

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

碩士論文

Master Thesis

指導老師：江文德 博士

高馥君 博士

Advisor : Wen-Dee Chiang, Ph.D.

Fuh-Juin Kao, Ph.D.

餘甘子溶劑萃取物的抗氧化及高血糖相關因子抑制活性

Antioxidant activities and inhibitory activities of  
hyperglycemic related factors for solvent extracts from

*Phyllanthus emblica* L.

劉上詠

Shang-Yung Liu

中華民國一零八年一月

January, 2019

# 碩士論文考試委員審定書

食品科學系碩士班食品科技組 劉上詠 君所提之論文

餘甘子溶劑萃取物的抗氧化

及高血糖相關因子抑制活性

Antioxidant activities and inhibitory activities of  
hyperglycemic related factors for solvent extracts  
from *Phyllanthus emblica* 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

林如 宜蘭大學食品科學系 教授

葉宏偉 東海大學食品科學系 助理教授

指導教授：劉上詠、石慶君

中華民國一零八年一月十一日

## 謝誌

從大學時期就進入研究室中學習到現在，終於在此畫下了句點，期間認識了許多不曾理解的事物，經歷了失敗，也一次次在老師及同儕的協助下克服並累積經驗，也因為這些難關我才能有如此多的成長。感謝在這個階段遇見的種種人事物，有了您們的協助及支持，才会有現在的劉上詠。

感謝指導教授 江文德博士這段期間的教導，在研究、報告及思考上分享充分的經驗，並且經常給予不同的想法來擴展思維，讓我擁有了獨立思考及解決問題的能力。除了專業上的協助外，亦會與我們分享生活，讓求學的過程不如以往的枯燥。同樣感謝指導教授 高馥君博士，在研究上給了我十分大的支持，在我的這本論文當中付出了相當的心力，每次都花費很多時間一同討論方法及結果，耐心的指出學生常進的誤區，不吝提供自己過去遇到的問題及解決辦法，感謝您的付出，才會完成這份研究。

文稿初成之時，感謝 蔡正宗博士、林世斌博士及葉宛儒博士，在繁忙之中審閱及改正論文中的錯誤與不足。並特別撥空參與論文口試，給予學生寶貴的建議，使得論文更趨完整，在此致上由衷的感謝。

一路走來感謝身邊所有的協助，系上所有的老師、助教及系助理，學長姊慈樺、明興、瀚文、暉婷、有容、筑盈、佑星的關懷及教導，共同努力的夥伴皓元、嘉鈴、琤綾、映竹、惟智、宏仰、羽庭、佳茵、文彥、昱均及宜榛，有你們的存在，讓我遇到的種種問題都不再那麼困難，有你們的陪伴，總是能安然地度過低潮。

最後最要感謝的是我的家人，謝謝你們給予我的關心與包容，讓我在沒有後顧之憂下完成學業，是我最溫暖的避風港，不如意的心情總是有你們的支持，你們是我完成這份學業的原動力。在此將此論文獻予你們，與你們一同分享這份喜悅。

學生 劉上詠 謹誌於  
東海大學食品科學系  
機能性食品開發研究室  
中華民國一零八年一月

## 摘要

餘甘子 (*Phyllanthus emblica* L.) 屬於大戟科葉下株屬的植物，廣泛的分布於亞熱帶及熱帶地區，已長期應用於中國及印度傳統醫療系統中使用，含有豐富的植物化學物質，如多酚、類黃酮及單寧。本研究以台灣所栽種的餘甘子果實經不同溶劑 (95% 甲醇、95% 乙醇、50% 甲醇、50% 乙醇、水、乙酸乙酯) 萃取後，測定萃取物中機能性成分 (總酚、總類黃酮、水解單寧)、抗氧化活性 (自由基清除活性、脂質過氧化抑制作用) 及高血糖相關因子抑制活性 ( $\alpha$ -Amylase、 $\alpha$ -Glucosidase、最終糖化終產物)。其中 50% 甲/乙醇萃取物可得最高的機能性成分含量；DPPH 及 ABTS 自由基清除活性則是 50% 甲醇萃取物最佳，其  $IC_{50}$  分別為  $7.51 \pm 0.08$  及  $3.43 \pm 0.11 \mu\text{g/mL}$ ；超氧陰離子自由基則是乙酸乙酯萃取物最佳，其  $IC_{50}$  為  $48.27 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$ ；不同濃度甲/乙醇萃取物都對脂質過氧化有良好的抑制活性，其  $IC_{50}$  介於  $7.9 \sim 1.01 \mu\text{g/mL}$ ； $\alpha$ -glucosidase 抑制活性亦是 50% 甲/乙醇萃取物最佳，其  $IC_{50}$  分別為  $0.24 \pm 0.02$  及  $0.29 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ ；各萃取物的最終糖化終產物的抑制活性相當，皆可抑制達 60%；各萃取物中特殊機能性成分的含量因不同溶劑而有所差異，但  $\beta$ -glucogallin 在六種測定成分中含量最多。綜觀上述，餘甘子最佳萃取溶劑為 50% 甲/乙醇，可做為抗氧化及高血糖相關因子抑制劑的天然來源。

關鍵字：餘甘子、溶劑萃取物、機能性成分、抗氧化活性、高血糖相關因子

## Abstract

*Phyllanthus emblica* L. which belongs to the Euphorbiaceae plant widely distributes in tropical and sub-tropical area and has been applied traditional medical systems in China and India for long time. In this study, the fruits of *Phyllanthus emblica* L. grown in Taiwan were extracted with six different solvents (95% methanol, 95% ethanol, 50% methanol, 50% ethanol, boiling water and ethyl acetate) and examined the functional ingredients, antioxidant activities and hyperglycemic related factors inhibitory activities. Among them, both 50% methanol and 50% ethanol extracts had the highest total phenolic, total flavonoids and hydrolyzed tannin content; The 50% methanol extract showed the highest free radical scavenging activity of DPPH and ABTS with  $IC_{50}$  of  $7.51 \pm 0.08$  and  $3.43 \pm 0.11 \mu\text{g/mL}$ , respectively. The ethyl acetate extract had highest superoxide anion radical scavenging activity with  $IC_{50}$   $48.27 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$ . The lipid peroxidation were not significantly different regardless of methanol and ethanol concentration. The 50% methanol extract also had highest inhibitory activity of alpha-glucosidase with  $IC_{50}$   $0.24 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$ . All extracts had the same AGEs formation inhibitory activity up to 60% inhibition rate. The content of special functional compounds in all extract varied with different solvents.  $\beta$ -Glucogallin had the highest content in each extracts. In conclusion, both 50% methanol and 50% ethanol extracts had the best antioxidant and hyperglycemic related factors inhibitory activity.

Keyword: *Phyllanthus emblica* L., solvent extracts, functional compounds, antioxidant activities, hyperglycemic related factors

# 目錄

摘要.....	I
Abstract.....	II
目錄.....	III
圖目錄.....	V
表目錄.....	VII
附錄目錄.....	VIII
壹、前言.....	1
貳、文獻回顧.....	3
一、餘甘子.....	3
(一) 餘甘子簡介.....	3
(二) 餘甘子機能性成分及功效.....	4
二、糖尿病.....	10
(一) 糖尿病的分類.....	11
(二) 糖尿病的治療.....	15
(三) 人體血糖的恆定.....	17
三、高血糖與自由基.....	19
(一) 自由基與活性氧.....	20
(二) 糖基化反應.....	22
(三) 自由基與脂質.....	23
四、氧化和抗氧化作用.....	24
(一) 酵素性抗氧化劑.....	24
(二) 非酵素性抗氧化劑.....	25
參、材料與方法.....	29
一、實驗材料.....	29

(一) 原料.....	29
(二) 實驗藥品及溶劑 (重複藥品不再列出).....	29
(三) 實驗儀器.....	31
二、 實驗方法.....	33
(一) 實驗架構.....	33
(二) 餘甘子果實粉末製備.....	33
(三) 餘甘子不同溶劑萃取物之製備.....	33
(四) 機能性成分測定.....	34
(五) 抗氧化活性分析.....	36
(六) 糖尿病相關抑制活性.....	39
(七) HPLC 分析.....	42
(八) 統計分析.....	43
肆、 結果與討論.....	44
一、 不同溶劑萃取餘甘子對其產率的影響.....	44
二、 不同溶劑萃取餘甘子對機能性成分含量的影響.....	44
三、 不同溶劑萃取餘甘子對抗氧化活性的影響.....	48
(一) 不同溶劑萃取餘甘子對自由基清除活性的影響.....	48
(二) 不同溶劑萃取餘甘子對脂質過氧化抑制活性.....	51
四、 不同溶劑萃取餘甘子對高血醣相關因子抑制活性的影響.....	55
(一) 不同溶劑萃取餘甘子對糖解酵素抑制活性的影響.....	55
(二) 不同溶劑萃取餘甘子對 AGEs 形成抑制的影響.....	57
五、 不同溶劑萃取物對特定機能性成分的影響.....	59
伍、 結論.....	64
陸、 參考文獻.....	65
柒、 附錄.....	77

## 圖目錄

圖一、餘甘子果實 .....	3
圖二、第二型糖尿病病理生理學 .....	12
圖三、糖解酵素作用模式 .....	17
圖四、血糖恆定機制 .....	18
圖五、粒線體內電子傳遞鏈產生超氧陰離子的過程 .....	19
圖六、高血糖促進糖化反應和粒線體中電子傳遞鏈產生 ROS .....	21
圖七、糖基化三階段反應示意圖 .....	22
圖八、脂質過氧化機制圖 .....	23
圖九、酵素性抗氧化劑作用機制 .....	25
圖十、維生素 C 的氧化還原反應 .....	27
圖十一、生育酚及生育三烯酚結構 .....	28
圖十二、實驗架構 .....	33
圖十三、總類黃酮含量測試反應式 .....	35
圖十四、水解單寧含量測定反應式 .....	36
圖十五、DPPH 自由基清除活性反應式 .....	36
圖十六、ABTS·清除活性反應式 .....	37
圖十七、超氧陰離子自由基與 NBT 呈色反應式 .....	38
圖十八、DNS 與還原糖反應方程式 .....	39
圖十九、 $\alpha$ -Glucosidase 抑制活性測定原理 .....	40
圖二十、不同溶劑萃取餘甘子對總酚含量的影響 .....	46
圖二十一、不同溶劑萃取餘甘子對總類黃酮含量的影響 .....	47
圖二十二、不同溶劑萃取餘甘子對水解單寧含量的影響 .....	49
圖二十三、不同溶劑萃取餘甘子對 DPPH 自由基清除活性的影響 .....	50
圖二十四、不同溶劑萃取餘甘子對 ABTS 自由基清除活性的影響 .....	52



圖二十五、同溶劑萃取餘甘子對超氧陰離子自由基清除活性的影響.....	53
圖二十六、不同溶劑萃取餘甘子對脂質過氧化抑制活性的影響.....	54
圖二十七、不同濃度萃取物對糖解酵素抑制活性的影響.....	56
圖二十八、不同溶劑萃取餘甘子對晚期糖化終產物抑制的影響.....	58
圖二十九、標準品 HPLC 圖譜 .....	60
圖三十、不同溶劑萃取物圖譜 (95%甲/乙醇、50%甲醇).....	61
圖三十一、不同溶劑萃取物圖譜 (50%乙醇、沸水、乙酸乙酯).....	62



## 表目錄

表一、餘甘子中常見的機能性成分及其功效 .....	5
表二、糖尿病診斷標準 .....	10
表三、糖尿病前期的診斷標準.....	11
表四、第一型糖尿病發病影響因子.....	11
表五、妊娠型糖尿病篩檢 .....	13
表六、其他特異型糖尿病病因.....	14
表七、降血糖注射藥物 .....	15
表八、口服降血糖藥物 .....	16
表九、活性氧分類.....	20
表十、HPLC 梯度條件 .....	42
表十一、不同溶劑萃取餘甘子對產率的影響 .....	45
表十二、不同溶劑萃取對餘甘子特殊機能性成分含量的影響 .....	63

## 附錄目錄

附錄一、沒食子酸標準曲線 .....	77
附錄二、槲皮素標準曲線 .....	77
附錄三、單寧酸標準曲線 .....	78
附錄四、 $\beta$ -glucogallin HPLC 標準曲線 .....	78
附錄五、沒食子酸 HPLC 標準曲線 .....	79
附錄六、柯里拉京 HPLC 標準曲線 .....	79
附錄七、Geraniin HPLC 標準曲線 .....	80
附錄八、鞣花酸 HPLC 標準曲線 .....	80
附錄九、Chebulinic acid HPLC 標準曲線 .....	81
附錄十、不同溶劑萃取餘甘子對糖解酵素抑制活性的影響 .....	81
附錄十一、不同溶劑萃取物 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 對 $\alpha$ -澱粉酶抑制活性的影響 .....	82

## 壹、前言

糖尿病 (Diabetes) 已然成為現今非常嚴重的流行病之一，全球各地區快速的發展，人類飲食文化及生活習慣也隨之變遷，高油脂高糖份的餐點隨處可見，造成了日漸攀升的糖尿病患者數 (IDF, 2017)。其中最為廣泛的第二型糖尿病，發病歲數也隨著全球肥胖人口年齡層的下降而降低 (Reinehr, 2013)。糖尿病會造成許多的併發症，其中為誘發路徑之一的是過量晚期糖化終產物 (Advanced glycation end products, AGEs) 的大量生成，生成過程中於高血糖環境下葡萄糖自氧化以及蛋白質與醣類非酵素性的結合，會產生大量的活性氧，故而破壞體細胞而造成衍生的疾病 (Chetyrkin *et al.*, 2011)。

活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 是一群具有氧的高反應性分子，包含自由基以及非自由基，會氧化細胞中的脂質、蛋白質及 DNA，而造成人體的氧化損傷 (Lobo *et al.*, 2010; El-Bahr, 2013)。可由身體的代謝作用產生，但若受到環境中的紫外線、病毒及化學物質的暴露，也會造成 ROS 的增加 (Ayala *et al.*, 2014)。當人體中氧化與抗氧化作用失去平衡時，會影響細胞正常功能的表現，產生如老化、關節炎及心血管疾病等，故額外攝取具有抗氧化活性的物質，可協助人體調節失衡的狀態 (Sindhi *et al.*, 2013)。

蔬果中含有許多植物化學物質 (Phytochemical)，包含多酚、維生素 C 及生育酚等。大多都具有抗氧化活性，可提供人體防禦自由基的攻擊 (Ganesan *et al.*, 2017)。其中多酚有助於降低心血管疾病、結腸癌及糖尿病等的發病率，而導致人們對其越發的關注 (Rasouli *et al.*, 2017)。餘甘子 (*Phyllanthus emblica* L.) 已在傳統醫療系統中被廣泛使用，含有豐富的植物化學物質，如多酚、類黃酮及單寧，已證實具有抗菌 (Ahmad *et al.*, 1998)、抗病毒 (Estari *et al.*, 2012)、抗發炎 (Wang *et al.*, 2017)、抗氧化 (Liu *et al.*, 2008) 及抗糖尿病 (D'Souza J *et al.*, 2014) 等活性。但不同栽種地區及萃取溶劑會影響其機能性成分及相關生物活性 (Liu *et al.*, 2008; Nampoothiri *et al.*, 2011)。餘甘子約於

1960 年代因特殊的風味引入台灣栽種，而後因加工產業的興起而影響國人種植的意願。近年因許多研究證實其機能性功效，結合大眾對天然食品的追求，再次受到重視，目前栽培面積約 100 公頃，大多分布於苗栗及南投地區 (賴瑞聲 *et al.*, 2017)。

本研究選用台灣地區所栽種生產的餘甘子果實，利用不同的溶劑進行萃取後，探討對多酚、類黃酮及水解單寧等機能性成分的影響；而後藉由測量 DPPH、ABTS、超氧陰離子等自由基清除活性以及脂質過氧化的抑制活性，評估不同溶劑萃取餘甘子對抗氧化活性之影響；其次，由於抗氧化作用與糖尿病息息相關，故進一步探討萃取物對  $\alpha$ -amylase、 $\alpha$ -glucosidase 及最終糖化終產物等高血糖相關因子之抑制活性；最終則分析餘甘子經不同溶劑萃取後對其特殊成分含量之影響。

## 貳、文獻回顧

### 一、餘甘子

#### (一) 餘甘子簡介

餘甘子 (*Phyllanthus emblica* L.) 為大戟科 (Euphorbeaceae.) 葉下株屬 (*Phyllanthus*) 的植物，也稱為油甘、油甘果、*Emblica officinalis*、印度醋栗 (Indian gooseberry) 或 amla 等。普遍種植於中國、印度、印尼等熱帶及亞熱帶地區，且印度的傳統醫療系統-阿育吠陀 (Ayurveda) 記載其可增加身體防禦疾病的能力 (Perianayagam *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2014)。過去的研究證實餘甘子含有豐富的植物化學物質，如單寧、酚酸、類黃酮及維生素 C 等 (Sarin *et al.*, 2014)。古印度神話認為餘甘子果樹是宇宙中的第一棵樹 (Khan, 2009)，可高達 8 ~ 10 公尺，樹皮呈淺褐色，樹葉為羽毛狀與枝條緊密相連，果實成熟後為黃綠色球型，並具有六條相互垂直的溝槽可將果實分為六等分 (Variya *et al.*, 2016)。果實直接食用口味酸甜，起初酸澀感較重，而後餘味甘甜，故名為「餘甘」子 (張雯雯 *et al.*, 2013)。



圖一、餘甘子果實

Fig 1. Fruit of *Phyllanthus emblica* L.

## (二) 餘甘子機能性成分及功效

餘甘子相關研究指出其含有多種不同的功效成分，其中以多酚、類黃酮及單寧為大宗，常見成份整理於表一。而餘甘子的機能性有抗菌、抗突變、抗病毒、抗氧化、抗發炎、抗腫瘤、降血脂及抗高血糖等，於下方略為敘述：

### 1. 抗菌活性 (Antimicrobial activity)

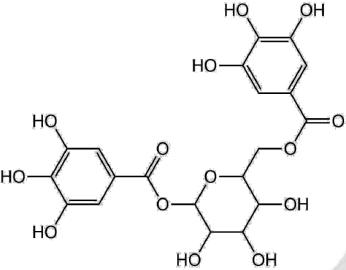
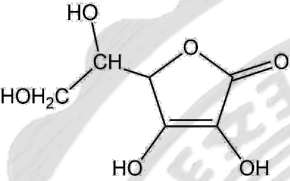
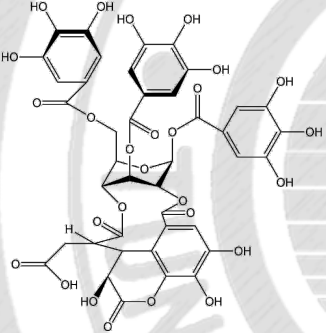
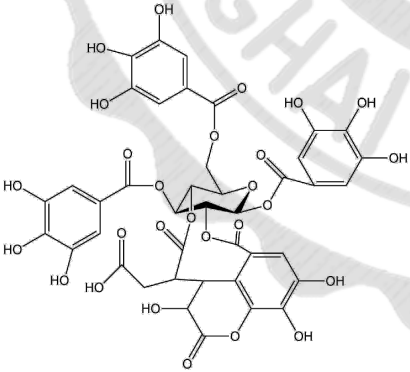
餘甘子甲醇、乙酸乙酯及水萃取物中的生物鹼 (Alkaloid) 及單寧 (Tannin) 對大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 及金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 具有抑制作用 (Vijayalakshmi *et al.*, 2007)。另一項利用瓊脂擴散法 (Agar well diffusion method) 對 82 種印度傳統藥用植物抗菌能力的研究指出，餘甘子乙醇及水萃取物對枯草芽孢桿菌 (*Bacillus subtilis*)、變形桿菌 (*Proteus tulgaris*)、鼠傷寒沙門氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 及前述兩種細菌皆具有良好的抑制活性 (Ahmad *et al.*, 1998)。

### 2. 抗病毒活性 (Anti-virus activity)

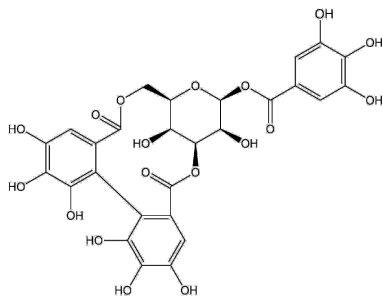
人類免疫缺陷病毒 (Human immunodeficiency virus, HIV) 為後天免疫缺乏症候群 (Acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) 的主要致病因子，餘甘子甲醇萃取物可抑制 HIV 反轉錄酶的活性，進而阻止病毒在體內的增生 (Estari *et al.*, 2012)。1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-b-D-glucose (PGG) 可藉由結合凝集素及減少病毒出芽生殖來抑制 A 型流感病毒 (Influenza A virus, IAV) 的複製，PGG 可由餘甘子樹枝或葉子中分離 (Liu *et al.*, 2011)。從餘甘子根部取得的數種倍半萜糖苷類 (Sesquiterpenoid glycoside) 可有效抑制 A 型流感病毒 H3N2、腸病毒 EV71 及 B 型肝炎病毒 (Hepatitis B virus, HBV) (Lv *et al.*, 2014; Lv *et al.*, 2015)。

表一、餘甘子中常見的機能性成分及其功效

Table 1. Functional compounds of *Phyllanthus emblica* L.

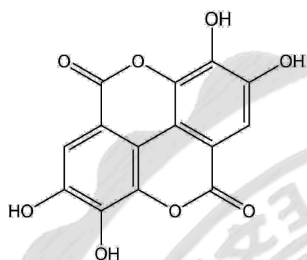
Compounds structure	Reported functional activity
 <p>The structure shows a central glucose molecule in its cyclic form, with two gallic acid units attached to the 1st and 6th carbon positions via ester linkages. Each gallic acid unit consists of a benzene ring with three hydroxyl groups.</p>	<p>Anti-virus (El-Mekkawy <i>et al.</i>, 1995) Anti-atherosclerotic (Duan <i>et al.</i>, 2005)</p>
<p>1,6-Di-O-galloyl-β-d-glucose</p>	
 <p>The structure shows the five-membered lactone ring of ascorbic acid, with a diene system and two hydroxyl groups on the ring, and a side chain containing a secondary alcohol and a terminal primary alcohol group.</p>	<p>Anti-inflammation (Carr <i>et al.</i>, 2017)</p>
<p>Ascorbic acid</p>	
 <p>The structure shows a central glucose molecule with multiple gallic acid units attached to various carbon positions (1, 2, 3, 6) via ester linkages, forming a complex polyphenolic structure.</p>	<p>Gastroprotective effects (W. Liu <i>et al.</i>, 2017) Anti-virus (Lin <i>et al.</i>, 2013) Anti-inflammation (Reddy <i>et al.</i>, 2009) Anti-diabetic (Gao <i>et al.</i>, 2008)</p>
<p>Chebulagic acid</p>	
 <p>The structure shows a complex polyphenolic structure consisting of a central glucose molecule with multiple gallic acid units and a chebulonic acid moiety attached via ester linkages.</p>	<p>Antioxidant (Manosroi <i>et al.</i>, 2010) Anti-inflammation (Manosroi <i>et al.</i>, 2010) Anti-diabetic (Lee <i>et al.</i>, 2010)</p>
<p>Chebulinic acid</p>	





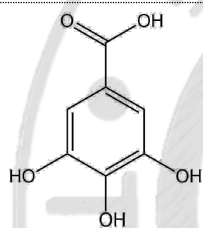
Antiatherogenic effects (Duan *et al.*, 2005)  
Anti-diabetic activity (Benalla *et al.*, 2010)

Corilagin



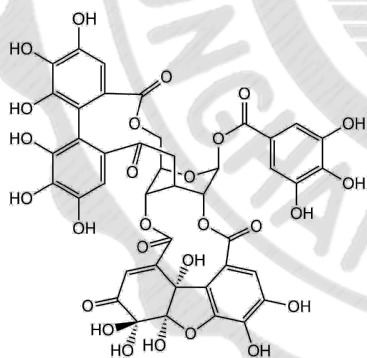
Antioxidant (Priyadarsini *et al.*, 2002)  
Anti-neoplastic (Boukharta *et al.*, 1992)  
Anti-diabetic (Benalla *et al.*, 2010)

Ellagic acid



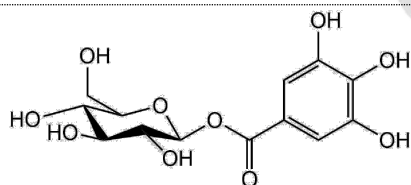
Antioxidant (Zhang *et al.*, 2004)  
Anti-diabetic (Benalla *et al.*, 2010)

Gallic acid



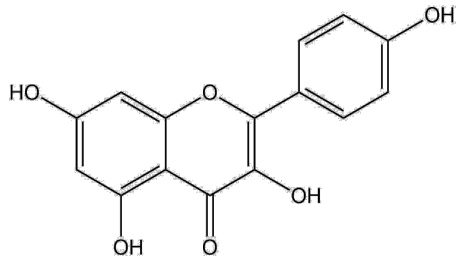
Antioxidant · Antimicrobial · Anti-virus · Anti-neoplastic · Anti-diabetic (Cheng *et al.*, 2016)

Geraniin



Antioxidant (Zhang *et al.*, 2004)  
Anti-diabetic (Puppala *et al.*, 2012)

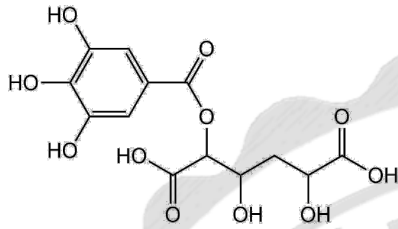
Glucogallin



Antioxidant · Antimicrobial · Anti-virus · Anti-neoplastic · Anti-diabetic (Chen *et al.*, 2013)

Kaempferol

---

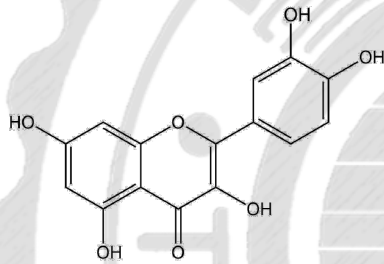


Anti-neoplastic (Potawale S. E. *et al.*, 2008)

Mucic acid-2-*O*-gallate

Mucic acid-2-*O*-gallate

---



Antioxidant (Manosroi *et al.*, 2010)  
Anti-inflammation (Manosroi *et al.*, 2010)

Quercetin

---

### 3. 抗突變活性 (Anti-mutagenicity activity)

Rao *et al.* (2016) 指出餘甘子水萃取物可降低小鼠經誘變劑-環磷醯胺 (Cyclophosphamide, CPM) 處理後，基因突變的產生頻率。使用艾美氏試驗 (Ames test) 評估 *Cassia occidentalis* 及 *Embllica officinalis* 水萃物對黃麴毒素 B1 (Aflatoxin B1, AFB1) 及苯並[a]芘 (benzo[a]-pyrene, B[a]P) 致突變的抑制活性，結果指出 *E. officinalis* 具有更好的效果，抗突變的能力應來自其中抗壞血酸 (Ascorbic acid)、鞣花酸 (Ellagic acid) 及單寧之抗氧化活性(Sharma *et al.*, 2000)。

