

東海大學食品科學系碩士班

Master of Food Science

Tunghai University

食品科技組

Food Technology Section

指導教授：蘇正德 博士

高馥君 博士

Advisor : Jeng-De Su, Ph.D.

Fuh-Juin Kao, Ph.D.

樹豆依品種及發芽時間探討其在體外之抗氧化

以及對醣類分解酵素及蛋白質醣化反應之抑制作用

In vitro antioxidation as well as inhibition of carbohydrate
hydrolysis regulated enzymes and protein glycation undering
various pigeon pea species and their germination time

研究生：林筑盈 撰

Graduate Student : Chu-Ying Lin

中華民國一百零五年六月

June, 2016

碩士論文指導教授推薦書

食品科學系碩士班食品科技組 林筑盈 君所提之論文

樹豆依品種及發芽時間探討其在體外之抗氧化

以及對醣類分解酵素及蛋白質醣化反應之抑制作用

In vitro antioxidation as well as inhibition of carbohydrate hydrolysis regulated enzymes and protein glycation undering various pigeon pea species and their germination time

係由本人指導撰述，同意提付審查

此致

食品科學系系主任

李政偉

指導教授

郭心志

高夔君

中華民國一零五年六月二十七日

碩士論文考試委員審定書

食品科學系碩士班食品科技組 林筑盈 君所提之論文
樹豆依品種及發芽時間探討其在體外之抗氧化
以及對醣類分解酵素及蛋白質醣化反應之抑制作用

In vitro antioxidation as well as inhibition of carbohydrate hydrolysis regulated enzymes and protein glycation undering various pigeon pea species and their germination time

經本委員會審定通過，特此證明。

論文考試委員會

委員：

蔡正宗 珍果生技股份有限公司研發長

吳淑娟 東海大學食品科學系教授

高菱君 銘傳大學餐飲管理系副教授

林建洲 宜蘭大學食品科學系教授

指導教授：蔡正宗 高菱君

中華民國一零五年六月二十七日

謝誌

三年的研究所學習過程在此將劃下句點，心中有歡笑也有淚水，途中經歷過多少次的實驗失敗，卻又能在一次次挫折中克服並且累積經驗，正因為有這些考驗才能使我成長，很感謝研修碩士學位的這段期間幫助和給我支持鼓勵的您們，有您們才有今日的我。

感謝恩師 蘇正德博士在實驗室不時給予我關懷，實驗若遇困難也不厭其煩地給予我建議，一路上的照顧及指導，學生會永遠銘記於心，與您相處的時光學生畢生難忘。感謝恩師 江文德博士在研究所期間對於實驗、報告上的細心指導，百忙之中仍花許多時間與學生討論，真的很感謝您。除此之外，更感謝恩師 高馥君博士，謝謝您三年來近乎每個禮拜都花許多寶貴的時間與學生討論實驗，耐心地給予修正和建議，並且不吝教導，因為有您的付出，才能使學生完成今日的研究。

文稿初成，承蒙 蔡正宗老師與林世斌老師，繁忙中撥空對學生論文詳加審閱並斧正缺失，且於口試時給予高度的肯定，給學生寶貴的建議與指導使得本論文更趨完整，在此致上衷心之謝意。

另外，更要感謝系上所有的老師，助教和系辦 王琴助理於實驗上的協助，以及學長姐皓儀、昱翔、瀚文、明興、大釘的關懷與照顧，共同砥礪的同窗及學弟妹有容、庭璋、怡臻、秉叡、萬宇、佑星等人，謝謝你們跟我一起分享研究所生活中的喜怒哀樂，陪我度過無數個實驗不如意的夜晚，讓我的研究所生涯充滿了歡樂與笑聲，對你們心中只有萬分的感謝與祝福，希望你們盡快能朝自己的夢想前進。

最後要感謝我的家人給予的支持、關心與鼓勵，讓我無後顧之憂的完成學業，是我最溫暖的避風港，你們的支持與體諒是推動我完成學業的動力。將此論文獻給我最親愛的家人，願家人與我一起分享這份喜悅與榮耀。

學生 林筑盈 謹致於

東海大學食品科學研究所
食品化學暨食品分析實驗室

中華民國一百零五年六月

目錄

目錄	I
圖目錄	IV
表目錄	VI
附目錄	VII
中文摘要	VIII
英文摘要	IX
壹、前言	1
貳、文獻回顧	3
一、樹豆	3
(一)樹豆之介紹	3
(二)樹豆機能性成分及生理活性	6
(三)樹豆之發芽	15
二、糖尿病	19
(一)糖尿病主要類型	22
(二)糖尿病之治療	25
(三)胰島素與血糖恆定	26
(四)胰島素阻抗性	29
三、高血醣與醣解酵素	30
(一) α -澱粉酶 (α -amylase)	30
(二) α -葡萄糖苷酶 (α -glucosidase)	30
(三)醣解酵素活性的抑制對高血糖症狀之改善	31
四、高血糖與活性氧之關聯	33
(一)自由基與活性氧	33
(二)高血糖誘導活性氧之生成機制	37
(三)抗氧化系統	58
(四)抗氧化成分與糖尿病	72
參、材料與方法	73
一、實驗材料	73
(一)樣品來源	73
(二)實驗試藥與溶劑	73
二、儀器設備	76
三、實驗方法	78
(一)實驗流程	78
(二)第一階段篩選最佳生理活性之樹豆品種	80

1.樹豆乙醇萃取物製備-----	80
2.總酚含量測定(Total phenolic compound determination) -----	80
3.總類黃酮含量測定(Total flavonoid determination) -----	81
4.Trolox 當量抗氧化能力測定(Trolox equivalent antioxidant capacity) -----	81
5. α -amylase 抑制能力測定-----	82
6. α -glucosidase 抑制能力測定-----	84
7.Aldose reductase 抑制能力測定-----	85
8.蛋白質醣化抑制能力測定(AGEs formation inhibitory activity)---	86
(三)第二階段探討發芽時間對抗氧化、醣解酵素及醛糖還原酶與蛋白質 醣化抑制活性之影響-----	87
1.發芽樹豆乙醇萃取物製備-----	87
2.總酚含量測定-----	89
3.總類黃酮含量測定-----	89
4.脂質氫過氧化物抑制作用測定(Lipid hydroperoxide inhibitory activity) -----	89
5.DPPH 自由基清除能力測定-----	91
6.氫氧自由基清除能力測定(Hydroxyl radical scavenging assay) -----	91
7. Trolox 當量抗氧化能力測定-----	93
8. α -amylase 抑制能力測定-----	93
9. α -glucosidase 抑制能力測定-----	93
10. Aldose reductase 抑制能力測定-----	93
11 蛋白質醣化抑制能力測定-----	93
12.類黃酮含量組成分析-----	93
(四)統計分析-----	94
肆、結果與討論-----	95
一、篩選最佳生理活性之樹豆品種-----	95
(一)不同品種樹豆萃取物產率、總酚及總類黃酮含量之比較-----	95
(二)不同品種樹豆萃取物之抗氧化能力比較-----	100
(三)不同品種樹豆萃取物對醣解酵素抑制活性之影響-----	102
(四)不同品種樹豆萃取物對醛糖還原酶及最終醣化產物抑制作用之探討 -----	105
二、台東 3 號樹豆不同發芽時間對抗氧化、醣解酵素及醛糖還原酶與蛋白 質醣化抑制作用之影響-----	108
(一) 發芽時間對台東 3 號樹豆產率、總酚及總類黃酮含量之影響-----	108
(二) 發芽時間對台東 3 號樹豆抗氧化能力之影響-----	111

(三) 發芽時間對台東 3 號樹豆醱解酵素抑制活性之影響-----	119
(四) 發芽時間對台東 3 號樹豆醛糖還原酶及最終醱化產物抑制作用 之影響-----	122
三、樹豆不同發芽時間類黃酮化合物含量分析-----	125
伍、結論-----	131
陸、參考文獻-----	132
柒、附錄-----	144



圖目錄

圖一、臺東 1 號、2 號及 3 號樹豆之植株結莢及籽實-----	4
圖二、豆類種子之構造-----	17
圖三、樹豆地下型發芽之豆芽型態-----	17
圖四、血糖恆定性之機制-----	28
圖五、自由基的攻擊目標-----	36
圖六、超氧陰離子 O_2^- 藉粒線體電子傳遞鏈作用生成之過程-----	39
圖七、高血糖誘發粒線體產生過量超氧陰離子 O_2^- 引發致病之途徑-----	41
圖八、過量超氧陰離子 O_2^- 誘發糖尿病併發症之途徑-----	42
圖九、多元醇代謝路徑及醛糖還原酶-----	44
圖十、己糖胺代謝途徑-----	47
圖十一、高血糖誘發 PKC 活化機制-----	49
圖十二、高血糖誘發 PKC 活化之效應-----	51
圖十三、最終糖化代謝產物之形成-----	53
圖十四、AGEs 前驅物造成細胞損傷的三種方式-----	55
圖十五、天然抗氧化物之分類-----	60
圖十六、細胞抗氧化酵素之防禦系統-----	60
圖十七、不同型態抗壞血酸與自由基之反應-----	63
圖十八、輔酶 Q_{10} 結構式-----	66
圖十九、類黃酮之基本結構圖-----	68
圖二十、類黃酮衍生物之化學結構-----	68
圖二十一、第一階段實驗流程圖-----	79
圖二十二、第二階段實驗流程圖-----	79
圖二十三、葡萄糖之呈色反應-----	83
圖二十四、多元醇(山梨糖醇)路徑-----	85
圖二十五、自動培芽機構造示意圖-----	88
圖二十六、DPPH 自由基清除作用之反應式-----	91
圖二十七、省產三種樹豆乙醇萃取物之總酚含量-----	98
圖二十八、省產三種樹豆乙醇萃取物之總類黃酮含量-----	99
圖二十九、省產三種樹豆乙醇萃取物之 Trolox 當量抗氧化力-----	101
圖三十、省產三種樹豆乙醇萃取物對 α -amylase 之抑制率-----	103
圖三十一、省產三種樹豆乙醇萃取物對 α -glucosidase 之抑制率-----	104
圖三十二、省產三種樹豆乙醇萃取物對 aldose reductase 之抑制率-----	106
圖三十三、省產三種樹豆乙醇萃取物對 AGEs 之抑制率-----	107
圖三十四、省產樹豆台東 3 號不同發芽時間乙醇萃取物之總酚含量-----	110

圖三十五、省產樹豆台東 3 號不同發芽時間乙醇萃取物之總類黃酮含量---	112
圖三十六、省產樹豆台東 3 號不同發芽時間乙醇萃取物對脂質過氧化之抑制率-----	113
圖三十七、省產樹豆台東 3 號不同發芽時間乙醇萃取物之 DPPH 自由基清除能力-----	115
圖三十八、省產樹豆台東 3 號不同發芽時間乙醇萃取物之氫氧自由基清除能力-----	117
圖三十九、省產樹豆台東 3 號不同發芽時間乙醇萃取物之 Trolox 當量抗氧化力-----	118
圖四十、省產樹豆台東 3 號不同發芽時間乙醇萃取物對 α -amylase 之抑制率-----	120
圖四十一、省產樹豆台東 3 號不同發芽時間乙醇萃取物對 α -glucosidase 之抑制率-----	121
圖四十二、省產樹豆台東 3 號不同發芽時間乙醇萃取物對 aldose reductase 之抑制率-----	123
圖四十三、省產樹豆台東 3 號不同發芽時間乙醇萃取物對 AGEs 之抑制率-	124
圖四十四、(a) 280 nm (b) 347 nm 波長下類黃酮化合物的 HPLC 層析圖---	126
圖四十五、280 nm 波長下不同發芽天數台東 3 號樹豆乙醇萃取物之 HPLC 層析圖-----	130

表目錄

表一、樹豆新品種臺東 1 號、2 號、3 號農藝性狀表-----	5
表二、樹豆所含類黃酮活性物質-----	8
表三、糖尿病之診斷標準-----	21
表四、可能具糖尿病風險患者之診斷標準-----	21
表五、A1C 與平均血漿葡萄糖值之對比-----	22
表六、妊娠性糖尿病篩檢-----	25
表七、口服降血糖藥物-----	27
表八、類黃酮對酵母菌 α -glucosidase 之抑制率-----	32
表九、活性氧族群-----	35
表十、類黃酮衍生物之抗氧化性-----	69
表十一、省產三種樹豆之乙醇萃取物產率-----	96
表十二、省產樹豆台東 3 號不同發芽時間之乙醇萃取物產率-----	109
表十三、不同發芽時間台東 3 號樹豆中類黃酮化合物含量之變化-----	127



附目錄

附錄一、沒食子酸之標準曲線-----	144
附錄二、槲皮酮之標準曲線-----	144
附錄三、Trolox 之標準曲線-----	145
附錄四、BHA 之標準曲線-----	145
附錄五、Catechin + EGCG 之標準曲線-----	146
附錄六、Cyanidin-3-glucoside 之標準曲線-----	146
附錄七、Genistein 之標準曲線-----	147
附錄八、Orientin 之標準曲線-----	147
附錄九、Vitexin 之標準曲線-----	148
附錄十、Quercetin 之標準曲線-----	148
附錄十一、Apigenin 之標準曲線-----	149
附錄十二、Pinostrobin 之標準曲線-----	149



摘要

台灣目前已培育出產量高且品質穩定，分別命名為樹豆台東 1 號、2 號及 3 號之三新品種樹豆。文獻指出樹豆具防治第二型糖尿病潛力，然而，其有關調節血糖有效成分仍尚未被研究，因此本研究擬進行整體性分析比較上述新品種樹豆的抗氧化活性、醣解酵素及醛糖還原酶(α -amylase, α -glucosidase 及 aldose reductase)與最終蛋白質醣化產物(AGEs)形成的抑制活性，以篩選出具最佳保健效果的品種。實驗結果發現，以樹豆台東 3 號同時具有較高含量的總酚、總類黃酮及強抗氧化活性(TEAC)；在醣解酵素、醛糖還原酶抑制活性與蛋白質醣化物抑制作用上，也是以台東 3 號樹豆的效果較佳。後續利用台東 3 號樹豆，探討發芽時間對於醣解酵素、醛糖還原酶抑制活性及蛋白質醣化物抑制之影響，結果顯示發芽第七天的樹豆芽醣解酵素之抑制率與蛋白質醣化抑制作用顯著高於其他發芽時間。經 HPLC 進一步分析發芽樹豆內類黃酮含量變化，得知在發芽第七天樹豆芽中含量最多的類黃酮為花青素 cyanidin-3-glucoside，含量達 5.04 mg/g extract。

Abstract

In Taiwan, there are three new varieties of pigeon pea with high productivity and quality have been successfully bred, named Pigeon Pea Taitung 1, 2, and 3 respectively. In the previous papers, pigeon pea has potential benefit in the treatment of type II diabetes. Nevertheless, the active components of the antidiabetic activities in pigeon pea have not yet been fully documented. Hence the purpose of this study was to evaluate the antioxidant activities as well as type II diabetes relating enzymes inhibitory activity (α -amylase, α -glucosidase and aldose reductase) and advanced glycation end-products (AGEs) formation inhibitory capacity of the Pigeon Pea Taitung 1, 2 and 3. The results showed that Pigeon Pea Taitung 3 had the highest total phenolics contents, total flavonoid contents, total antioxidant activity, and type II diabetes relating enzymes inhibitory activities among the three pigeon pea species. Furthermore, the effects of germination time 0-11 days of Pigeon Pea Taitung 3 on α -glucosidase, aldose reductase and AGEs were also investigated. The result indicated that the 7th day of germination for Taitung 3 Pigeon Pea had significantly higher inhibitory activities of type II diabetes relating enzymes than the other germination time. According to HPLC analysis, cyanidin-3-glucoside with the amount of 5.04 mg/g extract was the major flavonoid at the 7th day of germination for Taitung 3 Pigeon Pea.

壹、前言

樹豆(pigeon pea) 屬豆科(Leguminosae)，木豆屬(Cajanus)植物，學名為 *Cajanus cajan* (L.)，其含豐富的蛋白質、維生素 B₂、維生素 C、葉酸與礦物質等(Torres *et al.*, 2007 ; Shohag *et al.*, 2012)。樹豆含多種機能性成分，目前已被證實的生理活性包括抗氧化 (Wu *et al.*, 2009 ; Liu *et al.*, 2010 ; Zhang *et al.*, 2012)、降血脂 (Kong *et al.*, 2009 ; Dai *et al.*, 2013)、護肝 (Dai *et al.*, 2013)、抗發炎 (Choi *et al.*, 2014 ; Patel *et al.*, 2014)、抗菌 (Zu *et al.*, 2010)、抑制腫瘤細胞增生 (Li *et al.*, 2004 ; Zhao *et al.*, 2014)、減緩停經後骨質疏鬆 (Zhang & Zu *et al.*, 2012)及預防阿茲海默症等神經性退化疾病(Choi *et al.*, 2014)等。在過去樹豆因成熟期不一，造成採收上的困難，台灣僅少量栽種，而台東改良場目前已培育出產量高且品質穩定的品種；分別命名為樹豆台東 1 號、2 號及 3 號。

近年來全球人口因生活型態改變，消費大眾享用高熱量飲食及缺乏運動，糖尿病(Diabetes)罹患之人群已逐年增加且有年輕化的趨勢。根據行政院衛福部 2015 年最新統計資料，2014 年糖尿病位居國人十大死因第五位，且死亡人數有逐年增加的趨勢。糖尿病患者長期處於高血糖狀態，除了會使葡萄糖自氧化產生活性氧自由基(Reactive

oxygen species ; ROS)外，也會提高蛋白質醣化作用形成最終醣化產物(Advanced glycation end products ; AGEs)並誘發自由基產生，過多的自由基會導致體內抗氧化防禦系統失衡，破壞體內組織及引發更多併發症，因此如何維持血糖的恆定性及預防糖尿病併發症已為現今極為重要研究課題。目前調節血糖可從飲食、運動或藥物等三方面著手，進而緩和病情惡化，其中又以飲食內容影響最大，雖然現在可提供患者選擇的糖尿病藥物很多，但其中存在著許多藥物副作用的問題，因此開發具調節血糖活性的天然保健食品日趨重要，且未來具有市場發展潛力。

本研究欲針對新品種樹豆的保健功效，做系統性的深入探討；藉由分析樹豆萃取物之抗氧化、抑制醣解酵素及醛糖還原酶與蛋白質醣化作用等活性，篩選出具強抗氧化性及調節血糖機能之樹豆品種，並針對該品種探討其發芽時間對抑制醣解酵素 (α -amylase, α -glucosidase)、醛糖還原酶(Aldose reductase)之活性和抑制蛋白質醣化之影響。另分析樹豆中類黃酮含量隨發芽時間的變化，透過統計分析尋找出做為開發具調節血糖機能之保健食品中的主要成分。

貳、文獻回顧

一、樹豆

(一) 樹豆之介紹

樹豆 (Pigeon pea, *Cajanus cajan* (L.) Mill sp.)，屬於豆科 (*Leguminosae*)，樹豆屬 (*Cajanus*) 植物，別名有包括木豆、柳豆等，分佈在熱帶與亞熱帶的半乾旱地區，主要產地有亞洲、非洲、拉丁美洲和加勒比海等 (Kong *et al.*, 2010)。印度是樹豆的主要發源地，另外孟買、中國與尼泊爾也是主要生產國家，是開發中國家人民與素食者重要的蛋白質來源 (Torres *et al.*, 2007 ; Shohag *et al.*, 2012)。在臺灣，樹豆為原住民的傳統作物，大多以食用成熟種子為主，適宜在 18-30 °C 生長，不耐寒易霜害，其特性為耐旱性強，適合貧瘠半乾旱且缺乏灌溉地區種植(陳, 2013)。樹豆花序屬於無限生長型，植株會陸續開花、結莢，所以成熟時間皆不一，以致採收時無法一致，所以過去台灣樹豆的產量並不高，而近年來台東改良場經多年的選育後，淘汰地方品系成功選育出產量高、穩定、顏色豔麗且具高抗氧化活性的臺東 1 號、2 號及 3 號等三品種樹豆(圖一)，其農藝性狀如表一。



圖一、臺東 1 號、2 號及 3 號樹豆之植株結莢(左)及籽實(右)(陳, 2011)

Fig 1. Three species pigeon pea's podding photograph.

表一、樹豆新品種臺東 1 號、2 號、3 號農藝性狀表

Table 1. Agronomic trait of pigeon pea Taitung 1, 2 and 3

品系代號	株高 (cm)	分支數 (支)	始花期 (天)	成熟期 (天)	成熟莢數 (莢)	成熟莢率 (%)	每莢粒數 (莢)	百粒重 (g)	單株粒重 (g)	產量 (kg/ha)
臺東 1 號 (白色)	129±38	12.8	120	194	533	91.7	4.9	11.0	262	1,430
臺東 2 號 (茶褐色)	128±34	11.8	121	193	392	92.4	4.6	11.2	204	1,280
臺東 3 號 (黑色)	129±42	12.5	121	192	438	91.0	4.5	11.3	207	1,030

(陳，2011)



樹豆臺東 1 號、2 號及 3 號具高產、成熟期一致且適合台灣中、低海拔栽培的特性，品種各具特色，臺東 1 號種皮為白色，具高產、穩定的特性，而臺東 2 號種皮為茶褐色，其抗病、抗蟲性較強，臺東 3 號則為黑色，較耐貧瘠的環境。目前樹豆在台東的種植面積已有一百五十公頃，花蓮縣約十公頃，新竹縣尖石鄉也有少量栽種。

樹豆種子營養價值豐碩，每 100 g 乾豆含蛋白質 21.8 %、脂肪 1.0 %、碳水化合物 62.8 %、纖維為 4.4 %、灰分 3.8 %，礦物質中含鈣 128 mg、鐵 4.5 mg、磷 287 mg，維生素中含維生素 A 20 I.U.、B₁ 0.5 mg、B₂ 0.16 mg 及菸鹼酸 2.3 mg (陳、王，2010)。豆莢內種仁富含蛋白質、脂肪、碳水化合物、纖維素、礦物質等，食用方式大多以乾籽實及鮮嫩莢果型式食用，原住民將樹豆稱為『男人的聖品』，從前上山打獵，為增強體力與耐力，族人會將樹豆及豬腳燉在一起料理成為最佳食補的勇士湯；除食用外，乾莖還可做為燃料，幼嫩植株可做綠肥，對土壤改良極具價值。

(二) 樹豆機能性成分及生理活性

樹豆在傳統藥理作用上具有清熱解毒、利水消腫、補中益氣及止血止痢等功效。在中國與印度等地之民俗療效法中，常將樹豆用於糖尿病、膽結石排出、婦女生理期不適、皮膚過敏、肝炎、麻疹、黃疸、

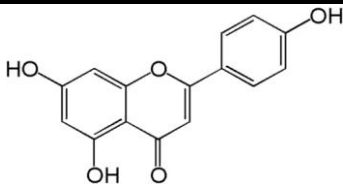
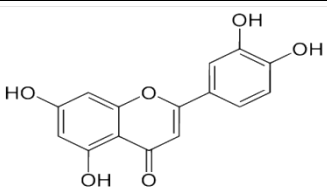
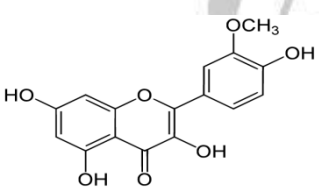
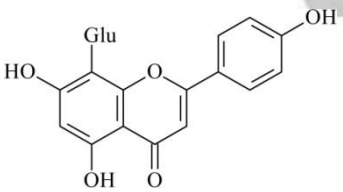
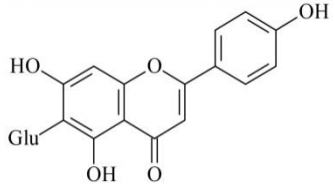
腹瀉 (Fu *et al.*, 2008 ; Kong *et al.*, 2010 ; Zu *et al.*, 2010)及鐮刀型貧血 (Sickle cell anaemia) (Duker *et al.*, 2004)。目前文獻分析出樹豆內含有的類黃酮活性物質整理如表二，而關於樹豆之生理活性分述如下：

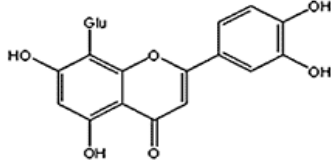
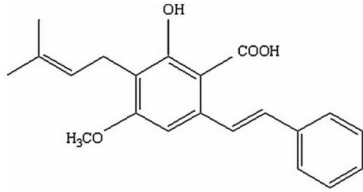
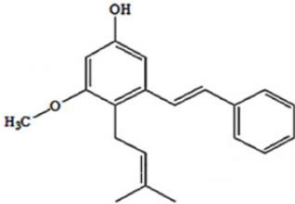
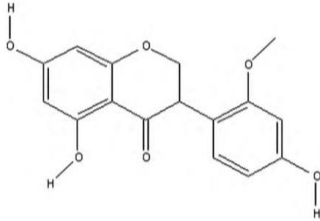
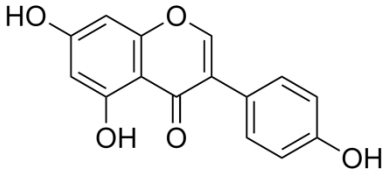
1. 抗氧化及清除自由基

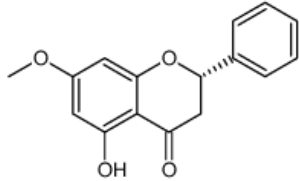
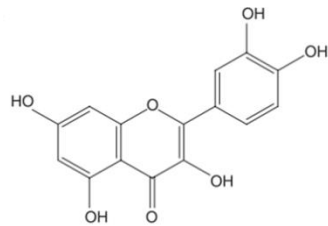
樹豆因富含總酚、類黃酮化合物而具有良好的抗氧化能力。針對印度市售常見之豆科植物進行總酚、類黃酮含量及抗氧化性測定，研究指出高總酚含量之樹豆在超氧陰離子(superoxide anion)、DPPH 自由基都具有良好的清除能力(Sweetie *et al.*, 2011)。此外以 HPLC 分析樹豆內含有 vitexin, isovitexin, orientin, apigenin, cajaninstilbene acid, genistein, luteolin, isorhamnetin 等類黃酮成分，並進行清除自由基、還原力、抑制脂質過氧化能力等相關抗氧化性測定，結果顯示樹豆之類黃酮含量與抗氧化活性呈正相關 (Zu *et al.*, 2006 ; Wu *et al.*, 2009 ; Liu *et al.*, 2010 ; Zhang *et al.*, 2012)。其次自樹豆分離出來的 pinostrobin 被證實能誘發哺乳動物產生具有排毒及抗氧化作用的酵素 (Fahey *et al.*, 2002)。探討樹豆內生性真菌所生產 apigenin 及 luteolin 對人體肝癌細胞(HepG2 cells)抗氧化的作用，結果顯示其萃取物不僅具清除自由基能力，且能顯著性提高 superoxide dismutase (SOD)、catalase (CAT)、glutathione reductase (GR)等抗氧化酵素活性，並降低脂質氧化程度，

表二、樹豆所含類黃酮活性物質

Table 2. Flavonoids isolated from *Cajanus cajan* (L.) Mill sp.

Structure	Type	Activities
 <p>Apigenin</p>	Flavone	Anti-inflammatory, anticancer, antiviral, antioxidant and free radical scavenging activities (Wang <i>et al.</i> , 2004)
 <p>Luteolin</p>	Flavone	Anti-inflammatory, antimicrobial activities (Liu <i>et al.</i> , 2009)
 <p>Isorhamnetin</p>	Flavonol	Antispasmodic, anti-inflammatory activities (Zu <i>et al.</i> , 2006 ; Liu <i>et al.</i> , 2009)
 <p>Vitexin</p>	Flavone C-glycoside	Antioxidant and free radical scavenging activities, anti-inflammatory activity (Liu <i>et al.</i> , 2009)
 <p>Isovitexin</p>	Flavone C-glycoside	Anti-inflammatory activity (Liu & Kong <i>et al.</i> , 2010)

Structure	Type	Activities
	Flavone C-glycoside	Antioxidant activity (Wu <i>et al.</i> , 2009 ; Liu <i>et al.</i> , 2010)
Orientin		
	Stilbene	Hypoglycaemic, hypotriglyceridemic activities and potential action in the treatment of postmenopausal osteoporosis (Luo <i>et al.</i> , 2008), antimicrobial activity (Zu <i>et al.</i> , 2010)
Cajaninstilbene acid (CSA)		
	Stilbene	Hypocholesterolemic activity (Liu <i>et al.</i> , 2010), antiplasmodial activity (Duker-Eshun <i>et al.</i> , 2004)
Longistylin C		
	Isoflavanone	Antifungal, antioxidant activities and inhibit human breast cancer cells proliferation (Luo <i>et al.</i> , 2010)
Cajanol		
	Isoflavone	Antioxidant, anti-inflammatory, antitumor activities and has potential activity to treat postmenopausal osteoporosis (Zhang <i>et al.</i> , 2013)
Genistein		

Structure	Type	Activities
 <p>Pinostrobin</p>	Flavanone	Anti-inflammatory activity, reduced estrogen-induced cell proliferation (Zhao <i>et al.</i> , 2014) and inhibited human breast cancer cells proliferation (Kong <i>et al.</i> , 2009)
 <p>Quercetin</p>	Flavonol	Antioxidant, anti-inflammatory activities (Zu <i>et al.</i> , 2006)

呈現抗氧化效果 (Gao *et al.*, 2012 ; Zhao *et al.*, 2014)。國內研究則提到新品種樹豆台東 1 號、2 號及 3 號，以台東 3 號在總抗氧化力及還原力測定上都具較高之活性 (陳和王，2012)。

2.降血脂作用

樹豆成分中 cajaninstilbene acid 具有降三酸甘油酯、降膽固醇等效果 (Kong *et al.*, 2009)。將樹豆萃取物加入到高血脂老鼠飲食中，連續餵食四周後發現，不僅可降低老鼠血液中 LDL-cholesterol 含量，另外也能顯著提高蛋白質 HMG-CoA reductase, CYP7A1, LDL-receptor 等 mRNA 表現量，調節倉鼠體內脂質及膽固醇的代謝機制進而改善高脂血症情形 (Luo *et al.*, 2008)。此外，樹豆進行餵食倉鼠調節血脂之評估，分別以低、中、高劑量組別進行 8 週，結果顯示隨著樹豆攝取劑量越高，LDL 濃度下降越顯著，研究中推測其調節血脂機轉為調控 LDL receptor 及 CYP7A1，加速體內多餘脂質排除及提升膽酸合成能力 (Dai *et al.*, 2013)。

3.護肝作用

高脂飲食會造成倉鼠肝臟脂質產生過氧化反應，導致二級氧化產物丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量上升，而餵食樹豆萃取物組能降低高脂飲食倉鼠血清中 ALT (alanine aminotransferase)、AST (aspartate aminotransferase) 等酵素活性，並使脂質 MDA 二級過氧化指標反應物 TBARS 下降，顯示樹豆具有保護高脂飲食導致肝臟損傷的作用 (Dai *et al.*,

2013)。在酒精誘導肝細胞損傷方面，樹豆也能有效減緩 Clone 9 細胞中三酸甘油酯蓄積量及脂質過氧化程度，並提升細胞中 glutathione (GSH) 含量，依此推測其具有保護酒精性肝損傷的效果(林，2012)。

4.抗發炎活性

以脂多醣 (lipopolysaccharides, LPS)刺激而活化的 RAW 264.7 cell 和 J774A.1 cell 會釋出促發炎物質，而樹豆中的 pinostrobin 與 cajanuslactone 等成分皆具有抑制其分泌促發炎細胞激素 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 與 interleukin-1 β (IL-1 β)的能力 (Patel *et al.*, 2014)。另外進一步評估樹豆對 H₂O₂ 誘導 RAW 264.7 巨噬細胞氧化損傷之保護作用及抗發炎活性，結果顯示該乙醇萃取物能顯著提升 H₂O₂ 誘導組細胞存活率、抗氧化酵素(SOD, CAT, GPx) 活性，且有效降低 LPS 誘導發炎激素 TNF- α 、IL-1 β 、interleukin-6 (IL-6)、nitric oxide (NO) 及 prostaglandin E₂ (PGE₂) 之分泌量，Lai 等人認為此活性歸因於該萃取物成分花青素 cyanidin-3-monoglucoside 可抑制細胞發炎反應 (Lai *et al.*, 2012)。樹豆中 apigenin 亦能顯著抑制 RAW 264.7 cell 經 LPS 誘導產生之 NO 生成量及 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 和 cyclooxygenase-2 (COX-2) 表現量 (Choi *et al.*, 2014)。

5.抗菌活性

樹豆成分 stilbene 中的 cajaninstilbene acid (CSA) 對 *Staphylococcus*

epidermidis, *Bacillus subtilis*, *B. cereus* 及 *Proteus vulgaris* 具有顯著的抑制效果(Zu *et al.*, 2010 ; Sweetie *et al.*, 2011) 。Cajanuslactone 亦對革蘭氏陽性菌 *S. aureus* (ATCC 6538)具有顯著的抑制力，最低抑菌濃度(minimum inhibitory concentration; MIC)及最低殺菌濃度(minimum bactericidal concentration; MBC)各為 0.031 及 0.125 mg/ml (Kong *et al.*, 2010) 。

6.抑制腫瘤細胞增生

樹豆成分中的 pinostrobin 能抑制由雌激素誘導之癌細胞增生 (Zhao *et al.*, 2014)，另有相關研究指出樹豆內 pinostrobin, cajanol 也能顯著性抑制人類乳癌細胞 MCF-7 增殖，並且具有劑量效應 (Liu *et al.*, 2010 ; Luo *et al.*, 2010) 。前列腺癌細胞經常轉移至骨骼，研究結果顯示 genistein 可透過調控細胞基因表現使細胞凋亡，顯著性抑制 PC3 人類前列腺癌細胞增殖及骨骼轉移現象 (Li *et al.*, 2004) 。

7.減緩停經後骨質疏鬆

樹豆成分 genistein 具有減緩停經後婦女骨質疏鬆的能力 (Zhang & Zu *et al.*, 2012) ，此外 cajaninstilbene acid 在對體外人類成骨細胞 TE85 的功能及破骨細胞分化的研究中顯示 cajaninstilbene acid 具有促進成骨細胞形成的作用，可有效減緩停經後婦女或使用類激素藥物引起的骨質疏鬆症 (Zhang & Li *et al.*, 2012) 。

8.預防阿茲海默症等神經性退化疾病

研究樹豆成分 flavone C-glycosides 中的 vitexin, isovitexin 對 LPS 誘導之 RAW 264.7 cell 導致阿茲海默症相關酵素包括 acetylcholin esterase (AChE), butyrylcholin esterase (BChE) 之影響，結果顯示 vitexin 及 isovitexin 對兩種膽鹼酯酶 AChE 及 BChE 活性，都具有顯著的抑制能力，在 AChE 方面其 IC₅₀ 值各為 12.2 及 6.2 μ M 而 BChE 則分別為 6.7 及 6.5 μ M (Choi *et al.*, 2014)。

9.抗瘧疾活性

自樹豆分離出三種植物防禦素(phytoalexin)包括 longistylin A、longistylin C 與白樺脂酸 (betulinic acid)，具有抗瘧原蟲菌株 (*Plasmodium falciparum* 3D7)的活性，能防範瘧疾的發生 (Duker-Eshun *et al.*, 2004)。

10.調節血糖

樹豆成分 stilbene 中的 cajaninstilbene acid，具有降血糖之活性 (Liu & Kong *et al.*, 2010 ; Liu & Zu *et al.*, 2010)，分析樹豆類黃酮對 RAW 264.7 cell 經 LPS 誘導調節血糖相關酵素之影響，結果顯示 apigenin、vitexin 及 isovitexin 能抑制最終糖化產物 (advanced glycation endproducts, AGEs) 之形成，其 IC₅₀ 值分別為；204.1、243.5 及 175.7 μ M，相較於正控制組 aminoguanidine 的 422.8 μ M，顯示較佳的抑制作

用，而對於醛糖還原酶 (aldose reductase)， isovitexin 也有顯著的抑制能力 (Choi *et al.*, 2014) 。另外，以樹豆萃取物餵食糖尿病大鼠觀察其血糖值，結果顯示餵食劑量 400 及 600 mg/kg 的組別可以顯著降低大鼠空腹血糖、飯後血糖值且具有劑量效應 (Amalraj *et al.*, 1998 ; Ezike *et al.*, 2010) 。

有關樹豆具降血糖之活性雖在國外已被證實，但其在降血糖機轉方面的研究仍不多，台灣三新品種樹豆之調節血糖及其活性成分更未被深入探討。此外，許多文獻指出豆類經發芽(germination)過程，會提高營養價值，如於發芽階段，會活化種子中的酵素提高酚類化合物釋出量 (Torres *et al.*, 2007 ; Orozco *et al.*, 2009 ; Khandelwal *et al.*, 2010 ; Fernandez-Abderrahim *et al.*, 2012) ，所以本研究目的在於針對台灣新品種樹豆依品種及發芽時間，探討對於抗氧化、抑制糖解酵素及醛糖還原酶活性及最終糖化產物抑制作用之影響，藉以篩選品種及最佳發芽時間的樹豆，期盼開發成具調節血糖保健功效之保健食品。

(三) 樹豆之發芽

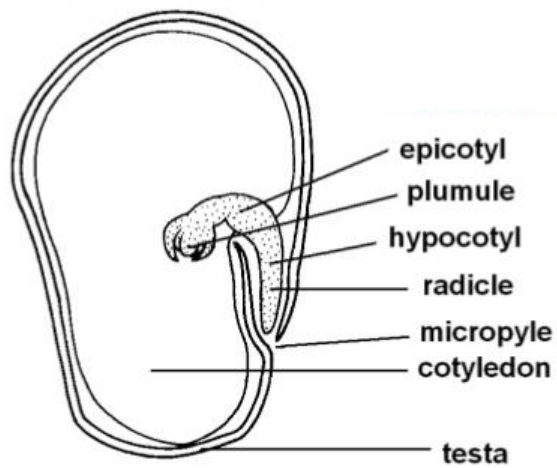
豆類種子本身含有豐富的營養成分，經發芽後其維生素、礦物質及醣類等含量都會增加，進而提高種子本身的營養價值。發芽是從種子吸收水分開始，到胚軸生長或伸長時結束，為種子恢復代謝機能的一種過程 (何，2010) 。

1. 發芽的條件

影響豆類種子發芽的因子包括外在的水分、溫度、空氣、光線等，豆科植物種子大多屬發芽過程對光線不敏感的光中性(楊等，2003)，因此光照非發芽的必要因子，另外因種子不具休眠，因此只要搭配適當的水分、溫度即可使種子發芽。樹豆生長適溫介於18-30°C，15°C以下則無法發芽(陳，2013)，參考上述各條件，本研究將樹豆生長的條件控制在 25°C 。水分含量也是發芽關鍵因子，種子在水分過多或過少的環境下皆會影響發芽情形，而樹豆適合在貧瘠半乾旱而缺乏灌溉地區種植，因此培養期間每9 h進行一次噴灑供水，以獲得適合豆芽生長的環境。

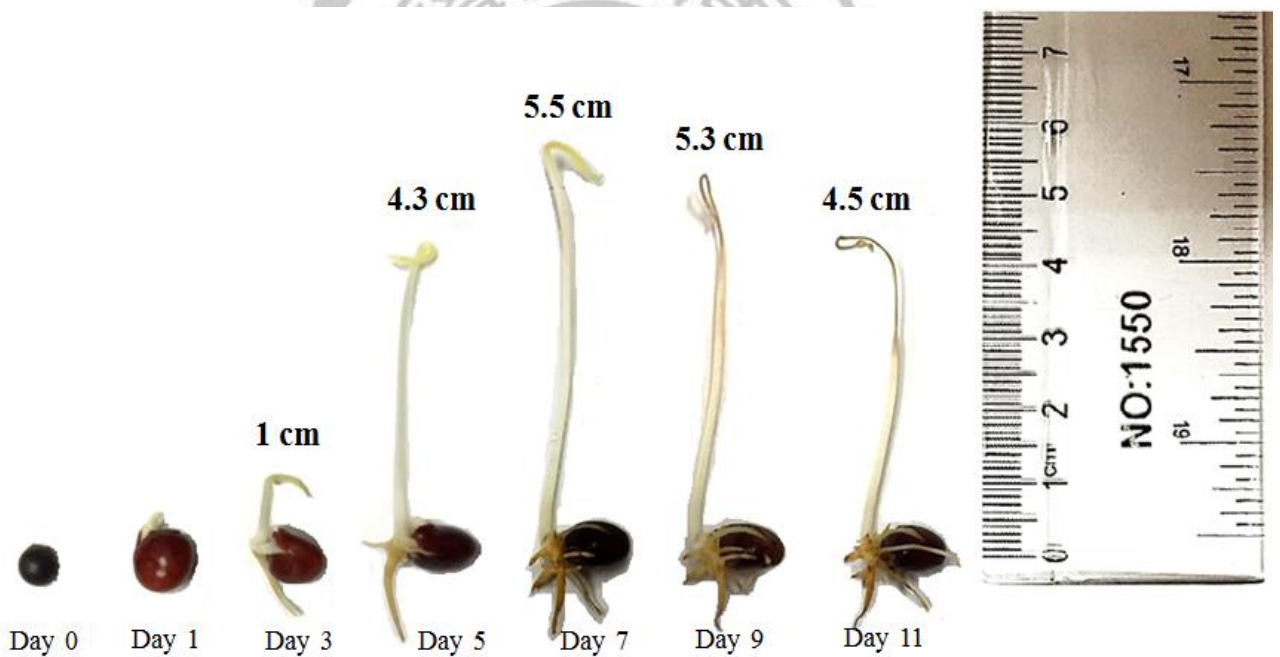
2. 發芽的種類

豆類種子依構造可分為種皮(testa or seed coat)、胚芽(plumule)、上胚軸(epicotyl)、下胚軸(hypocotyl)、胚根(radicle)及子葉(cotyledons)，如圖二。種子的發芽型態，依子葉之出土或不出土而分為兩種，子葉隨胚軸(hypocotyl)之延展而伸出地面，稱為地上型(epigeous germination)發芽型態，如綠豆、黑豆、黃豆等屬之；若只有胚芽(epicotyl)向上發育並生出葉子(foliage leaves)時，子葉仍留在土壤中，則為地下型(hypogeous germination)發芽，如豌豆、紅豆及樹豆則屬於此種，本實驗豆芽型態如圖三(何，2010)。



圖二、豆類種子之構造

Fig 2. Structure of bean seed.



