

東海大學食品科學研究所
Graduate Institute of Food Science
Tunghai University

科技組碩士論文
Master Thesis of Technology Section

指導教授(Advisor)
蘇正德教授(Jeng-De Su, Professor)

馬鞭草正丁醇萃取物及純化物質之
抗氧化及醣解酵素抑制作用
**Antioxidant and glycosidase inhibitory
activity of *n*-butanol extract and isolated
components from *Verbena officinalis* L.**

研究生：洪欣怡 撰
Graduate Student: Hsin-Yi Hung

中華民國一百零一年七月
July, 2012

謝誌

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

文稿初成，承蒙 王進崑教授、蔡正宗教授、江文德教授及盧錫祺教授對學生論文詳加審閱及斧正，使論文更趨完整。感謝系上所有師長與助教於專業領域上的知識傳授，在此致上衷心之謝意。

在學期間，感謝學長姐柏村、善存、瑄閔、怡慧、佳華實驗技術的傳授與協助。感謝研究所同學及學姐們，希奇、芄萱、彥蘋、豐毓、鈺萍、瑋翔、昱仁、世浩、惠旻、慈樺、哲暉、鈺欣、書平的一路相挺，以及大學姐妹姿瑄、天天、恰恰、戴戴、小冬及姿綺的定時充電，有你們真好。感謝學弟妹建宏、昭伶、皓儀、昱翔、虹每、巧玲、昭蓁、依旻、敏純、凱琳給與生活上的幫忙及生活中的歡樂。特別感謝彥蘋在碩士班生涯的一路相伴，柏村學長在實驗上及精神上的一路陪伴及不斷支持，還有希奇學姐的這兩年多的支持，正因為有了你們才豐富了我在學生涯並賦予我多彩多姿的生活與回憶。

最後我要感謝最親愛的媽媽、爸爸、姐姐對我的支持，總是給我勇往直前的力量，你們是我一路向前走的動力。感謝神明的保佑，讓我順利完成碩士論文。將此論文獻給我最親愛的家人，願家人與我一起分享這份喜悅與榮耀。

洪欣怡 謹致於

東海大學食品科學研究所
食品分析暨食品化學實驗室
中華民國一百零一年七月

目錄

摘要	1
英文摘要	3
壹、前言	5
貳、文獻回顧	6
一、馬鞭草	6
(一)馬鞭草之介紹	6
(二)馬鞭草之傳統功效	7
(三)馬鞭草之生理活性	7
二、自由基與活性氧	12
(一)自由基與活性氧的種類	12
(二)自由基與活性氧的來源	13
(三)自由基與活性氧對生物體的影響	14
三、脂質氧化作用	16
四、抗氧化劑與抗氧化劑作用機制	20
五、天然抗氧化物質	23
六、人工合成抗氧化劑	36
七、自由基與糖尿病之關聯	39
八、糖尿病	39
九、糖尿病併發症	45
十、糖尿病之治療	46
十一、胰島素	50
(一)胰島素作用	50
(二)胰島素作用於細胞	52
(三)胰島素細胞層面之傳訊	52

(四)胰島素阻抗性-----	54
十二、高血糖與醣解酵素-----	54
(一) α -澱粉酶(α -amylase)-----	54
(二) α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase)-----	55
十三、醣解酵素抑制劑之作用-----	55
參、研究目的與實驗流程-----	57
一、研究目的-----	57
二、實驗流程-----	58
肆、材料與方法-----	59
一、實驗材料-----	59
二、實驗試劑與溶劑-----	59
(1)醣解酵素抑制試驗之試藥-----	59
(2)抗氧化試驗之試藥-----	60
(3)純化成分層析及光譜分析之溶劑-----	61
三、實驗儀器設備-----	61
四、實驗方法-----	63
(一)樣品萃取-----	63
(二)水分含量測定-----	65
(三)總酚含量測定-----	65
(四)總類黃酮含量測定-----	66
(五)DPPH 自由基清除能力試驗-----	66
(六)硫氰酸鐵法測定-----	67
(七)總抗氧化能力測定-----	68
(八) α -amylase 抑制作用測定-----	69
(九) α -glucosidase 抑制作用測定-----	70
(十)馬鞭草抗氧化及醣解酵素抑制成分之萃取、分離及純化-----	71

(十一)統計分析-----	75
伍、結果與討論-----	77
一、馬鞭草萃取物之產率-----	77
二、馬鞭草萃取物之總酚含量-----	77
三、馬鞭草萃取物之總類黃酮含量-----	79
四、馬鞭草萃取物之 DPPH 自由基清除能力-----	79
五、馬鞭草萃取物之醣解酵素抑制活性-----	79
六、馬鞭草正丁醇萃取物抗氧化及醣解酵素抑制活性成分之分離純-----	82
1.馬鞭草正丁醇萃取物 XAD-7 液相管柱層析-----	82
2.馬鞭草正丁醇萃取物區分(C+D)之的一次 Comosil 75 C ₁₈ -OPN 液相管柱層析-----	86
3.馬鞭草正丁醇萃取物區分(I+II)之的二次 Comosil 75 C ₁₈ -OPN 液相管柱層析-----	90
4.馬鞭草正丁醇萃取物區分 a 之 HPLC 分析及製備-----	94
5.馬鞭草正丁醇萃取物區分 a-1、a-3、a-5 及 a-6 之 HPLC 分析及製備-----	97
6.馬鞭草正丁醇萃取物純化物質之結構鑑定-----	101
7.馬鞭草正丁醇萃取物純化物質之抗氧化及醣解酵素抑制作用-----	122
陸、結論 -----	125
柒、參考文獻 -----	127
捌、附表-----	138

圖目錄

圖 2-1、馬鞭草(<i>Verbena officinalis</i> L.)之圖片。	6
圖 2-2、氧分子之氧化還原及激發狀態 (遠藤和淺田, 1992)。	14
圖 2-3、脂質自氧化連鎖反應 (Nawar, 1985)。	18
圖 2-4、油脂自氧化的反應階段。	18
圖 2-5、不飽和脂肪酸自氧化反應中最初氫過氧化物的形成。	19
圖 2-6、自由基清除劑之抗氧化作用機制。	21
圖 2-7、不同型態抗壞血酸與自由基之反應。	24
圖 2-8、類黃酮之基本結構圖。	28
圖 2-9、常用之人工合成抗氧化劑。	38
圖 2-10、口服抗高糖藥物之作用位置。	48
圖 2-11、胰島素之代謝調控。	51
圖 2-12、胰島素之傳訊路徑。	53
圖 2-13、Acarbose 之結構。	56
圖 2-14、Miglitol 之結構。	56
圖 3-1、實驗流程圖。	58
圖 4-1、馬鞭草各種溶劑萃取物之製備。	64
圖 4-2、DPPH 自由基清除作用之反應式。	67
圖 4-3、葡萄糖之呈色反應。	70
圖 4-4、馬鞭草正丁醇萃取物抗氧化及醣解酵素抑制成分之純化流程圖。	76
圖 5-1、馬鞭草各種萃取物之 DPPH 自由基清除能力。	80
圖 5-2、馬鞭草不同溶劑萃取物對 α -amylase之抑制率。	80
圖 5-3、馬鞭草不同溶劑萃取物對 α -glucosidase之抑制率。	81
圖 5-4、馬鞭草正丁醇萃取物之XAD-7液相管柱層析圖。	83
圖 5-5、馬鞭草正丁醇萃取物經XAD-7 膠體液相管柱層析各沖提區分之	

抗氧化性。-----	84
圖 5-6、馬鞭草正丁醇萃取物經 XAD-7 膠體液相管柱層析各沖提區分之 DPPH 自由基清除能力。-----	84
圖 5-7、馬鞭草正丁醇萃取物經 XAD-7 液相管柱層析區分物之 α -amylase 及 α -glucosidase 抑制活性。-----	85
圖 5-8、馬鞭草正丁醇萃取物區分(C+D)之 Cosmosil 75 C ₁₈ -OPN 液相管柱層析圖。-----	87
圖 5-9、馬鞭草正丁醇萃取物區分(C+D)經 Cosmosil 75 C ₁₈ -OPN 液相管柱層析後各沖提區分之總抗氧化力。-----	88
圖 5-10、馬鞭草正丁醇萃取物區分(C+D)經第一次 Cosmosil 75 C ₁₈ -OPN 液相管柱層析後各沖提區分之 α -amylase 及 α -glucosidase 抑制性。-----	89
圖 5-11、馬鞭草正丁醇萃取物區分(I + II)經第二次 Cosmosil 75 C ₁₈ -OPN 液相層析管柱層析圖。-----	91
圖 5-12、馬鞭草正丁醇萃取物區分(I + II)經第二次 Cosmosil 75 C ₁₈ -OPN 液相管柱層析後各沖提區分之總抗氧化力。-----	92
圖 5-13、馬鞭草正丁純粹物區分(I + II)經第二次 Cosmosil 75C ₁₈ -OPN 液相管柱層析後各沖提區分之 α -amylase 及 α -glucosidase 抑制活性。-----	93
圖 5-14、馬鞭草正丁醇萃取物區分 a 之分析型 HPLC 圖。-----	95
圖 5-15、馬鞭草正丁醇萃取物區分 a 經 HPLC 層析後各沖提區分之總抗氧化力。-----	95
圖 5-16、馬鞭草正丁醇萃取物區分 a 經 HPLC 層析後各沖提區分之 α -amylase 及 α -glucosidase 抑制活性。-----	96
圖 5-17、馬鞭草正丁醇萃取物區分a-1 之分析型HPLC 圖。-----	98
圖 5-18、馬鞭草正丁醇萃取物區分a-3 之分析型HPLC 圖。-----	98

圖 5-19、馬鞭草正丁醇萃取物區分a-5 之分析型HPLC 圖。	-----98
圖 5-20、馬鞭草正丁醇萃取物區分a-6 之分析型HPLC 圖。	-----99
圖 5-21、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質 1 之分析型HPLC 圖。	--99
圖 5-22、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質 2 之分析型HPLC 圖。	-----99
圖 5-23、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質 3 之分析型HPLC 圖。	---100
圖 5-24、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質 4 之分析型HPLC 圖。	-100
圖 5-25、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質 5 之分析型HPLC 圖。	---100
圖 5-26、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質2之紫外—可見光光譜。	-103
圖 5-27、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質 2 之 ^1H 核磁共振光譜圖。	-104
圖 5-28、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質2之 ^{13}C -核磁共振光譜圖。	--105
圖 5-29、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質1之紫外—可見光光譜。	---107
圖 5-30、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質 1 之 ^1H -核磁共振光譜圖。	-108
圖 5-31、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質 1 之 ^{13}C -核磁共振光譜圖。	----109
圖 5-32、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質 3 之紫外—可見光光譜。	--111
圖 5-33、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質 3 之 ^1H -核磁共振光譜圖。	-112
圖 5-34、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質 3 之 ^{13}C -核磁共振光譜圖。	-113
圖 5-35、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質4之紫外—可見光光譜。	---115
圖 5-36、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質 4 之 ^1H -核磁共振光譜圖。	-116
圖 5-37、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質 4 之 ^{13}C -核磁共振光譜圖。	-----117
圖 5-38、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質5之紫外—可見光光譜圖。	----119
圖 5-39、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質 5 之 ^1H -核磁共振光譜圖。	---120
圖 5-40、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質 5 之 ^{13}C -核磁共振光譜圖。	-----121
圖 5-41、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質之總抗氧化力。	-----123
圖 5-42、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質之 α -amylase及 α -glucosidase 之抑制活性。	-----124

表目錄

表 2-1、活性氧族群-----	13
表 2-2、各種自由基的形成及其介入的各種疾病-----	15
表 2-3、類黃酮之抗氧化性-----	29
表 2-4、植物來源之抗氧化物質-----	32
表 2-5、妊娠性糖尿病篩檢-----	44
表 2-6、口服降血糖藥物-----	49
表 5-1、馬鞭草四種溶劑之萃取物產率-----	78
表 5-2、馬鞭草各種溶劑萃取物之總多酚、總類黃酮含量-----	78
表 5-3、馬鞭草正丁醇萃取物經 XAD-7 液相層析後各沖提區分之產率 -----	83
表 5-4、馬鞭草正丁醇萃取物區分(C+D)經第一次 Cosmosil 75 C ₁₈ -OPN 液 相層析後各沖提區分之產率-----	87
表 5-5、馬鞭草正丁醇萃取物區分(I + II)經第二次 Cosmosil 75 C ₁₈ -OPN 液相層析後各沖提區分之產率-----	91
表 5-6、純化物質1及2之 ¹ H及 ¹³ C-NMR 化學位移 (ppm, CD ₃ OD) -----	101
表 5-7、馬鞭草正丁醇萃取物五種純化物質之產率-----	123

附目錄

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

摘要

糖尿病(diabetes mellitus)與胰島素分泌不足或作用缺失相關。高血糖使體內產生過多活性氧，造成氧化壓力上升及相關併發症發生，抗氧化物質對於活性氧所引發疾病之調控中扮演重要角色。而醣解酵素不但參與人體消化作用，也影響許多代謝疾病如糖尿病的產生，醣解酵素中以 α -澱粉酶(α -amylase)及 α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase)最為重要。中藥材馬鞭草科(Verbenaceae)植物馬鞭草(*Verbena officinalis* L.)，文獻證實具有抗氧化、抗發炎、保護神經、止痛、抗真菌等生理功能，但對於血糖調控之研究卻相當少，因此本研究探討馬鞭草之抗氧化性並評估其對醣解酵素之抑制作用，期望馬鞭草具醣解酵素抑制作用進而對糖尿病具改善功效。馬鞭草乾燥全草先以甲醇萃取，再依序利用水與正己烷、乙酸乙酯及正丁醇等溶劑進行液液萃取，並以抗氧化及醣解酵素抑制活性為篩選平台，進行活性成分之分離、純化及結構鑑定。結果得知馬鞭草正丁醇萃取物的抗氧化及醣解酵素抑制作用較佳，此萃取物利用層析膠體(Amberlite XAD-7 及 Cosmosil 75 C18-OPN)進行區分，再以 HPLC 純化出 5 種具抗氧化及醣解酵素抑制活性之純化物質，並利用 MS、UV 及 ^1H 、 ^{13}C -NMR 鑑定結構。目前已鑑定出 5 種苯乙醇苷類化合物(phenyl ethanoid glycosides)，分別為 isoverbascoside (1)、verbascoside (2)、eukovoside (3)、eukovoside

isomer (4) 及 β -hydroxyverbascoside (5)。TEAC 法檢測的抗氧化性以 isoverbascoside (1) 最佳，醣解酵素抑制活性上，以 isoverbascoside (1) 和 verbascoside (2) 最佳，對 α -amylase 抑制率為 53.71 及 55.37%，對 α -glucosidase 抑制率為 59.90 及 48.40%。

Abstract

Diabetes is associated with deficiencies in insulin secretion or action. Excess reactive oxygen species are built up with chronic hyperglycemia, and are subsequently contributing to oxidative stress and complications. Antioxidants have important roles in disorders involving oxidative stress. Glycosidases are not only involved in human digestion, but also affect the generation of many metabolic diseases such as diabetes, the most important glycosidases are α -amylase and α -glucosidase. *Verbena officinalis* L., an herbaceous plant of Verbenaceae family, has long been used in traditional Chinese medicine. Previous studies have demonstrated that *V. officinalis* L. have antioxidant, anti-inflammatory, neuroprotective, analgesic and antibacterial activities. However, possible roles of *V. officinalis* L. in hypoglycemic regulation have not yet been explored. In the present study, antioxidative and glycosidase inhibitory components of *V. officinalis* L. were identified, and their hypoglycemic activities were then investigated.

V. officinalis L. was extracted with methanol, and the methanol extracts were extracted by water with *n*-hexane, ethyl acetate and *n*-butanol successively. These extracts were analysed for potential health promoting properties including their inhibitory effect on starch digestive enzymes and antioxidant activities. *n*-butanol extract of *V. officinalis* L. showed strong antioxidant and inhibitory properties against both α -amylase and α -glucosidase. The extract was further separated successively by Amberlite XAD-7, Comosil 75C₁₈-OPN and reversed HPLC chromatographies to obtain five components. The isolated components

were identified five phenylethanoid glycosides as isoverbascoside (**1**), verbascoside (**2**), eukovoside (**3**), eukovoside isomer (**4**) and β -hydroxyverbascoside (**5**) by MS, UV and ^1H , ^{13}C -NMR analyses. Among the five isolated components, isoverbascoside (**1**) showed the strongest antioxidant activity by trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC). And the isolated components isoverbascoside (**1**), verbascoside (**2**) gave the highest inhibition rates against α -amylase, which were 53.71 and 55.37 % respectively. The isolated component isoverbascoside (**1**) and verbascoside (**2**) were most efficient in inhibiting α -glucosidase, with inhibition rates of 59.90 and 48.40 %.

壹、前言

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 長久以來為台灣地區十大死因之一，根據100年衛生署統計資料顯示，糖尿病在國人十大死因排名已由99年之第五位上升至第四位(行政院衛生署，2012)，病患的年齡層也有慢慢年輕化的趨勢，由於無法治癒，新的患者持續發生，導致發病率持續累積並增加。糖尿病是一種因長期血糖過高的慢性疾病，其中以第二型糖尿病為主要糖尿病型態，約佔罹患率的95%左右，此類型之患者體內無法分泌足夠的胰島素或對胰島素產生阻抗性而無法充分代謝血液中的葡萄糖(Takeshi et al., 2002)。

糖尿病患者除會因高血糖而增加蛋白質糖化作用(glycation)形成醣化蛋白誘發自由基產生外，另一方面過多的葡萄糖也會因自氧化產生自由基(Dickinson et al., 2002)，過多自由基除了會直接破壞細胞組織，導致血管硬化，引發心臟疾病外，亦會促使細胞加速老化或死亡、免疫系統失調、癌症、糖尿病、白內障、老年失智、巴金森氏症、關節炎及皮膚鬆弛老化等 (顏等，2007)。而控制此病情的首要之務就是適當控制血糖含量，使血糖調節到一定的濃度，降低胰島素阻抗性，以預防各種嚴重併發症的發生。血糖調節主要有三大方法：(1) 膳食療法、(2) 運動療法、(3) 藥物療法，其中以膳食療法最為重要。此外，在進行藥物療法的同時，也需要膳食療法適當的配合，否則藥物療法也將無法發揮其功能，因此，尋求具調節血糖功效之保健食材已成為一項重要的課題。

台灣普遍使用的民間藥草馬鞭草(*Verbena officinalis* L.) 為馬鞭草科馬鞭草屬之植物，又稱鐵馬鞭、瘡馬鞭、紫頂龍芽草等，已證實其具有抗氧化、抗發炎、保護神經、止痛、抗真菌等生理功能，但文獻上對於血糖調控之相關研究卻相當少見，因此本研究探討馬鞭草之抗氧化性及評估其對血糖調控之能力，並期望從馬鞭草中純化出具抗氧化及調節血糖之活性成分，研發出具相關保健機能之保健食品。

貳、文獻回顧

一、馬鞭草

(一)馬鞭草之介紹



圖 2-1、馬鞭草(*Verbena officinalis* L.)。

Fig. 2-1 *Verbena officinalis* L.

馬鞭草(圖 2-1)為馬鞭草科植物馬鞭草的全草或帶根全草，別名龍牙草、馬鞭梢、鐵馬鞭、白馬鞭、瘡馬鞭、鐵釣竿、風頸草、鶴膝風、紫頂龍芽，主產中國湖北、江蘇、廣西、貴州。全草含馬鞭草苷(verbenalin，即 cornin 山茱萸苷)、鞣質、揮發油。根和莖中含水蘇糖(stachyose)。葉中含腺苷(adenosine)和 β -胡蘿蔔素。另發現該植物含強心苷。根莖圓柱型，長 1~2 厘米，表面土黃色，周圍著生多數的根及鬚根，莖四棱型，灰綠色或黃綠色，具稀疏的毛；質硬、易折斷，斷面纖維狀，中央有白色的髓，或已成空洞。葉片灰綠色或棕黃色，質脆，多皺縮破碎，具毛，頂端具花穗，可見黃棕色的花瓣；有時已成果穗，果食宿存灰綠色的萼片，萼片脫落後，則可見灰黃色的 4 個

小堅果。氣微，味微苦。以乾燥、色青綠、帶花穗、無根者為佳(中國醫藥大辭典，2003)。

(二)馬鞭草之傳統功效

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

(三)馬鞭草之生理活性

1. 抗發炎、鎮痛作用

馬鞭草乙醇及水萃取物對脂多糖類lipopolysaccharide (LPS) 誘導小鼠巨噬細胞株J774A.1 及初代腹腔細胞兩種細胞生成促發炎細胞激素TNF- α 、IL-6 及IL-1 β 具抑制效果(梁等，2004)。以12-*O*-tetradecanoylphorbol acetate (TPA) 誘發小鼠耳朵發炎反應試驗證實馬鞭草50%甲醇及氯仿萃取物具有抗發炎作用(Fernández, 1981; Calvo et al., 1998)。馬鞭草之水萃取物、醇類萃取物對於鹿角菜膠(carrageenin) 所誘導老鼠足部浮腫有明顯的抑制作用，且經福馬林誘發舔足之疼痛實驗顯示具抑制效果，具鎮痛抗炎作用(Calvo et al., 2006)。馬鞭草的石油醚、氯仿、甲醇萃取物別用於鹿角菜膠足腫脹

模型(carrageenan paw oedema model)，結果顯示三種提取物均有抗炎活性，其中氯仿萃取物的活性最強(Deepak et al., 2000)。

2. 抗菌作用

針對金黃色葡萄球菌及痢疾桿菌兩種菌有明顯抑菌作用(Hernández et al., 2000)。從 50% 甲醇萃取物中分離出的 caffeoyl derivatives 對 *Penicillium expansum* 及 *Rhizopus stolonifer* 兩種真菌之生長具有抑制作用，其抑制率分別為 87.45% 及 79.11% (Calvo et al., 2008)。馬鞭草中的總類黃酮對革蘭氏陽性和革蘭氏陰性微生物都有抑制作用；並能刺激小鼠網狀內皮組織的噬菌作用，當給小鼠腹腔注射(i.p.) 50 mg/kg 體重(致死劑量)的大腸桿菌(*Escherichia coli*)時，餵飼馬鞭草萃取物能產生保護小鼠的作用(Hernández et al., 2000)。

3. 保護神經作用

由細胞試驗得知，馬鞭草萃取物具有保護神經的特性，可以預防神經細胞老化(Lai et al., 2006)。馬鞭草中含保護神經物質，可顯著增加神經生長因數(NGF)介導的軸突細胞的比率(湯等，2004)。且具有微弱的增強神經生長因數介導的軸突生長的作用(蕭等，2004)。

4. 抗氧化作用

自馬鞭草 50% 甲醇物萃取物中分離出三種 flavonoids 及兩種 caffeoyl derivatives，測其 DPPH 自由基清除力，皆顯示強抗氧化力

(Calvo, 2008)。管餵四氯化碳(CCl_4) 誘發慢性肝損傷之大鼠會造成肝臟之脂質過氧化物丙二醛(malonaldehyde, MDA)顯著上升，餵食高劑量馬鞭草水萃物組與負控制組比較則能顯著降低MDA之生成，顯著提升肝臟中glutathione peroxidase (GPx)、catalase (CAT)及superoxide dismutase (SOD)等抗氧化酵素之活性(陳，2009)。苯乙醇苷類化合物(phenylpropanoids)為馬鞭草中主要物質，以總抗氧化力(TEAC)、ferric-reducing ability (FRAP value)、superoxide dismutase (SOD) activity、抑制MDA 的生成及oxygen radical absorbance capacity (ORAC)測試後發現馬鞭草萃取物具強抗氧化力，經LC -MS 鑑定出主要成分為verbascoside，推測成分為馬鞭草之主要抗氧化力來源(Micol et al., 2009)。馬鞭草之水萃及50%乙醇萃取物經清除DPPH自由基、ABTS及超氧陰離子三種體外試驗，皆具強抗氧化力(Calvo et al., 2010)。

5. 保肝作用

馬鞭草水萃物對管餵 CCl_4 誘發大鼠慢性肝損傷之體重變化方面， CCl_4 會造成大鼠體重上升速率減緩及肝相對重量之增加，與正常組比較具顯著性差異；餵食高劑量水萃物組 (1.0g/kg bw.) 與負控制組比較則能顯著提高體重之上升速率及減低肝之相對重量。在血清生化值之結果顯示，以 CCl_4 誘導慢性肝損傷之大鼠會致使血清 GOT

及 GPT 值顯著高於正常組。餵食高劑量水萃物組與負控制組比較則能顯著降低 GOT (glutamic oxaloacetic transaminase 麩胺基酸草醋酸轉氨基酶) 及 GPT (glutamic pyruvic transaminase 麩胺基酸丙酮酸轉氨基酶) 血清生化值，可顯著降低肝臟之損傷程度以達到保護肝臟之效果(陳，2009)。

6. 促進睡眠作用

利用大鼠口服馬鞭草活性成分戟葉馬鞭草苷 (hastatoside) 及馬鞭草苷 (verbenalin) 後經過腦波分析，發現服用 hastatoside 及 verbenalin 後大鼠增加了非快速眼動睡眠的總時間，在 9 小時的睡眠周期從 23.00 至 08.00 小時分別增加了 81% 及 42%。證實 hastatoside 及 verbenalin 兩者皆可能有益於治療失眠症狀，未來更需進一步研究這些有效物質在人類體內的生體可用率及安全性(Makino et al., 2009)。

7. 抑癌作用

馬鞭草中之具抗氧化物質苯乙醇苷類化合物 isoverbascoside 經細胞實驗證實，可抑制人類胃癌 MG_C80-3 細胞生長及造成 MG_C80-3 細胞株的分化，具抑癌作用(Chen RC.et al., 2002)。MG_C80-3 細胞經 20 μmol/L 天然抗氧化劑 isoverbascoside 處理後，細胞生長曲線與分裂指

數顯著下降，倍增時間延長，生長抑制率 57.8%。觀察結果表明 isoverbascoside 處理的細胞，核質比例下降，核形規則，核仁體積縮小，數量減少，核內染色質減少，粒體形態結構典型，細胞表面微絨毛減少等顯著變化。說明天然抗氧化劑 isoverbascoside 改變了 MG_C80-3 細胞的表型特徵，具有明顯的誘導分化作用(李等，1995)。

HL-60 細胞經 5 μ mol/L 劑量的 isoverbascoside 處理後，細胞生長顯著受抑，生長抑制率達到 34.5%，對 HL-60 細胞的誘導分化作用和細胞毒性有顯著效果(Wang T-J et al.,1999)。馬鞭草醇萃取物，分別作用於體外培養的人絨毛膜癌 JAR 細胞、人肝癌 SMMC 7721 細胞及人肺胚二倍體成纖維細胞(2BS)。MTT 法及螢光法檢測結果表明，馬鞭草醇萃取物對 JAR 細胞增殖有明顯抑制作用且具有特異性，對 JAR 細胞質中表皮生長因子受體的表達也有明顯抑制作用(徐等，2000)。

馬鞭草中有效成分 4'-methylether-scutellarein (4-MS)對人絨毛膜癌 JAR 細胞的增殖抑制作用及其相關機制，結果顯示不同品質濃度的 4-MS 對 JAR 細胞均有增殖抑制作用，並隨藥物濃度和作用時間的增加而不斷增強(馮等，2008)。研究馬鞭草醇萃取物聯合紫杉醇(PTX)在體外和體內的抗腫瘤效果，體外和體內試驗證實馬鞭草醇萃取物在小劑量時能夠顯著增加 PTX 的抗腫瘤活性，表明馬鞭草水萃取物和醇萃取物均可明顯抑制小鼠體內腫瘤的生長(徐等，2008)。

二、自由基 (free radicals) 與活性氧 (reactive oxygen species ; ROS)

(一) 自由基與活性氧的種類

自由基指含有一個或多個不成對電子而獨立存在之原子或分子 (Halliwell, 1994)，可依其未成對電子所在位置而區分成以碳、氧、氮或硫為中心之自由基 (Simic, 1988)。自由基具高能量，極易與附近的分子發生反應，掠奪其電子，自身成為穩定的配對狀態並釋放出能量，被掠奪電子分子會產生新的不穩定自由基，進而引起連鎖反應。

活性氧分子是指反應性較三旋態氧分子 ($^3\text{O}_2$) 強的含氧分子。廣義活性氧泛指含氧的高反應分子 (Niki, 1992)，許多活性氧亦屬於自由基(表 2-1)。狹義活性氧指需氧生物體，在生物體內代謝過程中產生的超氧自由基 (superoxyl radical ; $\text{O}_2^- \cdot$)、過氧化氫 (hydroperoxide ; H_2O_2)、氫氧自由基 (hydroxyl radical ; $\text{HO} \cdot$) 及由光或激發態光增感劑 (photosensitizer) 如葉綠素作用產生之單旋態氧分子 (singlet oxygen ; $^1\text{O}_2$)。如圖 2-2 所示，正常代謝過程，兩個氧原子共可接收四個電子，並和質子結合形成兩分子的水。若一個氧分子僅接收一個電子，則形成超氧陰離子；接收兩個電子和質子，則形成過氧化氫；接收三個電子則形成羥自由基 (遠藤和淺田，1992)。

(二) 自由基及活性氧的來源

生物體內自由基與活性氧之來源，可分為外在及內在兩方面。外在來源包括環境污染物、離子輻射及化學藥劑如農藥等所誘發體內產生的自由基；而細胞進行氧化作用所產生的自由基為主要內在來源。一般生物體進行的呼吸作用或某些藥物於體內的代謝過程皆會產生自由基。

表 2-1、活性氧族群

Table 2-1 Reactive oxygen species

Radicals		Nonradicals	
Hydroxyl	$\bullet\text{OH}$	Peroxynitrite	ONOO^-
Alkoxyl	$\text{L(R)O}\bullet$	Hypochlorite	$^- \text{OCl}$
Hydroperoxyl	$\text{HOO}\bullet$	Hydroperoxide	L(R)OOH
Peroxyl	$\text{L(R)OO}\bullet$	Singlet oxygen	$^1\Delta\text{O}_2$
Nitric oxide	$\bullet\text{NO}$	Hydrogen peroxide	H_2O_2
Superoxide	$\text{O}_2^- \bullet$		

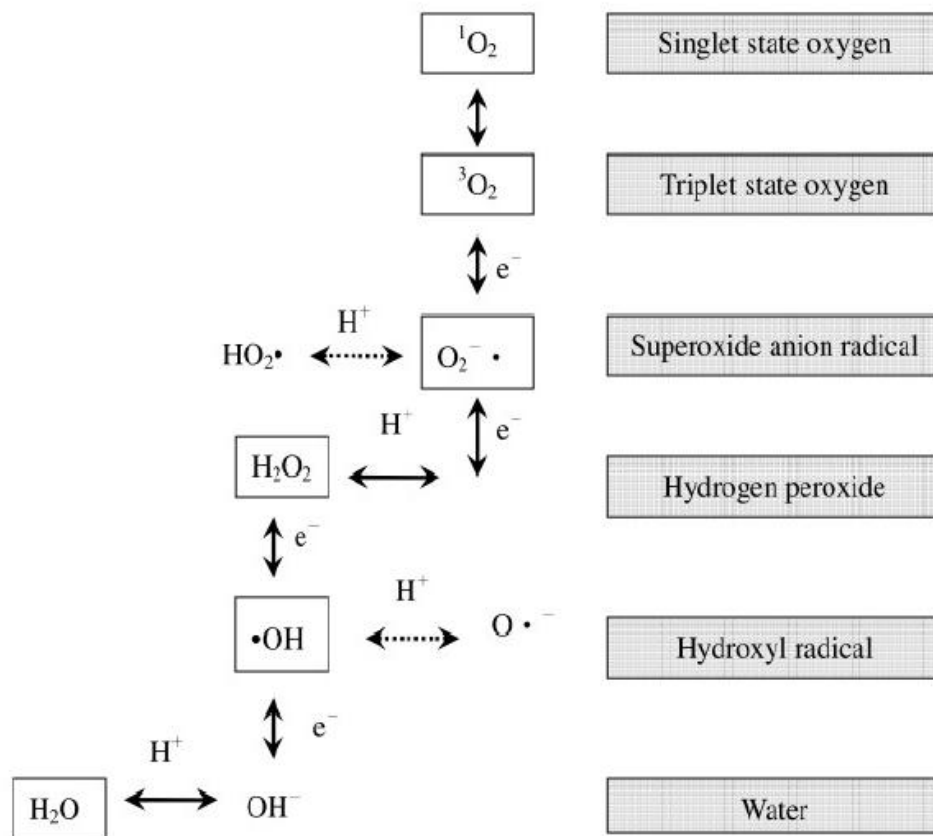


圖 2-2、氧分子之氧化還原及激發狀態（遠藤和淺田，1992）。

Fig 2-2 Oxygen and reactive oxygen species.