### 4. 抗氧化活性 (Antioxidant activity)

餘甘子果實具有的抗氧化活性，會隨著栽種地區而有所不同，主要與其機能性成分的含量有關 (Liu *et al.*, 2008)。其中可分離出 geraniin, isocorilagin, kaempferol, quercetin, quercetin-3- $\beta$ -D-glucopyranoside 及 kaempferol-3- $\beta$ -D-glucopyranoside 等六種具有良好抗氧化活性之酚類成分 (Liu *et al.*, 2008)。餘甘子水萃物於乙醇誘導 HepG2 氧化損傷的實驗中，展現活性氧與脂質過氧化的抑制作用，應是與抗氧化酵素活性之提升相關 (Shivananjappa *et al.*, 2012)。70% 甲醇餘甘子萃取物具有良好的 DPPH 自由基、超氧陰離子及過氧化氫清除活性，亦能使重金屬誘導氧化壓力之大鼠改善其肝臟脂質過氧化的現象，並能提升生物體內抗氧化相關酵素之活性 (Saha *et al.*, 2015)。

### 5. 抗發炎及抗腫瘤活性 (Anti-inflammatory and anti-neoplastic activity)

研究指出發炎現象是形成惡性腫瘤的必經免疫反應，長時間在炎症誘導物的刺激下，急性發炎反應會漸漸的轉變為無法逆轉的慢性發炎症狀，其中促發炎因子在發病機制中佔有很大的因素，如環氧化酶 (Cyclooxygenase-2, COX-2)、巨噬細胞發炎蛋白 (Macrophage Inflammatory Protein-2, MIP2)、腫瘤壞死因子 (Tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ ) 及白細胞介素家族 (Interleukin family) (Nathan *et al.*, 2010)。在細胞方面，餘甘子水萃物可有效抑

制由過氧化氫 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 誘導的自由基產生 (Charoenteeraboon *et al.*, 2010)。由 B[a]P 誘導小鼠產生發炎反應後，餘甘子水萃物可顯著的降低其血清中 MIP2, TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  的蛋白質比表現量，進而減少因慢性炎症所造成的癌前病變 (Wang *et al.*, 2017)。餘甘子中的 geraniin, quercetin-3- $\beta$ -D-glucopyranoside, kaempferol-3- $\beta$ -D-glucopyranoside, isocorilagin, quercetin 及 kaempferol 皆對人類乳腺癌細胞 (MCF-7) 及成纖維細胞 (HELF) 具有強烈的細胞毒性，各成分之抗腫瘤能力源自於個別的抗氧化活性 (Liu *et al.*, 2012)。

#### 6. 降血脂 (Hypolipidemic effect)

高血脂為心血管疾病的主要風險因子之一，其特點為血清中高濃度的總膽固醇 (Cholesterol, TC)、三酸甘油酯 (Triglycerides, TG) 及低密度脂蛋白膽固醇 (Low-density lipoprotein cholesterol, LDL-c)，與低濃度的高密度脂蛋白膽固醇 (High-density lipoprotein cholesterol, HDL-c)。而血清中 LDL-c 的含量上升會促使自由基產生，導致氧化反應，進而誘發動脈粥狀硬化。臨床研究中指出，餘甘子可顯著降低罹患二型高血脂症患者體內 TC, TG 及 LDL-c 的含量，並提高 HDL-c 的水平，且效果較現行治療藥物 Simvastatin (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme-A reductase inhibitor) 更加明顯 (Huang *et al.*, 2017)。

#### 7. 抗糖尿病活性 (Anti-diabetic activity)

餘甘子萃取物除了可清除自由基，還具有  $\alpha$ -amylase 及  $\alpha$ -glucosidase 兩種糖解酵素的抑制活性 (Nampoothiri *et al.*, 2011)。所含的 gallic acid 及 ellagic acid 兩種成分可抑制糖解酵素活性 (Benalla *et al.*, 2010; Gunawan-Puteri *et al.*, 2012)。由於高血糖的狀態會形成蛋白質糖基化終產物 (Advanced glycosylation end products, AGEs)，而 AGEs 被認為是糖尿病相關併發症的主要成因 (Liu *et al.*, 2011)，而 STZ 誘導糖尿病的小鼠實驗中，餘甘子萃取物可顯著降低血清中 AGEs 的含量 (Rao *et al.*, 2005)。

## 二、糖尿病

糖尿病 (Diabetes mellitus, DM) 是一種全世界的流行性慢性病，隨著快速的都市化，高油脂、高熱量的飲食方式及久坐不動的生活習慣，造成了日漸攀升的肥胖率及糖尿病發病率。目前全世界患者高達 4.25 億人，若無任何改善及預防措施，預計 2045 年將提升到 6.29 億人 (IDF, 2017)。糖尿病是一種代謝異常疾病，因為胰島素的分泌或是運作失常，無法正常代謝飲食所攝取的醣類，造成高血糖的現象 (Kharroubi *et al.*, 2015)。身體呈現高血糖的狀態時，會頻尿、口渴，有時伴隨暴食及視力模糊等症狀。血糖在短時間內急遽上升，恐引發危及生命的酮酸中毒 (Ketoacidosis)、非酮性高滲壓休克 (Nonketotic hyperosmolar coma)。而長期處於高血糖的狀態下，有可能併發視網膜和神經病變、腎衰竭及乳酸性酸中毒，並提高心血管疾病的發病率 (ADA, 2010)。

美國糖尿病協會 (American Diabetes Association, ADA) 的報告指出，可藉由糖化血色素 (Glycated hemoglobin, A1C)、空腹血糖值 (Fasting plasma glucose, FPG)、口服葡萄糖耐受性測試 (Oral glucose tolerance test, OGTT) 及隨機血糖測試 (Random plasma glucose test, RPGT) 診斷是否罹患糖尿病或評估罹患糖尿病的風險 (表二及表三)。

表二、糖尿病診斷標準

Table 2. Criteria for the diagnosis of diabetes (ADA, 2018)

診斷標準	備註
A1C $\geq$ 6.5%	至少 8 h 沒有進食*
FPG $\geq$ 126 mg/dL	依照 WHO 之方法，使用相當於 75 g 無水葡萄糖的葡萄糖水*
2-h PG $\geq$ 200 mg/dL during OGTT	應在具有 NGSP 認證及 DCCT 測量標準流程之實驗室中進行*
RPGT $\geq$ 200mg/dL	具有典型高血糖症狀之患者

\* 任一項符合即確認，若無明顯高血糖症狀下，應重複測試以驗證結果。

表三、糖尿病前期的診斷標準

Table 3. Criteria for the diagnosis of prediabetes (ADA, 2018)

診斷標準
A1C 5.7 ~6.4%
FPG 100 ~ 125 mg/dL
2-h PG during 75 g OGTT 140 ~ 199 mg/dL

\* 任一項符合即確認。

## (一) 糖尿病的分類

### 1. 第一型糖尿病 (Type I diabetes mellitus, T1DM)

此類患者體內的胰臟β細胞因自體免疫 (Autoimmunity) 而被破壞，無法正常分泌胰島素，為了代謝體內的醣類，需額外注射胰島素來控制血糖，故稱為胰島素依賴型糖尿病 (Insulin-dependent diabetes mellitus)，並且大多在兒童或青少年時期就發病，亦稱為青少年發病型糖尿病 (Juvenile-onset diabetes)，約有5%~10%的糖尿病患者為此類型。造成此類的影響因子很多 (表四)，並易於罹患其他自體免疫疾病，如重症肌無力、惡性貧血等 (ADA, 2010)。

表四、第一型糖尿病發病影響因子

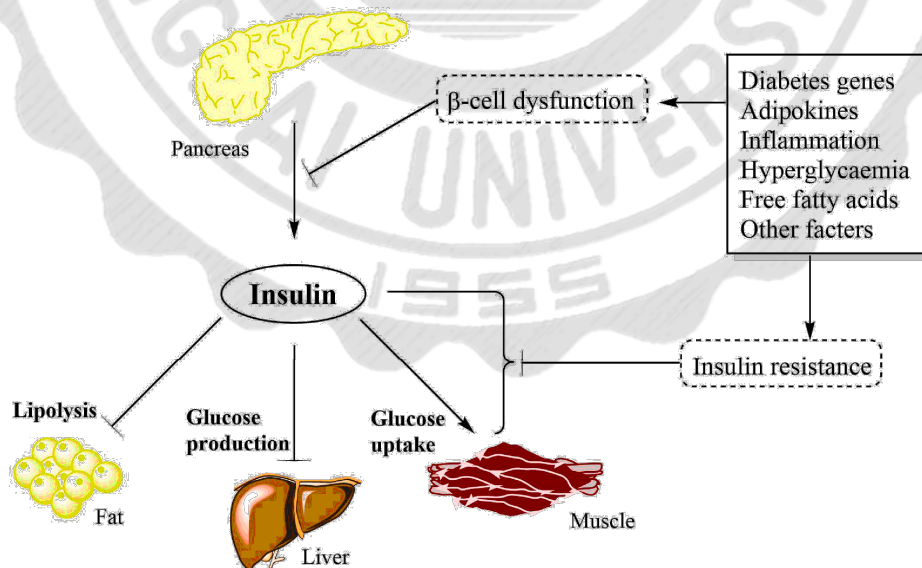
Table 4. Contributing factors in type 1 diabetes mellitus pathogenesis (Paschou *et al.*, 2017).

Contributing factors	Example
Genetic factors	HLA
	Insulin-VNTR
	CTLA-4
	Other genetic associations (PTPN22, AIRE...)
Epigenetic factors	-*
Environmental factors	Viruses (rubella, enteroviruses)
	Diet (cow's milk, cereals, ω-3 fatty acid, vit. D)
	Gut microbiota
Immunologic factors	Immune tolerance (central, peripheral, Tregs)
	Humoral immunity (GAD65, IA-2, IAA, ZnT8)

\* Specific pathogenesis remains unclear

## 2. 第二型糖尿病 (Type II diabetes mellitus, T2DM)

第二型糖尿病也可稱為非胰島素依賴型糖尿病 (Non-insulin-dependent DM) 或是成人型糖尿病 (Adult-onset DM)，是最為常見的糖尿病種類，約有 90% ~ 95% 患者屬於此類。通常會出現兩種病徵 (圖二)，一種是胰島素作用於組織上刺激葡萄糖代謝或抑制肝醣輸出的能力降低，為胰島素阻抗；另一種則是胰島  $\beta$  細胞為了補充胰島素缺乏所造成的代謝缺口，更加強烈的分泌胰島素 (代償性胰島素分泌)，高強度的工作下加速細胞死亡，使得激素不足，為胰島素缺乏 (Prentki *et al.*, 2006; Azevedo *et al.*, 2008)。上述兩種病徵導致血液中的葡萄糖無法進入肝臟細胞、肌肉細胞和脂肪細胞，造成高血糖的現象 (Olokoba *et al.*, 2012)。此類糖尿病會因為遺傳、環境或生活方式等多種因素相互影響而造成 (Ripsin *et al.*, 2009)。如果父母皆具糖尿病，其子女罹患 T2DM 的機率高達 50% (Kahn, 1994)。而肥胖會明顯的增加糖尿病的患病率，且許多的生活方式會進一步的提高風險，例如久坐不動和吸菸 (Hu *et al.*, 2001)。隨著現代化的影響，肥胖人口的年齡層逐漸下降，兒童及青少年罹患第二型糖尿病的人口數也逐漸攀升 (Reinehr, 2013)。



圖二、第二型糖尿病病理生理學

Fig 2. Pathophysiology of type II diabetes (Kahn, 1994)

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

GDM 為在懷孕期間第一次被診斷出有糖尿病，無論懷孕前後或是嚴重程度，影響約 2% ~ 5% 的孕婦。一項大規模跨國研究-高血糖和不良妊娠反應 (Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes, HAPO) 的結果指出，母親和胎兒產生不良妊娠反應的風險，會隨著母親的血糖升高而不斷的增加。對於母親而言，GDM 會導致尿道感染、腎炎、先兆子癇及增加孕後罹患第二型糖尿病的風險。對於胎兒，在其母親懷孕期間可能會過度成長，體型過大造成分娩困難；生產後短時間會提高膽紅素血症、低鈣血症、呼吸窘迫綜合症等發病率，長時間則可能引發肥胖、幼兒糖尿病、運動功能受損及好動 (Gilmartin *et al.*, 2008)。一般建議在懷孕 24 ~ 28 週及產後 6 ~ 12 週進行妊娠型糖尿病的篩檢，以確保胎兒及母體健康 (表五)。

表五、妊娠型糖尿病篩檢

Table 5. Screening for and diagnosis of GDM (ADA, 2018)

診斷標準
Perform a 75-g OGTT, with plasma glucose measurement when patient is fasting and at 1 and 2 h, at 24 ~ 28 weeks of gestation in women not previously diagnosed with overt diabetes.
The OGTT should be performed in the morning after an overnight fast of at least 8 h. The diagnosis of GDM is made when any of the following plasma glucose values are met or exceeded:
➤ FPG $\geq$ 92 mg/dl (5.1 mmol/L)
➤ 1 h $\geq$ 180 mg/dl (10.0 mmol/L)
➤ 2 h $\geq$ 153 mg/dl (8.5 mmol/L)

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

其他特異型為各種已知病因之糖尿病類型的統稱 (表六)，相當於發生在具有特定情況或病症患者身上的糖尿病。例如： $\beta$  細胞功能遺傳缺陷 (Maturity onset diabetes of the young, MODY)、胰島素作用遺傳缺陷、外分泌胰腺疾病、內分泌疾病、藥物或化學誘導、感染、少見自體免疫糖尿病及糖尿病相關綜合症等 (Baynes, 2015)。



表六、其他特異型糖尿病病因

Table 6. Etiologic Classification of other specific types Diabetes Mellitus (Baynes, 2015)

分類	病因
β 細胞功能遺傳缺陷	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 第 20 對染色體，HNF-4α (MODY1)</li> <li>2. 第 7 對染色體，葡萄糖激酶 (MODY2)</li> <li>3. 第 12 對染色體，HNF-α (MODY3)</li> <li>4. 第 13 對染色體，IPF-1 (MODY4)</li> <li>5. 粒線體 DNA</li> <li>6. 單基因糖尿病</li> </ol>
胰島素作用遺傳缺陷	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. A 型胰島素阻抗</li> <li>2. 矮妖精貌症候群 (Leprechaunism)</li> <li>3. Rabson-Mendenhall 綜合症</li> <li>4. 脂肪營養型糖尿病</li> </ol>
外分泌胰腺疾病	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 胰腺炎</li> <li>2. 胰腺切除/創傷</li> <li>3. 腫瘤</li> <li>4. 纖維性囊腫</li> <li>5. 血鐵沉積症</li> <li>6. 纖維鈣化性胰臟病變</li> </ol>
內分泌疾病	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 肢端肥大症</li> <li>2. 庫欣氏症候群</li> <li>3. 升糖素瘤</li> <li>4. 嗜鉻細胞瘤</li> <li>5. 甲狀腺亢進</li> <li>6. 體抑素瘤</li> <li>7. 醛固酮腺瘤</li> </ol>
藥物或化學誘導	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Vacor</li> <li>2. Pentamidine</li> <li>3. 菸鹼酸</li> <li>4. 糖皮質素</li> <li>5. 甲狀腺素</li> <li>6. Diazoxide</li> <li>7. β 腎上腺素促進劑</li> <li>8. Thiazides</li> <li>9. Dilantin</li> <li>10. α 干擾素</li> </ol>
感染	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 先天性德國麻疹</li> <li>2. 巨細胞病毒</li> </ol>
少見自身免疫糖尿病	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 僵體症候群 (stiff-man syndrome)</li> <li>2. 抗胰島素受器抗體</li> </ol>
糖尿病相關綜合症	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 唐氏症候群</li> <li>2. 克氏症候群</li> <li>3. 特納氏症候群</li> <li>4. Wolfram 症候群</li> <li>5. Friedreich 氏運動失調</li> <li>6. 亨汀頓氏舞蹈症</li> <li>7. 勞倫斯-月亮症候群</li> <li>8. 肌強直性營養不良</li> <li>9. 紫質症</li> <li>10. 普瑞德-威利症候群</li> </ol>

## (二) 糖尿病的治療

糖尿病的治療方式一般可分為非藥物及藥物兩種形式，非藥物即是利用日常生活習慣來調節血糖。T1DM 通常必須由體外注射胰島素來調控血糖，避免後續併發症的發生 (Hachana *et al.*, 2018)。T1DM 患者近年來肥胖率逐漸上升，恐是因為外源性胰島素造成體內激素表現紊亂，故需要利用飲食調整及運動來控制體重，進而避免心血管疾病 (Mottalib *et al.*, 2017)。初期 T2DM 可藉由改變生活方式及減重來改善，但若沒有良好的控制習慣還是有可能造成糖尿病的惡化，而需要降血糖藥物的輔助 (Röder *et al.*, 2016)。

目前核准使用的降血糖藥物整理於表七及表八，作用機制大多基於刺激胰島素分泌、增加胰島素敏感性、降低血液中葡萄糖含量及保護  $\beta$  細胞，但幾乎所有藥劑都有其副作用。各種源自於天然植物中的成份，如多酚、單寧及生物鹼，經研究證實具有抗糖尿病的功效，可做為較無副作用的天然降血糖來源 (Firdous, 2014)。

表七、降血糖注射藥物

Table 7. Hypoglycemic injection (Marín-Peñalver *et al.*, 2016)

分類	藥物	作用機制	副作用
類胰島素肽 1 受體 促效劑 (GLP-1 receptor agonist)	Albiglutide	促進腸道中 GLP-1 作用， 增加胰島素分泌及降低升 糖素含量。	噁心、腹瀉及腹 痛；注射部位的 壞死。
	Dulaglutide		
	Exenatide		
	Lixisenatide		
胰島素 (Insulin)	Rapid-acting insulin	促進細胞對葡萄糖的吸收。	-
	Long-acting insulin		
	Ultra-long-acting insulin		
胰島類澱粉肽類似 物	Pramlintide	利用延緩胃排空，減少食物 的攝取，來抑制餐後高血糖 的現象。	噁心、腹瀉。

表八、口服降血糖藥物

Table 8. Oral hypoglycemic agents (Marín-Peñalver et al., 2016)

分類	藥物	作用機制	副作用
雙胍類 (Biguanide)	Metfor min	抑制肝臟糖質新生作用、增加胰島素敏感性、減少腸胃道對葡萄糖的吸收。	厭食、噁心、腹瀉等，易罹患乳酸性酸中毒者須避免使用，否則會有生命危險。
胰島素分泌促進劑 (Insulin secretagogues)	磺脲類： Glyburide Glipizide Gliclazide Glimepiride 氯茴苯酸類： Repaglinide Nateglinide	作用於胰臟 β 細胞上的 ATP 敏感性鉀離子通道，促進胰島素分泌。兩類藥物主要結合位點不同。	低血糖、體重增加；隨時間藥物逐漸失效，而使 β 細胞衰竭；磺脲類須注意與其他藥物之間的相互作用。
胰島素增敏劑 (Insulin sensitizer)	Rosiglitazone Pioglitazone	作用於過氧化物酶體增殖物活化受體 (PPAR)，促進肌肉、脂肪及肝臟的胰島素敏感性；並維持 β 細胞功能。	體重增加、心力衰竭及肝損傷。
α-葡萄糖苷酶抑制劑 (α-glucosidase inhibitors)	Acarbose Miglitol Voglibose	抑制腸道中 α-葡萄糖苷酶將寡糖分解為單糖，延長食物中葡萄糖的消化的時間，減少餐後高血糖的現象。	寡糖經腸道細菌發酵造成脹氣、腹瀉及腹痛等。
二肽基肽酶抑制劑 (DPP-4 inhibitor)	Sitagliptin Vildagliptin Saxagliptin Linagliptin Alogliptin	抑制 DPP-4 剪切腸道內腸促胰島素 (GLP-1, GIP)。使此兩種蛋白持續刺激胰島素分泌，而代謝血液中葡萄糖。	目前無研究指出相關副作用。
鈉-葡萄糖協同轉運蛋白 2 抑制劑 (Sodium glucose co-transporter-2 inhibitor)	Dapagliflozin Canagliflozin Empagliflozin	抑制腎臟對葡萄糖的再吸收，減少血液葡萄糖來源，而減少高血糖的風險。	因高糖分尿液造成的泌尿道感染。

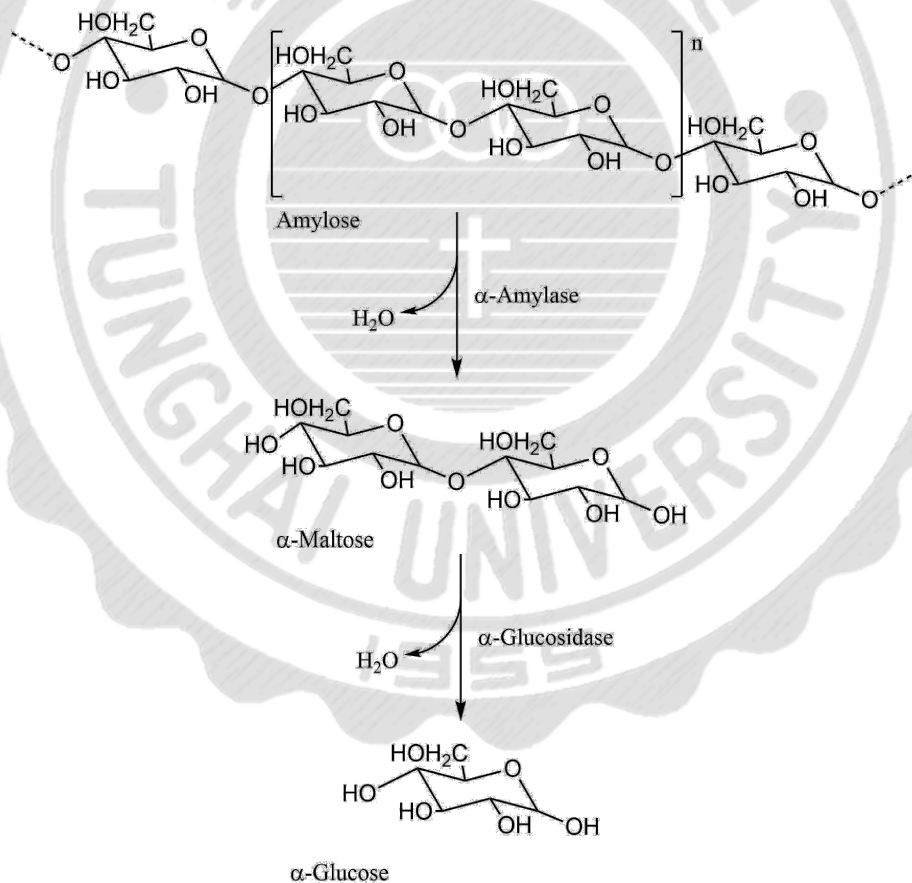
### (三) 人體血糖的恆定

#### 1. 碳水化合物的代謝闡述

碳水化合物是人體能量的主要來源，攝取進入人體的多醣需經由糖解酵素消化成葡萄糖後才能被人體吸收 (圖三)。故抑制糖解酵素的作用，會延緩葡萄糖於體內釋出，改善餐後高血糖的現象，可做為治療 T2DM 的方法。

##### (1) $\alpha$ -澱粉酶 ( $\alpha$ -Amylase)

$\alpha$ -Amylase (E.C.3.2.1.1) 是一種可水解結構內  $\alpha$ -1,4-糖苷鍵 ( $\alpha$ -1,4-Glycosidic linkage) 的內切型酵素，動物、植物及微生物組織中皆可發現，可將多醣剪切為寡醣 (Souza *et al.*, 2010)。



圖三、糖解酵素作用模式

Fig 3. Glycolytic enzyme action pattern (Gudipati *et al.*, 2005)

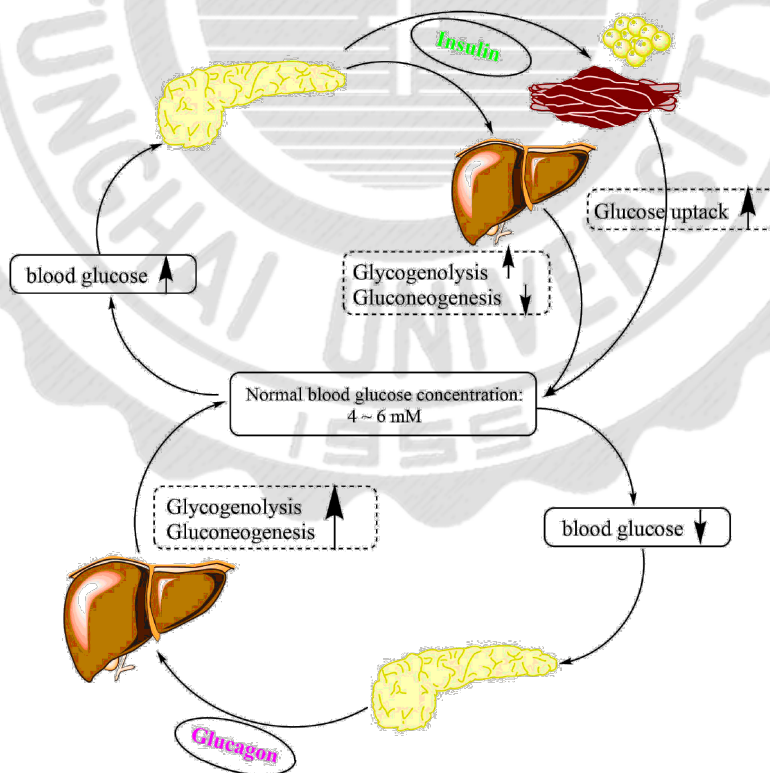
## (2) $\alpha$ -葡萄糖苷酶 ( $\alpha$ -Glucosidase)

$\alpha$ -Glucosidase (E.C.3.2.1.20.) 為外切型酵素，通常可於小腸絨毛邊緣找到，可釋放醣類非還原末端的葡萄糖，而造成血糖的上升 (Z. Liu *et al.*, 2017)。

碳水化合物經糖解酵素水解後，最終以葡萄糖的形式存在於血液當中，身體內各個組織會受到胰島素的刺激，而將葡萄糖攝取進入細胞，進行後續的利用。

## 2. 血液中葡萄糖的調節

血糖的調節主要倚靠胰臟所分泌的胰島素及升糖素，當血糖濃度過高時，胰臟會分泌胰島素促使肝臟、肌肉或脂肪將葡萄糖轉變為肝醣或是三酸甘油酯儲藏於組織中；而當血糖濃度不足時，升糖素則會作用於肝臟，使其將儲存的肝醣分解 (Glycogenolysis) 並進行糖質新生 (Gluconeogenesis)，將葡萄糖釋出於血液中供其他身體組織使用 (Röder *et al.*, 2016)。

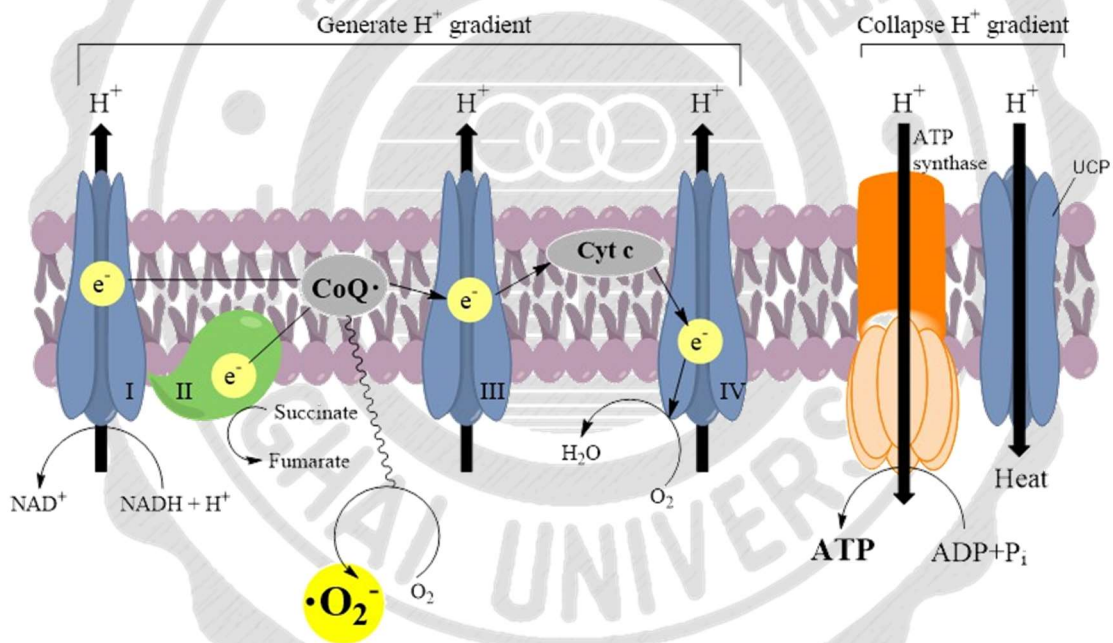


圖四、血糖恆定機制

Fig 4. The mechanism of blood glucose homeostasis (Röder *et al.*, 2016).

