方式不同，可單獨或合併使用，其中 SU 降血糖效果強過於雙胍類，當第二型糖尿病無法以飲食控制或運動達成其控制目標時，除非症狀嚴重或空腹血糖值經常超過 250~300 mg/dl，需考慮立即使用胰島素外，否則應先試用 OHA。

### ➤ 胰島素促泌劑

#### (1) 磺醯胺尿素類(sulfonylureas, SU)

此類型藥物效應主要是在加強  $\beta$  細胞對葡萄糖的敏感度，進而刺激胰島素分泌，以及減少肝臟葡萄糖的釋出。SU 大部分在肝臟代謝，其代謝產物效力大為減弱，並且和其他未經代謝轉變的藥物一起由腎臟排出，因此肝腎功能衰退的人，使用 SU 時會出現 SU 作用增強、時效延長的現象，易產生低血糖現象，使用時要特別小心。

第一代磺醯胺尿素類藥物於 1950 年代開始用於臨床，如 tolbutamide 和 chlorpropamide；第二代磺醯胺尿素類藥物於 1960 年代末用於臨床，至今仍廣泛應用，包括 glibenclamide、gliclazide、glipizide、glucotrol、gliquidone、glimepiride 等。gliquidone 是唯一不從腎臟排泄的此類藥物，所以為糖尿病併發腎臟病患者首選的降血糖藥物。適用對象有 1.非肥胖的第二型尿病患者，經飲食、運動治療後，血糖仍未達正常標準者；2.新診斷的患者，空腹時血糖介於 200mg/dl~240mg/dl 間；3.空腹時血清 C 肽值較高，證明胰島素  $\beta$  細胞還具有較好儲備功能的患者；4.為已經應用胰島素而每日用量在 30 單位以下者，可加用此類藥物。在餐前服用磺醯胺尿素類藥物能改善蘭氏小島  $\beta$  細胞不能及時分泌足量胰島素及對葡萄糖刺激反應減弱的缺點，故此類藥物均應在餐前服用。(李，2008)

#### (2) 新的胰島素促泌劑

此類藥物如 repaglinide，其作用類似磺醯尿素類藥物，作用於  $\beta$  細胞膜的特異性受體，促使胰島素的分泌，其特點有 1.其引起的胰島素分泌是葡萄糖依賴式，隨著葡萄糖濃度高低，改變其分泌作用的高低；2.單獨使用不增加低血糖發生，適合老年人使用；3.只需再進餐時服用；4.在肝臟代謝，極少量從腎臟排出，適合腎功能不全之患者使用。

## ➤ 胰島素增敏劑

### (1) 雙胍類(biguanides, BG)

BG 為 guanidine 之衍生物（二個 guanidine 分子去掉  $\text{NH}_2$  而連接在一起），目前已上市的 BG 有三種，即 phenformin、buformin、及 metformin (1957)。phenformin 因會引發乳酸中毒導致致死機率較高，故包括台灣在內的很多國家已禁止使用，目前在使用 BG 之國家中均以使用 metformin 為主（引起乳酸中毒機率佳 phenformin 的十分之一以下），而且 metformin 可減少糖尿病患者發生嚴重血管病變。

BG 本身不會刺激胰島素之分泌，其控制血糖機轉為：1.促進受體與胰島素結合，增強人體對胰島素的敏感性。2.延緩腸道吸收葡萄糖。3.加強胰島素在肝臟之作用，因此抑制肝臟葡萄糖之新生作用，減少葡萄糖從肝臟釋出。4.促使貯藏於細胞內的葡萄糖輸送蛋白 GLUT4 跑到細胞表面來參與輸送工作，使細胞表面之葡萄糖輸送蛋白量顯著增加，因此加強了胰島素之週邊作用，而加速葡萄糖的代謝。

此類藥物特點有 1.單獨使用時，降血糖功效低於磺醯尿素類藥物。2.不直接促進胰島素分泌，單獨使用不會導致低血糖現象。3.降低總膽固醇及會導致心血管疾病的危險因子(低密度脂蛋白膽固醇和三酸甘油脂)，增加具保護作用的高密度脂蛋白膽固醇。

BG 類藥物之副作用，初服時可能有腸胃道的不適如厭食，噁心、甚或嘔吐、腹瀉等，少數人可能出現皮膚發疹，偶而也會引起維他命  $\text{B}_{12}$  的吸收不良而導致貧血及週邊神經症狀，故最好定期（一年至少一次）偵測血中維他命  $\text{B}_{12}$  含量。此藥物適用對象在第一型糖尿病為胰島素治療過程

中，血糖波動較大，可使用雙胍類藥物穩定病情；於第二型糖尿病患者則是於飲食、運動治療上血糖控制不理想者，可使用此類藥物治療(李，2008)。

## (2) Thiazolidinedione 類衍生物(TZD)

這類藥物主要是加強骨骼肌的葡萄糖氧化代謝，增加周圍組織對葡萄糖的攝取以及抑制肝臟的糖質新生作用而防止血糖的上升。這類藥物主要作用為促進細胞核內 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma 接受器之活性，因而加強了胰島素的作用，使細胞內葡萄糖運輸蛋白 GLUT1 及 GLUT4 增加，將更多葡萄糖帶進細胞內代謝。此外，脂肪酸運輸蛋白及結合蛋白也增加，讓脂肪酸進入細胞。另外，lipoprotein lipase 的活性也增加因而促進三酸甘油脂的代謝，最近有人發現內皮細胞也含有 PPAR-gamma，TZD 可透過它而減低內皮素(endothelin)的合成及分泌，內皮素本身會干擾胰島素的作用，因此綜合以上諸作用 TZD 可有效的降低胰島素阻抗現象。使用的有 rosiglitazone、pioglitazone 等。適用對象為其他降血糖藥物療效不佳的第二型糖尿病患者，特別是有胰島素阻抗者，可單獨或與磺醯尿素類、胰島素合併使用，其主要不良反應有肝損害、體重增加及血漿容量增加(李，2008)。

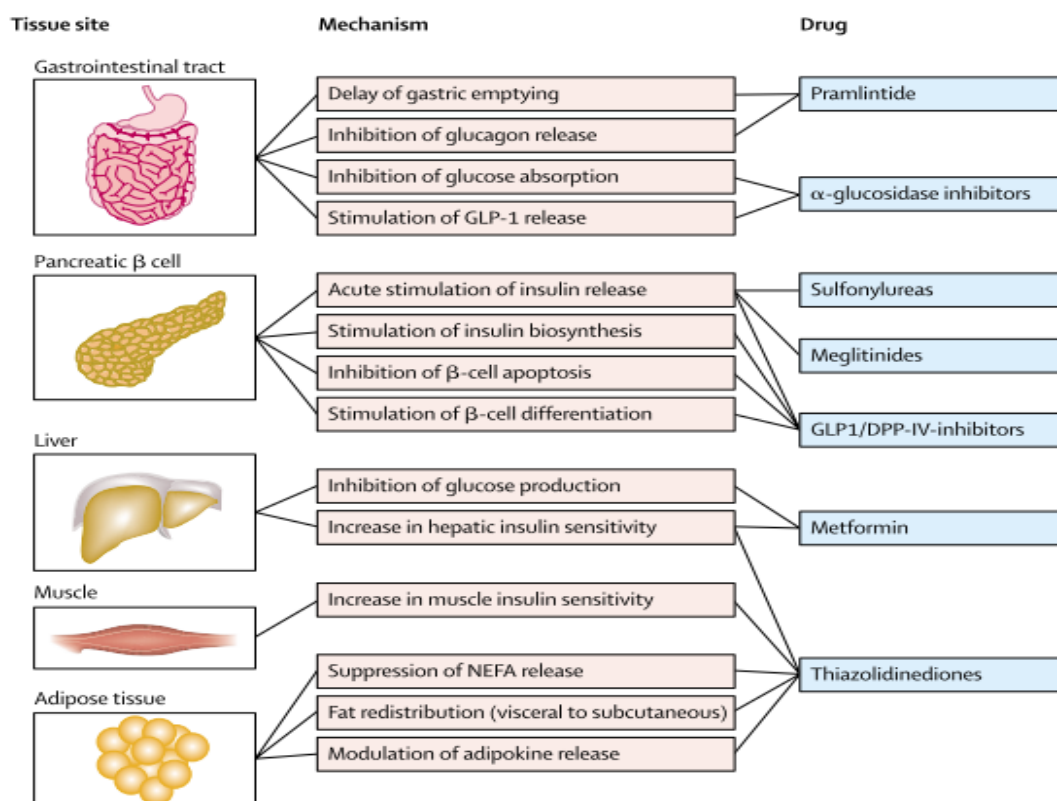
### ➤ $\alpha$ -glucosidase 抑制劑(AGI)

例如 acarbose、voglibose、miglitol 等。這類藥物主要作用藉由競爭型抑制胰臟  $\alpha$ -amylase 及腸黏膜刷狀緣上之  $\alpha$ -glucosidase 活性，因而延緩碳水化合物在腸道分解為單糖的速度，減少腸道對醣類的吸收，有效的降低飯後血糖及胰島素濃度，減少動脈硬化之危險，也稍稍的降低空腹血糖，降低糖化血色素約 1%。它的好處是全身性副作用少(因不到 2%被吸收)，而且單獨使用不會引起低血糖，但副作用為腹脹或偶而腹瀉。Acarbose 偶爾會有引起腸阻塞及 GPT 升高的病例報告，故不宜使用於有肝臟或腸道病變的病人身上(Glucobay, Precose, 1990)。不過此類藥物降血糖作用較弱，以減少糖吸收為主，很少單獨使用。雖然它單獨使用不會引起低血糖反

應，但與「磺醯尿素類」或胰島素合用時，一旦發生低血糖反應，最好馬上口服葡萄糖，而不能使用蔗糖或其他碳水化合物，因 acarbose 會抑制後者在腸道內之分解吸收(李，2008)。

圖 2-9 為根據不同藥理作用的機制，分別對不同組織治療高血糖症狀，來調節血液中的血糖濃度，來達到控制體內血糖的功效，以及目前使用的治療藥物。

除了以藥物控制糖尿病外，須配合飲食的控制及適當的運動，才能達到控制血液中血糖的理想狀態，其中運動扮演重要的角色，運動的具有多項功效，例如:可降低血糖、消除緊張、焦慮、可達到減肥、降血壓等功效。



(Stumvoll *et al.* , 2005)

圖 2-9 根據不同藥理作用部位治療高血糖。

Fig. 2-9 Pharmacological treatment of hyperglycaemia according to site of action.

## 2.2.8 糖尿病所引起的併發症

糖尿病的合併症可以原因而分為血管障礙和神經障礙等兩大類，血管障礙是因為高血糖而使毛細血管等細小血管發生異常，其中較具代表性的病症為視網膜血管被侵害的視網膜症，以及腎臟血管被侵害所產生的腎症，由高血糖的代謝異常所引發的神經障礙有手腳麻痺、肌肉痛、目眩、噁心等症狀，糖尿病性神經障礙、糖尿病視網膜症、糖尿病性腎症為糖尿病之三大併發症(本田，2004)。

### (1) 高血壓

糖尿病患者易罹患高血壓可能致病機轉為:血糖過高，使得人體細胞外的體液量增加，而近側彎曲腎小管再吸收葡萄糖的同時，也促進了鈉的強制性再吸收，進一步的增加細胞外體液量。

### (2) 糖尿病性神經障礙

在高血糖狀態下的血液會黏稠，流動不順暢，難以進入細小血管當中，所以末梢血管的血流量會減少，體內各組織、細胞都需要氧氣及養分，但此時血液卻無法充分發揮作用，結果對末梢神經造成嚴重影響，進而產生疼痛感和發麻感。

### (3) 糖尿病視網膜症

血糖值升高時，細小的血管容易出血，為了供給氧氣給感光用的視神經，視網膜有很多細小血管，當這些重要作用的血管出現毛病時，會對視網膜造成影響，尤其是視神經及中的黃斑部分等的障礙會導致失明。此外，因出血血液成分的不同，會造成各種不適或不良症狀，出血較少時會出現白斑；而出血較多時，視網膜會剝離，一旦惡化會導致失明。

### (4) 糖尿病性腎症

血管分布於全身，補給氧氣及養分、搬運體內廢物，而人體的腎臟，能調節血液中必要物質的量和水量，排除廢物，形成尿液，而糖尿病會損

傷腎小球的功能，使得尿量減少，體內廢物不易排出，囤積於體內，而出現中毒症狀，無法形成尿液就會引起尿毒症，有導致死亡的危險。

#### (5) 動脈硬化

隨著年齡的增長，長年以來氧化的脂肪變得容易積存，使得血管變硬，氧化脂肪沉著於血管的內膜，結果細胞和纖維等聚集堆積下來，使得血液能夠流通的部分越來越狹窄，糖尿病患者的血液黏稠，溶解血栓功能非常弱，使得動脈持續硬化，血栓不斷形成，此狀態若出現在心臟，就會引起心肌梗塞；出現在腦部就會引起腦梗塞(王，2001、菅野，2001)。

### 2.2.9 糖尿病的檢查項目

#### (1) 尿糖檢查

檢查尿中是否含有葡萄糖，有「定性檢查」和「定量檢查」兩種方式，定性檢查是將專用紙浸於尿液中查看，定量檢查則是調查一天份尿中所出現的糖含量。

#### (2) 血糖檢查

測出血液中所溶解葡萄糖的量，通常血糖值在餐前空腹時低，而餐後會增高，健康的人約經 2 小時左右就可回到餐前的血糖值，但糖尿病患者，即使經過長時間仍然會持續高血糖狀態。

#### (3) 葡萄糖負荷測試

空腹血糖值有時雖然在 140mg/dl 以下，但餐後的血糖值則會特別高，而長期持續此狀況者，則有必要做「葡萄糖負荷試驗」，觀察服用葡萄糖水 30 分鐘、1 小時及 2~3 小時後之血糖值變化。

#### (4) 血中胰島素檢查

人體健康時，胰島素會隨著餐後血糖濃度上升而增加，而在空腹時胰島素亦會隨血糖濃度而顯著下降，一旦患有糖尿病時，此一機能即無法發揮作用，藉此檢查可判斷胰島素的分泌是否正常。

#### (5) 糖化血紅素檢查

血液的紅血球內含有運輸氧氣用的血紅素紅素蛋白，其可以與血液中的葡萄糖結合成糖化血紅素，所以依據糖化血紅素含量多寡可推測血液中葡萄糖濃度高低，而與血紅素結合之葡萄糖在紅血球壽命未到時都不會離開，所以可以推估過去 1-2 個月間血糖值的狀態或期間的血糖值。

#### (6) 眼底檢查

患有糖尿病時，細微血管最容易受到侵害，尤其視網膜會出現異常，藉由眼底檢查來觀察視網膜不只可以知道是否患有糖尿病，更可以了解症狀的程度甚至預防視網膜異常的發生。

### 2.3 $\alpha$ -澱粉酶 ( $\alpha$ -amylase, EC 3.2.1.1)

為最常見的水解酵素，澱粉酶的其中一種，主要作用於澱粉上任何  $\alpha$ -1,4 鍵結，進行水解先降解成糊精(dextrins)，而將澱粉鏈一分為兩個較短的葡萄糖鏈。葡萄糖鏈一再由該酵素一分為二，因而鏈的長度不斷縮短，直到最後將澱粉長鏈分解成許多的葡萄糖及兩個葡萄糖分子所組成的麥芽糖(maltose)，麥芽糖再進一步由  $\alpha$ -glucosidase 分解。其所產生之葡萄糖，需經轉化成 G-6-P 後再合成為蔗糖。 $\alpha$ -amylase 主要存在於水稻、唾液、小麥芽中，亦可從微生物代謝中取得(張，2002)。

$\alpha$ -amylase 能水解碳水化合物而形成葡萄糖，透過抑制此酵素的活性，來延緩葡萄糖的吸收，降低餐後高血糖 (Bhandari, 2008)，此酵素抑制劑可延遲碳水化合物的消化，延長總碳水化合物的消化時間，可減少葡萄糖的吸收率，而鈍化餐後血糖上升(Rhabasa-Lhoret and Chiasson, 2004)。

### 2.4 $\alpha$ -葡萄糖苷酶 ( $\alpha$ -glucosidase, EC 3.2.1.20)

又稱為酸性麥芽糖酶或酸性  $\alpha$ -1,4-葡萄糖苷酶水解醣類非還原端  $\alpha$ -1,4 鍵結，形成  $\alpha$ -D- glucose 單位，主要存在於小腸上表皮細胞表面之絨毛刷緣(胡，2002)。

而此酵素亦是消化過成中的水解碳水化合物酵素之一，藉由抑制此酵素活性，減緩葡萄糖於小腸內吸收的速度，可以顯著減少混合型碳水化合物

物飲食餐後的血糖，藉由研發此酵素之抑制劑可運用在第二型糖尿病患者之餐後血糖水準的控制上 (Ali *et al.*, 2006)。

## 2.5 自由基與活性氧

### 2.5.1 自由基與活性氧種類

任何包含一個未成對電子的原子或原子團就可被定義為自由基(free radicals)，而未成對電子即是指那些在原子或分子軌道中未與其他電子配對而獨佔一個軌道的電子(Halliwell, 1994)，其自旋為二分之一，可依其未成對電子所在位置而區分成以碳、氧、氮或硫為中心之自由基(Simic, 1998)。自由基具有反應性強、順磁性以及壽命短三個明顯特徵，為了保持其穩定性，自由基會拉走鄰近的電子，而造成一連串的連鎖反應，導致生理功能受到影響(喬, 2006)。

活性氧分子(reactive oxygen species; ROS)是指反應性較三旋態氧分子( $^3\text{O}_2$ )強的含氧分子，對任何物質都非常容易反應的氧氣，對細菌、黴菌、異物反應而結合，並加以破壞來達到殺菌效果。廣義的活性氧則泛指含氧原子高反應的分子(Niki, 1992)，許多活性氧亦屬於自由基(表 2-1)，狹義的活性氧則是指需氧生物體，在生物體內代謝過程中所產生的，如超氧自由基( $\text{O}_2^- \cdot$ )、過氧化氫( $\text{H}_2\text{O}_2$ )、氫氧自由基( $\cdot\text{OH}$ )以及由光或激發態光增感劑如葉綠素作用產生之單旋態氧分子( $^1\text{O}_2$ )，其變化先由氧( $\text{O}_2$ )變成  $\text{O}_2^- \cdot$ ，再由  $\text{O}_2^- \cdot$  變成  $\text{H}_2\text{O}_2$ ，最後再從  $\text{H}_2\text{O}_2$  轉變成  $\cdot\text{OH}$  和  $^1\text{O}_2$ ，在這四種活性氧中， $\cdot\text{OH}$  和  $^1\text{O}_2$  被認為是最強的(丹羽, 1995)。活性氧產生如圖 2-10 所示，正常的代謝過程，兩個氧原子共可接收四個電子，並和質子結合形成兩分子的水，若一個氧分子僅接收一個電子，則形成超氧陰離子；接收兩個電子和質子，則形成過氧化氫；接收三個電子則形成羥自由基(遠藤和淺田, 1992)。

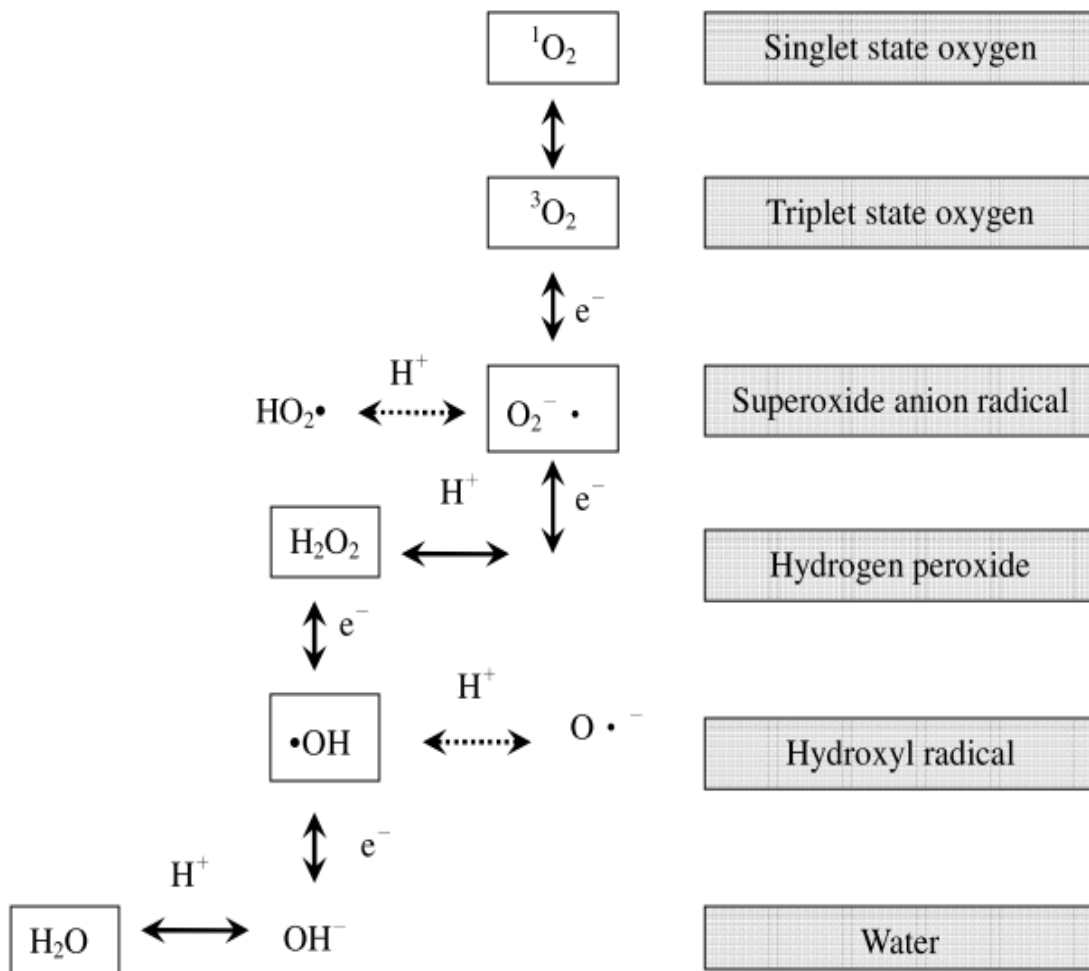


表 2-1 活性氧族群

Table 2-1 Reactive oxygen species

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

(Abuja and Albertini, 2001)



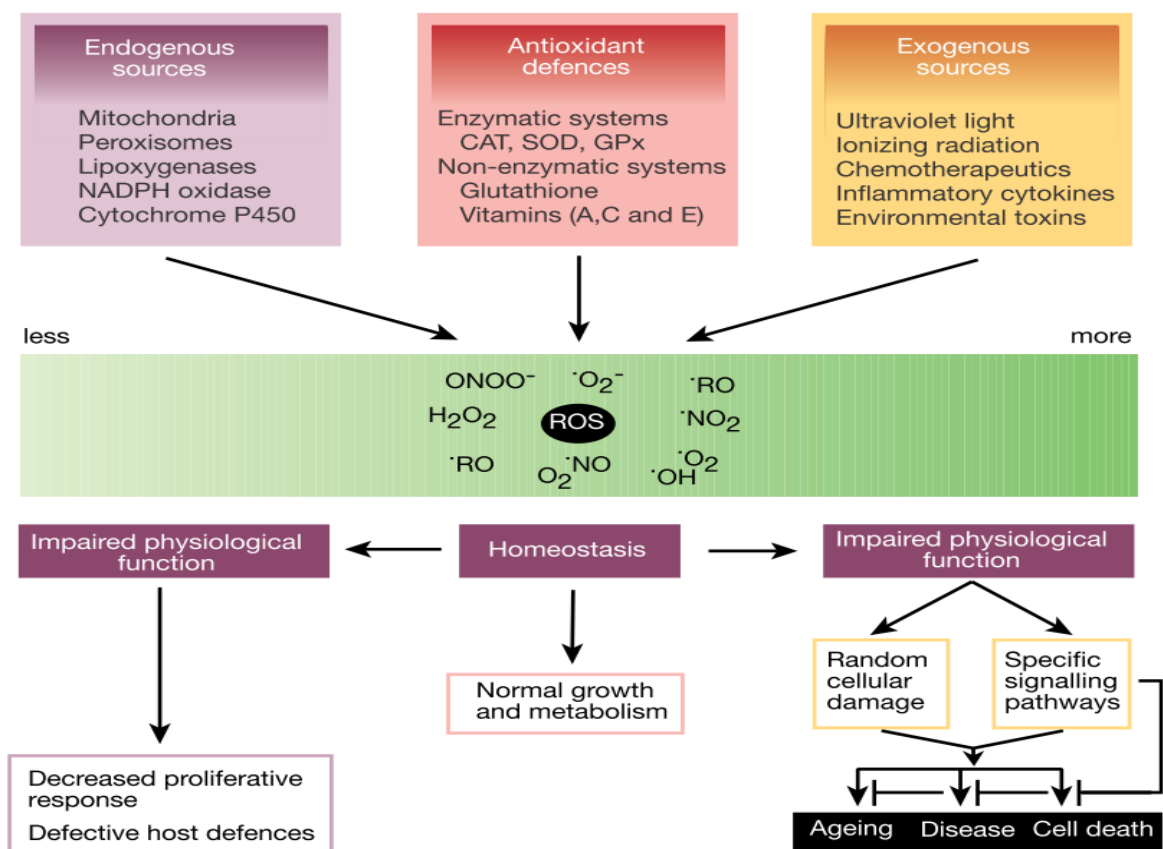
(遠藤和淺田, 1992)

圖 2-10 氧分子之氧化還原及激發狀態。

Fig. 2-10 Oxygen and reactive oxygen species.

## 2.5.2 自由基及活性氧來源

大部分生物都需氧氣，氧氣參與新陳代謝、氧化作用進而產生能量，幾乎是一切生命活動所需的物質。但是在氧氣參與生命活動的同時，自由基也因此產生，此為自由基之內在來源(圖 2-11)，不僅如此，自由基在環境污染、工業化學物和煙害等環境中也都會產生，這些為自由基產生的外在來源。在正常情況下，體內自由基的產生和消除是平衡的，但當氧自由基產生過多時或抗氧化系統出現故障，氧自由基代謝就會失衡，這就會導致細胞損傷，引起癌症、心血管、糖尿病、腎病變等疾病。



(Finkel and Holbrook, 2000)

圖 2-11 活性氧來源及其對細胞的影響。

Fig. 2-11 The sources and cellular responses to reactive oxygen species (ROS).

表 2-2 導致生活習慣病、癌症、老化的五種自由基

Table 2-2 The main free radicals inducing life style diseases、cancers and aging

No.	自由基名稱	化學式	反應方程式	說明
1	超氧化陰離子 (Super oxide anion)	$O_2^- \cdot$	${}^3O_2 + e^- \longrightarrow O_2^- \cdot$	普通氧(三旋態氧: ${}^3O_2$ )奪取一個電子形成超氧化陰離子
			$2O_2^- \cdot + 2H^+ \xrightarrow{SOD} 3O_2 + H_2O_2$	二個超氧陰離子與兩個質子藉由 SOD 變成氧和過氧化氫
			$2O_2^- \cdot + 2H^+ \xrightarrow{\text{無酶介入}} {}^1O_2 + H_2O_2$	沒有 SOD 參與反應時(自然分解)變成單旋態氧和過氧化氫
			$O_2^- \cdot + e^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2$	超氧陰離子奪取一個電子與兩個質子反應則形成過氧化氫
2	過氧化氫 (Hydrogen peroxide)	$H_2O_2$	$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{觸酶}} 2H_2O + {}^3O_2$	過氧化氫被觸酶變換為 2 分子水及 1 分子氧
			$2H_2O_2 \xrightarrow{GPx} 2H_2O$	被 GPx 作用轉換為 2 分子水
3	氫氧自由基 (Hydroxyl radical)	$\cdot OH$	$\cdot OH + H_2O_2 \longrightarrow O_2^- \cdot + H_2O + H^+$	氫氧自由基與過氧化氫反應時變為超氧化陰離子、水及質子
			$O_2^- \cdot + \cdot OH \longrightarrow {}^1O_2 + OH^-$	氫氧自由基與超氧化物反應則形成單旋態氧及氫氧基
			$\alpha\text{-V.E}$ $\cdot OH \longrightarrow H_2O$ $\alpha\text{-}\beta\text{-carotene}$ $\cdot OH \longrightarrow H_2O$	氫氧自由基遇 $\alpha$ -生育醇或 $\alpha$ -、 $\beta$ - carotene 則會變成水
4	單旋態氧 (Singlet oxygen)	${}^1O_2$	${}^3O_2 + {}^1SENS \longrightarrow {}^3SENS + {}^1O_2$	光增感物質受紫外線等提高能量時,三旋態氧會吸收其能量,變成單旋態氧
			${}^1O_2 + {}^1\beta\text{-Carotene} \longrightarrow {}^3O_2 + {}^3\beta\text{-Carotene}$ ${}^1O_2 + \alpha\text{-V.E} \longrightarrow {}^3O_2$	單旋態氧受到 $\alpha$ -、 $\beta$ - carotene 及 $\alpha$ -生育醇作用失去能量(不活性化)

表 2-2 (續)

Table 2-2 (continued)

5	過氧化脂質	LOO ·	<p>◎過氧化脂質是由上述氫氧自由基及單旋態氧的自由基(活性氧)形成，<math>\alpha</math>-、<math>\beta</math>- carotene 或 <math>\alpha</math>-生育醇可幫忙清除</p> <p>◎GPx 對過氧化脂質作用則分解為水和氧，但此反應結果會產生單旋態氧，因此須透過 <math>\alpha</math>-、<math>\beta</math>- carotene 或 <math>\alpha</math>-生育醇清除</p>
---	-------	-------	---

(增山，1997)

### 2.5.3 脂質氧化作用

脂質的氧化作用為人體從脂肪獲得能量的代謝過程，但人體在正常代謝過程中會產生活性氧與自由基，當多元不飽和脂肪酸產生自氧化作用 (autoxidation) 時，會產生過氧化脂質的產物，自由基的量亦隨之增加，此時就會產生了一連串的「過氧化脂質連鎖反應」。

脂質自氧化作用是由於油脂所含戊二烯雙鍵 (pentadiene) 中間之甲烯基 ( $\alpha$ -methylene,  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ ) 上因外在因素使其失去一個質子而形成活性高的自由基，進一步引起一連串過氧化脂質連鎖反應。此自由基會與氧分子作用形成過氧化自由基 (peroxy radical,  $\text{ROO}\cdot$ )，再經質子掠奪形成短暫安定的一級氧化產物-脂質氫過氧化物 (lipid hydroperoxide)，當連鎖反應告一個段落後，脂質氫過氧化物會再分解成醛、酮以及低級脂肪酸或形成聚合物，概略可分為三個步驟(圖 2-12)。

#### (1) 起始反應期 (initiation of autoxidation)

藉由單旋態氧 (singlet oxygen,  $^1\text{O}_2$ )、過渡金屬、光、熱、輻射照射或脂質氧化過程中所產生的脂質自由基 ( $\text{R}\cdot$ ) 與脂質自氧化自由基 ( $\text{ROO}\cdot$ ) 等高能量物質引發起始反應，這些活性氧或自由基會攻擊尚未氧化的多元不飽和脂肪酸 (RH)，使多元不飽和脂肪酸的戊二烯雙鍵中間之甲烯基 ( $\alpha$ -methylene) 失去一個質子，形成活性極高的脂質自由基 ( $\text{R}\cdot$ )。此階段反應較慢，但卻是脂質自氧化速率的決定步驟，所以，又稱為脂質過氧化誘導期間 (initiation period of lipid peroxidation)。圖 2-13 為不飽和脂質自氧化反應在各階段的變化。

#### (2) 連鎖增殖反應期 (propagation of autoxidation)

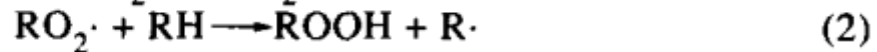
此時期的主要反應為正常油脂因受到自由基的攻擊，而產生更多的自由基。脂質自由基在連鎖反應的過程中與氧反應形成過氧化自由基 ( $\text{ROO}\cdot$ )，過氧化自由基再去攻擊其他不飽和脂肪酸，奪取其質子以產生新的脂質自由基與脂質氫過氧化物 (lipid hydroperoxides)，此步驟不斷進行直到系統內所有不飽和脂肪酸全部變成自由基為止。圖 2-14 表示脂質自由基的形成，及與環境中之氧反應形成的脂質過氧化物 (Gorkum and

Bouwman, 2005)。氧化反應初期會先經過氧化誘導期 (induction period)，先形成氫過氧化物，並在氫過氧化物形成累積量達最高峰後開始分解。

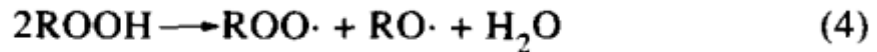
(3) 終止反應期 (termination of autoxidation)

此時期主要反應為自由基之間相互結合，形成相對穩定的產物。累積量到達高峰時的氫過氧化脂質其實並不安定，在此時期很容易裂解而形成醛、酮、醇、酸及短鏈的碳氫化合物等低分子揮發性物質或聚合成非揮發性的雙聚物(dimer)、三聚物(trimer)或多聚物(polymer)等高分子物質。

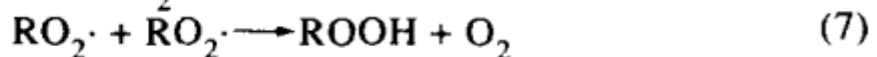
**Propagation**



**Branching**



**Termination**



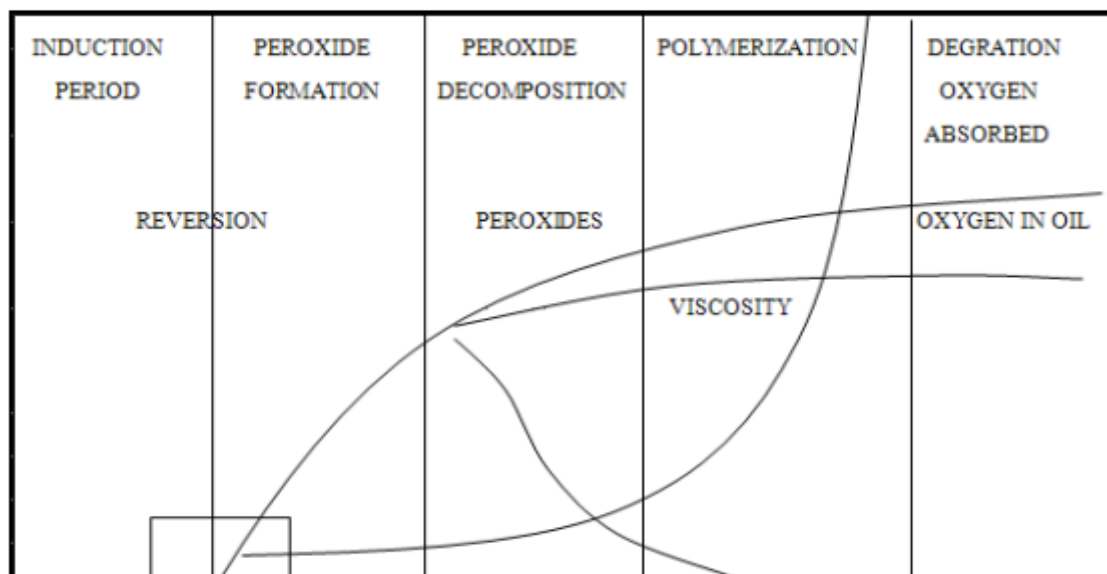
Where R = Fatty Acid Radical

ROOH	=	Fatty Acid Hydroperoxide
RO <sub>2</sub> ·	=	Peroxy radical
RO·	=	Alkoxy radical

(Hamilton et al., 1997)

圖 2-12 脂質自氧化連鎖反應。

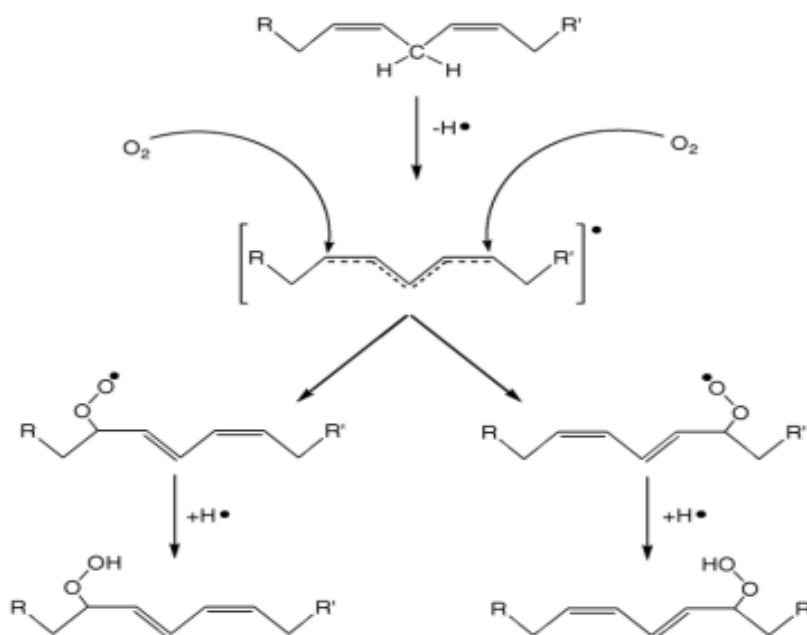
Fig. 2-12 Autoxidation chain reaction of lipid.