（三）自由基及活性氧對生物體的影響

有研究指出自由基及其間接誘發脂質反應產生之中間代謝物，會造成 DNA 及蛋白質損傷、細胞老化、突變癌化甚至死亡（Shigenaga et al., 1989；Rikans and Hornbrook. 1997；Moskovitz *et al.*, 2002）。當體內自由基或活性氧增加或抗氧化防禦能力降低時，容易使細胞組織甚至於器官造成傷害，包括誘發紅血球、腎臟、肺臟、皮膚及心血管

等疾病，並可能進一步引發癌症及體內其他系統疾病（表 2-2）

（Gutteridge, 1993；McCord, 2000；Moskovitz *et al.*, 2002）。

表 2-2、各種自由基的形成及其介入的各種疾病

Table 2-2 The sources of free radicals and involved disease of free radicals

Human disease	Source
阿茲海默症、關節炎、氣喘等	活化巨噬細胞，產生過量氧自由基、過氧化氫
巴金森氏症、酒精中毒等	藥物或病毒引發過量氧自由基
鐵中毒、大腸癌等	過渡金屬(銅、鐵)電子轉移產生氧自由基
呼吸窘迫症、休克、凍傷等	因應正常氧化作用或氧氣濃度變化而產生氧自由基
唐氏症、器官移植、高血壓、動脈粥狀硬化、紅斑性狼瘡等	受到免疫系統失調的影響產生過多或過少氧及一氧化氮自由基
肌萎縮性脊髓側索硬化症、肌肉萎縮症等	受到細胞結構變化產生多種自由基
腎炎、膀胱炎、白內障、皮膚癌等	輻射照射引發產生自由基
免疫系統失調、鎌形血球貧血等	基因缺陷帶來過多或過少自由基

（Gutteridge, 1993；McCord, 2000）

三、脂質氧化作用

油脂氧化時生成自由基(free radical)，與空氣中的氧氣結合後生成過氧化物(Peroxide)，因反應反覆進行，故稱為自氧化反應。自氧化反應主要是發生在不飽和脂肪酸，或不飽和脂肪酸的油脂因光線、酵素或助氧化成分存在，促使其與氧分子結合後，進行一連串反應而產生不良結果。油脂自氧化反應是一種自由基連鎖反應(free radical chain reaction)，整個反應可分為起始期(initiation stage)、連鎖生長期(propagation stage)與終止期(termination stage)三個階段，分述如下(圖 2-3)：

(一) 起始期(initiation stage)

藉由單旋態氧(singlet oxygen, $^1\text{O}_2$)、過渡金屬、光、熱、輻射照射或脂質氧化過程中所產生的脂質自由基($\text{R}\cdot$)與脂質自氧化自由基($\text{ROO}\cdot$)等高能量物質引發起始反應，這些活性氧或自由基會攻擊尚未氧化的多元不飽和脂肪酸(RH)，使多元不飽和脂肪酸的戊二烯雙鍵中間之甲烯基(α -methylene)脫落一個質子，形成活性極高的脂質自由基($\text{R}\cdot$)。圖 2-4 為不飽和脂質自氧化反應在各階段的變化。

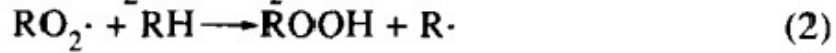
(二)連鎖增殖期(propagation stage)

此時期的主要反應為正常油脂因受到自由基的攻擊，產生更多的自由基。脂質自由基在連鎖反應的過程中與氧反應形成過氧化自由基($\text{ROO}\cdot$)，過氧化自由基再去攻擊其他不飽和脂肪酸，奪取其質子以產生新的脂質自由基與脂質氫過氧化物 (lipid hydroperoxides)，此步驟不斷進行直到系統內所有不飽和脂肪酸全部變成自由基為止。圖 2-5 表示脂質自由基的形成，及與環境中之氧反應形成的脂質過氧化物 (Gorkum and Bouwman, 2005)。氧化反應初期會先經過氧化誘導期(induction period)，先形成氫過氧化物，並在氫過氧化物形成累積量達最高峰後開始分解。

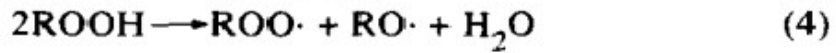
(三)終止期(termination stage)

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

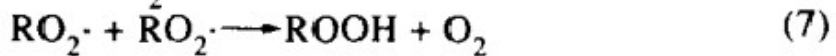
Propagation



Branching



Termination



Where R = Fatty Acid Radical

ROOH = Fatty Acid Hydroperoxide

RO₂· = Peroxy radical

RO· = Alkoxy radical

圖 2-3、脂質自氧化連鎖反應。(Nawar, 1985)

Fig 2-3 Autoxidation chain reaction of lipid.

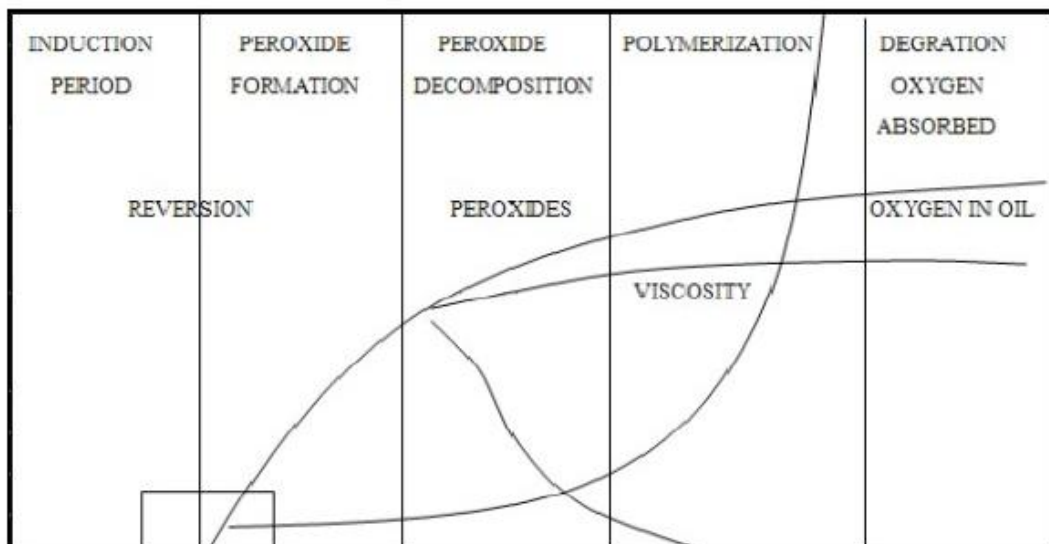
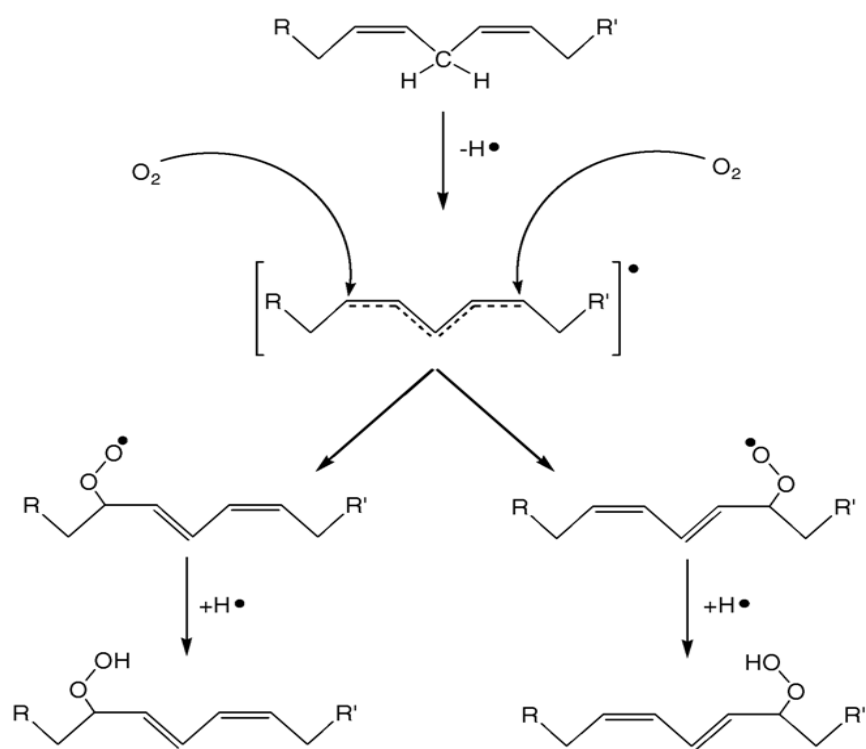


圖 2-4、油脂自氧化的反應階段。(Perkins, 1967)

Fig 2-4 The stages of lipid autoxidation.



(Gorkum and Bouwman, 2005)

圖 2-5、不飽和脂肪酸自氧化反應中最初氫過氧化物的形成。

Fig 2-5 Initial hydroperoxide formation in the autoxidation of the unsaturated fatty acid.

油脂氧化產生的自由基會與空氣中的氧結合形成過氧化物，會間接或直接破壞細胞組織，促使細胞加速衰亡、老化，而造成免疫系統失調、糖尿病、巴金森氏症、癌症、關節炎、白內障及皮膚鬆弛老化等疾病。近年來台灣地區十大死亡原因統計結果，排行榜中的惡性腫瘤、心臟疾病、糖尿病、腦血管疾病、肝臟疾病等皆與自由基相關（顏，2007）。

四、抗氧化劑與抗氧化劑作用機制

抗氧化劑廣泛定義為對於低濃度下具有抑制或延緩基質氧化（oxidizable substrate）的物質即稱之為抗氧化劑（Aruoma, 1999），氧化基質包括食品中或生物體內的分子，如脂質、蛋白質、醣類及DNA等。抗氧化劑能延緩或阻止食品氧化變質，以穩定食品的品質並延長儲存期限，在食品工業上扮演重要的角色。

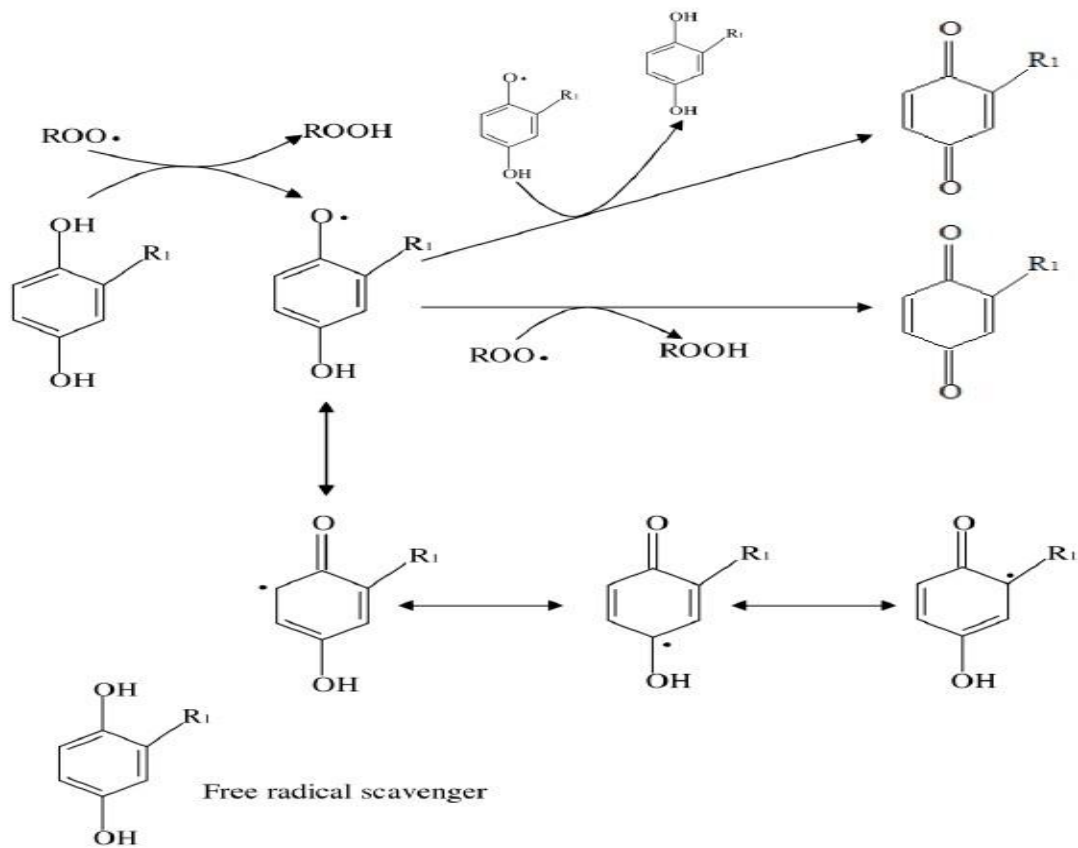
（一）抗氧化劑的作用機制

不同種類抗氧化劑展現不同抗氧化特性，大致分為下列四種：

1. 自由基清除劑（free radical scavenger）

此類抗氧化劑多為酚類化合物，酚類化合物易釋出氫氧基上的質子，提供一個電子或一個質子與自由基作用，而自身的苯環結構上的不成對電子會轉移而形成穩定的共振結構（resonating structure）。圖2-6表示酚型化合物清除脂質自由基之作用機制。

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



(Sherwin, 1978)

圖2-6、自由基清除劑之抗氧化作用機制。

Fig. 2-6 Mechanism of antioxidation for free radical scavenger.

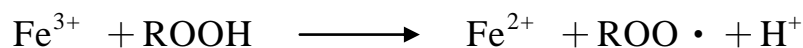
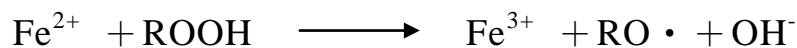
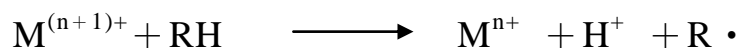
2. 單旋態氧之消光劑 (singlet oxygen quencher)

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

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

3. 金屬螯合劑 (metal chelator)

過渡金屬離子具有催化脂質形成自由基，促進脂質氧化的能力：



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

4.相乘劑 (synergist)

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

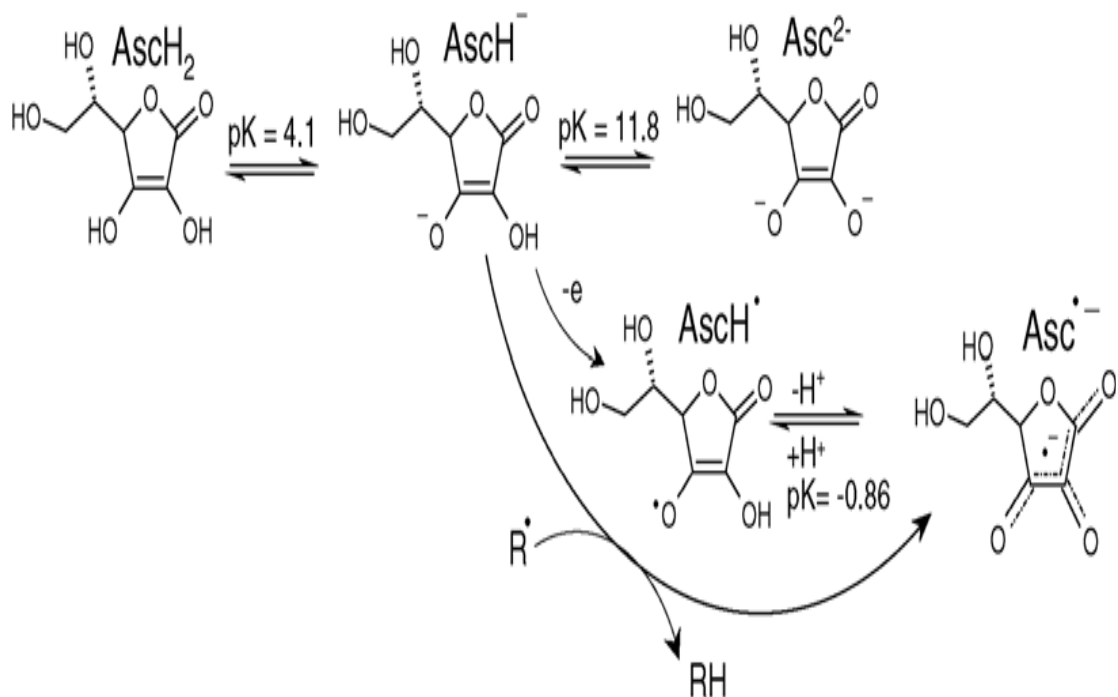
五、天然抗氧化物質

近年來許多研究證實在天然植物中含有多種不同型式的抗氧化物質如表六，包括穀類、豆類、蔬果類、香辛料、植物根部、葉子、及中草藥都含有抗氧化的成分。一般提供抗氧化能力的化合物可分為下列數種：生育醇 (tocopherols)、抗壞血酸 (L-ascorbic acid)、類黃酮 (flavonoids)、葉綠素衍生物 (chlorophyll derivatives)、類胡蘿蔔素 (carotenoids) 及酚類化合物 (phenolic compounds) 等 (Larson, 1988 ; Papas, 1999)。

(一)維生素 C (抗壞血酸，ascorbic acid)

抗壞血酸為一種水溶性物質，存在於體內水溶性部分如血漿與細胞間質內。其抗氧化機制在於其 C-2 和 C-3 上有兩個羥基 (hydroxyl group)，可提供質子來穩定自由基，本身轉變為半脫氫抗壞血酸 (semidehydroascorbic acid) (Beyer, 1994)。圖 2-7 表示不

同型態的抗壞血酸與自由基的反應。若在細胞內，可再經由麩胱甘肽或 NADPH 還原再生成具抗氧化活性的還原態(Jacob and Burri, 1996)。此外，抗壞血酸可還原生育醇恢復至抗氧化狀態，因此在細胞內可以此種相乘性的抗氧化作用預防膜和脂蛋白受到氧化性傷害(Aruoma, 1994；Beyer, 1994)。但若抗壞血酸在體內血漿中的濃度過高，或組織受傷後環境中有較高濃度金屬離子，抗壞血酸反而產生促氧化作用，進而導致活性氧分子如羧自由基的生成(Halliwell et al., 1995)。



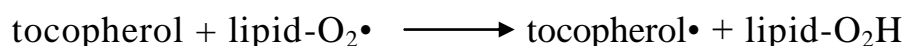
(Valko et al, 2006)

圖2-7、不同型態抗壞血酸與自由基之反應。

Fig 2-7 Various forms of ascorbic acid and its reaction with radicals (R•).

(二) 維生素E (生育醇, tocopherol)

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



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

(三) 類胡蘿蔔素(carotenoids)

Carotenoids 具有多重共軛雙鍵之長鏈多烯結構，可轉移消除單旋態氧的能量及捕捉過氧化自由基，以終止自由基連鎖反應。例如 β -胡蘿蔔素(β -carotene)因具有共軛雙烯(conjugated dienes)結構，可與過氧化自由基作用形成穩定的共振結構，來抑制脂質過氧化反應的發生

(Aruoma, 1999)。Carotenoids 的自由基清除能力視其結構而定，如結構上共軛雙鍵長度及 β -ionone 環上銜接之官能基種類，當共軛雙鍵數較多，則自由基清除能力便較強(Anguelova and Warthsen, 2000)，例如茄紅素 (lycopene) 含有 11 個共軛雙鍵，其中又以順式結構者具有較強的清除自由基及終止單旋態氧的能力。

(四) 麩胱甘肽(glutathione, GSH)

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

(五) 多酚類(polyphenols)

Polyphenols 為植物中廣泛存在的成分，已知種類至少超過 8000 種，其酚型構造上帶有數個羥基，此羥基與體內的抗氧化作用有關，

主要包括酚酸(phenolic acids)、類黃酮(flavonoids)及鞣質(tannins)等，
以下就幾種主要酚類化合物做介紹：

1. 類黃酮(flavonoids)

類黃酮是由三個環狀結構的 diphenyl propane($C_6-C_3-C_6$)型式所構成(圖 2-8)，屬於多酚類化合物(polyphenolic compounds)的一種，廣泛存在於植物組織中，尤其是葉、花、果實、種子等。依其結構差異性可分為黃酮(flavones)、黃酮醇(flavonols)、黃烷酮(flavanones)、黃烷醇(flavanols)、異黃酮(isoflavones)、黃烷酮醇(flavanonols)、花青素配質(anthocyanidins)及查酮(chalcones)等八大類(表 2-3)。

大多數類黃酮會與糖類形成配糖體以糖苷(glycosides)的形式存在，經過酸、鹼及熱水解後可產生配質(aglycones)和糖基，而 flavonoid glycosides 的抗氧化性比 flavonoid aglycone 來得弱，顯示糖化作用會影響類黃酮的化學、物理及生物特性(Rice-Evans et al., 1996；Scalbert and Williamson, 2000)。

類黃酮的抗氧化性與其結構有很大的關係：(1)若在 A 環上 5、7 位置有羥基，則能延長此類結構的共軛系統。(2)若在 B 環上 3、4 位置有鄰位雙羥基(ortho-dihydroxy)，則對過渡金屬離子(Cu^{2+} 、 Fe^{2+})有螯合作用，間接抑制脂質過氧化反應的發生。(3)若在 C 環上的 2、3 位置有雙鍵與 4 位置上有酮基，則會與 B 環

形成共軛結構。(4)若在 A、C 環上 2、5 位置有羥基與 C 環上 4 位置有酮基，則會形成分子內氫鍵，具有清除自由基與螯合金屬離子的能力。

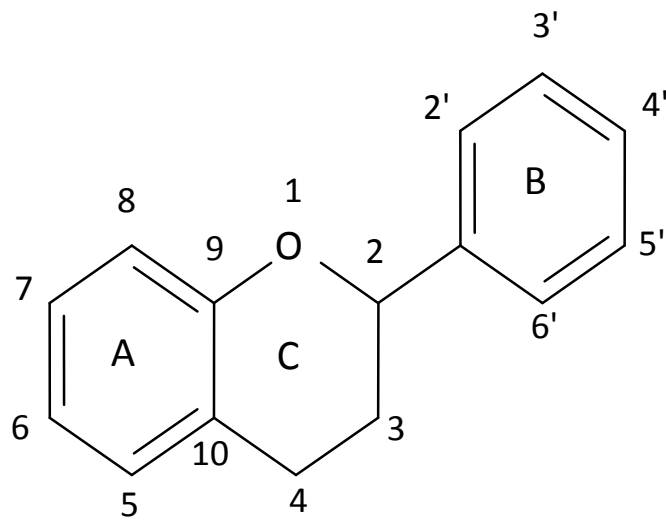


圖 2-8、類黃酮之基本結構圖。

Fig 2-8 Structure of flavonoid. (Cook and Samman, 1996)

表 2-3、類黃酮之抗氧化性

Table 2-3 The antioxidative activities of flavonoids

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

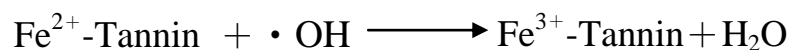
(Cook and Samman, 1996)

2. 酚酸(phenolic acids)

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

3. 鞣質(單寧，tannins)

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



此外，亦有研究指出 tannins 與其水解物如鞣酸 (tannic acid)、

沒食子酸 (gallic acid) 及鞣花酸 (ellagic acid) 等具有抗致突變性 (Huang et al., 1985 ; Horn and Vargas, 2003)。已有許多文獻研究初相當多抗氧化物質，表 2-4 為食品中天然抗氧化物之相關研究。

表 2-4、植物來源之抗氧化物質

Table 2-4 Source of antioxidative components in plant

來 源	抗氧化物質
1. 蔬菜	
蘋果渣	α -tocopherol (Lu and Foo, 1999)
青花菜	vanillic acid-4'-decenyl ester、1-methoxy-naphthalene-6,7-dihydrofuran、dilinoleic acid-1-methoxy-naphthalene-6,7-dihydroxymethyl ester (陳, 2001)
2. 茶葉	catechins and theaflavins (Hara and Kubota, 1984 ; Matsuzaki and Hara, 1985 ; Lee, 1988 ; 蘇等, 1991)
3. 樹臘及蜂蜜	
尤加利葉(eucalyptus leaves)的	<i>n</i> -tritriacontan-16,18-dione (Osawa and Namiki, 1985)
葉臘	α -tocopherol、ascorbic acid、catalase、flavonoids (Mckibben and Engeseth, 2002)
蜂蜜	
4. 大麥葉子	2''(3'')- <i>O</i> -glycosyl isovitexin (Osawa <i>et al.</i> , 1992)
5. 香辛料	
迷迭香(rosemary)乾燥葉正己烷	carosol、rosmanol、epirosmanol and
萃取物	isorosmamol (Inatani <i>et al.</i> , 1982 and 1983)
迷迭香乾燥葉的甲醇萃取物	rosmaridiphenol and rosmariquinone (Houlihan <i>et al.</i> , 1984 and 1985)
鬱金(<i>Plantago asiatica</i> L.)	curcumin (Toda <i>et al.</i> , 1985)protocatechuic acid、caffeic
披薩草(oregano)葉片	acid、2-caffeoyloxy-3[2-(4-hydroxybenzyl)-4,5-dihydroxyl]phenylpropionic acid、4-(3,4-dihydroxybenzoyloxymethyl)phenyl- β -D-glucopyranosine、rosmannic acid (Kikuzaki and Nakatani, 1987 and 1989)

來 源	抗氧化物質
辣椒(capsicum)	capsaicin dihydrocapsaicin 及其衍生物(中谷等, 1989)
肉豆蔻乙酸乙酯萃取物	eugenol、isoeugenol、diphenylpropanoid and 6-methoxy eugenol(劉, 1996)
百里香(<i>Thymus vulgaris</i> L.)	methylated flavonoids、eruoedicytol (Haraguchi <i>et al.</i> , 1996)
黑胡椒	ferulic acid amide (Rice-Evans <i>et al.</i> , 1997)
6.產廢棄物及庭園植物	
稻穀(rice hulls of <i>Oryza sativa</i> L.)	isovitexin (Ramarathnam <i>et al.</i> , 1988 and 1989)
花生殼(peanut hulls)	luteolin (Duh <i>et al.</i> , 1992)
翠玉茶梗	myricetin-3-glucoside、quercetin-3- <i>O</i> -(2-glucosyl-6-rhamnosyl-glucoside)(宋與蘇, 1994)
鳳凰花	2'-(3'',4'',5''-trihydroxyphenyl)-ethyl-margarate、isorhamnetin-3- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside、quercetin-3- <i>O</i> - β -D-xylopyranoside、quercetin (樊與蘇, 1996)
馬櫻丹花乙酸乙酯萃取物	2'-(3'',4'',5''-trihydroxyphenyl)ethyl-stearate (簡, 2000)
7.中藥	
羌活氣仿萃取物	phenethyl ferulate (孔, 1991)
補骨脂(<i>Psoralea corylifolia</i> L.)	bakuchiol (葉與蘇, 1993)
香薷(<i>Mosla formosana</i> Maxim)	luteolin-7- <i>O</i> -rutinoside (洪, 1994)
草果(fruits of <i>Amomum tsao-ko</i> L.)	caffeic acid、1-(4-hydroxy-5-methoxy-phenyl)ethanone、1,7-bis-4-hydroxyl-phenyl-3,5-dihydroxy(3R,5S)-heptane (吳, 1996)
茵陳蒿(<i>Artemisia capillaris</i> Thunb)	quercetin-3- <i>O</i> -D-robinoside、isorhamnetin
甲醇萃取物	-3- <i>O</i> -D-robinoside (張與蘇, 1996)

來 源	抗氧化物質
紅豆蔻(fruit hulls of <i>Alpinia galangal</i>) 甲醇萃取物	methyl paraben(4-hydroxybenzoic acid methyl ester)、4-(hydroxymethyl)-1,2-benzenediol、3,4-dihydrobenzaldehyde、 <i>trans</i> <i>p</i> -coumaric acid、 <i>trans</i> 3-(4-hydroxyphenyl)-2-propenal、3-(4-hydroxyphenyl)-propene (林, 1997)
高良薑(rhizoma of <i>Alpinia officinarum</i>) 乙酸乙酯萃取物	1,7-bis-diphenyl-3,5-diketo-2-heptene、1,7-bis-(4'-hydroxyl-3'-methoxy phenyl)-5-hydroxy-3-keto-heptane、1-(4'-hydroxy-3'-methoxy)-phenyl-7-phenyl-3-5-dihydroxy-heptane (吳, 1998)
沙苑子 (seeds of <i>Astragalus Semen</i>) 乙酸乙酯萃取物	3-5-dihydroxy-4'-methoxy-1,1-(1'2-ethylenediyl)bis[benzene]、6'-methoxy-7-methyl formononetin、 <i>p</i> -coumaroyl triterpenoidyl ester (簡, 2000)
細辛(<i>Asiasarum heterotropoides</i> var. <i>mandshuricum</i>) 乙酸乙酯萃取物	methyl paraben、 <i>trans p</i> -coumaric acid (蔡, 2001)
雷丸(nucleoids of <i>Polyporus mylittae</i>) 甲醇萃取物	7-4'-dihydroxy flavanone-7- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside、4-hydroxymethylbenzaldehyde、4-hydroxybenzaldehyde (洪, 2001)
廣藿香(<i>Pogostemon chablin</i> (Blanco) Benth) 甲醇萃取物	4-hydroxyethyl-catachol-1- <i>O</i> -(2'- α -L-rhamno pyranosyl)- β -D-glucopyranoside、Adenosine、 <i>O</i> -coumaroyl- β -D-glucopyranoside (柯, 2002)
白芍 (roots of <i>Paeonia lactiflora</i> Pall) 甲醇萃取物	pentagalloylglucose、methyl gallate、gallic acid、methyl vanillinate、benzoic acid、benzoylabiflorin、benzoylpaeoniflorin (廖, 2003)
常山 (<i>Dichroa febrifuga</i> Lour) 甲醇萃取物	4-hydroxy-3-methoxy-phenyl-2,3-dihydroxy-1-propanone、3-[[6- <i>O</i> -(6-deoxy- α -L-mannopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl]-oxy]-caffeic acid 3-[(β -D-glucopyranosyl)]

來 源	抗氧化物質
女貞子 (<i>Ligustrum lucidum</i> Ait) 甲醇萃取物	oxy]-4-hydroxy phenyl ethyl ester 、 3-[(β-D-glucopyranosyl)oxy]-caffeic acid 4-[(6-deoxyl-α-L-mannopyranosyl)oxy]- phenyl-ethyl ester 、umbelliferone 、trans ferulic acid 、3-(4-hydroxy-3-methoxy- phenyl)-2-propenal (林 , 2003)
篇蓄 (<i>Polygonum aviculare</i> L.) 乙酸乙酯萃取物	1-(4-hydroxy phenyl) ethyl acetate 、 4-hydroxy-3,5-methoxy-benzoic acid methyl ester 、 3-[4-hydroxy-3-methoxy phenyl]-2-propenyl-1-ol 、 trans-ferulic acid 、3-[4-hydroxy-3-methoxy phenyl]-2-propenal (陳 , 2003)
艾葉 (leaves of <i>Artemisia argyi</i>) 甲醇萃取物	apigenin 7,4'-O-β-D-diglucoopyranoside 、apigenin 、 quercetin-7,4'-O-β-D-diglucoopyranoside 、luteolin-7- O-β-D-glucoopyranoside (陳 , 2004) caffeyl-4-O-caffeic acid 、caffeyl acid 、caffeyl -4-O-ferulic acid 、ferulyl-4-O- ferulic acid (鄭 2004)

六、人工合成抗氧化劑

目前美國 FDA 核准使用的人工合成抗氧化劑有 BHT、BHA、沒食子酸丙酯(propyl gallate, PG)和 TBHQ 等，屬於自由基抑制劑類型的抗氧化劑，其作用機制及化學結構式如圖 2-9 所示(Sherwin, 1978；Hudson, 1990)。

(一) 丁基羥基甲氧苯(*t*-butyl hydroxyl anisole, BHA)

BHA 由 3-tertiary-butyl-*p*-4-hydroxyanisole 及 2-tertiary-butyl-*p*-4-hydroxyanisole 兩異構物混合而成，為白色結晶粉末(或微褐黃色結晶粉末)，易溶於油脂和乙醇，但幾乎不溶於水。耐高溫，油煎、高溫烘焙烹調皆不影響色澤、風味。同時配合冷藏則抗氧化效果加倍。與 BHT、TBHQ、PG 一起使用可產生相乘作用，使抗氧化效果更加強。添加量需低於總油脂含量之 0.02 % (高及李，1998)。

(二) 二丁基羥基甲苯(di,*t*-butyl hydroxyl toluene, BHT)

BHT 為白色結晶粉末，不溶於水，溶於乙醇、油脂。耐高溫，適用於油煎與高溫烘焙。可與 BHA、TBHQ 及 PG 一起使用。添加量需低於總油脂含量之 0.02 % (高及李，1998)。

(三) 第三丁基氫醌(tertiary-butyl hydroquinone, TBHQ)

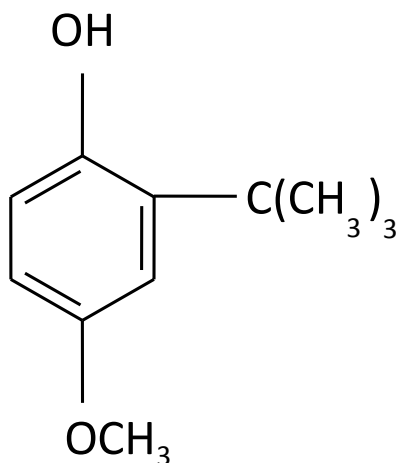
TBHQ 為白色結晶粉末，可溶於乙醇及乙醚，易溶於油脂，但不溶於水。TBHQ 可和檸檬酸鹽同時使用增加油脂穩定的效果，添加量

需低於總油脂含量之 0.02 % (郁，1999)。

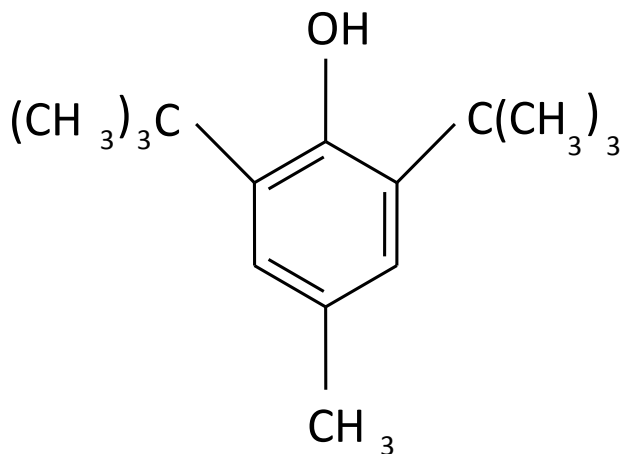
(四)沒食子酸丙酯(propyl gallate，PG)

PG 為白色結晶粉末，無臭但略有苦味，易溶於乙醇、丙酮及乙醚等，難溶於水。PG 易與銅、鐵離子反應呈紫色或暗綠色，影響添加食品之外觀，此現象可添加螯合劑如檸檬酸來克服。若和 BHA 及 BHT 同時混用將可增強其抗氧化功效。添加量需低於總油脂含量之 0.01% (高及李，1998)。

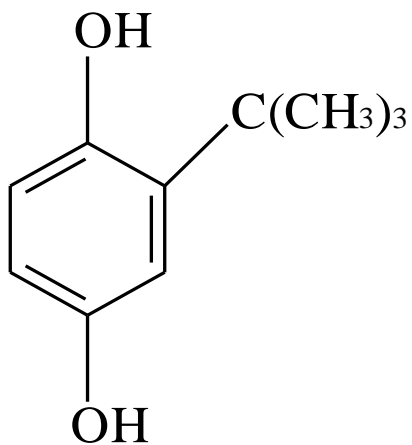
近幾年有研究顯示諸如 BHA、BHT 等人工合成抗氧化劑可能造成動物肝、腎傷害及致癌性(IARC, 1986a; IARC, 1986b; Schildermann et al., 1995)，建議還是以天然具抗氧化性的食物做為抗氧化劑來源。



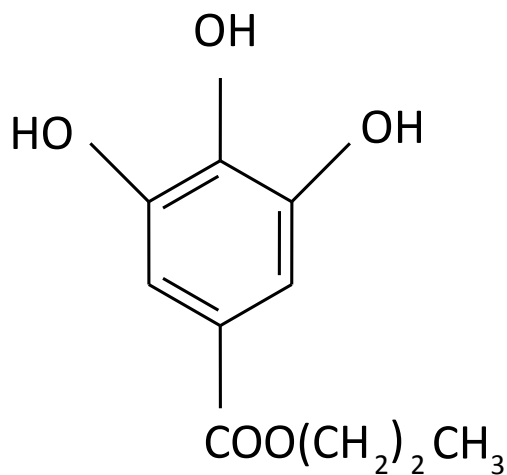
t-butyl hydroxyl
anisole (BHA)



di, *t*-butyl hydroxyl
toluene



tertiary butyl hydroquinone
(TBHQ)



propyl gallate
(PG)

圖2-9、常用之人工合成抗氧化劑(Hudson, 1990)。

Fig. 2-9 Structures of main synthetic antioxidants.