圖三、樹豆地下型發芽之豆芽型態

Fig 3. Hypogeal germination of pigeon pea.

3. 豆芽的保健功效

豆科植物含有許多抗營養成分，如植酸(phytic acid)、草酸(oxalate)、單寧(tannin)、胰蛋白酶抑制劑(trypsin inhibitors)、胃腸脹氣因子(raffinose, stachyose, verbascose)等物質 (Torres *et al.*, 2007)，而發芽過程會活化種子中的酵素，將不溶性的大分子轉換成許多可溶性物質，提高蛋白質與碳水化合物的降解率，增加游離胺基酸和還原糖的釋出量，有利人體對其消化利用，同時發芽也會將植酸、草酸、胃腸脹氣因子等抗營養成分分解，降低其含量(Torres *et al.*, 2007 ; Khandelwal *et al.*, 2010)。發芽過程脂肪含量會下降，且各種對人體有益的物質包括維生素、礦物質及膳食纖維含量會提高，又以維生素 C 增加幅度最大(Villaluenga *et al.*, 2006)。趙等人 (2001)探討五種食用豆芽之抗氧化性，數據顯示五種豆芽乙醇萃取物皆有還原力、清除 DPPH 自由基、螯合亞鐵離子之能力，且抗氧化活性與其所含維生素 C、總酚化合物及花青素都具顯著相關性。

樹豆內抗營養成分植酸、草酸、胰蛋白酶抑制劑已由許多文獻證實經過發芽可顯著降低，而營養成分維生素 B₂、C、E 和礦物質(Fe, Mn, Ca, Mg)發芽後也能顯著增加其含量(Sangronis *et al.*, 2007 ; Torres *et al.*, 2007)。發芽時間對樹豆組成分、礦物質及抗營養成分的研究，結果亦顯示隨著發芽時間增加，其植酸、草酸的含量顯著降低，而礦物質(Fe, Mn, Ca, Mg)及酚類化合物則增加釋出量 (Oloyo *et al.*, 2004)。樹豆發芽後其蛋白質消化率(*In vitro* protein digestibility)相較未發芽者可顯著提高，而對於人體不易消化的短鏈寡糖 raffinose, stachyose 及 verbascose 則呈現降低的趨勢 (Sangronis *et al.*, 2007)。Torres (2007)更提出由於發芽後酚類化合物釋出量大幅增加，相對提高了其抗氧化活性。

二、糖尿病

糖尿病(Diabetes mellitus, DM)為全球流行性的慢性疾病之一，且罹患糖尿病人口數有不斷上升的趨勢，其中以第二型糖尿病(Type 2 DM)為主要型態，約占罹患率 95%；屬於一種新陳代謝異常之疾病，主要原因是因為胰臟 β 細胞不能分泌胰島素或雖能分泌胰島素，但身體各組織對胰島素產生阻抗性，使其無法充分發揮作用，導致血液中的葡萄糖無法進入細胞，而呈現高血糖狀態。吃多、喝多、尿多 (三多)、易疲倦及體重減輕 (一少) 為典型糖尿病的主要症狀，有時候會產生手腳麻痺、

傷口不易癒合、視覺模糊等現象，甚至會引發各種急、慢性併發症，如糖尿病酮酸血症 (diabetic ketoacidosis, DKA)、腎病變、視網膜病變、神經病變等，以上症狀已證實與糖化作用有極大關聯性，若缺乏即時及適當的處理，可能導致器官失能等後遺症甚至死亡 (譚，2011 ; Singh *et al.*, 2001)。

根據 2015 年美國糖尿病協會 (American Diabetes Association, ADA) 所公布，可藉由測量醣化血色素 (glycated hemoglobin, A1C)、空腹血糖值 (fasting plasma glucose, FPG)、葡萄糖耐受性試驗 (oral glucose tolerance Test, OGTT) 及隨機血糖值 (random plasma glucose test, RPGT) 評估是否已罹患糖尿病 (表三、四、五)。

表三、糖尿病之診斷標準

Table 3. Criteria for the diagnosis of diabetes

A1C \geq 6.5%

The test should be performed in a laboratory using a method that is
NGSP certified and standardized to the DCCT assay*

Or

FPG \geq 126 mg/dL (7.0 mmol/L)

Fasting is defined as no caloric intake for at least 8 h*

Or

2-h plasma glucose \geq 200 mg/dL (11.1 mmol/L) during an OGTT

The test should be performed as described by the WHO, using a glucose load
containing the equivalent of 75 g anhydrous glucose dissolved in water*

Or

In a patient with classic symptoms of hyperglycemia or hyperglycemic crisis,
a random plasma glucose \geq 200 mg/dL (11.1 mmol/L)

*In the absence of unequivocal hyperglycemia, result should be confirmed by repeat testing. (American Diabetes Association, 2015)

表四、可能具糖尿病風險患者之診斷標準

Table 4. Categories of increased risk for diabetes (Prediabetes)*

A1C 5.7-6.4%

Or

FPG 100-125 mg/dl (5.6-6.9 mmol/L)

Or

2-h plasma glucose in the 75g OGTT 140-199 mg/dL(7.8-11.0 mmol/L)

* For all three tests, risk is continuous, extending below the lower limit of a range and becoming disproportionately greater at higher ends of the range. (American Diabetes Association, 2015)

表五、A1C 與平均血漿葡萄糖值之對比

Table 5. Correlation of A1C with average glucose

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

These estimates are based on data of ~2,700 glucose measurements over 3 months per A1C measurement in 507 adults with type 1, type 2, and no diabetes. The correlation between A1C and average glucose was 0.92. A calculator for converting A1C results into estimated average glucose (eAG), in either mg/dl or mmol/l, is available at [http:// professional.diabetes.org/eAG](http://professional.diabetes.org/eAG). (American Diabetes Association, 2015)

(一) 糖尿病主要類型

1. 第一型糖尿病 (Type 1 diabetes mellitus)

第一型糖尿病為胰島素依賴型 (Insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM)，主要因為胰臟內 β 細胞受到自身免疫抗體的破壞，導致無法分泌胰島素或分泌不足，間接造成體內醣類、蛋白質及脂肪代謝失常。當血液中缺乏胰島素，葡萄糖就無法進入細胞，造成血糖濃度升高，此類型與生活習慣、遺傳無關，患者需長期依賴胰島素的注射以維持血糖的平衡，發病年齡多在兒童期或青少年期，因此又稱幼年型(Early-onset diabetes)糖尿病，約佔糖尿病患人口數 5% 以下。目前並無有效方法可以預防或治癒第一型糖尿病，不過抑制醣類消化吸收的物質對患者飯後血

糖升高有減緩的功能 (Zimmet *et al.*, 2001 ; Putnam *et al.*, 2009)。

2. 第二型糖尿病 (Type 2 diabetes mellitus)

第二型糖尿病約佔所有糖尿病患者 95 % 以上，是所有類型中最常見的，又稱為非胰島素依賴型 (non-insulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM)或成人型 (adult-onset diabetes)糖尿病。此類型病患體內雖可分泌胰島素，但因胰島素分泌量不足或功能缺失、對胰島素敏感度下降、胰島素接受器異常或已對胰島素產生阻抗，導致組織無法有效利用葡萄糖。前期患者不需每天依賴注射胰島素，可藉由飲食改善、規律運動或口服藥物來控制體內血糖濃度，後期則需補充胰島素。第二型尚有一項重要的特徵即為胰島素阻抗性 (insulin resistance)，患者初期胰島素分泌量相對的不足，無法有效調節肝臟、肌肉及脂肪細胞等代謝，胰臟補償性的增加胰島素的分泌量，進而產生高胰島素症狀(hyperinsulinaemia)，而由於胰臟長期過量產生胰島素，最終因負荷不了而損傷 β 細胞，導致胰島素分泌功能有缺陷，造成低胰島素症狀 (hypoinsulinaemia)，演變成需要補充胰島素，最終發生功能失調而形成的第二型糖尿病 (Prentki *et al.*, 2006)。研究顯示，第二型糖尿病患者，隨著 BMI (body mass index) 值的上升，胰島素阻抗性、 β 細胞胰島素分泌功能障礙及肝臟內生性葡萄糖的產生比例也會上升 (Duman *et al.*, 2003)。此類型非自體免疫系統的疾病，形成原因複雜，主要因現代人生活習慣改變，飲食過量、運動

量不足及壓力等，所以罹患第二型糖尿病患者通常伴隨著肥胖現象，然而肥胖人口的年齡層不斷下降，兒童及青少年中發現第二型糖尿病情形亦有增加的趨勢 (Poitout *et al.*, 2002)。

3. 妊娠型糖尿病 (Gestational diabetes mellitus, GDM)

指婦女在懷孕期間罹患糖尿病，約發生於 4% 的孕婦，這段期間若沒控制好血糖，產後嬰兒體重會異常增加，且糖尿病控制不良也會造成早產兒及其他問題，如：新生兒低血糖、呼吸困頓等。形成原因為懷孕時過多荷爾蒙分泌，使身體產生胰島素阻抗性及高血糖現象，約半數婦女生產後即恢復正常，但許多妊娠型糖尿病婦女日後常會得到非胰島素依賴型糖尿病。醫師通常建議孕婦在懷孕 24~28 週及產後 6~12 週期間，可接受妊娠糖尿病篩檢 (表六)。

4. 其他特異型糖尿病 (Other specific types of diabetes mellitus)

其他特異型可能為β細胞功能基因缺陷 (genetic defects of β-cell)、胰島素作用基因缺陷 (genetic defects in insulin action)、內分泌病變、外分泌胰臟疾病 (diseases of the exocrine pancreas)、藥物或化學物質以及病毒感染等引發的糖尿病 (WHO, 1999)。

表六、妊娠性糖尿病篩檢

Table 6. Screening for and diagnosis of gestational diabetes mellitus

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

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

GDM: Gestational diabetes mellitus

(ADA, 2015)

FPG: Fasting Plasma Glucose

OGTT: Oral Glucose Tolerance Test

(二) 糖尿病之治療

現今治療方式主要希望可調控血糖及延緩併發症，針對糖尿病患之降血糖的策略有(1)刺激胰島素分泌(2)改善胰島素阻抗性(3)增進末梢組織葡萄糖的利用(4)抑制醣類在腸道內的吸收(5)調節脂質代謝(6)抑制肝臟內生葡萄糖產生及(7)保護 β 細胞，以達到降血糖之目的(陳，2002)。研究證實有效控制糖尿病患的血糖濃度，對於第一型或第二型之慢性併發症具有延緩或減弱的效果(劉，2008)。第一型糖尿病患者，需每天注射胰島素，而第二型糖尿病患者高血糖之情況，主要可透過飲食和體重控制、規律作息、壓力紓解及定期運動並搭配藥物的幫助才能達到適度的血糖調控 (Inzucchi *et al.*, 2002)。

目前治療方法分為非藥物及藥物兩種，非藥物治療包括飲食調控、運動及衛教，而藥物方面除了胰島素外，尚有口服降血糖藥物(Oral

hypoglycemic agent, OHA)可選擇。OHA 主要作用是刺激胰島素的分泌、改善胰島素阻抗性、減緩腸胃道對醣類的吸收，進而改善血糖的異常(沈等,2008)。常見的 OHA 包括胰島素分泌促進劑 (insulin secretagogues)、雙胍類(biguanide)、 α -glucosidase inhibitor 及 thiazolidinediones (或稱 glitazones)為胰島素增敏劑如表七所示。這些藥物雖然有效，但也伴隨副作用之產生如過敏、腸胃不適、體重增加和肝臟損傷等，只能治標性的減輕部分因糖尿病所造成的代謝紊亂，無法治本的改善身體中根本的生化損傷，而目前已有許多植物或其萃取物被證實具有降血糖功能之活性物質，有益於糖尿病之改善或治療，包括生物鹼(alkaloids)、配醣體(glycosides)、多醣類、二硫化物及其它物質(胡，2002；Waring, 2007)。

(三) 胰島素與血糖恆定

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

表七、口服降血糖藥物

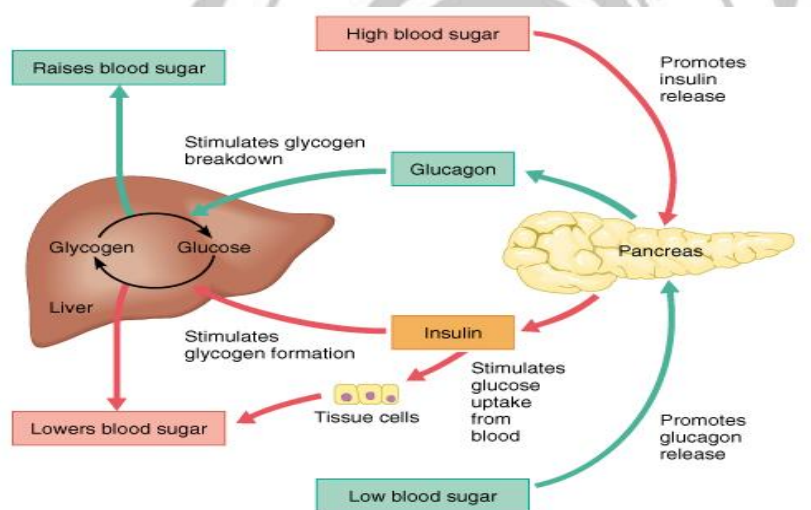
Table 7. Oral hypoglycemic agent

分類	藥物	平均降低 HbA1c 作用	作用機轉	副作用
胰島素分泌促進劑 (Sulfonylurea 磺酸尿類)	Glimepiride、 Glipizide、 Glyburide、 Gliclazide	↓ 0.8-2.0%	加強胰臟β細胞對葡萄糖敏感度，並刺激β細胞分泌胰島素	低血糖及 體重增加
胰島素分泌促進劑 (Non-Sulfonylurea 非磺酸尿類)	Repaglinide、 Nateglinide	↓ 0.5-2.0%	直接刺激胰臟β細胞分泌胰島素	低血糖及體重 增加，但其發生 機會較 Sulfonylurea低
雙胍類(Biguanide)	Metformin	↓ 1.0-2.0%	抑制肝臟葡萄糖之糖質新生、減少葡萄糖在腸道吸收、促進細胞組織對胰島素的敏感性，並無直接刺激胰島素分泌之作用	傷害腸胃道
α-glucosidase inhibitor	Acarbose Voglibose	↓ 0.5-1.0%	作用為競爭型抑制腸黏膜刷狀緣上α-glucosidase之酵素活性，降低澱粉及雙醣類在腸道分解的速度，延緩腸道對葡萄糖的吸收	由於藥物作用在腸道，因此未被消化、吸收的醣類會受到腸內菌發酵造成脹氣、腹痛、腹瀉等
胰島素增敏劑 Thiazolidinedione類衍生物	Pioglitazone、 Rosiglitazone	↓ 1.0-2.0%	作用機制為活化PPAR-γ之活性，增進脂肪組織、肝臟及骨骼肌之胰島素敏感性	體重增加及水腫，鬱血性心臟衰竭

(沈，2008)

(Bessesen, 2001)。血糖恆定須藉由胰島素調控周邊組織(肝臟、肌肉及脂肪)之參與，如圖四(Zierath *et al.*, 2003)。

胰島素為一種蛋白質激素，由胰臟蘭氏小島之 β 細胞所分泌，為兩條胜肽(21 個胺基酸之 A 鏈及 30 個胺基酸之 B 鏈) 藉由兩個雙硫鍵鍵結而成，其分子量約 6000 Da。其主要作用為促進醣類、脂肪及蛋白質之合成與儲存，並抑制其分解與釋放至血液循環中(Wilcox, 2005 ; Dimitriadis *et al.*, 2011)。胰島素不僅是維持血糖恆定、亦參與體內醣類、蛋白質及脂質之代謝 (Dimitriadis *et al.*, 2011)。



(Zierath *et al.*, 2003)

圖四、血糖恆定性之機制

Fig 4. The mechanism of blood glucose homeostasis.

1. 醣類代謝

抑制糖質新生、降低葡萄糖之生成、刺激肝醣合成、抑制肝醣分解

及促進葡萄糖能量轉換 (Shepherd *et al.*, 1999)。

2. 蛋白質代謝

胰島素可促使細胞膜對胺基酸之通透性，並可加速細胞核的複製及轉錄過程，增加 DNA 和 RNA 的生成，亦可加速核糖體之轉譯過程，促進蛋白質合成。

3. 脂質代謝

胰島素可抑制荷爾蒙敏感性脂解酶 (hormone sensitive lipase) 的活性，減緩脂肪分解作用，且減少三酸甘油酯分解成甘油及游離脂肪酸 (熊，2014)。

(四) 胰島素阻抗性

胰島素阻抗性在代謝症候群機轉中為主要核心異常因子，更是第二型糖尿病最主要前驅因子。當肌肉、肝臟與脂肪等組織細胞對胰島素敏感度下降，導致胰島素與受器結合後無法使葡萄糖進入細胞，使血液中胰島素調控體內能量代謝的能力降低，即為胰島素阻抗性(Zick, 2001)。胰島素阻抗性會導致末梢組織對葡萄糖攝入能力降低、飯後葡萄糖耐受性不良、異常的脂肪分解等影響，造成大量葡萄糖釋出到血液中，隨著阻抗性加劇以及胰臟β細胞分泌胰島素之能力逐漸喪失，高血糖情形會持續惡化，更會引發高血壓、高血脂及心血管疾病等併發症 (Lillioja *et al.*, 1993 ; Bessesen, 2001 ; Saltiel *et al.*, 2001)。

三、高血糖與醣解酵素

碳水化合物為人體能量的主要來源，分為單醣、雙醣及多醣類，食物中澱粉多醣經由唾液腺與胰臟分泌的澱粉酶先行消化分解成較小分子糊精、寡醣、雙醣，最後再經由小腸上皮細胞所分泌的葡萄糖苷酶水解成葡萄糖，才能被人體吸收及利用，使血糖上升。而利用醣解酵素抑制劑可有效延緩碳水化合物的消化與葡萄糖的吸收，改善餐後高血糖之現象 (Tadera *et al.*, 2006)。

(一) α -澱粉酶 (α -amylase)

α -amylase (EC 3.2.1.1)為內切型醣解酵素，主要存在哺乳動物之唾液及胰液中，可將多醣之 α -1,4-glycosidic linkage 水解成葡萄糖、麥芽糖、寡糖或糊精。 α -amylase 廣泛存在於微生物、動物及植物組織當中，動物的唾液和胰臟也能分泌 (Aquino *et al.*, 2003 ; Vaseekaran *et al.*, 2010)。

(二) α -葡萄糖苷酶 (α -glucosidase)

α -glucosidase (EC 3.2.1.20)屬外切型醣解酵素，主要存在小腸上皮細胞表面的絨毛刷緣(brush border)中，可將多醣經由此酵素催化並釋放非還原端的D-葡萄糖，其包括glucoamylase、sucrase、maltase 及isomaltase 等酵素，通稱為 α -葡萄糖苷酶 (Frandsen *et al.*, 1998 ; Shobana *et al.*, 2009)。

(三) 醣解酵素活性的抑制對高血醣症狀之改善

醣解酵素 α -amylase及 α -glucosidase抑制劑，可延緩多醣水解成葡萄糖之速率，進而降低葡萄糖之吸收，以減緩飯後高血糖，維持血糖穩定 (Baron, 1998 ; McCue and Shetty, 2004)。目前臨床上應用之 α -glucosidase inhibitor 有acarbose及voglibose等藥物，其在腸道內與 α -glucosidase有很高的親和力，會與食物中的多醣類互相競爭 α -glucosidase，而抑制小腸內醣類的水解，延緩碳水化合物在腸道分解為單醣的速度，減少腸道對醣類的吸收，有效降低飯後血糖及胰島素濃度，但亦會引起病患腹脹不適、頻頻排氣、腹瀉、腹鳴等腸胃不適之副作用，主要是因腸道中食物的消化吸收受到延遲，一部分未被消化完全的食物到達結腸，引發腸道菌的產氣發酵，通常持續用藥後症狀會逐漸緩解進而消失。尚有研究顯示此類藥物對高危險群的葡萄糖不耐患者能減少其約30%發生糖尿病的機會 (Fujisawa *et al.*, 2005 ; Fred-Jaiyesimi *et al.*, 2009)。所以尋找天然的醣解酵素抑制劑，有助於改善糖尿病患者餐後高血糖，也可讓忙於分泌胰島素的 β 細胞得以短暫休息，使得受傷的細胞能緩慢恢復 (Fred-Jaiyesimi *et al.*, 2009)。

據研究指出，類黃酮化合物對 α -glucosidase 與 α -amylase 具良好的抑制作用，其中花青素、黃酮醇類、異黃酮對酵母菌 α -glucosidase 抑制之 IC_{50} 值皆小於 $15\mu M$ (表八) ;其次探討類黃酮對大鼠腸道的 α -glucosidase

及豬胰臟的 α -amylase 抑制率之影響，結果發現以黃酮醇(flavonol)及黃酮類(flavone)抑制效果最佳，進一步以結構分析，推測類黃酮 B 環上 C3'、C4' 及 C5' 三個取代之 OH 基數目越多，其抑制效果越好；C2 與 C3 之間是雙鍵、3-OH、4-CO、5-OH 對酵素抑制都具提升之作用 (Tadera *et al.*, 2006)。

表八、類黃酮對酵母菌 α -glucosidase 之抑制率

Table 8. Inhibitory activity of flavonoid against yeast α -glucosidase

Flavonoid	Inhibition ^{a,b} (%)	IC ₅₀ (μ M) ^{a,c}		Flavonoid	Inhibition ^{a,b} (%)	IC ₅₀ (μ M) ^{a,c}	
		This work ^a				This work ^a	
Flavonol				Isolavone			
Myricetin	94		5	Daidzein	89 (67) ^d		14
Quercetin	91		7	Genistein	93 (78) ^d		7
Kaempferol	82 (64) ^d		12	Flavan-3-ol			
Fisetin	88		13	Catechin	45		>200
Flavone				Epicatechin	24		>200
Luteolin	92		21	Epigallocatechin	71		75
Apigenin	43 (43) ^d		>200	Epigallocatechin	89		2
Baicalein	5		>200	gallate			
Flavanone				Anthocyanidin			
Naringenin	73 (25) ^d		75	Cyanidin	99		4
Hesperetin	61		150				

The enzyme activity was estimated by measuring *p*-nitrophenol liberated. Experimental details are described in "Materials and Methods."

^aThe result was an average of three determinations.

^bInhibition by 200 μ M flavonoid.

^cConcentration required for 50% inhibition of the enzyme activity under the assay conditions.

^dInhibition by 25 μ M flavonoid.

(Tadera *et al.*, 2006)

四、高血糖與活性氧之關聯

糖尿病病患由於體內長期處於高血糖狀態，會進而誘發活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 生成機制，產生氧化壓力，而醣化反應是指蛋白質、脂肪等與葡萄糖產生化學作用而改變其性質，研究指出減低醣化反應能抑制氧化壓力，並達到保護細胞之效果。 β 細胞負責分泌胰島素，其細胞內抗氧化酵素含量較低，易受到氧化壓力之傷害，而高血糖狀態易使粒線體產生大量自由基，造成 β 細胞嚴重損傷，因此降低粒線體的氧化壓力傷害，也被認為是治療糖尿病的一種策略 (Green *et al.*, 2004)。人體的細胞雖然易受到 ROS 攻擊，但可透過體內之抗氧化酵素如超氧歧化酶、觸酶及麩胱甘肽過氧化酶等降低 ROS 形成自由基所造成之氧化傷害，並保護細胞 (Ceriello, 2003)。

研究指出糖尿病大鼠體內維生素C、E 及 β -胡蘿蔔素均有明顯不足之現象，而具有抗氧化功能之維生素可以降低糖尿病鼠及糖尿病患體內之氧化壓力，且植物中抗氧化成分也能運用於糖尿病及其併發症之防治上 (Rahimi *et al.*, 2005)。

(一) 自由基與活性氧

自由基 (free radicals) 是指含有一個或多個不成對電子而獨立存在之原子、分子或離子 (Halliwell *et al.*, 1995)。自由基因具有高自由能及不穩定性較其他分子高，因此易與其他分子作用，搶奪鄰近分子的電子，

使自己電子成對釋放能量形成較穩定的狀態，相對地失去電子的分子(自由基)會再去搶奪其他分子的電子，進而引發一連串連鎖反應 (chain reaction)，促使更多自由基產生。

活性氧族群是指以氧為中心的自由基及非自由基型態的高反應分子 (Niki, 1992)，如表九所示。活性氧族群具有開啟氧化的能力，進而產生更多自由基，對生物體造成氧化傷害 (Pinnell, 2003)，其中又以 $\cdot\text{OH}$ 毒性最為強烈，可輕易通過細胞膜而到達細胞核與 DNA 反應，造成 DNA 突變。ROS 也會間接誘發脂質氧化反應，所產生的中間代謝產物會造成細胞老化、蛋白質損傷、突變致癌甚至死亡 (Shigenaga *et al.*, 1989)。許多報告也證實自由基與其他疾病發生有密切的關係，如心血管疾病、癌症、免疫系統失調等 (Rikans *et al.*, 1997; Moskovitz *et al.*, 2002)。

生物體內自由基與活性氧之來源，大致可分外在及內在兩方面。外在來源包括環境污染物、菸害、離子輻射及化學藥劑如農藥等誘發體內產生 ROS，而內在來源包括粒線體電子傳遞鏈、自我氧化反應等所產生的 ROS (Morrissey *et al.*, 1998)。

表九、活性氧族群

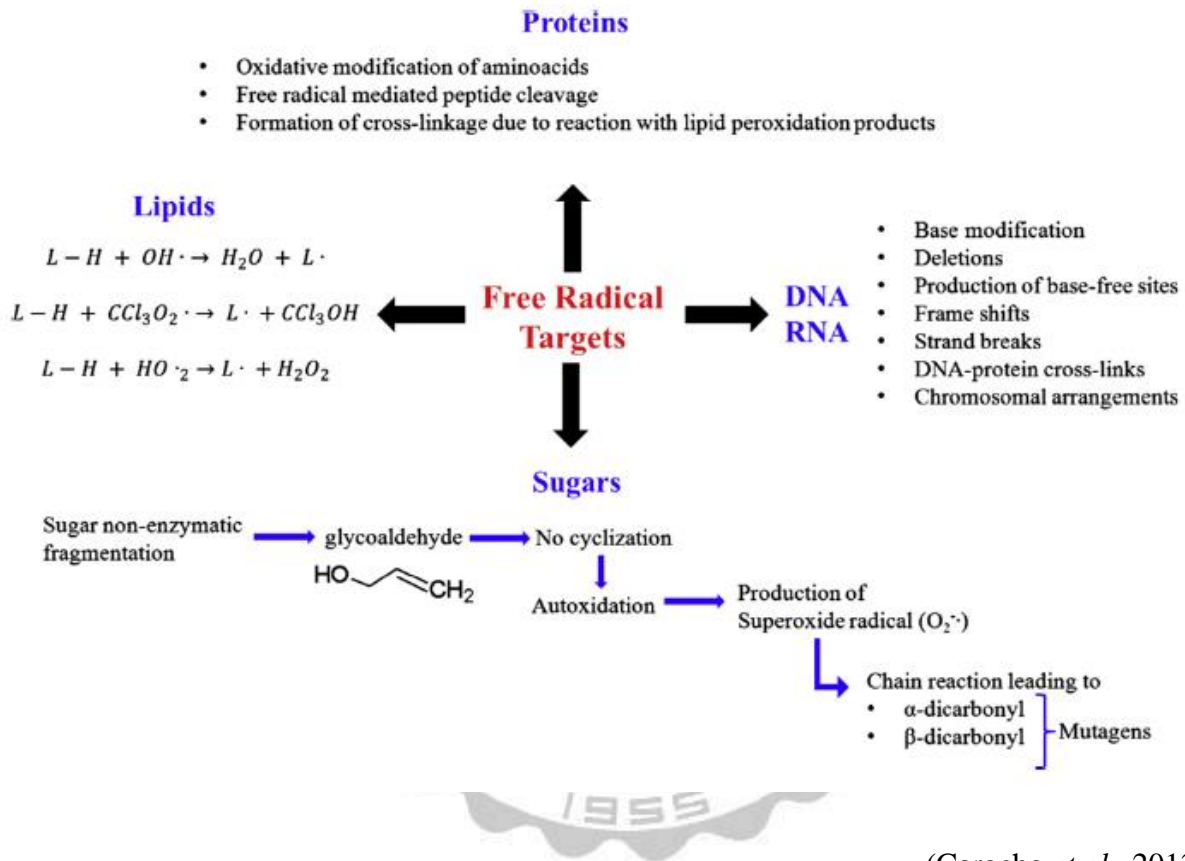
Table 9. Reactive oxygen species

Radicals		nonradicals	
Hydroxyl	•OH	Peroxynitrite	ONOO ⁻
Alkoxyl	L(R)O•	Hypochlorite	⁻ OCl
Hydroperoxyl	HOO•	Hydroperoxide	L(R)OOH
Peroxyl	L(R)OO•	Singlet oxygen	¹ ΔO ₂
Nitric oxide	•NO	Hydrogen peroxide	H ₂ O ₂
Superoxide	O ₂ ⁻ •		

(Abuja and Albertini, 2001)

人體內自由基的產生大致可分為四類，第一類來自生合成 (biosynthesis)，此類自由基在人體內不可或缺，會因生理需求而由胺基酸合成，例如一氧化氮自由基(•NO)，其為 L-arginine 在一氧化氮合成酶 (NO synthase) 的作用下所產生，不但是人類神經系統傳遞訊息的分子，更對人體免疫系統有所貢獻。第二類來自新陳代謝 (metabolism)，這類自由基產量的多寡因人而異，通常在需依賴酵素催化進行代謝之機轉中形成，其中最主要的為超氧陰離子、羥自由基等 (Halliwell, 1994)。第三類由外來物質引起，包括空氣或水汙染、藥物或防腐劑或食入燒焦肉類中的多環碳氫化合物如 benzo pyrene 或 benzanthracene 等，進而對人體造成危害。第四類由不良生活習慣所引起，包括抽菸、長時間情緒緊張使身體暴露在充滿外生性及內生性自由基環境中，造成傷害 (Maxwell *et al.*, 1992)。正常情況下，體內自由基的產生和消除是平衡的，但當體內自由基過多或抗氧化防禦系統出現故障，自由基代謝就會失衡

並破壞體內 DNA、蛋白質、醣類及脂質引起氧化連鎖反應，如圖五 (Carocho *et al.*, 2013)。



(Carocho *et al.*, 2013)

圖五、自由基的攻擊目標

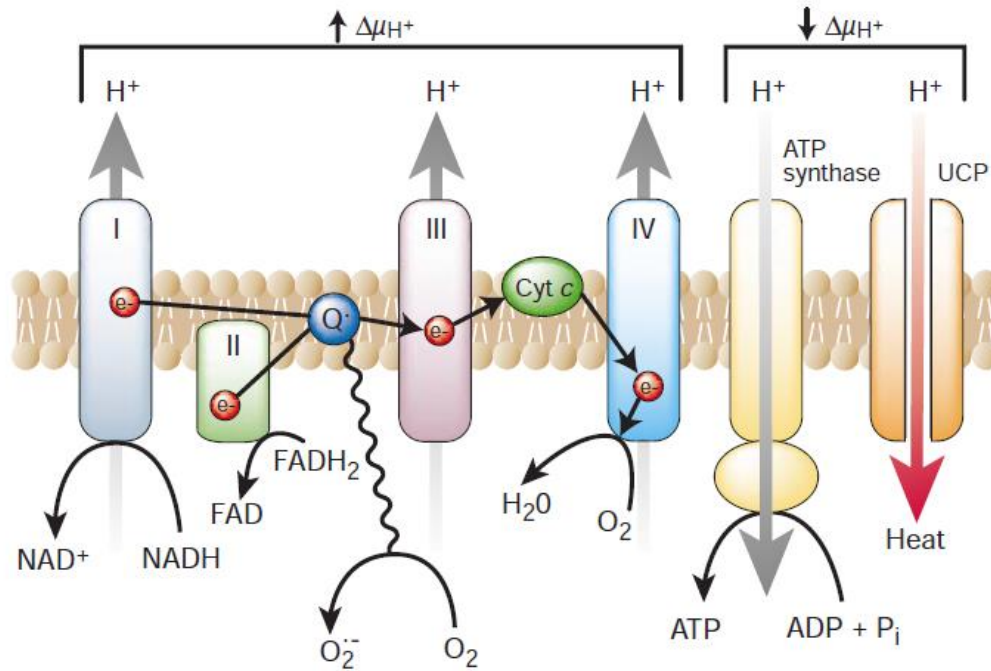
Fig 5. Targets of free radicals.

(二) 高血糖誘導活性氧之生成機制

糖尿病患體內若長期維持高血糖，葡萄糖會自我氧化產生過多的活性氧，且會使體內蛋白質產生醣化作用，並消耗體內的抗氧化因子，造成細胞損傷，而蛋白質醣化過程亦會產生大量活性氧，再度加強蛋白質醣化作用，惡性循環之下，導致體內抗氧化系統失衡與誘發糖尿病相關併發症有很大的相關性 (Dandona *et al.*, 1996 ; Baynes *et al.*, 1999 ; Nishikawa *et al.*, 2000 ; Brownlee, 2001)。人體內在持續高血糖情況下，會誘發體內相關致病機轉而引發細胞及血管的傷害，機轉包括高血糖引發細胞內多元醇代謝路徑中之醛醣還原酶 (aldose reductase) 而產生過多的山梨糖醇(sorbitol)聚集、活化 DAG (diacylglycerol) 和 PKC (protein kinase C) 輔酶系統而引起細胞內訊息傳遞障礙、葡萄糖和蛋白質形成醣化最終代謝產物 AGEs 影響組織代謝等，而在上述幾項可能致病機轉中，高血糖誘發血管內皮細胞中的粒線體過度生成不穩定性過氧化物自由基超氧陰離子 $O_2^{\cdot-}$ 是導致糖尿病各種併發症的共同根源之一 (Korshunov *et al.*, 1997 ; Du *et al.*, 2000 ; 吳，2009)。

粒線體過度生成超氧陰離子主要因葡萄糖在細胞內進行醣解作用時會產生 NADH 及 pyruvate，而 NADH 會走兩項可能路徑，其一是將 pyruvate 還原成 lactate 後，離開細胞到肝臟作為下次醣質新生的受質，另一種則是進入到粒線體做為電子傳遞鏈的受質。Pyruvate 進入粒線體

內會行 TCA 循環而產生 CO_2 、 H_2O 、 NADH 及 FADH_2 ，而上述這些在粒線體內生成的 NADH 和 FADH_2 可再經由電子傳遞鏈來產生細胞能量來源 ATP。粒線體電子傳遞鏈如圖六，主要由 cytochrome C、ubiquinone 及四個酵素複合體所組成，過程中 NADH 及 FADH_2 負責分別將電子傳遞給酵素複合體 I 和 II，電子再經由 ubiquinone 傳給酵素複合體 III，但同時也會產生不穩定性氧自由基，電子最後會再經由 cytochrome C 及酵素複合體 IV，使得氧分子轉變成水。這些過程中質子會被送到粒線體內，膜外產生電位差而驅動 ATP 合成酶 (ATP synthase) 及 UCP (uncoupling protein) 作用以產生能量 ATP 和熱能。在粒線體內膜中，質子運送過程產生的電位差若增大時，就會使得 coenzyme Q (ubiquinone) 的半衰期延長或無法將電子傳遞到酵素複合體 III 阻礙其功能，而造成氧氣轉變成不穩定性過氧化物自由基 $\text{O}_2^- \cdot$ 情形加劇，而當糖尿病患體內細胞的高血糖經由 TCA 代謝後產生過多的電子供應者 NADH 和 FADH_2 時，會加大粒線體內膜的電位差，產生更多不穩定 $\text{O}_2^- \cdot$ (Brownlee, 2001；吳，2004；Jezek *et al.*, 2005)。



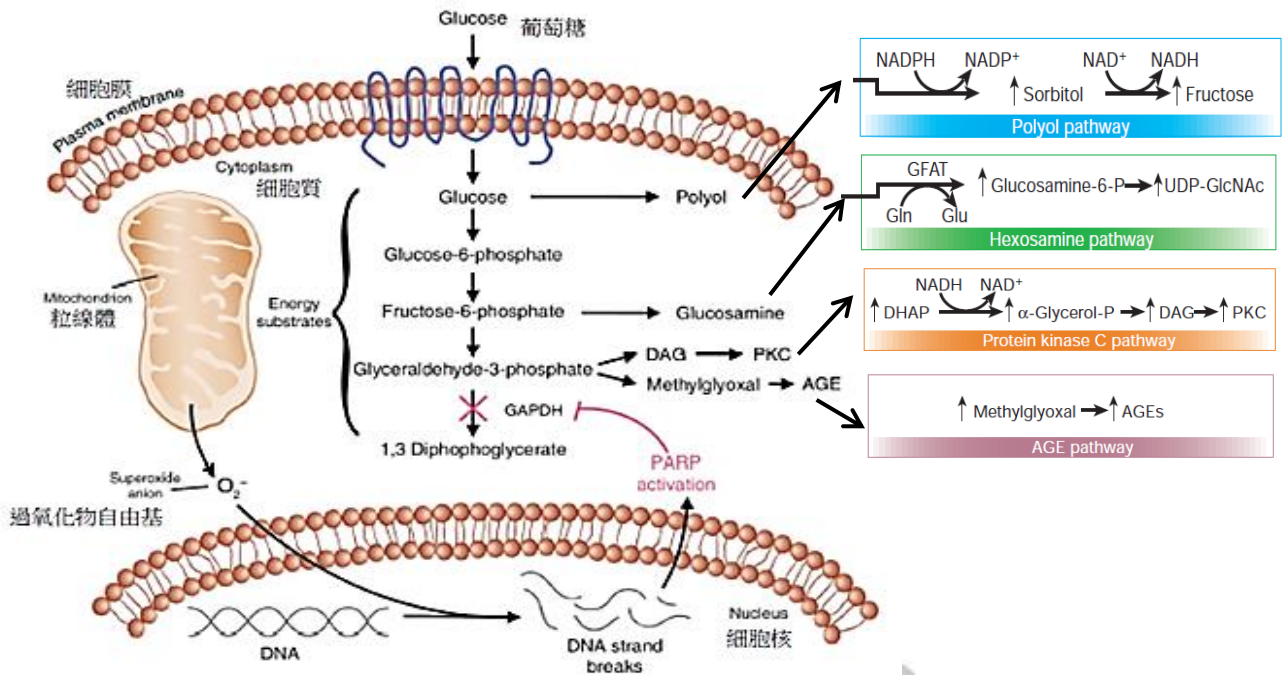
(Brownlee, 2001)

圖六、超氧陰離子 $O_2^- \cdot$ 藉粒線體電子傳遞鏈作用生成之過程

Fig 6. Production of superoxide anion by the mitochondrial.

electron-transport chain. Increased hyperglycaemia-derived electron donors from the TCA cycle (NADH and FADH₂) generate a high mitochondrial membrane potential ($\Delta\mu_{H^+}$) by pumping protons across the mitochondrial inner membrane. This inhibits electron transport at complex III, increasing the half-life of free-radical intermediates of coenzyme Q (ubiquinone), which reduce O₂ to superoxide anion. (Brownlee, 2001)

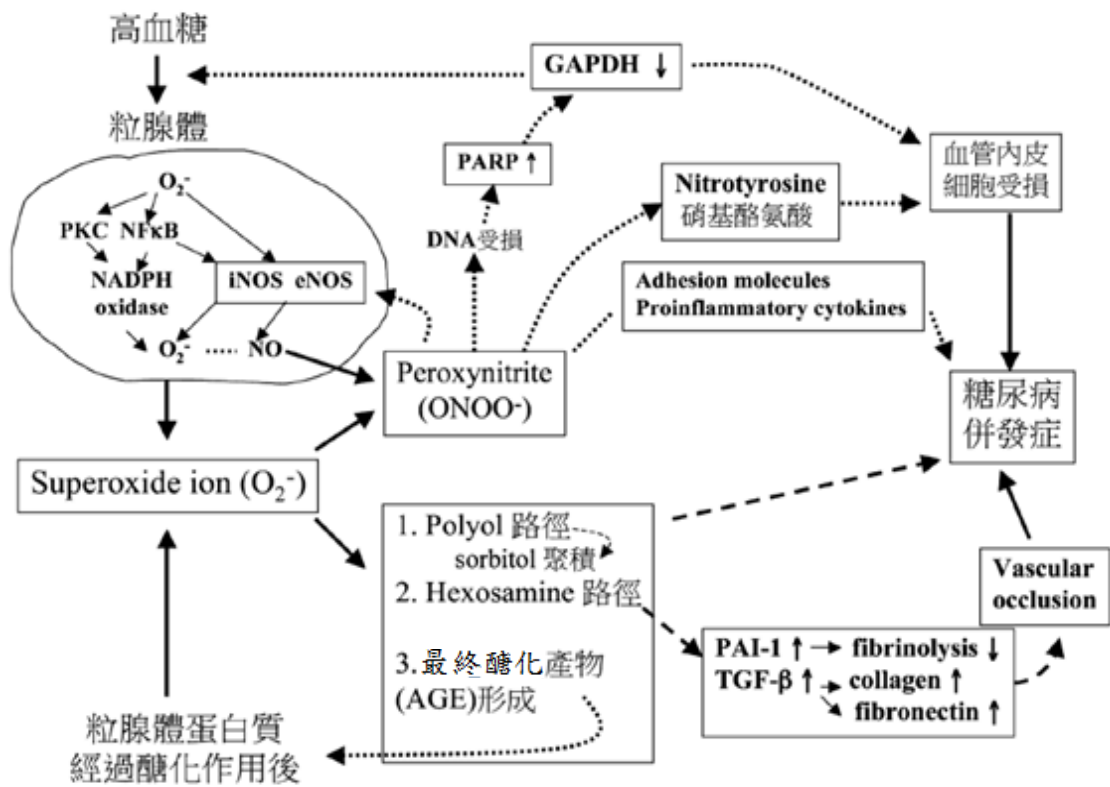
由高血糖誘發粒線體過度產生的超氧陰離子 $O_2^{\cdot-}$ ，會經由激活細胞內 PARP (poly-ADP-ribose polymerase) 而使葡萄糖代謝路徑中的 GAPDH 輔媒 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 活性下降，導致葡萄糖代謝過程 GAPDH 催化前之前趨物質產生聚集效應，如圖七，引起四條可能致病之路徑：1. 因 glucose 聚積而加強多元醇 (polyol) 代謝路徑，2. 因 fructose-6-phosphate 聚積而走己醣胺/六碳醣胺 (hexosamine) 代謝路徑，3. 因 glyceraldehyde-3-phosphate 聚積而促使蛋白質激酶 C (protein kinase C ; PKC) 活化，4. 生合成過多的最終醣化產物 (advanced glycation end-products ; AGEs)。高血糖環境下，葡萄糖會透過上述四條途徑，伴隨著 ROS 之生成，造成組織損傷，除此之外超氧陰離子 $O_2^{\cdot-}$ 也會和 NO (nitric oxide) 反應形成 peroxynitrite，及藉硝基酪胺酸等中間產物引發 DNA 及細胞的受損，而 hexosamine 路徑中也會藉由 PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) 和 TGF- β (transforming growth factor- β) 之分泌增加，導致血管容易阻塞，如圖八所示 (Brownlee, 2001 ; Evans *et al.*, 2002 ; 吳, 2009)。以下針對上述四種致病之路徑加以說明。



(Modified from Brownlee, 2001 ; 吳, 2004)

圖七、高血糖誘發粒線體產生過量超氧陰離子 $O_2^{\cdot-}$ 引發致病之途徑

Fig 7. Potential mechanism by which hyperglycaemia-induced mitochondrial superoxide anion overproduction activates four pathways of hyperglycaemic damage. Excess superoxide anion partially inhibits the glycolytic enzyme GAPDH, thereby diverting upstream metabolites from glycolysis into pathways of glucose over utilization. This results in increased flux of dihydroxyacetone phosphate (DHAP) to DAG, an activator of PKC, and of triose phosphates to methylglyoxal, the main intracellular AGE precursor. Increased flux of fructose-6-phosphate to UDP-N-acetylglucosamine increases modification of proteins by O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) and increased glucose flux through the polyol pathway consumes NADPH and depletes GSH. (Brownlee, 2001)



(吳，2009)

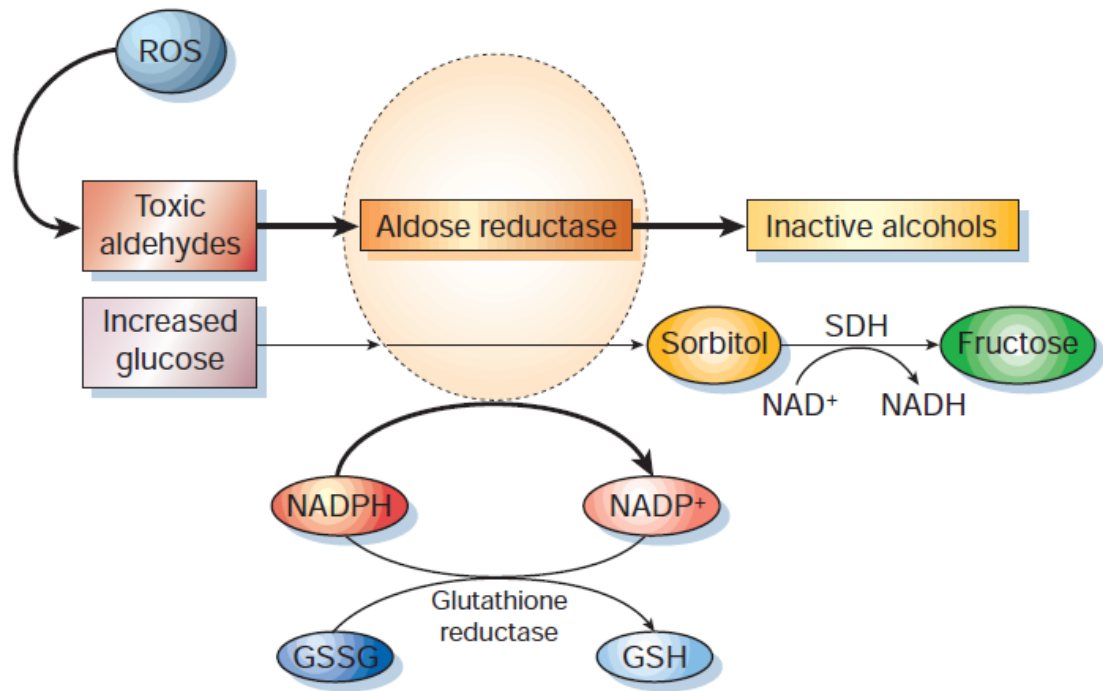
圖八、過量超氧陰離子 $O_2^{\cdot-}$ 誘發糖尿病併發症之途徑

Fig 8. The pathway of overproduction of superoxide anion caused diabetic complications.