(Perkins, 1967)

圖 2-13 油脂自氧化的反應階段。

Fig. 2-13 The stages of lipid autoxidation.



(Gorkum and Bouwman, 2005)

圖 2-14 不飽和脂肪酸自氧化反應中最初氫過氧化物的形成。

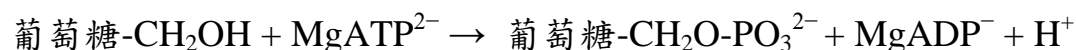
Fig. 2-14 Initial hydroperoxide formation in the autoxidation of the unsaturated fatty acid.

## 2.6 自由基與糖尿病

粒線體為生物體細胞製造能量的地方，而當能量產生過程，粒線體內會形成大量自由基(Duchen, 2004)，正常情況下，粒線體內會有足夠的酵素快速地來清除這些自由基，例如 catalase、GPx 及 SOD，當這些自由基無法被清除時，就會傷害粒線體，而這些受傷害有缺陷粒線體的累積不僅被認為是造成糖尿病與老化相關疾病，也是導致多項糖尿病併發症的主要原因。

Wolff 和 Dean (1987)為最早提出自由基對蘭氏小島  $\beta$  細胞產生傷害學者，長時間高血糖或高血脂皆會對胰臟  $\beta$  細胞造成傷害，分別稱為  $\beta$  細胞糖質毒性( $\beta$ -cell glucose toxicity)和脂質毒性(lipotoxicity)，其會造成胰島素基因的表現、胰島素的分泌受到抑制以及細胞死亡(Rhodes, 2005)等現象。

胰島素的分泌機制涉及硫氫基的氧化還原修飾和己糖磷酸化途徑的活化，自由基可能會與硫氫基和抗氧化酵素競爭六碳糖磷酸化途徑產物，即 6-磷酸葡萄糖(圖 2-15)，其反應式如下，所以  $\beta$  細胞中自由基濃度可能會影響胰島素的分泌。



依據六碳糖磷酸化途徑和胰島素釋放過程前列腺素的合成機理推斷，抗氧化酵素體系不僅能保護  $\beta$  細胞，而且與胰島素的釋放及與糖尿病形成有密切相關性。

有研究將四氧嘧啶阿脲(Alloxan)做一個氧自由基誘導糖尿病體外研究試驗，Alloxan 為尿酸的結晶氧化物，能選擇性地破壞胰臟蘭氏小島  $\beta$  細胞，而引發試驗性的糖尿病，分別做阿脲、阿脲+SOD、阿脲+觸酶、阿脲+DETAPAC 組別測試，結果發現以有添加抗氧化作用之物質與阿脲共培養後，以葡萄糖刺激，測量出抑制胰島素分泌能力有明顯下降趨勢，其結果證明阿脲對胰島  $\beta$  細胞產生的損傷作用，在 SOD、觸酶和 DETAPAC 存在時皆可受到保護作用(趙, 1999)。



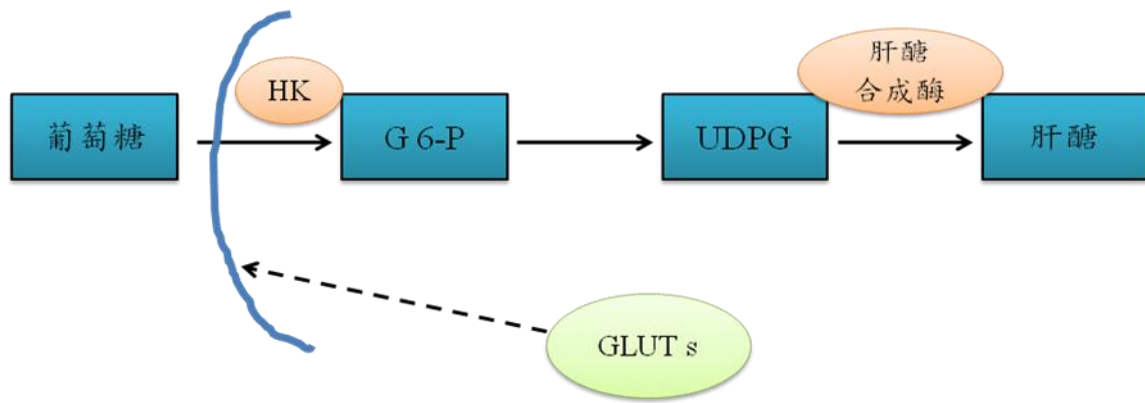


圖 2-15 肝醣合成路徑。

Fig. 2-15 Glycogen synthesis process.

## 2.7 抗氧化機制與抗氧化劑

由於自由基在生物體內會攻擊 DNA、蛋白質、脂質及許多小分子等，引起一連串有害的氧化連鎖反應，而抗氧化劑可透過釋放出一個電子或質子給自由基，使電子能夠配對，與自由基反應形成無害的物質，或終止自由基的後續連鎖反應，使其不再具傷害性，因此，抗氧化劑在食品工業上佔有頗重要的角色，來延緩或阻止食品氧化變質，以穩定食品品質並延長儲存的期限。

抗氧化劑可根據物質在組織中的溶解性分為水溶性及脂溶性兩大類，又可依其來源分為天然和人工合成抗氧化劑。水溶性脂抗氧化物主要有抗壞血酸（維生素 C）和 glutathion (GSH)，而脂溶性抗氧化物則包含生育醇、維他命 A、D、K、Ubiquinol (coenzyme Q)、類胡蘿蔔素、蝦紅素等。依抗氧化劑作用性質可分為兩大類：1. 預防性抗氧化劑，此類抗氧化劑可清除脂質過氧化鏈啟動階段的自由基等引發劑，如 SOD、觸酶、穀胱甘肽過氧化物酶等皆屬之；2. 脂質過氧化鏈反應阻斷劑，此類抗氧化劑具有捕捉脂質過氧化鏈式反應中產生自由基的能力，能減少脂質過氧化反應鏈的長度，因而阻斷或減緩脂質過氧化的進行，如維生素 C、E 等就屬於此類抗氧化劑。

### 2.7.1 抗氧化作用機制

不同抗氧化劑展現出不同的抗氧化特性，根據這些特性大致可分為四種：

#### (1) 自由基清除劑 (free radical scavenger)

此類抗氧化劑大多為酚類化合物，因酚類化合物易釋出氫氧基上的質子，直接提供一個電子或一個質子與自由基作用，而自身的苯環結構上的不成對電子會轉移而形成穩定的共振結構 (resonating structure)。圖 2-16 表示酚型化合物清除脂質自由基之作用機制。

食品中的自由基清除劑以維生素 E 及人工合成抗氧化劑如 butylated hydroxyanisole (BHA)、butylated hydroxytoluene (BHT) 等為最常見，但人工合成之抗氧化劑有安全性上的顧慮 (Branen, 1975)，因此從天然物中尋求天然抗氧化劑是目前相當受到重視的。

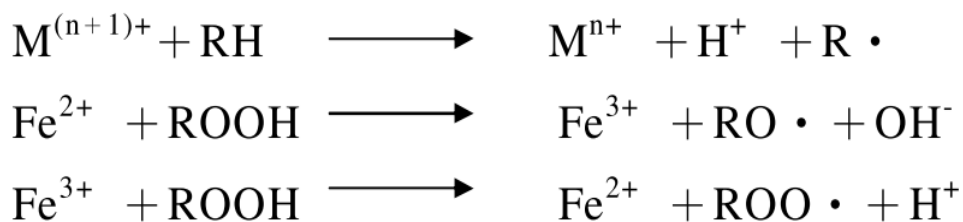
#### (2) 單旋態氧之消光劑 (singlet oxygen quencher)

空氣中的氧主要以較安定的基態三旋態氧 (triplet oxygen,  $^3\text{O}_2$ ) 狀態存在。由於在食品中常含有一些光增感劑 (photosensitizer) 如葉綠素、血紫質及核黃素等，這些物質會吸收光能，從基態 (ground state) 提升至激發態 (excited state)，當激發態返回基態時，所釋放的過多能量便被三旋態氧吸收而提升至單旋態氧 ( $^1\text{O}_2$ )，此單旋態氧極易和食品中的不飽和脂肪酸上的雙鍵反應產生氫過氧化物。

此類抗氧化劑包括一些類胡蘿蔔素如  $\beta$ -胡蘿蔔素 ( $\beta$ -carotene) 等，可吸收光增感劑所釋放的過多能量使單旋態氧恢復成穩定的三旋態氧型態，藉此降低與不飽和脂肪酸反應的可能性 (Kellogg and Fridovich, 1975; Bando *et al.*, 2004)。

#### (3) 金屬螯合劑 (metal chelator)

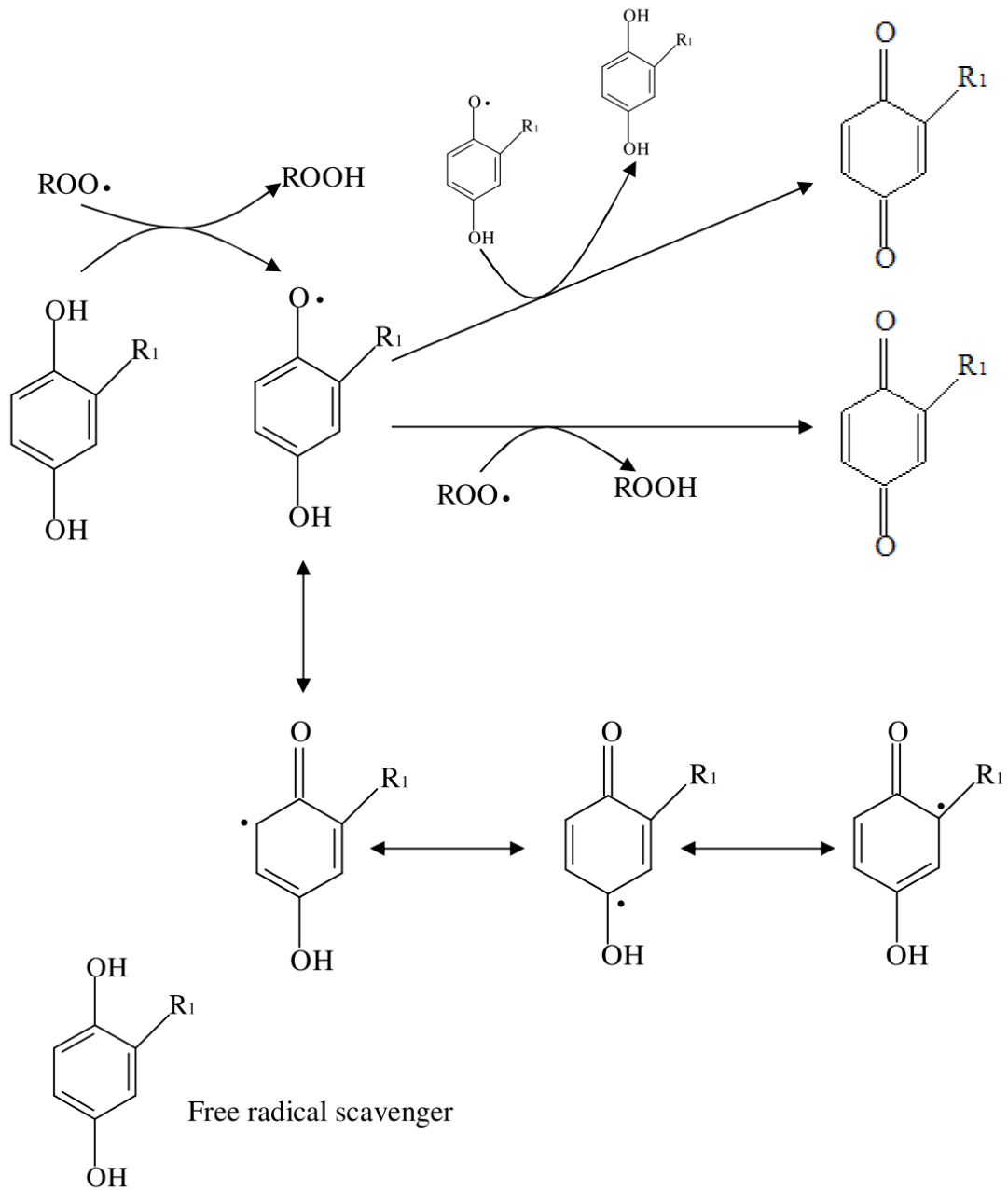
過渡金屬離子具有催化脂質形成自由基，促進脂質氧化的能力：



金屬螯合劑本身不具抗氧化性，但能與促氧化之金屬離子如銅及鐵離子結合，消除其催化作用進而抑制脂質氧化反應。例如檸檬酸(citric acid)、EDTA 及聚磷酸鹽 (polyphosphate) 等。

#### (4) 相乘劑 (synergist)

相乘劑本身並不與促氧化因子作用，而是可還原已失去質子之酚型自由基，進而達到增強酚型抗氧化劑的抗氧化能力。在食品系統中的相乘劑以抗壞血酸 (ascorbic acid) 為代表，例如抗壞血酸可還原失去一個質子的 $\alpha$ -生育醇，使得氧化的 $\alpha$ -生育醇恢復抗氧化能力。



(Sherwin, 1978)

圖 2-16 自由基清除劑之抗氧化作用機制。

Fig. 2-16 Mechanism of antioxidation for free radical scavenger.

## 2.7.2 天然抗氧化劑

蔬菜和水果是抗氧化物質的最佳來源，裡面內含一些自然的植化素 (phytochemicals)，如表 2-3 所示：

表 2-3 天然抗氧化物質及其來源

Table 2-3 Natural antioxidants and sources

名稱	作用	食物來源
維生素 C (Ascorbic acid)	* 與羥基自由基作用 * 還原維生素 E 自由基	巴樂、奇異果、柳橙、木瓜、葡萄柚
維生素 E ( $\alpha$ -Tocopherol)	* 防止脂質過氧化反應 * 預防自由基傷害細胞膜	玉米油、黃豆油、堅果、深綠色蔬菜
$\beta$ -胡蘿蔔素 ( $\beta$ -Carotene)	* 中斷脂質過氧化連鎖反應	胡蘿蔔、番茄、深綠色蔬果、地瓜
黃酮類 (Flavonoids)	* 預防動脈硬化	蘋果、香瓜、鮮黃色蔬果
引朶類 (Indoles)	* 預防乳癌	十字花科蔬菜，如高麗菜、花椰菜、蘿蔔
番茄紅素 (Lycopene)	* 去除氧自由基	番茄、西瓜、櫻桃
花青素 (Anthocyanins)	* 清除自由基	茄子、紅甜菜、紅番茄
無色花青素 (Leucoanthocyanins)	* 預防因三氯甲烷自由基所引起的微血管硬化	葡萄籽
鞣花酸 (Ellagic)	* 抗癌 * 清除自由基	覆盆子、草莓、櫻桃、藍莓
多酚類 (Polyphenols)	* 預防冠心病 * 抗腫瘤 * 清除自由基	葡萄酒、綠茶

(庫柏，1997；增山，1997)

### 2.7.3 人工合成抗氧化劑

在食品中，為了防止不飽和脂肪和油經由氧化而酸敗及延長食品保存期限，通常會添加抗氧化劑，而目前食品界常用的人工合成抗氧化劑為 BHA 與 BHT，因這兩種人工合成抗氧化劑不僅具有較佳的抗氧化性，且在化學性質上亦有較天然抗氧化物好之溶解性等化學性質，價格上也較天然抗氧化物便宜，但近幾年有研究顯示諸如 BHA、BHT 等人工合成抗氧化劑可能造成動物肝、腎傷害及致癌性（IARC，1986a；IARC，1986b；Schildermann et al，1995），建議還是以天然具抗氧化性的食物做為抗氧化劑來源。

## 2.8 多酚 (Polyphenol compounds)化合物

多酚指在天然化合物中的分子結構內之苯環上含有兩個或以上-OH基，此-OH基與抗氧化作用有相關，主要由酚酸(phenolic acids)與黃酮類化合物(flavonoids)所組成 (Tapiero *et al.*，2002)。

### 2.8.1 酚酸 (Phenolic acids)

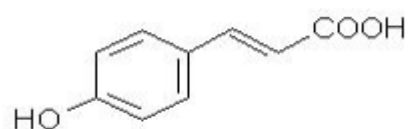
酚酸依其結構大致可分為苯甲酸 (benzoic acid ) 與肉桂酸 (cinnamic acid) 兩大類，兩者之羥基衍生物廣泛存在於植物中 (圖 2-17)，且雙羥基衍生物之抗氧化性優於單羥基衍生物，如 3,4-二羥基肉桂酸(caffeic acid) 在多種抗氧化系統中皆顯示出強抗氧化力 (Milic *et al.*，1998)，若第二個羥基位於苯環的鄰位或對位上，其抗氧化性會增強。此外，研究顯示許多酚酸如 ferulic acid、caffeic acid 等皆具有抑制低密度脂蛋白(LDL)氧化的能力 (Bors *et al.*，1990)。

### 2.8.2 類黃酮 (Flavonoids)

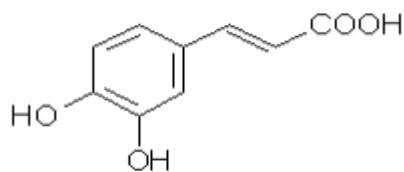
類黃酮 (flavonoids) 屬於水溶性的植物化學物，由三個環狀結構的 diphenyl propane (C6 -C3 -C6) 型式所構成(圖 2-18)，又稱為生物類黃酮，為含量最豐富的多酚類化合物，具有多樣的結構與特性(圖 2-19、表 2-4)，

主要是依其含氧雜環上的氧化程度來區分(Tapiero *et al.*, 2002), 其在溶液中具有清除自由基的能力, 是天然的抗氧化劑(Lin *et al.*, 2002), 能加強維生素 C 的作用, 幫助維生素 C 再生, 其抗氧化力皆高於維生素 E 及維生素 C, 具有抑制癌細胞增生、預防心血管疾病、老年癡呆以及清除自由基等功效, 多存在於植物果實、根、莖及蔬果、堅果類、葡萄酒或茶葉中, 大部分是以和醣類結合的形式存在, 一般而言, 植物的葉、花、果實和其他活的細胞中以醣苷(glycosides)的形態存在, 若以酵素或酸處理則會降解成配質(aglycone)和醣基(sugar) 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)。

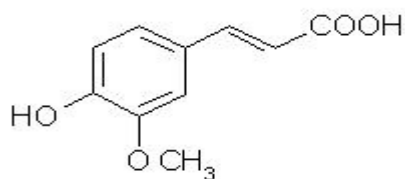
類黃酮之抗氧化性與其結構有很大的關係, 其中羥化作用之位置及程度決定其抗氧化活性: (1)在 A 環 C-5、C-7 位置有羥基, 則能延長此類結構的共軛系統。(2)若在 B 環上 C-3'、C-4' 位置有鄰位雙羥基 (ortho-dihydroxy), 則對過渡金屬離子 ( $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ ) 有螯合作用, 間接抑制脂質過氧化反應的發生。(3)若在 C 環上的 2、3 位置有雙鍵與 4 位置上有酮基, 則會與 B 環形成共軛結構。(4) 若在 A、C 環上 2、5 位置有羥基與 C 環上 4 位置有酮基, 則會形成分子內氫鍵, 具有清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



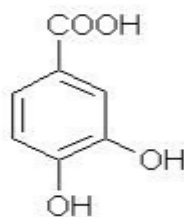
*p*-coumaric acid



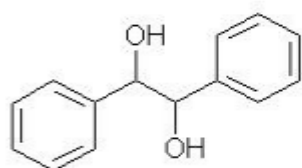
caffeic acid



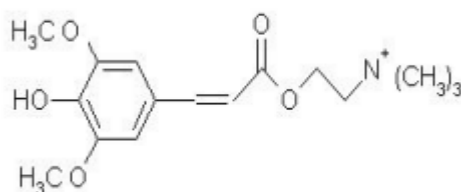
ferulic acid



protocatechuic acid



hydrobenzoin

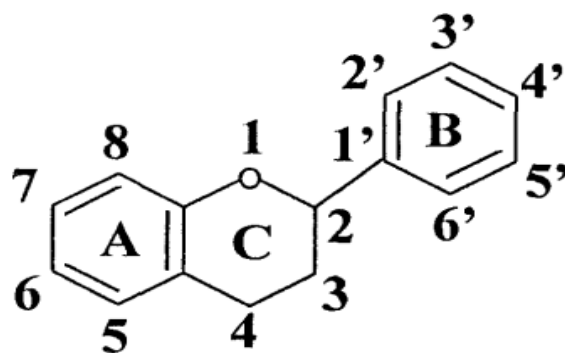


sinapine

(Pokorny, 1987)

圖 2-17 苯甲酸及肉桂酸衍生物之結構圖。

Fig. 2-17 The structures of the derivatives of benzoic acid and cinnamic acid.

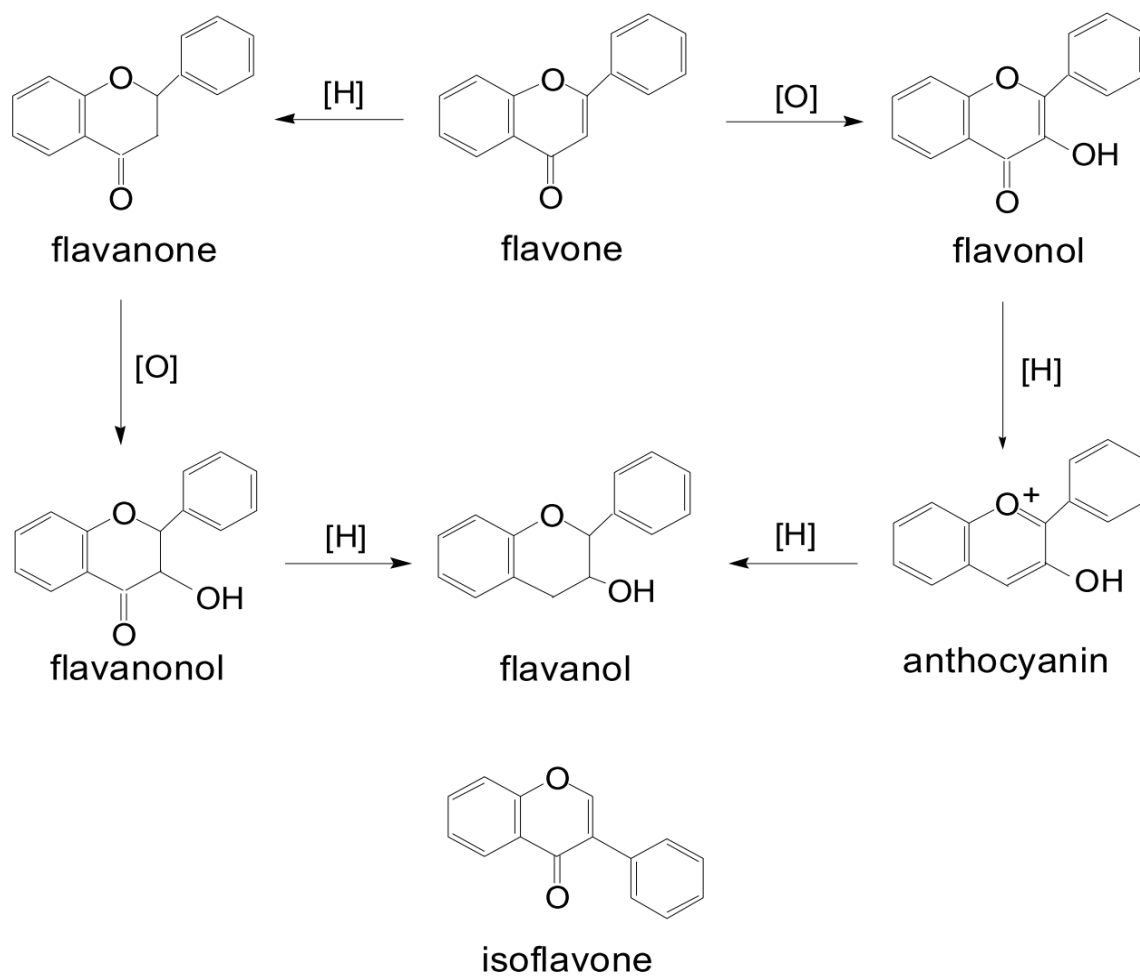


(N.C. Cook and S. Samman, 1996)

圖 2-18 類黃酮基本結構圖。

Fig. 2-18 Structure of flavonoid.





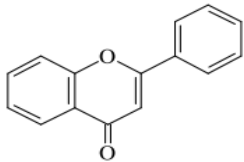
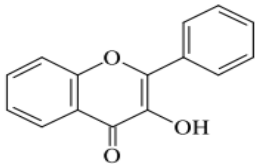
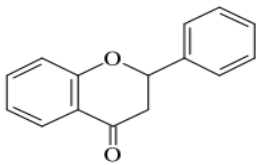
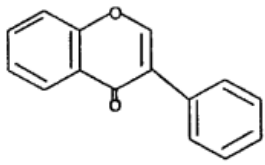
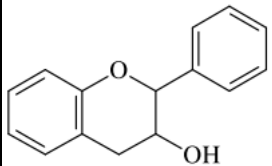
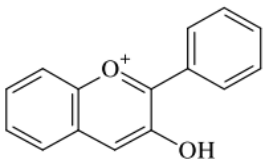
(蔡和陳，2006)

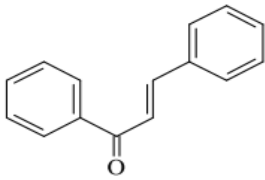
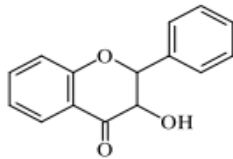
圖 2-19 類黃酮衍生物之化學結構。

Fig. 2-19 The chemical structures of flavonoid derivative.

表 2-4 類黃酮衍生物之抗氧化性

Table 2-4 The antioxidative activities of flavonoid derivatives

類黃酮種類	抗氧化性特徵	化學結構	來源
黃酮類 flavones	<p>主要為芸香甘(Rutin)以及槲皮素(Quercetin)</p> <p>*此結構為在 C 有 2,3 double bond, 4-oxofu, 但沒有 3-OH。</p> <p>*B 環上-OH 越多, A 環在 C5 及 C7 上有 -OH, 抗氧化性越強。</p> <p>*抗氧化性: lutein &gt; apigenin &gt; chrysin</p>		甜椒 芹菜
黃酮醇類 flavonols	<p>*此結構為在 C 有 2,3 double bond, 4-oxofu 且有 3-OH。</p> <p>* B 環上-OH 越多, A 環在 C5 及 C7 上有 -OH, 抗氧化性越強。</p> <p>*抗氧化性: quercetin &gt; myricetin &gt; morin &gt; kaempferol</p>		紅洋蔥
黃烷酮類 flavanones	<p>*抗氧化性:</p> <p>taxifolin &gt; naringenin &gt; hesperitin &gt; hesperidin &gt; naringin</p> <p>和 OH 的數目及取代位置有關。</p> <p>*其抗氧化性小於 flavonols 及 flavanones。</p>		柑橘類水果
異黃酮類 isoflavones	<p>* genistin, daidzein 屬之。</p> <p>*抗氧化性差, 在天然產物中此類結構較少。</p> <p>* orthodihydroxyl 的結構。</p>		豆類 綠茶 芹菜
黃烷醇類 flavanols	<p>*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。</p> <p>*抗氧化性: catechin-gallate &gt; catechin</p>		綠茶
花青素類 anthocyanins	<p>*抗氧化性: cyanidin-3-β-D-glucoside</p> <p>*Cyanidin 以 flavylum cation 的形式存在時抗氧化性較佳 (pH2 &gt; pH4 &gt; pH7), B 環結構影響抗氧化性。</p> <p>*Cyanidin = dephindin &gt; malvidin &gt; pelargonidin</p>		葡萄 櫻桃 覆盆子

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 lischalcone A。 * 具有潛在抗氧化性, dihydrochalcone > chalcone		甘草
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。		木豆 葉

(N.C. Cook and S. Samman, 1996)

## 2.9 小鼠肝臟 FL83B 細胞

為探討甘草 50% 乙醇萃取物及純化物質 4-O-β-D-glucopyranosyl-2',4'-dihydroxy-chalcone 對於肝臟組織細胞之各種生理活性, 以及將葡萄糖帶入細胞轉換成肝醣儲存能力, 因此本實驗選擇小鼠肝臟 FL83B 細胞株 (mouse hepatocyte cell; BCRC number 60325), 取自 *Mus musculus*, 購自新竹食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center, Hsinchu, Taiwan)。屬於貼附型細胞, 類似上皮細胞的生長型態(圖 2-20)。並將細胞以高糖(60mM Glucose)誘導使細胞產生胰島素抵抗性, 探討甘草 50% 乙醇萃取物及純化物質 4-O-β-D-glucopyranosyl-2',4'-dihydroxy-chalcone 於正常細胞與胰島素抵抗性細胞葡萄糖帶入量及肝醣合成量。

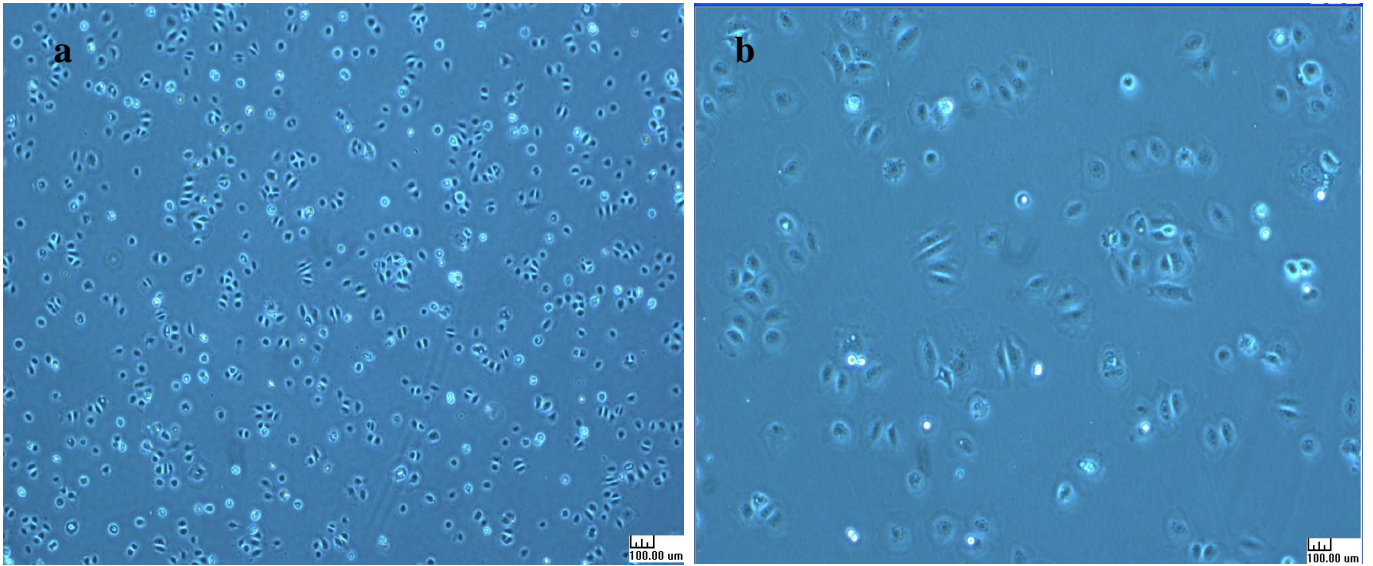


圖 2-20 FL83B 細胞株之生長型態。

Fig. 2-20 Morphology of FL83B cell line. (a)40X (b)100X

## 參、材料與方法

### 3.1 實驗材料

本實驗所使用之中藥材為產地位於中國東北的甘草，於雲林縣北港鎮養元中藥行購入。樣品以磨粉機磨碎至可通過 20mesh 篩網孔之粉末，實驗流程如圖 3-1 所示。

### 3.2 實驗儀器與藥品

#### 3.2.1 儀器設備

1. 紫外光可見光吸收光譜儀-日本 Hitachi 公司的 U-2001 Spectrophotometer。
2. 光二極矩高效能液相層析儀-日本 Hitachi 公司的 L-7100 型的液相層析儀、L-7450A 型的光二極體矩陣層析器以及 D-7000 型層析控制與資料處理器。
3. 核磁共振光譜儀-使用 VXR-300/51 型核磁共振光譜儀( $^1\text{H-NMR}$  以 300MHz、 $^{13}\text{C-NMR}$  以 75 MHz)檢測。
4. 旋轉式減壓濃縮機-日本 Tokyo Rikakikia 公司的 EYELA N-1 型號。
5. 40°C 恆溫烘箱-使用華興化學原料行所代理之烘箱。
6. pH meter- Wissenschaftlich Technische Werkstatten ,Weilheim Germany 型號 D-82362。
7. 冷凍乾燥機-日本 Tokyo Rikakikia 公司的 EYELA FDU-1200 型號。
8. ELISA-Dynex
9. 流式細胞儀- Becton Dickinson, USA, 型號 FACScan。
10. 細胞計數器-Marienfeld, 0.0025 mm<sup>2</sup>。
11. 無菌操作台- Inc.vineland NJ USA , 型號 Bellco。
12. CO<sub>2</sub> 恆溫培養箱- Thermo, USA , 型號 HEPA class 100。
13. 震盪機 Vortex- Scientific Industries, USA, 型號, vortex-2 genie。
14. 高速低溫離心機- Eppendorf, USA, 型號 5810R。
15. 倒立螢光顯微鏡-Olympus, Japan, 型號 IX-71。
16. 加熱恆溫循環槽- Kansin, USA, 型號 WB 212-B1。

17.液態氮貯存桶- Taylor-Wharton, Germany, 型號 LS-750。

### 3.2.2 化學試劑

(1)  $\alpha$ -amylase 抑制活性測定

- a. Potassium phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ):購自林 純藥工業株式會社。
- b. Sodium phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ):購自 Merck 公司(Darmstadt, Germany)。
- c. Sodium chloride ( $\text{NaCl}$ ): 購自 Merck 公司(Darmstadt, Germany)。
- d. Starch:購自島久藥品株式會社 OSAKA。
- e. Sodium hydrate ( $\text{NaOH}$ ):片山化學工業株式會社。
- f. Potassium sodium tartrate ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ): 島久藥品株式會社。
- g. 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS): 購自 Sigma-Aldrich 公司 (St. Louis,MO,USA)。
- h.  $\alpha$ -amylase:Form *Aspergillus oryzae* spray-dried  $\geq 150$  protein 購自 Sigma-Aldrich 公司(Japan)。

(2)  $\alpha$ -glucosidase 抑制活性測定

- a. Potassium phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ): 購自林 純藥工業株式會社。
- b. Sodium Phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ): 購自 Merck 公司(Darmstadt,Germany)。
- c. 4-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside :minimum 99%購自 Sigma-Aldrich 公司(Switzerland)。
- d.  $\alpha$ -glucosidase:Type I, From Bakers Yeast  $\geq 50\%$  protein 購自 Sigma-Aldrich 公司(USA)。
- e. Sodium carbonate( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ): 購自 Sigma-Aldrich 公司(St. Louis, MO, USA)。

(3)硫氰酸鐵分析法(ferric thiocyanate assay)

- a. Linoleic acid:購自 Wako 公司(Osaka, Japan)。使用前經減壓蒸餾再分裝於 10mL 指形瓶中貯存於-20°C 備用。
- b. Ammonium thiocyanate( $\text{NH}_4\text{SCN}$ ):試藥級，純度 99%，購自關東化學株式會社(Tokyo, Japan)。
- c. Iron(II)chloride tetrahydrate( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ):試藥級，純度 95%，購自林純藥工業株式會社(Osaka, Japan)。
- d.  $\alpha$ -tocopherol: 試藥級，純度 95%，購自 Sigma-Aldrich 公司(St. Louis, MO, USA)。
- e. Butyl hydroxyl anisole(BHA): 試藥級，純度 90%，購自 Sigma 公司(St. Louis, MO, USA)。
- f. Potassium phosphate, monobasic ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ): 試藥級，純度 99%，購自林純藥工業株式會社(Osaka, Japan)。
- g. Hydrochloric acid (HCl):購自 Union Chemical Works 公司(Hsinchu, Taiwan)。

#### (4) DPPH 自由基清除力測定

- a. 2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH): 購自 Fluka 公司 (Buchs,Switzerland)。
- b. Butylated hydroxyanisole (BHA): 購自 Sigma-Aldrich 公司(U.S.A.)。

#### (5)總酚含量測定

- a. Folin-Ciocalteu's phenol reagent:購自 Sigma-Aldrich 公司(St. Louis, MO, USA)。
- b. Sodium carbonate( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ): 購自 Sigma-Aldrich 公司(St. Louis, MO, USA)。
- c. Gallic acid:購自 Sigma-Aldrich 公司(St. Louis, MO, USA)。

