

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**

檸檬馬鞭草及鐵馬鞭草抗氧化及醣解酵素

抑制活性成分之分析比較

**Comparison on antioxidative and glycosidase  
inhibitory components from water extracts of**

*Aloysia triphylla* and *Verbena officinalis*

指導教授：蘇正德 博士

**Advisor : Jeng-De Su, Ph.D.**

研究生：王仁宜 撰

**Graduate Student : Ren-Yi Wang**

中華民國一百零七年一月

**January, 2018**

# 碩士論文指導教授推薦書

食品科學研究所科技組 王仁宜 君所提之論文

檸檬馬鞭草及鐵馬鞭草抗氧化及

醣解酵素抑制活性成分之分析比較

**Comparison on antioxidative and glycosidase  
inhibitory components from water extracts of  
*Aloysia triphylla* and *Verbena officinalis* L.**

係由本人指導撰述，同意提付審查

此致

食品科學系系主任 符廷亮

指導教授：鄭心遠

中華民國 106 年 12 月 8 日

# 碩士論文考試委員審定書

食品科學碩士班食品科技組 王仁宜 君所提之論文

檸檬馬鞭草及鐵馬鞭草水萃取物

抗氧化及醣解酵素抑制活性成分之分析比較

**Comparison on antioxidative and glycosidase  
inhibitory components from water extracts of  
*Aloysia triphylla* and *Verbena officinalis* L.**

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

汲及

東海大學食品科學系農學院院長

指導教授：汲及

中華民國 106 年 12 月 8 日

## 謝誌

轉眼間，兩年研究所的求學生涯在此即將畫下休止符，這段期間經歷了不少喜怒哀樂與難忘的回憶。首先要感謝恩師 蘇正德教授於實驗、論文及生活上辛勤的指導與照顧，與您相處的時光畢生難忘，謹以卷首致上最大的謝意。

文稿初成，承蒙蔡正宗老師與江文德老師，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。

在學期間，要感謝系上所有的老師，助教於實驗上的協助，以及學長姐秉叡、筑盈、萬宇、佑星、閔鴻的關懷與照顧，共同砥礪的同窗有奕葶、宏仰、惟智、紹華、佳純、映竹等人，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 王仁宜 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  
中華民國一百零七年一月

# 目錄

目錄	I
圖目錄	V
表目錄	X
附目錄	XII
中文摘要	XIII
英文摘要	XV
壹、前言	1
貳、文獻回顧	3
一、鐵馬鞭草	3
(一)鐵馬鞭草之介紹	3
(二)鐵馬鞭草之傳統功效	4
(三)鐵馬鞭草之生理活性	4
二、檸檬馬鞭草	10
(一)檸檬馬鞭草之介紹	10
(二)檸檬馬鞭草之傳統功效	11
(三)檸檬馬鞭草之生理活性	11
三、糖尿病	16
(一)胰島素(Insulin)	18
(二)糖尿病之類型	23
(三)糖尿病症狀及所引起之併發症	26
(四)糖尿病之治療	31
(五)糖尿病與醣解酵素	37
四、高血糖與活性氧之關聯	39
(一)自由基與活性氧	39
(二)自由基種類及介紹	40

(三) 自由基導致糖尿病併發症機轉-----	41
五、抗氧化作用-----	46
(一) 抗氧化劑之種類-----	47
(二) 抗氧化劑作用機制-----	56
(三) 抗氧化與脂質氧化之關係-----	59
(四) 人體酵素抗氧化防禦系統-----	61
參、研究目的與實驗流程-----	63
一、研究目的-----	63
二、實驗架構-----	64
肆、材料與方法-----	65
一、實驗材料-----	65
(一) 樣品來源-----	65
(二) 實驗試藥與溶劑-----	65
(三) 實驗儀器設備-----	67
二、實驗方法-----	69
(一) 萃取樣品-----	69
(二) 總酚含量測定(total phenolic compounds determination) -----	70
(三) 總類黃酮含量測定(Flavonoid determination) -----	70
(四) DPPH 自由基清除能力試驗-----	71
(五) 總抗氧化能力測定(Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC) -----	72
(六) $\alpha$ -amylase 抑制作用測定-----	73
(七) $\alpha$ -glucosidase 抑制作用測定-----	74
(八) 檸檬馬鞭草、鐵馬鞭草草抗氧化及醣解酵素抑制成分之萃取、分離與純化-----	75

(九) 高效液相層析分析法(high performance liquid chromatography, HPLC)	78
(十) 液相層析串聯質譜法(Liquid chromatography tandem-mass spectrometry, LC-MS/MS)	79
(十一) 純化物質之結構鑑定	81
(十二) 統計分析	81
<b>伍、結果與討論</b>	<b>82</b>
一、檸檬馬鞭草及鐵馬鞭草水萃物之產率	82
二、檸檬馬鞭草及鐵馬鞭草水萃物總酚含量	82
三、檸檬馬鞭草及鐵馬鞭草水萃物之總類黃酮含量	83
四、檸檬馬鞭草與鐵馬鞭草 DPPH 自由基清除能力	84
五、檸檬馬鞭草與鐵馬鞭草之總抗氧化能力測定	85
六、檸檬馬鞭草與鐵馬鞭草對醣解酵素之抑制活性	86
七、檸檬馬鞭草抗氧化及抑制醣解酵素活性成分之分離純化	87
(一) 檸檬馬鞭草之 XAD-7 液相管柱層析	87
(二) 檸檬馬鞭草區分(IV)之Cosmosil 75 C <sub>18</sub> -OPN 液相管柱層析	92
(三) 經由 Cosmosil 75 C <sub>18</sub> -OPN 液相管柱層析之檸檬馬鞭區分物 I、II 之 HPLC 分析及製備	97
(四) 檸檬馬鞭草 1-1~1-5 、 2-1~2-4 區分物之 HPLC 分析及製備	99
(五) 檸檬馬鞭草純化物質 1~6 之HPLC分析及製備	105
八、鐵馬鞭草抗氧化及抑制醣解酵素活性成分之分離純化	109
(一) 鐵馬鞭草之 XAD-7 液相管柱層析	109
(二) 鐵馬鞭草區分(III)之第一次Cosmosil 75 C <sub>18</sub> -OPN 液相管柱層析	114

(三)經由 Cosmosil 75 C <sub>18</sub> -OPN 液相管柱層析之鐵馬鞭區分物I、II 之 HPLC 分析及製備 -----	119
(四)鐵馬鞭草 1-1~1-5、2-1~2-3 區分物之 HPLC 分析及製備---	121
(五)鐵馬鞭草純物質 1~9 之 HPLC 分析及製備-----	126
九、檸檬馬鞭草之 LC/MS/MS 分析及結構鑑定 -----	130
十、檸檬馬鞭草水萃取物純化物質之結構鑑定 -----	132
(一)純化物質 1(isoverbascoside)之結構鑑定 -----	132
(二)純化物質 2(verbascoside)之結構鑑定 -----	137
(三)純化物質 3(eukovoside)之結構鑑定 -----	140
(四)純化物質 4(eukovoside isomer)之結構鑑定 -----	143
(五)純化物質 5(ferulic acid)之結構鑑定 -----	146
(六)純化物質 6(caffeic acid)之結構鑑定 -----	149
十一、鐵馬鞭草水萃取物純化物質之結構鑑定 -----	152
(一)純化物質 1(isoverbascoside)之結構鑑定 -----	152
(二)純化物質 2(verbascoside)之結構鑑定 -----	155
(三)純化物質 3(eukovoside)之結構鑑定 -----	157
(四)純化物質 4(eukovoside isomer)之結構鑑定 -----	159
(五)純化物質 5(ferulic acid)之結構鑑定 -----	161
(六)純化物質 6(caffeic acid)之結構鑑定 -----	163
十二、檸檬馬鞭草、鐵馬鞭草水萃取物及鐵馬鞭草正丁醇萃取物之 產率比較-----	165
陸、結論-----	168
柒、參考文獻-----	170
捌、附錄-----	179



## 圖目錄

圖一、鐵馬鞭草( <i>Verbena officinalis</i> L.)	3
圖二、檸檬馬鞭草( <i>Aloysia triphylla</i> )	10
圖三、胰島素之代謝調控	20
圖四、粒線體內電子傳遞鏈之作用過程	42
圖五、AGEs 前驅物造成細胞損傷的三種方式	43
圖六、高血糖誘發 PKC 活化機制	44
圖七、活性氧對生物體傷害及其防禦系統	46
圖八、抗壞血酸抗氧化機制	48
圖九、常見類胡蘿蔔素結構圖	50
圖十、類黃酮之結構	56
圖十一、常見酚酸之結構	53
圖十二、常見單寧之結構	54
圖十三、常用之人工合成抗氧化劑	55
圖十四、自由基捕捉劑之機制	56
圖十五、SOD 和 CAT 抗氧化酵素系統	61
圖十六、GPx 抗氧化酵素系統	62
圖十七、檸檬馬鞭草及鐵馬鞭草之分離純化圖	64
圖十八、檸檬馬鞭草及鐵馬鞭草熱水萃取及製備流程	69
圖十九、DPPH 自由基清除作用之反應式	72
圖二十、葡萄糖之呈色反應	74
圖二十一、檸檬馬鞭草、鐵馬鞭草水萃物之抗氧化及醣解酵素抑制 成分之分離與純化流程	76
圖二十二、檸檬馬鞭草與鐵馬鞭草水萃物之 DPPH 自由基清除能力 之比較	84

圖二十三、檸檬馬鞭草與鐵馬鞭草水萃物之 ABTS·+ 自由基清除能力之比較-----	85
圖二十四、檸檬馬鞭草與鐵馬鞭草水萃物對 $\alpha$ -amylase 及 $\alpha$ -glucosidase 之抑制率比較 -----	86
圖二十五、檸檬馬鞭草水萃物之 XAD-7 液相管柱層析圖 -----	88
圖二十六、檸檬馬鞭草水萃物經 XAD-7 膠體液相管柱層析各沖提區分之抗氧化性-----	89
圖二十七、檸檬馬鞭草水萃物經 XAD-7 膠體液相管柱層析各沖提區分之 DPPH 自由基清除能力-----	90
圖二十八、檸檬馬鞭草水萃物經 XAD-7 液相管柱層析各沖提區分物之 $\alpha$ -amylase 及 $\alpha$ -glucosidase 抑制活性-----	91
圖二十九、檸檬馬鞭草區分物(IV)之 Cosmosil 75 C18-OPN 液相管柱層析圖-----	93
圖三十、檸檬馬鞭草區分物(IV)經 Cosmosil 75 C <sub>18</sub> -OPN 液相管柱層析後各沖提子區分之總抗氧化力-----	94
圖三十一、檸檬馬鞭草區分物(IV)經 Cosmosil 75 C <sub>18</sub> -OPN 液相管柱層析各沖提子區分之 DPPH 自由基清除能力-----	95
圖三十二、檸檬馬鞭草區分物(IV)經 Cosmosil 75 C <sub>18</sub> -OPN 液相管柱層析後各沖提子區分之 $\alpha$ -amylase 及 $\alpha$ -glucosidase 抑制活性-----	96
圖三十三、檸檬馬鞭草 Cosmosil 75 C18-OPN 子區分 I 之分析 HPLC 圖-----	98
圖三十四、檸檬馬鞭草 Cosmosil 75 C18-OPN 子區分 II 之分析型 HPLC 圖-----	98

圖三十五、檸檬馬鞭草子區分物 1-1 之分析型 HPLC 圖	-----100
圖三十六、檸檬馬鞭草子區分物 1-2 之分析型 HPLC 圖	-----100
圖三十七、檸檬馬鞭草子區分物 1-3 之分析型 HPLC 圖	-----101
圖三十八、檸檬馬鞭草子區分物 1-4 之分析型 HPLC 圖	-----101
圖三十九、檸檬馬鞭草子區分物 1-5 之分析型 HPLC 圖	-----102
圖四十、檸檬馬鞭草子區分物 2-1 之分析型 HPLC 圖	-----102
圖四十一、檸檬馬鞭草子區分物 2-2 之分析型 HPLC 圖	-----103
圖四十二、檸檬馬鞭草子區分物 2-3 之分析型 HPLC 圖	-----103
圖四十三、檸檬馬鞭草子區分物 2-4 之分析型 HPLC 圖	-----104
圖四十四、檸檬馬鞭草純化物質 1 之分析型 HPLC 圖	-----106
圖四十五、檸檬馬鞭草純化物質 2 之分析型 HPLC 圖	-----106
圖四十六、檸檬馬鞭草純化物質 3 之分析型 HPLC 圖	-----107
圖四十七、檸檬馬鞭草純化物質 4 之分析型 HPLC 圖	-----107
圖四十八、檸檬馬鞭草純化物質 5 之分析型 HPLC 圖	-----108
圖四十九、檸檬馬鞭草純化物質 6 之分析型 HPLC 圖	-----108
圖五十、鐵馬鞭草水萃物之 XAD-7 液相管柱層析圖	-----110
圖五十一、鐵馬鞭草水萃物經 XAD-7 膠體液相管柱層析各沖提區 分之抗氧化性	-----111
圖五十二、鐵馬鞭草水萃物經 XAD-7 膠體液相管柱層析各沖提區 分之 DPPH 自由基清除能力	-----112
圖五十三、鐵馬鞭草水萃物經 XAD-7 液相管柱層析各沖提區分物 之 $\alpha$ -amylase 及 $\alpha$ -glucosidase 抑制活性	-----113
圖五十四、鐵馬鞭草區分物(III)之 Cosmosil 75 C <sub>18</sub> -OPN 液相管柱 層析圖	-----115
圖五十五、鐵馬鞭草(III)經 Cosmosil 75 C <sub>18</sub> -OPN 液相管柱層析後各 沖提子區分之總抗氧化力	-----116

圖五十六、鐵馬鞭草區分物(III)經 Cosmosil 75 C <sub>18</sub> -OPN 液相管柱 層析各沖提子區分之 DPPH 自由基清除能力-----	117
圖五十七、鐵馬鞭草區分物(III)經 Cosmosil 75 C <sub>18</sub> -OPN 液相管柱 層析後各沖提子區分之 $\alpha$ -amylase及 $\alpha$ -glucosidase 抑制 活性-----	118
圖五十八、鐵馬鞭草Cosmosil 75 C <sub>18</sub> -OPN物區分 I 之分析型 HPLC 圖-----	120
圖五十九、鐵馬鞭草Cosmosil 75 C <sub>18</sub> -OPN物區分 II 之分析型 HPLC 圖-----	120
圖六十、鐵馬鞭草子區分物 1-1 之分析型 HPLC 圖-----	122
圖六十一、鐵馬鞭草子區分物 1-2 之分析型 HPLC 圖-----	122
圖六十二、鐵馬鞭草子區分物 1-3 之分析型 HPLC 圖-----	123
圖六十三、鐵馬鞭草子區分物 1-4 之分析型 HPLC 圖-----	123
圖六十四、鐵馬鞭草子區分物 1-5 之分析型 HPLC 圖-----	124
圖六十五、鐵馬鞭草子區分物 2-1 之分析型 HPLC 圖-----	124
圖六十六、鐵馬鞭草子區分物 2-2 之分析型 HPLC 圖-----	125
圖六十七、鐵馬鞭草子區分物 2-3 之分析型 HPLC 圖-----	125
圖六十八、鐵馬鞭草純化物質 <b>1</b> 之分析型 HPLC 圖-----	127
圖六十九、鐵馬鞭草純化物質 <b>2</b> 之分析型 HPLC 圖-----	127
圖七十、鐵馬鞭草純化物質 <b>3</b> 之分析型 HPLC 圖-----	128
圖七十一、鐵馬鞭草純化物質 <b>4</b> 之分析型 HPLC 圖-----	128
圖七十二、鐵馬鞭草純化物質 <b>5</b> 之分析型 HPLC 圖-----	129
圖七十三、鐵馬鞭草純化物質 <b>6</b> 之分析型 HPLC 圖-----	129
圖七十四、檸檬馬鞭草水萃物純化物質 <b>1</b> 之紫外-可見光光譜 ---	135
圖七十五、檸檬馬鞭草水萃物純化物質 <b>1</b> 之 <sup>1</sup> H-NMR 光譜圖 ----	136
圖七十六、檸檬馬鞭草水萃物純化物質 <b>2</b> 之紫外-可見光光譜 ---	138

圖七十七、檸檬馬鞭草水萃物純化物質 2 之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜圖	----139
圖七十八、檸檬馬鞭草水萃物純化物質 3 之紫外-可見光光譜	---141
圖七十九、檸檬馬鞭草水萃物純化物質 3 之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜圖	----142
圖八十、檸檬馬鞭草水萃物純化物質 4 之紫外-可見光光譜	-----144
圖八十一、檸檬馬鞭草水萃物純化物質 4 之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜圖	----145
圖八十二、檸檬馬鞭草水萃物純化物質 5 之紫外-可見光光譜	---147
圖八十三、檸檬馬鞭草水萃物純化物質 5 之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜圖	----148
圖八十四、檸檬馬鞭草水萃物純化物質 6 之紫外-可見光光譜	---150
圖八十五、檸檬馬鞭草水萃物純化物質 6 之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜圖	----151
圖八十六、鐵馬鞭草水萃物純化物質 1 之紫外-可見光光譜	-----153
圖八十七、鐵馬鞭草水萃物純化物質 1 之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜圖	-----154
圖八十八、鐵馬鞭草水萃物純化物質 2 之紫外-可見光光譜	-----155
圖八十九、鐵馬鞭草水萃物純化物質 2 之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜圖	-----156
圖九十、鐵馬鞭草水萃物純化物質 3 之紫外-可見光光譜	-----157
圖九十一、鐵馬鞭草水萃物純化物質 3 之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜圖	-----158
圖九十二、鐵馬鞭草水萃物純化物質 4 之紫外-可見光光譜	-----159
圖九十三、鐵馬鞭草水萃物純化物質 4 之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜圖	-----160
圖九十四、鐵馬鞭草水萃物純化物質 5 之紫外-可見光光譜	-----161
圖九十五、鐵馬鞭草水萃物純化物質 5 之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜圖	-----162
圖九十六、鐵馬鞭草水萃物純化物質 6 之紫外-可見光光譜	-----163
圖九十七、鐵馬鞭草水萃物純化物質 6 之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜圖	-----164

## 表目錄

表一、醣化血色素-----	17
表二、空腹血糖值-----	17
表三、葡萄糖耐受性試驗-----	18
表四、妊娠性糖尿病篩檢標準-----	25
表五、糖尿病主要併發症-----	27
表六、糖尿病急性併發症症狀-----	28
表七、糖尿病慢性併發症症狀-----	29
表八、磺酰脲類藥物-----	33
表九、雙胍類藥物-----	35
表十、 $\alpha$ -葡萄糖酶抑制劑-----	37
表十一、自由基之種類-----	40
表十二、天然抗氧化劑之來源-----	47
表十三、類黃酮之種類-----	52
表十四、脂質氧化反應與疾病之關聯-----	60
表十五、檸檬馬鞭草及鐵馬鞭草水萃物之產率-----	82
表十六、檸檬馬鞭草、鐵馬鞭草之總多酚及總類黃酮含量比較----	83
表十七、檸檬馬鞭草水萃物 XAD-7 液相層析後各沖提區分之產率- -----	88
表十八、檸檬馬鞭草區分物(III)經 Cosmosil 75 C <sub>18</sub> -OPN 液相層析 後各沖提子區分之產率-----	93
表十九、鐵馬鞭草水萃物 XAD-7 液相層析後各沖提區分之產率---- -----	110
表二十、鐵馬鞭草區分物(III)經 Cosmosil 75 C <sub>18</sub> -OPN 液相層析後 各沖提子區分之產率-----	115
表二十一、檸檬馬鞭草之 2 次質譜-----	131

表二十二、純化物質 1 及 2 之 $^1\text{H}$ 化學位移 (ppm, $\text{D}_2\text{O}+\text{Methanol-d}_4$ )-----	133
表二十三、鐵馬鞭草正丁醇萃取物 5 種純化物質之產率-----	166
表二十四、檸檬馬鞭草水萃取物 6 種純化物質之產率-----	166
表二十五、鐵馬鞭草水萃取物 6 種純化物質之產率-----	167



## 附目錄

附錄一、沒食子酸之標準曲線-----	179
附錄二、槲皮酮之標準曲線-----	179
附錄三、Trolox 之標準曲線-----	180
附錄四、BHA 之標準曲線-----	180





## 摘要

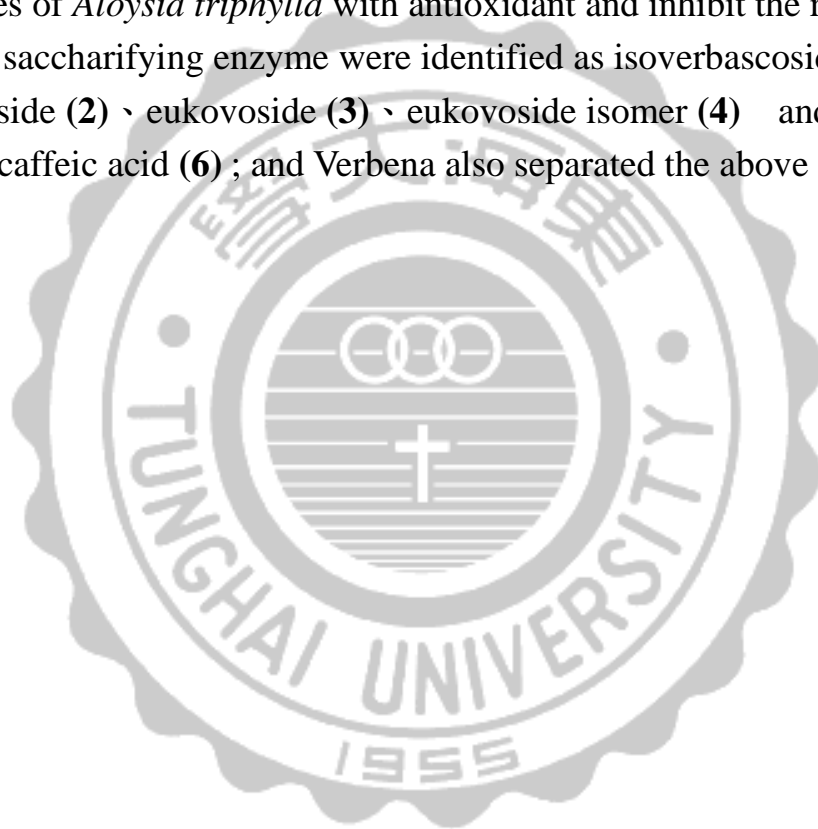
糖尿病(Diabetes mellitus ; DM)與胰島素分泌不足或作用缺失相關，其形成的高血糖使體內產生過多活性氧，造成氧化壓力上升及相關併發症發生，所以抗氧化物質對於活性氧所引發疾病之調控中扮演重要角色。而醣解酵素不但參與人體消化作用，也影響如糖尿病的許多代謝疾病產生，醣解酵素中以 $\alpha$ -澱粉酶( $\alpha$ -amylase)及 $\alpha$ -葡萄糖苷酶( $\alpha$ -glucosidase)最為重要。中藥草馬鞭草(*Verbena officinalis* L.)又稱鐵馬鞭，已證實其具有抗氧化、抗發炎、保護神經、止痛、抗真菌等生理功能，本研究室曾自鐵馬鞭草之正丁醇萃取物分離出具抗氧化及抑制醣解酵素作用之isoverbascoside (1)、verbascoside (2)、eukovoside (3)、eukovoside isomer (4) 及 $\beta$ -hydroxyverbascoside (5)等成分，但鐵馬鞭草並非藥食兩用植物，較不利於發展保健食品；本研究主旨是利用鐵馬鞭草(*V. officinalis* L.)與藥食兩用之檸檬馬鞭草(*Aloysia triphylla*)為實驗材料，分析比較其抗氧化性及醣解酵素抑制活性成分。二種馬鞭草分別經由熱水萃取(2kg乾草/100L水)及超音波震盪萃取30min重複3次，將得到之粗萃物進行XAD-7、ODS管柱層析，再經由HPLC分析與製備，最後經由LC/MS/MS及<sup>1</sup>H-NMR等光譜進行抗氧化及醣解酵素抑制活性成分之解析及比較。結果顯

示，檸檬馬鞭草粗萃物之抗氧化活性總酚、總類黃酮含量，總抗氧化、DPPH抑制及抗醣解酵素 $\alpha$ -glucosidase抑制活性顯著高於鐵馬鞭草， $\alpha$ -amylase抑制活性則沒有顯著差異。在波長280nm之下，XAD-7管柱層析區分物，鐵馬鞭草區分出I~V個區分物，檸檬馬鞭草區分出I~VI個區分物，而在鐵馬鞭草第III區分物與檸檬馬鞭草第IV區分物中，其抗氧化活性及抗醣解酵素皆顯著高於其他區分物；檸檬馬鞭草第IV區分物其抗氧化活性總酚、總類黃酮、總抗氧化能力、DPPH抑制率及 $\alpha$ -glucosidase抑制活性皆顯著高於鐵馬鞭草第III區分物， $\alpha$ -amylase抑制活性則沒有顯著差異。上述區分並利用ODS管柱層析進行進一步分離，目前得知活性區分都落在第I及第II區分上；並繼續經由HPLC、LC/MS/MS及 $^1\text{H-NMR}$ 等光譜分析，檸檬馬鞭草水萃取物製備出的純化物質，分別分離出具抗氧化及抑制醣解酵素作用之isoverbascoside (1)、verbascoside (2)、eukovoside (3)、eukovoside isomer (4)、ferulic acid (5)及caffeic acid(6)；而鐵馬鞭草同樣也分離出上述 1~6。

## Abstract

Diabetes are related to the insufficient insulin secretion or missing role related to the formation of the high blood sugar to the body produces too much and cause oxidation active oxygen pressure rise and related complications to occur, the oxidation material for active oxygen-caused disease-control plays an important role. The currency of the enzyme role not only in the human body digestion, such as diabetes and metabolic diseases many monetary-enzyme in the  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase enzyme is the most important Charter. *Verbena officinalis* L., also known as iron horse whip, has been proved to have antioxidant, anti-inflammatory, neuroprotective, analgesic, antifungal and other physiological functions, the laboratory has been from *Verbena* n-butanol extract as isoverbascoside (1) 、 verbascoside (2) 、 eukovoside (3) 、 eukovoside isomer (4) and  $\beta$ -hydroxyverbascoside (5), But *Verbena officinalis* L. is not a kind of edible plant, which is not conducive to the development of health foods. The main purpose of this study is to study the effects of *Verbena officinalis* L. and Edible homologous *Aloysia triphylla* , Analysis and comparison of its antioxidant and glycolytic enzyme inhibitory active ingredients. The two species of *Verbena* were extracted by hot water (2 kg of hay / 100 L of water) and extracted by ultrasonic wave for 30 min, respectively. The crude extract was subjected to XAD-7 and ODS column chromatography, and then analyzed and prepared by HPLC. Finally, the antioxidant and glycoenzymes inhibitory active components were analyzed and compared by LC / MS / MS and  $^1\text{H-NMR}$  spectra. The results showed that the antioxidative activity of total extract, total flavonoids, total antioxidant, DPPH and anti-glycolysis  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of *Aloysia triphylla* extract was significantly higher than that of *Verbena officinalis*,  $\alpha$ -amylase inhibitory activity No significant difference. Under the wavelength of 280nm, XAD-7 column chromatography region, *Verbena officinalis* distinguish I ~ V Division, *Aloysia triphylla* distinguish I ~ VI Division, and in *Verbena officinalis* III Division and *Aloysia triphylla* IV Division, its

antioxidant activity and anti-glycolytic enzymes were significantly higher than other divisions; *Aloysia triphylla* IV of its antioxidant activity of total phenols, total flavonoids, total antioxidant capacity, DPPH Inhibition rate and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity were significantly higher than *Verbena officinalis* Division III,  $\alpha$ -amylase inhibitory activity was not significantly different. The above distinction and the use of ODS column chromatography for further separation, the current known activity fell on the distinction between the first and II Division; and continue by HPLC, LC / MS / MS and  $^1\text{H-NMR}$  spectral analysis, The main purified substances of *Aloysia triphylla* with antioxidant and inhibit the role of enzymes saccharifying enzyme were identified as isoverbascoside (1) verbascoside (2) 、 eukovoside (3) 、 eukovoside isomer (4) and ferulic acid (5), caffeic acid (6) ; and Verbena also separated the above 1 ~ 6.



# 前言

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是國人位居十大死因之一，每年近萬人因糖尿病死亡，根據衛福部統計，全國約有200多萬名糖尿病的病友，每年以25,000名的速度持續增加，且有年輕化的趨勢，根據105年衛生署統計資料顯示，糖尿病在國人十大死因排名第5名，相較104年增加了4.3%的糖尿病患者(行政院衛生福利部統計處, 2016)。糖尿病是一種代謝性疾病，它的特徵是患者的血糖長期高於標準值，其中以第二型糖尿病為主，約占罹患率的95%左右，此類型之患者體內分泌的胰島素不足或對胰島素產生阻抗性而無法充分代謝血液中的葡萄糖(Sah et al., 2016)，糖尿病患者除會因高血糖而增加蛋白質醣化作用(glycation)形成醣化蛋白誘發自由基產生外，另一方面過多的葡萄糖也會因自氧化產生自由基(Jagdale et al., 2016)，過多自由基除了會直接破壞細胞組織，造成沉積在血管壁膽固醇的氧化，引起心血管病、動脈粥樣硬化等，這也是糖尿病最常見的死亡原因(Diano & Horvath, 2010)，自由基還會損傷腎小球，使腎臟的過濾功能降低，引起糖尿病腎病變(Jefferson, et al., 2008)，因此如何維持血糖恒定是預防糖尿病及併發症的重要因素。調節血糖可從飲食、運動及藥物等方面著手，而其中藥物存在著許多副作用的問題，因此抗氧化及調節血糖等保健食品之研發相當重要。臺灣普遍

使用的民間藥草馬鞭草(*Verbena officinalis* L.) 為馬鞭草科馬鞭草屬之植物，又稱鐵馬鞭、瘡馬鞭、紫頂龍芽草等，已證實其具有抗氧化、抗發炎、保護神經、止痛、抗真菌等生理功能(Calvo, 2006; Rehecho et al., 2011)，但鐵馬鞭草並非藥食兩用植物，較不利於發展保健食品，而檸檬馬鞭草(*Aloysia triphylla*)屬於藥食兩用之植物(衛生福利部食品藥物管理署, 2017)也是馬鞭草科馬鞭草屬之植物，可治療偏頭痛、舒緩緊張情緒、驅散焦慮，(Becker et al., 2015)，因此本研究利用兩者，互相比較其抗氧化性及評估其對血糖調控之能力，並期望藥食兩用之檸檬馬鞭草能比純藥用之鐵馬鞭草更有潛力開發成改善糖尿病及抗氧化之保健食品。綜合以上之抗氧化及醣解酵素抑制活性測定與LC-MS/MS、氬譜結構鑑定以及參考文獻，證實同時可以藥食兩用之檸檬馬鞭草比鐵馬鞭草更有潛力開發成改善糖尿病之保健食品。

# 壹、文獻回顧

## 一、鐵馬鞭草

### (一)鐵馬鞭草之介紹



圖1、鐵馬鞭草(*Verbena officinalis* L.)。

Fig.1 *Verbena officinalis* L.

鐵馬鞭草(圖1)為馬鞭草科植物馬鞭草的全草或帶根全草，名馬鞭梢、龍牙草、白馬鞭、鐵馬鞭、鐵釣竿、鶴膝風、風頸草、紫頂龍芽，主產中國湖北、貴州江蘇、廣西。全草含馬鞭草苷(verbenalin，即cornin 山茛菪苷)、鞣質、揮發油。根和莖中含水蘇四糖(stachyose)。葉中含腺苷(adenosine)和 $\beta$ -胡蘿蔔素。另發現該植物含強心苷(Cardiac glycosides)。根莖圓柱型，長1~2 釐米，表面土黃色，周圍著生多數的根及鬚根，莖四棱型，灰綠色或黃綠色，具稀疏的毛；質硬、易折斷，斷面纖維狀，中央有白色的髓，或已成空洞。葉片灰綠色或棕黃色，質脆，多皺縮破碎，具毛，頂端具花

穗，可見黃棕色的花瓣；有時已成果穗，果食宿存灰綠色的萼片，萼片脫落後，則可見灰黃色的4 個小堅果。氣微，味微苦。以乾燥、色青綠、帶花穗、無根者為佳(中國醫藥大辭典，2003)。

## (二)馬鞭草之傳統功效

馬鞭草在傳統藥理作用上具有止血、抗發炎、鎮咳、促進哺乳動物乳汁分泌及擬副交感作用，主治感冒發熱、咽喉腫痛、牙齦腫痛、白喉、絲蟲病、黃疸、痢疾、血瘀經閉、痛經、症瘕、水腫、小便不利、瘡疾、癰瘡腫毒，外用治跌打損傷，疔瘡腫毒(中國醫藥大辭典，2003)。

## (三)馬鞭草之生理活性

### 1. 抗發炎、鎮痛作用

馬鞭草之石油醚、氯仿、甲醇萃取物對於鹿角菜膠足腫脹模型(carrageenan paw oedema model)，皆有抗炎活性，其中氯仿萃取物之活性最好(Deepak & Handa, 2000)。馬鞭草之水萃物以及醇類萃取物對於鹿角菜膠(carrageenin) 所誘導老鼠足部浮腫有明顯的抑制作用，且經福馬林誘發舔足之疼痛實驗顯示具抑制效果，具鎮痛抗炎作用(Calvo, 2006)。馬鞭草50% 甲醇及氯仿萃取物對於12-O-tetradecanoylphorbol acetate (TPA) 誘發小鼠耳朵發炎，具有抗炎活



性(Calvo et al., 1998) 。馬鞭草甲醇萃取物以及超臨界二氧化碳萃取物，兩者對於大鼠胃發炎均有抗炎活性，其中以超臨界二氧化碳萃取物活性最好(Speroni et al., 2007) 。

## 2. 抗菌作用

鐵馬鞭草精油萃取物針對一系列致病以及常見的農業食品的細菌及真菌評估抗菌作用，結果顯示鐵馬鞭草精油萃取物具有抗菌活性，特別是對蠟狀芽孢桿菌和銅綠假單胞菌(De Martino et al., 2009) 。鐵馬鞭草乙酸乙酯和甲醇萃取物具有抗真菌作用，而馬鞭草中分離出的咖啡醯基衍生物(caffeoylderivatives)對*Penicillium expansum* 及*Rhizopus stolonifer* 兩種真菌之生長具有抑制作用(Casanova et al., 2008) 。鐵馬鞭草中的類黃酮化合物對革蘭氏陽性和革蘭氏陰性微生物都有抑制作用，而類黃酮大多數皆屬於單和雙羥基化的類黃酮化合物(Hernández et al., 2000) 。

## 3. 保護神經作用

鐵馬鞭草水萃物可以顯著降低中樞神經系統中 $\beta$ -澱粉樣蛋白肽和還原劑二硫蘇糖醇的毒性，進而發揮細胞保護作用，預防阿滋海默病(Lai et al., 2006) 。馬鞭草萃取物可藉由MEK/ERK和PI3K/Akt途徑增強PC12細胞中神經生長因數(NGF) 介導的軸突細胞的比率(Phan et al., 2014) 。

#### 4. 抗氧化作用

鐵馬鞭草通過HPLC-DAD和LC-MS的分析，鑒定出三種環烯醚萜類，十五種類黃酮和四種酚酸衍生物，並且顯示出顯著的抗氧化活性(Rehecho et al., 2011)。高劑量馬鞭草之水萃物能顯著提升由四氯化碳(CCl<sub>4</sub>) 誘發慢性肝損傷之大鼠肝臟中catalase (CAT)、glutathione peroxidase (GPx)、superoxide dismutase (SOD)等抗氧化酵素之活性(L. Funes et al., 2009)。鐵馬鞭草水萃物通過HPLC-DAD-ESI-MS鑒定出主要化合物是苯丙素，而最為豐富的毛蕊花苷，占苯丙素的97%，還發現了類胡蘿蔔素、馬鞭黴素、類黃酮以及木犀草素和芹菜素的單葡萄糖醛酸衍生物和二葡萄糖醛酸衍生物，這些物質皆具有抗氧化活性，且鐵馬鞭草水萃物對於利用Trolox作為標準品的DPPH試驗，亦有顯著的抗氧化活性(Bilia et al., 2008)。利用超音波輔助，乙醇濃度為70%，固液比為1:40 (g / mL)，超聲功率500 W，萃取溫度70°C，處理時間20分鐘，萃取鐵馬鞭草，結果顯示鐵馬鞭草萃取物對於羥基和超氧陰離子自由基清除率有顯著上升，具有抗氧化活性(BIAN et al., 2013)。鐵馬草萃取物在各種自由基清除試驗中，DPPH、超氧化物、一氧化氮自由基皆有顯著的清除率，表現出良好之抗氧化活性(Shim et al., 2010)。

## 5. 保肝作用

以馬鞭草水草物管餵食四氯化碳誘發慢性肝損傷大鼠顯著降低血清中GOT (glutamic oxaloacetic transaminase, 麩胺基酸草醋酸轉胺基酶) 及GPT (glutamic pyruvic transaminase, 麩胺基酸丙酮酸轉胺基酶) 血清生化值，而大鼠體重上升速率減緩及肝相對重量之增加，與正常組比較具顯著性差異；餵食高劑量水草物組 (1.0g/kg bw.) 與負控制組比較則能顯著提高體重之上升速率及減低肝之相對重量，並且顯著提升肝臟中GPx、CAT及SOD等抗氧化酵素之活性。因此餵食大鼠馬鞭草水草物可以顯著提升肝臟因四氯化碳誘發傷害而下降之抗氧化活性，並顯著降低肝臟之損傷程度，達到保肝之效果(陳，2009)。

## 6. 促進睡眠作用

利用大鼠口服馬鞭草活性成分戟葉馬鞭草苷 (hastatoside) 及馬鞭草苷 (verbenalin) 後經過腦波分析，發現服用hastatoside 及 verbenalin 後大鼠增加了非快速眼動睡眠的總時間，在9小時的睡眠週期從 23.00 至08.00 小時分別增加了81%及42%。證實hastatoside 及verbenalin 兩者皆可能有益於治療失眠症狀，未來可更需進一步研究這些有效物質在人類體內的生體可用率及安全性(Makino et al.,

2009)。

## 7. 抑癌作用

鐵馬鞭草水萃物中的苯乙醇苷類化合物在在DHD / K12 / PROb 大鼠結腸上皮細胞和HCT-116人結腸腺癌細胞治療72小時後，其IC50值顯著低於20 $\mu$ g/ mL，具抑制癌症作用(Encalada et al., 2015)。馬鞭草萃取物能顯著抑制肝癌HepG-2細胞的活性,促進HepG-2細胞凋亡,並顯著提高Caspase-3、Caspase-9、Apaf-1蛋白酶,降Survivin蛋白酶，而鐵馬鞭草誘導細胞凋亡可能與增強Caspase-3、Caspase-9蛋白酶相對活性有關(李等，2017)。鐵馬鞭草萃取物可顯著減少人絨毛膜癌JAR細胞數目並萎縮，細胞增殖抑制率隨著時間的延長和濃度的增加逐漸增大，在72h、40mg/ml劑量組抑制最明顯，抑制率為65%；流式細胞儀檢測結果顯示阻滯週期在G2/M期之間結論，馬鞭草萃取物對人絨毛膜癌JAR細胞增殖有明顯抑制作用(張等，2004)。MGC80-3 細胞經20 $\mu$ mol/L 天然抗氧化劑isoverbascoside 處理後，細胞生長曲線與分裂指數顯著下降，倍增時間延長，生長抑制率57.8%。觀察結果表明isoverbascoside 處理的細胞，核質比例下降，核形規則，核仁體積縮小，數量減少，核內染色質減少，粒體形態結構典型，細胞表面微絨毛減少等顯著變化。這說明天然抗氧化劑馬鞭草中的isoverbascoside 改變了MGC80-3 細胞的表型特徵，具有

明顯的誘導分化作用(李等，1995)。HL-60 細胞經 $5\mu\text{mol/L}$  劑量的 isoverbascoside 處理後，細胞生長顯著受抑，生長抑制率達到34.5%，對HL-60 細胞的誘導分化作用和細胞毒性有顯著效果(Wang et al.,1999)



## 二、檸檬馬鞭草

### (一) 檸檬馬鞭草之介紹



圖2、檸檬馬鞭草(*Aloysia triphylla*)。

Fig. 2 *Aloysia triphylla*.

檸檬馬鞭草(圖2)為馬鞭草科多年生草本植物，通常高30~80cm。莖上部方形，老後下部近圓形。葉對生，卵形至短圓形，長2~8cm，寬1~4cm，兩面有粗毛，邊緣有粗鋸齒或缺刻，莖生葉無柄，多數3深裂，有時羽裂，裂片邊緣有不整齊鋸齒。穗狀花序頂生或生於上部葉腋，開花時通常似馬鞭，每花有1苞片，苞片比萼略短，外面有毛；花萼管狀，5齒裂；花冠管狀，淡紫色或藍色，近2唇形；雄蕊4，二強；子房4室，每室1胚珠。熟時分裂為4個長圓形的小堅果。花期6~8月，果期7~11月。生路旁、村邊、田野、山坡。主產湖北、江蘇、廣西、貴州。性涼，味苦。氣味：(苗、

葉) 苦、微寒、無毒。(藥用植物學, 2012)

## (二) 檸檬馬鞭草之傳統功效

檸檬馬鞭草在傳統功效上具有活血散瘀, 截瘧, 解毒, 利水消腫、用於症瘕積聚、經閉痛經、瘧疾、喉痹、癰腫, 且具有促進消化、減輕反胃及腸胃脹氣、鎮靜鬆弛的作用; 當傷風感冒引起發燒時飲用, 既有益於康復, 並且能緩和喉嚨及鼻子的不適。(藥用植物學, 2012)

## (三) 檸檬馬鞭草之生理活性

### 1. 抗發炎、鎮痛作用

管餵Wistar大鼠檸檬馬鞭草水萃物(1000mg/kg)之後1小時, 在扭動試驗中, 大鼠扭轉次數顯著降低, 且在檸檬馬鞭草水萃物的最大鎮痛作用與嗎啡(10mg/kg)相當, 具有相當的鎮痛作用(Veisi et al., 2016)。檸檬馬鞭草中的黃酮二葡萄糖苷和苯丙素苷(主要是毛蕊花苷)顯著降低利用葡聚糖硫酸鈉(DSS)誘導大鼠結腸炎之發炎症狀(Felgines et al., 2014)。

### 2. 抗菌、抗病毒

檸檬馬鞭草萃取物在體外試驗pH 5.0下對0.01%的幽門螺桿菌具

有殺菌作用，且在體內試驗給予小鼠0.01%檸檬馬鞭草萃取物，小鼠胃中之幽門螺桿菌的密度顯著降低(Ohno et al., 2003)。10%之檸檬馬鞭草精油對大腸桿菌，沙門氏菌，金黃色葡萄球菌，銅綠假單胞菌和糞產鹼桿菌顯著抑制細菌之生長(Wilkinson & Cavanagh, 2005)，檸檬馬鞭草精油對大腸桿菌的抗菌活性使用光密度法（比濁法）進行評價，大腸桿菌的生長率顯著下降為為0.05%(Lin et al., 2016)。將200 $\mu$ L金黃色葡萄球菌懸浮液皮內接種在63隻實驗室20-30g小鼠的肩膀上，並給予含檸檬馬鞭草乙醇萃取物之軟膏治療，在第8天對小鼠解剖後的局部膿液進行比較，發現在檸檬馬鞭草乙醇萃取物之軟膏治療後，小鼠的傷口恢復率顯著上升為92.3%(Ghaemi et al., 2007)。

### 3. 抗氧化作用

檸檬馬鞭草水萃物通過HPLC-DAD-ESI-MS鑒定出主要化合物是苯丙素之酚類物質，而最為豐富的毛蕊花苷(verbascoside)，占苯丙素的97%，還發現了類胡蘿蔔素、馬鞭黴素、類黃酮以及木犀草素和芹菜素的單葡萄糖醛酸衍生物和二葡萄糖醛酸衍生物，這些物質皆具有抗氧化活性，且鐵馬鞭草水萃物對於利用Trolox作為標準品的DPPH試驗，亦有顯著的抗氧化活性(Bilia et al., 2008)。檸檬馬鞭草萃取物顯著提升紅血球中抗氧化酵素穀胱甘肽酶（GSH），進而



保護血漿中受到氧化應激之細胞(Carrera-Quintanar et al., 2012)。檸檬馬鞭草丙酮、乙醇、甲醇萃取物，3者皆顯著提升還原鐵的能力，並顯著提升DPPH自由基清除率以及總抗氧化能力，且效果以檸檬馬鞭草甲醇萃取物之抗氧化活性最佳(Choupani et al., 2014)。檸檬馬鞭草萃取物顯著減少男性運動員強烈運動21天後誘導嗜中性粒細胞之氧化應激，並增加抗氧化酵素穀胱甘肽過氧化酶(glutathione peroxidase)和穀胱甘肽還原酶(glutathione reductase)的活性(Lorena Funes et al., 2011)。檸檬馬鞭草甲醇萃取物在DPPH自由基清除試驗(2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl)、ORAC試驗 (oxygen radical absorbance capacity)，鐵還原力試驗 (FRAP) 和超氧化物陰離子自由基清除試驗，皆表現出顯著的抗氧化活性(Georgiev et al., 2011)。

#### 4. 抑癌作用

在人類大腸直腸癌細胞株(Caco-2)培養檸檬馬鞭草水萃物，結果顯示Caco-2的存活率範圍為 46.95%~59.71%，且Caco-2細胞週期停滯在sub G1期，導致細胞株無法進入G1期進行細胞增生與分裂，誘導Caco-2走向凋亡路徑(林和吳，2010)。檸檬馬鞭草中之檸檬醛(3,7-二甲基-2,6-辛二烯-1-醛)可以誘導腫瘤細胞系中的caspase-3代謝路徑，使腫瘤細胞走向凋亡(Dudai et al., 2005)。檸檬馬鞭草葉萃取物

培養人肺癌細胞 (NCI-H460)，用MTT測定法測定葉片提取物對抗細胞的抗增殖活性，24小時處理後，IC<sub>50</sub>的生長抑制濃度範圍為1~50µg/ mL，並且以溴化乙錠雙螢光染色法可以觀察NCI-H460肺癌細胞之凋亡(Vanajothi et al., 2012)。

## 5. 改善肥胖作用

檸檬馬鞭草中的馬鞭草苷可以降低高膽固醇飲食誘導小鼠之三酸甘油酯，並且產生活性氧 (ROS) 恢復脂肪細胞線粒體膜電位，以及AMP激活蛋白激酶 (AMPK) 的有效活化，顯著上升PPAR- $\alpha$ 的mRNA表現以及顯著下降脂肪酸合酶的mRNA表現，檸檬馬鞭草中之馬鞭草苷具有改善肥胖症狀(Herranz-López et al., 2015)。檸檬馬鞭草多酚提取物(500mg /天)，顯著降低BMI超重之女性體重、收縮壓、心跳，並且改善血脂及增加超重之女性飽足感，減少飢餓(Boix-Castejón et al., 2016)

## 6. 抗焦慮作用

檸檬馬鞭草之水萃物餵食安息香(carboxybenzene)誘導之小鼠，並使用舉臂式十字迷宮 (Elevated plus-maze, EPM) 抗焦慮試驗以及戊巴比妥睡眠試驗當中，檸檬檸檬中之毛蕊花苷的水萃物表現出抗焦慮、催眠以及肌肉鬆弛作用(Razavi et al., 2017)。檸檬馬鞭草

精油，可顯著增加斑馬魚和鯰魚皮質醇與降低離子損失，並且通過減少兒茶酚胺的釋放減少血液流向鰓，對斑馬魚和鯰魚具有抗焦慮作用(Junior et al., 2015)。

## 7. 保護神經作用

檸檬馬鞭草中的成分citrodora(檸檬桉)可以顯著降低H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100%，0.001mg/ml)和β-澱粉樣蛋白(約50%，0.01mg/ml)培養之神經元細胞的毒性，並且對於AChE(乙醯膽鹼酯酶)有抑制作用，citrodora(檸檬桉)具有神經保護之作用(Abuhamdah & Mohammed, 2014)。檸檬馬鞭草中的成分毛蕊花苷(verbascoside)對於體外乙醯膽鹼酯酶(AChE)和丁醯膽鹼酯酶(BChe)具有抑制活性，顯示出良好的神經保護作用(Georgiev et al., 2011)

### 三、糖尿病

根據105年衛生署統計資料顯示，糖尿病在國人十大死因排名第5名，相較104年增加了4.3%的糖尿病患者(行政院衛生福利部統計處, 2016)。糖尿病是一種代謝性疾病，它的特徵是患者的血糖長期高於標準值，其中以第二型糖尿病為主，約占罹患率的95%左右，此類型之患者體內分泌的胰島素不足或對胰島素產生阻抗性而無法充分代謝血液中的葡萄糖(Sah et al., 2016)，糖尿病患者除會因高血糖而增加蛋白質醣化作用(glycation)形成醣化蛋白誘發自由基產生外，另一方面過多的葡萄糖也會因自氧化產生自由基(Jagdale et al., 2016)，過多自由基除了會直接破壞細胞組織，造成沉積在血管壁膽固醇的氧化，引起心腦血管病、動脈粥樣硬化等 (Diano & Horvath, 2010)，自由基還能損傷腎小球，使腎臟的濾過功能降低，引起糖尿病性腎病(Jefferson et al., 2008)。已有研究證實以上症狀與醣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。

根據 2016 年美國糖尿病協會(American Diabetes Association, ADA)所公布，可藉由以下3種方式評估是否罹患糖尿病:

### 1. 醣化血色素 (glycated hemoglobin, A1C)

該檢驗測量血液中醣化血紅素 (HbA1C) 的百分比，且能提供過去二到三個月的血糖水準。

表一、醣化血色素

Table 1 glycated hemoglobin, A1C

正常	小於5.7%
糖尿病前期	5.7%至6.4%
糖尿病	6.5%以上

(Association, 2017)

### 2. 空腹血糖值 (fasting plasma glucose, FPG)

該測試需空腹至少8小時沒有進食，通常會在早餐前做測試。

表二、空腹血糖值

Table 2 fasting plasma glucose, FPG

結果	空腹血漿糖值
正常	小於100mg / dl
糖尿病前期	100mg / dl至125mg / dl
糖尿病	126mg / dl以上

(Association, 2017)

### 3. 葡萄糖耐受性試驗 (oral glucose tolerance Test, OGTT)

空腹8小時後，並喝下葡萄糖漿之後的兩個小時內觀察人體當中的血糖值變化。

表三、葡萄糖耐受性試驗

Table 3 oral glucose tolerance Test, OGTT

結果	口服葡萄糖耐量試驗 (OGTT)
正常	小於140mg / dl
糖尿病前期	140mg / dl至199mg / dl
糖尿病	200mg / dl以上

(Association, 2017)

### (一)胰島素(Insulin)

胰島素是一種蛋白質激素，由胰臟內的胰島β細胞分泌，其分子量約為5808道爾頓。胰島素結構是由A、B兩條肽鏈組成，人胰島素的A鏈有11種21個胺基酸，B鏈有15種30個胺基酸，共26種51個胺基酸組成。其中A7 (Cys) -B7 (Cys)、A20 (Cys) -B19 (Cys) 四個半胱氨酸中的巰基形成兩個雙硫鍵，使A、B兩鏈連接起來。此外A鏈中A6 (Cys) 與A11 (Cys) 之間也存在一個雙硫鍵。生理功能為調節碳水化合物和脂肪代謝，控制血糖平衡，可促使肝臟、骨骼肌將血液中的葡萄糖轉化為肝糖。缺乏胰島素會導致血糖過高並造成糖尿病。因此胰島素在人體當中對於平衡血糖扮演非常重要之角色 (Mayer et al., 2007)。

## 1. 胰島素作用

胰島素是促進合成代謝及調節血糖穩定的主要賀爾蒙，其具同化作用。可調節細胞之醣類、脂質及蛋白質的代謝，扮演著重要的調控角色之一(Strachan, 2003)

### (1) 調節醣類代謝

胰島素能促進全身組織對葡萄糖的攝取和利用，並抑制肝醣的分解，因此有降低血糖的作用。若分泌太多時，血糖下降過於迅速，腦組織受影響最大，可出現驚厥、昏迷，甚至引起休克。相反，若分泌不足或胰島素受體缺乏常導致血糖升高；若超過腎糖閾，則糖從尿中排出，引起尿糖；同時由於血液成分中改變（含有過量的葡萄糖），亦導致高血壓、冠心病和視網膜血管病等病變(de Bodo & Altzuler, 1956)。

### (2) 調節脂質代謝

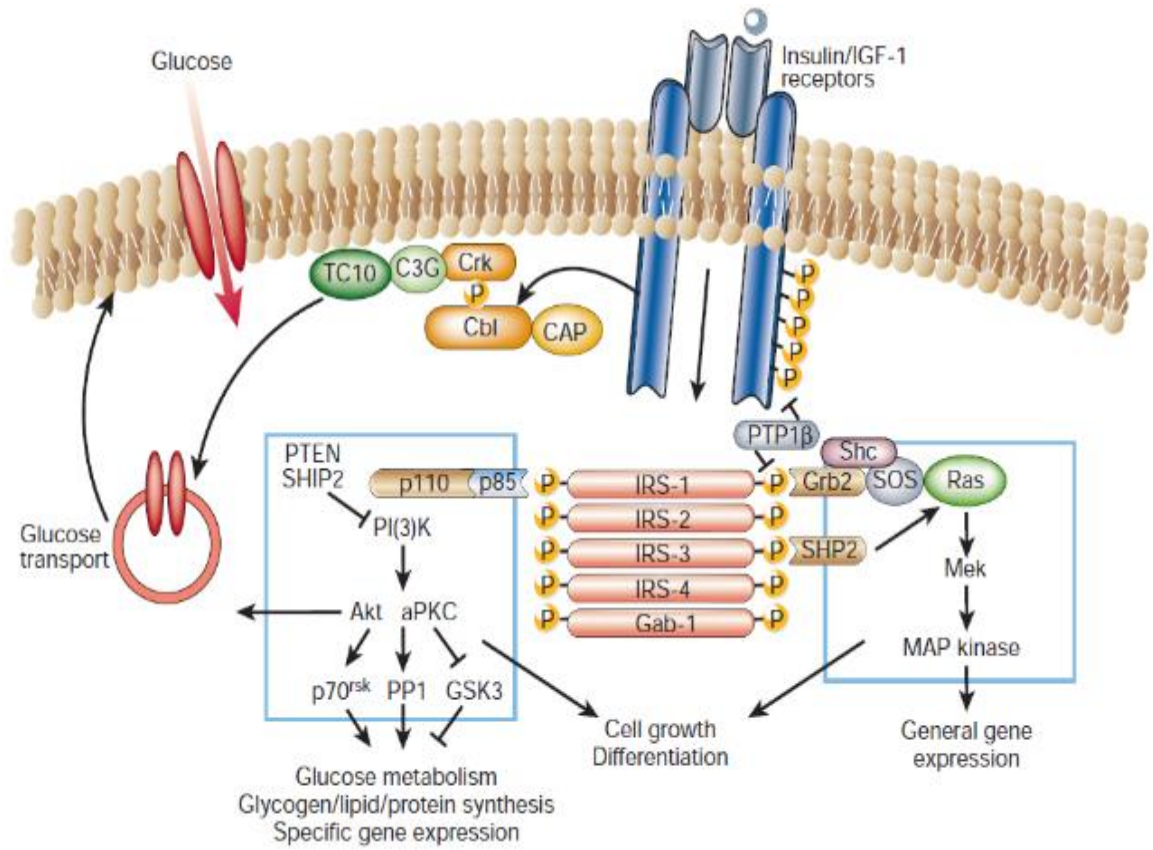
胰島素促進肝醣合成脂肪酸，然後轉運到脂肪細胞貯存。在胰島素的作用下，脂肪細胞也能合成少量的脂肪酸。胰島素還促進葡萄糖進入脂肪細胞，除了用於合成脂肪酸外，還可轉化為 $\alpha$ -磷酸甘油，脂肪酸與 $\alpha$ -磷酸甘油形成甘油三酯，貯存於脂肪細胞中，同時，胰島素還抑制脂肪酶的活性，減少脂肪的分解。胰島素缺乏