1. 高血糖與多元醇代謝路徑

細胞內之葡萄糖經由醛糖還原酶催化下，藉由 NADPH 來還原生成山梨糖醇，而山梨糖醇會進一步被山梨糖醇去氫酶 (sorbitol dehydrogenase ; SDH) 氧化形成果糖，同時伴隨著 NAD^+ 被還原成 NADH，上述路徑稱為多元醇代謝路徑，如圖九所示。醛糖還原酶對葡萄糖之親合性較低，在正常血糖濃度下，葡萄糖經由此代謝路徑只佔小部份，但若於高血糖環境下，細胞內增加的葡萄糖會經由此代謝而形成 sorbitol，同時伴隨著 NADPH 的減少。據研究顯示，於高血糖的情況下經由此代謝路徑的過程，最高能佔葡萄糖氧化代謝總量的 33% (吳，2004)。

多元醇途徑活化使得 sorbitol 堆積，其不易穿透細胞膜，使得細胞內滲透壓增加，且 sorbitol 氧化成 fructose 會提高細胞內 NADH/NAD^+ 比值及 NADPH 含量減少，影響細胞膜正常代謝，研究提到在糖尿病大鼠中發現眼睛水晶體之多元醇途徑造成氧化壓力升高，結果認為其與水晶體引起之視力模糊有關，甚至會引起腎臟、周邊神經、視網膜及水晶體等組織傷害 (Brownlee, 2001 ; Yamagishi and Imaizumi, 2005)。麩胱甘肽還原酶 (glutathione reductase) 之輔酶 NADPH 若消耗過多，使得 GSSG 含量減少而 GSH 合成受阻，增加細胞內不穩定性氧自由基壓力負載 (Nishikawa *et al.*, 2000 ; Brownlee, 2001 ; 吳，2004)。而利用醛糖還原酶



(Brownlee, 2001)

圖九、多元醇代謝路徑及醛糖還原酶

Fig 9. The polyol pathway and aldose reductase. Aldose reductase reduces aldehydes generated by reactive oxygen species (ROS) to inactive alcohols, and glucose to sorbitol, using NADPH as a co-factor. In cells where aldose reductase activity is sufficient to deplete reduced glutathione (GSH), oxidative stress is augmented. Sorbitol dehydrogenase (SDH) oxidizes sorbitol to fructose using NAD⁺ as a co-factor. (Brownlee, 2001)

抑制劑 (aldose reductase inhibitor)可有效預防 NADPH 之消耗，目前 aldose reductase 抑制劑於人體實驗中，如 zenarestat 證實對糖尿病引起之神經病變有效 (Greene *et al.*, 1999)。

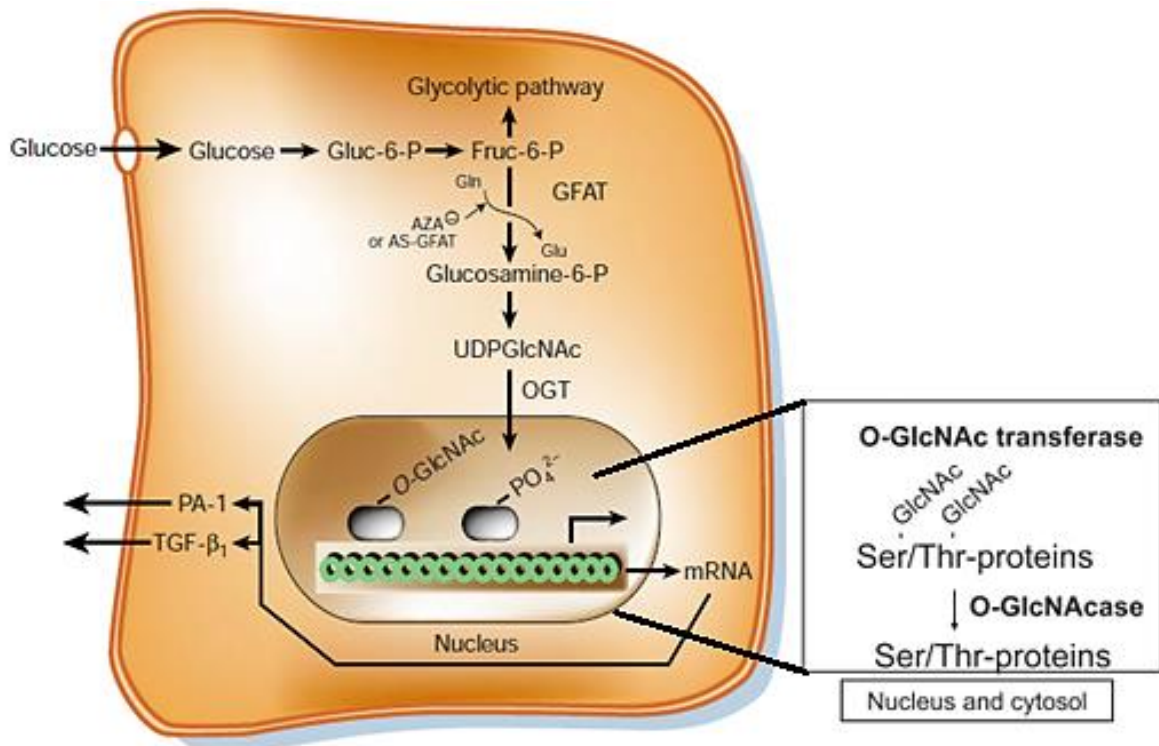
多元醇的最終產物果糖不易代謝，而且比葡萄糖更容易與蛋白質進行醣化作用，形成後期醣化最終產物 AGEs 對身體產生傷害(Brownlee, 2001)。除此之外 sorbitol 的氧化作用提高 NADH/NAD⁺ 比值，而抑制醣解代謝酵素 GAPDH 之活性，使 Glyceraldehyde-3-P 累積，進而產生 AGEs 前驅物 methylglyoxal (MGO) 及 diacylglycerol (DAG, PKC 活化物質)。此途徑也會被高糖誘導之 ROS 生成及 DNA 斷裂所活化，而活化的雙羰基化合物 (dicarbonyls)，會促進醣化作用 (glycation)及後期最終醣化產物(AGEs)之形成 (Wells-Knecht *et al.*, 1995)。因此，高血糖會同時伴隨著醣化作用及氧化壓力，引起更多的併發症。

2.高血糖與己醣胺 (hexosamine) 代謝路徑

正常的血糖濃度下，只有少量 1-3% 葡萄糖會經由 hexosamine 途徑進行代謝，但若細胞內產生過多的葡萄糖就會增加此代謝途徑，進一步引起糖尿病併發症的臨床表現。在此途徑中，因細胞內葡萄糖含量升高使得醣解作用後產生的 fructose-6-phosphate 蓄積量增加，而其在酵素 glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT)催化下進一步被代謝成 glucosamine-6-phosphate，之後於 UDP-N-acetylglucosamine (UDP-

GlcNAc) 存在下受 OGT (*O*-GlcNAc transferase) 作用，將 N-acetylglucosamine (GlcNAc)和蛋白質上之 threonine 或 serine 鍵結，有助於 proteoglycan 合成及形成 *O*-linked glycoprotein，而 *O*-GlcNAc 會修飾轉錄因子造成基因轉錄之改變，轉錄及轉譯一系列之變化而分泌過多的 TGF- β 及 PAI-1 物質，若其分泌量增加時，容易導致血管阻塞 (Brownlee, 2001 ; 吳, 2004)，如圖十。

上述過程說明了葡萄糖藉由己醣胺途徑影響細胞核內轉譯因子，許多細胞核和細胞內蛋白質也會被 *O*-GlcNAc 所修飾調控，造成內皮細胞製造的一氧化氮合成輔酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS)活性降低。據研究證實在血管平滑肌細胞中高血糖可透過調節轉錄因子 Sp1 的結合位置而促進胰島素阻抗性相關轉錄因子 PAI-1、TGF- α (transforming growth factor- α)、TGF- β 之活性的增加 (Hsueh *et al.*, 1998 ; Du *et al.*, 2000)。研究發現老鼠及人類注射 glucosamine 後，會干擾胰島素及 β 細胞對葡萄糖敏感性 (Monauni *et al.*, 2000)。此外，glucosamine 會誘導 H₂O₂ 之增加，且肝臟、脂肪及肌肉組織中過度表現之 GFAT 會造成胰島素阻抗性，然而加入抗氧化劑 N-acetylcysteine 可降低 GFAT 之表現 (Marshall *et al.*, 1991 ; Brownlee, 2001)。因此，高血糖所誘發之己醣胺途徑會影響基因表現及蛋白質功能異常，使細胞對胰島素產生阻抗性，引發糖尿病慢性併發症 (Brownlee, 2001 ; Buse, 2006)。



(Modified from Brownlee, 2001 ; Buse, 2006)

圖十、己糖胺代謝途徑

Fig 10. The hexosamine pathway. The glycolytic intermediate fructose-6-phosphate (Fruc-6-P) is converted to glucosamine-6-phosphate by the enzyme glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT). Intracellular glycosylation by the addition of N-acetylglucosamine (GlcNAc) to serine and threonine is catalyzed by the enzyme O-GlcNAc transferase (OGT). Increased donation of GlcNAc moieties to serine and threonine residues of transcription factors such as Sp1, often at phosphorylation sites, increases the production of factors as PAI-1 and TGF- β 1. AZA, azaserine; AS-GFAT, antisense to GFAT. (Brownlee, 2001)

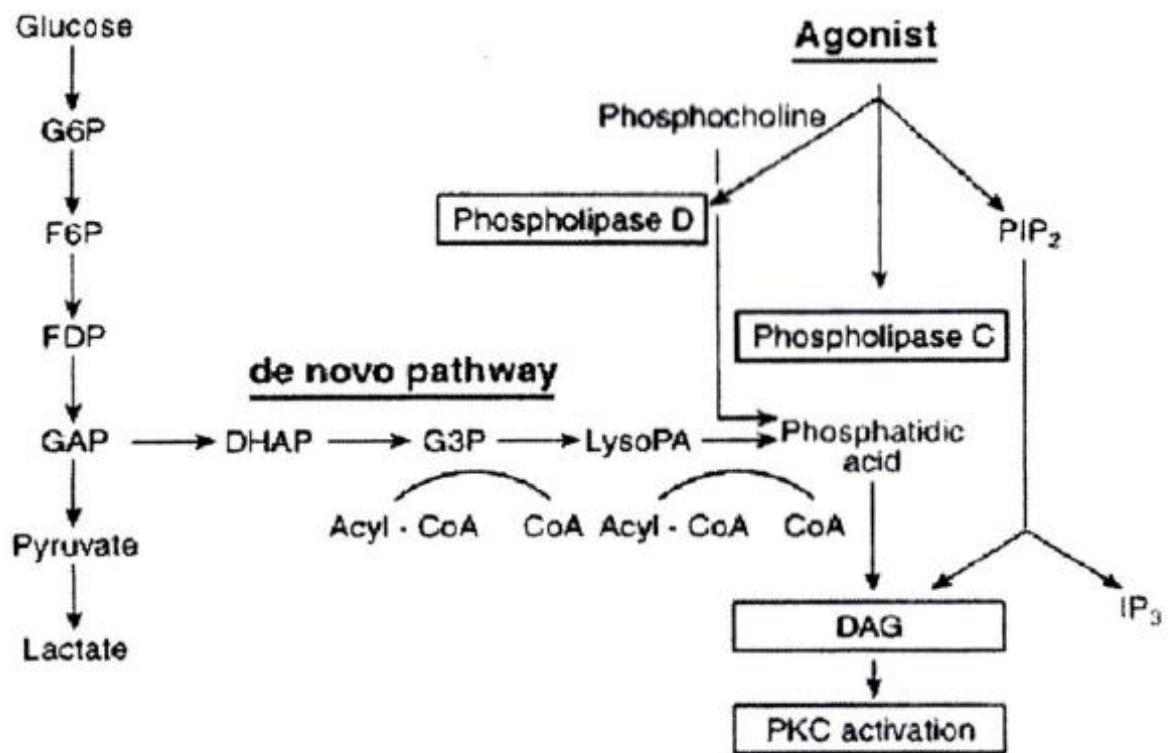
3.高血糖與 protein kinase C (PKC)之活化

PKC 參與細胞的訊息傳遞過程，目前研究已知 PKC 的活化會影響細胞增生及分化、基因表現、腫瘤成長及造成血管受損等。PKC 可被訊息傳遞者 DAG 激活，於動物實驗中得知，於血管內皮細胞、視網膜和腎絲球體中，細胞內的高血糖狀態會使糖解代謝中間產物 DHAP 經還原成 glycerol-3-phosphate 後，並進一步醃化，使 DAG 的生合成增加，而增加的 DAG 會激活上述細胞內之 PKC 輔酶系統的作用(Koya and King, 1998)，如圖十一。

高血糖本身也可經由間接的方式來激活 PKC 系統，如藉由最終醃化代謝產物 AGEs 與細胞表面接受體(AGEs receptor, RAGE)的鍵結，或是多元醇代謝路徑的活化，都可激活 PKC 之表現，而其共同的催化物質推測為極不穩定的游離氧自由基(Keogh *et al.*, 1997 ; Brownlee, 2001)。

最主要的 PKC 系統分為 β - 和 δ - 型式的 PKC 輔酶，在糖尿病動物及人體實驗發現，DAG 之增加造成異常的 PKC 系統活化，使糖尿病併發症相關組織，包括肝臟、肌肉、視網膜、心臟、腎小球等胰島素敏感性降低，PKC 活化也被證實和腎絲球體、平滑肌細胞產生的 NO 量下降有關；PKC 的激活也抑制了原本胰島素對促進內皮細胞一氧化氮合成輔酶 (eNOS)基因之傳遞表現(Kuboki *et al.*, 2000)。糖尿病相關研究也發現 β -型式的 PKC 輔酶活化與視網膜及腎臟血流發生異常有極

Glycolysis



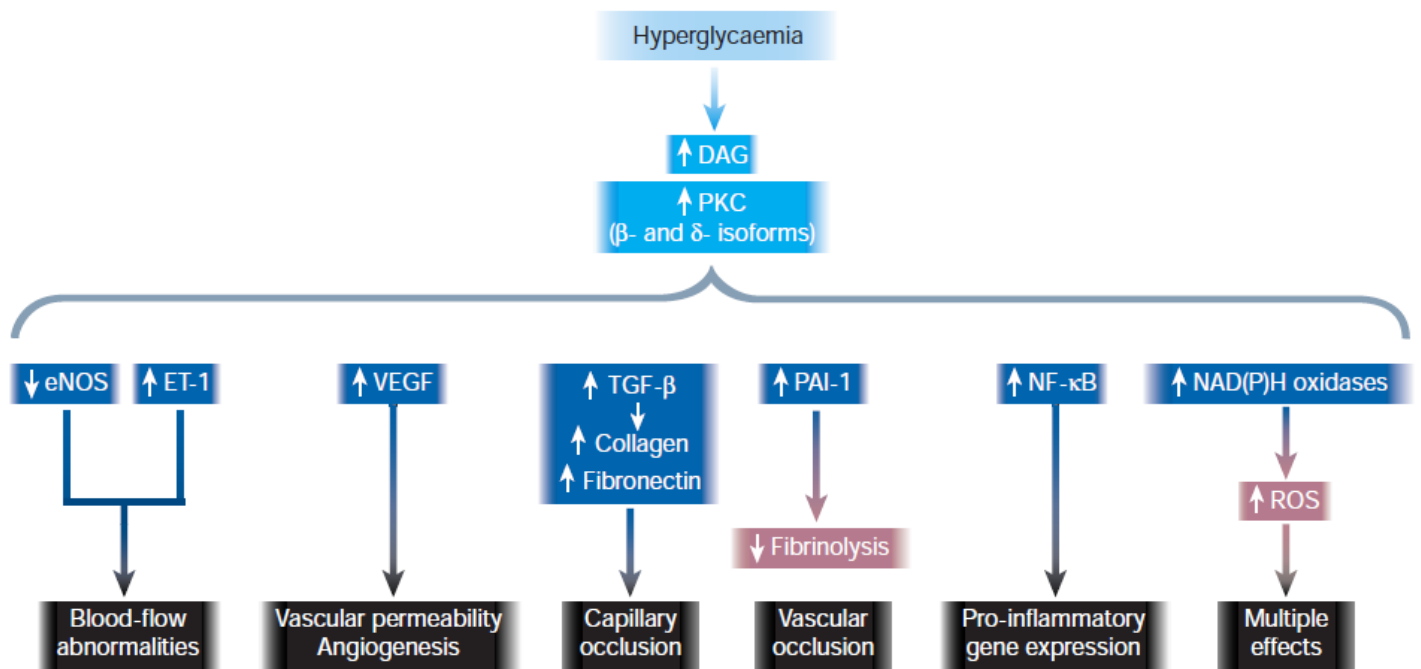
(Koya & King, 1998)

圖十一、高血糖誘發 PKC 活化機制

Fig 11. Activation mechanism of hyperglycemia-induced protein kinase C (PKC). (Koya & King, 1998)

大相關性，學者推測可能因一氧化氮合成降低或內皮收縮素(ET-1：
endothelin-1) 活性增加所致 (Ishii *et al.*, 1996；吳，2004)。

高血糖引發 PKC 系統的活化除了引起一氧化氮及內皮收縮素造成
血流異常的狀況外，也會藉 VEGF (vascular endothelial growth factor) 去
影響血管壁之通透性，同時藉由促進腎絲球體間質細胞 TGF- β 1 的分泌，
使得纖維連接蛋白(fibronectin) 和第四型膠原蛋白形成增加，導致微血
管外的基質蛋白聚積而造成微血管阻塞。同時 PKC 的活化也可能使
PAI-1 分泌增加、NF-K β 之活化和提升 NADPH oxidase 等因子之表現，
引發體內血栓溶解能力下降而增加血管阻塞及一系列發炎反應等不同生
理效應，如圖十二 (Koya and King, 1998；Brownlee, 2001；吳，2004)。
其次，高血糖誘導血管或內皮細胞，會經由活化 NADPH oxidase 生成
ROS，但以 PKC 抑制劑處理後，ROS 會降低，因此當 PKC 受到抑制時，
可降低由高血糖所引起之氧化壓力 (Inoguchi *et al.*, 2000)。動物實驗中也
發現以 β 型 PKC 抑制劑來治療糖尿病時，可以顯著降低視網膜和腎絲
球體內 PKC 系統之活性，改善視網膜血管的循環及腎絲球體間質的過度
增生、矯正腎絲球體的過濾率、減緩蛋白尿之情形等 (Koya *et al.*,
2000)。



(Brownlee, 2001)

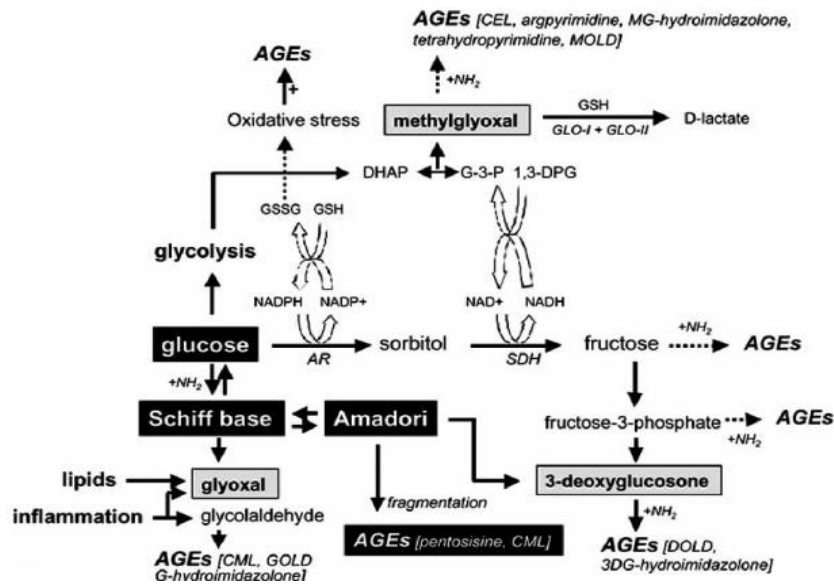
圖十二、高血糖誘發 PKC 活化之效應

Fig 12. Consequences of hyperglycaemia-induced activation of protein kinase C (PKC). Hyperglycaemia increases diacylglycerol (DAG) content, which activates PKC, primarily the β - and δ -isoforms. Activation of PKC has a number of pathogenic consequences by affecting expression of endothelial nitric oxide synthetase (eNOS), endothelin-1 (ET-1), vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor- β (TGF- β) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), and by activating NF- κ B and NAD(P)H oxidases. (Brownlee, 2001)

4.高血糖與最終醣化代謝產物 AGEs

最終醣化代謝產物 (advanced glycation end-products, AGEs)在糖尿病患視網膜血管及腎絲球體中含量有明顯增加的趨勢，而先前研究認為可能源自於非酵素性醣化作用 (glycation)下自然反應形成的，細胞外蛋白質分子上的胺基和葡萄糖之酮基脫水形成 Schiff's base，造成分子重新排列成 Amadori product，而氧化 Amadori product 會生成 AGEs，但後來證實由葡萄糖產生 AGEs 的速率遠低於由細胞內葡萄糖代謝產生之雙羰前趨物質(glucose-derived dicarbonyl precursors) 形成 AGEs 的速率，因此目前認為細胞內高血糖應該是細胞內、外 AGEs 形成最主要原因(吳，2004)。

細胞內的 AGEs 可藉由葡萄糖本身行氧化作用形成 glyoxal，或由 Amadori product 分解成 3-deoxyglucosone，乃至由 glyceraldehyde-3 -phosphate 及 dihydroxyacetone phosphate 裂解成 methylglyoxal 而產生，上述細胞內活躍的雙羰前趨物質 glyoxal、methylglyoxal 和 3-deoxyglucosone 會進一步和細胞內、外蛋白質上的胺基反應而生成 AGEs (Imanaga *et al.*, 2000) (圖十三)。而若於正常血糖濃度下，其產生的量不多時，三種前趨物質都可被還原酶代謝去除，不會有過多的 AGEs 形成，且正常人體內 AGEs 生成是相當緩慢的，因此大多是半衰期 (half-life) 較長的蛋白質容易產生 AGEs 堆積 (Reddy and Beyaz, 2006 ; Uribarri *et al.*, 2006)。



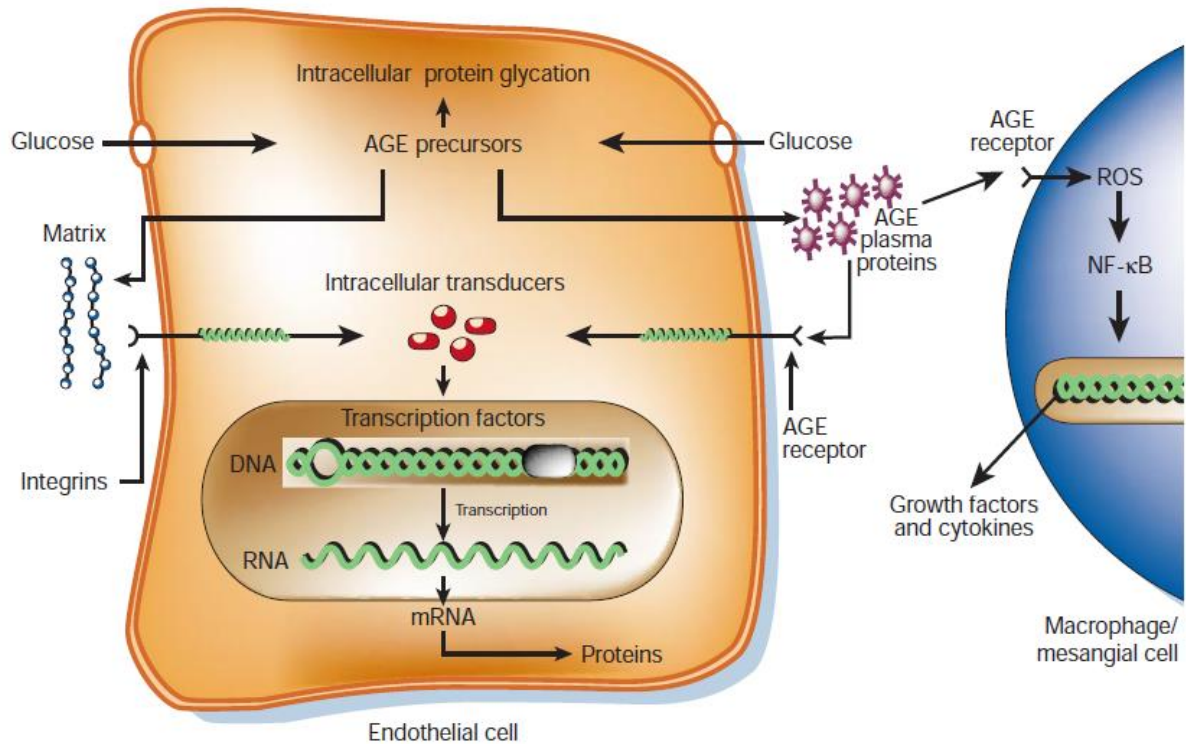
(趙，2010)

圖十三、最終醣化代謝產物之形成

Fig 13. The formation of advanced glycation endproducts. The classical pathway of the Maillard reaction is indicated in black boxes and the reactive dicarbonyl compounds in grey boxes. The initial condensation reaction of glucose with amino groups leads to the formation of Schiff bases, Amadori-products and upon oxidative rearrangements, to AGEs such as N-(carboxymethyl)lysine (CML) and pentosidine. An excess of glucose is also metabolised to sorbitol by aldose reductase (AR), accompanied by increased oxidation of NADPH to NADP⁺. A putative decreased level of NADPH, which is a cofactor for glutathione reductase, may lead to depletion of reduced glutathione and thus to enhanced oxidative stress and the formation AGEs. Oxidation of sorbitol by sorbitol dehydrogenase (SDH) yields NADH and causes an increase in the ratio NADH/ NAD⁺. An important feature of an increase of the ratio NADH/ NAD⁺ is that it inhibits glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and, subsequently, may lead to the accumulation of triose phosphates glyceraldehyde-3-phosphate (G-3-P) and dihydroxyacetone (DHAP). Both trioses, which are also formed in the glycolysis, are precursors of the potent AGE-forming compound methylglyoxal. Methylglyoxal reacts with arginine residues to form the non-fluorescent products 5-hydro-5-methylimidazolone (MG-hydroimidazolone), tetrahydropyrimidine and the major fluorescent product argpyrimidine. Although it has been reported that methylglyoxal primarily reacts with arginine, the methylglyoxal-lysine adducts N-(carboxyethyl) lysine (CEL), and methylglyoxal-derived lysine dimer (MOLD) have been identified. The sorbitol pathway may further increase the level of methylglyoxal by depletion of reduced glutathione (GSH) in the cell, which has a detoxification function in the glyoxalase pathway by facilitating the conversion of methylglyoxal to D-lactate. Fructose and its derivative fructose-3-phosphate, which is produced by the phosphorylation of fructose by fructose-3-phosphokinase, are potent glycating agents. Fructose-3-phosphate is also hydrolysed to 3-deoxyglucosone, which rapidly reacts with protein amino groups to form the AGEs 3DG-hydroimidazolone and the 3-deoxyglucosone-derived lysine dimer (DOLD). Glyoxal and glycolaldehyde are products of autooxidation of glucose or glucose adducts to proteins and may also be formed directly during oxidative degradation of polyunsaturated fatty acids and during myeloperoxidase-mediated degradation of serine at sites of inflammation. These compounds are able to modify the side chains of various amino acids in protein, including those of lysine and arginine, to form several products, such as CML, glyoxal-hydroimidazolone, and the glyoxal-derived lysine dimer (GOLD).

細胞內 AGEs 前驅物可透過三個機轉造成細胞傷害(圖十四), 包括(1) 細胞內蛋白質受 AGEs 修飾後, 原先功能受到結構上改變而出現異常; (2) 經 AGEs 前驅物修飾之胞外基質(matrix)與其他基質相互作用, 並與細胞上之基質受器(integrins)結合而誘發異常的訊號傳導途徑, 進一步干擾細胞應有功能; (3) 血漿蛋白質經 AGEs 修飾後與血管內皮細胞、基質細胞(mesangial cell)及巨噬細胞上之 AGE 受器結合, 於細胞內產生不穩定的 ROS 而活化轉錄因子 NF- κ B 導致異常的基因表現 (Brownlee, 2001; 劉, 2008)。因此當體內葡萄糖含量過高可能透過此路徑, 造成過多的 ROS 生成, 引發疾病的產生。

當血管內皮細胞處在高血糖環境下, 細胞內 AGEs 約一星期內就會產生, 而 AGEs 的形成改變了許多細胞間基質的功能特性, 例如對第一型膠原蛋白而言, 分子間因 AGEs 作用後改變鍵結方式造成間質呈現水腫情況, 同時也改變其所支撐血管的功能, 導致血管壁的通透性增加及大血管壁的彈性降低; 再以第四型膠原蛋白為例, AGEs 會影響內皮細胞和血管壁間基底膜的功能, 導致內皮細胞的附著異常, 上述例子都能進一步證實 AGEs 的形成不僅干擾到基質間的連結反應, 也相對影響到基質和細胞間的反應 (吳, 2004)。相關研究已發現許多和 AGEs 鍵結的細胞受器, AGEs 可藉由與受器反應造成細胞生理反應異常, 如吞噬細胞、腎絲球間質細胞和血管內皮細胞等, 細胞會因此分泌細胞激素



(Brownlee, 2001)

圖十四、AGEs 前驅物造成細胞損傷的三種方式

Fig 14. Mechanisms by which intracellular production of advanced glycation end-product (AGE) precursors damages vascular cells. Covalent modification of intracellular proteins by dicarbonyl AGE precursors alters several cellular functions. Modification of extracellular matrix proteins causes abnormal interactions with other matrix proteins and with integrins. Modification of plasma proteins by AGE precursors creates ligands that bind to AGE receptors, inducing changes in gene expression in endothelial cells, mesangial cells and macrophages. (Brownlee, 2001)

(cytokine) 和生長因子而造成後續的不良反應，如 IL-1、insulin-like growth factor-I、tumor necrosis factor- α 、TGF- β 等，同時也會使血管內皮細胞產生血管栓塞、發炎性之物質（如 thrombomodulin、tissue factor、VCAM-1 等）和增加血管壁的通透性。相關動物實驗中研究阻斷 AGEs 和受器之鍵結，已證實有正面的效果，能抑制糖尿病腎病變的發展和加速糖尿病傷口的癒合等 (Park *et al.*, 1998；吳，2004)。

由於 AGEs 產生組織內自由基速率比沒有經醣化效應的蛋白質快很多，因此其與糖尿病併發症具有相關性(劉，2008)。動物實驗中得知，使用 AGEs 抑制劑可阻止糖尿病在視網膜、腎臟上產生小血管疾病之結構和功能上的變化 (Souli-Liparota *et al.*, 1991)。在臨床試驗中，第 1 型糖尿病合併有蛋白尿的患者，使用 AGEs 抑制劑 aminoguanidine 後，可降低尿蛋白的量和減緩腎病變，同時也可減緩糖尿病視網膜病變的惡化 (Abdel *et al.*, 2002)。

AGEs 會對人體帶來細胞及組織間傷害，抑制 AGEs 與補充抗氧化劑為目前預防及減緩老化或糖尿病併發症的策略，而審視國內外對於抑制醣化作用之研究，尚有幾種已被證實具抑制 AGEs 形成之活性，包括藥理成分 aminoguanidine (AG)、carnosine、ALT-711、pyridoxamine 及已被確效具抗氧化之成分 vitaminB₁、C、E、lipoic acid 等 (Booth *et al.*, 1996；Vinson *et al.*, 1996；Krone and Ely, 2004)。除此之外，尚有文獻探討多酚

類如類黃酮及酚酸化合物，對蛋白質醣化之抑制效應，研究證實蛋白質醣化過程會伴隨氧化自由基生成，而類黃酮化合物抑制醣化之特性與其清除醣化過程所衍生出的自由基間有顯著相關，因此推測類黃酮抑制醣化作用機制應與本身之抗氧化性有關；另外高濃度葡萄糖會誘導 LDL 氧化及醣化修飾，而類黃酮單體可結合於 LDL 上並助於提高脂蛋白抵禦醣化毒性物質 (glycotoxins) 所引發之負面效應，抗醣化活性中以 epigallocatechin gallate (EGCG)、rutin、luteolin 及 quercetin 尤佳；酚酸化合物也在相關研究上證實能抑制醣化反應，以甲氧基酚酸化合物 (methoxyphenolic acids) 具有較佳之抗醣化活性 (Wu and Yen, 2005)。

目前用於糖尿病血糖控制的治療方法中，並無法完全預防相關併發症，糖尿病患者不管如何控制血糖值，有些患者依舊會發生大、小血管併發症，而這部分歸因於高血糖是以某種致病機轉來引發細胞或血管的傷害，因此許多研究提出多種討論，包括高血糖引發多元醇代謝路徑中之酵素 aldose reductase 而產生過多 sorbitol 蓄積、不可逆之醣化最終產物 AGEs 之形成影響組織代謝、高血糖藉活化 DAG 及 PKC 輔酶系統導致細胞內訊息傳導障礙、己醣胺途徑會影響基因之表現及蛋白質功能異常等，在上述機轉中，共同根源極有可能是粒線體內之不穩定性過氧化物超氧陰離子自由基。

目前有研究嘗試以上述代謝過程之拮抗劑，例如 aldose reductase 抑制劑阻止 sorbitol 體內堆積、AGEs 形成之抑制劑 aminoguanidine 藥物、PKC 輔酶系統拮抗劑等，治療糖尿病相關併發症，結果均顯示出一些正面之效果，而近年來從大型臨床試驗也得知糖尿病患血糖控制的情形與併發症的發生和進展有絕對關聯性 (Greene *et al.*, 1999 ; Saltiel *et al.*, 2001 ; Wagner, 2002 ; 吳, 2004)。

(三) 抗氧化系統

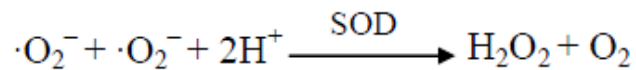
活性氧會對細胞造成氧化傷害，但生物體內有天然抗氧化防禦系統可保護細胞，降低 ROS 帶來的傷害，而其防禦系統可分為酵素性抗氧化作用 (enzymetic antioxidation) 及非酵素性抗氧化作用 (non-enzymetic antioxidation)，如圖十五 (Carocho *et al.*, 2013)。其中酵素性抗氧化作用包括：超氧歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、麩胱甘肽過氧化酶 (glutathione peroxidase, GPx)、麩胱甘肽還原酶 (GR)、觸酶 (catalase, CAT)、一氧化氮合成酶 (NOS) 等；而非酵素性抗氧化作用成分有維生素 C (ascorbic acid)、維生素 E (α -tocopherol)、麩胱甘肽 (glutathione)、輔酶 Q₁₀ (coenzyme Q₁₀)、類胡蘿蔔素 (carotenoids)、多酚類 (polyphenols) 等。

1.體內酵素性抗氧化作用

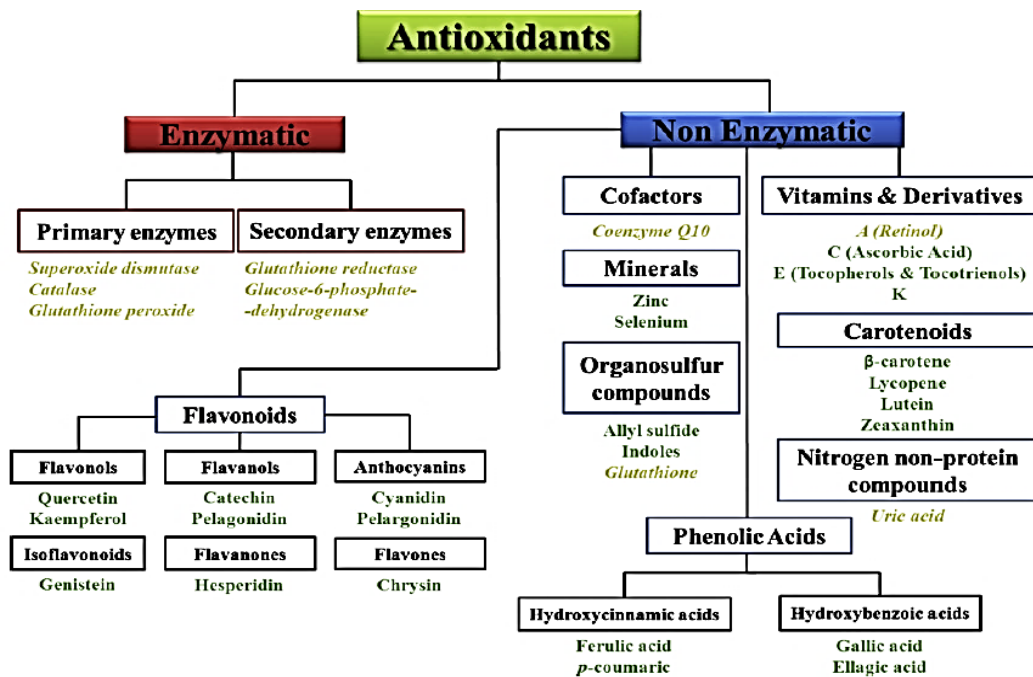
生物體內酵素性抗氧化系統，可保護細胞免受自由基傷害，如圖十六。

a. 超氧歧化酶

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



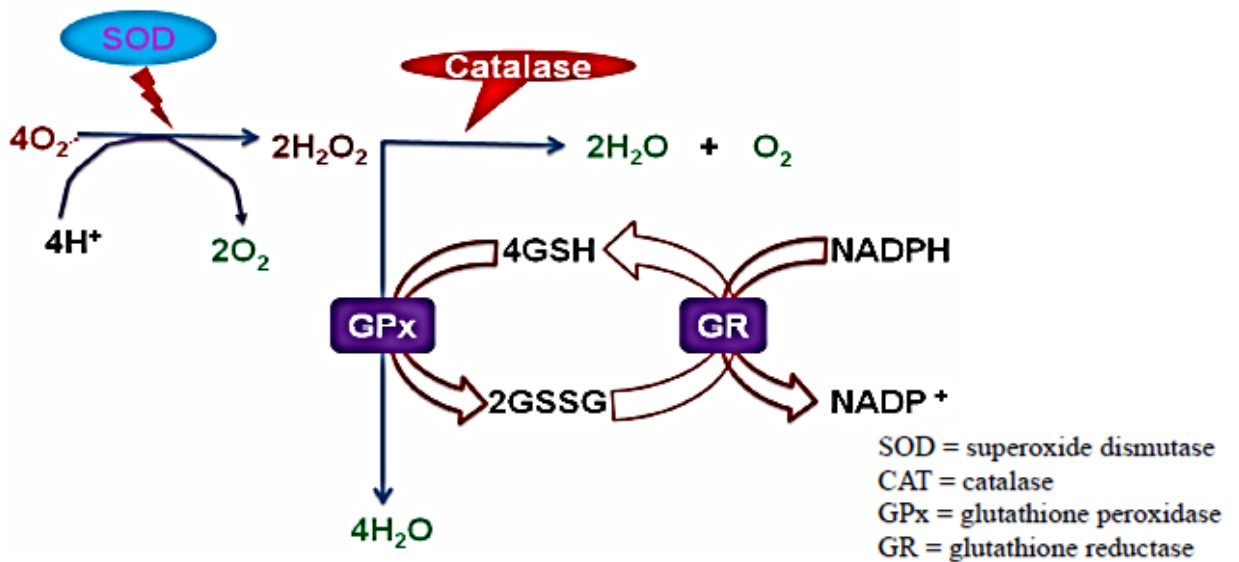
SOD 需要金屬離子的輔助才能作用，其酵素活性由金屬離子輔基 (prosthetic group) 決定，根據所結合的金屬離子可分為三類：(1) Cu-Zn SOD，(2) Mn SOD，(3) Fe SOD。其中 Cu-Zn SOD 主要存在於真核生物之細胞質、溶酶體、細胞核及粒線體的內外膜間，為細胞主要的 SOD 形式 (Fridovich, 1995)；Mn SOD 則主要存在於真核生物之粒線體內；而 Fe SOD 主要存在於原核生物和植物葉綠體中，動物組織無此形式。



(Carocho *et al.*, 2013)

圖十五、天然抗氧化物之分類

Fig 15. Natural antioxidants separated in classes.