#### (6)總類黃酮含量測定

- a. Aluminium nitrate nonahydrate( $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ):購自 Merck 公司 (Darmstadt, Germany)。
- b. Potassium acetate ( $\text{CH}_3\text{COOK}$ ):購自 Riedel-deHaen。
- c. Quercetin: 購自 Sigma-Aldrich 公司(St. Louis, MO, USA)。

#### (7)細胞試驗

- a. 小鼠肝細胞-小鼠肝臟細胞株 FL83B (mouse hepatocyte cell; 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 and Research Center, Hsinchu, Taiwan)。
- b. 細胞培養基-F12K (Kaighn's modification of Ham's F12 medium)購自 Sigma 公司。使用時每瓶以 900mL 二次水溶解後，再以  $0.22\mu\text{m}$  過濾膜 (Millipore, USA)過濾，最後加入 100mL 胎牛血清(Charcoal/Dextran treated fetal bovine serum ; FBS , Lot : 315734)，均勻混合後貯存於  $4^\circ\text{C}$  備用。
- c. 磷酸緩衝液(Phosphate buffer saline, PBS):以  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.06g/L、KCl 0.4g/L、 $\text{NaHCO}_3$  0.35g/L、NaCl 8g/L 及  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.048g/L 的比例加入無菌水攪拌至完全溶解後，經滅菌釜  $121^\circ\text{C}$  30 分鐘滅菌處理，冷卻置於室溫備用。
- d. 胰島素粉末:購自 Sigma 公司，取 10mg 粉末將其濃度配製成 1mg/mL 並與  $100\mu\text{L}$  acetic acid 均勻混合後，以  $0.22\mu\text{m}$  過濾膜(Millipore, USA)過濾，於  $-20^\circ\text{C}$  下儲存，添加至細胞時，再以培養基稀釋至濃度  $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
- e. 葡萄糖擬似物 2-NBDG:購自 Invitrogen(OR, USA)，於避光環境下以 PBS 配其濃度為 29.2mM，儲存於  $-20^\circ\text{C}$  備用。
- f. XTT Reagent solution activator solution。
- g. Trypan blue:購自 Biological Industries (Kibbutz, Israel)。
- h. Sodium bicarbonate( $\text{NaHCO}_3$ ): (Osaka, Japan)。
- i. Potassium phosphate( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ):購自 Mallinckrodt Baker 公司(NJ, USA)。
- j. Sodium phosphate( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ):購自 Mallinckrodt Baker 公司(NJ, USA)。
- k. Sodium chloride( $\text{NaCl}$ ):購自 Amresco 公司(OH, USA)。



1. Acetic acid:購自 TEDIA(OH, USA)。
- m. Cell lysis buffer
  1. Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane 購自 Bio-Rad(CA, USA)。
  2. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、Nonidet P-40 substitute (NP-40) 及 Sodium deoxycholate 均購自 Sigma (MO, USA)。
  3. Sodium dodecyl sulfate (SDS)購自 Bio-Rad(CA, USA)。
- n. 蛋白質定量試劑: BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit 購自 Pierce Biotechnology (IL, USA)。

### 3.2.3 溶劑

- 1.Methanol (MeOH) :HPLC 級，純度 99.9%，購自 Baker 公司(New Jersey, USA)。
- 2.Acetone: HPLC 級，純度 99.9%，購自華興化學原料行。
- 3.Ethanol (EtOH) :工業級，購自華興化學原料行。
- 4.Trifluoroacetic acid (TFA):純度 99%，購自 Riedel-de Haen 公司(Swwlze, Germany)。
- 5.Hydrochloric acid (HCl):試藥級，純度 35%，購自聯工化學公司(HsinChu, Taiwan)。
- 6.Methanol-D<sub>4</sub>(CD<sub>3</sub>OD):純度 99.96%，購自華興化學原料行。

### 3.2.4 液相管柱層析充填劑

- 1.XAD-7 層析充填劑(20-60mesh): Amberlite XAD-7，購自 Sigma 公司 (St.Louis, USA)。
- 2.ODS 層析充填劑:Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN，購自 Nacalai Tesque Inc.公司 (Kyoto, Japan)。

### 3.3 實驗架構

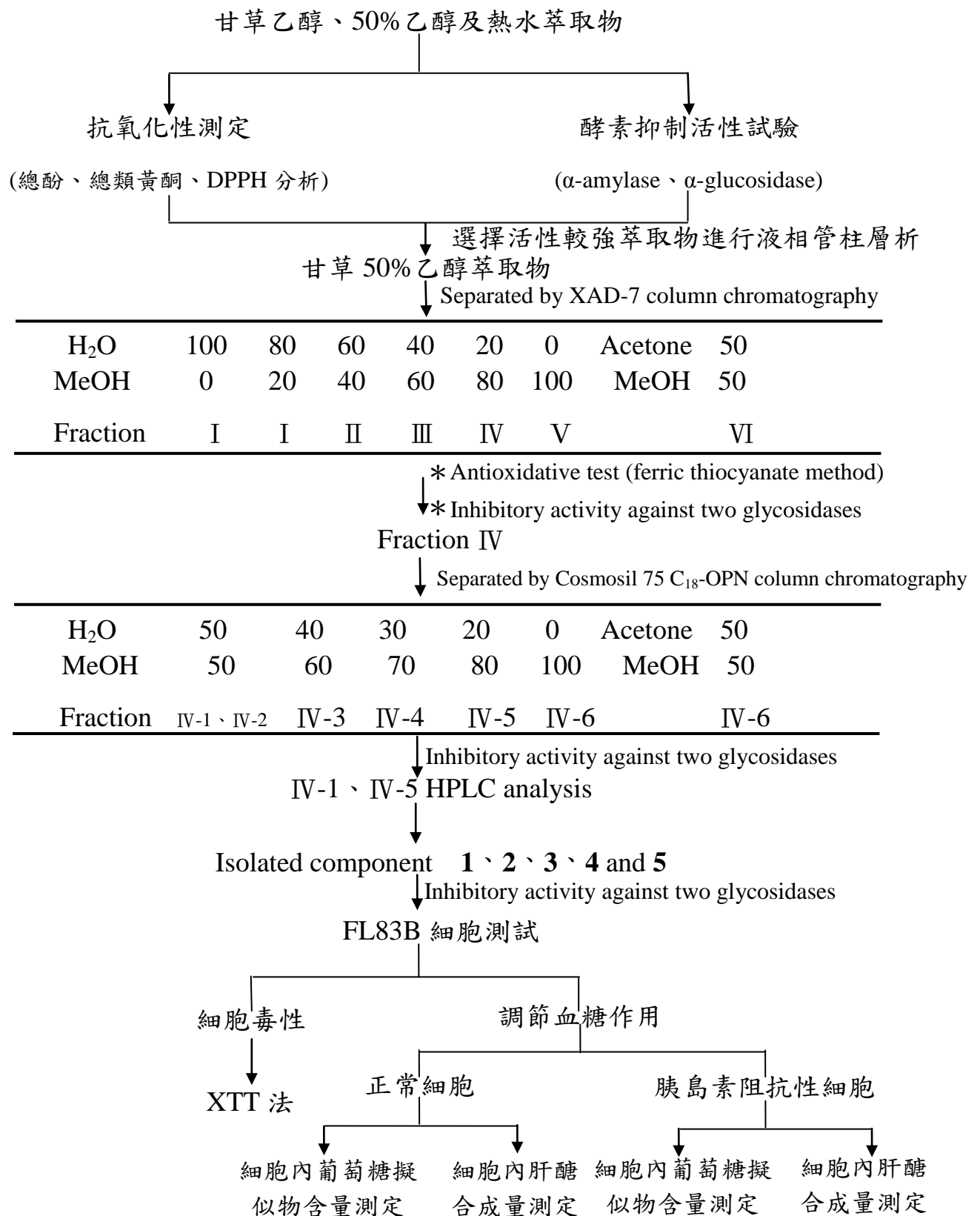


圖 3-1 甘草糖解酵素抑制活性成分之純化及調節血糖作用實驗流程圖。

Fig. 3-1 Scheme on isolation of glycosidases inhibitory components from licorice and their hyperglycemic regulation.

### 3.4 實驗方法

#### 3.4.1 抗氧化性檢測

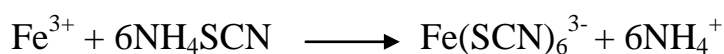
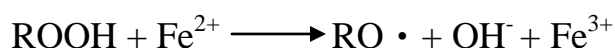
##### (1) 脂質氫過氧化物之測定(Ferric thiocyanate method)

本實驗參考滿田(1967)及蘇(1991)等之方法(圖 3-2)。將欲檢測之樣品、 $\alpha$ -生育醇( $\alpha$ -tocopherol)及丁基羥基甲氧苯(Butyl hydroxyl anisole, BHA)分別將其濃度配製成 1mg/mL 之甲醇溶液，各取 0.2mL 加入具有磨砂瓶蓋之 50mL 三角錐形瓶中，對照組則僅加入等量(0.2mL)之甲醇溶液於三角錐形瓶內，分別加入 1.3%之亞麻油酸(linoleic acid)甲醇溶液 10mL 及 1/30M pH7.0 之磷酸緩衝溶液 10mL，最後再以去離子水定量至 25mL，將三角錐形瓶密封，置於 40°C 循環式恆溫烘箱反應，每隔 24 小時取出測試，進行呈色反應及比色分析。

呈色反應:取上述反應之樣品及標準品溶液 0.2mL 至含有 9.4mL 75% 甲醇水溶液之試管中，再依序加入氯化亞鐵鹽酸溶液 0.2mL 及硫氰酸鉍溶液，震盪混合均勻，反應 3 分鐘後，在波長 500nm 下檢測其吸光值。

當油脂氧化程度越高，氫過氧化物生成即越多，顏色也就越深，因此由吸光值的大小可推得其氧化程度，並可獲知抗氧化性之強弱。

反應式如下:



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

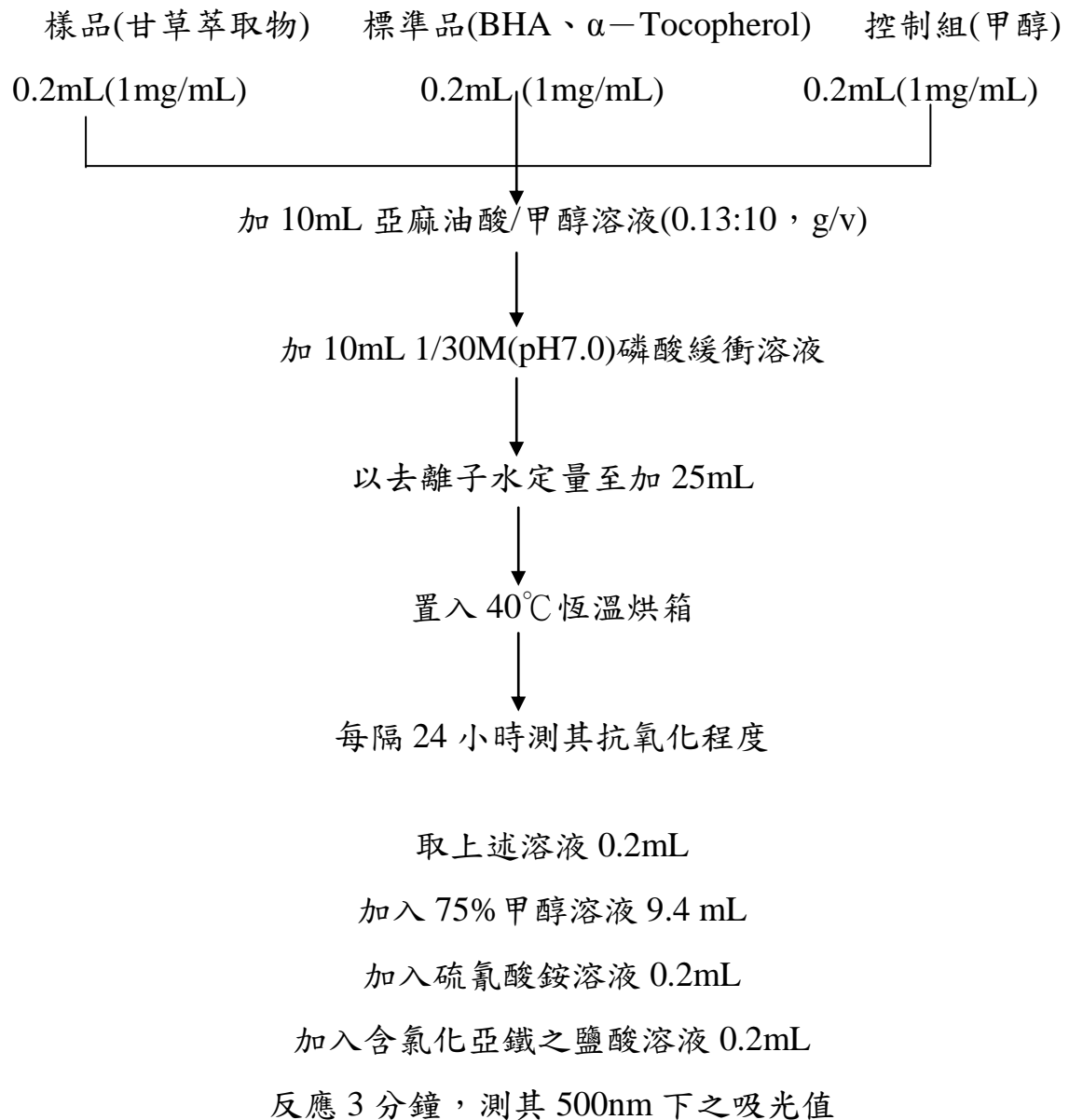


圖 3-2 硫氰酸鐵法測定流程圖。

Fig. 3-2 Analytic procedure for the ferric thiocyanate method.

## (2) DPPH 自由基清除能力測定

以 Shimada *et al.* (1992)的方法測定，DPPH 自由基清除能力常用來評估抗氧化物其提供質子的能力。帶有自由基的 DPPH 甲醇溶液本身為一深紫色化合物，此化合物在 517nm 下有極大吸光值，當加入具抗氧化作用的物質時，抗氧化物會提供質子給 DPPH· (2, 2-Diphenyl-1-Picylhydrazyl free radical)，使其形成一個非自由基的 DPPH (圖 3-3)，而不帶電子的 DPPH (2,

2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)的顏色較淡，吸光值亦會隨之降低，利用相對於控制組之吸光值下降百分比，可判斷樣品清除 DPPH 自由基能力之強弱。DPPH 自由基清除能力隨著吸光值下降，能力越佳。

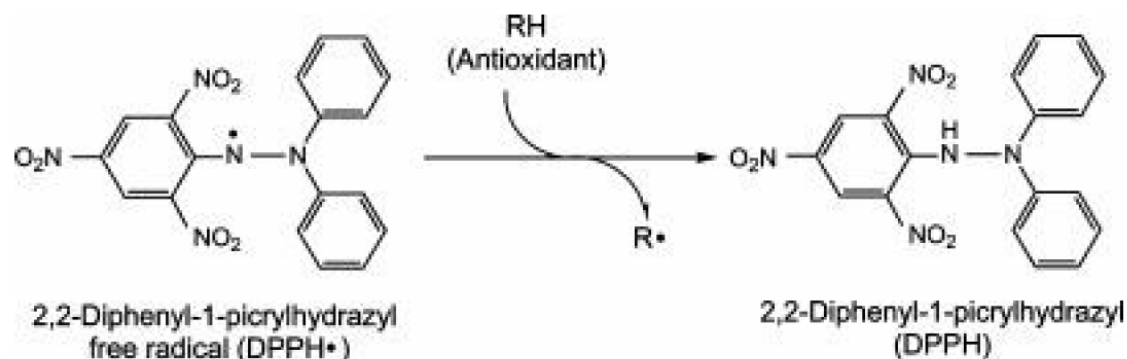


圖 3-3 DPPH 自由基清除作用之反應式。

Fig. 3-3 Reaction of scavenging activity on DPPH radical.

### (3)總酚含量測定

以 Julkunen-Titto (1985)的方法測定。Folin-Ciocalteu's phenol reagent 可與酚類化合物上鄰接之 di-OH 基反應，並產生顏色變化（由黃變藍），並於波長 735nm 下有極大吸光值。取 50  $\mu$ L 欲測定之樣品，加入 1 mL 去離子水和 500  $\mu$ L Folin-Ciocalteu's phenol reagent 混合均勻，並加入 2.5 mL 20%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  再次混合均勻，於室溫下靜置反應 20 分鐘，以分光光度計測其在波長 735 nm 下的吸光值。以不添加 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 之試驗當作空白對照組。以 gallic acid 作為標準品，並製作標準曲線，換算樣品中所含的總酚含量，其含量以 mg gallic acid equivalent/ g licorice extract 表示。

### (4)總類黃酮含量測定

參考唐等 (1996)和鍾 (2003)的方法測定。類黃酮化合物在鹼性條件下可與硝酸鋁形成穩定的黃色錯合物，並在波長 415 nm 下有極大吸光值。將欲測定之樣品 250 $\mu$ L 加入 10% 硝酸鋁及 1 M 醋酸鉀各 50 $\mu$ L，再加入 1.4 mL 去離子水，均勻混合，於室溫下反應 40 分鐘，以分光光度計在 415nm

下測其吸光值，以不添加硝酸鋁之試驗當作空白對照組。以 quercetin 當作標準品，並製作標準曲線，換算樣品中所含的類黃酮含量，其含量以  $\mu\text{g}$  quercetin equivalent/ g licorice extract 表示。

### 3.4.2 醱解酵素抑制活性檢測

#### (1) $\alpha$ -澱粉酶( $\alpha$ -amylase) 抑制活性測定

本實驗方法參考 Bernfeld (1955)及 Hasenah *et al.*(2006)之方法進行，利用 DNS 具還原力之特性，將具有游離或游離趨勢醛或酮基之碳水化合物在鹼性溶液下有還原的能力而進行反應(圖 3-4)，將欲檢測之樣品濃度配製成 1mg/mL，取 40 $\mu\text{L}$  加入 160 $\mu\text{L}$  去離子水於 1.5mL 離心管當中，隨後加入  $\alpha$ -amylase 受質 0.5%(w/v)之澱粉溶液 400 $\mu\text{L}$ ，再加入 200 $\mu\text{L}$  (4U/mL) 酵素液，於 25 $^{\circ}\text{C}$  下反應 3 分鐘後，自此混合物中取出 200 $\mu\text{L}$  加入新的 1.5mL 離心管中，加入溶於 5.31M 酒石酸鉀鈉溶液的二硝基水楊酸呈色溶液(3, 5-dinitrosalicylic acid, DNS) 100 $\mu\text{L}$ ，在水浴 85 $^{\circ}\text{C}$  下加熱 15 分鐘後，再加入 900 $\mu\text{L}$  去離子水測其在 540nm 下的吸光值。

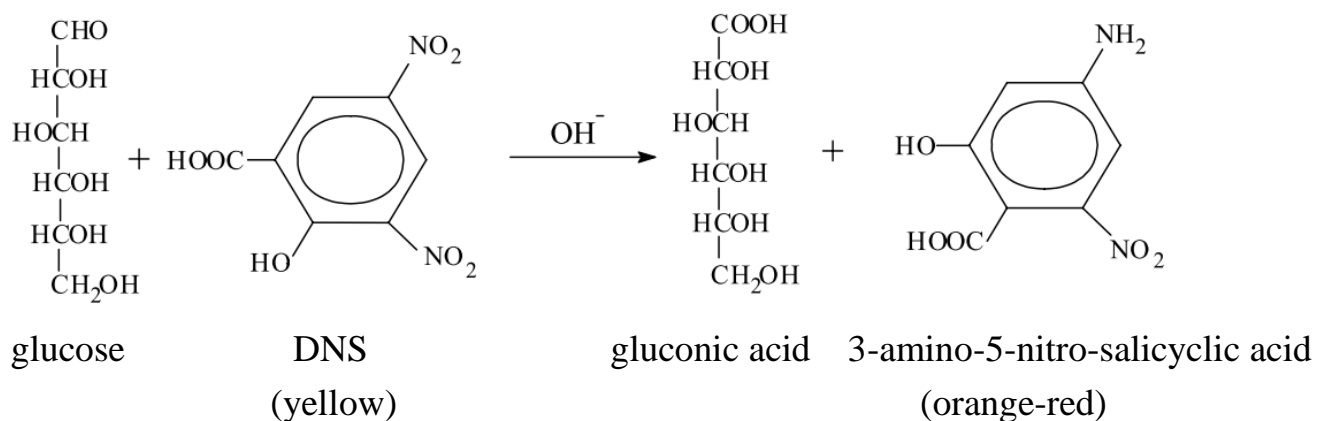


圖 3-4 葡萄糖之呈色反應。

Fig. 3-4 The coloration reaction of glucose.

$$\text{抑制率}(\%) = [1 - (\text{實驗組吸光值} - \text{背景組吸光值}) / \text{控制組吸光值}] \times 100\%$$

- A. 實驗組: 酵素+基質+萃取物
- B. 控制組: 酵素+基質+甲醇
- C. 背景組: Buffer+基質+萃取物

## (2) $\alpha$ -葡萄糖苷酶( $\alpha$ -glucosidase) 抑制活性測定

本實驗參考 Oki (1999) 之方法進行，將欲檢測之樣品濃度配製成 (1mg/mL)，取 100 $\mu$ l 待測樣品與 20 $\mu$ l 之  $\alpha$ -glucosidase 酵素液(1U/mL)於 1.5 mL 離心管當中，隨之加入 380 $\mu$ l 0.53mM 的受質 4-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside(p-NPG)溶液，於 37 $^{\circ}$ C 下反應 20 分鐘後，加入 500 $\mu$ l (0.1M) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 充分混合，使酵素失活終止其反應，以分光光度計測其在 400nm 下的吸光值。而控制組則以 0.1 M 的磷酸緩衝液(pH 6.8)取代萃取液，背景組是指只有萃取物的吸光值，僅需加入萃取物，而酵素與 PNP-G 皆以磷酸緩衝液代替。

抑制率(%)=[1-(實驗組吸光值-背景組吸光值)/控制組吸光值] $\times$ 100%

A. 實驗組: 酵素+基質+萃取物

B. 控制組: 酵素+基質+甲醇

C. 背景組: Buffer+基質+萃取物

### 3.4.3 甘草調節血糖成分之分離純化及結構鑑定

#### (1) <sup>1</sup>H 及 <sup>13</sup>C-核磁共振光譜測定

將純化之樣品溶於 CD<sub>3</sub>OD，以核磁共振光譜儀(型號 VXR-300/51, <sup>1</sup>H-NMR 300MHz; <sup>13</sup>C-NMR 75 MHz)測定，獲得各物質之 <sup>1</sup>H-NMR 及 <sup>13</sup>C-NMR 光譜。光譜解析以  $\delta$  表示化學位移(chemical shift)，並以 TMS(tetramethylsilane)做為比較的基準點，s 表示單線峰(singlet)，d 表示雙線峰(doublet)，m 表示多重線峰(multiplet)。各純化物質同時配合 UV-visible 光譜及質譜進行光譜解析及結構鑑定。

#### (2) 分析型高效液相層析

管 柱: Develosil ODS-HG-5(250 $\times$ 4.6mm，日本 Nomura)

沖提劑: H<sub>2</sub>O:MeOH(v/v)=50:50 (IV-1)

H<sub>2</sub>O:MeOH(v/v)=35:65 (IV-5)

流 速: 0.5mL/min

偵測器: 254nm

(3) 製備型高效液相層析

管 柱: Develosil ODS-HG-5(250×20mm, 日本 Nomura)

沖提劑: H<sub>2</sub>O:MeOH(v/v)=50:50 (IV-1)

H<sub>2</sub>O:MeOH(v/v)=35:65 (IV-5)

流 速: 3mL/min

偵測器: 254nm



### 3.4.4 細胞降血糖功效測定

#### (1) 細胞培養與繼代

將培養基置於 37°C 水浴槽中回溫，移進無菌操作台內並將瓶口過火備用，自液態氮桶內取出小鼠肝臟細胞(FL83B)之冷凍小管，置於 37°C 水浴快速解凍，以 70% 乙醇溶液擦拭試管外部後，移入無菌操作台內，將已解凍之 FL83B 細胞液加入 10cm dish，並緩慢加入 10mL 培養基，混合均勻，置於 37°C 含 5% CO<sub>2</sub> 培養箱中，培養 1~2 天後待細胞生長約 7-8 分滿，再進行繼代培養。

繼代培養時，先將其內培養基吸除，以 5mL PBS 清洗後，加入 2mL 之 1×Trypsin-EDTA，於培養箱內反應 5 分鐘，待細胞浮起後，加入 3 倍體積量之培養基終止 Trypsin-EDTA 作用，再將細胞懸浮液平均分配至新的 dish 當中，置於培養箱內培養。

#### (2) XTT 法細胞毒性檢測

利用細胞粒線體中琥珀酸去氫酶(Succinate-tetrazolium reductase)將 XTT (2,3- bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide)試劑的 Tetrazolium 環打斷，形成橘紅色之 formazan 化合物，顏色的深淺與存活的細胞數目成正比，於波長 540~570nm 測其吸光值，即可推算細胞存活率。其反應式如圖 3-5 所示。

測定時先於 96 孔盤內種適量細胞 (10<sup>4</sup> cells/well) 進行培養，添加不同濃度之甘草 50% 乙醇萃取物以及純物質 (4-O-β-D-glucopyranosyl-2',4'-dihydroxy-chalcone)，於 24 小時後，移去培養基並以 PBS 潤洗一次，加入 XTT 試劑 50μL (XTT reagent:activation=50:1) 混合均勻，於 37°C 反應 2 小時，測其在波長 540~570nm 下之吸光值，並不添加樣品做為控制組。

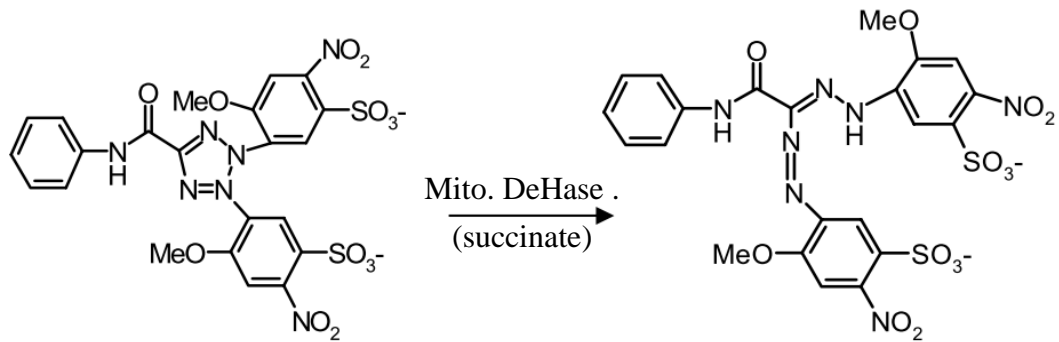


圖 3-5 XTT 反應機制。

Fig. 3-5 XTT reaction mechanism.

### (3) 高糖誘導細胞產生胰島素阻抗性

本試驗參考(吳，2011)之方法進行，將細胞鋪於 12well 中培養約八分滿，更換不含血清之培養基培養 24 小時，再加入 60mM 之葡萄糖於細胞中反應 24 小時，移除培養基，經不同處理(高糖、甘草萃取物、甘草純物質)，加入含有 2-NBDG 及胰島素之培養基作用 1 個小時，以流式細胞儀測定 2-NBDG 帶入量。

### (4) FL83B 細胞葡萄糖擬似物(2-NBDG)帶入百分率分析

測試前先於 12 孔盤中種適量細胞數( $10^4$ cells/well)進行培養，經不同處理(高糖、甘草萃取物、甘草純物質)後，加入含有 5 $\mu$ g/mL 胰島素及 2-NBDG 之培養基作用 1 小時後，將其培養基移除，以 PBS 潤洗兩次，再以 1 $\times$ Trypsin 收集細胞於試管中，加入 PI 試劑，以流式細胞儀檢測葡萄糖擬似物之帶入百分率。

### (5) FL83B 細胞之胞內肝醣合成量測定

使用蒽酮-硫酸法分析，利用多醣遇濃硫酸脫水生成的糠醛或其衍生物可與蒽酮試劑產生縮合反應，而生成藍綠色化合物之特性，測其在 625nm 下之吸光值，其吸光值與糖含量呈現性關係，且此方法測定較為靈敏且微量，可測定至 0.05 $\mu$ g 之肝醣含量(Lawrence *et al.*，1961)。

參考 Lawrence *et al.* (1961)及顏(2003)之方法，將細胞總數調整為  $10^5$  cell/mL 取 3mL 鋪於 6cm dish，加入不同濃度之甘草 50% 乙醇萃取物及純物質處理正常及胰臟阻抗細胞，於反應 24 小時後，將細胞以 Trypsin 收於離心管當中，並加入 500 $\mu$ L 30% KOH 混合均勻，於 100 $^{\circ}$ C 水浴 20 分鐘後，加入 3 倍體積之絕對酒精，放置 -20 $^{\circ}$ C 14~16 小時，再以 4000rpm/離心 15 分鐘，去除上清液，沉澱物以 500 $\mu$ L 去離子水回溶，再加入 1mL 0.2% 蔥酮試劑置於 100 $^{\circ}$ C 水浴 20 分鐘，以分光光度計測其在 620nm 下之吸光值。並做葡萄糖標準曲線，推算其肝醣含量。

#### (6) 蛋白質定量

將細胞先以 PBS 溶液沖洗，再以 150 $\mu$ L trypsin 切下細胞收於 1.5mL 離心管內，離心去除上清液，以 500 $\mu$ L PBS 復溶使蛋白質均勻混合，取 50 $\mu$ L 蛋白質液與 10 $\mu$ L lysis buffer 混合，離心完後取 10 $\mu$ L 上清液加入 96 孔盤當中，並與 200 $\mu$ L working reagent 於 37 $^{\circ}$ C 反應 30 分鐘，測其 550nm 下之吸光值。並以標準品作蛋白質標準曲線，換算蛋白質含量。

### 3.5 統計分析

實驗所得之數據結果皆為三重複，以平均值 $\pm$ 標準偏差表示，並以 Statistical Analysis System (SAS) 8.1 版之統計軟體進行變異數分析 (ANOVA) 及 Duncan 's multiple range test 分析，比較組間的顯著差異程度。

## 肆、結果與討論

### 4.1 甘草調解血糖成分之萃取、分離及純化

#### 4.1.1 甘草調節血糖成分之萃取

將 500 公克乾燥後甘草經磨碎後，所得粉末分別以 95% 乙醇、50% 乙醇以及熱水 1:20 (w/v) 的比例進行萃取，重複萃取三次，過濾後收集其濾液，並利用減壓濃縮機濃縮至乾，將三種不同溶劑甘草萃取物進行萃取率、 $\alpha$ -amylase 及  $\alpha$ -glucosidase 兩種醣解酵素抑制活性，以及 DPPH 自由基清除能力、總多酚、總類黃酮含量等抗氧化性分析。

萃取率以 50% 乙醇甘草萃取物含量較高，每公克萃取物量約萃出  $38.12 \pm 1.62\%$  的萃取物(表 4-1)； $\alpha$ -amylase 及  $\alpha$ -glucosidase 抑制率結果三種萃取物(1mg/ml)間均有顯著差異，乙醇萃取物在兩者酵素抑制方面結果只對  $\alpha$ -glucosidase 有抑制作用；50% 乙醇甘草萃取物對兩種酵素皆有抑制作用，對  $\alpha$ -amylase 抑制率為 15.64%， $\alpha$ -glucosidase 抑制率為 51.05%；而熱水萃取物則只對  $\alpha$ -amylase 有抑制效果(圖 4-1)。

DPPH 自由基清除能力測試，三種萃取物間有顯著差異，以 50% 乙醇萃取物最高，清除率可達 87.34% (圖 4-2)；乙醇萃取物和 50% 乙醇萃取物的總多酚、總類黃酮含量相當，為三種萃取物中最佳的(表 4-2)。綜合各項測得結果，甘草 50% 乙醇的萃取物為三者當中最佳，因此選擇此萃取物以 XAD-7 樹脂進行第一次液相管柱層析分離。

表 4-1 不同溶劑甘草萃取物之萃取率

Table 4-1 Yields of different solvent extracts from licorice

Extract	Yield (w/w) %
EtOH	21.46±4.84%
50%EtOH	38.12±1.62%
Hot water	30.74±8.72%

表 4-2 不同溶劑甘草萃取物之總多酚、總類黃酮含量

Table 4-2 The total polyphenols and total flavonoid contents of different solvent licorice extracts

Extract	Total phenolic content	Total flavonoid content
EtOH	33.93±2.70	4.93±0.14
50%EtOH	34.17±2.51	4.05±0.07
Hot water	20.60±2.70	3.23±0.01

\* Total phenolic content : mg gallic acid equivalent / g licorice extract

\* Total flavonoid content : mg quercetin equivalent /g licorice extract

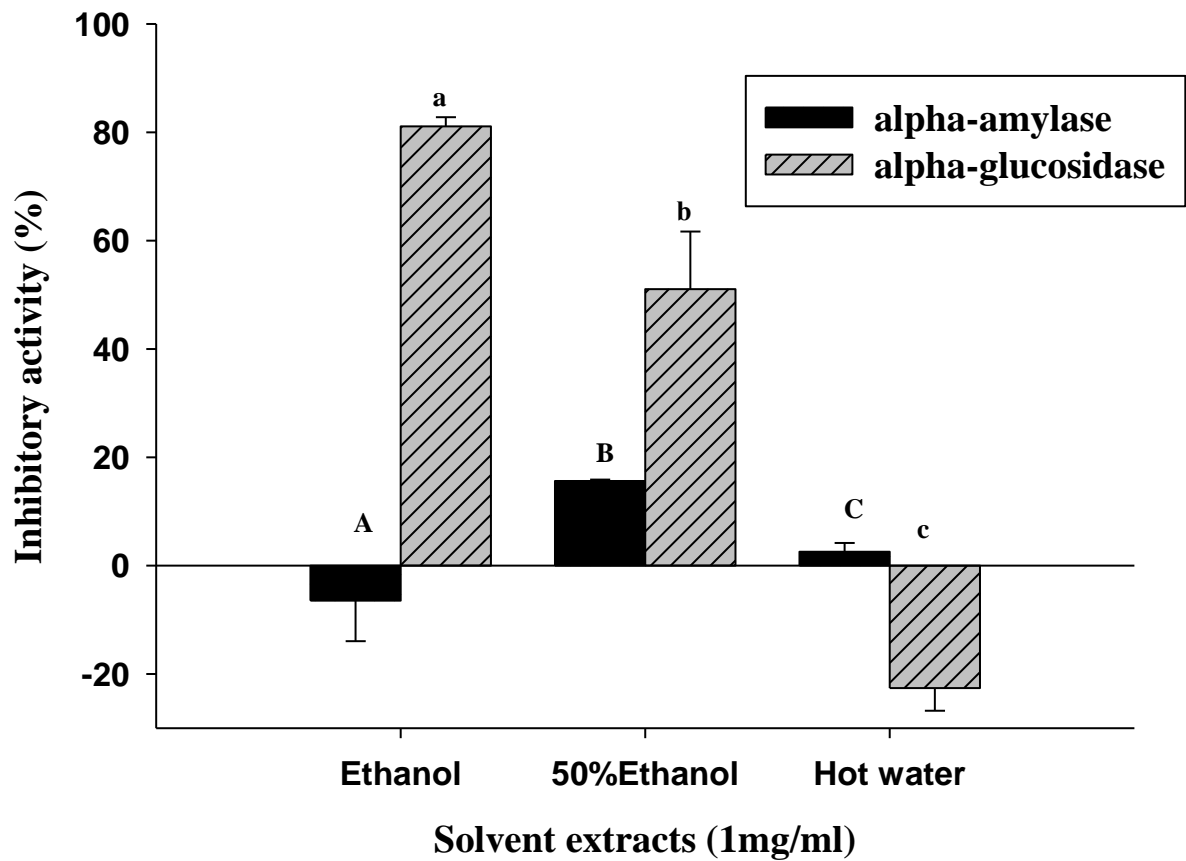


圖 4-1 甘草不同溶劑萃取物對  $\alpha$ -amylase 及  $\alpha$ -glucosidase 之抑制活性百分率。

Fig. 4-1  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of different solvent extracts from licorice. Bars represent mean $\pm$ SD,  $n=3$ . Means with different letters are significant different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