## 2. 胰島素細胞層面之傳訊路徑

葡萄糖是提供生物體能量的重要來源之一，而葡萄糖進入細胞需要藉由激素的幫助。人體於進食後，血中葡萄糖濃度上升，當血糖濃度達到5 mM，會刺激胰臟中 $\beta$ 細胞分泌出胰島素(Matschinsky, 1990)。胰島素藉由血液的運送，與細胞膜上的胰島素接受器(Insulin receptors, IR)結合，其結合之後，便可自行活化其膜上的 $\beta$ 次單元，藉此磷酸化IR本身及下游胰島素受體基小質(insulin receptor substrates, IRS)家族，當IRS-1及IRS-2磷酸化時，會與PI3-Kinase的次單元p85蛋白結合，使PI3K合成PIP3，接著啟動下游Akt (Protein kinase B, PKB)、aPKC (atypical protein kinase C)的活化，帶動下列一連串的代謝機制及生長反應，例如提高葡萄糖代謝率、增加脂質及蛋白質的合成、促進肝糖的合成、抑制糖質新生作用等(Saltiel and Kahn, 2001)。



圖四、胰島素之傳訊路徑。

Fig. 4 Singal transduction in insulin action.  
(Saltiel & Kahn, 2001)

### 3.胰島素阻抗性

胰島素阻抗性就是胰島素無法在肝細胞、肌肉細胞和脂肪細胞發揮作用，亦即這些細胞需要更高的胰島素濃度才能對胰島素產生反應。在脂肪細胞內，胰島素阻抗性導致葡萄糖的吸收降低，儲存的甘油三酸酯的水解加速，進而提高血漿內自由脂肪酸的含量。而在肝細胞內，會使葡萄糖的儲備量降低，導致血液中血糖的含量提高。胰島素阻抗性引起的血漿中高糖和高胰島素含量，並導致第2型糖尿病、痛風以及其他代謝綜合徵狀等。(Weyer et al., 2001)

## (二)糖尿病之類型

### 1.第一型糖尿病( Type I diabetes mellitus )

是一種自體免疫疾病(autoimmune disease)。自體免疫疾病是由於身體的免疫系統對自身作出攻擊而成的。糖尿病患者的免疫系統對自身分泌胰島素的胰臟β 細胞 (pancreatic beta cells)作出攻擊並殺死他們。結果胰臟並不能分泌足夠的胰島素。幾乎第一型糖尿病患者，需要每天注射胰島素來維持生命。在現今的科學界，科學家還未能找到身體攻擊胰臟β 細胞的真正原因，但他們相信這病跟遺傳因素 (genetic factors) 和環境因素(environmental factors)例如病毒是有關連的。第一型糖尿病的患者通是是兒童和較年輕的成年人，但

任何年齡的人也有機會患病。第一型糖尿病的病徵通常在很短的時間內便會顯現出來。(Eisenbarth, 2005)

## 2. 第二型糖尿病 ( Type II diabetes mellitus )

為最普遍的糖尿病，接近95%的糖尿病患者是第二型的。通常在40歲時發病，55歲為病發的高峰期。八成第二型患者是過胖的。第二型患者通常會有肥胖 (obesity), 高血壓(hypertension), 高血脂 (high levels of blood lipids) 等疾病。因現在很多年輕人很肥胖，故第二型糖尿病患者的年紀有逐漸下降的趨勢。第二型的患者通常能夠分泌足夠的胰島素，但因為身體產生了胰島素阻抗性(insulin resistance) 和胰臟 $\beta$ 細胞功能不全( $\beta$  cell dysfunction)，所以，身體不能有效地使用胰島素。第二型的病徵需在較多的時間來形成，不像第一型只要很短的時間便出現病徵。有些患者甚至沒有病徵。病徵包括了疲倦(fatigue), 噁心(nausea)、多尿 (frequent urination)、多渴 (unusual thirst)、瘦 (weightloss)、視力下降(blurred vision)、常受感染 (frequent infections)和傷口較難痊癒 (slow healing of wounds or sores)。(Edelman, 1998)

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

在懷孕期間孕婦所需要的胰島素大概在一般人的2~3倍左右，並

且在胎盤會產生一些激素（又稱荷爾蒙），如人類胎盤泌乳激素和雌三醇等。這些激素刺激乳房發育，但是這些激素也會使血糖增高。大部分的孕婦此時能夠生產足夠的胰島素使血糖下降，維持正常的血糖濃度。但是少數孕婦的胰島素製造量不足或作用不良，對糖類的作用減低，甚至完全無法利用，無法使血糖濃度降到正常範圍，甚至有尿糖現象，同時也造成蛋白質和脂肪的代謝不正常，而導致懷孕中得到糖尿病。而診斷妊娠型糖尿病標準如下：

對妊娠24~28周之婦女進行檢查，前一晚至次日早晨至少空腹8小時，口服75g葡萄糖溶液之後，測定空腹、服糖過後1、2小時之血糖值。任何一項血糖值達到或超過以下標準及診斷為妊娠型糖尿病。

表4、妊娠性糖尿病篩檢標準

Table. 4 Screening for and diagnosis of gestational diabetes mellitus

FPG(空腹血糖值)	92mg/dl(5.1mmol/L)
服糖後1h血糖值	180mg/dl(10.0mmol/L)
服糖後2h血糖值	153mg/dl(8.5mmol/L)

(American Diabetes Association, ADA, 2017)

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

根據「美國糖尿病學會」在「胰島素使用要項 (Insulin Administration)」中所發表的聲明，有少部分的糖尿病可能發生在具有某些情況或症狀的人身上，例如：胰島素作用基因缺陷(genetic defects in insulin action)、 $\beta$ 細胞功能基因缺陷(genetic defects of  $\beta$ -cell)、內分泌病(Endocrinopathies)、外分泌胰臟疾病(diseases of the exocrine pancreas)、藥物或化學誘發(drug-or chemical-induced)、感染(infections)、偶發型合併糖尿病的其他遺傳症候群(other genetic syndromes sometimes associated with diabetes)、不尋常形式的免疫媒介性的糖尿病(uncommon forms of immune-mediated diabetes)等引起糖尿病。(Association, 2014)

#### (三)糖尿病症狀及所引起之併發症

長期血糖控制不當，容易引起許多併發症，在國人十大死因當中，有半數死因與糖尿病之併發症有關。糖尿病主要併發症(表五)，而糖尿病併發症又可分為急性與慢性兩種，(表六)(表七)為糖尿病主要急性與慢性併發症之症狀：

表五、糖尿病主要併發症

Table 5 The major complication of Diabetes

<p>循環系統併發症</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 高血壓(Hypertension)</li> <li>● 低血糖(Hypoglucoemia)</li> <li>● 動脈硬化(Artersclerosis)</li> <li>● 敗血症(Sepsis)</li> </ul>
<p>神經系統併發症</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 糖尿病性膀胱症(Diabetic Cystopathy)</li> <li>● 視力模糊眼睛病變(Diabetic Oculopathy)</li> <li>● 其它神經病變(Diabetic Neuropathy)</li> </ul>
<p>腎臟引起併發症</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 腎病症候群(Renal Failure)</li> <li>● 腎衰(Nephrotic Syndrome)</li> <li>● 酮酸毒症(Ketoacidosis)</li> <li>● 高血糖高滲壓非酮體性昏迷症(Ketoacidotic Coma)</li> <li>● 乳酸毒症(Latic Acidosis)</li> </ul>
<p>上皮組織併發症</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 褥瘡(Bed Scores)</li> <li>● 蜂窩組織炎(Cellulitis)</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 糖尿病皮膚病變(Diabetic Dermopathy)</li> </ul>
--	--

(Chang-Chen et al., 2008)

表六、糖尿病急性併發症症狀

Table 6 Complications of Diabetes Acute Illness

急性併發症	
併發症	症狀
糖尿病酮酸血症 diabetic ketoacidosis(DKA)	口渴、倦怠、神智改變、脫水、皮膚乾燥、溫暖、快而深沉之呼吸、丙酮水果味、心跳加快、休克、噁心嘔吐、腹痛和腹瀉。
高血糖高滲透壓非酮體性昏迷 hyperglycemic hyperosmolar nonketotic coma(HHNC)	昏迷、神智不清、局限性痙攣、脫水、眼球凹陷、皮膚乾燥無彈性、低血壓、休克、伴隨其他併發症如腦中風、心肌梗塞和感染等。
低血糖 hypoglycemia	顫抖、不安、心悸、心跳加速、饑餓感、皮膚蒼白、感覺



	異常、出汗、神經遲鈍、混淆、昏迷、痙攣、頭痛、語焉不詳、視力模糊、健忘、精神無法集中、極度倦怠和行為詭異。
乳酸酸血症 lactic acidosis	呼吸急速、虛脫、脫水、低血壓、乏尿無尿、腎功能不全。

(Chang-Chen et al., 2008)

表七、糖尿病慢性併發症症狀。

Table 7 Complications of diabetes chronic disease

慢性併發症	
糖尿病視網膜病變 diabetic retinopathy	罹病初期，在患者眼底可發現血管瘤；到了二期，眼底動脈可能出現阻塞，並有滲出物；最後視力將逐漸模糊，而導致失明。
糖尿病心血管病變 diabetic macroangiopathy	糖尿病患者易因血管硬化或高血壓而導致中風；也易因冠狀動脈阻塞而引起心絞痛或心肌

	<p>梗塞;更易因下肢血管硬化或阻塞，而引發壞疽。</p>
<p>糖尿病腎臟病變 diabetic nephropathy</p>	<p>腎臟中有許多腎小球，它們具有過濾的功能;糖尿病患者會隨病情發展，導致腎小球硬化，使過濾功能逐漸衰退，而產生尿毒症。</p>
<p>糖尿病皮膚病變 diabetic dermopathy</p>	<p>糖尿病會使人的防禦功能降低，使細菌易在人體皮膚滋生，一旦皮膚有傷口，將很不易癒合，尤其是腳部；而且也容易出現皮膚搔癢、肛門搔癢，女性外陰潰瘍等現象。</p>
<p>糖尿病神經系統病變 diabetic neuropathy</p>	<p>糖尿病會使人的防禦功能降低，使細菌易在人體皮膚滋生，一旦皮膚有傷口，將很不易癒合，尤其是腳部；而且也</p>

	容易出現皮膚搔癢、肛門搔癢，女性外陰潰瘍等現象。
--	--------------------------

(Chang-Chen et al., 2008)

#### (四)糖尿病之治療(treatment of diabetes)

主要的治療方式可分為非藥物治療與藥物治療兩種。在非藥物治療方面，主要是藉由飲食調控和運動的方式來加以治療。運動所造成的肌肉收縮，可以活化AMPK(AMP-activated protein kinase) pathway 22，促使GLUT4(Glucose transporter 4)移至細胞膜表面，促使葡萄糖的吸收(Fryer et al., 2002)。而且，AMPK pathway 與我們人體一般利用胰島素來刺激細胞吸收的機制並不相同，且此一機制，在第二型糖尿病中並未受損。所以，目前有一種藥AICAR，可模擬肌肉收縮，來促使GLUT4 移至細胞表面來使葡萄糖進入細胞。而在藥物治療方面，主要的目的是使不足的胰島素上升、調降進食後的高血糖和改善胰島素阻抗性。所以，以此目標而成生的治療方式和藥物主要有：1.胰島素治療。2.口服降血糖藥物。3.聯合藥物治療。

##### 1.胰島素治療

目前所使用的胰島素有：短效胰島素(regular insulin)、中效胰島

素(NPH insulin)、人體胰島素(human insulin)、豬型胰島素(pork insulin)、牛型胰島素(beef insulin)、insulin lispro human、pre-mixed insulin。

## 2.口服藥物治療

### (1)磺酰脲類藥物(Sulphonylureas, SU)

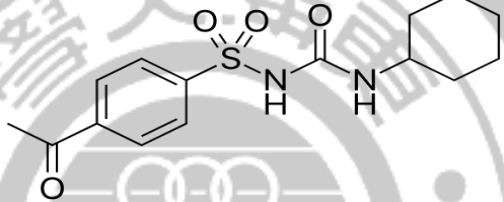
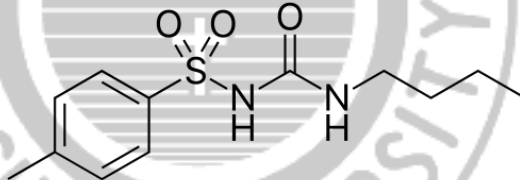
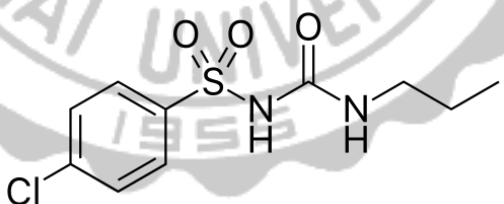
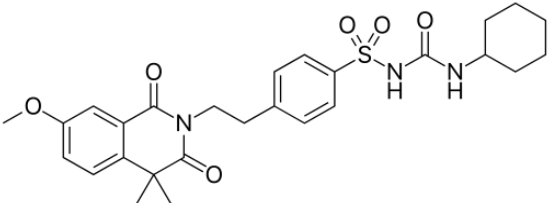
SU降血糖最主要之機制為促進胰臟胰島素之分泌，特別是加強胰臟 $\beta$ 細胞對葡萄糖刺激而釋放胰島素之作用。因此這是SU降血糖之基本重要機轉。如病人胰臟已無法分泌胰島素（例如Type 1 DM）則SU治療是註定失敗的。SU尚可抑制胰島 $\alpha$ 細胞分泌升糖激素(glucagons)，故減少肝醣之釋出，有效的降低空腹血糖(Larsen et al., 2001)。SU不但在胰臟發揮作用（刺激胰島素及抑制昇糖素分泌），尚可作用在胰臟以外之組織，包括：增加組織對胰島素之敏感度。SU可直接增加胰島素與接受器（receptor）之結合作用及結合後作用，亦可因其降低血糖及減少血中non-esterified fatty acid

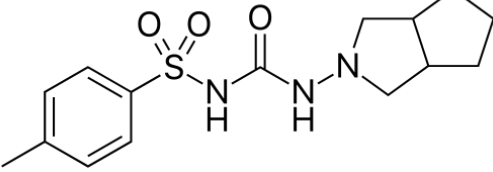
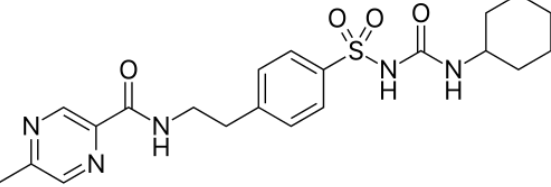
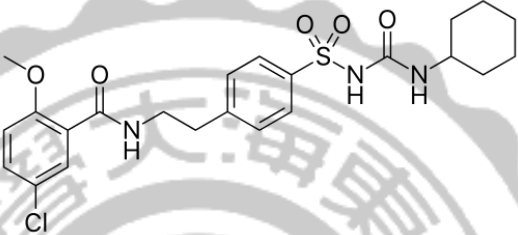
（NEFA，非脂化脂肪酸）濃度而間接加強胰島素之週邊作用(Nauck et al., 1993)。SU刺激胰島細胞分泌胰島素之機轉：在 $\beta$ 細胞膜上存在著一些SU接受器（140 kDa），它可能是ATP-依賴性「鉀離子通道」的一部份或是另一獨立結構但靠近「鉀離子通道」，一旦SU

與SU 接受器結合後，會使「鉀離子通道」關閉，鉀離子則在細胞內聚積，使細胞膜之電位差改變，因而打開了細胞膜上之「鈣離子通道」，鈣離子自細胞外湧入細胞內，增加了細胞內之鈣離子，終使含胰島素之顆粒被釋出β 細胞外(Krauter et al., 2001)。

表八、磺酰脲類藥物

Table 8 Sulphonylureas, SU

藥名	結構	生產公司
醋酸己脲 (Acetohexamide)		Dimelor-Lilly
甲苯磺丁脲 (Tolbutamide)		Orinase-Upjohn
氯磺丁脲 (Carbutamide)		Diabinese-Pfizer
格列喹酮 (Gliquidone)		Glurenorm-Boehringer Mannheim

格列齊特 (Gliclazide)		Diamicon- Servier
格列吡嗪 (Glipizide)		Minidiab- Farmitalia Glibenese- Pfizer
格列本脲 (Glibenclamide)		Euglucon- Boehringer Mannheim Daonil- Hoechst

## (2) 雙胍類藥物(Biguanides, BG)

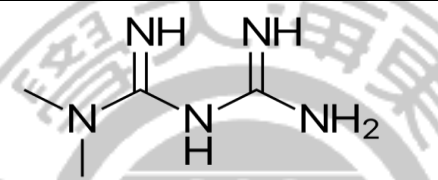
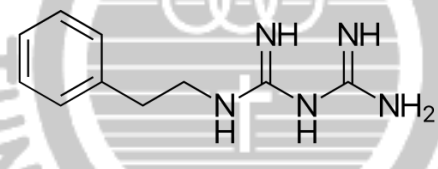
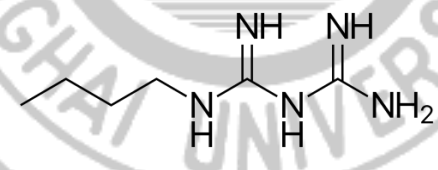
BG 為 guanidine 之衍生物 (二個 guanidine 分子去掉 NH<sub>2</sub> 而連接在一起)，目前已上市的 BG 有三種。BG 本身不會刺激胰島素之分泌，其控制血糖機轉為：a. 抑制食慾，因此應優先使用於肥胖之第二型糖尿病人身上，使其進食減少，體重下降而改善胰島素之週邊作用。b. 延緩腸道吸收葡萄糖。c. 促進葡萄糖在腸道之厭氧性分解作用而增加葡萄糖在腸道中之利用，但因而產生乳酸(lactic acid)，如產生過多，極易造成乳酸中毒而送命，特別在老人 (65 歲以上) 或併有心、肺、肝、腎功能不佳者由於藥物滯留加上血中氧氣分壓較低，更易產生乳酸中毒，應為禁忌。d. 加強胰島素在肝臟之作

用，因此抑制肝臟葡萄糖之新生作用，減少葡萄糖從肝臟釋出。e.

促使貯藏於細胞內的葡萄糖輸送蛋白GLUT4到細胞表面，參與輸送工作，使細胞表面之葡萄糖輸送蛋白量顯著增加，因此加強了胰島素之週邊作用，而加速葡萄糖的代謝。(Miller et al., 2013)

表九、雙胍類藥物

Table 9 Biguanides, BG

藥名	結構	生產公司
二甲雙胍 (Metformin)		Glucophage-Lipha Glycoran-日本新藥 Melbin-住友
苯乙雙胍 (Phenformin)		ACIC LTD
丁福明 (Buformin)		Bigunal-日研 Krebon-大日本

(3)胰島素增敏劑(Insulin sensitizer)

這類藥物主要作用為促進細胞核內peroxisome proliferators activated receptor(PPAR)-gamma 接受器之活性，因而加強了胰島素的作用，使細胞內葡萄糖運輸蛋白GLUT1 及GLUT4 增加，將葡萄糖帶進細胞內代謝。此外，脂肪酸運輸蛋白及結合蛋白也增加，讓脂肪酸進入細胞。另外，lipoprotein lipase 的活性也增加因而促進三

酸甘油脂的代謝。最近有人發現內皮細胞也含有PPAR-gamma，TZD 可透過它而降低內皮素（endothelin）的合成及分泌。內皮素本身會干擾胰島素的作用，因此綜合以上諸作用，可知TZD可有效的降低胰島素抗阻現象。(Murakami et al., 1998)

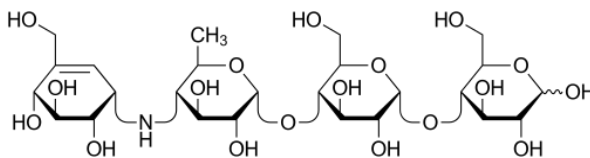
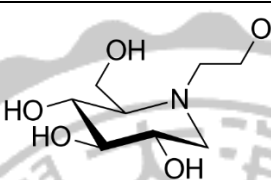
#### (4) $\alpha$ -葡萄糖酶抑制劑

這類藥物主要作用為抑制胰臟 $\alpha$ -amylase 及腸內之 $\alpha$ -glucosidase，因而抑制碳水化合物在腸道之分解及吸收，有效的降低飯後血糖及胰島素濃度，減少動脈硬化之危險，也稍稍的降低空腹血糖。它的好處是全身性副作用少（因不到2%被吸收），而且單獨使用不會引起低血糖，但副作用為腹脹或偶而腹瀉。Acarbose 偶有引起腸阻塞及GPT 升高的病例報告，故不宜使用於有肝臟或腸道病變的病人身上。須注意的是，雖然它單獨使用不會引起低血糖反應，但與「磺醯尿素類」或胰島素合用時，一旦發生低血糖反應，最好馬上口服葡萄糖，而不能使用蔗糖或其他碳水化合物，因為acarbose 會抑制後者在腸道內之分解吸收。(Schmidt et al., 1977)



表十、 $\alpha$ -葡萄糖酶抑制劑

Table 10  $\alpha$ -glucosidase inhibitor (AGI)

藥名	結構	生產公司
阿卡波糖 (Acarbose)		Glucobay-Bayer
米格列醇 (Miglitol)		Glyset-Bayer

(Schmidt et al., 1977)

### (五)糖尿病與醣解酵素(Diabetes and glycolysis enzymes)

人在攝取醣類後，會由口腔之唾液與胰臟分泌之 $\alpha$ -澱粉酶 ( $\alpha$ -amylase)分解成分子較小的雙醣、寡醣及糊精，當最後進到小腸當中，會由小腸絨毛細胞上所分泌的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶 ( $\alpha$ -glucosidase)水解成葡萄糖，並藉由胰島素從血液運送到身體各器官利用，而糖尿病患者無法利用葡萄糖，使葡萄糖留在血液當中，形成飯後高血糖之現象。所以利用醣解酵素抑制劑可以有效延緩葡萄糖在人體中的代謝，進而改善飯後高血糖的狀況。

#### 1. $\alpha$ -澱粉酶 ( $\alpha$ -amylase)

$\alpha$ -澱粉酶可在澱粉（葡萄糖鏈）上任何 $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)的鍵結作用，進行水解，而將澱粉鏈一分為兩個較短的葡萄糖鏈。因而鏈的長度不斷

縮短，直到最後將澱粉長鏈分解成許多的葡萄糖及兩個葡萄糖分子所組成的麥芽糖(maltose)，而麥芽糖再進一步由 $\alpha$ -glucosidase 分解。 $\alpha$ -澱粉酶催化水解澱粉會使澱粉黏度迅速下降，所以又稱為液化澱粉酶(Aquino et al., 2003 ; Vasekaran et al., 2010)。

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

葡萄糖澱粉酶能催化澱粉水解為葡萄糖。葡萄糖澱粉酶既可以催化水解 $\alpha$ -1,4 糖苷鍵，也可以催化水解 $\alpha$ -1,6 糖苷鍵，水解產物全部為葡萄糖，主要存在人體小腸中之絨毛細胞上，而自然界存在於根霉、黑麴霉、紅麴霉等黴菌中。(Frandsen *et al.*, 1998 ; Shobana *et al.*,2009)。

#### 四、高血糖與活性氧之關聯

血糖及胰島素濃度增加時，會直接刺激體內自由基的生成及降低抗氧化的能力，當處在高血糖環境中，血管內皮細胞中的粒腺體(mitochondria)過度生成superoxide陰離子，會導致β細胞遭到破壞而使分泌胰島素的功能失調及增加糖尿病併發症發生的機率，另外也有四項導致糖尿病高血糖併發症的可能致病機轉：增加的polyol路徑流動、過多的醣化終極產物(AGE: advanced glycation end-product)物質形成、蛋白質激 C(protein kinase C)的活化和增加的hexosamine路徑流動等。而這四條導致糖尿病高血糖併發症的致病機轉的源頭—superoxide陰離子，會抑制細胞內葡萄糖代謝路徑中的glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase活性 (GAPDH酵素)，使得葡萄糖代謝過程中之前趨物質的量上升，引起這四項致病路徑的發展(Du et al., 2003)。

##### (一) 自由基與活性氧

###### 1. 自由基

自由基是帶有一個單獨未配對電子的原子、分子、或離子，因其極具活性及不穩定性，會和體內的細胞組織產生氧化反應，導致組織細胞失去正常功能，甚至破壞DNA，造成損害或突變進而引發癌症。自由基主要伴隨體內新陳代謝所產生，例如：粒線體在進行

呼吸作用電子傳遞的過程中即會產生自由基，當有外來病毒細菌進入人體，白血球也會產生自由基去抵抗外來的入侵者。然而，當身體受到外界不當刺激也會促使大量的自由基產生。(Freeman & Crapo, 1982)

## 2. 活性氧

氧氣在體內代謝之後所衍生出活性高、攻擊性強的氧氣化合物。包括氧離子、過氧化物和含氧自由基等。

### (二) 自由基種類及介紹

表十一、自由基之種類

Table 11 The type of free radicals

種類	介紹
超氧化物自由基 (superoxide anion radical, $O_2^{\cdot-}$ )	人體中最先產生、最多的一種自由基，亦會誘發其他種類的自由基的產生。
過氧化氫 (hydrogen peroxide)	氫氧基由超氧化物自由基代謝後產生，也有可能是由身體其他的吞噬細胞經氧化還原作用而產生，過氧化氫的穩定性比其他的自由基都強，但因為會通過細胞膜流竄於身體的各部位，而擴大傷害的範圍。
羥基自由基 (hydroxyl radical)	破壞力最強的自由基，其產生來源是因為過氧化氫的代謝以及各式輻射線所產生，羥基自由基會攻擊細胞膜造成細胞的死亡，也會攻擊我們所食用的不飽和脂肪酸，造成油脂的過氧化而劣變。

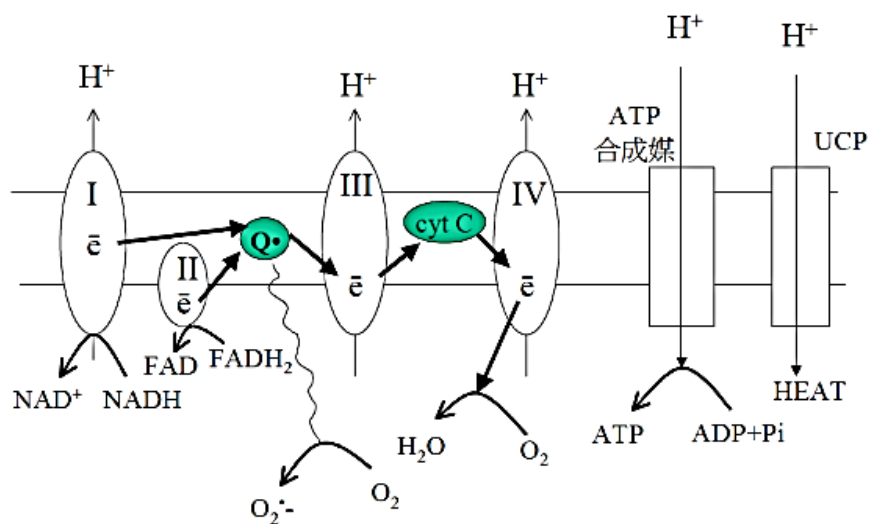
單線態氧 (singlet oxygen)	活性比氧氣高，更容易破壞細胞。
過氧化脂質 (lipid hydroperoxide )	自由基破壞脂質之後的產物，但此物質對於細胞是具有毒性的。因此，也可以當作是細胞氧化後受害的指標。
一氧化氮自由基 (nitric oxide, ·NO)	經由組織中一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOSs)所產生，為帶有未配對電子的氣體，於體內分布廣泛，並且具有多項生理作用及防禦、訊息傳遞等功能。
過氧化亞硝基陰離子 (peroxynitrous acid, ONOO <sup>-</sup> )	由一氧化氮(·NO)和超氧陰離子(superoxide, O <sub>2</sub> <sup>-</sup> )反應生成，是一種活性極大、破壞力超強的自由基，也是對抗外來病原菌的最佳防禦武器。

(Freeman & Crapo, 1982)

### (三) 自由基導致糖尿病併發症機轉

葡萄糖醱解作用可產生pyruvate和NADH，而NADH有兩種途徑，其一為將丙酮酸(pyruvate)還原成乳酸(lactate)而離開細胞至肝臟作為醱質新生(Gluconeogenesis)之受質，另一途進為進入粒線體作為電子傳遞鏈的受質之一。而pyruvate 在進入粒線體中可進一步行TCA 代謝環而產生水分子、二氧化碳、NADH 和FADH<sub>2</sub>，而這些在粒線體內生成的NADH 和FADH<sub>2</sub> 可經由電子傳遞鏈的過程來產生細胞能量來源—ATP 物質。而粒線體的電子傳遞鏈由四個酵素複合體、cytochrome c 和ubiquinone 所組成，NADH 和FADH<sub>2</sub> 分別將電子傳遞給酵素複合體I和II，電子再經由ubiquinone 傳遞至酵素

複合體III，同時產生不穩定性氧自由基（superoxide），電子最後再經由cytochrome c、酵素複合體IV 到氧分子而形成水。在這些過程中，氫離子被送到粒線體內膜之外產生電位差而驅動ATP 合成酶和UCP（uncoupling protein）作用以產生能量來源ATP 和熱能。而在粒線體內膜中，當由氫離子所產生的電位差增大時，就會阻礙電子傳遞鏈中酵素複合體III 的功能，使得coenzyme Q（ubiquinone）之半衰期延長或無法將電子傳遞到酵素複合體III，造成氧氣被轉變成不穩定性過氧化物自由基（superoxide： $O_2^-$ ）的效應增加，此點在糖尿病情況下，細胞內的高血糖經由TCA 代謝環而產生過多的電子供應者NADH 和FADH<sub>2</sub> 時，更可加大粒線體內膜的電位差，使得不穩定性過氧化物自由基的產生更多。(Williamson et al., 1993)



圖四、粒線體內電子傳遞鏈之作用過程。

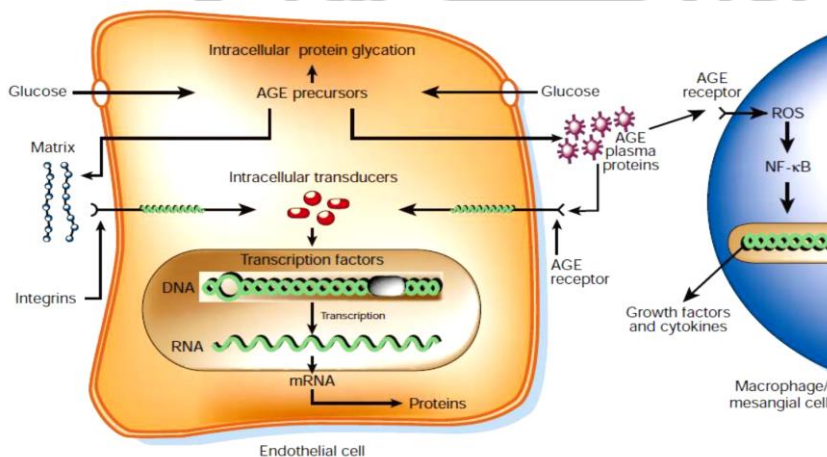
Fig4、The action of electron transport chain in grain body.

## 1. 增加的polyol代謝路徑

糖尿病患者其細胞內過多的葡萄糖會經由polyol代謝徑路形成山梨糖醇(sorbitol)，並且使NADPH減少。而在此代謝徑路中，sorbitol極不易穿越細胞膜，滲透壓會在細胞內產生，產生更多過氧化物自由基，其與糖尿病患者眼睛病變有關。(Chung et al., 2003)

## 2. 增加的細胞內醣化終極代謝產物(AGEs)

葡萄糖本身氧化作用可以形成 glyoxal(醣化終極代謝產物)，或是由梅納反應中Amadori重組中dihydroxyacetone phosphate及glyceraldehyde-3-phosphate裂解methylglyoxal而產生3-deoxyglucosone，而這些前驅物質可在和細胞中之蛋白質形成醣化終極代謝產物，造成腎臟、視網膜和神經上小血管病變。

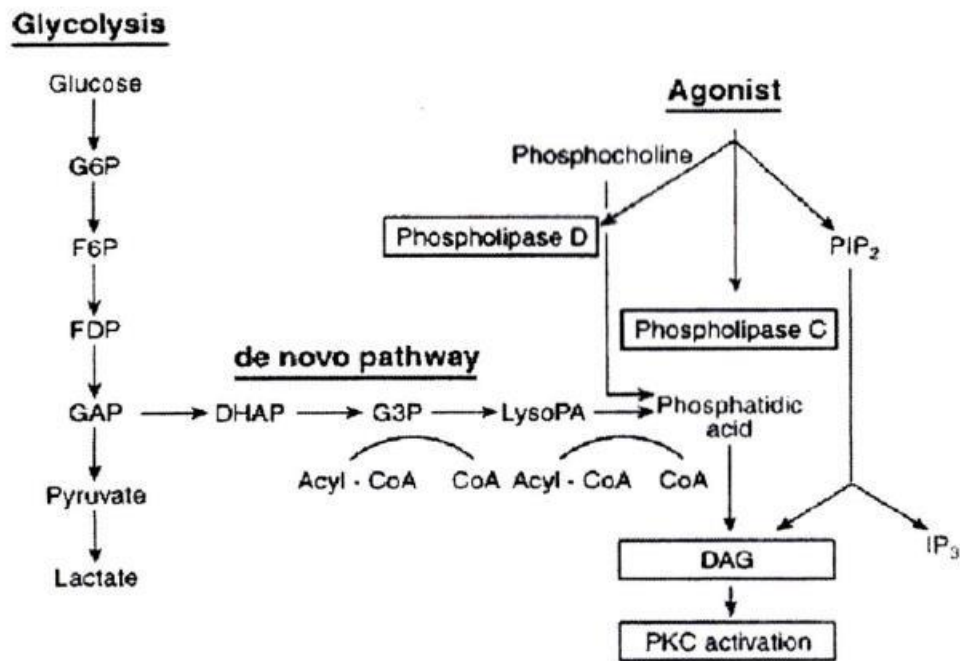


圖五、AGEs 前驅物造成細胞損傷的三種方式。

Fig 5. AGEs precursors cause three ways of cell damage.  
(Bierhaus et al., 1998)

### 3. Protein kinase C (PKC) 的激活

高血糖狀態會使葡萄糖在梅納反應中代謝產物dihydroxyacetone phosphate還原形成glycerol-3-phosphate後，使得DAG(甘油二酯)的生物合成增加，並且使的PKC輔酶系統被激活，並造成細胞內傳導訊息異常。(Koya & King, 1998)



(Koya & King, 1998)

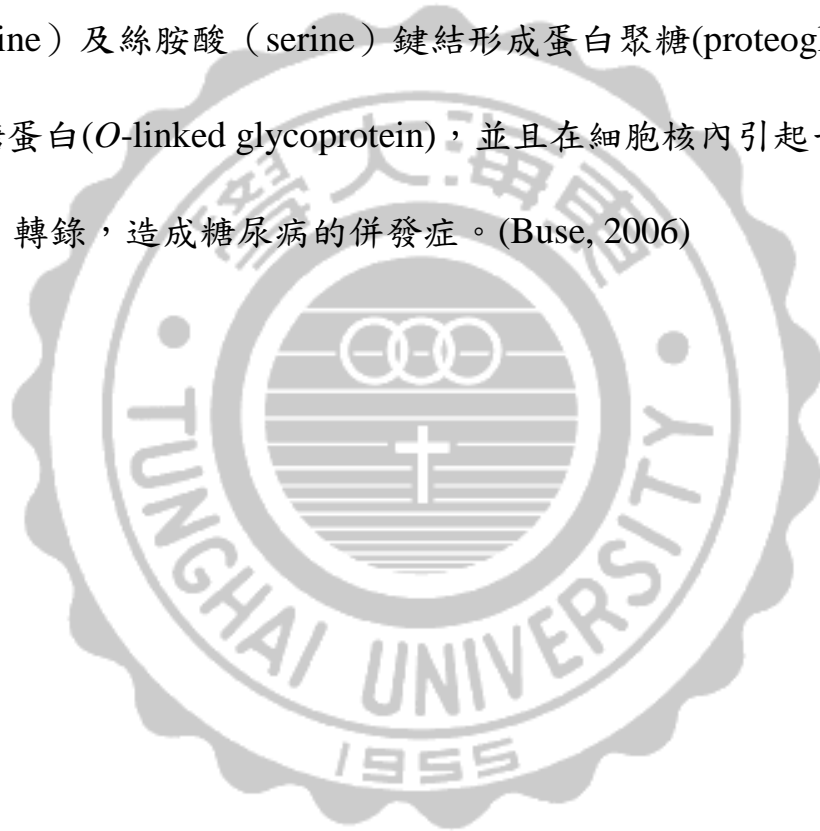
圖六、高血糖誘發PKC 活化機制。

Fig 6. Activation mechanism of hyperglycemia-induced protein kinase C (PKC).



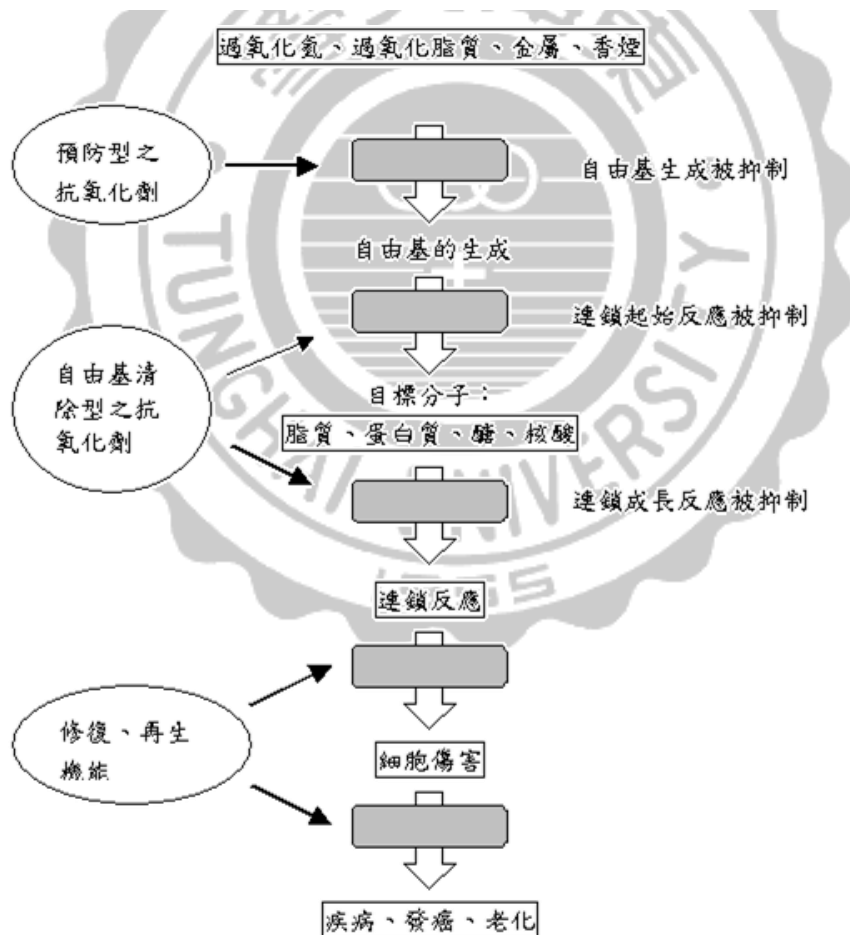
#### 4. 增加的 hexosamine 代謝徑路

葡萄糖之醱解過程產生的fructose-6-phosphate，可在GFAT(glutamine fructose-6-phosphate amidotransferase)催化下而代謝成glucosamine-6-phosphate，而輔酶UDP-GlcNAc受到OGT轉移酶的作用，將 N-acetylglucosamine (GlcNAc) 和蛋白質上之蘇胺酸 (threonine) 及絲胺酸 (serine) 鍵結形成蛋白聚糖(proteoglycan)和O-連接糖蛋白(O-linked glycoprotein)，並且在細胞核內引起一系列基因轉譯、轉錄，造成糖尿病的併發症。(Buse, 2006)



## 五、抗氧化作用

人體在日常生活當中，在氧化代謝過程中，或因生活作息不正常、情緒壓力、抽菸、輻射、外在環境污染、熬夜、缺乏運動等，會破壞體內抗氧化防禦系統，並攻擊體內正常細胞之 DNA、細胞膜、蛋白質等，造成癌症、衰老或其它疾病，而抗氧化作用就是利用抗氧化物質，清除體內有害之自由基，並維持體內自由基平衡，以達到預防預防及治療疾病的目的。(Frei, 1994)



圖七、活性氧對生物體傷害及其防禦系統。

Fig 7. Reactive oxygen species on organism damage and defense system.

## (一) 抗氧化劑之種類

### 1. 天然之抗氧化劑：

如：生育醇 (tocopherols)、抗壞血酸 (L-ascorbic acid)、類黃酮 (flavonoids)、葉綠素衍生物 (chlorophyll derivatives)、類胡蘿蔔素 (carotenoids) 及酚類化合物 (phenolic compounds) 等(表十二)。

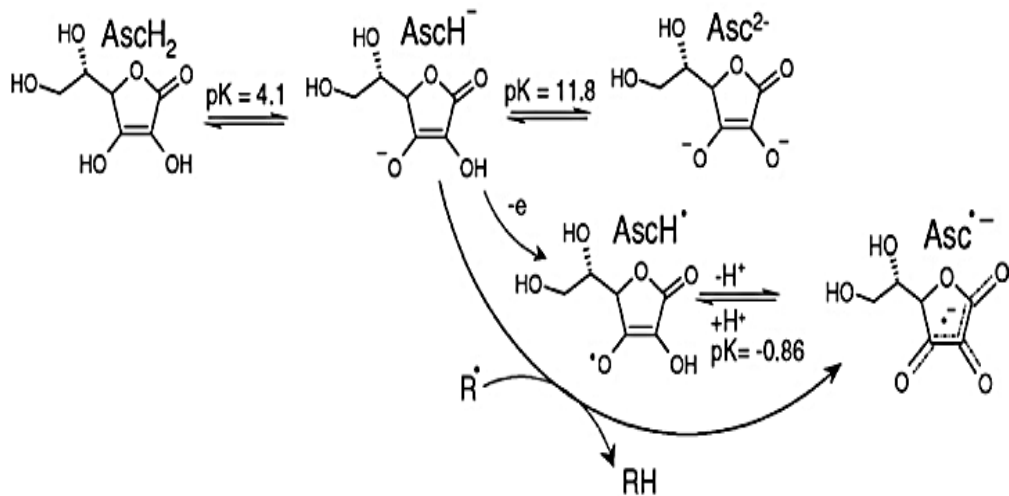
表十二、天然抗氧化劑之來源

Table 12. Natural source of antioxidants

Antioxidants	Some food source and activity
Carotenoids	Parsley, carrots, winter squash, sweet potatoes, yams, cantaloupe, apricots, spinach, kale, turnip greens, citrus fruit. Antioxidants and cell differentiation agents (cancer cell non-differentiated)
Catechins	Green tea, berries. Antioxidants, linked to lower rates of gastro-intestinal cancer; mechanism not understood.
Flavonoids	Most fruits and vegetables, including parsley, carrots, citrus fruits, broccoli, cabbage, cucumbers, squash, yams, tomatoes, eggplant, peppers, soy products, berries. Block receptor sites for certain hormones that promote cancers. Phenolic compounds possessing antioxidant actions.
Lycopene	Tomatoes. Red grapefruit.
Monoterpenes	Parsley, carrots, broccoli, cabbage, cucumbers, squash, yams, tomatoes, eggplant, peppers, mint, basil, citrus fruit. Some antioxidant properties; inhibit cholesterol production in tumors; aid protective enzyme activity.
Phenolic acids	Parsley, carrots, broccoli, cabbage, tomatoes, eggplant, peppers, citrus fruits, whole grains, berries. Some antioxidant properties; inhibit formation of nitrosamine, a carcinogen, and affect enzyme activity.
Spice and plant extracts	Antioxidant activities have been demonstrated in extracts from rosemary, oregano, clove, pepper, ginger, olive, birch bark, nutmeg, red onions, garlic, oats, Chia seeds, etc.
Various tropical fruits	Papaya, mango, passion fruit and equi seeds may contain antioxidant nutrients and are therefore recommended.
Vitamin C	Fruits and vegetables.
Vitamin E	Sunflower, seed oils, almonds, hazelnuts, eggs, margarine, cheese, butter, dairy products, wholegrain breakfast cereal, wholemeal bread, dark green vegetables.

(1) 維生素C - 抗壞血酸，ascorbic acid

其為水溶性物質，人體存在於細胞間質與血漿內。維生素C其  
在第2和第3個碳上有兩個羥基，可提供質子自由基質子，自身還原  
成半脫氫抗壞血酸 (semidehydroascorbic acid) (Beyer, 1994)。而其  
還原態可再經由NADPH或麩胱甘肽還原成具有抗氧化活性(Jacob &  
Burri, 1996)。若體內血漿中抗壞血酸的濃度過高，抗壞血酸會造成  
反效果，反而產生促氧化作用，並生成自由基。(Halliwell, 1995)



圖八、抗壞血酸抗氧化機制。

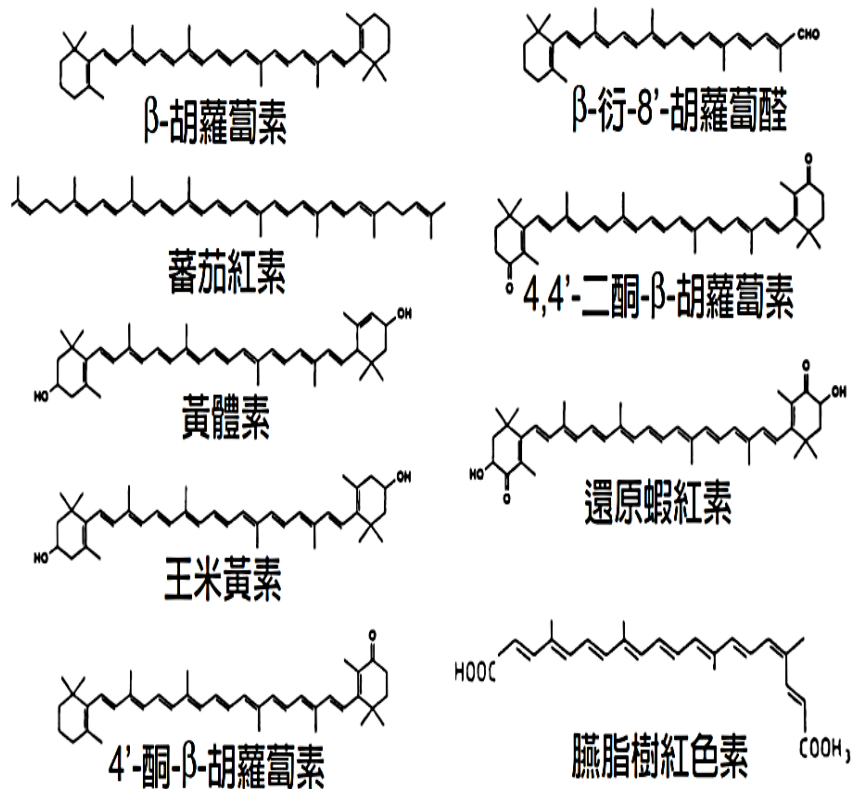
Fig 8. Antioxidant mechanism of ascorbic acid.

## (2) 維生素E -生育醇，tocopherol

維生素E為全球使用最廣泛的，屬於脂溶性維生素，其可分為四種型態 ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ )，在自然界中分佈最多為 $\gamma$ 型態。當脂質自由基攻擊生育醇時，會將苯環上的酚基當中之氫離子轉移給脂質自由基，本身作氧化反應，而脂質自由基作還原反應，並阻斷脂質的過氧化反應及一連串的自由基連鎖反應。(Fang et al.,2002)。過氧化自由基可被生育醇抑制，並可避免生物體內之血漿中極低密度脂蛋白的氧化及不飽和脂肪酸的過氧化，生育醇也可避免細胞中之DNA受到傷害(Topinka et al.,1989)。

## (3) 類胡蘿蔔素(carotenoids)

類胡蘿蔔素屬於脂溶性色素，有多重共軛雙鍵之長鏈多烯結構，單旋態氧可被其抑制及並且可以捕捉自由基，以終止自由基連鎖反應。類胡蘿蔔素本身可行氧化作用，並提供質子，使自由基還原，以達到脂質過氧化反應的抑制(Aruoma, 1998)。類胡蘿蔔素的 $\beta$ -ionone 環上銜接之官能基種類及共軛雙鍵長度，皆會影響其抗氧化能力，而當共軛雙鍵數越多，其清除自由基能力也相對提高(Sahlin et al., 2004)。



圖九、常見類胡蘿蔔素結構圖。

Table 9. Common structure of carotenoid.

#### (4) 麩胱甘肽-glutathione, GSH

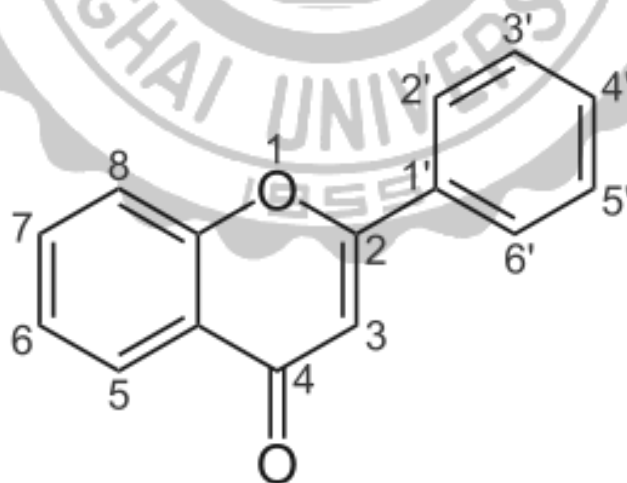
GSH是由半胱胺酸 (cysteine)、麩胺酸 (glutamic acid) 及甘胺酸 (glycine) 組成的三胜肽，為細胞內含量最豐富的胜肽，並廣泛分布於微生物、動植物之細胞中，也是人體中最重要的抗氧化系統(Slivka et al., 1987)。

## (5) 多酚類-polyphenols

多酚類其成分為自然界植物中廣泛存在，且在自然界中至少有8000多種多酚類化合物已被鑑定，其結構有多個酚基團，而酚基團中之羥基可以提供質子給予自由基，而中斷自由基之連鎖反應，以下為主要多酚類物質，包括類黃酮（flavonoids）、酚酸（phenolic acids）及鞣質（tannins）：

### a. 類黃酮（flavonoids）

其以2個酚羥基的苯環化合物為主體，並通過中央三碳原子連接而形成類黃酮化合物，其結構如圖十。大多分布於植物和水果當中，依其結構可分為八大類如表十三：

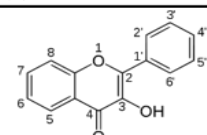
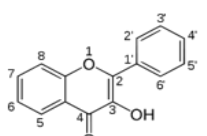
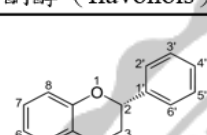
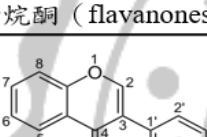
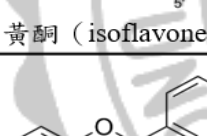
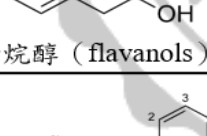
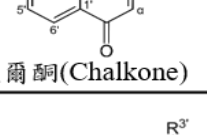
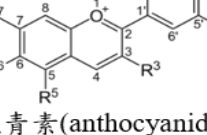


圖十、類黃酮之結構。

Fig 10. Structure of flavonoids.