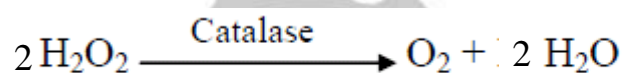
(Finosh *et al.*, 2013)

圖十六、細胞抗氧化酵素之防禦系統

Fig 16. Cellular antioxidative enzymatic defense system.

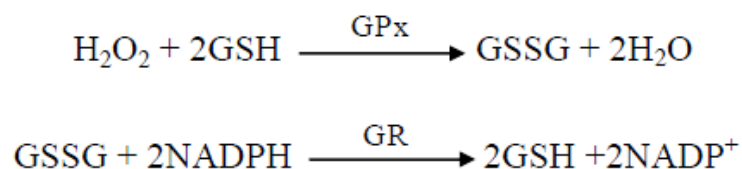
b. 觸酶

Catalase 屬於 Fe^{3+} - heme protein，大多存在細胞的過氧化小體 (peroxisomes) 內，能將過氧化氫 (H_2O_2) 催化為水分子 (H_2O) 與氧分子 (O_2)，然而在許多細胞內如肝細胞、內皮細胞、神經細胞等，其 catalase 含量不足以清除體內所產生的過氧化氫，因此必須依賴 GSH-Px 來協同清除過氧化氫，以保護細胞不受氧化傷害 (Meyer *et al.*, 1995)。其反應式如下：



c. 麩胱甘肽過氧化酶

Glutathione peroxidase 一般多存在於血液、肝臟、粒線體及細胞質中，需要硒 (selenium) 作為 cofactor (Jacob, 1994)。作用機制為將還原態的 glutathione (GSH) 氧化為氧化態的 glutathione (GSSG) 來清除過氧化氫。另有 glutathione reductase (GR) 以 NADPH 為還原力來源，催化 GSSG 再生成 GSH，其反應式如下：



2. 非酵素性抗氧化作用

a. 維生素

(1) 維生素C (抗壞血酸, ascorbic acid)

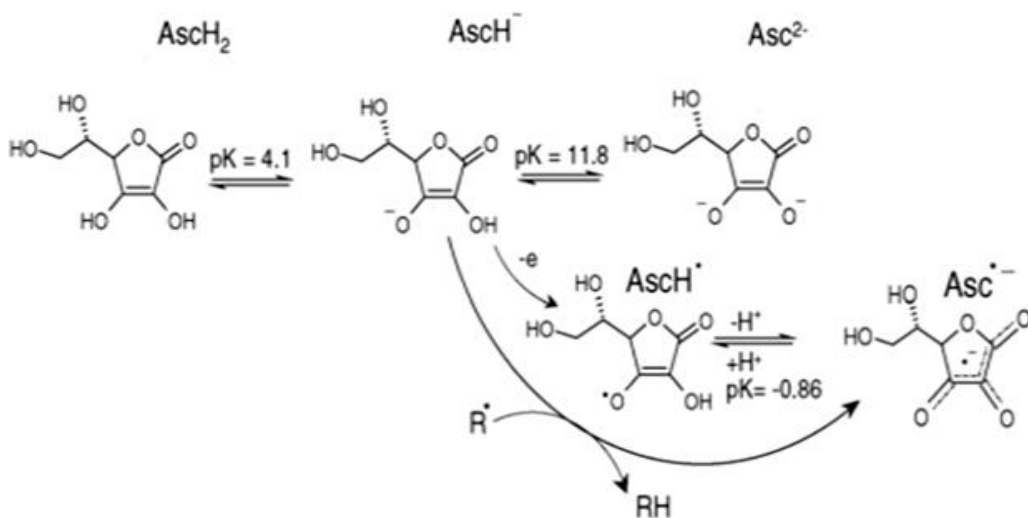
維生素C為一種水溶性物質，主要存在於體內水溶性部分如血漿與細胞間質內。抗氧化機制在於其 C-2 和 C-3 上有兩個羥基 (hydroxyl group)，可提供質子給自由基使其穩定，自身轉變為半脫氫抗壞血酸 (semidehydroascorbic acid) (Beyer, 1994)。不同型態的抗壞血酸與自由基的反應，如圖十七。若於細胞內，可經由麩胱甘肽或 NADPH 還原再生成具抗氧化活性的還原態 (Jacob *et al.*, 1996)。除此之外，維生素C可還原生育醇至抗氧化狀態，在細胞內就能以此種相乘性的抗氧化作用預防膜和脂蛋白受到ROS氧化性傷害 (Aruoma, 1994; Beyer, 1994)。但若體內血漿中維生素C的濃度過高，或在組織受傷後之環境中有較高濃度金屬離子，維生素C反而會產生促氧化作用，進而導致活性氧分子如羥自由基的生成 (Halliwell *et al.*, 1995)。

(2) 維生素E (生育醇, tocopherol)

生育醇為脂溶性維生素，是使用廣泛的抗氧化劑。其可分為四型 (α 、 β 、 γ 、 δ)，抗氧化作用 $\delta > \beta \geq \gamma > \alpha$ ，其中以 γ 型在自然界中分佈最多 (Kamal-Eldin *et al.*, 1996)。當維生素E 受到脂質自由基攻擊時，會將酚基上的質子轉移給脂質過氧化的 peroxy and alkoxy radicals，而本身形成共振結構而呈穩定的狀態，進而阻斷自由基連鎖反應及生物體膜上脂質的過氧化反應。維生素E 抗氧化機制如下：



因此，維生素E 可抑制活性氧分子誘導產生脂質過氧化自由基，且避免生物膜上不飽和脂肪酸的過氧化、血漿中極低密度脂蛋白的氧化及對細胞 DNA 和蛋白質的傷害 (Traber *et al.*, 2007)。



(Valko *et al.*, 2006)

圖十七、不同型態抗壞血酸與自由基之反應

Fig 17. Various forms of ascorbic acid and its reaction with radicals (R•).

b. 類胡蘿蔔素 (carotenoids)

Carotenoids 具多重共軛雙鍵之長鏈多烯結構，能抑制單旋態氧及捕捉過氧化自由基，以終止自由基連鎖反應。例如 β -胡蘿蔔素(β -carotene) 因具有共軛雙烯(conjugated dienes)結構，因此可與過氧化自由基作用形成穩定的共振結構，來抑制脂質過氧化反應的發生(Aruoma, 1994)。Carotenoids 的自由基清除能力依結構而定，例如結構上共軛雙鍵長度及 β -ionone環上銜接之官能基種類，當共軛雙鍵數越多，則自由基清除能力越強；又如茄紅素(lycopene)含 11 個共軛雙鍵，其中又以順式結構具有較強的清除自由基及終止單旋態氧的能力 (Anguelova *et al.*, 2000)。

c. 輔因子 (cofactor)

(1) 輔酶Q₁₀ (coenzyme Q₁₀)

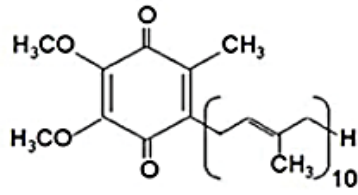
輔酶Q₁₀又稱泛醌 (ubi-quinone)，存在於人體每一個細胞之粒線體中，為內生性脂溶醌類化合物，可由食物中獲取來源，但主要以內生性為主，coenzyme Q 有多種形態，包括CoQ₁~CoQ₁₃，而人體中主要存在的型態是coenzyme Q₁₀，因其聚異戊烯基聚合度為10因此命名 (Ernster *et al.*, 1995 ; Parmar *et al.*, 2015)。

CoQ₁₀ 主要功能為粒線體酵素進行三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 合成之輔酶，負責電子傳遞鏈中電子的接收和傳遞，將碳水化合物與脂肪酸之能量轉換為ATP，因此人體中各組織與器官之

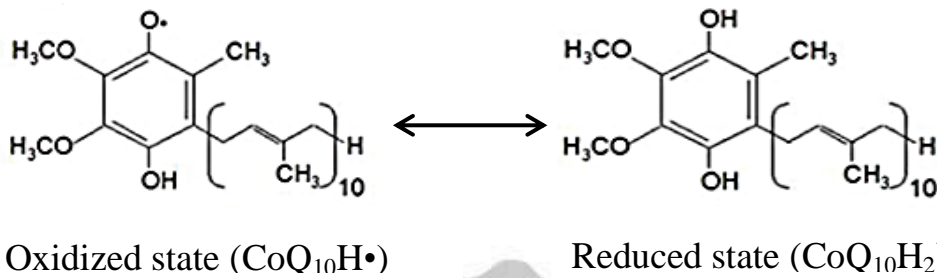
能量轉換代謝能維持正常運作需依靠CoQ₁₀的存在(Crane, 2001)。而抗氧化方面，CoQ₁₀H₂ (還原態之CoQ₁₀)為細胞膜上之有效抗氧化劑，可提供質子，保護細胞膜不受自由基攻擊。CoQ₁₀H• (氧化態之CoQ₁₀)可於粒線體電子傳遞鏈中再被還原成CoQ₁₀H₂的型態，且終止脂質過氧化連鎖反應 (Weber *et al.*, 1994 ; Gopi *et al.*, 2014)，其結構如圖十八所示，CoQ₁₀H₂終止脂質過氧化反應如下：



CoQ₁₀在體內的含量於20歲時達到尖峰，而隨年齡的增長，粒線體DNA受內源性氧自由基的傷害，體內自主合成之CoQ₁₀濃度降低，細胞能量供給受到影響，導致體內各細胞代謝功能下降，而對高耗能的心臟而言，代謝功能下降的特別嚴重，身體出現的老化現象也更加明顯 (Ernster *et al.*, 1993)。



Coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀)



Oxidized state (CoQ₁₀H•)

Reduced state (CoQ₁₀H₂)

(Ernster and Dallner, 1995)

圖十八、輔酶Q₁₀結構式

Fig 18. Structures of coenzyme Q₁₀.

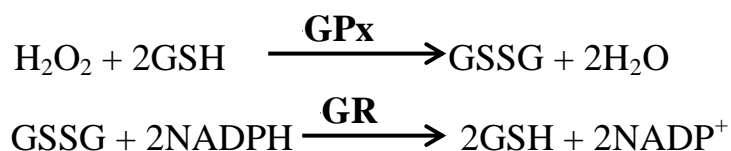
d. 有機硫化物 (organosulfur compound)

(1) 麩胱甘肽

GSH 是由麩胺酸 (glutamic acid)、半胱胺酸 (cysteine) 及甘胺酸 (glycine) 等三種胺基酸所組成，廣泛存在於動植物與微生物細胞中，是細胞內含量最豐富之小分子硫化物，在細胞抗氧化系統中為一個重要之成分 (Sen, 1997; Wu *et al.*, 2004)。其抗氧化機制為GSH 的cysteine 具有高度親核性 (nucleophilic) 的側鏈硫氫基 (sulfhydryl group)，提供電子給活性氧或自由基分子將其還原，氧化後形成之 GS• 可與 GS• 形成氧化態的 GSSG，再進一步藉 NADPH-dependent glutathione reductase

還原為 GSH，以終止自由基連鎖反應，降低活性氧對細胞的傷害

(Knapen *et al.*, 1999)。其反應式如下：

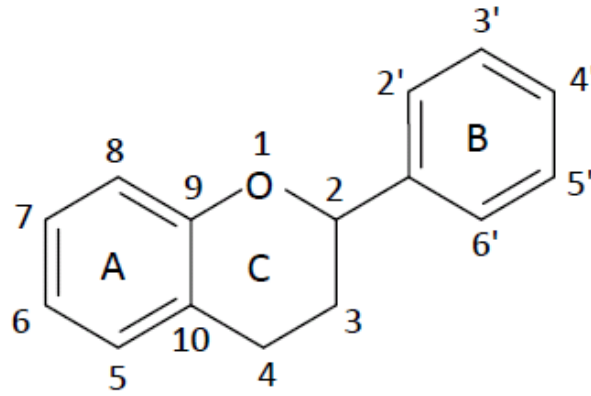


e. 多酚類

Polyphenols 為植物中廣泛存在的成分，目前已知種類至少超過 40,000 種，其酚型結構上帶有數個羥基，其羥基與體內的抗氧化作用息息相關，主要種類包括類黃酮 (flavonoids)、酚酸 (phenolic acids) 及鞣質 (tannins) 等，以下為幾種主要酚類化合物：

(1) 類黃酮

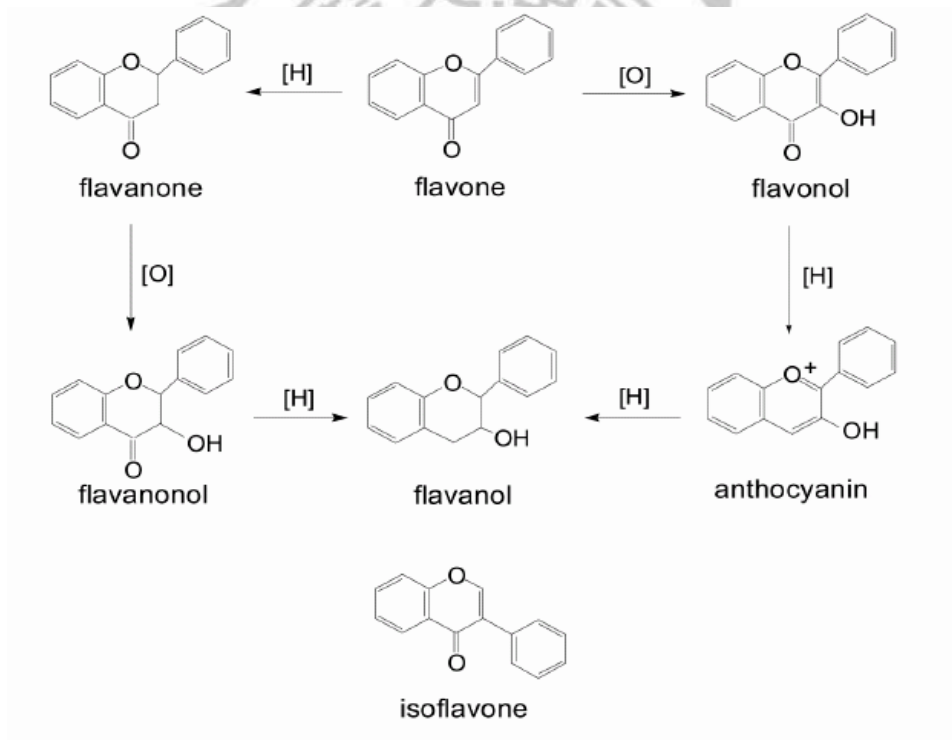
類黃酮屬水溶性化合物，由三個環狀結構的 diphenyl propane ($\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$) 型式所構成，如圖十九，又稱生物類黃酮，為多酚類化合物含量最豐富者，廣泛存在於植物組織中，依結構差異可分為黃酮 (flavones)、黃酮醇 (flavonols)、黃烷酮 (flavanones)、黃烷醇 (flavanols)、異黃酮 (isoflavones)、黃烷酮醇 (flavanonols)、花青素配質 (anthocyanidins) 及查酮 (chalcones) 等八大類，如圖二十及表十，主要是依其含氧雜環上的氧化程度來區分。



(Cook *et al.*, 1996)

圖十九、類黃酮之基本結構圖

Fig 19. Structure of flavonoid.



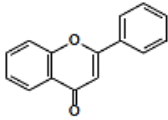
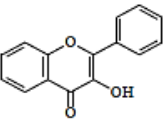
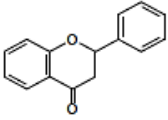
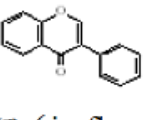
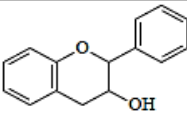
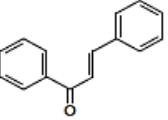
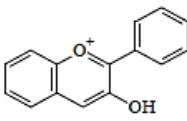
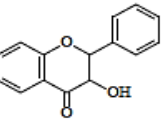
(Cook *et al.*, 1996)

圖二十、類黃酮衍生物之化學結構

Fig 20. The chemical structures of flavonoid derivatives.

表十、類黃酮衍生物之抗氧化性

Table 10. The antioxidative activities of flavonoid derivatives

類黃酮類別	抗氧化性特徵
 <p>黃酮 (flavones)</p>	<p>* 此結構為在 C 環有 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 > apigenin > chrysin</p>
 <p>黃酮醇 (flavonols)</p>	<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 > myricetin > morin > kaempferol</p>
 <p>黃烷酮 (flavanones)</p>	<p>* 抗氧化性: taxifolin > naringenin > hesperitin > hesperidin > 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>
 <p>異黃酮 (isoflavones)</p>	<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>
 <p>黃烷醇 (flavanols)</p>	<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 > catechin</p>
 <p>查酮 (chalcones)</p>	<p>* butein, phloretin, phloridzin 屬之。</p> <p>* 從甘草的成分可分離出具有抗氧化性的物質 lichalcone A。</p> <p>* 具有潛在抗氧化性, dihydrochalcone > chalcone</p>
 <p>花青素配質 (anthocyanidins)</p>	<p>* 抗氧化性: cyanidin > cyanidine-3-β-D-glucoside</p> <p>* Cyanidin 以 flavylium cation 的形式存在時抗氧化性較佳 (pH2 > pH4 > pH7), B 環結構影響抗氧化性。</p> <p>* Cyanidin = dephindin > malvidin > pelargonidin</p>
 <p>黃烷酮醇 (flavanonols)</p>	<p>* 抗氧化性類似 flavanones, 與 OH 的數目及取代位置有關。</p> <p>* taxifolin, fustin 屬之。</p>

(Cook *et al.*, 1996)

大多數類黃酮會與醣類形成配醣體而以醣苷(glycosides)的形式存在，經過酸、鹼及熱水解後可產生配質(aglycones)和醣基，而 flavonoid glycosides 的抗氧化性比 flavonoid aglycones 來得弱，因此證實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 *et al.*, 2000)。

類黃酮的抗氧化活性與其結構具有關聯性，其中羥化作用之位置及程度決定其抗氧化活性高低：(1) 在A 環 5、7 位置上有羥基，則能延長結構的共軛系統。(2) 若在 B 環上 3、4 位置有鄰位雙羥基(ortho-dihydroxy)，對過渡金屬離子(Cu^{2+} 、 Fe^{2+})則具有螯合作用，能間接抑制脂質過氧化反應。(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，具清除自由基與螯合金屬離子的能力。多篇文獻研究類黃酮具清除自由基的能力，為天然的抗氧化劑，也能抑制癌細胞增生、預防心血管疾病、老年癡呆等 (Cook and Samman, 1996)。

(2) 酚酸

酚酸依結構不同大致可分為苯甲酸 (benzoic acid)及肉桂酸 (cinnamic acid)兩大類，兩者之羥基衍生物廣泛存在於植物中，就抗氧化性而言，雙羥基衍生物優於單羥基衍生物，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，但若第二個羥基位於苯環的鄰位或對位上，則抗氧化性會增強。此外，研究顯示許多酚酸如 caffeic acid、ferulic acid等皆具抑制低密度脂蛋白(LDL)氧化的能力 (Nardini, M *et al.*, 1995 ; Chalas *et al.*, 2001)。

(3) 鞣質

Tannins 存在於多種植物性食品及動物飼料中，一般可分為 hydrolyzable 及 condensed tannins (proanthocyanidins，原花青素)。而植物中的 tannins 大多屬於 hydrolyzable tannins 類型，其分子量約 500-3000 dalton，若分子量低於 500 dalton 或高於 3000 dalton 是不具功能的tannins (Hong *et al.*, 1995)。其抗氧化性在於苯環上之 hydroxyl group，可清除自由基防止脂質過氧化 (Yokozawa *et al.*, 2000)，且容易與過渡金屬離子 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 螯合，所形成的 Fe^{2+} -Tannin 複合物可防止羥自由基的氧化傷害 (Lopes *et al.*, 1999 ; Lodovici *et al.*, 2001)。其反應式如下：



此外，尚有研究提出 tannins 與其水解物如鞣酸 (tannic acid)、沒食子酸 (gallic acid) 及鞣花酸 (ellagic acid) 等具有抗致突變性 (Horn and Vargas, 2003)。

(四) 抗氧化成分與糖尿病

糖尿病患體內由於長期處於高血糖狀態，會因而誘發前部分所提起的四種高血糖誘導 ROS 生成機制，所以從減低糖化反應作用的角度來抑制氧化壓力的發生，能夠保護細胞及組織免受傷害。而四種 ROS 生成機制的根源為粒線體中超氧陰離子的增加，因此預防粒線體的氧化壓力損傷也被認為是治療糖尿病及併發症的目標之一(Green *et al.*, 2004)。

由於主要分泌胰島素的胰島 β 細胞內抗氧化酵素含量較低，對於高血糖所引發之 ROS 也較為敏感，因此會影響胰島 β 細胞調控胰島素基因之表現而導致其分泌胰島素失常 (Lenzen *et al.*, 1996 ; Tiedge *et al.*, 1997)。人體的細胞雖然易受 ROS 攻擊，但可透過體內的抗氧化酵素 SOD、catalase、GPx 等防禦系統來清除(Ceriello, 2003)。有研究指出，第一型糖尿病患血漿中抗氧化能力比一般健康的人低16%，而以鏈佐黴素(streptozotocin, STZ) 誘導之糖尿病大鼠中發現，其腎臟內抗氧化酵素 SOD及catalase 有降低之趨勢 (Vessby *et al.*, 2002)。此外，糖尿病患及糖尿病大鼠體內維生素C、E 及 β -胡蘿蔔素有明顯不足現象，而這些抗氧化之維生素可降低其體內之氧化壓力 (Rahimi *et al.*, 2005)。現今許多研究也陸續以植物中的抗氧化成分，如類黃酮、酚酸等，致力於糖尿病及其併發症之治療，且具有良好之效果。

參、材料與方法

一、實驗材料

(一) 樣品來源

本實驗樣品為臺東農業改良場選育之新品種台東 1 號、台東 2 號及 3 號樹豆 (*Pigeon pea, Cajanus cajan* (L.) Mill sp.)，購自台東縣中小企業協會楊卿偉理事長，樣品利用磨粉機磨碎後，以 70 mesh 過篩得到樹豆乾燥粉末以備用。

(二) 實驗試藥與溶劑

1. 調節血糖相關酵素及蛋白質醣化抑制試驗之試藥

品名	廠商
α -amylase (1663 U/mg protein)	Sigma-Aldrich (USA)
Potato starch	Sigma-Aldrich (USA)
Potassium phosphate, monobasic (KH_2PO_4)	J.T.Baker (USA)
Sodium phosphate, anhydrous (Na_2HPO_4)	J.T.Baker (USA)
Sodium chloride (NaCl)	Sigma-Aldrich (USA)
Sodium potassium tartrate tetrahydrate	Sigma-Aldrich (USA)
Sodium hydrate (NaOH)	Sigma-Aldrich (USA)
3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)	Sigma-Aldrich (USA)
Acarbose	Sigma-Aldrich (USA)
<i>p</i> -nitrophenyl α -D-glucopyranoside (<i>p</i> NPG)	Sigma-Aldrich (USA)
α -glucosidase (86 U/mg protein)	Sigma-Aldrich (USA)
L-glutathione reduced (GSH)	Sigma-Aldrich (USA)
Sodium carbonate (Na_2CO_3)	Sigma-Aldrich (USA)

Human recombinant aldose reductase	Wako (Japan)
β -nicotinamide adenine dinucleotide 2'-phosphate reduced tetrasodium salt hydrate (β -NADPH)	Sigma-Aldrich (USA)
DL-glyceraldehyde	Sigma-Aldrich (USA)
Quercetin	Sigma-Aldrich (USA)
D-(+)glucose	Sigma-Aldrich (USA)
Bovine serum albumin (BSA)	Gibco (USA)
Trichloroacetic acid (TCA)	Riedel-de Haën (Germany)
Aminoguanidine hydrochloride	Sigma-Aldrich (USA)

2. 抗氧化試驗之試藥

品名	廠商
Gallic acid	Sigma-Aldrich (USA)
Folin-Ciocalteu's phenol reagent	Sigma-Aldrich (USA)
Sodium carbonate (Na_2CO_3)	Sigma-Aldrich (USA)
Quercetin	Sigma-Aldrich (USA)
Aluminium nitrate ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)	J.T.Baker (USA)
Potassium acetate (CH_3COOK)	J.T.Baker (USA)
6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-2,2 carboxylic acid (Trolox)	Sigma-Aldrich (USA)
2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)	Sigma-Aldrich (USA)
Peroxidase from horseradish	Sigma-Aldrich (USA)
Hydrogen peroxide (H_2O_2)	Riedel-deHaën (Germany)
Butylated hydroxyanisole (BHA)	Sigma-Aldrich (USA)
2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH)	Fluka (Switzerland)

Linoleic acid	Sigma-Aldrich (USA)
Tween-20	聯工化學公司 (Taiwan)
Ammonium thiocyanate (NH ₄ SCN)	關東化學公司 (Japan)
Iron(II) chloride tetrahydrate(FeCl ₂ • 4H ₂ O)	林純藥工業公司(Japan)
Butylated hydroxytoluene (BHT)	Sigma-Aldrich (USA)
L(+)-ascorbic acid	Merck (Germany)
α-tocopherol	Sigma-Aldrich (USA)
2-deoxy-D-ribose	Sigma-Aldrich (USA)
Iron(II) sulfite (FeSO ₄)	Sigma-Aldrich (USA)
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma-Aldrich (USA)
2-Thiobarbituric acid (TBA)	Sigma-Aldrich (USA)

3. 類黃酮化合物組成分析所需試藥

品名	廠商
Catechin, analytical standard	Chromadex (USA)
Epigallocatechin gallate (EGCG)	Fluka (Switzerland)
Cyanidin-3-glucoside, analytical standard	Chromadex (USA)
Genistein, analytical standard	Sigma-Aldrich (USA)
Orientin, analytical standard	Chromadex (USA)
Vitexin, analytical standard	Chromadex (USA)
Quercetin ≥ 98%	Sigma-Aldrich (USA)
Apigenin, analytical standard	Sigma-Aldrich (USA)
(±)-Pinostrobin ≥ 99%	Sigma-Aldrich (USA)
Benzoic acid ≥ 98.5%	Sigma-Aldrich (USA)
Ellagic acid ≥ 95%	Sigma-Aldrich (USA)

4. 溶劑

品名	廠商
Ethanol (HPLC 級)	Sigma-Aldrich (USA)
Methanol (HPLC 級)	Mallinckrodt (USA)
Formic acid (HPLC 級)	Sigma-Aldrich (USA)
Dimethyl sulfoxide (分析級)	Sigma-Aldrich (USA)

二、儀器設備

(一) 高效液相層析儀 (HPLC)

管柱：購自美國 Agilent 公司，Eclipse Plus C₁₈ 管柱(4.6x250mm)，

填充物顆粒大小 5 μm

幫浦：日本 Shimadzu 公司 LC-10AT 型

自動注射器：日本 Shimadzu 公司 SIL-9A 型

光電二極體陣列偵測器：日本 Shimadzu 公司 SPD-M20A 型

線上自動除氣裝置：美國 Phenomenex 公司 DG-4400 型

資料處理：日本 Shimadzu 公司 Class-VP chromatography data system

(二) 超高速離心機

台灣 Hitachi 公司 Himac CF-15R 型

(三) 旋轉式減壓濃縮機

濃縮器：瑞士 Buchi 公司 RE111 型

水浴槽：瑞士 Buchi 公司 461 型

抽真空幫浦：日本 Tokyo Rikakikai 公司 A-3S 型

冷卻循環機：台灣 Firstek Scientific 公司 B403L 型

(四) 超音波震盪機

澳洲 Power Sonic 公司 420 型

(五) 紫外-可見光分光光度計

日本 Hitachi 公司 U-2001 Spectrophotometer

(六) Vortex Mixer

美國 Thermolyne 公司產品，型號 37600 Maxi Mix II

(七) 旋轉式磁石攪拌器

美國 Corling 公司產品

(八) ELISA Reader

美國 Thermo 公司產品，型號 MRX II

(九) 多功能螢光分子偵測系統

美國 Perkin Elmer 公司，型號 Victor X2

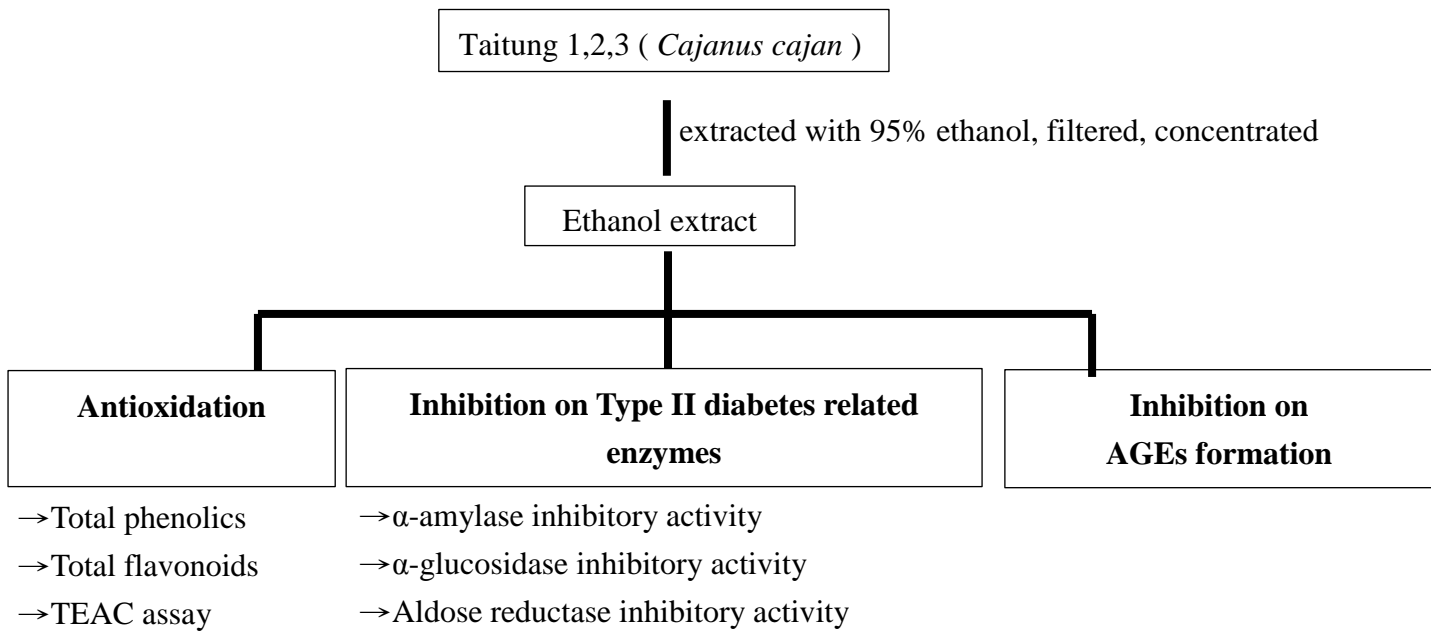


三、實驗方法

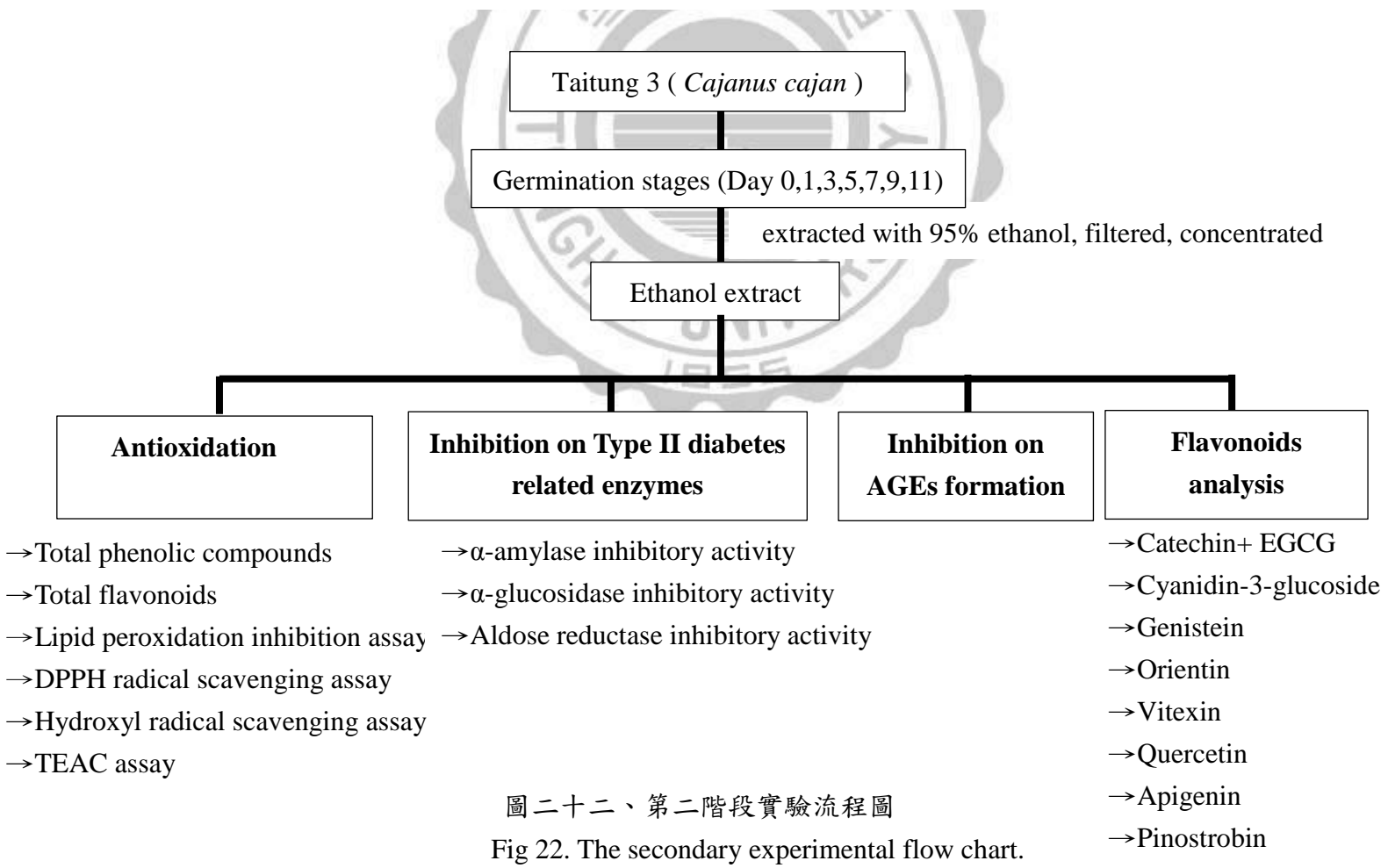
(一)實驗流程

本實驗主要分為兩階段進行，如圖二十一、二十二。第一階段針對樹豆台東 1 號、2 號及 3 號的 95% 乙醇萃取物，分別測定萃取物對抗氧化性、醣解酵素及醛糖還原酶之抑制活性及蛋白質醣化抑制活性等之影響，以篩選出具最佳生理活性之樹豆品種。第二階段則以上述篩選之品種，比較不同發芽時間之樹豆對抑制醣解酵素、醛糖還原酶之活性和蛋白質醣化的影響，並將不同發芽時間進行 HPLC 類黃酮含量分析，以期找出樹豆內主要機能性成分。





圖二十一、第一階段實驗流程圖
Fig 21. The first experimental flow chart.



圖二十二、第二階段實驗流程圖
Fig 22. The secondary experimental flow chart.

(二)第一階段篩選最佳生理活性之樹豆品種

1. 樹豆乙醇萃取物之製備

不同品種樹豆以磨粉機 (RT-08, 榮聰精密科技有限公司, 台灣) 磨碎成粉, 萃取方法參考 Blonska *et al.* (2004) 方法並修飾, 分別精秤約 5 g 已通過 70 mesh 篩網之樹豆粉末(水分含量 12~14%), 加入 20 mL 之 95% 乙醇溶劑中, 在室溫、避光條件下以高速均質機均質 1 min, 將均質物放入 4°C 冰箱靜置 5 min, 後於 10,000 rpm, 4°C 下離心 5 min 並收集上清液, 將沉澱物重複均質與離心的步驟 3 次。將三次收集的上清液混合抽氣過濾去除殘渣(以 Advantec No.5A 直徑 90 mm 之濾紙), 以減壓濃縮將乙醇抽乾, 用乙醇定量至一定體積, 取約 400 μ l 萃取液以抽乾機抽乾, 此為樹豆乙醇萃取物, 存於 4°C 備用, 待各項測定前再以乙醇回溶。

2. 總酚化合物 (Total phenolic compounds) 含量測定

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

參照 Julkunen-Titto (1985) 之方法, 分別取 50 μ L 樣品及不同濃度標準品沒食子酸 (gallic acid) 與 1 mL H₂O 及 500 μ L Folin-Ciocalteu's phenol reagent 混合均勻, 再加入 2.5 mL 之 20 % Na₂CO₃ 溶液反應, 於避光、室溫下靜置 20 min, 以分光光度計檢測波長 735 nm 下之吸光值。

另外再以不添加 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 之試驗當作空白對照組，製作標準曲線（附錄一），以換算樣品中相對之沒食子酸當量，以 mg gallic acid equivalent/g extract 表示。

3. 總類黃酮化合物 (Total flavonoid compounds) 含量測定

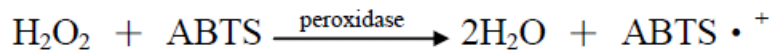
原理為類黃酮化合物於鹼性條件下可與硝酸鋁形成穩定的黃色錯合物，於波長 415 nm 有最大吸光值，當吸光值越高代表所含總類黃酮化合物含量越多。

參照 Sarikurkcu (2008) 方法，將 250 μ L 樣品及不同濃度之槲皮素 (quercetin) 標準品，加入 10% 硝酸鋁及 1 M 醋酸鉀各 50 μ L，再加入 1.4 mL 去離子水，混合均勻，於避光、室溫下反應 40 min，以分光光度計檢測波長 415 nm 下之吸光值。另外再以不添加硝酸鋁之試驗當作空白對照組，製作標準曲線（附錄二），以換算樣品中相對之槲皮素當量，以 mg quercetin equivalent / g extract 表示。

4. Trolox 當量抗氧化能力 (Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)

測定

原理為利用 horseradish peroxidase 催化 H_2O_2 及 ABTS 反應形成 $ABTS \cdot +$ ，此為穩定的藍綠色自由基物質，其在波長 734 nm 有最大吸光值。當樣品具有抗氧化能力時，則能減少 $ABTS \cdot +$ 形成量，導致吸光值下降，當吸光值愈低，代表樣品之抗氧化能力愈強。其反應式如下：



Trolox 是一種強抗氧化劑，許多文獻皆已證實具有良好之抗氧化力，因此以 trolox 作為評估抗氧化能力的標準，計算樣品的自由基清除能力相當於多少 trolox 當量 ($\mu\text{g trolox equivalent} / \text{mg extract}$)，即為樣品之 TEAC。

參照 Miller (1993) 及 Arnao (1996) 等人之方法加以修飾，將 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)、peroxidase 與 H_2O_2 混合均勻，使最終系統濃度分別為 $100 \mu\text{M}$ 、 4.4 unit/mL 與 $50 \mu\text{M}$ ，於 30°C 下避光反應 1 h，其形成穩定的藍綠色 $\text{ABTS} \cdot^+$ ，再加入 $250 \mu\text{L}$ 樣品 (mg/mL) 及不同濃度之 trolox 標準品，混合均勻，於避光、室溫下反應 10 min，以分光光度計檢測波長 734 nm 下之吸光值，製作標準曲線(附錄三)，以換算樣品中相對之 trolox 當量，以 $\mu\text{g trolox equivalent} / \text{mg extract}$ 表示。

5. α -amylase 抑制活性(α -amylase inhibitory activity) 測定

原理為利用 DNS 具氧化力，以及澱粉經 α -amylase 水解釋放的游離醛或酮基之碳水化合物在鹼性溶液下具有還原力之特性而進行反應(圖二十三)。

6. α -glucosidase 抑制活性 (α -glucosidase inhibitory activity) 測定

參考 Adam (2010)之方法並稍加修飾，取 5 mL pH 6.8 sodium phosphate buffer 及 0.2 mL 3 mM GSH (L-glutathione reduced)、0.2 mL α -glucosidase 酵素液 (0.15 U/mL) 均勻混合，於 37°C 下反應 5 min後添加 0.5 mL 0.3 mM的受質4-nitrophenyl- α -D-glucoopyranoside (p-NPG) 溶液與1 mL待測樣品，再次於 37 °C 下反應 20 min後，從混合液取 2 mL 再加入到含 8 mL 100 mM Na₂CO₃ 溶液充分混合，使酵素失活終止其反應，以分光光度計測其在 400 nm 下的吸光值，算其抑制率。Positive control 使用acarbose 其為一種治療第二型糖尿病的藥物，具文獻指出其可抑制醣解酵素的作用，減緩飯後高血糖。

α -glucosidase 抑制活性(%) =

$$\left[(A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{sample blank}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}) \right] \times 100$$

A_{control} : 酵素+基質+ 95 % ethanol : buffer = 1:3混合液

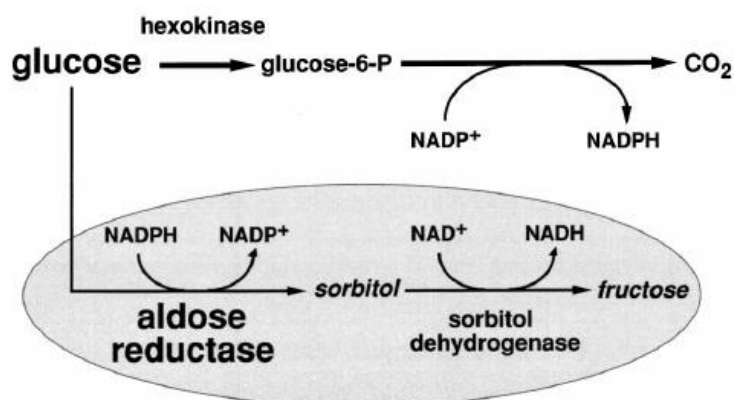
A_{blank} : Buffer+基質+95 % ethanol : buffer = 1:3混合液

A_{sample} : 酵素+基質+萃作物

$A_{\text{sample blank}}$: Buffer +基質+萃作物

7. Aldose reductase 抑制活性(Aldose reductase inhibitory activity)測定

此實驗為模擬體內 glucose 經由 aldose reductase 及輔酶NADPH 的催化轉變成 sorbitol 的過程(圖二十四)，而實驗中受質改用 DL-glyceraldehyde，利用輔酶NADPH 的還原反應，NADPH還原成 NADP⁺ 波長340 nm之吸光值會下降，測其10 min前後之變化，推得 aldose reductase 抑制率。



圖二十四、多元醇(山梨糖醇)路徑

Fig 24. Polyol (sorbitol) pathway.