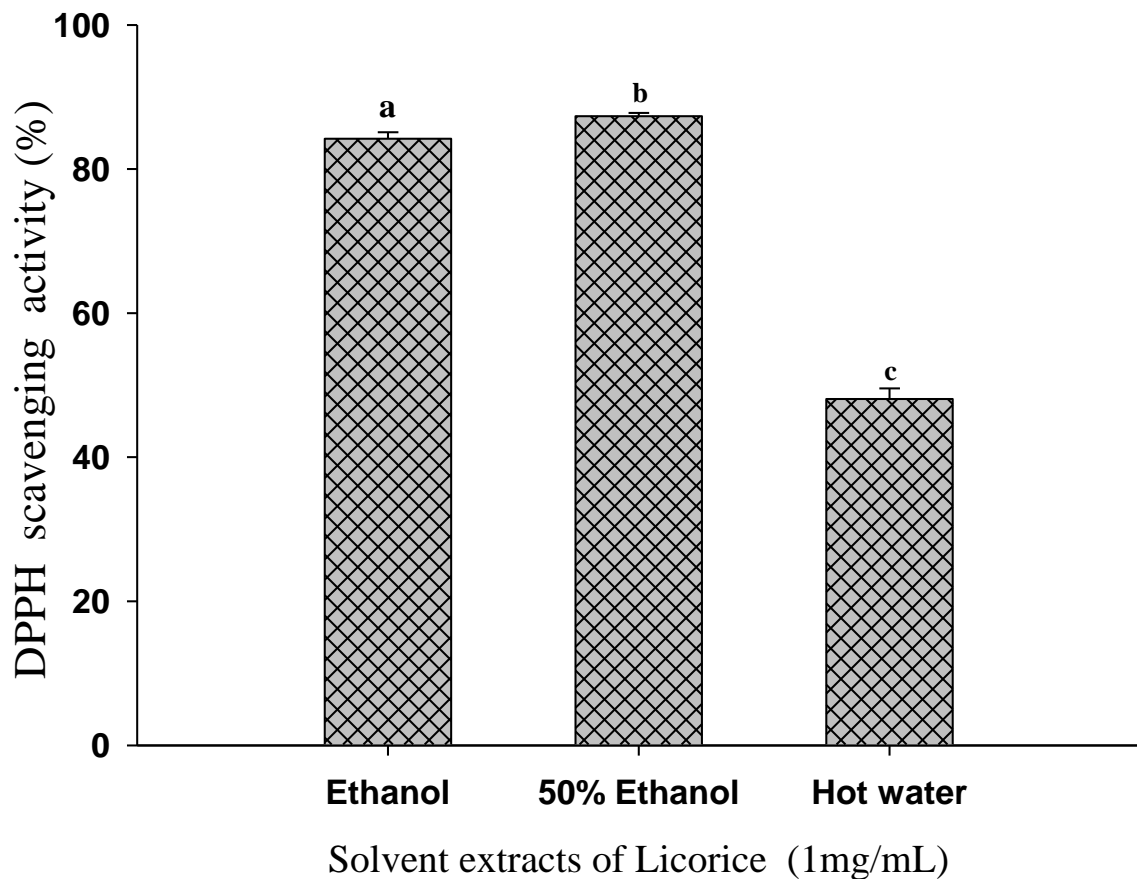


圖 4-2 甘草不同溶劑萃取物之 DPPH 自由基清除能力。

Fig. 4-2 Scavenging activity of different solvent extracts from licorice on DPPH radical. Bars represent mean $\pm$ SD,  $n=3$ . Means with different letters are significant different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

#### 4.1.2 XAD-7 液相管柱層析

甘草 50% 乙醇萃取物先以 XAD-7 樹脂填充於玻璃管柱(66 $\times$ 3.5cm)進行第一次液相管柱層析，其沖提條件依序為去離子水:甲醇(v/v)=100:0、80:20、60:40、40:60、20:80、0:100 及丙酮:甲醇(v/v)=50:50 之混合溶液，各梯度沖提總量為 3L，沖提液以每瓶 300mL 為收集單位，沖提前先以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描甘草 50% 乙醇萃取液，因在 261nm 下有極大吸光值，故選 261nm 為偵測波長，依各收集瓶檢測所得吸光值變化做圖，共可分成 6 個區分(圖 4-3)，分別濃縮，各區分所得含量如表 4-3。而後分別測定各區分物對  $\alpha$ -amylase 及  $\alpha$ -glucosidase 活性的抑制率(圖 4-4)，並以

硫氰酸鐵法測定各區分的抗氧化性(圖 4-5)，結果顯示在酵素活性抑制方面，區分物IV為當中抑制率最佳者， $\alpha$ -amylase 及  $\alpha$ -glucosidase 抑制率分別為 55.87%和 88.92%；而硫氰酸鐵法測試上抗氧化能力強弱為區分VI>區分V>區分IV>區分II>區分III>區分I，由此兩試驗結果相互驗證得之推測區分IV具有良好的調節血糖及抗氧化物質，並將此區分物以 Cocmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 膠體進行第二次液相管柱層析。



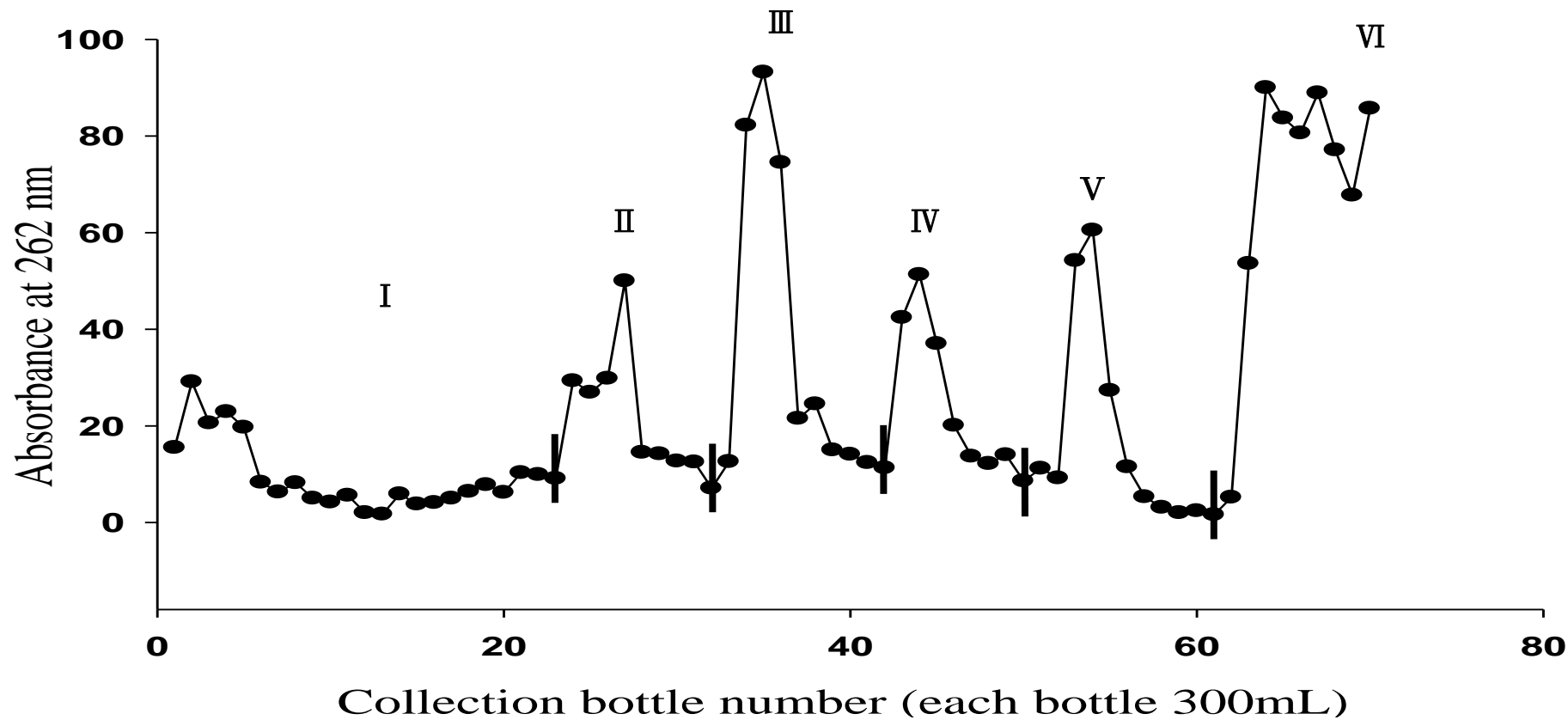


圖 4-3 甘草 50% 乙醇萃取物之 XAD-7 液相管柱層析圖。

Fig. 4-3 XAD-7 liquid chromatogram of eluted fractions from 50% ethanol extract of licorice.

表 4-3 甘草 50% 乙醇萃取物經 XAD-7 液相層析後各沖提區分之產率

Table 4-3 Yields of eluted fractions separated from 50% ethanol extract of licorice by XAD-7 liquid chromatography

Fraction	Weight(g)	Yield(%) <sup>a</sup>
I	23.51±0.14	23.48±0.14
II	37.12±1.35	37.07±1.35
III	6.07±0.54	6.06±0.54
IV	10.72±0.37	10.71±0.37
V	8.49±1.88	8.48±1.88
VI	0.81±0.11	0.81±0.11
Total	86.72	86.61

<sup>a</sup>weight of 50% ethanol extract :100.138g

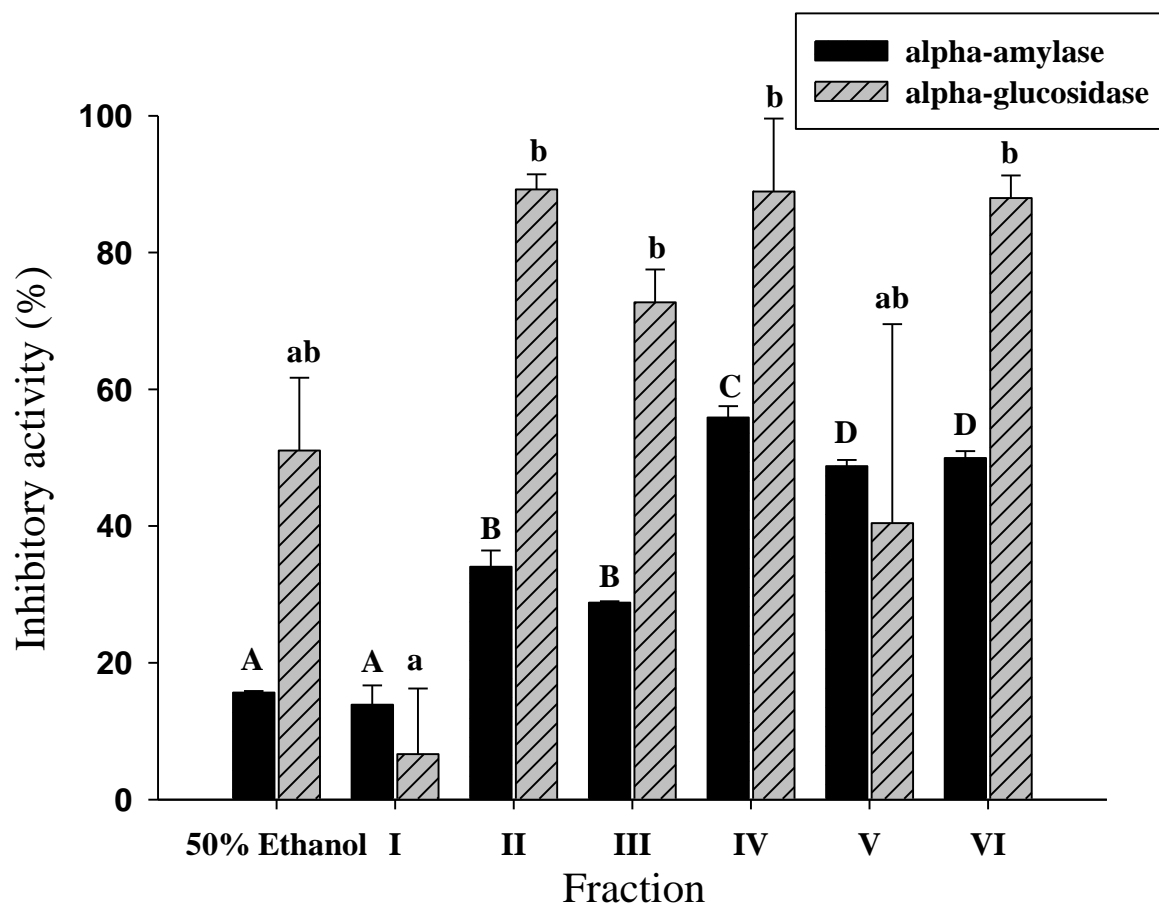


圖 4-4 XAD-7 液相管柱層析區分物對  $\alpha$ -amylase 及  $\alpha$ -glucosidase 之抑制活性百分率。

Fig. 4-4  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of fractions eluted by XAD-7 liquid chromatography from 50% ethanol extract of licorice. Bars represent mean $\pm$ SD,  $n=3$ . Means with different letters are significant different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

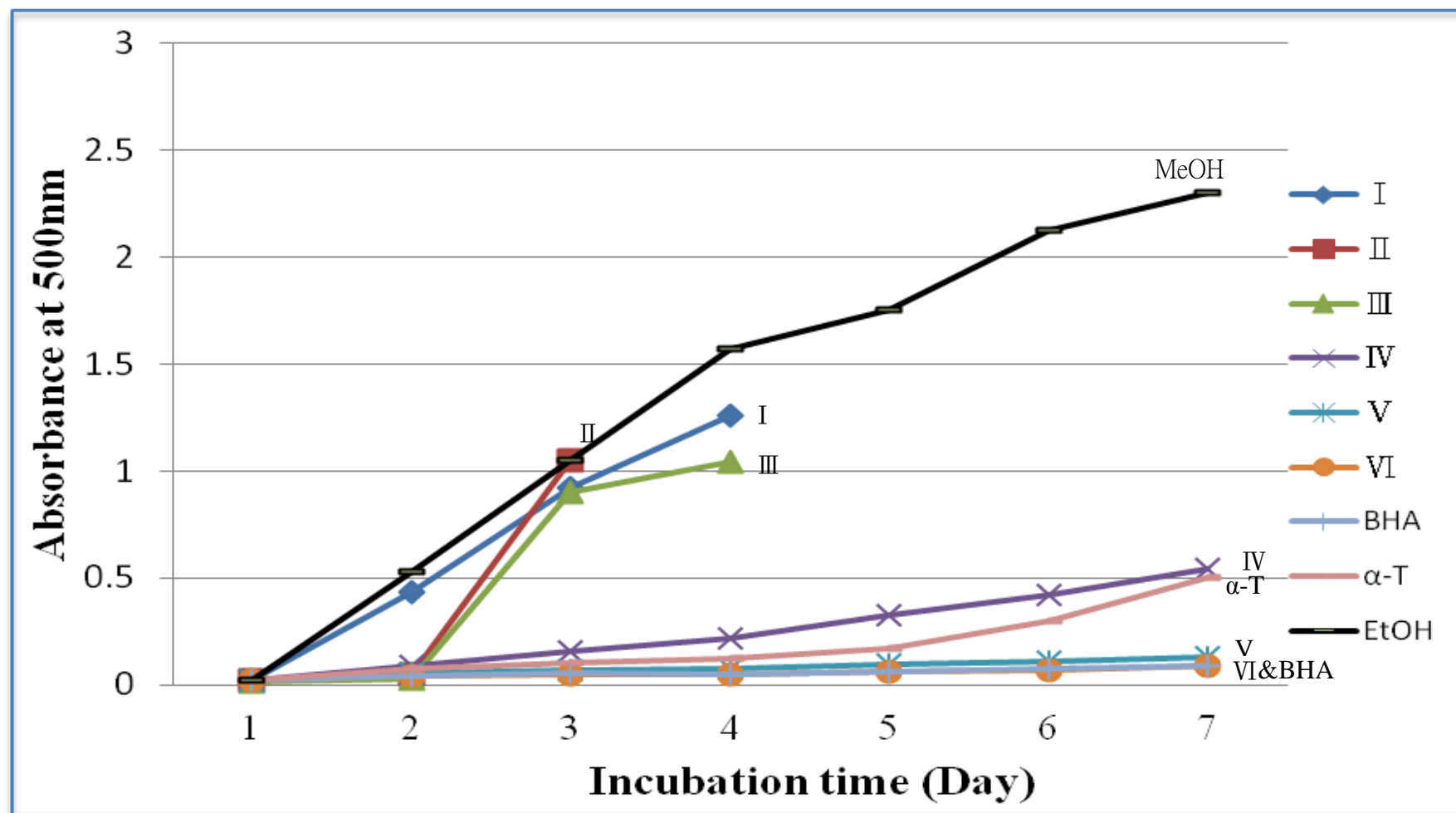


圖 4-5 甘草 50% 乙醇萃取物沖提區分之抗氧化性。

Fig. 4-5 Antioxidative activities of eluted fractions from 50% ethanol extract of licorice by ferric thiocyanate assay.

### 4.1.3 Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 液相管柱層析

經 XAD-7 液相管柱層析後所得抑制酵素效果最佳區分物 IV 以 C<sub>18</sub>-OPN 液相管柱層析做第二次分離，將 Cosmosil 75C<sub>18</sub>-OPN 膠體填充於管柱當中，先以 1 倍管柱體積沖提劑將其內溶劑置換成沖提的第一個比例沖提劑(50% 甲醇)，並將經由 XAD-7 液相管柱層析分離所得之區分物 IV 濃縮至乾，以少量甲醇回溶並先與部分膠體預混合後，填充於膠體最上端，再依序以去離子水: 甲醇(v/v)=50:50、40:60、30:70、20:80、0:100 及丙酮: 甲醇(v/v)=50:50 之混合溶液沖提，各梯度沖提總量為 1L，沖提液以每瓶 50mL 為收集單位，區分物 IV 溶液先以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，結果在 273nm 下有極大吸光值，故選 273nm 作為偵測波長，並以各收集瓶所測得之吸光值做圖，共可細分成六個區分(圖 4-6)，各區分含量如表 4-4 所示，並將六個區分(IV-1、IV-2、IV-3、IV-4、IV-5、IV-6)，分別測定對  $\alpha$ -amylase 及  $\alpha$ -glucosidase 活性抑制能力，結果顯示以區分物 IV-1 和 IV-5 對兩者酵素活性抑制率為所有區分中最佳(圖 4-7)，其對  $\alpha$ -amylase 抑制率分別為 49.66% 及 64.36%； $\alpha$ -glucosidase 抑制率亦都高達 91.69%，故接著將兩個區分利用高效液相層析儀(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)分析及製備其主要醣解酵素抑制活性成分。

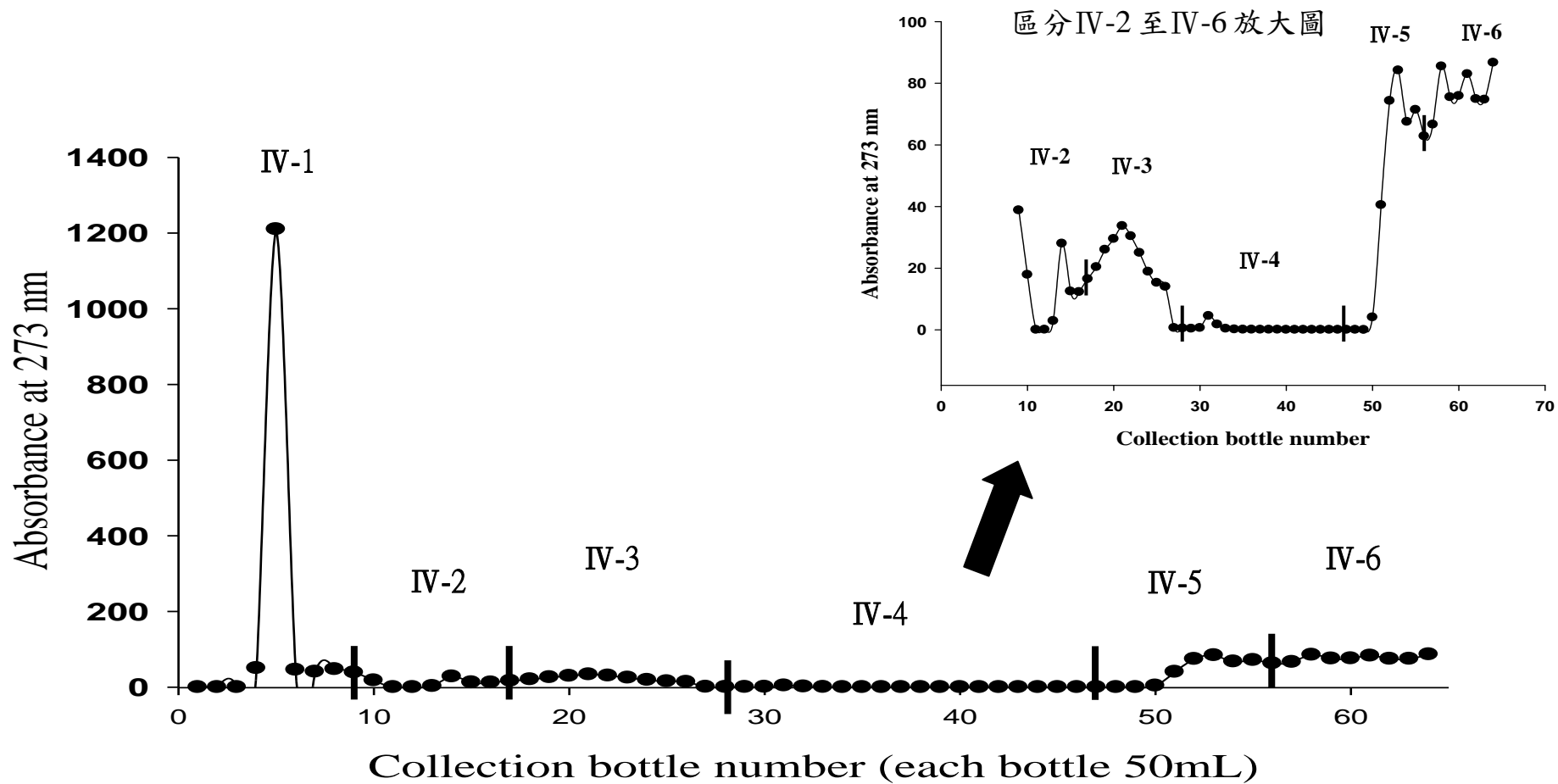


圖 4-6 甘草 50% 乙醇萃取物之 Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 液相管柱層析圖。

Fig. 4-6 Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN liquid chromatogram of eluted fraction IV from 50% ethanol extract of licorice.

表 4-4 Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 液相管柱層析區分 IV 各沖提區分之產率

Table 4-4 Yields of eluted fractions separated from fraction IV by the secondary Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN liquid chromatography

Fraction	Weight(g)	Yield(%) <sup>a</sup>
IV-1	2.76±0.19	25.75±1.78
IV-2	0.39±0.12	3.80±1.12
IV-3	0.21±0.04	1.96±0.40
IV-4	1.25±0.01	11.66±0.00
IV-5	0.67±0.06	6.25±0.53
IV-6	0.08±0.07	0.75±0.66
Total	5.36	50.17

<sup>a</sup>weight of fraction IV:10.72g

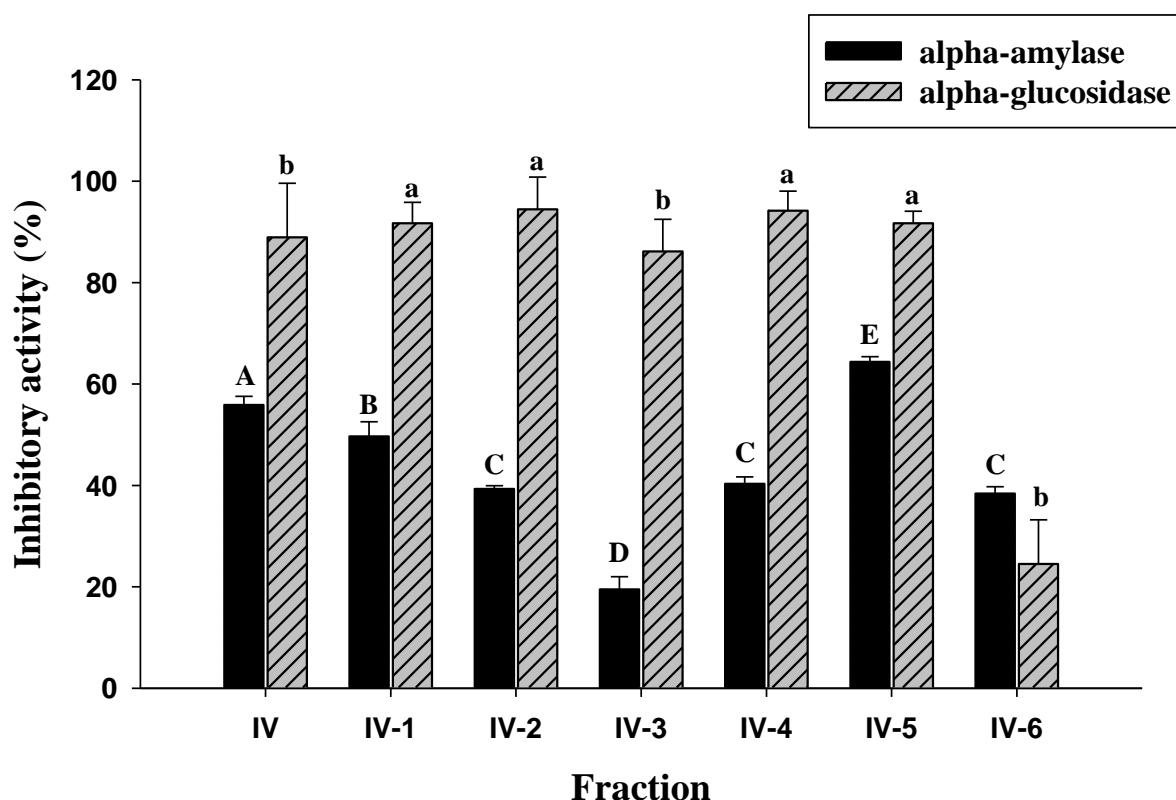


圖 4-7 Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 液相管柱層析區分物對  $\alpha$ -amylase 及  $\alpha$ -glucosidase 之抑制活性百分率。

Fig. 4-7  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of fractions from fraction IV of 50% ethanol extract of licorice by Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN liquid chromatography .

#### 4.1.4 活性成分之高效液相層析

##### (1) 區分 IV-1 之高效液相層析

參考 Baek (2008) 之純化方法，以 254nm 做為檢測波長。再將區分 IV-1 濃縮至乾，以適量的甲醇溶解，並以 0.45 $\mu$ m 之濾膜過濾。區分 IV-1 先以分析型高效液相層析儀找尋良好的分離條件，其沖提劑為去離子水: 甲醇 (v/v)=50:50，分別再以相同條件之製備型高效液相層析儀進行分離，並重覆收集層析圖上相同滯留時間波峰之沖提液。

區分 IV-1 (圖 4-8) 經 HPLC 分析型管柱後可得 **1**、**2** 與 **3** 等三個主要波峰，經製備型管柱分離重覆收集的 3 個波峰再以去離子水: 甲醇 (v/v)=50:50 之沖提條件分析，(圖 4-9) 得知波峰 **1** 並非單一物質，並以去離子水: 甲醇 (v/v)=50:50 之條件進行第二次分離純化，再次以去離子水: 甲醇 (v/v)=50:50 之沖提條件分析，結果(圖 4-10、圖 4-11、圖 4-14) 得到純化物質 **1** 與 **4**。而收集波峰 **2** 與 **3** 分析後確定均為單一物質(圖 4-12、圖 4-13)，並進行下一步之光譜分析及結構鑑定。

##### (2) 區分 IV-5 之高效液相層析

同樣參考 Baek (2008) 之純化方法，以 254nm 做為檢測波長。再將區分 IV-5 濃縮至乾，以適量的甲醇溶解，並以 0.45 $\mu$ m 之濾膜過濾。區分 IV-5 分別以分析型高效液相層析儀找尋良好的分離條件，其沖提劑為去離子水: 甲醇 (v/v)=35:65，再以相同條件之製備型高效液相層析儀進行分離，並重覆收集層析圖上相同滯留時間波峰之沖提區分。

區分 IV-5 經分析型管柱後顯示出波峰 **5** 為此區分內主要的波峰(圖 4-15)，經製備型管柱重覆收集波峰 **5** (圖 4-16)，接著繼續進行下一步之光譜分析及結構鑑定。



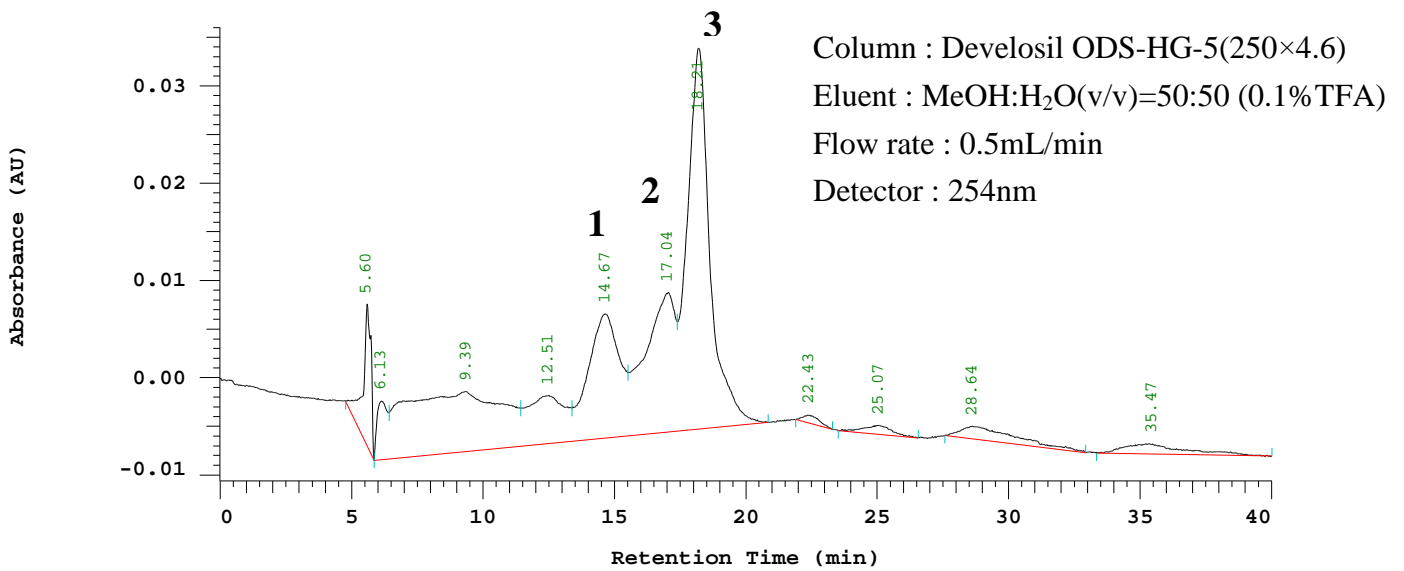


圖 4-8 甘草 50%乙醇萃取物沖提區分 IV-1 之分析型高效液相層析圖。

Fig. 4-8 Analytical HPLC chromatogram of fraction IV-1 separated from 50% ethanol extract of licorice.

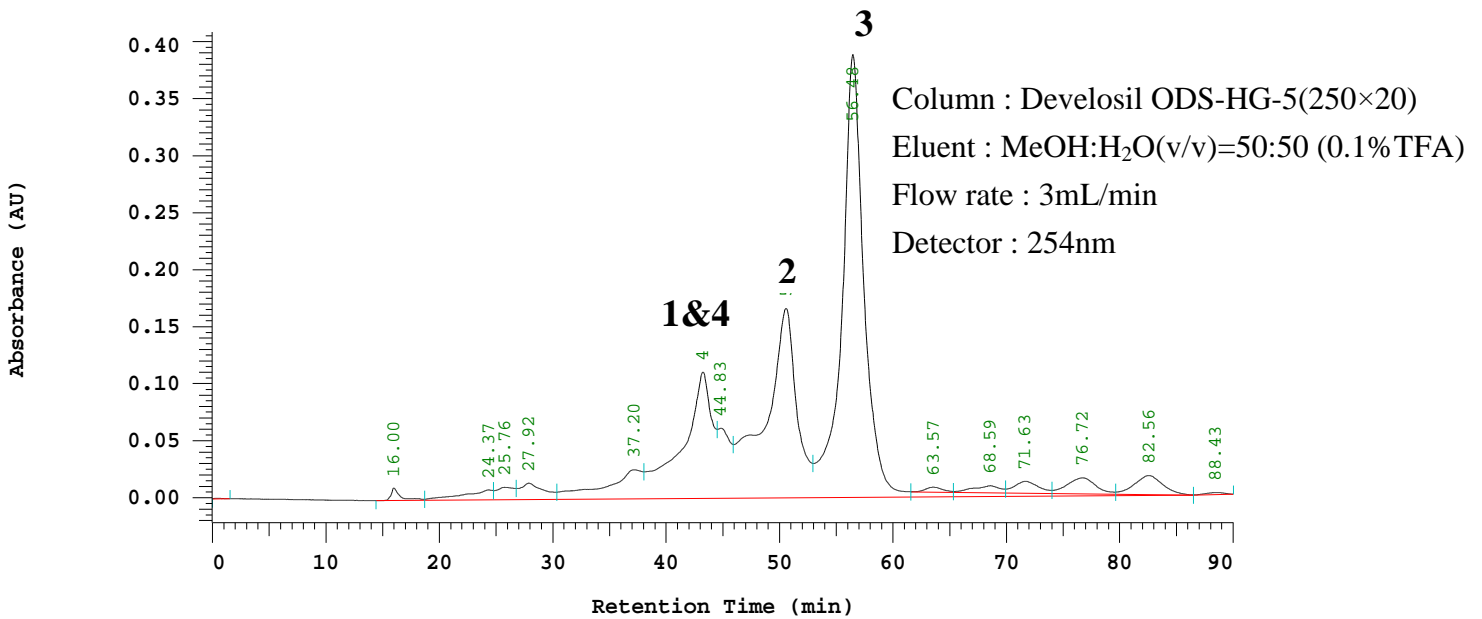


圖 4-9 甘草 50%乙醇萃取物沖提區分 IV-1 之製備型高效液相層析圖。

Fig. 4-9 Preparative HPLC chromatogram of fraction IV-1 separated from 50% ethanol extract of licorice.

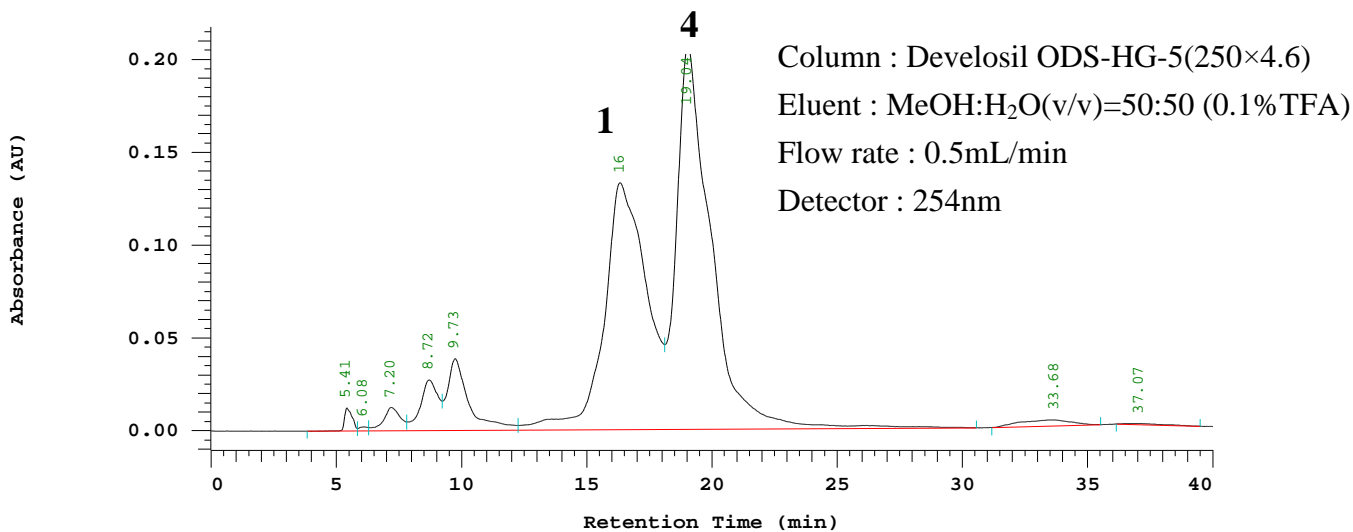


圖 4-10 甘草 50% 乙醇萃取物沖提區分 IV-1-(1) 之分析型高效液相層析圖。

Fig. 4-10 Analytical HPLC chromatogram of fraction IV-1-(1) separated from 50% ethanol extract of licorice.