表十三、類黃酮之種類

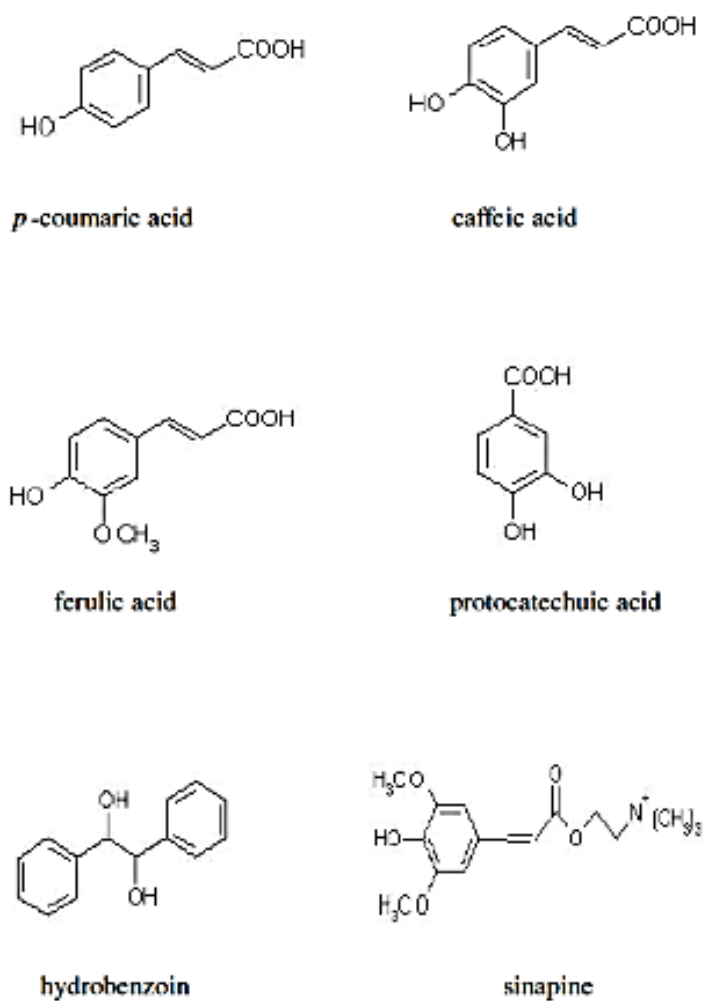
Table 13. Types of flavonoids

類黃酮類別	抗氧化性特徵
 <p>黃酮 (flavones)</p>	<p>* 此結構為在C有2,3 double bond, 4-oxofu, 但沒有3-OH。                      * B環上-OH 越多, A環在C5及C7上有-OH, 抗氧化性越強。                      * 抗氧化性: lutein &gt; apigenin &gt; 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。                      * B環上-OH 越多, A環在C5及C7上有-OH, 抗氧化性越強。                      * 抗氧化性: quercetin &gt; myricetin &gt; morin &gt; kaempferol</p>
 <p>黃烷酮 (flavanones)</p>	<p>* 抗氧化性: taxifolin &gt; naringenin &gt; hesperitin &gt; hesperidin &gt; naringin和OH的數目及取代位置有關。                      * 其抗氧化性小於flavonols及flavanones</p>
 <p>異黃酮 (isoflavones)</p>	<p>* genistin, daidzein 屬之。                      * 抗氧化性差, 在天然產物中此類結構較少。                      * orthodihydroxyl 的結構。</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。                      * 抗氧化性: catechin-gallate &gt; catechin</p>
 <p>查爾酮(Chalkone)</p>	<p>* butein, phloretin, phloridzin 屬之。                      * 從甘草的成分可分離出具有抗氧化性的物質lichalcone A。                      * 具有潛在抗氧化性, dihydrochalcone &gt; chalcone</p>
 <p>花青素(anthocyanidins)</p>	<p>* 抗氧化性: cyanidin &gt; cyanidine-3-β-D-glucoside                      * Cyanidin以flavylium cation的形式存在時抗氧化性較佳 (pH2 &gt; pH4 &gt; pH7), B環結構影響抗氧化性。                      * Cyanidin = dephindin &gt; malvidin &gt; 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。                      * taxifolin, fustin 屬之。</p>



b. 酚酸 (phenolic acids)

肉桂酸 (cinnamic acid)、苯甲酸 (benzoic acid) 為酚酸之兩大類，並廣泛分布於自然界植物當中，其皆具有良好清除自由基能力，有良好之抗氧化能力(Kim et al., 2006)。

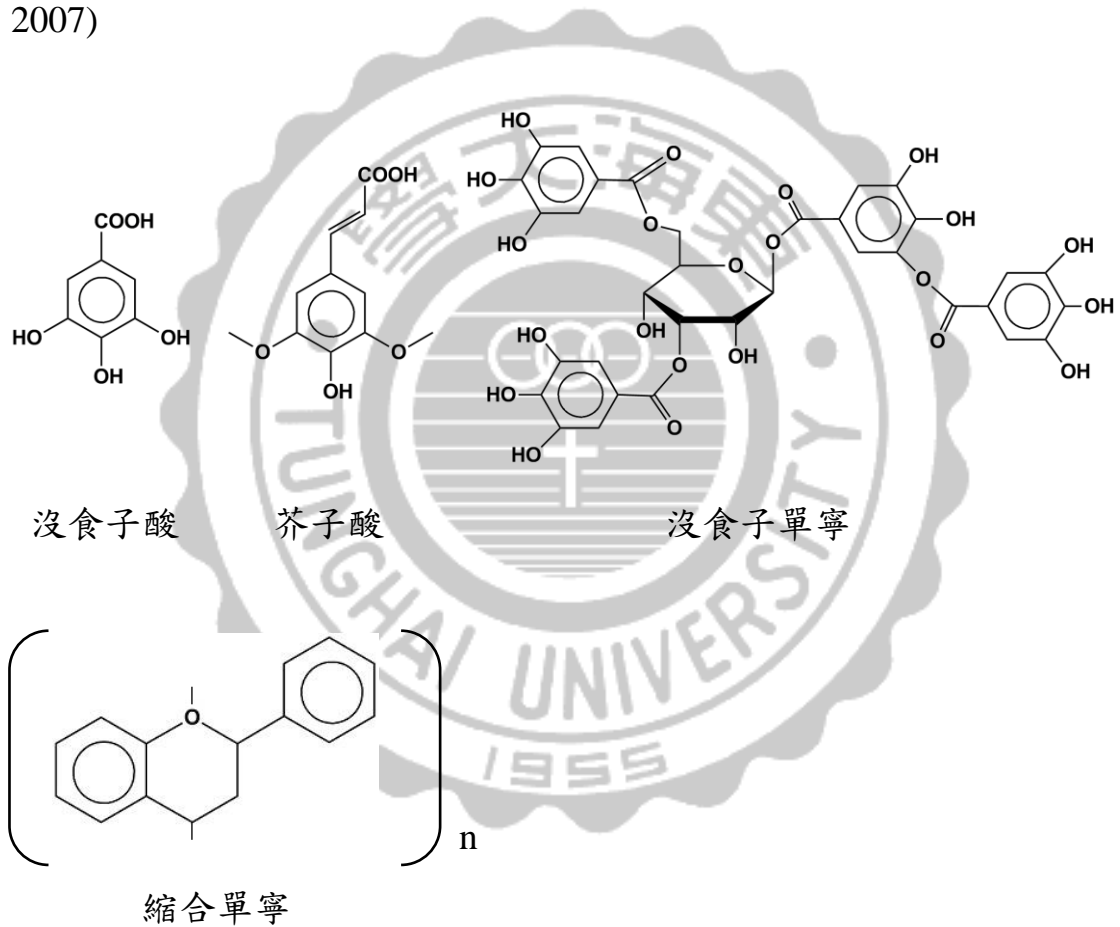


圖十一、常見酚酸之結構。

Fig 11. Common of phenolic acid structures.

c.鞣質（單寧，tannins）

一般可分為水解及縮合單寧。在苯環上之羥基，可以提供質子給予自由基，並可抑制自由基產生，防止人體當中氧化應激的傷害 (Riedl et al., 2002)。單寧也具有螯合 $Fe^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ 之能力，其所形成之複合物可防止羥自由基對人體所造成之傷害。(Yapo-Kicho et al., 2007)

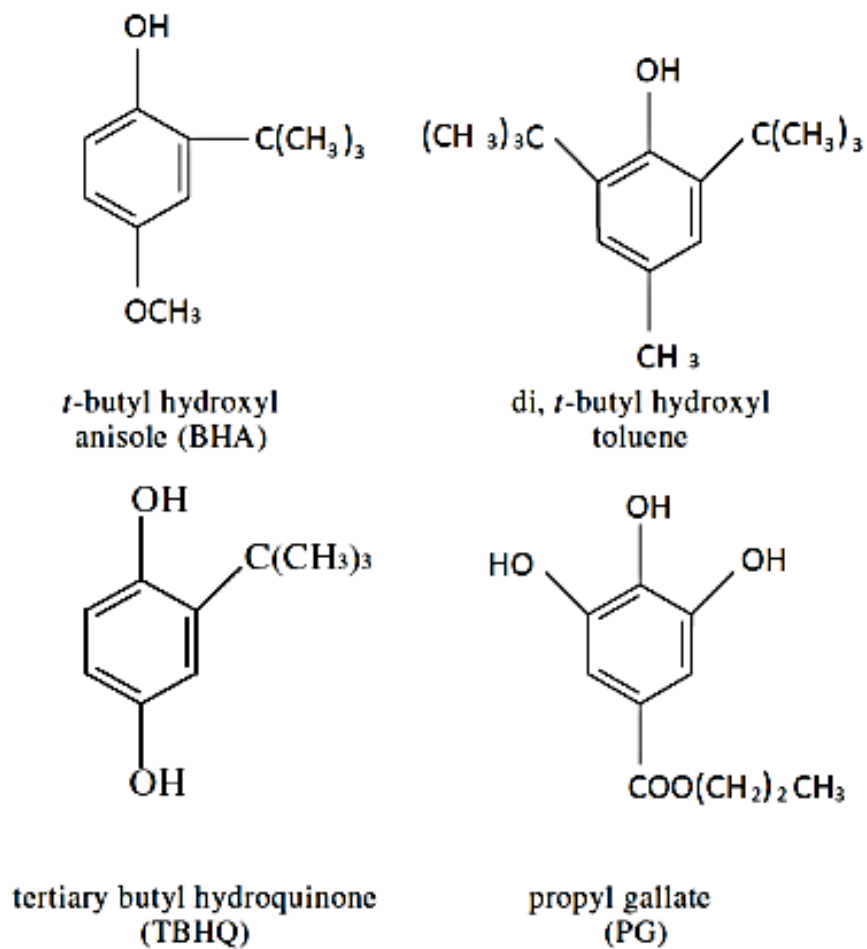


圖十二、常見單寧之結構。

Fig 12. Common of tannin structure.

## 2.人工合成的抗氧化劑：

目前只有二丁基羥基甲苯(BHT)、丁基羥基甲氧苯(BHA)、三丁基氫醌TBHQ、沒食子酸丙酯(propyl gallate, PG)這四種人工合成之抗氧化劑被美國FDA核准使用(Carocho & Ferreira, 2013)其結構如下：



圖十三、常用之人工合成抗氧化劑。

Fig 13. Structures of main synthetic antioxidants.

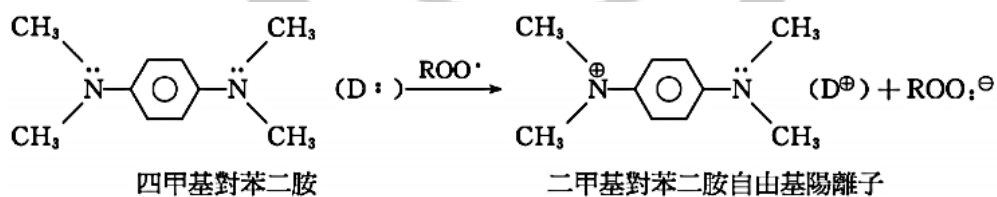
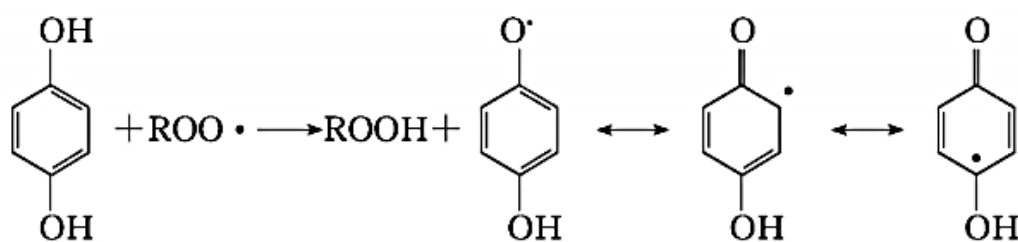
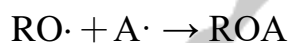
## (二) 抗氧化劑作用機制

### 1. 自由基捕捉劑

A. 質子供應者: 抗氧化劑(AH)提供自由基(R·)質子，還原自由基，本身產生氧化作用。



B. 自由基接受者: 抗氧化劑直接與自由基結合

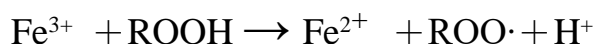
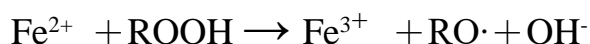
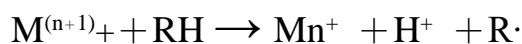


圖十四、自由基捕捉劑之機制。

Fig 14. the mechanism of free radical capture agent.

## 2. 金屬螯合劑:

過渡金屬離子具有催化脂質形成自由基，促進脂質氧化的能力：



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

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

空氣中的氧主要以較安定的基態三旋態氧 (triplet oxygen,  $3O_2$ ) 狀態存在。由於在食品中常含有一些光增感劑 (photosensitizer) 如葉綠素、血紫質及核黃素等，這些物質會吸收光能，從基態

(ground state) 提升至激發態 (excited state)，當激發態返回基態時，所釋放的過多能量便被三旋態氧吸收而提升至單旋態氧

( $1O_2$ )，此單旋態氧極易和食品中的不飽和脂肪酸上的雙鍵反應產生氫過氧化物。此類抗氧化劑包括一些類胡蘿蔔素如  $\beta$ -胡蘿蔔素 ( $\beta$ -carotene) 等，可吸收光增感劑所釋放的過多能量使單旋態氧

恢復成穩定的三旋態氧型態，藉此降低與不飽和脂肪酸反應的可能性（Kellogg and Fridovich, 1975; Bando et al., 2004）。

#### 4.相乘劑

相乘劑定義為本身對某特定反應並無作用或作用很少，但若有其他化合物存在，則反應程度比單一化合物作用大，故稱之。抗氧化劑之相乘劑，一般以有機酸、無機酸和其衍生物，如檸檬酸、磷酸、酒石酸(tartaric acid)。



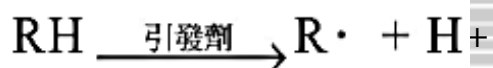
### (三)抗氧化與脂質氧化之關係

脂質的自氧化作用會引起一連串過氧化之連鎖反應，其內多元不飽和脂肪酸非常不安定，其雙鍵結構更容易引起自由基攻擊，更容易讓油脂腐敗，並在人體當中則會產生更多之自由基。若是能利用抗氧化劑在起始反應期及連鎖反應期抑制自由基之生成、並能保護人體中之器官，預防疾病、老化甚至癌症的發生。

油脂自氧化大致可以分為以下三個步驟：

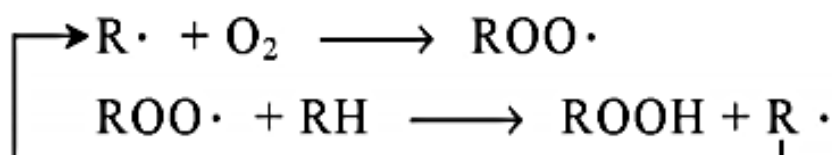
起始反應期(initiation of autoxidation)

氧、光、熱、金屬、輻射等外界因素，使脂肪酸產生脂肪酸自由基(R·)



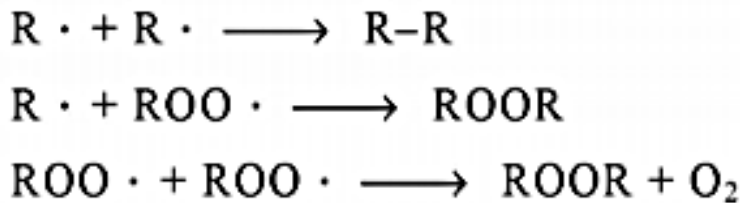
連鎖增殖反應期(propagation of autoxidation)

脂肪酸自由基(R·)在連鎖反應的過程中會與氧形成過氧化自由基(ROO·)，而過氧化自由基會再去攻擊脂肪酸，而再度產生脂質自由基(R·)，此過程會產生更多的自由基。



終止反應期(termination of autoxidation)

此時期自由基相互結合，形成不穩定之聚合物，並且解形成醛、酮、醇、酸，除了造成脂肪的氧化酸敗外，亦會造成人體中血管阻塞，產生粥狀動脈硬化。



表十四、脂質氧化反應與疾病之關聯。

Table 14. Disorders associated with lipid oxidation (LO).

Disease or disorder	Oxidative mechanisms
Atherosclerosis	Induced by intracytoplasmic macrophage accumulation of cholesterol oxides from oxidized foods and biological sources
Cataract	Diet rich in fat and deficient in antioxidants ( tocopherol and ascorbic acid )
Diabetes	Oxidation of carbohydrates and lipids from a diet rich of these nutrients
Diarrhea and respiratory inflammations	Peroxides irritate gastrointestinal mucosae. There is occupational risk of lung disease in food services
Aging	Ingestion of a diet rich in fat and deficient in antioxidants , since childhood, can increase cellular aging
Hemolysis and anemia	Diet rich in PUFAs predisposes erythrocytes to cell membrane disruption, resulting in hemolysis and, as a consequence, in anemia
Partial losses of essential vitamins and nutrients	ROS and products of LO induce loss of liposoluble vitamins ( A, carotenoids and E ) , of vitamin C and of essential fatty acids. Peroxides and LO end products block intestinal absorption of many nutrients ( thiamine, pantothenate, riboflavin, ascorbate, vitamin B <sub>12</sub> , vitamin A, tocopherols, lysine and sulfured peptides )
Necrosis and/or apoptosis	Cell death is provoked by peroxides, malonaldehyde and 4-hydroxynonenal
Mutagenicity, genetic damage and cancer	Peroxides, malonaldehyde and 4-hydroxynonenal and other aldehydes are clastogenic agents that damage genetic material, increasing cancer risk

(Frankel, 2014)

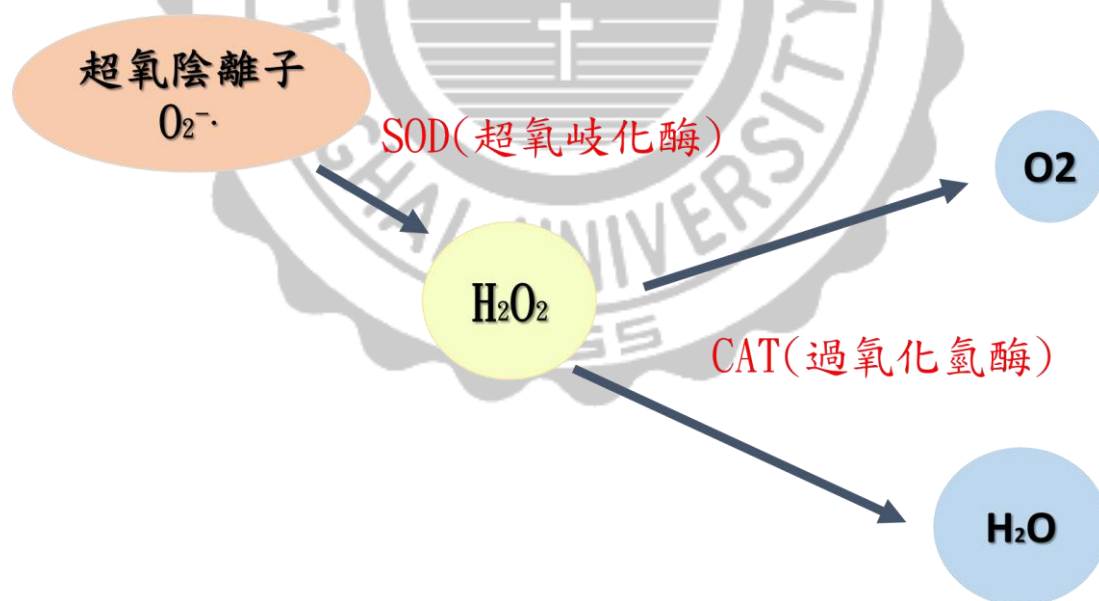


#### (四)人體酵素抗氧化防禦系統

抗氧化酵素在人體當中有相當多種，可以利用氧化還原的方式來對抗人體中之自由基，並將人體中代謝的毒性物質，轉為毒性較小甚至完全無毒之物質，所以抗氧化酵素在人體當中是非常重要的防禦系統，避免人體受到活性氧之氧化傷害。而最常見之防禦系統如下：

##### 1.SOD和CAT抗氧化酵素系統

SOD酵素可以將超氧陰離子( $O_2^{\cdot-}$ )轉為毒性較小之 $H_2O_2$ ，CAT有可以將 $H_2O_2$ 轉變為完全無毒性之氧和水。

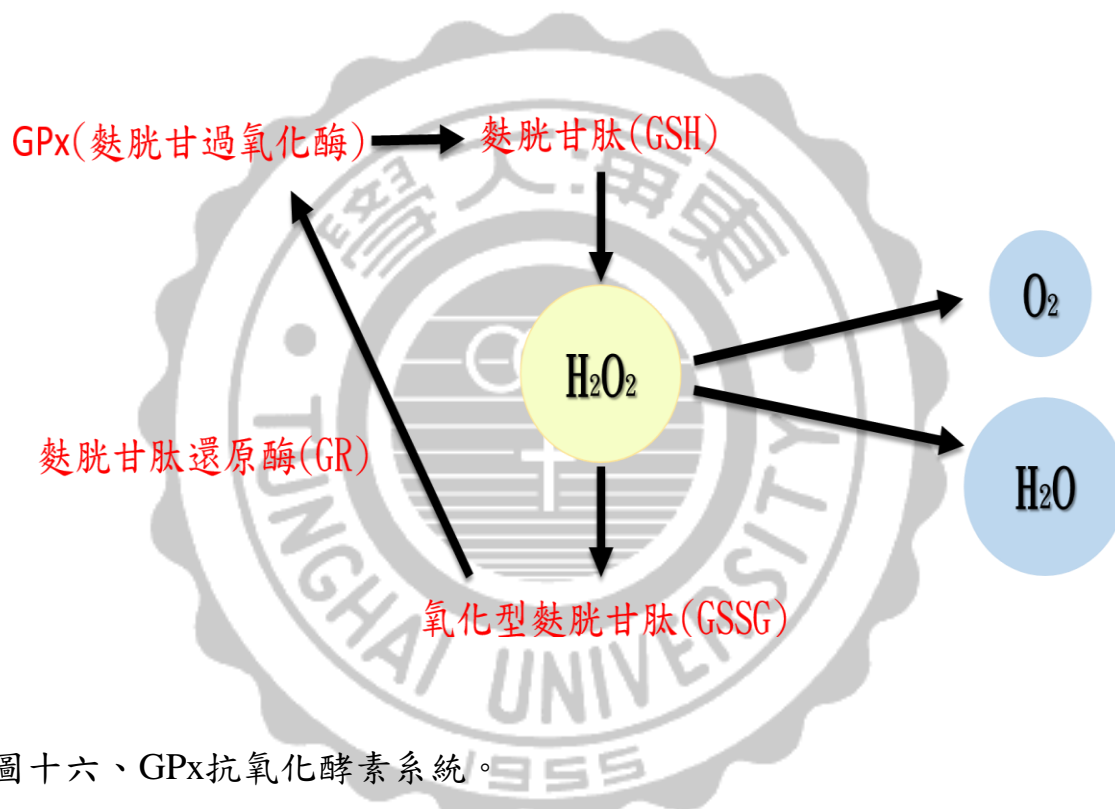


圖十五、SOD和CAT抗氧化酵素系統。

Fig 15. Antioxidant systems of SOD and CAT enzyme.  
(Djordjevic et al., 2004)

### 3. GPx抗氧化酵素系統

麩胱甘肽(GSH)被麩胱甘過氧化酶(GPx)活化後，麩胱甘肽(GSH)會將 $H_2O_2$ 轉變為沒有毒性之氧和水，而麩胱甘肽(GSH)此時會氧化成氧化型麩胱甘肽(GSSG)，而在麩胱甘肽還原酶(GR)催化下，又會還原成麩胱甘過氧化酶(GPx)，因而可循環利用。



圖十六、GPx抗氧化酵素系統。

Fig 16. Antioxidant systems of GPx enzyme.  
(Sarma & Mugesh, 2005)

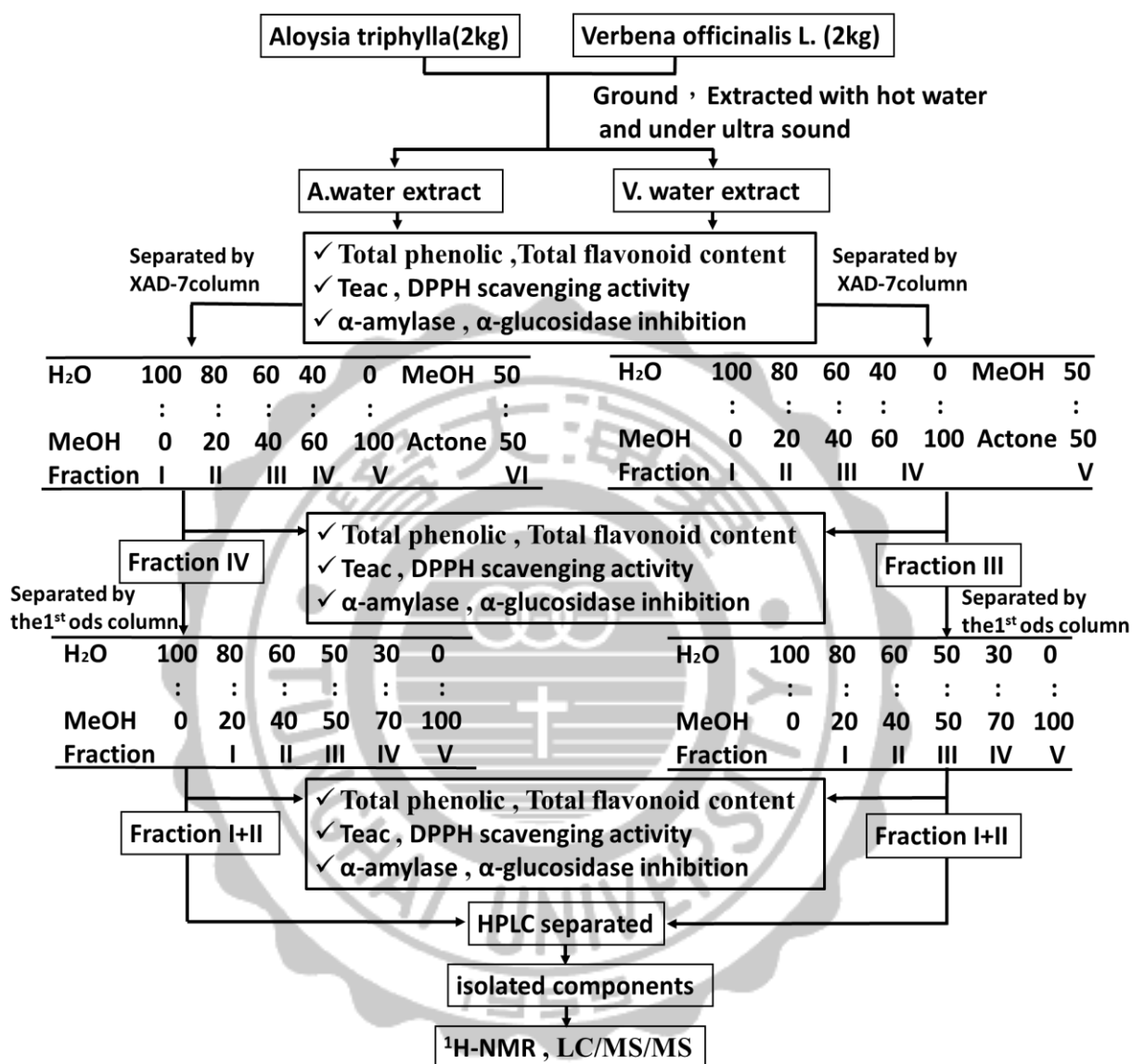
## 參、研究目的與實驗流程

### 一、研究目的

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是國人位居十大死因之一，每年近萬人因糖尿病死亡，且有年輕化的趨勢。糖尿病患者除了會因高血糖而增加蛋白質醣化作用(glycation)形成醣化蛋白誘發自由基產生外，另一方面的葡萄糖也會因自氧化產生自由基(Jagdale et al., 2016)，過多自由基會導致細胞損傷，並造成膽固醇在血管壁的沉積，引起心腦血管病、動脈粥樣硬化等，這也是糖尿病最常見併發的死亡原因(Diano & Horvath, 2010)。因此如何維持血糖恆定是預防糖尿病及併發症的重要因素。調節血糖可從飲食、運動及藥物等方面著手，而其中藥物存在著許多副作用的問題，可能造成動物肝、腎損傷及致癌性，因此抗氧化及調節血糖等保健食品在近幾年來的研發是相當重要。

本研究使用的樣品為非藥食兩用之鐵馬鞭草及藥食兩用之檸檬馬鞭草水萃物，並將兩者所分離純化之物質互相比較其抗氧化性(總酚、總類黃酮含量、總抗氧化能力、DPPH自由基清除等)及評估其對血糖調控之能力( $\alpha$ -amylase和 $\alpha$ -glucosidase酵素抑制活性)，並期望藥食兩用之檸檬馬鞭草會比藥用之鐵馬鞭草更有潛力開發成改善糖尿病及抗氧化之保健食品。

## 二、實驗架構



圖十七、檸檬馬鞭草及鐵馬鞭草活性成分之分離純化圖。

Fig 17. Separation and identification of antioxidative and glycosidase inhibitory components from *Aloysia triphylla* and *Verbena officinalis* L. water extracts.

## 肆、材料與方法

### 一、實驗材料

#### (一) 樣品來源

本實驗使用之鐵馬鞭草(*Aloysia triphylla*)以及檸檬馬鞭草(*Verbena officinalis* L.)分別購自南投市六一堂蔘藥行以及雲林縣北港鎮養元中藥房，樣品利用磨粉機磨碎後，而得到乾燥粉末各2公斤。

#### (二) 實驗試藥與溶劑

##### 1. 調節血糖相關酵素試驗之試藥

品名	廠商
Potassium phosphate, monobasic ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	J.T.Baker (USA)
Disodium hydrogenphosphate, anhydrous ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	J.T.Baker (USA)
Sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	Sigma-Aldrich (USA)
<i>p</i> -Nitrophenyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside ( <i>p</i> NPG)	Sigma-Aldrich(USA)
$\alpha$ -glucosidase from bakers yeast	Sigma-Aldrich (USA)
Sodium chloride (NaCl)	Sigma-Aldrich (USA)
Starch	島久藥品株式會社
Sodium hydroxide (NaOH)	片山化學工業株式會社

Potassium sodium tartrate (KNaC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> · 4H <sub>2</sub> O)	島久藥品株式會社
3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS)	Sigma-Aldrich (USA)
$\alpha$ -amylase from <i>Aspergillus oryzae</i>	Sigma-Aldrich (USA)
Bovine serum albumin (BSA)	Gibco (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 <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	聯工化學試藥
Quercetin	Sigma-Aldrich (USA)
Aluminium nitrate (Al(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O)	Merck(Germany)
Potassium acetate (CH <sub>3</sub> COOK)	Riedel-de Haën
Butyl hydroxyl anisole (BHA)	Sigma-Aldrich (USA)
2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH)	島久藥品株式會社
$\alpha$ -tocopherol	Sigma-Aldrich(USA)
6-Hydroxy-2,5,7,8-teramethyl-2-2carboxylic acid (trolox)	Sigma-Aldrich (USA)

2,2-Anzino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS)	Sigma-Aldrich (USA)
Peroxidase from horseradish (146 units/mg solid)	Sigma-Aldrich(USA)
Hydrogen peroxide (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Riedel-de Haën (Seelze, Germany)

---

### 3.純化成分層析及光譜分析之溶劑

---

品名	廠商
Methanol (工業級)	景明化工
Methanol (HPLC)	景明化工
Ethanol	景明化工
Trifluoroacetic acid(分析級)	Sigma-Aldrich ( USA )

---

### (三)實驗儀器設備

#### 1.充填式膠體液相層析管柱

---

品名	廠商
XAD-7 樹脂(20-60 mesh)	Sigma-Aldrich (St. Louis,MO,USA)
ODS層析充填劑Cosmosil 75 C <sub>18</sub> -OPN	Nacalia Tesque Inc(Kyoto,Japan)

---

## 2. 光二極矩高效液相層析儀(HPLC)

品名	廠商
液相層析儀(L-7100)	Hitachi (Japan)
光二極體陣列層析器(L-7450A)	Hitachi (Japan)
層析控制與資料處理器(D-7000)	systemHitachi (Japan)
Hitachi HPLC-2000	

## 3. 高效液象層析管柱

品名	廠商
Develosil ODS-5 (250×4.6 mm)分析型	Nomura Chemicals (Japan)
Develosil ODS-5 (250×20 mm)制備型	Nomura Chemicals (Japan)

## 4. 其他儀器設備

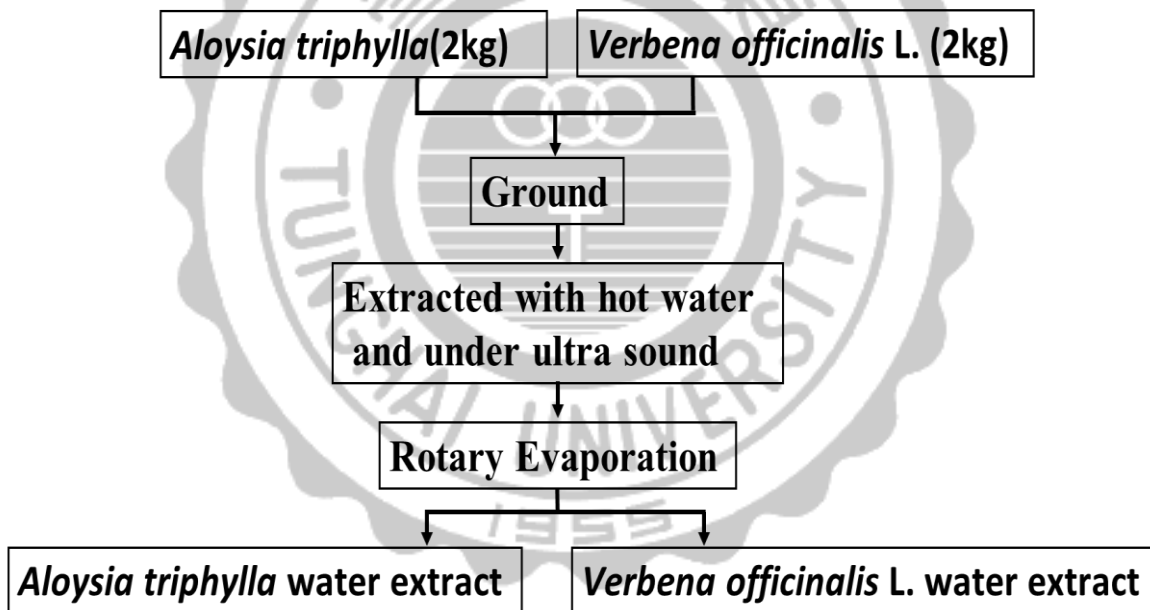
品名	廠商
旋轉式減壓濃縮機(EyelaN-1)	Rikkakikai (Tokyo, Japan)
循環式恆溫烘箱	華興化學原料公司
紫外-可見光吸光光譜儀 (50Conc)	Varian
免疫酵素分析儀 (Multiskan Go)	Thermo



## 二、實驗方法

### (一) 萃取樣品

分別將檸檬馬鞭草(*Aloysia triphylla*)以及鐵馬鞭草(*Verbena officinalis* L.)各2000g利用磨粉機磨成粉末，並以煮沸之熱水(20ml/200mg)進行萃取，重複3次每次1小時，再以超音波萃取30分鐘，接著抽氣過濾、減壓濃縮到適量體積，並以凍乾機凍乾保存。兩者製備流程如下：



圖十八、檸檬馬鞭草及鐵馬鞭草熱水萃取及製備流程。

Fig 18. preparation of hot water extracts from *Aloysia triphylla* and *Verbena officinalis* L..

## (二)總酚含量測定 (Total phenolic compounds)

原理：Folin-Ciocalteu's phenol reagent 與酚類化合物之OH 基反應，產生顏色變化，由黃色轉為藍色，在波長735nm下具有最大吸光值，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，取50 $\mu$ L樣品及不同濃度之沒食子酸(gallic acid) 標準品，加入1mL H<sub>2</sub>O及 500 $\mu$ L Folin-Ciocalteu's phenol reagent，搖晃均勻並加入2.5mL 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>，混和均勻後於室溫下避光靜置 20 分鐘，以分光光度計檢測波長 735nm 下之吸光值。另外再以不添加 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 之試驗當作空白對照組。製作標準曲線(附錄一)，以換算相對之 gallic acid 當量，以 mg gallic acid equivalent/g 鐵馬鞭草或檸檬馬鞭草區分物表示。

## (三) 總類黃酮含量測定 (Total Flavonoid content)

原理：在鹼性條件下類黃酮化合物可與硝酸鋁形成穩定的黃色錯合物，在波長415nm下具有最大吸光值，當吸光值越高，代表所含總類黃酮化合物含量越多。

參照唐(1996)和鍾(2003)等之方法，將250 $\mu$ L 樣品及不同濃度之槲皮素(quercetin) 標準品，加入10%硝酸鋁及1M 醋酸鉀各50 $\mu$ L，

再加入1.4mL 去離子水，混合均勻，於室溫下反應40 分鐘，以分光光度計檢測波長415nm 下之吸光值。另外再以不添加硝酸鋁之試驗當作空白對照組。製作標準曲線(附錄二)，以換算相對之quercetin 當量，以mg quercetin equivalent/g 鐵馬鞭草及檸檬馬鞭草區分物表示。

#### (四) DPPH 自由基清除能力測定

參照Shimada et al.(1992)的方法測定，DPPH 自由基清除能力常用來評估抗氧化物其提供質子的能力。帶有自由基的DPPH甲醇溶液本身為一深紫色化合物，此化合物在517nm 下有最大吸光值，當加入具抗氧化作用之物質時，抗氧化物質會提供質子給DPPH·

(2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical)，使其形成一個非自由基的DPPH(圖二十)，而未成對的DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)的顏色較淺，吸光值也較低，計算相對於控制組之吸光值其下降之百分比，可以判斷樣品清除DPPH 自由基之能力強弱。吸光值下降百分比越多，代表清除DPPH 自由基之能力越佳，反之則清除DPPH 自由基之能力較弱。



加入250 $\mu$ L 樣品(mg/mL)，混合均勻，於室溫下反應10分鐘，以分光光度計檢測波長 734nm 下之吸光值。計算相對於控制組之吸光值其下降之百分比，可以判斷樣品抗氧化之能力強弱。吸光值下降百分比越多，代表抗氧化之能力越佳。

#### (六) $\alpha$ -amylase 抑制作用測定

參考Ali (2006)及巫(2009)等人之方法並加修飾，利用 DNS 具氧化力之特性，將具有游離醛或酮基之碳水化合物在鹼性溶液下有還原的能力而進行反應(圖二十一)，將欲檢測之樣品濃度配製成 0.1mg/mL，取 40 $\mu$ L 加入 160 $\mu$ L 去離子水於 1.5mL 離心管當中，隨後加入 $\alpha$ -amylase 受質 0.5%(w/v)之澱粉溶液 400 $\mu$ L，再加入 200 $\mu$ L (4U/mL)酵素液，於 25 $^{\circ}$ C 下反應 3 分鐘後，自此混合物中取出 200 $\mu$ L 加入新的 1.5mL 離心管中，加入溶於 5.31M 酒石酸鉀鈉溶液的二硝基水楊酸呈色溶液(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS) 100 $\mu$ L，在水浴 85 $^{\circ}$ C 下加熱 15 分鐘後，再加入900 $\mu$ L 去離子水測其在 540nm 下的吸光值。

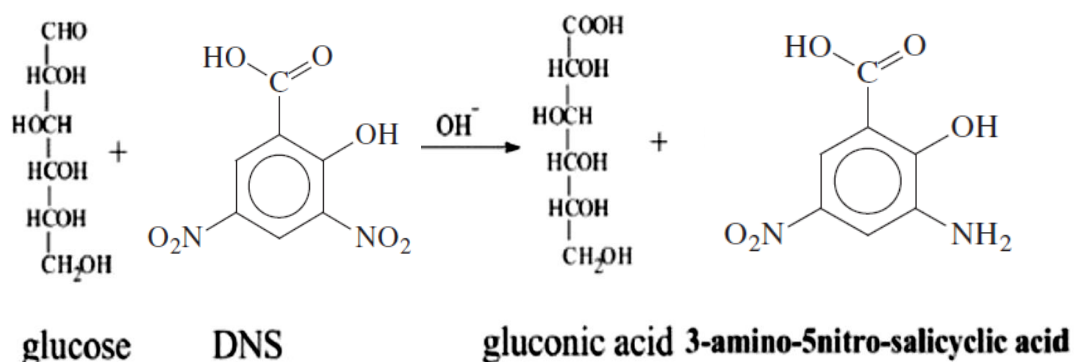
抑制率之計算方式如下：

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

A. 實驗組: 酵素+基質+萃取物

B. 控制組: 酵素+基質+甲醇

C. 背景組: Buffer+基質+萃取物



圖二十、葡萄糖之呈色反應。

Fig 20. The coloration reaction of glucose.

### (七) $\alpha$ -glucosidase 抑制作用測定

參考 Shim(2003)及林(2008) 等人之方法並稍加修飾，將欲檢測之樣品濃度配製成(0.1mg/mL)，取 100 $\mu$ L 待測樣品與 20 $\mu$ L 之  $\alpha$ -glucosidase 酵素液(1U/mL)於 1.5 mL 離心管當中，隨之加入 380 $\mu$ L 0.53mM 的受質 4-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (p-NPG)溶液，於 37 $^{\circ}$ C下反應 20 分鐘後，加入 500 $\mu$ L (0.1M) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 充分混合，使酵素失活終止其反應，以分光光度計測其在 400nm 下的吸光值。而控制組則以 0.1 M 的磷酸緩衝液(pH 6.8)取代萃取液，背景組是指只有萃取物的吸光值，僅需加入萃取物，而酵素與 p-NPG

皆以磷酸緩衝液代替。

抑制率之計算方式如下：

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

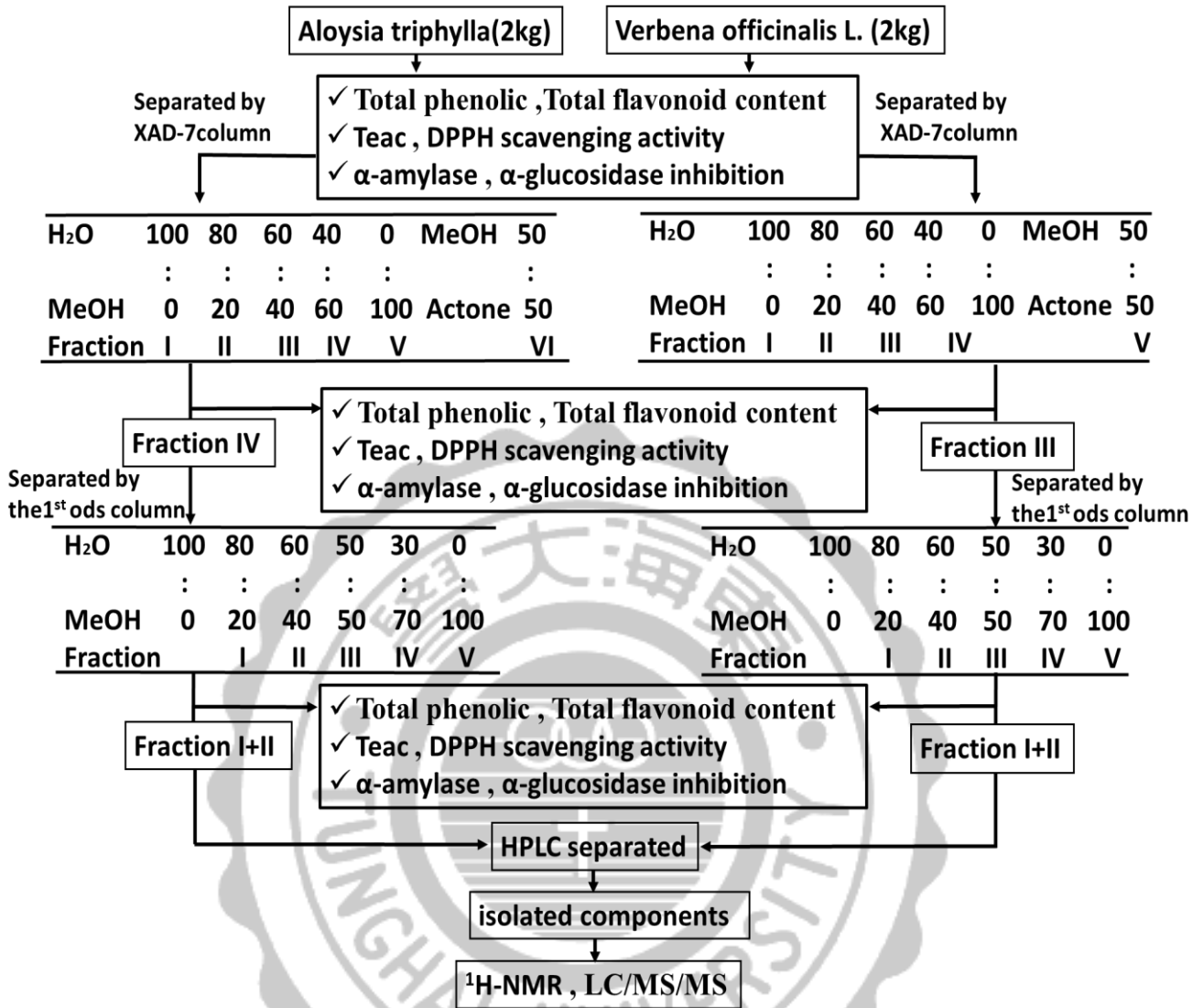
A. 實驗組: 酵素+基質+萃取物

B. 控制組: 酵素+基質+甲醇

C. 背景組: Buffer+基質+萃取物

#### (八) 檸檬馬鞭、鐵馬鞭草草抗氧化及醣解酵素抑制成分之萃取、分離與純化

檸檬馬鞭草、鐵馬鞭草之水萃取物，利用醣解酵素抑制作用之結果顯示，第一次的XAD-7管柱層析檸檬馬鞭草第四區分物及鐵馬鞭草第三區分物其抗氧化活性（總酚含量、總類黃酮含量、總抗氧化能力、DPPH自由基清除能力）較佳，且也表現出良好的抑制醣解酵素活性（ $\alpha$ -amylase、 $\alpha$ -glucosidase），而在第二次ODS管柱層析檸檬馬鞭及鐵馬鞭草草的第一和第二區分物其抗氧化活性及抑制醣解酵素活性表現較佳，並利用兩者之第一和第二區分混和物重複利用高效液相層析儀進行各活性成分之分析及製備。檸檬馬鞭草、鐵馬鞭草區分物之抗氧化及醣解酵素抑制成分之分離與純化流程如圖二十二所示。



圖二十一、檸檬馬鞭草、鐵馬鞭草水萃物之抗氧化及醣解酵素抑制成分之分離與純化流程。

Fig 21. The isolation of antioxidant and glycosidase inhibitory components from water extract of *Aloysia triphylla* and *Verbena officinalis* L.



## 1. 檸檬馬鞭草、鐵馬鞭草水萃物 XAD-7 液相管柱層析

使用XAD-7 充填於玻璃管柱(500× 40 mm)，再分別將具強抗氧化性及醣解酵素抑制活性之檸檬馬鞭草、鐵馬鞭草水萃物懸浮於去離子水後充填至管柱最頂層，其沖提液條件依序是水：甲醇(v/v)=100：0、80：20、60：40、0：100、丙酮：甲醇(v/v)=50：50 之混合溶劑，沖提液以每 250mL 為收集單位，並以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，偵測波長 280nm 之吸光值對收集瓶作圖進行區分，並測定各區分濃縮物之抗氧化活性及醣解酵素抑制活性。

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

使用Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 膠體充填於玻璃管柱(500×24 mm)，再將具較高醣解酵素抑制活性之檸檬馬鞭草區分物IV及鐵馬鞭草區分物III懸浮於去離子水後充填至管柱最頂層，並進行Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN液相管柱層析，其沖提劑條件依序是水：甲醇(v/v)=100：0、80：20、60：40、50：50、30：70、0：100之混合溶劑，沖提液以每 200mL 為收集單位，並以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，偵測波長 335nm 之吸光值對收集瓶作圖進行區分，而後利用總抗氧化力及醣解酵素抑制測試檢測各區分濃縮物之活性。經過活性測試後，結果顯示抗氧化抑活性以及醣解酵素抑制活性皆以檸檬馬鞭草

及鐵馬鞭草第I、II區分物效果最佳，因此選擇此兩者之I、II區分物繼續進行高效液相層析分析儀進行活性物質之分離純化。

### (九) 高效液相層析分析法(high performance liquid chromatography, HPLC)

將上述量較多且抗氧化、醣解酵素抑制活性較佳之成分區分利用高效液相層析儀進行區分，先以分析型高效液相層析找尋分離條件，再依其沖提條件套用於製備型高效液相層析，重複收集分離，檸檬馬鞭草區分出 1-1~1-5、2-1~2-4，共9個區分物，再以相同沖提條件利用高效液相層析重複收集分離出12個活性成分，而鐵馬鞭草區分出 1-1~1-5、2-1~2-3 共8個區分物再以相同沖提條件利用高效液相層析重複收集分離出9個活性成分，將兩者將經高效液相層析分離、純化之21種活性成分濃縮定量後，進行結構鑑定。

高效液相層析條件敘述如下：

#### 1. 分析型高效液相層析

管 柱：Develosil ODS-HG-5

(250×4.6 mm，日本Nomura 公司)

沖提液：H<sub>2</sub>O：MeOH：三氟醋酸 (v/v/v) = 49.9：50：0.1

流 速：0.8 mL/min

偵測器：335 nm(檸檬馬鞭草)、280 nm(鐵馬鞭草)

## 2. 製備型高效液相層析

管柱：Develosil ODS-HG-5

(250×20 mm，日本Nomura 公司)

沖提液：H<sub>2</sub>O：MeOH：三氟醋酸 (v/v/v) = 49.9：50：0.1

流速：0.8 mL/min

偵測器：335 nm(檸檬馬鞭草)、280 nm(鐵馬鞭草)

(十) 液相層析串聯質譜法(Liquid chromatography tandem-mass spectrometry, LC-MS/MS)

(1) HPLC使用Hitachi HPLC-2000 system，逆相層析管柱為YMC-Pack ODS-AM(100×2.0 mmID.，S-3- $\mu$ m 12nm；Kyoto，Japan)，UV-Vis diode array detector(DAD) 波長掃描範圍設定在200-550 nm，定量波長為265、285、365、520 nm，移動相流速為0.2 mL/min，注射量為5  $\mu$ L，層析溫度為35°C，移動相為：A 溶液為含0.5 % formic acid 之水溶液，B 溶液為含0.5 % formic acid 之75 % acetonitrile。沖提梯度如下：0 min 5% B； 10 min 10% B； 12 min 12% B； 35min 16% B； 40 min 20% B； 45 min 25% B； 60 min 40% B； 65 min 55% B； 70min 60% B； 75 min 80% B； 80 min 80% B； 85 min

100%B； 90 min 5% B； 110min 5% B。每次分析前管柱先以起始梯度平衡30 min。

(2)質譜分析儀條件如下：高壓液相層析串聯式質譜系統 (HPLC-tandem MS)由LCQDeca XP Max (Thermo Fisher Scientific)-裝置有離子阱(IonTrap，IT) 連結電噴灑游離源 (electrospray ionization，ESI) 所構成。而成分鑑定是以電噴灑游離源，在正、負離子 (positive and negative ion mode) 下進行質譜分析。在噴灑過程中，使用氮氣 (nitrogen gas) 進行噴灑，條件為主要氣體 (sheath gas) 60arb、輔助氣體 (auxiliary gas) 50arb；而毛細管溫度 (capillary temperature)為 280°C。其餘條件在正離子模式下：游離源電壓 (source voltage)為 4.5 kv、毛細管電壓(capillary voltage) 為46 v、tube lens 電壓為55 v；然而在負離子模式下：游離源電壓為3.5 kv、毛細管電壓為 -42 v、tube lens 電壓為 -45v。在MS/MS 及MS<sub>n</sub>質譜分析中，則使用氦氣(helium) 於離子阱中當作碰撞氣體(collision gas)，質譜掃瞄範圍 (mass scan range) 為 m/z 100~1000。其碰撞能量 (normalized collision energy) 範圍設定為35~45% (根據不同成分)。所有收集到的數據以 Xcalibur 軟體進行定性分析。

## (十一) 純化物質之結構鑑定

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

將純化之樣品溶methanol- $\text{d}_4$  中，以VXR-300/51 型核磁共振光譜儀 ( $^1\text{H}$ -NMR 以300MHz， $^{13}\text{C}$ -NMR 以75MHz) 測定，獲得其 $^1\text{H}$ -NMR 及  $^{13}\text{C}$ -NMR 光譜。光譜解析以 $\delta$  表示化學位移 (chemical shift)，並以TMS(tetramethylsilane)充當比較基準點，s 表示單線峰 (singlet)，d 表示雙線峰(doublet)，t 表示三線峰(triplet)，q 表示四線峰(quartet)，b 表示寬線峰(broad)，m 表示多重線峰 (multiplet)；同時進行紫外-可見光譜及 MS 質譜分析，再綜合進行光譜解析及結構鑑定。

## (十二) 統計分析

實驗結果所得之數據均為三重複，以平均值  $\pm$  標準偏差

(Mean  $\pm$  SD) 表示，並採用Statistical Analysis System (SAS) 8.1

版之統計軟體進行變異數分析 (ANOVA) 與Duncan's multiple range test 分析，比較組間的顯著差異程度。

## 伍、結果與討論

### 一、檸檬馬鞭草及鐵馬鞭草水萃物之產率

將檸檬馬鞭草及鐵馬鞭草各2000g粉末以100°C去離子水作萃取(200mg→20ml)，每次1小時重複3次，並再利用超音波萃取30分鐘之後，進行抽氣過濾，減壓濃縮至適當體積，並利用抽氣真空將溶劑完全清除，回推檸檬馬鞭及鐵馬鞭草之產率，其產率如表十五：

表十五、檸檬馬鞭草及鐵馬鞭草水萃物之產率

Table 15. Yields of the water extracted from *Aloysia triphylla* and *Verbena officinalis*

Fraction	weight(g)	yeild(%)
<i>Verbena officinalis</i>	234.65	11.73
<i>Aloysia triphylla</i>	277.58	13.87

Sample wet weight: 2000g

### 二、檸檬馬鞭草及鐵馬鞭草水萃物總酚含量

由文獻得知抗氧化活性與植物之多酚類化合物有著相當大的關連 (Castelluccio *et al.*, 1995 ; Kalt *et al.*, 1999) , Folin-Ciocalteu's assay為一種廣泛應用於測量總酚類化合物的方法，Folin-Ciocalteu's phenol reagent 可與酚類化合物結構上的 OH 基作用，產生由黃變藍的呈色反應(Julkunen-Titto, 1985) 。本實驗以 gallic acid 作為標準品，換算相對 gallic acid 之當量。將檸檬馬鞭及鐵馬鞭草水萃物，

進行總酚類化合物含量分析，從實驗結果(表十六) 顯示檸檬馬鞭水草物其總酚含量顯著高於鐵馬鞭草。

### 三、檸檬馬鞭草及鐵馬鞭水草物之總類黃酮含量

類黃酮(flavonoids)屬於酚類化合物之類物質，存在於許多蔬菜、水果中，類黃酮化合物可在鹼性條件下與硝酸鋁反應形成穩定的黃色錯合物(唐等人，1996；鍾，2003)。本實驗以 quercetin 作為標準品，換算相對 quercetin 之量。將檸檬馬鞭草及鐵馬鞭水草物，進行總類黃酮類化合物含量分析，從實驗結果(表十六) 顯示檸檬馬鞭水草物其總類黃酮含量顯著高於鐵馬鞭草。

表十六、檸檬馬鞭草、鐵馬鞭草之總多酚及總類黃酮含量比較

Table 16. Comparison of total polyphenols and total flavonoids contents in *Aloysia triphylla* and *Verbena officinalis* L.

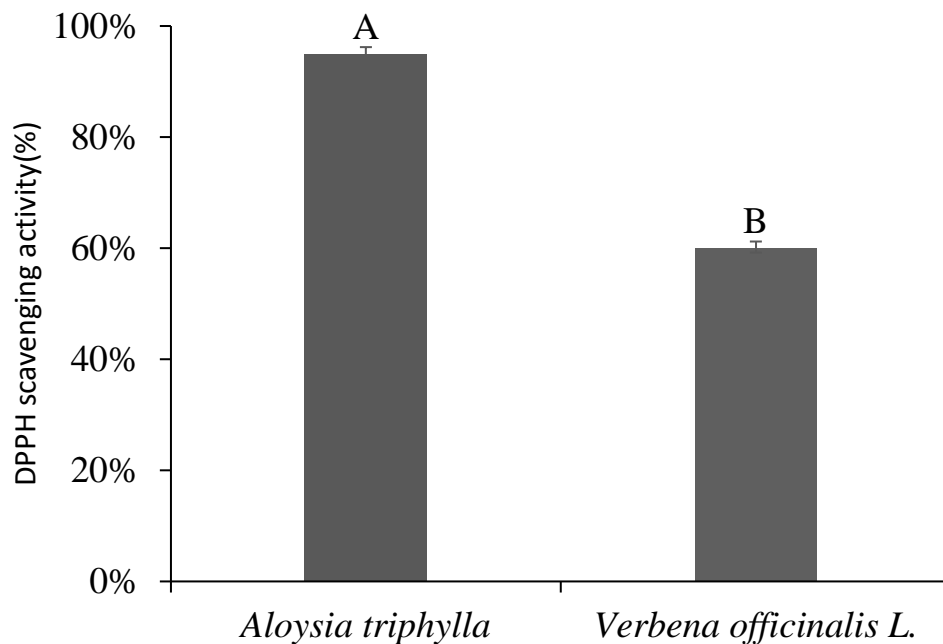
	Total phenolic content	Total flavonoid content
<i>Aloysia triphylla</i>	150.21±0.35a	21.77±0.45a
<i>Verbena officinalis</i> L.	64.5±1.07b	3.92±0.65b

\*Total phenolic content : mg gallic acid equivalent / g *Verbena officinalis* L. or *Aloysia triphylla* extract

\*Total flavonoid content : mg quercetin equivalent / g *Verbena officinalis* L. or *Aloysia triphylla* extract

#### 四、檸檬馬鞭草與鐵馬鞭草之DPPH自由基清除能力

本實驗檢測檸檬馬鞭草與鐵馬鞭草水萃物之DPPH自由基消除作用，檢測結果顯示檸檬馬鞭草水萃物之清除 DPPH 自由基抗氧化性最好，其清除率達93.27% (圖二十二)。



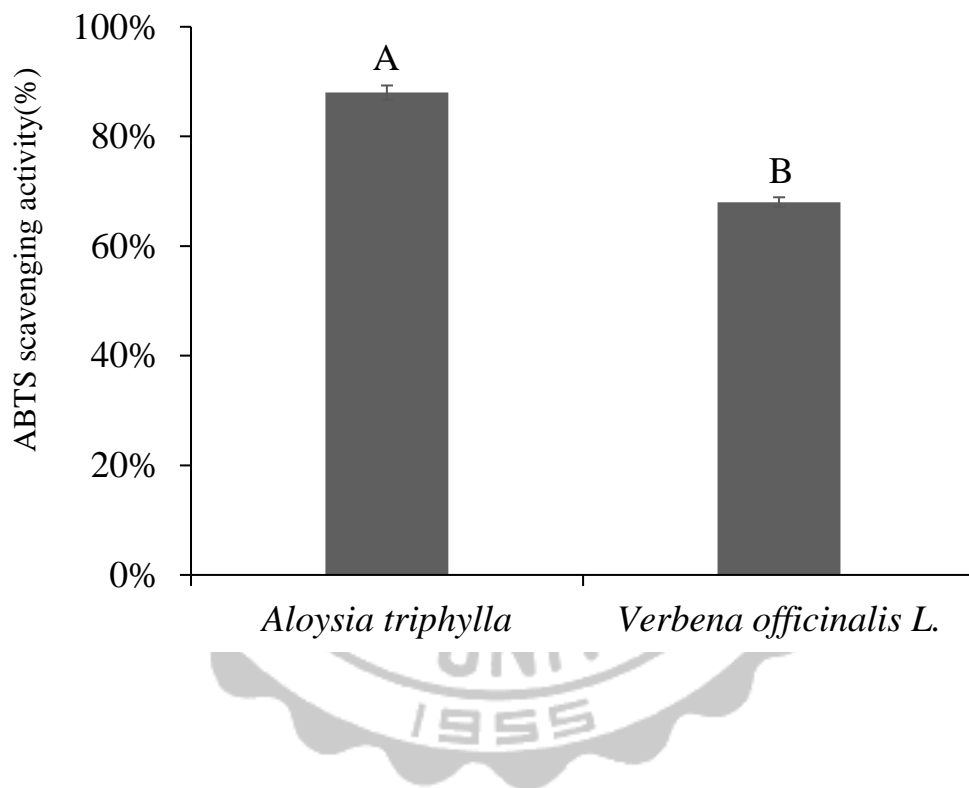
圖二十二、檸檬馬鞭草與鐵馬鞭草水萃物之 DPPH 自由基清除能力之比較。

Fig 22. Scavenging activity of radical water extract from *Aloysia triphylla* and *Verbena officinalis* on DPPH . Bars represent means $\pm$  SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.