七、自由基與糖尿病之關聯

高血糖、氧化壓力與自由基相關，葡萄糖能直接產生自由基與其他氧化物，或經由少量金屬觸媒行氧化作用產生 $\cdot\text{OH}$ 、 O_2^- 及 H_2O_2 等，同樣的，葡萄糖氧化也會誘導脂質過氧化(林，1999)。當體內血液中葡萄糖濃度高容易行醱化反應時，會破壞皮膚保持彈性構造組織的膠原蛋白纖維，使肌膚衰老、失去彈性、暗沉、鬆垮，甚至會導致身體異常快速老化，使病情加重產生各種嚴重的糖尿病併發症的產生(米井，2010)。

八、糖尿病

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 長久以來為台灣地區十大死因之一，且為主要的代謝症候群之一，其中以第二型糖尿病(Type 2 DM)為主要糖尿病型態，約佔罹患率的95%左右。從罹患情形來看，糖尿病與肥胖呈現一種高度正相關性。正常人進食後，食物在胃腸到被消化分解，產生葡萄糖。葡萄糖經由血液循環到胰臟，會刺激胰臟分泌胰島素，可幫助葡萄糖進入身體各組織細胞，轉變成能量，或貯存在肝臟、肌肉及脂肪組織內。如果胰臟不能分泌胰島素或者雖能分泌胰島素，但身體各組織對胰島素產生阻抗性，胰島素不能發揮充分的作用，那麼葡萄糖濃度會上升，超過所訂定的標準，便是糖尿病。當血糖升高到某一程度，超過腎臟所能回收的極限(稱為葡萄糖閾值)時，葡萄糖會從尿液中漏出來，於是可以偵測到尿糖。其為一種複雜的代謝疾病，症狀包括多渴、多尿、多食，體重減輕及疲倦，且亦產生許

多如高血壓、痛風及心血管疾病等併發症(Juan et al.,2011)。

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

1. 隨機測得的血糖(所謂隨機測得的血糖指無論空腹與否) \geq 200mg/dl，同時合併出現糖尿病典型症狀(包括多喝、多尿、多吃、體重下降等症狀。)
2. 空腹 8 小時靜脈血漿糖值 \geq 126 g / d l 。
3. 空腹8小時靜脈血漿糖值 \geq 140g/dl，但口服75g葡萄糖耐量檢驗(oral glucose tolerance test, OGTT)，2小時後的靜脈血漿糖值 \geq 200g/dl。但如果2小時的靜脈血漿糖值介於140至200g/dl間，加上檢驗過程中有一次血糖是200mg/dl或以上就可以說是血糖耐受不良(impaired glucose tolerance, IGT)，為糖尿病前驅現象。

正常人的血糖值在70-120mg/dl的範圍，餐後血糖值會上升，此時胰島素會參與醣類代謝的調控，多餘的葡萄糖未被利用，就會轉成肝醣型式儲存於肌肉或肝臟中，剩餘的則被轉成中性脂肪存於脂肪細胞，使人體血糖值於一穩定的範圍內，當胰島素分泌量不足時，造成體內血糖值高居不下，而生活習慣不正當如壓力大、肥胖等都是引發糖尿病的誘因。

糖尿病在醫學領域裡的共識是大致上分為四大類來研究以及處置，分別是第一型糖尿病 (type 1 diabetes)、第二型糖尿病 (type 2

diabetes)、其他特殊型糖尿病 (other specific types diabetes) 以及妊娠性糖尿病 (gestational diabetes mellitus, GDM)。

(1) 糖尿病主要類型

(一) 第一型糖尿病

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

(二) 第二型糖尿病

第二型糖尿病在所有類型中最常見，約佔所有糖尿病患者九成以上，又稱非胰島素依賴型(non-insulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM)或成人型(adult-onset diabetes)糖尿病。前期患者不需每天依賴注射胰島素，可藉由飲食改善、規律運動或口服藥物來控制體內血糖濃度，後期則需補充胰島素。第二型糖尿病還有一項很重要的特徵

為胰島素阻抗性(insulin resistance)，患者初期時胰島素分泌量相對的不足，無法有效調節肝臟、肌肉及脂肪細胞等代謝，胰臟補償性的增加胰島素的分泌量，進而產生高胰島素症狀(hyperinsulinaemia)。由於胰臟長期過量產生胰島素，最終因負荷不了而損傷β細胞，導致胰島素分泌功能有缺陷，造成低胰島素症狀(hypoinsulinaemia)，演變成需要補充胰島素，最終發生功能失調而形成的第二型糖尿病(Prentki and Nolan, 2006)。第二型糖尿病不是自體免疫系統的疾病，其形成原因複雜，主要由於現代人生活習慣改變，攝取過多的營養及運動量不足，所以罹患第二型糖尿病患者通常伴隨著肥胖現象，然而肥胖人口的年齡層不斷下降，兒童及青少年中發生第二型糖尿病之情形有普遍增加的趨勢(Poitout and Roberson, 2002)。另有研究顯示，第二型糖尿病患者，隨著 BMI (body mass index)值的上升，胰島素阻抗性、β細胞胰島素分泌功能障礙及肝臟內生性葡萄糖的產生之比例也上升(Duman et al., 2003)。

(三)其他特殊型糖尿病

根據「美國糖尿病學會」在「胰島素使用要項 (*Insulin Administration*)」中所發表的聲明，有少部分的糖尿病可能發生在具有某些情況或症狀的人身上：

- 由藥物或化學物品引發的糖尿病

- 胰臟的疾病：如慢性胰臟炎、胰臟切除
- 內分泌疾病：如皮質類固醇過多、生長激素過多
- 胰島素受體異常
- 某些基因症候群

(四) 妊娠型糖尿病

指婦女懷孕前沒有糖尿病，懷孕時期卻出現高血糖症狀，約發生於 4% 的孕婦，而大部分於生產後消失。其形成原因為懷孕時過多荷爾蒙分泌，使身體產生胰島素阻抗性與高血糖現象。妊娠性糖尿病婦女，高達 60% 在 15 年內會得到糖尿病(林，2003)。醫師建議在懷孕 24~28 週及產後 6~12 週之間，可接受妊娠糖尿病篩檢(表 2-5)。

表 2-5、妊娠性糖尿病篩檢

Table. 2-5 Screening for and diagnosis of gestational diabetes mellitus

Perform a 75-g OGTT, with plasma glucose measurement fasting and at 1 and 2 h, at 24–28 weeks of gestation in women not previously diagnosed with overt diabetes.

The OGTT should be performed in the morning after an overnight fast of at least 8 h.

The diagnosis of GDM is made when any of the following plasma glucose values are exceeded:

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

GDM: Gestational diabetes mellitus (ADA, 2011)

九、糖尿病併發症

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

(一) 糖尿病性神經障礙

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

(二) 高血壓

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

(三) 糖尿病性腎症

血管分布於全身，補給氧氣及養分、搬運體內廢物，而人體的腎臟，能調節血液中必要物質的量和水量，排除廢物，形成尿液，而糖尿病會損傷腎小球的功能，使得尿量減少，體內廢物不易排出，囤積

於體內，而出現中毒症狀，無法形成尿液就會引起尿毒症，有導致死亡的危險。

(四) 動脈硬化

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

(五) 糖尿病視網膜症

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

十、糖尿病之治療

糖尿病之治療主要是期望可延緩併發症及調控其血糖，而現今治療方式分為非藥物及藥物兩種治療方法。非藥物治療包括飲食治療、運動及衛教，此治療方式最常被忽略，但其重要性卻是不容小

觀的。然而藥物治療又可分為兩種，一為胰島素類似物治療，如長效型 Glargine、中效型 NPH insulin、短效型 regular insulin 或速效型 insulin lispro。另一為表 2-6 中的其他藥物，其主要作用機轉為圖 2-10。雖然糖尿病藥物有如此多種，但由於其藥物皆有副作用，如：過敏、腸胃不適、葉酸吸收率降低、肝指數增高或增加心臟疾病之風險等副作用。

近年來興起健康養生觀念及自我照護及健康意識之抬頭，傳統醫學 (traditional medicine, TM) 及補充替代醫學 (complementary and alternative medicine, CAM) 亦逐受到重視。因此，促使具預防及改善高血糖潛力之中草藥及天然物逐漸受到青睞。也因此許多文獻致力於研究改善胰島素阻抗或代謝症候群之保健植物或天然物上，如人參、苦瓜、紅麴、兒茶素及發酵乳等皆已有文獻指出其可透過不同機制達到改善高血糖、胰島素阻抗性及對抗肥胖等 (郝等, 2011; 朱, 2009)。

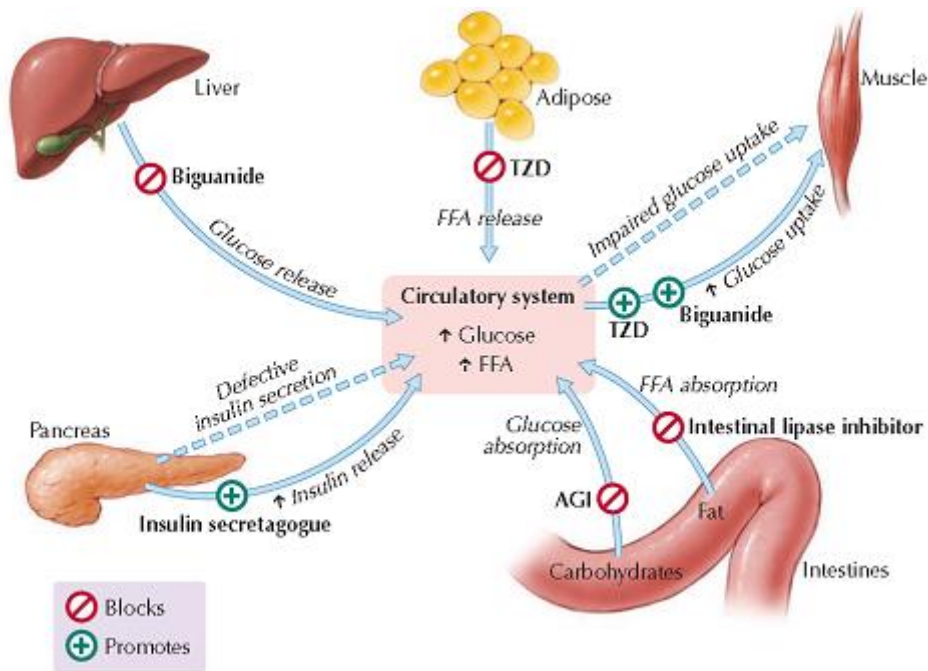


圖 2-10、口服抗高血糖藥物之作用位置。

Fig. 2-10 Major target and actions of orally administered antihyperglycemic in type 2 diabetes mellitus. TZD = thiazolidinedone ; FFA = free fatty acid ; AGI = α -glucosidase inhibitor.

表 2-6、口服降血糖藥物

Table 2-6 oral hypoglycemic agent

名稱	第一型類升糖素胜肽 (Glucagons-like peptide -1; CLP-1)	二胜基肽酶-4 抑制劑 (Dipeptidyl peptidase 4, DPP-4 inhibitor)	Amylin 類 似物	α -Glucosidase inhibitor	Biguanide	Sulfonylureas 類促胰島素分 泌藥	非 sulfonylureas 促胰島素分泌 藥	Thiazolidinedione (或稱 glitazones)
簡述	CLP-1 為腸胃道所分泌的一種腸促胰素 (incretin)。其缺點為會被體內酵素二胜基肽酶-4 (dipeptidyl peptidase 4, DPP-4) 快速代謝，故臨床上使用受限。	抑制 DPP-4，使腸泌素 (incretin) 或使 CLP-1 不易被分解。	Amylin 為胰臟 β 細胞所分泌之荷爾蒙	此類藥物較常使用為 acarbose 及 miglitol。藥物的結構與醣類相似，故會競爭胰臟及腸內之醣類消化酵素	Biguanides 類為 Biguanide 之衍生物常用藥物為 metformin。	目前臨床上所使用之抗高血糖劑大多為此類	Meglitinide 類似物。分為 repaglinide (Novonorm®) 及 nateglinide (Starlix®) 兩種。	簡稱 TZDs。亦稱胰島素增敏劑 (insulin sensitizer)
機轉	在血糖上升時，促進胰島素分泌、增加胰島素敏感性、抑制升糖素 (glucagon) 分泌、抑制食慾、降低胃排空速度、促進胰臟 β 細胞生長、分化與再生	腸泌素濃度增加，促進 β 細胞胰島素分泌、抑制升糖素合成	抑制升糖素 (glucagon) 分泌、抑制食慾、降低胃排空速度	延遲胃腸道對碳水化合物吸收、刺激 glucagons-like peptide 分泌	抑制肝臟製造葡萄糖；增加肝臟與肌肉對胰島素的敏感性	與胰臟 β 細胞受體有高度親和力，使得 β 細胞葡萄糖敏感度提高，進而促進胰島素分泌	刺激 β 細胞之碘醯尿素接受器，快速促進胰島素分泌	為活化細胞核表面接受器 peroxisome proliferative-activated receptor- γ (PPAR- γ)，增加脂肪細胞攝取游離脂肪酸及增加脂肪組織、肝臟、骨骼肌之胰島素敏感性
副作用	嘔吐、腹瀉、頭暈、頭痛或消化不良，在臨床上有引起急性胰臟炎之報告。	噁心、嘔吐、腹瀉、過敏	噁心、嘔吐或血糖過低	脹氣、腹瀉、腹痛	腸胃道副作用	血糖過低、體重增加	血糖過低、體重增加	水腫、貧血、體重增加、心臟衰竭

十一、胰島素

胰島素是一種蛋白質激素，由胰臟內的胰島 β -cell 分泌。胰島素參與調節糖代謝，控制血糖平衡，可用於治療糖尿病。在健康的人體內，當我們吃進食物時，糖分会進入到血液，而糖分進入血液時，血糖逐漸升高，血糖上升則會刺激胰臟分泌胰島素，來平衡血糖。相對的，血糖下降時，則會抑制胰島素的分泌，身體經此調節機制，使血糖維持在正常的範圍(劉，2011)。胰島素與同樣由胰島的 α -cell 所分泌的升糖素 (glucagon)，為調節血糖濃度的兩大內分泌激素。升糖素的作用機制與胰島素相反，是在血液中血糖濃度偏低時，分泌促使肝醣分解、三酸甘油酯分解、糖質新生 (是一種利用氨基酸合成糖類的過程)，以提升血糖濃度(陳，1999；吳，2011)。

(一)胰島素作用

胰島素是促進合成代謝及調節血糖穩定的主要賀爾蒙，其具同化作用。胰島素可調節細胞之醣類、脂質及蛋白質的代謝 (圖 2-11)，其扮演著重要的調控角色之一 (White and Kahn,1994)。

1.醣類代謝

抑制糖質新生作用 (gluconeogenesis)、降低葡萄糖之生成、刺激肝醣合成 (glycogen)、抑制肝醣分解作用 (glycogenolysis) 及促進葡

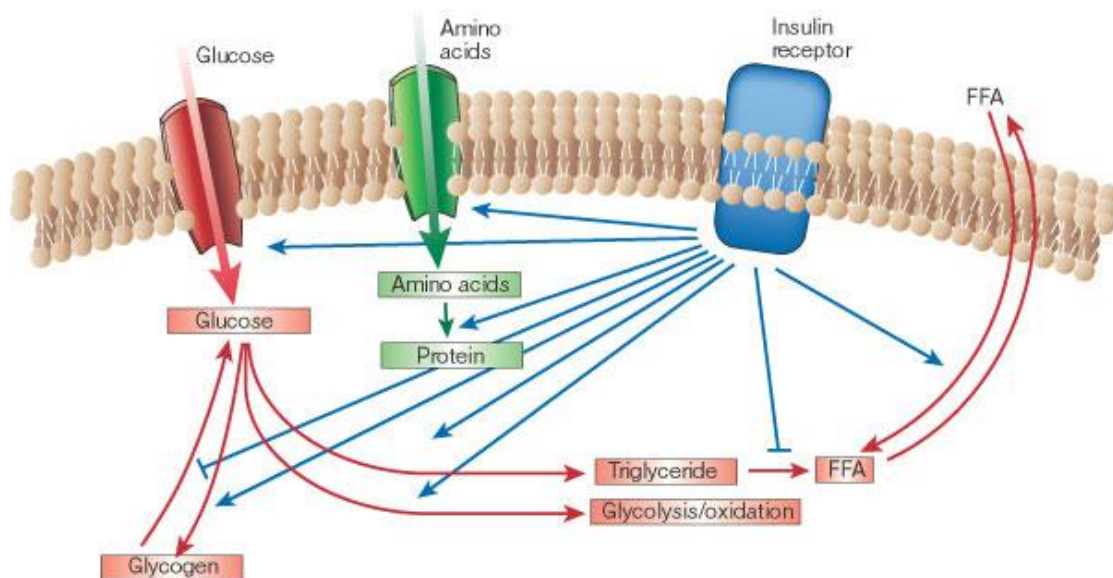
葡萄糖分解 (Shepherd and Kahn,1999)。

2.脂質代謝

胰島素抑制脂解酶 (hormone sensitive lipase) 的活性，減緩脂肪分解作用，且減少三酸甘油脂分解成甘油 (glycerol) 及游離脂肪酸 (free fatty acid; FFA) (吳，2011)。

3.蛋白質代謝

胰島素可促使細胞膜對胺基酸之通透性，並可加速細胞核的複製及轉錄過程，增加 DNA 和 RNA 的生成，亦可加速核糖體之轉譯過程，促進蛋白質合成 (林，1986；何，1986)。



(Saltiel and Kahn,2001)

圖 2-11 胰島素之代謝調控。

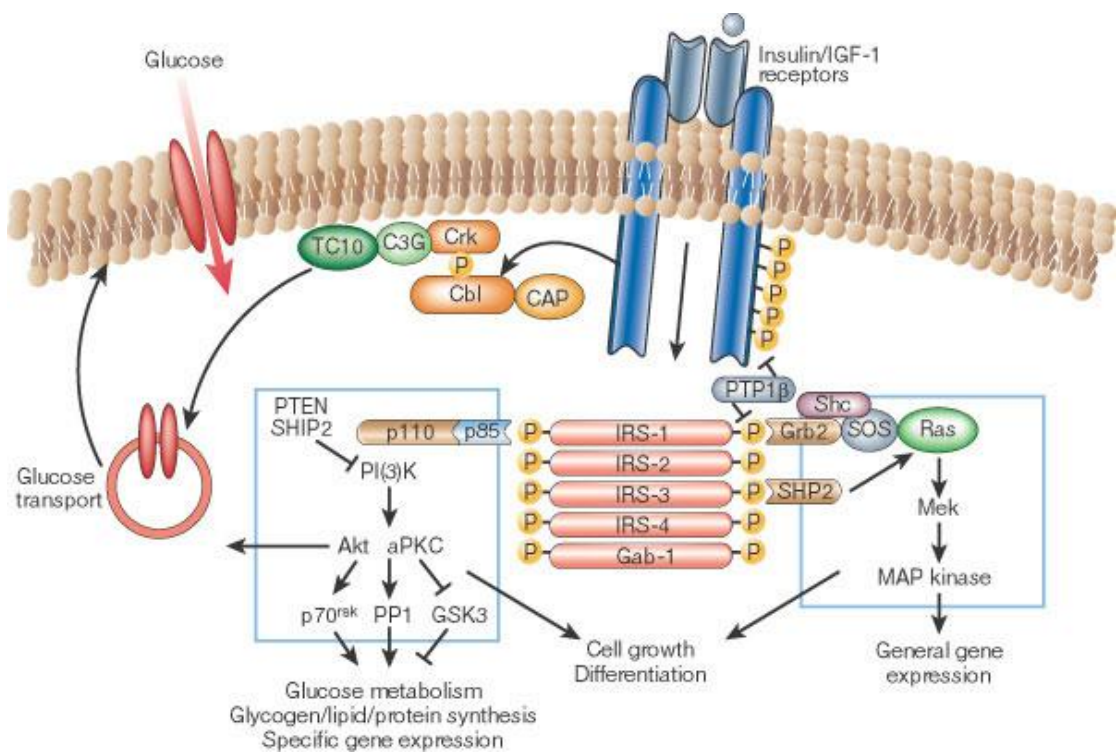
Fig. 2-11 The regulation of metabolism by insulin.

(二) 胰島素作用於細胞

胰島素主要作用於肝細胞、肌肉細胞及脂肪細胞，胰島素會與細胞上的受器結合，產生一連串分子磷酸化、去磷酸化作用及訊息傳遞反應，最後促使細胞上的葡萄糖轉運蛋白(glucose transporter)移到細胞膜上而協助葡萄糖的吸收；而肝臟細胞中的胰島素會促進肝醣及脂質儲存而減少葡萄糖釋出(鄭，2009；Saltiel and Kahn, 2001)。

(三) 胰島素細胞層面之傳訊路徑

胰島素接受器(insulin receptor, IR)由兩個 α -subunit 及兩個 β -subunit 組成一個四俱體，而 α -subunit 位於細胞膜外會與胰島素結合，受體構型改變引發 β -subunit 的自磷酸化(auto-phosphorylation)，催化一連串的訊息傳遞作用，胰島素的訊息進入可活化Protein B (PKB/Akt)激酶等下游因子，使Akt 被磷酸化，產生一連串代謝反應，造成葡萄糖代謝、肝醣及脂質合成、蛋白質合成等作用(Saltiel and Kahn, 2001; Taniguchi, 2006)。



(Saltiel and Kahn,2001)

圖 2-12 胰島素之傳訊路徑。

Fig. 2-12 Singal transduction in insulin action.

(四)胰島素阻抗性

胰島素阻抗在代謝症候群機轉中為主要核心異常因子，更是第二型糖尿病最主要前驅因子。當血液中胰島素調控體內能量代謝力降低時即為胰島素阻抗性(Zick, 2001)。亦即在正常胰島素濃度下，肌肉、肝臟與脂肪等組織對其敏感度下降，而造成於正常血糖濃度時，胰島素濃度上升、飯前或飯後血中胰島素增加、及飯後有葡萄糖受性不良之情形，這些構成胰島素阻抗性之要件(Saltiel, 2000; 陳，2006)。

十二、高血糖與醣解酵素

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

(一) α -amylase可將多醣之 α -1,4-glycosidic linkage 水解成葡萄糖、麥芽糖或糊精。透過抑制此酵素的活性，來延緩葡萄糖的吸收，降低餐後高血糖(Bhandari, 2008)，此酵素抑制劑可延遲碳水化合物的消化，延長總碳水化合物的消化時間，可減少葡萄糖的吸收率，而延緩餐後血糖上升(Rhabasa-Lhoret and Chiasson, 2004)。

(二) α -glucosidase 可將多醣經由此酵素催化並釋放非還原端的 D-葡萄糖，其包括 glucoamylase、sucrase、maltase 及 isomaltase 等酵素 (Frandsen and Svensson, 1998；李，2006)，藉由抑制此酵素活性，減緩葡萄糖於小腸內吸收的速度，可以顯著減少混合型碳水化合物飲食餐後的血糖，藉由研發此酵素之抑制劑可運用在第二型糖尿病患者之餐後血糖水準的控制上 (Ali et al., 2006)。

十三、醣解酵素抑制劑之作用

市面上常見之 α -葡萄糖苷酶抑制劑(α -glucosidase inhibitor) 為 acarbose 及 miglito，在腸道內均與 α -glucosidase 有很高的親和力，會與食物中的多醣類互相競爭 α -glucosidase，而抑制小腸內醣類的水解，延緩碳水化合物在腸道分解為單醣的速度，減少腸道對醣類的吸收，有效降低飯後血糖及胰島素濃度。這類藥物也在高危險群的葡萄糖不耐患者做過研究，可以減少其約30%發生糖尿病的機會。但此種抑制劑可能引起消化道的副作用如腹脹不適、脹氣及腹瀉等，主要是因acarbose延後了醣類的分解，未分解的醣容易引起上述不良反應，通常情形不嚴重，持續用藥後症狀會逐漸緩解進而消失(陳等，2009)。

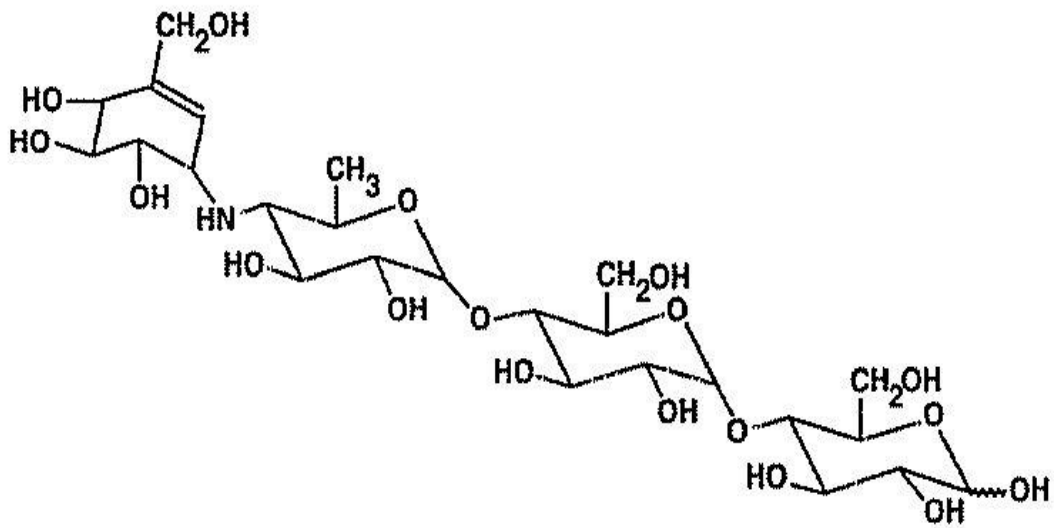


圖 2-13、Acarbose 之結構。
Fig. 2-13 Structure of Acarbose.

Miglitol
C₈H₁₇NO₅

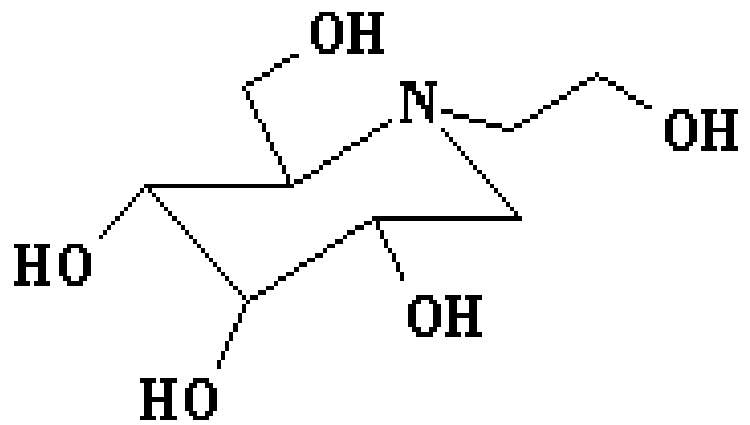


圖 2-14、Miglitol 之結構。
Fig. 2-14 Structure of Miglitol.

參、研究目的與實驗流程

一、研究目的

糖尿病患者的逐年上升，糖過多會增加體內自由基讓糖尿病的發生機會增加。長期高血糖，葡萄糖會自我氧化產生過多的自由基，並消耗體內中和自由基毒素的抗氧化因子，然而高血糖會使體內蛋白質產生醣化作用，造成細胞損傷，蛋白質醣化過程中亦會產生大量自由基，再度加強蛋白質醣化作用，導致體內抗氧化系統失衡，造成不可逆轉的併發症，譬如心血管疾病、腎功能衰竭、神經病變、視網膜病變等(Ceriello, 2003；Rahimi et al, 2005)。許多研究亦證實抗氧化劑可降低高血糖所引起之氧化壓力，降低脂質過氧化及蛋白質醣化的產生，進而減少細胞損傷及疾病的發生。由於人工合成的抗氧化劑可能造成動物肝、腎損傷及致癌性，所以近年來相當熱烈的研究自然界中尋找更安全有效的的抗氧化劑來取代合成的抗氧化劑。

馬鞭草利用甲醇萃取，所得萃取物依序利用水與正己烷、乙酸乙酯及正丁醇等溶劑進行液液萃取，進行抗氧化及醣解酵素抑制活性測試，希冀除了醣解酵素抑制功能外，亦期待同時具有抗氧化力，選擇抑制率佳的區分利用各種液相層析及光譜分析進行活性成分之分離純化及結構鑑定，純化成分並測試抗氧化及醣解酵素抑制活性。

二、實驗流程

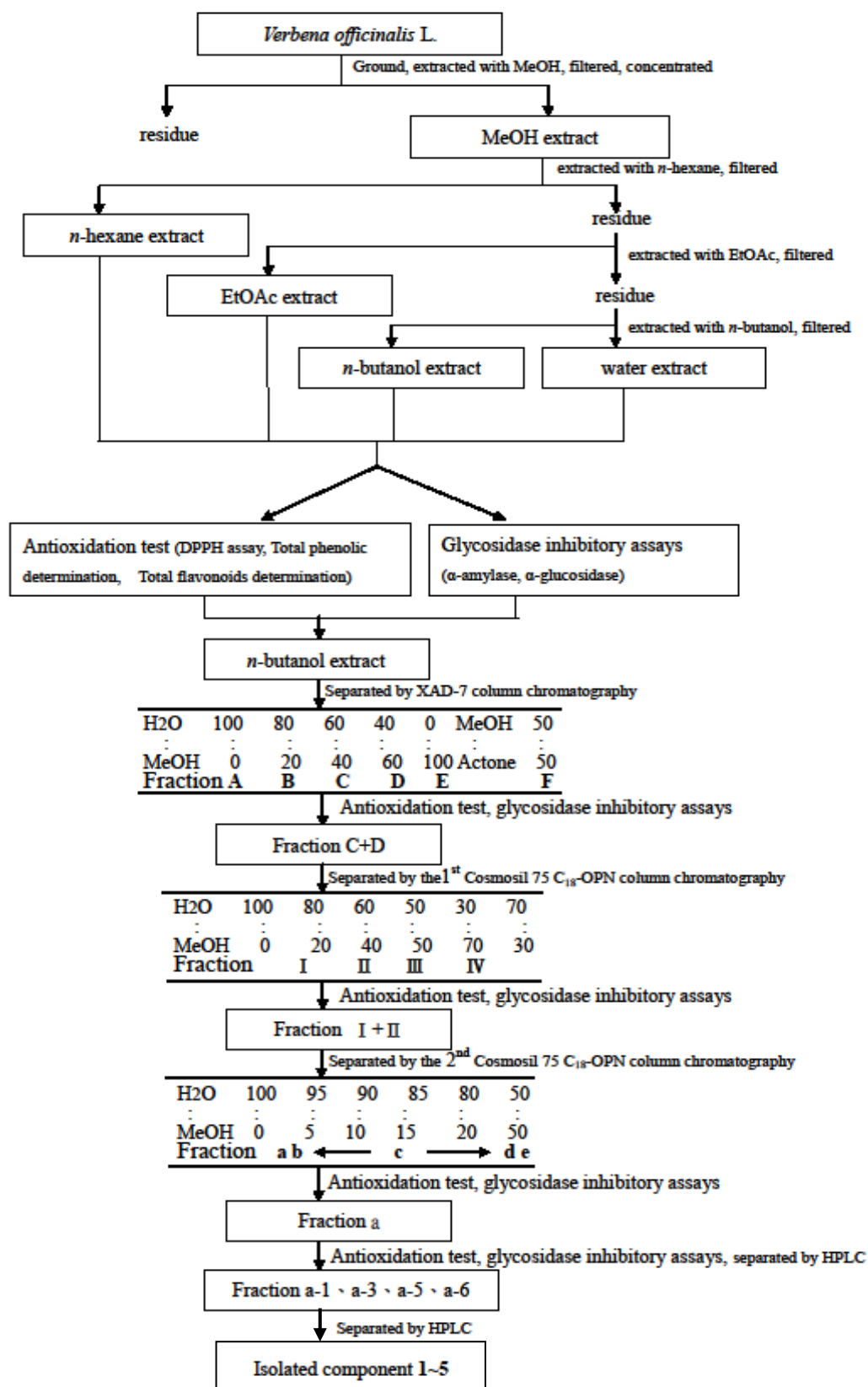


圖 3-1、實驗流程圖。

Fig. 3-1 Scheme on isolated of antioxidative and glycosidase inhibitory components from *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L.