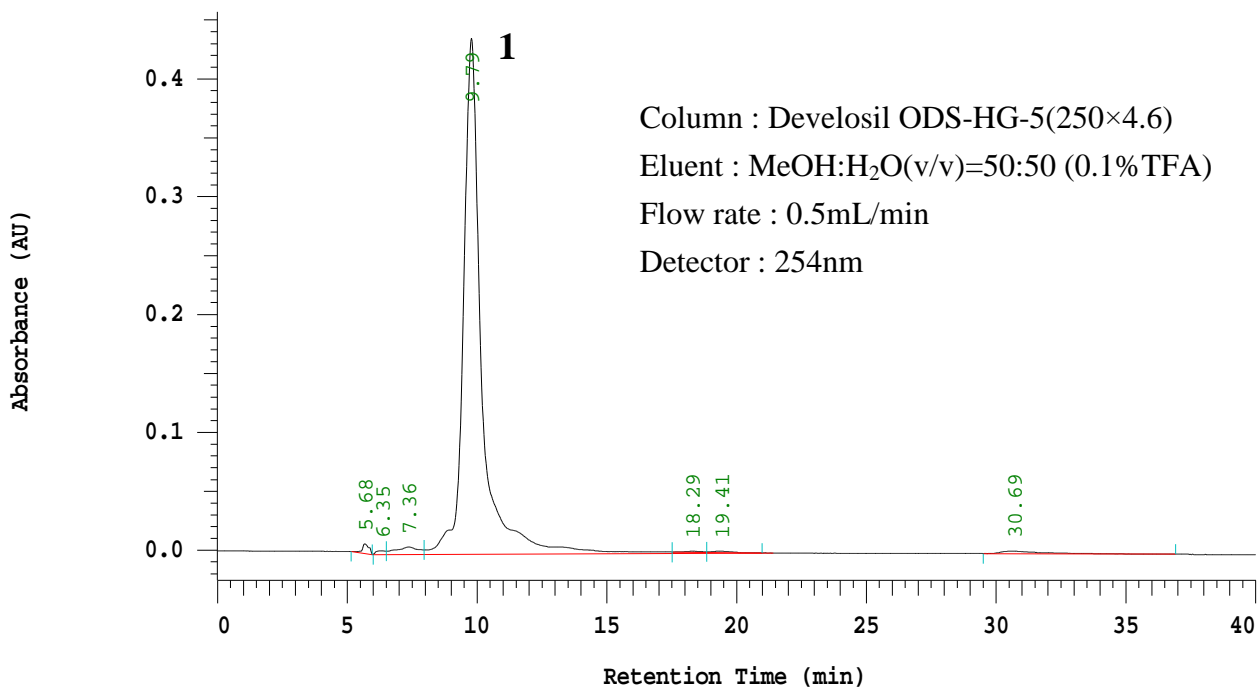


圖 4-11 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 1 之分析型高效液相層析圖。

Fig. 4-11 Analytical HPLC chromatogram of the isolated component 1 from 50% ethanol extract of licorice.

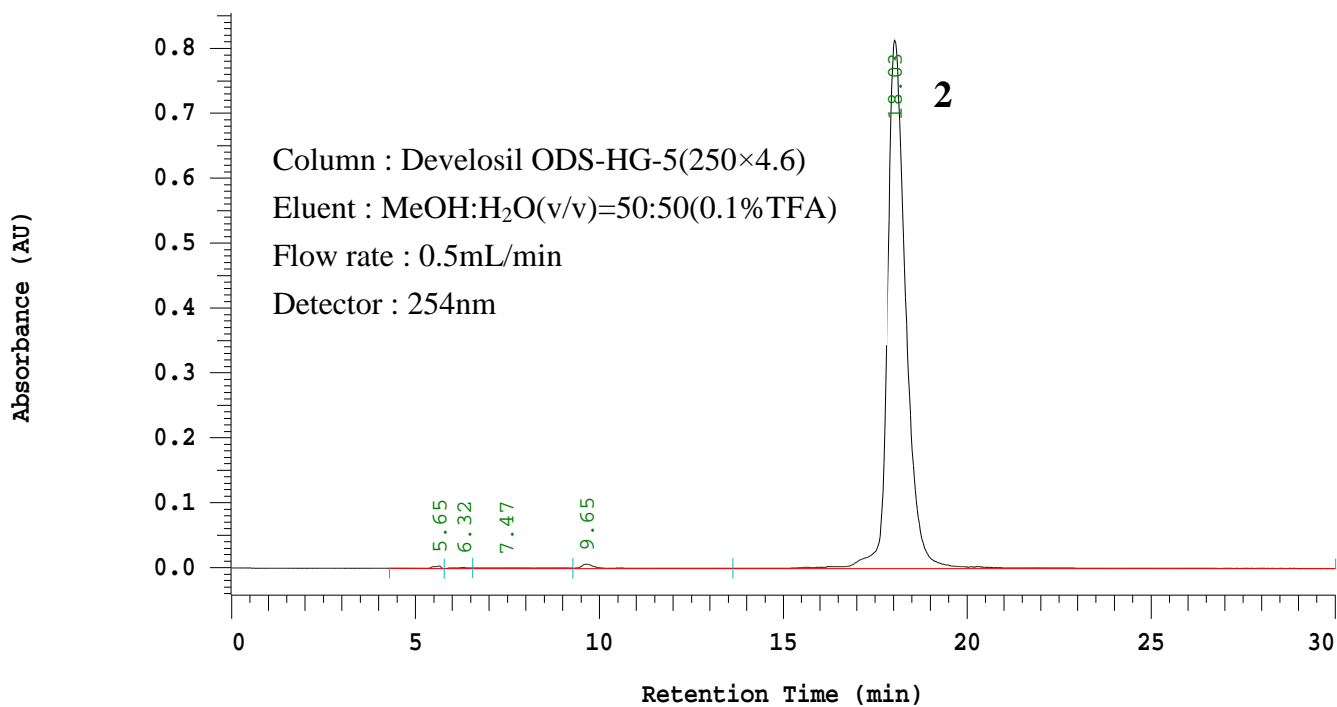


圖 4-12 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 **2** 之分析型高效液相層析圖。

Fig. 4-12 Analytical HPLC chromatogram of the isolated component **2** from 50% ethanol extract of licorice.

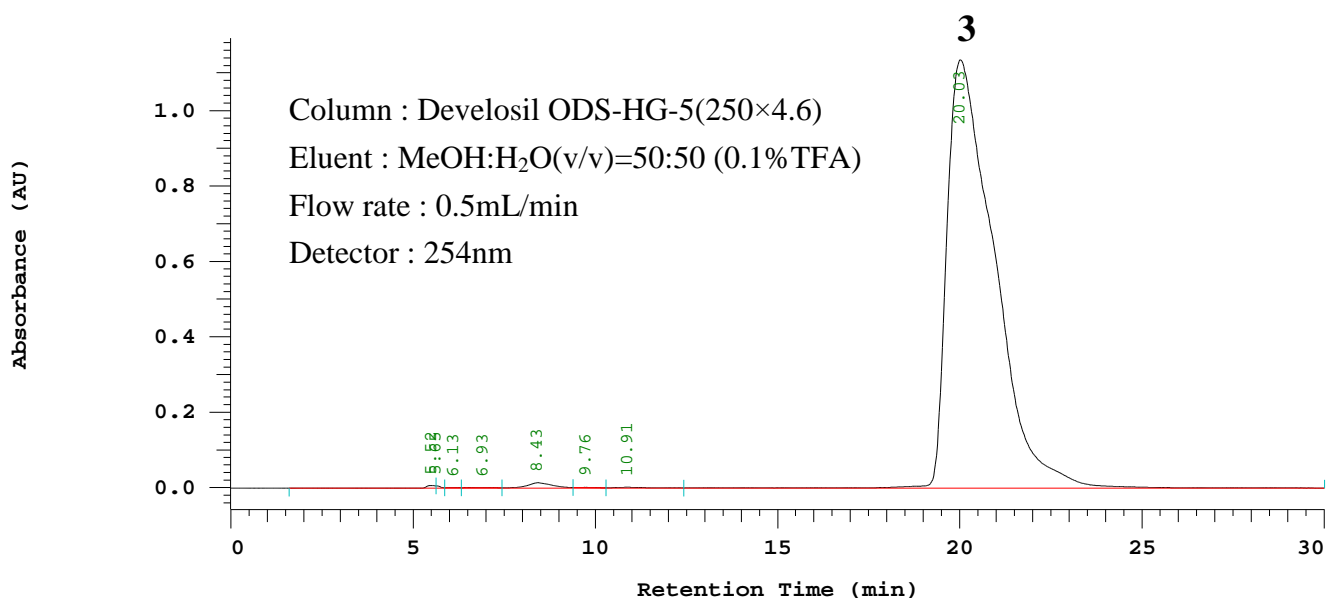


圖 4-13 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 **3** 之分析型高效液相層析圖。

Fig. 4-13 Analytical HPLC chromatogram of the isolated component **3** from 50% ethanol extract of licorice.

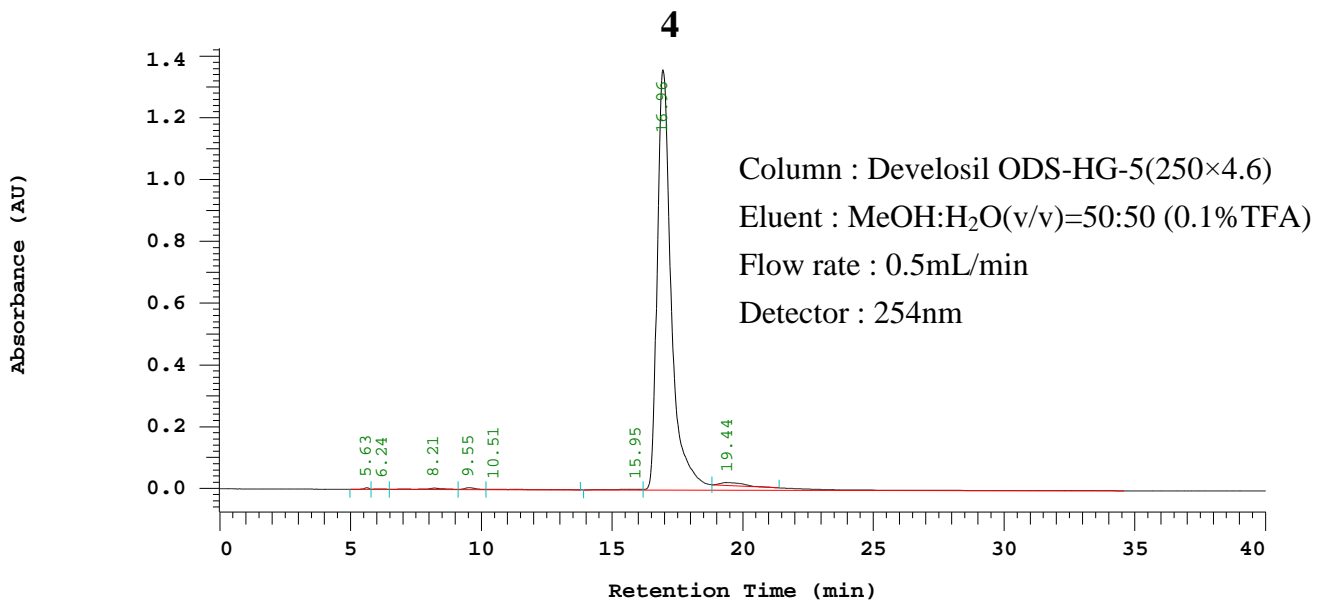


圖 4-14 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 **4** 之分析型高效液相層析圖。

Fig. 4-14 Analytical HPLC chromatogram of the isolated component **4** from 50% ethanol extract of licorice.

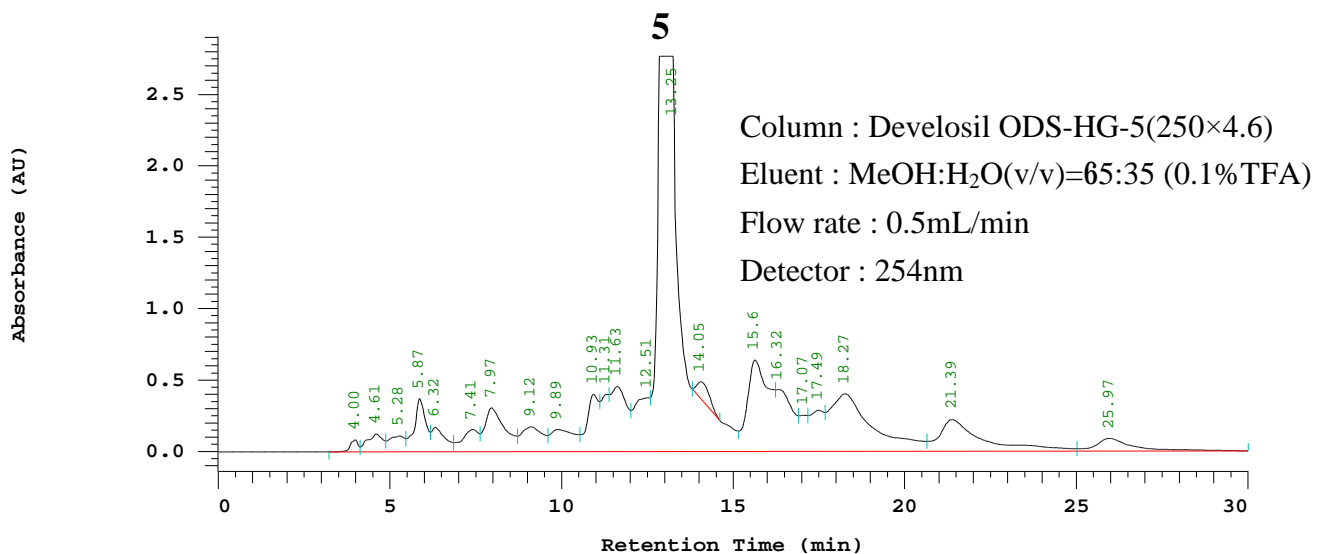


圖 4-15 甘草 50% 乙醇萃取物沖提區分 IV-5 之分析型高效液相層析圖。

Fig. 4-15 Analytical HPLC chromatogram of fraction IV-5 separated from 50% ethanol extract of licorice.

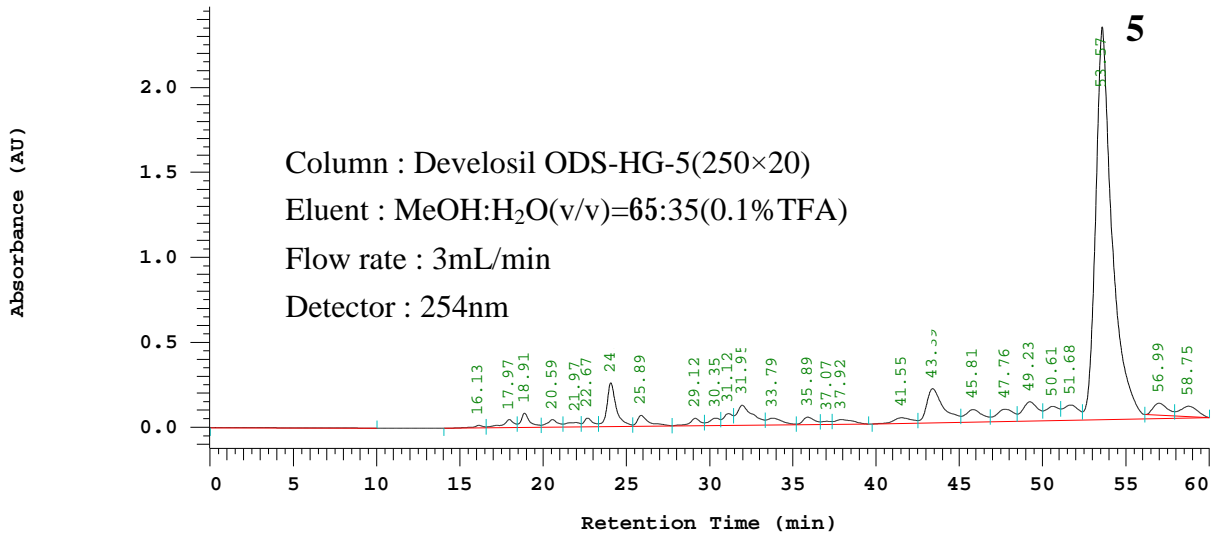


圖 4-16 甘草 50% 乙醇萃取物沖提區分 IV-5 之製備型高效液相層析圖。

Fig. 4-16 Preparative HPLC chromatogram of fraction IV-5 separated from 50% ethanol extract of licorice.

## 4.2 甘草 50%乙醇萃取物純化物質之結構鑑定

甘草 50%乙醇萃取物調節血糖沖提區分的純化物質進行紫外-可見吸光(UV-visible spectrum)、核磁共振光譜( $^1\text{H}$ -及  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum)等光譜分析，其光譜解析如下：

### (1) 純化物質 1 之結構鑑定

純化物質 1 呈現米白色粉末，化學式  $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_9$  由 UV-visible 吸光光譜(圖 4-18)  $\lambda_{\text{max}}$  nm (MeOH) 顯示 230(sh)、271.5(sh)、356.5(sh)nm 推測為 flavanone。 $^1\text{H}$ -NMR 光譜(圖 4-19)顯示  $\delta$  2.85(1H, d, d,  $J=1.8, 16.8\text{Hz}$ )、 $\delta$  3.03(1H, d, d,  $J=13.2, 16.8\text{Hz}$ )為上 H-3 equatorial 及 axial 軸上的兩個質子波訊， $\delta$  3.24-3.89 為葡萄糖基上 6 個質子波訊， $\delta$  4.93 推測為 A 環 C-7 位上連接一個葡萄糖基的波訊， $\delta$  5.34(1H, d, d,  $J=1.8, 13.2\text{Hz}$ )為 A 環上 H-2 質子波訊， $\delta$  6.34(1H, d,  $J=2.3\text{Hz}$ )、 $\delta$  6.48(1H, d, d,  $J=2.3, 8.7\text{Hz}$ )及  $\delta$  7.71(1H, d,  $J=8.7\text{Hz}$ )為典型苯環 ABX 型互為耦合的質子波訊，分別為 A 環上 H-5、H-8、H-6 的質子波訊， $\delta$  6.80(2H, d)、 $\delta$  7.30(2H, d) 分別為 B 環上 H-3'、H-5'與 H-2'、H-6'的質子波訊。

綜合以上光譜解析，並比對文獻 (Ma *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2010)，推測純化物質 1 的結構為 liquiritigenin 於 A 環上 C-7 位置接上一個葡萄糖基的 4'-hydroxy-flavanone-7-O-glucoside (圖 4-17)。

Formula: C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>9</sub>

UVλ<sub>max</sub> (MeOH) nm:213、230(sh)、271.5(sh)、356.5(sh)

<sup>1</sup>H-NMR (300MHz, CD<sub>3</sub>OD):

2.85(1H, d, d, J=1.8, 16.8Hz, H-3eq)

3.03(1H, d, d, =13.2, 16.8Hz, H-3ax)

3.24-3.89, glu-6H

4.93(H-1'')

5.34(1H, d, d J=1.8, 13.2Hz, H-2)

6.34(1H, d, J=2.3Hz, H-8)

6.48(1H, d, d, J=2.3, 8.7Hz, H-6)

6.80(2H, d, J=8.7Hz, H-3', 5')

7.30(2H, d, J=8.7Hz, H-2', 6')

7.71(1H, d, J=8.7Hz, H-5)

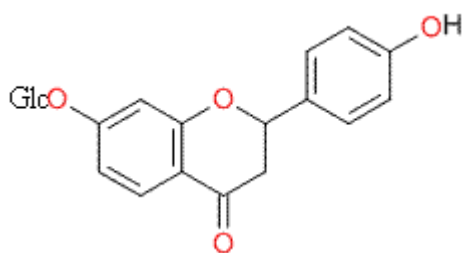


圖 4-17 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 **1** 之結構。

Fig. 4-17 The structure of isolated component **1** from 50% ethanol extract of licorice.

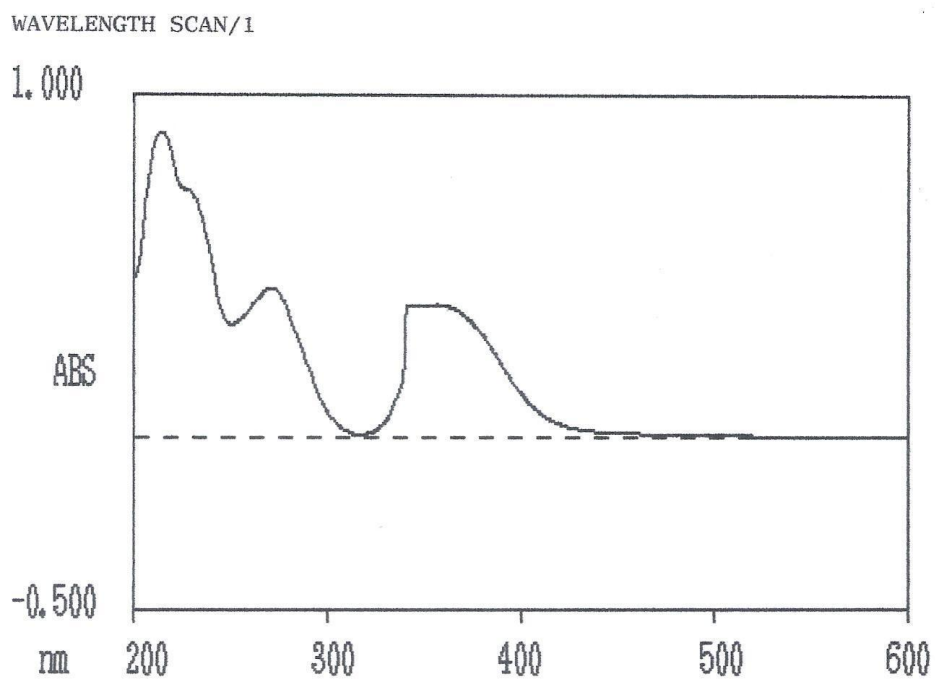


圖 4-18 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 **1** 之紫外光-可見光光譜圖。

Fig. 4-18 UV-visible spectrum for the isolated component **1** from 50% ethanol extract of licorice.



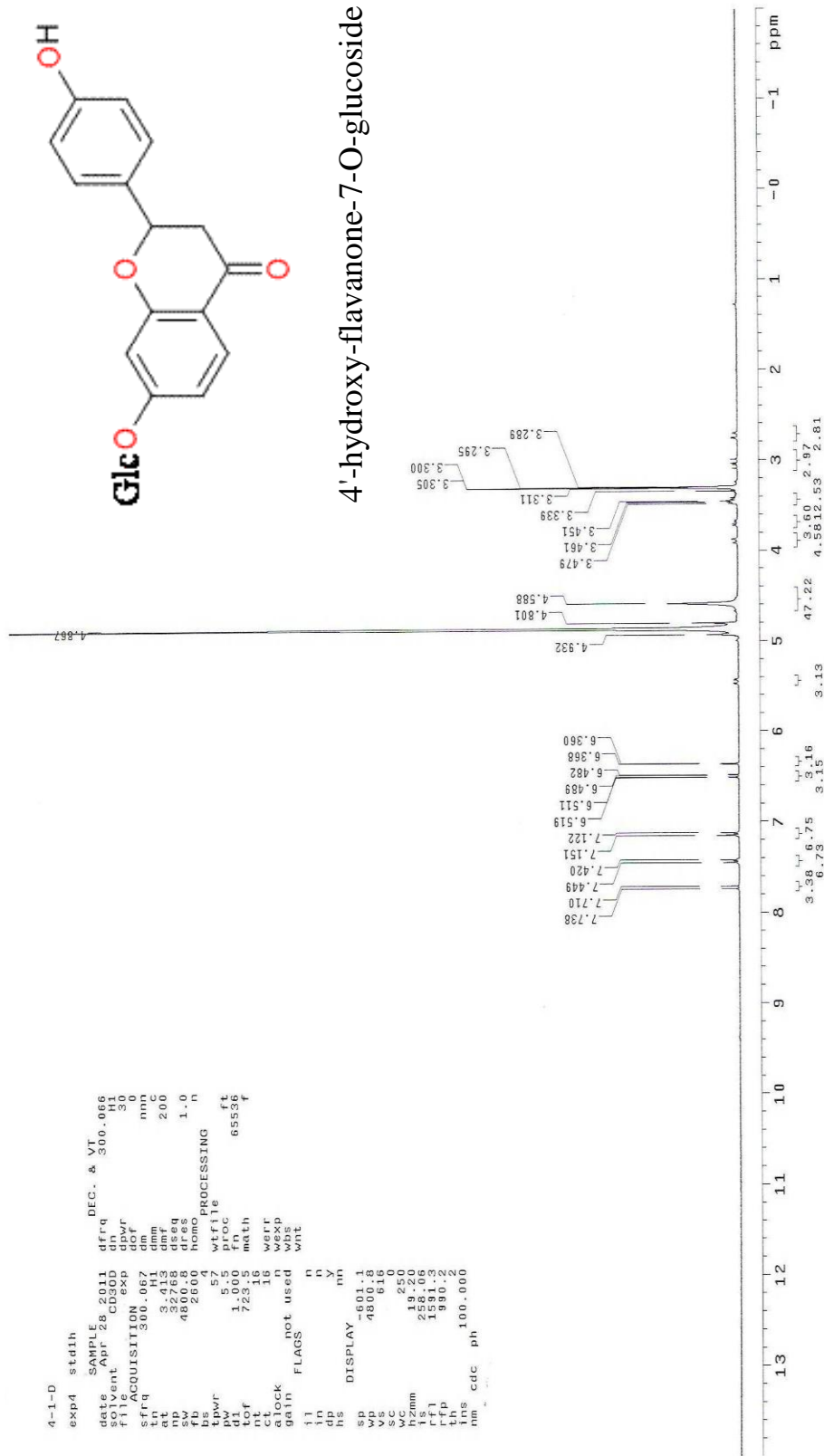


圖 4-19 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 1 之  $^1\text{H}$ -核磁共振光譜圖。

Fig. 4-19  $^1\text{H}$ -NMR spectrum for the isolated component 1 from 50% ethanol extract of Licorice.

## (2) 純化物質 2 之結構鑑定

純化物質 2 呈現黃色針狀結晶，難溶於水，溶於極性小的溶劑，如乙醚、氯仿等，分子式推測為  $C_{21}H_{22}O_9$ ，由 UV-visible 吸光光譜(圖 4-21)  $\lambda_{max}$  nm 顯示 359、230(sh)、254(sh)、288(sh)推測亦為類黃酮特徵吸收。 $^1H$ -NMR 光譜(圖 4-22)顯示  $\delta 7.97(2H, d, J=8.4Hz)$ 與  $\delta 7.14(2H, d, J=8.4Hz)$ 為 B 環 1, 4 取代二組互為偶合 H-2'、H-6'的質子波訊， $\delta 7.79(1H, d, J=15.3Hz)$ 為 H- $\beta$  之質子波訊， $\delta 7.67(1H, d, J=15.3Hz)$  H- $\alpha$  之質子波訊， $\delta 7.73(1H, d, J=8.1Hz)$ 、 $\delta 6.41(1H, d, d, J=2.1, 8.1Hz)$ 、 $\delta 6.28(1H, d, J=2.1Hz)$ 典型苯環三取代 ABX 型質子波訊，分別為 H-3'、H-5'、H-6'之質子波訊， $\delta 4.98(1H, d, J=5.1Hz)$ 為葡萄糖基 H-1 的質子波訊。較高磁場領域上  $\delta 3.24-3.92(6H, m)$ 為葡萄糖基的 6 個質子波訊。

$^{13}C$ -NMR 光譜(圖 4-23)上亦顯示有 1, 3, 4 三取代，及 1, 4 二取代之兩組苯環的碳原子波訊， $\delta 193.35$  為查酮(chalcone)酮基的碳原子波訊。

綜合以上光譜解析，並比對文獻(Hatano *et al.*, 1998)，推測純化物質 2 結構為 4-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-2',4'-dihydroxy-chalcone(圖 4-20)，亦即異甘草素或異甘草苷(Isoliquiritin)，為查酮類物質，研究證明其可提高海馬迴、下丘腦及皮層的神經傳遞物質 5-HT 和 NE 的含量，亦降低 5-HIAA/5-HT 比，因此具有抗憂鬱之功效 (Wang *et al.*, 2008)。

Isoliquiritin 存在於豆科植物甘草的根，鷹嘴豆 *Cicer arietinum* L.的幼苗、豆芽，紅芪 *Radix Hedysari*，黃芪 *Radix Astragali*、滇黃精 *Polygonatum kingianum* 的根，串果藤 *Sinofranchetia chinensis*、香殊蘭 *Crinum bulbispermum* 的球莖等(李等，2010)。

Formula: C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>9</sub>

UVλ<sub>max</sub> (MeOH) nm:359、230(sh)、254(sh)、288(sh)

<sup>1</sup>H-NMR(300MHz, CD<sub>3</sub>OD):

7.97(2H, d, J=8.4Hz, H-2, H-6)

7.79(1H, d, J=15.3Hz, H-β)

7.73(1H, d, J=8.1Hz, H-3')

7.67(1H, d, J=15.3Hz, H-α')

7.14(2H, d, J=8.4Hz, H-3, H-5)

6.41(1H, d, d, J=2.1, 8.1Hz, H-5')

6.28(1H, d, J=2.1Hz, H-5')

4.98(1H, d, J=5.1Hz, H-1'')

3.24-3.92(6H, m, glu-6H)

<sup>13</sup>C-NMR(75MHz, CD<sub>3</sub>OD):

62.45(C-6''), 71.28(C-4''), 74.82(C-2''), 77.92(C-3''), 78.23(C-5''),

101.78(C-1''), 103.80(C-3'), 109.20(C-5'), 114.67(C-1'), 117.97(C-3',5'),

120.019(α-C), 130.50(C-1), 131.39(C-2',6'), 133.47(C-6'), 144.81(β-C),

161.02(C-4), 166.47(C-2'), 167.54(C-4'), 193.35(C=O)

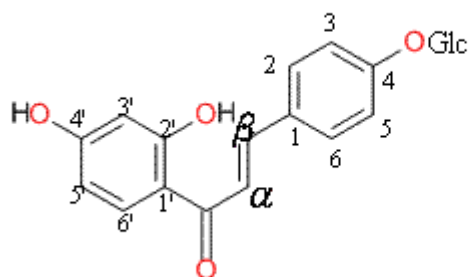


圖 4-20 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 **2** 之結構。

Fig. 4-20 The structure of isolated component **2** from 50% ethanol extract of licorice.

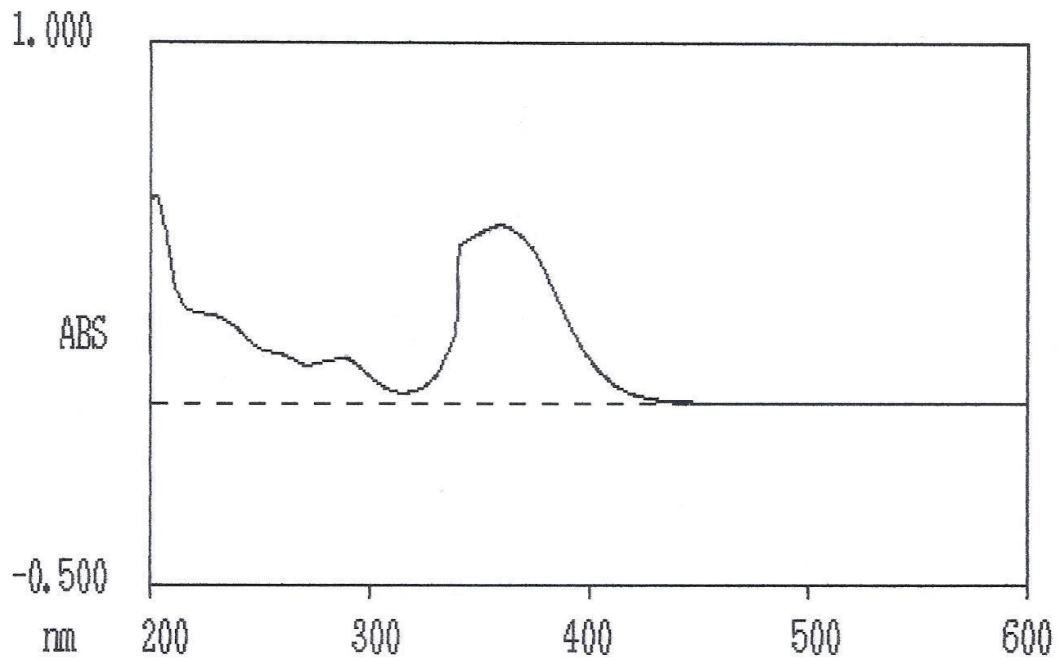
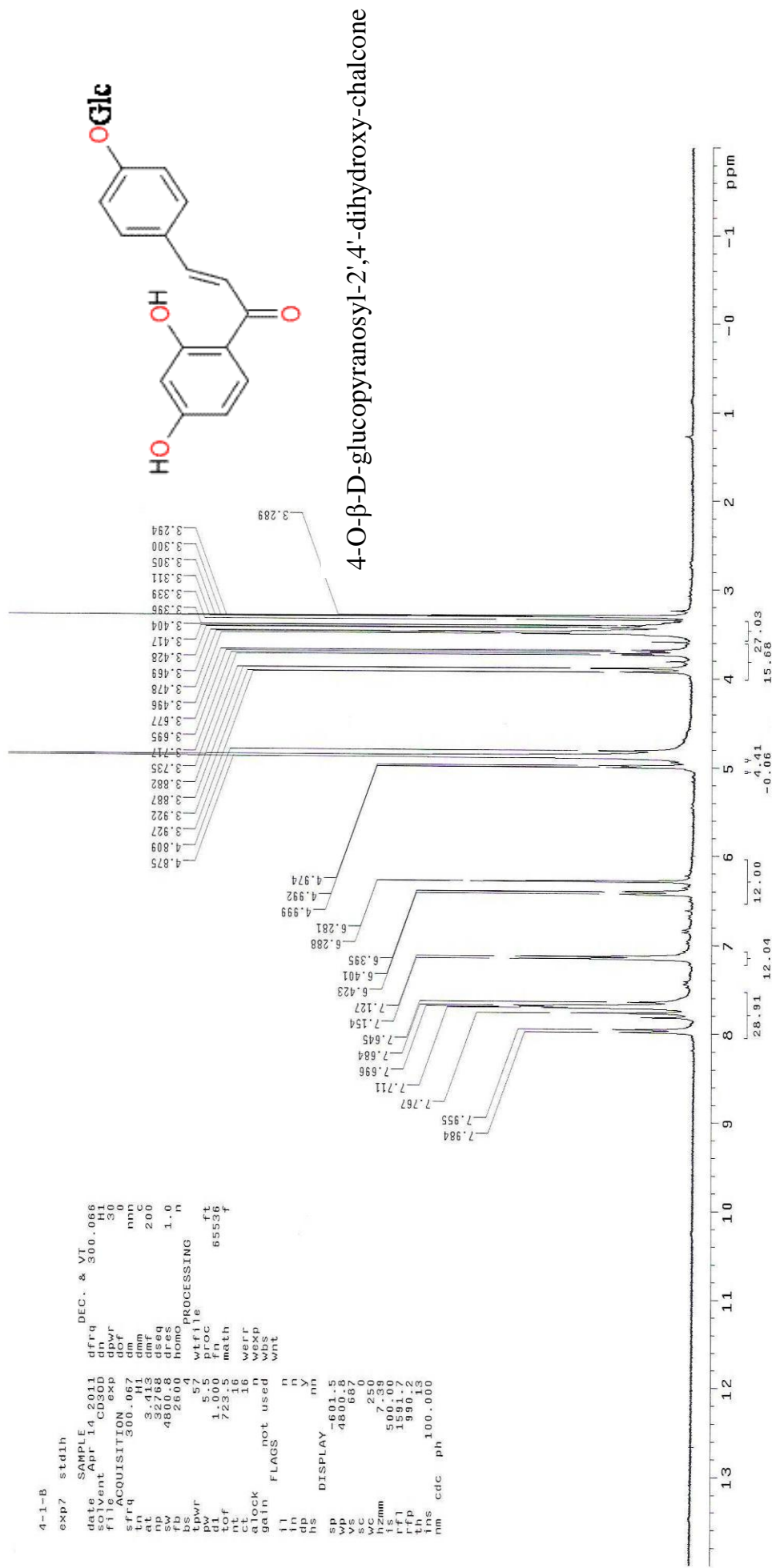


圖 4-21 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 **2** 之紫外光-可見光光譜圖。

Fig. 4-21 UV-visible spectrum for the isolated component **2** from 50% ethanol extract of licorice.



4-22 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 2 之  $^1\text{H}$ -核磁共振光譜圖。

Fig. 4-22  $^1\text{H}$ -NMR spectrum for the isolated component 2 from 50% ethanol extract of Licorice.