### 三、高血糖與自由基

正常體內代謝系統會攝取葡萄糖進入細胞，藉由粒線體中的電子傳遞鏈反應產生能量，但同時也會產生活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) (圖五)。而糖尿病相關併發症的發生，倚賴下列幾種致病機制：提高多元醇代謝途徑中的醛糖還原酶活性、提升己糖胺路徑的反應、增加蛋白質激酶 C (Protein kinase C, PKC) 活性及加速細胞內產生晚期糖化終產物 (Advanced glycation end products, AGEs)，上述機制皆會造成細胞損傷而衍生相關的疾病 (Kaneto *et al.*, 2010)。而粒線體電子傳遞鏈反應產生過量的活性氧超氧陰離子  $O_2\cdot^-$  被認為是前述四種糖尿病併發症誘發路徑的主要源頭 (Brownlee, 2005)。



圖五、粒線體內電子傳遞鏈產生超氧陰離子的過程

Fig 5. Hyperglycemia-induced production of superoxide anion by the mitochondrial electron transport chain (Brownlee, 2005).

## (一) 自由基與活性氧

自由基是一種具有一個或一個以上不成對電子的離子、原子或分子，因為電子不成對，所以傾向奪取附近結構中的電子，使自身形成穩定的狀態，而失去單一電子的分子則會形成新的自由基，再進行搶奪，而造成自由基連鎖反應，產生越來越多的自由基 (Aruoma, 2003)。

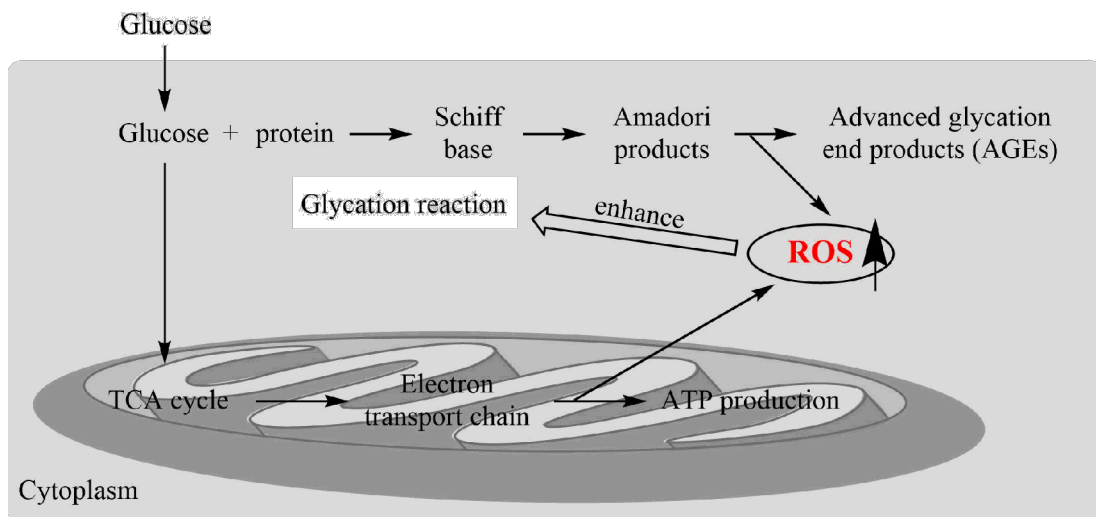
ROS 則是一群具有氧的高反應性分子，包含中心為氧的自由基以及中心為氧的非自由基 (表九) (El-Bahr, 2013)。許多疾病都與活性氧相關，其所具有的高反應性，會破壞細胞中的 DNA、蛋白質、碳水化合物及脂質 (Lobo *et al.*, 2010)。ROS 的來源可分為內源性及外源性，身體內部自行產生的可能來自於粒線體、細胞膜、內質網、過氧化酵素及自氧化物質等；而環境中的紫外線、病毒、毒素及化學物質的暴露都有可能造成體內 ROS 的增加 (Ayala *et al.*, 2014)。

以 30 mM 與 5 mM 葡萄糖分別刺激內皮細胞，高濃度組所產生的 ROS 含量為低濃度的五倍 (Brownlee, 2005)。圖六表示細胞長時間處於高血糖的狀態下，會產生過量的 ROS，而過多的 ROS 又會促進蛋白質與醣類的非酵素性糖化反應 (Non-enzymatic glycation reaction)，惡性循環下體內的 ROS 含量大幅上升，造成體內氧化還原平衡的失調，形成氧化壓力 (Lapolla *et al.*, 2005; Kaneto *et al.*, 2010)。

表九、活性氧分類

Table 9. Classification of ROS (El-Bahr, 2013).

Radicals		Nonradicals	
Hydroxyl	$\cdot\text{OH}$	Singlet oxygen	$^1\text{O}_2$
Alkoxyl	$\text{RO}\cdot$	Hydrogen peroxide	$\text{H}_2\text{O}_2$
Peroxyl	$\text{ROO}\cdot$	Hydroperoxide	$\text{ROOH}$
Superoxide	$\text{O}_2^{\cdot-}$		



圖六、高血糖促進糖化反應和粒線體中電子傳遞鏈產生 ROS

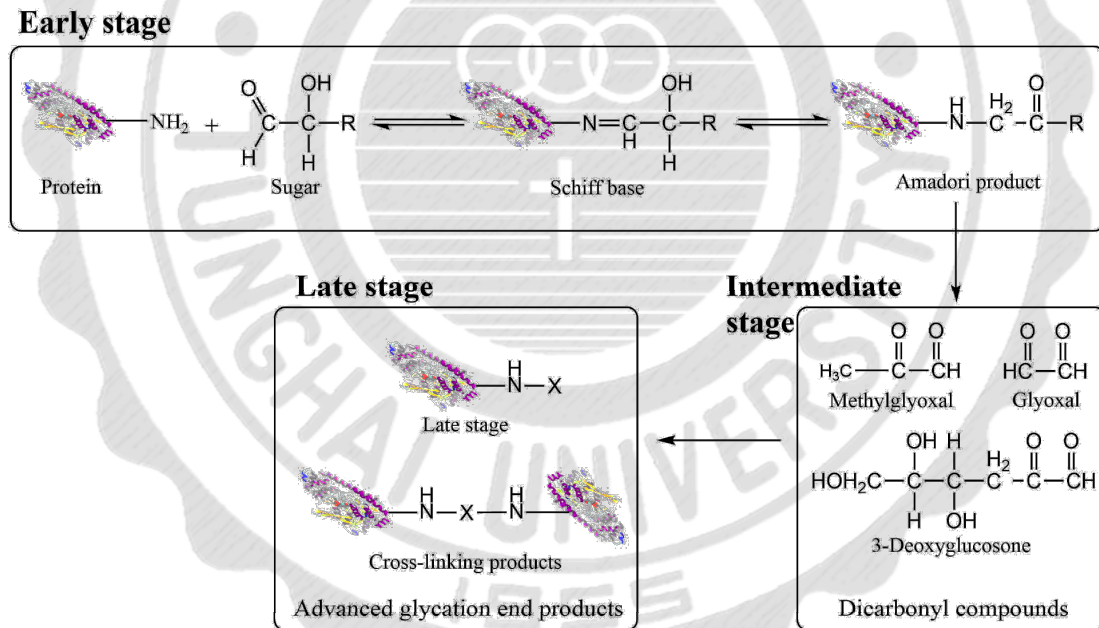
Fig 6. Hyperglycemia promotes saccharification and ROS production in the electron transport chain in mitochondria (Kaneto et al., 2010).





## (二) 糖基化反應

晚期糖化終產物 (Advanced glycation end products, AGEs) 的形成是藉由胺基酸與葡萄糖進行非酵素性梅納反應 (Maillard reaction)，其中分為三個階段 (圖七)：早期葡萄糖先與游離胺基反應形成不穩定的希夫鹼 (Schiff base)，經 Amadori 重排後成為穩定的產物。Amadori 產物在中期經脫水及氧化作用降解成高反應性的二羰基化合物，最終再次經過脫水、氧化及環化反應，形成具有螢光性質的 AGEs (Singh *et al.*, 2014)。而 AGEs 會與蛋白質連接，破壞蛋白質的功能，也可做為酵素的連接劑，使酵素沉積而失去活性 (Lapolla *et al.*, 2005)。有研究指出，形成 AGEs 的糖基化反應過程，同時也會產生  $O_2^{\cdot-}$ ，造成更嚴重的氧化損傷 (Nakashima *et al.*, 2012)。



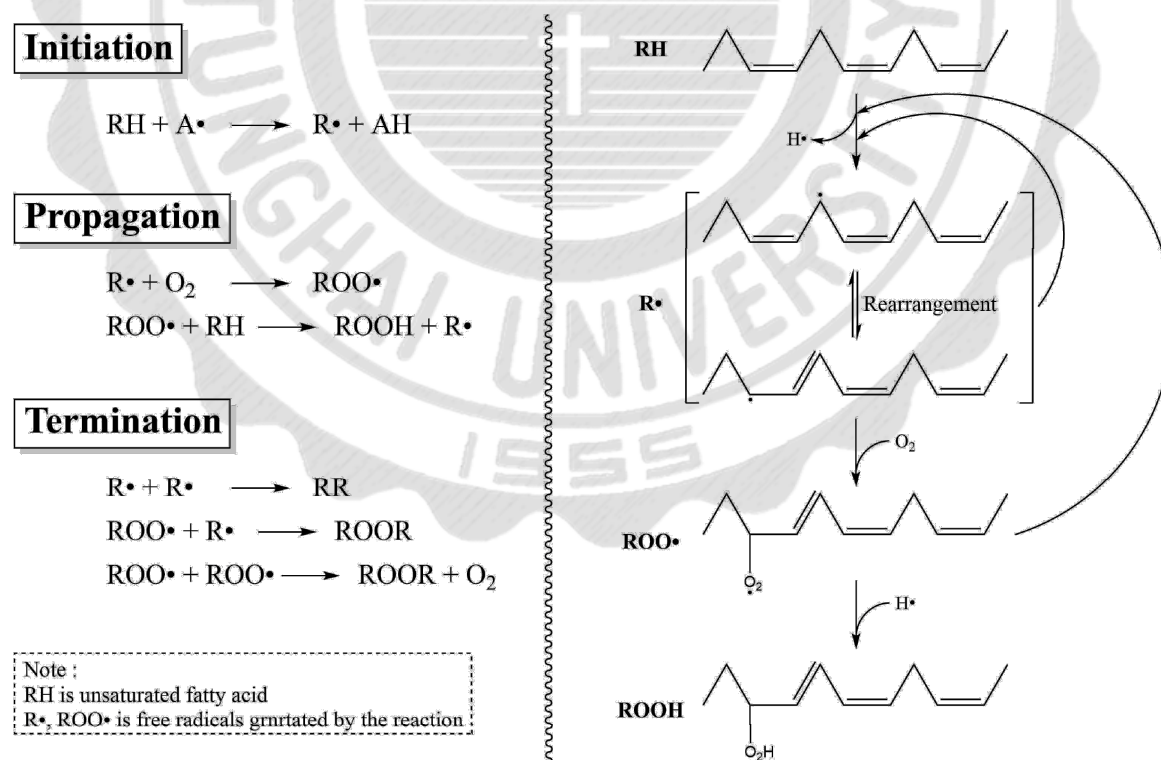
圖七、糖基化三階段反應示意圖

Fig 7. Formation of advanced glycation end products in three stages (Lapolla *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2014).

### (三) 自由基與脂質

高氧化性的自由基會攻擊含有碳-碳雙鍵的脂質，尤其是富含雙鍵的多元不飽和脂肪酸，結構中的雙鍵造成相連的 C-H 鍵強度下降，故 H 更容易被搶奪 (Repetto *et al.*, 2012)。

油脂氧化為一種自由基連鎖反應 (Free radical chain reaction)，整個反應包含了三個步驟：起始期 (Initiation stage)、連鎖反應期 (Propagation stage)與終止期 (Termination stage)，如圖八。由自由基、紫外線、輻射或金屬離子氧化脂肪酸開始，產生以碳為中心的脂質自由基 (R·)。起始期所產生的脂質自由基與氧反應形成脂質過氧化自由基 (ROO·)，再與其他脂質分子進行連鎖反應，產生更多的 R·、ROO·及脂質過氧化物 (ROOH)。最終則是自由基相互作用產生非自由基產物。脂質一但開始進行氧化，就會引發上述連鎖反應，直到最終步驟 (Ayala *et al.*, 2014)。



圖八、脂質過氧化機制圖

Fig 8. Reaction of lipid peroxidation (Gutteridge, 1995; Repetto *et al.*, 2012)

#### 四、氧化和抗氧化作用

氧化壓力 (Oxidative stress) 是身體中氧化與抗氧化平衡失調時的現象，影響了正常細胞的功能表現，導致各種疾病的產生，如衰老、關節炎、自體免疫疾病、糖尿病及心血管疾病等。因氧化會導致人體生病，抗氧化的作用被認為是可以回復體內失衡的狀態，進而預防各項疾病的發生。抗氧化劑被定義為在低濃度下即可延緩蛋白質、脂質、碳水化合物和 DNA 受到氧化破壞的任何物質 (Tiwari, 2001; Sindhi *et al.*, 2013)。

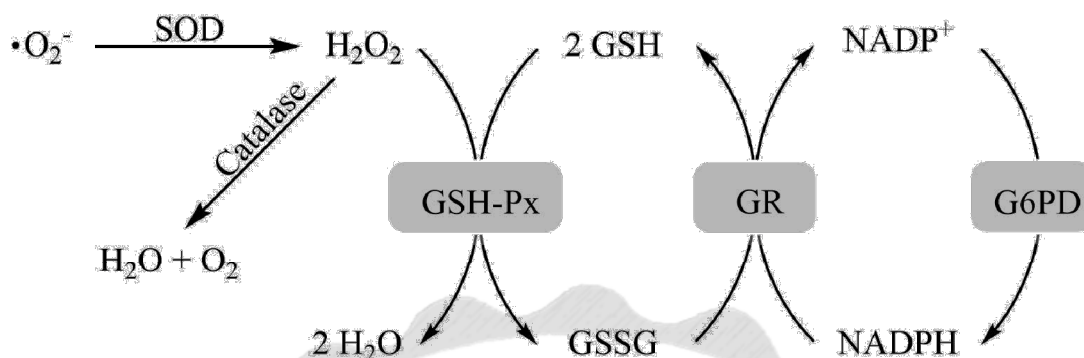
生物體演化的進程，很多的反應都需要進行氧化反應來釋放能量，而通常反應的過程都會產生對人體有害的活性氧，因此需要有相應的抗氧化機制 (Lushchak, 2014)。以防禦的角度，抗氧化劑通常可以分為三類，分別為一線防禦抗氧化劑，包含超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD)、過氧化氫酶 (Catalase, CAT) 及穀胱甘肽 (Glutathione, GSH)，可排除人體內因代謝所產生的活性氧；第二類為二線防禦抗氧化劑，例如維生素 C、維生素 E、類胡蘿蔔素及多酚類等；第三類為三線防禦抗氧化劑，為體內用於修復受損成分的酵素，如脂肪酶、蛋白酶和 DNA 修復酶等 (Sindhi *et al.*, 2013)。

若以抗氧化劑性質區分，可分為酵素性及非酵素性抗氧化劑 (Carocho *et al.*, 2013)。

##### (一) 酵素性抗氧化劑

此類包含超氧化物歧化酶、穀胱甘肽過氧化物酶 (Glutathione peroxidase, GSH-Px)、過氧化氫酶、穀胱甘肽還原酶 (Glutathione reductase, GR) 及葡萄糖-6-磷酸脫氫酶 (Glucose-6-phosphate-dehydrogenase, G6PD)。其作用機制如圖九，SOD 先將合成能量所產生的超氧陰離子轉變為毒性較低的過氧化氫 ( $H_2O_2$ )，再藉由 CAT 及 GSH-Px 將其轉化為無毒的水，而 GR 及 G6PD 則是負責將反應過後的 GSSG 及  $NADP^+$  轉變為 GSH 及 NADPH，使兩者能再次在

酵素性防禦系統中作用 (Carocho *et al.*, 2013)。



圖九、酵素性抗氧化劑作用機制

Fig 9. Reaction of enzymatic antioxidant (Tandoğan *et al.*, 2006)

## (二) 非酵素性抗氧化劑

此類則可分為體內可自行合成的內源性抗氧化劑及倚靠飲食攝取的外源性抗氧化劑。

### 1. 內源性抗氧化劑 (Endogenous antioxidants)

#### (1) 穀胱甘肽

GSH 是由麩胺酸、半胱胺酸及甘胺酸所組成的非蛋白質硫醇 (Non-protein thiol)，兩個 GSH 經 GSH-Px 作用提供電子將過氧化氫還原為水，而自身形成穀胱甘肽二硫化物 (GSSG)，GSH 與 GSSG 為動物體內最主要的氧化還原對 (Redox couple) (Aguilar *et al.*, 2016)。

#### (2) $\alpha$ -硫辛酸 ( $\alpha$ -Lipoic acid, LA)

LA 經氧化會轉化為二氫硫辛酸，而達到抗氧化的作用；但其主要功效是再生已使用的抗氧化劑，回復其抗氧化的活性，並且具有金屬螯合的能力，亦可做為螯合劑減緩氧化的速率 (Packer *et al.*, 1995)。LA 可降低高糖誘導脂質過氧化小鼠腦中的氧化終產物的含量 (Nickander *et al.*, 1996)。

#### (3) 輔酶 Q (Coenzyme Q, CoQ)

輔酶 Q 為人體內唯一的內源性脂溶性苯醌化合物，幾乎存在於體內所有

細胞的粒線體內膜上，具有很強的抗氧化活性，又因分布廣泛的原因，在體內抗氧化扮演很重要的角色。且研究發現，CoQ 具有多種不同的功能，如氧化還原載體、抗氧化劑、解偶聯蛋白活化劑及影響粒線體滲透性轉換孔；且抗氧化保護效果遍及 DNA、蛋白質及脂質等 (Bentinger *et al.*, 2007; Aguilar *et al.*, 2016)。

#### (4) 鐵蛋白 (Ferritin)

鐵蛋白為一種獨特的蛋白質，由 24 個蛋白亞基構成，可在所有生物中發現，包含細菌及古細菌，而在細胞內的含量，取決於細胞在生物體內的作用。鐵蛋白為許多細胞功能的催化劑，例如製造用於 DNA 的脫氧核糖、攜帶氧氣 (血紅蛋白、肌紅蛋白) 及合成類固醇等 (Theil, 2010)。二價鐵會催化芬頓反應 (Fenton's reaction) 增加 ROS 的含量，而鐵蛋白可限制二價鐵在體內的流通，減少活性氧的產生 (Imam *et al.*, 2017)。

#### (5) 尿酸 (Uric acid)

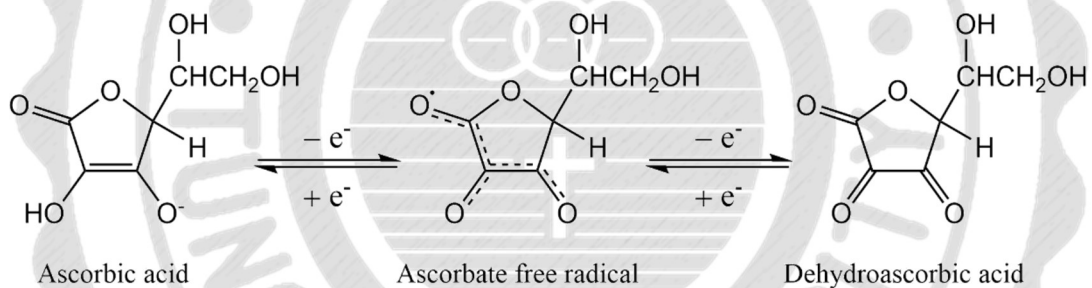
尿酸為靈長類體內嘌呤代謝的中間產物，有研究指出，尿酸的含量可用於預測高血壓、肥胖、心血管疾病及糖尿病的發生。血漿的抗氧化活性約有 24% 是尿酸所貢獻的，高濃度的尿酸已證實可保護神經、血管及心臟免受氧化損傷。但尿酸為水溶性，故僅能在親水的環境中做為抗氧化劑使用 (Sautin *et al.*, 2008; Aguilar *et al.*, 2016)。

### 2. 外源性抗氧化劑 (Exogenous antioxidants)

上述內源性抗氧化劑皆具有良好的抗氧化活性，但隨人體的成長，會受到更多外界的影響，導致 ROS 的產量上升，需藉由食物來攝取額外的抗氧化劑協助體內自由基的調節 (Bouayed *et al.*, 2010)。常見的有維生素 C、維生素 E 及多酚等植物中常見的化學物質。

### (1) 維生素 C (Vitamin C)

維生素 C 又稱為抗壞血酸 (Ascorbic acid)，被認為是人體血漿中最重要  
的抗氧化劑，部分推斷是因為其水溶性，在正常生理濃度下可避免細胞遭受  
ROS 的攻擊。維生素 C 可作為電子供給者 (One-electron donor)，消除 ROS 的  
破壞性後，形成相對穩定的抗壞血酸自由基 (Ascorbate free radical, AFR) 或  
脫氫抗壞血酸 (Dehydroascorbic acid, DHA)，如圖十兩者皆可藉由 NADH 或  
NADPH 依賴性還原酶，將其還原為抗壞血酸 (Harrison, 2012; Grosso *et al.*,  
2013)。矛盾的是，當體內維生素 C 含量過低或有過渡金屬離子存在時，維生  
素 C 反而會促進氧化產生 ROS，而喪失抗氧化的功效 (Duarte *et al.*, 2005)。  
人類體內缺乏合成維生素 C 所需要的 L-古洛糖酸內酯氧化酶 (L-  
gulonolactone oxidase)，所以必須從天然蔬果中取得 (Telang, 2013)。

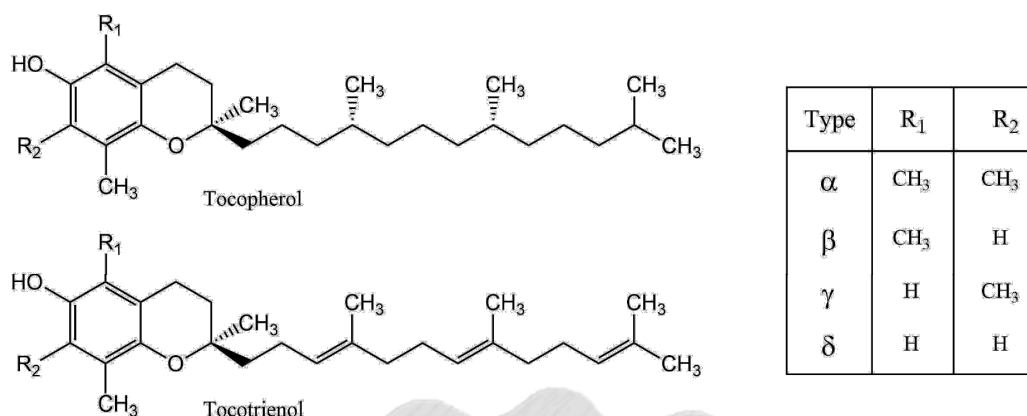


圖十、維生素 C 的氧化還原反應

Fig 10. Redox of vitamin C (Duarte *et al.*, 2005)

### (2) 維生素 E (Vitamin E)

亦稱為生育醇 (Tocopherol)，為抗氧化防禦系統中主要的脂溶性成分，並  
且僅能於食物中獲得。在自然界中主要以八種形式存在 (圖十一)，分別為  $\alpha$ -  
 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -生育酚 (Tocopherol) 和生育三烯酚 (Tocotrienol)，主要功能為阻斷  
脂質的過氧化 (Rizvi *et al.*, 2014)。 $\gamma$ -生育酚於飲食中含量豐富，而  $\alpha$ -生育酚  
則是在人體組織及血清中最多。可保護表皮細胞免受氧化作用，如急性紫外  
線損傷、慢性紫外線光老化及皮膚癌等 (Keen *et al.*, 2016)。



圖十一、生育酚及生育三烯酚結構

Fig 11. The structures of a tocopherol and tocotrienol (Rizvi *et al.*, 2014).