## 五、檸檬馬鞭草與鐵馬鞭草之總抗氧化能力測定

本實驗檢檸檬馬鞭草與鐵馬鞭草水萃物之ABTS·+ 藍色自由基物質消除作用。檢測結果顯示檸檬馬鞭草水萃物消除 ABTS·+ 藍色自由基物質之抗氧化性最好，其清除率達91.22% (圖二十三)。

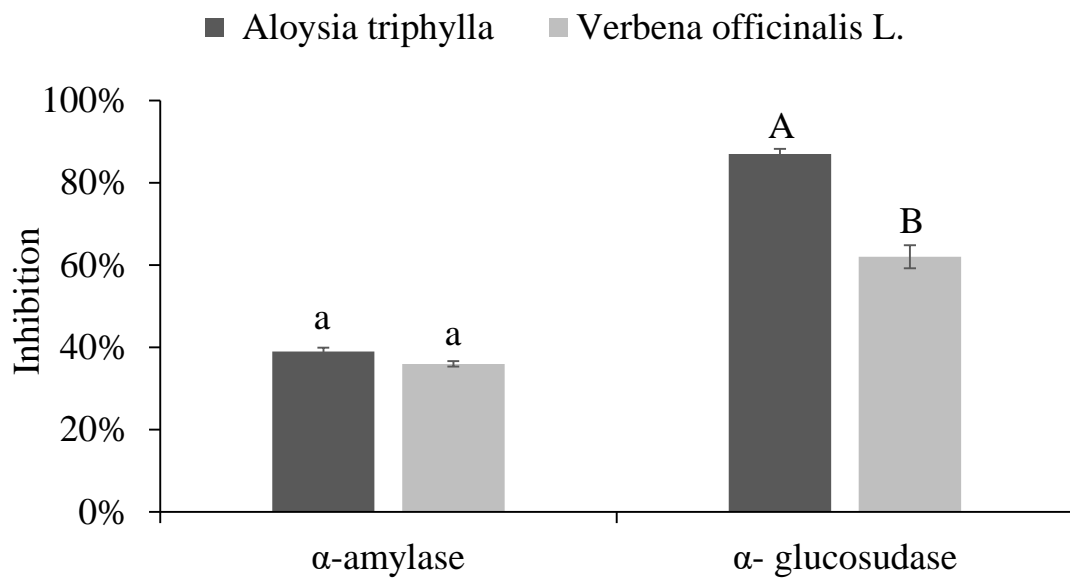


圖二十三、檸檬馬鞭草與鐵馬鞭草水萃物之 ABTS·+自由基清除能力之比較。

Fig 23. Scavenging activity of water extract level from *Aloysia triphylla* or *Verbena officinalis* on ABTS·+ radical. Bars represent means±SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

## 六、檸檬馬鞭草與鐵馬鞭草對醣解酵素之抑制活性

本實驗所使用的醣解酵素包括  $\alpha$ -amylase 及  $\alpha$ -glucosidase 二種，檸檬馬鞭草與鐵馬鞭草水萃物進行  $\alpha$ -amylase 酵素抑制分析，實驗結果(圖二十四)顯示檸檬馬鞭草與鐵馬鞭草沒有顯著差異；而  $\alpha$ -glucosidase 酵素抑制分析，實驗結果(圖二十四)則顯示檸檬馬鞭草有較高的醣解酵素抑制率，分別為 87.22% 和 62.58%。



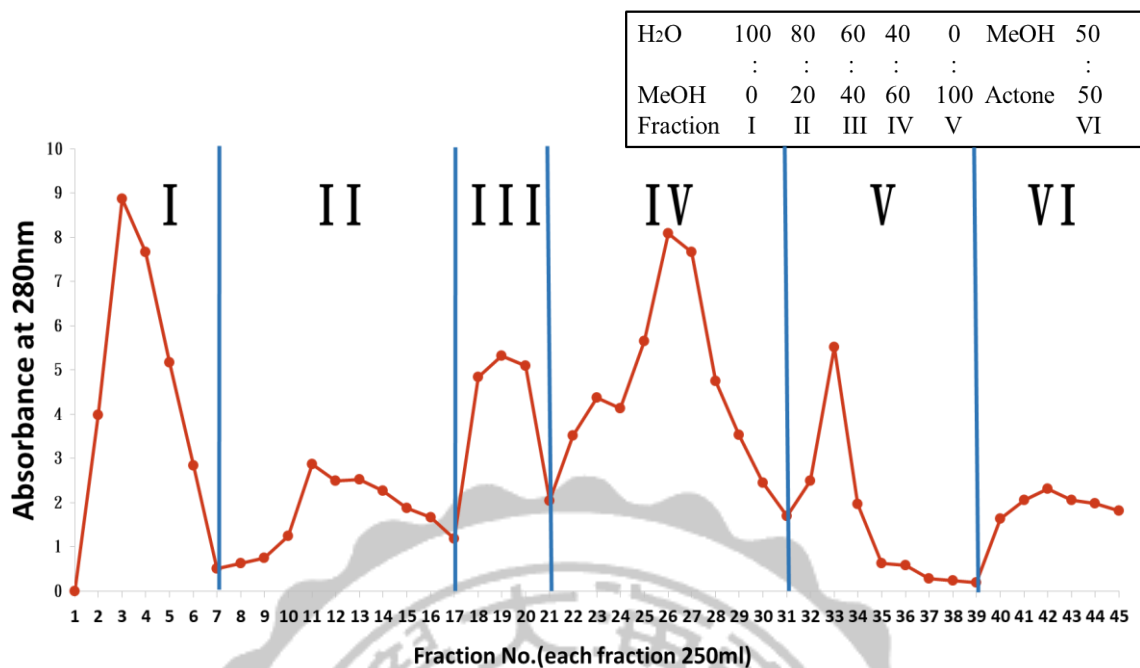
圖二十四、檸檬馬鞭草與鐵馬鞭草水萃物對  $\alpha$ -amylase 及  $\alpha$ -glucosidase 之抑制率比較。

Fig 24.  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of water extract from *Aloysia triphylla* and *Verbena officinalis*. Bars represent means  $\pm$  SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

## 七、檸檬馬鞭草抗氧化及抑制醣解酵素活性成分之分離純化

### (一) 檸檬馬鞭草之 XAD-7 液相管柱層析

檸檬馬鞭草及鐵馬鞭草預先以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，而兩者在波長 280nm 具有最大吸收值，故選取這兩個吸光值分別做為檸檬馬鞭草及鐵馬鞭草之液相管柱層析物質之偵測波長。首先將 XAD-7 充填於玻璃管柱(500×40 mm)進行液相管柱層析，其沖提條件依序是水：甲醇(v/v)=100：0、80：20、60：40、0：100、丙酮：甲醇(v/v)=50：50 之混合溶劑，沖提液以每 250mL 為收集單位，並以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，將檸檬馬鞭草在偵測波長 335nm 之吸光值對收集瓶作圖進行區分，檸檬馬鞭草共取 6 個區分(I~VI)(圖二十五)。其產率如(表十七)。將檸檬馬鞭草 6 個區分物進行總抗氧化力及 DPPH 自由基清除能力等抗氧化性檢測，並進行醣解酵素抑制作用測試，綜合抗氧化測試及醣解酵素抑制活性試驗結果，檸檬馬鞭草第IV區分物之活性較佳，故利用此兩區分物做更進一步分析。(圖二十六~二十八)



圖二十五、檸檬馬鞭草水萃物之 XAD-7 液相管柱層析圖。

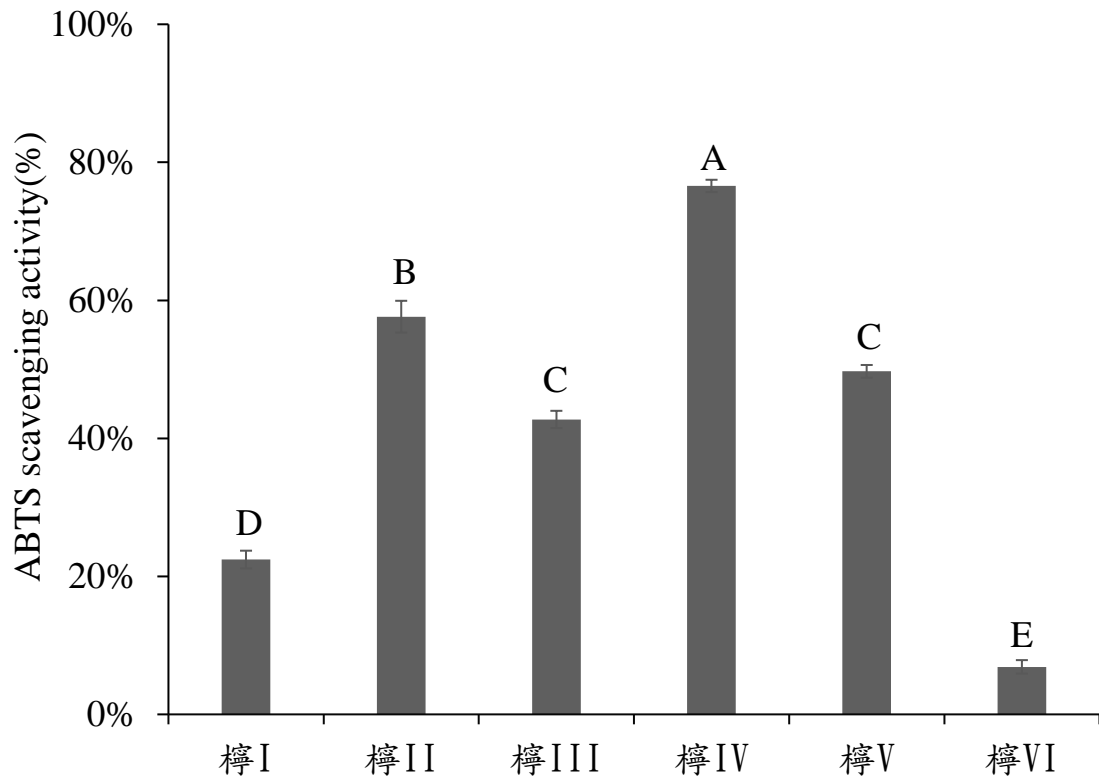
Fig 25. The XAD-7 column chromatogram of eluted fractions from water extract of *Aloysia triphylla*.

表十七、檸檬馬鞭草水萃物 XAD-7 液相層析後各沖提區分之產率

Table 17. Yields of fractions eluted from water extract of *Aloysia triphylla*

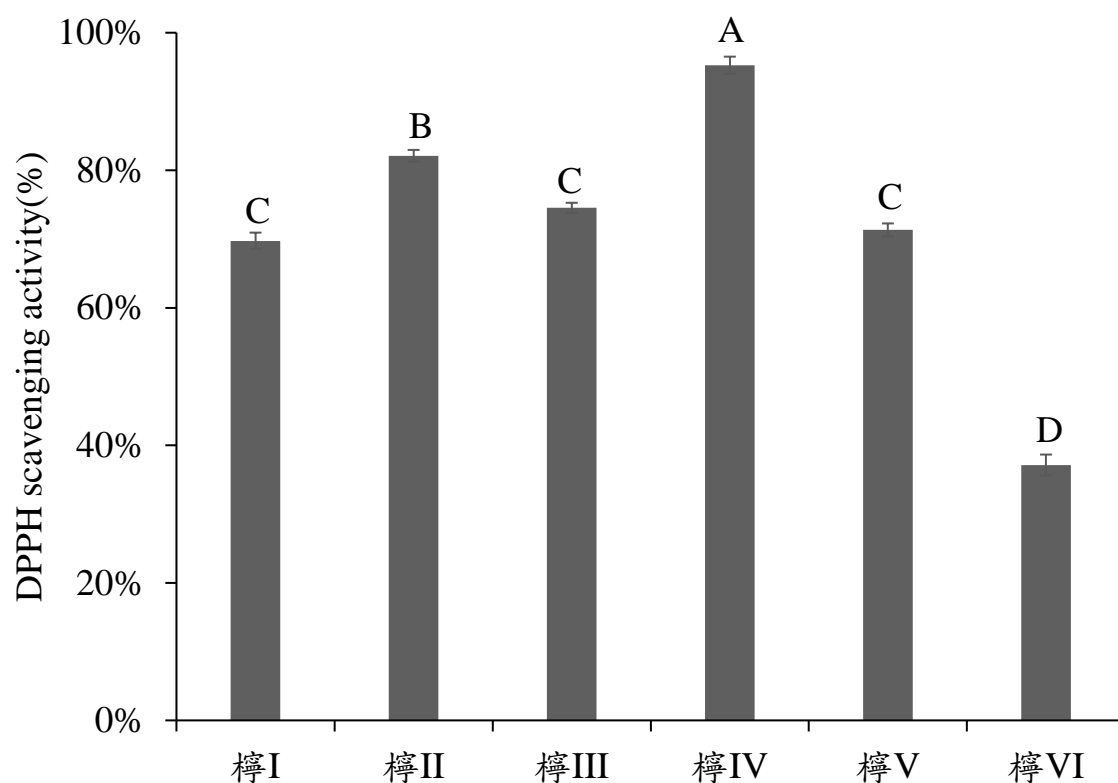
Fraction	Weight(g)	Yield(%)
I	26.73	9.63
II	9.14	3.29
III	4.84	1.74
IV	6.45	2.32
V	3.42	1.23
VI	0.69	0.24

Sample weight : 277.58 g



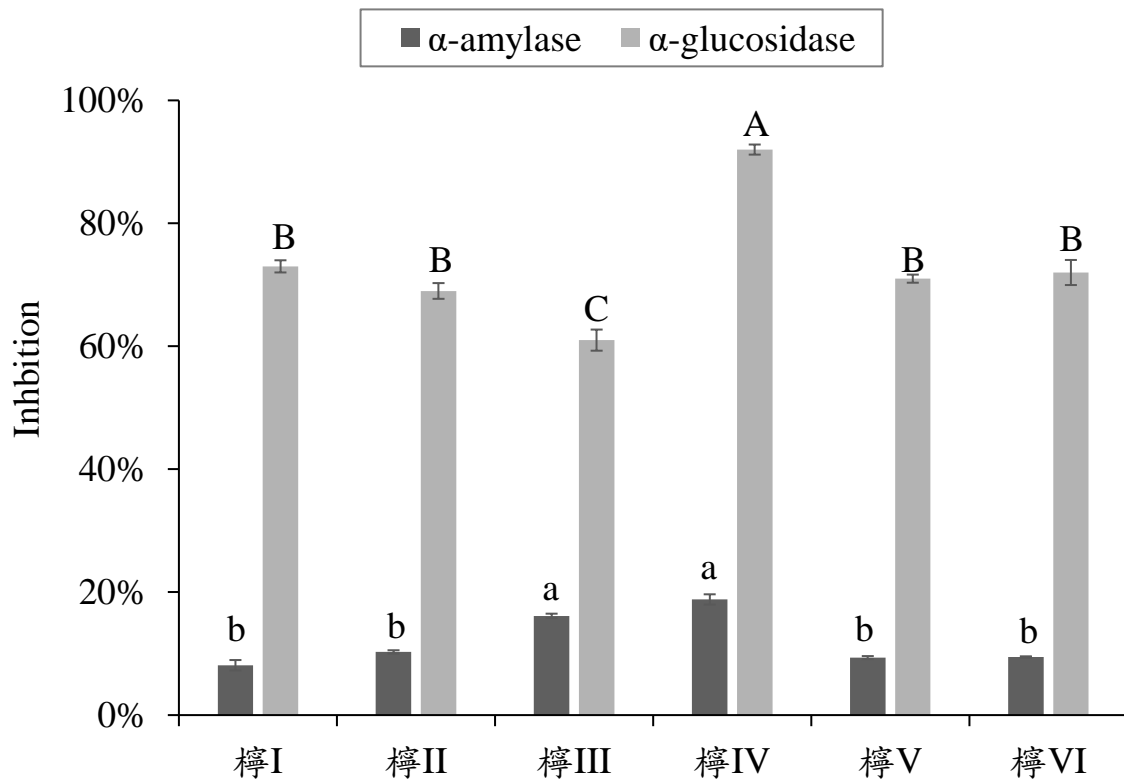
圖二十六、檸檬馬鞭草水萃物經 XAD-7 膠體液相管柱層析各沖提區分之抗氧化性。

Fig 26. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of the XAD-7 chromatography eluted fractions from water extract of *Aloysia triphylla*. by the TEAC method. Bars represent means  $\pm$  SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.



圖二十七、檸檬馬鞭草水萃物經 XAD-7 膠體液相管柱層析各沖提區分之 DPPH 自由基清除能力。

Fig 27. DPPH radical scavenging activity of eluted fractions from water extract of *Aloysia triphylla*. by XAD-7 chromatography. Bars represent means  $\pm$  SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.



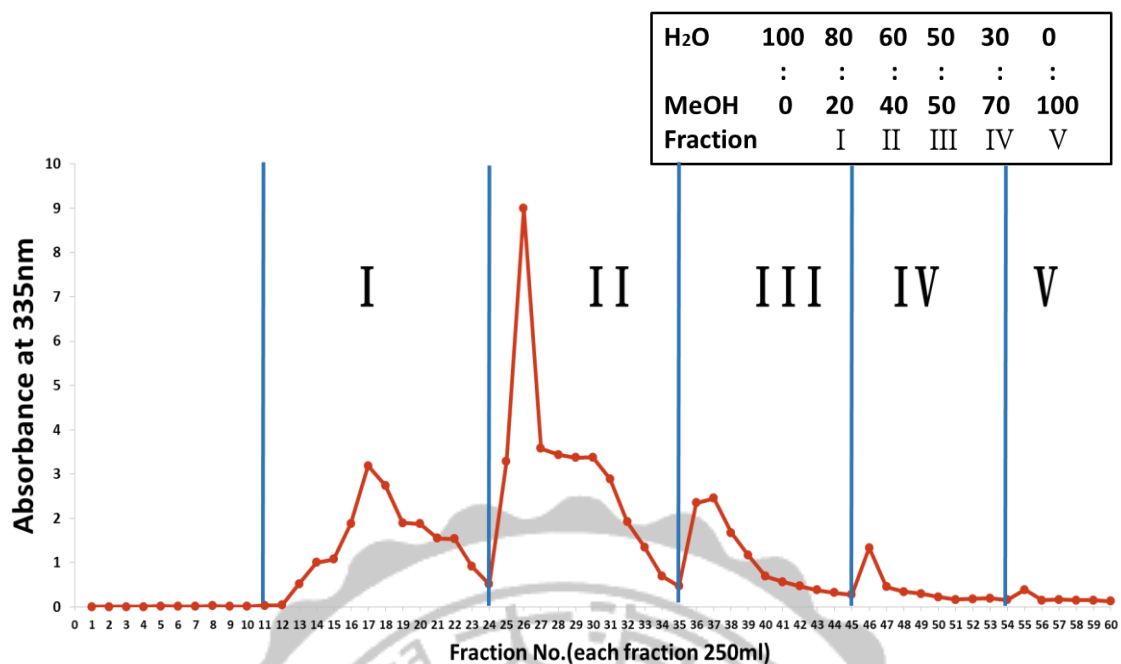
圖二十八、檸檬馬鞭草水萃物經 XAD-7 液相管柱層析各沖提區分物之  $\alpha$ -amylase 及  $\alpha$ -glucosidase 抑制活性。

Fig 28.  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of eluted fractions from water extract of *Aloysia citrodora* by XAD-7 chromatography. Bars represent means  $\pm$  SD, n=3. Means with different letters within the same enzyme are significant different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

## (二)檸檬馬鞭草區分(IV)之Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 液相管柱層析

如同上述，將檸檬馬鞭草區分(IV)沖提區分液預先以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，在波長 335nm 具有最大吸收值，故選取 335nm 為液相管柱層析物質之偵測波長。將檸檬馬鞭草區分(IV)濃縮物懸浮置入充填 Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 之膠體玻璃管柱充填於玻璃管柱(600×24.5mm) 進行第一次Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 液相管柱層析，其沖提條件依序是水：甲醇(v/v)=100：0、80：20、60：40、50：50、30：70、0：100 之混合溶劑，沖提液以每 200mL 為收集單位，並以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，偵測波長 335nm 之吸光值對收集瓶作圖進行區分，並將檸檬馬鞭草區分(IV)取 5 個子區分(圖二十九)，兩者產率如(表十八)所示。將檸檬馬鞭草區分(IV)之 5 個子區分進行總抗氧化力及醣解酵素抑制作用檢測(圖三十~三十二)，結果顯示，檸檬馬鞭草區分(IV)之子區分 I 及 II 具有較佳活性，並將 I 及 II 子區分物，更進一步利用 HPLC 分離純化出兩者之活性物質。





圖二十九、檸檬馬鞭草區分物(IV)之 Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 液相管柱層析圖。

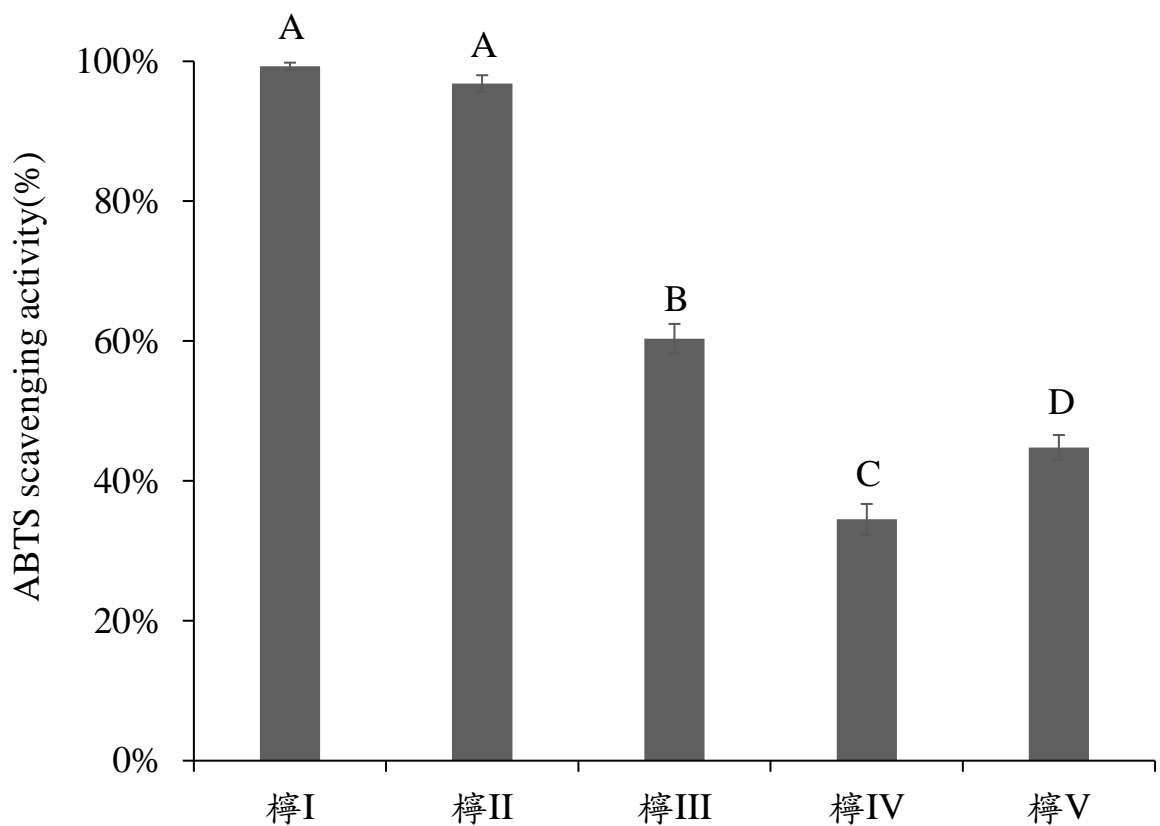
Fig 29. The Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN chromatogram of eluted sub fractions from fraction (IV) of *Aloysia citrodora*.

表十八、檸檬馬鞭草區分物(III)經 Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 液相層析後各沖提子區分之產率

Table 18 Yields of eluted sub fractions from fraction (III) of *Aloysia citrodora* by Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN chromatography

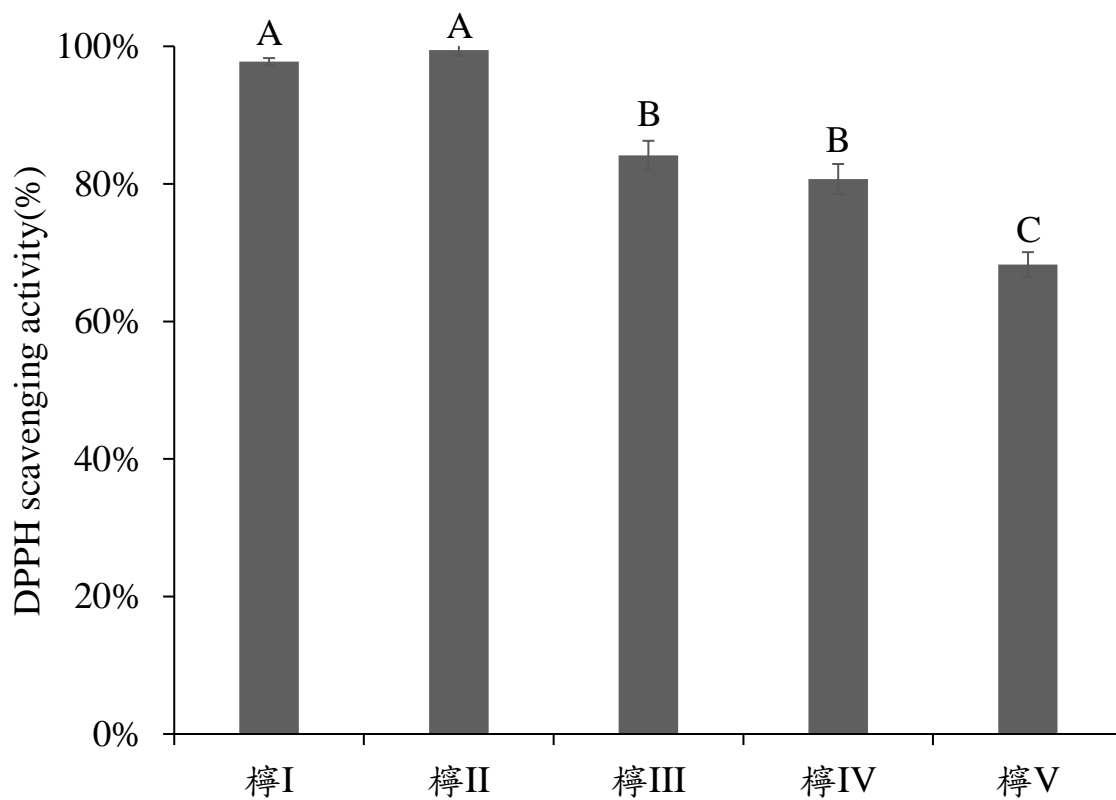
Fraction	Weight(g)	Yield(%)
I	1.57	24.43
II	2.09	32.39
III	0.50	7.77
IV	0.36	5.72
V	0.03	0.46

Sample weight : 6.45 g



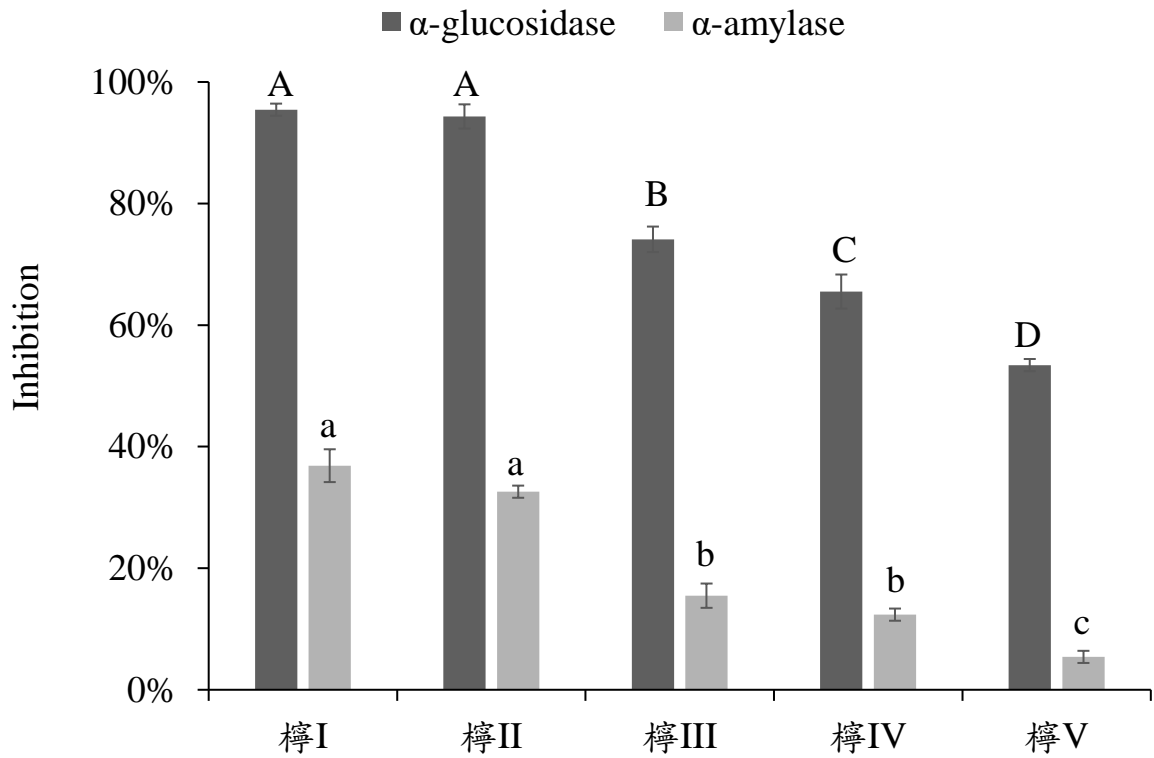
圖三十、檸檬馬鞭草區分物(IV)經 Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 液相管柱層析後各沖提子區分之總抗氧化力。

Fig 30. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of the Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN eluted subfractions from fraction (IV) of *Aloysia citrodora*. Bars represent means  $\pm$  SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.



圖三十一、檸檬馬鞭草區分物(IV)經 Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 液相管柱層析各沖提子區分之 DPPH 自由基清除能力。

Fig 31. DPPH radical scavenging activity of the Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN eluted subfractions from fraction (IV) of *Aloysia citrodora*. Bars represent means± SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.



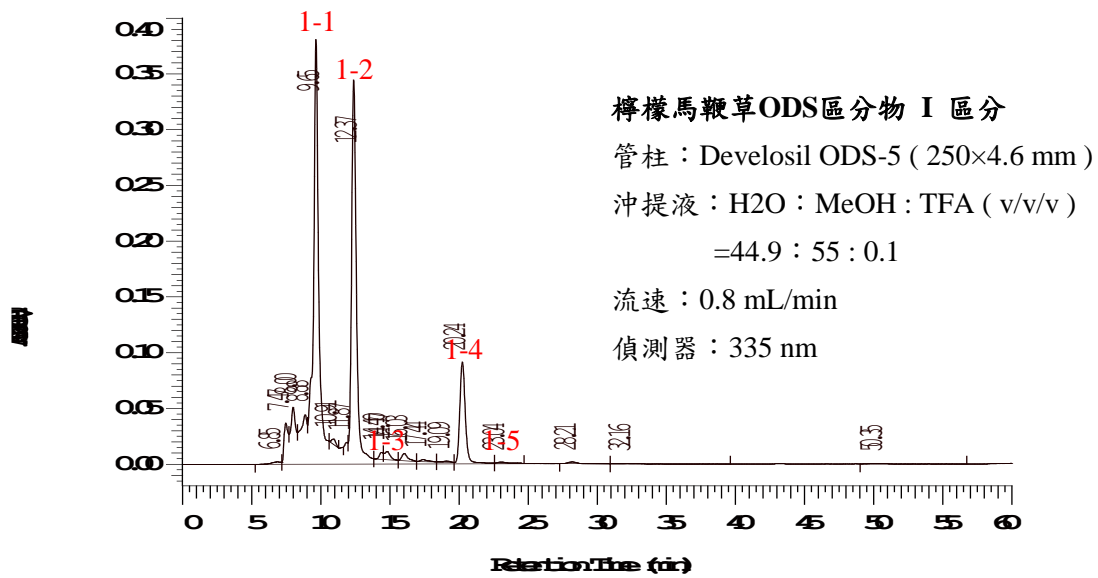
圖三十二、檸檬馬鞭草區分物(IV)經 Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 液相管柱層析後各沖提子區分之 α-amylase及α-glucosidase 抑制活性。

Fig 32. α-amylase and α-glucosidase inhibitory activities of the Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN eluted subfractions from fraction (IV) of *Aloysia citrodora*. Bars represent means± SD, n=3. Means with different letters within the same enzyme are significant different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

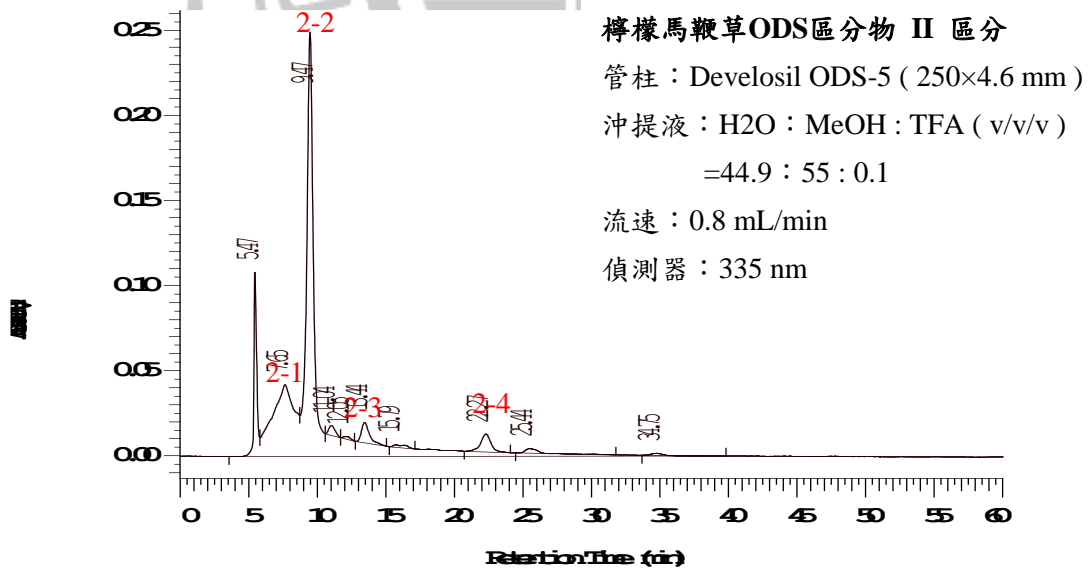
### (三) 經由 Cosmosil 75 C18-OPN 液相管柱層析之檸檬馬鞭區分物

#### I、II之 HPLC 分析及製備

將上述經過 Cosmosil 75 C18-OPN 液相管柱層析檸檬馬鞭草量較多且抗氧化、醣解酵素抑制活性佳之成分區分 I、II 沖提液，預先以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，因其在波長335nm 具有最大吸收值，故選取 335nm 為液相管柱層析物質之偵測波長。將檸檬馬鞭草 I、II 區分物，經由 0.45 $\mu$ m 之過濾膜過濾後進行 HPLC 分析，並以分析型高效液相層析儀尋找良好的分離條件為H<sub>2</sub>O：MeOH：三氟醋酸（v/v/v）=44.9：55：0.1，流速0.8 ml/min，偵測波長為 335nm，結果顯示於圖三十四~三十五，由於還是沒有將物質分離，因此檸檬馬鞭草 I 區分繼續重複收集分離成 5 個區分物，檸1-1、檸1-2、檸1-3、檸1-4、檸1-5(圖三十三)，檸檬馬鞭草II 分離出 4 個區分物，檸2-1、檸2-2、檸2-3、檸2-4(圖三十四)，並繼續進行HPLC之分離純化。



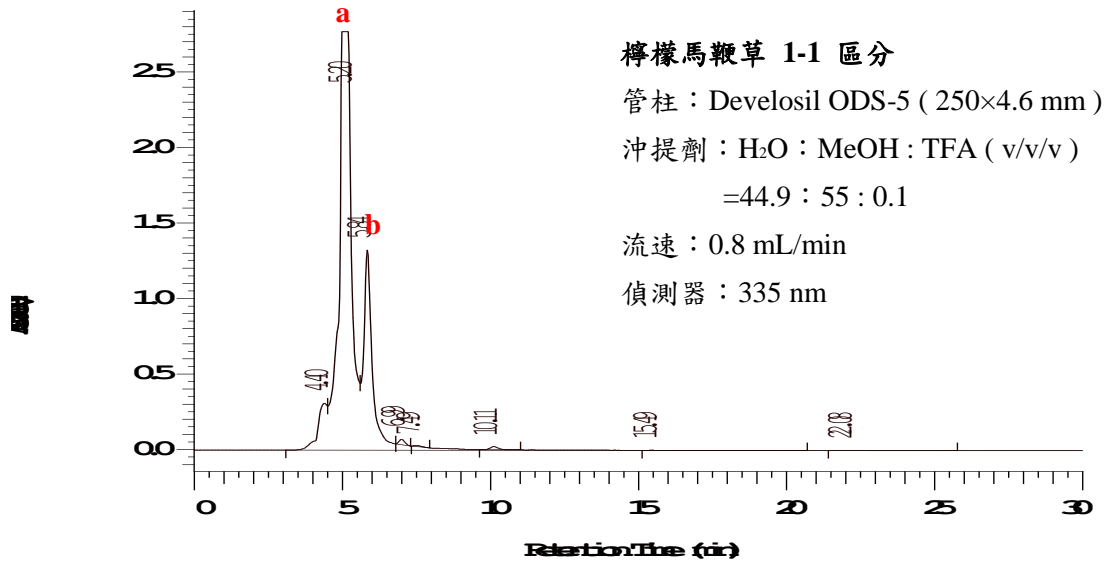
圖三十三、檸檬馬鞭草Cosmosil 75 C18-OPN子區分 I 之分析型 HPLC 圖。  
 Fig 33. Analytical HPLC chromatogram of subfraction I of water extract of *Aloysia citrodora*.



圖三十四、檸檬馬鞭草Cosmosil 75 C18-OPN子區分 II 之分析型 HPLC 圖。  
 Fig 34. Analytical HPLC chromatogram of subfraction II of water extract of *Aloysia citrodora*.

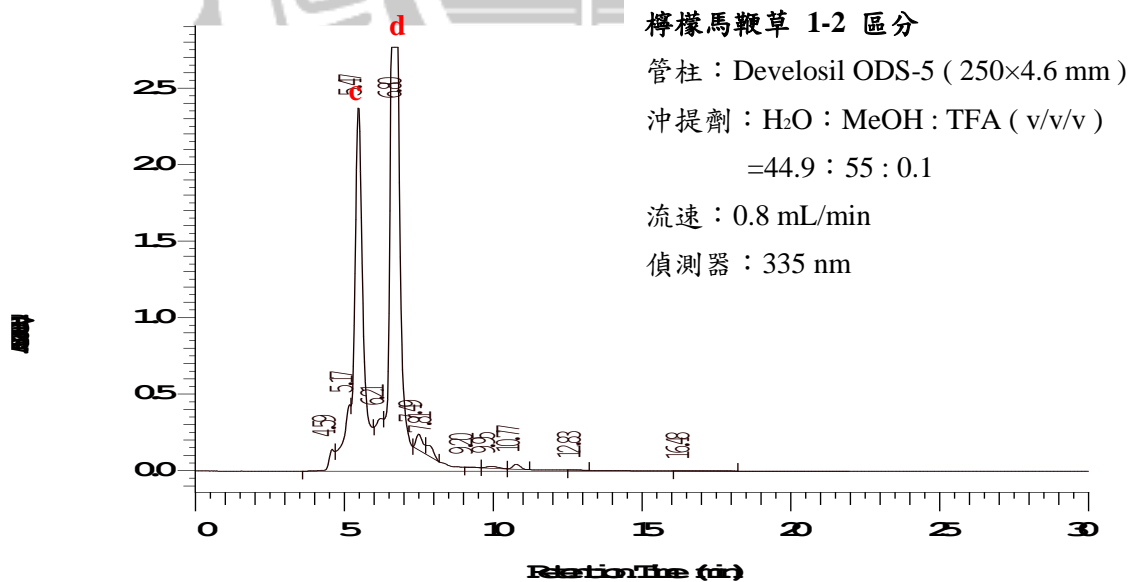
#### (四) 檸檬馬鞭草 1-1~1-5 、 2-1~2-4 區分物之 HPLC 分析及製備

將檸檬馬鞭草各分區物，預先以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，因其在波長 335nm 具有最大吸收值，故選取 335nm 為 HPLC 之偵測波長。將所有區分物經由 0.45 $\mu$ m 之過濾膜過濾後，進行分析型 HPLC 分析，沖提條件為 H<sub>2</sub>O : MeOH : 三氟醋酸 (v/v/v) = 44.9 : 55 : 0.1，流速 0.8 ml/min，偵測波長為 335 nm，結果顯示於圖三十七~圖四十五，將圖中的主要波峰，利用相同的移動相與波長條件，流速為 3.5 mL/min 之製備型高效液相層析儀進行分離，重覆收集層析圖上滯流時間相同主要波峰之沖提區分，由於還是沒有將物質分離，因此將檸檬馬鞭草 1-1~1-5 、 2-1~2-4 再區分為 14 個 a~n 區分物，結果顯示於圖三十五~圖四十三，並繼續進行 HPLC 之分離純化。



圖三十五、檸檬馬鞭草子區分物 1-1 之分析型 HPLC 圖。

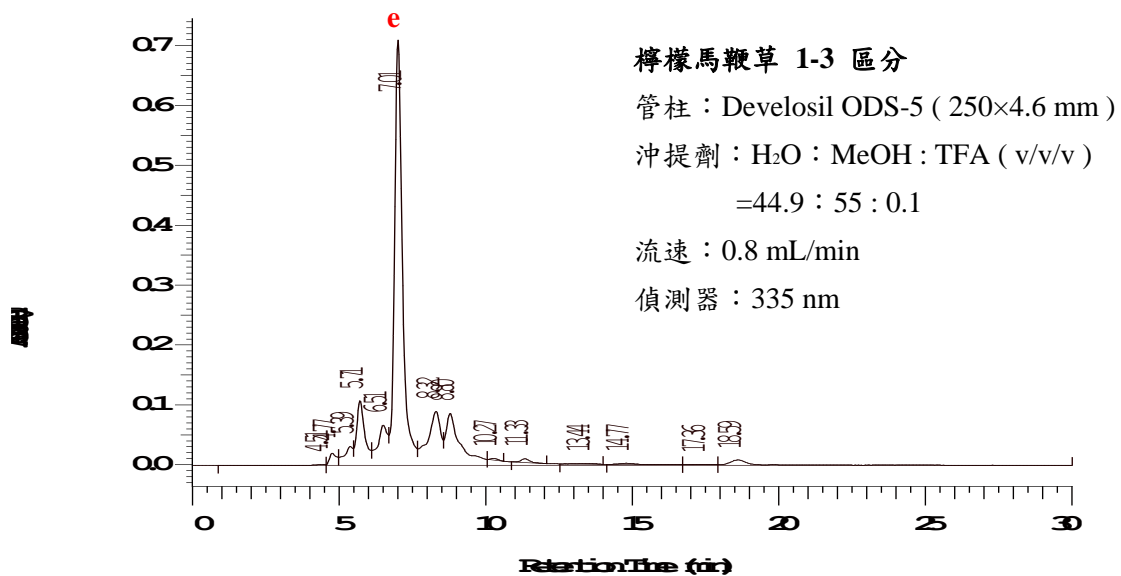
Fig 35. Analytical HPLC chromatogram of subfraction 1-1 of *Aloysia citrodora*.



圖三十六、檸檬馬鞭草子區分物 1-2 之分析型 HPLC 圖。

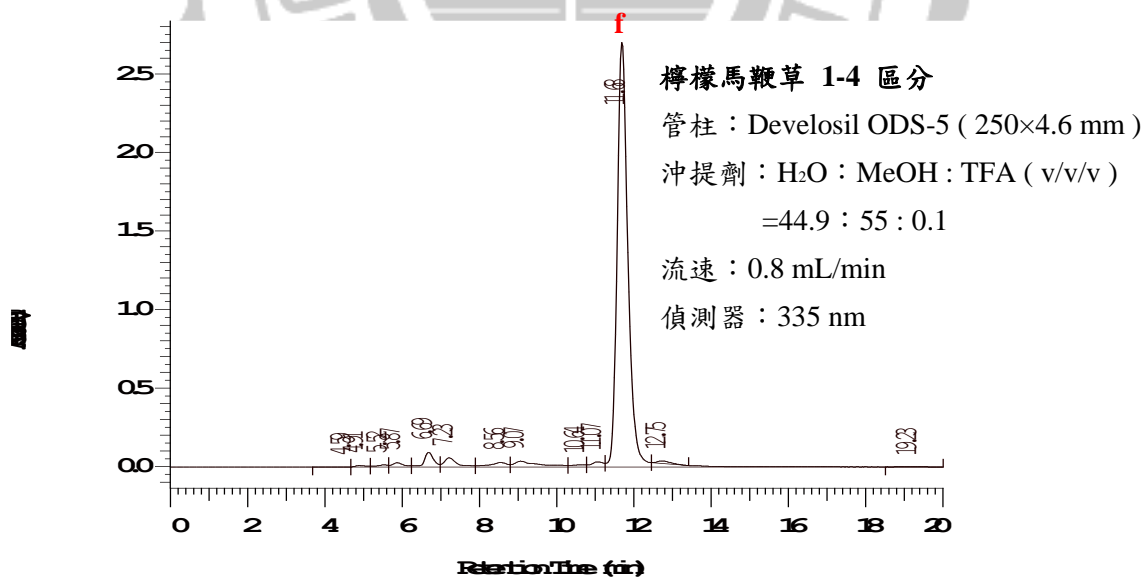
Fig 36. Analytical HPLC chromatogram of subfraction 1-2 of *Aloysia citrodora*.





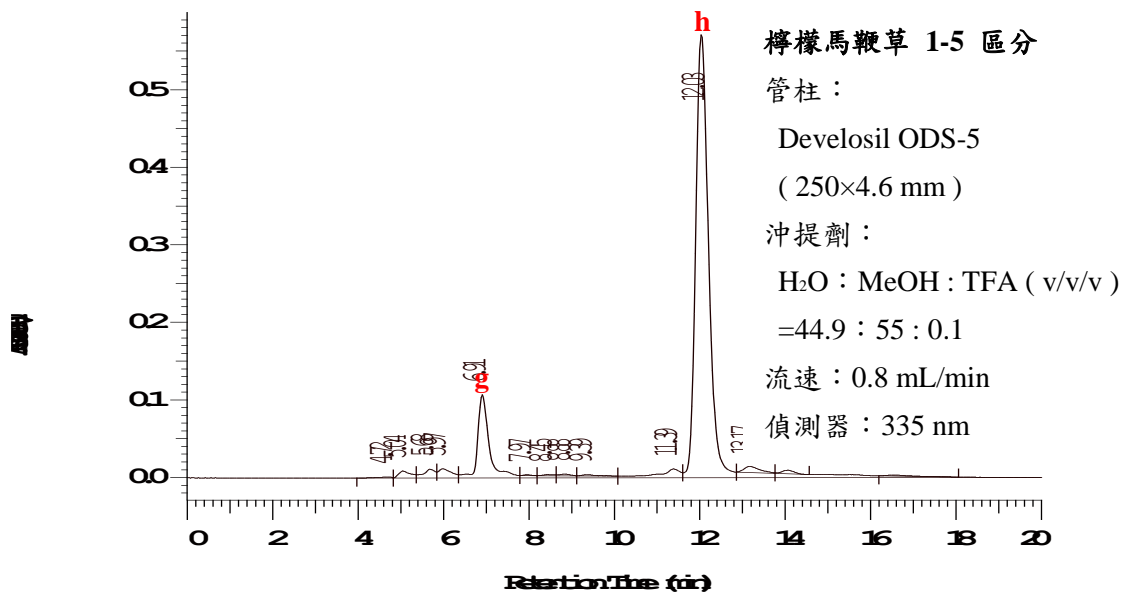
圖三十七、檸檬馬鞭草子區分物 1-3 之分析型 HPLC 圖。

Fig 37. Analytical HPLC chromatogram of subfraction 1-3 of *Aloysia citrodora*.



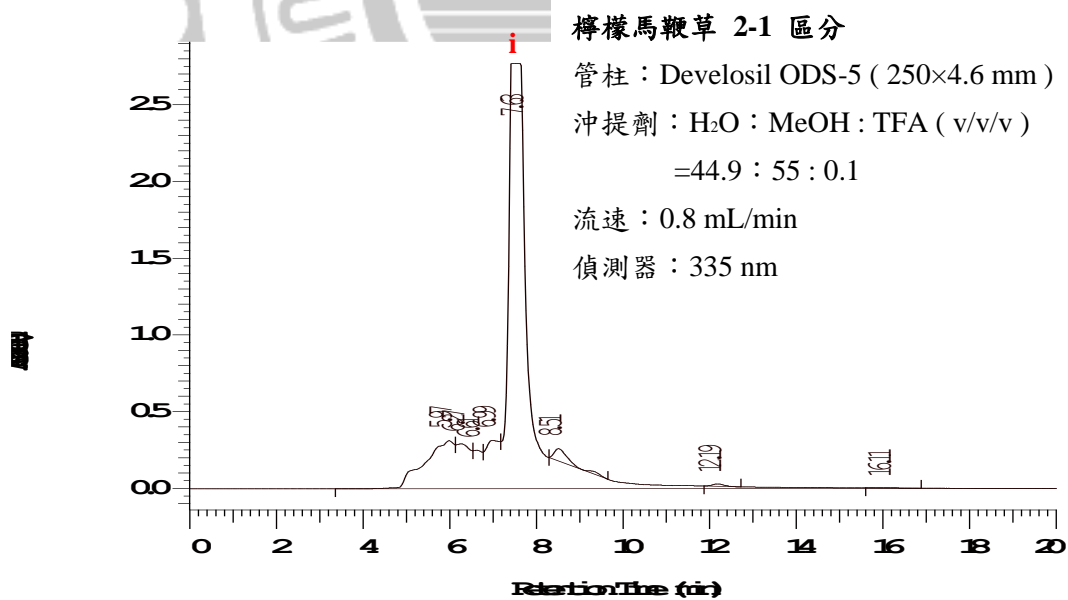
圖三十八、檸檬馬鞭草子區分物 1-4 之分析型 HPLC 圖。

Fig 38. Analytical HPLC chromatogram of subfraction 1-4 of *Aloysia citrodora*.



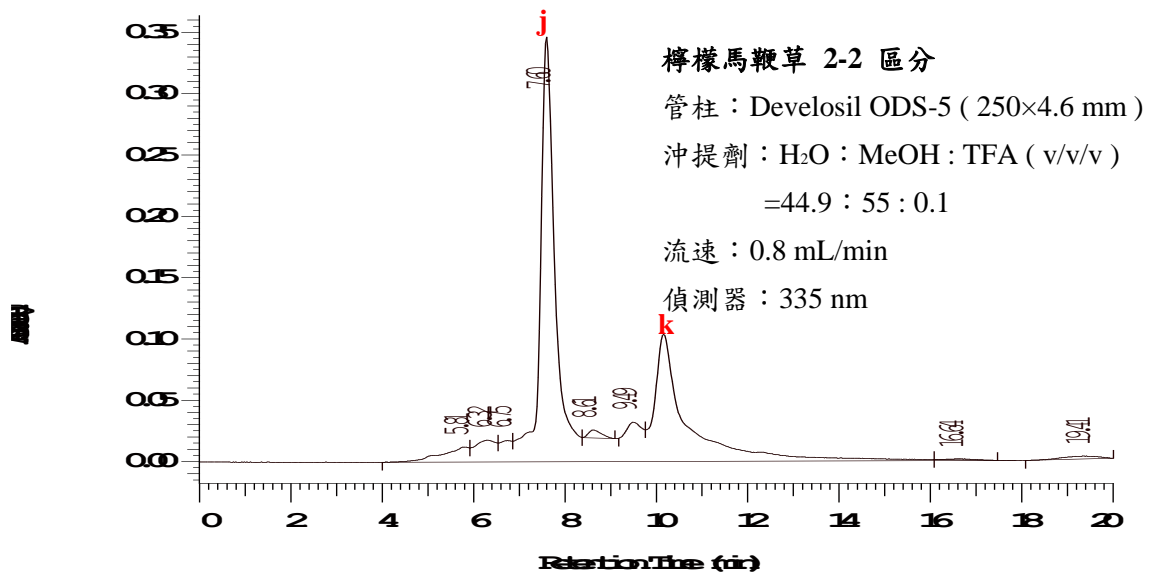
圖三十九、檸檬馬鞭草子區分物 1-5 之分析型 HPLC 圖。

Fig 39. Analytical HPLC chromatogram of subfraction 1-5 of *Aloysia citrodora*.



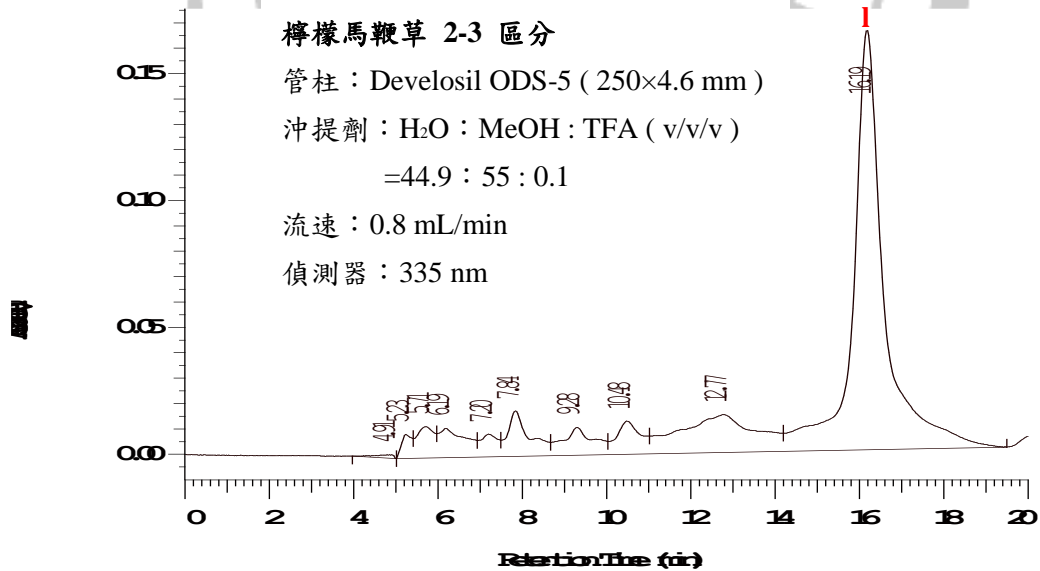
圖四十、檸檬馬鞭草子區分物 2-1 之分析型 HPLC 圖。

Fig 40. Analytical HPLC chromatogram of subfraction 2-1 of *Aloysia citrodora*.