參考並修飾 Palanisamy *et al.* (2011)方法，將欲檢測之樣品取20 μ L 加入870 μ L pH 6.2 sodium phosphate buffer 混合後，隨後再加入10 μ L aldose reductase (0.2U/mL) 及 50 μ L 3 mM NADPH、50 μ L 5 mM DL-glyceraldehyde 均勻混合，於 25 $^{\circ}$ C下反應 3 min後，於波長340 nm 下測其10 min前後吸光值之變化量，推其抑制率。正對照組使用 quercetin。

Aldose reductase 活性抑制(%) =

$$\left[\left[1 - (A_{\text{sample / min}} - A_{\text{sample blank / min}}) \right] / (A_{\text{control / min}} - A_{\text{blank / min}}) \right] \times 100$$

$A_{\text{sample / min}}$: 酵素+基質+萃取物

$A_{\text{sample blank / min}}$: Buffer +基質+萃取物

$A_{\text{control / min}}$: 酵素+基質+ 95 % ethanol : buffer = 1:3 混合液

$A_{\text{blank / min}}$: Buffer+基質+95 % ethanol : buffer = 1:3 混合液

8. 蛋白質醣化抑制活性測定 (Inhibition on AGEs formation)

原理為葡萄糖會使牛血清蛋白 (bovine serum albumin ; BSA)產生梅納反應產生最終醣化產物(advanced glycation end products ; AGEs) , 以三氯醋酸 (trichloroacetic acid ; TCA) 使 AGEs 沉澱 , 再以 pH 10 alkaline PBS 溶解它 , 利用多功能螢冷光分子偵測系統在370 / 440 nm下測其螢光強度 , 進而推算蛋白質醣化反應之抑制率。

參考並修飾 Matsuura *et al.* (2002) 方法 , 取 400 μL BSA 加入 80 μL 1M glucose 及欲檢測之樣品 20 μL 混合均勻 , 上述重複做兩組各放入 60 $^{\circ}\text{C}$ 及 4 $^{\circ}\text{C}$ 反應 48 h , 反應完成後 , 各取 100 μL 混合液添加 100 μL 20% TCA 以終止反應 , 讓蛋白質沉澱 , 等待 3 min 觀察沉澱狀況 , 之後以 10,000 rpm、 4 $^{\circ}\text{C}$ 條件下離心 4 min 沉澱蛋白質 , 離心後移除上清液留沉澱物 , 以 pH 10 alkaline PBS 溶解蛋白質 , 再利用多功能螢光分子偵測系統在 370 / 440 nm 下測其螢光強度 , 推算抑制率。實驗中正對照組使用 aminoguanidine , 為抑制 AGEs 形成之藥物。

蛋白質醣化抑制率(%) =

$$1 - \left[\frac{(A_{\text{BSA} + \text{Glucose} + \text{extract}}) - (A_{\text{BSA} + \text{extract}})}{(A_{\text{BSA} + \text{Glucose}}) - (A_{\text{BSA}})} \right] \times 100$$

$A_{\text{BSA} + \text{Glucose} + \text{extract}}$: 牛血清蛋白+葡萄糖+萃取物

$A_{\text{BSA} + \text{extract}}$: 牛血清蛋白+Buffer + 萃取物

$A_{\text{BSA} + \text{Glucose}}$: 牛血清蛋白+葡萄糖+ Buffer

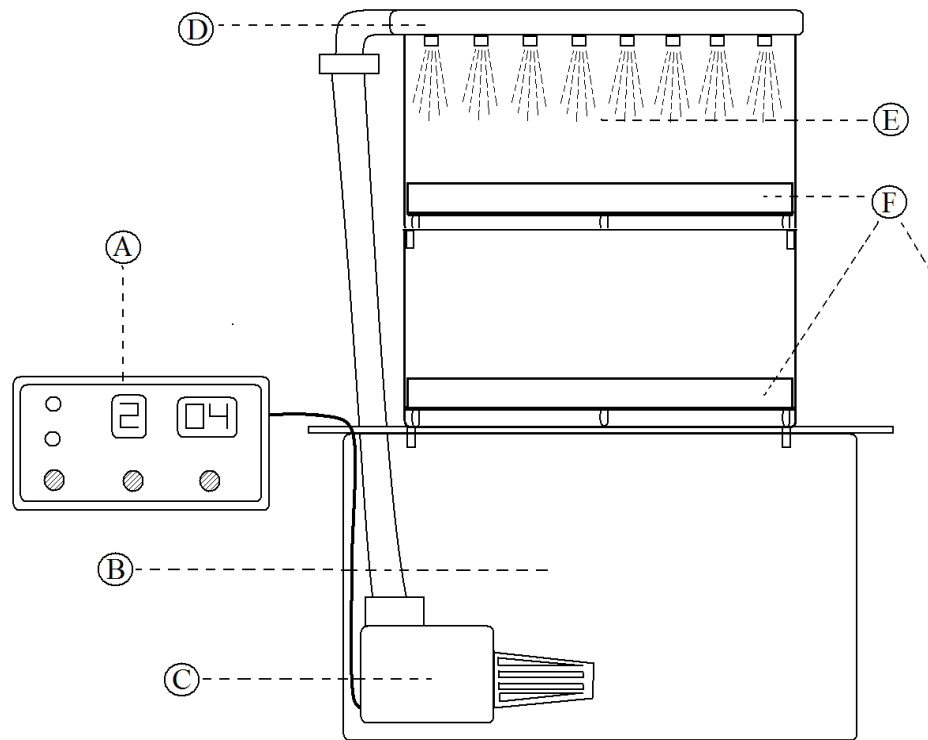
A_{BSA} : 牛血清蛋白+Buffer + Buffer

(三)第二階段探討發芽時間對抗氧化性、調節血糖相關酵素及蛋白質醣化抑制活性之影響

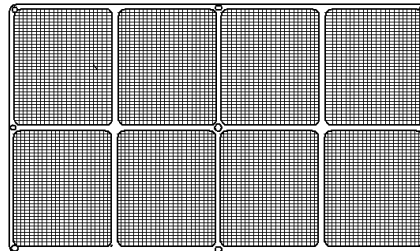
1. 發芽樹豆乙醇萃取物之製備

a. 發芽處理

篩選出抗氧化性強且具最佳調節血糖機能之台東三號樹豆，每 5 g 種子做為一個實驗單位，分別以自來水、蒸餾水洗淨後，浸泡於 0.05% 次氯酸鈉溶液中 30 min (Alexia *et al.*, 2007)，再以蒸餾水潤洗三次，洗去次氯酸鈉後於 25°C 培養箱以蒸餾水浸泡 48 h。接著以自動培芽機 (OP-2, 開力農藝公司) 培養豆芽如圖二十五，首先，將洗淨種子平鋪於培芽盤中寬與長為 7 cm × 9 cm 大小的方格 (block) 內，生長的條件控制在溫度 25 °C、避光、每 9 h 噴灑循環水一次，每次灑水 10 sec，水源使用一次去離子水，每 24 h 更換一次。種子培養 11 day 期間，分別於第 0、1、3、5、7、9、11 day 進行樹豆芽之採收，每批均以蒸餾水潤洗三次，將水瀝乾之後，平鋪於乾淨的吸水紙上拭乾，即為新鮮豆芽樣品。新鮮樹



- A: 定時灑水控制器
- B: 水箱
- C: 抽水幫浦
- D: 灑水噴頭
- E: 培芽箱
- F: 培芽盤(8 blocks)



圖二十五、自動培芽機構造示意圖

Fig 25. Schematic structure of automatic bean-sprout cultivator.

豆芽以液態氮凍結，置於冷凍乾燥機中進行乾燥，凍乾後的樣品以磨粉機 (RT-08，榮聰精密科技有限公司，台灣) 磨碎成粉。

b. 發芽樹豆萃取

萃取的方法參考 Blonska *et al.* (2004) 並加以修改，分別精秤約 5 g 已通過 70 mesh 篩網之發芽樹豆粉末，加入 20 mL 95% 乙醇溶劑中，在室溫、避光條件下，以高速均質機均質 1 min，將均質物放入 4°C 冰箱靜置 5 min，後於 10,000 rpm、4°C 下離心 5 min 並收集上清液，將沉澱物重複均質與離心的步驟 3 次，將三次收集的上清液混合抽氣過濾去除殘渣(以 Advantec No.5A 直徑 90 mm 之濾紙)，以減壓濃縮將乙醇抽乾，用乙醇定量至一定體積，取約 400 μ l 萃取液以抽乾機抽乾，此為發芽樹豆乙醇萃取物。

2. 總酚化合物 (Total phenolic compounds) 含量測定

參照第一階段(二)之 2 實驗方法

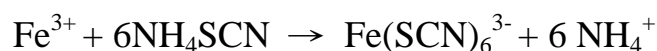
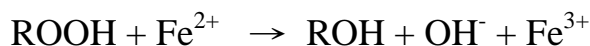
3. 總類黃酮化合物 (Total flavonoid compounds) 含量測定

參照第一階段(二)之 3 實驗方法

4. 脂質氫過氧化物抑制活性(Lipid hydroperoxide inhibitory activity)之測定

脂質氫過氧化物測定原理是利用硫氰酸鐵法 (ferric thiocyanate method) 來測定亞麻油酸乳化系統 (linoleic acid emulsion system) 中之過氧化物，由於脂質氧化初期會生成氫過氧化物，將 Fe^{2+} 氧化成 Fe^{3+} ，

Fe³⁺再與 SCN⁻反應生成紅色的硫氰酸鐵錯合物【Fe(SCN)₆³⁻】，此錯合物於 500 nm 波長有最大吸光值。反應式如下：



參考並修飾 Mitsuda *et al.* (1996)及 Kao (2014)等人方法，將含樹豆乙醇萃取物、BHT、ascorbic acid 及 α -tocopherol 的乙醇溶液各取 0.5 mL，而對照組為等量之乙醇 0.5 mL，再依序分別加入 0.02 M 之 linoleic acid emulsion 2.5 mL 及 0.2 M sodium phosphate buffer (pH7.0) 2 mL，之後放入有蓋的錐形瓶混合均勻後，置於 37°C 恆溫培養箱中，每隔 24 h 取上述之混合液 0.1 mL，再依序加入 75% 之乙醇溶液 4.7 mL、30% 之 ammonium thiocyanate 0.1 mL 及 0.02 M 溶在 3.5% HCl 之 iron(II) chloride tetrahydrate 0.1 mL，振盪均勻後靜置 3 min，以分光光度計測其在 500 nm 波長下吸光值。當置於 37°C 培養箱時間越長，脂質過氧化程度就越高，氫過氧化物之生成量亦越多，呈色也跟著加深。不過加入抗氧化劑時會抑制氫過氧化物的產生，使呈色速度減緩，吸光值越低表示樣品抗氧化力越強，算其抑制率 IP %。

脂質過氧化抑制率 (Inhibition on peroxidation % ; IP%) =

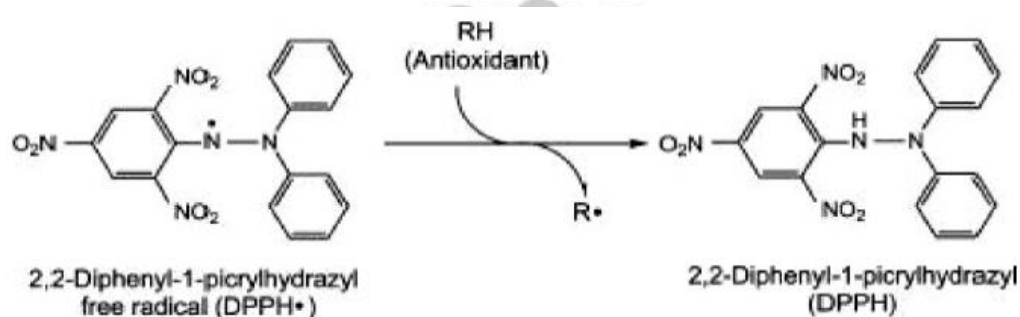
$$\left[1 - \left(A_{500\text{nm of sample}} / A_{500\text{nm of control}} \right) \right] \times 100$$

◆ Linoleic acid emulsion (pH7.0) 之配製方法為，於 50 mL 0.2 M sodium phosphate buffer (pH7.0) 中加入 0.2804 g 之 linoleic acid 及 0.2804 g 之

Tween 20，以磁石攪拌呈乳狀液，需新鮮配製。

5. DPPH 自由基清除能力試驗 (DPPH radical scavenging assay)

原理為帶有自由基的 DPPH 甲醇溶液本身為深紫色化合物，此化合物在 517 nm 下具有最大吸光值，當加入具抗氧化作用之物質時，其會提供質子給 DPPH·，使其變成不帶電子的 DPPH，其顏色較淡，因此吸光值會隨之降低。



圖二十六、DPPH 自由基清除作用之反應式

Fig 26. Reaction of scavenging activity on DPPH radical.

參照 Shimada *et al.* (1992) 方法加以修飾，將 600 μ L 樣品加入 0.008 % DPPH 甲醇溶液 600 μ L，混合均勻，於避光、室溫下反應 30 min，以分光光度計檢測波長 517 nm 下之吸光值，利用相對於控制組之吸光值下降百分比，換算抑制率(%)，藉以判斷樣品清除 DPPH 自由基能力之強弱，隨著吸光值下降，表示樣品清除能力越佳。

6. 氫氧自由基清除能力測定 (Hydroxyl radical scavenging assay)

氫氧自由基本身是一個非常活潑的自由基，可由超氧陰離子或過氧化氫在金屬離子催化之下形成，本測定利用亞鐵離子和 EDTA 的錯合物

在 pH 7.4 下，會與 H₂O₂ 反應並生成氫氧自由基，反應式如下：



氫氧自由基會攻擊去氧核糖及含多元不飽和脂肪酸之細胞膜，並產生一連串氧化反應，並生成二級氧化產物丙二醛 (malondialdehyde, MDA)，丙二醛會與硫巴比妥酸 (thiobarbituric acid, TBA) 反應生成 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)，TBARS 在波長 520 nm 下有吸光值，若樣品具氫氧自由基清除能力，MDA 生成量會降低，相對 TBARS 也隨之降低，因此吸光值越低表示樣品清除氫氧自由基能力越強。

參考並修飾 Sakanaka *et al.* (2006) 方法，取 0.45 ml 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7.4)、0.15 ml 10 mM 2-deoxyribose、0.15 ml 10 mM FeSO₄-EDTA、0.15 ml 10 mM H₂O₂、0.525 ml 去離子水及各含 0.075 ml 樹豆乙醇萃取物、BHT、ascorbic acid 及 α -tocopherol 的乙醇溶液混合均勻，於 37 °C 下反應 4 h 後，再添加 0.75 ml 2.8% 三氯醋酸 (TCA) 和 0.75 ml 1% 硫巴比妥酸以終止及顯色反應，將上述混合液 85°C 水浴加熱 10 min 後，冰浴冷卻，以分光光度計於 520 nm 下測其吸光值，控制組以等量之乙醇取代樣品，利用公式推算清除率。

Hydroxyl radical scavenging activity (%) =

$$\left[1 - \left(A_{520\text{nm of sample}} / A_{520\text{nm of control}} \right) \right] \times 100$$

7. Trolox 當量抗氧化能力(Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)測定

參照第一階段(二)之 4 實驗方法

8. α -amylase 抑制活性(α -amylase inhibitory activity) 測定

參照第一階段(二)之 5 實驗方法

9. α -glucosidase 抑制活性 (α -glucosidase inhibitory activity) 測定

參照第一階段(二)之 6 實驗方法

10. Aldose reductase 抑制活性(Aldose reductase inhibitory activity)測定

參照第一階段(二)之 7 實驗方法

11. 蛋白質醣化抑制活性 (AGEs formation inhibitory activity) 測定

參照第一階段(二)之 8 實驗方法

12. 類黃酮含量組成分析 (Liu *et al.*,2010)

a. 樣品處理

以 DMSO 將不同發芽天數已稱重的樹豆萃取物溶解並定量，取 70 μ L 與 benzoic acid 35 μ L 及 ellagic acid 35 μ L 混合，再以 0.22 μ m 小飛碟過濾器過濾後，取 20 μ L 注入 HPLC 分析，流速 1ml / min。

b. HPLC 條件

固定相是利用逆相 C18 column (4.6 x 250 mm)，移動相包含 A 沖提液劑 100% 甲醇及 B 沖提劑 8% 甲酸溶液，沖提條件為 0 min 時，B 由 70% 逐漸減少至 20 min 時為 65%，至 30 min 時降低為 55%，30 min 到

50 min B 沖提劑再由 55% 降低到 50%，一直到 52 min 降為 30%，到 60 min 降到 10%，而 70 min 時 B 沖提劑再由 10% 提高到原先的 70%，利用 photodiode-array 偵測器在波長 190-800 nm 下進行分析。擬檢測的類黃酮標準品有 catechin + EGCG, cyanidin-3-glucoside, genistein, orientin, vitexin, quercetin, apigenin, pinostrobin, benzoic acid 及 ellagic acid。其中 catechin + EGCG, cyanidin-3-glucoside, genistein 與 benzoic acid (內標準品) 在 280 nm 下紀錄吸光值；orientin, vitexin, quercetin, apigenin, pinostrobin 與 ellagic acid (內標準品) 在 347 nm 下紀錄吸光值。

(四) 統計分析

實驗結果所得之數據均為三重複，以平均值 \pm 標準差 (Mean \pm SD) 表示，並採用 Statistical Analysis System (SAS) 8.1 版之統計軟體進行變異數分析 (ANOVA) 與 Duncan's multiple range test 分析組間的顯著差異程度，顯著差異水準為 $p < 0.05$ 。

肆、結果與討論

一、篩選最佳生理活性之樹豆品種

醣解酵素 α -amylase及 α -glucosidase因參與體內碳水化合物的分解，因此可藉抑制此兩種酵素的活性，有效延緩碳水化合物的消化與葡萄糖的吸收，改善餐後高血糖之現象。藉由各原料乙醇萃取物比較其醣解酵素及醛糖還原酶抑制活性與抗氧化性作為篩選的依據，以選出具調節血糖及抗氧化性最佳之樹豆品種，此篩選出的樹豆品種將作為後續探討發芽時間的原料。

(一) 不同品種樹豆之萃取物萃取率、總酚及總類黃酮含量之比較

將 5 g 乾燥樹豆粉末，使用高速均質機萃取方法，以 20 mL 95% 乙醇於室溫高速均質，分別重複萃取三次，以抽氣過濾收集上清液並濃縮至適當體積後，以抽乾方式得乙醇萃取物(Blonska *et al.*, 2004)，萃取率如表十一，三個品種之萃取率介於 2.70 至 2.83 % 間，彼此間並無顯著差異。植物所含的酚類及類黃酮化合物具有抗氧化、抗發炎等生理活性，其含量也與抗氧化活性呈正相關 (Zhang *et al.*, 2012 ; Choi *et al.*, 2014)。Folic-Ciocalteu's assay 為一種廣泛用於測量酚類化合物的方法，Folic-Ciocalteu's phenol reagent 可作用於酚類化合物上的 OH 基，使其產生由黃轉藍的顏色變化 (Julkunen-Titto, 1985)。文獻一般使用高極性溶劑如醇類作為酚類化合物萃取(Sun *et al.*, 2009)，因此本研究以乙醇進行萃

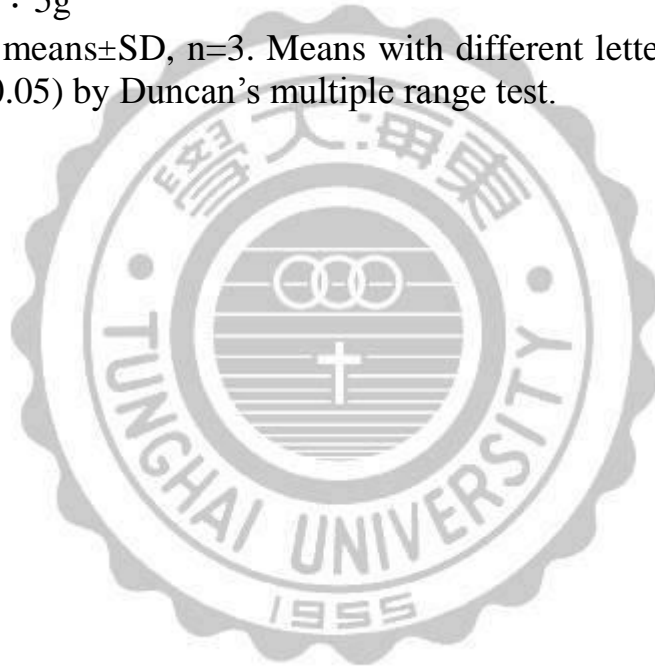
表十一、省產三種樹豆之乙醇萃取物萃取率

Table 11. Extraction yields of ethanol extracts from three varieties of pigeon pea in Taiwan

Variety*	Extract(dry weight, g)	Extraction yields(%)
Taitung 1	0.1396 ± 0.007	2.77 ± 0.01 a
Taitung 2	0.1438 ± 0.009	2.83 ± 0.02 a
Taitung 3	0.1375 ± 0.008	2.70 ± 0.01 a

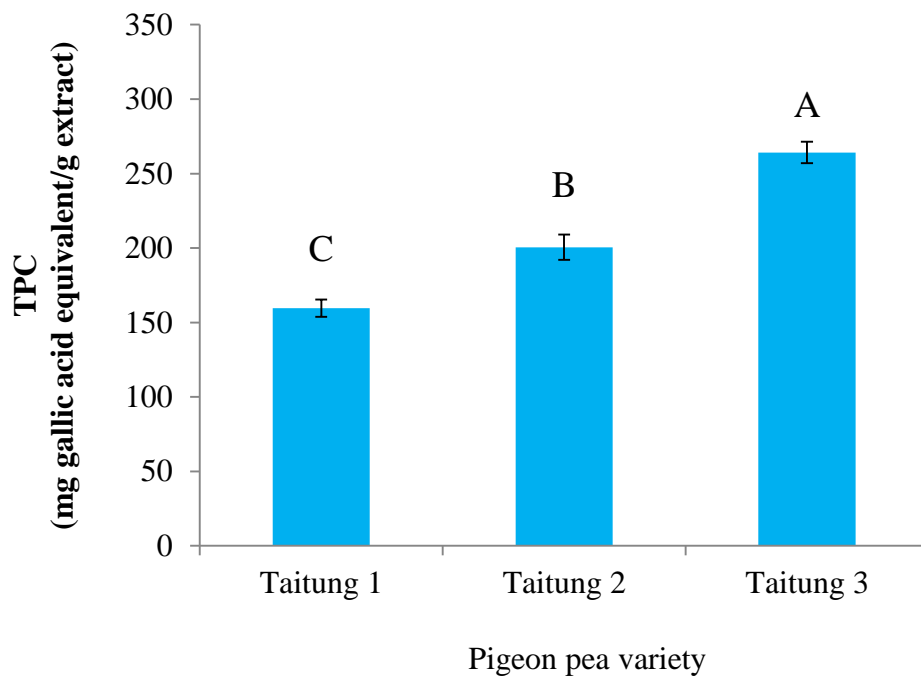
*Sample weight : 5g

Bars represent means±SD, n=3. Means with different letters are significant difference (p<0.05) by Duncan's multiple range test.



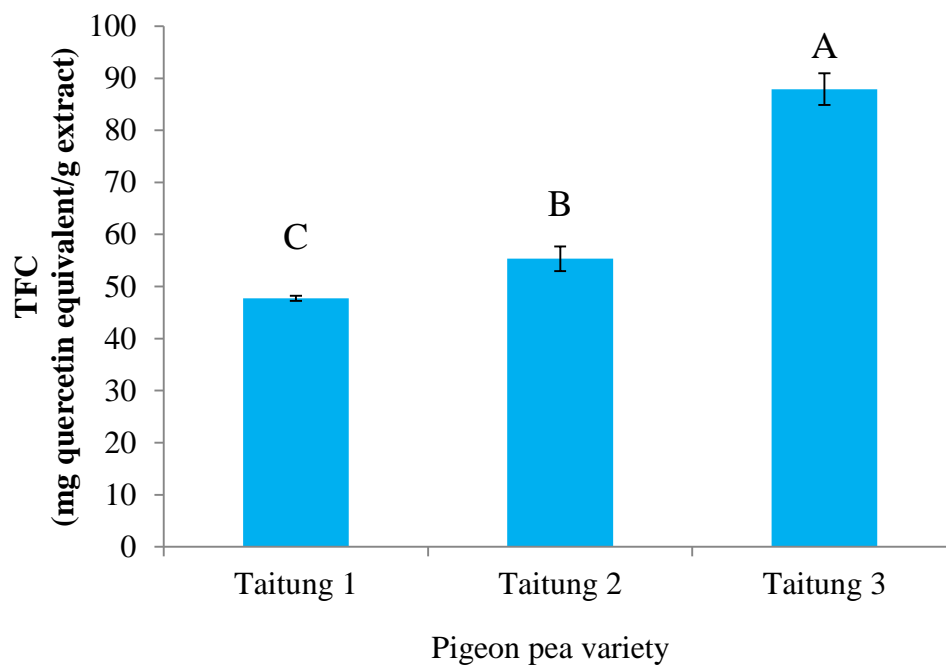
取，利用 gallic acid (GA)作為標準品，換算相當於多少 GA 當量回推總酚含量，以 mg gallic acid equivalent/g extract 表示，值越高表示酚類化合物越多，圖二十七為省產三種樹豆乙醇萃取物中總酚含量之比較，結果顯示三個品種樹豆中，以台東 3 號具較高之總酚含量達 264.15 mg gallic acid equivalent/g extract，台東 2 號次之，達 200.55 mg gallic acid equivalent/g extract。Al-Saeedi *et al.* (2015)將樹豆先以甲醇進行攪拌萃取，再分別以正己烷、氯仿、乙酸乙酯及正丁醇液液萃取得各區分物，測得其總酚含量甲醇萃取物為 74.00，其餘區分物依序各達 153.00、86.30、57.40 及 42.50 mg gallic acid equivalent/g of powder crude extract，本實驗所測得台東 3 號之總酚含量遠高於上述研究之各區分物測得結果；Nantitanon *et al.* (2010)指出植物之化學成分組成會受到品種、環境等變化而有所不同，也會受到採收季節等因素影響，且萃取方法也可能影響總酚的含量。

類黃酮也屬酚類化合物一部分，本實驗以 quercetin 作為標準品，換算 quercetin 當量回推總類黃酮含量，圖二十八省產三種樹豆乙醇萃取物之總類黃酮含量，實驗結果指出台東 3 號顯著高於其餘品種，($p < 0.05$)，其含量達 87.90 mg quercetin equivalent/g extract，其餘依序為台東 2 號及 1 號，分別達 55.34 及 47.74 mg quercetin equivalent/g extract。台東 3 號類黃酮含量較高可能原因是較其他兩品種含有較多的花青素含量，檢測



圖二十七、省產三種樹豆乙醇萃取物之總酚含量

Fig. 27. The total phenolic compound contents of ethanol extracts from three varieties of pigeon pea in Taiwan. Bars represent means \pm SD, n=3. Means with different letters are significant difference ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



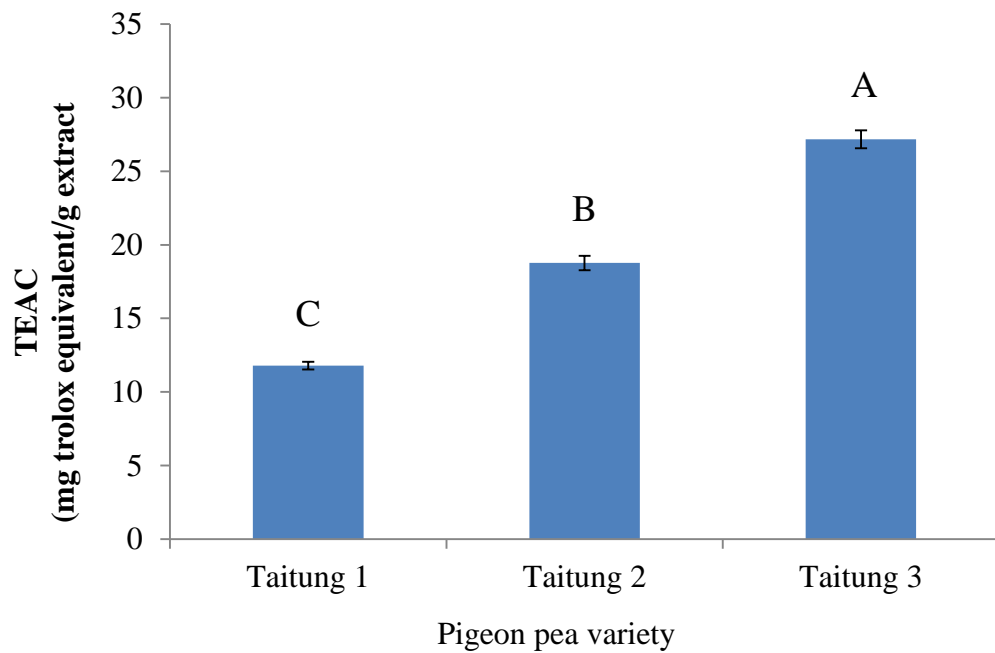
圖二十八、省產三種樹豆乙醇萃取物之總類黃酮含量

Fig. 28. The total flavonoid compound contents of ethanol extracts from three varieties of pigeon pea in Taiwan. Bars represent means \pm SD, n=3. Means with different letters are significant difference ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

類黃酮物質的原理是凡具有鄰苯二羥基之物質皆可與鋁離子成錯合物而呈色，而花青素中如 cyanidin、delphinidin 皆具有鄰苯二羥基，能和鋁離子結合而呈色，也可能因此使得台東 3 號樹豆中類黃酮含量最高 (Sarikurkcu *et al.*, 2008)。

(二) 不同品種樹豆萃取物之抗氧化能力比較

以 TEAC 法分析總抗氧化力，利用 peroxidase 會催化 ABTS 與 H_2O_2 形成藍綠色穩定的 $ABTS^+$ 陽離子自由基，當抗氧化物質與 $ABTS^+$ 結合後會使吸光值下降，以檢測抗氧化力之強弱，以 trolox 為標準品，換算相對當量，以 mg trolox equivalent/g extract 表示，當量越高表示其抗氧化力越強。圖二十九為省產三種樹豆乙醇萃取物之 trolox 當量抗氧化活性，結果指出三品種相較之下，以台東 3 號抗氧化力最高，達 27.17 mg trolox equivalent/g extract，依序為台東 2 號的 18.77 及 1 號的 11.80 mg trolox equivalent/g extract。Tabart *et al.*, (2006) 等研究指出植物中總酚含量與 TEAC 等抗氧化活性呈正相關趨勢，因此可反應在本實驗結果上，以台東 3 號具最高之抗氧化活性。國內針對新品種之樹豆台東 1 號、2 號及 3 號進行總抗氧化力測定，結果顯示以台東 3 號 84.6 % 最高，其次為台東 2 號的 48.6%，與本實驗結果相符 (陳，2012)。



圖二十九、省產三種樹豆乙醇萃取物之 Trolox 當量抗氧化活性

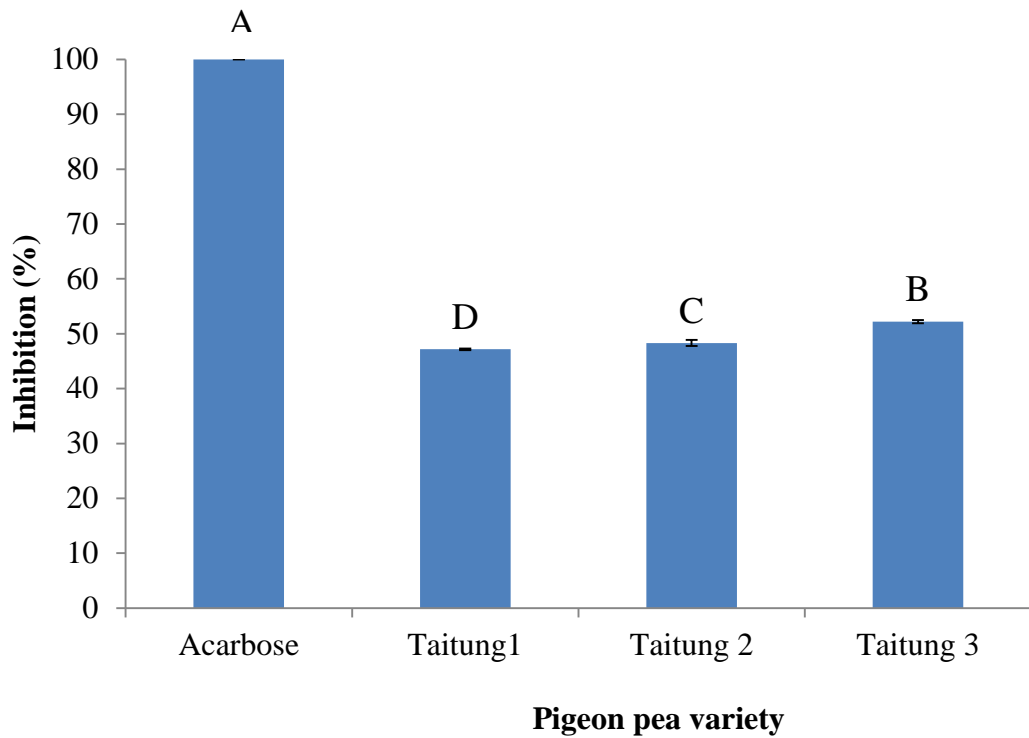
Fig. 29. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of ethanol extracts from three varieties of pigeon pea in Taiwan. Bars represent means \pm SD, n=3. Means with different letters are significant difference ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

(三) 不同品種樹豆萃取物對醣解酵素抑制活性之影響

本實驗所使用的醣解酵素包括 α -amylase 及 α -glucosidase，許多研究提到多酚及類黃酮化合物具有抑制 α -amylase 及 α -glucosidase 的活性 (Tadera *et al.*, 2006 ; Gao *et al.*, 2008)。Hsieh *et al.* (2010)認為植物萃取物中的類黃酮具有抑制酵素活性，是因為多酚類物質可與蛋白質結合，令其沉澱而使酵素失活。樹豆萃取物含有豐富的酚類化合物，因此本研究亦探討不同品種樹豆萃取物對抑制 α -amylase 及 α -glucosidase 活性之影響，並以目前糖尿病患者使用藥物 acarbose 作為正控制組。

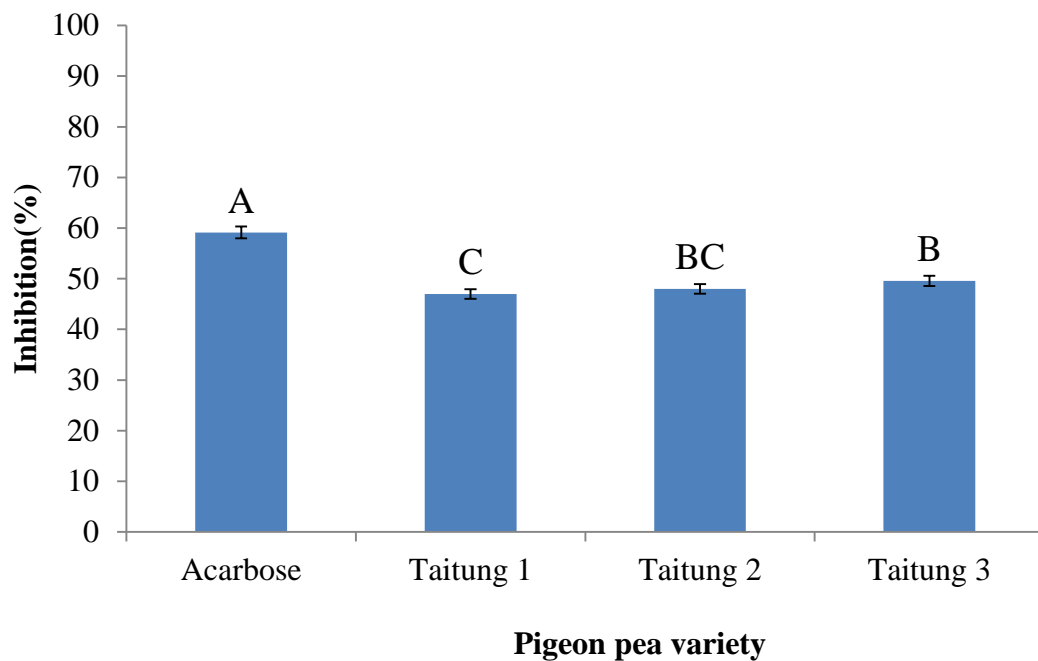
圖三十為省產三種樹豆乙醇萃取物對 α -amylase 抑制活性之影響，結果指出，三品種萃取物中以台東 3 號有較高之抑制率 52.20%，抑制效果最為顯著($p < 0.05$)，但低於正控制組 acarbose 之抑制率，而台東二號及一號分別達 48.31 % 及 47.18 %。其次，圖三十一為省產三種樹豆乙醇萃取物對 α -glucosidase 抑制活性之影響，結果顯示不同品種樹豆萃取物之間，台東 3 號有較高抑制率 49.57%，與其他兩品種有顯著差異 ($p < 0.05$)，但低於 acarbose 之抑制率 59.13%，本研究使用之樹豆為粗萃物，尚未經分離純化或以發芽等方式處理，或許因此抑制活性表現較不佳。

α -amylase 及 α -glucosidase 兩種醣解酵素在體內水解所作用的位置不同，經 α -amylase 水解可能為葡萄糖、寡糖或糊精，而經 α -glucosidase 水解後為葡萄糖，因此在抑制活性上，較著重 α -glucosidase 抑制效果，



圖三十、省產三種樹豆乙醇萃取物(0.3 mg/mL)對 α -amylase 之抑制率

Fig.30. α -amylase inhibitory activity of ethanol extracts at 0.3 mg/mL level from three varieties of pigeon pea in Taiwan. Bars represent means \pm SD, n=3. Means with different letters are significant difference ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Acarbose at 0.3 mg/mL level.



圖三十一、省產三種樹豆乙醇萃取物(0.12 mg/mL)對 α -glucosidase 之抑制率

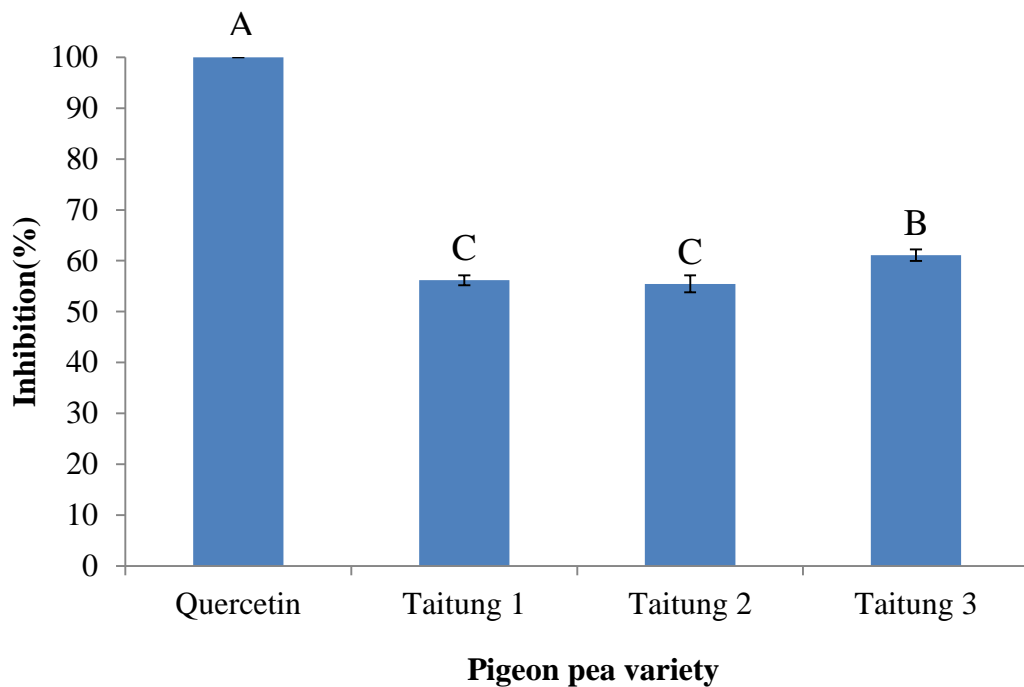
Fig.31. α -glucosidase inhibitory activity of ethanol extracts at 0.12 mg/mL level from three varieties of pigeon pea in Taiwan. Bars represent means \pm SD, n=3. Means with different letters are significant difference ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test. Acarbose at 0.12 mg/mL level.