肆、材料與方法

一、實驗材料

本實驗樣品為中藥材馬鞭草(*Verbena officinalis* L.)，購自雲林縣北港鎮養元中藥房，樣品利用磨粉機磨碎成粉末以備用。

二、實驗試劑與溶劑

(一) 醣解酵素抑制試驗之試藥

品名	廠商
Potassium phosphate (KH_2PO_4)	林純藥工業株式會社
Sodium phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Merck公司(Darmstadt, Germany)
Sodium chloride (NaCl)	Merck公司(Darmstadt, Germany)
Starch	島久藥品株式會社
Sodium hydrate (NaOH)	片山化學工業株式會社
Potassium sodium tartrate ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	島久藥品株式會社
3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
α -amylase	Sigma-Aldrich (Japan)
<i>p</i> -nitrophenyl α -D-glucopyranoside(<i>p</i> NPG)	Sigma-Aldrich (Switzerland)
α -glucosidase	Sigma-Aldrich (USA)
Sodium carbonate (Na_2CO_3)	Sigma-Aldrich (USA)

(二) 抗氧化試驗之試藥

品名	廠商
Linoleic acid	Sigma公司(St. Louis, MO, USA)
Ammonium thiocyanate (NH ₄ SCN)	關東化學株式會社(Tokyo, Japan)
Iron (II)chloride tetrahydrate (FeCl ₂ · 4H ₂ O)	林純藥工業株式會社
α-tocopherol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Butyl hydroxyl anisole (BHA)	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Potassium phosphate, monobasic (KH ₂ PO ₄)	林純藥工業株式會社
Hydrochloric acid (HCl)	Union Chemical Works (Hsinchu, Taiwan)
2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH)	Fluka(Buchs,Switzerland)
Butylated hydroxyanisole (BHA)	Sigma-Aldrich (USA)
Folin-Ciocalteu's phenol reagent	Sigma-Aldrich (USA)
Sodium carbonate(Na ₂ CO ₃)	Sigma-Aldrich (USA)
Gallic acid	Sigma-Aldrich (USA)
Aluminium nitrate nonahydrate(Al(NO ₃) ₃ · 9H ₂ O)	Merck (Germany)
Potassium acetate (CH ₃ COOK)	Riedel-de Haën
Quercetin	Sigma-Aldrich(USA)
2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS)	Sigma (USA)

Peroxidase from horseradish (116 units/mg solid)	Sigma (USA)
Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	Riedel-de Haën (Seelze, Germany)
6-Hydroxy-2,5,7,8-teramethyl-2,2-carboxylic acid (trolox)	Aldrich (USA)

(三) 純化成分層析及光譜分析之溶劑

品名	廠商
Ethyl acetate、 <i>n</i> -hexane、methanol (工業級)	華興化學原料行
<i>n</i> -butanol (試藥級)	聯工化學試藥
Acetone、Methanol (HPLC 級)	SK Chemicals (Korea)
Ethyl acetate (HPLC 級)	ECHO (Taiwan)
Methanol-D ₄	CIL 公司(USA)
Trifluoroacetic acid (TFA)	Riedel-de Haën (Seelze, Germany)

三、實驗儀器設備

(一) 充填式膠體液相層析管柱

- XAD-7 樹脂(20-60 mesh)購自 Sigma 公司(St. Louis, MO, USA)
- ODS 層析充填劑 Cosmosil 75 C₁₈-OPN，購自 Nacalai Tesque Inc. (Kyoto, Japan)。

(二) 光二極矩高效液相層析儀(HPLC)

- 液相層析儀(L-7100)購自 Hitachi 公司(Japan)

- 光二極體陣列層析器(L-7450A) 購自 Hitachi 公司(Japan)
- 層析控制與資料處理器(D-7000) 購自 Hitachi 公司(Japan)
- 以下高效層析液相管柱 Develosil ODS-HG-5 (250×4.6 mm) 、
- Develosil ODS-HG-5 (250×20 mm) 、 Develosil RP-Aqueous
- (250×4.6 mm) 、 Develosil RP-Aqueous (250×20 mm)均購自
Nomura Chemicals 公司(Japan)

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

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

(五)核磁共振光譜儀(VXR-300/51)

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

(六) 40°C 循環式恆溫烘箱購自華興化學原料行代理

四、實驗方法

(一)樣品萃取

使用浸漬萃取方法，將4,372.28 g乾燥中藥馬鞭草粉末，先以20 L工業級甲醇於室溫下分別重複萃取三次，抽氣過濾、濃縮後，再依序使用等體積的工業級正己烷、乙酸乙酯及藥用級正丁醇進行液液萃取，各二重複，以抽氣過濾收集上清液，所獲得之正己烷、乙酸乙酯、正丁醇及水層等四種萃取液在低於40°C下以旋轉式減壓濃縮機濃縮至適當體積，並計算產率後充氮儲藏於4°C冰箱備用。馬鞭草各種溶劑萃取及製備流程如(圖4-1)所示。市售馬鞭草為方便儲存，皆已乾燥過，經水分含量測定，其水分含量約為5%，其產率以濕重及乾重表示，濕重產率為3.36%，乾重產率為3.38%。

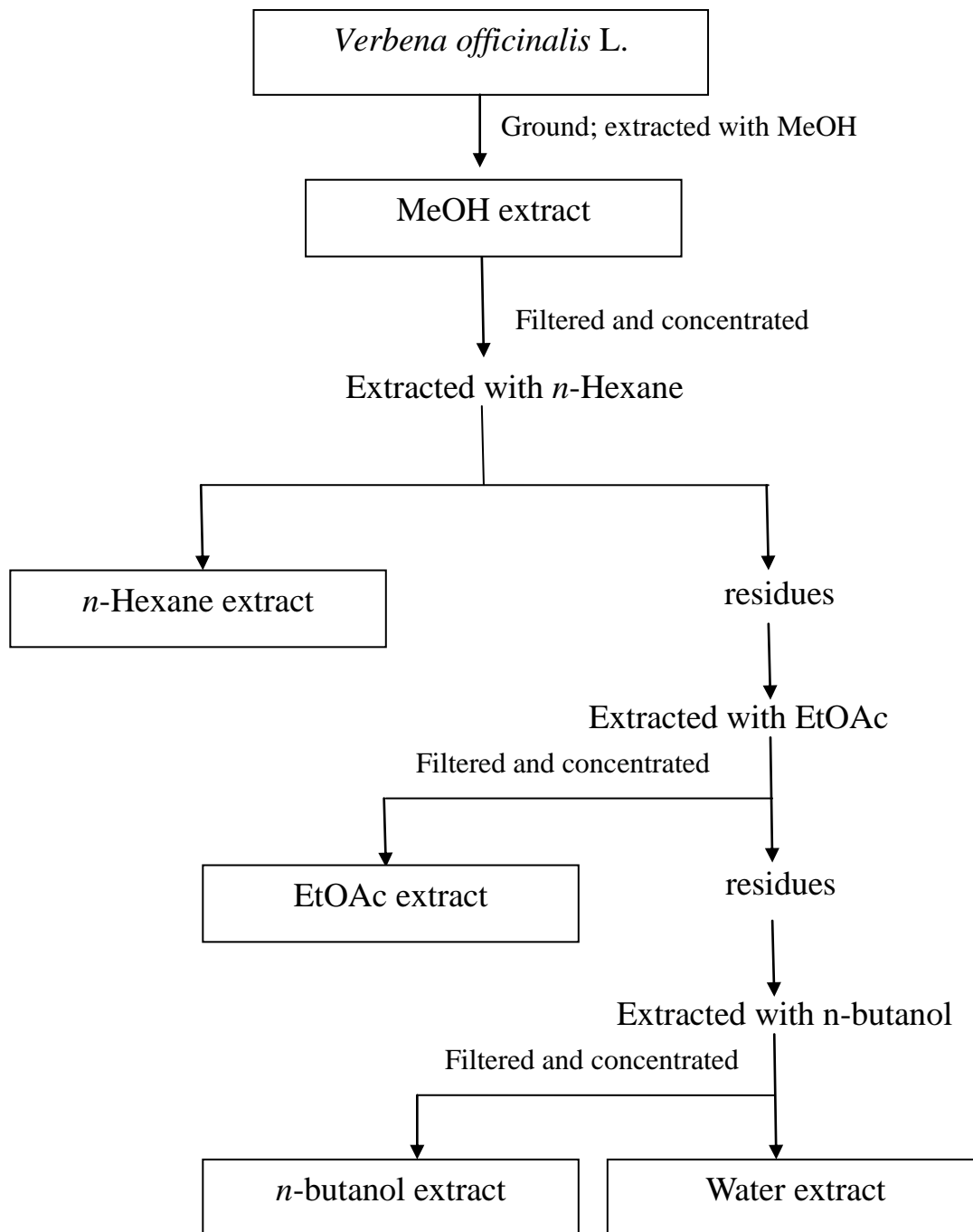


圖 4-1、馬鞭草各種溶劑萃提取物之製備。

Fig. 4-1 The solvent extracts prepared from *Verbena officinalis* L.

(二) 水分含量測定

以常壓乾燥法測定 (A. O. A. C., 1984)。將預先烘乾的秤量瓶放入乾燥皿中冷卻後稱重 (W_0)。稱取馬鞭草粉末樣品約 1g 放入秤量瓶中，紀錄重量 (W_1)，放入預溫至 $105\pm 5^\circ\text{C}$ 之烘箱中烘烤 2 小時，取出並放入乾燥皿中冷卻至室溫再稱重 (W_2)，再放入烘箱中烘 30 分鐘，取出，放入乾燥皿中冷卻，稱重 (W_3)。重覆前一步驟，直到前後兩次加熱乾燥，其重量差小於 1 mg，達恆重，即可結束得到最後重量 (W_n)。

$$\text{水分 (\%)} = \frac{W_1 - W_n}{W_1 - W_0} \times 100\%$$

W_0 ：秤量瓶淨重 (g)

W_1 ：樣品 + 秤量瓶重 (g)

W_n ：乾燥達恆重時樣品 + 秤量瓶重 (g)

(三) 總酚含量測定 (total phenolic compounds determination)

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

參照 Julkunen-Titto (1985) 之方法，將 50 μL 樣品及不同濃度之 gallic acid 標準品，加入 1mL H_2O 及 500 μL Folin-Ciocalteu's phenol reagent，用力搖勻混合，再加入 2.5mL 20% Na_2CO_3 ，混合均勻，於室溫下靜置 20 分鐘，以分光光度計檢測波長 735nm 下之吸光值。另

外再以不添加 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 之試驗當作空白對照組。製作標準曲線(附錄 7-1)，以換算相對之 gallic acid 當量，以 mg gallic acid equivalent / g 馬鞭草萃取物。

(四) 總類黃酮含量測定 (Flavonoid determination)

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

參照唐(1996)和鍾(2003)等人之方法，將 250 μ L 樣品及不同濃度之 quercetin 標準品，加入 10% 硝酸鋁及 1M 醋酸鉀各 50 μ L，再加入 1.4mL 去離子水，混合均勻，於室溫下反應 40 分鐘，以分光光度計檢測波長 415nm 下之吸光值。另外再以不添加硝酸鋁之試驗當作空白對照組。製作標準曲線(附錄 7-2)，以換算相對之 quercetin 當量，以 mg quercetin equivalent / g 馬鞭草萃取物。

(五) DPPH 自由基清除能力試驗

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

(2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical)，使其形成一個非自由基的

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

0.2M KH_2PO_4 50mL、0.2N NaOH 30mL 及去離子水 100mL，以 0.2N NaOH 調整 pH 值至 7.0，定量至 200mL 備用。

2. 亞麻油酸(Linoleic acid)製備

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

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

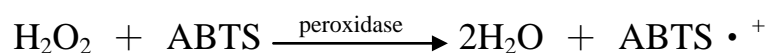
取出上述反應基質 200 μL ，加入 9.4mL 75% 甲醇，再依序加入 200 μL (38.8mg $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ / 10 mL 3.5% HCl)氯化亞鐵及 200 μL (3g NH_4SCN / 7mL dist. H_2O)硫氰酸銨，混合均勻，於室溫下反應 3 分鐘，以分光光度計檢測波長 500nm 下之吸光值。

(七) 總抗氧化能力測定(Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)

原理：horseradish peroxidase 會催化 H_2O_2 及 ABTS 反應形成

$\text{ABTS} \cdot^+$ ，此為穩定的藍綠色自由基物質，其在波長 734nm 有極大

吸光值。當樣品具有抗氧化能力時，則能減少 $ABTS \cdot^+$ ，導致吸光值下降。當吸光值愈低，代表樣品之抗氧化能力愈強。其反應式如下：



參照 Miller(1993)及 Arnao 等人(1996)之方法，將 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS)、peroxidase 與 H_2O_2 混合均勻，使最終系統濃度分別為 $100\mu M$ 、 4.4 unit/mL 與 $50\mu M$ ，於 $30^\circ C$ 下避光反應 1 小時，其形成穩定的藍綠色 $ABTS \cdot^+$ ，加入 $250\mu L$ 樣品(mg/mL)及不同濃度之 trolox 標準品，混合均勻，於室溫下反應 10 分鐘，以分光光度計檢測波長 $734nm$ 下之吸光值。製作標準曲線(附錄 7-3)，以換算相對之 trolox 當量，以 $\mu g \text{ trolox equivalent} / mg$ 馬鞭草萃取物表示。

(八) α -amylase 抑制作用測定

參考 Ali (2006)及 巫(2009)等人之方法並加修飾，利用 DNS 具氧化力之特性，將具有游離醛或酮基之碳水化合物在鹼性溶液下有還原的能力而進行反應(圖 4-3)，將欲檢測之樣品濃度配製成 $0.1mg/mL$ ，取 $40\mu L$ 加入 $160\mu L$ 去離子水於 $1.5mL$ 離心管當中，隨後加入 α -amylase 受質 $0.5\%(w/v)$ 之澱粉溶液 $400\mu L$ ，再加入 $200\mu L$ ($4U/mL$) 酵素液，於 $25^\circ C$ 下反應 3 分鐘後，自此混合物中取出 $200\mu L$ 加入新的 $1.5mL$ 離心管中，加入溶於 $5.31M$ 酒石酸鉀鈉溶液的二硝基

水楊酸呈色溶液(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS) 100 μ L，在水浴 85 $^{\circ}$ C 下加熱 15 分鐘後，再加入900 μ L 去離子水測其在 540nm 下的吸光值。

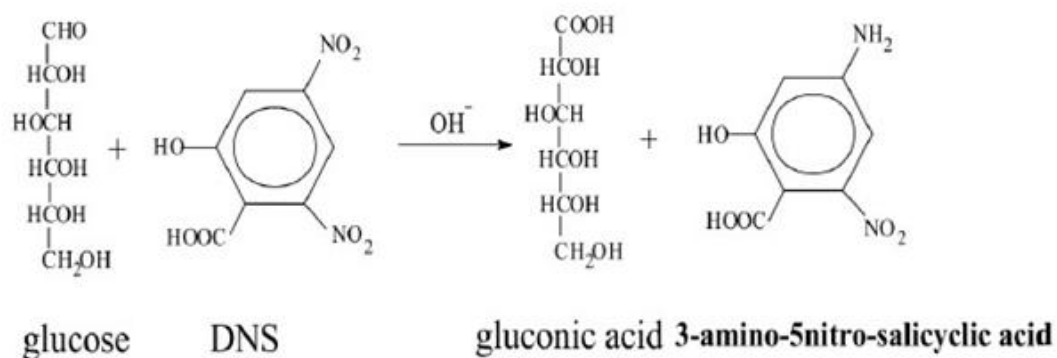


圖4-3、葡萄糖之呈色反應。

Fig. 4-3 The coloration reaction of glucose.

抑制率之計算方式如下：

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

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

(九) α -glucosidase 制作用測定

參考Shim(2003)及林(2008)等人之方法並稍加修飾，將欲檢測之樣品濃度配製成(0.1mg/mL)，取 100 μ L 待測樣品與 20 μ L 之 α -glucosidase 酵素液(1U/mL)於 1.5 mL 離心管當中，隨之加入

380 μ L 0.53mM 的受質 4-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (p-NPG)溶液，於 37 $^{\circ}$ C 下反應 20 分鐘後，加入 500 μ L (0.1M) Na₂CO₃ 充分混合，使酵素失活終止其反應，以分光光度計測其在400nm 下的吸光值。而控制組則以 0.1 M 的磷酸緩衝液(pH 6.8)取代萃取液，背景組是指只有萃取物的吸光值，僅需加入萃取物，而酵素與 p-NPG皆以磷酸緩衝液代替。

抑制率之計算方式如下：

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

A.實驗組:酵素+基質+萃取物

B.控制組: 酵素+基質+甲醇

C.背景組:Buffer+基質+萃取物

(十) 馬鞭草抗氧化及醣解酵素抑制成分之萃取、分離與純化

馬鞭草之正己烷、乙酸乙酯、水層萃取物，利用醣解酵素抑制作用之結果顯示，其正丁醇萃取物顯現較佳抑制率，經總酚和總類黃酮含量及清除DPPH自由基分析發現其亦含多總酚和總類黃酮含量，清除DPPH自由基能力也較高，故選取正丁醇萃取物進行抗氧化及醣解酵素抑制成分之分析。馬鞭草正丁醇萃取物之抗氧化醣解酵素抑制成分之分離與純化流程如圖4-4 所示。

1. 馬鞭草正丁醇萃取物 XAD-7 液相管柱層析

使用 XAD-7 充填於玻璃管柱(700 \times 45 mm)，再將具強抗氧化性

及醣解酵素抑制活性之馬鞭草正丁醇萃取物懸浮於去離子水後充填至管柱最頂層，其沖提液條件依序是水：甲醇(v/v)=100：0、80：20、60：40、40：60、0：100、丙酮：甲醇(v/v)=50：50之混合溶劑，沖提液以每300mL為收集單位，並以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，偵測波長280nm之吸光值對收集瓶作圖進行區分，而後利用硫氰酸鐵法及醣解酵素抑制測試檢測各區分濃縮物之活性。

2. 第一次 Cosmosil 75 C₁₈-OPN 液相管柱層析

使用 Cosmosil 75 C₁₈-OPN 膠體充填於玻璃管柱(600×24.5 mm)，再將具強抗氧化性及醣解酵素抑制活性之馬鞭草正丁醇萃取物沖提區分 C、D 混合後懸浮於去離子水後充填至管柱最頂層，進行第一次 Cosmosil 75 C₁₈-OPN 液相管柱層析，其沖提液條件依序是水：甲醇(v/v)=100：0、80：20、60：40、50：50、30：70、70：30之混合溶劑，沖提液以每50mL為收集單位，並以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，偵測波長291nm之吸光值對收集瓶作圖進行區分，而後利用總抗氧化力及醣解酵素抑制測試檢測各區分濃縮物之活性。

3. 第二次 Cosmosil 75 C₁₈-OPN 液相管柱層析

由於經過活性測試後，發現其抗氧化及醣解酵素抑制作用皆為區分 I 及 II 較佳，經 HPLC 分析後，其 HPLC 層析圖譜類似，推測可能為相同的物質，因此再將此兩個區分沖提物混合後，經過沖提條件的調整，進行第二次 Cosmosil 75 C₁₈-OPN 液相管柱層析。使用 Cosmosil

75 C₁₈-OPN 膠體充填於玻璃管柱(600×24.5 mm)，再將具強抗氧化性及醣解酵素抑制活性之馬鞭草正丁醇萃取物沖提區分 I、II 混合後懸浮於去離子水後充填至管柱最頂層，進行第二次 Cosmosil 75 C₁₈-OPN 液相管柱層析，其沖提液條件依序是水：甲醇(v/v)=100：0、95：05、90：10、85：15、80：20、50：50 之混合溶劑，沖提液以每 50mL 為收集單位，並以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，偵測波長 330nm 之吸光值對收集瓶作圖進行區分，而後利用總抗氧化力及醣解酵素抑制測試檢測各區分濃縮物之活性。將活性高的區分 a，利用高效液相層析儀(high performance liquid chromatography, HPLC)分析各成分。

4. 高效液相層析分析

將上述量較多且抗氧化、醣解酵素抑制活性較佳之成分區分利用高效液相層析儀進行區分，先以分析型高效液相層析找尋分離條件，再依其沖提條件套用於製備型高效液相層析，重複收及分離成六個區分，區分 a-1、a-2、a-3、a-4、a-5、a-6，而後利用總抗氧化力及醣解酵素抑制測試檢測各區分濃縮物之活性，最後選取抗氧化力及醣解酵素抑制活性較佳之 a-1、a-3、a-5、a-6 等四個區分再以相同沖提條件利用高效液相層析重複收集分離活性成分，將經高效液相層析分離、純化之 5 種成分濃縮定量後，進行結構鑑定。

高效液相層析條件敘述如下：

(4-1)分析型高效液相層析【區分 a、純化物質 1、2、3、4、5】

管 柱：Develosil RP-Aqueous (C30-UG)

(250×4.6 mm，日本 Nomura 公司)

沖提液：H₂O：MeOH：三氟醋酸 (v/v/v) = 49.9：50：0.1

流 速：0.8 mL/min

偵測器：330 nm

(4-2)製備型高效液相層析【區分 a、純化物質 1、2、3、4、5】

管 柱：Develosil RP-Aqueous (C30-UG)

(250×20 mm，日本 Nomura 公司)

沖提液：H₂O：MeOH：三氟醋酸 (v/v/v) = 49.9：50：0.1

流 速：3.5 mL/min

偵測器：330 nm

5. 純化物質之結構鑑定

¹H-及 ¹³C-核磁共振 (¹H-及 ¹³C-NMR) 光譜測定敘述如下：

將純化之樣品溶 methanol-d₄ 中，以 VXR-300/51 型核磁共振光譜儀 (¹H-NMR 以 300MHz，¹³C-NMR 以 75MHz) 測定，獲得其 ¹H-及 ¹³C-NMR 光譜。光譜解析以 δ 表示化學位移 (chemical shift)，並以 TMS(tetramethylsilane) 充當比較基準點，s 表示單線峰 (singlet)，

d 表示雙線峰(doublet)，t 表示三線峰(triplet)，q 表示四線峰(quartet)，b 表示寬線峰(broad)，m 表示多重線峰(multiplet)；同時進行紫外-可見光譜及質譜分析，再綜合進行光譜解析及結構鑑定。

(十一) 統計分析

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

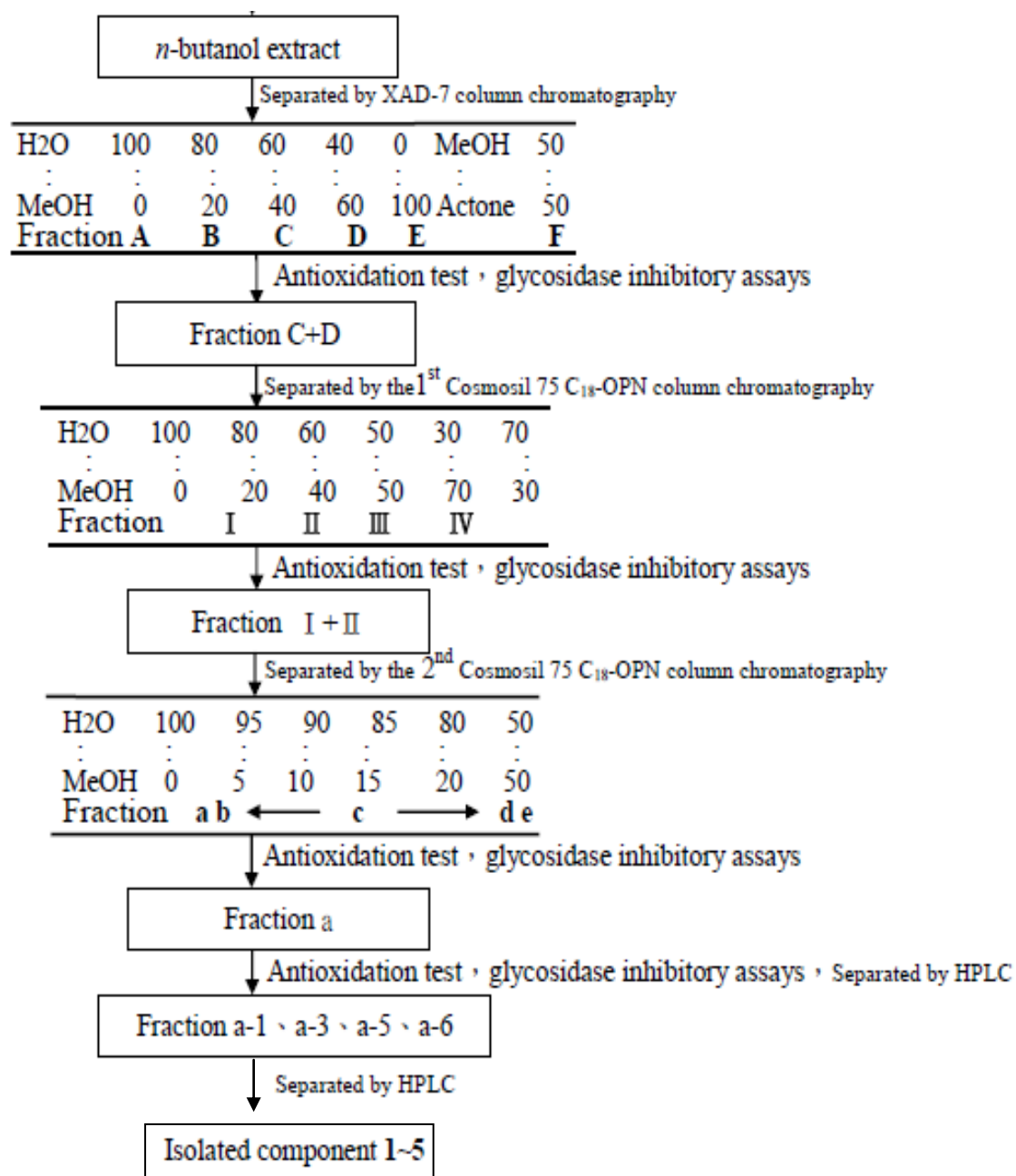


圖4-4、馬鞭草正丁醇萃取物抗氧化及醣解酵素抑制成分之純化流程圖。

Fig. 4-4 The isolation of antioxidant and glycosidase inhibitory components from *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L.

伍、結果與討論

一、馬鞭草萃取物之產率

使用浸漬萃取方法，將4,372.28 g乾燥中藥馬鞭草粉末，先以20 L工業級甲醇於室溫下分別重複萃取三次，抽氣過濾、濃縮後，再依序使用等體積的工業級正己烷、乙酸乙酯及藥用級正丁醇進行液液萃取，各二重複，以抽氣過濾收集上清液，所獲得之正己烷、乙酸乙酯、正丁醇及水等四種萃取液，過濾濃縮後，產率如表5-1所示，以水層萃取物產率較高，濕重產率為3.36%，乾重產率為3.38%，其次為正丁醇萃取物濕重產率為2.32%，乾重產率為2.33%，而正己烷萃取物產率為1.85%，乾重產率為1.86%，乙酸乙酯濕重及乾重產率皆為0.59%。

二、馬鞭草萃取物之總酚含量

由文獻得知植物之多酚類化合物對於其抗氧化性及生物活性扮演重要之角色(Castelluccio *et al.*, 1995; Kalt *et al.*, 1999)，Folin-Ciocalteu's assay為一種廣泛應用於測量總酚類化合物的方法，Folin-Ciocalteu's phenol reagent 可作用於酚類化合物結構上的OH基，並產生由黃變藍的呈色反應(Julkunen-Titto, 1985)。本實驗以gallic acid 作為標準品，換算相對gallic acid之當量。將四種溶劑(正己烷、乙酸乙酯、正丁醇、水)萃取物，進行總酚類化合物含量分析，從實驗結果(表5-2)顯示馬鞭草四種萃取物中，以正丁醇萃取物具有最高

的總酚含量。

表5-1、馬鞭草四種溶劑之萃取出產率

Table 5-1 Yields of the solvent extracts from *Verbena officinalis* L.

Extract	weight(g)	wet weight yeild(%)	dry weight yeild(%)
n-hexane	81.05	1.85	1.86
EtOAc	25.75	0.59	0.59
n-butanol	101.25	2.32	2.33
Water	147.11	3.36	3.38
Total	355.16	8.12	8.16

Sample wet weight: 4372.28g

Sample dry weight: 4350.41g

表5-2、馬鞭草各種溶劑萃取出物之總多酚、總類黃酮含量

Table 5-2 The total polyphenol and total flavonoid contents of different solvent extracts from *Verbena officinalis* L.

Extract	Total phenolic content	Total flavonoid content
n-hexane	157.43 ± 3.07	9.66 ± 0.35
EtOAc	234.57 ± 2.16	16.47 ± 0.17
n-butanol	250.29 ± 2.11	13.28 ± 0.15
Water	138.38 ± 5.06	0.41 ± 0.03

*Total phenolic content : μ g gallic acid equivalent / μ L *Verbena officinalis* L. extract

*Total flavonoid content : μ g quercetin equivalent / μ L *Verbena officinalis* L. extract

三、馬鞭草各種溶劑萃取物之總類黃酮含量

類黃酮(flavonoids)屬於酚類化合物之類物質，存在於許多蔬菜、水果中，類黃酮化合物於鹼性條件下可與硝酸鋁形成穩定的黃色錯合物(唐等人，1996；鍾，2003)。本實驗以quercetin 作為標準品，換算相對quercetin 之量。將四種溶劑(正己烷、乙酸乙酯、正丁醇、水)萃取物，進行總類黃酮化合物含量分析，從實驗結果(表5-2) 顯示馬鞭草乙酸乙酯萃取物具有最高的總類黃酮含量，而正丁醇萃取物總類黃酮含量次之。

四、馬鞭草各種溶劑萃取物之DPPH自由基清除能力

本實驗檢測五種溶劑(甲醇、正己烷、乙酸乙酯、正丁醇、水)萃取物之DPPH自由基消除作用。抗氧化性檢測結果顯示四種溶劑萃取物中以馬鞭草正丁醇萃取物之消除DPPH自由基抗氧化性最好，其清除率達94.27% (圖5-1)。

五、馬鞭草萃取物之醣解酵素抑制活性

本實驗所使用的醣解酵素包括 α -amylase 及 α -glucosidase 二種，馬鞭草五種溶劑萃取物進行 α -amylase 酵素抑制分析，實驗結果(圖5-2)顯示正丁醇萃取物有較高之抑制率 18.25%；此五種溶劑萃取物進行 α -glucosidase 酵素抑制分析，實驗結果(圖 5-3)亦顯示正丁醇萃取物有最高之抑制率 81.82%。

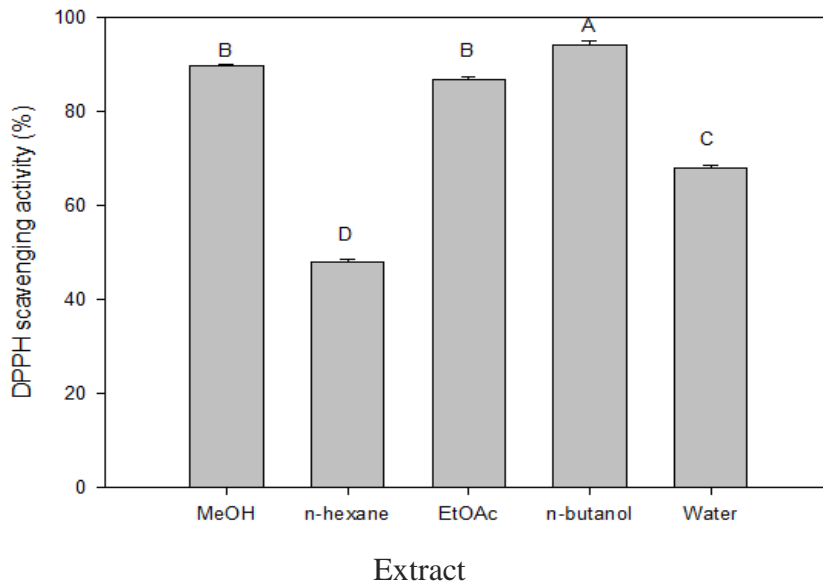


圖 5-1、馬鞭草各種萃取物(1 mg/mL)之 DPPH 自由基清除能力。

Fig. 5-1 Scavenging activity of different solvent extracts at 1mg/mL level from *Verbena officinalis* L. on DPPH radical. Bars represent means \pm SD, n=3. Means with different letters are significant different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

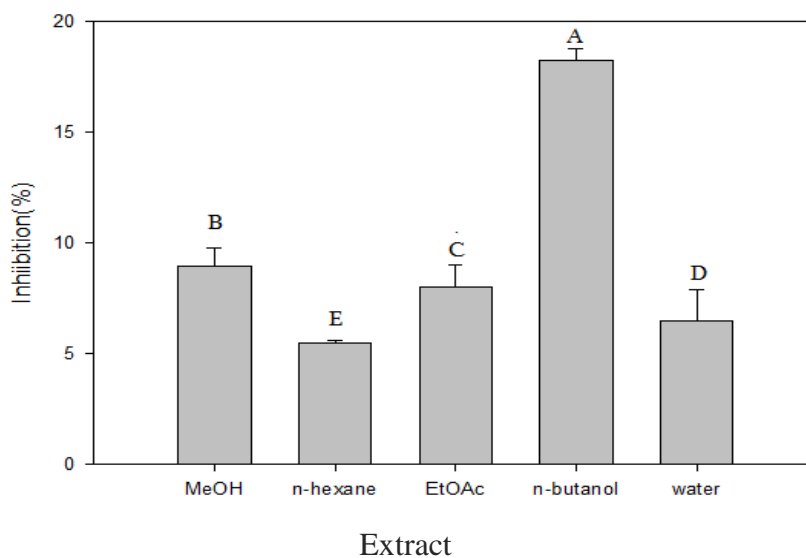


圖 5-2、馬鞭草不同溶劑萃取物(0.1mg/mL)對 α -amylase 之抑制率。

Fig. 5-2 α -amylase inhibitory activity of different solvent extracts at 0.1mg/mL level from *Verbena officinalis* L. Bars represent means \pm SD, n=3. Means with different letters are significant different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

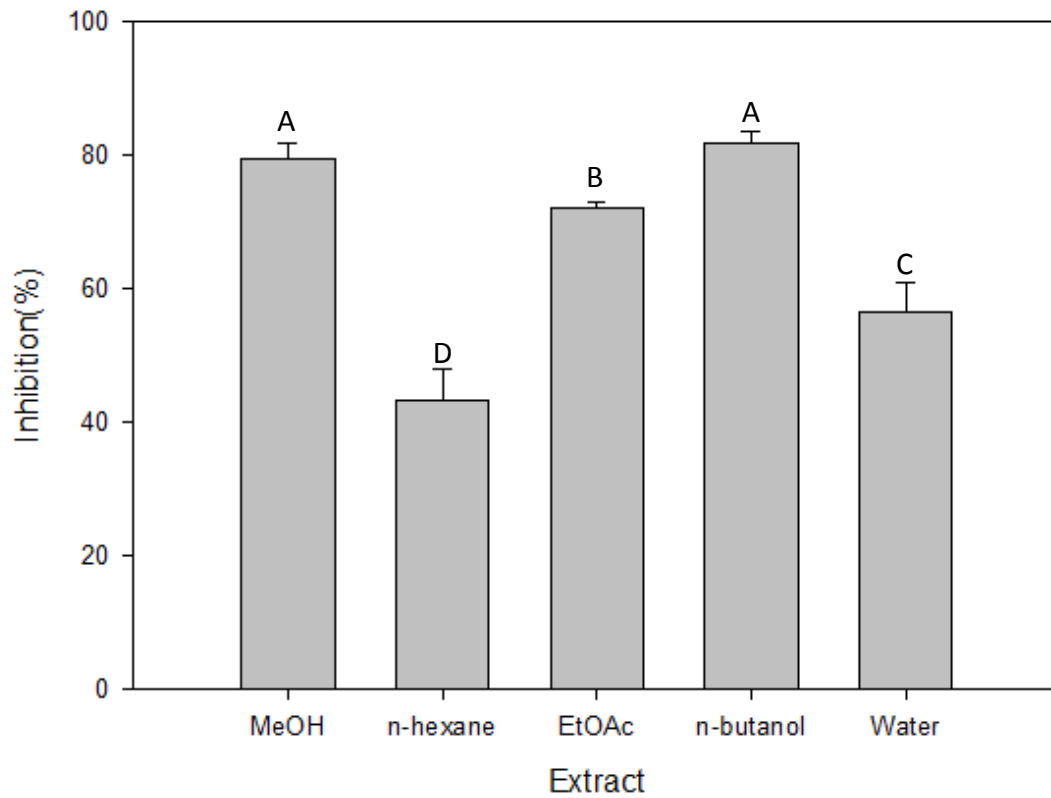


圖 5-3、馬鞭草不同溶劑萃取物(0.1mg/mL)對 α -glucosudase之抑制率。

Fig. 5-3 α - glucosudase inhibitory activity of different solvent extracts at 0.1mg/mL level from *Verbena officinalis* L. Bars represent means \pm SD, n=3. Means with different letters are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

六、馬鞭草正丁醇萃取物抗氧化及抑制醣解酵素活性成分之分離純化

1. XAD-7 液相管柱層析

馬鞭草正丁醇萃取物預先以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，因其在波長 280nm 具有最大吸收值，故選取 280nm 為液相管柱層析物質之偵測波長。首先將 XAD-7 充填於玻璃管柱(700 × 45 mm)進行液相管柱層析，其沖提液條件依序是水：甲醇(v/v)=100：0、80：20、60：40、40：60、0：100、丙酮：甲醇(v/v)=50：50 之混合溶劑，沖提液以每 300mL 為收集單位，並以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，偵測波長 280nm 之吸光值對收集瓶作圖進行區分，共取 6 個區分，將 6 個區分物依序命名為區分 A、B、C、D、E、F(圖 5-4)。其產率如表 5-3 所示。將 6 個區分物進行 DPPH 自由基清除能力(圖 5-6)及硫氰酸鐵法(圖 5-5)之抗氧化性檢測，及醣解酵素抑制作用測試(圖 5-7)，綜合抗氧化測試及醣解酵素抑制活性試驗結果，五個區分物中，以區分 C 及區分 D 具有較佳的活性，經 HPLC 分析後由於其圖譜類似，又為鄰近區分，推測其成分相近，因此將區分 C 及 D 混合後進行更進一步分析。

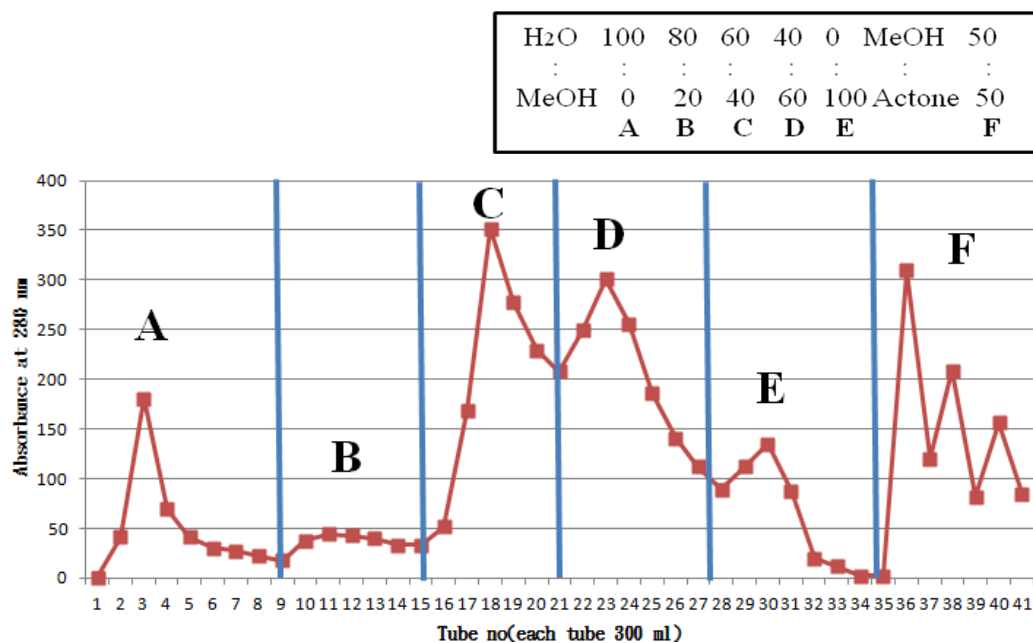


圖5-4、馬鞭草正丁醇萃取物之XAD-7液相管柱層析圖。

Fig. 5-4 The XAD-7 column chromatogram of eluted fractions from *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L.