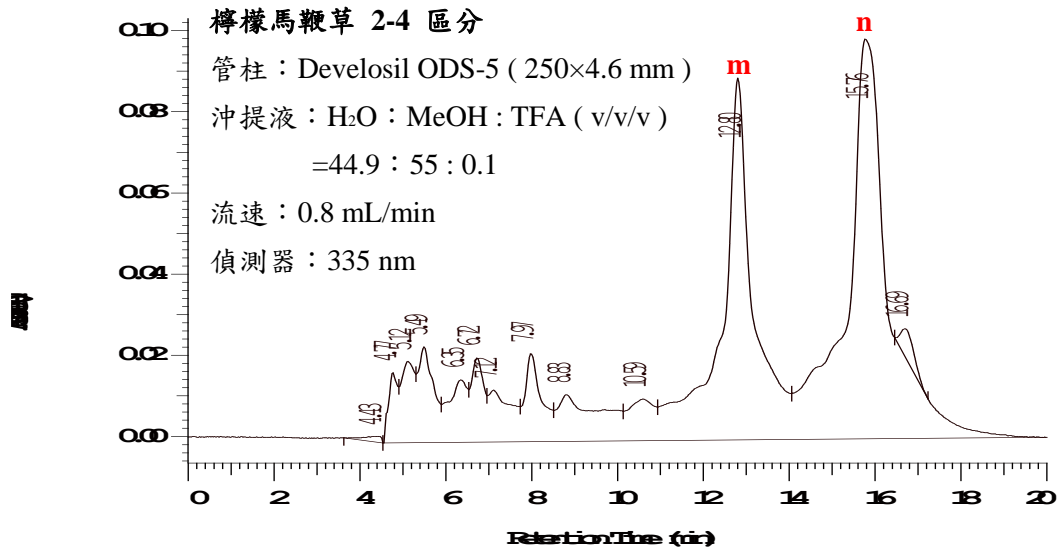
圖四十一、檸檬馬鞭草子區分物 2-2 之分析型 HPLC 圖。

Fig 41. Analytical HPLC chromatogram of subfraction 2-2 of *Aloysia citrodora*.



圖四十二、檸檬馬鞭草子區分物 2-3 之分析型 HPLC 圖。

Fig 42. Analytical HPLC chromatogram of subfraction 2-3 of *Aloysia citrodora*.



圖四十三、檸檬馬鞭草子區分物 2-4 之分析型 HPLC 圖。

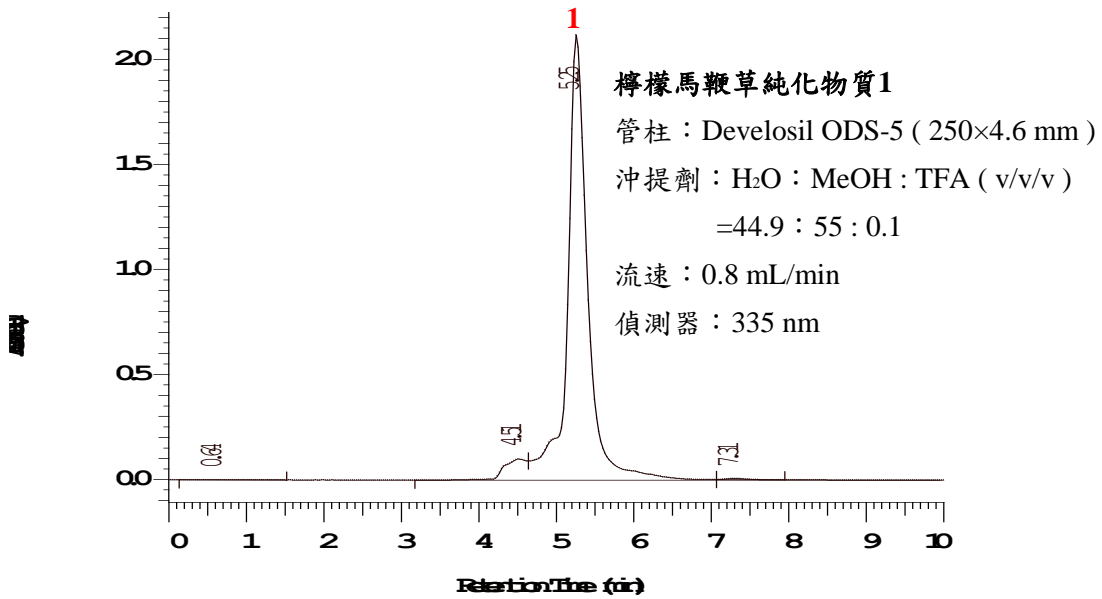
Fig 43. Analytical HPLC chromatogram of subfraction 2-4 of *Aloysia citrodora*.



## (五) 檸檬馬鞭草純物質 1~6 之HPLC分析及製備

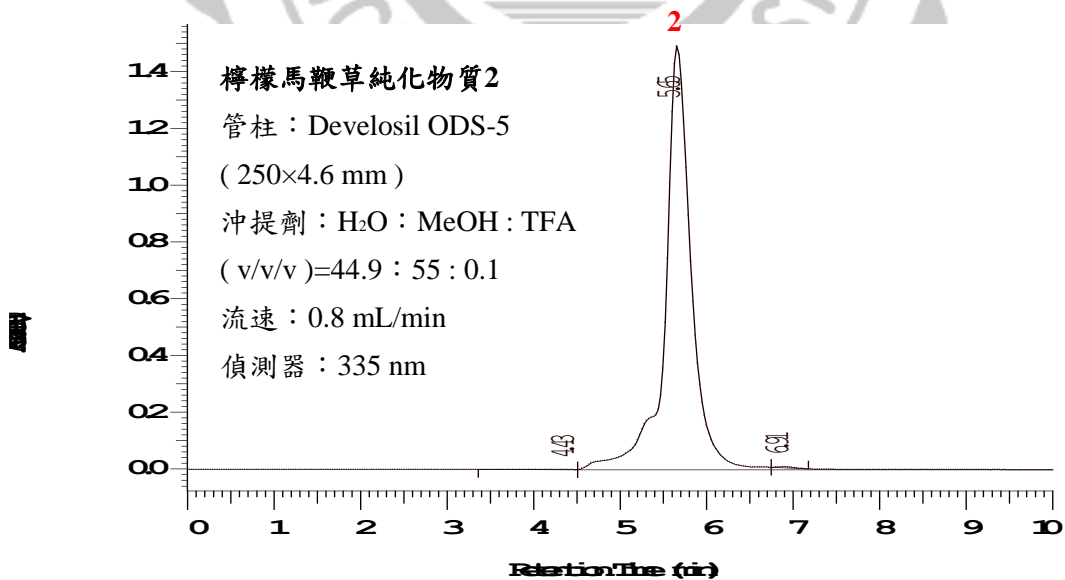
將上述(四)檸檬馬鞭草區分物 a~n，預先以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，因其在波長 335nm 具有最大吸收值，故選取 335 nm 為 HPLC 之偵測波長。將所有區分物經由 0.45 $\mu$ m 之過濾膜過濾後進行分析型 HPLC 分析，沖提條件為H<sub>2</sub>O：MeOH：三氟醋酸

(v/v/v) = 44.9：55：0.1，流速0.8 ml/min，偵測波長為 335 nm，得到純化物質 1~6 之光譜(純化物質 1 → 區分物 a、純化物質 2 → 區分物 b、純化物質 3 → 區分物 i、純化物質 4 → 區分物 k、純化物質 5 → 區分物 f、純化物質 6 → 區分物 h)，結果顯示於圖四十四~圖四十九，並將圖中的主要波峰，利用相同的移動相與波長條件，流速為3.5 mL/min 之製備型高效液相層析儀進行分離，重覆收集層析圖上滯留時間相同主要波峰之沖提區分，再繼續經由 <sup>1</sup>H-NMR 之測定並解析光譜進行結構鑑定。



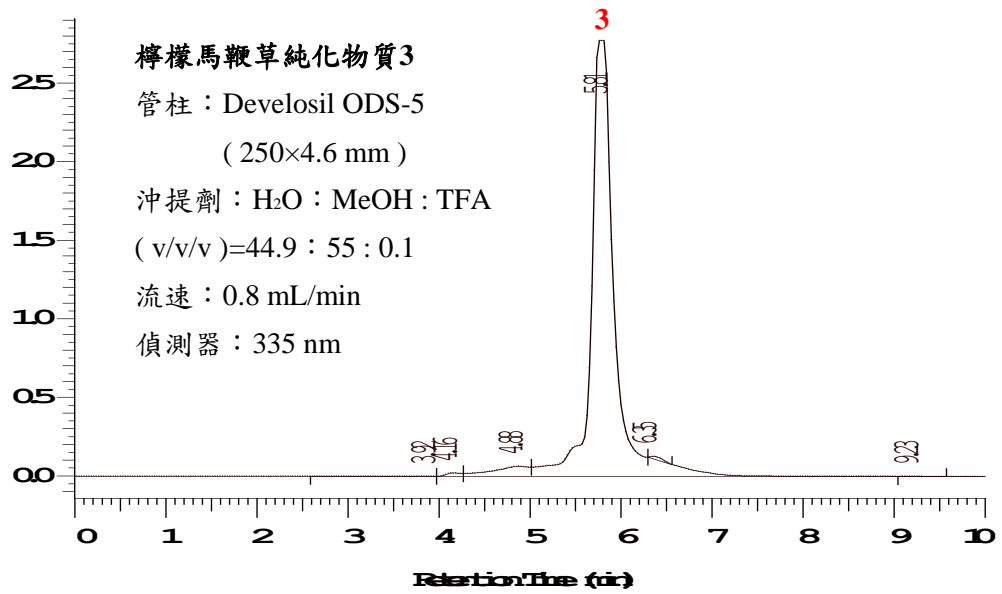
圖四十四、檸檬馬鞭草純化物質 1 之分析型 HPLC 圖。

Fig 44. Analytical HPLC chromatogram of isolated component 1 of *Aloysia triphylla*.



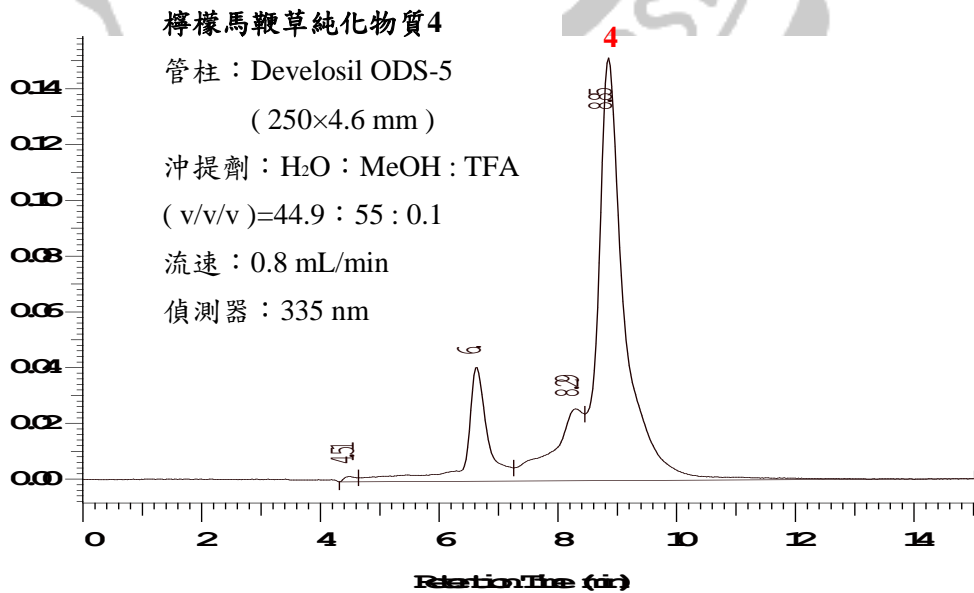
圖四十五、檸檬馬鞭草純化物質 2 之分析型 HPLC 圖。

Fig 45. Analytical HPLC chromatogram of isolated component 2 of *Aloysia triphylla*.



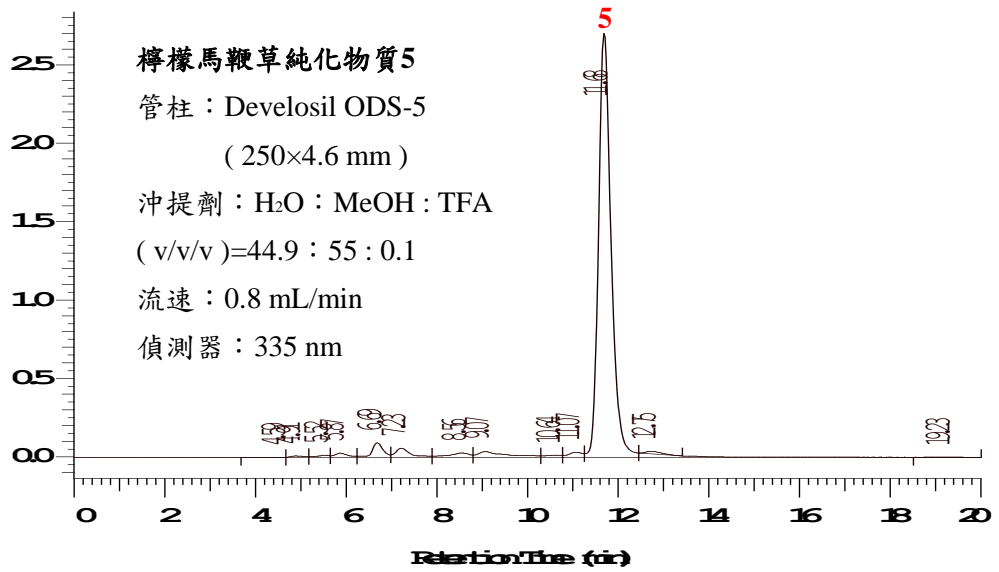
圖四十六、檸檬馬鞭草純化物質 3 之分析型 HPLC 圖。

Fig 46. Analytical HPLC chromatogram of isolated component 3 of *Aloysia triphylla*.



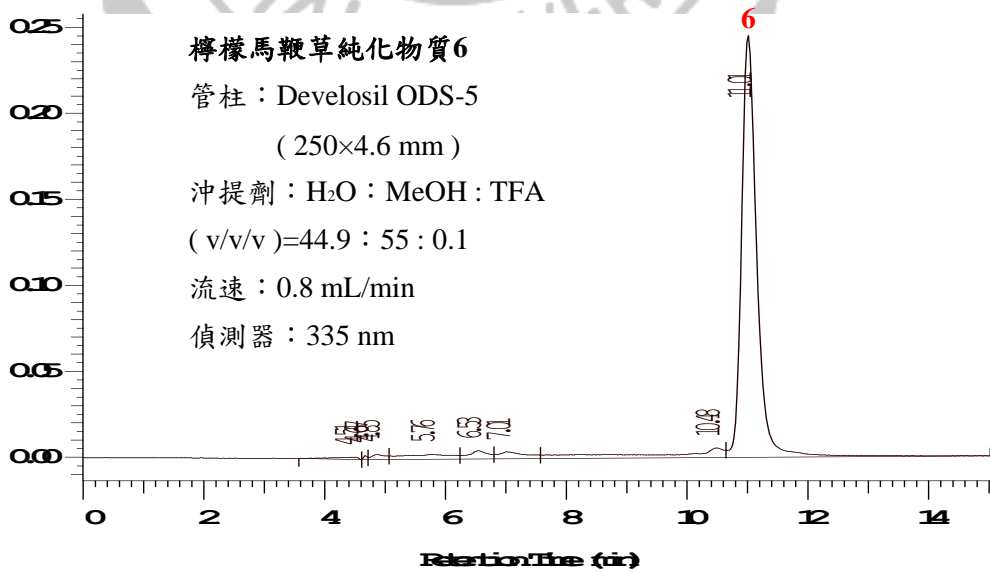
圖四十七、檸檬馬鞭草純化物質 4 之分析型 HPLC 圖。

Fig 47. Analytical HPLC chromatogram of isolated component 4 of *Aloysia triphylla*.



圖四十八、檸檬馬鞭草純化物質 5 之分析型 HPLC 圖。

Fig 48. Analytical HPLC chromatogram of isolated component 5 of *Aloysia citrodora*.



圖四十九、檸檬馬鞭草純化物質 6 之分析型 HPLC 圖。

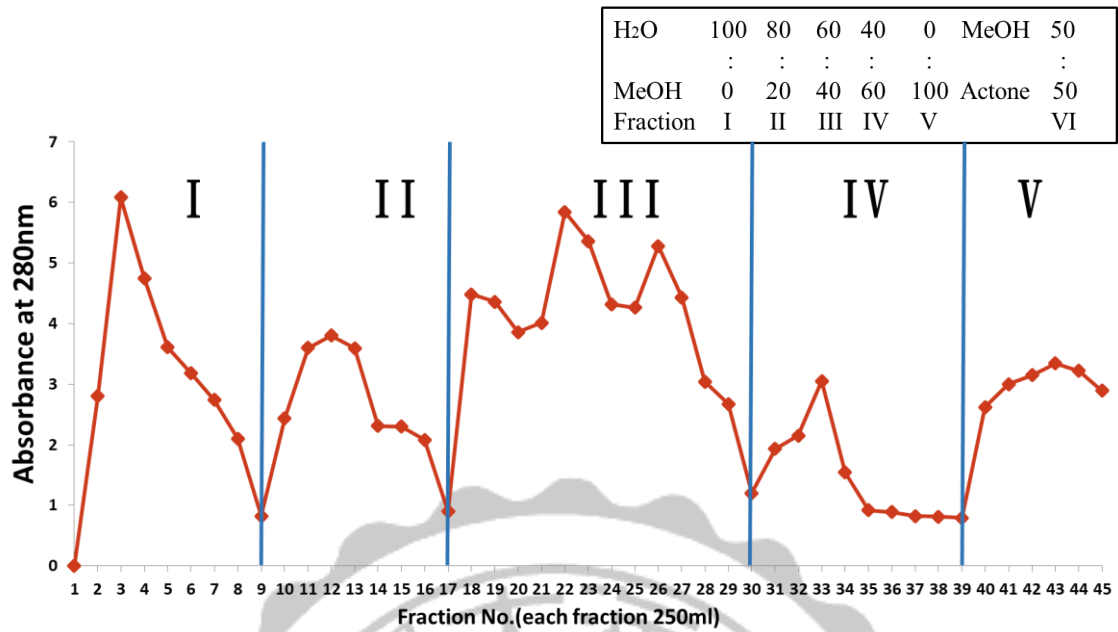
Fig 49. Analytical HPLC chromatogram of isolated component 6 of *Aloysia citrodora*.



## 八、鐵馬鞭草抗氧化及抑制醣解酵素活性成分之分離純化

### (一) 鐵馬鞭草之 XAD-7 液相管柱層析

鐵馬鞭草預先以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，在波長 280nm 具有最大吸收值，故選取這個吸光值做為鐵馬鞭草之液相管柱層析物質之偵測波長。首先將 XAD-7 充填於玻璃管柱(500 × 40 mm)進行液相管柱層析，其沖提液條件依序是水：甲醇(v/v)=100：0、80：20、60：40、0：100、丙酮：甲醇(v/v)=50：50 之混合溶劑，沖提液以每 250mL 為收集單位，並以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，將鐵馬鞭草在偵測波長 280nm 之吸光值對收集瓶作圖進行區分，鐵馬鞭草共取 5 個區分(I~V)(圖五十)。其產率如(表十九)所示。將鐵馬鞭草 5 個區分物進行總抗氧化力及 DPPH 自由基清除能力等抗氧化性檢測，並進行醣解酵素抑制作用測試，綜合抗氧化測試及醣解酵素抑制活性試驗結果，鐵馬鞭草第 III 區分物之活性較佳，故利用此兩區分物做更進一步分析。(圖五十一~五十三)



圖五十、鐵馬鞭草水萃物之 XAD-7 液相管柱層析圖。

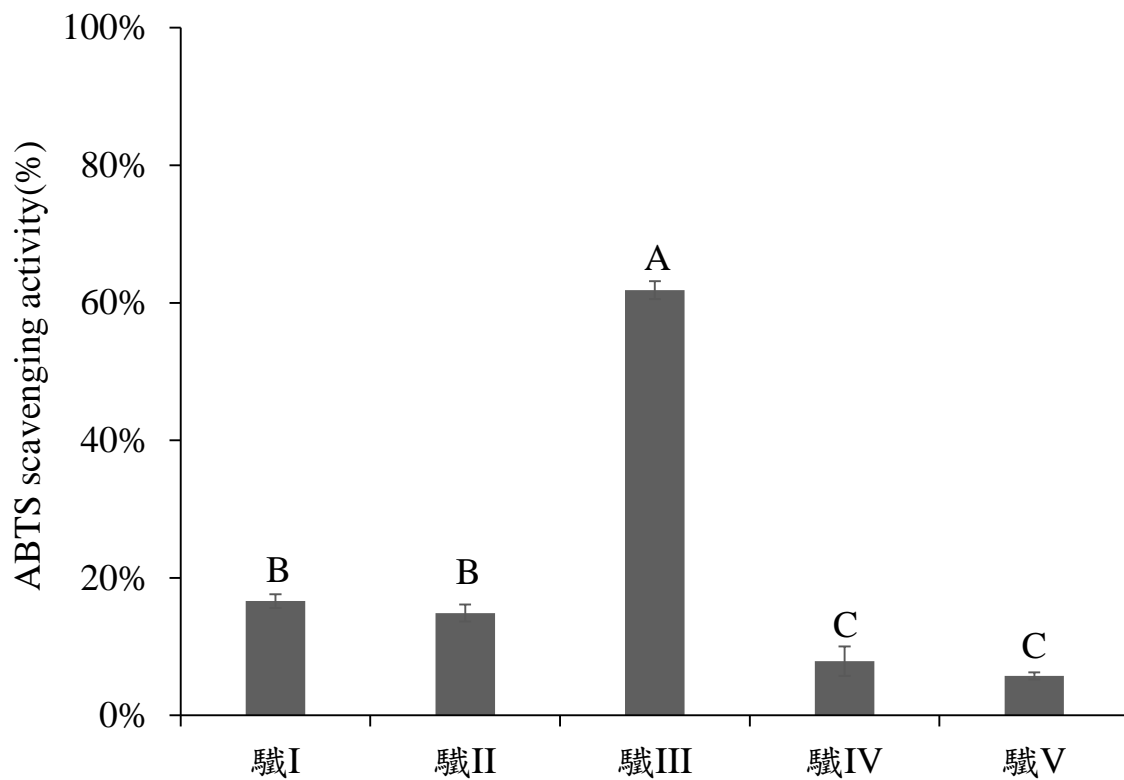
Fig 50. The XAD-7 column chromatogram of eluted fractions from water extract of *Verbena officinalis*.

表十九、鐵馬鞭草水萃物 XAD-7 液相層析後各沖提區分之產率

Table 19. Yields of fractions eluted from water extract of *Verbena officinalis*

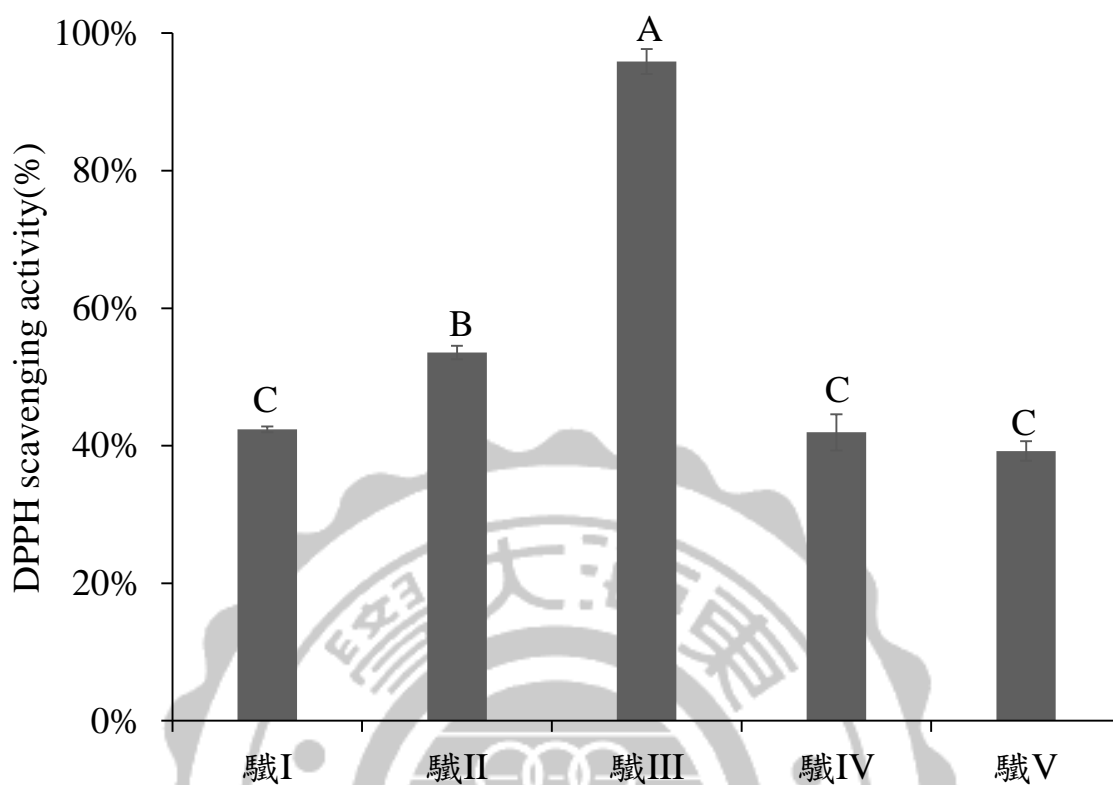
Fraction	Weight(g)	Yield(%)
I	11.78	5.02
II	4.35	1.85
III	5.06	2.15
IV	1.83	0.78
V	2.00	0.85

Sample weight : 234.65 g



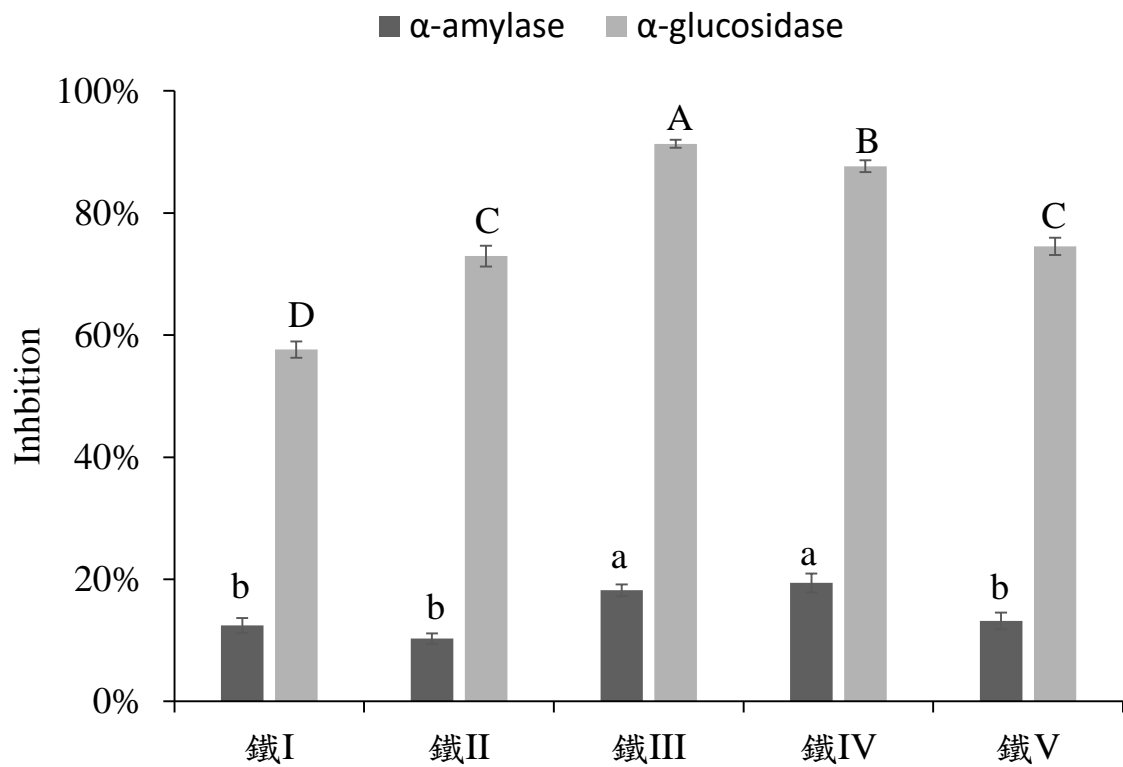
圖五十一、鐵馬鞭草水萃物經 XAD-7 膠體液相管柱層析各沖提區分之抗氧化性。

Fig 51. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of eluted fractions from water extract of *Verbena officinalis* by the XAD-7 chromatography. by the TEAC method. Bars represent means  $\pm$  SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.



圖五十二、鐵馬鞭草水萃物經 XAD-7 膠體液相管柱層析各沖提區分之 DPPH 自由基清除能力。

Fig 52. DPPH radical scavenging activity of eluted fractions from water extract of *Verbena officinalis*. by XAD-7 chromatography. Bars represent means $\pm$  SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

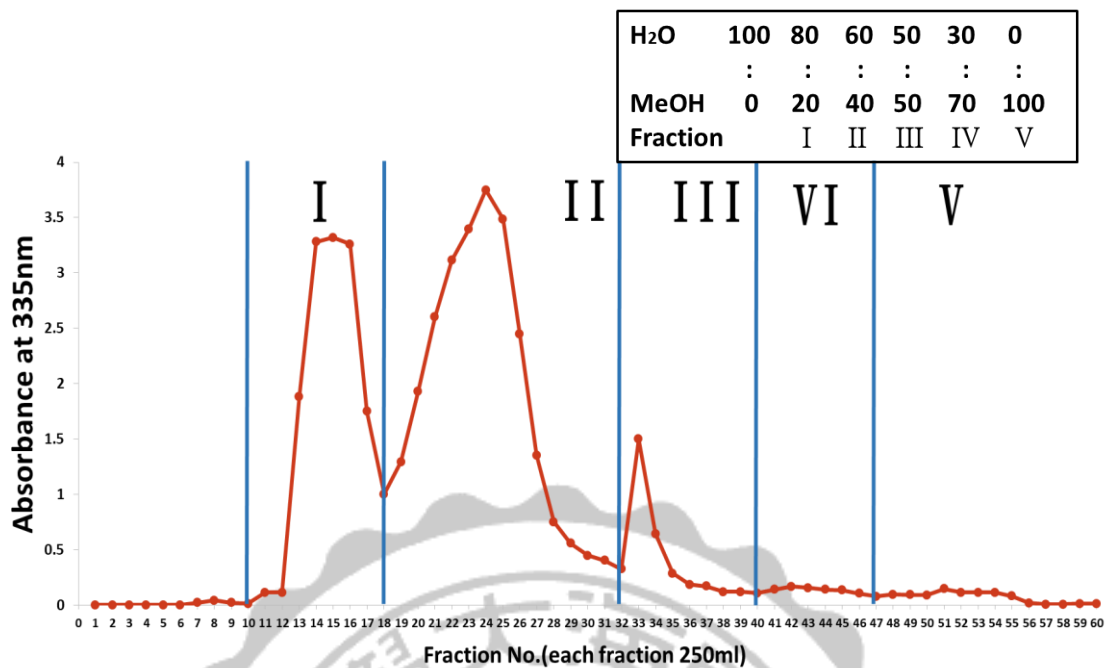


圖五十三、鐵馬鞭草水萃物經 XAD-7 液相管柱層析各沖提區分物之  $\alpha$ -amylase 及  $\alpha$ -glucosidase 抑制活性。

Fig 53.  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of eluted fractions from water extract of *Verbena officinalis* by XAD-7 chromatography. Bars represent means  $\pm$  SD, n=3. Means with different letters within the same enzyme are significant different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

## (二)鐵馬鞭草區分(III)之Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 液相管柱層析

如同上述，將鐵馬鞭草區分(III)沖提區分液預先以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，在波長 335nm 具有最大吸收值，故選取 335nm 為液相管柱層析物質之偵測波長。將鐵馬鞭草區分(III)濃縮物懸浮置入充填 Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 之膠體玻璃管柱充填於玻璃管柱(600×24.5mm) 進行第一次Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 液相管柱層析，其沖提條件依序是水：甲醇(v/v)=100：0、80：20、60：40、50：50、30：70、0：100 之混合溶劑，沖提液以每 200mL 為收集單位，並以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，偵測波長 335nm 之吸光值對收集瓶作圖進行區分，並將鐵馬鞭草區分(III)取 5 個子區分(圖五十四)，產率如(表二十)所示。將鐵馬鞭草區分(III)之 5 個子區分進行總抗氧化力及醣解酵素抑制作用檢測(圖五十五~五十七)，結果顯示，鐵馬鞭草區分(III)之子區分 I 及 II 具有較佳活性，並將 I 及 II 子區分物，更進一步利用 HPLC 分離純化出兩者之活性物質。



圖五十四、鐵馬鞭草區分物(III)之 Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 液相管柱層析圖。

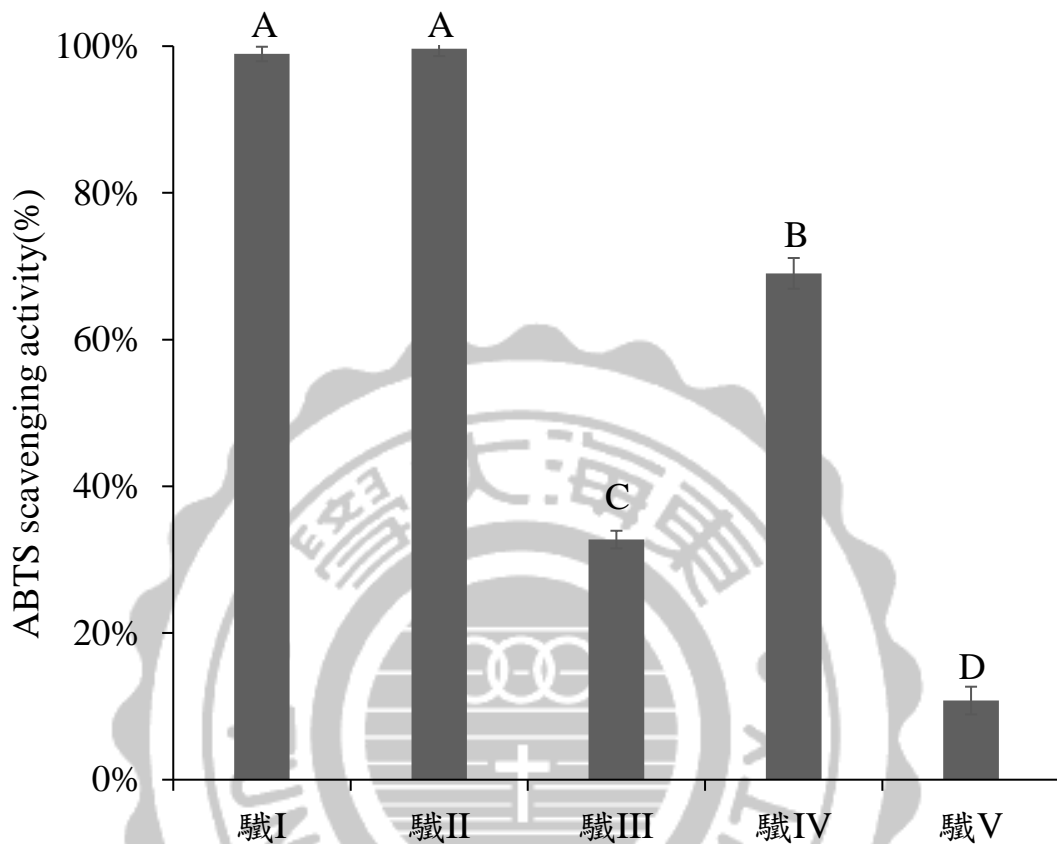
Fig 54. The Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN chromatogram of eluted fractions from fraction (III) of *Verbena officinalis*.

表二十、鐵馬鞭草區分物(III)經 Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 液相層析後各沖提子區分之產率

Table 20. Yields of eluted sub fractions from fraction (III) of *Verbena officinalis* by Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN chromatography

Fraction	Weight(g)	Yield(%)
I	0.94	18.65
II	1.45	28.61
III	0.27	5.35
IV	0.17	3.54
V	0.04	0.78

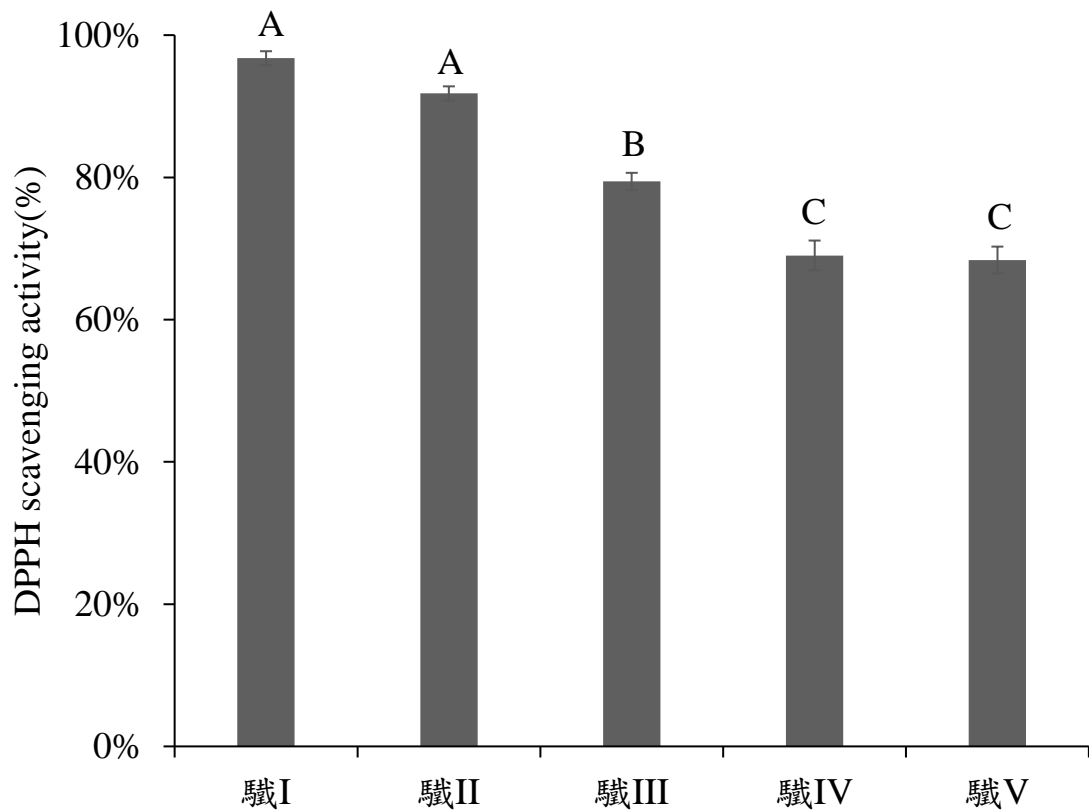
Sample weight:5.06g



圖五十五、鐵馬鞭草(III)經 Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 液相管柱層析後各沖提子區分之總抗氧化力。

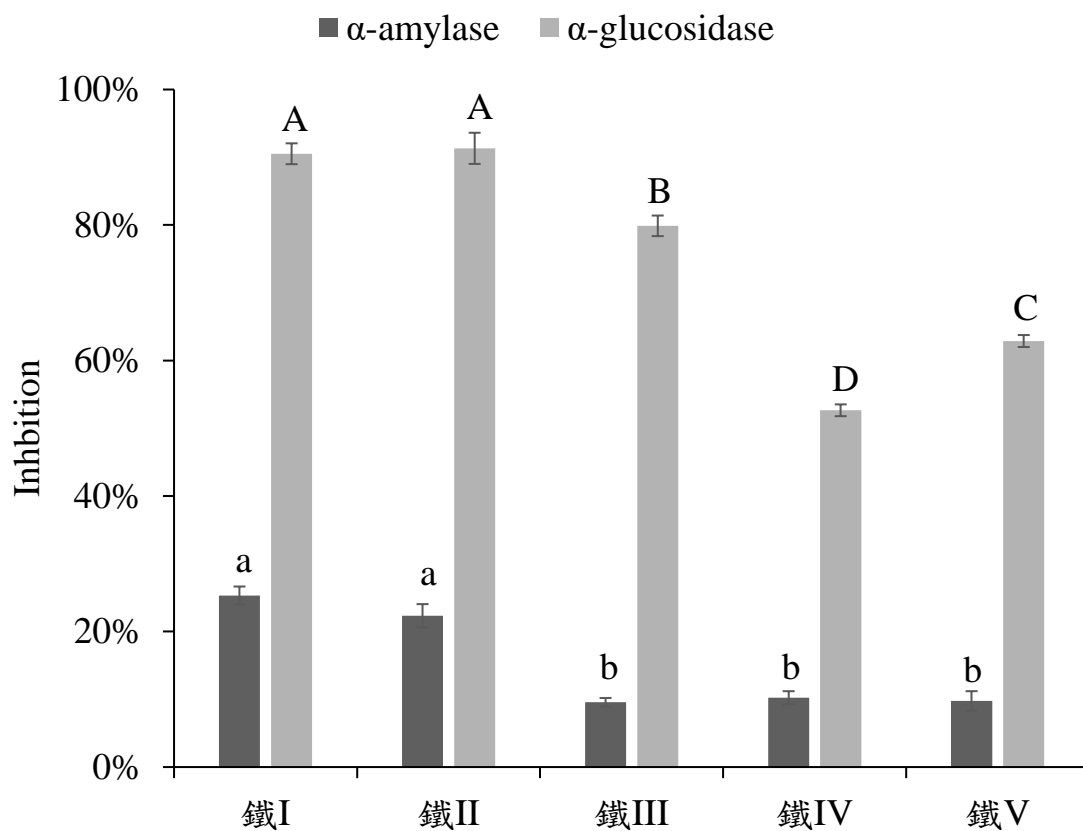
Fig 55. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of eluted subfractions from fraction (IV) of *Verbena officinalis* by the Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN chromatogram. Bars represent means  $\pm$  SD, n=3. Mens with different letters are significant different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.





圖五十六、鐵馬鞭草區分物(III)經 Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 液相管柱層析各沖提子區分之 DPPH 自由基清除能力。

Fig 56. DPPH radical scavenging activity of eluted subfractions from fraction (III) of *Verbena officinalis*. by the Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN chromatogram. Bars represent means± SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.



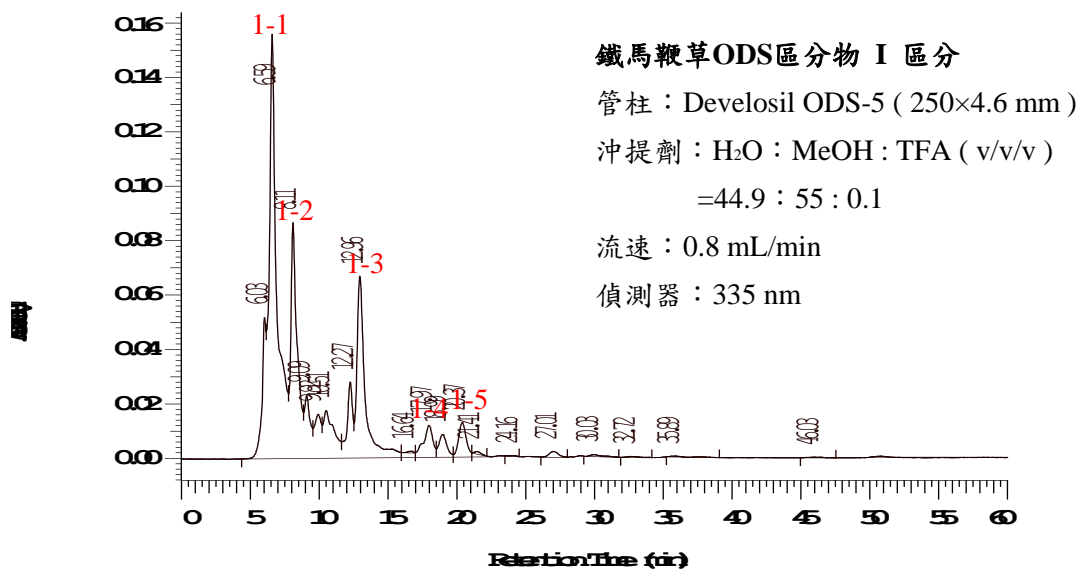
圖五十七、鐵馬鞭草區分物(III)經 Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 液相管柱層析後各沖提子區分之 α-amylase 及 α-glucosidase 抑制活性。

Fig 57. α-amylase and α-glucosidase inhibitory activities of eluted subfractions from fraction (III) of *Verbena officinalis*. by the Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN chromatogram. Bars represent means ± SD, n=3. Means with different letters within the same enzyme are significant different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

### (三) 經由 Cosmosil 75 C18-OPN 液相管柱層析之鐵馬鞭區分物

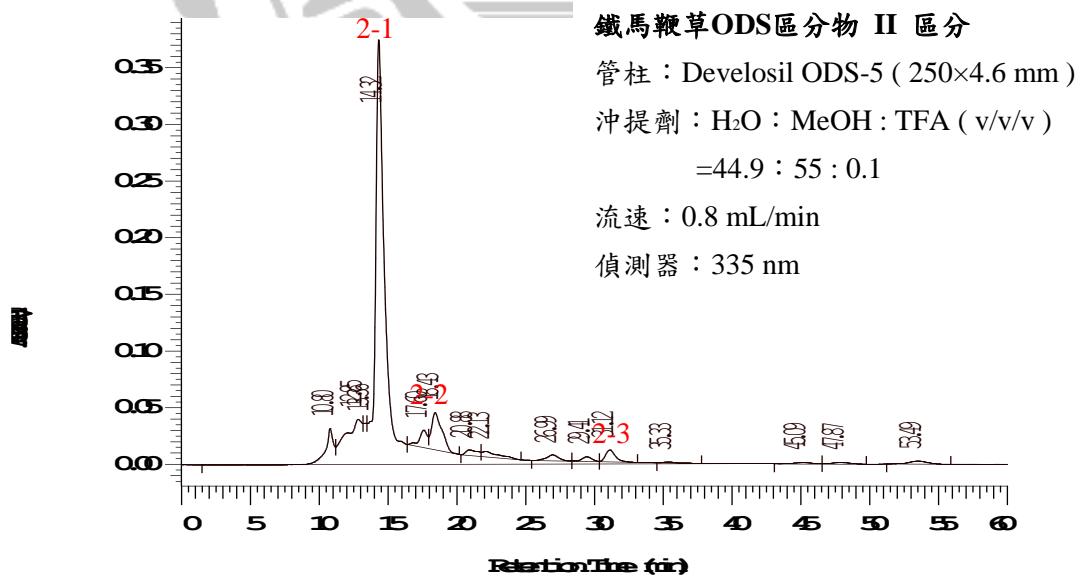
#### I、II之 HPLC 分析及製備

將上述經過 Cosmosil 75 C18-OPN 液相管柱層析鐵馬鞭草量較多且抗氧化、醣解酵素抑制活性佳之成分區分 I、II 沖提液，預先以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，因其在波長335nm 具有最大吸收值，故選取 335nm 為液相管柱層析物質之偵測波長。將鐵馬鞭草 I、II 區分物，經由 0.45 $\mu$ m 之過濾膜過濾後進行 HPLC 分析，並以分析型高效液相層析儀尋找良好的分離條件為H<sub>2</sub>O：MeOH：三氟醋酸 (v/v/v) =44.9：55：0.1，流速0.8 ml/min，偵測波長為 335 nm，結果顯示於圖六十、六十一，由於還是沒有將物質分離，因此將鐵馬鞭草 I 區分出 5 個區分物，鐵1-1、鐵1-2、鐵1-3、鐵1-4、鐵1-5(圖五十八)，鐵馬鞭草 II 區分出 3 個區分物，鐵2-1、鐵2-2、鐵2-3、鐵2-4(圖五十九)，並繼續進行HPLC之分離純化。



圖五十八、鐵馬鞭草Cosmosil 75 C18-OPN物區分 I 之分析型 HPLC 圖。

Fig 58. Analytical HPLC chromatogram of fraction I of water extract of *Verbena officinalis*.

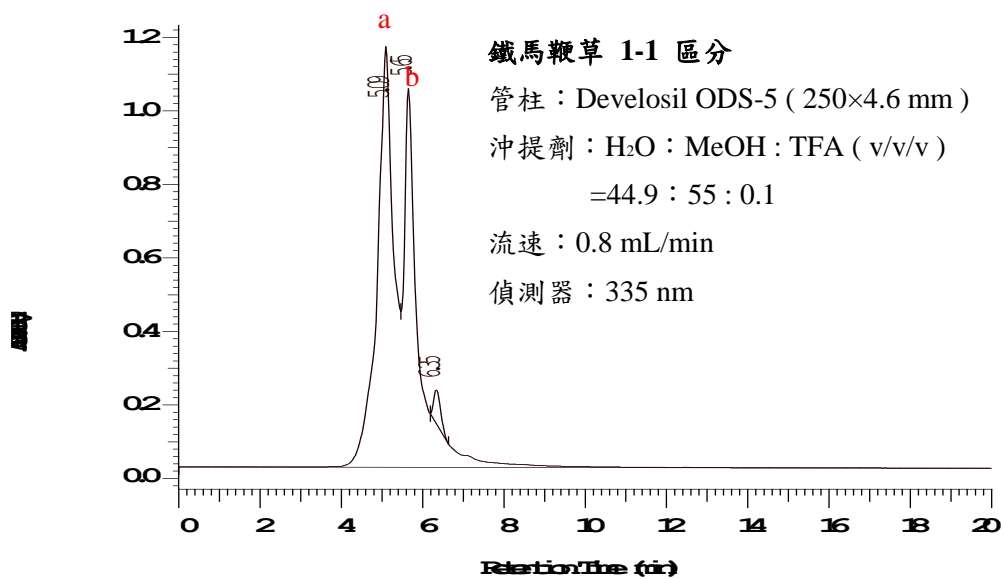


圖五十九、鐵馬鞭草Cosmosil 75 C18-OPN物區分 II 之分析型 HPLC 圖。

Fig 59. Analytical HPLC chromatogram of fraction II of water extract of *Verbena officinalis*.

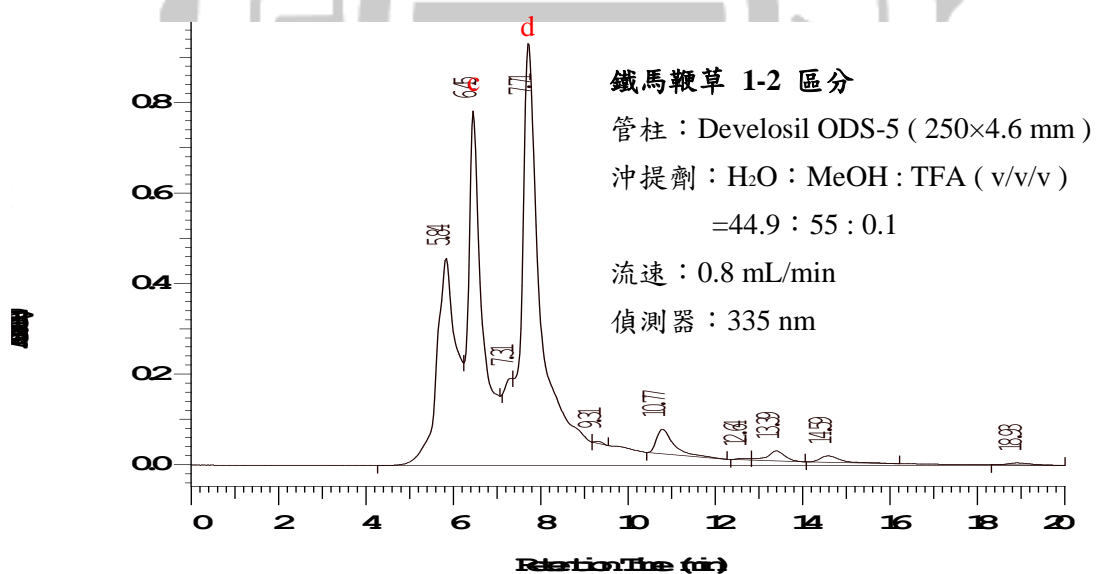
#### (四) 鐵馬鞭草 1-1~1-5、2-1~2-3 區分物之 HPLC 分析及製備

將鐵馬鞭草各分區物，預先以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，因其在波長 335nm 具有最大吸收值，故選取 335nm 為 HPLC 之偵測波長。將所有區分物經由 0.45 $\mu$ m 之過濾膜過濾後進行分析型 HPLC 分析，沖提條件為 H<sub>2</sub>O : MeOH : 三氟醋酸 (v/v/v) = 44.9 : 55 : 0.1，流速 0.8 ml/min，偵測波長為 335 nm，結果顯示於圖六十~六十七，將圖中的主要波峰，利用相同的移動相與波長條件，流速為 3.5 mL/min 之製備型高效液相層析儀進行分離，重覆收集層析圖上滯留時間相同主要波峰之沖提區分，由於還是沒有將物質分離，因此將鐵馬鞭草 1-1~1-5、2-1~2-3 再區分為 13 個 a~m 之區分物(圖六十~六十七)，並繼續進行 HPLC 之分離純化。



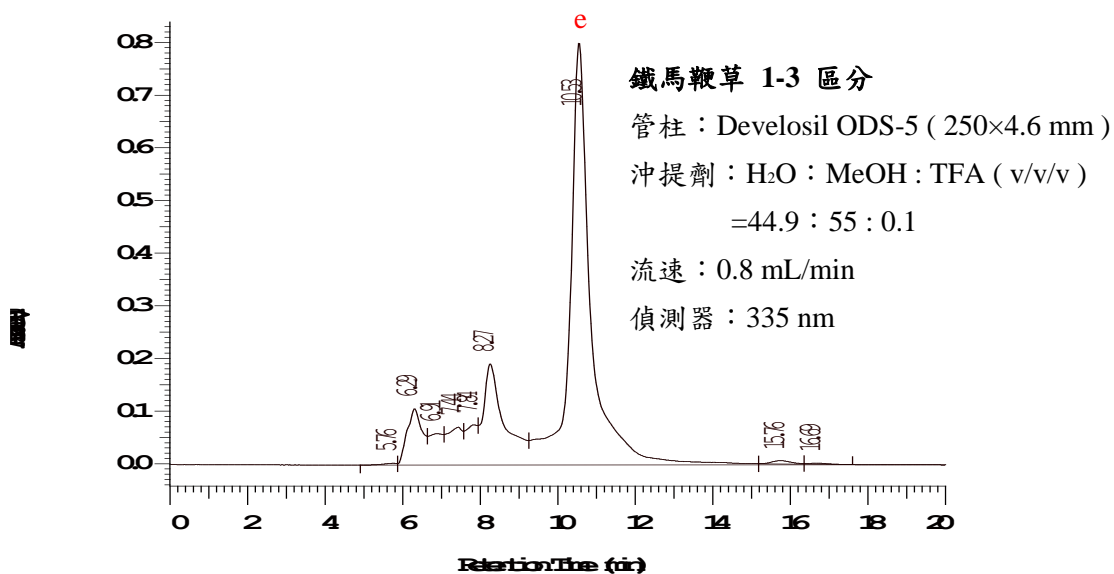
圖六十、鐵馬鞭草子區分物 1-1 之分析型 HPLC 圖。

Fig 60. Analytical HPLC chromatogram of subfraction 1-1 of *Verbena officinalis*.