能直接性地延緩碳水化合物在腸道內分解為單糖的速度，有效降低飯後血糖 (Fred-Jaiyesimi *et al.*, 2009)。

(四)不同品種樹豆萃取物對醛糖還原酶抑制活性及最終醣化產物抑制量之探討

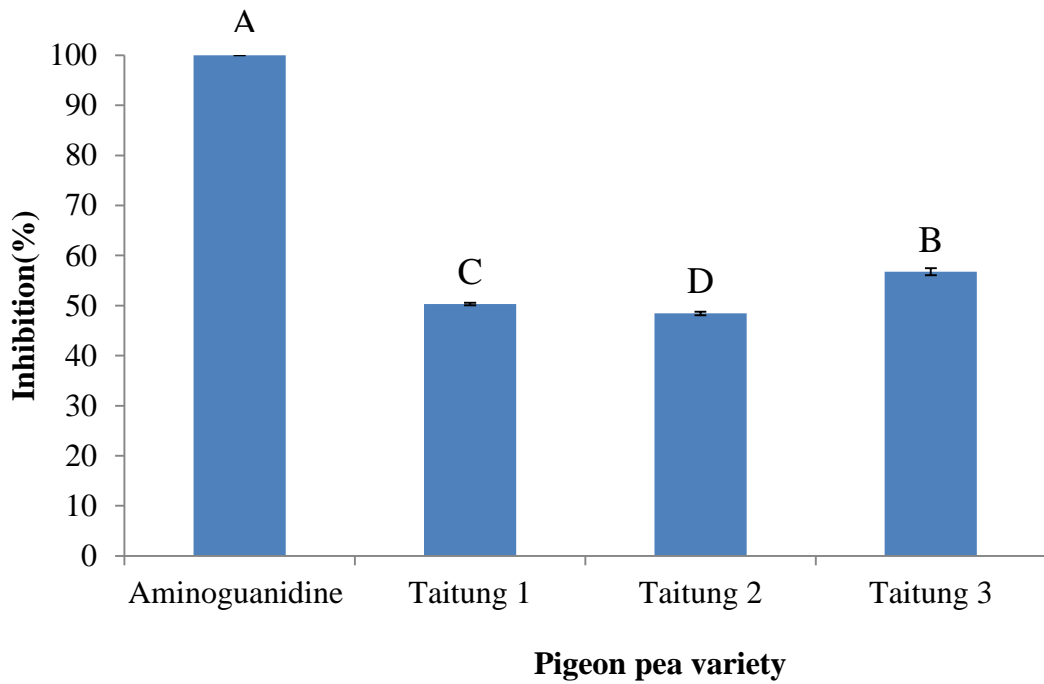
醛糖還原酶測定為模擬體內 glucose 經由 aldose reductase 及輔酶 NADPH 催化轉變成 sorbitol 的過程，利用輔酶 NADPH 的還原反應，推算 aldose reductase 抑制率，並以具 aldose reductase 抑制效果的 quercetin 作為正控制組 (Palanisamy *et al.*, 2011)。圖三十二為省產三種樹豆乙醇萃取物對醛糖還原酶抑制活性之影響，結果指出，不同品種間台東 3 號抑制效果最為顯著($p < 0.05$)，抑制率為 61.10%，低於正控制組 quercetin 之抑制率，台東 2 號及 1 號抑制率分別為 55.44 % 及 56.17 %。

在最終醣化產物 AGEs 部分，則是利用葡萄糖使牛血清蛋白經梅納反應生成 AGEs，再測其螢光強度推算蛋白質醣化抑制率，以文獻提到有效抑制 AGEs 之藥物 aminoguanidine 作為正控制組。圖三十三為省產三種樹豆乙醇萃取物對最終醣化產物抑制量之影響，結果顯示，台東 3 號雖低於 aminoguanidine 之抑制率但相較於其他兩者具顯著抑制效果($p < 0.05$)，抑制率達 56.75 %，而台東 2 號及 1 號抑制率分別達 48.44 % 及 50.32 %。



圖三十二、省產三種樹豆乙醇萃取物(0.14 mg/mL)對 aldose reductase 之抑制率

Fig.32. Aldose reductase inhibitory activity of ethanol extracts at 0.14 mg/mL level from three varieties of pigeon pea in Taiwan. Bars represent means \pm SD, n=3. Means with different letters are significant difference ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test. Quercetin at 0.14 mg/mL level.



圖三十三、省產三種樹豆乙醇萃取物(0.16 mg/mL)對 AGEs 之抑制率

Fig.33. Advanced glycation end products inhibitory activity of ethanol extracts at 0.16 mg/mL level from three varieties of pigeon pea in Taiwan. Bars represent means \pm SD, n=3. Means with different letters are significant difference ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test. Aminoguanidine at 0.16 mg/mL level.

綜合總酚、總類黃酮含量、抗氧化及醣解酵素與醛糖還原酶抑制活性、蛋白質醣化抑制作用等分析，結果都顯示台東3號為具調節血糖機能且抗氧化最佳之樹豆品種，因此選取台東3號樹豆進行後續發芽處理，探討不同發芽時間是否能進一步提升其調節血糖機能性。

二、台東3號樹豆不同發芽時間對抗氧化、醣解酵素及醛糖還原酶與蛋白質醣化抑制作用之影響

經篩選具調節血糖機能且抗氧化最佳之樹豆品種台東3號，以發芽方式處理，藉由不同發芽時間0, 1, 3, 5, 7, 9, 11 day之乙醇萃取物，探討抗氧化及抑制醣解酵素、醛糖還原酶之活性和蛋白質醣化的影響，作為主要篩選平台、以篩出最佳發芽時間。

(一) 發芽時間對台東3號樹豆萃取率、總酚及總類黃酮含量之影響

萃取率部分如表十二，結果指出不同發芽時間之萃取率介於2.73 ~ 2.93 % 之間，彼此並無顯著差異。Oloyo *et al.* (2004)提出發芽對樹豆組成分、礦物質及抗營養成分皆會造成改變，其植酸、草酸的含量顯著降低，而礦物質及酚類化合物則增加釋出量。圖三十四為發芽時間對台東3號樹豆乙醇萃取物總酚含量之影響，結果顯示，總酚含量隨樹豆發芽時間而漸增，直到第7天後下降，其中發芽第7天有較高的趨勢，達377.98 mg gallic acid equivalent/g extract，而第5天及第9天次之，分別為318.57

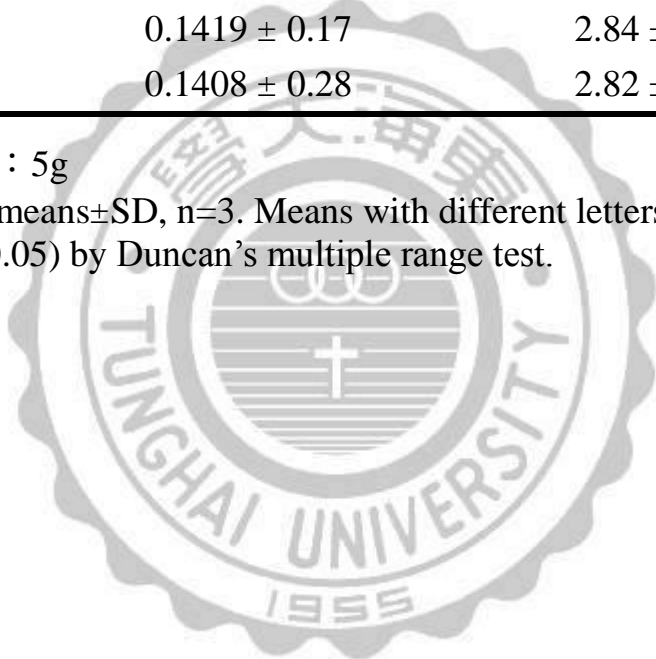
表十二. 省產樹豆台東3號不同發芽時間之乙醇萃取物萃取率

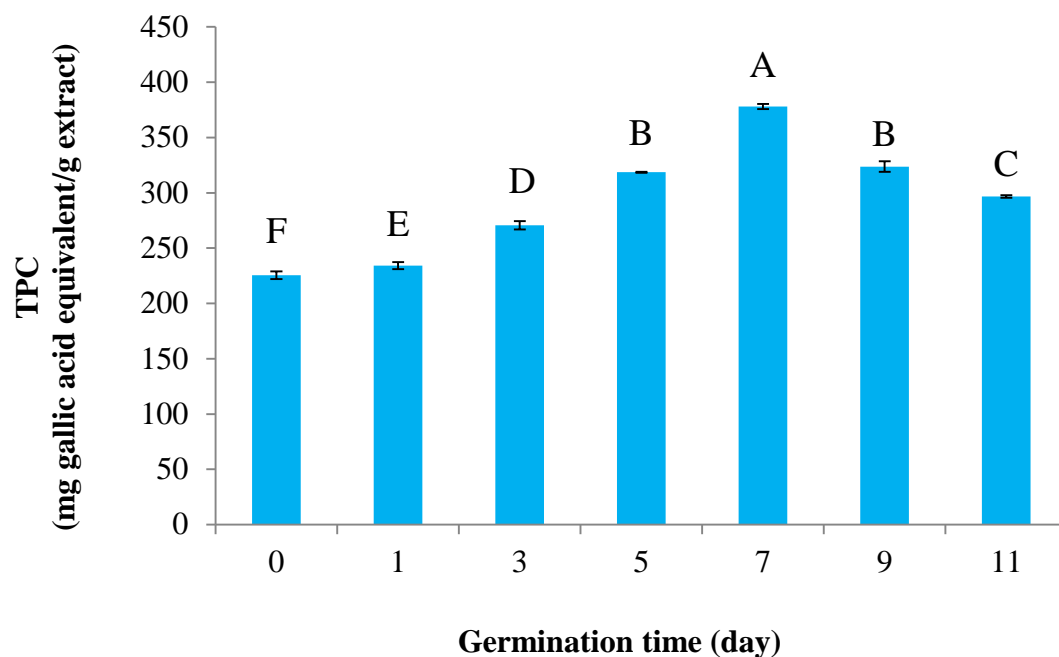
Table 12. Extraction yields of ethanol extracts from different germination time of Taitung 3 pigeon pea in Taiwan

Germination time* (day)	Extract (dry weight, g)	Extraction yields(%)
0	0.1463 ± 0.45	2.93 ± 1.03 a
1	0.1363 ± 0.31	2.73 ± 0.17 a
3	0.1399 ± 0.38	2.80 ± 1.31 a
5	0.1449 ± 0.13	2.90 ± 0.94 a
7	0.1387 ± 0.20	2.77 ± 1.34 a
9	0.1419 ± 0.17	2.84 ± 1.29 a
11	0.1408 ± 0.28	2.82 ± 1.24 a

*Sample weight : 5g

Bars represent means±SD, n=3. Means with different letters are significant difference (p<0.05) by Duncan's multiple range test.





圖三十四、省產樹豆台東3號不同發芽時間乙醇萃取物之總酚含量

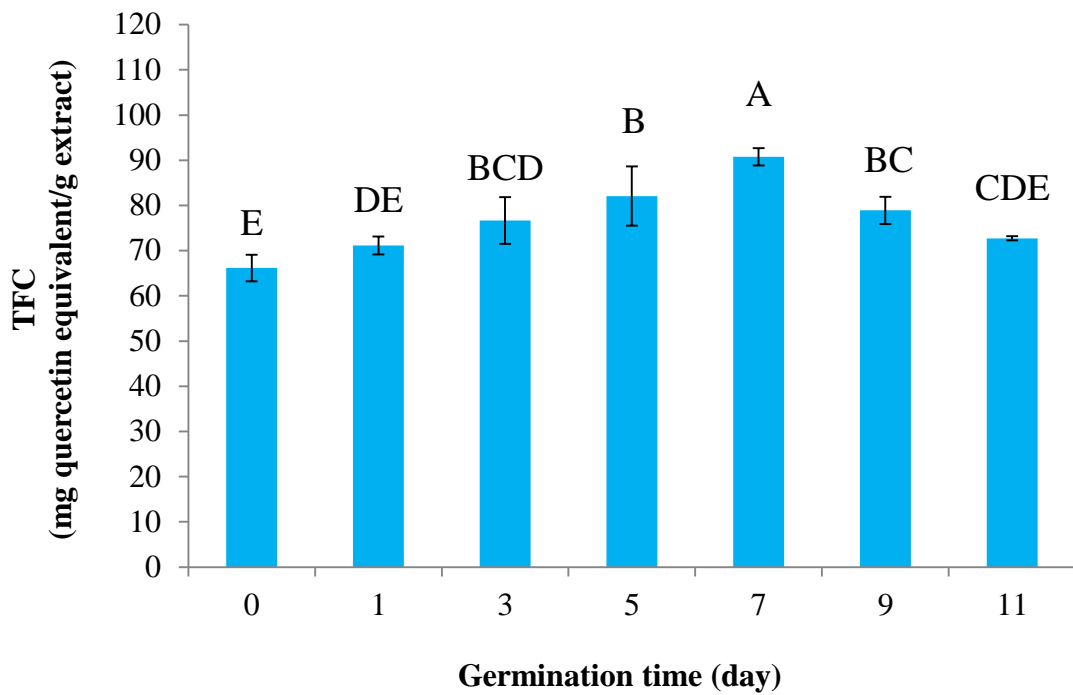
Fig.34. The total phenolic compound contents of ethanol extracts from different germination time of Taitung 3 pigeon pea in Taiwan. Bars represent means \pm SD, n=3. Means with different letters are significant difference ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

及 323.76 mg gallic acid equivalent/g extract。

圖三十五則是不同發芽時間對台東 3 號樹豆乙醇萃取物中總類黃酮含量之影響，結果指出其含量一樣隨樹豆發芽時間而漸增至第 7 天後下降，而發芽第 7 天總類黃酮含量顯著高於其他天數($p < 0.05$)，達 90.80 mg quercetin equivalent/g extract，而發芽第 5 天次之，達 82.09 mg quercetin equivalent/g extract。實驗結果中總酚及總類黃酮含量都有相同的趨勢，隨樹豆發芽而含量漸增至第 7 天有最高量而後下降，可能原因為在發芽過程，第 7 天樹豆芽生長到達最極限，而第 7 天過後樹豆芽則會緩慢枯萎，影響其機能性成分之含量。

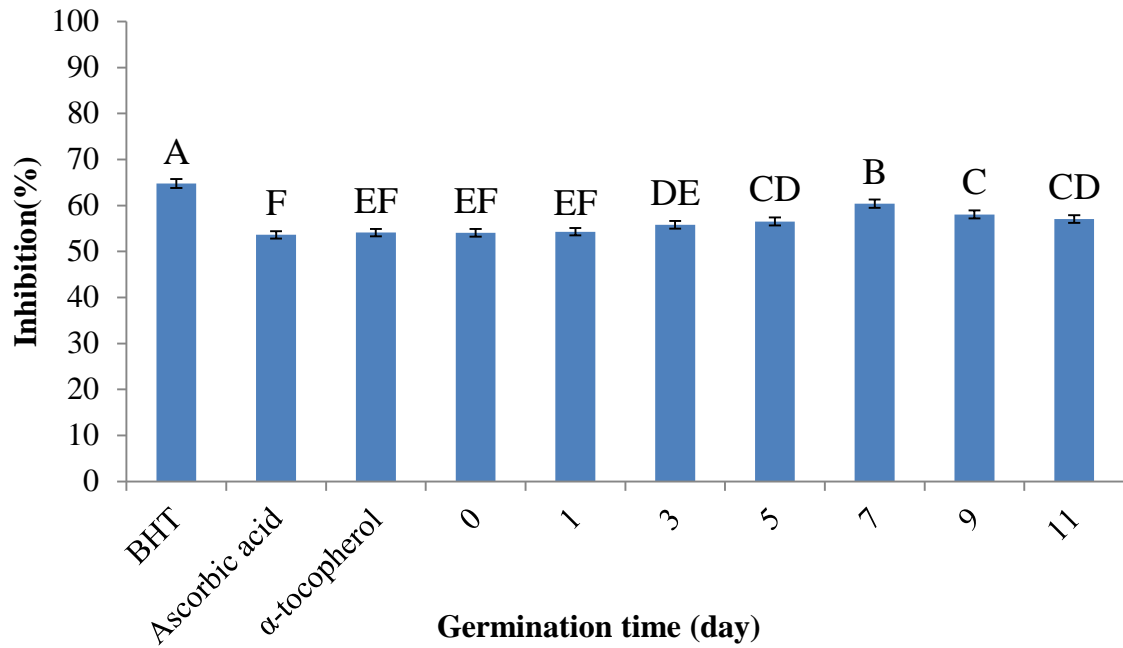
(二) 發芽時間對台東 3 號樹豆抗氧化能力之影響

抗氧化部分以脂質過氧化、DPPH 自由基清除能力、氫氧自由基清除力及總抗氧化力(trolox 當量)來做測定。脂質氫過氧化物測定部分是利用硫氰酸鐵法來測定亞麻油酸乳化系統中之過氧化物，脂質氧化初期生成之氫過氧化物，會將 Fe^{2+} 氧化成 Fe^{3+} ， Fe^{3+} 再與 SCN^- 反應生成紅色的硫氰酸鐵錯合物，脂質過氧化程度越高，氫過氧化物之生成量亦越多，呈色也跟著加深，若樣品抑制氫过氧化物的產生，會使呈色速度減緩，吸光值越低表示樣品抗氧化力越強，以 BHT / ascorbic acid / α -tocopherol 作為正控制組，計算抑制率 IP %。圖三十六為不同發芽時間對台東 3 號樹豆乙醇萃取物中脂質過氧化抑制活性之影響，結果指出在不同發芽天



圖三十五、省產樹豆台東3號不同發芽時間乙醇萃取物之總類黃酮含量

Fig.35. The total flavonoid compound contents of ethanol extracts from different germination time of Taitung 3 pigeon pea in Taiwan. Bars represent means \pm SD, n=3. Means with different letters are significant difference ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

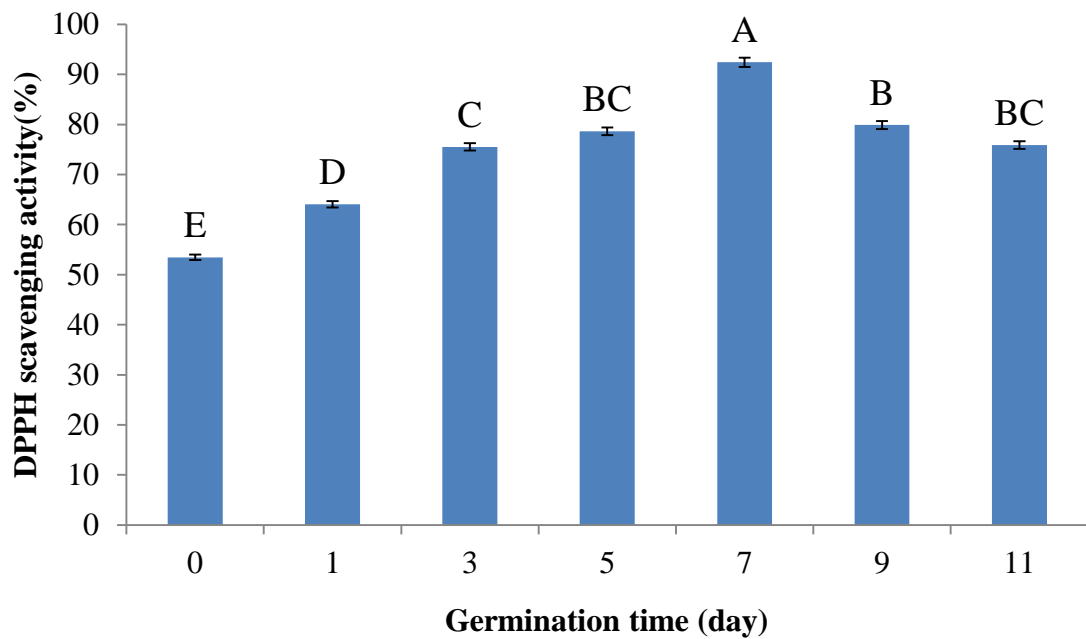


圖三十六、省產樹豆台東 3 號不同發芽時間乙醇萃取物(0.1 mg/mL)對脂質過氧化之抑制率

Fig. 36. Lipid peroxidation inhibitory effect of ethanol extracts at 0.1 mg/mL level from different germination time of Taitung 3 pigeon pea in Taiwan. Bars represent means \pm SD, n=3. Means with different letters are significant difference ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. BHT, ascorbic acid and α -tocopherol at 0.1 mg/mL level.

數中第 7 天有較高之抑制率 60.42 %，與其他天數具顯著差異($p < 0.05$)，但略低於正控制組 BHT 的 64.76 %，高於 ascorbic acid 的 53.61 % 及 α -tocopherol 的 54.10 %，隨發芽時間增加，其抑制率依序為 54.06、54.30、55.80、56.52、60.42、58.05、57.06 %。Bajpai *et al.* (2014) 採用具調節血糖活性之水杉(*M. glyptostroboides*) 乙酸乙酯萃取物進行脂質過氧化測定，結果指出其抑制率在 0.1 mg/mL 時約為 40%，與其測得 α -tocopherol 之抑制率無顯著差異。

在 DPPH 自由基清除能力方面，主要利用帶有自由基的 DPPH 甲醇溶液本身為深紫色化合物，當加入具抗氧化作用之物質時，其會提供質子給 DPPH· 自由基，使其變成不帶電子的 DPPH，吸光值會隨之降低，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，隨著吸光值下降，能力越佳(Shimada *et al.*, 1992)。圖三十七為發芽時間對台東 3 號樹豆乙醇萃取物 DPPH 自由基清除能力之影響，結果顯示，以第 7 天 DPPH 自由基清除效果最為顯著($p < 0.05$)，清除率達 92.42 %，較未發芽的樹豆清除率多出 1.73 倍，隨發芽時間增加，抑制率依序為 53.47、64.03、75.53、78.63、92.42、79.91 及 75.90 %。Sweetie *et al.* (2011) 及 Zhang *et al.* (2012) 的研究結果均指出總酚含量與 DPPH 自由基清除能力具有正相關($R^2=0.97$)，本研究結果也有相同的趨勢。

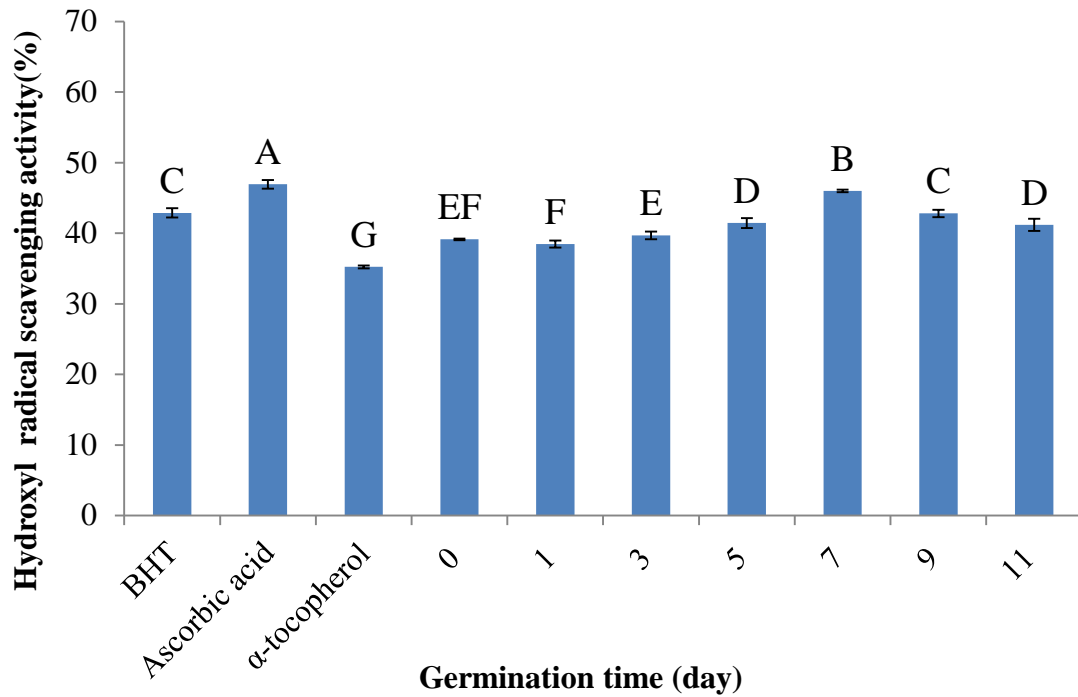


圖三十七、省產樹豆台東 3 號不同發芽時間乙醇萃取物(1 mg/mL)之
DPPH 自由基清除能力

Fig. 37. Scavenging activity of ethanol extracts at 1 mg/mL level from different germination time of Taitung 3 pigeon pea in Taiwan on DPPH radical. Bars represent means \pm SD, n=3. Means with different letters are significant difference ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

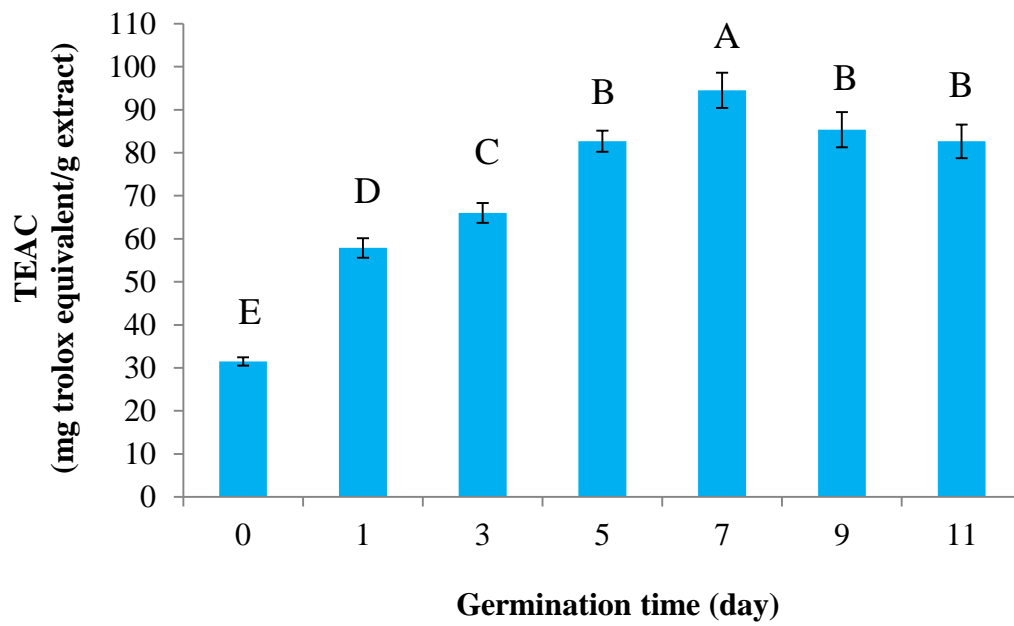
氫氧自由基可由超氧陰離子或過氧化氫在金屬離子催化之下形成，本實驗利用亞鐵離子和 EDTA 的錯合物在 pH 7.4 下，會與 H_2O_2 反應並生成氫氧自由基，其會攻擊去氧核糖，並生成氧化產物 MDA，MDA 會與 TBA 反應生成 TBARS，若樣品具氫氧自由基清除能力，MDA 生成量會降低，相對 TBARS 也隨之降低，因此吸光值越低表示樣品清除氫氧自由基能力越強。圖三十八為不同發芽時間對台東 3 號樹豆乙醇萃取物氫氧自由基清除率之影響，結果顯示，發芽第 7 天有較高的氫氧自由基清除率，達 45.99 %，與正控制組相比清除率低於 ascorbic acid 的 46.94 %，顯著高於 BHT 的 42.89 % 及 α -tocopherol 的 35.24 %，隨發芽時間增加，清除率依序為 39.15、38.47、39.70、41.44、45.99、42.80 及 41.18 %。

在總抗氧化力部分，圖三十九為發芽時間對台東 3 號樹豆乙醇萃取物 Trolox 當量抗氧化力之影響，結果指出發芽第 7 天總抗氧化力顯著高於其他天數($p < 0.05$)，而發芽第 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11 day 其 trolox 當量依序為 31.49、57.89、65.98、82.70、94.51、85.36 及 82.66 mg trolox equivalent/g extract，其抗氧化力強弱依序為 Day 7 > 9 > 5 > 11 > 3 > 1 > 0。



圖三十八、省產樹豆台東3號不同發芽時間乙醇萃取物(0.1mg/mL)之氫
 氧自由基清除能力

Fig. 38. Scavenging activity of ethanol extracts at 0.1 mg/mL level from different germination time of Taitung 3 pigeon pea in Taiwan on hydroxyl radicals. Bars represent means \pm SD, n=3. Means with different letters are significant difference ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. BHT, ascorbic acid and α -tocopherol at 0.1 mg/mL level.



圖三十九、省產樹豆台東 3 號不同發芽時間乙醇萃取物之 Trolox 當量抗氧化力

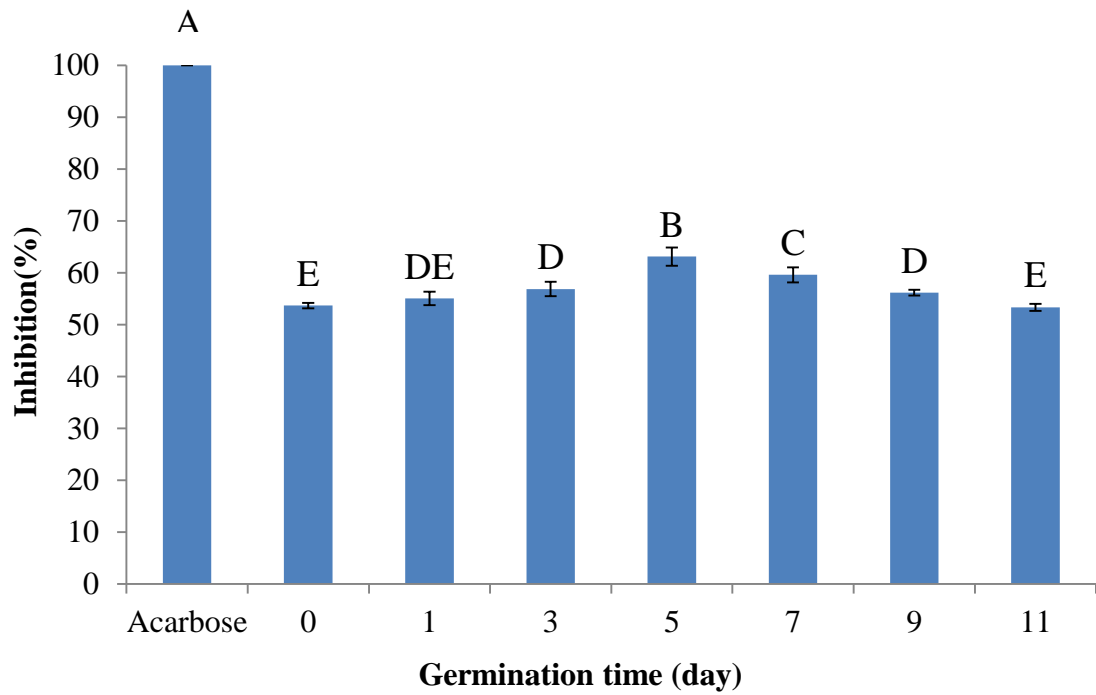
Fig.39. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of ethanol extracts from different germination time of Taitung 3 pigeon pea in Taiwan. Bars represent means \pm SD, n=3. Means with different letters are significant difference ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

酚類及類黃酮具抗氧化等生理活性(Sweetie *et al.*, 2011 ; Zhang *et al.*, 2012)，因此可反應在本研究抗氧化結果上，皆以發芽第 7 天有最多量之總酚及類黃酮化合物，抗氧化活性上也最為顯著。

(三) 發芽時間對台東 3 號樹豆醣解酵素抑制活性之影響

此部分探討不同發芽時間樹豆萃取物對醣解酵素包括 α -amylase 及 α -glucosidase 抑制活性之影響，正控制組使用糖尿病患者藥物 acarbose，如圖四十所示，結果指出，以第 5 天抑制 α -amylase 效果最為顯著($p < 0.05$)，抑制率達 63.12 %，比未發芽的樹豆抑制率多出 1.18 倍，但與正控制組 acarbose 之抑制率相比仍差距甚大，隨發芽天數增加，抑制率依序為 53.68、55.05、56.87、63.12、59.60、56.16 及 53.34 %。

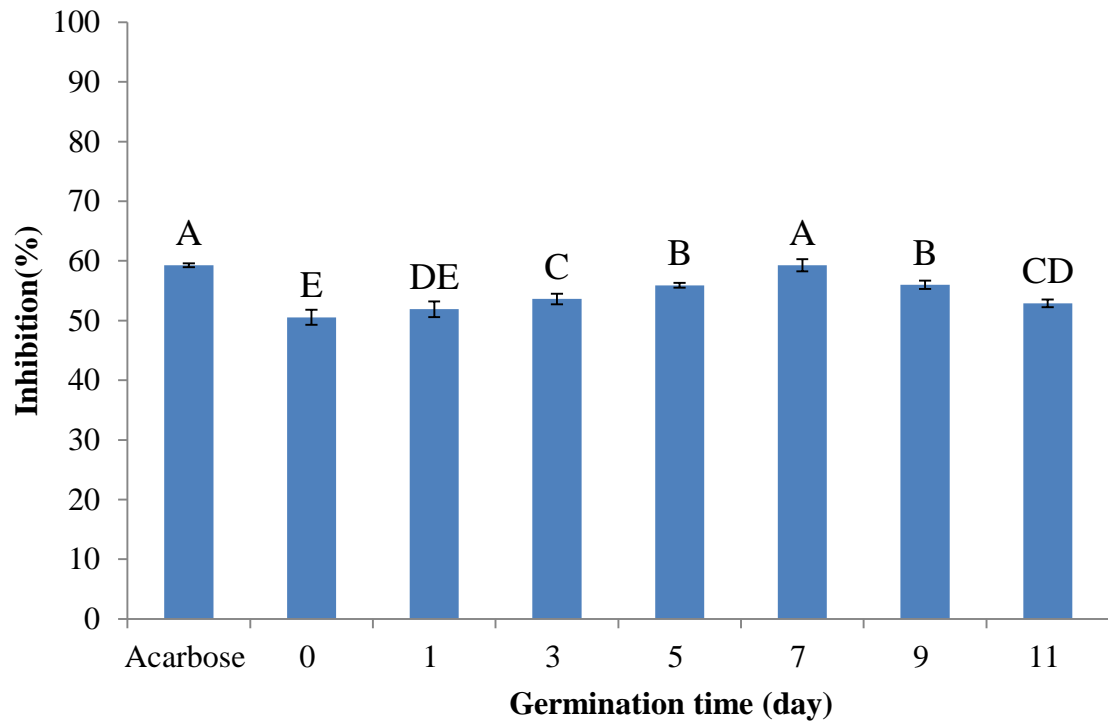
α -glucosidase 抑制活性方面，圖四十一為不同發芽時間對台東 3 號樹豆乙醇萃取物中 α -glucosidase 抑制活性之影響，結果顯示以發芽第 7 天有較高的抑制率 59.27 %，顯著高於其他發芽天數($p < 0.05$)，比未發芽樹豆抑制率高出 1.17 倍，與正控制組 acarbose 的 59.28 % 相比無顯著差異，隨發芽時間增加，抑制率分別為 50.54、51.91、53.63、55.92、59.27、56.00 及 52.89 %。Gao *et al.* (2008)及 Gutierrez *et al.* (2008)等指出多酚及類黃酮具抑制醣解酵素之活性，因此若可藉發芽提高樹豆內類黃酮量，將可增加其抑制活性，發芽後總酚及類黃酮量隨樹豆發芽而漸增至第 7 天有最高量，此結果可與 α -glucosidase 抑制活性之趨勢相呼應。



圖四十、省產樹豆台東 3 號不同發芽時間乙醇萃取物(0.3 mg/mL)對

α -amylase 之抑制率

Fig.40. α -amylase inhibitory activity of ethanol extracts at 0.3 mg/mL level from different germination time of Taitung 3 pigeon pea in Taiwan. Bars represent means \pm SD, n=3. Means with different letters are significant difference ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test. Acarbose at 0.3 mg/mL level.



圖四十一、省產樹豆台東 3 號不同發芽時間乙醇萃取物(0.12 mg/mL)對

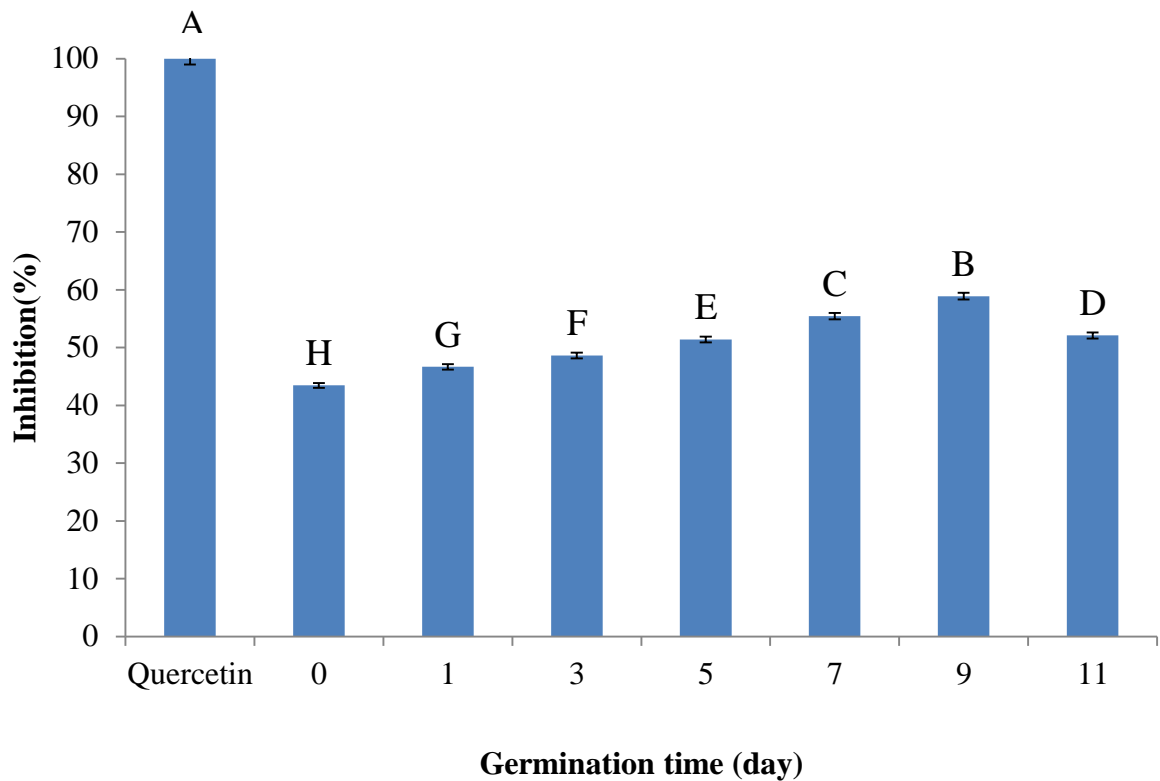
α -glucosidase 之抑制率

Fig.41. α -glucosidase inhibitory activity of ethanol extracts at 0.12 mg/mL level from different germination time of Taitung 3 pigeon pea in Taiwan. Bars represent means \pm SD, n=3. Means with different letters are significant difference (p<0.05) by Duncan's multiple range test. Acarbose at 0.12 mg/mL level.