表 5-3、馬鞭草正丁醇萃取物經 XAD-7 液相層析後各沖提區分之產率

Table 5-3 Yields of fractions eluted from *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L. by XAD-7 column chromatogram

Fraction	Weight(g)	Yield(%) ^a
A	42.29	41.77
B	5.49	5.42
C	17.88	17.67
D	16.32	16.12
E	3.18	3.14
F	0.08	0.07

^aSample weight : 101.25 g

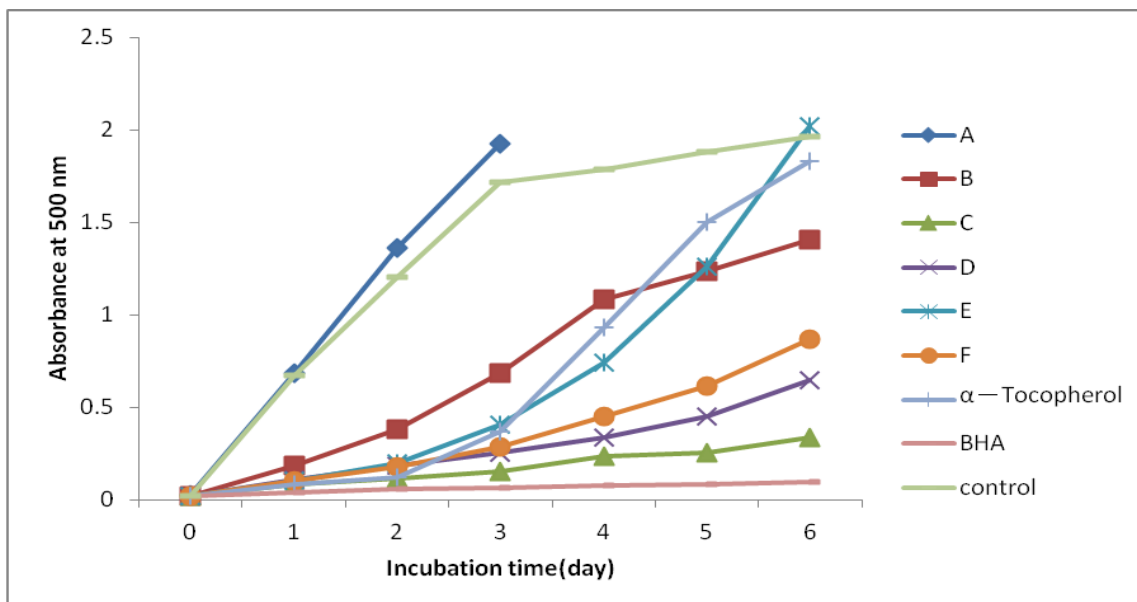


圖 5-5、馬鞭草正丁醇萃取物(1mg/mL)經 XAD-7 膠體液相管柱層析各沖提區分之抗氧化性。

Fig. 5-5 Antioxidative activity of XAD-7 chromatography eluted fractions at 1mg/mL level from *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L. by the ferric thiocyanate method.

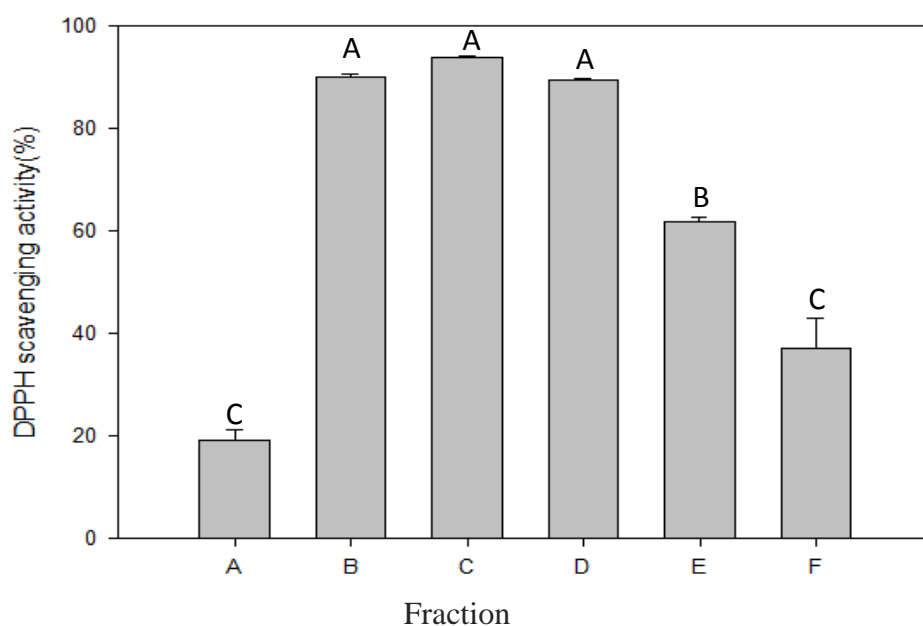


圖 5-6、馬鞭草正丁醇萃取物經 XAD-7 膠體液相管柱層析各沖提區分(1mg/mL) 之 DPPH 自由基清除能力。

Fig. 5-6 DPPH radical scavenging activity of eluted fractions at 1mg/mL level from *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L. by XAD-7 chromatography. Bars represent means \pm SD, n=3. Means with different letters are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

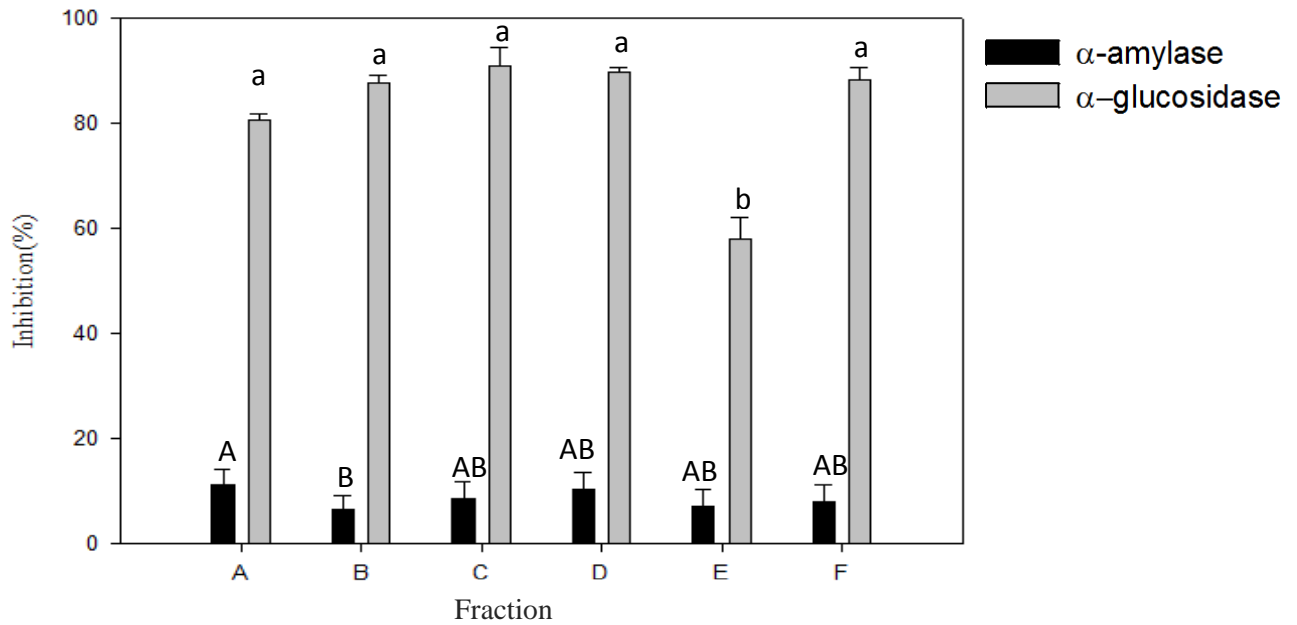


圖 5-7、馬鞭草正丁醇萃取物經 XAD-7 液相管柱層析區分物(0.1mg/mL)之 α -amylase 及 α -glucosidase 抑制活性。

Fig. 5-7 α -amylase and α -glucosidase inhibitory activity of eluted fractions at 0.1mg/mL level from *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L. by XAD-7 chromatography. Bars represent means \pm SD, n=3. Means with different letters within the same enzyme are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

2.馬鞭草正丁醇萃取物區分(C+D)之第一次 Cosmosil 75 C₁₈-OPN 液相管柱層析

如同上述，將區分(C+D)混合沖提區分液預先以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，因其在波長 291nm 具有最大吸收值，故選取 291nm 為液相管柱層析物質之偵測波長。將上述區分 C+D 濃縮物懸浮置入充填 Cosmosil 75 C₁₈-OPN 之膠體玻璃管柱充填於玻璃管柱(600×24.5 mm) 進行第一次 Cosmosil 75 C₁₈-OPN 液相管柱層析，其沖提液條件依序是水：甲醇(v/v)=100：0、80：20、60：40、50：50、30：70、70：30 之混合溶劑，沖提液以每 50mL 為收集單位，並以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，偵測波長 291nm 之吸光值對收集瓶作圖進行區分，共取 4 個區分，將個區分物依序命名為區分 I、II、III、IV (圖 5-8)，其產率如表 5-4 所示。將此 4 個區分進行總抗氧化力及醣解酵素抑制作用檢測(圖 5-9、圖 5-10)，結果顯為區分 I 及 II 皆有較佳活性，經 HPLC 分析後，此兩區分之 HPLC 層析圖譜類似，推測可能含有相近的物質，因此再將此兩個區分沖提物混合後，調整沖提條件再進行第二次 Cosmosil 75 C₁₈-OPN 液相管柱層析。

H ₂ O	100	80	60	50	30	70
:	:	:	:	:	:	:
MeOH	0	20	40	50	70	30
	I		II		III	
					IV	

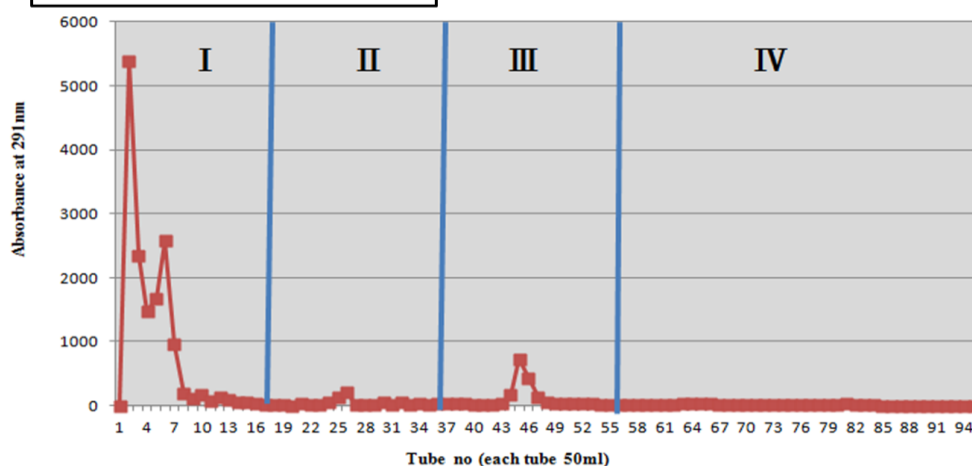


圖 5-8、馬鞭草正丁醇萃取物區分(C+D)之 Cosmosil 75 C₁₈-OPN 液相管柱層析圖。

Fig. 5-8 The first Cosmosil 75 C₁₈-OPN chromatogram of eluted fractions from fraction (C+D) of *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L.

表 5-4、馬鞭草正丁醇萃取物區分(C+D)經第一次 Cosmosil 75 C₁₈-OPN 液相層析後各沖提區分之產率

Table 5-4 Yields of eluted fractions from fraction (C+D) from *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L. by Cosmosil 75 C₁₈-OPN chromatogram

Fraction	Weight(g)	Yield(%) ^a
I	14.00	40.92
II	3.39	9.9
III	3.6	10.52
IV	1.96	5.73

^aSample weight (Fr .C+D) : 34.201 g

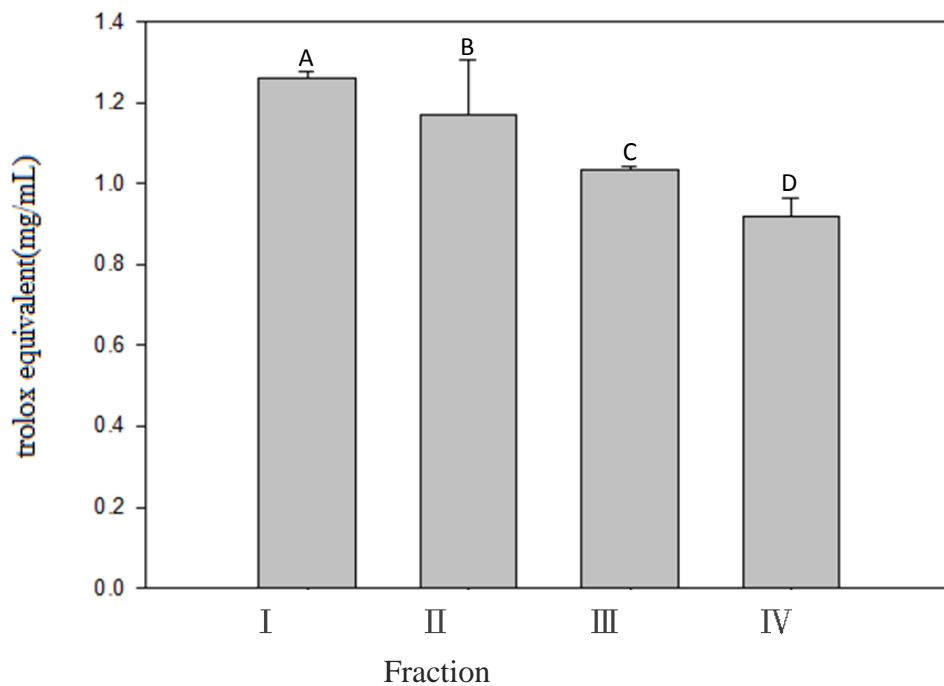


圖 5-9、馬鞭草正丁醇萃取物區分(C+D)經 Cosmosil 75 C₁₈-OPN 液相管柱層析後各沖提區分(1mg/mL)之總抗氧化力以 trolox 當量表示。

Fig. 5-9 Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of the first Cosmosil 75 C₁₈-OPN eluted fractions at 1mg/mL level from fraction (C+D) of *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L. Bars represent means±SD, n=3. Means with different letters are significant different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

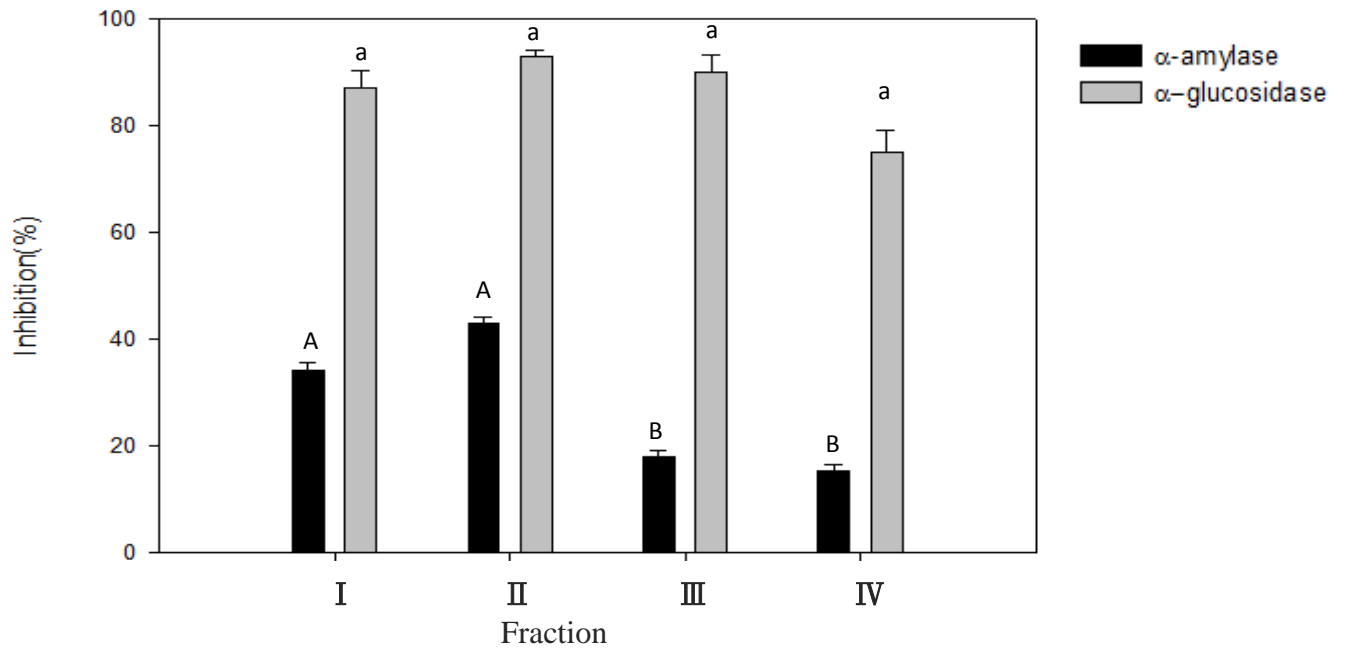


圖 5-10、馬鞭草正丁醇萃取物區分(C+D)經第一次 Cosmosil 75 C₁₈-OPN 液相管柱層析後各沖提區分(0.1mg/mL)之 α -amylase 及 α -glucosidase 抑制活性。

Fig. 5-10 α -amylase and α -glucosidase inhibitory activities of the first Cosmosil 75 C₁₈-OPN eluted fractions at 0.1mg/mL level from fraction (C+D) of *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L. Bars represent means \pm SD, n=3. Means with different letters within the same enzyme are significant different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.馬鞭草正丁醇萃取物區分(I+II)之第二次 Cosmosil 75 C₁₈-OPN 液相管柱層析

如同上述，將區分(I+II)混合沖提液預先以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，因其在波長 330nm 具有最大吸收值，故選取 330nm 為液相管柱層析物質之偵測波長。將上述區分(I+II)濃縮物置入充填 Cosmosil 75 C₁₈-OPN 之膠體玻璃管柱充填於玻璃管柱(600×24.5 mm)進行第二次 Cosmosil 75 C₁₈-OPN 液相管柱層析，調整後的沖提劑條件依序是水：甲醇(v/v)=100：0、95：05、90：10、85：15、80：20、50：50 之混合溶劑，沖提液以每 50mL 為收集單位，並以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，偵測波長 330nm 之吸光值對收集瓶作圖進行區分，共取 5 個區分，將個區分物依序命名為區分 a、b、c、d、e(圖 5-11)，其產率如表 5-5 所示，而後利用總抗氧化力及醣解酵素抑制作用檢測各區分濃縮物之活性(圖 5-12、圖 5-13)。最後選擇活性高且含量也較多的區分 a，重複利用高效液相層析儀(high performance liquid chromatography, HPLC)進行各活性成分之分析及製備。

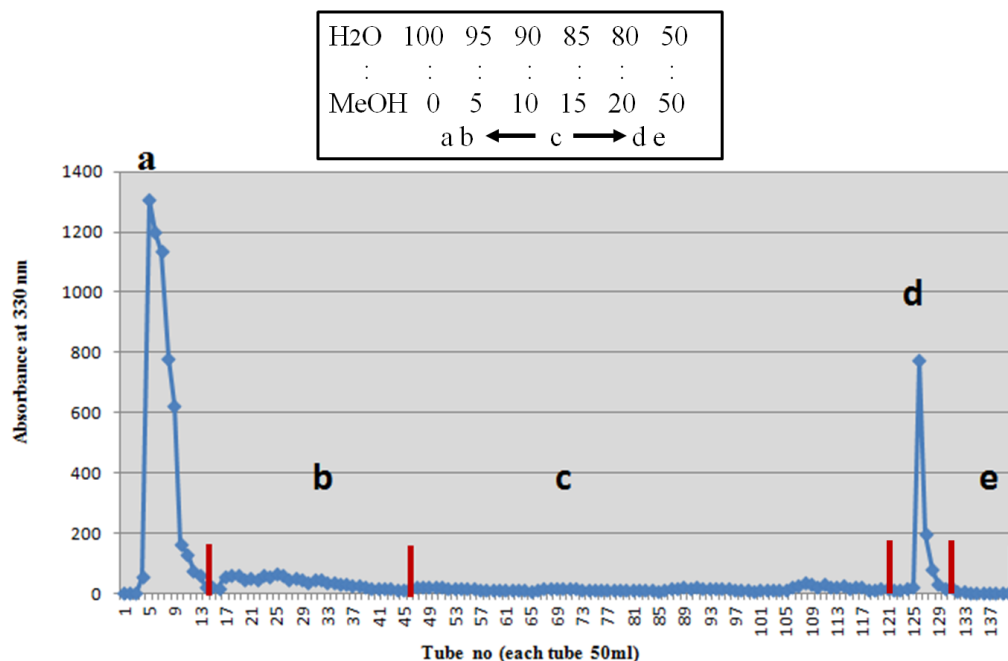


圖 5-11、馬鞭草正丁醇萃取物區分(I + II)之第二次 Cosmosil 75 C₁₈-OPN 液相管柱層析圖。

Fig. 5-11 The secondary Cosmosil 75 C₁₈-OPN column chromatogram of eluted fractions from fraction (I + II) of *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L.

表 5-5、馬鞭草正丁醇萃取物區分(I + II)經第二次 Cosmosil 75 C₁₈-OPN 液相層析後各沖提區分之產率

Table 5-5 Yields of eluted fractions from fraction(I + II) from *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L. by the secondary Cosmosil 75 C₁₈-OPN column chromatogram

Fraction	Weight(g)	Yield(%) ^a
a	9.8	56.34
b	2.53	14.55
c	2.48	14.26
d	2.2	12.65
e	0.21	1.21

^aSample weight(Fr. I + II) : 17.3935g

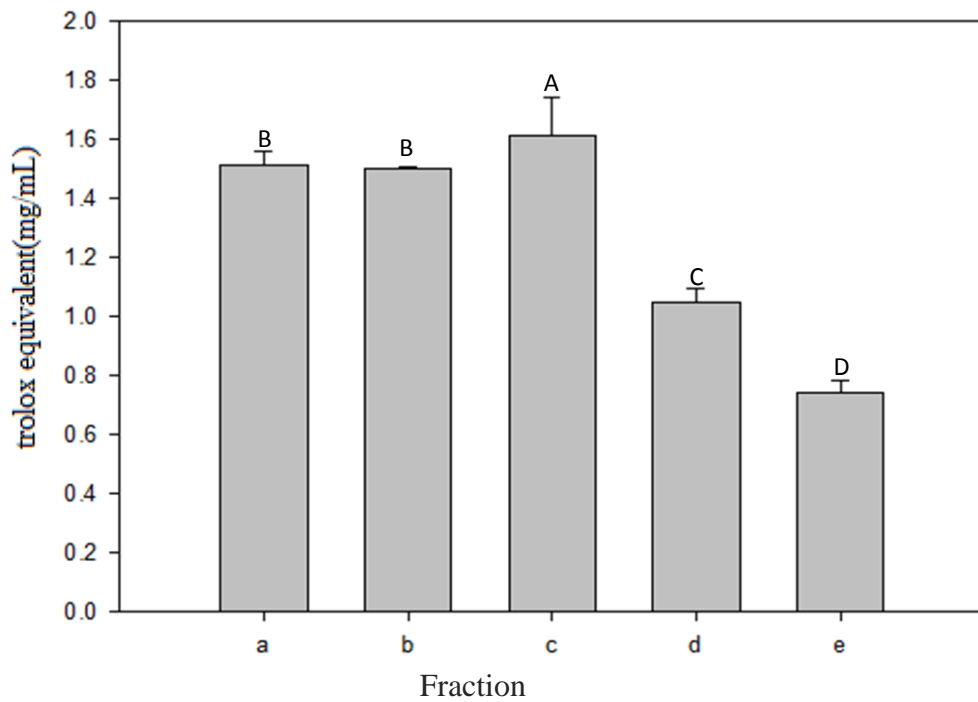


圖 5-12 馬鞭草正丁醇萃取物區分 (I + II) 經第二次 Cosmosil 75 C₁₈-OPN 液相管柱層析後各沖提區分 (1mg/mL) 之總抗氧化力以 trolox 當量表示。

Fig. 5-12 Trolox equivalent (TEAC) of the secondary Cosmosil 75 C₁₈-OPN eluted fractions at 1mg/mL level from fraction (I + II) of *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L. Bars represent means±SD, n=3. Means with different letters are significant different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

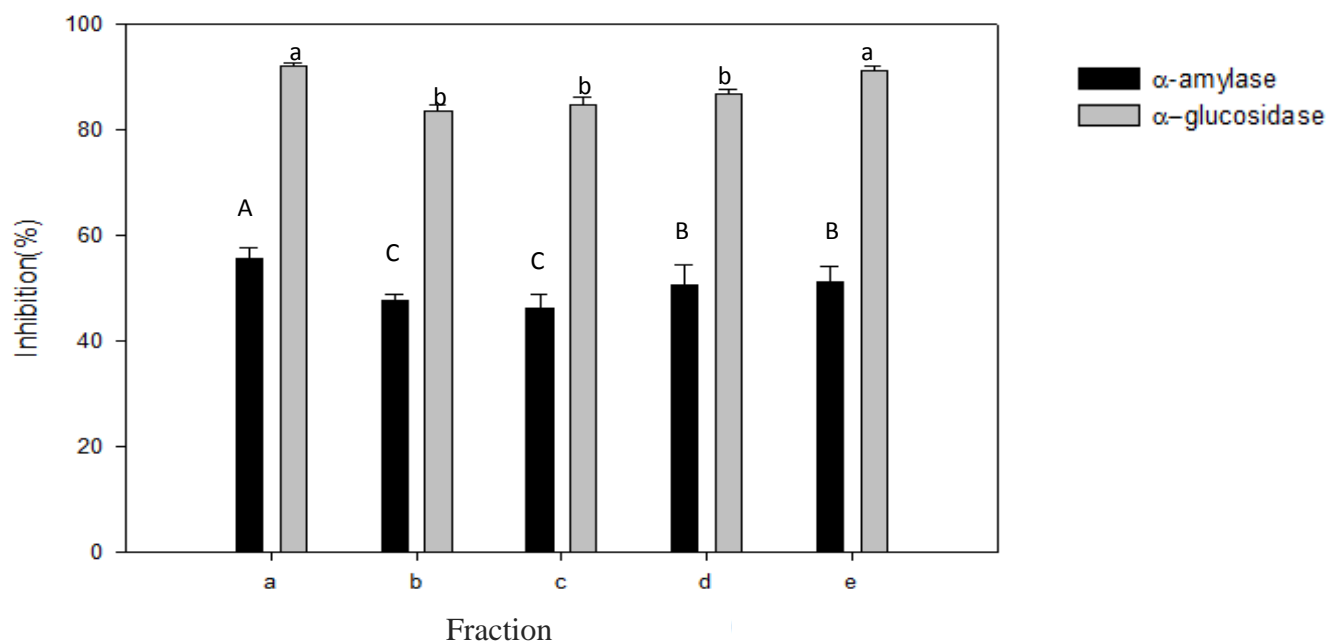


圖 5-13 馬鞭草正丁醇萃取物區分(I + II)經第二次 Cosmosil 75 C₁₈-OPN 液相管柱層析後各沖提區分(0.1mg/mL)之 α -amylase 及 α -glucosidase 之抑制活性。

Fig. 5-13 α -amylase and α -glucosidase inhibitory activity of the second Cosmosil 75 C₁₈-OPN eluted fractions at 0.1mg/mL level from fraction (I + II) of *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L. Bars represent means \pm SD, n=3. Means with different letters within the same enzyme are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

4.馬鞭草正丁醇萃取物區分 a 之 HPLC 分析及製備

將上述量較多且抗氧化、醣解酵素抑制活性佳之成分區分 a 沖提液，預先以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，因其在波長 330nm 具有最大吸收值，故選取 330nm 為液相管柱層析物質之偵測波長。將馬鞭草正丁醇萃取物區分 a 濃縮至乾，爾後溶於甲醇，經由 0.45 μ m 之過濾膜過濾後進行 HPLC 分析，並以分析型高效液相層析儀尋找良好的分離條件為 H₂O : MeOH : 三氟醋酸 (v/v/v) = 49.9 : 50 : 0.1，流速 0.8 ml/min，偵測波長為 330nm，結果顯示於圖 5-14，由於還是沒有將物質分離，因此繼續重複收集分離成 6 個區分，區分 a-1、a-2、a-3、a-4、a-5、a-6(圖 5-14)，同樣進行總抗氧化力(圖 5-14)及醣解酵素抑制作用(圖 5-15)檢測各區分濃縮物之活性，最後選取抗氧化力及醣解酵素抑制活性較佳之 a-1、a-3、a-5、a-6 等四個區分繼續 HPLC 進行純化。

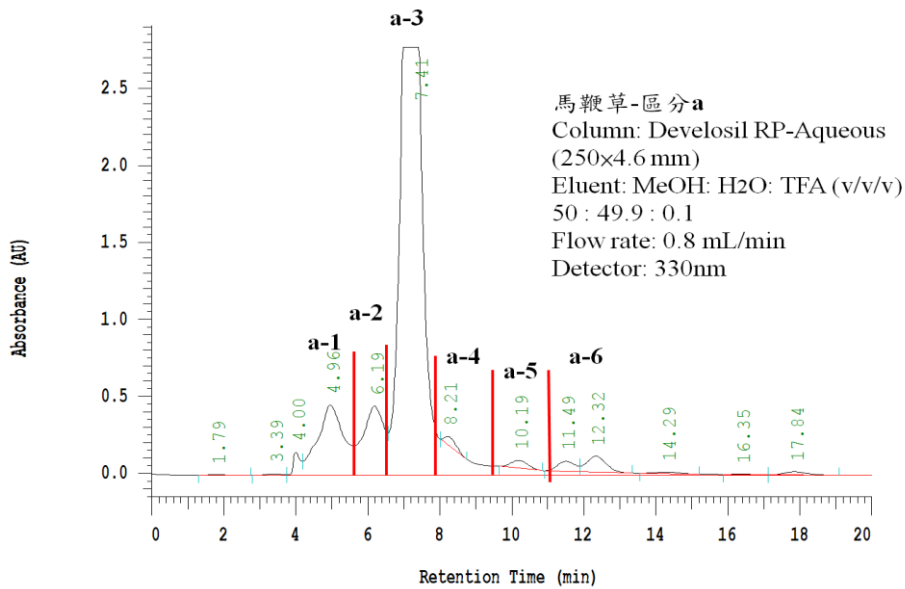


圖 5-14、馬鞭草正丁醇萃取物區分 **a** 之分析型 HPLC 圖。

Fig. 5-14 Analytical HPLC chromatogram of fraction **a** of *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L.