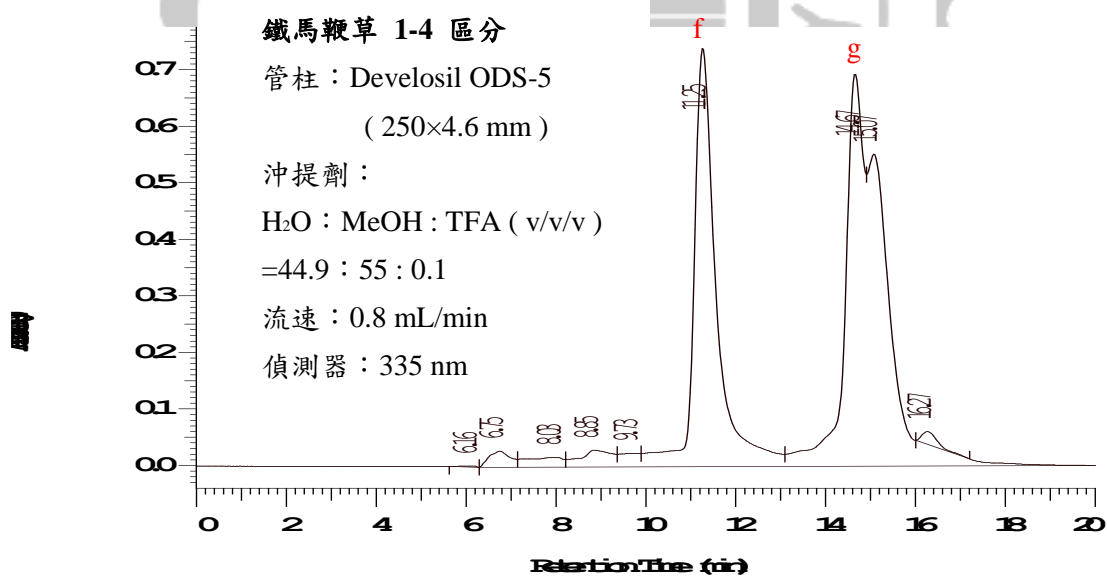
圖六十一、鐵馬鞭草子區分物 1-2 之分析型 HPLC 圖。

Fig 61. Analytical HPLC chromatogram of subfraction 1-2 of *Verbena officinalis*.



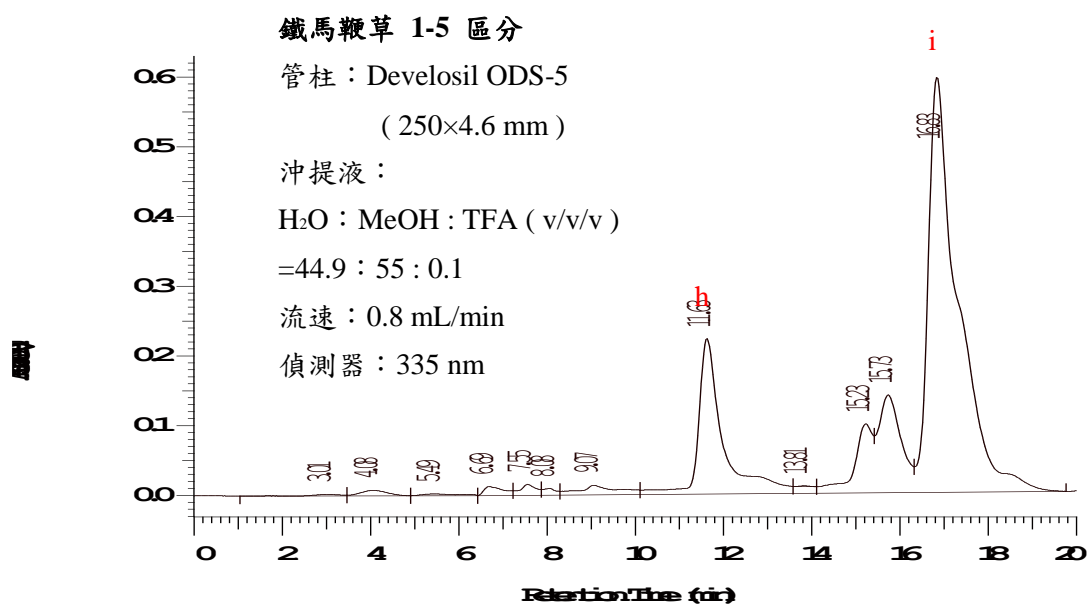
圖六十二、鐵馬鞭草子區分物 1-3 之分析型 HPLC 圖。

Fig 62. Analytical HPLC chromatogram of subfraction 1-3 of *Verbena officinalis*.



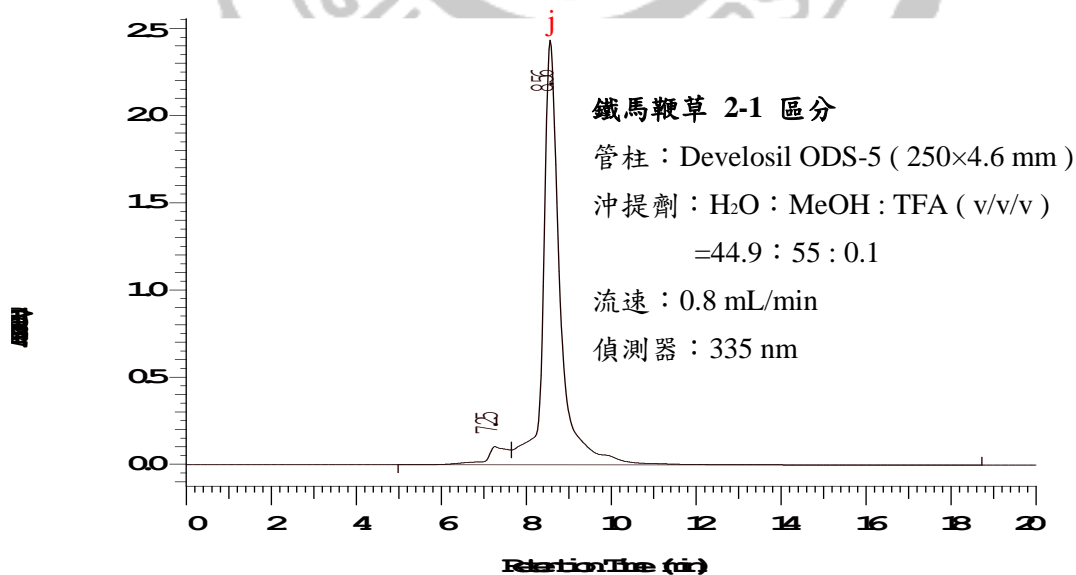
圖六十三、鐵馬鞭草子區分物 1-4 之分析型 HPLC 圖。

Fig 63. Analytical HPLC chromatogram of subfraction 1-4 of *Verbena officinalis*.



圖六十四、鐵馬鞭草子區分物 1-5 之分析型 HPLC 圖。

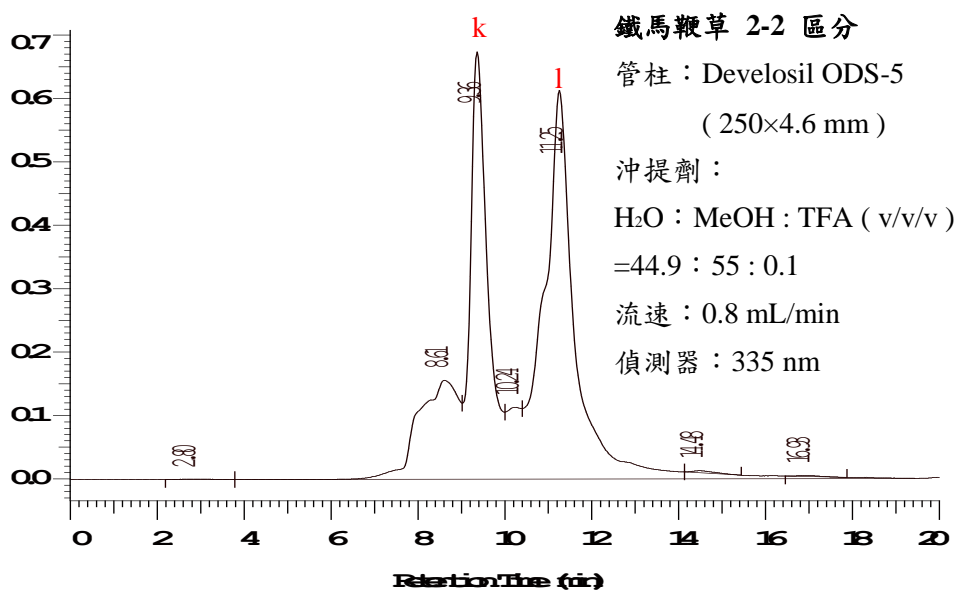
Fig 64. Analytical HPLC chromatogram of subfraction 1-5 of *Verbena officinalis*.



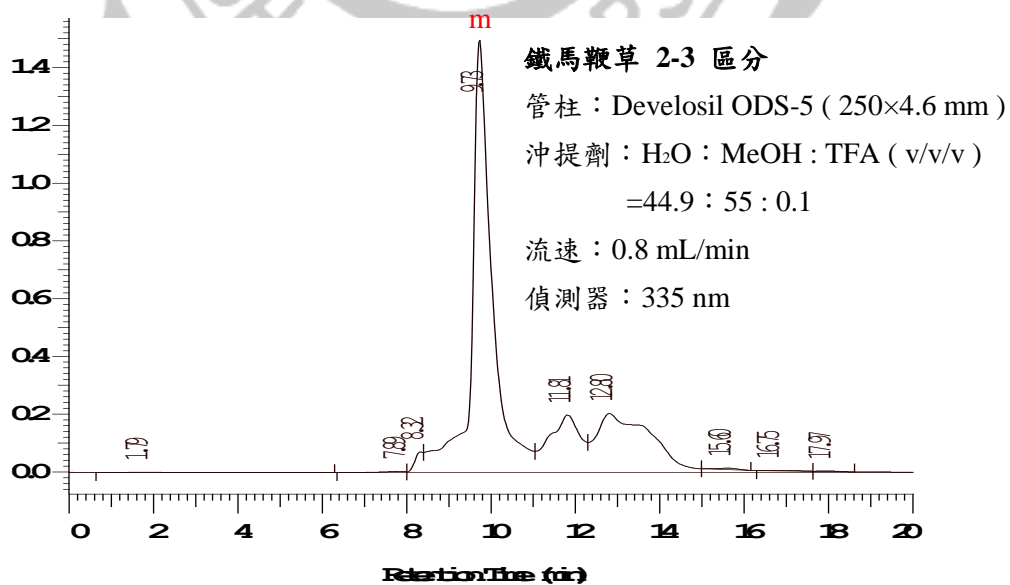
圖六十五、鐵馬鞭草子區分物 2-1 之分析型 HPLC 圖。

Fig 65. Analytical HPLC chromatogram of subfraction 2-1 of *Verbena officinalis*.





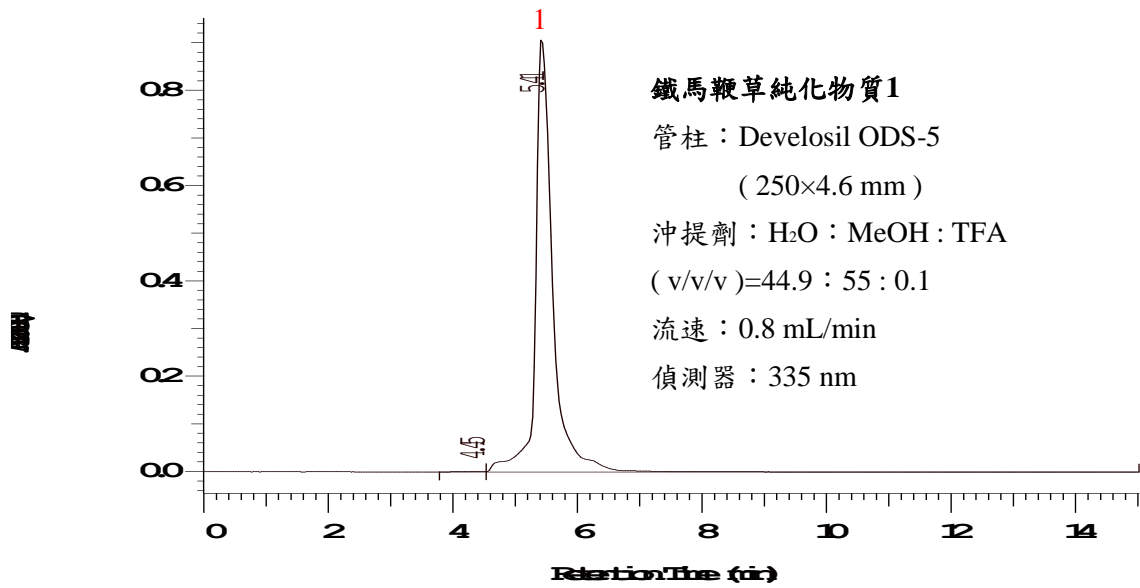
圖六十六、鐵馬鞭草子區分物 2-2 之分析型 HPLC 圖。  
 Fig 66. Analytical HPLC chromatogram of subfraction 2-2 of *Verbena officinalis*.



圖六十七、鐵馬鞭草子區分物 2-3 之分析型 HPLC 圖。  
 Fig 67. Analytical HPLC chromatogram of subfraction 2-3 of *Verbena officinalis*.

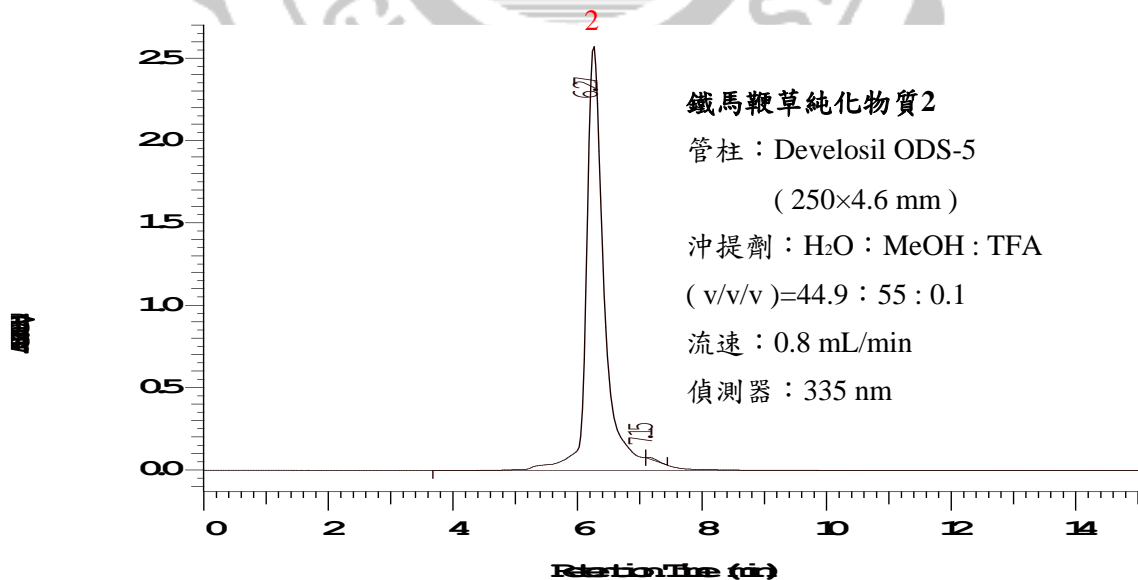
## (五) 鐵馬鞭草純物質 1~6 之HPLC分析及製備

將上述(四)鐵馬鞭草 a~m 區分物，預先以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，因其在波長 335nm 具有最大吸收值，故選取 335nm 為 HPLC 之偵測波長。將所有區分物經由 0.45 $\mu$ m 之過濾膜過濾後進行分析型 HPLC 分析，沖提條件為H<sub>2</sub>O：MeOH：三氟醋酸 (v/v/v) =44.9：55：0.1，流速0.8 ml/min，偵測波長為 335 nm，得到純化物質 1~6 的光譜，結果顯示於圖六十八~圖七十三(純化物質1→區分物 m、純化物質 2→區分物 j、純化物質 3→區分物 k、純化物質 4→區分物 d、純化物質 5→區分物 f、純化物質 6→區分物 e)，並將圖中主要純化物質之波峰，利用相同的移動相與波長條件，流速為3.5 mL/min 之製備型高效液相層析儀進行分離，重覆收集層析圖上滯留時間相同主要波峰之沖提區分，再繼續經由 <sup>1</sup>H-NMR 之測定並解析光譜進行結構鑑定。



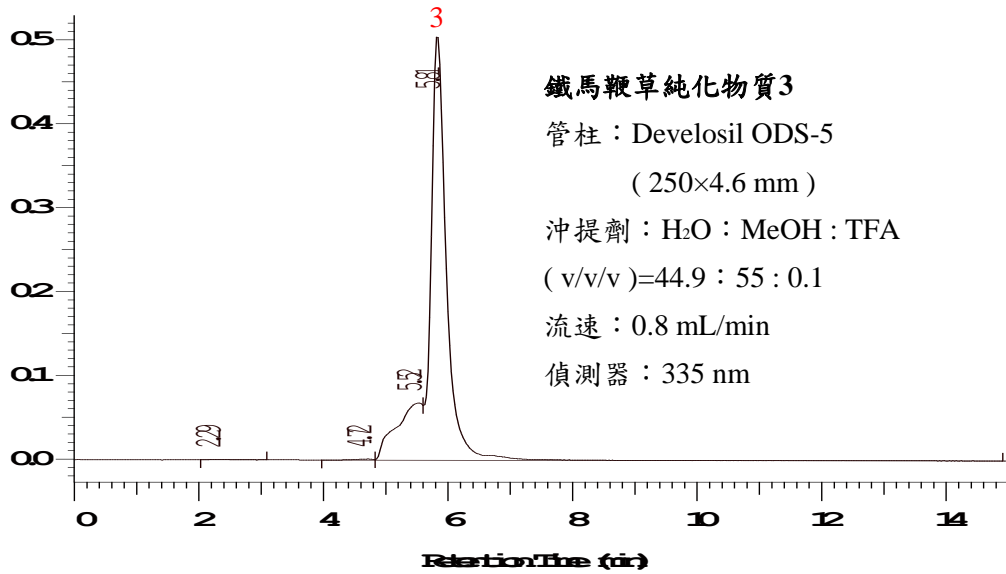
圖六十八、鐵馬鞭草純化物質 1 之分析型 HPLC 圖。

Fig 68. Analytical HPLC chromatogram of isolated component 1 of *Verbena officinalis*.



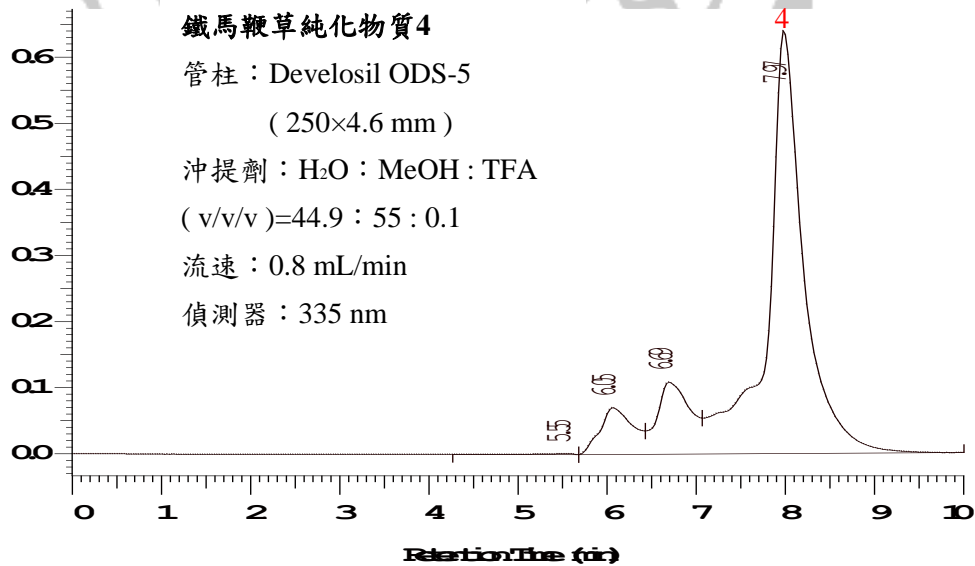
圖六十九、鐵馬鞭草純化物質 2 之分析型 HPLC 圖。

Fig 69. Analytical HPLC chromatogram of isolated component 2 of *Verbena officinalis*.



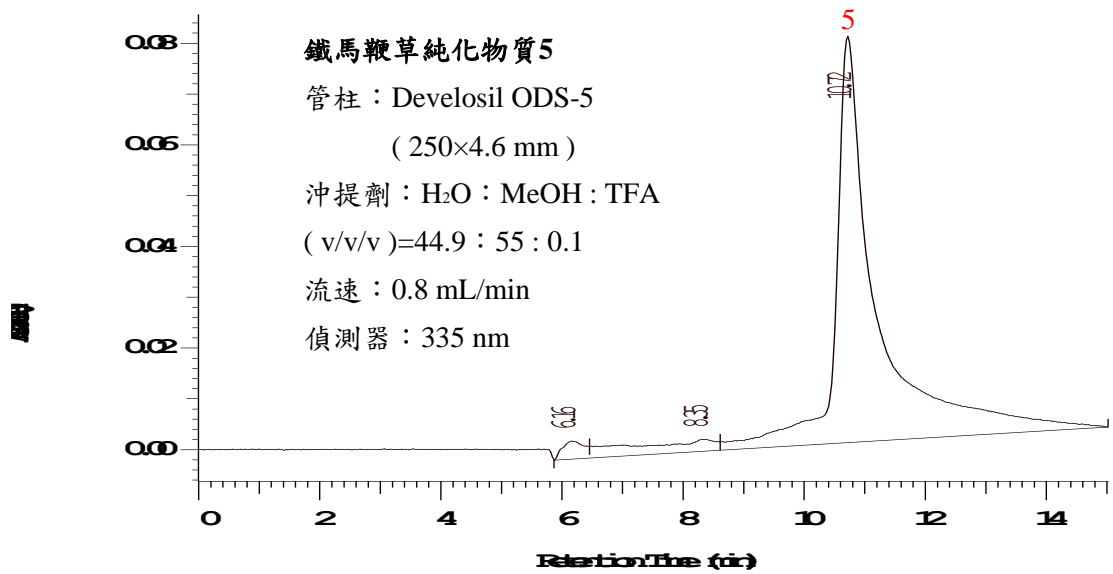
圖七十、鐵馬鞭草純化物質 3 之分析型 HPLC 圖。

Fig 70. Analytical HPLC chromatogram of isolated component 3 of *Verbena officinalis*.

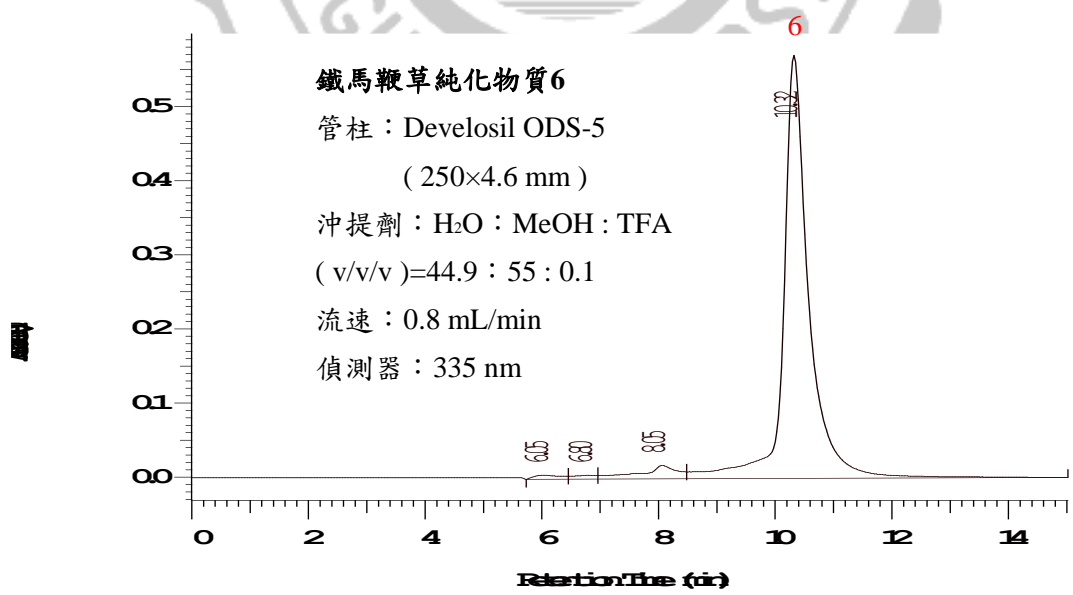


圖七十一、鐵馬鞭草純化物質 4 之分析型 HPLC 圖。

Fig 71. Analytical HPLC chromatogram of isolated component 4 of *Verbena officinalis*.



圖七十二、鐵馬鞭草純化物質 5 之分析型 HPLC 圖。  
 Fig 72. Analytical HPLC chromatogram of isolated component 5 of *Verbena officinalis*.



圖七十三、鐵馬鞭草純化物質 6 之分析型 HPLC 圖。  
 Fig 73. Analytical HPLC chromatogram of isolated component 6 of *Verbena officinalis*.

## 九、檸檬馬鞭草之 LC/MS/MS 分析及結構鑑定

(1) HPLC使用Hitachi HPLC-2000 system，逆相層析管柱為YMC-Pack ODS-AM(100× 2.0 mmID.， S-3- $\mu$ m 12nm；Kyoto，Japan)，UV-Vis diode array detector(DAD) 波長掃描範圍設定在200-550 nm，定量波長為265、285、365、520 nm，移動相流速為0.2 mL/min，注射量為5  $\mu$ ，層析溫度為35°C，移動相為：A 溶液為含0.5 % Formic acid 之水溶液，B 溶液為含0.5 % Formic acid 之75 % acetonitrile。沖提梯度如下：0 min 5% B； 10 min 10% B； 12 min 12% B； 35min 16% B； 40 min 20% B； 45 min 25% B； 60 min 40% B； 65 min 55% B； 70min 60% B； 75 min 80% B； 80 min 80% B； 85 min 100%B； 90 min 5% B； 110min 5% B。每次分析前管柱先以起始梯度平衡30 min。

(2)質譜分析儀條件如下：高壓液相層析串聯式質譜系統 (HPLC-tandem MS)由LCQDeca XP Max (Thermo Fisher Scientific)-裝置有離子阱(iontrap，IT) 連結電噴灑游離源 (electrospray ionization，ESI) 所構成。而成分鑑定是以電噴灑游離源，在正、負離子 (positive and negative ion mode) 下進行質譜分析。在噴灑過程中，使用氮氣 (nitrogen gas) 進行噴灑，條件為主要氣體 (sheath gas) 60arb、輔助氣體 (auxiliary gas) 50arb；而毛細管溫度 (capillary temperature)為

280°C。其餘條件在正離子模式下：游離源電壓 (source voltage) 為 4.5 kv、毛細管電壓(capillary voltage) 為 46 v、tube lens 電壓為 55 v；然而在負離子模式下：游離源電壓為 3.5 kv、毛細管電壓為 -42 v、tube lens 電壓為 -45v。在 MS/MS 及 MS<sub>n</sub> 質譜分析中，則使用氦氣(helium) 於離子阱中當作碰撞氣體(collision gas)，質譜掃瞄範圍 (mass scan range) 為 m/z 100~1000。其碰撞能量 (normalized collision energy) 範圍設定為 35~45% (根據不同成分)。所有收集到的數據以 Xcalibur 軟體進行定性分析。如下：

表二十一、檸檬馬鞭草之 2 次質譜

Table 21. 2nd mass spectra of *Aloysia triphylla*.

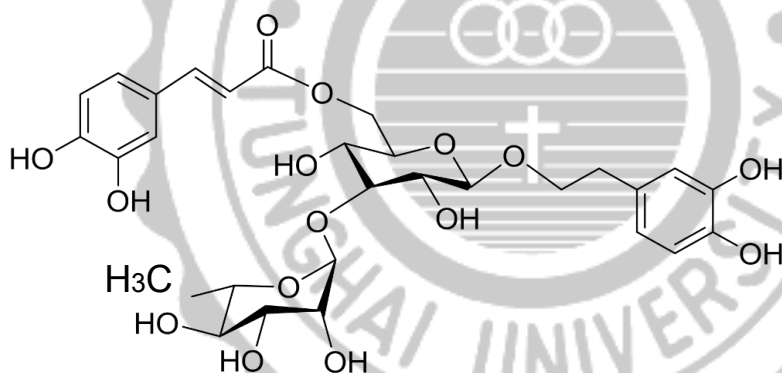
Rt(min)	[M-H] <sup>-</sup>	MS/MS(%)	Identification
13.89	637	381(11),357(8), <b>351(100)</b> ,327(4),285(42)	Luteolin-7-diglucuronide
20.45	621	487(15),426(2),365(2), <b>351(100)</b> ,311(3),269(4)	Apigenin-7-diglucuronide
24.97	639	<b>621(100)</b> ,529(4),487(6),459(1),323(3)	β-hydroxy-isoverbascoside
26.55	651	517(6),413(7),395(7),371(2), <b>351(100)</b> ,341(11),299(1)	Chrysoeriol-7-diglucuronide
34.01	623	<b>461(100)</b>	Verbascoside isomer
37.41	623	<b>461(100)</b>	Verbascoside
42.83	637	491(8),475(6), <b>461(100)</b> ,265(5)	Eukovoside
47.58	651	505(51), <b>475(100)</b> ,337(8),265(30),193(25)	Martinoside

(Quirantes-Pinéa, R., Funesb, L., Micolb, V., Segura-Carretero, A., and Fernández-Gutiérrez, A. (2009). High-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem mass spectrometry to identify phenolic compounds from a lemon verbena extract. *Journal of Chromatography A*, 1216: 5391–5397.)

## 十、檸檬馬鞭草水萃取物純化物質之結構鑑定

檸檬馬鞭草水萃取物純化出的純化物質分別利用UV,  $^1\text{H-NMR}$ 及LC-MS-MS進行結構鑑定，並對照已知文獻鑑定出6種苯乙醇苷類化合物(phenyl ethanoid glycosides)，分別為 isoverbascoside(1)、verbascoside (2)、eukovoside (3)、eukovoside isomer (4)、ferulic acid(5)及caffeic acid(6)。

### (一) 純化物質 1 (isoverbascoside)之結構鑑定



UV  $\lambda$  max (MeOH) nm: 290, 330

Formula :  $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_{15}$

MS : 623 [ M-H ]<sup>+</sup>

MS/MS(%):461(100)

純化物質1及2的  $^1\text{H-NMR}$  化學位移如表二十二所示。



表二十二、純化物質**1**及**2**之<sup>1</sup>H 化學位移 (ppm, D<sub>2</sub>O+methanol-d<sub>4</sub>)

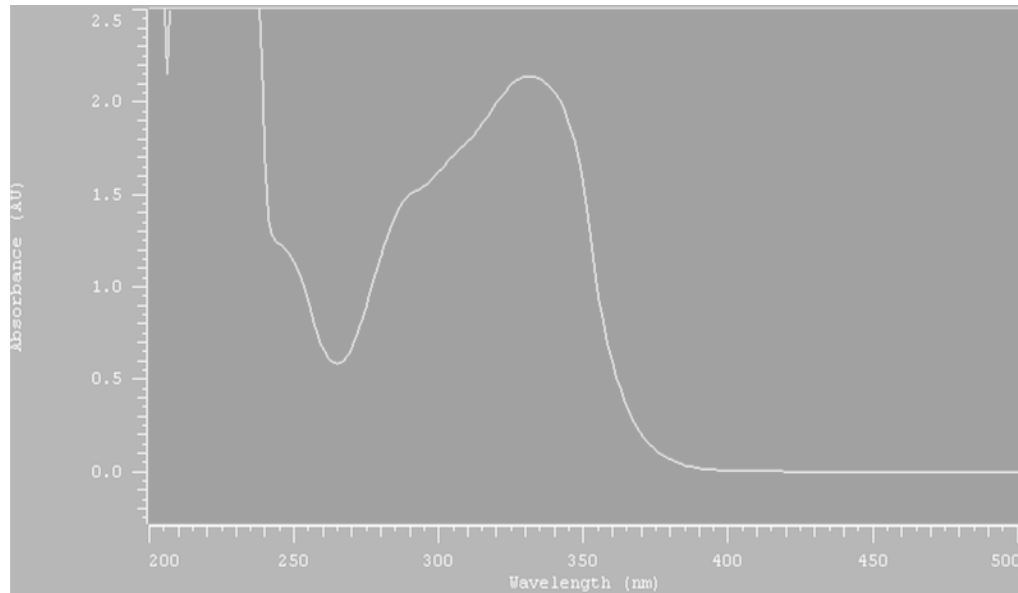
Table 22 <sup>1</sup>H-NMR spectrum for the isolated component **1** and **2**

moiety	Carbon position	<b>1</b> (isoverbascoside) <sup>1</sup> H(J)	<b>2</b> (verbascoside) <sup>1</sup> H(J)
Aglycone	1		
	2	6.73(d,2.1)	6.69(d,2)
	3		
	4		
	5	6.71(d,7.5)	6.83(d,8)
	6	6.64(dd,2.4,7.8)	6.62(dd,2,8)
	7	2.77(m), 2.75(m)	2.77(ddd,3.5,7,14), 2.77(ddd,3,7,14)
	8	3.72(m),3.76(m)	3.75(ddd,6.5,7,8), 4.03(ddd,3,6.5,8)
Glucose	1	4.43(d,8.1)	4.43(d,8)
	2	3.39(m)	3.39-3.81(dd,7.5,9.5)
	3		3.39-3.81 (t,9.3)
	4		<b>4.92(dd,7.5,9.5)</b>
	5		3.39-3.81(m)
	6	3.90(m)	3.39-3.81(m) 3.39-3.81(d,10)
Caffeic acid	1		
	2		
	3	7.09(d,2.1)	7.10(d,2)
	4		
	5	6.82(d,8.1)	6.73(d,8)
	6	7.01(dd,2.1,8.1)	7.02(dd,2,8)
	7	7.59(d,15.9)	7.59(d,16)
	8	6.30(d,15.9)	6.31(d,16)
	9		
Rhamnose	1	5.05(s)	5.07(d,2)
	2	3.37(m)	3.35(dd,2,3)
	3		
	4		
	5	3.91(m)	3.93(m)
	6	0.99(d,6)	0.99(d,6)

純化物質1 呈現白色結晶粉末，由UV-visible光譜 (圖八十五)  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 245, 290, 335 nm，與純化物質 2 同樣顯示苯環K band及B band的特徵吸收帶。由<sup>1</sup>H-NMR光譜(圖八十六，表二十二)，亦顯示與純化物質 2 極相近的質子波訊，同樣以glucosyl 基團為中心，接上phenyl ethanoxyl, rhamnosyl 及caffeoyl 等基團，再由<sup>1</sup>H-NMR及LC/MS/MS光譜解析與文獻比對(Gomez-Aguirre et al., 2012；洪，2012)，鑑定出純化物質 2 的 caffeoyl 基團不是接在glucosyl C-4(無J4.92之質子波訊)，而是接在C-6 的isoverbascoside。

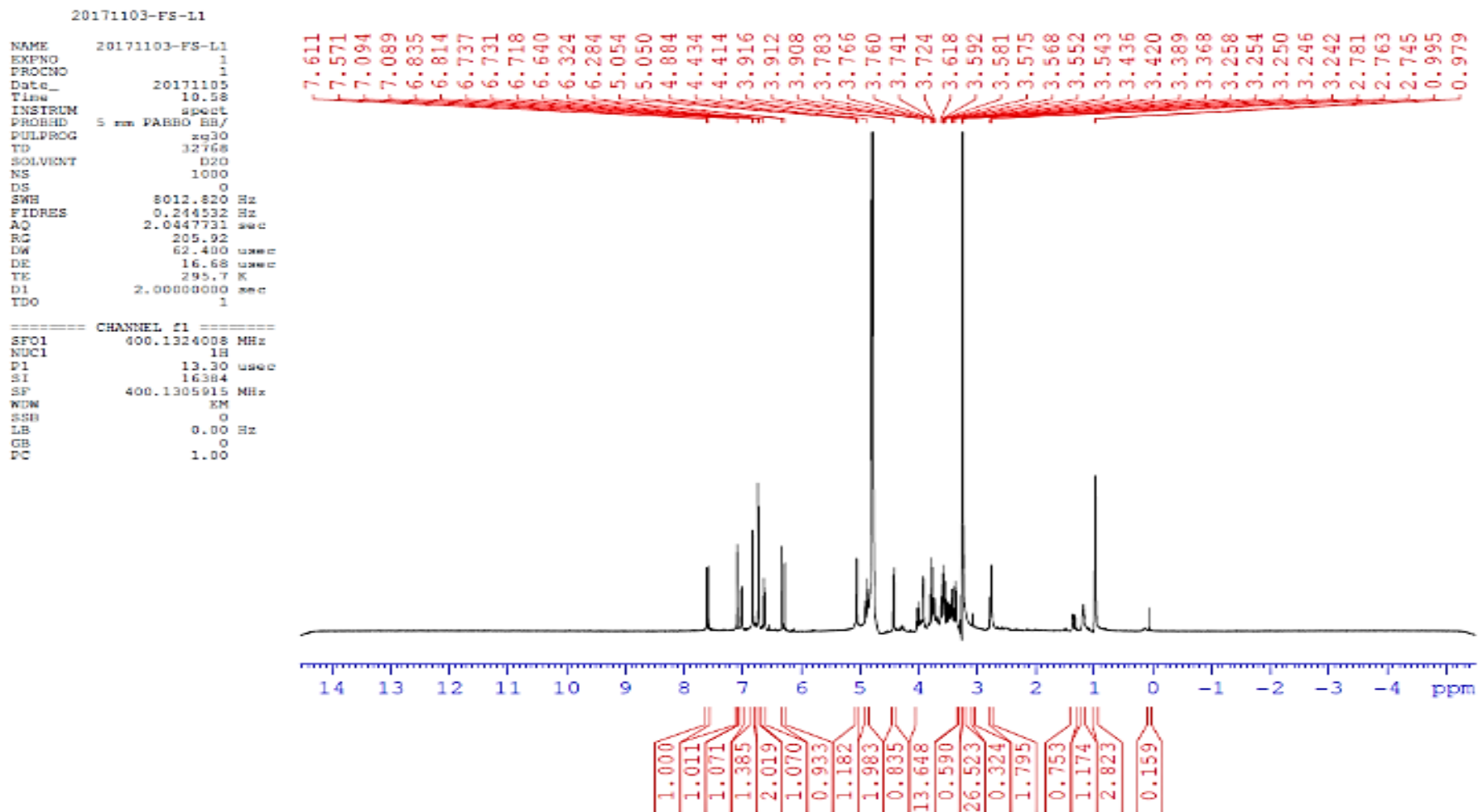
Cardinali A et al. (2012)研究發現isoverbascoside 具良好的抗氧化性，可做為天然抗氧化劑添加於食品中。Tang 等人(2008) 以MTT法，探討不同濃度的isoverbascoside 對小鼠骨髓來源樹突狀細胞增殖的影響。結果顯示isoverbascoside 可促進小鼠樹突狀細胞的增殖，isoverbascoside 在16 $\mu$ mol/L 濃度下與細胞因子共同作用時，可顯著刺激小鼠樹突狀細胞的增殖。細胞實驗證實，可抑制人類胃癌MGc80-3 細胞生長及造成MGc80-3 細胞株的分化 (Chen et al., 2002)。MGc80-3 細胞經20  $\mu$ mol/L 抗氧化劑isoverbascoside 處理後，細胞生長曲線與分裂指數顯著下降，生長抑制率達57.8%。且改變MGc80-3 細胞的惡性表型特徵，具有明顯的誘導分化作用 (李等，1995)。同樣 HL-60 細胞經5 $\mu$ mol/L 劑量的isoverbascoside 處

理後，細胞生長顯著受到抑制，生長抑制率達到34.5% (Wang et al.,1999)。



圖七十四、檸檬馬鞭草水萃物純化物質 **1** 之紫外-可見光光譜。

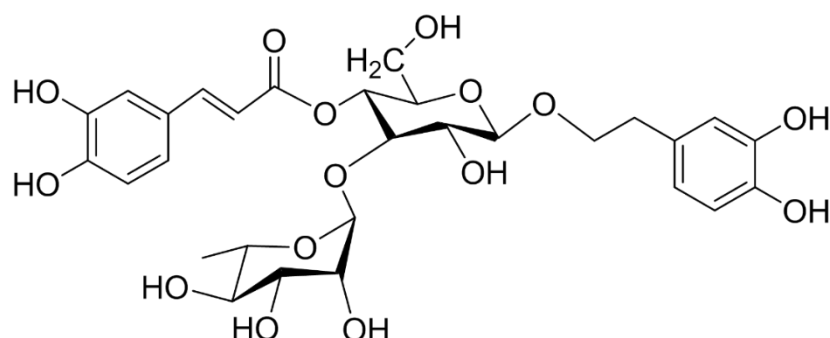
Fig 74 UV-visible spectrum of the isolated component **1** from water extract of *Aloysia triphylla*.



圖七十五、檸檬馬鞭草水萃物純化物質 **1** 之  $^1\text{H-NMR}$  光譜圖。

Fig 75  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of the isolated component **1** from water extract of *Aloysia triphylla*.

## (二) 純化物質 2 (verbascoside)之結構鑑定



UV  $\lambda$  max (MeOH) nm: 245,290,335

Formula : C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>O<sub>15</sub>

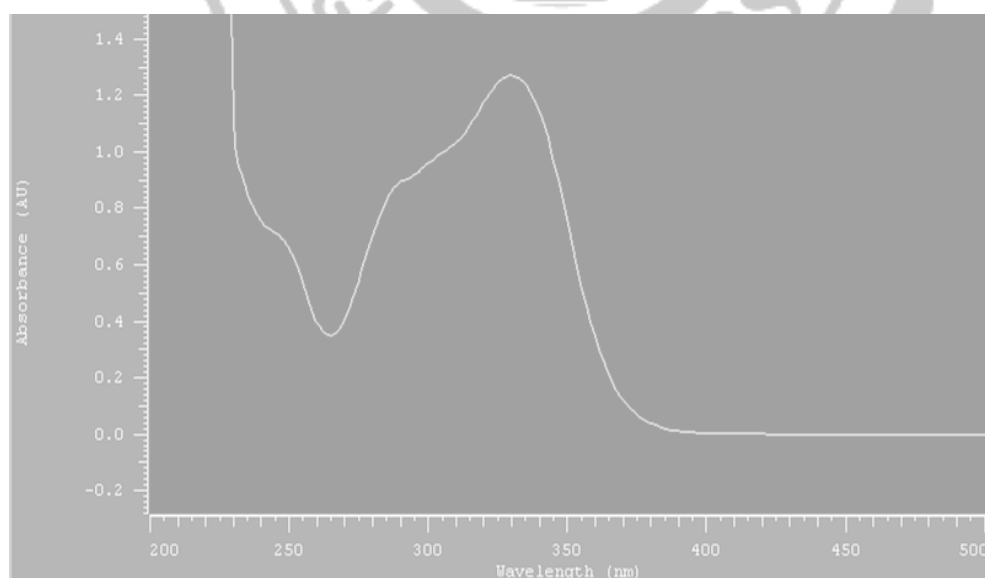
MS : 623 [ M-H ]<sup>+</sup>

MS/MS%:461(100)

純化物質 2 呈現白色結晶粉末，由 UV-visible 光譜(圖八十七)  $\lambda$  max (MeOH) 245, 290, 335 nm，同樣顯示苯環K band及B band 的特徵吸收帶，由<sup>1</sup>H-NMR光譜(圖八十八，表二十二) 在低磁場領域顯示二組苯環ABX三取代的三個質子波訊， $\delta$  6.62 (1H, d d, J=2, 8 Hz), 6.69(1H, d, J=2 Hz), 6.83(1H, d, J=8 Hz) 及 6.73 (1H, d, J=8), 7.02 (1H, d d, J=2, 8Hz), 7.59 (7.06, d d, J=2 Hz), 另外6.28 (1H, d, J=16 Hz) 及 7.59 (1H, d, J=16 Hz) 則為caffeoyl 基團trans-form 雙鍵上的二個質子波訊，較高磁場醣基的部分  $\delta$  4.37 (1H, d, J=8), 5.19 (1H, d, J=2) 分別為glucosyl及rhamnosyl H-1 的質子波訊， $\delta$  3.39-  $\delta$  4.92則為glucosyl及rhamnosyl的10個質子波訊， $\delta$  1.09則為rhamnosyl上甲基的質子波訊，其中glycosyl H-4的質子波訊從  $\delta$  3.5 shift到  $\delta$  4.92，推測

接上caffeoyl基團，再透過<sup>1</sup>H-NMR及LC/MS/MS光譜解析與文獻比對 (Gomez-Aguirre et al., 2012；洪，2012)，純化物質 **2** 的結構鑑定為verbascoside。

Verbascoside為苯乙醇苷類化合物，是馬鞭草主要成分之一，研究指出verbascoside具有明顯的體內外抗疲勞活性和提高小鼠運動能力的作用(中科院昆明植物研究所，2008)。另外有學者指出verbascoside在16μmol/L濃度與細胞因子一齊作用時，同樣可以直接促進小鼠骨髓來源樹突狀細胞的增殖，而且與細胞因子有明顯的協同作用 (Tang et al., 2008)。在體外實驗中發現外加verbascoside確實具有抑制血小板凝集之能力(Campo et al., 2012)。其他研究亦發現verbascoside具良好的抗氧化性 (Cardinali A et al., 2012)。



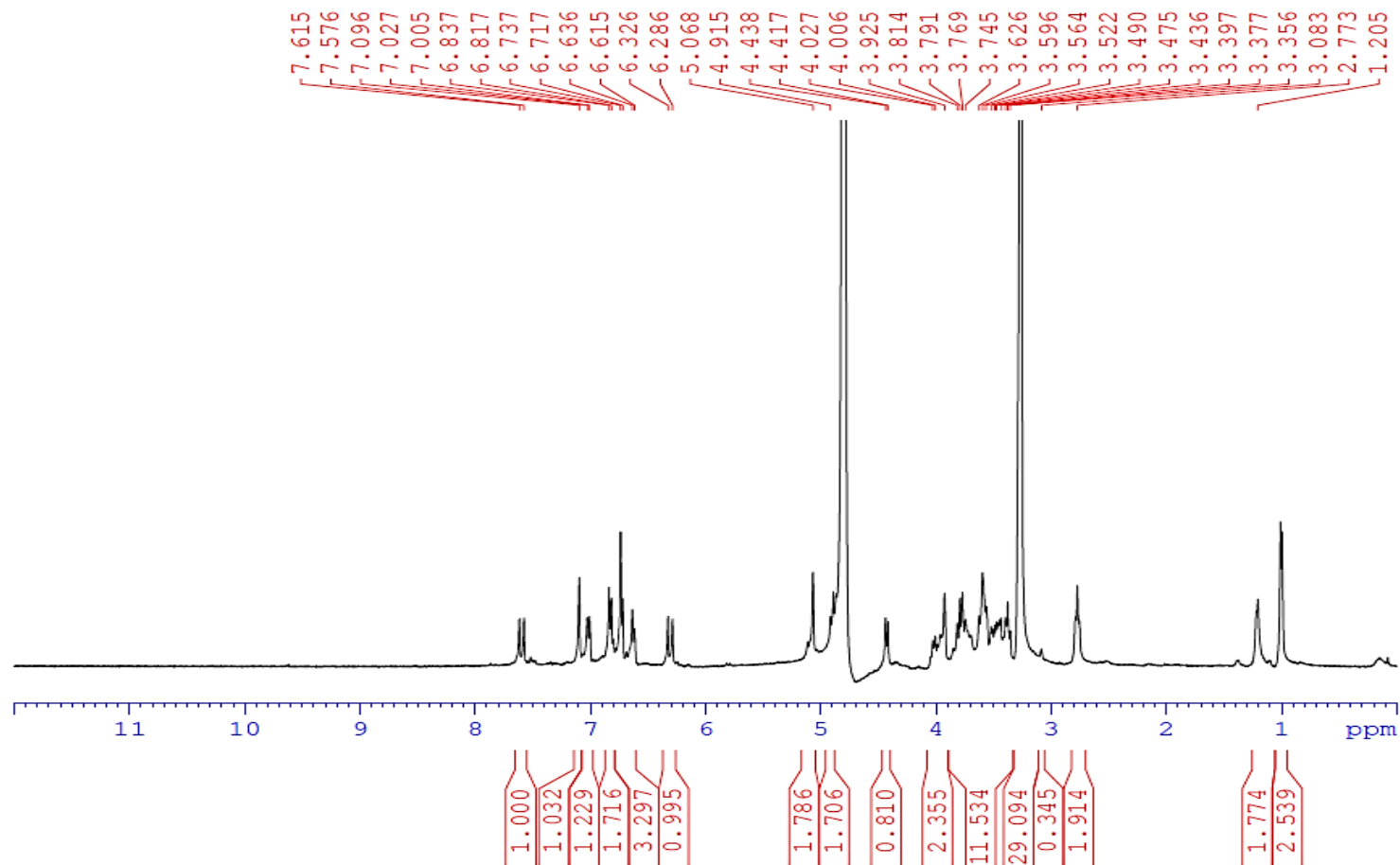
圖七十六、檸檬馬鞭草水萃物純化物質 **2** 之紫外-可見光光譜。

Fig 76 UV-visible spectrum of the isolated component **1** from water extract of *Aloysia triphylla*.

```

20171103-FS-L2
NAME      20171103-FS-L2
EXPNO     1
PROCNO    1
Date_     20171105
Time      9.46
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm PABBO BB/
PULPROG   zg30
TD        32768
SOLVENT   D2O
NS        1000
DS        0
SWH       8012.820 Hz
FIDRES    0.244532 Hz
AQ        2.0447731 sec
RG        205.92
DW        62.400 usec
DE        16.68 usec
TE        295.5 K
D1        2.00000000 sec
TDO       1
===== CHANNEL f1 =====
SFO1      400.1324008 MHz
NUC1       1H
P1        13.30 usec
SI        16384
SF        400.1305860 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        0.00 Hz
GB        0
PC        1.00

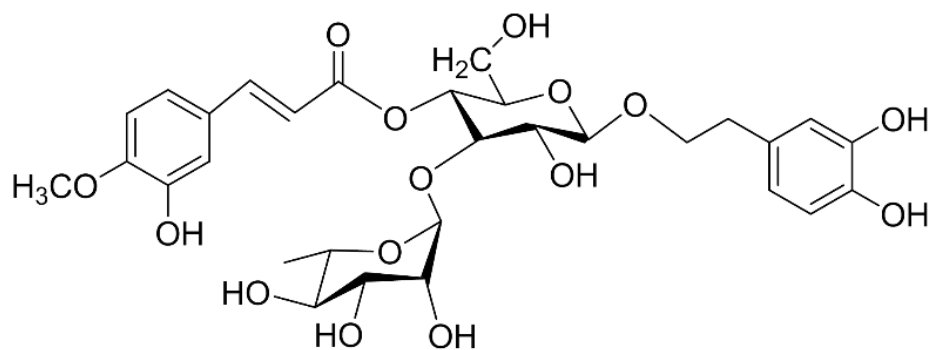
```



圖七十七、檸檬馬鞭草水萃物純化物質 **2** 之 <sup>1</sup>H-NMR 光譜圖。

Fig 77 <sup>1</sup>H-NMR spectrum for of isolated component **2** from water extract of *Aloysia triphlha*.

### (三) 純化物質 3 (eukovoside)之結構鑑定



UV  $\lambda$  max (MeOH) nm: 245, 290, 325

Formula : C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>O<sub>16</sub>

MS : 637 [ M-H ]<sup>+</sup>

MS/MS(%):491(8),475(6),461(100),265(5)

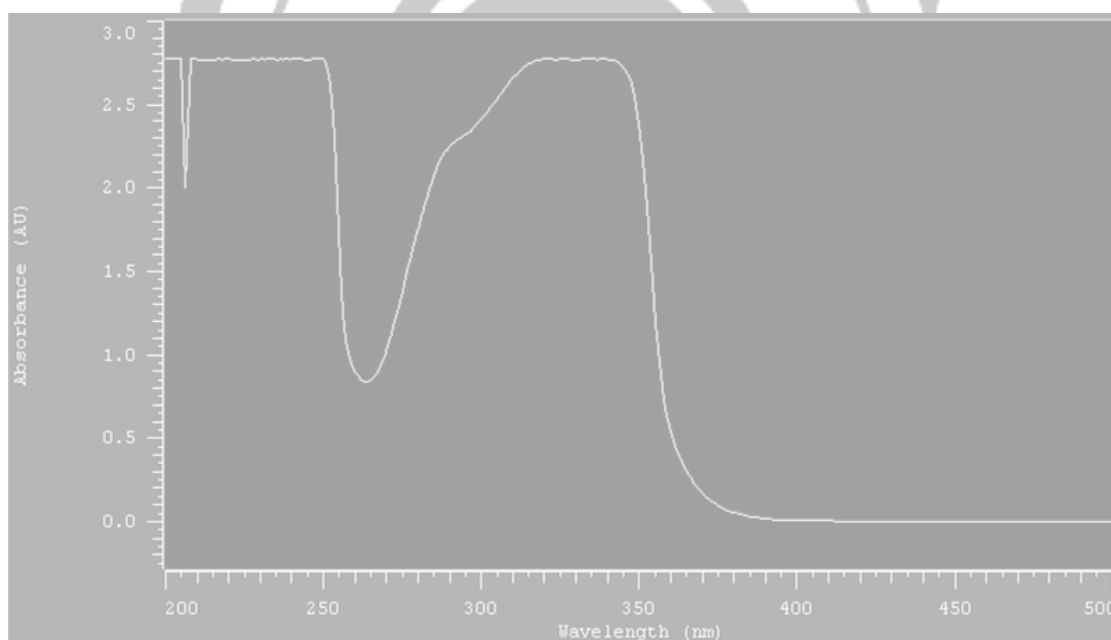
<sup>1</sup>H-NMR(400MHz, D<sub>2</sub>O+methanol-d<sub>4</sub>):  $\delta$

1.09 (rha CH<sub>3</sub>, d, J=6.3 Hz), 2.77 (agl H-7, m), 3.83 (fer OCH<sub>3</sub>, s), 3.03, 4.94 (glc, rha, 10 protons), 4.34 (glc H-1, d, J=8.1 Hz), 4.91 (agl H-7, d, m), 5.17 (rha H-1, d, J=1.5 Hz), 6.28 (fer H-8', d, J=15.9 Hz), 6.53 (agl H-6, dd, J=1.8, 8.1 Hz), 7.03 (fer H-2', d, J=1.8 Hz), 7.55 (fer H-7, d, J=15.9 Hz)

純化物質**3** 為白色粉末，UV-visible光譜(圖八十九)  $\lambda$  max: 245, 290, 325nm顯示苯環上K band及B band的特徵吸收帶，<sup>1</sup>H-NMR(圖九十)顯示與純化物質**1** 和 **2** 亦十分相近，唯一有差異的是顯是有一 phenyl OCH<sub>3</sub>( $\delta$ 3.83)，因此推測其結構亦是以 glucosyl 基團為中心，在C-1，C-3，C-4 位置上接上 phenylethoxy，rhamnosyl及feruloyl 的 eukovoside.