(四) 發芽時間對台東 3 號樹豆醛醣還原酶抑制活性及最終醣化產物抑制量之影響

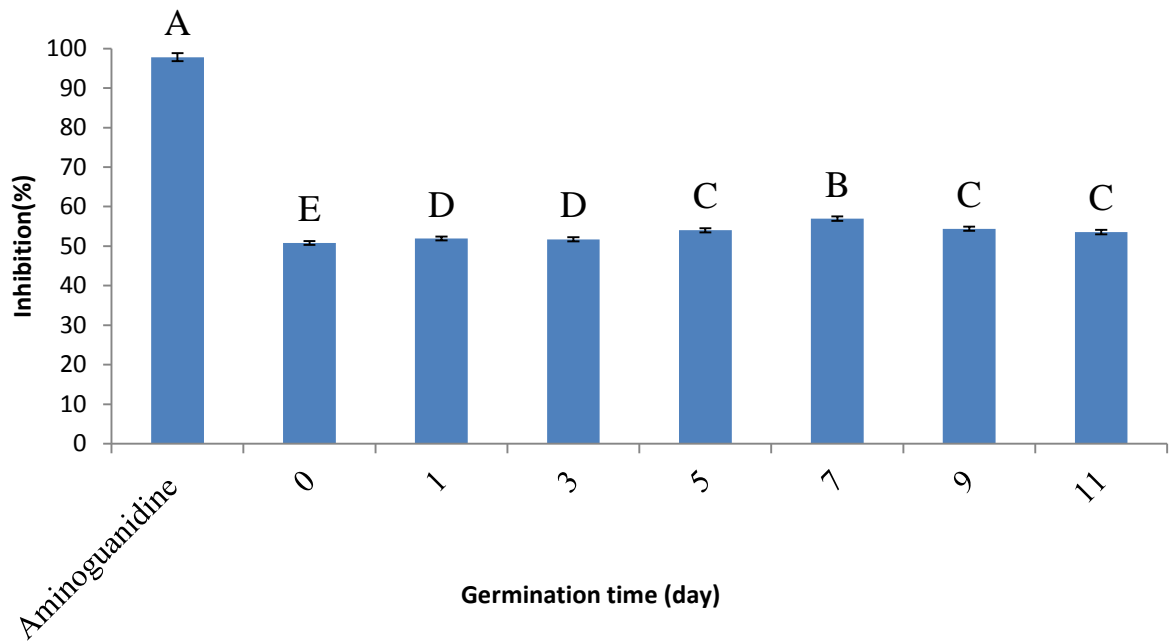
利用測定醛醣還原酶 aldose reductase 抑制活性及最終醣化產物 AGEs 抑制量，來探討經發芽處理是否能提升樹豆調節血糖機能性。抑制 aldose reductase 之測定以 quercetin 作為正控制組，圖四十二為不同發芽時間對台東 3 號樹豆醛醣還原酶抑制活性之影響，結果顯示，不同發芽時間中以第 9 天抑制效果最顯著，抑制率達 58.89 %，比未發芽樹豆的 43.44 % 高出 1.36 倍，但與正控制組 quercetin 之抑制率相較之下差距甚大，隨發芽天數增加，抑制率分別為 43.44、46.67、48.61、51.38、55.43、58.89 及 52.10 %。

圖四十三為不同發芽時間對台東 3 號樹豆最終醣化產物抑制量之影響，以抑制 AGEs 之藥物 aminoguanidine 作為正控制組，結果顯示，發芽第 7 天有較高之抑制率 56.95 %，與其他天數有顯著差異($p < 0.05$)，相較未發芽樹豆第 0 天的 50.79 %，其高出 1.12 倍，但低於正控制組 aminoguanidine 之抑制率，隨發芽天數增加，抑制率依序為 50.79、51.94、51.71、54.02、56.95、54.40 及 53.56 %。Wu and Yen (2005)指出類黃酮可顯著抑制 AGEs 的生成及蛋白質交聯化(protein crosslinking)，而在本研究類黃酮含量及 AGEs 抑制活性結果中有相同之趨勢。



圖四十二、省產樹豆台東3號不同發芽時間乙醇萃取物(0.12 mg/mL)對aldose reductase 之抑制率

Fig.42. Aldose reductase inhibitory activity of ethanol extracts at 0.12 mg/mL level from different germination time of Taitung 3 pigeon pea in Taiwan. Bars represent means \pm SD, n=3. Means with different letters are significant difference ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Quercetin at 0.12 mg/mL level.



圖四十三、省產樹豆台東3號不同發芽時間乙醇萃取物(0.12 mg/mL)對
AGEs 之抑制率

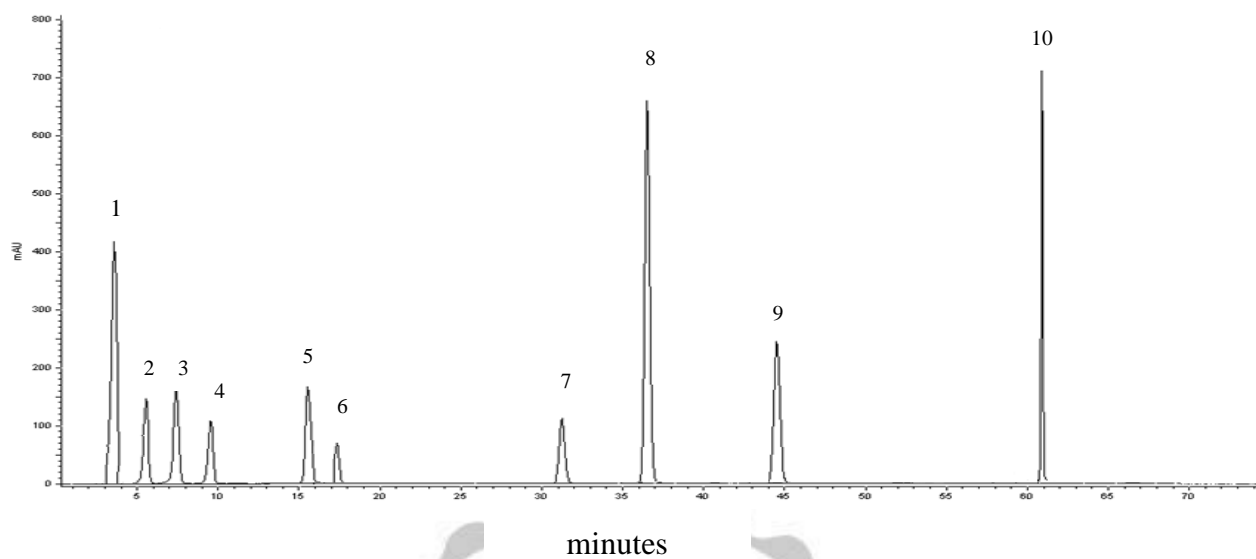
Fig.43. Advanced glycation end products inhibitory activity of ethanol extracts at 0.12 mg/mL level from different germination time of Taitung 3 pigeon pea in Taiwan. Bars represent means \pm SD, n=3. Means with different letters are significant difference ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test. Aminoguanidine at 0.12 mg/mL level.

三、樹豆不同發芽時間類黃酮化合物含量分析

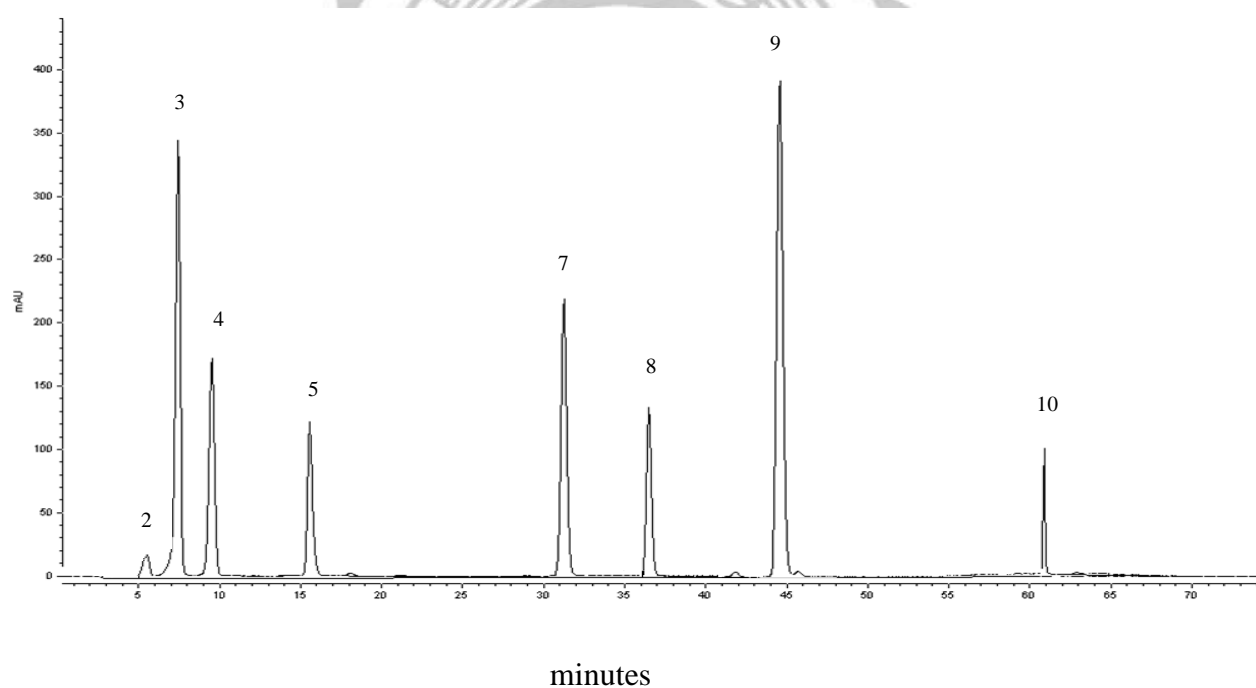
多酚及類黃酮化合物不僅能抑制醣解酵素，且對醣糖還原酶參與之多元醇路徑也具抑制活性，此外蛋白質醣化過程會伴隨氧化自由基生成，而類黃酮化合物抑制醣化之特性與其清除醣化過程所衍生出的自由基間有顯著相關($R^2=0.79$)，且推測類黃酮抑制醣化作用機制應與本身之抗氧化性有關(Krone and Ely, 2004 ; Gao *et al.*, 2008)，因此本研究進一步利用 HPLC 進行類黃酮化合物分析，圖四十四為不同檢測波長下類黃酮化合物的 HPLC 層析圖，包括 280 nm 有 catechin + EGCG, cyanidin-3-glucoside, orientin, vitexin, quercetin, genistein, apigenin, pinostrobin, ellagic acid 及 benzoic acid (內標準品)，347 nm 有 cyanidin-3-glucoside, orientin, vitexin, quercetin, genistein, apigenin, pinostrobin 及 ellagic acid (內標準品)。Liu *et al.* (2010)提出特定類黃酮滯留時間(RT)分佈有其規則性，隨 OH 基團數增加，極性也跟著增加則 RT 減少，另外多酚若含極性取代基團，則 RT 會增加。

表十三為不同發芽時間樹豆中類黃酮化合物含量之變化，結果指出隨發芽時間增加其含量呈現先增加後下降的趨勢，每一種含量多的類黃酮均集中在發芽第 5、7 及 9 天，在第 5 天含量最多的包括 catechin + EGCG 顯著高於其他天數($p < 0.05$)，從未發芽第 0 天的 0.34 mg / g extract 增加至 1.85 mg / g extract；在第 7 天量最多的有 cyanidin-3-glucoside, genistein,

(a) 280 nm



(b) 347nm



圖四十四、(a) 280 nm (b) 347 nm 波長下類黃酮化合物的 HPLC 層析圖

Fig. 44. HPLC chromatograms of flavonoid compounds under (a) 280 nm (b) 347 nm detection. 1.catechin + EGCG; 2.cyanidin-3-glucoside; 3.orientin; 4.vitexin; 5.ellagic acid; 6.benzoic acid; 7.quercetin; 8.genistein; 9.apigenin; 10.pinostrobin

表十三、不同發芽時間台東3號樹豆中類黃酮化合物含量之變化

Table 13. Changes of flavonoid compound contents in different germination time of Taitung 3 pigeon pea. Means represent means±SD, n=3. Means with different letters in the same row are significant difference (p<0.05) by Duncan's multiple range test

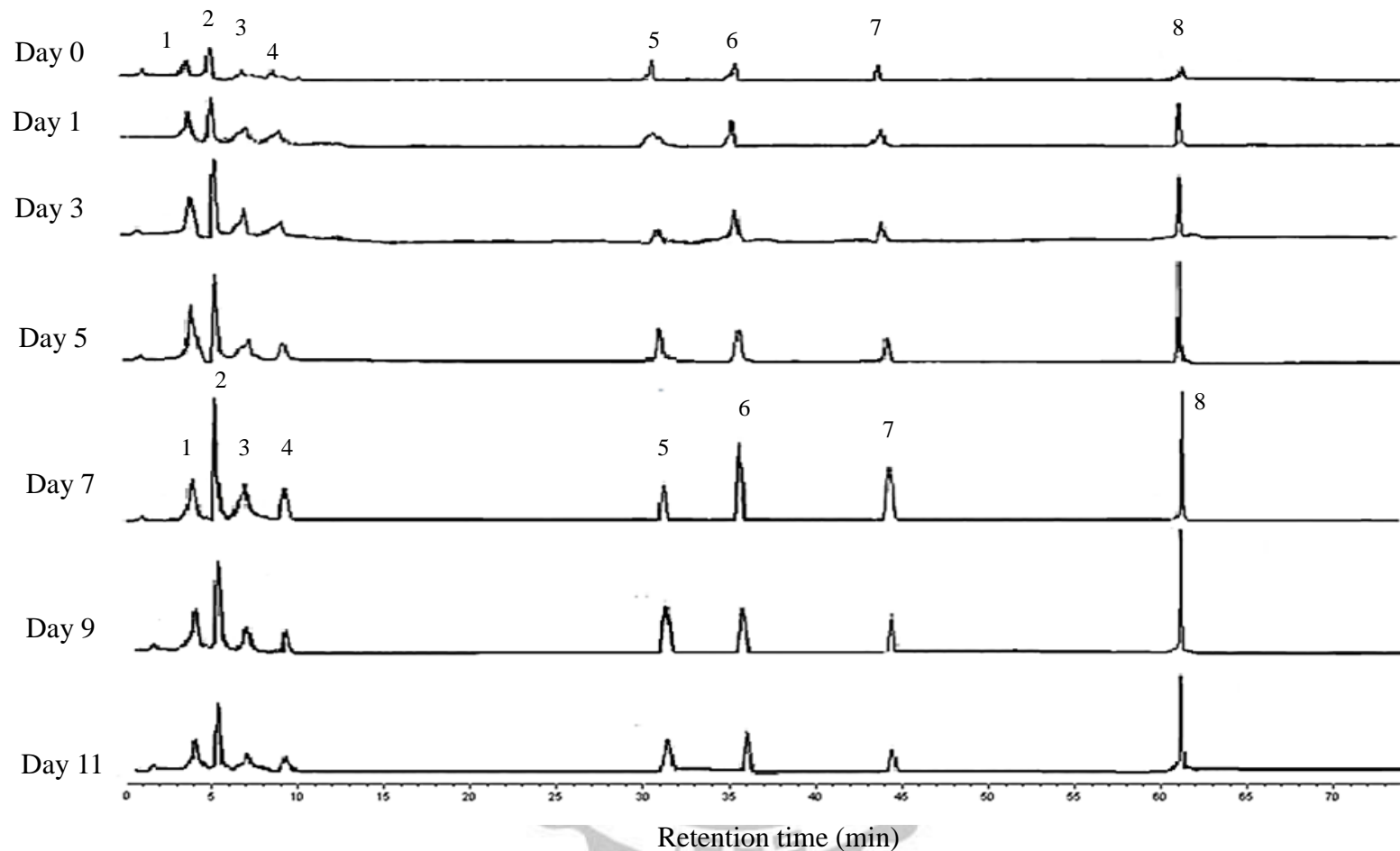
Flavonoid* compounds	Germination time (day)						
	0	1	3	5	7	9	11
Catachin+EGCG	0.34 ± 0.02e	0.99 ± 0.01d	1.40 ± 0.04c	1.85 ± 0.03a	1.51 ± 0.05b	1.50 ± 0.06b	1.39 ± 0.04c
Cyanidin-3-glucoside	1.94 ± 0.09f	2.31 ± 0.13e	4.09 ± 0.10d	4.25 ± 0.02c	5.04 ± 0.11a	4.78 ± 0.06b	4.23 ± 0.04cd
Genistein	0.13 ± 0.08f	0.15 ± 0.08e	0.22 ± 0.09d	0.21 ± 0.04d	0.48 ± 0.02a	0.42 ± 0.08b	0.39 ± 0.07c
Orientin	0.06 ± 0.01e	0.09 ± 0.05d	0.10 ± 0.03c	0.11 ± 0.02b	0.13 ± 0.05a	0.10 ± 0.02c	0.09 ± 0.04d
Vitexin	0.08 ± 0.07d	0.11 ± 0.06b	0.09 ± 0.05cd	0.11 ± 0.01b	0.13 ± 0.01a	0.10 ± 0.05bc	0.09 ± 0.05cd
Isovitexin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Quercetin	0.09 ± 0.02b	0.10 ± 0.03b	0.08 ± 0.05b	0.10 ± 0.03b	0.10 ± 0.01b	0.13 ± 0.05a	0.10 ± 0.02b
Luteolin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Apigenin	0.104 ± 0.05c	0.120 ± 0.09abc	0.116 ± 0.09 bc	0.119 ± 0.01 abc	0.135 ± 0.01 a	0.127 ± 0.06 ab	0.126 ± 0.09 ab
Isorhamnetin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pinostrobin	0.08 ± 0.08g	0.11 ± 0.04f	0.14 ± 0.07e	0.31 ± 0.01d	0.75 ± 0.01b	0.82 ± 0.02a	0.73 ± 0.07c
Total	2.824	3.980	6.236	7.059	8.275	7.977	7.146

* mg / g Extract

orientin, vitexin 及 apigenin，分別可達 5.04、0.48、0.13、0.13 及 0.135 mg/g extract，相較於未發芽第 0 天分別提高了 2.60、3.69、2.17、1.63 及 1.30 倍；而第 9 天量最多的有 quercetin 及 pinostrobin，達 0.13 及 0.82 mg/g extract，皆顯著高於其他天數($p < 0.05$)，相較未發芽第 0 天也提高了 1.44 及 10.25 倍，由此可證發芽處理能提高樹豆內類黃酮之含量。Zu *et al.* (2006)針對樹豆葉之乙醇萃取物進行類黃酮分析，結果提到其成分內之 quercetin 及 apigenin 分別達 0.082 及 0.130 mg/g extract 均較本研究測得之最高量少 1.59 及 1.06 倍。Apigenin 及 vitexin 經研究證實具有抗氧化及抑制最終醣化產物 AGEs 形成之活性(Choi *et al.*, 2014)。Matsuda *et al.* (2002)等學者提出，對 aldose reductase 具抑制活性的類黃酮，在結構上具有共通點，flavone 及 flavonol 有較高的抑制效果，另外若於其 B ring 之 C3、C4 位置上，帶有 catechol group，或是 C7 位置上有 OH 基之類黃酮，具有較高的抑制活性，因而本研究測定之類黃酮中，符合條件的包括 apigenin, quercetin, genistein, vitexin, orientin, pinostrobin(如圖四十四)這些都具有 aldose reductase 抑制活性，而樹豆乙醇萃取物中特定類黃酮總含量其最高量都集中在發芽第 7 和第 9 天，分別可達 8.275 mg/g extract 和 7.977 mg/g extract，而 aldose reductase 抑制效果最顯著也

為發芽第 7 天和第 9 天(如表十三)，兩者結果相互呼應。

圖四十五為不同發芽時間台東 3 號樹豆之 HPLC 層析圖，結果指出，發芽第 7 天其波峰面積明顯大於其餘天數，其中 catechin 及 EGCG 滯留時間一致，因此共同計算含量，其餘類黃酮化合物之滯留時間(RT)分佈有其規則性，隨 OH 基團數增加，極性也跟著增加則 RT 減少，另外多酚若含極性取代基團，則 RT 會增加 (Liu *et al.* (2010)。綜合以上結果顯示，以總量而言，不同發芽天數中以第 7 天佔有最多量之類黃酮，而類黃酮化合物之間，又以花青素 cyanidin-3-glucoside 佔的量最高，達 5.04 mg/g extract。Lai *et al.* (2012)以 HPLC 分析樹豆乙醇萃取物，分析出 cyanidin-3-glucoside 含有 2.25 mg/g extract，而本研究發芽第 7 天的 5.04 mg/g extract 多出前者 2.24 倍。



圖四十五、280 nm 波長下不同發芽天數台東 3 號樹豆乙醇萃取物之 HPLC 層析圖

Fig. 45. HPLC chromatograms of different germination stages of Taitung 3 pigeon pea under 280 nm. 1.catechin + EGCG; 2.cyaniding-3-glucoside; 3.orientin; 4.vitexin; 5.quercetin; 6.genistein; 7.apigenin; 8.pinostrobin

伍、結論

本研究首先探討不同品種樹豆之醣解酵素與醛糖還原酶(α -amylase, α -glucosidase 及 aldose reductase)抑制活性、蛋白質醣化最終產物(AGEs)抑制量及抗氧化活性等，進行整體性分析比較，以篩選出保健效果最佳的樹豆品種，結果指出樹豆台東 3 號醣解酵素及醛糖還原酶之抑制活性與醣化蛋白質抑制量均顯著高於其他品種($p < 0.05$)，且具有最強之抗氧化活性。後續以台東 3 號作為起始原料，探討不同發芽時間對醣解酵素、醛糖還原酶抑制活性及蛋白質醣化抑制量之影響，結果顯示，發芽第七天醣解酵素之抑制活性及醣化蛋白質抑制量顯著高於其他發芽時間($p < 0.05$)，且也具顯著之抗氧化活性，更經 HPLC 進一步分析發芽樹豆內特定類黃酮之含量，獲悉樹豆內最多量之類黃酮為花青素 cyanidin-3-glucoside，達 5.04 mg/g extract，且發芽第七天有最高之特定類黃酮總量為 8.275 mg/g extract，由上述結果證實發芽樹豆更具調節血糖保健食品之研發潛力。

陸、參考文獻

- 吳崇榮 (2004). 自然醫學在第 2 型糖尿病治療中的角色扮演. 自然醫學研究: 10-16.
- 吳崇榮 (2004). 糖尿病慢性併發症的致病機轉和未來展望. 台灣醫界 47(6): 13-18.
- 吳崇榮 (2009). 新陳代謝記憶：糖尿病治療的新挑戰. 內科學誌 20: 220-225.
- 何志剛 (2010). 高 GABA 發芽豆類篩選及促進 GABA 生成因子探討. 東海大學食品科學研究所碩士論文.
- 沈德昌、顏兆熊 (2008). 第 2 型糖尿病藥物治療新知. 台灣醫界 51: 11.
- 林筱晴 (2012). 樹豆對酒精誘導肝細胞損傷之保護效應及其活性成分之研究. 嘉義大學食品科學研究所碩士論文.
- 林瀚文 (2015). 不同生長階段金針花苞萃取物之抗發炎活性研究. 東海大學食品科學研究所碩士論文.
- 胡智伯 (2002). 口服降血糖製劑與天然調節血糖物質. 食品工業 34(6): 19-37.
- 趙文婉、張珍田、周淑姿 (2001). 五種食用豆芽菜 50% 乙醇萃取液抗氧化活性研究. 中華生質能源學會繪誌 20(3-4): 113-122.
- 郭柏村 (2011). 高良薑乙酸乙酯萃取物之抗氧化成分及調節血糖作用. 東海大學食品科學研究所碩士論文.
- 陳紀樺 (2002). 血糖調節機制及功效評估. 食品工業 34(6): 2-17.
- 陳振義、王柏蓉、蘇炳鐸、黃 昌 (2010). 一枝獨秀-臺灣藜. 農友月刊 4 月: 61-63.
- 陳振義 (2011). 樹豆新品種介紹. 臺東區農技報導(8): 1-4.
- 陳振義、王勝、葉茂生 (2012). 樹豆新品種-臺東 1 號、2 號、3 號之育成. 台東區農業改良場研究彙報 22: 31-52.
- 陳振義 (2013). 樹豆有機栽培技術. 臺東區農技報導(19): 1-4.
- 張昭伶 (2014). 秋葵萃取物及其純化物質之抗氧化及葡萄糖恆定作用. 東海大學食品科學研究所碩士論文.
- 楊期和、宋松泉、葉萬輝、殷壽華 (2003). 種子感光的機裡及影響種子感光性的因素. 植物學通報 20(2): 238-247.
- 趙佩君 (2010). 分析醬料醱化產物含量以及探討糖尿病人飲食中醱化產物與血液中氧化、發炎因子的相關性. 中山醫學大學營養學系博士論文.
- 熊皓儀 (2014). 核桃仁乙酸乙酯區分物及純化物質之抗氧化及醱解酵素抑制作用. 東海大學食品科學研究所碩士論文.
- 劉毓蕙 (2008). 後期醱化終產物與活性氧在糖尿病併發症中的角色. 食品工業 40(1): 27-35.
- 戴汎蓁 (2010). 樹豆調節高脂飲食誘發倉鼠高血脂症之探討. 嘉義大學食品科學研究所碩士論文.
- 譚健民 (2011). 美國糖尿病協會(ADA)糖尿病診療標準指引摘要.
- Abdel-Rahman, E., & Bolton, W. K. (2002). Pimagedine: a novel therapy for diabetic nephropathy. *Expert Opin Investig Drugs*, 11(4), 565-574.
- Abderrahim, F., Huanatico, E., Repo-Carrasco-Valencia, R., Arribas, S. M., Gonzalez, M. C., & Condezo-Hoyos, L. (2012). Effect of germination on total phenolic compounds, total antioxidant capacity, Maillard reaction products and oxidative stress markers in canihua (*Chenopodium pallidicaule*). *Journal of Cereal Science*,

- 56(2), 410-417.
- Abuja, P. M., & Albertini, R. (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin Chim Acta*, 306(1-2), 1-17.
- Adam Z, K. S., Ismail A, Harmid M. . (2010). Inhibitory properties of *Ficus deltoidea* on α -glucosidase activity. *Res. J. Med. Plant*, 4(2), 61-75.
- Al-Saeedi, A. H., & Hossain, M. A. (2015). Total phenols, total flavonoids contents and free radical scavenging activity of seeds crude extracts of pigeon pea traditionally used in Oman for the treatment of several chronic diseases. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(4), 316-321.
- Ali, H., Houghton, P. J., & Soumyanath, A. (2006). alpha-Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *J Ethnopharmacol*, 107(3), 449-455.
- Amalraj, T., & Ignacimuthu, S. (1998). Hypoglycemic activity of *Cajanus cajan* (seeds) in mice. *Indian J Exp Biol*, 36(10), 1032-1033.
- American Diabetes Association (ADA) (2015). 2015 ADA Diabetes Guidelines.
- Anguelova, T., Warthsen, J. (2000). Degradation of lycopene, α -carotene, and β -carotene during lipid peroxidation. *J. Food Sci.*, 65, 71-75.
- Aquino, A. C., Jorge, J. A., Terenzi, H. F., & Polizeli, M. L. (2003). Studies on a thermostable alpha-amylase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 61(4), 323-328.
- Arnao, M. B., Cano, A., Hernandez-Ruiz, J., Garcia-Canovas, F., & Acosta, M. (1996). Inhibition by L-ascorbic acid and other antioxidants of the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) oxidation catalyzed by peroxidase: a new approach for determining total antioxidant status of foods. *Anal Biochem*, 236(2), 255-261.
- Aruoma, O. I. (1994). Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 32, 671-683.
- Bajpai, V. K., Sharma, A., Kang, Sun C., Baek, Kwang-Hyun. (2014). Antioxidant, lipid peroxidation inhibition and free radical scavenging efficacy of a diterpenoid compound sugiol isolated from *Metasequoia glyptostroboides*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7(1), 9-15.
- Baron, A. D. (1998). Postprandial hyperglycaemia and alpha-glucosidase inhibitors. *Diabetes Res Clin Pract*, 40 Suppl, S51-S55.
- Baynes, J. W., & Thorpe, S. R. (1999). Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes*, 48(1), 1-9.
- Bernfeld, P. (1955). Amylase α and β . *Methods Enzymol*, 1, 149-158.
- Bessesen, D. H. (2001). The Role of Carbohydrates in Insulin Resistance. *J. Nutr.*, 131, 2782S-2786S.
- Beyer, R. E. (1994). The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: interaction with vitamin E and coenzyme Q. . *J. Bioenerg. Biomembr.*, 26(4), 349-358.
- Blonska, M., Bronikowska, J., Pietsz, G., Czuba, Z. P., Scheller, S., & Krol, W. (2004). Effects of ethanol extract of propolis (EEP) and its flavones on inducible gene expression in J774A.1 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 91(1), 25-30.
- Booth, A. A., Khalifah, R. G., & Hudson, B. G. (1996). Thiamine pyrophosphate and pyridoxamine inhibit the formation of antigenic advanced glycation end-products: comparison with aminoguanidine. *Biochem Biophys Res Commun*, 220(1),

113-119.

- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *NATURE*, *414*, 813-820.
- Buse, M. G. (2006). Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *290*(1), E1-E8.
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol*, *51*, 15-25.
- Ceriello, A. (2003). New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy. *Diabetes Care*, *26*(5), 1589-1596.
- Chalas, J., Claise, C., Edeas, M., Messaoudi, C., Vergnes, L., Abella, A., & Lindenbaum, A. (2001). Effect of ethyl esterification of phenolic acids on low-density lipoprotein oxidation. *Biomed Pharmacother*, *55*(1), 54-60.
- Choi, J. S., Islam, M. N., Ali, M. Y., Kim, E. J., Kim, Y. M., & Jung, H. A. (2014). Effects of C-glycosylation on anti-diabetic, anti-Alzheimer's disease and anti-inflammatory potential of apigenin. *Food Chem Toxicol*, *64*, 27-33.
- Cook, N. C. a. S. S. (1996). Flavonoids: Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.*, *7*, 66-76.
- Crane, F. L. (2001). Biochemical functions of coenzyme Q10. *J Am Coll Nutr*, *20*(6), 591-598.
- Cristina Martínez-Villaluenga, Y.-H. K., Fernand Lambein, Juana Frías, Concepción Vidal-Valverde. (2006). Kinetics of free protein amino acids, free non-protein amino acids and trigonelline in soybean (*Glycine max* L.) and lupin (*Lupinus angustifolius* L.) sprouts. *European Food Research and Technology*, *224*(2), 177-186.
- Dandona, P., Thusu, K., Cook, S., Snyder, B., Makowski, J., Armstrong, D., & Nicotera, T. (1996). Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet*, *347*(8999), 444-445.
- Dimitriadis, G., Mitrou, P., Lambadiari, V., Maratou, E., & Raptis, S. A. (2011). Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res Clin Pract*, *93* Suppl 1, S52-59.
- Du, X. L., Edelstein, D., Rossetti, L., Fantus, I. G., Goldberg, H., Ziyadeh, F., Wu, J., & Brownlee, M. (2000). Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(22), 12222-12226.
- Duker-Eshun, G., Jaroszewski, J. W., Asomaning, W. A., Opong-Boachie, F., & Brogger Christensen, S. (2004). Antiplasmodial constituents of *Cajanus cajan*. *Phytother Res*, *18*(2), 128-130.
- Duman, B. S., Turkoglu, C., Gunay, D., Cagatay, P., Demiroglu, C., & Buyukdevrim, A. S. (2003). The interrelationship between insulin secretion and action in type 2 diabetes mellitus with different degrees of obesity: evidence supporting central obesity. *Diabetes Nutr Metab*, *16*(4), 243-250.
- Ernster, L., & Dallner, G. (1995). Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim Biophys Acta*, *1271*(1), 195-204.
- Ernster, L., & Forsmark-Andree, P. (1993). Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms. *Clin Investig*, *71*(8 Suppl), S60-65.
- Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., & Grodsky, G. M. (2002). Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes.

- Endocr Rev*, 23(5), 599-622.
- Ezike, A. C., Akah, P. A., Okoli, C. C., & Okpala, C. B. (2010). Experimental evidence for the antidiabetic activity of *Cajanus cajan* leaves in rats. *J Basic Clin Pharm*, 1(2), 81-84.
- Fahey, J. W., & Stephenson, K. K. (2002). Pinostrobin from honey and thai ginger (*Boesenbergia pandurata*): A potent flavonoid inducer of mammalian phase 2 chemoprotective and antioxidant enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25), 7472-7476.
- Fan-Jhen Dai, W.-H. H., Jan-Jeng Huang, She-Ching Wu. (2013). Effect of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.) on high-fat diet-induced hypercholesterolemia in hamsters. *Food and Chemical Toxicology*, 53, 384-391.
- Fernandez-Orozco, R., Frias, J., Zielinski, H., Muñoz, R., Piskula, M. K., Kozłowska, H., & Vidal-Valverde, C. (2009). Evaluation of bioprocesses to improve the antioxidant properties of chickpeas. *LWT - Food Science and Technology*, 42(4), 885-892.
- Finosh, G. T. J., Muthu. (2013). Reactive oxygen species—Control and management using amphiphilic biosynthetic hydrogels for cardiac applications. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4 (12), 1134-1146.
- Frandsen, T. P., Svensson, B. (1998). Plant α -glucosidases of the glycoside hydrolase family 31. Molecular properties, substrate specificity, reaction mechanism, and comparison with family members of different origin. *Plant Molecular Biology*, 37, 1-13.
- Fred-Jaiyesimi, A., Kio, A., & Richard, W. (2009). α -Amylase inhibitory effect of 3 β -olean-12-en-3-yl (9Z)-hexadec-9-enoate isolated from *Spondias mombin* leaf. *Food Chemistry*, 116(1), 285-288.
- Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutase. *Annu. Rev. Biochem.*, 64(97-112).
- Fu, Y. J., Liu, W., Zu, Y. G., Tong, M. H., Li, S. M., Yan, M. M., Efferth, T., & Luo, H. (2008). Enzyme assisted extraction of luteolin and apigenin from pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves. *Food Chem*, 111(2), 508-512.
- Fuh-Juin Kao, Y.-s. C., Wen-Dee Chiang. (2014). Effect of water cooking on antioxidant capacity of carotenoid-rich vegetables in Taiwan. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22, 202-209.
- Fujisawa, T., Ikegami, H., Inoue, K., Kawabata, Y., & Ogihara, T. (2005). Effect of two α -glucosidase inhibitors, voglibose and acarbose, on postprandial hyperglycemia correlates with subjective abdominal symptoms. *Metabolism*, 54(3), 387-390.
- Gao, Y., Zhao, J., Zu, Y., Fu, Y., Liang, L., Luo, M., Wang, W., & Efferth, T. (2012). Antioxidant properties, superoxide dismutase and glutathione reductase activities in HepG2 cells with a fungal endophyte producing apigenin from pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. *Food Research International*, 49(1), 147-152.
- Gopi, M., Purushothaman, M. R., & Chandrasekaran, D. (2014). Effect of dietary coenzyme Q10 supplementation on the growth rate, carcass characters and cost effectiveness of broiler fed with three energy levels. *Springerplus*, 3, 518-520.
- Green, K., Brand, M. D., & Murphy, M. P. (2004). Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes*, 53 Suppl 1, S110-118.
- Greene DA, A. J., Brown MB. (1999). Effect of aldose reductase inhibition on nerve conduction and morphometry in diabetic neuropathy. *Zenarestat Study Group*.

- Neurology*, 53, 580-591.
- Gutierrez, R. M., Mitchell, S., & Solis, R. V. (2008). *Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol*, 117(1), 1-27.
- Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*, 344(8924), 721-724.
- Halliwell, B., Murcia, M. A., Chirico, S., & Aruoma, O. I. (1995). Free radicals and antioxidants in food and *in vivo*: what they do and how they work. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 35(1-2), 7-20.
- Hong, C. Y., Wang, C. P., Huang, S. S., & Hsu, F. L. (1995). The inhibitory effect of tannins on lipid peroxidation of rat heart mitochondria. *J Pharm Pharmacol*, 47(2), 138-142.
- Hong Gao, Y.-N. H., Bo Gao, Pei-Yu Xu, Chika Inagaki, Jun Kawabata. (2008). α -Glucosidase inhibitory effect by the flower buds of *Tussilago farfara* L. *Food Chemistry*, 106(3), 1195–1201.
- Horn, R. C., and V. M. Vargas. (2003). Antimutagenic activity of extracts of natural substances in the Salmonella/microsome assay. *Mutagenesis*, 18, 113-118.
- Hsieh, P. C., Huang, G. J., Ho, Y. L., Lin, Y. H., Huang, S. S. Chiang, Y. C., Tseng, M. C., & Chang, Y. S. (2010). Activities of antioxidants, α -glucosidase inhibitors and aldose reductase inhibitors of the aqueous extracts of four Flemingia species in Taiwan. *Botanical Studies*, 51, 293–302.
- Hsueh, W. A., & Law, R. E. (1998). Cardiovascular risk continuum: implications of insulin resistance and diabetes. *Am J Med*, 105(1a), 4-14.
- Imanaga, Y., Sakata, N., Takebayashi, S., Matsunaga, A., Sasaki, J., Arakawa, K., Nagai, R., Horiuchi, S., Itabe, H., & Takano, T. (2000). *In vivo* and *in vitro* evidence for the glycooxidation of low density lipoprotein in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*, 150(2), 343-355.
- Inoguchi, T., Li, P., Umeda, F., Yu, H. Y., Kakimoto, M., Imamura, M., Aoki, T., Etoh, T., Hashimoto, T., Naruse, M., Sano, H., Utsumi, H., & Nawata, H. (2000). High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*, 49(11), 1939-1945.
- Inzucchi, S. E. (2002). Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes: scientific review. *Jama*, 287(3), 360-372.
- Ishii, H., Jirousek, M. R., Koya, D., Takagi, C., Xia, P., Clermont, A., Bursell, S. E., Kern, T. S., Ballas, L. M., Heath, W. F., Stramm, L. E., Feener, E. P., & King, G. L. (1996). Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science*, 272(5262), 728-731.
- Jacob, R. A. (1994). Nutrition, health and antioxidants. *Inform.*, 11(1271-1275).
- Jacob, R. A. a. B. J. B. (1996). Oxidative damage and defense. *American Journal of Clinical Nutrition*, 63, 985S-990S.
- Jezek, P., & Hlavata, L. (2005). Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol*, 37(12), 2478-2503.
- Julkunen-Tiitto, R. (1985). Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33(2), 213-217.
- Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L. A. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31, 671-701.

- Keogh, R. J., Dunlop, M. E., & Larkins, R. G. (1997). Effect of inhibition of aldose reductase on glucose flux, diacylglycerol formation, protein kinase C, and phospholipase A2 activation. *Metabolism*, 46(1), 41-47.
- Khandelwal, S., Udipi, S. A., & Ghugre, P. (2010). Polyphenols and tannins in Indian pulses: Effect of soaking, germination and pressure cooking. *Food Research International*, 43(2), 526-530.
- Knapen, M. F., Zusterzeel, P. L., Peters, W. H., & Steegers, E. A. (1999). Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction. A review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 82(2), 171-184.
- Kong, Y., Fu, Y.-J., Zu, Y.-G., Chang, F.-R., Chen, Y.-H., Liu, X.-L., Stelten, J., & Schiebel, H.-M. (2010). Cajanuslactone, a new coumarin with anti-bacterial activity from pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves. *Food Chemistry*, 121(4), 1150-1155.
- Kong, Y., Fu, Y.-J., Zu, Y.-G., Liu, W., Wang, W., Hua, X., & Yang, M. (2009). Ethanol modified supercritical fluid extraction and antioxidant activity of cajanin stilbene acid and pinostrobin from pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves. *Food Chemistry*, 117(1), 152-159.
- Korshunov, S. S., Skulachev, V. P., & Starkov, A. A. (1997). High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett*, 416(1), 15-18.
- Koya, D., Haneda, M., Nakagawa, H., Isshiki, K., Sato, H., Maeda, S., Sugimoto, T., Yasuda, H., Kashiwagi, A., Watanabe, D. K., King, G. L., & Kikkawa, R. (2000). Amelioration of accelerated diabetic mesangial expansion by treatment with a PKC beta inhibitor in diabetic db/db mice, a rodent model for type 2 diabetes. *Faseb j*, 14(3), 439-447.
- Koya, D., & King, G. L. (1998). Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*, 47(6), 859-866.
- Krone, C. A., & Ely, J. T. (2004). Ascorbic acid, glycation, glycohemoglobin and aging. *Med Hypotheses*, 62(2), 275-279.
- Kuboki, K., Jiang, Z. Y., Takahara, N., Ha, S. W., Igarashi, M., Yamauchi, T., Feener, E. P., Herbert, T. P., Rhodes, C. J., & King, G. L. (2000). Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and *in vivo* : a specific vascular action of insulin. *Circulation*, 101(6), 676-681.
- Lai, Y. S., Hsu, W. H., Huang, J. J., & Wu, S. C. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory effects of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.) extracts on hydrogen peroxide- and lipopolysaccharide-treated RAW264.7 macrophages. *Food Function*, 3(12), 1294-1301.
- Lenzen, S., Drinkgern, J., & Tiedge, M. (1996). Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med*, 20(3), 463-466.
- Li, Y., Che, M., Bhagat, S., Ellis, K. L., Kucuk, O., Doerge, D. R., Abrams, J., Cher, M. L., & Sarkar, F. H. (2004). Regulation of gene expression and inhibition of experimental prostate cancer bone metastasis by dietary genistein. *Neoplasia*, 6(4), 354-363.
- Lillioja, S., Mott, D. M., Spraul, M., Ferraro, R., Foley, J. E., Ravussin, E., Knowler, W. C., Bennett, P. H., & Bogardus, C. (1993). Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians. *N Engl J Med*, 329(27), 1988-1992.