### (3) 多酚 (Polyphenols)

多酚是植物化學物質 (Phytochemical)，可在蔬菜、水果、豆類、穀物及茶葉中找到。現今已發現上千種多酚，大多數可作為抗氧化劑，保護植物體免受外界的攻擊。近年來人類對於攝取膳食多酚越來越感興趣，用以避免受到自由基及各項環境因子的傷害 (Ganesan *et al.*, 2017)。食用富含多酚的食物可能有助於降低心血管疾病、結腸癌、肝臟疾病、肥胖及糖尿病的發病率 (Rasouli *et al.*, 2017)。

餘甘子中含有多種酚類物質，其抗氧化及糖尿病相關抑制活性雖於國外已有許多研究證實，但台灣地區最近幾年才重新正視其價值，並進一步的推廣及栽種。植物化學物質的含量及機能性會與其栽種地區和不同的萃取溶劑而有所差異，故本實驗將利用六種溶劑萃取台灣本土栽種的餘甘子果實，並比較萃取物之抗氧化、高血糖相關因子抑制活性及成分組成的差異。

## 參、材料與方法

### 一、實驗材料

#### (一) 原料

本實驗樣品使用之餘甘子 (*Phyllanthus emblica* L.) 果實購自苗栗縣聖果油甘農莊。

#### (二) 實驗藥品及溶劑 (重複藥品不再列出)

##### 1. 機能性成分測定

品名	編號	廠商
Folin & Ciocalteu's phenol reagent	F9252	Sigma-Aldrich (USA)
Sodium carbonate anhydrous ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	No. 949	Duasn (Korea)
Gallic acid $\geq 98\%$	48630	Honeywell (USA)
Aluminum nitrate, 9-hydrate ( $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ )	0528-01	J.T.Baker (USA)
Potassium acetate ( $\text{CH}_3\text{COOK}$ )	2912-01	J.T.Baker (USA)
Quercetin	Q4951	Sigma-Aldrich (USA)
Potassium iodate ( $\text{KIO}_3$ )	A1616222	Alfa aesar (USA)
Tannin acid	16201	Sigma-Aldrich (USA)

##### 2. 抗氧化活性分析

品名	編號	廠商
2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	D9132	Sigma-Aldrich (USA)
2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt ( $\text{ABTS}^{2-}$ )	A1888	Sigma-Aldrich (USA)
Potassium Persulfate ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ )	3238-01	J.T.Baker (USA)
Butylated hydroxyanisole (BHA)	B1253	Sigma-Aldrich (USA)
Potassium phosphate, dibasic ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	3252-01	J.T.Baker (USA)
Potassium phosphate, monobasic ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	3246-01	J.T.Baker (USA)



Nitrotetrazolium blue chloride (NBT)	N6639	Sigma-Aldrich (USA)
2-Naphthyl phosphate disodium salt (NADH)	N6005	Sigma-Aldrich (USA)
Phenazine methosulfate (PMS)	P9625	Sigma-Aldrich (USA)
Linoleic acid	L1376	Sigma-Aldrich (USA)
Polyoxyethylene-20	L-81	Bio basic (Canada)
Ammonium thiocyanate (NH <sub>4</sub> SCN)	A7149	Sigma-Aldrich (USA)
Iron(III) chloride, anhydrous	12357	Alfa aesar (USA)
L-Ascorbic acid (Vit. C)	33034	Sigma-Aldrich (USA)
Hydrochloric acid (HCl)	-	聯工化學試藥

### 3. 糖尿病相關抑制活性

品名	編號	廠商
$\alpha$ -Amylase from porcine pancreas	A6255	Sigma-Aldrich (USA)
Starch from potato	S2004	Sigma-Aldrich (USA)
3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS)	D0550	Sigma-Aldrich (USA)
Potassium sodium tartrate tetrahydrate	S2377	Sigma-Aldrich (USA)
Sodium hydroxide (NaOH)	30620	Honeywell (USA)
$\alpha$ -Glucosidase from <i>Saccharomyces</i>	G0660	Sigma-Aldrich (USA)
4-Nitrophenyl $\alpha$ -D-glucuronide ( <i>p</i> -NPG)	N1377	Sigma-Aldrich (USA)
Acarbose	A8980	Sigma-Aldrich (USA)
Bovine serum albumin (BSA)	30063-481	Gibco (USA)
D-Glucose	G5767	Sigma-Aldrich (USA)
Trichloroacetic acid (TCA)	T6399	Sigma-Aldrich (USA)
A minoguanidine hydrochloride	396494	Sigma-Aldrich (USA)

### 4. HPLC

品名	編號	廠商
Methyl alcohol (HPLC)	3041-48	MACRON (USA)
Acetonitrile (HPLC)	9152-80	J.T.Baker (USA)
Formic acid	94318	Honeywell (USA)

Ellagic acid $\geq$ 95%	E2250	Sigma-Aldrich (USA)
$\beta$ -Glucogallin $\geq$ 97%	QB-1422	Combi-Blocks (USA)
Geraniin $\geq$ 95%	AK114505	Ark Pharm (USA)
Kaempferol $\geq$ 90%	K0133	Sigma-Aldrich (USA)
Chebulinic acid	A1092B	ChromaDex (USA)
Benzoic acid $\geq$ 98.5%	B9300	Sigma-Aldrich (USA)

### (三) 實驗儀器

#### 1. 冷凍乾燥機

台灣 Kingmech 公司 FD2-6P 型

#### 2. 磨粉機

台灣榮聰精密科技有限公司 RT-08 型

#### 3. 高速均質機

瑞士 Kinematica AG 公司 PT-3000 型

#### 4. Vortex Mixer

美國 Thermolyne 公司 37600 Maxi Mix II 型

#### 5. 離心機

台灣 Hitachi 公司 Himac CF-15R 型

#### 6. 減壓濃縮機

濃縮器：瑞士 BUCHI 公司 RE111 型；

水浴槽：瑞士 BUCHI 公司 461 型；

真空幫補：日本 Tokyo Rikakikai 公司 A-3S 型；

低溫循環水浴槽：台灣 Firstek Scientific 公司 B403L 型

#### 7. 紫外-可見光分光光度計

美國 Varian 公司 50 Conc 型

8. ELISA reader

美國 Thermo Fisher Scientific 公司 MRX II 型

9. 螢光分光光度計

美國 Thermo Fisher Scientific 公司

10. 高效液相層析儀 (HPLC)

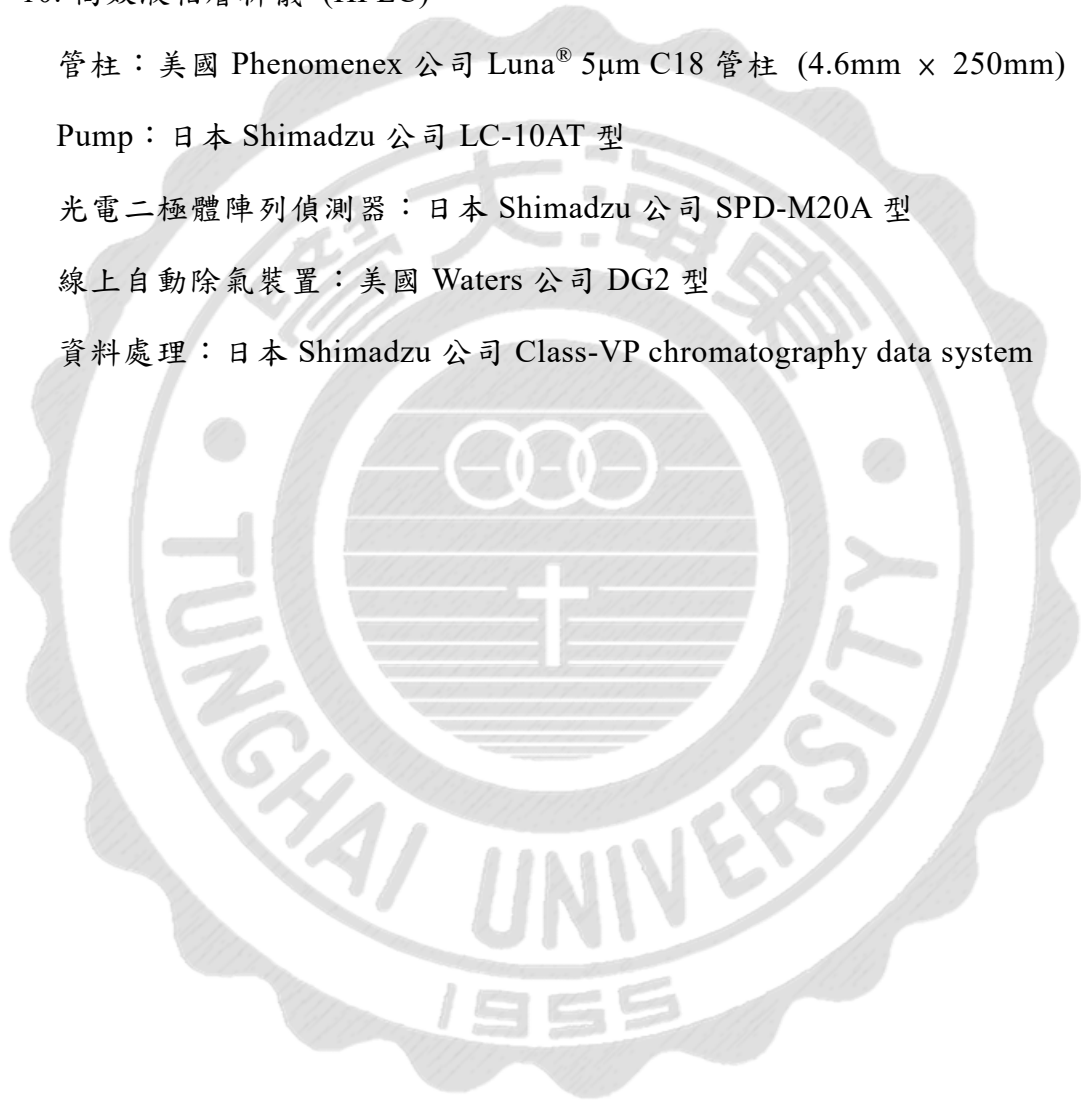
管柱：美國 Phenomenex 公司 Luna<sup>®</sup> 5 $\mu$ m C18 管柱 (4.6mm  $\times$  250mm)

Pump：日本 Shimadzu 公司 LC-10AT 型

光電二極體陣列偵測器：日本 Shimadzu 公司 SPD-M20A 型

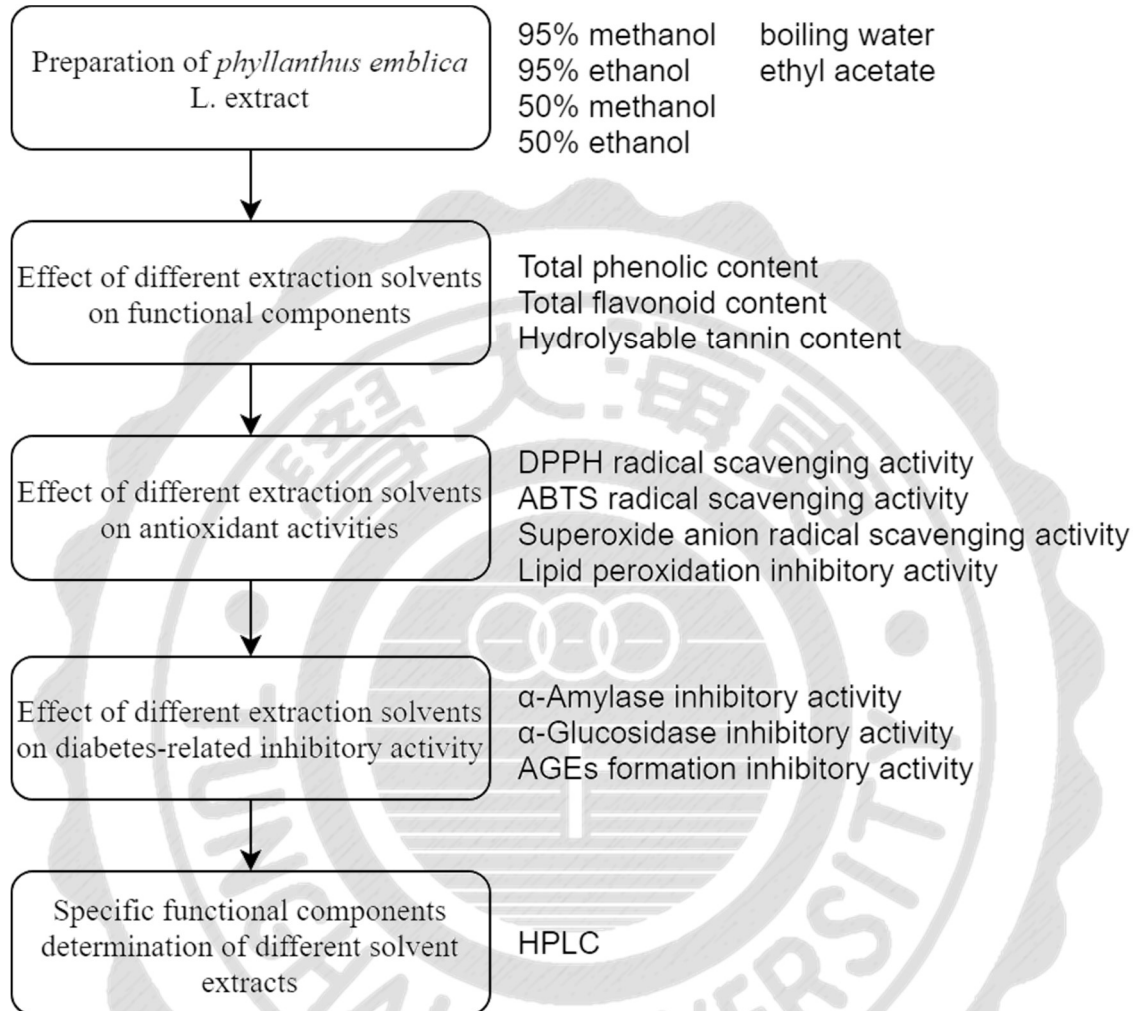
線上自動除氣裝置：美國 Waters 公司 DG2 型

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



## 二、實驗方法

### (一) 實驗架構



圖十二、實驗架構

Fig 12. Experimental architecture

### (二) 餘甘子果實粉末製備

餘甘子果實（包含種皮、種子及果肉）以清水洗淨風乾，冷凍乾燥後以磨粉機磨成粉，收集可通過 70 目數篩網的粉末，保存於-20 °C 冰箱中備用。

### (三) 餘甘子不同溶劑萃取物之製備

餘甘子以 95% 甲醇、95% 乙醇、50% 甲醇、50% 乙醇、乙酸乙酯及沸水萃

取，前五種溶劑參考林筑盈 (2016) 之萃取方法，秤約 5 g 已過篩之餘甘子粉末，加入 20 mL 溶劑，在室溫下以高速均質機處理 1 min，將均質液於 4°C 冰箱中靜置 5 min，之後在 10,000 rpm、4°C 的條件下離心 5 min 並收集上清液，沉澱物則再次加入新的 20 mL 溶劑重複均質、靜置及離心的步驟直到上清液呈無色。收集的上清液透過抽氣過濾去除殘渣 (使用 Advantes® No. 5A 直徑 90 mm 濾紙)，減壓濃縮後，再以溶劑定量，取一定體積以減壓抽氣的方式抽乾，即為餘甘子溶劑萃取物。

沸水萃取參考 Charoenteeraboon *et al.* (2010) 之方法，餘甘子粉末與水以 1:10 的比例混合後，在水浴槽中以沸水浴的方式處理 1 h，冷卻後抽氣過濾去除殘渣，濾液經冷凍乾燥後即為餘甘子沸水萃取物，儲存於 -20 °C 冰箱中備用。

#### (四) 機能性成分測定

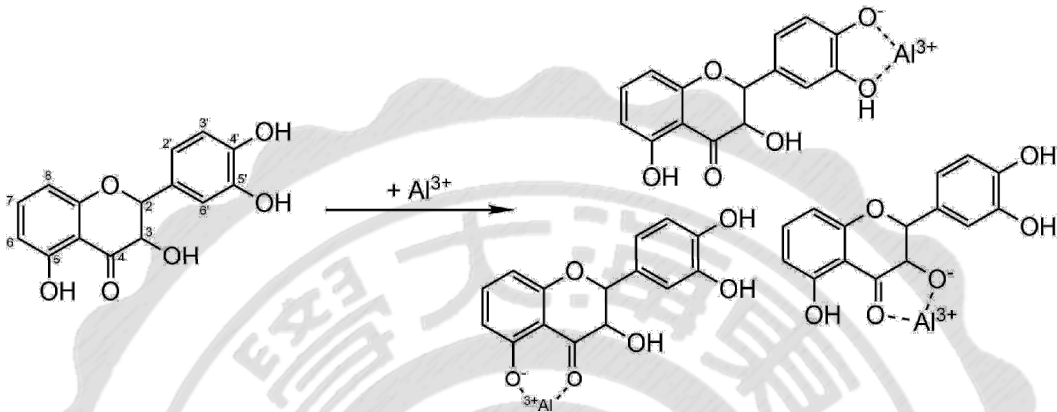
##### 1. 總酚含量分析 (Total phenolic content) 分析

一般認為 Folin-Ciocalteu's reagent 與酚類化合物中苯環上的羥基 (-OH) 反應，使試劑中的 Mo(VI) 還原為 Mo(V)，形成藍色的  $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}$  (Huang *et al.*, 2005)，於 735 nm 下有最大吸光值，總酚含量與吸光值成正比。

參考 Sachan *et al.* (2011) 之方法並稍做修飾，1 mg/mL 萃取物及不同濃度標準品沒食子酸 (Gallic acid) 取 0.05 mL 與 1 mL deionized water (DDW) 及 0.5 mL 50% Folin-Ciocalteu's reagent 混合均勻，再加入 2.5 mL 的 20%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ，於室溫、黑暗環境中反應 20 min，將反應液轉移 0.2 mL 至 96 孔盤中以 ELISA reader 測量波長 735 nm 下的吸光值。另外以沒有加入 50% Folin-Ciocalteu's reagent 的試驗作為空白對照組，不同濃度標準品的反應吸光值繪製標準曲線 (附錄一)，換算萃取物中相對的沒食子酸當量，結果以 mg gallic acid equivalent/g extract 表示。

## 2. 總類黃酮含量 (Total flavonoid content) 分析

鋁離子 ( $\text{Al}^{3+}$ ) 與類黃酮的酮基及 C-3/C-5 羥基或是 A/B 苯環上相鄰的羥基產生酸穩定的黃色錯合物 (Bhaigyabati *et al.*, 2014), 在波長 415 nm 有最大吸光值, 吸光值越高表示樣品中類黃酮含量越多。



圖十三、總類黃酮含量測試反應式

Fig 13. Reaction of total flavonoid content determination (Frederice *et al.*, 2010).

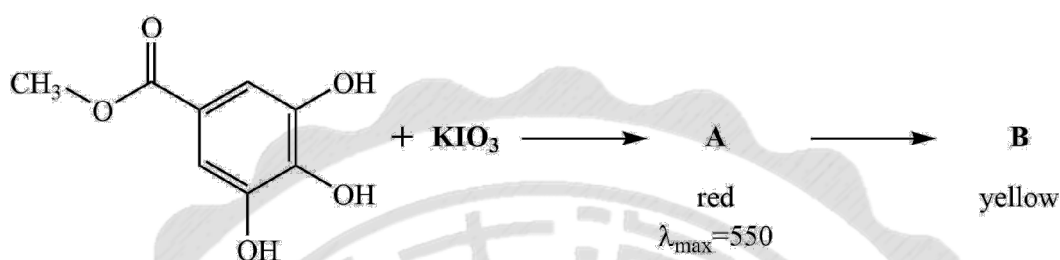
參考 Hsu *et al.* (2007) 之方法並稍加修飾, 2 mg/mL 萃取物及不同濃度標準品槲皮素 (Quercetin) 各取 0.5 mL, 加入 0.1 mL 10%  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 、0.1 mL 1M  $\text{CH}_3\text{COOK}$  及 4.3 mL 80% ethanol, 混和均勻後於室溫、黑暗環境中靜置 40 min。反應完成後, 轉移 0.2 mL 反應液至 96 孔盤, 並測量波長 415 nm 下的吸光值。未添加 10%  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  的試驗作為空白對照組, 依不同濃度標準品之吸光值繪製標準曲線 (附錄二), 用以換算萃取物中相對槲皮素當量, 結果以 mg quercetin equivalent/g extract 表示。

## 3. 水解單寧含量 (Hydrolysable tannin content) 分析

水解單寧與碘酸鉀 ( $\text{KIO}_3$ ) 進行氧化反應生成紅色中間產物 (Hartzfeld *et al.*, 2002), 於波長 550 nm 有最大吸光值, 吸光值與含量成正比。

參考 Fernandes *et al.* (2015) 之方法並略作修飾, 取 0.2 mL 萃取物或標準品單寧酸 (Tannic acid) 置入比色管中, 加入 1 mL 2.5%  $\text{KIO}_3$ , 混和均勻後反

應中間產物生成最大量的時間，以分光光度計測量波長 550 nm 的吸光值。DDW 代替 2.5% KIO<sub>3</sub> 的組別作為空白對照，不同濃度單寧酸之吸光值繪製成標準曲線 (附錄三)，換算不同萃取出中相對單寧酸當量，結果以 mg tannic acid equivalent/g extract 表示。



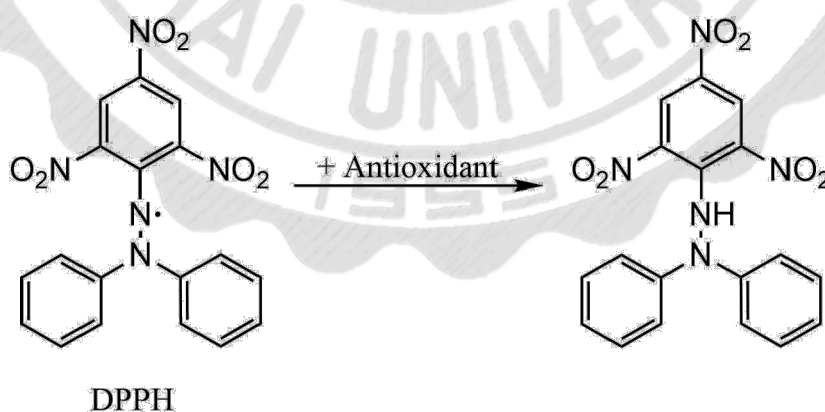
圖十四、水解單寧含量測定反應式

Fig 14. Reaction of hydrolysable tannin determination (Hartzfeld et al., 2002).

### (五) 抗氧化活性分析

#### 1. DPPH 自由基清除活性 (DPPH radical scavenging activity)

DPPH 為一種穩定的深紫色自由基，於 517 nm 下有最大吸光值，當樣品具有抗氧化活性時，會提供電子使其還原為淡黃色的 DPPH (Huang *et al.*, 2005)，反應後的吸光值越低，表示樣品具有越好的 DPPH 自由基清除活性。



圖十五、DPPH 自由基清除活性反應式

Fig 15. Reaction of scavenging activity on DPPH radical (Teixeira et al., 2013).

參考 Fernandes *et al.* (2015) 並結合 Shimada *et al.* (1992) 之方法進行測

試，0 ~ 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的樣品取 0.1 mL 與 0.9 mL 0.2 mM DPPH 甲醇溶液混和均勻，在室溫中反應 30 min 後，轉移 0.2 mL 反應液到 96 孔盤中測量波長 517 nm 下的吸光值。利用沒有樣品的空白組作為分母，依下列公式換算清除率 (%)，並計算不同樣品清除 50% DPPH 自由基所需的濃度 (Half maximal inhibitory concentration,  $\text{IC}_{50}$ )。

$$\text{DPPH 清除率 (\%)} = \frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}} \times 100$$

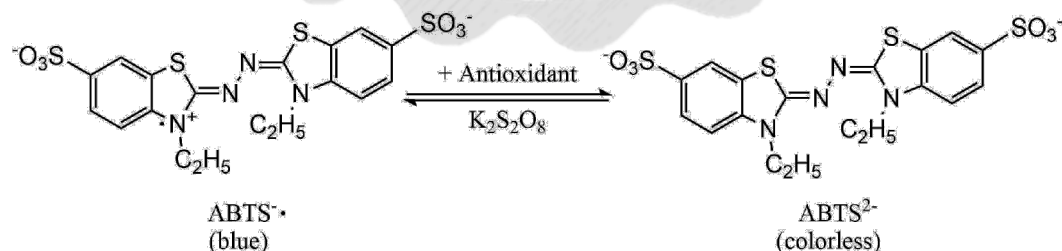
$A_{\text{blank}}$  = 空白對照組吸光值

$A_{\text{sample}}$  = 樣品組吸光值

## 2. ABTS 自由基清除活性 (ABTS radical scavenging activity)

利用過硫酸鹽將  $\text{ABTS}^{2-}$  氧化為藍綠色的  $\text{ABTS}^{\cdot-}$ ，抗氧化劑可提供電子將其還原為無色的  $\text{ABTS}^{2-}$  (Huang *et al.*, 2005)，波長 734 nm 的吸光值越低，表示樣品具有越佳的 ABTS 自由基清除活性。

使用 Wang *et al.* (2015) 之方法檢測，先配置 ABTS 自由基溶液，將 7 mM  $\text{ABTS}^{2-}$  與 2.45 mM  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  等體積混合，於室溫、黑暗中反應 16 h 後，稀釋到  $\lambda_{734}$  約為 0.7 左右。0 ~ 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的樣品取 50  $\mu\text{L}$  與 950  $\mu\text{L}$  ABTS 溶液混合均勻，在室溫下反應 6 min，轉移 200  $\mu\text{L}$  到 96 孔盤中測量波長 734 nm 下的吸光值，空白組的吸光值做為分母，換算 ABTS 自由基清除率 (%)，並計算不同樣品的  $\text{IC}_{50}$ 。



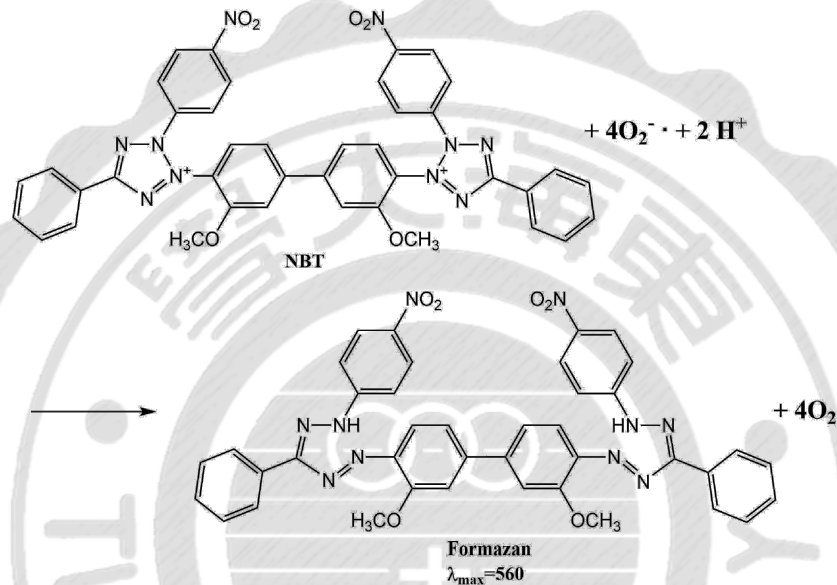
圖十六、 $\text{ABTS}^{\cdot+}$  清除活性反應式

Fig 16. Reaction of scavenging activity on ABTS radical (Huang *et al.*, 2005).