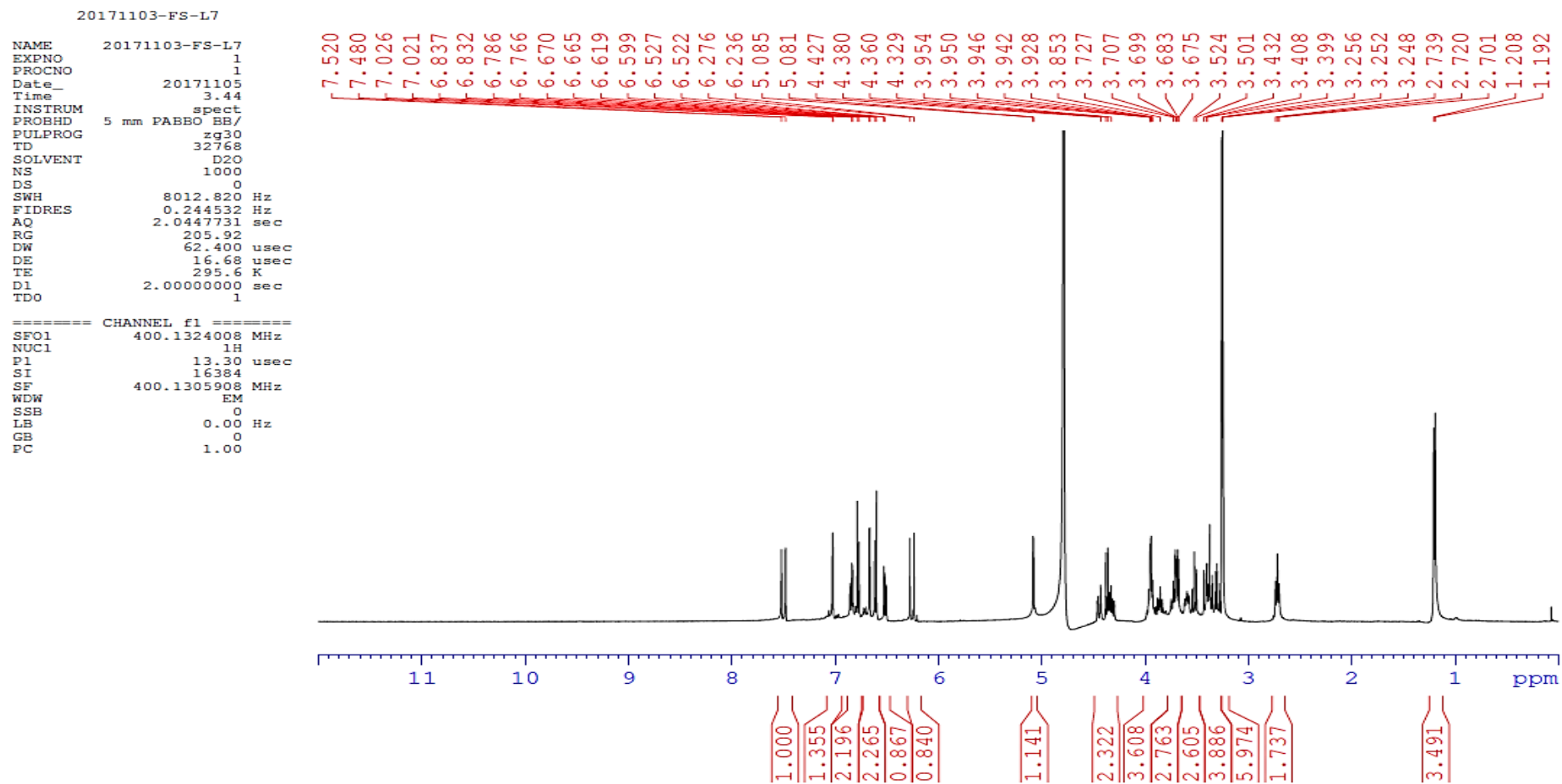


研究指出在兩種神經性疼痛動物模型中通過體內爪壓力試驗來測 eukovoside 的抗痛覺過敏活性：慢性坐骨神經壓迫損傷（CCI）或碘乙酸鈉（MIA）誘導之外周性單神經病，結果顯示 eukovoside 具有良好之抗痛覺及抗過敏之活性(Benedetta Isacchi et al., 2011)。小鼠口服 eukovoside 之後，並檢測其血漿，發現其MDA產生量下降，且血漿鐵還原能力（FRAP值）以及最大超氧化物歧化酶活性（SOD）顯著上升，顯示 eukovoside 對於小鼠體內具有抗氧化應激(oxidative stress)之作用(V.Micola et al., 2009)



圖七十八、檸檬馬鞭草水萃物純化物質 **3** 之紫外-可見光光譜。

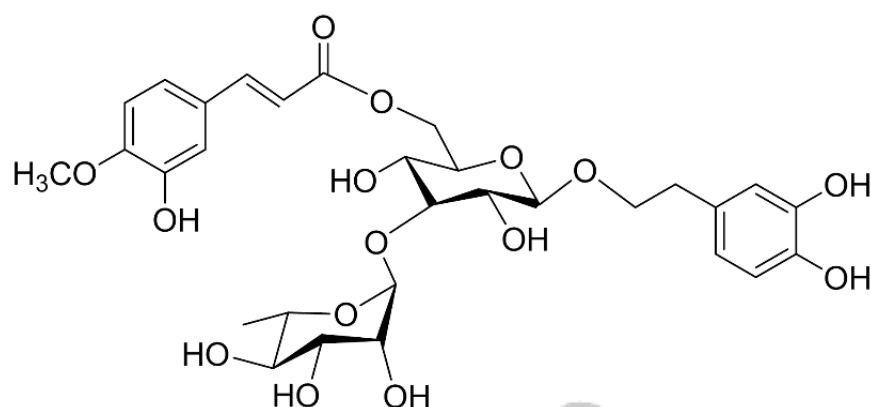
Fig 78 UV-visible spectrum of the isolated component **3** from water extract of *Aloysia triphylla*.



圖七十九、檸檬馬鞭草水萃物純化物質 **3** 之  $^1\text{H-NMR}$  光譜圖。

Fig 79  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of the isolated component **3** from water extract of *Aloysia triphlla*.

#### (四) 純化物質 4 (eukovoside isomer)之結構鑑定



UV  $\lambda$  max (MeOH) nm: 245, 290, 325

Formula : C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>O<sub>16</sub>

MW: 638 [M]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H -NMR(300MHz, D<sub>2</sub>O+methanol-d<sub>4</sub>):  $\delta$

1.09 (rha CH<sub>3</sub>, d, J=6.3 Hz), 2.77 (agl H-7, m), 3.83 (fer OCH<sub>3</sub>, s), 3.03, 4.94 (glc, rha, 10 protons), 4.34 (glc H-1, d, J=8.1 Hz), 4.91 (agl H-7, d, m), 5.17 (rha H-1, d, J=1.5 Hz), 6.28 (fer H-8', d, J=15.9 Hz), 6.53 (agl H-6, dd, J=1.8, 8.1 Hz), 7.03 (fer H-2', d, J=1.8 Hz), 7.55 (fer H-7, d, J=15.9 Hz)

純化物質 4，由 UV-visible 光譜(圖九十一)  $\lambda$  max (MeOH)

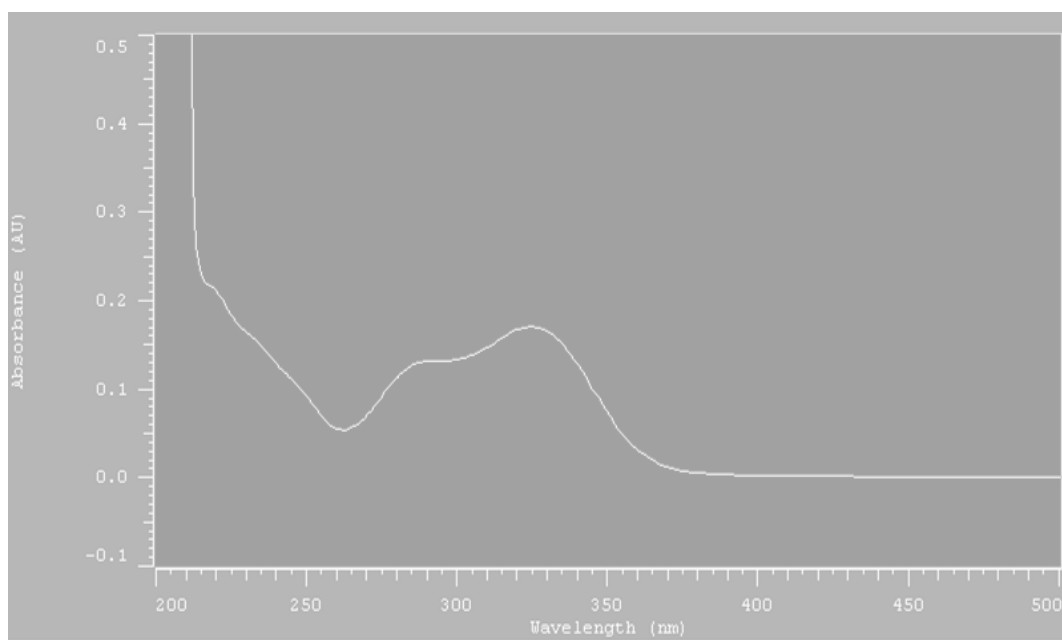
245, 290, 335 nm，顯示苯環K band及B band的特徵吸收帶，測得<sup>1</sup>H-

NMR(圖九十二)光譜資訊，可觀測到<sup>1</sup>H -NMR  $\delta$  3.88的波訊，解析

為phenyl OCH<sub>3</sub>的質子，純化物質 4 與純化物質 3 之<sup>1</sup>H -NMR光

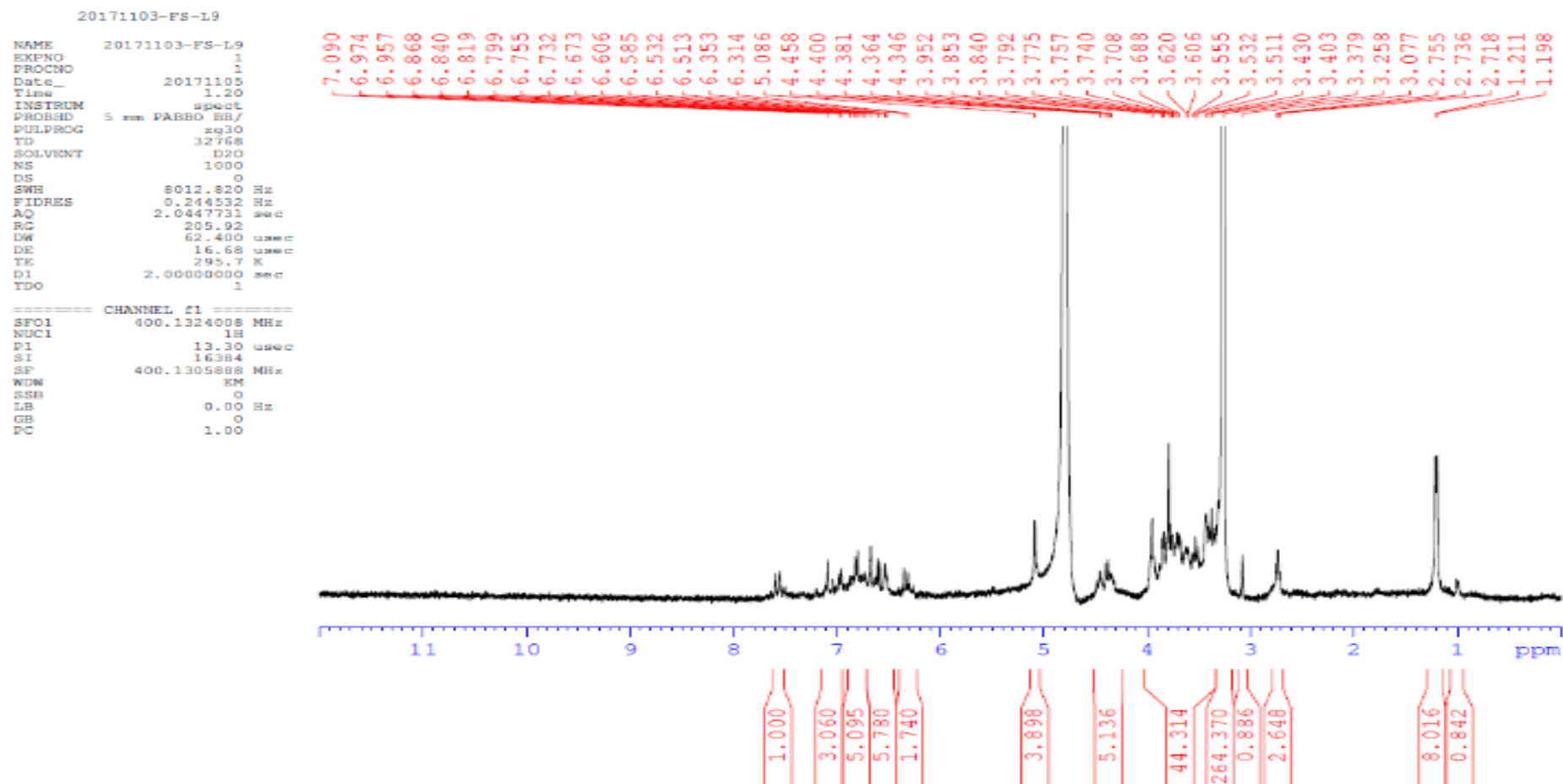
譜資訊幾乎完全一致，就現有光譜資訊只能推測純化物質 4 的結構

為eukovoside isomer。



圖八十、檸檬馬鞭草水萃物純化物質 **4** 之紫外-可見光光譜。

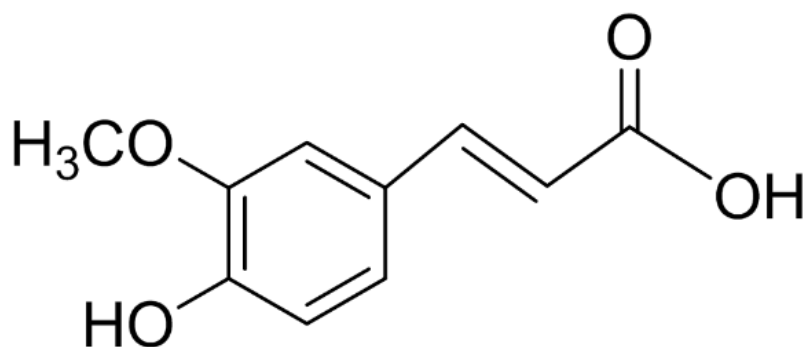
Fig 80 UV-visible spectrum of the isolated component **4** from water extract of *Aloysia triphylla*.



圖八十一、檸檬馬鞭草水提取物純化物質 **4** 之  $^1\text{H-NMR}$  光譜圖。

Fig 81  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of the isolated component **4** from water extract of *Aloysia triphlha*.

### (五) 純化物質 5 (ferulic acid)之結構鑑定



UV  $\lambda$  max (MeOH) nm: 245, 290, 325

Formula : C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>

MW: 194

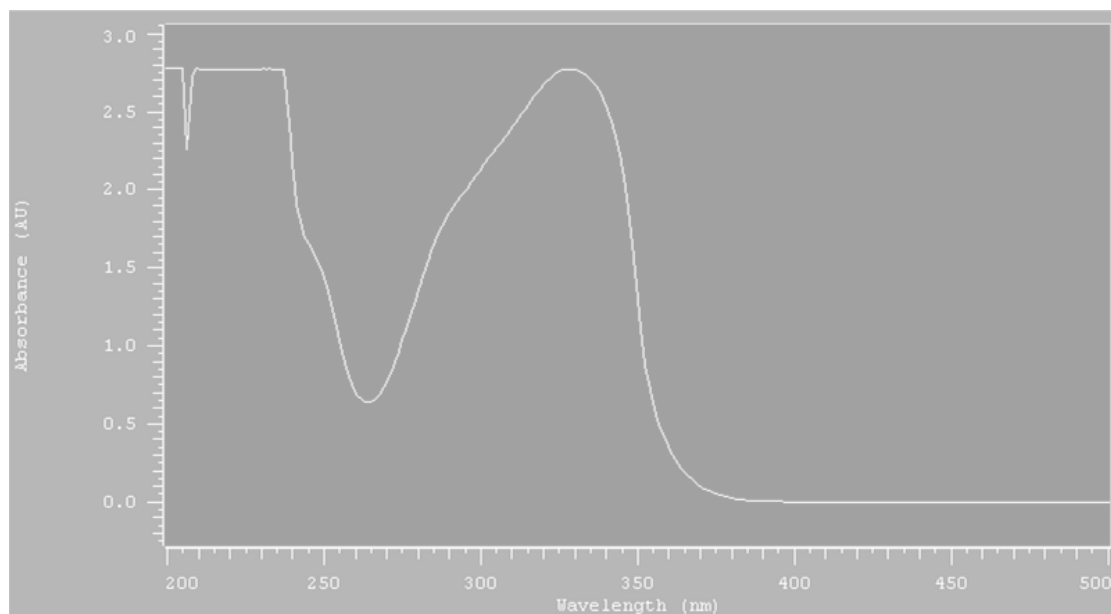
<sup>1</sup>H -NMR(400MHz, D<sub>2</sub>O+methanol-d<sub>4</sub>):  $\delta$

3.78(3H,s,fer OCH<sub>3</sub>),6.28(1H,d,J=16HZ,fer H-8),7.06(1H,d,J=2Hz,f,ferH-2),6.97(1H,d,J=2、8Hz,ferH-5),6.82(1H,d,J=8Hz, fer H-6),7.55(1H,d,J=16HZ,fer H-7)

純化物質 5，由 UV-visible 光譜(圖九十三)  $\lambda$  max (MeOH) 245, 290, 335 nm，顯示苯環K band及B band的特徵吸收帶，由<sup>1</sup>H - NMR光譜資訊(圖九十四)鑑定純化物質 5 結構為ferulic acid。

ferulic acid 可顯著降低利用羥基和過氧化氫自由基產生劑，誘導大鼠突觸體膜系統中之氧化應激反應所產生之脂質過氧化代謝物及活性氧物質(ROS)(D.AllanButterfielda et al., 2002)。利用佛波醇-12-十四烷醯-13-乙酸酯(TPA)誘導小鼠表皮產生促癌因子鳥胺酸脫羧酶並產生腫瘤細胞，研究顯示 ferulic acid 可有效抑制腫瘤細胞之

產生(Mou-Tuan Huang et al., 1998)。



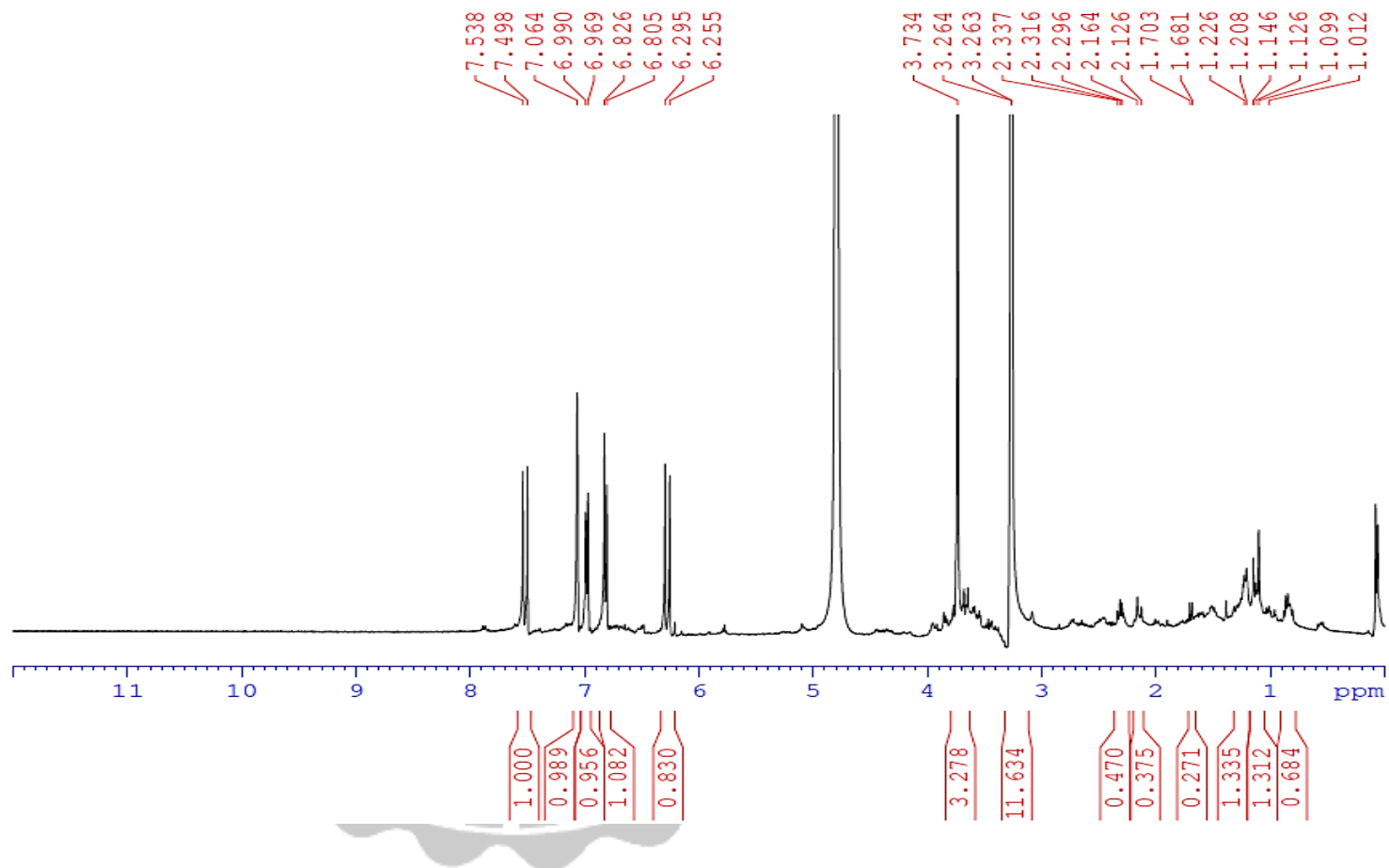
圖八十二、檸檬馬鞭草水取物純化物質 **5** 之紫外-可見光光譜。

Fig 82 UV-visible spectrum of the isolated component **5** from water extract of *Aloysia triphylla*.

```

20171103-FS-L4
NAME      20171103-FS-L4
EXPNO    1
PROCNO   1
Date_    20171105
Time     7.22
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm PABBO BB/
PULPROG  zg30
TD       32768
SOLVENT  D2O
NS       1000
DS       0
SWH      8012.820 Hz
FIDRES   0.244532 Hz
AQ       2.0447731 sec
RG       205.92
DW       62.400 usec
DE       16.68 usec
TE       295.6 K
D1       2.00000000 sec
TDO      1
===== CHANNEL f1 =====
SFO1     400.1324008 MHz
NUC1     1H
P1       13.30 usec
SI       16384
SF       400.1305862 MHz
WDW      EM
SSB      0
LB       0.00 Hz
GB       0
PC       1.00

```

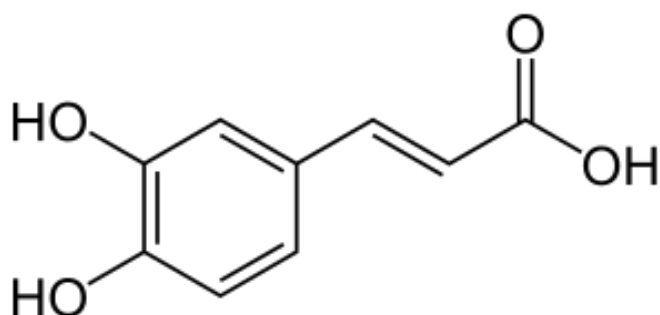


圖八十三、檸檬馬鞭草水萃物純化物質 **5** 之  $^1\text{H-NMR}$  光譜圖。

Fig 83  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of the isolated component **5** from water extract of *Aloysia triphylla*.



## (六) 純化物質 6 (caffeic acid)之結構鑑定



UV  $\lambda$  max (MeOH) nm: 245, 290, 325

Formula : C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>

MW: 180

<sup>1</sup>H -NMR(400MHz, D<sub>2</sub>O+methanol-d<sub>4</sub>):  $\delta$

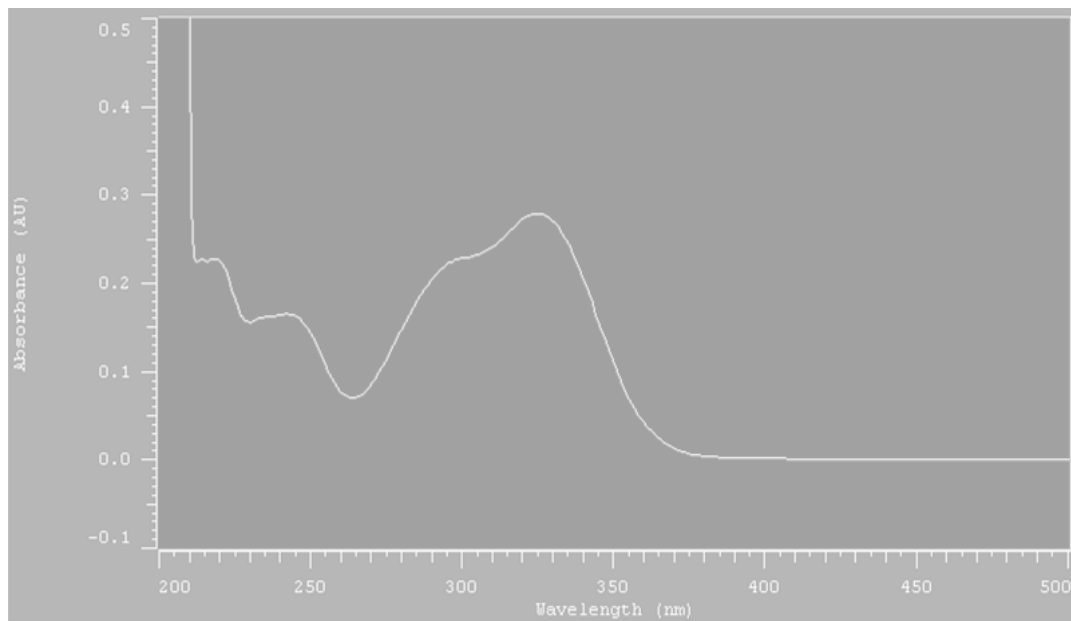
7.54(1H,d,J=16Hz,H-7), 7.08(1H,d,J=2,0Hz), 7.01(1H,d,d,  $\delta$ =2,8Hz),

6.83(H,d,J=8Hz,H-5), 6.30(H,d,J=16Hz,H-8),

純化物質 6，由 UV-visible 光譜(圖九十五)  $\lambda$  max (MeOH) 245, 290, 335 nm，顯示苯環K band及B band的特徵吸收帶，再由<sup>1</sup>H - NMR光譜資訊(圖九十六)，純化物質 6 之結構鑑定結構為caffeic acid。

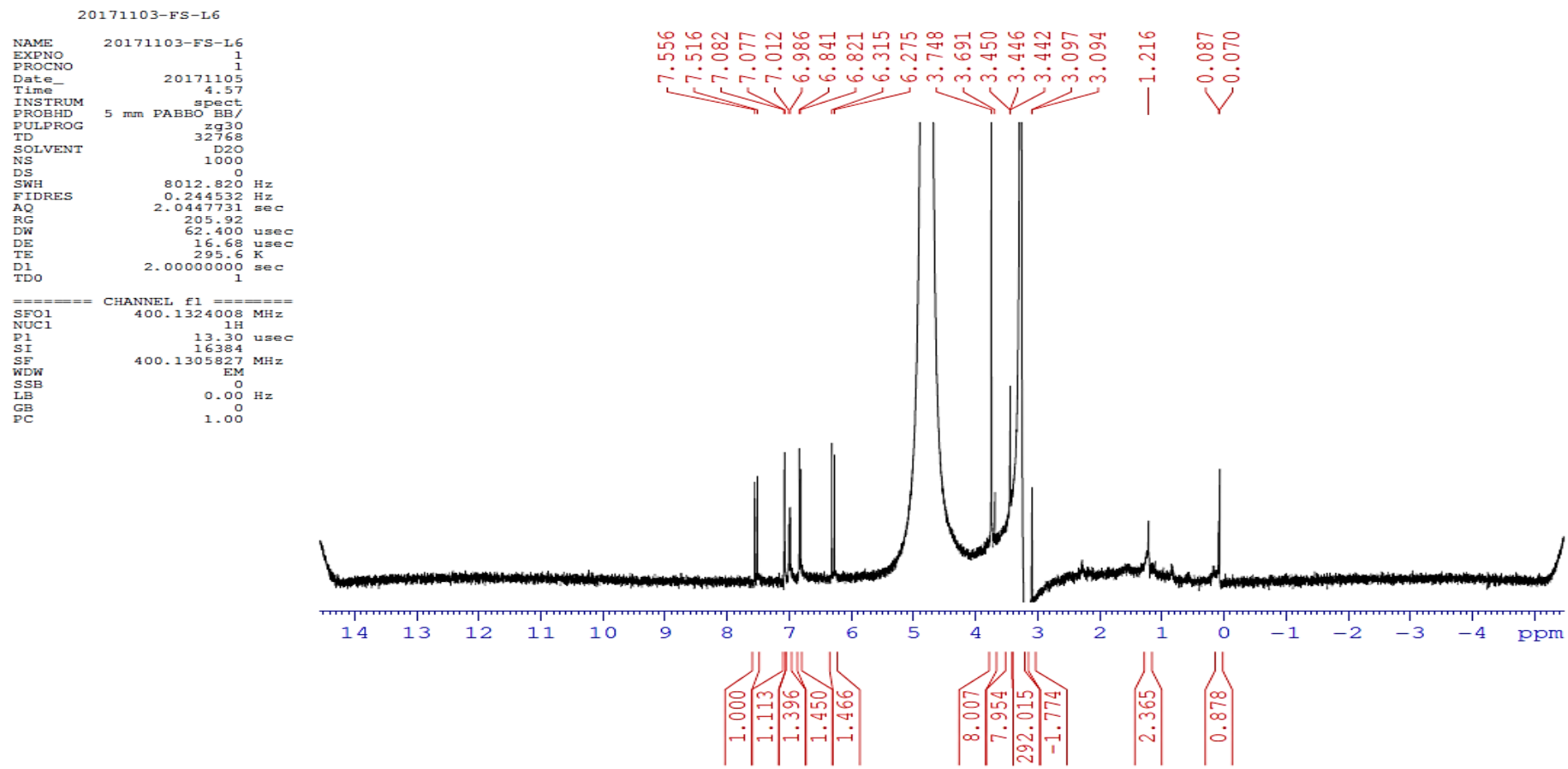
Caffeic acid 對於體外之抗氧化試驗ABTS自由基清除率、DPPH 自由基清除率、硫氰酸鐵法測定總抗氧化活性、鐵氰化鉀還原法總還原能力、超氧陰離子自由基清除和金屬螯合活性，皆表現出良好之抗氧化活性。(Gülçin, 2005)。利用佛波醇-12-十四烷醯-13-乙酸

酯(TPA)誘導小鼠表皮產生促癌因子鳥氨酸脫羧酶並產生腫瘤細胞，研究顯示 caffeic acid 可有效抑制腫瘤細胞之產生(Mou-Tuan Huang et al., 1998)。



圖八十四、檸檬馬鞭草水萃物純化物質 **6** 之紫外—可見光光譜。

Fig 84 UV-visible spectrum of the isolated component 6 from water extract of *Aloysia triphylla*.



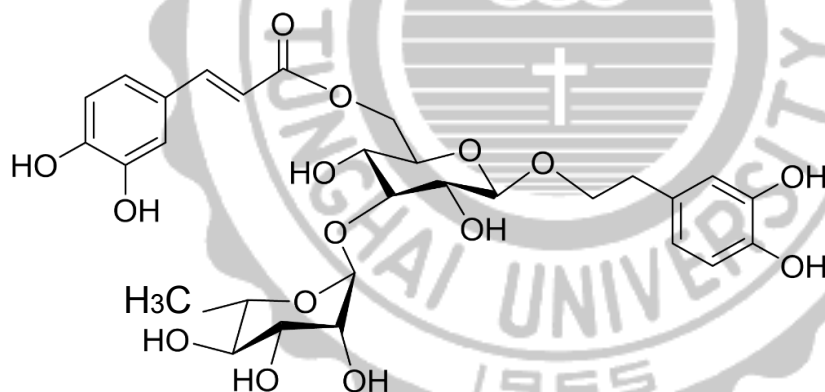
圖八十五、檸檬馬鞭草水萃物純化物質 **6** 之  $^1\text{H-NMR}$  光譜圖。

Fig 85  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of the isolated component **6** from water extract of *Aloysia triphylla*.

## 十一、鐵馬鞭草水萃取物純化物質之結構鑑定

參照檸檬馬鞭草 HPLC 之滯留時間及  $^1\text{H-NMR}$  圖譜，而鐵馬鞭草水萃取之純化物質亦和檸檬馬鞭草一樣鑑定出6種苯乙醇苷類化合物(phenyl ethanoid glycosides)，分別為 isoverbascoside(1)、verbascoside (2)、eukovoside (3)、eukovoside isomer (4)、ferulic acid(5)及caffeic acid(6)。

### (一) 純化物質 1 (isoverbascoside)之結構鑑定

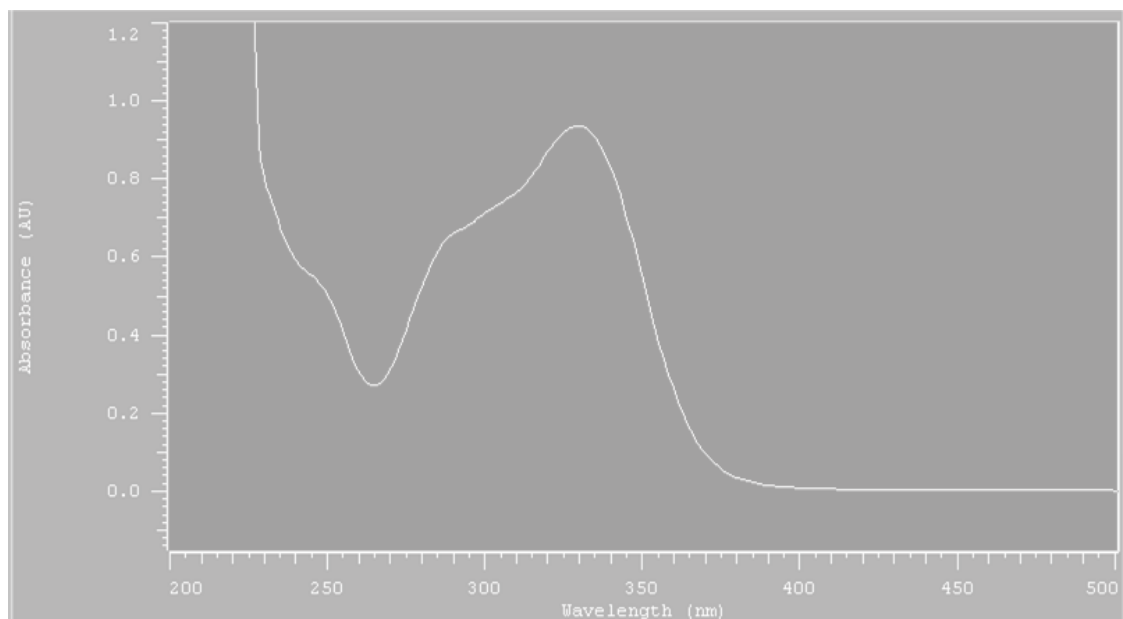


UV  $\lambda$  max (MeOH) nm: 290, 330

Formula :  $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_{15}$

MS : 623 [M-H]<sup>+</sup>

MS/MS(%):461(100)



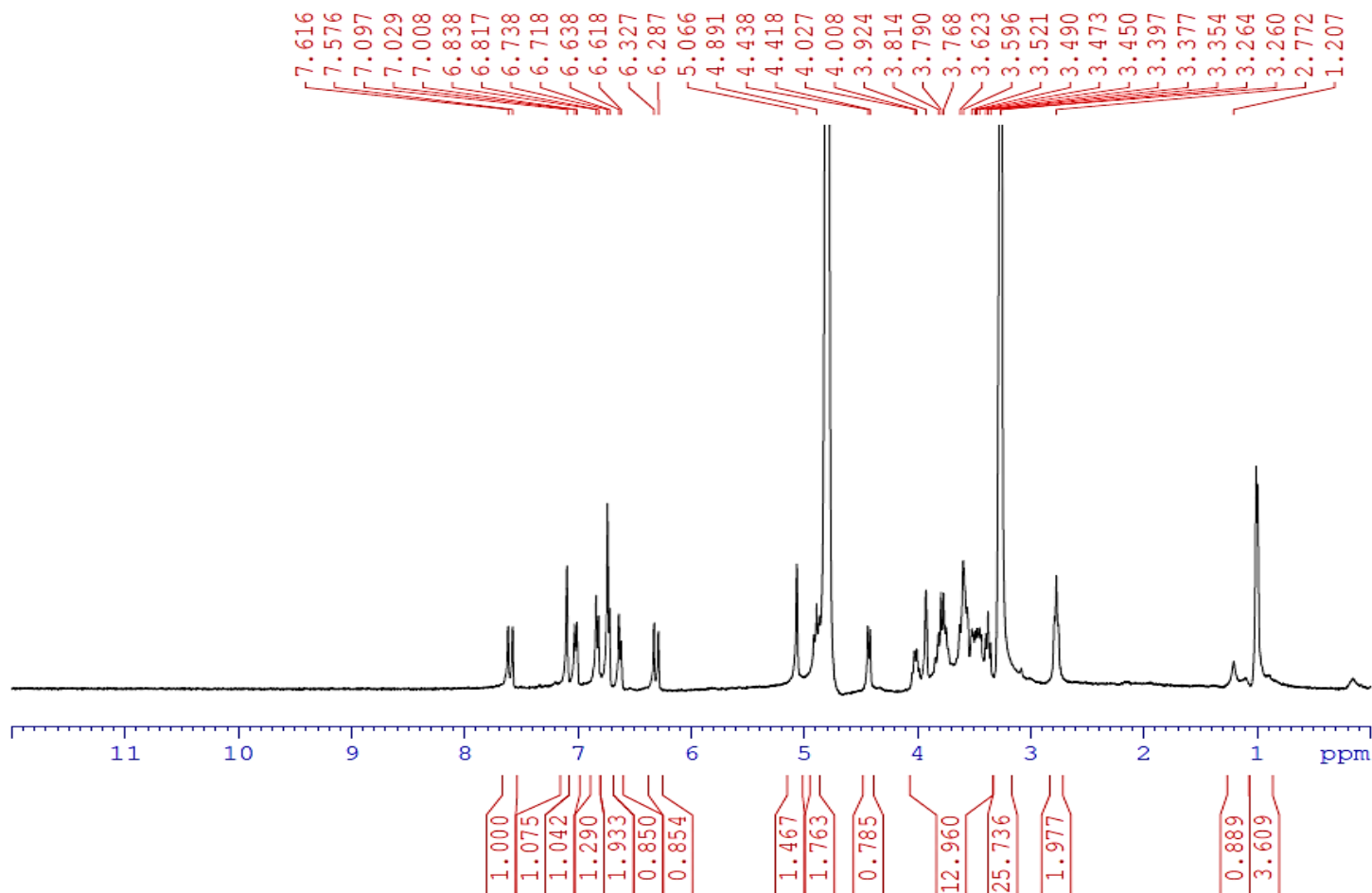
圖八十六、鐵馬鞭草水萃物純化物質 **1** 之紫外—可見光光譜。

Fig 86 UV-visible spectrum of the isolated component **1** from water extract of *Verbena officinalis*.

```

20171103-FS-F9
NAME      20171103-FS-F9
EXPNO     1
PROCNO    1
Date_     20171104
Time      10.56
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm PABBO BB/
PULPROG   zg30
TD         32768
SOLVENT   D2O
NS         1000
DS         0
SWH        8012.820 Hz
FIDRES     0.244532 Hz
AQ         2.0447731 sec
RG         205.92
DW         62.400 usec
DE         16.68 usec
TE         295.7 K
D1         2.00000000 sec
TDO        1
===== CHANNEL f1 =====
SFO1      400.1324008 MHz
NUC1       1H
P1         13.30 usec
SI         16384
SF         400.1305866 MHz
WDW        EM
SSB         0
LB         0.00 Hz
GB         0
PC         1.00

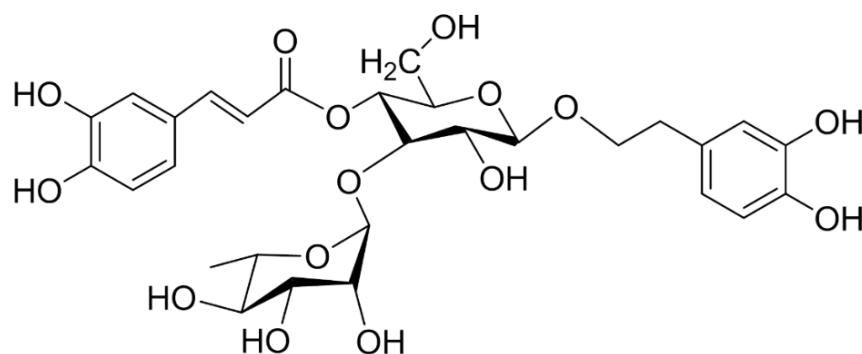
```



圖八十七、鐵馬鞭草水萃物純化物質 **1** 之 <sup>1</sup>H-NMR 光譜圖。

Fig 87 <sup>1</sup>H-NMR spectrum of the isolated component **1** from water extract of *Verbena officinalis*.

## (二) 純化物質 2 (verbascoside) 之結構鑑定

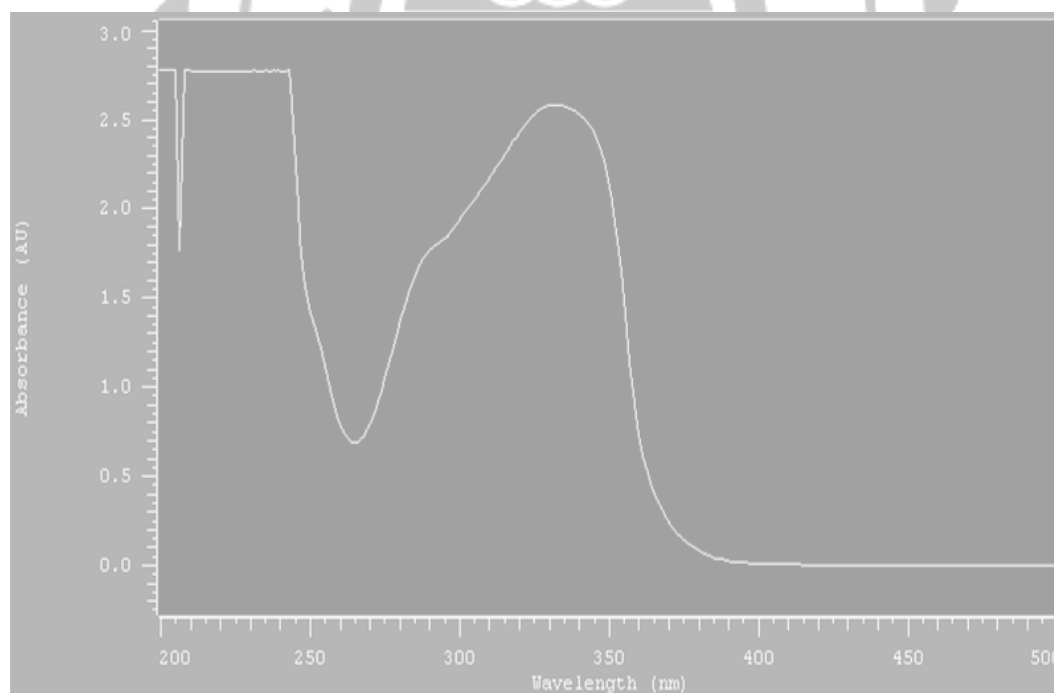


UV  $\lambda$  max (MeOH) nm: 245,290,335

Formula : C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>O<sub>15</sub>

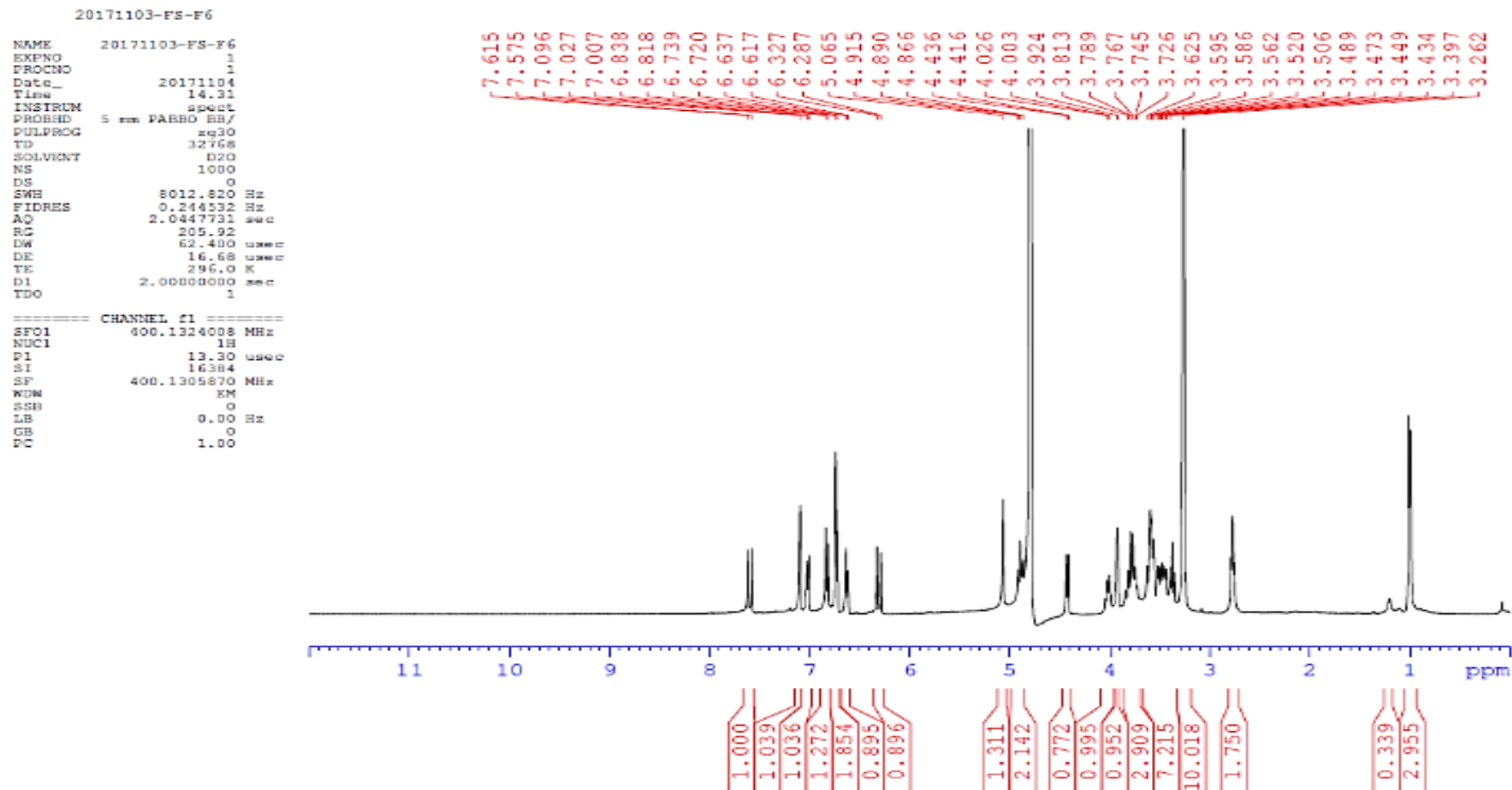
MS : 623 [ M-H ]<sup>+</sup>

MS/MS%:461(100)



圖八十八、鐵馬鞭草水萃物純化物質 2 之紫外—可見光光譜。

Fig 88 UV-visible spectrum of the isolated component 2 from water extract of *Verbena officinalis*.

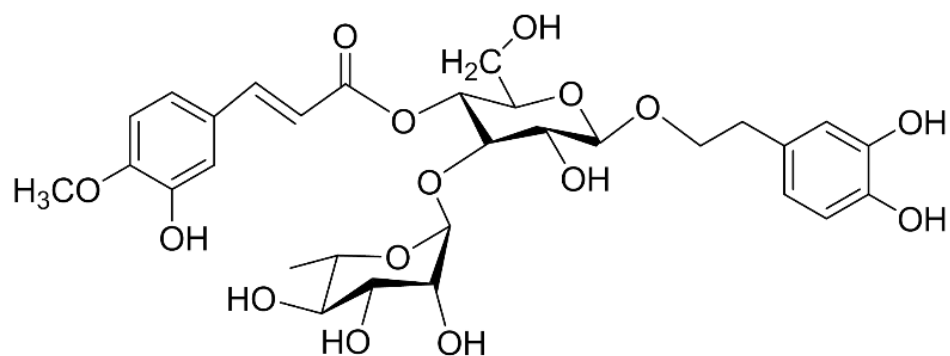


圖八十九、鐵馬鞭草水萃物純化物質 **2** 之  $^1\text{H-NMR}$  光譜圖。

Fig 89  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of the isolated component **2** from water extract of *Verbena officinalis*.



### (三) 純化物質 3 (eukovoside)之結構鑑定

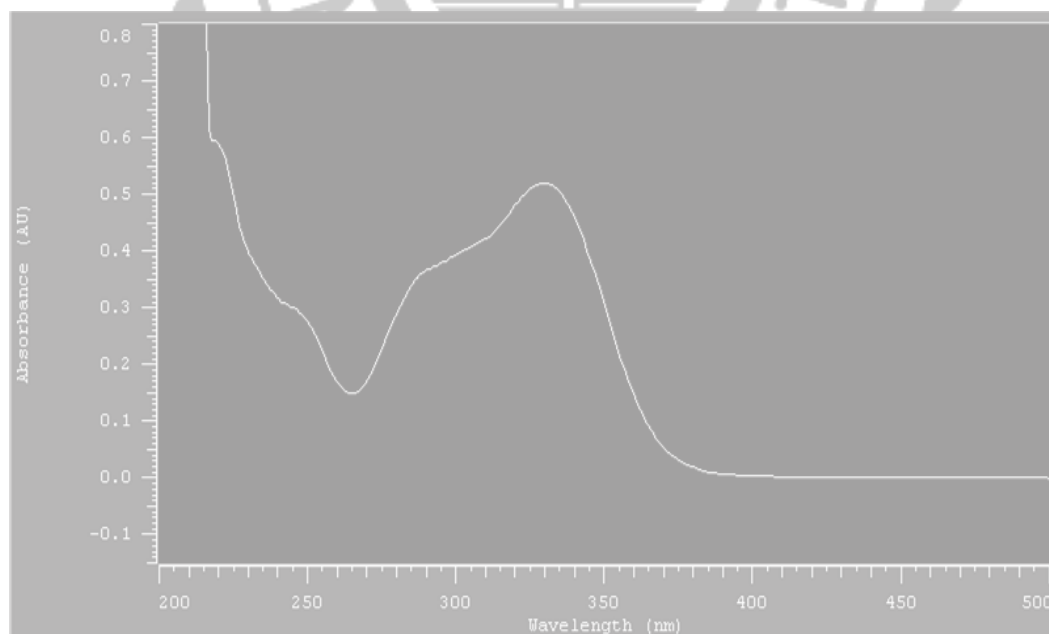


UV  $\lambda$  max (MeOH) nm: 245, 290, 325

Formula : C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>O<sub>16</sub>

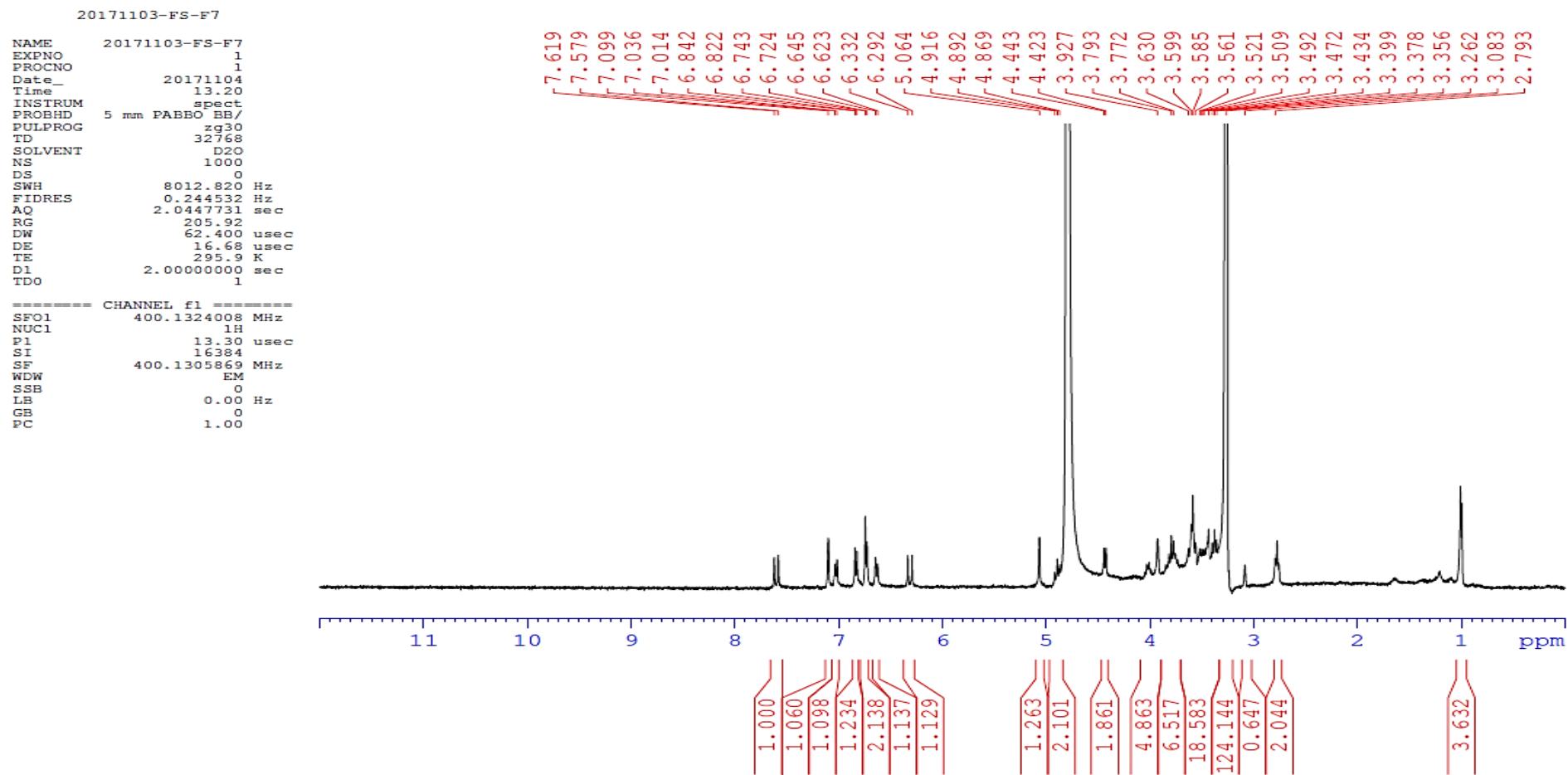
MS : 637 [M-H]<sup>+</sup>

MS/MS(%):491(8),475(6),461(100),265(5)



圖九十、鐵馬鞭草水萃物純化物質 3 之紫外-可見光光譜。

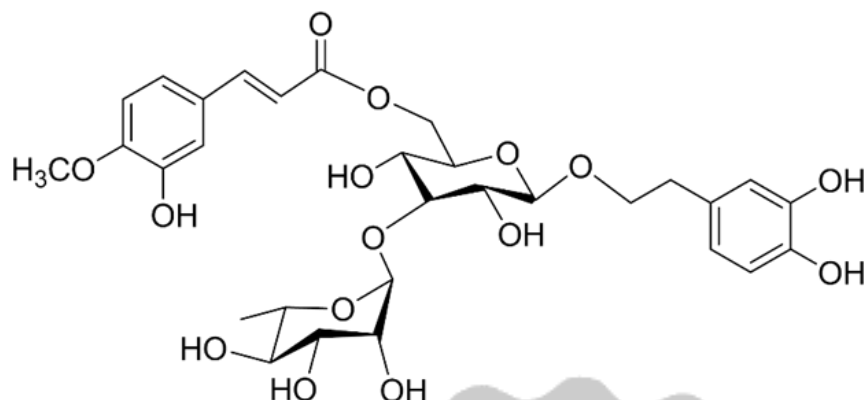
Fig 90 UV-visible spectrum of the isolated component 3 from water extract of *Verbena officinalis*.