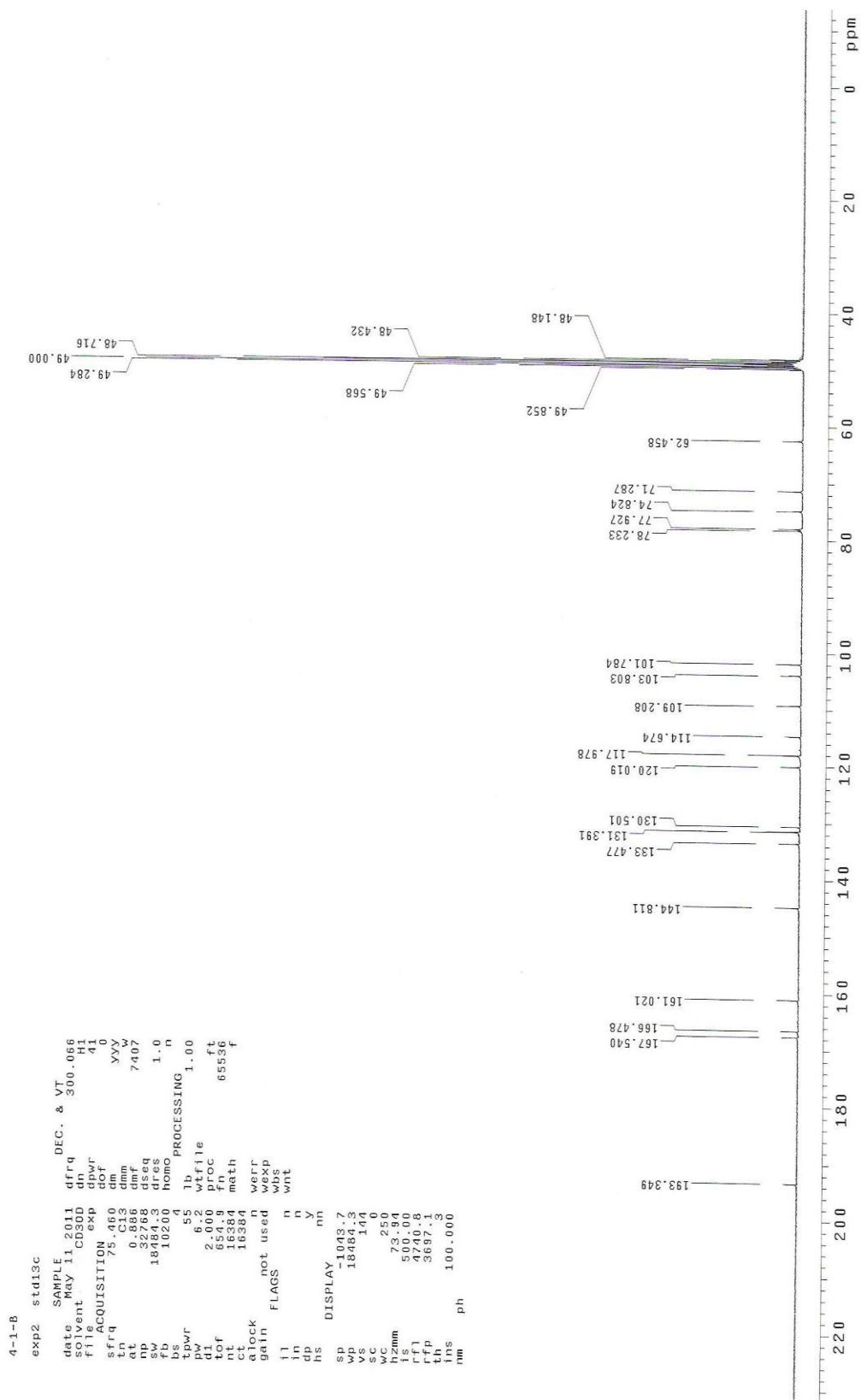


圖 4-23 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 2 之  $^{13}\text{C}$ -核磁共振光譜圖。

Fig. 4-23  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum for the isolated component 2 from 50% ethanol extract of Licorice.

### (3) 純化物質 **3** 之結構鑑定

純化物質 **3** 呈黃褐色粉末，分子式為  $C_{15}H_{12}O_4$ ，由 UV-visible 吸光光譜(圖 4-25)  $\lambda_{max}$  nm 顯示 273、365nm，推測亦為類黃酮 A 環與 B 環的特徵吸收， $^1H$ -NMR 光譜(圖 4-26)顯示除葡萄糖基的質子波訊外，其他質子波訊與純化物質 **1** 都十分相似， $\delta 2.67(1H, d, d, J=13.2, 16.8Hz)$ 、 $\delta 3.03(1H, d, d, J=1.8, 16.8Hz)$  為 H-3 equatorial 及 axial 軸上的兩個質子波訊， $\delta 5.34(1H, d, d, J=1.8, 13.2Hz)$ 、 $\delta 6.34(1H, d)$ 、 $\delta 6.50(1H, d, d, J=2.1, 8.4Hz)$  及  $\delta 6.34(1H, d, J=2.1, 8.4Hz)$  分別為 A 環上 H-5、H-6、H-8 苯環 1, 3, 4 取代 ABX 型互為耦合的質子波訊， $\delta 7.71(1H, d, J=8.1Hz)$ 、 $\delta 7.30(2H, d, J=8.4Hz)$ 、 $\delta 6.80(2H, J=8.4Hz)$  則為 1, 4 取代 B 環上 H-2'、H-6' 與 H-3'、H-5' 的質子波訊。 $^{13}C$ -NMR 光譜(圖 4-27)亦支持  $^1H$ -NMR 光譜之推論。

綜合以上光譜解析，並比對文獻(Ma *et al.*, 2005; Hatano *et al.*, 1998)，推測 **3** 的結構為 4',7-dihydroxyflavanone(圖 4-24)亦即 liquiritigenin，研究證明 liquiritigenin 在體外試驗具抑制黃嘌呤氧化酶活性以及抗過敏的功效(Ma *et al.*, 2005)。

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

UVλ<sub>max</sub> (MeOH) nm: 213、231(sh)、273(sh)、365(sh)

<sup>1</sup>H-NMR(300MHz, CD<sub>3</sub>OD)

7.71(1H, d, J=8.2Hz, H-5)

7.30(2H, d, J=8.4Hz, H-2', 6')

6.80(2H, d, J=8.4Hz, H-3', 5')

6.50(1H, d, d, J=2.1, 8.1Hz, H-6)

6.34(1H, d, J=2.1Hz, H-8)

5.34(1H, d, d, J=1.8, 13.2Hz, H-2)

3.03(1H, d, d, J=13.2, 16.8Hz, H-3eq)

2.67(1H, d, d, J=1.8, 16.8Hz, H-3ax)

<sup>13</sup>C-NMR(75MHz, CD<sub>3</sub>OD):

44.91(C-3), 80.99(C-2), 103.78(C-8), 111.71(C-6), 114.95(C-10),

116.28(C-3',5'), 128.99(C-2',6'), 129.83(C-1), 131.30(C-1'), 159.5(C-4'),

165.52(C-9), 166.71(C-7), 193.52(C=O)

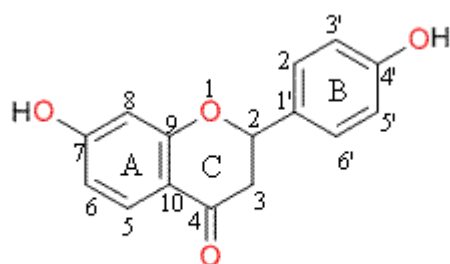


圖 4-24 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 **3** 之結構。

Fig. 4-24 The structure of isolated component **3** from 50% ethanol extract of licorice.



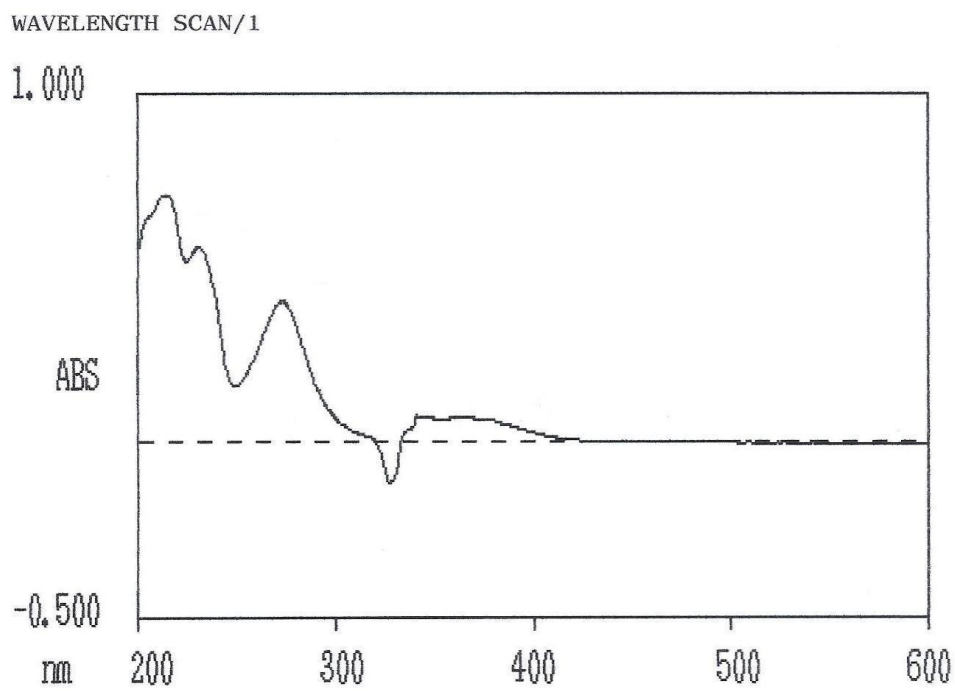
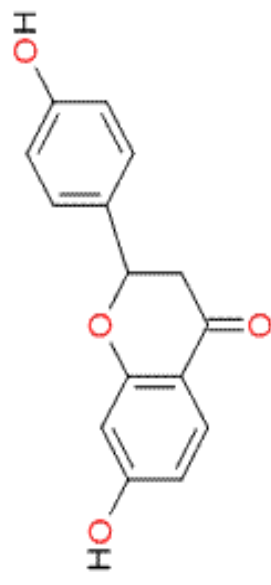


圖 4-25 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 **3** 之紫外光-可見光光譜圖。

Fig. 4-25 UV-visible spectrum for the isolated component **3** from 50% ethanol extract of licorice.



4',7-Dihydroxyflavanone

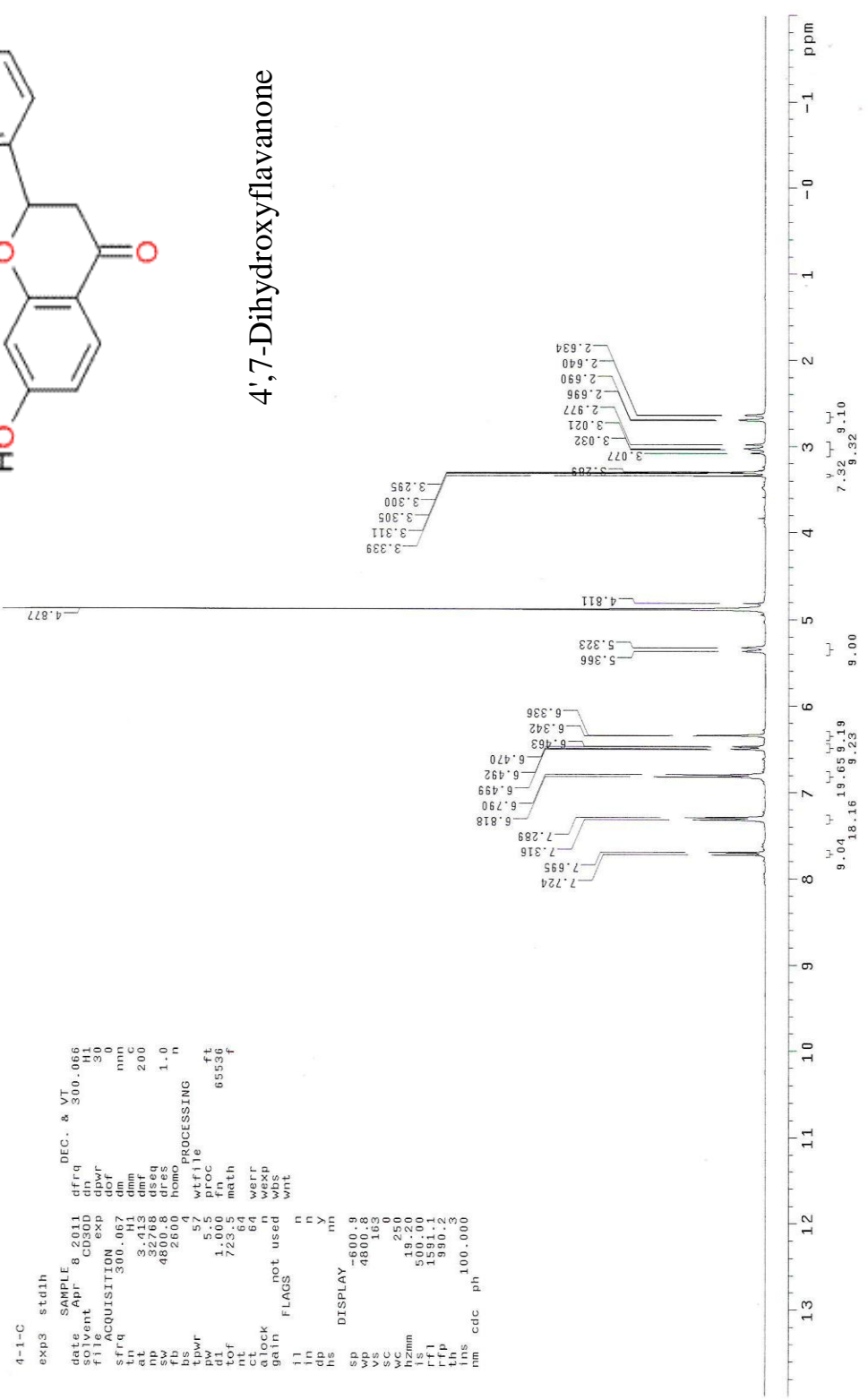


圖 4-26 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 3 之 <sup>1</sup>H-核磁共振光譜圖。

Fig. 4-26 <sup>1</sup>H-NMR spectrum for the isolated component 3 from 50% ethanol extract of Licorice.

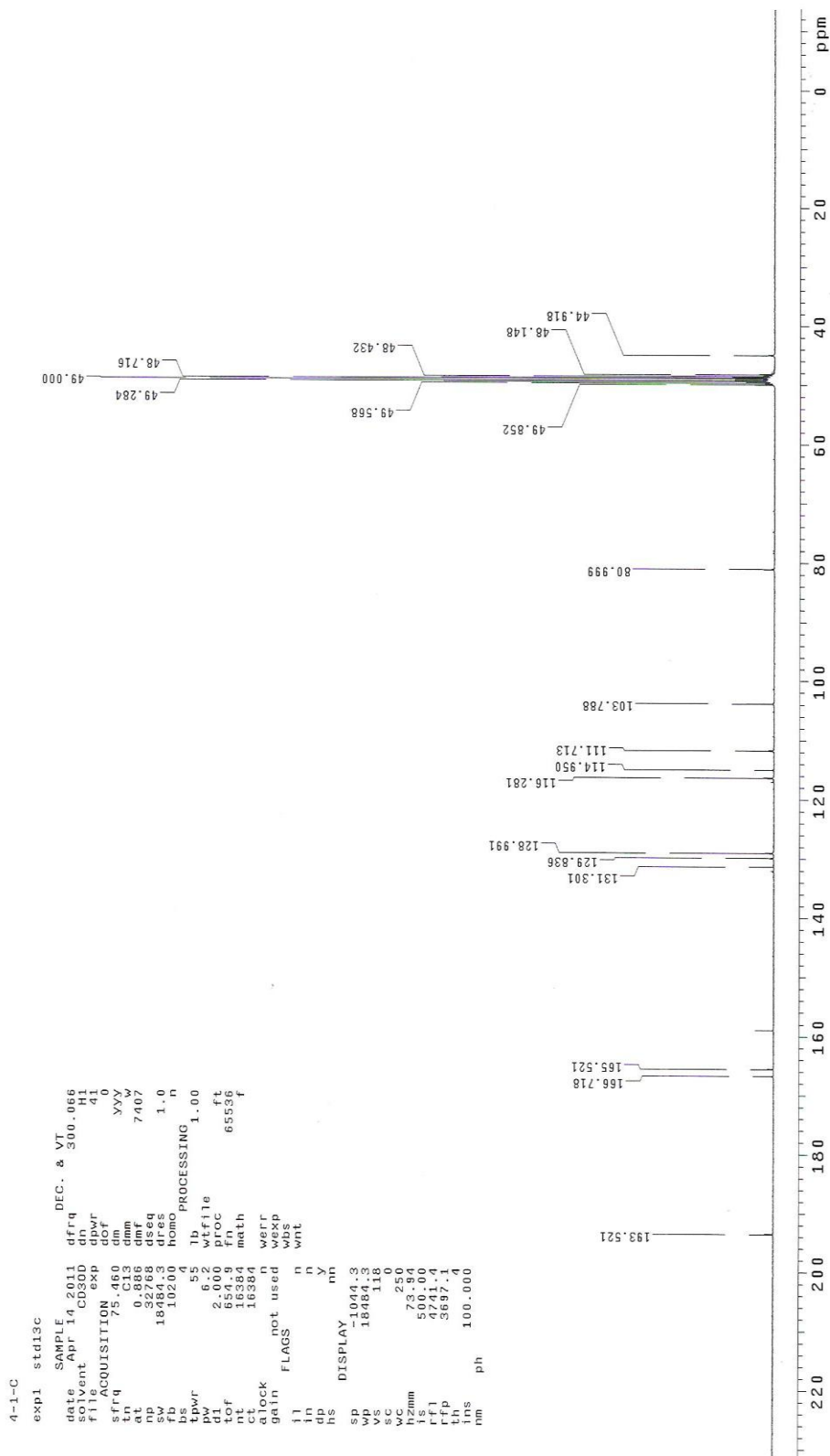


圖 4-27 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 3 之  $^{13}\text{C}$ -核磁共振光譜圖。

Fig. 4-27  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum for the isolated component 3 from 50% ethanol extract of Licorice.

#### (4) 純化物質 4 之結構鑑定

純化物質 4 呈淺黃色粉末，分子式為  $C_{22}H_{22}O_9$ ，由 UV-visible 吸光光譜(圖 4-29)  $\lambda_{max}$  nm 顯示 213、230(sh)、271(sh)、345，推測亦為類黃酮化合物，再由  $^1H$ -NMR(圖 4-30)  $\delta$ 8.23 (1H, s)推測為 isoflavone H-2 的質子波訊， $\delta$ 8.14(1H, d,  $J=8.7$ Hz)、 $\delta$ 7.20(1H, d, d,  $J=2.1, 8.7$ Hz)及  $\delta$ 7.25(1H, d,  $J=2.1$ Hz)為典型 ABX 質子波訊，推測為 A 環上的 H-5、H-6 及 H-8 的質子波訊， $\delta$ 7.48 (2H, d,  $J=8.7$ Hz) 與  $\delta$ 6.98 (2H, d,  $J=8.7$ Hz)為苯環 1, 4 取代 H-2'、H-6'與 H-3'、H-5'的質子波訊， $\delta$ 5.10(1H, d) 為葡萄糖基上 H-1"的質子波訊， $\delta$ 3.82(3H, s)為  $OCH_3$  基團波訊，較高磁場領域上  $\delta$  3.24-3.95(6H, m) 為葡萄糖基上的 6 個質子波訊。

綜合以上光譜解析，並比對文獻(Xiao *et al.*, 2005; Hatano *et al.*, 1998) 推測純化物質 4 的結構為 ononin(圖 4-28)，亦為異黃酮的一種，屬於植物雌激素，可能具有防癌的作用，特別是針對於乳腺癌和前列腺癌(Kennelly *et al.*, 2002)，另外 Yu 等(2005)曾自 *Astragalus mongholicus* 分離純化到純化物質 4，利用對於穀胺酸誘導 PC12 細胞損傷具抑制作用，其  $EC_{50}$  為  $0.047 \mu g/ml$ 。

Formula: C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>O<sub>9</sub>

UVλ<sub>max</sub> (MeOH) nm:213、230(sh)、271(sh)

<sup>1</sup>H-NMR (300MHz, CD<sub>3</sub>OD):

8.23(1H, s, H-2)

8.14(1H, d, J=8.7Hz, H-5)

7.48(2H, d, J=8.7Hz, H-2',6')

7.25(1H, d, J=2.1Hz, H-8)

7.20(1H, d, d, J=2.1, 8.7Hz, H-6)

6.98(2H, d, J=8.7Hz, H-3'-5')

5.10(1H, d, J=7.5Hz, H-1'')

3.82(3H, s, OCH<sub>3</sub>)

3.24-3.95(6H, m, glu-6H)

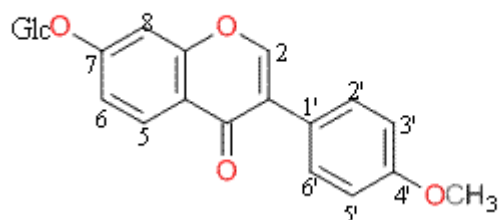


圖 4-28 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 **4** 之結構。

Fig. 4-28 The structure of isolated component **4** from 50% ethanol extract of licorice.

WAVELENGTH SCAN/1

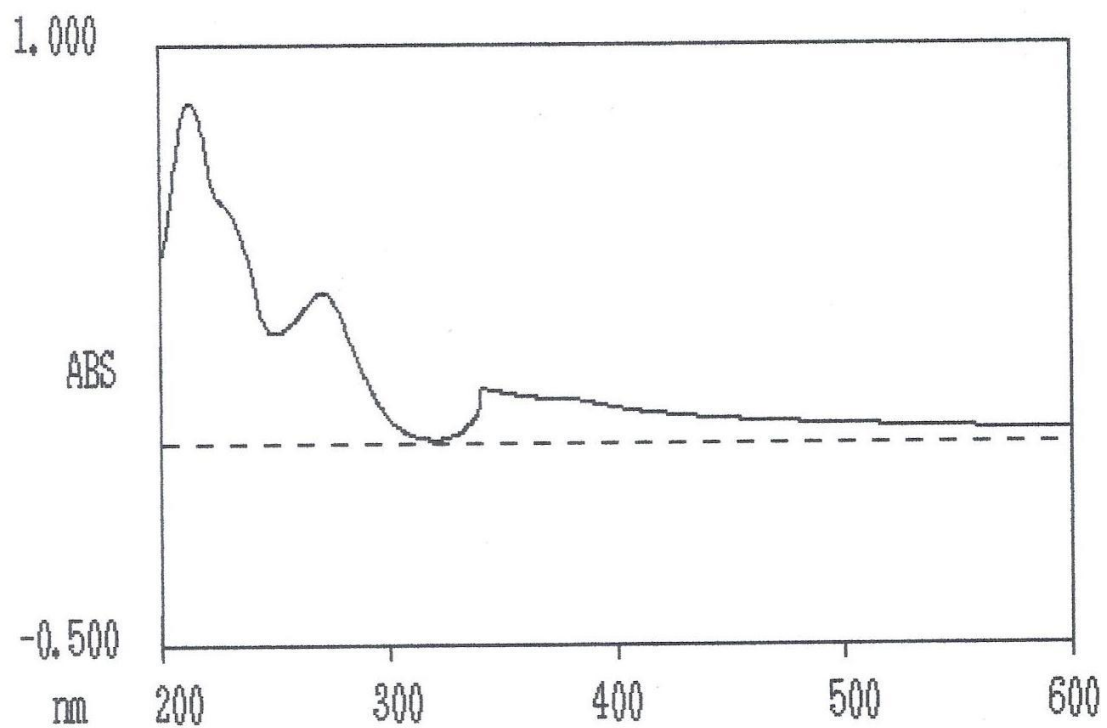


圖 4-29 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 **4** 之紫外光-可見光光譜圖。

Fig. 4-29 UV-visible spectrum for the isolated component **4** from 50% ethanol extract of licorice.

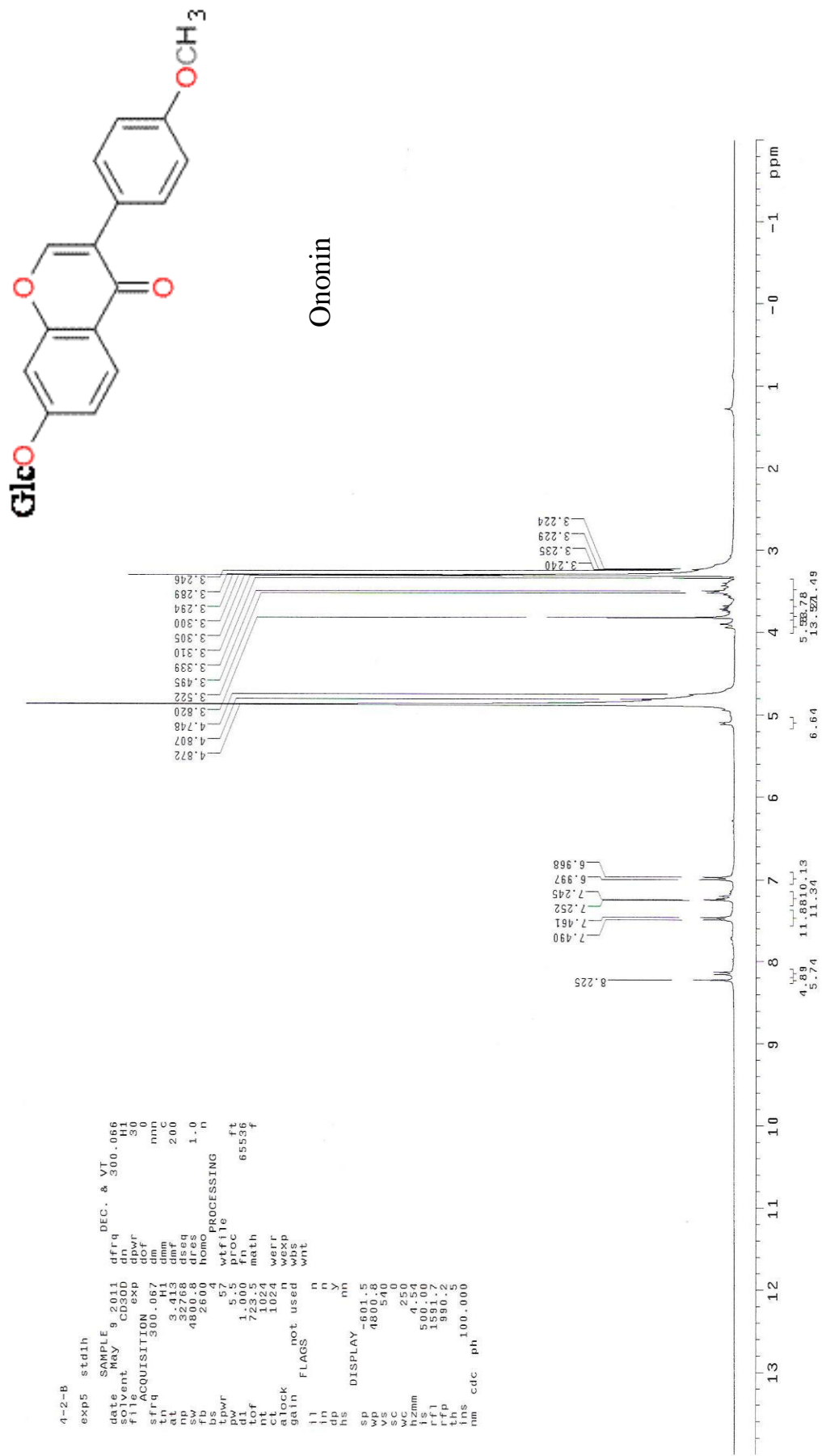


圖 4-30 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 4 之 <sup>1</sup>H-核磁共振光譜圖。

Fig. 4-30 <sup>1</sup>H-NMR spectrum for the isolated component 4 from 50% ethanol extract of licorice.

#### (5) 純化物質 5 之結構鑑定

純化物質 5 呈褐色粉末，分子式為  $C_{16}H_{12}O_4$ ，由 UV-visible 吸光光譜 (圖 4-32)  $\lambda_{max}$  nm 顯示 263、355 推測亦為類黃酮 A 環與 B 環的特徵吸收， $^1H$ -NMR 光譜上(圖 4-33)顯示  $\delta$  8.15 (1H, s) 為 isoflavone H-2 之質子波訊， $\delta$  8.05 (1H, d,  $J=8.7$ Hz)、 $\delta$  6.95 (1H, d, d,  $J=2.1$ 、8.7Hz) 及  $\delta$  6.85 (1H, d,  $J=2.1$ Hz) 為 1, 3, 4 取代 A 環上 H-5、H-6 及 H-8 ABX 型互為耦合的質子波訊， $\delta$  7.47 (2H, d,  $J=8.7$ Hz) 與  $\delta$  6.89 (2H, d,  $J=8.7$ Hz) 為 B 環上 H-2' 與 H-6'、H-3'、H-5' 之質子波訊，較高磁場領域上  $\delta$  3.82 (3H, s) 為  $-OCH_3$  之甲基質子波訊，與純化物質 4 之光譜比較質子波訊大同小異，僅差一個葡萄糖基的質子波訊，推測其為純化物質 4 之配質 (aglycone)。

綜合以上光譜解析，並與文獻作比對 (Hatano *et al.*, 1998) 推測 5 的結構為 7-hydroxy-4'-methoxy-isoflavone (圖 4-31)，亦即芒柄花素 formononetin，其同樣為植物雌激素的一種，可能具有防癌的作用，特別是針對乳腺癌和前列腺癌 (Kennelly *et al.*, 2002)，另外 Yu 等 (2005) 曾自 *Astragalus mongholicus* 分離純化到純化物質 5，利用對於穀胺酸誘導 PC12 細胞損傷具抑制作用，其  $EC_{50}$  為  $0.027 \mu g/ml$ 。



Formula: C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>

UVλ<sub>max</sub> (MeOH) nm:207、232(sh)、248(sh)、263(sh)、355(sh)

<sup>1</sup>H-NMR(300MHz, CD<sub>3</sub>OD):

8.15(1H, s, H-2)

8.05(1H, d, J=8.7Hz, H-5)

7.47(2H, d, J=8.7Hz, H-2',6')

6.98(2H, d, J=8.7Hz, H-3',5')

6.95(1H, J=2.1, 8.7Hz, H-6)

6.85(1H, d, J=2.1Hz, H-8)

3.82(3-H, s, OCH<sub>3</sub>)

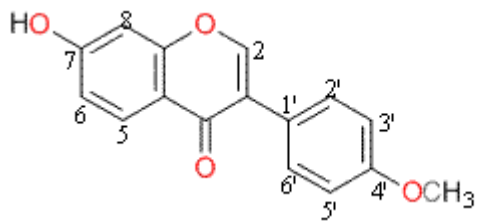


圖 4-31 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 **5** 之結構。

Fig. 4-31 The structure of isolated component **5** from 50% ethanol extract of licorice.

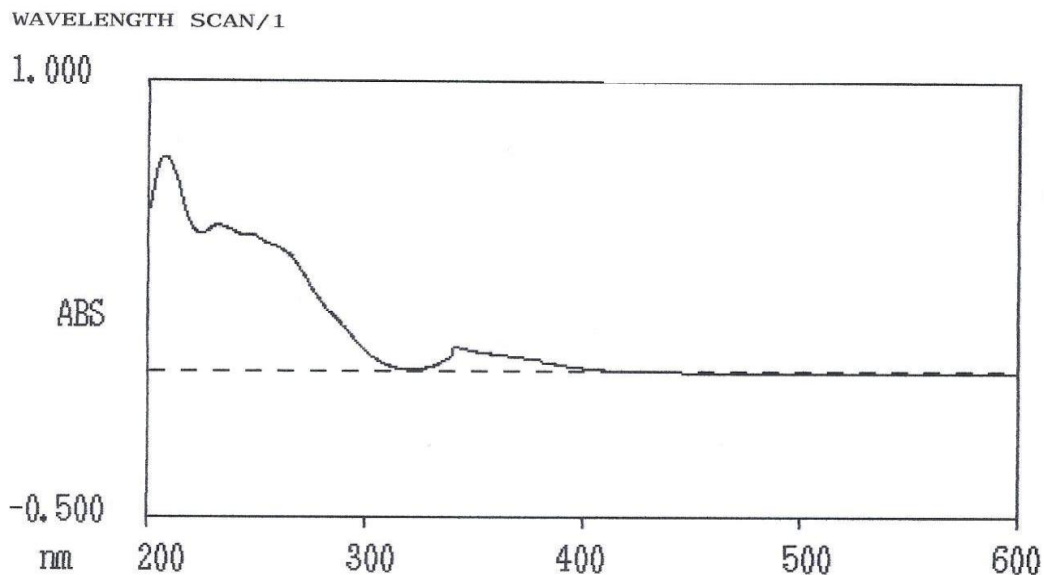


圖 4-32 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 **5** 之紫外光-可見光光譜圖。

Fig. 4-32 UV-visible spectrum for the isolated component **5** from 50% ethanol extract of licorice.

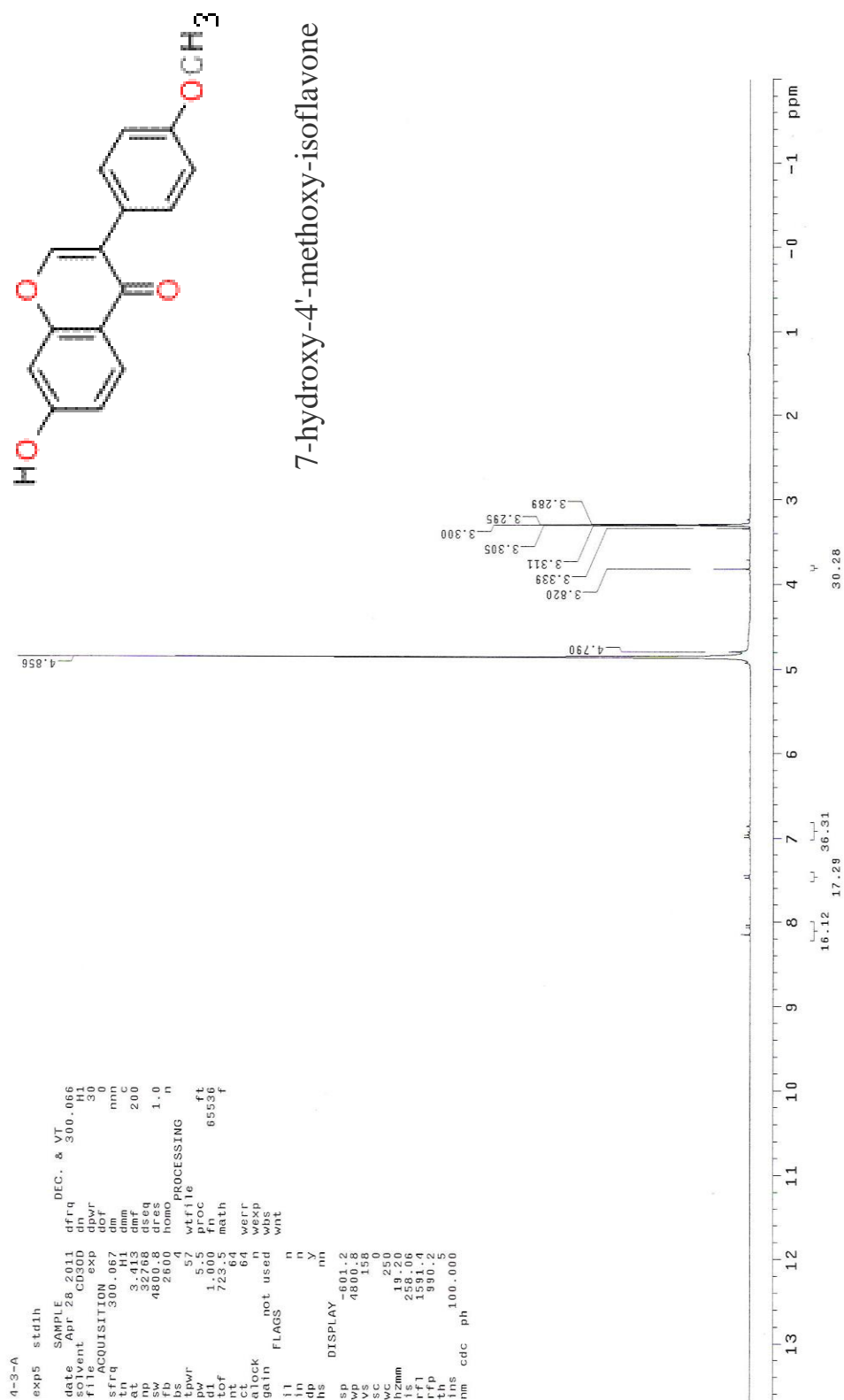


圖 4-33 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質 5 之  $^1\text{H}$ -核磁共振光譜圖。

Fig. 4-33  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum for the isolated component 5 from 50% ethanol extract of Licorice.