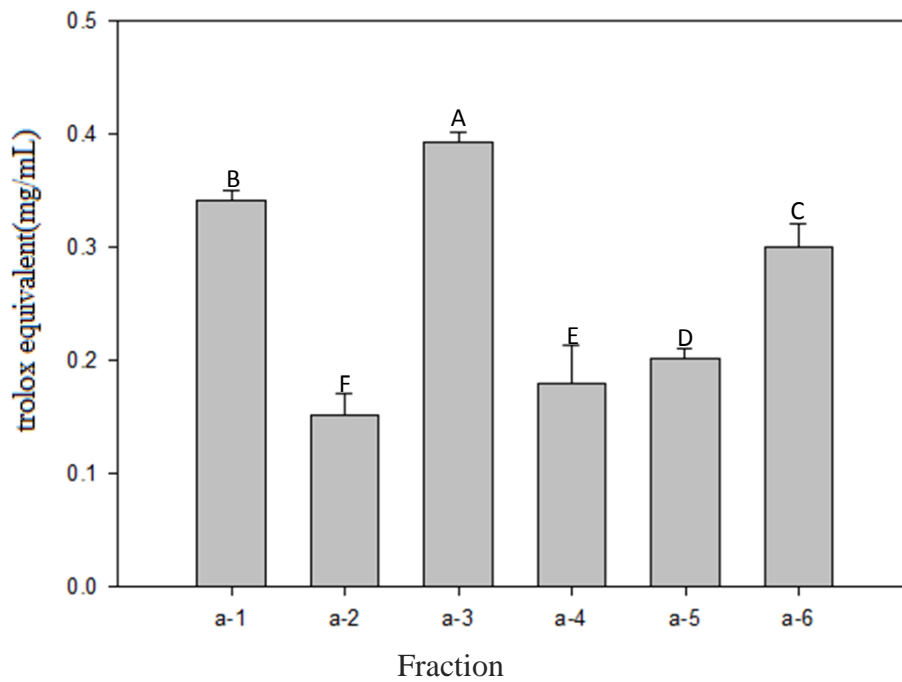


圖 5-15、馬鞭草正丁醇萃取物區分 **a** 經 HPLC 層析後各沖提區分 (1mg/mL) 之總抗氧化力以 trolox 當量表示。

Fig. 5-15 Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of the HPLC eluted fractions at 1mg/mL level from fraction **a** of *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L. Bars represent means \pm SD, n=3. Means with different letters are significant different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

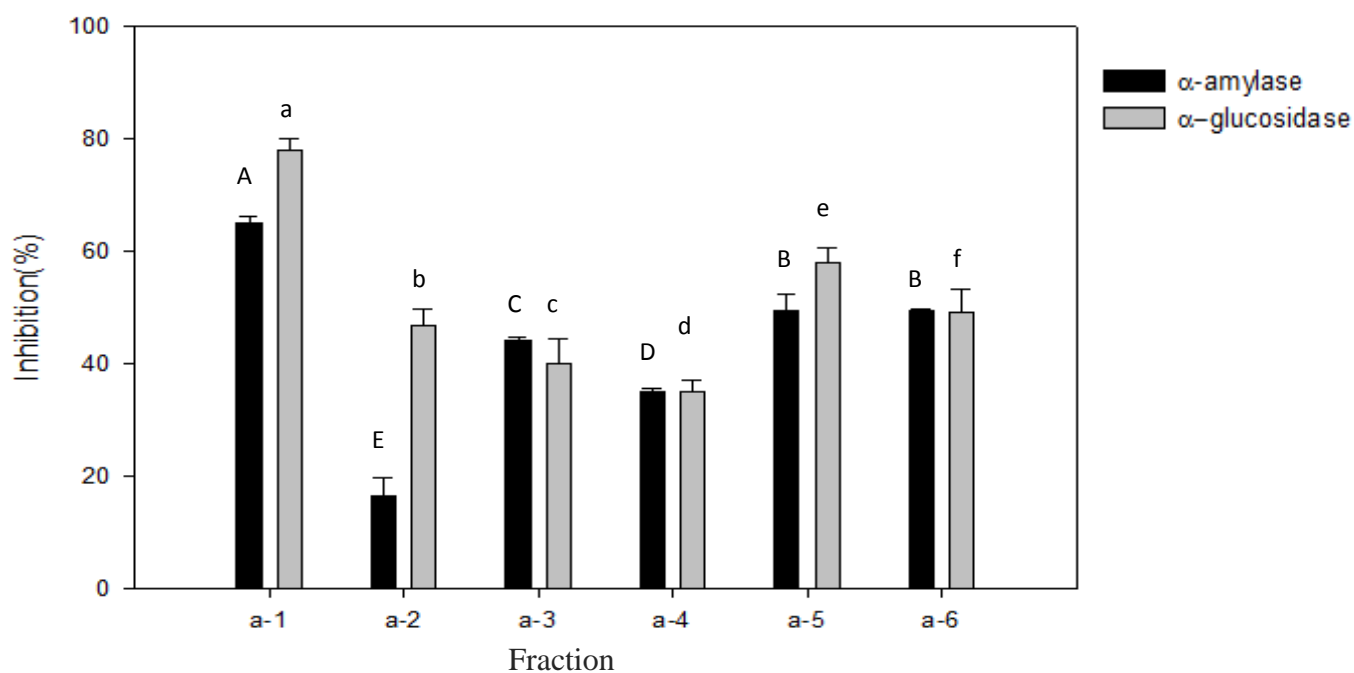


圖 5-16、馬鞭草正丁醇萃取物區分 **a** 經 HPLC 層析後各沖提區分 (0.1mg/mL) 之 α -amylase 及 α -glucosidase 抑制活性。

Fig 5-16 α -amylase and α -glucosidase inhibitory activity of the HPLC eluted fractions at 0.1mg/mL level from fraction **a** of *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L. Bars represent means \pm SD, n=3. Means with different letters within the same enzyme are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

5. 馬鞭草正丁醇萃取物區分 a-1、a-3、a-5、a-6 之 HPLC 分析及製備

將分區分 a-1、a-3、a-5、a-6 區分沖提液，預先以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，因其在波長 330nm 具有最大吸收值，故選取 330 nm 為 HPLC 之偵測波長。馬鞭草正丁醇萃取物區分 a-1、a-3、a-5、a-6 先行濃縮至乾，爾後溶於甲醇，並經由 0.45 μ m 之過濾膜過濾後進行分析型 HPLC 分析，沖提條件為 H₂O : MeOH : 三氟醋酸 (v/v/v) = 49.9 : 50 : 0.1，流速 0.8 ml/min，偵測波長為 330nm，結果顯示於圖 5-17、圖 5-18、圖 5-19、圖 5-20，將圖中的主要波峰，利用相同的移動相與波長條件，流速為 3.5 mL/min 之製備型高效液相層析儀進行分離，重覆收集層析圖上滯流時間相同主要波峰之沖提區分，得到純化物質 **1**、**2**、**3**、**4**、**5**(圖 5-21、圖 5-22、圖 5-23、圖 5-24、圖 5-25)，其產率如表 5-7 所示，5 種純化物質，同時檢測 UV，MS，¹H-NMR 及 ¹³C-NMR 的光譜，再解析光譜及比對文獻資訊進行結構鑑定。

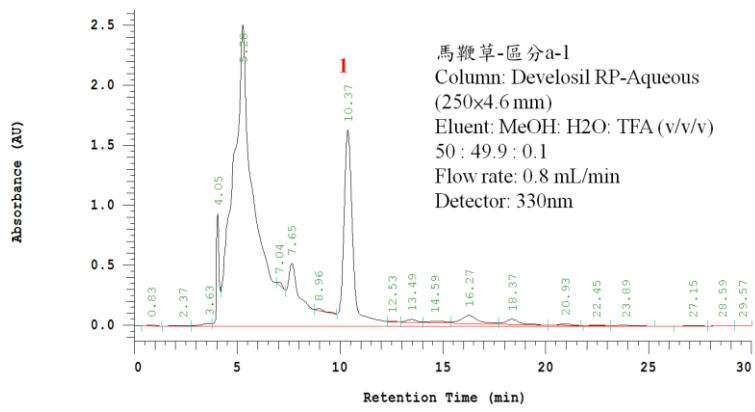


圖5-17、馬鞭草正丁醇萃取物區分 a-1 之分析型HPLC 圖。

Fig. 5-17 Analytical HPLC chromatogram of isolated component from a-1 fraction of *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L.

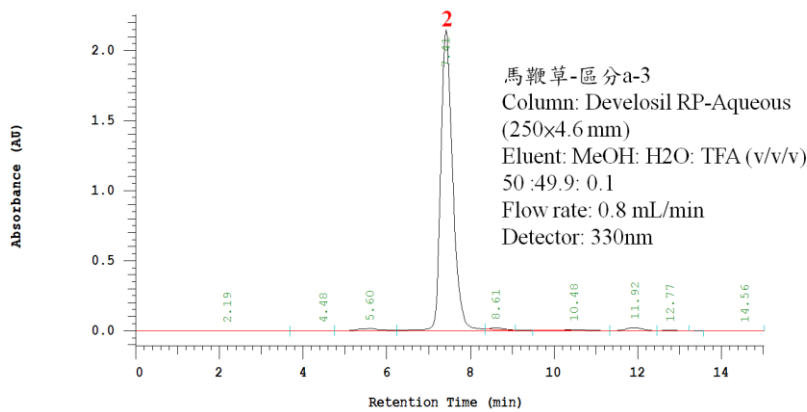


圖5-18、馬鞭草正丁醇萃取物區分 a-3 之分析型HPLC 圖。

Fig. 5-18 Analytical HPLC chromatogram of isolated component from a-3 fraction of *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L.

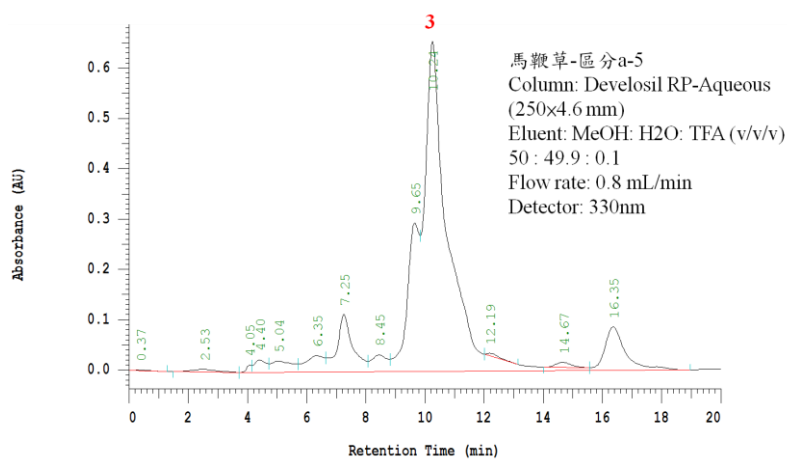


圖5-19、馬鞭草正丁醇萃取物區分 a-5 之分析型HPLC 圖。

Fig. 5-19 Analytical HPLC chromatogram of isolated component from a-5 fraction of *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L.

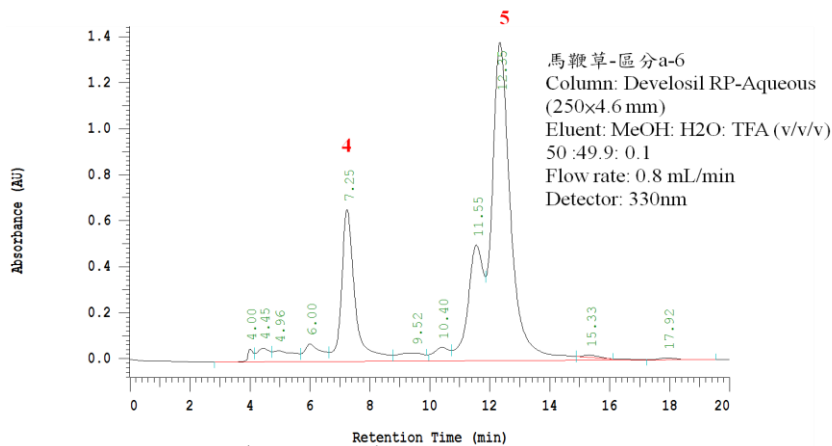


圖5-20、馬鞭草正丁醇萃取物區分 a-6 之分析型HPLC 圖。

Fig. 5-20 Analytical HPLC chromatogram of isolated components from a-6 fraction of *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L.

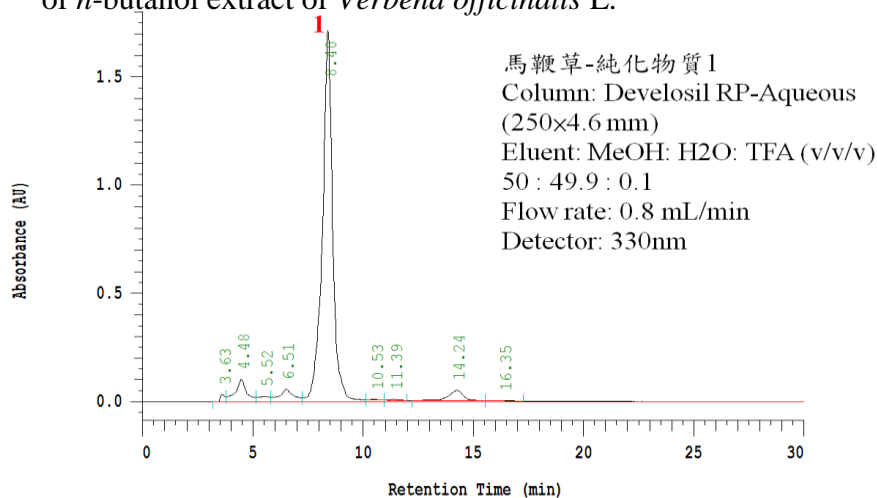


圖5-21、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質 1 之分析型HPLC 圖。

Fig. 5-21 Analytical HPLC chromatogram of isolated component 1 from *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L.

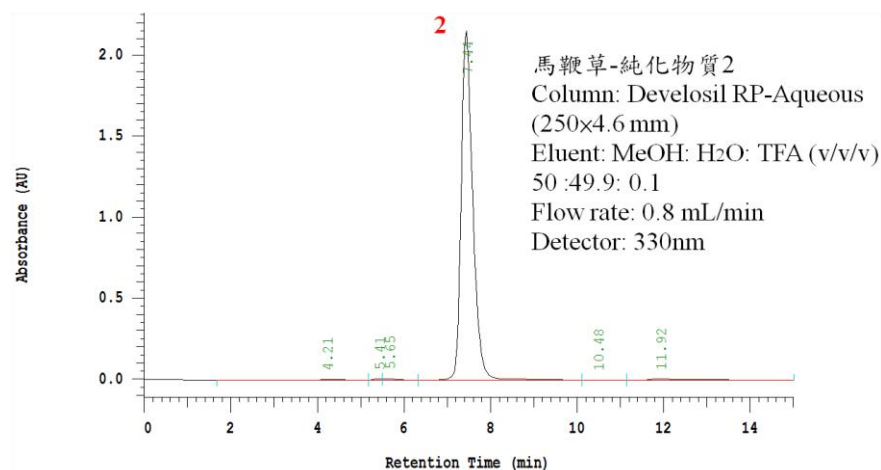


圖5-22、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質 2 之分析型HPLC 圖。

Fig. 5-22 Analytical HPLC chromatogram of isolated component 2 from *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L.

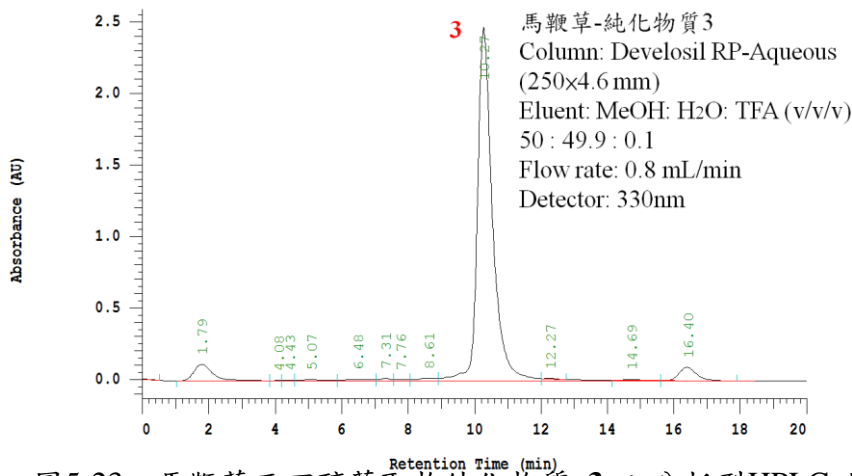


圖5-23、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質 **3** 之分析型HPLC 圖。

Fig. 5-23 Analytical HPLC chromatogram of isolated component **3** from *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L.

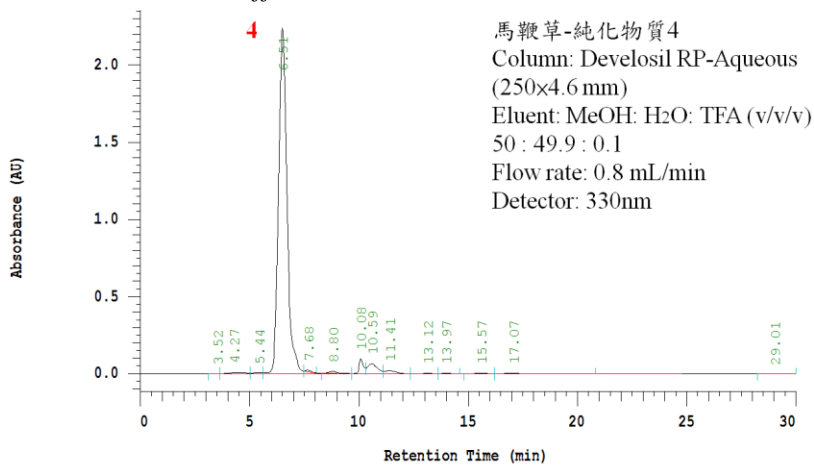


圖5-24、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質 **4** 之分析型HPLC 圖。

Fig. 5-24 Analytical HPLC chromatogram of isolated component **4** from *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L.

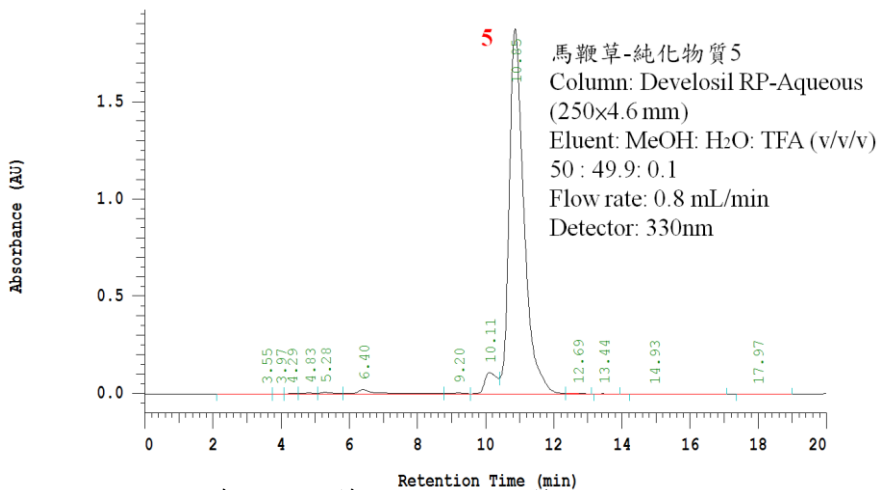


圖5-25、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質 **5** 之分析型HPLC 圖。

Fig. 5-25 Analytical HPLC chromatogram of isolated component **5** from *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L.

6. 馬鞭草正丁醇萃取物純化物質之結構鑑定

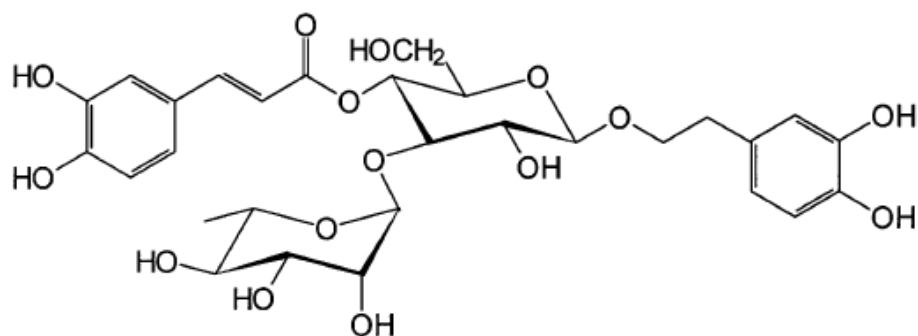
馬鞭草正丁醇萃取物純化出的純化物質分別利用UV, ^1H 及 ^{13}C -NMR及LC-MS-MS進行結構鑑定。並對照已知文獻鑑定出5種苯乙醇苷類化合物(phenyl ethanoid glycosides)，分別為 isoverbascoside (1)、verbascoside (2)、eukovoside (3)、eukovoside isomer (4) 及 β -hydroxyverbascoside (5)。由於純化物質2 (6047.00 mg) 及1 (145.53 mg)的純化量較多(表 5-7)，測得的 ^1H 及 ^{13}C -NMR光譜資訊(表 5-6)較充分，故先就這二種純化物質進行詳盡的光譜分析。

表5-6、純化物質1及2之 ^1H 及 ^{13}C -NMR 化學位移 (ppm,CD₃OD)

Table 5-6 ^1H and ^{13}C -NMR spectrum for the isolated component 1 and 2

Moiety	Carbon position	2(verbascoside) ^1H (J)	^{13}C	1(isoverbascoside) ^1H (J)	^{13}C
Aglycone	1		131.6		131.4
	2	6.69 (d,2)	117.2	6.68 (d,2.1)	117.1
	3		146.2		146.1
	4		144.7		144.6
	5	6.78 (d,8)	116.4	6.66 (d,7.5)	116.3
	6	6.56 (dd,2,8)	121.4	6.55 (dd,2.4,7.8)	121.2
	7	2.78 (ddd,3.5,7,14), 2.80 (ddd,3,7,14)	36.6	2.78 (m), 2.78 (m)	36.7
	8	3.72 (ddd,6.5,7,8), 4.04 (ddd,3, 6.5,8)	72.3	3.68 (m), 3.72 (m)	72.2
Glucose	1	4.37 (d,8)	104.3	4.36 (d,8.1)	104.4
	2	3.39 (dd,7.5, 9.5)	76.3	3.35 (m)	76.4
	3	3.83 (t,9.3)	81.7	3.81 (t,10.5,3)	78.2
	4	4.93 (t,9.5)	70.6	3.4-3.5 (m)	70.4
	5	3.53 (m)	76.1	3.60 (m)	75.7
	6	3.55 (m), 3.63 (d,10)	62.4	4.46 (m), 4.28 (m)	64.6
Caffeic acid	1'		127.7		127.6
	2'	7.06 (d,2)	115.3	7.04 (d,2.1)	115.0
	3'		146.9		146.7
	4'		149.8		149.6
	5'	6.78 (d,8)	116.6	6.76 (d,8.1)	116.5
	6'	7.01 (dd,2,8)	123.3	6.96 (dd,2.1,8.1)	123.1
	7'	7.59 (d,16)	148.1	7.59 (d,15.9)	147.2
	8'	6.28 (d,16)	114.8	6.26 (d,15.9)	114.8
	9		168.4		169.1
Rhamnose	1	5.19 (d,2)	103.1	5.17 (s)	102.7
	2	3.93 (dd,2,3)	72.4	3.90 (m)	72.3
	3	3.56 (dd,3,9.5)	70.5	3.56 (m)	70.4
	4	3.30 (t,9.5)	73.9	3.5-3.8 (m)	73.8
	5	3.56 (m)	72.1	4.00 (m)	72.2
	6	1.09 (d,6)	18.5	1.17 (d,6)	17.9

6-1 純化物質2 之結構鑑定



UV λ max (MeOH) nm: 245,290,335

Formula : C₂₉H₃₆O₁₅

MW: 624

純化物質2 呈現白色結晶粉末，由 UV-visible 光譜(圖 5-26) λ max (MeOH) 245, 290, 335 nm，顯示苯環K band及B band的特徵吸收帶，由¹H-NMR光譜(圖 5-27，表 5-6) 在低磁場領域顯示二組苯環ABX三取代的三個質子波訊， δ 6.56 (1H, d d, J=2, 8 Hz), 6.69(1H, d, J=2 Hz), 6.78(1H, d, J=8 Hz) 及6.78 (1H, d, J=8), 7.01 (1H, d d, J=2, 8Hz), 7.59 (7.06, d d, J=2 Hz), 另外6.28 (1H, d, J=16 Hz) 及7.59 (1H, d, J=16 Hz) 則為caffeoyl 基團trans-form 雙鍵上的二個質子波訊，較高磁場糖基的部分 δ 4.37 (1H, d, J=8), 5.19 (1H, d, J=2) 分別為glucosyl 及rhamnosyl H-1 的質子波訊， δ 3.39- δ 4.93則為glucosyl及rhamnosyl 的10個質子波訊， δ 1.09則為rhamnosyl上甲基的質子波訊，其中 glycosyl H-4的質子波訊從 δ 3.5 shift δ 4.9，推測接上caffeoyl基團，¹³C-NMR(圖 5-28，表 5-6)，亦呈現以glucosyl基團為中心，C-1接上 phenyl ethanoxy，C-3接上rhamnosyl，C-4接上caffeoyl基團，再透過¹H-¹H COSY, ¹H-¹H NOESY, ¹H-¹³C HSQC, ¹H-¹³C HMBC光譜(data未呈現)解析與文獻比對(Gomez-Aguirre et al., 2012)，純化物質2 的結構鑑定為verbascoside。

Verbascoside為苯乙醇苷類化合物，是馬鞭草主要成分之一，研究指出verbascoside具有明顯的體內外抗疲勞活性和提高小鼠運動能力的作用(中科院昆明植物研究所，2008)。另外有學者指出verbascoside在 1.60×10^{-6} 濃度與細胞因子作用時，可以直接促進小鼠骨髓來源樹突狀細胞的增殖，而且與細胞因子有明顯的協同作用 (Tang et al.,2008)。在體外實驗中發現外加verbascoside確實具有抑制血小板凝集之能力。並且在血小板凝集試驗中發現若事先外加verbascoside，確實有抑制由二磷酸腺苷(ADP)、花生四烯酸(AA)等血小板活化劑所引起的凝集作用 (Campo et al.,2012)。其他研究亦發現verbascoside具有良好的抗氧化性 (Cardinali A et al. 2012)。

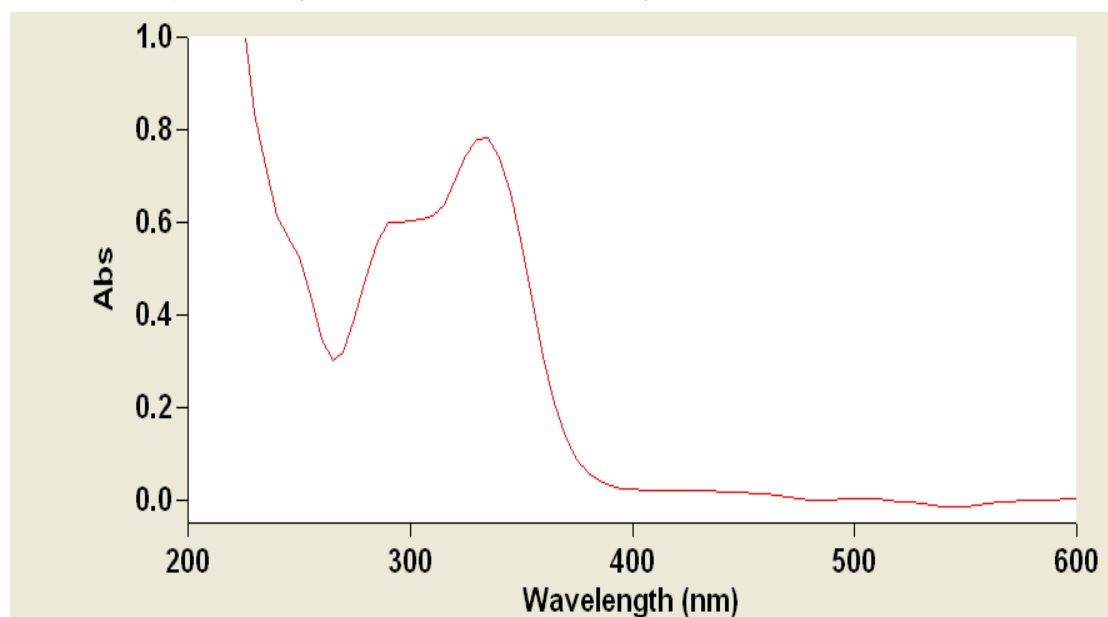


圖5-26、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質 **2** 之紫外—可見光光譜。

Fig. 5-26 UV-visible spectrum for the isolated component **2** from *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L.

```

SAMPLE          DEC. & VT
date  May 4 2012  dfrq      300.066
solvent CD3OD     dn        H1
file      exp    dpwr      30
ACQUISITION    dof        0
sfrq      300.067  dm        nnn
tn         H1    dmm        c
at         3.413  dmf       200
np        32768  dseq
sw        4800.8 dres      1.0
fb         2600  homo      n
bs         4
tpwr      57    wtfile
pw         5.5  proc      ft
dl         1.000 fn        65536
tof        723.5 math      f
nt         4
ct         4    werr
alock      n    wexp
gain      not used wbs
          FLAGS  wnt
il         n
in         n
dp         y
hs         nn
DISPLAY
sp        -600.0
wp        4800.8
vs         75
sc         0
wc         250
hzmm      5.10
is        500.00
rfl       600.0
rfp        0
th         8
ins       100.000
nm  cdc  ph

```

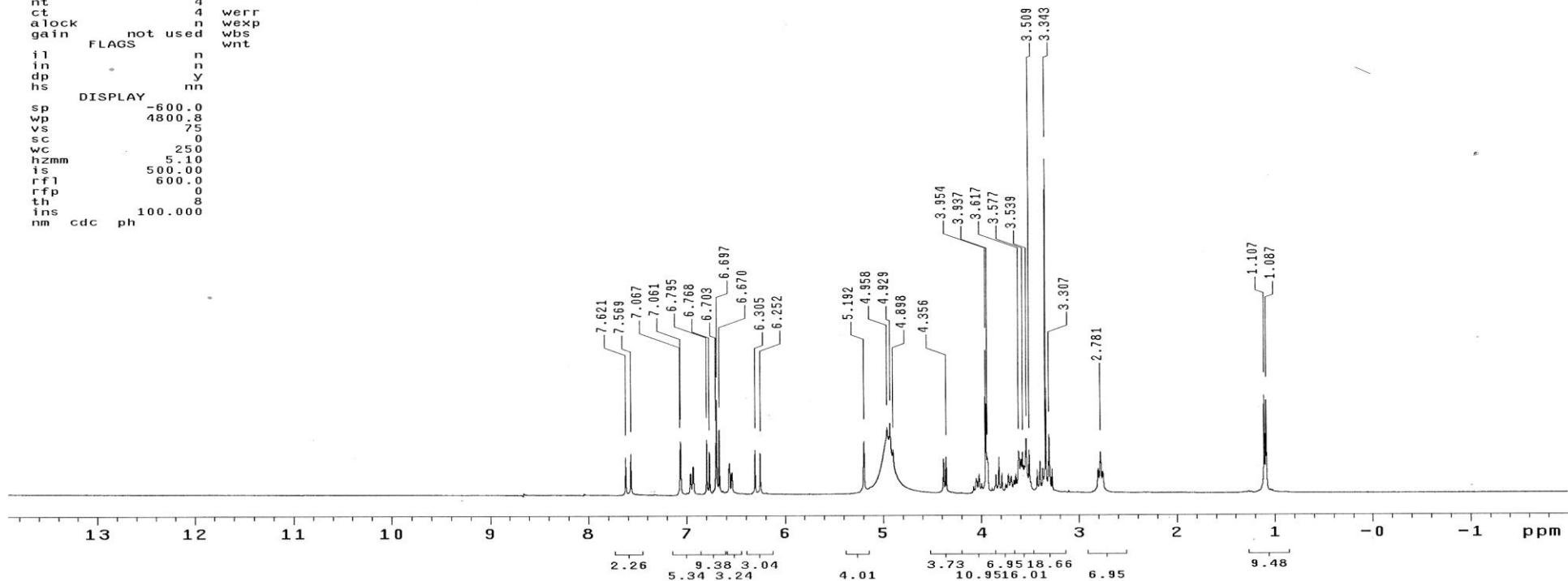


圖 5-27、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質 2 之 ^1H -核磁共振光譜圖。

Fig. 5-27 ^1H NMR spectrum for the isolated component 2 from *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L.

```

SAMPLE          DEC. & VT
date    May 3 2012    dfrq    300.066
solvent  CD3OD        dn      H1
file    /export/home/~ dpwr    41
vnmr1/vnmr1sys/data/ dcf     0
/mst/1-3-C.fid      dm      YYY
ACQUISITION        dmm      W
sfrq    75.460       dmf    7407
tn      C13          dseq
at      0.886       dres    1.0
np      32768       homo   n
sw      18484.3     PROCESSING
fb      10200       lb     1.00
bs      4           wtfile
tpwr    55         proc   ft
pw      6.2        fn     65536
d1      2.000      math   f
tof     654.9
nt      16384      werr
ct      16384      wexp
alock   n          wbs
gain    not used   wnt
FLAGS
fl      n
in      n
dp      y
hs      nn
DISPLAY
sp      -1051.6
wp      18484.3
vs      106
sc      0
wc      250
h2mm   73.94
is      500.00
rf1     4748.7
rfp     3697.1
th      13
ins     100.000
nm      ph

```

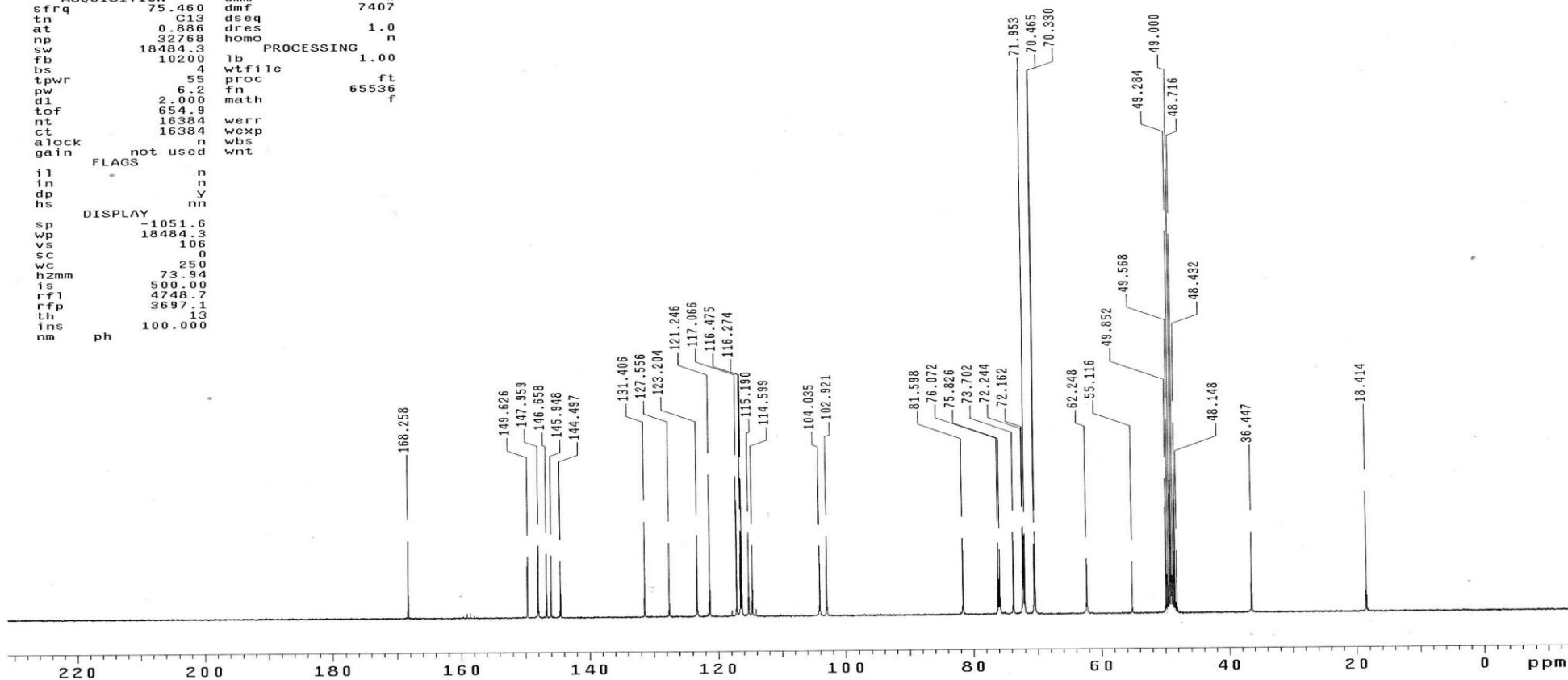
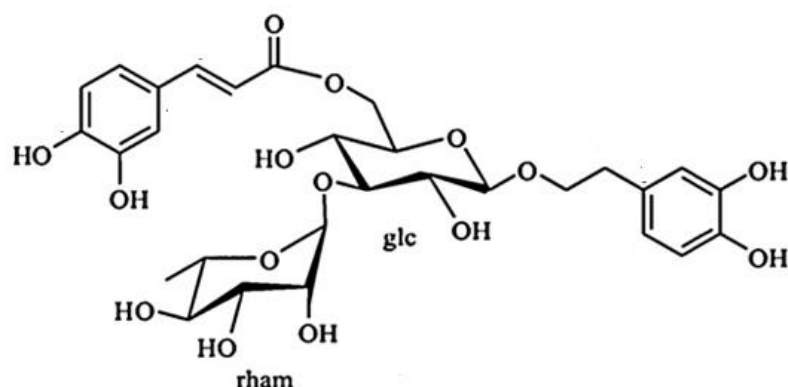


圖 5-28、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質 2 之 ^{13}C -核磁共振光譜圖。

Fig. 5-28 ^{13}C -NMR spectrum for the isolated component 2 from *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L.