圖九十一、鐵馬鞭草水萃物純化物質 **3** 之  $^1\text{H-NMR}$  光譜圖。

Fig 91  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of the isolated component **3** from water extract of *Verbena officinalis*.

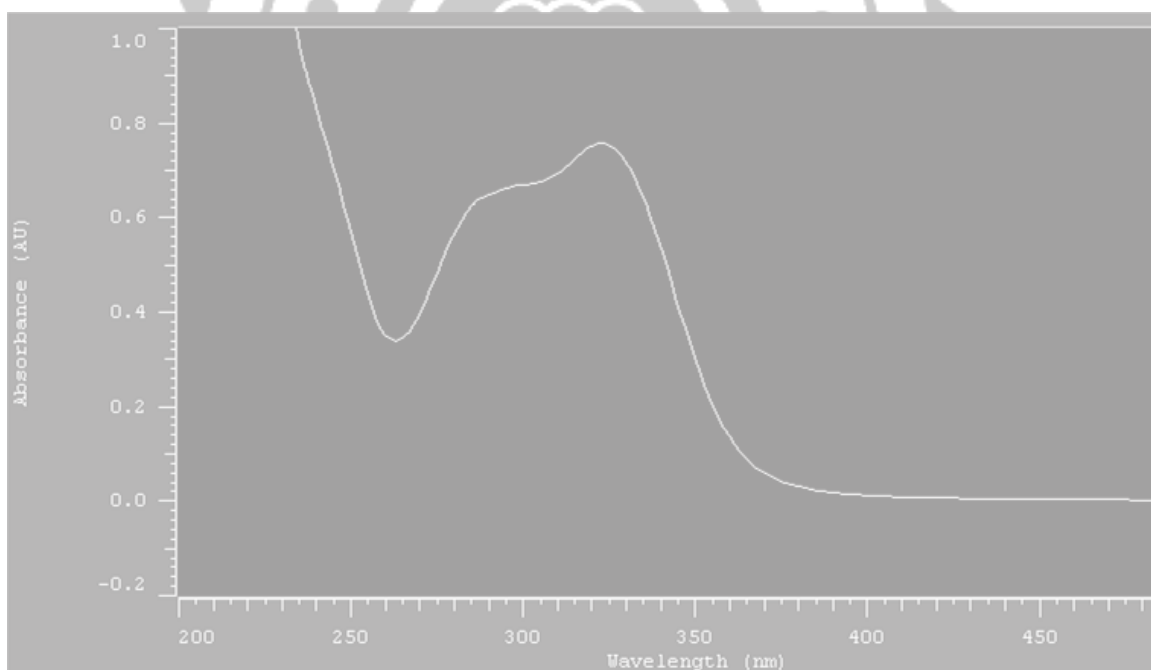
#### (四) 純化物質 4 (eukovoside isomer)之結構鑑定



UV  $\lambda$  max (MeOH) nm: 245, 290, 325

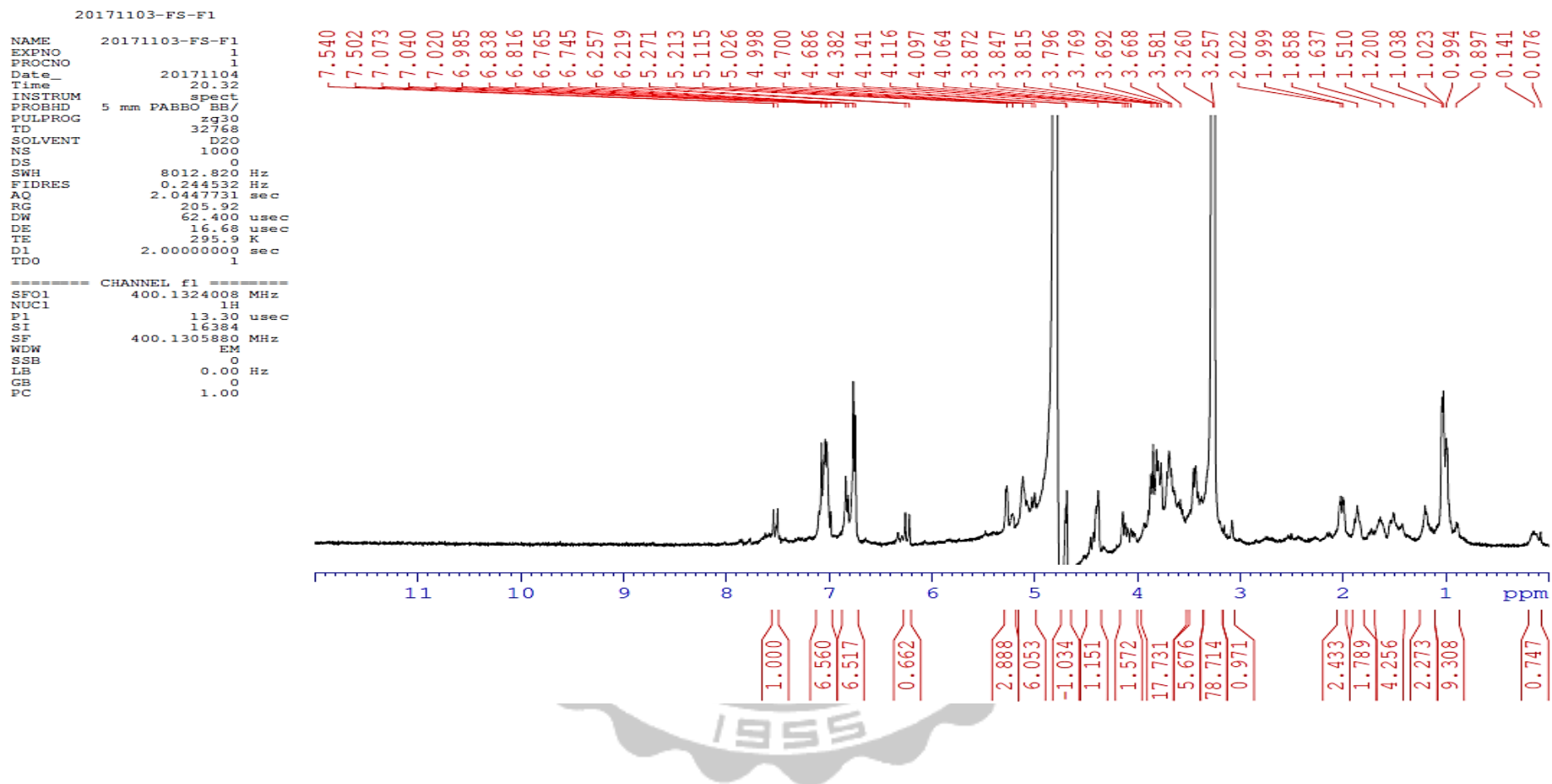
Formula : C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>O<sub>16</sub>

MW: 638



圖九十二、鐵馬鞭草水萃物純化物質 4 之紫外-可見光光譜。

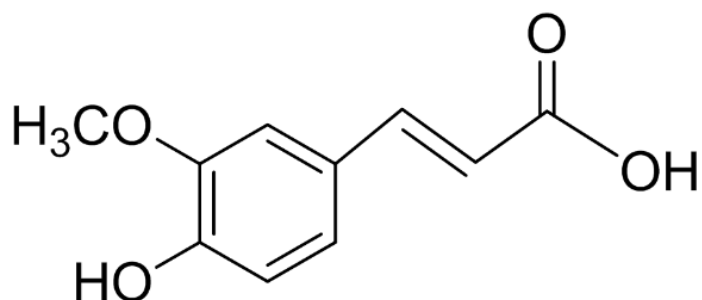
Fig 92 UV-visible spectrum of the isolated component 4 from water extract of *Verbena officinalis*.



圖九十三、鐵馬鞭草水萃物純化物質 4 之  $^1\text{H-NMR}$  光譜圖。

Fig 93  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of the isolated component from water extract of *Verbena officinalis*.

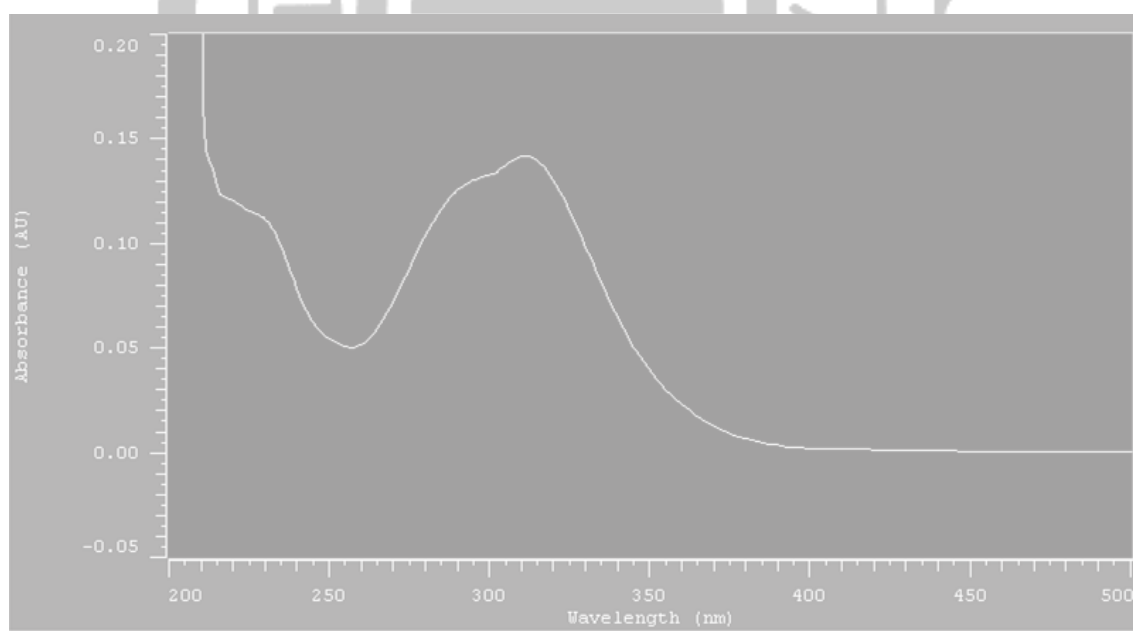
(五) 純化物質 5 (ferulic acid) 之結構鑑定



UV  $\lambda$  max (MeOH) nm: 245, 290, 325

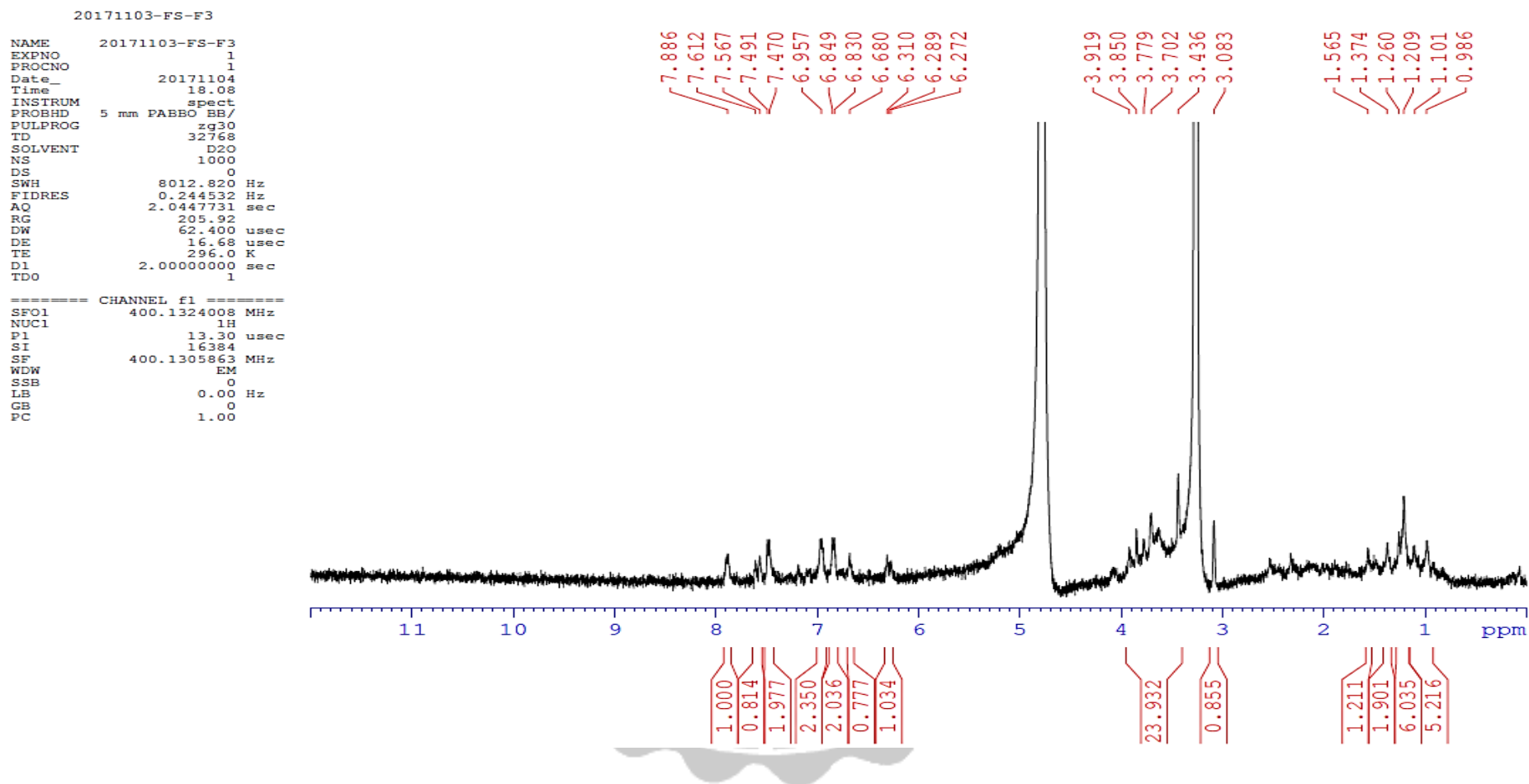
Formula : C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>

MW: 194



圖九十四、鐵馬鞭草水萃物純化物質 5 之紫外—可見光光譜。

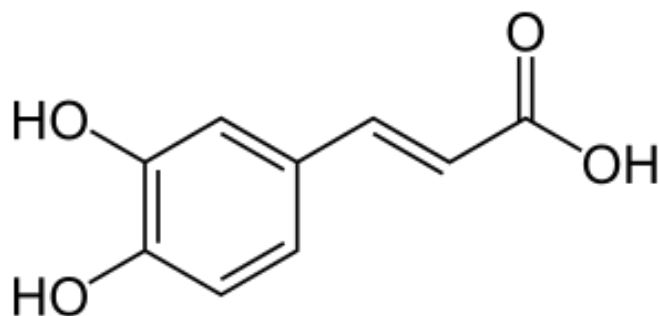
Fig 96 UV-visible spectrum of the isolated component 5 from water extract of *Verbena officinalis*.



圖九十五、鐵馬鞭草水萃物純化物質 **5** 之  $^1\text{H-NMR}$  光譜圖。

Fig 95  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of the isolated component **5** from water extract of *Verbena officinalis*.

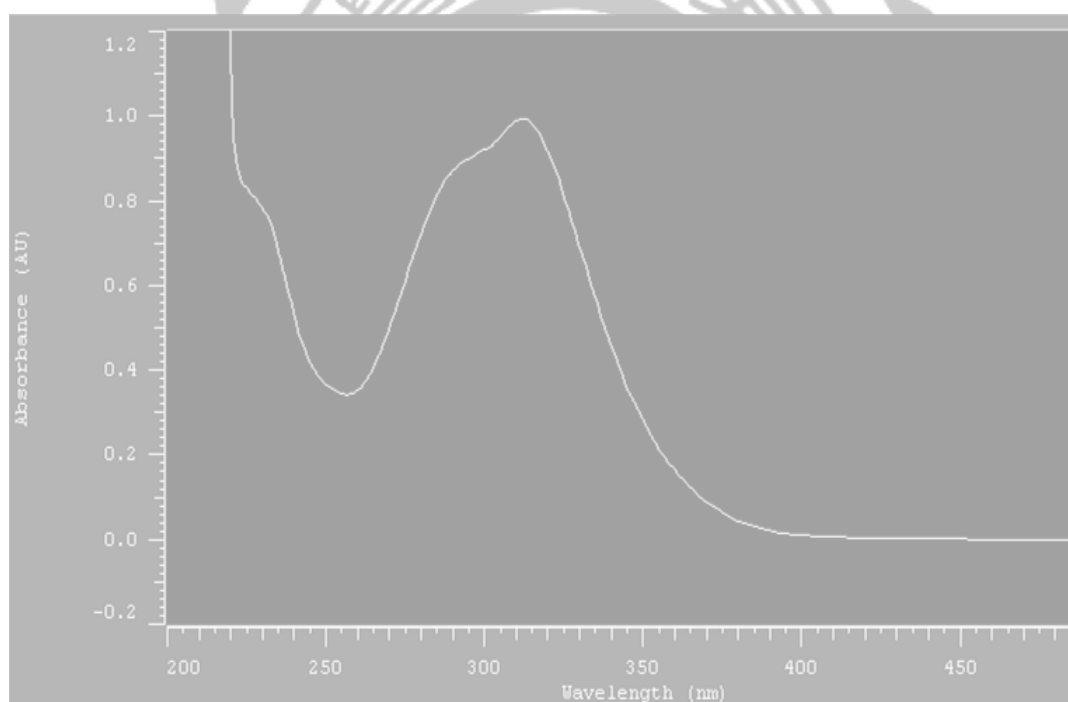
(六) 純化物質 6 (caffeic acid) 之結構鑑定



UV  $\lambda$  max (MeOH) nm: 245, 290, 325

Formula : C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>

MW: 180



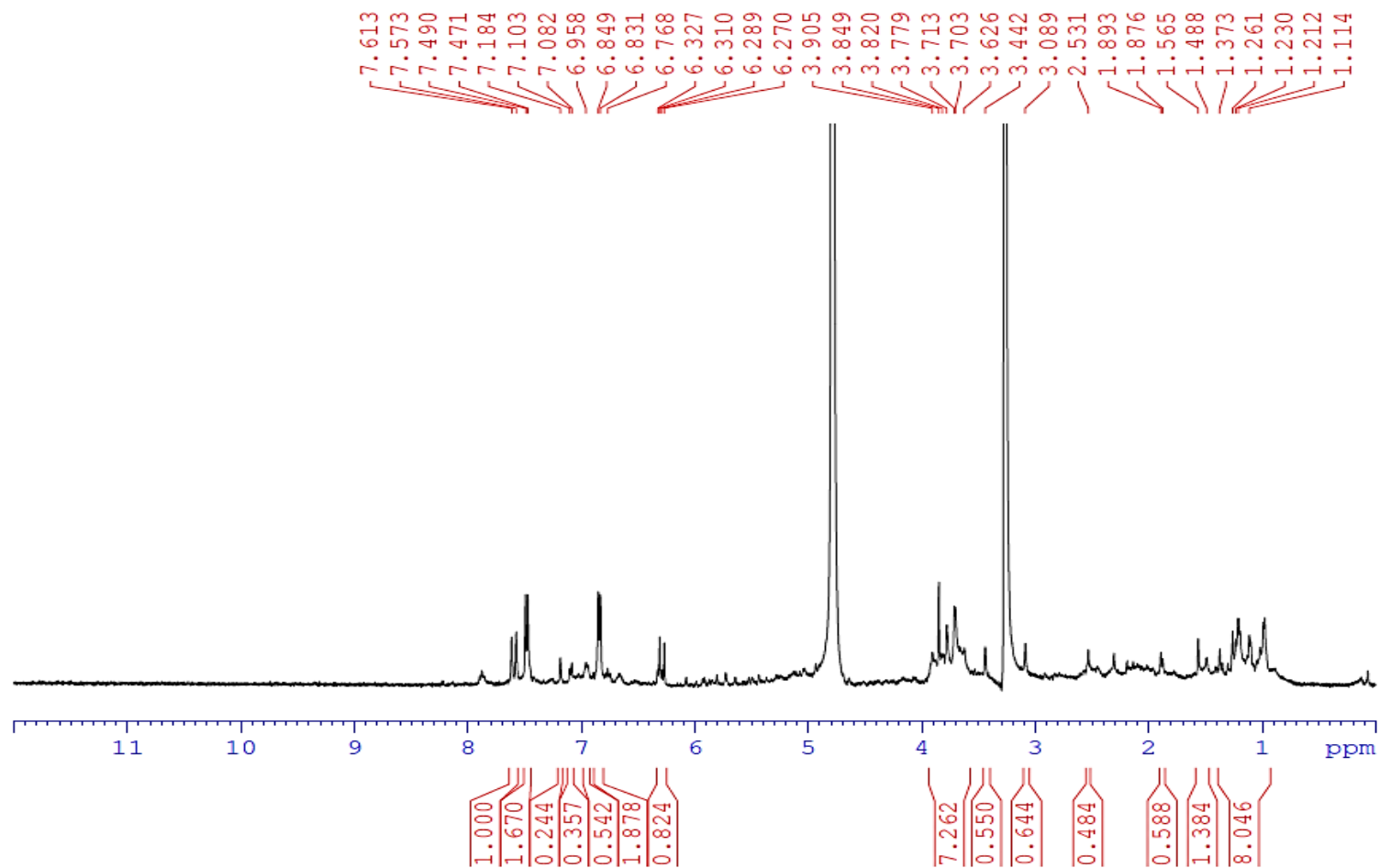
圖九十六、鐵馬鞭草水萃物純化物質 6 之紫外—可見光光譜。

Fig 96 UV-visible spectrum of the isolated component 6 from water extract of *Verbena officinalis*.

```

20171103-FS-F2
NAME      20171103-FS-F2
EXPNO    1
PROCNO   1
Date_    20171104
Time     19.20
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm PABBO BB/
PULPROG  zg30
TD        32768
SOLVENT  D2O
NS        1000
DS        0
SWH      8012.820 Hz
FIDRES   0.244532 Hz
AQ        2.0447731 sec
RG        205.92
DW        62.400 usec
DE        16.68 usec
TE        296.0 K
D1        2.00000000 sec
TDO       1
===== CHANNEL f1 =====
SF01    400.1324008 MHz
NUC1     1H
P1       13.30 usec
SI       16384
SF       400.1305852 MHz
WDW      EM
SSB      0
LB       0.00 Hz
GB       0
PC       1.00

```



圖九十七、鐵馬鞭草水萃物純化物質 **6** 之  $^1\text{H-NMR}$  光譜圖。

Fig 97  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of the isolated component **6** from water extract of *Verbena officinali*



## (十二)檸檬馬鞭草、鐵馬鞭草水萃取物及鐵馬鞭草正丁醇萃取物之產率比較

檸檬馬鞭草及鐵馬鞭草分別屬於木本植物及草本植物之不同基源的香草植物，古代植物學家僅藉著外觀、氣味、性狀等非科學資訊，將兩種植物分別命名為“馬鞭草”及“檸檬馬鞭草”，今由精密的化學分析手段證實兩種植物居然含有的生理功效成分，雖然量有差異，幾乎是完全一致的，令人感佩古植物學家的真知灼見。由於檸檬馬鞭草名列藥食兩用植物，由本實驗證實，其抗氧化及醣解酵素活性強於單純藥用植物之鐵馬鞭草，未來研發成調節血糖等相關保健食品，將更省時省力更有效益。2012年洪自鐵馬鞭草正丁醇萃取物分離出如表二十三所示 5 種之苯乙醇苷類化合物(phenyl ethanoid glycosides)，本研究室則分別自檸檬馬鞭草及鐵馬鞭草分離出 6 種苯乙醇苷類化合物，其產率分別列於表二十四及表二十五。

表二十三、鐵馬鞭草正丁醇萃取物 5 種純化物質之產率

Table 23 Yields of five isolated components from *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L

Isolated components	含量(mg)	產率(%)
isoverbascoside	145.53	0.0033
verbascoside	6047.00	0.139
eukovoside	48.29	0.0011
eukovoside isomer	19.03	0.0004
$\beta$ -hydroxyverbascoside	100.47	0.0023

sample dry weight: 4250.41g

(洪，2012)

表二十四、檸檬馬鞭草水萃取物 6 種純化物質之產率

Table 24 Yields of six isolated components from *water* extract of *aloyisia triphylla*

Isolated components	含量(mg)	產率(%)
isoverbascoside	2777.64	0.13888
verbascoside	616.05	0.0308
eukovoside	2547.12	0.12735
eukovoside isomer	142.81	0.00714
ferulic acid	1167.62	0.05838
caffeic acid	56.31	0.0028

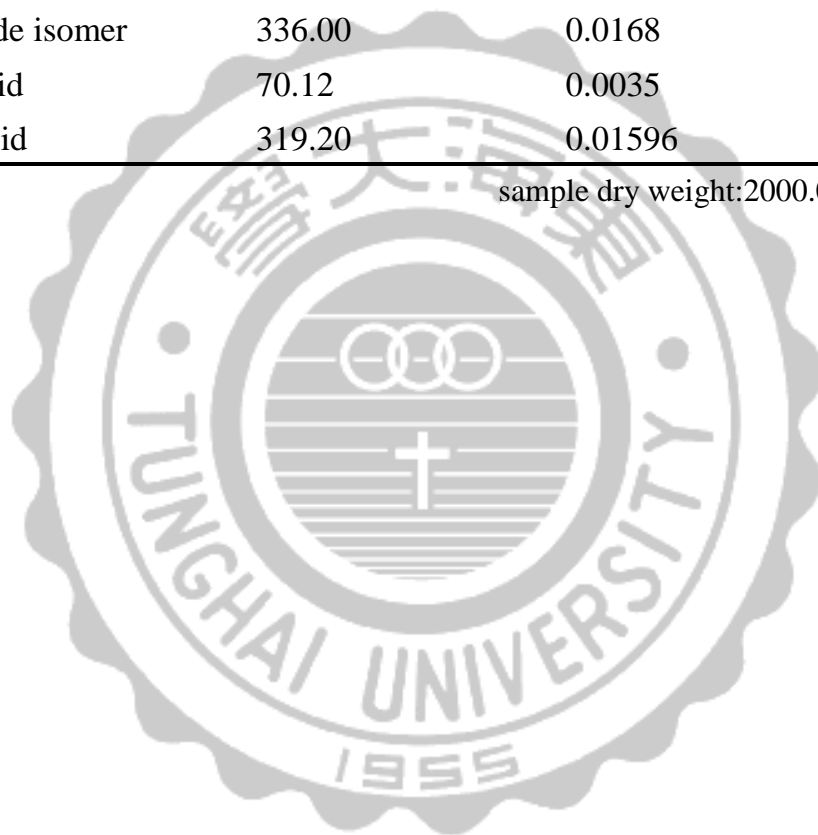
sample dry weight:2000.00g

表二十五、鐵馬鞭草水萃取物 6 種純化物質之產率

Table 25 Yields of six isolated components from *water* extract of *Verbena officinalis*

Isolated components	含量(mg)	產率(%)
isoverbascoside	652.46	0.03262
verbascoside	2005.27	0.10026
eukovoside	445.24	0.02226
eukovoside isomer	336.00	0.0168
ferulic acid	70.12	0.0035
caffeic acid	319.20	0.01596

sample dry weight:2000.00g



## 陸、結論

1. 檸檬馬鞭草及鐵馬鞭草水萃物，經由抗氧化成分含量測定，檸檬馬鞭草其總酚含量相當於每克 150.21 mg 之 gallic acid 當量，總類黃酮含量相當於每克 21.77 mg 之 quercetin 當量；而鐵馬鞭草其總酚含量相當於每克 64.50 mg 之 gallic acid 當量，總類黃酮含量相當於每克 3.92mg 之 quercetin 當量。顯示檸檬馬鞭草水萃物具有較高之抗氧化成分含量。
2. 檸檬馬鞭草及鐵馬鞭草水萃物，經由抗氧化活性測定，檸檬馬鞭草其ABTS自由基清除率為91.22%，DPPH自由基清除率為93.27%；鐵馬鞭草其ABTS自由基清除率為71.84%，DPPH自由基清除率為62.00%。亦顯示檸檬馬鞭草水萃物具有較高之抗氧化活性。
3. 檸檬馬鞭草及鐵馬鞭草水萃物，經由醣解酵素抑制活性測定試驗中， $\alpha$ -amylase酵素抑制活性沒有顯著差異，而 $\alpha$ -glucosidase酵素抑制活性，檸檬馬鞭草同樣具有較高之抑制活性。
4. 檸檬馬鞭草水萃物製備出的純化物質分別利用UV,  $^1\text{H-NMR}$ 及LC/MS/MS進行結構鑑定，分別分離出具抗氧化及抑制醣解酵素作用之isoverbascoside (1)、verbascoside (2)、eukovoside (3)、eukovoside isomer (4)、ferulic acid (5)及caffeic acid(6)；而鐵馬鞭草同樣也分離出上述 1~6 之活性物質。

5. 由本實驗結果得知檸檬馬鞭草及鐵馬鞭草雖然屬於不同基源的植物，但卻含有相同之抗氧化及醣解酵素抑制活性成分，雖然含量略有參差，但活性成分種類幾乎是一致的。
6. 綜合以上之抗氧化及醣解酵素抑制活性測定與LC-MS/MS、氬譜結構鑑定以及參考文獻，證實同時可以藥食兩用之檸檬馬鞭草比鐵馬鞭草更有潛力開發成改善糖尿病之保健食品。



## 柒、參考文獻

- 行政院衛生福利部統計處. (2016). 105 年國人十大死因統計.
- 李先佳, 任麗平, & 金少舉. (2017). 馬鞭草總黃酮對肝癌 HepG-2 細胞凋亡的影響機制研究. 現代預防醫學.
- 林雁中, & 吳芳禎. (2010). 檸檬馬鞭草水萃取液對大腸直腸癌細胞株 (Caco-2) 之效應. 大葉大學生物產業科技學系碩士班.
- 張立平, 羅莉, 王家俊, & 徐昌芬. (2004). 馬鞭草提取液 C 部位對人絨毛膜癌 JAR 細胞增殖的影響. 南京醫科大學學報 (自然科學版), 24 (5), 470-472。
- 陳金滄. (2009). 馬鞭草水淬取物對四氯化碳誘導大鼠肝損傷之護肝及抗氧化功效評估 (仁研 98081)。
- 衛生福利部食品藥物管理署. (2017). 可供食品使用原料彙整一覽表.
- Abuhamdah, R., & Mohammed, A. (2014). *Chemical, molecular pharmacology and neuroprotective properties of the essential oil derived from Aloysia citrodora Palau*. durham university.
- Aruoma, O. I. (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American oil chemists' society*, 75 (2), 199-212.
- Association, A. D. (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*, 37 (Supplement 1), S81-S90.
- Association, A. D. (2017). Diagnosing Diabetes and Learning About Prediabetes. In.
- Becker, A. G., Luz, R. K., Mattioli, C. C., Nakayama, C. L., de Souza e Silva, W., de Oliveira Paes Leme, F., de Mendonça Mendes, H. C. P., Heinzmann, B. M., & Baldisserotto, B. (2015). Can the essential oil of *Aloysia triphylla* have anesthetic effect and improve the physiological parameters of the carnivorous freshwater catfish *Lophiosilurus alexandri* after transport? *Aquaculture*, 481 (Supplement C), 184-190.

- Beyer, R. E. (1994). The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: interaction with vitamin E and coenzyme Q. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 26 (4), 349-358.
- BIAN, J.-s., FENG, J.-n., TAN, Q.-y., & DENG, B. (2013). Study on the ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of total flavonoids from *Verbena officinalis* L.[J]. *journal of baoji university of arts and sciences (Natural Science Edition)*, 1, 007.
- Bierhaus, A., Hofmann, M. A., Ziegler, R., & Nawroth, P. P. (1998). AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *cardiovascular research*, 37 (3), 586-600.
- Bilia, A. R., Giomi, M., Innocenti, M., Gallori, S., & Vincieri, F. F. (2008). HPLC- DAD-ESI-MS analysis of the constituents of aqueous preparations of verbena and lemon verbena and evaluation of the antioxidant activity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46 (3), 463-470.
- Boix-Castejón, M., Herranz-López, M., Caturla, N., Roche, E., Barrajón-Catalán, E., & Micol, V. (2016). P 226 - Hibiscus and lemon verbena polyphenols: Assessment for weight management in overweight volunteers. Appetite control and satiety. *free radical biology and medicine*, 108 (Supplement 1), S96.
- Buse, M. G. (2006). Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 290 (1), E1-E8.
- Calvo, M. I. (2006). Anti-inflammatory and analgesic activity of the topical preparation of *Verbena officinalis* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 107 (3), 380-382.
- Calvo, M. I., Vilalta, N., San Julián, A., & Fernández, M. (1998). Anti-inflammatory activity of leaf extract of *Verbena officinalis* L. *Phytomedicine*, 5 (6), 465-467.
- 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 and chemical toxicology*, 51, 15-25.
- Carrera-Quintanar, L., Funes, L., Viudes, E., Tur, J., Micol, V., Roche, E., & Pons, A. (2012). Antioxidant effect of lemon verbena extracts in lymphocytes of university students performing aerobic training program. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 22

- (4), 454-461.
- Casanova, E., García-Mina, J., & Calvo, M. (2008). Antioxidant and antifungal activity of *Verbena officinalis* L. leaves. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63 (3), 93-97.
- Chang-Chen, K., Mullur, R., & Bernal-Mizrachi, E. (2008).  $\beta$ -cell failure as a complication of diabetes. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 9 (4), 329.
- Choupani, M., Arabshahi Delouee, S., & Alami, M. (2014). Antioxidant properties of various solvent extracts of Lemon Verbena (*Lippia citriodora*) leaves. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2 (4), 1340-1346.
- Chung, S. S., Ho, E. C., Lam, K. S., & Chung, S. K. (2003). Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14 (suppl 3), S233-S236.
- de Bodo, R. C., & Altzuler, N. (1956). Hormonal Regulation of Carbohydrate Metabolism. In *Medical Society in the City of New York, Vol. 14* (pp. 51-53): Karger Publishers.
- De Martino, L., De Feo, V., Fratianni, F., & Nazzaro, F. (2009). Chemistry, antioxidant, antibacterial and antifungal activities of volatile oils and their components. *Natural product communications*, 4 (12), 1741-1750.
- Deepak, M., & Handa, S. S. (2000). Antiinflammatory activity and chemical composition of extracts of *Verbena officinalis*. *Phytotherapy Research*, 14 (6), 463-465.
- Di Mascio, P., Kaiser, S., & Sies, H. (1989). Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archives of biochemistry and biophysics*, 274 (2), 532-538.
- Diano, S., & Horvath, T. L. (2010). A Sympathetic View on Free Radicals in Diabetes. *Neuron*, 66 (6), 809-811.
- Djordjevic, A., Spasic, S., Jovanovic-Galovic, A., Djordjevic, R., & Grubor-Lajsic, G. (2004). Oxidative stress in diabetic pregnancy: SOD, CAT and GSH-Px activity and lipid peroxidation products. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 16 (6), 367-372.
- Du, X., Matsumura, T., Edelstein, D., Rossetti, L., Zsengellér, Z., Szabó, C., & Brownlee, M. (2003). Inhibition of GAPDH activity by poly (ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *Journal of Clinical*



- Investigation*, 112 (7), 1049.
- Dudai, N., Weinstein, Y., Krup, M., Rabinski, T., & Ofir, R. (2005). Citral is a new inducer of caspase-3 in tumor cell lines. *Planta medica*, 71 (05), 484-488.
- Edelman, S. V. (1998). Type II diabetes mellitus. *Advances in internal medicine*, 43, 449-500.
- Eisenbarth, G. S. (2005). Type 1 diabetes mellitus. *Joslin's diabetes mellitus*, 14, 399-424.
- Encalada, M. A., Rehecho, S., Ansorena, D., Astiasarán, I., Cavero, R. Y., & Calvo, M. I. (2015). Antiproliferative effect of phenylethanoid glycosides from *Verbena officinalis* L. on Colon Cancer Cell Lines. *LWT - Food Science and Technology*, 63 (2), 1016-1022.
- Fang, Y.-Z., Yang, S., & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18 (10), 872-879.
- Felgines, C., Fraisse, D., Besson, C., Vasson, M.-P., & Texier, O. (2014). Bioavailability of lemon verbena (*Aloysia triphylla*) polyphenols in rats: impact of colonic inflammation. *British Journal of Nutrition*, 111 (10), 1773-1781.
- Frankel, E. N. (2014). *Lipid oxidation*: Elsevier.
- Freeman, B. A., & Crapo, J. D. (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 47 (5), 412-426.
- Frei, B. (1994). Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *The American journal of medicine*, 97 (3), S5-S13.
- Fryer, L. G., Parbu-Patel, A., & Carling, D. (2002). The anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 277 (28), 25226-25232.
- Funes, L., Carrera-Quintanar, L., Cerdán-Calero, M., Ferrer, M. D., Drobnic, F., Pons, A., Roche, E., & Micol, V. (2011). Effect of lemon verbena supplementation on muscular damage markers, proinflammatory cytokines release and neutrophils' oxidative stress in chronic exercise. *European journal of applied physiology*, 111 (4), 695-705.
- Funes, L., Fernández-Arroyo, S., Laporta, O., Pons, A., Roche, E., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., & Micol, V. (2009). Correlation between plasma antioxidant capacity and verbascoside

- levels in rats after oral administration of lemon verbena extract. *Food Chemistry*, 117 (4), 589-598.
- Georgiev, M., Alipieva, K., Orhan, I., Abrashev, R., Denev, P., & Angelova, M. (2011). Antioxidant and cholinesterases inhibitory activities of *Verbascum xanthophoeniceum* Griseb. and its phenylethanoid glycosides. *Food Chemistry*, 128 (1), 100-105.
- Ghaemi, E., Khorshidi, D., Moradi, A., Seifi, A., Mazendrani, M., Bazouri, M., & Mansourian, A. R. (2007). The efficacy of Ethanolic extract of Lemon Verbena on the Skin Infection Due to *Staphylococcus aureus* in an Animal Model. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10 (22), 4132-4135.
- Goodman, D., McDonnel, J., Nelson, H., Vaughan, T., & Weber, R. (1990). Chronic urticaria exacerbated by the antioxidant food preservatives, butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT). *Journal of allergy and clinical immunology*, 86 (4), 570-575.
- Halliwell, B. (1995). Antioxidant characterization: methodology and mechanism. *Biochemical pharmacology*, 49 (10), 1341-1348.
- Hernández, N. E., Tereschuk, M. L., & Abdala, L. R. (2000). Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafí del Valle (Tucumán, Argentina). *Journal of Ethnopharmacology*, 73 (1), 317-322.
- Herranz-López, M., Barrajon-Catalán, E., Segura-Carretero, A., Menéndez, J. A., Joven, J., & Micol, V. (2015). Lemon verbena (*Lippia citriodora*) polyphenols alleviate obesity-related disturbances in hypertrophic adipocytes through AMPK-dependent mechanisms. *Phytomedicine*, 22 (6), 605-614.
- Jacob, R. A., & Burri, B. J. (1996). Oxidative damage and defense. *The American journal of clinical nutrition*, 63 (6), 985S-990S.
- Jagdale, A. D., Bavkar, L. N., More, T. A., Joglekar, M. M., & Arvindekar, A. U. (2016). Strong inhibition of the polyol pathway diverts glucose flux to protein glycation leading to rapid establishment of secondary complications in diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and its Complications*, 30 (3), 398-405.
- Jefferson, J. A., Shankland, S. J., & Pichler, R. H. (2008). Proteinuria in diabetic kidney disease: A mechanistic viewpoint. *Kidney International*, 74 (1), 22-36.
- Junior, G. B., de Abreu, M. S., dos Santos da Rosa, J. G., Pinheiro, C. G.,

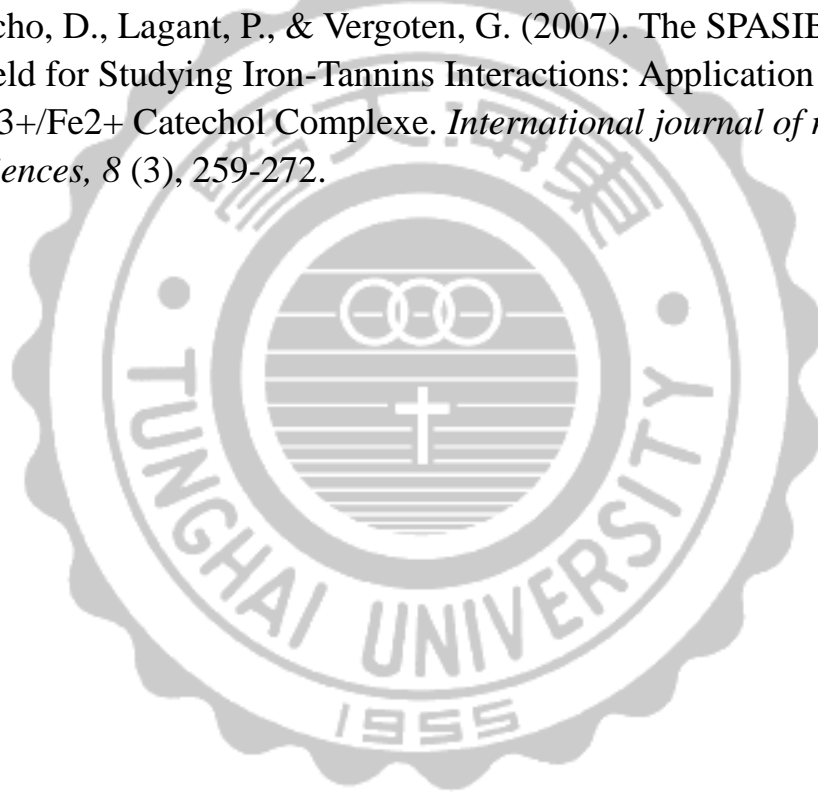
- Heinzmann, B. M., Caron, B. O., Baldisserotto, B., & Barcellos, L. J. G. (2015). Lippia alba and Aloysia triphylla essential oils are anxiolytic without inducing aversiveness in fish. *Aquaculture*.
- Kim, K.-H., Tsao, R., Yang, R., & Cui, S. W. (2006). Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry*, 95 (3), 466-473.
- Koya, D., & King, G. L. (1998). Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*, 47 (6), 859-866.
- Krauter, T., Ruppertsberg, J. P., & Baukrowitz, T. (2001). Phospholipids as modulators of KATP channels: distinct mechanisms for control of sensitivity to sulphonylureas, K<sup>+</sup> channel openers, and ATP. *Molecular Pharmacology*, 59 (5), 1086-1093.
- Lai, S.-W., Yu, M.-S., Yuen, W.-H., & Chang, R. C.-C. (2006). Novel neuroprotective effects of the aqueous extracts from *Verbena officinalis* Linn. *Neuropharmacology*, 50 (6), 641-650.
- Larsen, J., Hylleberg, B., Ng, K., & Damsbo, P. (2001). Glucagon-like peptide-1 infusion must be maintained for 24 h/day to obtain acceptable glycemia in type 2 diabetic patients who are poorly controlled on sulphonylurea treatment. *Diabetes care*, 24 (8), 1416-1421.
- Lin, P.-C., Lee, J. J., & Chang, I. J. (2016). Essential oils from Taiwan: Chemical composition and antibacterial activity against *Escherichia coli*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24 (3), 464-470.
- Makino, Y., Kondo, S., Nishimura, Y., Tsukamoto, Y., HUANG, Z. L., & Urade, Y. (2009). Hastatoside and verbenalin are sleep-promoting components in *Verbena officinalis*. *Sleep and Biological Rhythms*, 7 (3), 211-217.
- Matschinsky, F. M. (1990). Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic  $\beta$ -cells and hepatocytes. *Diabetes*, 39 (6), 647-652.
- Mayer, J. P., Zhang, F., & DiMarchi, R. D. (2007). Insulin structure and function. *Peptide Science*, 88 (5), 687-713.
- Miller, R. A., Chu, Q., Xie, J., Foretz, M., Viollet, B., & Birnbaum, M. J. (2013). Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature*, 494 (7436), 256-260.
- Murakami, K., Tobe, K., Ide, T., Mochizuki, T., Ohashi, M., Akanuma, Y., Yazaki, Y., & Kadowaki, T. (1998). A novel insulin sensitizer acts

- as a coligand for peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR-alpha) and PPAR-gamma: effect of PPAR-alpha activation on abnormal lipid metabolism in liver of Zucker fatty rats. *Diabetes*, 47 (12), 1841-1847.
- Nauck, M., Kleine, N., Ørskov, C., Holst, J. J., Willms, B., & Creutzfeldt, W. (1993). Normalization of fasting hyperglycaemia by exogenous glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia*, 36 (8), 741-744.
- Ohno, T., Kita, M., Yamaoka, Y., Imamura, S., Yamamoto, T., Mitsufuji, S., Kodama, T., Kashima, K., & Imanishi, J. (2003). Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 8 (3), 207-215.
- Olefsky, J. M., Saekow, M., Tager, H., & Rubenstein, A. (1980). Characterization of a mutant human insulin species. *Journal of Biological Chemistry*, 255 (13), 6098-6105.
- Phan, C.-W., Lee, G.-S., Hong, S.-L., Wong, Y.-T., Brkljača, R., Urban, S., Malek, S. N. A., & Sabaratnam, V. (2014). *Herichium erinaceus* (Bull.: Fr) Pers. cultivated under tropical conditions: isolation of hericenones and demonstration of NGF-mediated neurite outgrowth in PC12 cells via MEK/ERK and PI3K-Akt signaling pathways. *Food & function*, 5 (12), 3160-3169.
- Rasmussen, B. B., Fujita, S., Wolfe, R. R., Mittendorfer, B., Roy, M., Rowe, V. L., & Volpi, E. (2006). Insulin resistance of muscle protein metabolism in aging. *The FASEB journal*, 20 (6), 768-769.
- Razavi, M., Zargarani, N., & Hosseinzadeh, H. (2017). Anti-anxiety and hypnotic effects of ethanolic and aqueous extracts of *Lippia citriodora* leaves and verbascoside in mice. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 1-11.
- Rehecho, S., Hidalgo, O., García-Iñiguez de Cirano, M., Navarro, I., Astiasarán, I., Ansorena, D., Caverio, R. Y., & Calvo, M. I. (2011). Chemical composition, mineral content and antioxidant activity of *Verbena officinalis* L. *LWT - Food Science and Technology*, 44 (4), 875-882.
- Riedl, K. M., Carando, S., Alessio, H. M., McCarthy, M., & Hagerman, A. E. (2002). Antioxidant activity of tannins and tannin-protein complexes: assessment in vitro and in vivo. In: ACS Publications.
- Sah, S. P., Singh, B., Choudhary, S., & Kumar, A. (2016). Animal models of insulin resistance: A review. *Pharmacological Reports*, 68 (6),

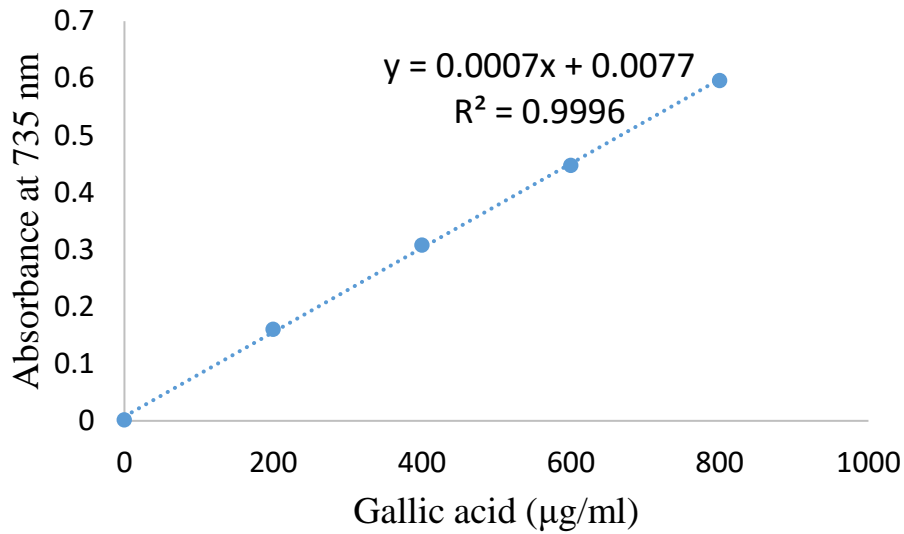
1165-1177.

- Sahlin, E., Savage, G., & Lister, C. (2004). Investigation of the antioxidant properties of tomatoes after processing. *Journal of Food composition and Analysis*, 17 (5), 635-647.
- Saltiel, A. R., & Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414 (6865), 799-806.
- Sarma, B. K., & Muges, G. (2005). Glutathione peroxidase (GPx)-like antioxidant activity of the organoselenium drug ebselen: unexpected complications with thiol exchange reactions. *Journal of the American Chemical Society*, 127 (32), 11477-11485.
- Schmidt, D., Frommer, W., Junge, B., Müller, L., Wingender, W., Truscheit, E., & Schäfer, D. (1977).  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors. *Naturwissenschaften*, 64 (10), 535-536.
- Shim, H.-K., Kim, S.-Y., Kim, B.-R., Cho, J.-P., Park, Y.-J., Ji, W.-G., Cha, D.-S., & Jeon, H. (2010). Anti-inflammatory and radical scavenging properties of *Verbena officinalis*. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 10 (4), 310-318.
- Slivka, A., Mytilineou, C., & Cohen, G. (1987). Histochemical evaluation of glutathione in brain. *Brain research*, 409 (2), 275-284.
- Speroni, E., Cervellati, R., Costa, S., Guerra, M., & Utan, A. (2007). Effects of Differential Extraction of *Verbena officinalis* on Rat Models of Inflammation, Cicatrization and Gastric Damage. *Planta Med*, 73, 227-235.
- Strachan, M. W. (2003). Insulin and cognitive function. *The Lancet*, 362 (9392), 1253.
- Topinka, J., Binkova, B., Sram, R., & Erin, A. (1989). The influence of  $\alpha$ -tocopherol and pyritinol on oxidative DNA damage and lipid peroxidation in human lymphocytes. *Mutation Research Letters*, 225 (3), 131-136.
- Vanajothi, R., Sudha, A., Manikandan, R., Rameshthangam, P., & Srinivasan, P. (2012). *Luffa acutangula* and *Lippia nodiflora* leaf extract induces growth inhibitory effect through induction of apoptosis on human lung cancer cell line. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 2 (4), 287-293.
- Veisi, M., Shahidi, S., Komaki, A., & Sarihi, A. (2016). Analgesic Effects of the Aqueous Lemon *Verbena* Extract in Rats. *Neurophysiology*, 48 (2), 107-110.
- Weyer, C., Funahashi, T., Tanaka, S., Hotta, K., Matsuzawa, Y., Pratley,

- R. E., & Tataranni, P. A. (2001). Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86 (5), 1930-1935.
- Wilkinson, J. M., & Cavanagh, H. (2005). Antibacterial activity of essential oils from Australian native plants. *Phytotherapy Research*, 19 (7), 643-646.
- Williamson, J. R., Chang, K., Frangos, M., Hasan, K. S., Ido, Y., Kawamura, T., Nyengaard, J. R., van Den Enden, M., Kilo, C., & Tilton, R. G. (1993). Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes*, 42 (6), 801-813.
- Yapo-Kicho, D., Lagant, P., & Vergoten, G. (2007). The SPASIBA Force Field for Studying Iron-Tannins Interactions: Application to Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup> Catechol Complexes. *International journal of molecular sciences*, 8 (3), 259-272.

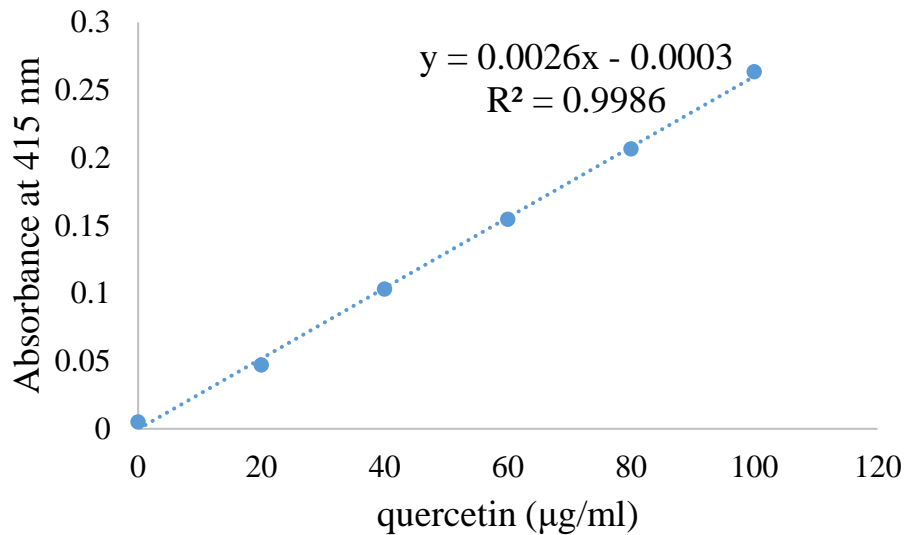


## 捌、附錄



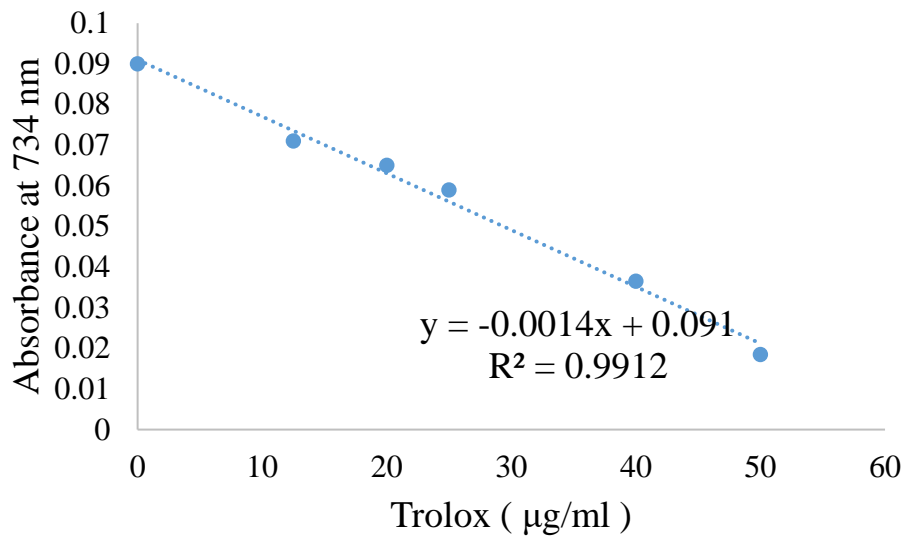
附錄一、沒食子酸之標準曲線。

Appendix 1 Standard curve of gallic acid.



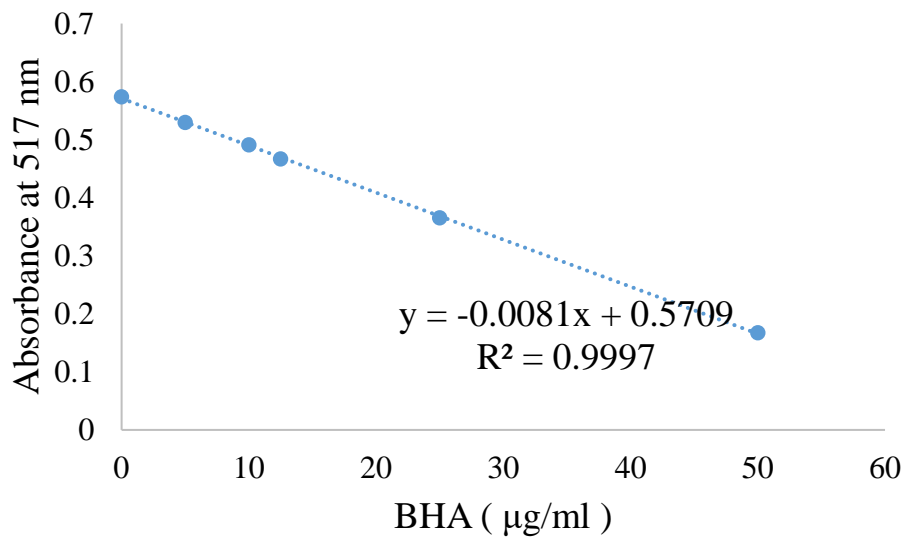
附錄二、槲皮酮之標準曲線。

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.