在甘草中，甜味成分甘草酸及其衍生物是最常被提到具生物活性的系列物質，但在本實驗研究篩選醣解酵素抑制作用的區分當中，並未分離到甘草酸及其衍生物，推測甘草酸及其衍生物並未存在具有醣解酵素抑制活性的區分當中，相對地甘草中的類黃酮在抑制醣解酵素或調節血糖作用上可能扮演著重要的角色。

### 4.3 純化物質之醱解酵素抑制活性

自甘草 50% 乙醇萃取物分離純化的五個純化物質中，其中以 4-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-2',4'-dihydroxy-chalcone (2)、4',7-dihydroxyflavanone (3)、7-hydroxy-4'-methoxy-isoflavone (5) 等三個物質的含量較多(表 4-5)，將篩選進行後續細胞實驗，同樣以醱解酵素抑制活性作為篩選平台，所得結果如圖 4-34 所示，結果顯示純化物質 4-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-2',4'-dihydroxy-chalcone (2) 對  $\alpha$ -amylase 及  $\alpha$ -glucosidase 的抑制率皆為三種物質中最佳的。

表 4-5 利用 HPLC 定量純化物質 IV-1、IV-5 所得純化物質含量及產率

Table 4-5 The contents and yields of isolated component from 50% ethanol extract of licorice by HPLC analyses

Component	Formula	Content (mg)	Yield (mg/g extract)
4'-Hydroxy-flavanone-7-O-glucoside	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	3.45	0.03
4-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-2',4'-dihydroxy-chalcone	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	80.34	0.8
4',7-Dihydroxyflavanone	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	218.21	2.18
Ononin	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	4.68	0.05
7-Hydroxy-4'-methoxy-isoflavone	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	31.82	0.32

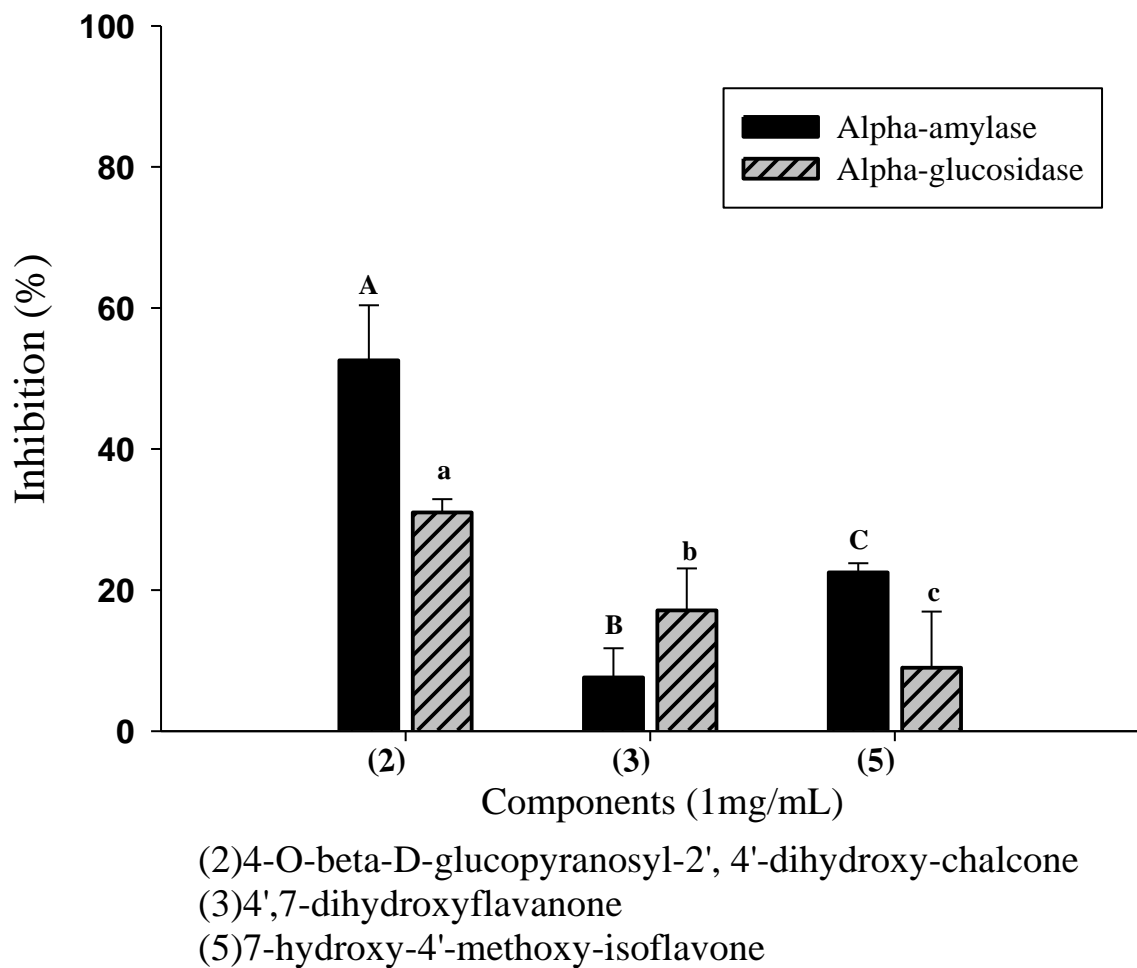


圖 4-34 甘草 50% 乙醇萃取物純化物質對  $\alpha$ -amylase 及  $\alpha$ -glucosidase 之抑制活性百分率。

Fig. 4-34  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of the isolated components from 50% ethanol extract of licorice. Bars represent mean $\pm$ SD,  $n=3$ . Means with different letters are significant different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

## 4.4 甘草 50%乙醇萃取物及純化物質對小鼠肝臟 FL83B 細胞之血糖調節作用

### 4.4.1 甘草 50%乙醇萃取物及純化物質對 FL83B 細胞之毒性

為了解甘草 50%乙醇萃取物及純化物質 4-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-2',4'-dihydroxy-chalcone 是否對細胞會造成毒殺作用，FL83B 細胞中添加不同濃度之甘草 50%乙醇萃取物，分別為 50、100、200、400、800、1600 及 3200 ppm，作用 24 小時後，以 XTT 進行分析。由圖 4-35 結果得知，甘草 50%乙醇萃取物添加量在 400 ppm 時雖無顯著的毒殺作用，但細胞存活率有逐漸下降趨勢，直到添加量為 3200 ppm 時就有顯著的毒殺作用，所以將甘草 50%乙醇萃取物設定 200 ppm 為其最高添加量。純化物質 4-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-2',4'-dihydroxy-chalcone 的安全添加量範圍亦隨之設為 200 ppm 以下，故選擇 50、100 及 200 ppm 進行 XTT 細胞毒性測試，由圖 4-35、4-36 結果顯示，確定甘草 50%乙醇萃取物及純化物質 4-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-2',4'-dihydroxy-chalcone 在這些設定濃度下，對細胞均未產生毒性，並以 50、100 及 200 ppm 探討甘草 50%乙醇萃取物及純化物質 4-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-2',4'-dihydroxy-chalcone 是否具有調節血糖功效，並分析比較三種不同濃度其調節血糖的程度。

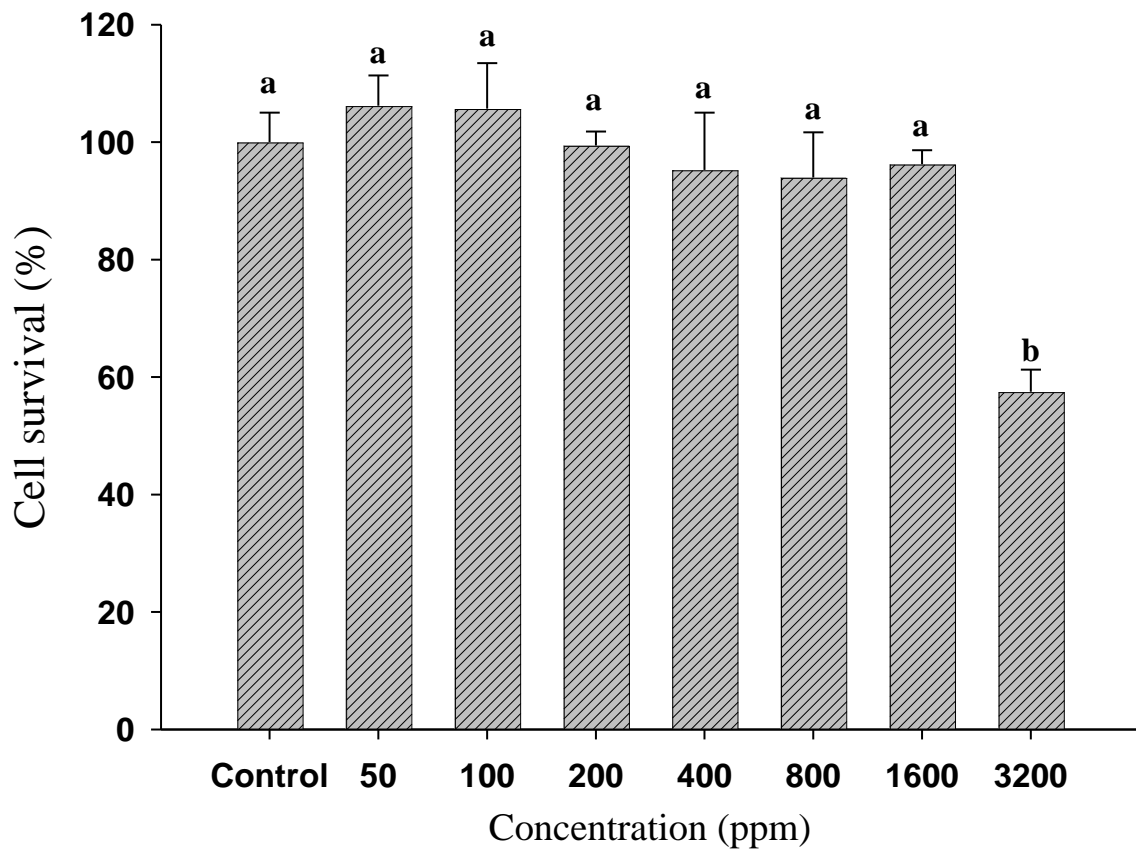


圖 4-35 不同濃度甘草 50% 乙醇萃取物對 FL83B 細胞存活率之影響。

Fig. 4-35 Effect of 50% ethanol licorice extract on cell viability at different concentration on the FL83B cells. Bars represent mean $\pm$ SD,  $n=3$ . Means with different letters are significant different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

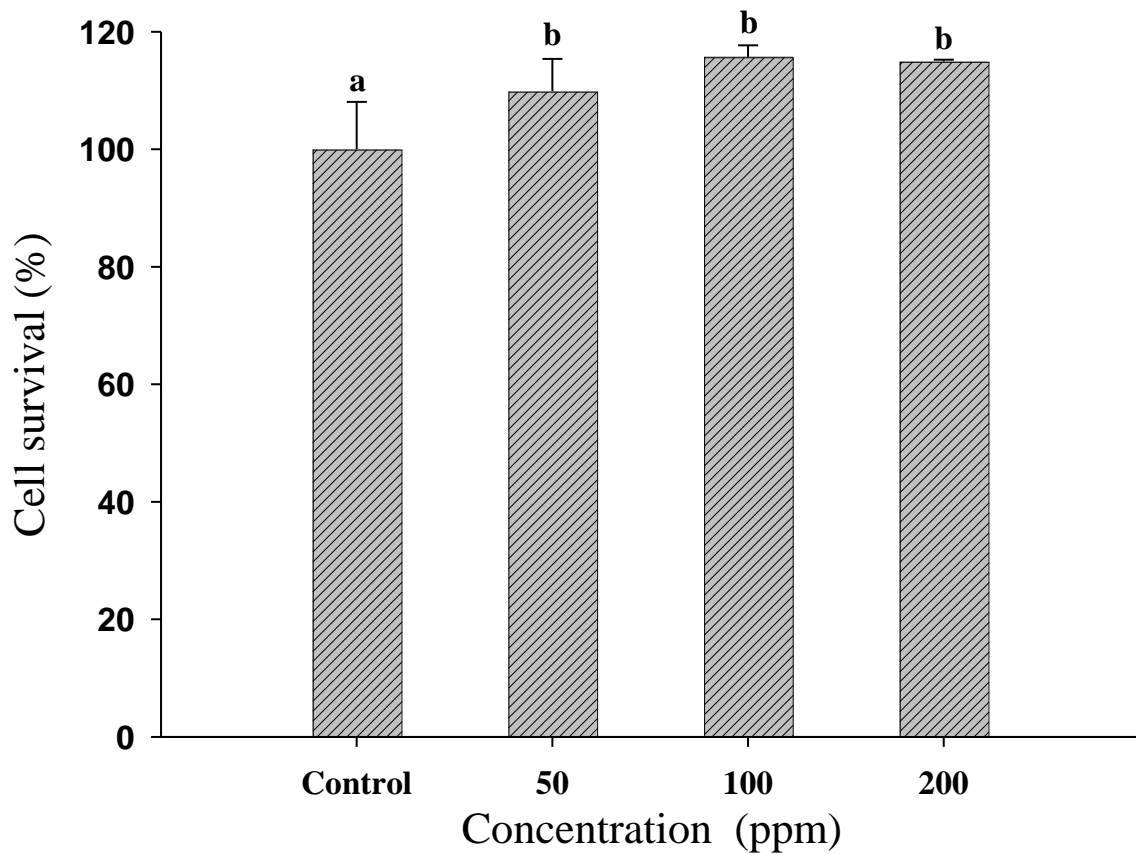


圖 4-36 不同濃度 4-O-β-D-glucopyranosyl-2',4'-dihydroxy-chalcone 對 FL83B 細胞存活率之影響。

Fig. 4-36 Effect of 4-O-β-D-glucopyranosyl-2',4'-dihydroxy-chalcone on cell viability at different concentration on the FL83B cells. Bars represent mean±SD,  $n=3$ . Means with different letters are significant different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.



#### 4.4.2 甘草 50%乙醇萃取物及純化物質對 FL83B 細胞葡萄糖擬似物 2-NBDG 攝入百分率之影響

##### (1) 甘草 50%乙醇萃取物對正常 FL83B 細胞 2-NBDG 攝入量之影響

本實驗將 FL83B 細胞添加 50、100 及 200 ppm 之不同濃度萃取物處理，探討對正常 FL83B 細胞之 2-NBDG 攝入量之影響。結果如圖 4-37 所示，非阻抗模式中，經胰島素(5 $\mu$ g/mL)處理之 FL83B 細胞其葡萄糖攝入百分比較正常組增為 1.43 倍，而添加 50、100 及 200 ppm 甘草萃取物組其葡萄糖帶入量後兩者均顯著高於控制組，50 ppm 增為 1.1 倍、100 ppm 增為 2.4 倍及 200 ppm 增為 2.6 倍。而同時添加胰島素與萃取物共同處理，各組攝入量亦有上升趨勢，在 50 ppm 時增為控制組的 1.77 倍，100 ppm 為 2.75 倍及 200 ppm 為 3.25 倍，其中添加 200 ppm 時與胰島素組相較達顯著差異 ( $p < 0.05$ )。表示添加甘草 50%乙醇萃取物對正常 FL83B 細胞有助於 2-NBDG 攝入。因此，進一步探討萃取物是否可提升胰島素阻抗性 FL83B 細胞對 2-NBDG 的攝入。

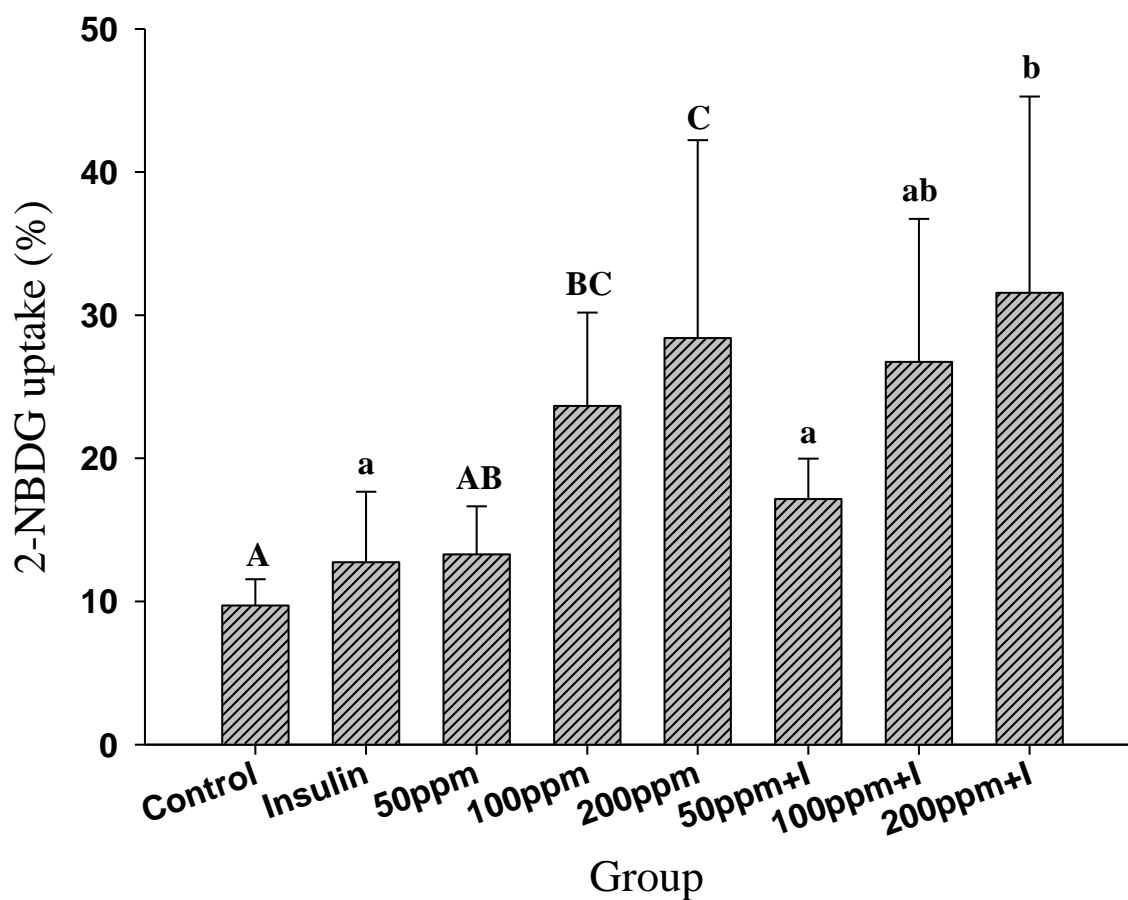


圖 4-37 甘草 50% 乙醇萃取物對於 FL83B 細胞 2-NBDG 攝入百分率之影響。

Fig. 4-37 Effects of 50% ethanol extract of licorice on 2-NBDG uptake in FL83B cells. Bars represent mean±SD,  $n=3$ . Means with different letters are significant different ( $p<0.05$ ) between the control group and the insulin group by Duncan's multiple range test.

(2) 甘草 50% 乙醇萃取物對胰島素抗性 FL83B 細胞 2-NBDG 攝入百分率之影響

添加不同濃度甘草 50% 乙醇萃取物於高糖誘導胰島素抗性之 FL83B 細胞，探討經不同處理下其 2-NBDG 攝入百分率之影響。結果如圖 4-38 所示，與控制組相比，可發現添加胰島素組與甘草萃取物組增加 2-NBDG 攝入，分別增加 1.04 倍及 1.38、1.58、2.58 倍(50、100、200 ppm)，控制組(添加 60mM glucose)則降低約正常細胞攝入量 0.95 倍；而與胰島素組(7 mM glucose)相比較，得知控制組顯著降低其攝入量成為 0.83 倍，甘草萃取物與胰島素共同處理組則隨著添加濃度上升增為控制組的 1.59 倍、1.99 倍及 3.06 倍(50、100 及 200 ppm)。

由以上結果得知，添加甘草 50% 乙醇萃取物對正常及胰島素抗性之 FL83B 細胞皆有助於 2-NBDG 之攝入，對於胰島素抗性細胞亦有增加攝入 2-NBDG 效果，且可發現甘草萃取物與胰島素共同作用下，具加成效果，使攝入量提高。

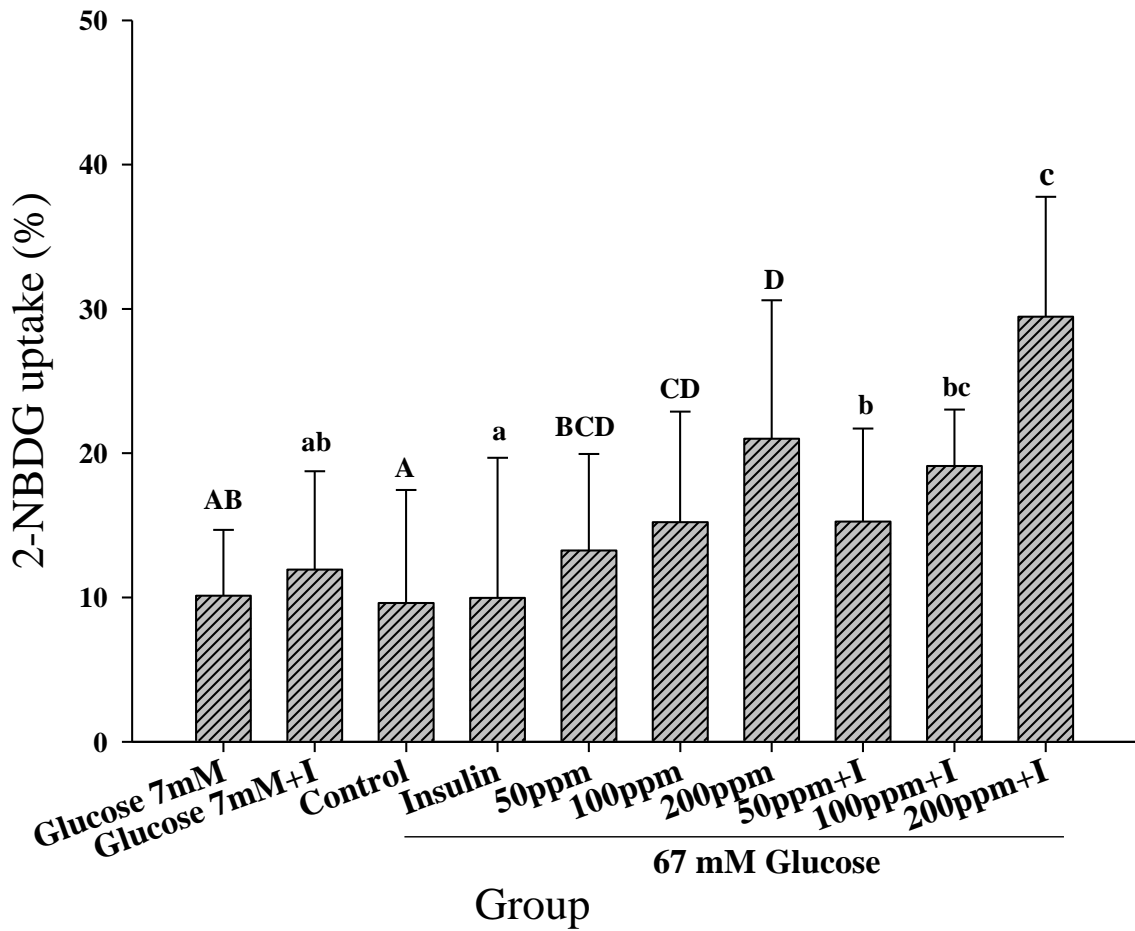


圖 4-38 甘草 50% 萃取物對於胰島素阻抗性 FL83B 細胞 2-NBDG 攝入百分率之影響。

Fig. 4-38 Effects of 50% ethanol extract of licorice on 2-NBDG uptake in insulin resistant FL83B cells. Bars represent mean±SD,  $n=3$ . Means with different letters are significant different ( $p<0.05$ ) between the control group and the insulin group by Duncan's multiple range test.

(3) 純化物質 4-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-2',4'-dihydroxy-chalcone 對 FL83B 細胞 2-NBDG 攝入百分率之影響

為進一步證實甘草 50% 乙醇萃取物中分離出的純化物質 4-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-2',4'-dihydroxy-chalcone 是否對降血糖有一定的影響，於 FL83B 細胞添加 50、100 及 200 ppm 之不同濃度來處理，探討對正常 FL83B 細胞之 2-NBDG 攝入百分率之影響。結果如圖 4-39 所示，非阻抗模式中，經胰島素(5 $\mu$ g/mL)處理 FL83B 細胞葡萄糖帶入較正常組增為 1.51 倍，而添加不同濃度(50、100 及 200 ppm)於 200 ppm 時與控制組有顯著差異( $p < 0.05$ )，為控制組的 1.28 倍。而同時添加胰島素與純化物質和控制組比較，加入純化物質後各組亦有上升趨勢，添加於 100 ppm 以上與胰島素組相比較，有顯著帶入。推測此物質在 200 ppm 時有較佳的帶入效果，而在胰島素增敏作用上則是在添加 100 ppm 以及 200 ppm 時效果較好。接續探討純化物對於胰島素阻抗性 FL83B 細胞提升 2-NBDG 攝入量之效應。

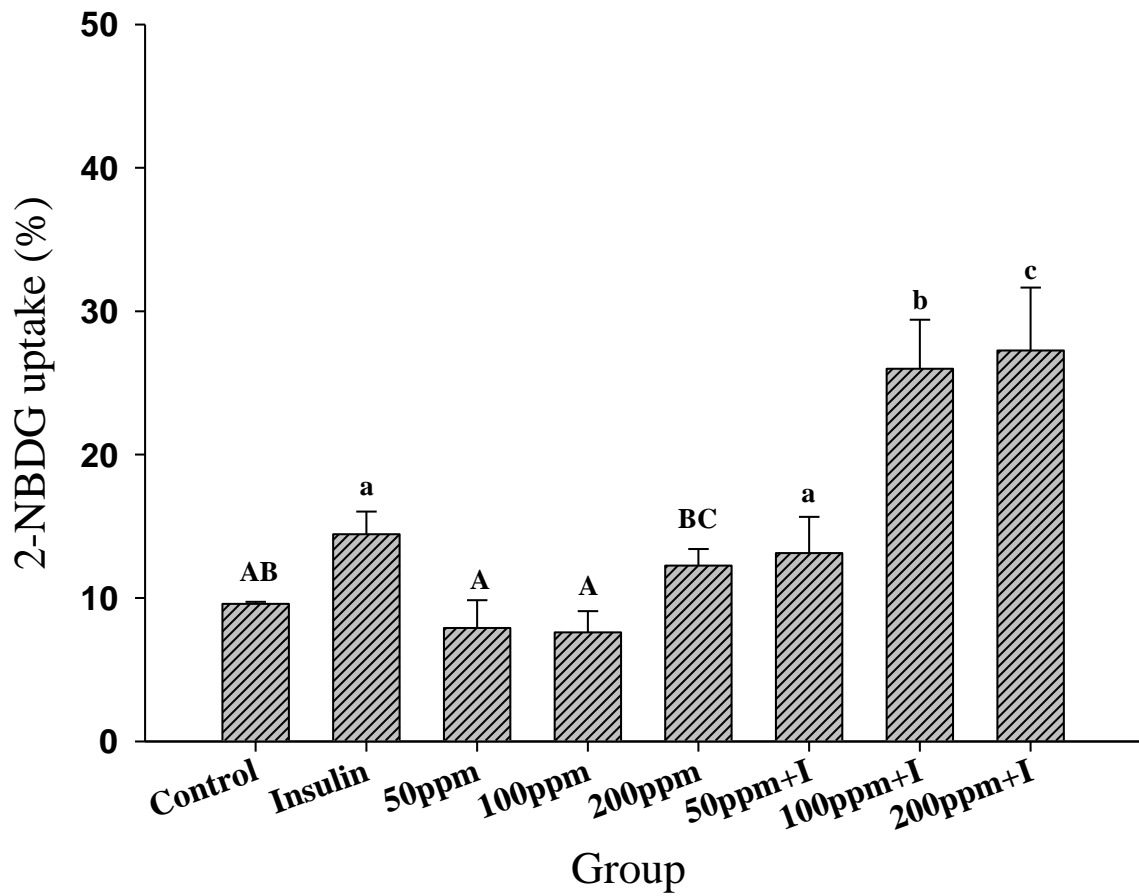


圖 4-39 4-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-2',4'-dihydroxy-chalcone 對 FL83B 細胞

2-NBDG 攝入百分率之影響。

Fig. 4-39 Effects of 4-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-2', 4'-dihydroxy-chalcone on 2-NBDG uptakes in the FL83B cells. Bars represent mean $\pm$ SD, n=3. Means with different letters are significant different (p<0.05) between the control group and the insulin group by Duncan's multiple range test.

(4) 純化物質 4-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-2',4'-dihydroxy-chalcone 對胰島素抵抗性 FL83B 細胞 2-NBDG 攝入量之影響

添加不同濃度純化物質 4-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-2',4'-dihydroxy-chalcone 於抵抗態之 FL83B 細胞探討其 2-NBDG 之攝入。結果如圖 4-40 所示，與控制組相比，可發現添加胰島素組與純化物質組帶入 2-NBDG 分別為 1.91 倍及 1.15、1.89、2.39 倍 (50、100、200 ppm)，控制組(67mM glucose)其攝入量約降為正常細胞(7mM glucose)的 0.79 倍。而共同添加胰島素與純化物質時與控制組相比較，則增加為控制組的 1.69 倍、2.67 倍及 3.02 倍(50、100 及 200 ppm)。

由以上結果得知，添加純化物質處理正常及胰島素抵抗性之 FL83B 細胞皆有助於 2-NBDG 之攝入。純化物質在 100 ppm 以上時於胰島素抵抗性細胞中顯著增長效果，且可發現與胰島素共同作用下，同樣於 100 ppm 以上具顯著加成作用，推估此物質添加量至少要高於 100 ppm 才對於胰島素抵抗性細胞有顯著效果，使 2-NBDG 攝入量提高。

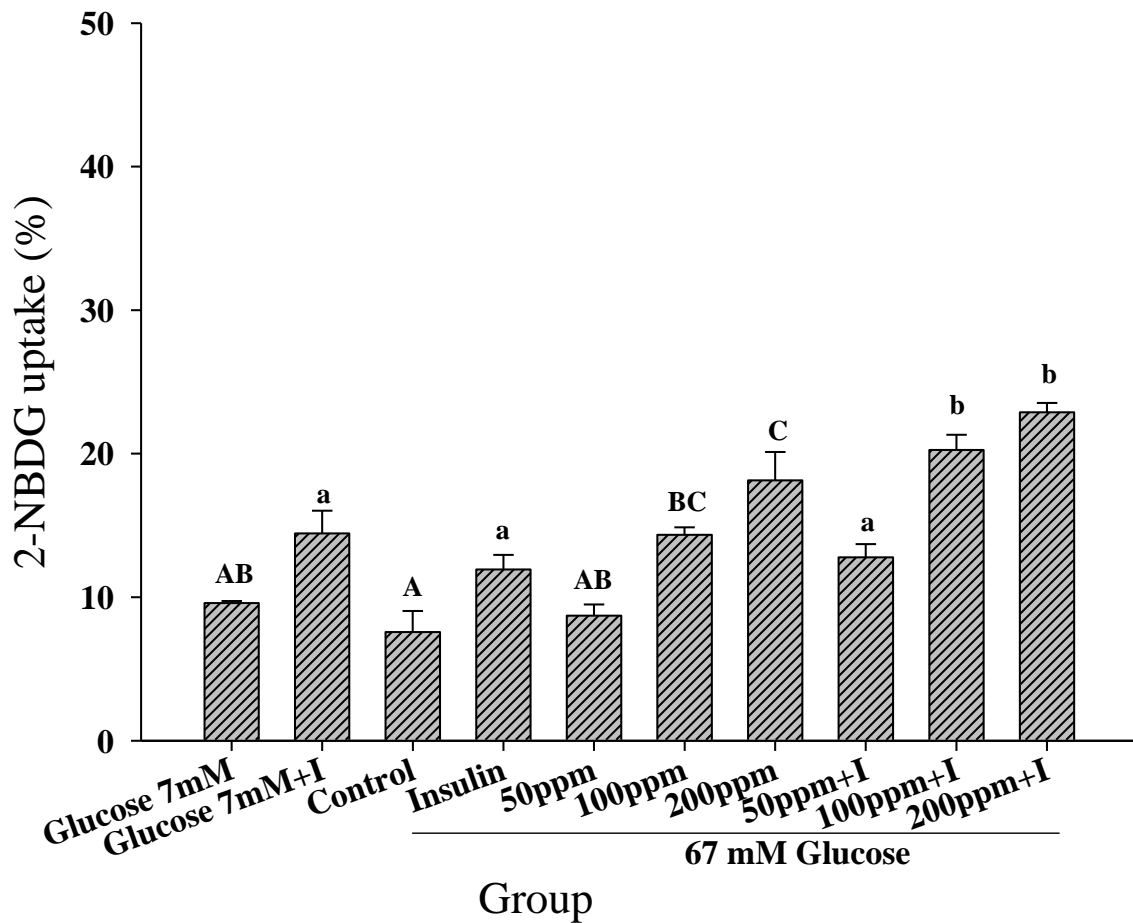


圖 4-40 4-O-β-D-glucopyranosyl-2',4'-dihydroxy-chalcone 對胰島素阻抗性

FL83B 細胞 2-NBDG 攝入百分率之影響。

Fig. 4-40 Effects of 4-O-β-D-glucopyranosyl-2', 4'-dihydroxy-chalcone on 2-NBDG contents in the insulin resistant FL83B cells. Bars represent mean±SD, n=3. Means with different letters are significant different (p<0.05) between the control group and the insulin group by Duncan's multiple range test.



#### 4.4.3 甘草 50%乙醇萃取物及純化物質對 FL83B 細胞肝醣合成量之影響

(1) 添加不同濃度甘草 50%乙醇萃取物對正常 FL83B 細胞其肝醣合成量之影響

肝醣含量可反映肝醣合成與分解雙向路徑的平衡。添加不同濃度甘草 50%乙醇萃取物觀察對 FL83B 細胞肝醣含量之影響，若有提升趨勢，可推測肝醣合成量大於分解量，促使胞外葡萄糖帶入細胞中，以降低外界含糖量。由圖 4-41 正常 FL83B 細胞所示，經胰島素刺激後與控制組相比，其肝醣含量顯著增為 1.26 倍；若添加不同濃度甘草萃取物(50、100 及 200 ppm)與控制組相比，各組皆有增加之趨勢，分別增為 1.27、1.55 及 2.58 倍；而同時添加甘草萃取物(50、100 及 200 ppm)和胰島素處理，其肝醣合成量皆高於單加胰島素處理，分別增加為控制組的 2.43、2.92 及 3.28 倍。

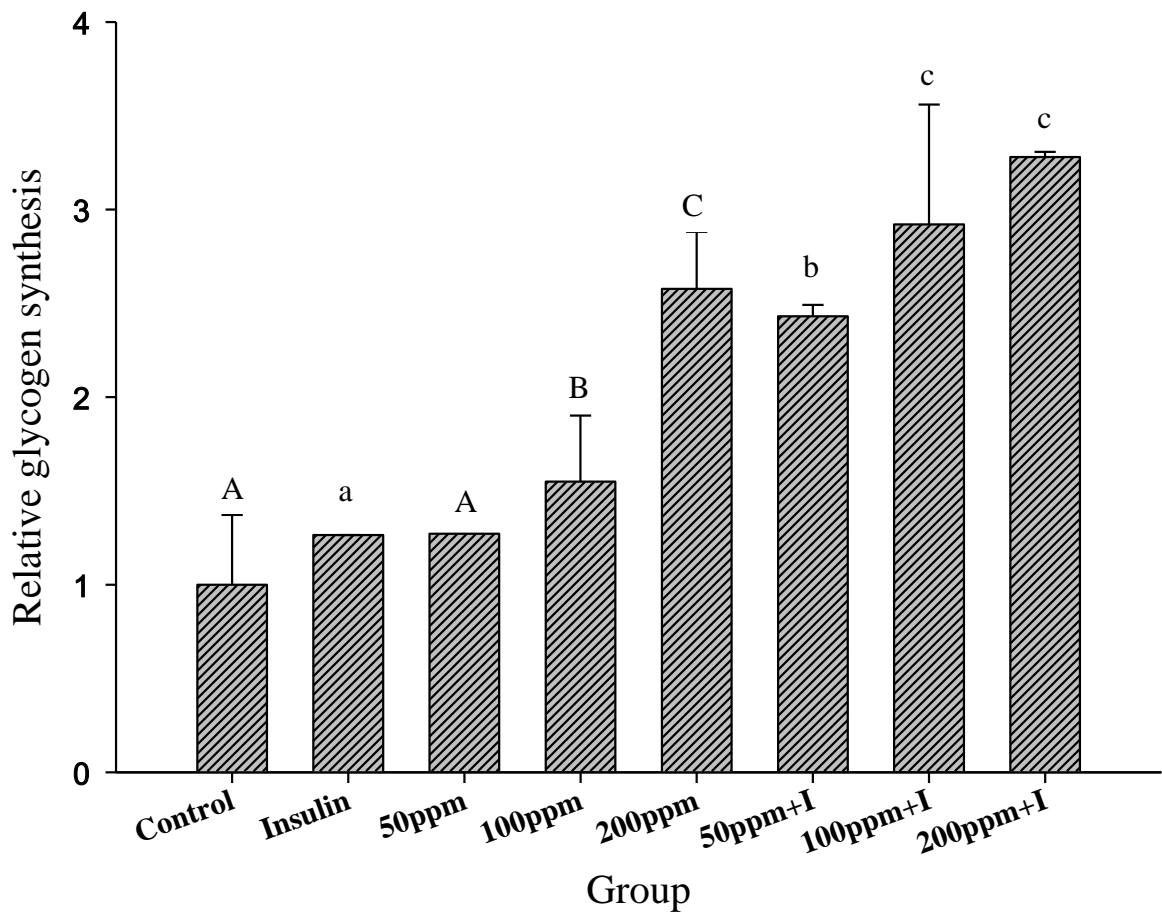


圖 4-41 不同濃度甘草 50% 乙醇萃取物對 FL83B 細胞肝糖合成量之影響。

Fig. 4-41 The effects of 50% ethanol extract of licorice on glycogen contents in FL83B cells. Bars represent mean±SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p<0.05$ ) between the control group and the insulin group by Duncan' s multiple range test.