6-2 純化物質1 之結構鑑定



UV λ max (MeOH) nm: 290,330

Formula : C₂₉H₃₆O₁₅

MW : 624

純化物質1 呈現白色結晶粉末，由UV-visible光譜 (圖 5-29) λ max (MeOH) 245, 290, 335 nm，與純化物質2 同樣顯示苯環K band 及B band的特徵吸收帶。由¹H-NMR光譜(圖 5-30，表 5-6)，亦顯示與純化物質2 極相近的質子波訊及碳譜波訊，同樣以glucosyl 基團為中心，接上phenyl ethanoxy, rhamnosyl 及caffeoyl 等基團，再由¹H-¹H COSY, ¹H-¹H NOESY, ¹H-¹³C HSQC, ¹H-¹³C HMBC光譜(data未呈現)解析與文獻比對(Gomez-Aguirre et al., 2012)，鑑定出純化物質2 的 caffeoyl 基團不是接在glucosyl C-4，而是接在C-6 的isoverbascoside。

Cardinali A et al. (2012)研究發現 isoverbascoside 具有良好的抗氧化性，可做為天然抗氧化劑添加於食品中。Tang 等人(2008) 以 MTT 法，觀察不同濃度的 isoverbascoside 對小鼠骨髓來源樹突狀細胞增殖的影響,結果顯示 isoverbascoside 可促進小鼠樹突狀細胞的增殖，isoverbascoside 在 $1.60 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 濃度下與細胞因子作用時，可顯著刺激小鼠樹突狀細胞的增殖。細胞實驗證實，可抑制人類胃癌

MG_C80-3 细胞生長及造成 MG_C80-3 细胞株的分化 (Chen et al 2002)。MG_C80-3 细胞經 20 μmol/L 抗氧化劑 isoverbascoside 處理後，细胞生長曲線與分裂指数顯著下降，生長抑制率達 57.8%。且改變 MG_C80-3 细胞的惡性表型特徵，具有明顯的誘導分化作用 (李等，1995)。HL-60 细胞經 5 μmol/L 劑量的 isoverbascoside 處理後，细胞生長顯著受抑，生長抑制率達到 34.5% (Wang T-J et al.,1999)。

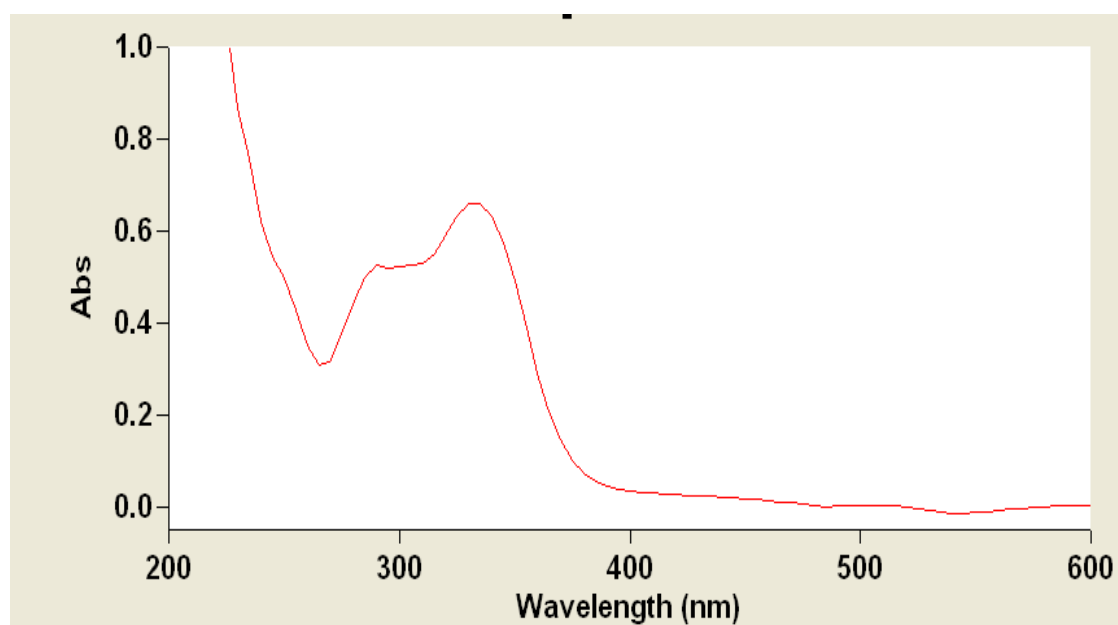


圖 5-29、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質 **1** 之紫外—可見光光譜。

Fig. 5-29 UV-visible spectrum for the isolated component **1** from *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L.

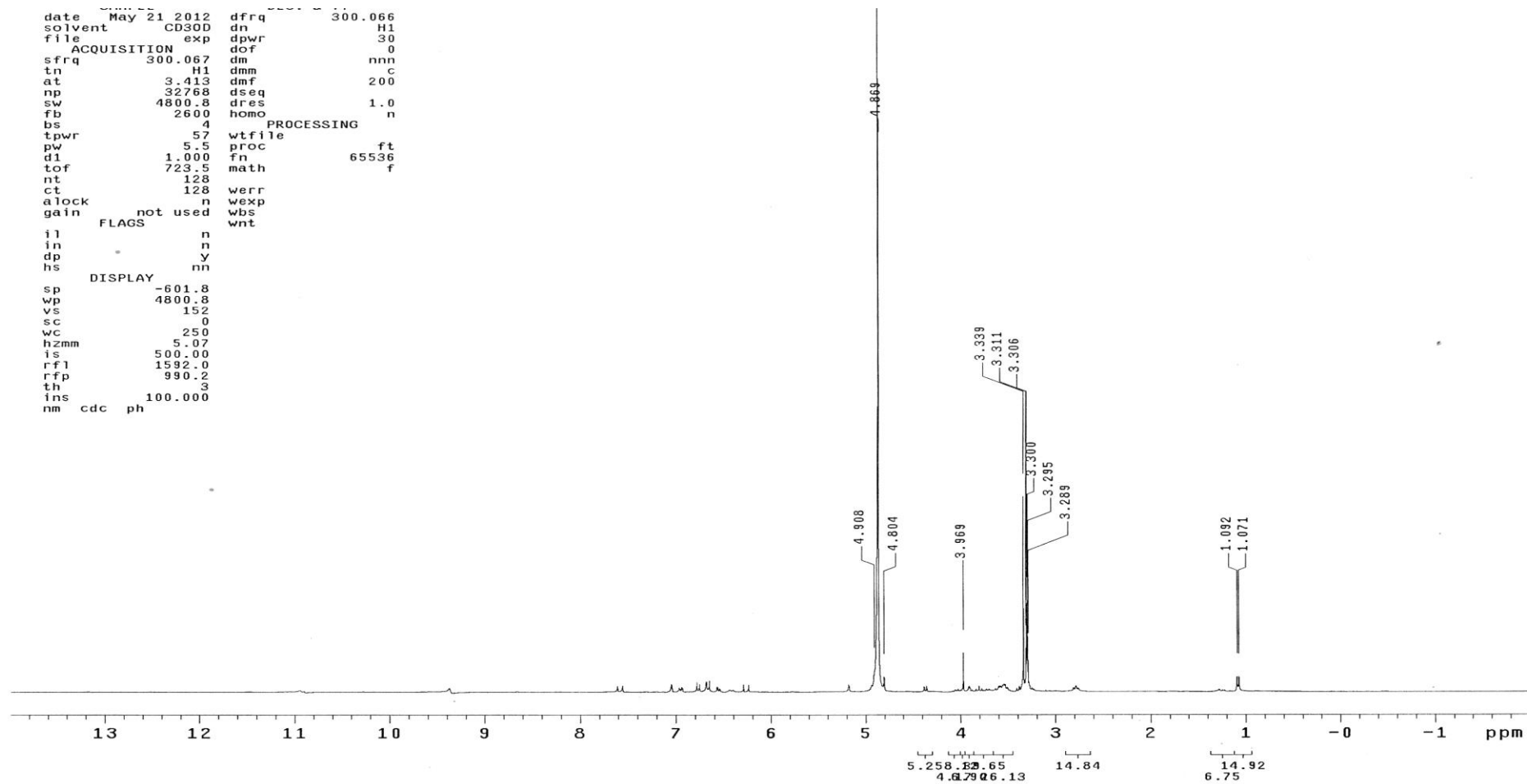


圖 5-30、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質 **1** 之 ^1H 核磁共振光譜圖。

Fig. 5-30 ^1H -NMR spectrum for the isolated component **1** from *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L.

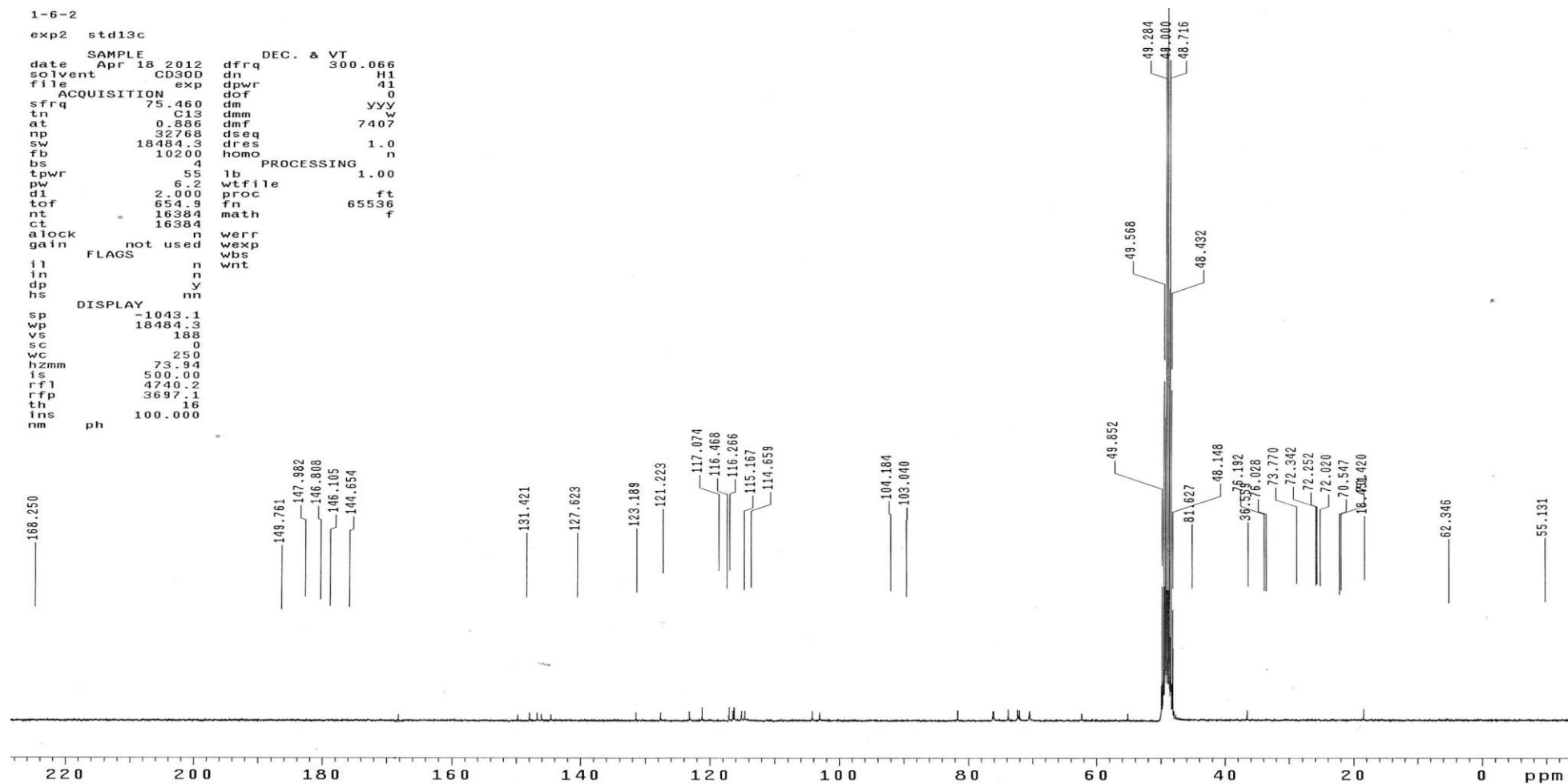
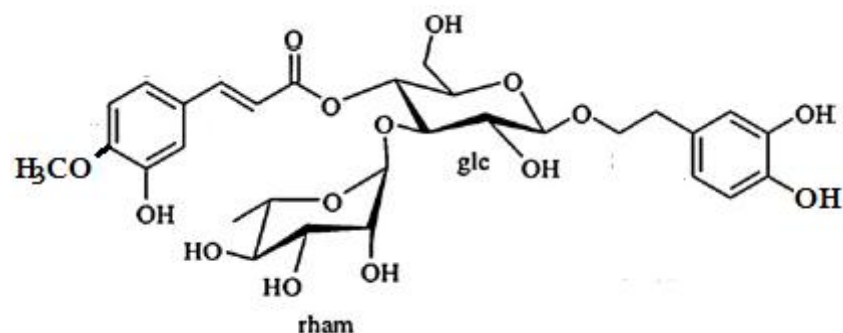


圖 5-31、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質 **1** 之 ^{13}C -核磁共振光譜圖。

Fig. 5-31 ^{13}C -NMR spectrum for the isolated component **1** from *n*-butanol extract of *Verbena officinalis*

6-3 純化物質**3** 之結構鑑定

純化物質**3**：eukovoside



UV λ max (MeOH) nm: 245, 290, 325

Formula : $C_{30}H_{38}O_{16}$

MW: 638

1H -NMR(300MHz, methanol- d_4): δ

1.09 (rha CH_3 , d, $J=6.3$ Hz), 2.77 (agl H-7, m), 3.83 (fer OCH_3 , s), 3.03, 4.94 (glc, rha, 10 protons), 4.34 (glc H-1, d, $J=8.1$ Hz), 4.91 (agl H-7, d, m), 5.17 (rha H-1, d, $J=1.5$ Hz), 6.28 (fer H-8', d, $J=15.9$ Hz), 6.53 (agl H-6, dd, $J=1.8, 8.1$ Hz), 7.03 (fer H-2', d, $J=1.8$ Hz), 7.55 (fer H-7, d, $J=15.9$ Hz).

^{13}C -NMR(75MHz, methanol- d_4): δ

18.4 (rha C-6), 36.5 (agl C-7), 56.4 (fer OCH_3 , s), 62.4 (glc C-6), 70.9 (rha C-4), 72.0 (rha C-3), 72.3 (rha C-5), 73.8 (rha C-4), 76.0 (glc C-5), 76.3 (glc C-2), 81.5 (glc C-3), 102.9 (rha C-1), 104.4 (glc C-1), 111.7 (fer C-8'), 115.1 (fer C-2'), 116.3 (agl C-5), 116.5 (fer C-5'), 117.1 (agl C-2), 121.2 (agl C-6), 124.3 (fer C-6'), 127.6 (fer C-1'), 131.4 (agl C-1), 144.6 (agl C-4), 146.1 (agl C-3), 147.9 (fer C-3'), 149.3 (fer C-7'), 150.8 (fer C-4'), 168.2 (fer $-OC=O$).

純化物質**3** 為白色粉末，UV-visible光譜(圖 5-32) λ max: 245, 290, 325nm顯示苯環上K band及B band的特徵吸收帶， ^{13}C -NMR 光譜(圖 5-34)與純化物質**1** 和**2** 亦十分相近，唯一有差異的是顯是有一 phenyl OCH_3 ，因此推測其結構亦是以glucosyl 基團為中心，在C-1，

C-3, C-4 位置上接上 phenylethoxy, rhamnosyl及feruloyl的 eukovoside.

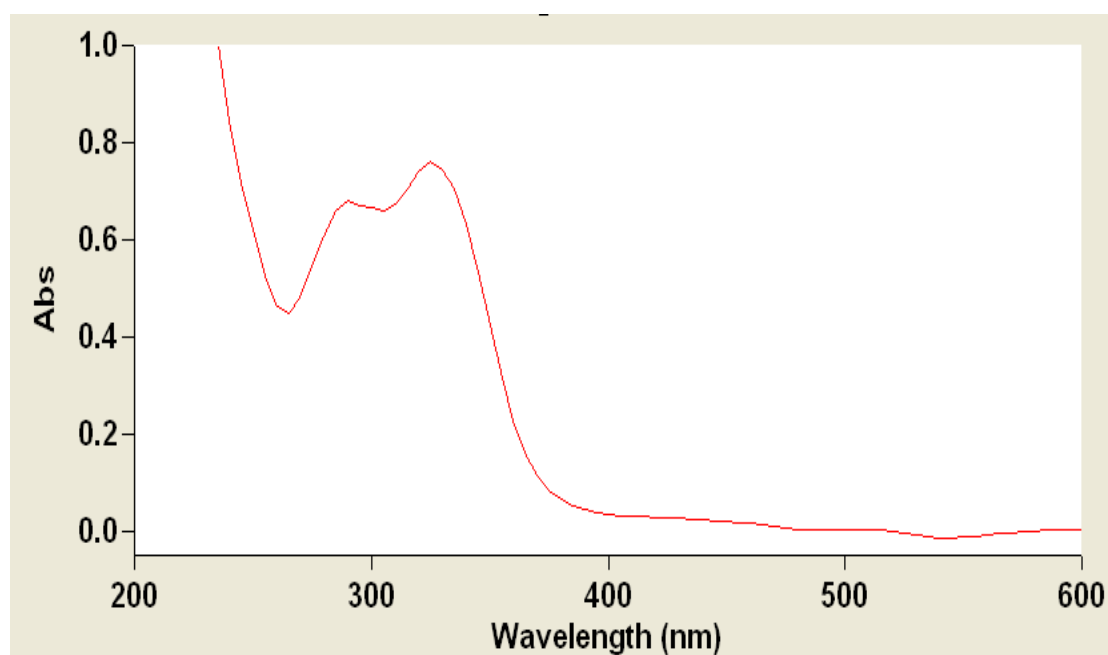


圖5-32、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質 **3** 之紫外-可見光光譜。

Fig. 5-32 UV-visible spectrum for the isolated component **3** from *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L.

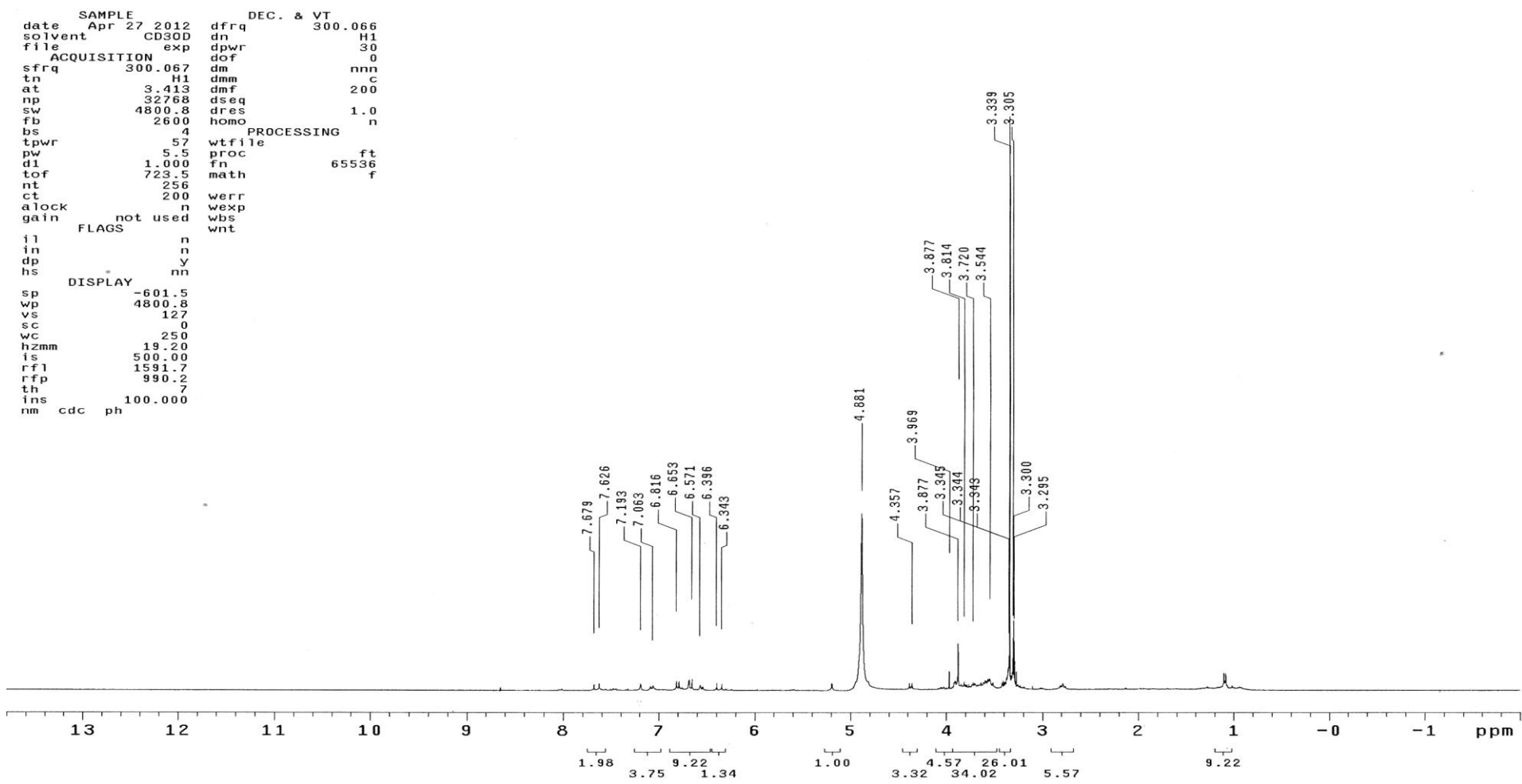


圖 5-33、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質 **3** ^1H -核磁共振光譜圖。

Fig. 5-33 ^1H -NMR spectrum for the isolated component **3** from *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L.

```

1-3-2
exp3 std13c

SAMPLE          DEC. & VT
date    Apr 27 2012  dfrq    300.066
solvent  CD300      dn      H1
file     exp       dpwr    41
ACQUISITION  dof     0
sfrq     75.460    dm      yyy
tn       C13      dmm     w
at       0.886    dmf     7407
np       32768    dseq
sw       18484.3  dres    1.0
fb       10200   homo
bs       4        PROCESSING
tpwr     55      lb      1.00
pw       6.2     wtfile
d1       2.000   proc   ft
tof      654.9   fn     65536
nt       16384  math   f
ct       16384
alock    not used  werr
gain     not used  wexp
        FLAGS      wbs
il       n        wnt
in       n
dp       y
hs       nn

DISPLAY
sp       -1044.3
wp       18484.3
vs       169
sc       0
wc       250
hzmm     73.94
is       500.00
rfl      4741.4
rfp      3697.1
th       5
ins      100.000
nm       ph

```

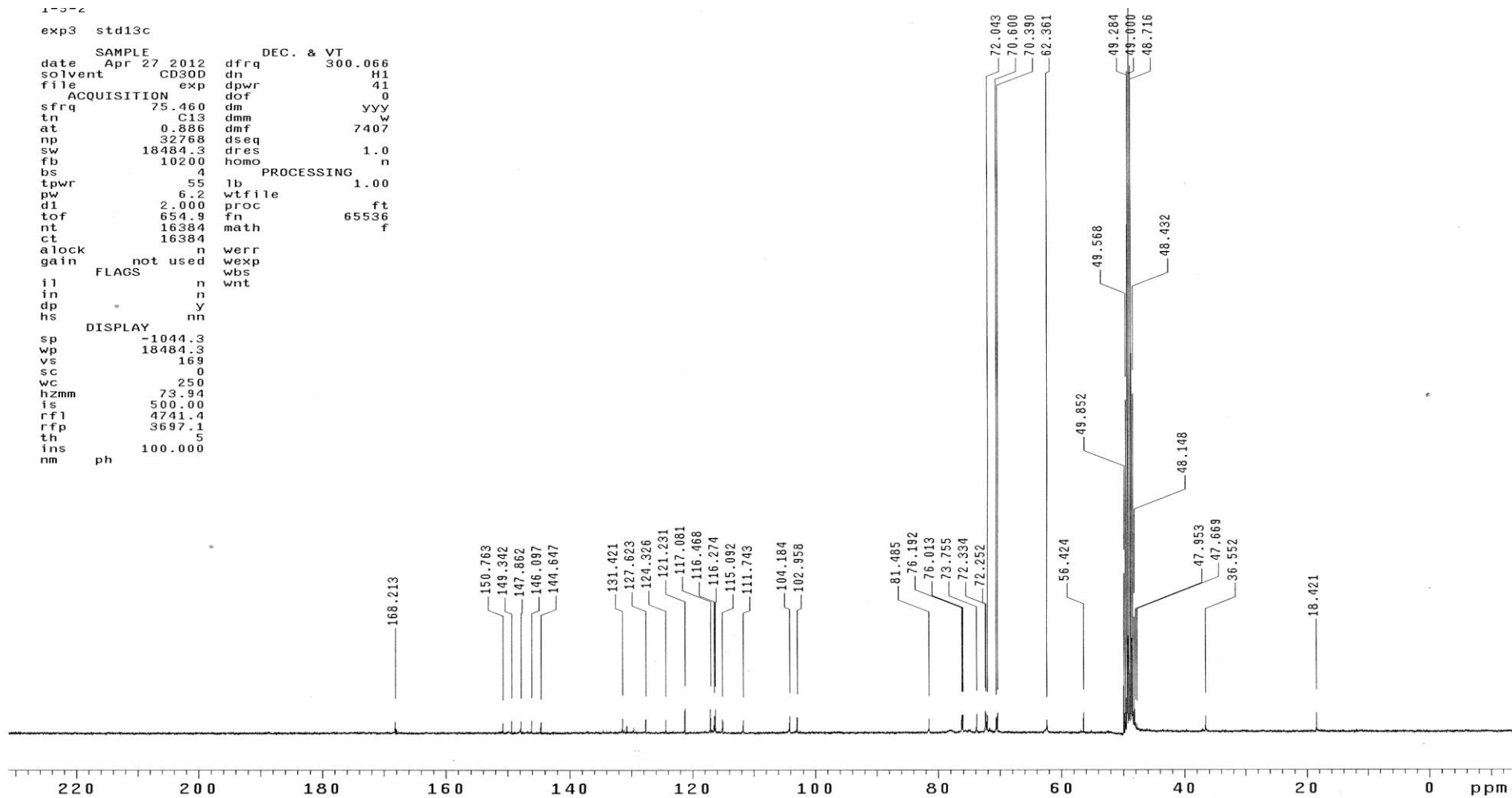
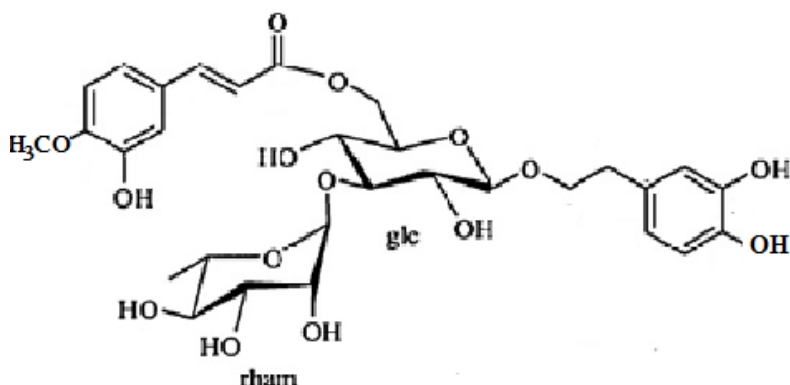


圖 5-34、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質 **3** 之 ^{13}C -核磁共振光譜圖。

Fig. 5-34 ^{13}C -NMR spectrum for the isolated component **3** from *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L.

6-4 純化物質 4 之結構鑑定



UV λ max (MeOH) nm: 245, 290, 325

Formula : $C_{30}H_{38}O_{16}$

MW: 638

1H -NMR(300MHz, methanol- d_4): δ

1.09 (rha CH_3 , d, $J=6.3$ Hz), 2.77 (agl H-7, m), 3.83 (fer OCH_3 , s), 3.03, 4.94 (glc, rha, 10 protons), 4.34 (glc H-1, d, $J=8.1$ Hz), 4.91 (agl H-7, d, m), 5.17 (rha H-1, d, $J=1.5$ Hz), 6.28 (fer H-8', d, $J=15.9$ Hz), 6.53 (agl H-6, dd, $J=1.8, 8.1$ Hz), 7.03 (fer H-2', d, $J=1.8$ Hz), 7.55 (fer H-7, d, $J=15.9$ Hz).

^{13}C -NMR(75MHz, methanol- d_4): δ

18.4 (rha C-6), 36.5 (agl C-7), 56.4 (fer OCH_3 , s), 62.4 (glc C-6), 70.9 (rha C-4), 72.0 (rha C-3), 72.3 (rha C-5), 73.8 (rha C-4), 76.0 (glc C-5), 76.3 (glc C-2), 81.5 (glc C-3), 102.9 (rha C-1), 104.4 (glc C-1), 111.7 (fer C-8'), 115.1 (fer C-2'), 116.3 (agl C-5), 116.5 (fer C-5'), 117.1 (agl C-2), 121.2 (agl C-6), 124.3 (fer C-6'), 127.6 (fer C-1'), 131.4 (agl C-1), 144.6 (agl C-4), 146.1 (agl C-3), 147.9 (fer C-3'), 149.3 (fer C-7'), 150.8 (fer C-4'), 168.2 (fer $-OC=O$).