### 3. 超氧陰離子自由基清除活性 (Superoxide anion radical scavenging activity)

利用 PMS 氧化 NADH 產生超氧陰離子自由基 ( $\cdot\text{O}_2^-$ )，再與 NBT 結合形成在波長 560 nm 有最大吸光值的化合物 (Shareef *et al.*, 2014)，吸光值越低，表示樣品具有越高的超氧陰離子自由基清除活性。



圖十七、超氧陰離子自由基與 NBT 呈色反應式

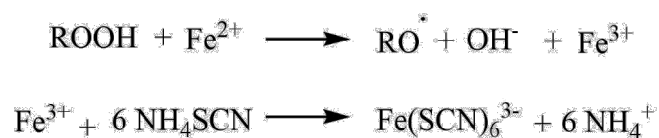
Fig 17. Reaction of NBT with superoxide anion radical(Deng *et al.*, 2017)

參考 Ramani *et al.* (2013) 之方法，0 ~ 3 mg/mL 的樣品 0.1 mL 與 1 mL 156  $\mu\text{M}$  NBT 和 1 mL 468  $\mu\text{M}$  NADH 於平口試管中混和均勻，以 0.1 mL 60  $\mu\text{M}$  PMS 開始反應，在室溫靜置 5 min 後轉移 200  $\mu\text{L}$  到 96 孔盤中，測量 560 nm 下的吸光值。利用沒有樣品的空白組作為分母，換算超氧陰離子的清除率 (%)，並利用樣品不同濃度的清除率計算  $\text{IC}_{50}$ 。

### 4. 脂質過氧化抑制活性 (Lipid peroxidation inhibitory activity)

本研究使用硫氰酸鐵法 (Ferric thiocyanate method) 測定亞麻油酸乳化液中過氧化的抑制活性。脂質氧化產生的氫過氧化物會使  $\text{Fe}^{2+}$  氧化成  $\text{Fe}^{3+}$ ， $\text{Fe}^{3+}$  會再與硫氰酸根反應形成紅色的硫氰酸鐵錯合物 (Mihaljevic *et al.*, 1996)，於

波長 500 nm 有最大吸光值，反應式如下：

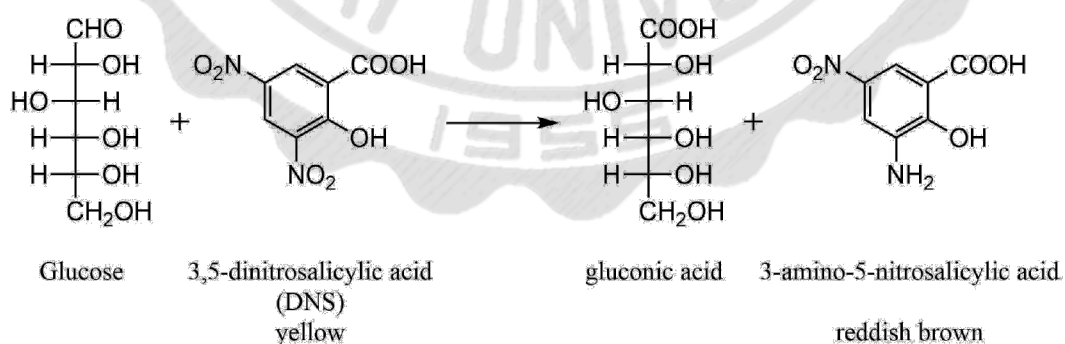


參考 Siddhuraju *et al.* (2007) 之方法，萃取物或 BHA (正控制組) 各取 0.5 mL，依序加入 2 mL 0.2 M phosphate buffer (PBS; pH 7.0) 及 2.5 mL linoleic acid emulsion (0.2804 g 亞麻油酸、0.2804 g tween-20 溶於 50 mL 0.02 M PBS)，混和均勻後置入 37 °C 恆溫培養箱中。培養結束後，取 0.1 mL 反應液與 4.7 mL 75% 乙醇、0.1 mL 30% 硫氰酸銨及 0.1 mL 0.02 M 氯化鐵混合均勻，反應 3 min 後以分光光度計測量波長 500 nm 的吸光值。以 0.2 M PBS 作為空白組，換算脂質過氧化抑制率 (%)，並計算不同樣品的 IC<sub>50</sub>。

## (六) 糖尿病相關抑制活性

### 1. $\alpha$ -Amylase 抑制活性 ( $\alpha$ -amylase inhibitory activity)

$\alpha$ -Amylase 將澱粉水解後，會釋放出具有醛基或酮基的碳水化合物，在鹼性的環境下會將黃色的 3,5 dinitrosalicylic acid (DNS) 還原為紅棕色的 3-amino-5-nitrosalicylic acid，於波長 540 有最大吸光值 (Dangkulwanich *et al.*, 2018)，吸光值與抑制活性成反比。



圖十八、DNS 與還原糖反應方程式

Fig 18. Reaction of DNS with reducing sugars (Dangkulwanich *et al.*, 2018).

參考 Mogale *et al.* (2011) 及 Zaharudin *et al.* (2018) 之方法並略做修改。實驗於 pH 6.8 的 phosphate buffer solution (PBS) 中進行，樣品及藥劑皆以 PBS 進行配置。取 100  $\mu$ L 不同濃度萃取物放入平口試管，加入 100  $\mu$ L  $\alpha$ -amylase (5 unit/mL，溶於 PBS 中) 於室溫反應 10 min，加入 100  $\mu$ L 澱粉溶液 (1%)，在 37  $^{\circ}$ C 水浴反應 10 min，最後加入 200  $\mu$ L DNS 試劑 (1% DNS 及 12% 酒石酸鉀鈉溶於 0.4 M 氫氧化鈉溶液中)，在 95  $^{\circ}$ C 水浴處理 5 min，冷卻後測量波長 540 nm 的吸光值。以 Acarbose 作為正控制組，其為一種治療第二型糖尿病的藥物，依下列公式換算抑制率 (%)。

$$\alpha\text{-Amylase 抑制率 (\%)} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{sample blank}})}{(A_{\text{control}} - A_{\text{blank}})} \times 100$$

$A_{\text{control}}$  = 控制組 (PBS + 酵素 + 澱粉 + DNS)

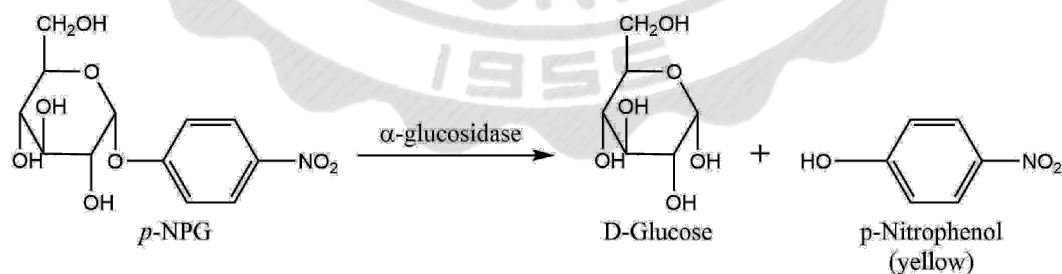
$A_{\text{blank}}$  = 控制背景組 (PBS + 酵素 + 澱粉 + PBS)

$A_{\text{sample}}$  = 樣品實驗組 (sample + 酵素 + 澱粉 + DNS)

$A_{\text{sample blank}}$  = 樣品背景組 (sample + 酵素 + 澱粉 + PBS)

## 2. $\alpha$ -Glucosidase 抑制活性 ( $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity)

4-Nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucuronide (*p*-NPG) 可被  $\alpha$ -glucosidase 水解成葡萄糖和對硝基苯酚，對硝基苯酚在波長 400 nm 有最大吸光值，樣品抑制活性與吸光值成反比。



圖十九、 $\alpha$ -Glucosidase 抑制活性測定原理

Fig 19. Principle of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity (Qurrat ul *et al.*, 2017).

參考 Chen *et al.* (2018) 之方法，實驗於 pH 6.8 的 PBS 中進行，樣品及藥

劑皆以 PBS 進行配置。於 96 孔盤中加入 50  $\mu\text{L}$  不同濃度萃取物，隨後加入 50  $\mu\text{L}$   $\alpha$ -glucosidase (0.1 unit/mL)、50  $\mu\text{L}$  PBS (0.1 M, pH 6.8)及 20  $\mu\text{L}$  *p*-NPG (10 mM)，於 37  $^{\circ}\text{C}$ 培養箱中反應 20 min，加入 130  $\mu\text{L}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0.67 M) 終止反應，使用 ELISA reader 測量波長 400 nm 下的吸光值。Acarbose 作為正控制組，依下列公式換算抑制率 (%)。

$\alpha$ -Glucosidase 抑制率 (%)

$$= \frac{(A_{control} - A_{blank}) - (A_{sample} - A_{sample\ blank})}{(A_{control} - A_{blank})} \times 100$$

$A_{control}$  = 控制組 (PBS + 酵素 + *p*-NPG)

$A_{blank}$  = 控制背景組 (PBS + 酵素 + PBS)

$A_{sample}$  = 樣品實驗組 (sample + 酵素 + *p*-NPG)

$A_{sample\ blank}$  = 樣品背景組 (sample + 酵素 + PBS)

### 3. 蛋白質糖基化抑制活性 (AGEs formation inhibitory activity)

牛血清蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 與葡萄糖產生梅納反應形成晚期糖化終產物 (AGEs) (Grzegorzcyk-Karolak *et al.*, 2016)，利用三氯醋酸 (Trichloroacetic acid, TAC) 將所有蛋白質沉澱後，再利用 AGEs 的螢光特性偵測其含量，螢光量越低表示樣品抑制活性越好。

參考 Matsuura *et al.* (2002) 之方法，實驗於 pH 7.4 的 PBS 中進行，樣品及藥劑溶解後皆以 PBS 進行稀釋。20  $\mu\text{L}$  0.1 mg/mL 萃取物與 400  $\mu\text{L}$  BSA (1 mg/mL) 及 80  $\mu\text{L}$  1.25 M glucose 混和均勻，於 60  $^{\circ}\text{C}$ 處理 48 h。取 100  $\mu\text{L}$  反應液添加 100  $\mu\text{L}$  20% TCA 靜置 3 min，以 10,000 rpm、4  $^{\circ}\text{C}$ 條件下離心 4 min 沉澱蛋白質，去除上清液後以 pH 10 的 PBS 溶解沉澱物，再利用螢光分光光度計測量 370/440 nm 下的螢光強度。依下列公式換算樣品蛋白質糖基化抑制活性。

$$\text{蛋白糖化抑制率 (\%)} = \frac{(A_{control} - A_{blank}) - (A_{sample} - A_{sample\ blank})}{(A_{control} - A_{blank})} \times 100$$

$A_{control}$  = 控制組 (PBS + BSA + glucose)

$A_{blank}$  = 控制背景組 (PBS + BSA + PBS)

$A_{sample}$  = 樣品實驗組 (sample + BSA + glucose)

$A_{sample\ blank}$  = 樣品背景組 (sample + BSA + PBS)

## (七) HPLC 分析

本實驗參考 Yang *et al.* (2012)的方法並略做修改，使用逆相 C18 管柱 (4.6mm × 250mm)，以 0.1% formic acid (A) 及 acetonitrile/methanol (4:1 ; B) 兩種移動相對樣品成分進行梯度沖提。流速 1.0 mL/ min，注射量 20 μL，梯度條件如表十，利用 SPD-020A 偵測器在波長 190 ~ 800 nm 分析。檢測標準品有 chebulinic acid, corilagin, ellagic acid, gallic acid, β-glucogallin, geraniin, kaempferol, quercetin 及內標準品 benzoic acid (附錄四 ~ 九)。

表十、HPLC 梯度條件

Table 10. Condition of HPLC gradient elution.

時間 (time)	B (%)
0	0
5	0
15	5
20	10
25	15
30	20
45	25
55	60
60	0
65	0

## (八) 統計分析

本研究之實驗結果皆以平均值±標準偏差 (mean ± SD) 表示，並以 SPSS V21 (Statistical Package for Social Science) 軟體中 Duncan's multiple range test 分析各數據之間的差異性，顯著分析水準  $p < 0.05$ 。



## 肆、結果與討論

### 一、不同溶劑萃取餘甘子對其產率的影響

本研究將冷凍乾燥後磨粉的餘甘子果實利用 95% 甲醇、95% 乙醇、50% 甲醇、50% 乙醇、熱水及乙酸乙酯分別萃取，盡可能萃出溶劑可萃取之成分。萃取產率如表十一，乙酸乙酯產率僅有 2.26% (w/w)，顯著低於其他五種溶劑的產率 (25% ~ 37%)。多酚類化合物的含量與抗氧化活性直接相關，但成分複雜的植物中，不同極性的化合物具有不同的抗氧化活性，所有抗氧化活性的測試方法都會受到萃取溶劑的影響 (Verma *et al.*, 2018)。因此將進一步針對萃取物的機能性及其所含成分進行探討。

### 二、不同溶劑萃取餘甘子對機能性成分含量的影響

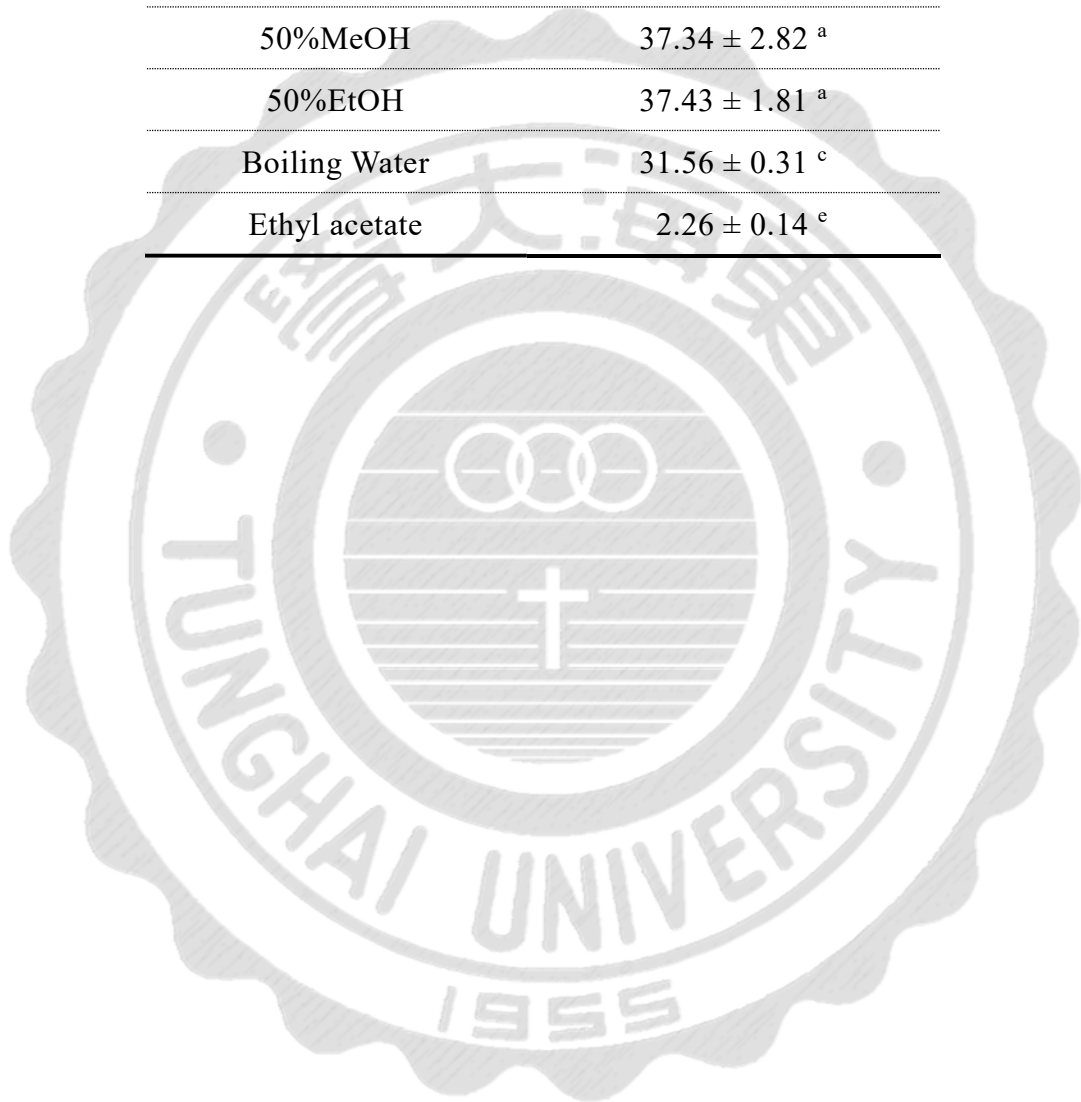
植物含有的化學物質，大多具有良好的抗氧化活性，可做為天然的抗氧化劑補充人體的需求 (Altemimi *et al.*, 2017)。其中多酚類物質可以清除活性氧，並有效的防止細胞的氧化損傷 (Bhaigyabati *et al.*, 2014)。圖二十為不同溶劑萃取餘甘子對總酚含量的影響，其中 95% 乙醇的總酚含量顯著高於其他萃取物，為 400.71 mg GAE/g extract，95% 甲醇次之，而乙酸乙酯萃取物僅有 154.92 mg GAE/g extract。

類黃酮是多酚的一種，為植物的次級代謝產物，已鑑定出約 6000 種不同的類黃酮化合物 (Bhaigyabati *et al.*, 2014)。本研究使用 quercetin 作為標準品換算萃取物中總類黃酮的相對濃度。在圖二十一中可發現，總類黃酮含量由高到低依序為：50% 乙醇 (17.27 mg QE/g extract) > 50% 甲醇 (15.80 mg QE/g extract) > 水 (10.71 mg QE/g extract) > 95% 甲/乙醇 (4.42 ~ 5.27 mg QE/g extract) > 乙酸乙酯 (2.83 mg QE/g extract)。Verma *et al.* (2018) 使用水及不同濃度甲醇、乙醇對印度所產之餘甘子進行萃取，總類黃酮含量介於 0.71 ~ 10.34 mg QE/g weight 之間，並指出 50% 乙醇具有最佳的萃取效果，與本研究結果

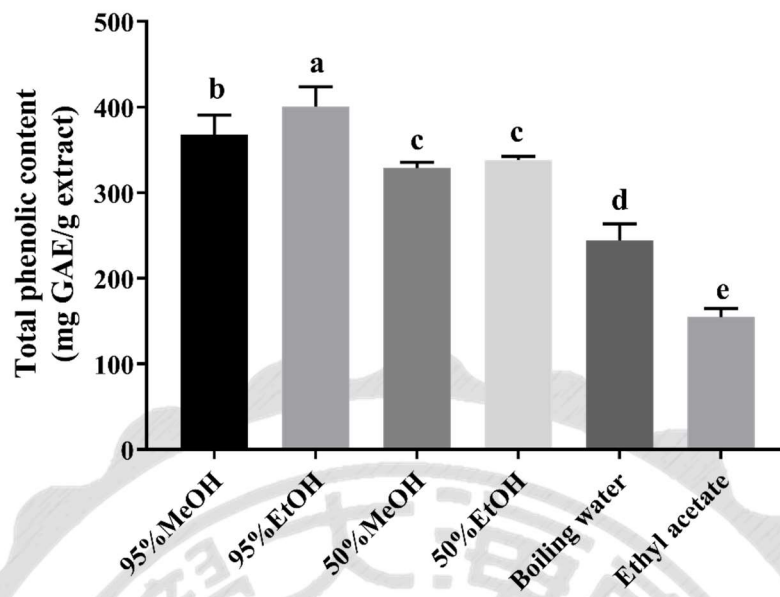
表十一、不同溶劑萃取餘甘子對產率的影響

Table 11. Effect of different solvent on yield. Data expressed as means of triplicate  $\pm$  SD. Means with different letters were significantly different at  $p < 0.05$ .

Solvent	Yield (%)
95%MeOH	34.27 $\pm$ 1.25 <sup>b</sup>
95%EtOH	25.05 $\pm$ 1.13 <sup>d</sup>
50%MeOH	37.34 $\pm$ 2.82 <sup>a</sup>
50%EtOH	37.43 $\pm$ 1.81 <sup>a</sup>
Boiling Water	31.56 $\pm$ 0.31 <sup>c</sup>
Ethyl acetate	2.26 $\pm$ 0.14 <sup>e</sup>

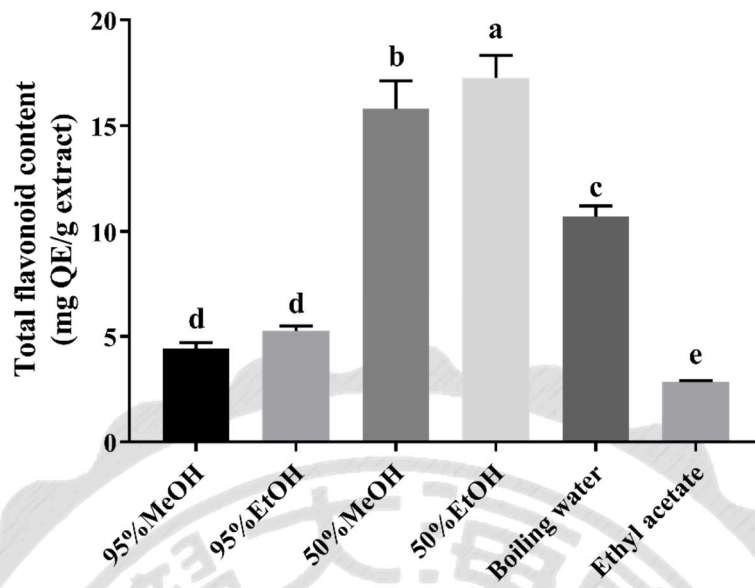






圖二十、不同溶劑萃取餘甘子對總酚含量的影響

Fig 20. Effect of different solvent on total phenolic content. Data expressed as means of triplicate  $\pm$  SD. Means with different letters were significantly different at  $p < 0.05$ .



圖二十一、不同溶劑萃取餘甘子對總類黃酮含量的影響

Fig 21. Effect of different solvent on total flavonoid content. Data expressed as means of triplicate  $\pm$  SD. Means with different letters were significantly different at  $p < 0.05$ .

相同，但其萃取物中總類黃酮含量較低。Do *et al.* (2014) 指出水和有機溶劑的組合，可以增加溶於溶劑或水溶性化學物質的萃取效果，其實驗中含水甲/乙醇 (75%及 50%) 的萃取率亦分別高於水、甲醇及乙醇。Agarwal *et al.* (2012) 表示餘甘子萃取物中總酚含量與總類黃酮含量沒有絕對關係，本研究的結果也支持這一論點，最多的總酚及總類黃酮含量並非展現在同一種溶劑萃取物。

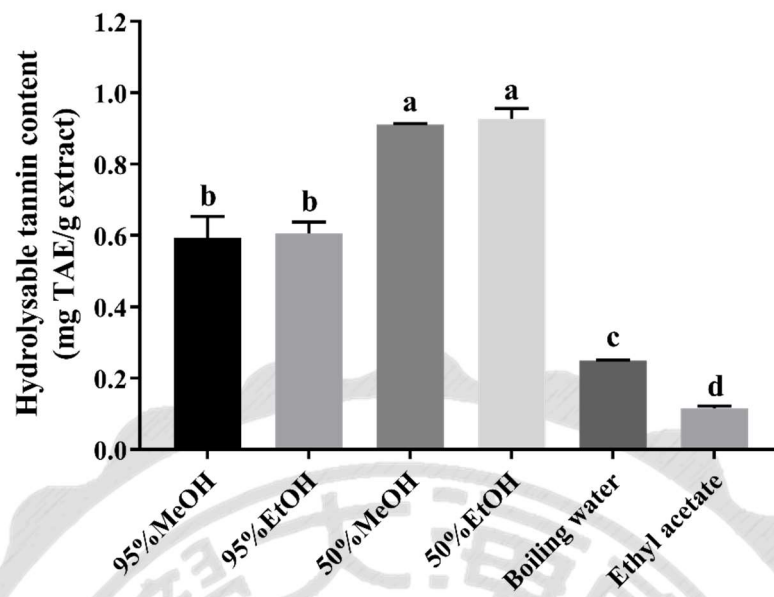
水解單寧是一種可在植物中發現的高分子量多酚，可提供抗氧化的作用，由不同數量的沒食子酸包圍中心的多元醇 (葡萄糖) 而組成，周圍的沒食子酸又可互相連接，而形成多種不同的形態 (Mueller-Harvey, 2001; Hartzfeld *et al.*, 2002)。不同溶劑萃取物中水解單寧的含量 (圖二十二) 與總類黃酮含量類似，同樣是 50% 甲/乙醇具有最高的萃取效果 (0.91 及 0.93 mg TAE/g extract)，95% 甲/乙醇次之 (0.59 及 0.61 mg TAE/g extract)，水萃為三 (0.25 mg TAE/g extract)，乙酸乙酯僅有 0.12 mg TAE/g extract。Yang *et al.* (2014) 表示水解單寧為餘甘子果實中主要的多酚類化合物，已鑑定出數百種，是一種結構組成非常多元的化合物，並指出具有良好的抗菌及抗氧化活性。

### 三、不同溶劑萃取餘甘子對抗氧化活性的影響

多酚類物質大多都具有良好的抗氧化活性 (Vieito *et al.*, 2018)，本研究利用自由基清除活性及脂肪過氧化的抑制作用進行不同溶劑萃取物的抗氧化活性分析。

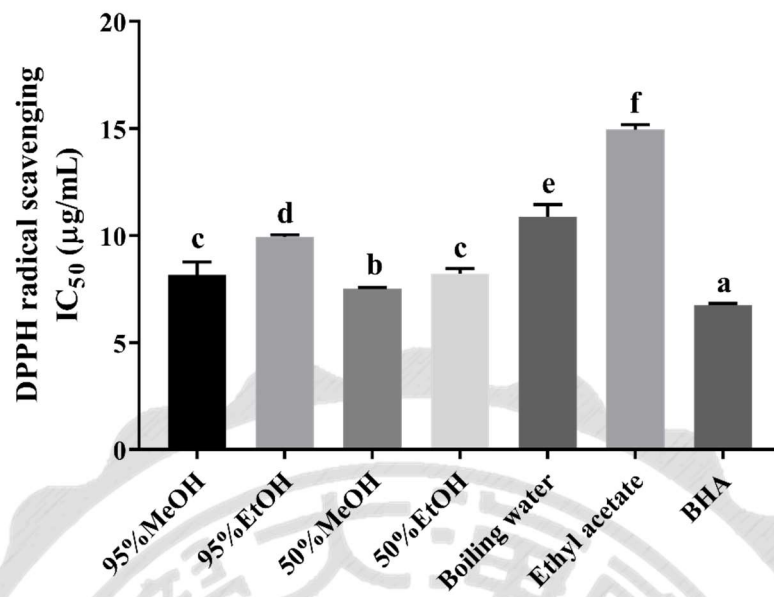
#### (一) 不同溶劑萃取餘甘子對自由基清除活性的影響

DPPH 為穩定的紫色醇溶性自由基，基於電子轉移產生的顏色變化，評估萃取物的抗氧化活性 (Teixeira *et al.*, 2013)。在圖二十三中可發現，50% 甲醇萃取物的  $IC_{50}$  為 7.51  $\mu\text{g/mL}$ ，顯著低於其他五種溶劑萃取物 (8.16 ~ 14.95  $\mu\text{g/mL}$ )，具有最高的 DPPH 清除活性，與正控制組 BHA 的清除活性 ( $IC_{50} = 6.75 \mu\text{g/mL}$ ) 非常接近。



圖二十二、不同溶劑萃取餘甘子對水解單寧含量的影響

Fig 22. Effect of different solvent on hydrolysable tannin content. Data expressed as means of triplicate  $\pm$  SD. Means with different letters were significantly different at  $p < 0.05$ .