- Liu, W., Fu, Y., Zu, Y., Kong, Y., Zhang, L., Zu, B., & Efferth, T. (2009). Negative-pressure cavitation extraction for the determination of flavonoids in pigeon pea leaves by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1216(18), 3841-3850.
- Liu, W., Kong, Y., Zu, Y., Fu, Y., Luo, M., Zhang, L., & Li, J. (2010). Determination and quantification of active phenolic compounds in pigeon pea leaves and its medicinal product using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(28), 4723-4731.
- Liu, W., Zu, Y.-G., Fu, Y.-J., Kong, Y., Ma, W., Yang, M., Li, J., & Wu, N. (2010). Variation in contents of phenolic compounds during growth and post-harvest storage of pigeon pea seedlings. *Food Chemistry*, 121(3), 732-739.
- Lodovici, M., Guglielmi, F., Casalini, C., Meoni, M., Cheynier, V., & Dolaro, P. (2001). Antioxidant and radical scavenging properties in vitro of polyphenolic extracts from red wine. *Eur J Nutr*, 40(2), 74-77.
- Lopes, G. K., Schulman, H. M., & Hermes-Lima, M. (1999). Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochim Biophys Acta*, 1472(1-2), 142-152.
- Luo, M., Liu, X., Zu, Y., Fu, Y., Zhang, S., Yao, L., & Efferth, T. (2010). Cajanol, a novel anticancer agent from Pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] roots, induces apoptosis in human breast cancer cells through a ROS-mediated mitochondrial pathway. *Chem Biol Interact*, 188(1), 151-160.
- Luo, Q. F., Sun, L., Si, J. Y., & Chen, D. H. (2008). Hypocholesterolemic effect of stilbenes containing extract-fraction from *Cajanus cajan* L. on diet-induced hypercholesterolemia in mice. *Phytomedicine*, 15(11), 932-939.
- Marshall, S., Bacote, V., & Traxinger, R. R. (1991). Complete inhibition of glucose-induced desensitization of the glucose transport system by inhibitors of mRNA synthesis. Evidence for rapid turnover of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase. *J Biol Chem*, 266(16), 10155-10161.
- Matsuda, H., Morikawa, T., Toguchida, I., & Yoshikawa, M. (2002). Structural requirements of flavonoids and related compounds for aldose reductase inhibitory activity. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 50, 788-795.
- Maxwell, L., & Gavin, J. (1992). Anti-oxidant therapy improves microvascular ultrastructure and perfusion in postischemic myocardium. *Microvasc Res*, 43(3), 255-266.
- McCue, P. P., & Shetty, K. (2004). Inhibitory effects of rosmarinic acid extracts on porcine pancreatic amylase *in vitro*. *Asia Pac J Clin Nutr*, 13(1), 101-106.
- Meyer, A. S. a. A. I. (1995). Application of enzymes as food antioxidants. *Trends in Food Sci. and Tech.*, 6, 300-304.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond)*, 84(4), 407-412.
- Monauni, T., Zenti, M. G., Cretti, A., Daniels, M. C., Targher, G., Caruso, B., Caputo, M., McClain, D., Del Prato, S., Giaccari, A., Muggeo, M., Bonora, E., & Bonadonna, R. C. (2000). Effects of glucosamine infusion on insulin secretion and insulin action in humans. *Diabetes*, 49(6), 926-935.
- Morrissey, P. A., N.M. O'Brien. (1998). Dietary antioxidants in health and disease. *Int. Dairy J.*, 8, 463-472.
- Moskovitz, J., M. B. Yim, and P. B. Chock. (2002). Free radicals and disease. *Arch.*

- Biochem. Biophys.*, 397(2), 354-359.
- Mruk, D. D., Silvestrini, B., Mo, M. Y., & Cheng, C. Y. (2002). Antioxidant superoxide dismutase a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception*, 65(4), 305-311.
- Nardini, M., D'Aquino, M., Tomassi, G., Gentili, V., Di Felice, M., & Scaccini, C. (1995). Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. *Free Radic Biol Med*, 19(5), 541-552.
- Niki, E. (1992). Active oxygens and free radicals in biology. *Yukagaku*, 41(9), 768-773.
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X. L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M. A., Beebe, D., Oates, P. J., Hammes, H. P., Giardino, I., & Brownlee, M. (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *NATURE*, 404(6779), 787-790.
- Nobuyasu Matsuura, M. O., Tadashi Aradate, Junichi Hasegawa, Chihiro Sasaki, Hiroyuki Kojima, Makoto Ubukata, . (2002). Screening system for the maillard reaction inhibitor from natural product extracts. *Journal of Health Science*, 48, 520-526.
- Oloyo, R. A. (2004). Chemical and nutritional quality changes in germinating seeds of *Cajanus cajan* L. *Food Chemistry*, 85 497–502.
- Palanisamy, U. D., Ling, L. T., Manaharan, T., & Appleton, D. (2011). Rapid isolation of geraniin from *Nephelium lappaceum* rind waste and its anti-hyperglycemic activity. *Food Chemistry*, 127(1), 21-27.
- Park, L., Raman, K. G., Lee, K. J., Lu, Y., Ferran, L. J., Jr., Chow, W. S., Stern, D., & Schmidt, A. M. (1998). Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat Med*, 4(9), 1025-1031.
- Parmar, S. S., Jaiwal, A., Dhankher, O. P., & Jaiwal, P. K. (2015). Coenzyme Q10 production in plants: current status and future prospects. *Crit Rev Biotechnol*, 35(2), 152-164.
- Patel, N. K., & Bhutani, K. K. (2014). Pinostrobin and *Cajanus* lactone isolated from *Cajanus cajan* (L.) leaves inhibits TNF- α and IL-1 β production: *in vitro* and *in vivo* experimentation. *Phytomedicine*, 21(7), 946-953.
- Pinnell, S. R. (2003). Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *J Am Acad Dermatol*, 48(1), 1-19.
- Poitout, V., & Robertson, R. P. (2002). Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes--a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology*, 143(2), 339-342.
- Prentki, M., & Nolan, C. J. (2006). Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest*, 116(7), 1802-1812.
- Putnam, A. L., Brusko, T. M., Lee, M. R., Liu, W., Szot, G. L., Ghosh, T., Atkinson, M. A., & Bluestone, J. A. (2009). Expansion of human regulatory T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes*, 58(3), 652-662.
- Rahimi, R., Nikfar, S., Larijani, B., & Abdollahi, M. (2005). A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomed Pharmacother*, 59(7), 365-373.
- Ramu, R., Shirahatti, P. S., Zameer, F., Ranganatha, L. V., & Nagendra Prasad, M. N. (2014). Inhibitory effect of banana (*Musa* sp. var. Nanjangud rasa bale) flower extract and its constituents Umbelliferone and Lupeol on α -glucosidase, aldose reductase and glycation at multiple stages. *South African Journal of Botany*, 95, 54-63.
- Reddy, V. P., & Beyaz, A. (2006). Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as

- therapeutics for multiple diseases. *Drug Discov Today*, 11(13-14), 646-654.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*, 20(7), 933-956.
- Rikans, L. E., & Hornbrook, K. R. (1997). Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim Biophys Acta*, 1362(2-3), 116-127.
- Sakanaka S., T. Y. (2006). Active oxygen scavenging activity of egg-yolk protein hydrolysates and their effects on lipid oxidation in beef and tuna homogenates. *Food Chemistry*, 95, 243-249.
- Saltiel, A. R. (2001). New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell*, 104(4), 517-529.
- Saltiel, A. R., & Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *NATURE*, 414(6865), 799-806.
- Sangronis, E., & Machado, C. J. (2007). Influence of germination on the nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* and *Cajanus cajan*. *LWT - Food Science and Technology*, 40(1), 116-120.
- Sarikurku, C., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., & Harmandar, M. (2008). Studies on the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Marrubium globosum* subsp. *globosum* (lamiaceae) by three different chemical assays. *Bioresour Technol*, 99(10), 4239-4246.
- Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr*, 130(8S Suppl), 2073s-2085s.
- Sen, C. K. (1997). Nutritional biochemistry of cellular glutathione. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 8(12), 660-672.
- Shepherd, P. R., & Kahn, B. B. (1999). Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 341(4), 248-257.
- Shigenaga, M. K., Gimeno, C. J., & Ames, B. N. (1989). Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of *in vivo* oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(24), 9697-9701.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., & Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(6), 945-948.
- Shobana, S., Sreerama, Y. N., Malleshi, N. G. (2009). Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet (*Eleusine coracana* L.) seed coat phenolics: Mode of inhibition of α -glucosidase and pancreatic amylase. *Food Chemistry*, 115, 1268-1273.
- Shohag, M. J. I., Wei Yanyan, Yang X. . (2012). Changes of Folate and Other Potential Health-Promoting Phytochemicals in Legume Seeds As Affected by Germination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 9137-9143.
- Shu-Ping Wang, Kuo-Jun Huang. (2004). Determination of flavonoids by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1032(1-2), 273-279.
- Singh, R., Barden, A., Mori, T., & Beilin, L. (2001). Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*, 44(2), 129-146.
- Soulis-Liparota, T., Cooper, M., Papazoglou, D., Clarke, B., & Jerums, G. (1991). Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial

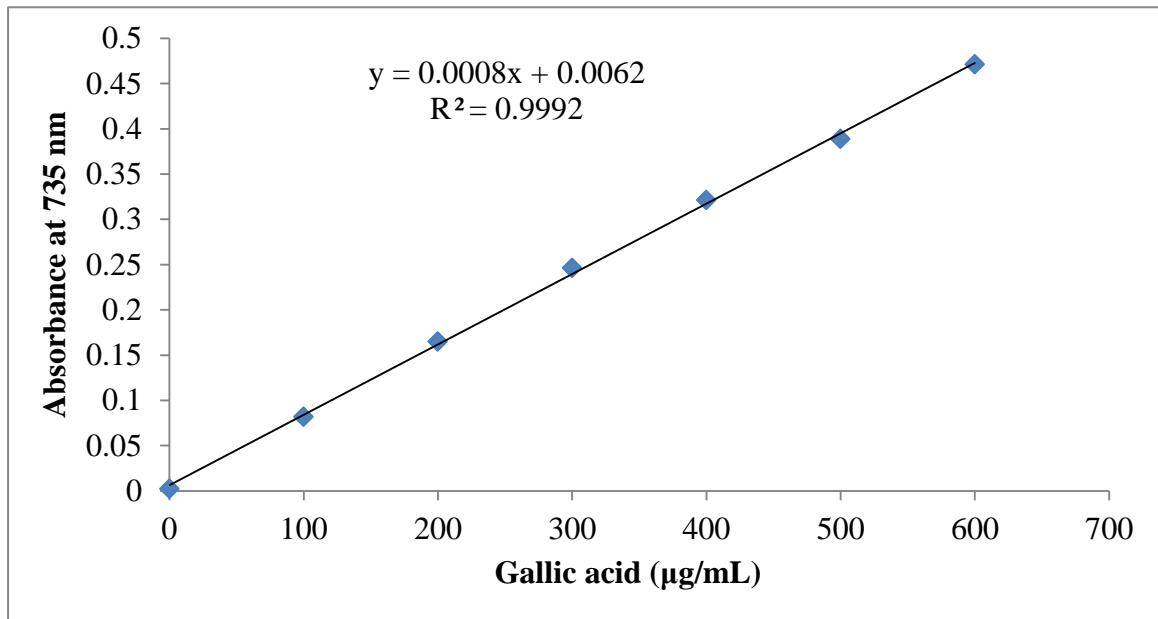
- expansion, and tissue fluorescence in streptozocin-induced diabetic rat. *Diabetes*, 40(10), 1328-1334.
- Sun, Y. P., Chou, C. C. and YU, R. C. (2009). Antioxidant activity of lactic-fermented Chinese cabbage. *Food Chemistry*, 115, 912-917.
- Sweetie R. Kanatt, A. K., Arun Sharma. (2011). Antioxidant and antimicrobial activity of legume hulls. *Food Research International*, 44, 3182–3187.
- Tabart, J. K., C.; Pincemail, J.; Defraigne, J.O.; Dommes, J.O.; Dommes, J. (2006). Antioxidant capacity of black currant varies with organ, season, and cultivar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 6(54), 6271–6276.
- Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K., & Matsuoka, T. (2006). Inhibition of alpha-glucosidase and alpha-amylase by flavonoids. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 52(2), 149-153.
- Tiedge, M., Lortz, S., Drinkgern, J., & Lenzen, S. (1997). Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes*, 46(11), 1733-1742.
- Torres, A., Frias, J., Granito, M., & Vidal-Valverde, C. (2007). Germinated *Cajanus cajan* seeds as ingredients in pasta products: Chemical, biological and sensory evaluation. *Food Chemistry*, 101(1), 202-211.
- Traber, M. G., & Atkinson, J. (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med*, 43(1), 4-15.
- Uribarri, J., & Tuttle, K. R. (2006). Advanced glycation end products and nephrotoxicity of high-protein diets. *Clin J Am Soc Nephrol*, 1(6), 1293-1299.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.*, 160(1), 1-40.
- Vaseekaran, S. B. a. V. A. (2010). Isolation and identification of a bacterial strain producing thermostable α - amylase. *Tropical Agricultural Research*, 22 (1), 1-11.
- Vessby, J., Basu, S., Mohsen, R., Berne, C., & Vessby, B. (2002). Oxidative stress and antioxidant status in type 1 diabetes mellitus. *J Intern Med*, 251(1), 69-76.
- Vinson, J. A., & Howard, T. B., III. (1996). Inhibition of protein glycation and advanced glycation end products by ascorbic acid and other vitamins and nutrients. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 7(12), 659-663.
- Wagner, J. A. (2002). Early clinical development of pharmaceuticals for type 2 diabetes mellitus: from preclinical models to human investigation. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(12), 5362-5366.
- Waring, W. S. (2007). Antidiabetic drugs. *Medicine*, 35(11), 590-591.
- Weber, C., Jakobsen, T. S., Mortensen, S. A., Paulsen, G., & Holmer, G. (1994). Effect of dietary coenzyme Q10 as an antioxidant in human plasma. *Mol Aspects Med*, 15 Suppl, 97-102.
- Wells-Knecht, K. J., Zyzak, D. V., Litchfield, J. E., Thorpe, S. R., & Baynes, J. W. (1995). Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry*, 34(11), 3702-3709.
- Wilcox, G. (2005). Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev*, 26(2), 19-39.
- Witayapan Nantitanon, S. Y., Siriporn Okonogi. (2010). Factors influencing antioxidant activities and total phenolic content of guava leaf extract. *LWT - Food Science and Technology*, 43(7), 1095–1103.
- Wu, C. H., & Yen, G. C. (2005). Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the

- formation of advanced glycation endproducts. *J Agric Food Chem*, 53(8), 3167-3173.
- Wu, G., Fang, Y. Z., Yang, S., Lupton, J. R., & Turner, N. D. (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*, 134(3), 489-492.
- Wu, N., Fu, K., Fu, Y. J., Zu, Y. G., Chang, F. R., Chen, Y. H., Liu, X. L., Kong, Y., Liu, W., & Gu, C. B. (2009). Antioxidant activities of extracts and main components of Pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves. *Molecules*, 14(3), 1032-1043.
- Yamagishi, S., & Imaizumi, T. (2005). Diabetic vascular complications: pathophysiology, biochemical basis and potential therapeutic strategy. *Curr Pharm Des*, 11(18), 2279-2299.
- Yokozawa, T., Cho, E. J., Hara, Y., & Kitani, K. (2000). Antioxidative activity of green tea treated with radical initiator 2, 2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride. *J Agric Food Chem*, 48(10), 5068-5073.
- Yu-Ping Sun, C.-C. C., Roch-Chui Yu. (2009). Antioxidant activity of lactic-fermented Chinese cabbage. *Food Chemistry*, 115(3), 912-917.
- Zhang, D.-Y., Zu, Y.-G., Fu, Y.-J., Luo, M., Wang, W., Gu, C.-B., Zhao, C.-J., Jiao, J., & Efferth, T. (2012). Enzyme pretreatment and negative pressure cavitation extraction of genistein and apigenin from the roots of pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] and the evaluation of antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 311-320.
- Zhang, D.-Y., Zu, Y.-G., Fu, Y.-J., Wang, W., Zhang, L., Luo, M., Mu, F.-S., Yao, X.-H., & Duan, M.-H. (2013). Aqueous two-phase extraction and enrichment of two main flavonoids from pigeon pea roots and the antioxidant activity. *Separation and Purification Technology*, 102, 26-33.
- Zhang, D. M., Li, Y., Cheang, W. S., Lau, C. W., Lin, S. M., Zhang, Q. L., Yao, N., Wang, Y., Wu, X., Huang, Y., & Ye, W. C. (2012). Cajaninstilbene acid relaxes rat renal arteries: roles of Ca²⁺ antagonism and protein kinase C-dependent mechanism. *PLS One*, 7(10), 11-13.
- Zhao, C., Liu, D., Li, C., Fu, Y., Yang, L., & Zu, Y. (2014). Separation of pinostrobin from pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaf extract using a cation exchange resin for catalytic transformation combined with a polyamide resin. *Separation and Purification Technology*, 133, 168-175.
- Zhao, J., Ma, D., Luo, M., Wang, W., Zhao, C., Zu, Y., Fu, Y., & Wink, M. (2014). In vitro antioxidant activities and antioxidant enzyme activities in HepG2 cells and main active compounds of endophytic fungus from pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. *Food Research International*, 56, 243-251.
- Zick, Y. (2001). Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling. *Trends Cell Biol*, 11(11), 437-441.
- Zierath, J. R., & Kawano, Y. (2003). The effect of hyperglycaemia on glucose disposal and insulin signal transduction in skeletal muscle. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 17(3), 385-398.
- Zimmet, P., Alberti, K. G. M. M., & Shaw, J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *NATURE*, 414(6865), 782-787.
- Zu, Y.-g., Fu, Y.-j., Liu, W., Hou, C.-l., & Kong, Y. (2006). Simultaneous determination of four flavonoids in pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves using RP-LC-DAD. *Chromatographia*, 63(9-10), 499-505.
- Zu, Y. G., Liu, X. L., Fu, Y. J., Wu, N., Kong, Y., & Wink, M. (2010). Chemical composition of the SFE-CO extracts from *Cajanus cajan* (L.) Huth and their

antimicrobial activity *in vitro* and *in vivo*. *Phytomedicine*, 17(14), 1095-1101.

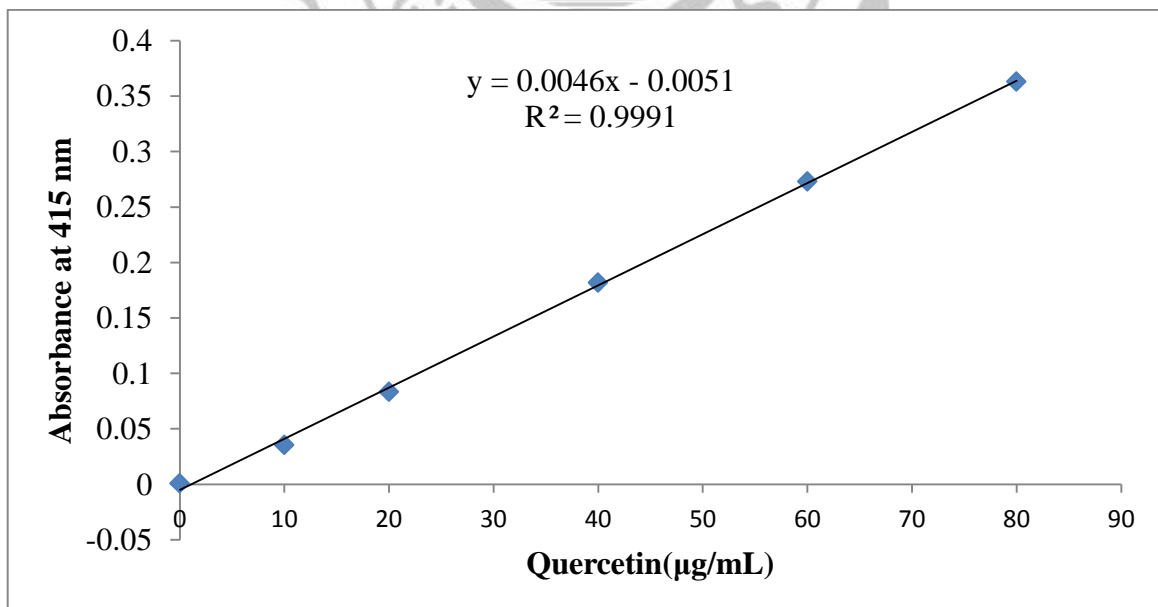


柒、附錄



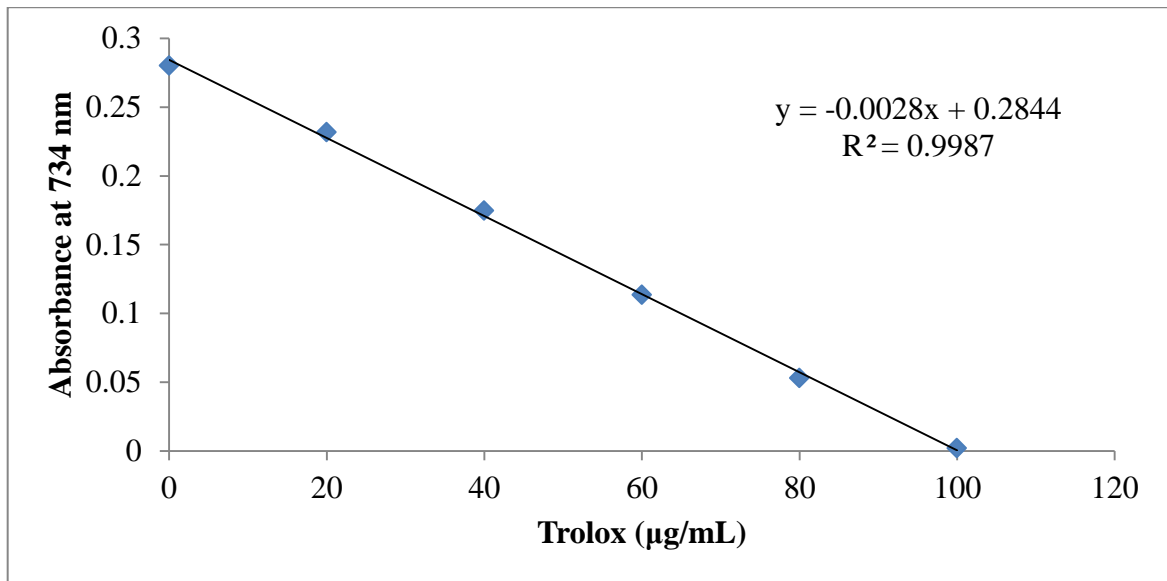
附錄一、沒食子酸之標準曲線

Appendix 1. Standard curve of gallic acid.



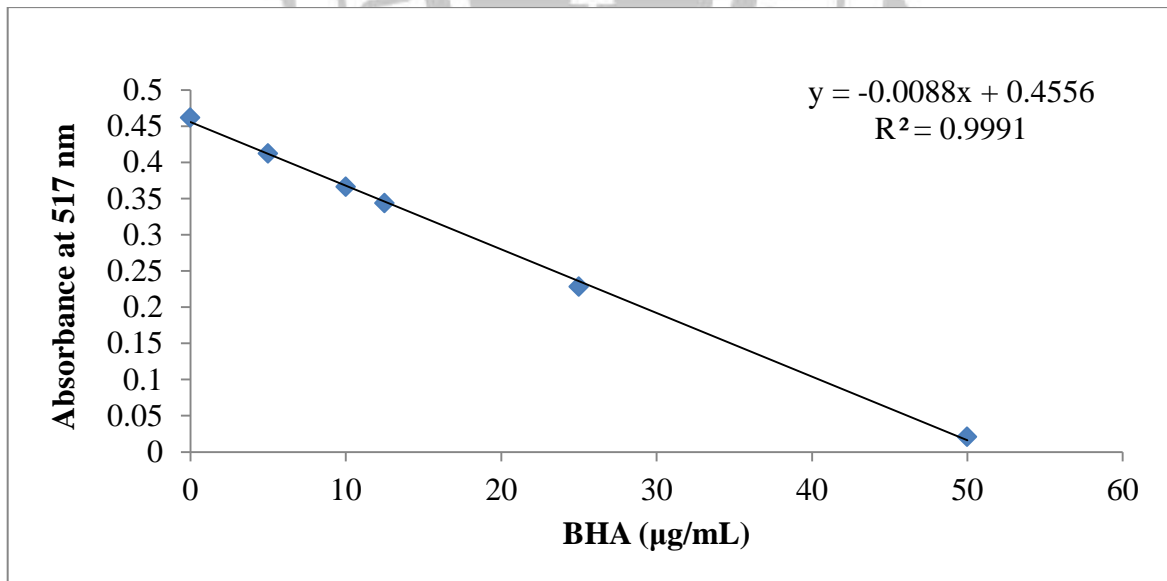
附錄二、槲皮酮之標準曲線

Appendix 2. Standard curve of quercetin.



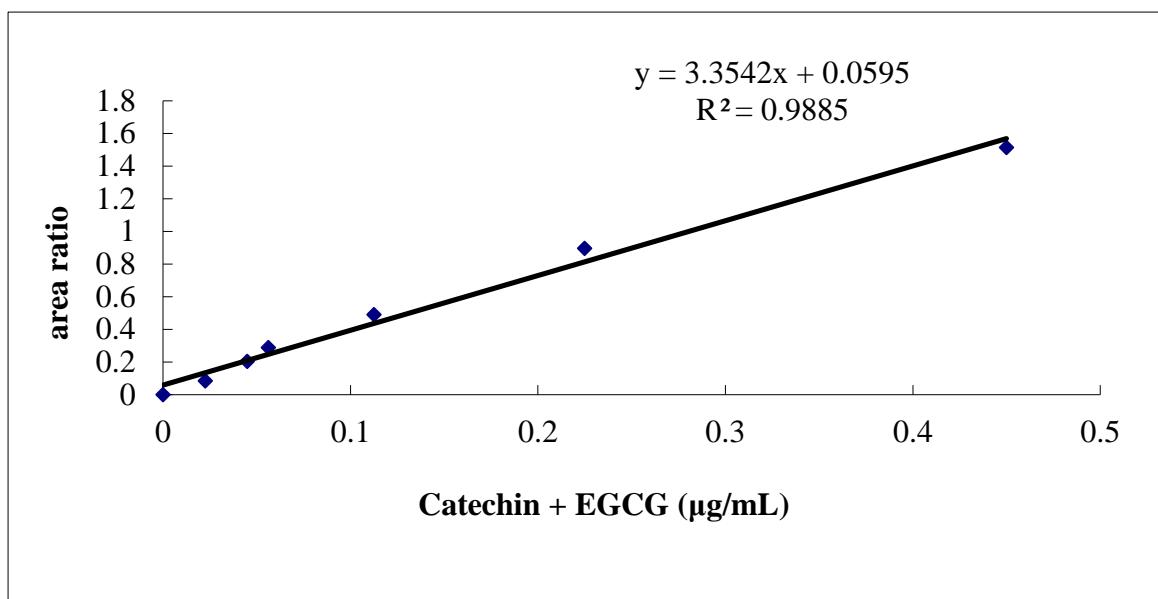
附錄三、Trolox 之標準曲線

Appendix 3. Standard curve of trolox.



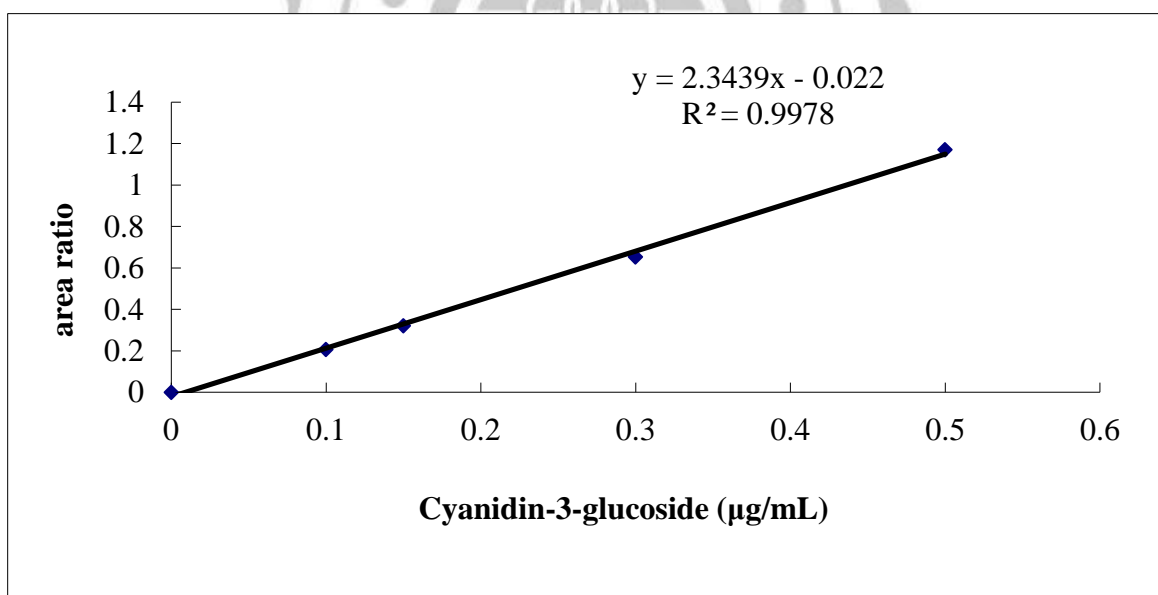
附錄四、BHA 之標準曲線

Appendix 4. Standard curve of BHA.



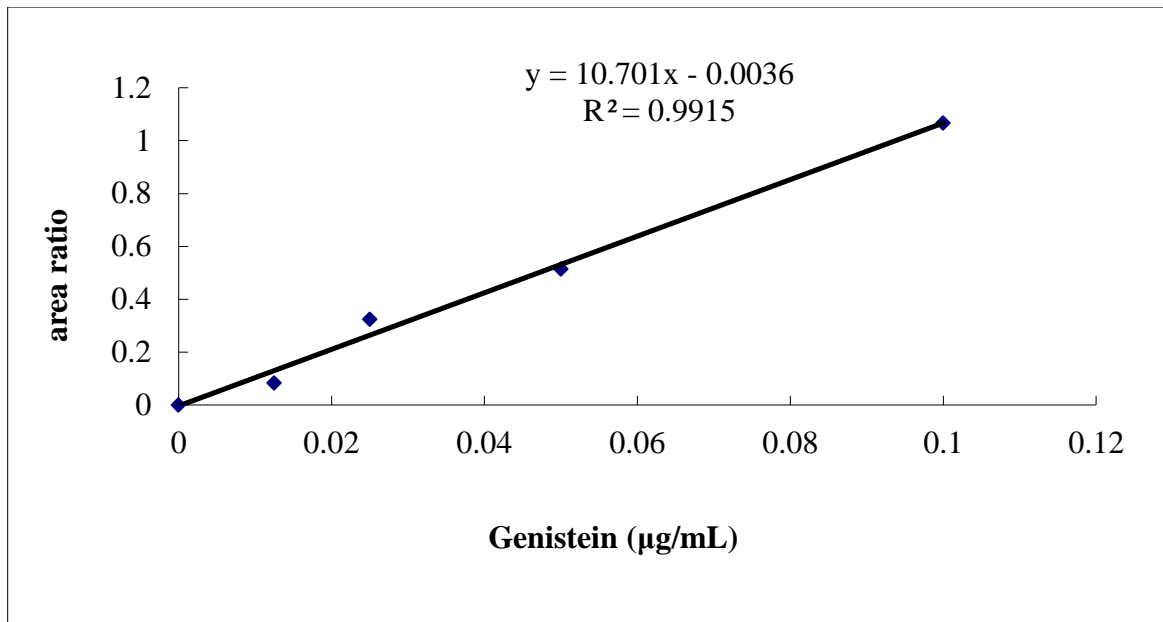
附錄五、Catechin + EGCG 之標準曲線

Appendix 5. Standard curve of catechin + EGCG.



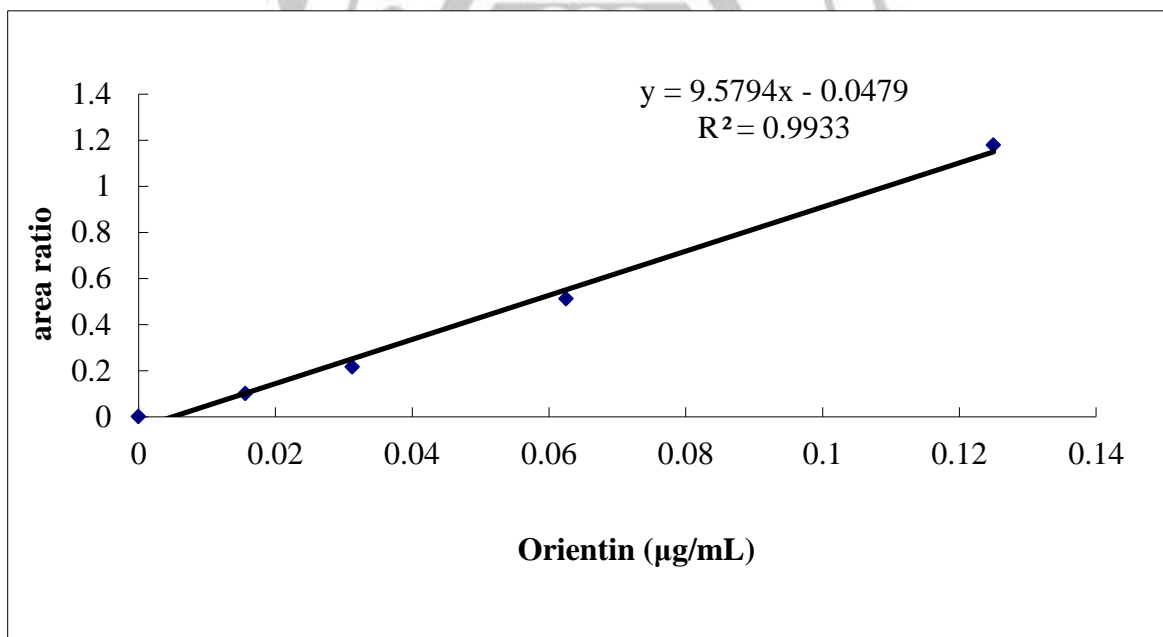
附錄六、Cyanidin-3-glucoside 之標準曲線

Appendix 6. Standard curve of cyanidin-3-glucoside.



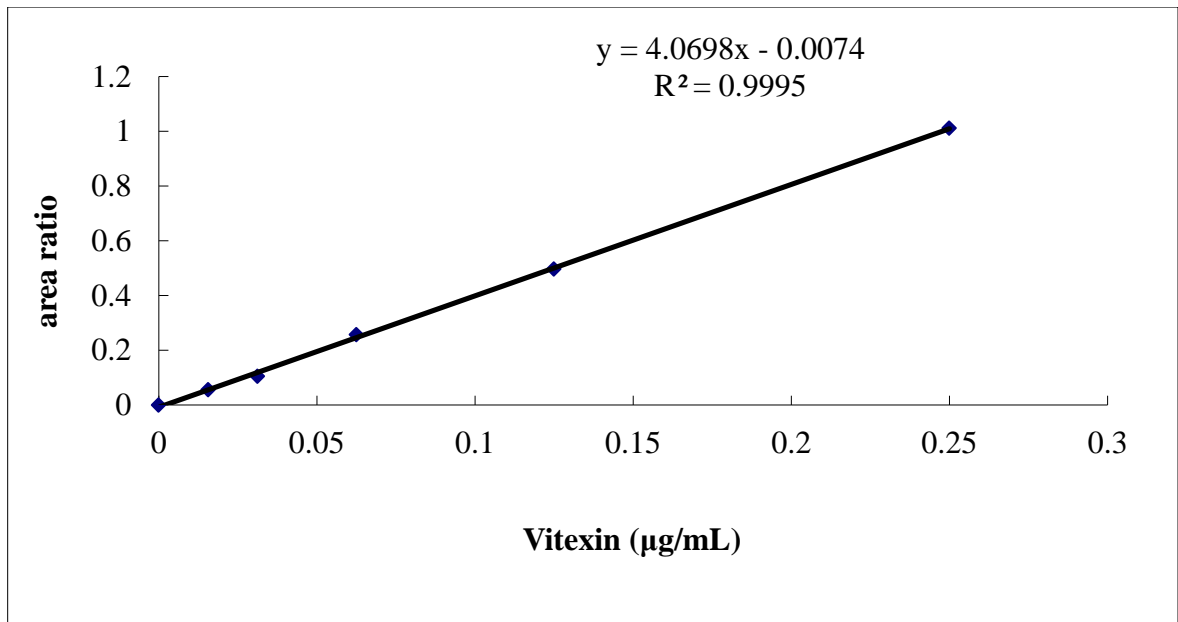
附錄七、Genistein 之標準曲線

Appendix 7. Standard curve of genistein.



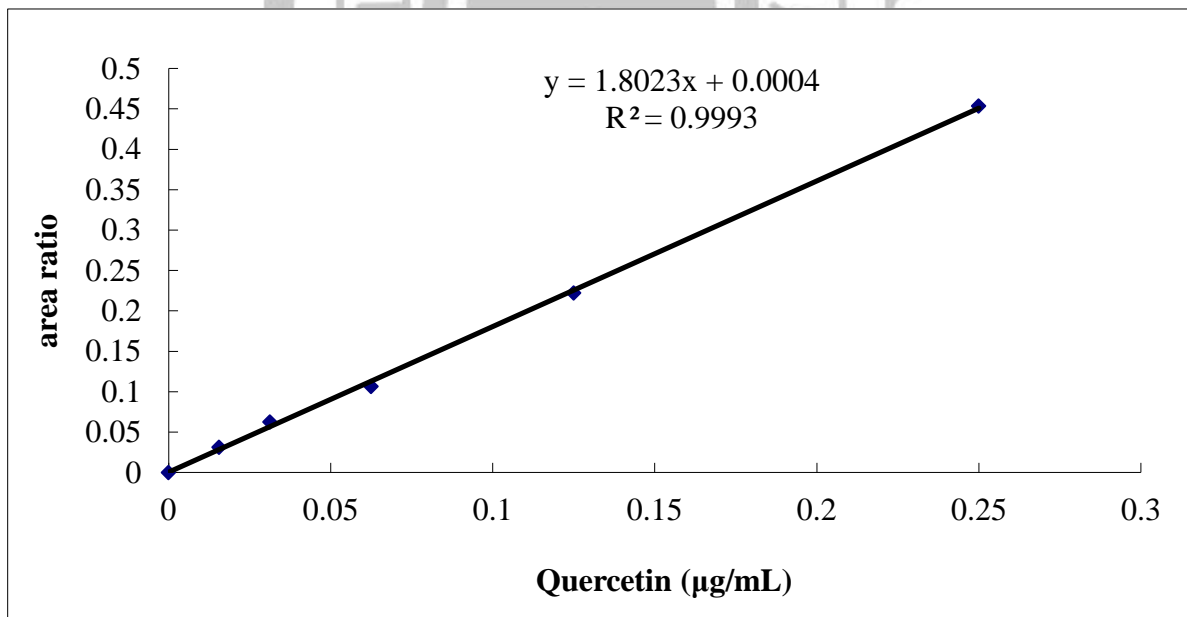
附錄八、Orientin 之標準曲線

Appendix 8. Standard curve of orientin.



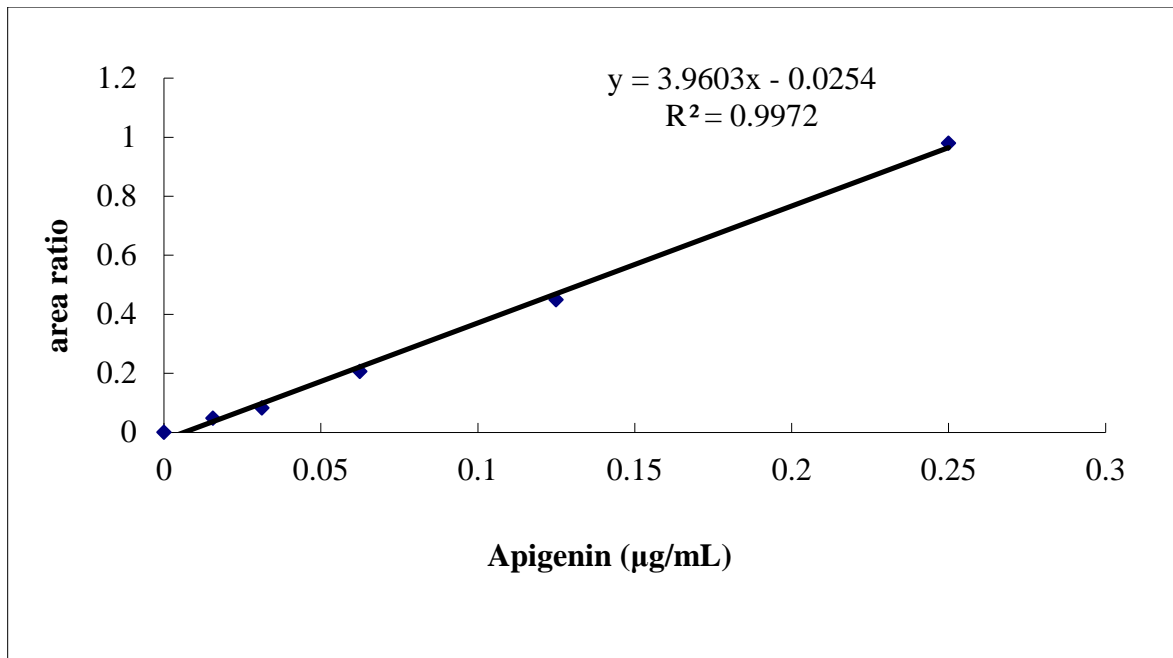
附錄九、Vitexin 之標準曲線

Appendix 9. Standard curve of vitexin.



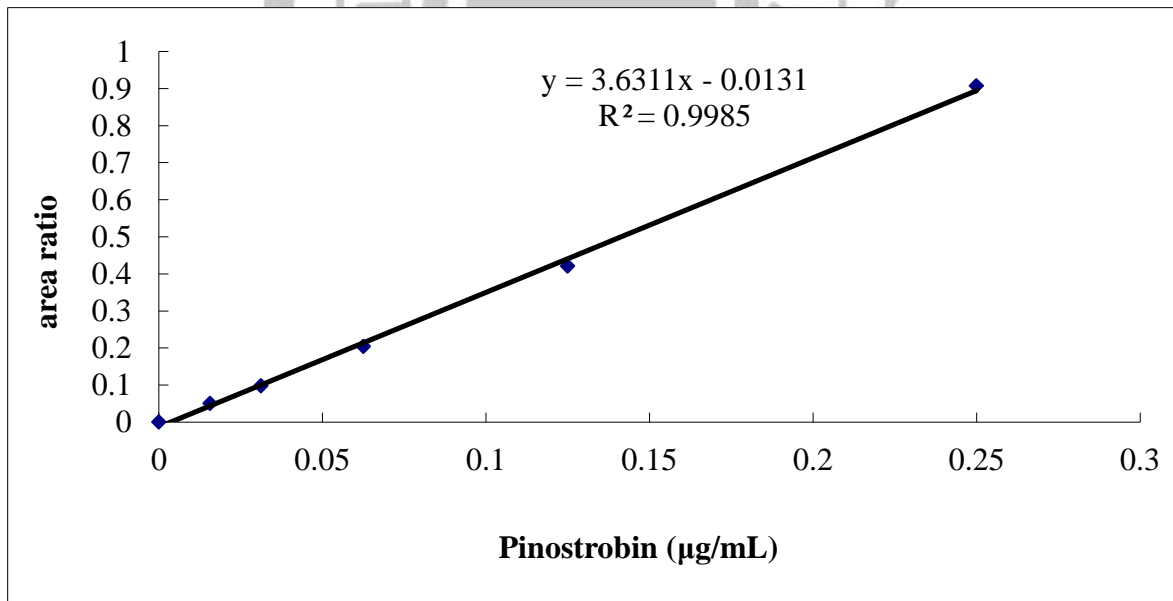
附錄十、Quercetin 之標準曲線

Appendix 10. Standard curve of quercetin.



附錄十一、Apigenin 之標準曲線

Appendix 11. Standard curve of apigenin.



附錄十二、Pinostrobin 之標準曲線

Appendix 12. Standard curve of pinostrobin.