(2) 添加不同濃度甘草 50% 乙醇萃取物於胰島素抗性 FL83B 細胞其肝醣合成量之影響

利用高糖誘導抗性對於肝醣合成之影響如圖 4-42 所示，發現添加高糖(67 mM Glucose)與正常組(7 mM Glucose)相比顯著降低 0.94 倍，若胰島素抗性細胞添加不同濃度之甘草 50% 乙醇萃取物 (50、100、200 ppm)皆顯著提升肝醣合成量，分別增加為高糖組的 1.47、1.55 及 1.61 倍；與胰島素共同處理下，各濃度(50、100、200 ppm)肝醣合成量則增加為高糖組的 1.54、1.76 及 1.92 倍。由結果可知，甘草 50% 乙醇萃取物對於胰島素抗性細胞有促進肝醣合成量並能與胰島素產生加成作用之能力。

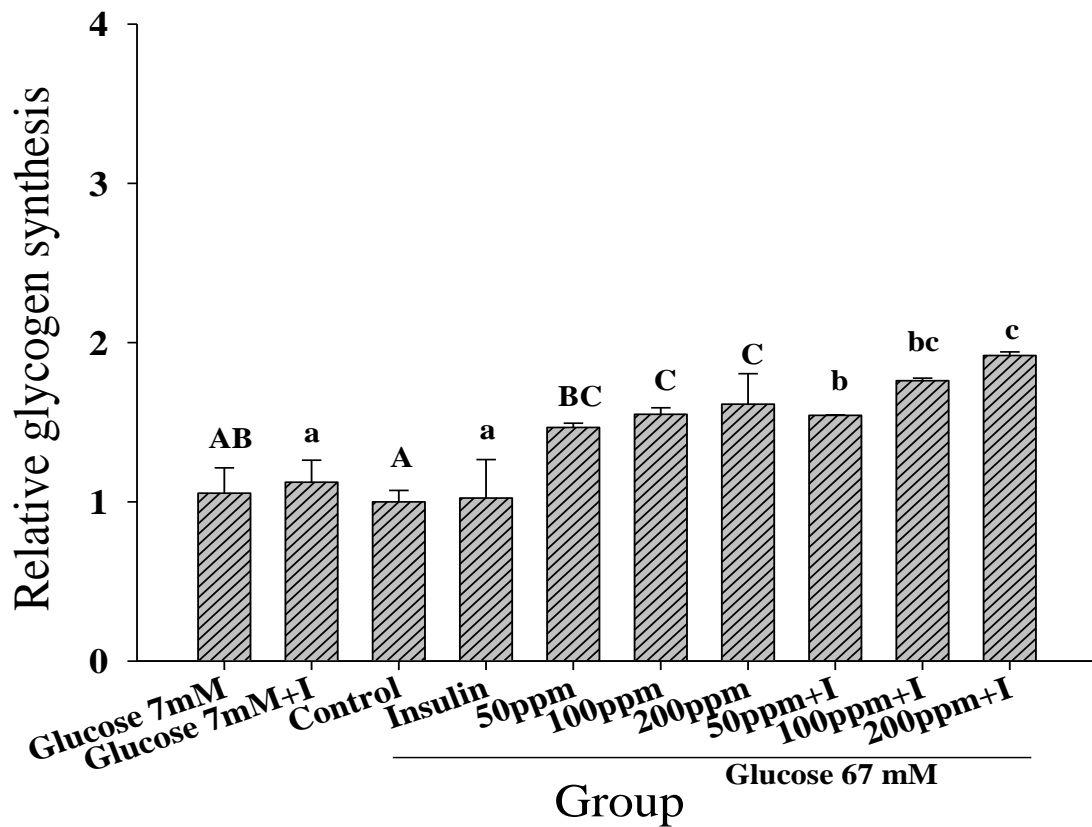


圖 4-42 不同濃度甘草 50% 乙醇萃取物對胰島素抗性 FL83B 細胞肝糖合成量之影響。

Fig. 4-42 The effects of 50% ethanol extract of licorice on glycogen contents in insulin resistant FL83B cells. Bars represent mean±SD, n=3. Means with different letters are significant different (p<0.05) between the control group and the insulin group by Duncan's multiple range test.

(3) 不同濃度純化物質 4-O-β-D-glucopyranosyl-2',4'-dihydroxy-chalcone 對正常 FL83B 細胞肝醣合成量之影響

在正常態 FL83B 細胞加入不同濃度純化物質 4-O-β-D-glucopyranosyl-2',4'-dihydroxy-chalcone 進行肝醣含量分析，其結果如圖 4-43 所示，胰島素組與添加樣品處理之細胞，其肝醣合成量雖無顯著差異，但皆有隨濃度增加而合成量上升的趨勢。而同時與胰島素共同處理下，其肝醣合成量亦隨添加濃度增加而上升，在添加 200 ppm 以上其合成量有顯著提升，與胰島素共同處理有加成效果。

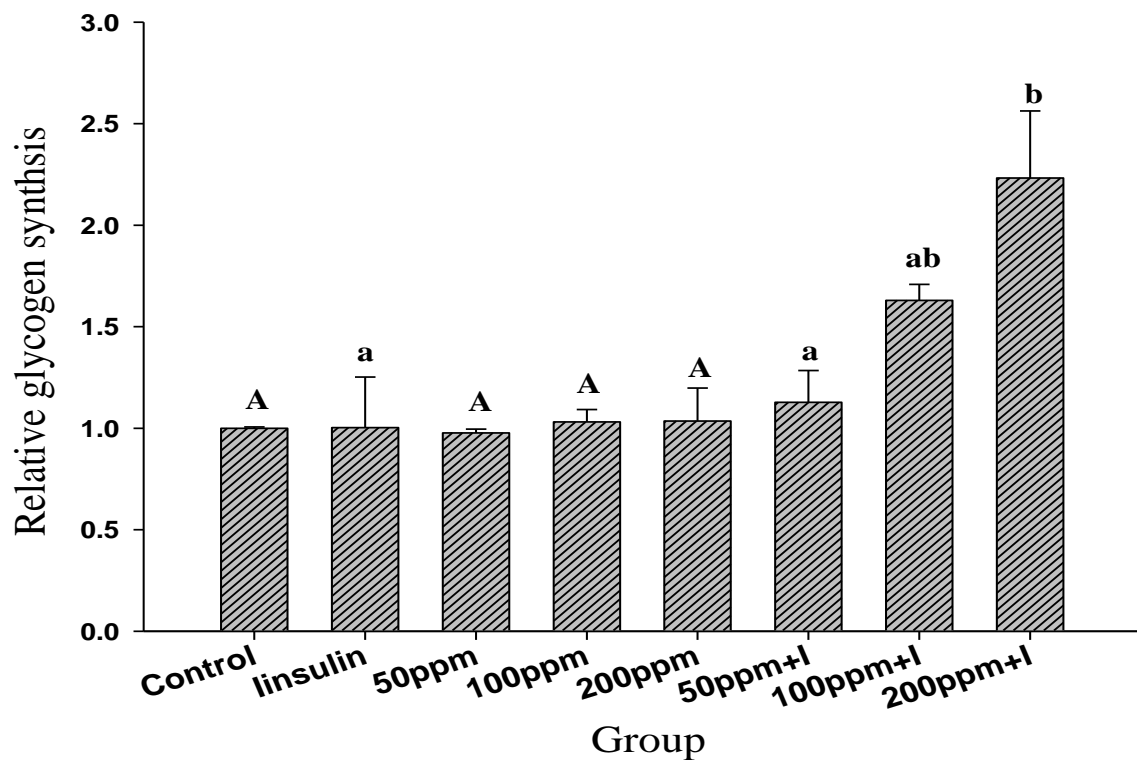


圖 4-43 不同濃度純化物質 4-O-β-D-glucopyranosyl -2',4'-dihydroxy-chalcone 對 FL83B 細胞肝醣合成量之影響。

Fig. 4-43 The effects of isolated component 4-O-β-D-glucopyranosyl-2',4'-dihydroxy-chalcone from 50% ethanol extract of licorice on glycogen contents in FL83B cells . Bars represent mean±SD, n=3. Means with different letters are significant different (p<0.05) between the control group and the insulin group by Duncan's multiple range test.

(4) 不同濃度純化物質 4-O-β-D-glucopyranosyl-2',4'-dihydroxy-chalcone 對胰島素阻抗性 FL83B 細胞肝醣合成量之影響

利用高糖誘導細胞產生阻抗性，再添加純化物質處理後，探討其對於肝醣合成之影響如圖 4-44 所示，發現添加高糖(67 mM Glucose)與正常組(7 mM Glucose)相比顯著降為其 0.97 倍，若胰島素阻抗性細胞添加不同濃度之純化物質 4-O-β-D-glucopyranosyl-2',4'-dihydroxy-chalcone 皆提升肝醣合成量，分別增加為控制組(添加 67 mM Glucose)的 1.08、1.11 及 1.24 倍。與胰島素共同處理下，各濃度肝醣合成量則增為 1.39、1.48 及 1.47 倍。由結果可知，純化物質 4-O-β-D-glucopyranosyl-2',4'-dihydroxy-chalcone 對於胰島素阻抗性細胞有促進肝醣合成量並能與胰島素產生加成作用。

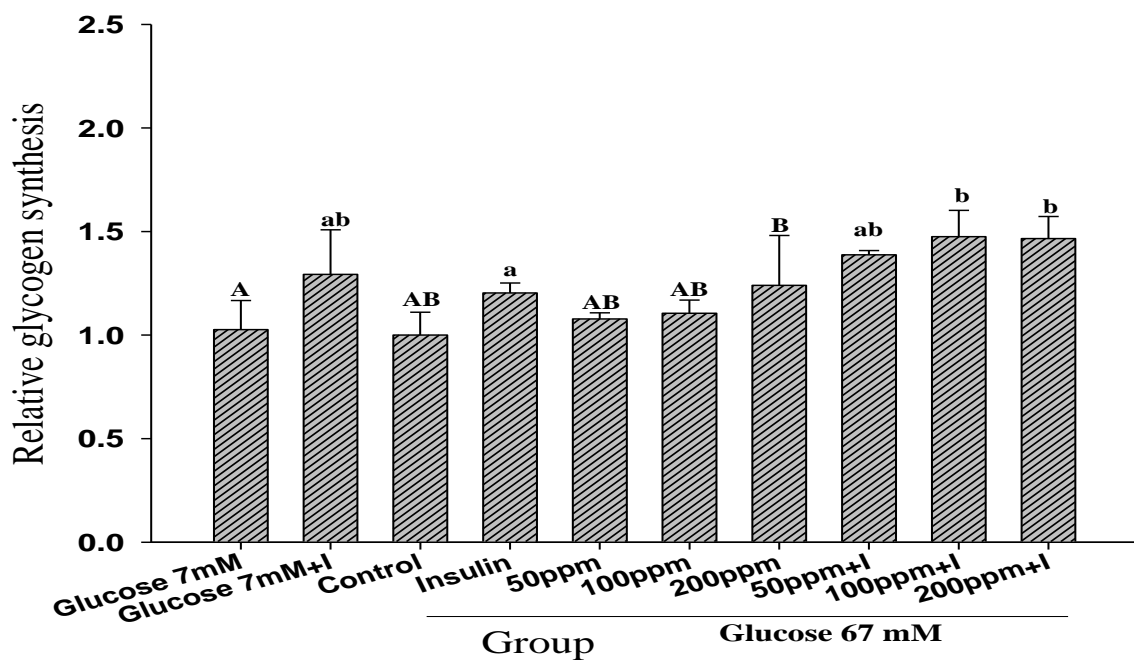


圖 4-44 不同濃度純化物質 4-O-β-D-glucopyranosyl -2',4'-dihydroxy-chalcone 對胰島素阻抗性 FL83B 細胞肝醣合成量之影響。

Fig. 4-44 Effects of isolated component 4-O-β-D-glucopyranosyl-2',4'-dihydroxy-chalcone from 50% ethanol extract of licorice on glycogen contents in insulin resistant FL83B cells . Bars represent mean±SD, n=3. Means with different letters are significant different (p<0.05) between the control group and the insulin group by Duncan's multiple range test.

## 伍、結論

- ◆ 甘草分別以乙醇、50%乙醇及熱水萃取，所得萃取物之萃取率、總酚含量、總類黃酮含量及 DPPH 清除能力均以 50% 乙醇萃取物最高。
- ◆ 對於  $\alpha$ -amylase 及  $\alpha$ -glucosidase 之抑制作用亦以甘草 50% 乙醇萃取物具有較好的抑制率。
- ◆ 甘草 50% 乙醇萃取物利用各種液相層析及光譜分析純化鑑定出 4'-hydroxy-flavanone-7-O-glucoside (1)、4-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-2',4'-dihydroxy-chalcone (2)、4',7-Dihydroxyflavanone (3)、Ononin (4) 及 7-hydroxy-4'-methoxy-isoflavone (5) 等 5 種糖解酵素抑制純化物質，皆屬黃酮類的衍生物，其中以純化物質 2 對兩種糖類酵素的抑制效果最佳。
- ◆ 利用小鼠肝臟 FL83B 細胞進行調節血糖活性測試，在未對 FL83B 細胞產生毒性的濃度下，甘草 50% 乙醇萃取物及純化物質 2 4-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-2',4'-dihydroxy-chalcone 對正常及胰島素抵抗性 FL83B 細胞之葡萄糖擬似物(2-NBDG)帶入量及肝糖合成量均有增加的趨勢，且具劑量效應關係。

## 陸、參考文獻

- 中藥大辭典 江蘇新醫學院編。p567-573 上海科學技術出版社。上海(1986)。
- 丹羽靱負 SOD 與自由基 初版。青春出版社。台北(1995)。
- 王金亮、侯紅霞、許翠梅 甘草用途雖廣有禁忌。中國中醫藥報 第 3212 期。北京(2009)。
- 王玉生 調和眾藥說甘草。中國中醫藥報 第 3446 期。北京(2011)。
- 王煊 糖尿病安全手冊 初版。p47-77 林鬱文化事業有限公司。台北(2001)。
- 包佐義 甘草妙用治皮膚病。中國中醫藥報 第 3221 期。北京(2009)。
- 本田正志 糖尿病診斷療法 初版三刷。信宏出版社。台南(2004)
- 行政院衛生署 [http://www.doh.gov.tw/CHT2006/DM/DM2\\_2.aspx?now\\_fod\\_list\\_no=11962&class\\_no=440&level\\_no=4](http://www.doh.gov.tw/CHT2006/DM/DM2_2.aspx?now_fod_list_no=11962&class_no=440&level_no=4) 公布資料檔案/99 主要死因分析。(2011)。
- 李乾構 藥食同源藥物卷。P83-84 華夏出版社。北京(2007)。
- 李良石 五分鐘降血糖 初版一刷。p136-140。世茂出版社。台北(2008)。
- 李德芳、王振華、羅鋒、鄭秋生 異甘草素的藥理作用研究。華夏海昌論文網 藥學論文。(2010)。
- 杜明 中醫大觀。家庭醫生報 第 17 期。(2002)。
- 吳青蓉 黃金銀耳酸性多醣對 FL83B 小鼠肝臟細胞具胰島素增敏功效。東海大學食品科學研究所 碩士論文。(2011)。
- 肯尼士·庫柏 抗氧化健康計畫。p259 世茂出版社。台北(1997)。
- 林念穎 茜草根正己烷及乙酸乙酯萃取物之抗氧化成分。東海大學食品科學研究所 碩士論文。(2009)。
- 胡智柏 口服降血糖製劑與天然調控血糖物質。血糖調節及評估專輯。財團法人食品工業發展研究所。新竹(2002)。
- 高本釗 新編中藥大辭典。p544-550。新文豐出版社。台北(1982)。
- 唐孟成、賈之慎、朱祥瑞、呂順霖 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。(1996)



- 張欽宏 烘焙酵素的應用。血糖調節及評估專輯。財團法人食品工業發展研究所。新竹(2002)。
- 黃順爵、吳金濱、廖容君 天然化合物對 proton pump 活性抑制之研究。中國醫學院雜誌。1:35-40(1992)。
- 菅野光男 苦瓜降低血糖值 初版。林鬱文化事業有限公司。台北(2001)。
- 喬長誠 超級抗氧化劑蝦紅素 初版。元氣齋出版社有限公司。台北(2006)。
- 楊桂生 甘草新用途。中國中醫藥報 第 2913 期。北京(2008)。
- 葉力瑋 蔓荊子抗氧化成分之研究。東海大學食品科學研究所 碩士論文。(2007)。
- 蒲昭和 甘草能解百樣毒。醫藥經濟報。(2007)。
- 蒲昭和 能護肝的單味中藥。中國中醫藥報 第 2913 期。北京(2008)。
- 遠藤 剛、淺田浩二 活性酸素在生物中之生存、消去、作用。食品工業 5 月 30 日 p20-25。(1992)。
- 趙保路 氧自由基和天然抗氧化劑。p121-122 科學出版社。北京(1999)。
- 潘菡君 燃燒系光果甘草精萃類黃酮。食品資訊。p66-68。(2011)。
- 增山吉成 自由基之陰謀 吳氏圖書有限公司。台北(1997)。
- 鄭衛生 眾藥之王話甘草。中國中醫藥報 第 2604 期。北京(2006)。
- 蔡旻都、陳皓君 蔬果中類黃酮之抗氧化作用與生物活性。CHEMISTRY (THE CHINESE CHEM. SOC., TAIPEI) Vol. 64, No.3, pp.353~315。(2006)。
- 鍾玉玲 海巴戟天葉、莖及果實粗萃取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。(2003)。
- 顏巧雯 篩選及研究與 B 型肝炎表面抗原交互作用之蛋白。國立成功大學生物化學研究所 碩士論文。(2003)。
- 藍文孝 甘草甲醇萃取物抑菌性之研究。國立中興大學食品科學研究所 碩士論文。(2000)。
- Abuja, P. M. and Albertini, R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. Clin. Chim. Acta. 306:1-17 (2001).

- Ali, H., Houghton P.J. and Soumyanath, A.  $\alpha$ -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *J Ethnopharmacol* 107: 449–455 (2006).
- Anderson, D. M. and Smith, W. G. The antitussive activity of glycyrrhetic acid and its derivatives. *J Pharm Pharmacol*, 13:396-404 (1961).
- Baek, J. Y., Lee, J. M. and Lee, S. C. Extraction of nutraceutical compounds from licorice roots with subcritical water. *Separation and Purification Technology* 63:661–664 (2008).
- Bando, N., Hayashi, H., Wakamatsu, S., Inakuma, T., Miyoshi, M., Nagao, A., Yamauchi, R. and Terao, J. Participation of singlet oxygen in ultraviolet-a-induced lipid peroxidation in mouse skin and its inhibition by dietary  $\beta$ -carotene: an *ex vivo* study. *Free Radic Biol Med.* 37: 1854-1863(2004).
- Bhandari, M. R., Anurakkun, N. J., Hong G. and Kawabata, J.  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory activities of Nepalese medicinal herb Pakhanbhed (*Bergenia ciliata*, Haw.) *Food Chemistry* 106: 247–252 (2008).
- Branen, A. C. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 52: 59-63(1975).
- Bros, W., Heller, W., Michel, C. and Saran, M. Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* 186: 343-355(1990).
- Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 414:813-820 (2001).
- Cho, H. J., Lim, S. S., Lee, Y.S., Kim, J. S., Lee, C. H., Kwon, D. Y. and Park, J. H. Y. Hexane/ethanol extract of *Glycyrrhiza uralensis* licorice exerts potent anti-inflammatory effects in murine macrophages and in mouse skin. *Food Chemistry* , 121:959–966 (2010).

Duchen, M. R. Role of mitochondria in health and disease. *Diabetes* 53: S96-S102 (2004).

Dyer, D.G. Accumulation of maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *Journal of Clinical Investigation* 91: 2463-2469 (1993).

Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A. and Grodsky, G. M. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: A unifying hypothesis of Type 2 diabetes. *Endocrine Reviews* 23(5): 599–622 (2002).

Finkel, T., and Holbrook, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 408: 239-247 (2000).

Gorkum, R. V. and Bouwman, E. The oxidative drying of alkyd paint catalysed by metal complexes. *Coord. Chem. Rev.* 249: 1709-1728 (2005).

Green, K., Brand, M. D. and Murphy, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes* Vol. 53: S110-118 (2004).

Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. In “Antioxidant in nutrition, health and disease.” p90-100 (1994).

Hamilton, R. J., Kalu, C., Prisk, E., Padleyb, F. B. and Pierce, H. Chemistry of free radicals in lipids. *Food Chemistry*, Vol. 60, No. 2, 193-199 (1997 ).

Hashemi, P., Beyranvand, S., Mansur, R. S. and Ghiasvand, A. R. Development of a simple device for dispersive liquid–liquid microextraction with lighter than water organic solvents: Isolation and enrichment of glycyrrhizic acid from licorice. *Analytica Chimica Acta*, 655 : 60–65 (2009).

Hatano, T., Takagi, M., Ito, H., and Yoshida, T. Acylated flavonoid glycosides and accompanying phenolics from Licorice. *Phytochemistry*, Vol. 47, No. 2, 287-293 (1998).

Hu, K., Yang, Z. H., Pan, S. S., Xu, H. J. and Ren, J. Synthesis and antitumor activity of liquiritigenin thiosemicarbazone derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* 45: 3453e3458 (2010).

IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks of chemicals to humans. Some naturally occurring and synthetic food components, furocoumarins and ultraviolet radiation butylated hydroxyanisole (BHA). International Agency for Research on Cancer, Lyon. 40:123-159 (1986a).

IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some naturally occurring and synthetic food components, furocoumarins and ultraviolet radiation butylated hydroxytoluene (BHT), International Agency for Research on Cancer, Lyon. 40:161-206 (1986b).

Isbrucker, R.A. and Burdock, G.A. Risk and safety assessment on the consumption of Licorice root (*Glycyrrhiza* sp.), its extract and powder as a food ingredient, with emphasis on the pharmacology and toxicology of glycyrrhizin. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 46: 167–192 (2006).

Julkunen-Titto, R. Phenolic constituents in the leaves of Northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics. *J. Agric. Food Chem.* 33: 213-217(1985).

Kang, J. S., Yoon, Y. D., Cho, I. J., Han, M. H., Lee, C. W., Park, S. K. and Kellogg, E. W. III and Fridovich, I. Superoxide, hydrogen peroxide and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *J. Biol. Chem.* 250: 8812-8815(1975).

Kennelly, E. J., Baggett, S., Nuntanakorn, P., Ososki, A. L., Mori, S. A., Duke, J., Coletton, M. and Kronenberg F. Analysis of thirteen populations of black cohosh for formononetin. *Phytomedicine* 9: 461–467 (2002).

Kim, H. M. Glabridin, an isoflavan from licorice root, inhibits inducible nitric-oxide synthase expression and improves survival of mice in experimental model of septic shock. *JPET*, 312:1187–1194 ( 2005).

Lawrence. Microdetermination of glycogen with anthrone reagent. Department of Anatomy, University of Kansas, Received for publication April 21(1961).

Lee, J. Y., Lee, J. H., Park, J. H., Kim, S. Y., Choi, J. Y., Lee, S. H., Kim, Y. S., Kang, S. S., Jang, E. C. and Han, Y. Liquiritigenin, a licorice flavonoid, helps mice resist disseminated candidiasis due to *Candida albicans* by Th1 immune response, whereas liquiritin, its glycoside form, does not. *International Immunopharmacology* 9: 632–638 (2009).

Lin, C. M., Chen, C. T., Lee, H. H. and Lin, J. K. Prevention of cellular ROS damage by isovitexin and related flavonoids. *Planta Med.* 68:365-367 (2002).

Ma, C. J., Li G. S., Zhang, D. L., Liu, K. and Fan, X. One step isolation and purification of liquiritigenin and isoliquiritigenin from *Glycyrrhiza uralensis* Risch. using high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A.* 1078: 188–192 (2005).

McCance, D. *et al.* Maillard reaction products and their relation to complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Clinical Investigators* 91: 2470-2478 (1993).

Méndez, J. D., Xie J. and García-Pérez, E. Urea Inhibits the In vitro Formation of Fluorescent Advanced Glycation End Products. *World Applied Sci. J.* 2: 090-098 (2007).

Milic, B. L., Djilas, S. M. and Canadanovic-Brunet, J. M. Antioxidative activity of phenolic compounds on the metal-ion breakdown of lipid peroxidation system. *Food Chem.* 61: 443-447(1998).

Mukhopadhyay, M. and Panja, P. A novel process for extraction of natural sweetener from licorice (*Glycyrrhiza glabra*) roots. *Separation and Purification Technology* 63:539–545 (2008).

Perkins, E. G. Formation of nonvolatile decomposition products in heated fats and oils. *Food Technol.* 21, 125-134 ( 1967).

Rhabasa-Lhoret, R., and Chiasson, J. L. Alpha-glucosidase inhibitors (3rd ed.). In R. A. Defronzo, E. Ferrannini, H. Keen and P. Zimmet (Eds.). *International textbook of diabetes mellitus* (Vol. 1).UK: John Wiley. (2004).

- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. and Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20: 933-956(1996)
- Rhodes, C. J. Type 2 diabetes-a matter of  $\beta$ -cell life and death? *Science* 307: 380-4 (2005).
- Saltiel, A. R. and Khan, C. R. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806 (2001).
- Scalbert, A. and Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130: 2073-2085 (2000).
- Schildermann, P. A. E. L., Ten Hoor, F. and Kleinjas, J. C. S. Induction of oxidative DNA damage and early lesions in rat gastro-intestinal epithelium in relation to prostaglandin H synthase-mediated metabolism of butylated hydroxyanisole. *Food Chem. Toxic.*, 33: 99-109 (1995).
- Simic, M. G. Mechanisms of inhibition of free-radical processes in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.* 202 377-386 (1988).
- Stumvoll, M., Goldstein, B. J. and Haeften, T. W. V. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 365: 1333-46 (2005).
- Tapieo, H., Tew, K. D., Ba, G. N. and Mathe, G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed. Pharmacother.* 56:200-207 (2002).
- Wang, W., Hu, X., Zhao, Z., Liu, P., Hu, Y., Zhou, J., Zhou, D., Wang, Z., Guo, D. and Guo, H. Antidepressant-like effects of liquiritin and isoliquiritin from *Glycyrrhiza uralensis* in the forced swimming test and tail suspension test in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 32: 1179 – 1184 (2008).
- Wang, Y. C. and Yang, Y. S. Simultaneous quantification of flavonoids and triterpenoids in licorice using HPLC. *Journal of Chromatography B*, 850 :392-399 (2007).

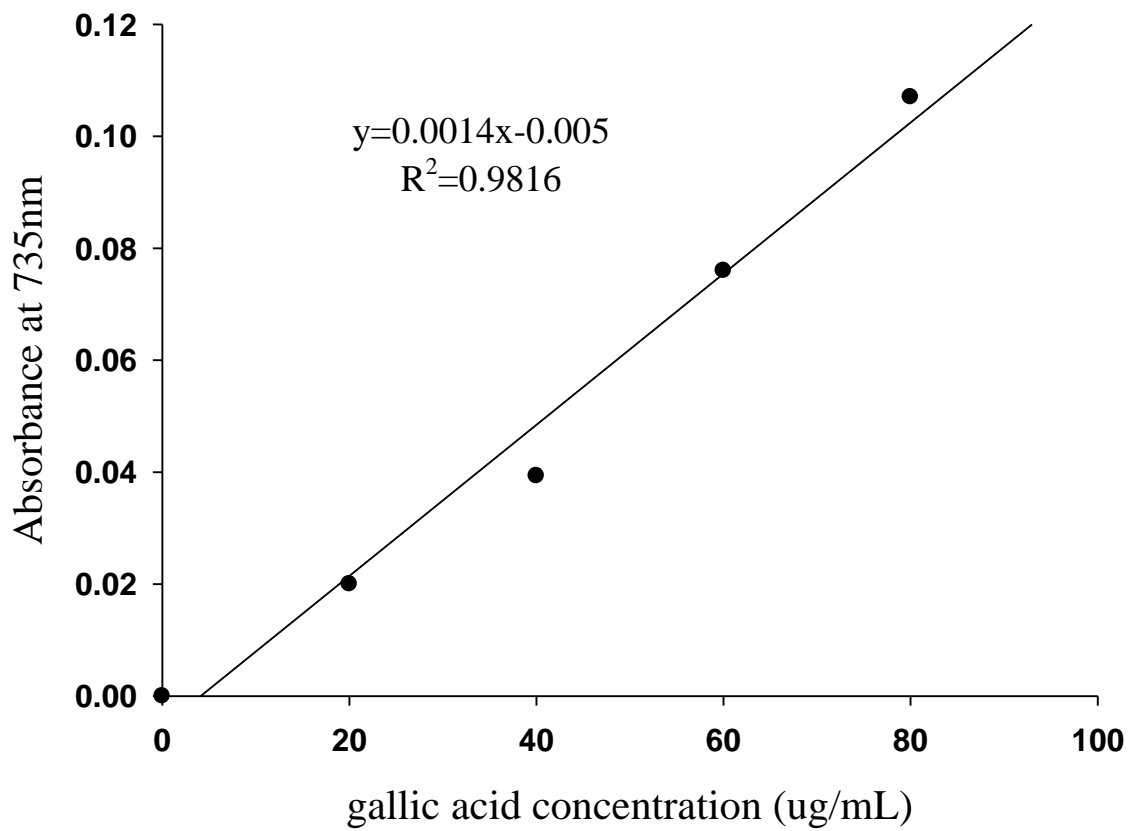
Wolff, S. P. and Dean, R. T. Glucose autoxidation and protein modification: the potential role of "autoxidative glycosylation" in diabetes. *Biochem. J.* 245: 243-50 (1987).

Xiao, H. B., Krucker, M., Putzbach, K. and Albert, K. Capillary liquid chromatography–microcoil <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy and liquid chromatography–ion trap mass spectrometry for on-line structure elucidation of isoflavones in *Radix astragali*. *Journal of Chromatography A*, 1067: 135–143 (2005).

Yu, D., Duan, Y., Bao, Y., Wei, C. and An, L. Isoflavonoids from *Astragalus mongholicus* protect PC12 cells from toxicity induced by L-glutamate. *Journal of Ethnopharmacology* 98: 89–94 (2005).

Zhang, L., Li, J., Hogan, S., Chung, H., Welbaum, G. E. and Zhou, K. Inhibitory effect of raspberries on starch digestive enzyme and their antioxidant properties and phenolic composition. *Food Chemistry*, 119: 592–599 (2010).

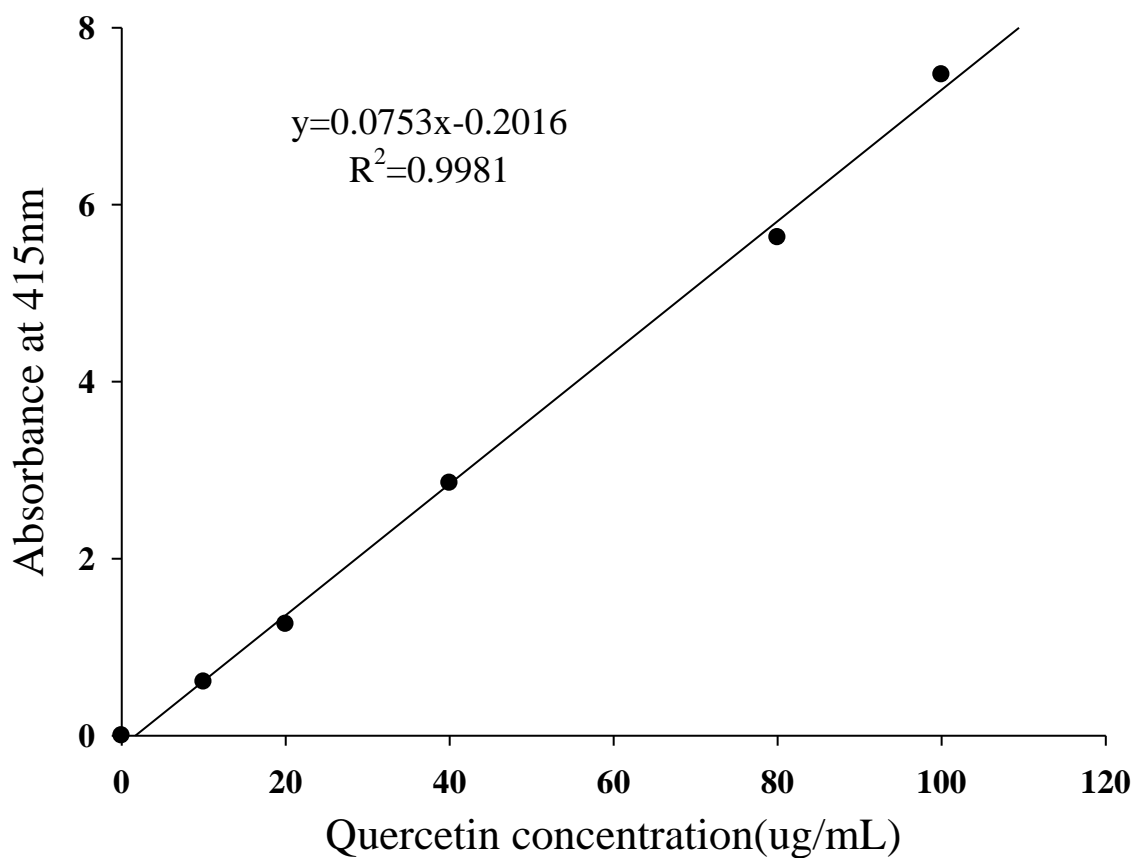
柒、附錄



附錄 7-1 沒食子酸之標準曲線圖。

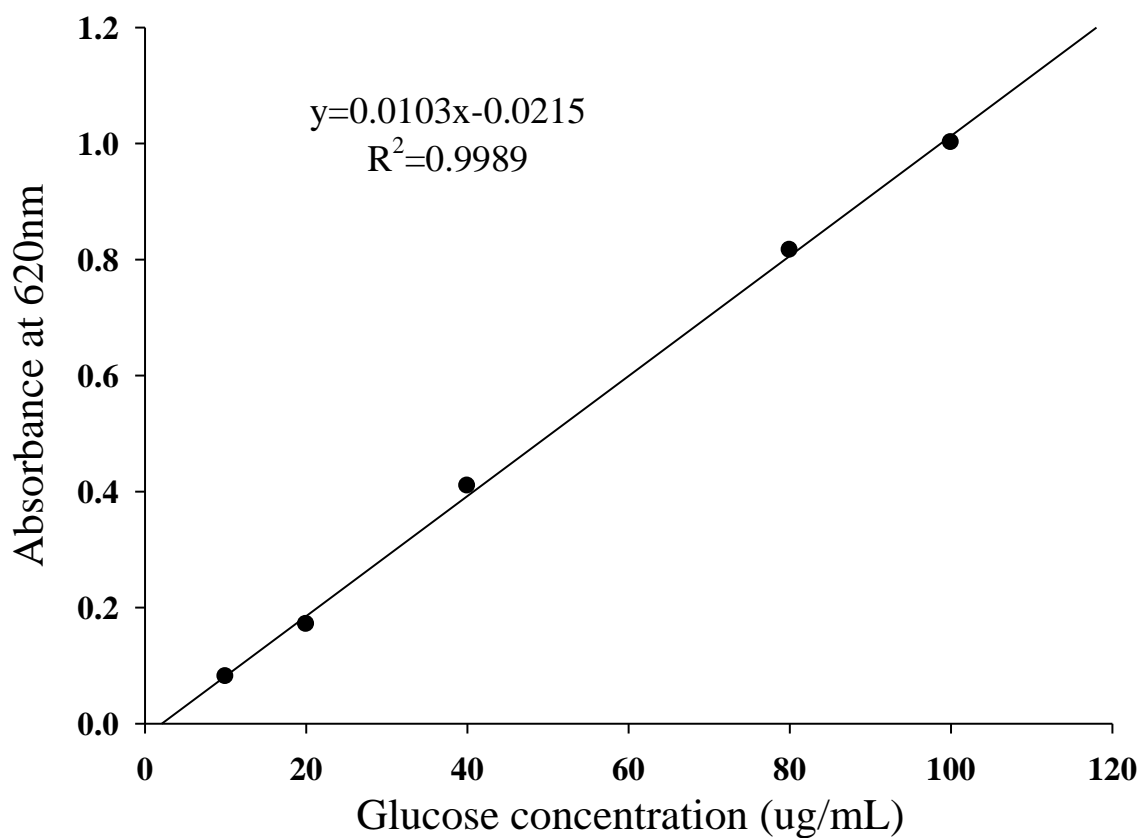
Appendix 7-1 Standard curve of gallic acid.





附錄 7-2 槲皮酮之標準曲線圖。

Appendix 7-2 Standard curve of quercetin.



附錄 7-3 葡萄糖之標準曲線圖。

Appendix 7-3 Standard curve of glucose.