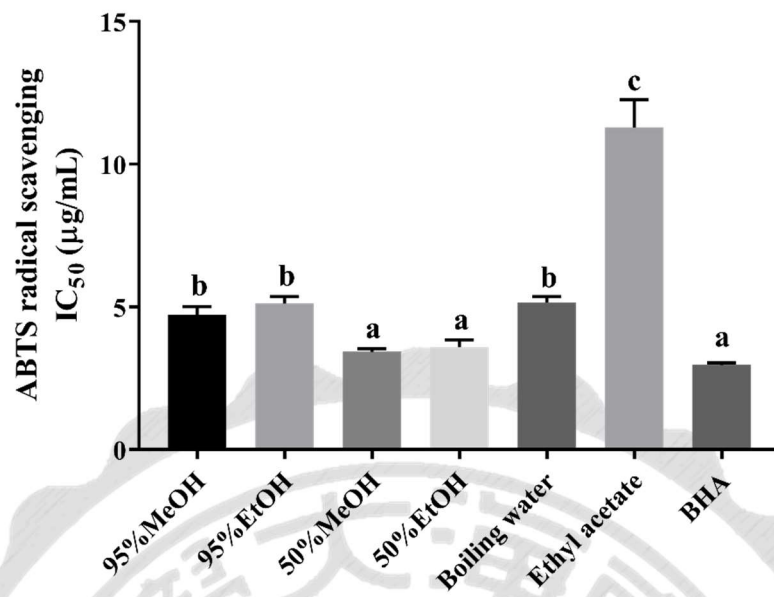
圖二十三、不同溶劑萃取餘甘子對 DPPH 自由基清除活性的影響  
 Fig 23. Effect of different solvent on DPPH free radical scavenging activity. Data expressed as means of triplicate  $\pm$  SD. Means with different letters were significantly different at  $p < 0.05$ .

ABTS 為穩定的水溶性藍色自由基，同樣是由 50%甲/乙醇具有最好的 ABTS 自由基清除效果， $IC_{50}$  分別為  $3.43 \pm 0.11$  及  $3.59 \pm 0.26 \mu\text{g/mL}$ ，與正控制組 BHA 的  $IC_{50}$   $2.97 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$  沒有顯著差異，其他清除活性依序為 95%甲/乙醇、水萃物及乙酸乙酯萃取物（圖二十四）。Chaphalkar *et al.* (2017) 以 70%乙醇萃取餘甘子樹皮，其 ABTS 自由基  $IC_{50}$  為  $329.20 \mu\text{g/mL}$ ，高於本研究的萃取物，可知餘甘子果實較其樹皮具有更高的 ABTS 自由基清除活性。

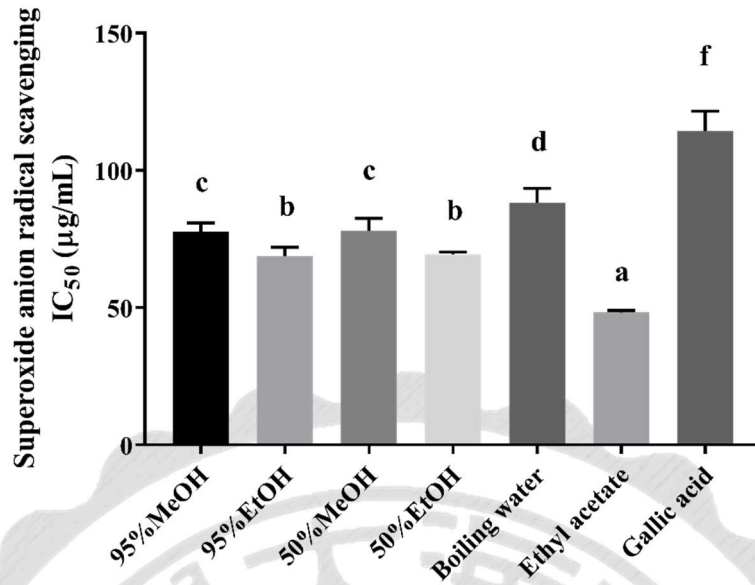
超氧陰離子自由基在體內為相對較弱的活性氧，但卻會產生毒性更高的羥基自由基，使細胞受到氧化損傷 (Liu *et al.*, 2008)。超氧陰離子自由基的過度產生，是引起糖尿病相關併發症的主要原因之一 (Brownlee, 2005)。圖二十五結果顯示，所有萃取物對超氧陰離子自由基的清除活性均顯著高於正控制組 gallic acid ( $p < 0.05$ )，其中乙酸乙酯萃取物具有最佳的清除效果，其  $IC_{50}$  為  $48.27 \pm 0.77 \mu\text{g/mL}$ ，乙醇萃取物次之，甲醇萃取物為三，水萃最差。

## (二) 不同溶劑萃取餘甘子對脂質過氧化抑制活性

脂質過氧化是在乳化亞麻油酸系統中進行 (圖二十六)，不同濃度的甲/乙醇萃取物抑制脂質過氧化的能力均顯著高於水及乙酸乙酯萃取物，其  $IC_{50}$  介於  $7.92 \sim 10.13 \mu\text{g/mL}$ ，但彼此間沒有顯著差異。而乙酸乙酯及水萃取物的半抑制濃度都顯著的大於前述四種溶劑萃取物；所有萃取物與正控制組比較下都稍顯遜色，BHA 的  $IC_{50}$  為  $0.13 \mu\text{g/mL}$ 。BHA 為人工合成抗氧化劑，普遍在油脂食品中做為添加劑，防止食品氧化酸敗，但卻有致癌的可能性，所以需要尋找天然抗氧化劑代替其作用 (Özgür *et al.*, 2017)。

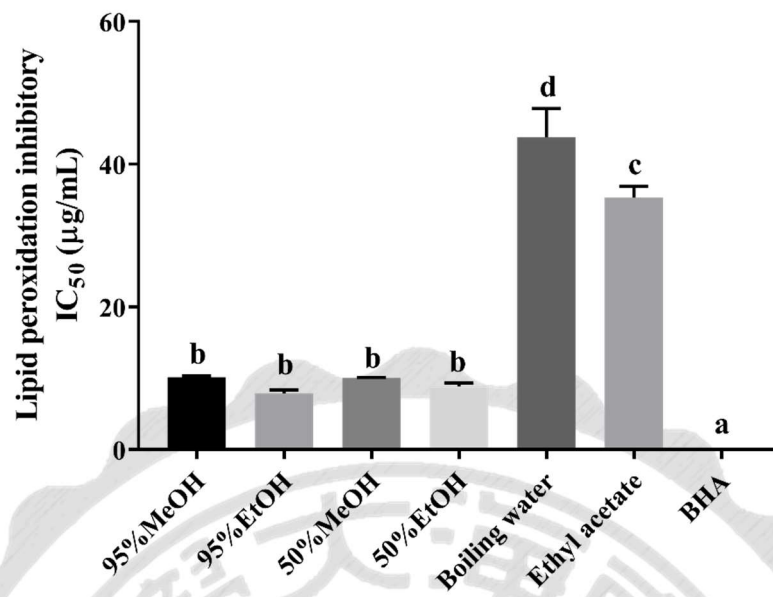


圖二十四、不同溶劑萃取餘甘子對 ABTS 自由基清除活性的影響  
 Fig 24. Effect of different solvent on ABTS free radical scavenging activity. Data expressed as means of triplicate  $\pm$  SD. Means with different letters were significantly different at  $p < 0.05$ .



圖二十五、不同溶劑萃取餘甘子對超氧陰離子自由基清除活性的影響  
 Fig 25. Effect of different solvent on superoxide anion radical scavenging activity. Data expressed as means of triplicate  $\pm$  SD. Means with different letters were significantly different at  $p < 0.05$ .





圖二十六、不同溶劑萃取餘甘子對脂質過氧化抑制活性的影響  
 Fig 26. Effect of different solvent on lipid peroxidation inhibitory activity. Data expressed as means of triplicate  $\pm$  SD. Means with different letters were significantly different at  $p < 0.05$ .

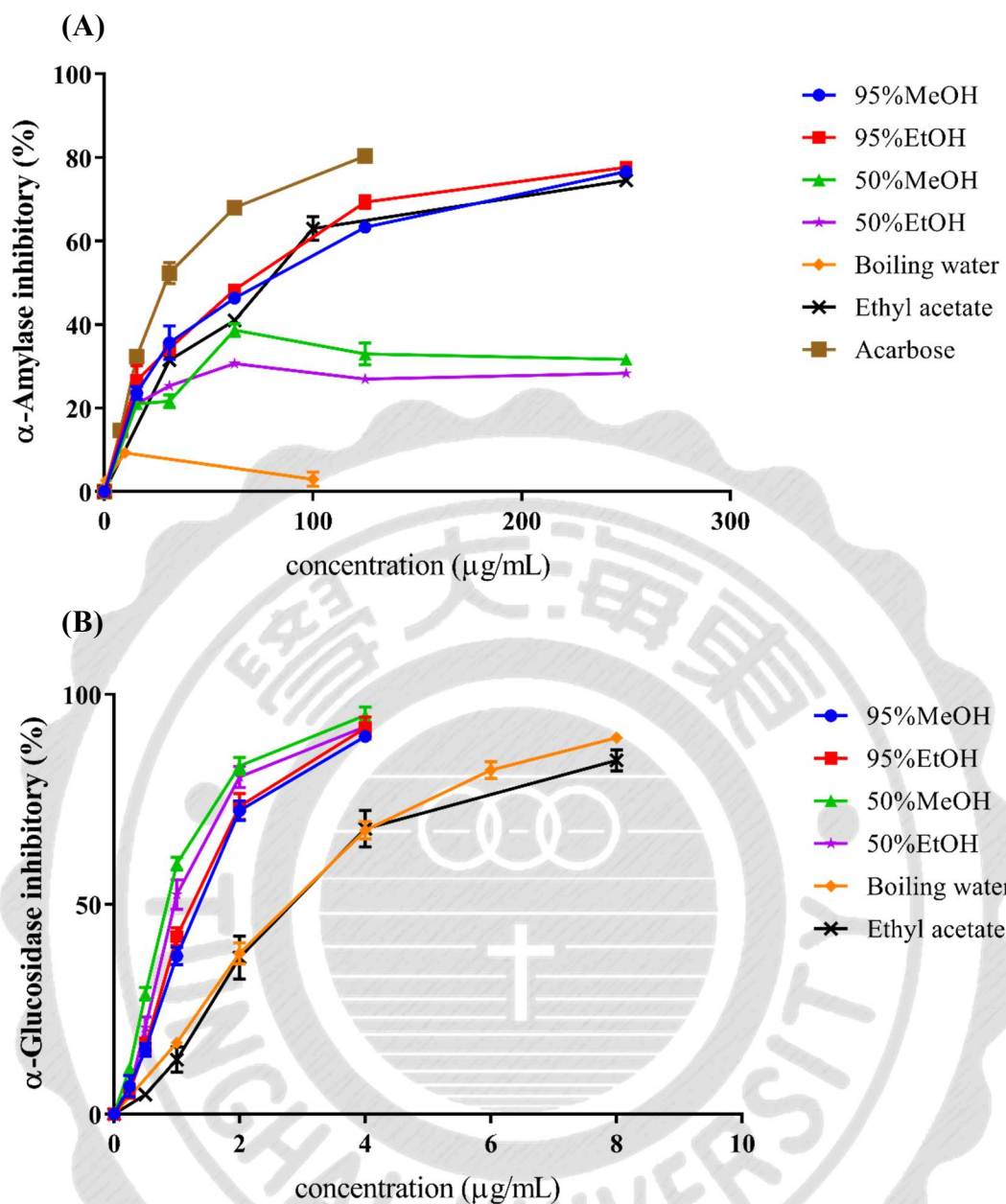
#### 四、不同溶劑萃取餘甘子對高血糖相關因子抑制活性的影響

##### (一) 不同溶劑萃取餘甘子對糖解酵素抑制活性的影響

本研究使用的糖解酵素為  $\alpha$ -amylase 及  $\alpha$ -glucosidase，兩者皆參與碳水化合物的代謝，會將澱粉水解成多醣、寡醣或葡萄糖。抑制此類酵素可以延緩餐後血糖上升的速度，避免高血糖的現象，為第二型糖尿病的治療方法之一 (Tundis *et al.*, 2010)。

$\alpha$ -Amylase 可藉由剪切多醣及寡醣的  $\alpha$ -1,4-糖苷鍵將大分子水解為小分子，但因其為內切酵素的緣故，釋放出的分子大多屬於寡醣，可被人體吸收的葡萄糖相對較少 (Souza *et al.*, 2010)。圖二十七(A) 顯示，95%甲/乙醇及乙酸乙酯萃取物隨著濃度上升對  $\alpha$ -amylase 的抑制活性也隨之提高，三種萃取溶劑的半抑制濃度介於 20~22  $\mu\text{g/mL}$ ，僅為正控制組 acarbose 的兩倍 (附錄四)。但在水分含量較多的 50%甲/乙醇及水萃取物中效果則不太理想，50%甲/乙醇隨著濃度的上升，其抑制率最高僅達到 30%；而水萃取物則僅有 10%的抑制活性。並且在同濃度 (0.1  $\text{mg/mL}$ ) 下也可發現相同的趨勢 (附錄五)。Nampoothiri *et al.* (2011) 研究中餘甘子甲醇萃取物的  $\alpha$ -amylase  $\text{IC}_{50}$  為 94.3  $\mu\text{g/mL}$ ，稍遜於本研究之溶劑萃取物。餘甘子中含有豐富的酚酸以及水解單寧，水解單寧的主要結構是由醣類與多個沒食子酸結合形成，gallic acid 會與  $\alpha$ -amylase 結合影響其結構，減緩碳水化合物的代謝，而減少餐後高血糖的現象 (Mueller-Harvey, 2001; Lu *et al.*, 2016)。

$\alpha$ -Glucosidase 則是以外切的方式，從醣類非還原末端逐一水解葡萄糖，為碳水化合物釋放葡萄糖的主要推手 (Kumar *et al.*, 2011)。六種溶劑萃取餘甘子皆隨著使用濃度的上升而有更好的抑制活性 (圖二十七 B)，各萃取物半抑制濃度介於 0.24~0.79  $\mu\text{g/mL}$ ，其中以 50%甲醇萃取物的抑制活性最佳， $\text{IC}_{50}$  為  $0.24 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$  (附錄四)。而正控制組 acarbose 的抑制效果不彰， $\text{IC}_{50}$



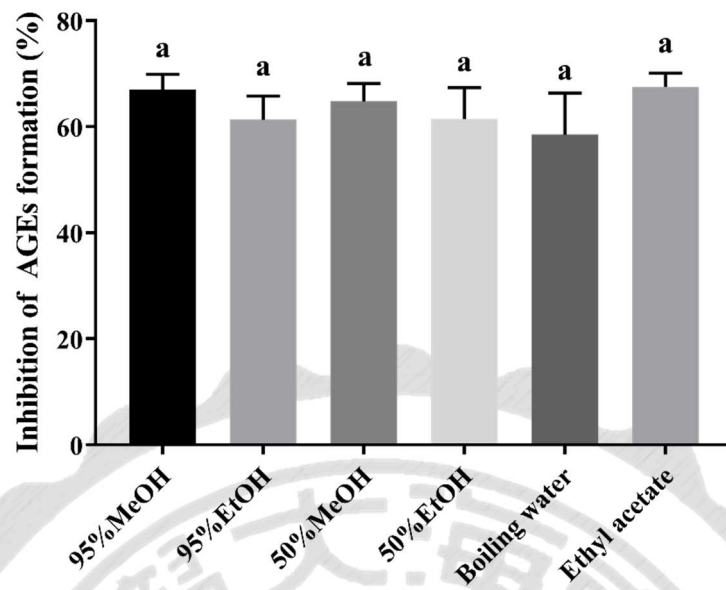
圖二十七、不同濃度萃取物對糖解酵素抑制活性的影響

Fig 27. Effect of different concentrate extracts on glycolytic enzymes inhibitory activity.

高達 278  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，為樣品的 350~1000 倍。在 Shai *et al.* (2010) 的研究中指出 acarbose 半抑制濃度高達 17  $\text{mg}/\text{mL}$ 。其中原因可能是由於  $\alpha$ -glucosidase 的來源不同，acarbose 對酵母菌生產之葡萄糖苷酶抑制效果較差 (Oki *et al.*, 1999)。Nampoothiri *et al.* (2011) 餘甘子甲醇萃取物的  $\alpha$ -glucosidase 抑制活性只有本研究的四分之一，其  $\text{IC}_{50}$  達 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。Shobana *et al.* (2009) 指出  $\alpha$ -glucosidase 的抑制活性與多酚類物質的含量有關，本研究不同濃度甲/乙醇萃取物的總酚含量介於 350 ~ 400  $\text{mg GAE}/\text{g extract}$ ，高於沸水及乙酸乙酯萃取物的含量 (244 及 154  $\text{mg GAE}/\text{g extract}$ )，實驗結果指出前者多酚含量較高，其  $\alpha$ -glucosidase 的抑制活性亦較高。其次，不同溶劑萃取物對  $\alpha$ -glucosidase 的  $\text{IC}_{50}$  都較  $\alpha$ -amylase 更低，可直接減緩飲食中葡萄糖的釋放。

## (二) 不同溶劑萃取餘甘子對 AGEs 形成抑制的影響

醴類的自氧化是形成 AGEs 的必經途徑，多酚類物質的還原能力可抑制此過程的進行，而降低 AGEs 的產生 (Chen *et al.*, 2016)。利用醴類與蛋白質在高糖環境下會促進糖基化作用的現象，進行抑制活性的測定。牛血清白蛋白與葡萄糖在有或沒有抑制物的情況下於 60 度培養箱中培養，藉由 TCA 收集蛋白質，再利用 AGEs 的螢光特性進行檢測。圖二十六為不同溶劑萃取餘甘子對晚期糖化終產物抑制的影響，結果顯示六種溶劑萃取物在濃度為 0.1  $\text{mg}/\text{mL}$  均可達到 55~65% 的抑制率，彼此間沒有顯著差異 ( $p < 0.05$ )。蛋白質糖基化後期會產生蛋白質交聯，Perera *et al.* (2015) 使用電泳評估餘甘子甲醇萃取物的蛋白質交聯抑制作用，結果證實其具有良好的糖基化抑制作用。本研究藉由 AGEs 形成的抑制作用，檢測萃取物的糖基化抑制活性，結果表示餘甘子不同溶劑萃取物均可藉由抑制晚期糖化終產物的產生，預防糖尿病併發症的發生。

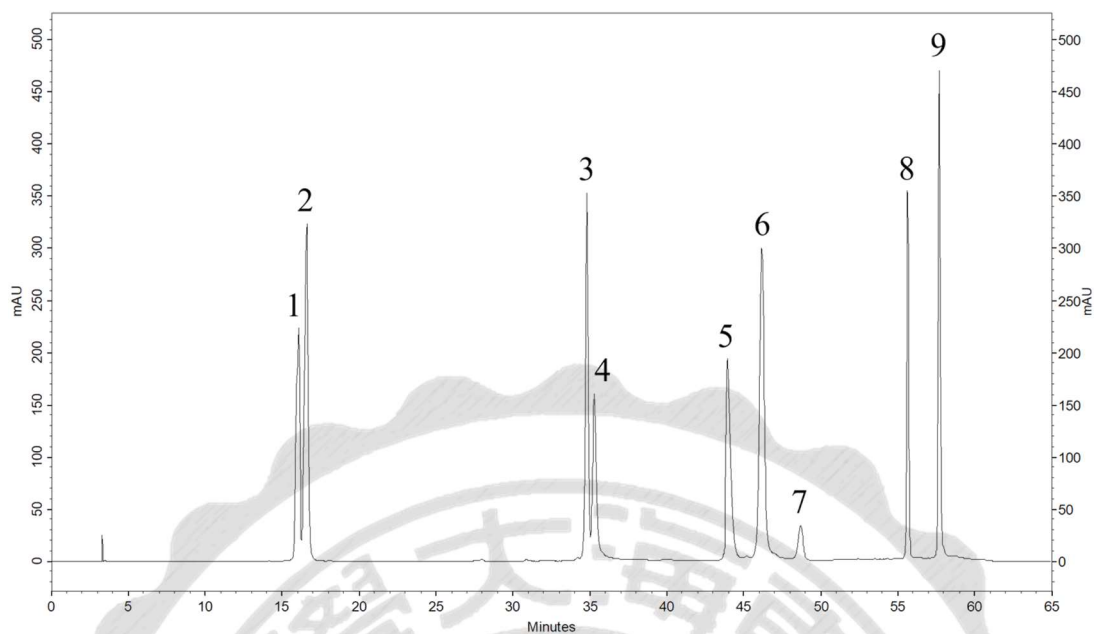


圖二十八、不同溶劑萃取餘甘子對晚期糖化終產物抑制的影響  
Fig 28. Effect of different solvent on advanced glycation end products formation inhibitory activity. Sample concentration = 0.1 mg/mL. Data expressed as means of triplicate  $\pm$  SD. Mean with different letters were significantly different at  $p < 0.05$ .

## 五、不同溶劑萃取物對特定機能性成分的影響

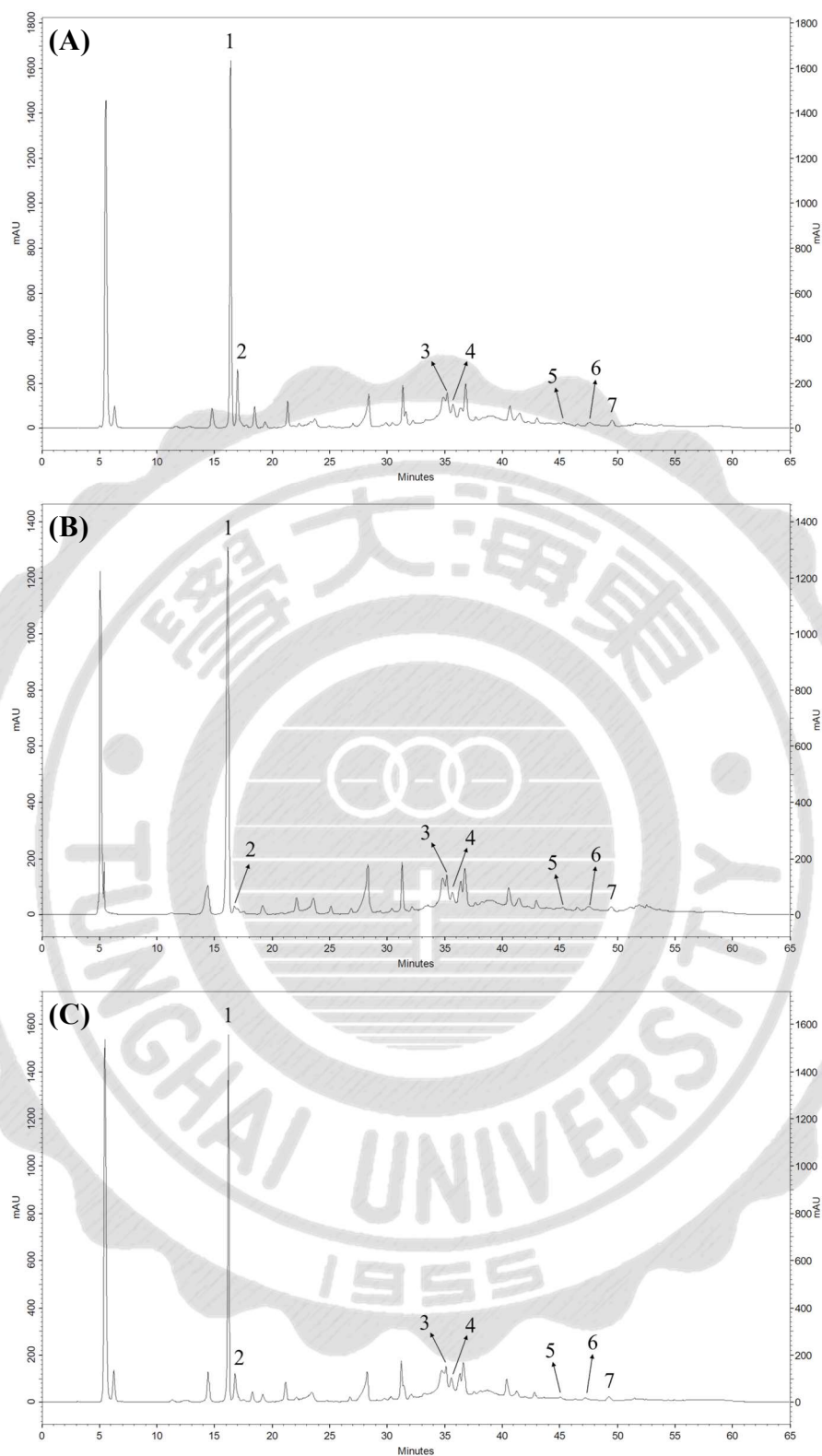
餘甘子中含有豐富的多酚類物質，其中以單寧、類黃酮及酚酸類為大宗。本研究針對餘甘子中常見的八種成分 (chebulinic acid, corilagin, ellagic acid, gallic acid,  $\beta$ -glucogallin, geraniin, kaempferol, quercetin) 進行分析，圖二十九為標準品在波長 280 nm 的圖譜。不同溶劑萃取物之圖譜如圖三十及三十一，由圖譜中可發現所有萃取物中都沒有檢測出 kaempferol 及 quercetin 兩種成分，但 Liu *et al.* (2008) 的研究中，不同溶劑液相分配的區分物中可將他們分離鑑定，本研究僅使用單一溶劑對餘甘子進行萃取，這兩種成分可能因含量占比較低，故無法在實驗中被檢測。除了分析的幾項成分外，圖譜中還呈現出其他的波峰 (Peak)，其中滯留時間約在 5 min 的 peak 非常顯著，與參考方法 Yang *et al.* (2012) 的圖譜對照下，推測應為 mucic acid gallate。Olennikov *et al.* (2015) 指出此化合物亦具有良好的抗氧化活性，DPPH 及 ABTS 自由基清除活性的 IC<sub>50</sub> 分別為 10.16 及 6.37  $\mu$ M。

餘甘子果實中常見成分的含量列於表十二， $\beta$ -glucogallin 於六種溶劑萃取物中含量都相當多， $\beta$ -glucogallin 除了可作為抗氧化劑外，也可做為醛糖還原酶的抑制劑，進而抑制 AGEs 的產生 (Puppala *et al.*, 2012)。沸水可以萃取出餘甘子中大量 gallic acid, corilagin, geraniin 及 ellagic。Gallic acid, geraniin 及 ellagic acid 為 corilagin 的代謝產物，會在沸水中水解，故沸水萃取物中上述四種成分含量相對多於其他萃取物 (Elendran *et al.*, 2015)。乙酸乙酯萃取物中沒有檢測出 corilagin, geraniin, ellagic acid 及 chebulinic acid 四種成分。各種成分不同的溶解度展現在不同溶劑萃取的結果，而乙酸乙酯萃取物中檢測項目的總含量最高，與其在機能性的表現相悖，推測其他溶劑萃取物中含有更多機能性成分，提供更強大的機能性效果。



圖二十九、標準品 HPLC 圖譜

Fig 29. HPLC chromatograms of standard. Peak 1,  $\beta$ -glucogallin; peak 2, gallic acid; peak 3, corilagin; peak 4, geraniin; peak 5, ellagic acid; peak 6, chebulinic acid; peak 7, benzoic acid; peak 8, quercetin; peak 9, kaemferol.

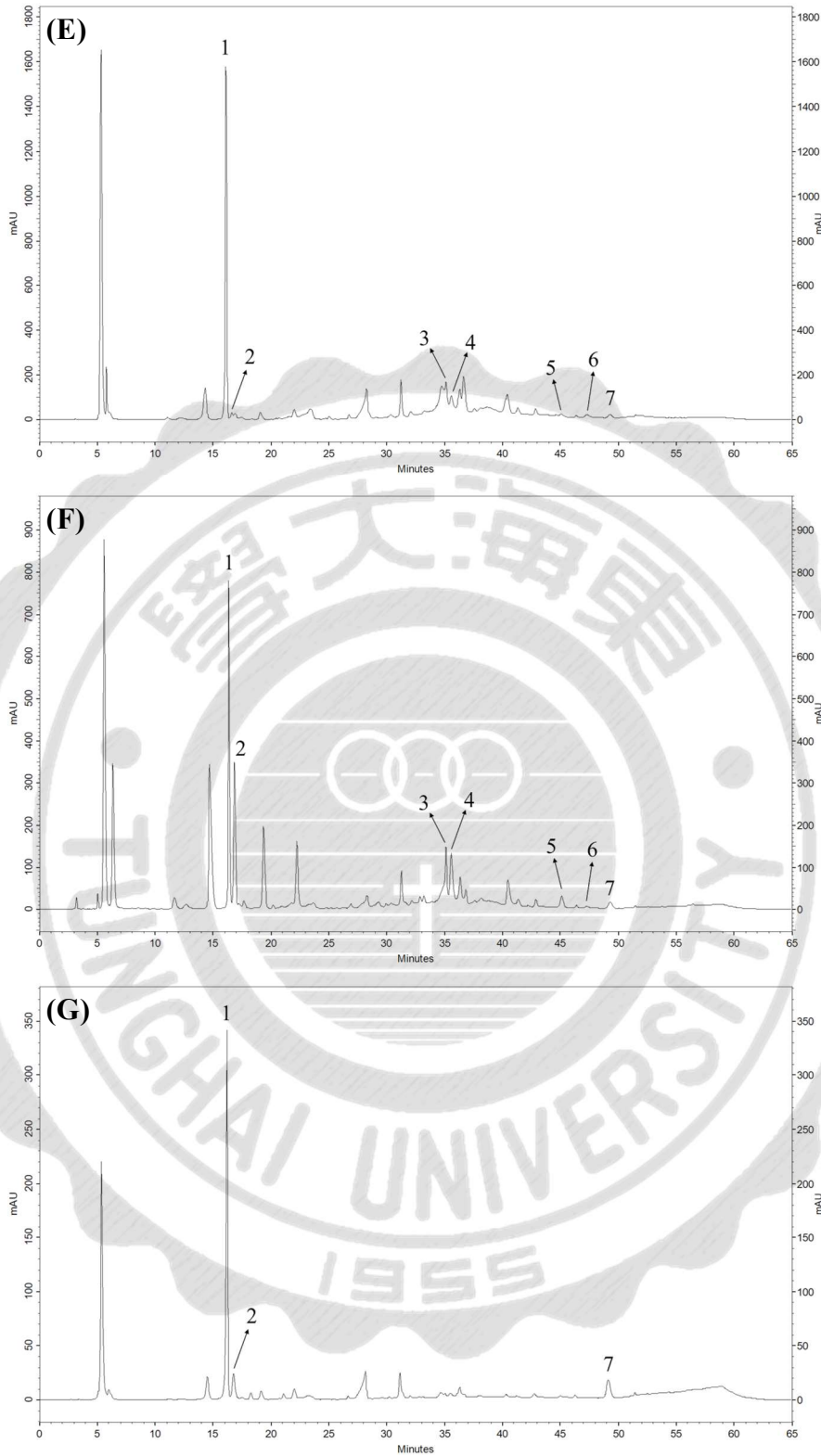


圖三十、不同溶劑萃取物圖譜 (95%甲/乙醇、50%甲醇)

Fig 30. HPLC chromatograms of different solvent extracts.

(A)95%MeOH; (B) 95%EtOH; (C) 50%MeOH





圖三十一、不同溶劑萃取物圖譜 (50%乙醇、沸水、乙酸乙酯)

Fig 31. HPLC chromatograms of different solvent extracts. (E) 50%EtOH; (F) Boiling water; (G) Ethyl acetate

表十二、不同溶劑萃取對餘甘子特殊機能性成分含量的影響

Table 12. Effect of different solvent on functional compounds content. Compounds concentration = mg/g extract. Data expressed as means of triplicate  $\pm$  SD. Means with different letters were significantly different at  $p < 0.05$ .

Solvents	95% MeOH	95% EtOH	50% MeOH	50% EtOH	Boiling water	Ethyl acetate
$\beta$ -Glucogallin	65.26 $\pm$ 1.87 <sup>c</sup>	100.83 $\pm$ 5.34 <sup>b</sup>	93.79 $\pm$ 4.21 <sup>b</sup>	93.51 $\pm$ 1.60 <sup>b</sup>	66.41 $\pm$ 1.58 <sup>c</sup>	163.77 $\pm$ 17.62 <sup>a</sup>
Gallic acid	9.89 $\pm$ 0.58 <sup>c</sup>	1.17 $\pm$ 0.17 <sup>d</sup>	8.32 $\pm$ 0.60 <sup>c</sup>	1.51 $\pm$ 0.04 <sup>d</sup>	28.87 $\pm$ 1.66 <sup>a</sup>	11.69 $\pm$ 1.58 <sup>b</sup>
Corilagin	9.11 $\pm$ 0.71 <sup>c</sup>	10.13 $\pm$ 0.61 <sup>c</sup>	14.93 $\pm$ 0.28 <sup>b</sup>	15.91 $\pm$ 0.69 <sup>b</sup>	30.61 $\pm$ 0.78 <sup>a</sup>	N.D.
Geraniin	10.40 $\pm$ 0.40 <sup>c</sup>	9.49 $\pm$ 0.37 <sup>d</sup>	15.12 $\pm$ 0.38 <sup>b</sup>	15.16 $\pm$ 0.36 <sup>b</sup>	23.96 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>	N.D.
Chebulinic acid	11.96 $\pm$ 0.49 <sup>b</sup>	14.34 $\pm$ 0.93 <sup>a</sup>	12.13 $\pm$ 1.45 <sup>b</sup>	12.07 $\pm$ 1.30 <sup>b</sup>	8.42 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	N.D.
Ellagic acid	5.01 $\pm$ 0.29 <sup>c</sup>	6.60 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	6.57 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>	7.01 $\pm$ 0.35 <sup>b</sup>	9.09 $\pm$ 0.66 <sup>a</sup>	N.D.
Quercetin	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Kaempferol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<b>Total</b>	111.62	142.55	150.85	145.17	167.36	175.46

## 伍、結論

本研究使用不同溶劑萃取餘甘子，並探討其機能性成分、抗氧化活性、高血糖相關因子抑制活性及特殊機能性成分的含量。結果顯示，使用 50% 甲醇萃取餘甘子可以得到最高的產率、最多的機能性成分、最好的抗氧化活性及最佳的高血糖相關因子抑制活性。乙酸乙酯在超氧陰離子自由基清除活性及 AGEs 抑制有不差的表現，但鑒於其產率極低，不建議以其作為萃取溶劑。不同溶劑對餘甘子中常見成分的萃取效果因不同的溶解度而有差異，而萃取物中尚含有其他具機能性之成分。本研究僅針對於溶劑粗萃物進行機能性之探討，成分較為複雜，未來可針對 50% 甲/乙醇餘甘子萃取物進行後續更深入的研究；而對餘甘子中各種不同成分，則須進一步分離純化，來對不同的功效進行評估。

## 陸、參考文獻

- 林筑盈. (2016). 樹豆依品種及發芽時間探討其在體外之抗氧化以及對醣類分解酵素及蛋白質醣化反應之抑制作用. *東海大學食品科學所碩士論文*.
- 張雯雯, 張弘, 鄭華, 李坤, 馮穎, 甘瑾, 侯彬, & 李成強. (2013). 餘甘子核仁油的微波萃取工藝優化及脂肪酸組成分析. *食品科學*, 34, 13-18.
- 賴瑞聲, 郭曜豪, & 葉靜華. (2017). 餘甘子機能性成分及其保健功效. *苗栗區農業專訊*, 78, 15-18.
- American Diabetes Association (2010). *Diagnosis and classification of diabetes mellitus* (Vol. 33).
- American Diabetes Association (2018). *Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2018* (Vol. 41).
- Agarwal, M., Kumar, A., Gupta, R., & Upadhyaya, S. (2012). Extraction of Polyphenol, Flavonoid from *Emblca officinalis*, *Citrus limon*, *Cucumis sativus* and Evaluation of their Antioxidant Activity. *Oriental Journal Of Chemistry*, 28, 993-998.
- Aguilar, T. A. F., Navarro, B. C. H., & Perez, J. A. M. (2016). Endogenous Antioxidants: A Review of their Role in Oxidative Stress. In *The Transcription Factor Nrf2*.
- Ahmad, I., Mehmood, Z., & Mohammad, F. (1998). Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 62, 183-193.
- Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D. G., & Lightfoot, D. A. (2017). Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants*, 6, 42-64.
- Aruoma, O. I. (2003). Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research*, 523-524, 9-20.
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014, 1-31.
- Azevedo, M., & Alla, S. (2008). Diabetes in Sub-Saharan Africa: Kenya, Mali, Mozambique, Nigeria, South Africa and Zambia. *International journal of diabetes in developing countries*, 28, 101-108.
- Baynes, H. (2015). Classification, Pathophysiology, Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. *Journal of Diabetes & Metabolism*, 6, 541-550.

- Benalla, W., Bellahcen, S., & Bnouham, M. (2010). Antidiabetic medicinal plants as a source of alpha glucosidase inhibitors. *Current Diabetes Reviews*, 6, 247-254.
- Bentinger, M., Brismar, K., & Dallner, G. (2007). The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion*, 7, 41-50.
- Bhaigyabati, T., Grihanjali Devi, P., & Bag, G. C. (2014). Total flavonoid content and antioxidant activity of aqueous rhizome extract of three Hedychium species of Manipur valley. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5, 970-976.
- Bouayed, J., & Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants--Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 3, 228-237.
- Boukharta, M., Jalbert, G., & Castonguay, A. (1992). Biodistribution of ellagic acid and dose-related inhibition of lung tumorigenesis in A/J mice. *Nutrition and Cancer*, 18, 181-189.
- Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*, 54, 1615-1625.
- 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.
- Carr, A. C., & Maggini, S. (2017). Vitamin C and Immune Function. *Nutrients*, 9, 1211-1236.
- Chaphalkar, R., Apte, K. G., Talekar, Y., Ojha, S. K., & Nandave, M. (2017). Antioxidants of *Phyllanthus emblica* L. Bark Extract Provide Hepatoprotection against Ethanol-Induced Hepatic Damage: A Comparison with Silymarin. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 1-10.
- Charoenteeraboon, J., Wongnoppavich, A., Soonthornchareonnon, N., Jaijoy, K., & Sireeratawong, S. (2010). Antioxidant activities of the standardized water extract from fruit of *Phyllanthus emblica* Linn. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 32, 599-604.
- Chen, A. Y., & Chen, Y. C. (2013). A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food chemistry*, 138, 2099-2107.
- Chen, H., Virk, M. S., & Chen, F. (2016). Phenolic acids inhibit the formation of advanced glycation end products in food simulation systems depending on

- their reducing powers and structures. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 67, 400-411.
- Chen, J., Li, L., Zhou, X., Li, B., Zhang, X., & Hui, R. (2018). Structural characterization and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of polysaccharides extracted from Chinese traditional medicine Huidouba. *International Journal of Biological Macromolecules*, 117, 815-819.
- Cheng, H. S., Ton, S., & Kadir, K. (2016). Ellagitannin geraniin: a review of the natural sources, biosynthesis, pharmacokinetics and biological effects. *Phytochemistry Reviews*, 16, 159-193.
- Chetyrkin, S., Mathis, M., Pedchenko, V., Sanchez, O. A., McDonald, W. H., Hachey, D. L., Madu, H., Stec, D., Hudson, B., & Voziyan, P. (2011). Glucose autoxidation induces functional damage to proteins via modification of critical arginine residues. *Biochemistry*, 50, 6102-6112.
- D'Souza J, J., D'Souza P, P., Fazal, F., Kumar, A., Bhat, H. P., & Baliga, M. S. (2014). Anti-diabetic effects of the Indian indigenous fruit *Embolia officinalis* Gaertn: active constituents and modes of action. *Food & Function*, 5, 635-644.
- Dangkulwanich, M., Kongnithigarn, K., & Aurnoppakhun, N. (2018). Colorimetric Measurements of Amylase Activity: Improved Accuracy and Efficiency with a Smartphone. *Journal of Chemical Education*, 95, 141-145.
- Deng, Y., Tang, L., Feng, C., Zeng, G., Wang, J., Lu, Y., Liu, Y., Yu, J., Chen, S., & Zhou, Y. (2017). Construction of Plasmonic Ag and Nitrogen-Doped Graphene Quantum Dots Codecorated Ultrathin Graphitic Carbon Nitride Nanosheet Composites with Enhanced Photocatalytic Activity: Full-Spectrum Response Ability and Mechanism Insight. *ACS Appl Mater Interfaces*, 9, 8552-8558.
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y.-H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22, 296-302.
- Duan, W., Yu, Y., & Zhang, L. (2005). Antiatherogenic effects of phyllanthus emblica associated with corilagin and its analogue. *Yakugaku Zasshi*, 125, 587-591.
- Duarte, T. L., & Lunec, J. (2005). Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free Radical Research*, 39, 671-686.
- El-Bahr, S. M. (2013). Biochemistry of Free Radicals and Oxidative Stress. *Science International*, 1, 111-117.

- El-Mekkawy, S., Meselhy, M. R., Kusumoto, I. T., Kadota, S., Hattori, M., & Namba, T. (1995). Inhibitory effects of Egyptian folk medicines on human immunodeficiency virus (HIV) reverse transcriptase. *Chem Pharm Bull*, *43*, 641-648.
- Elendran, S., Wang, L. W., Pranker, R., & Palanisamy, U. D. (2015). The physicochemical properties of geraniin, a potential antihyperglycemic agent. *Pharmaceutical biology*, *53*, 1719-1726.
- Estari, M., Venkanna, L., Sripriya, D., & Lalitha, R. (2012). Human immunodeficiency virus (HIV-1) reverse transcriptase inhibitory activity of phyllanthus emblica plant extract. *Biology and Medicine*, *4*, 178-182.
- Fernandes, L., Pereira, J. A., Lopez-Cortes, I., Salazar, D. M., & Ramalhosa, E. C. (2015). Physicochemical Changes and Antioxidant Activity of Juice, Skin, Pellicle and Seed of Pomegranate (cv. Mollar de Elche) at Different Stages of Ripening. *Food Technol Biotechnol*, *53*, 397-406.
- Firdous, S. M. (2014). Phytochemicals for treatment of diabetes. *EXCLI Journal*, *13*, 451-453.
- Frederice, R., Ferreira, A. P. G., & Gehlen, M. H. (2010). Molecular Fluorescence in Silica Particles Doped with Quercetin-Al<sup>3+</sup> Complexes. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *21*, 1213-1217.
- Ganesan, K., & Xu, B. (2017). A Critical Review on Polyphenols and Health Benefits of Black Soybeans. *Nutrients*, *9*, 455-471.
- Gao, H., Huang, Y. N., Gao, B., & Kawabata, J. (2008). Chebulagic acid is a potent alpha-glucosidase inhibitor. *Biosci Biotechnol Biochem*, *72*, 601-603.
- Gilmartin, A. B. H., Ural, S. H., & Repke, J. T. (2008). Gestational diabetes mellitus. *Reviews in obstetrics & gynecology*, *1*, 129-134.
- Grosso, G., Bei, R., Mistretta, A., Marventano, S., Calabrese, G., Masuelli, L., Giganti, M. G., Modesti, A., Galvano, F., & Gazzolo, D. (2013). Effects of vitamin C on health: a review of evidence. *Frontiers in Bioscience*, *18*, 1017-1029.
- Grzegorzczak-Karolak, I., Golab, K., Gburek, J., Wysokinska, H., & Matkowski, A. (2016). Inhibition of Advanced Glycation End-Product Formation and Antioxidant Activity by Extracts and Polyphenols from *Scutellaria alpina* L. and *S. altissima* L. *Molecules*, *21*, 739-749.
- Gudipati, M., & Mavila, N. (2005). Cereal  $\alpha$ -amylases - An overview. *Carbohydrate Polymers*, *60*, 163-173.
- Gunawan-Puteri, M. D., Kato, E., & Kawabata, J. (2012). alpha-Amylase inhibitors from an Indonesian medicinal herb, *Phyllanthus urinaria*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *92*, 606-609.

- Gutteridge, J. M. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*, *41*, 1819-1828.
- Hachana, A., & Harmas, M. N. (2018). Terminal Synergetic Control for Blood Glucose Regulation in Diabetes Patients. *Journal of Dynamic Systems, Measurement and Control*, *140*, 100801-100805.
- Harrison, F. E. (2012). A critical review of vitamin C for the prevention of age-related cognitive decline and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease*, *29*, 711-726.
- Hartzfeld, P. W., Forkner, R., Hunter, M. D., & Hagerman, A. E. (2002). Determination of Hydrolyzable Tannins (Gallotannins and Ellagitannins) after Reaction with Potassium Iodate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 1785-1790.
- Hsu, C. Y., Chan, Y. P., & Chang, J. (2007). Antioxidant activity of extract from *Polygonum cuspidatum*. *Biological Research*, *40*, 13-21.
- Hu, F. B., Manson, J. E., Stampfer, M. J., Colditz, G., Liu, S., Solomon, C. G., & Willett, W. C. (2001). Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *The New England Journal of Medicine*, *345*, 790-797.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 1841-1856.
- Huang, S., Liu, H., Meng, N., Li, B., & Wang, J. (2017). Hypolipidemic and Antioxidant Effects of *Malus toringoides* (Rehd.) Hughes Leaves in High-Fat-Diet-Induced Hyperlipidemic Rats. *Journal of medicinal food*, *20*, 258-264.
- International Diabetes Federation (2017). *IDF Diabetes Atlas* (8 ed.).
- Imam, M. U., Zhang, S., Ma, J., Wang, H., & Wang, F. (2017). Antioxidants Mediate Both Iron Homeostasis and Oxidative Stress. *Nutrients*, *9*, 671-690.
- Kahn, C. R. (1994). Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes*, *43*, 1066-1084.
- Kaneto, H., Katakami, N., Matsuhisa, M., & Matsuoka, T.-a. (2010). Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis. *Mediators of inflammation*, *2010*, 1-11.
- Keen, M. A., & Hassan, I. (2016). Vitamin E in dermatology. *Indian dermatology online journal*, *7*, 311-315.
- Khan, K. (2009). Role of *Embllica officinalis* in Medicine - A Review. *Botany Research International*, *2*, 218-228.
- Kharroubi, A. T., & Darwish, H. M. (2015). Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World journal of diabetes*, *6*, 850-867.



- Kumar, S., Narwal, S., Kumar, V., & Prakash, O. (2011).  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. *Pharmacognosy reviews*, *5*, 19-29.
- Lapolla, A., Traldi, P., & Fedele, D. (2005). Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. *Clinical Biochemistry*, *38*, 103-115.
- Lee, H. S., Koo, Y. C., Suh, H. J., Kim, K. Y., & Lee, K. W. (2010). Preventive effects of chebulic acid isolated from *Terminalia chebula* on advanced glycation endproduct-induced endothelial cell dysfunction. *Journal of Ethnopharmacology*, *131*, 567-574.
- Lin, L. T., Chen, T. Y., Lin, S. C., Chung, C. Y., Lin, T. C., Wang, G. H., Anderson, R., Lin, C. C., & Richardson, C. D. (2013). Broad-spectrum antiviral activity of chebulagic acid and punicalagin against viruses that use glycosaminoglycans for entry. *BMC Microbiol*, *13*, 1-15.
- Liu, G., Xiong, S., Xiang, Y. F., Guo, C. W., Ge, F., Yang, C. R., Zhang, Y. J., Wang, Y. F., & Kitazato, K. (2011). Antiviral activity and possible mechanisms of action of pentagalloylglucose (PGG) against influenza A virus. *Archives of Virology*, *156*, 1359-1369.
- Liu, W., Shang, P., Liu, T., Xu, H., Ren, D., Zhou, W., Wen, A., & Ding, Y. (2017). Gastroprotective effects of chebulagic acid against ethanol-induced gastric injury in rats. *Chemico-Biological Interactions*, *278*, 1-8.
- Liu, X., Cui, C., Zhao, M., Wang, J., Luo, W., Yang, B., & Jiang, Y. (2008). Identification of phenolics in the fruit of emblica (*Phyllanthus emblica* L.) and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, *109*, 909-915.
- Liu, X., Zhao, M., Wang, J., Yang, B., & Jiang, Y. (2008). Antioxidant activity of methanolic extract of emblica fruit (*Phyllanthus emblica* L.) from six regions in China. *Journal of Food Composition and Analysis*, *21*, 219-228.
- Liu, X., Zhao, M., Wu, K., Chai, X., Yu, H., Tao, Z., & Wang, J. (2012). Immunomodulatory and anticancer activities of phenolics from emblica fruit (*Phyllanthus emblica* L.). *Food Chemistry*, *131*, 685-690.
- Liu, Z., & Ma, S. (2017). Recent Advances in Synthetic  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors. *ChemMedChem*, *12*, 819-829.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, *4*, 118-126.
- Lu, Q., Chen, C., Zhao, S., Ge, F., & Liu, D. (2016). Investigation of the Interaction Between Gallic Acid and  $\alpha$ -Amylase by Spectroscopy. *International Journal of Food Properties*, *19*, 2481-2494.

- Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 164-175.
- Lv, J. J., Wang, Y. F., Zhang, J. M., Yu, S., Wang, D., Zhu, H. T., Cheng, R. R., Yang, C. R., Xu, M., & Zhang, Y. J. (2014). Anti-hepatitis B virus activities and absolute configurations of sesquiterpenoid glycosides from *Phyllanthus emblica*. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 12, 8764-8774.
- Lv, J. J., Yu, S., Xin, Y., Cheng, R. R., Zhu, H. T., Wang, D., Yang, C. R., Xu, M., & Zhang, Y. J. (2015). Anti-viral and cytotoxic norbisabolane sesquiterpenoid glycosides from *Phyllanthus emblica* and their absolute configurations. *Phytochemistry*, 117, 123-134.
- Manosroi, A., Jantrawut, P., Akazawa, H., Akihisa, T., & Manosroi, J. (2010). Biological activities of phenolic compounds isolated from galls of *Terminalia chebula* Retz. (Combretaceae). *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, 24, 1915-1926.
- Marín-Peñalver, J. J., Martín-Timón, I., Sevillano-Collantes, C., & Del Cañizo-Gómez, F. J. (2016). Update on the treatment of type 2 diabetes mellitus. *World journal of diabetes*, 7, 354-395.
- Matsuura, N., Aradate, T., Sasaki, C., Kojima, H., Ohara, M., Hasegawa, J., & Ubukata, M. (2002). Screening System for the Maillard Reaction Inhibitor from Natural Product Extracts. *Journal of Health Science*, 48, 520-526.
- Mihaljevic, B., Katusin-Razem, B., & Razem, D. (1996). The reevaluation of the ferric thiocyanate assay for lipid hydroperoxides with special considerations of the mechanistic aspects of the response. *Free Radical Biology & Medicin*, 21, 53-63.
- Mogale, M., Lebelo, L. S., Thovhogi, N., de Freitas, A. N., & Shai, L. o. L. (2011).  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory effects of *sclerocarya birrea* [(A. Rich.) Hochst.] subspecies *caffra* (Sond) Kokwaro (Anacardiaceae) stem-bark extracts. *African Journal of Biotechnology*, 10, 15033-15039.
- Mottalib, A., Kasetty, M., Mar, J. Y., Elseaidy, T., Ashrafzadeh, S., & Hamdy, O. (2017). Weight Management in Patients with Type 1 Diabetes and Obesity. *Current diabetes reports*, 17, 92-100.
- Mueller-Harvey, I. (2001). Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology*, 91, 3-20.
- Nakashima, T., Omura, S., & Takahashi, Y. (2012). Generation of superoxide anions by a glycation reaction in conventional laboratory media. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114, 275-280.
- Nampoothiri, S. V., Prathapan, A., Cherian, O. L., Raghu, K. G., Venugopalan, V. V., & Sundaresan, A. (2011). In vitro antioxidant and inhibitory potential of

- Terminalia bellerica and Emblica officinalis fruits against LDL oxidation and key enzymes linked to type 2 diabetes. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 125-131.
- Nathan, C., & Ding, A. (2010). Nonresolving Inflammation. *Cell*, 140, 871-882.
- Nickander, K. K., McPhee, B. R., Low, P. A., & Tritschler, H. (1996). Alpha-lipoic acid: Antioxidant potency against lipid peroxidation of neural tissues in vitro and implications for diabetic neuropathy. *Free Radical Biology and Medicine*, 21, 631-639.
- Oki, T., Matsui, T., & Osajima, Y. (1999). Inhibitory Effect of  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors Varies According to Its Origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 550-553.
- Olennikov, D., Kashchenko, N., Schwabl, H., Vennos, C., & Loepfe, C. (2015). New Mucic Acid Gallates from Phyllanthus emblica. *Chemistry of Natural Compounds*, 51, 666-670.
- Olokoba, A. B., Obateru, O. A., & Olokoba, L. B. (2012). Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman medical journal*, 27, 269-273.
- Özgür, M., Kalaycıoğlu, Z., & Kutlu, O. (2017). Simultaneous spectrophotometric determination of phenolic antioxidant (BHA and BHT) concentrations in pharmaceutical preparations and chewing gums using the H-point standard addition method. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 36, 211-222.
- Packer, L., Witt, E. H., & Tritschler, H. J. (1995). Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Biology and Medicine*, 19, 227-250.
- Paschou, S. A., Papadopoulou-Marketou, N., Chrousos, G. P., & Kanakantentsein, C. (2017). On type 1 diabetes mellitus pathogenesis. *Endocrine connections*, 7, 38-46.
- Perera, H. K., & Handuwalage, C. S. (2015). Analysis of glycation induced protein cross-linking inhibitory effects of some antidiabetic plants and spices. *BMC complementary and alternative medicine*, 15, 1-9.
- Perianayagam, J. B., Narayanan, S., Gnanasekar, G., Pandurangan, A., Raja, S., Rajagopal, K., Rajesh, R., Vijayarajkumar, P., & Vijayakumar, S. G. (2005). Evaluation of Antidiarrheal Potential of Emblica officinalis. *Pharmaceutical Biology*, 43, 373-377.
- Potawale S. E., Vetal Y.D., Mehta U.K., Md.Waseem Md.Sadiq, Luniya K.P., Mantri R.A., & Deshmukh R.S. (2008). Phytoconstituents and therapeutic potential of phyllanthus emblica: a review. *Pharmacologyonline*, 2, 236-255.
- Prentki, M., & Nolan, C. J. (2006). Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *Journal Of Clinical Investigation*, 116, 1802-1812.

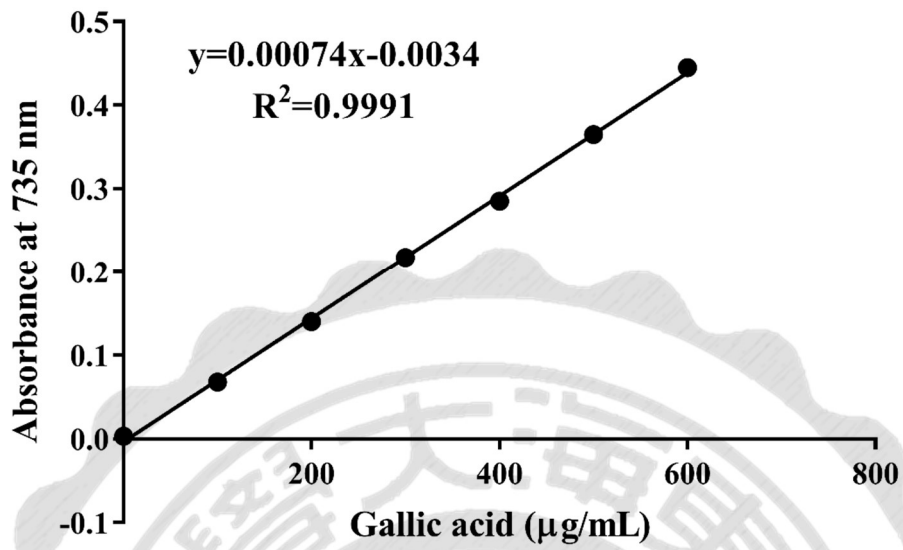
- Priyadarsini, K. I., Khopde, S. M., Kumar, S. S., & Mohan, H. (2002). Free Radical Studies of Ellagic Acid, a Natural Phenolic Antioxidant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 2200-2206.
- Puppala, M., Ponder, J., Suryanarayana, P., Reddy, G. B., Petrash, J. M., & LaBarbera, D. V. (2012). The Isolation and Characterization of  $\beta$ -Glucogallin as a Novel Aldose Reductase Inhibitor from *Emblca officinalis*. *PLOS ONE*, *7*, 1-9.
- Qurrat ul, A., Ashiq, U., Jamal, R. A., Saleem, M., & Mahroof-Tahir, M. (2017). Alpha-glucosidase and carbonic anhydrase inhibition studies of Pd(II)-hydrazide complexes. *Arabian Journal of Chemistry*, *10*, 488-499.
- Röder, P. V., Wu, B., Liu, Y., & Han, W. (2016). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Experimental & molecular medicine*, *48*, 219-219.
- Ramani, R., Anisetti, R. N., Boddupalli, B. M., Malothu, N., & Arumugam, B. S. (2013). Antiparkinson's and free radical scavenging study of ethyl acetate fraction of ethanolic extract of *Leucas lanata*. *Drug Invention Today*, *5*, 251-255.
- Rao, K., & Devi, K. R. (2016). The Protective Effects of *Phyllanthus emblica* in Cyclophosphamide Induced Genotoxicity in Mice. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, *4*, 90-97.
- Rao, T. P., Sakaguchi, N., Juneja, L. R., Wada, E., & Yokozawa, T. (2005). Amla (*Emblca officinalis* Gaertn.) extracts reduce oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of medicinal food*, *8*, 362-368.
- Rasouli, H., Farzaei, M. H., & Khodarahmi, R. (2017). Polyphenols and their benefits: A review. *International Journal of Food Properties*, *20*, 1700-1741.
- Reddy, D. B., & Reddanna, P. (2009). Chebulagic acid (CA) attenuates LPS-induced inflammation by suppressing NF-kappaB and MAPK activation in RAW 264.7 macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *381*, 112-117.
- Reinehr, T. (2013). Type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. *World journal of diabetes*, *4*, 270-281.
- Repetto, M., Semprine, J., & Boveris, A. (2012). Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination. In *Lipid Peroxidation* (Vol. 1).
- Ripsin, C. M., Kang, H., & Urban, R. J. (2009). Management of blood glucose in type 2 diabetes mellitus. *American Family Physician*, *79*, 29-36.
- Rizvi, S., Raza, S. T., Ahmed, F., Ahmad, A., Abbas, S., & Mahdi, F. (2014). The role of vitamin e in human health and some diseases. *Sultan Qaboos University medical journal*, *14*, 157-165.

- Sachan, N., Arif, D. M., Zaman, M. K., & Kumar, Y. (2011). Anti-inflammatory, analgesic and antioxidant potential of the stem bark of *Spondias mangifera* Willd. *Archives of Biological Sciences*, 63, 413-419.
- Saha, S., & Verma, R. J. (2015). Antioxidant activity of polyphenolic extract of *Phyllanthus emblica* against lead acetate induced oxidative stress. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 7, 82-90.
- Sarin, B., Verma, N., Martín, J., & Mohanty, A. (2014). An Overview of Important Ethnomedicinal Herbs of *Phyllanthus* Species: Present Status and Future Prospects. *The Scientific World Journal*, 2014, 1-12.
- Sautin, Y. Y., & Johnson, R. J. (2008). Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids*, 27, 608-619.
- Shai, L. J., Masoko, P., Mokgotho, M. P., Magano, S. R., Mogale, A. M., Boaduo, N., & Eloff, J. N. (2010). Yeast alpha glucosidase inhibitory and antioxidant activities of six medicinal plants collected in Phalaborwa, South Africa. *South African Journal of Botany*, 76, 465-470.
- Shareef, I., Reddy, P. J. M., Gopinath, S. M., Dayananda, K. S., Somashekhar, R., Mandal, A., & Km, P. (2014). Superoxide anion scavenging activity of *Carthamustinctorius* flower. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 3, 10101-10104.
- Sharma, N., Trikha, P., Athar, M., & Raisuddin, S. (2000). In vitro inhibition of carcinogen-induced mutagenicity by *Cassia occidentalis* and *Emblica officinalis*. *Drug and Chemical Toxicology*, 23, 477-484.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., & Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 945-948.
- Shivananjappa, M. M., & Joshi, M. K. (2012). Influence of *Emblica officinalis* aqueous extract on growth and antioxidant defense system of human hepatoma cell line (HepG2). *Pharmaceutical Biology*, 50, 497-505.
- Shobana, S., Sreerama, Y. N., & Malleshi, N. G. (2009). Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet (*Eleusine coracana* L.) seed coat phenolics: Mode of inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic amylase. *Food Chemistry*, 115, 1268-1273.
- Siddhuraju, P., & Manian, S. (2007). The antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of dietary phenolic extracts from horse gram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.) seeds. *Food Chemistry*, 105, 950-958.

- Sindhi, V., Gupta, V., Sharma, K., Bhatnagar, S., Kumari, R., & Dhaka, N. (2013). Potential applications of antioxidants – A review. *Journal of Pharmacy Research*, 7, 828-835.
- Singh, V. P., Bali, A., Singh, N., & Jaggi, A. S. (2014). Advanced glycation end products and diabetic complications. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, 18, 1-14.
- Souza, P. M., & Oliveira Magalhães, P. (2010). Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry - A review. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 41, 850-861.
- Tandoğan, B., & Ulusu, N. (2006). Kinetic mechanism and molecular properties of glutathione reductase. *Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences*, 31, 230-237.
- Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E. M., Garrido, J., & Borges, F. (2013). Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview. *Biomed Res Int*, 2013, 1-11.
- Telang, P. S. (2013). Vitamin C in dermatology. *Indian dermatology online journal*, 4, 143-146.
- Theil, E. C. (2010). Ferritin iron minerals are chelator targets, antioxidants, and coated, dietary iron. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1202, 197-204.
- Tiwari, A. (2001). Imbalance in antioxidant defense and human disease: Multiple approach of natural antioxidant therapy. *Current science*, 81, 1179-1187.
- Tundis, R., Loizzo, M. R., & Menichini, F. (2010). Natural products as alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 10, 315-331.
- Variya, B. C., Bakrania, A. K., & Patel, S. S. (2016). *Emblica officinalis* (Amla): A review for its phytochemistry, ethnomedicinal uses and medicinal potentials with respect to molecular mechanisms. *Pharmacological Research*, 111, 180-200.
- Verma, M., Rai, G. K., & Kaur, D. (2018). Effect of extraction solvents on phenolic content and antioxidant activities of Indian gooseberry and guava. *International Food Research Journal* 25, 762-768.
- Vieito, C., Fernandes, É., Vaz Velho, M., & Pires, P. (2018). The Effect of Different Solvents on Extraction Yield, Total Phenolic Content and

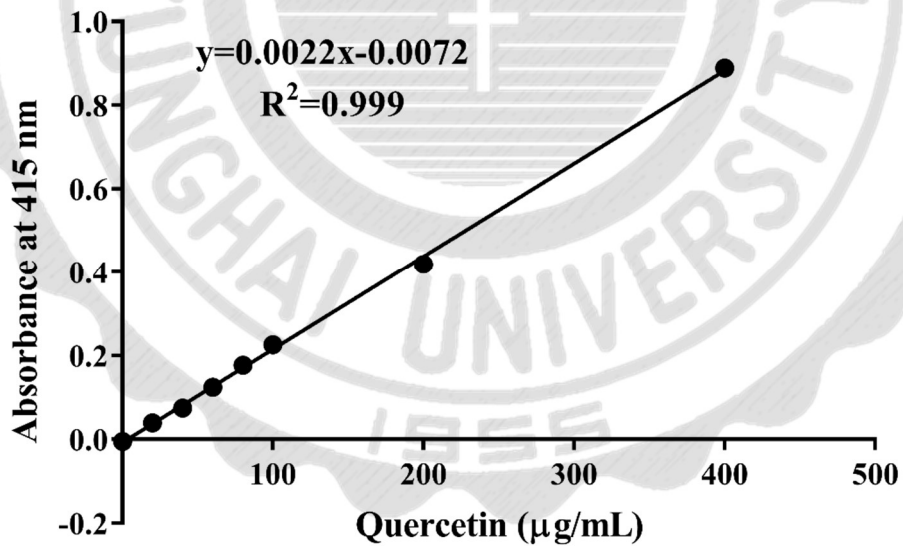
- Antioxidant Activity of Extracts from Pine Bark (*Pinus pinaster* subsp. *atlantica*). *Chemical Engineering Transactions*, 64.
- Vijayalakshmi, S., Arunkumar, V., Anju, D., Gunasundari, P., Moorthy, P., & Chandrasekharan, A. K. (2007). Comparative antimicrobial activities of *Emblia officinalis* and *Ocimum sanctum*. *Ancient science of life*, 27, 1-6.
- Wang, C.-C., Yuan, J.-R., Wang, C.-F., Yang, N., Chen, J., Liu, D., Song, J., Feng, L., Tan, X.-B., & Jia, X.-B. (2017). Anti-inflammatory Effects of *Phyllanthus emblica* L on Benzopyrene-Induced Precancerous Lung Lesion by Regulating the IL-1 $\beta$ /miR-101/Lin28B Signaling Pathway. *Integrative cancer therapies*, 16, 505-515.
- Wang, X., Liu, R., Yang, Y., & Zhang, M. (2015). Isolation, purification and identification of antioxidants in an aqueous aged garlic extract. *Food Chemistry*, 187, 37-43.
- Yang, B., Kortessniemi, M., Liu, P., Karonen, M., & Salminen, J. P. (2012). Analysis of hydrolyzable tannins and other phenolic compounds in emblic leafflower (*Phyllanthus emblica* L.) fruits by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60, 8672-8683.
- Yang, B., & Liu, P. (2014). Composition and biological activities of hydrolyzable tannins of fruits of *Phyllanthus emblica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 529-541.
- Zaharudin, N., Salmean, A. A., & Dragsted, L. O. (2018). Inhibitory effects of edible seaweeds, polyphenolics and alginates on the activities of porcine pancreatic alpha-amylase. *Food Chemistry*, 245, 1196-1203.
- Zhang, Y., DeWitt, D. L., Murugesan, S., & Nair, M. G. (2004). Novel lipid-peroxidation- and cyclooxygenase-inhibitory tannins from *Picrorhiza kurroa* seeds. *Chemistry & Biodiversity*, 1, 426-441.

## 柒、附錄



附錄一、沒食子酸標準曲線

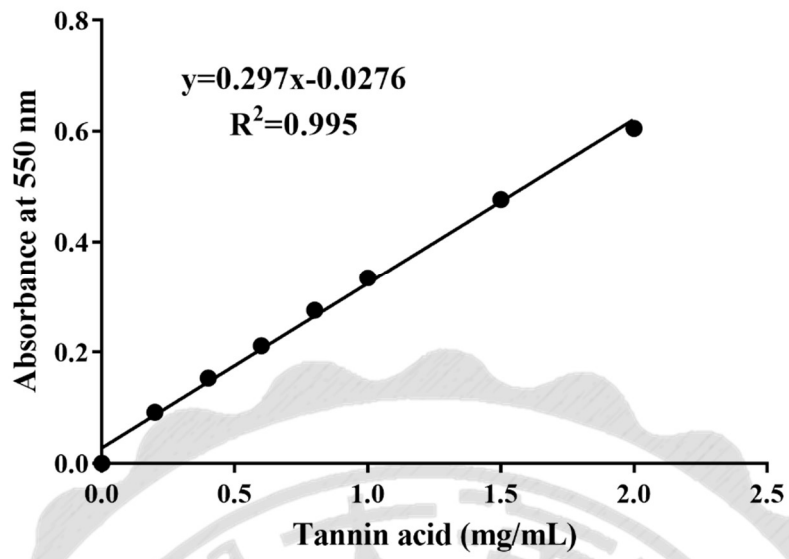
Appendix 1. Standard curve of gallic acid



附錄二、槲皮素標準曲線

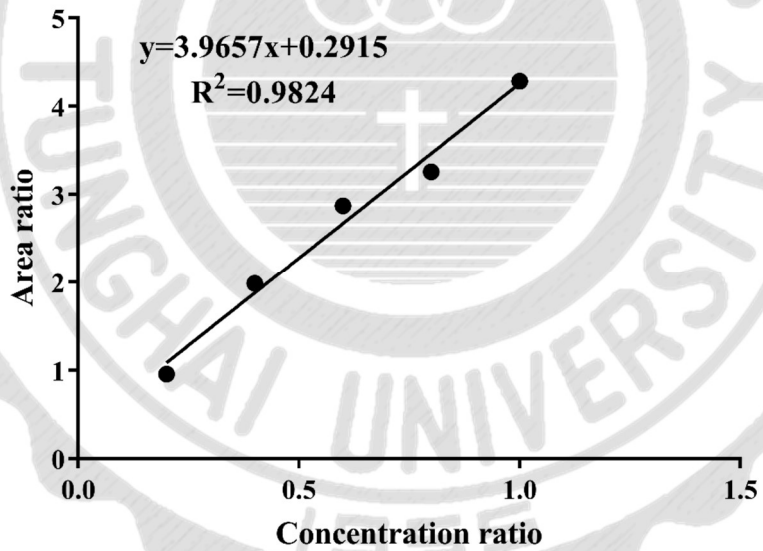
Appendix 2. Standard curve of quercetin.





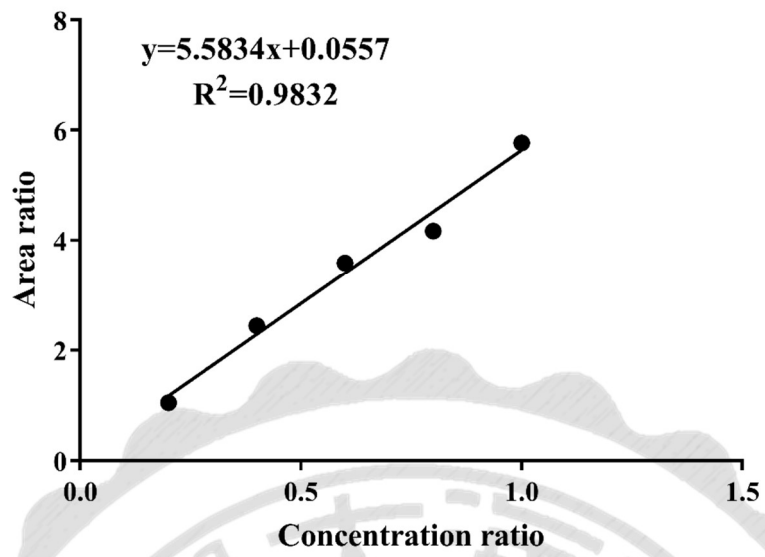
附錄三、單寧酸標準曲線

Appendix 3. Standard curve of tannin acid



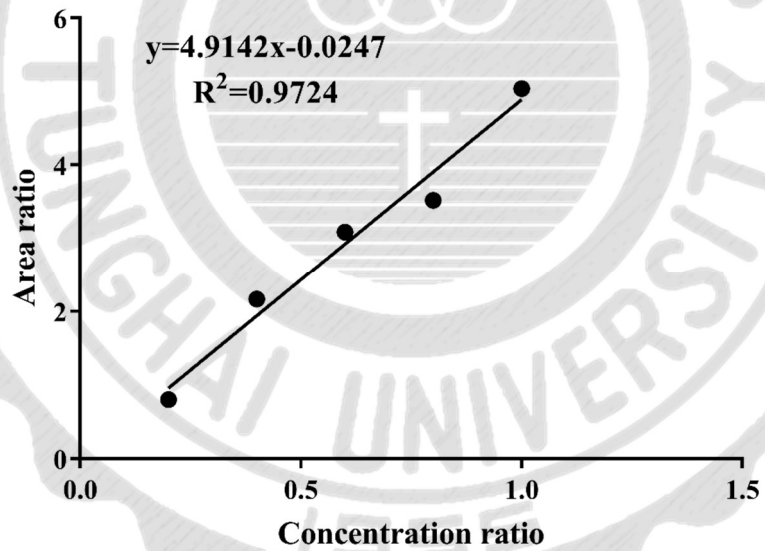
附錄四、 $\beta$ -glucogallin HPLC 標準曲線

Appendix 4. Standard curve of  $\beta$ -glucogallin for HPLC



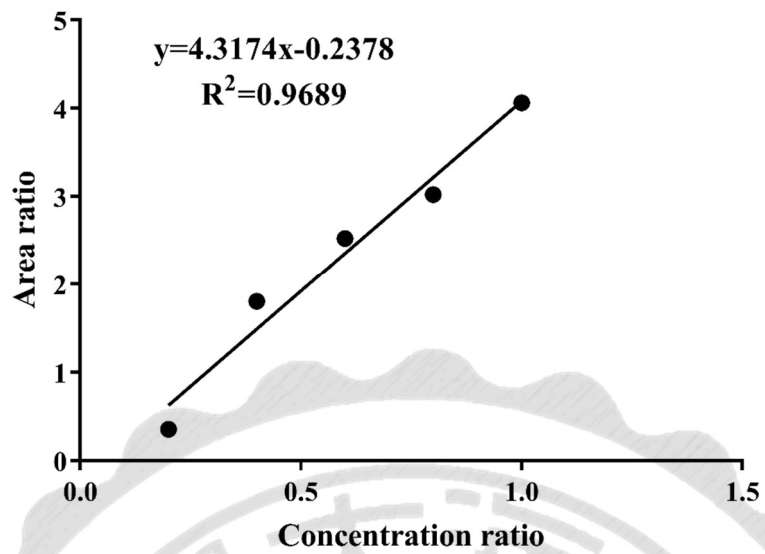
附錄五、沒食子酸 HPLC 標準曲線

Appendix 5. Standard curve of gallic acid for HPLC



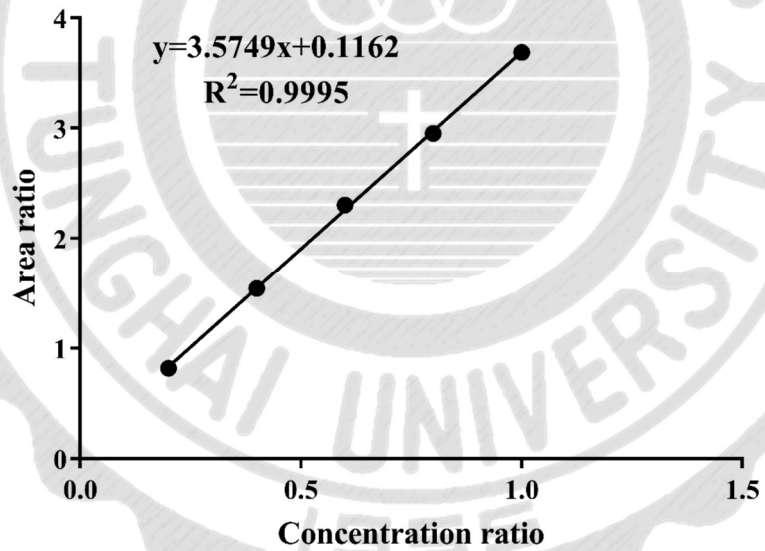
附錄六、柯里拉京 HPLC 標準曲線

Appendix 6. Standard curve of corilagin for HPLC



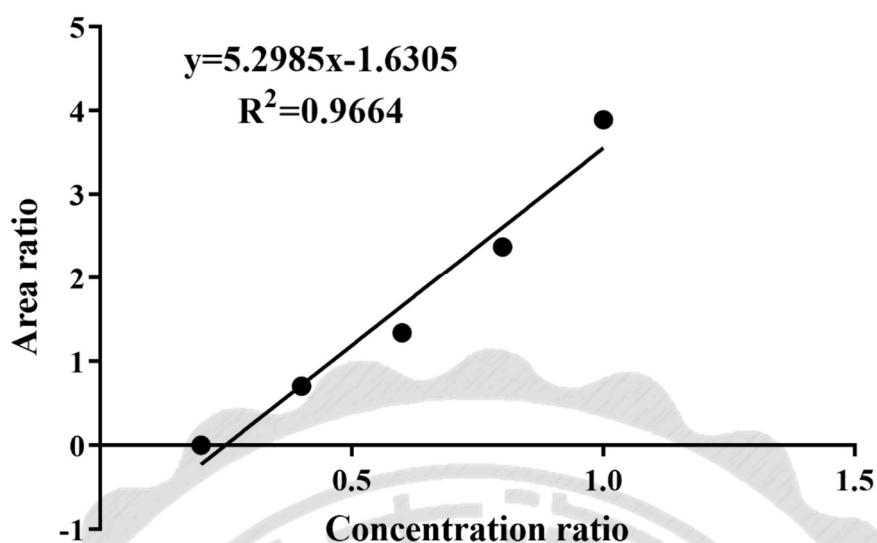
附錄七、Geraniin HPLC 標準曲線

Appendix 7. Standard curve of geraniin for HPLC



附錄八、鞣花酸 HPLC 標準曲線

Appendix 8. Standard curve of ellagic acid for HPLC



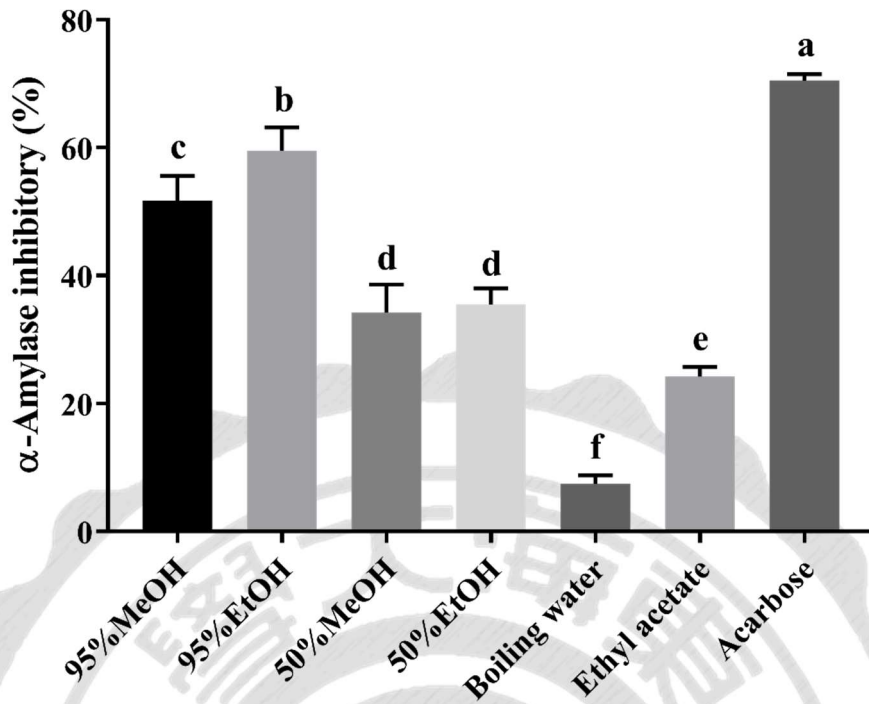
附錄九、Chebulinic acid HPLC 標準曲線

Appendix 9. Standard curve of chebulinic acid for HPLC

Solvents/standard	$\alpha$ -Amylase	$\alpha$ -Glucosidase
	inhibitory activity IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)	inhibitory activity IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)
95% MeOH	21.61 $\pm$ 1.01	0.35 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
95% EtOH	19.66 $\pm$ 0.89	0.33 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
50% MeOH	N.D.	0.24 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
50% EtOH	N.D.	0.29 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>
Water	N.D.	0.74 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>
Ethyl acetate	22.31 $\pm$ 1.81	0.79 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>
Acarbose	10.72 $\pm$ 0.62	278.23 $\pm$ 8.18

附錄十、不同溶劑萃取餘甘子對糖解酵素抑制活性的影響

Appendix 10. Effect of different solvent on glycolytic enzymes inhibitory activity. Data expressed as means of triplicate  $\pm$  SD. Means with different letters over a column were significantly different at  $p < 0.05$ .



附錄十一、不同溶劑萃取物 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 對  $\alpha$ -澱粉酶抑制活性的影響

Appendix 11. Effect of different solvent at 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  level on  $\alpha$ -amylase inhibitory activity.