此純化物質因量較少，測得 1H 及 ^{13}C -NMR光譜資訊不夠清晰，概略可觀測到 1H -NMR δ 3.88，及 ^{13}C -NMR δ 56.42 的波訊，解析為 phenyl OCH_3 的質子及碳波訊，引此推測純化物質 4 的結構為 eukovoside isomer。

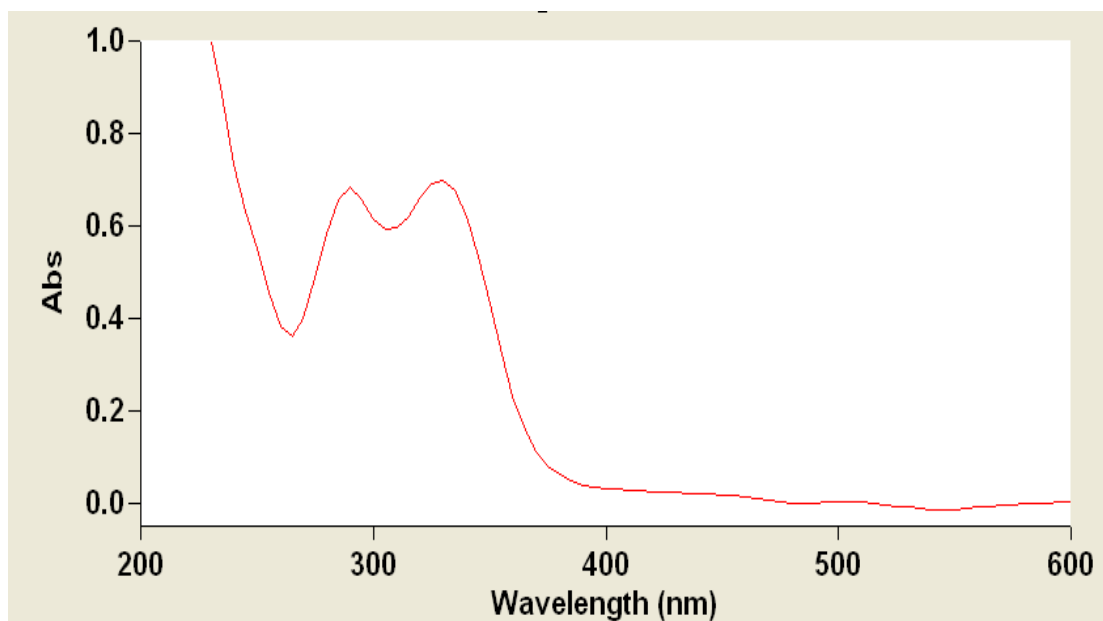


圖5-35、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質 **4** 之紫外-可見光光譜。

Fig. 5-35 UV-visible spectrum for the isolated component **4** from *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L.

```

1-6-4
exp6 stdlh
SAMPLE
date Mar 27 2012 dfrq DEC. & VT 300.066
solvent CD3OD dn H1
file /export/home/~ dpwr 30
vnmr1/vnmr5s/data~ dof 0
/mei/1-6-4.fid dm nnn
ACQUISITION dmm c
sfrq 300.067 dmf 200
tn H1 dseq
at 3.413 dres 1.0
np 32768 homo n
sw 4800.8 PROCESSING
fb 2600 wtfile ft
bs 4 proc 65536
tpwr 57 tn
pw 5.5 math f
df 1.000
tof 729.5 werr
nt 16 wexp
ct 16 wbs
atock n wnt
gain not used
FLAGS
il n
in n
dp Y
hs nn
DISPLAY
sp -601.3
wp 4800.8
vs 1138
sc 0
wc 250
h2mm 4.44
is 500.00
rf1 1591.6
rfp 990.2
th 13
ins 100.000
nm cdc ph

```

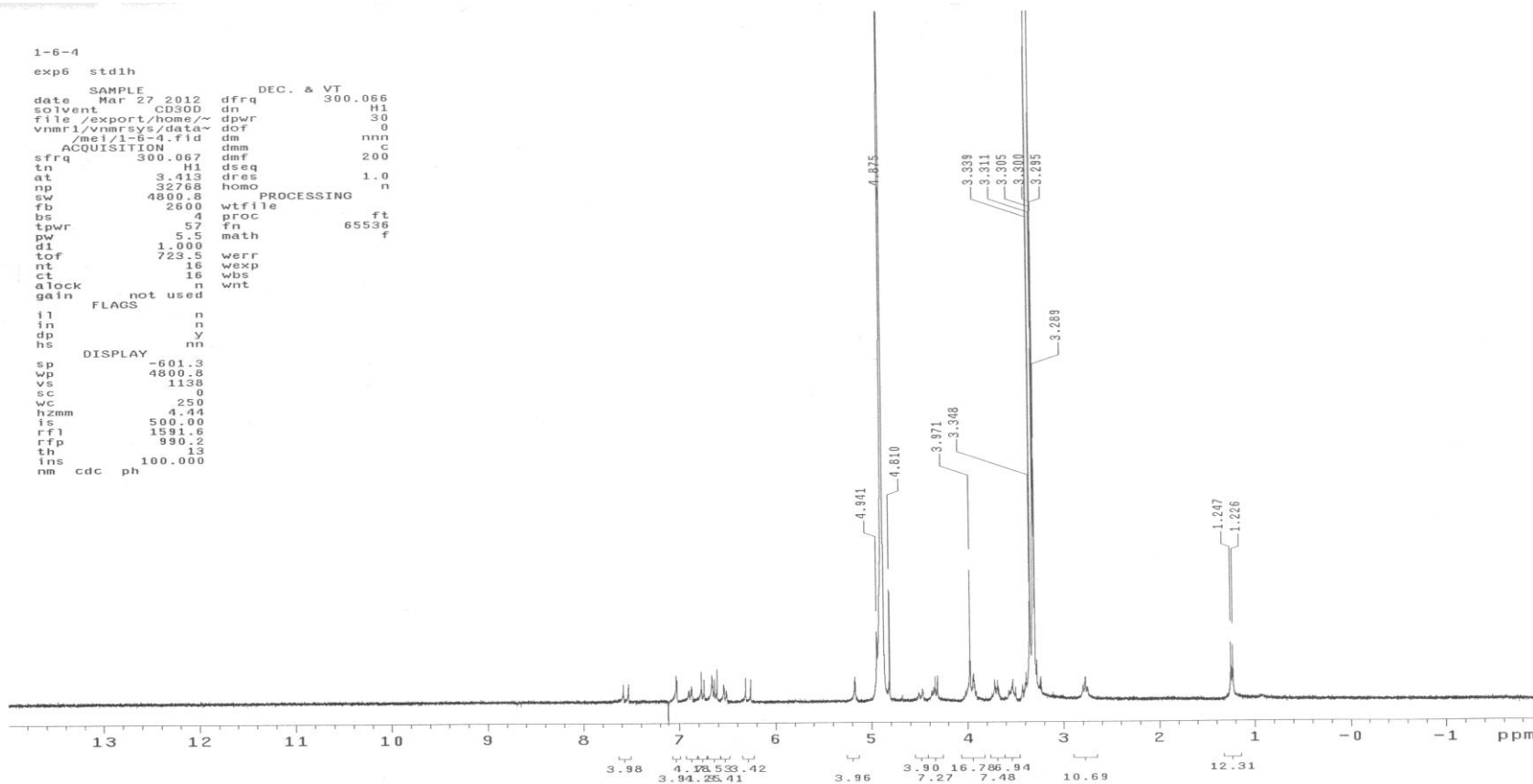


圖 5-36、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質 **4** 之 ^1H -核磁共振光譜圖。

Fig. 5-36 ^1H -NMR spectrum for the isolated component **4** from *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L

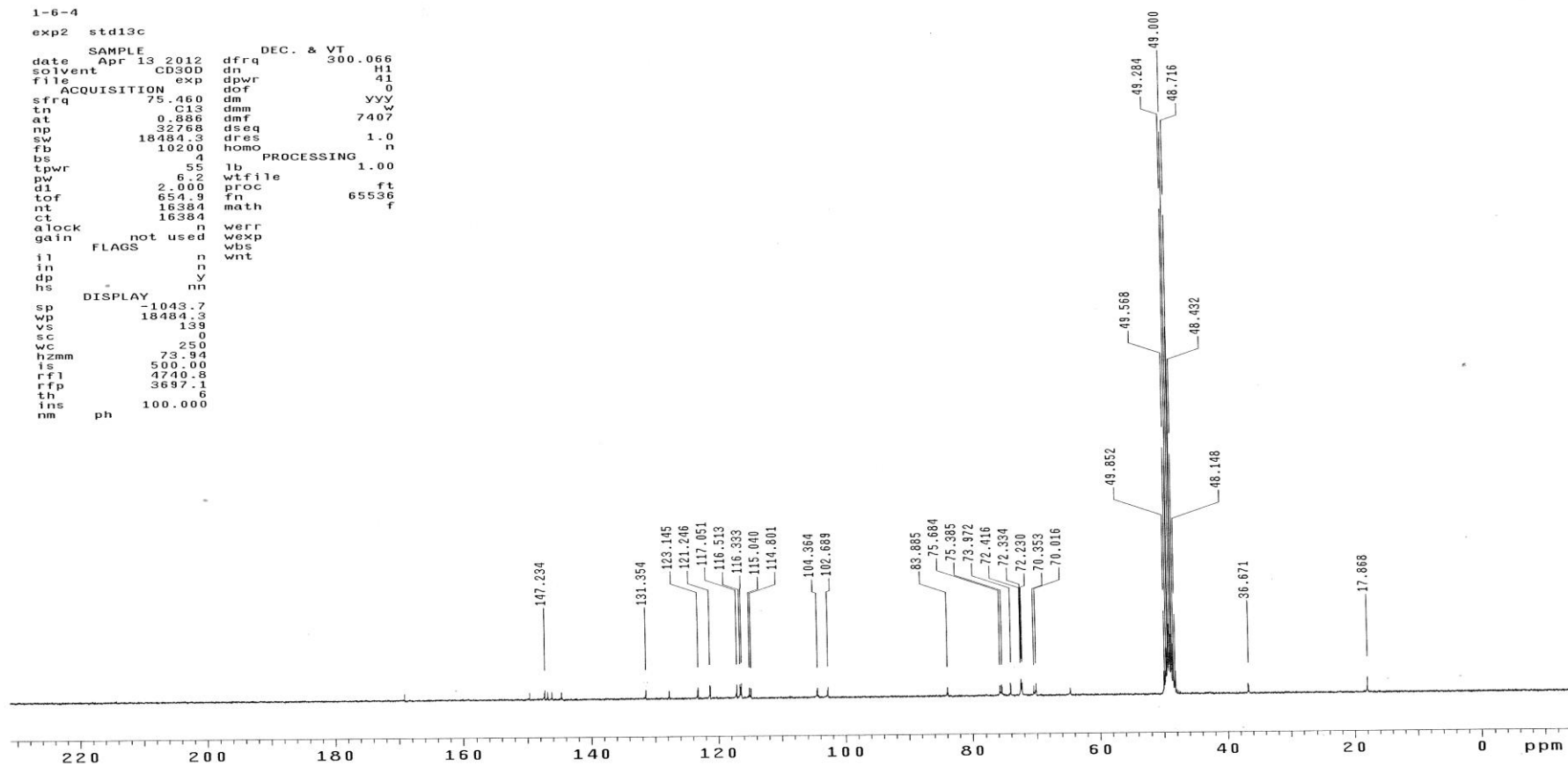
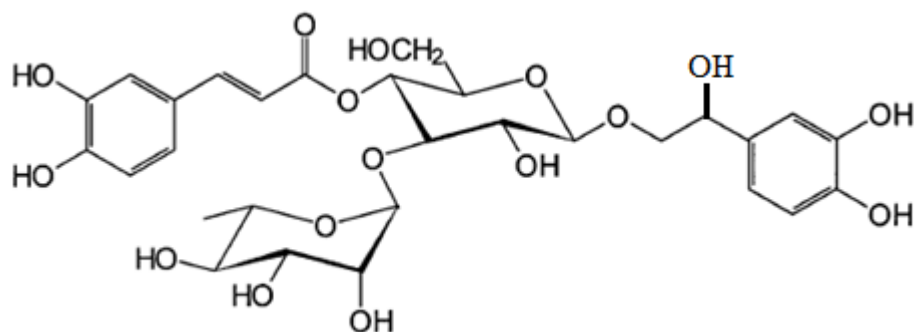


圖 5-37、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質 **4** 之 ^{13}C -核磁共振光譜圖。

Fig. 5-37 ^{13}C -NMR spectrum for the isolated component **4** from *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L.

6-5 純化物質 5 之結構鑑定



UV λ max (MeOH) nm: 245, 290, 335 nm

Formula : C₂₉H₃₆O₁₆

MW: 640

¹H-NMR(300MHz, methanol-d₄): δ

1.09 (rha CH₃, d, J=6.3 Hz), 3.30-4.94 (glc, rha, 10 protons), 4.37 (glc H-1, d, J=8 Hz), 4.91 (agl H-7, m), 5.19 (rha H-1, d, J=2 Hz), 6.28 (caf H-8', d, J=16 Hz), 6.56 (agl H-6, d d, J=2.1, 8.1 Hz), 6.69 (agl H-5, d, J=8.1 Hz), 6.78 (caf H-5', d, J=8.1 Hz), 7.01 (caf H-6', d d, J=2.1, 8.1 Hz), 7.06 (caf H-2', d, J=2 Hz), 7.59 (caf H-7, d, J=16 Hz).

¹³C-NMR(75MHz, methanol-d₄): δ

17.8 (rha C-6), 62.4 (glc C-6), 70.0 (rha C-4), 70.4 (glc C-4), 72.2 (rha C-5), 72.3 (rha C-2), 72.4 (rha C-4), 73.9 (glc C-5), 75.4 (glc C-2), 75.7 (glc C-3), 83.9 (agl C-7), 102.7 (rha C-1), 104.4 (glc C-1), 75.4 (glc C-2), 114.8 (caf C-8'), 115.0 (caf C-2'), 116.3 (glc C-5), 116.5 (caf C-5'), 117.1 (aglc C-3), 121.2 (agl C-6), 123.1 (caf C-6), 127.6 (caf C-1), 131.4 (agl C-1), 144.6 (agl C-4), 146.1 (agl C-3), 146.7 (caf C-3), 147.2 (caf C-7'), 149.6 (caf C-4'), 169.1 (caf C-9').

純化物質無論在UV-visible(圖 5-38), ¹H-NMR(圖 5-40),

¹³C-NMR(圖 5-39) 光譜都與純化物質 1 極相近, 唯二的差異為

¹H-NMR光譜 δ 4.91(aglycone H-7), ¹³C-NMR 光譜上 δ 83.9(aglycone C-7)比對文獻(Gomez-Aguirre et al., 2012), 純化物質 5 的結構推測為

β -hydroxyverbascoside。Cardinali A et al. (2012) 的研究發現從馬鞭草中的 β -hydroxyverbascoside具良好的抗氧化性，為天然抗氧化劑。Ihsan C A et al.(2005)等人也證實 β -hydroxyverbascoside 具有強清除自由基能力， IC_{50} 為52.1，強於天然抗氧化劑 α -tocopherol(IC_{50} =75.5)。

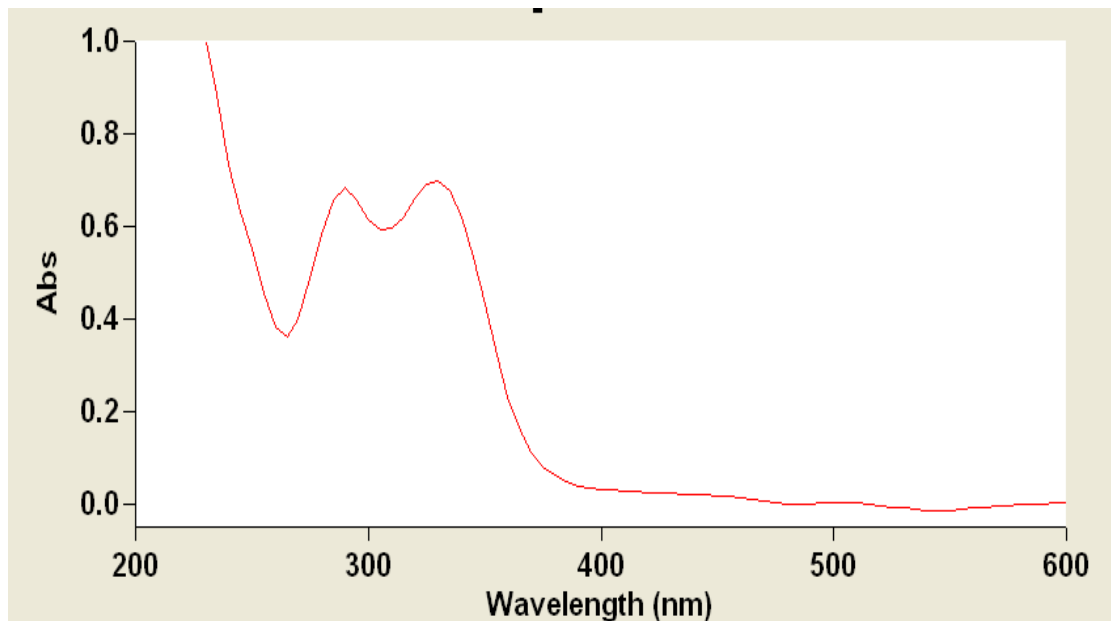


圖5-38、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質 **5** 之紫外—可見光光譜。

Fig. 5-38 UV-visible spectrum for the isolated component **5** from *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L.

```

SAMPLE          DEC. & VT
date  May 18 2012  dfrq  300.066
solvent  CD3OD    dn     H1
file     exp     dpwr   30
          ACQUISITION
sfrq    300.067  dm     nnn
tn      H1      dmm    c
at      3.413   dmf    200
np      32768   dseq
sw      4800.8  dres   1.0
fb      2600   homo
bs      4       PROCESSING
tpwr    57     wtfile
pw      5.5    proc   ft
d1      1.000  fn     65536
tof     723.5  math   f
nt      16
ct      16     werr
alock   n      wexp
gain    not used  wbs
          FLAGS   wnt
il      n
in      n
dp      y
hs      nn
          DISPLAY
sp      -600.0
wp      4800.8
vs      87
sc      0
wc      250
hZmm    19.20
is      500.00
rfl     600.0
rfp     0
th      10
ins     100.000
nm      cdc  ph

```

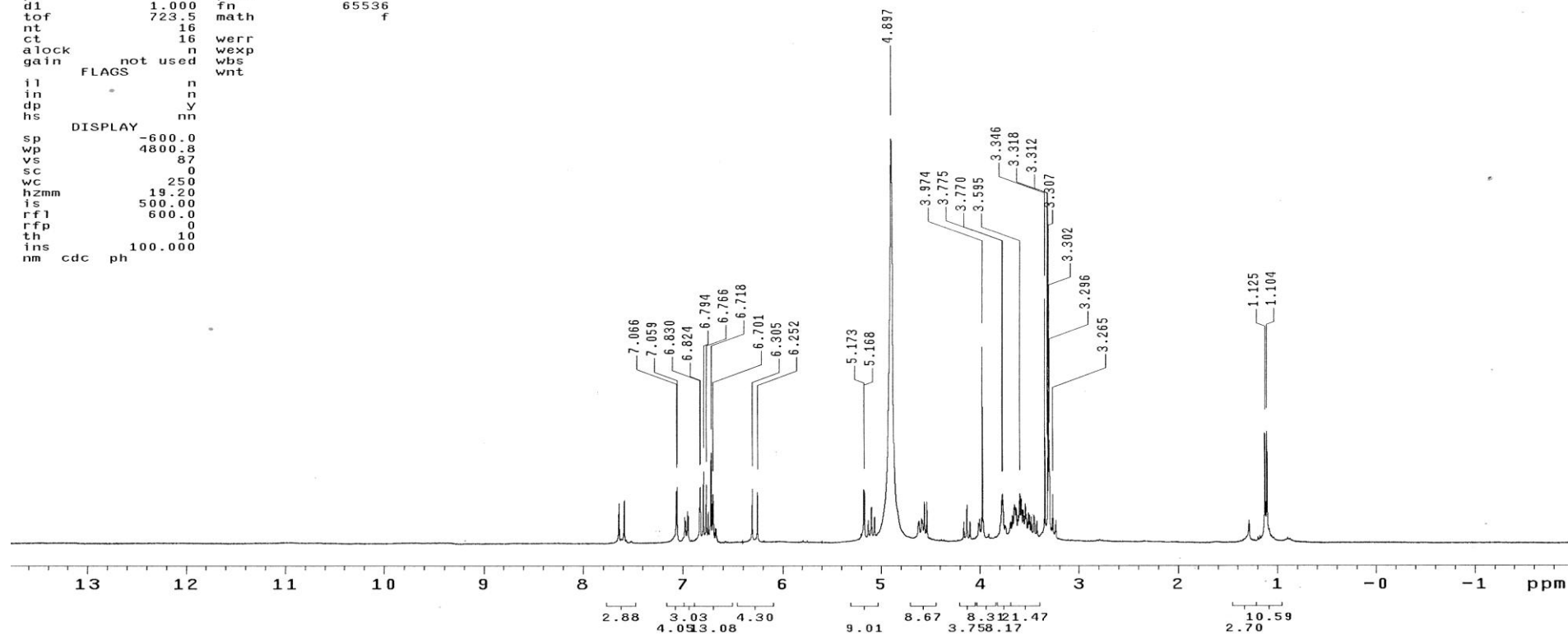


圖 5-39、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質 **5** 之 ^1H -核磁共振光譜圖。

Fig. 5-39 ^1H -NMR spectrum for the isolated component **5** from *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L

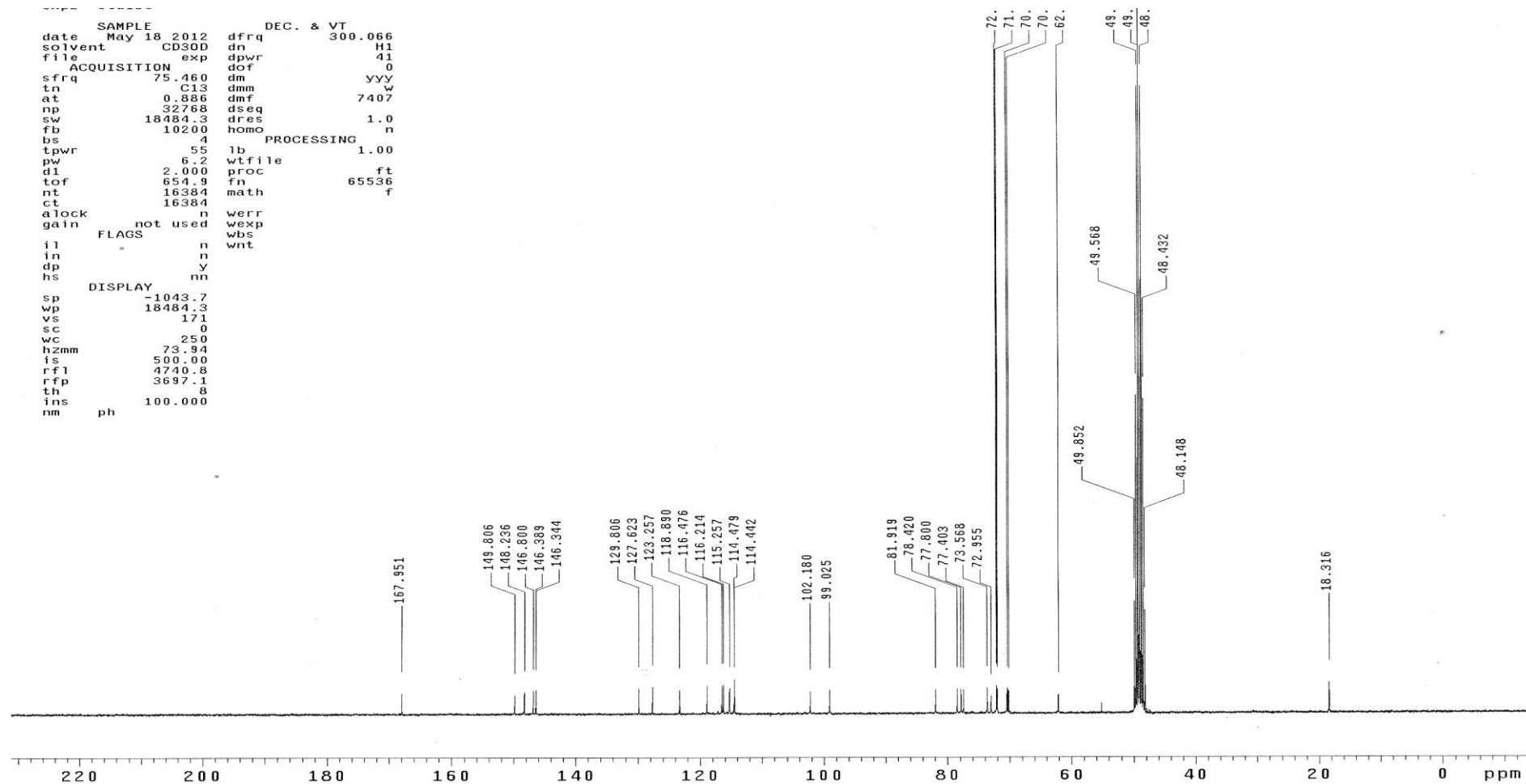


圖 5-40、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質 **5** 之 ^{13}C -核磁共振光譜圖。

Fig. 5-40 ^{13}C -NMR spectrum for the isolated component **5** from *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L.

7.馬鞭草正丁醇萃取物純化物質之抗氧化及醣解酵素抑制作用

自馬鞭草正丁醇萃取物純化出苯乙醇苷類純化物質**1-5**之萃取產率如表 5-7 所示，利用總抗氧化力(TEAC) 法檢測五種純化物質的抗氧化能力(圖 5-41)，其中以純化物質**1** isoverbascoside之抗氧化性最佳，結果顯示為每毫克樣品分別相當於 0.214 mg之trolox當量。

同樣進行醣解酵素抑制效果測試，對 α -amylase 及 α -glucosidase 酵素抑制作用測試，結果顯示當樣品濃度 0.1 mg/mL，其中純化物質 **1** isoverbascoside 及 **2** verbascoside 在 α -amylase、 α -glucosidase 抑制率上皆呈現良好的效果；對 α -amylase 抑制率分別為 53.71%(**1**)，55.37%(**2**)；對 α -glucosidase 抑制率分別為 59.9%(**1**)，48.4%(**2**) (圖 5-42)。

由於五種苯乙醇苷類化合物結構皆有接酚酸結構，S. Manzano 和 G. Williamson 研究指出，水果中含有一些多酚(polyphenol)、酚酸(phenolic acid)及單寧(tannins)等活性物質，會阻斷腸道細胞的運輸作用，能降低及改變腸道對葡萄糖的吸收，能延緩飯後血糖上升的曲線高峰，可應用於糖尿病及代謝症候群的管理。

表 5-7、馬鞭草正丁醇萃取物五種純化物質之產率

Table 5-7 Yields of five isolated components from *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L.

Isolated components	含量(mg)	產率(%)
isoverbascoside	145.53	0.0033
verbascoside	6047.00	0.1390
eukovoside	48.29	0.0011
eukovoside isomer	19.03	0.0004
β -hydroxyverbascoside	100.47	0.0023

^a sample dry weight: 4250.41g

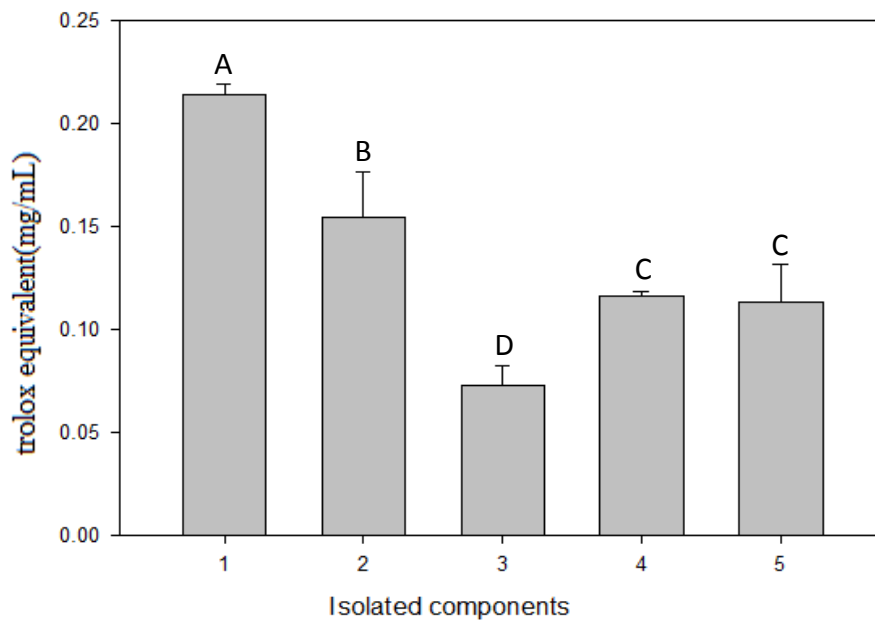


圖5-41、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質(0.5 mg/mL)之總抗氧化力以trolox當量表示。

Fig. 5-41 Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of the isolated components at 0.5 mg/mL level from *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L. Bars represent means \pm SD, n=3. Means with different letters are significant different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

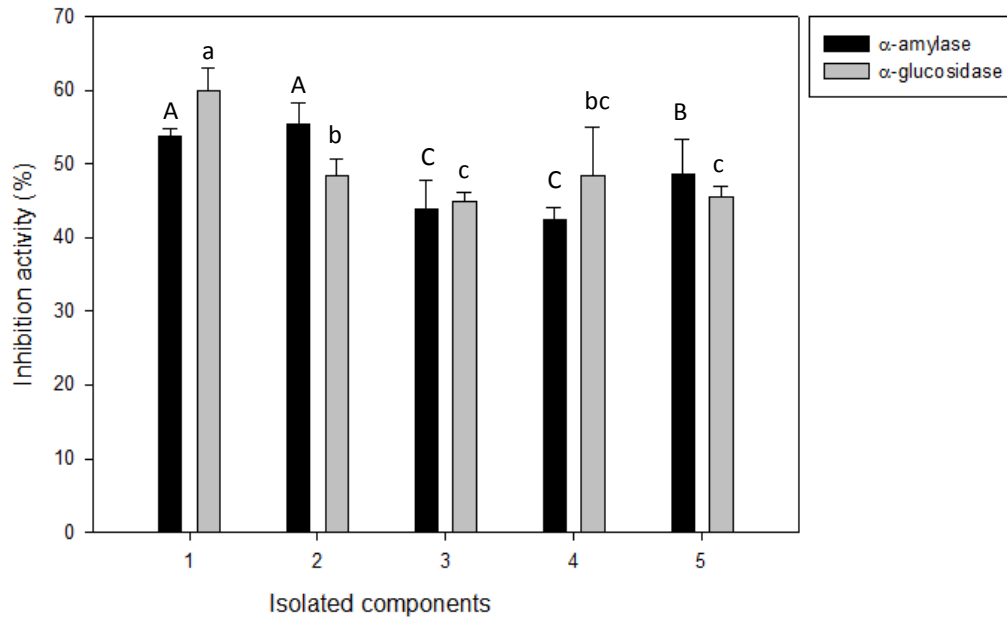


圖5-42、馬鞭草正丁醇萃取物純化物質(0.1mg/mL)之 α -amylase 及 α -glucosidase 之抑制活性。

Fig. 5-42 α -amylase and α -glucosidase inhibitory activity of isolated components at 0.1mg/mL level from *n*-butanol extract of *Verbena officinalis* L. Bars represent means \pm SD, n=3. Means with different letters within the same enzyme are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

陸、結論

1. 馬鞭草四種正己烷、乙酸乙酯、正丁醇及水萃取物，經由抗氧化性及醣解酵素抑制作用測試，顯示馬鞭草正丁醇萃取物具最佳的抗氧化及醣解酵素抑制作用。
2. 馬鞭草正丁醇萃取物製備出的純化物質分別利用UV, ^1H 及 ^{13}C -NMR進行結構鑑定，分別為isoverbascoside (1)、verbascoside (2)、eukovoside (3)、eukovoside isomer (4) 及 β -hydroxyverbascoside (5)。
3. 馬鞭草正丁醇萃取物中的五種純化物利用總抗氧化力(TEAC)檢測其抗氧化性，當樣品濃度為0.5 mg/mL，結果顯示相當於每毫升0.214(1)、0.155(2)、0.152(3)、0.073(4) 及0.116(5) mg之trolox當量。其中以純化物質1 isoverbascoside之抗氧化性最佳。
4. 將5種純化物質進行醣解酵素抑制效果測試，結果顯示當樣品濃度0.1 mg/mL，對 α -amylase 抑制率分別為53.71(1)，55.37(2)，43.87(3)，42.44(4)，48.74(5)；對 α -glucosidase 抑制率分別為59.9(1)，48.4(2)，44.9(3)，48.4(4)，45.53(5)，其中純化物質1 isoverbascoside 及2 verbascoside 在 α -amylase、 α -glucosidase 抑制率上皆呈現良好的效果。
5. 經由抗氧化及醣解酵素抑制作用測試，證實馬鞭草具降血糖保健食品之研發潛力。
6. 馬鞭草的正丁醇萃取物及及活性純化物質亦將利用小鼠肝臟

FL83B細胞進行細胞毒性、細胞葡萄糖攝入、胞內肝醣合成等實驗，
以為馬鞭草確立降血糖功效的學理根據。

柒、參考文獻

- 王煊。糖尿病安全手冊 初版。林鬱文化事業有限公司p47-77。(2001)。
- 王瑄閔。甘草中具抑制醣解酵素活性萃取物及純化物質之調節葡萄糖恆定作用。東海大學食品科學研究所 碩士論文。(2011)。
- 古為榮，喬長誠，蘇正德。咖啡果肉抗氧化及揮發性成分之研究。東海大學食品科學研究所 碩士論文。(2006)。
- 本田正志 糖层病診斷療法 初版三刷。信宏出版社。(2004)。
- 行政院衛生署
http://www.doh.gov.tw/CHT2006/DM/DM2_p01.aspx?class_no=25&level_no=1&doc_no=84788公布資料檔案/100主要死因分析。(2012)。
- 朱婉兒、樓亞洲、朱姿樺、林美吟、蘇聖棋。胰島素增敏劑—thiazolidinediones藥物之臨床使用及安全性探討。藥學雜誌。(2009)。
- 朱彥華和周于嵐。食品工業。06-15。(2011)。
- 米井嘉一。這樣生活，讓你不變老延遲老化就從避免醣化開始。樂果文化世界股份有限公司。(2010)。
- 李旻。綠藻中 α -glucosidase 抑制物之分離與特性鑑定。靜宜大學 食品營養學系碩士論文。(2006)。
- 李忌、周紅、鄭耘、林炳珍、鄭榮梁、賈忠健。天然抗氧化劑 isoverbascoside對人類未現癌細胞生長和超微結構的影響。廈門大學學報(自然科學版)05期。(1995)。
- 李怡慧。白芍熱水萃取物醣解酵素抑制成分之純化及對小鼠肝臟 FL83B細胞之葡萄糖恆定調節。東海大學食品科學研究所 碩士論文。(2011)。
- 巫熒。綠藻水解物對 α -葡萄糖苷酶與 α -澱粉酶之抑制與活性物質的純化。海洋大學 食品科學系 碩士論文。(2009)。
- 吳青蓉。黃金銀耳酸性多醣對 FL83B 小鼠肝臟細胞具胰島素增敏功效。東海大學 食品科學系 碩士論文。(2011)。
- 林建谷。綠藻萃取物與細胞壁組成之分離、鑑定與抑制糖苷酵素活性。靜宜大學 食品科學系 碩士論文。(2008)。
- 林宏達。認識糖尿病。台灣糖尿病協會。(2003)。
- 林書玉。紅豆蔻揮發性及抗氧化成分之研究。東海大學食品科學研究所 碩士論文。(1997)。
- 林念穎。茜草根正己烷及乙酸乙酯萃取物之抗氧化成分。東海大學食品科學研究所 碩士論文。(2009)。
- 林天送。你的生命力—從自由基談起。健康世界雜誌社。(1999)。

- 林宏達。認識糖尿病。台灣糖尿病協會。(2003)。
- 郝凱衡。酚類抗氧化劑(上)－合成類。食品資訊。157:34-38。(1999)。
- 洪裕閔。雷丸抗氧化、螢光成分及揮發性成分之研究。東海大學食品科學研究所 碩士論文。(2001)。
- 唐孟成、賈之慎、朱祥瑞和呂順霖。春秋桑葉中黃酮類化合物總量及提取方法比較。浙江農業大學學報 22(4): 394-398。(1996)。
- 徐珊、焦中秀、徐小晶等。馬鞭草醇萃取物對絨毛膜癌JAR細胞增殖及表皮生長因數受體表達的影響。中國藥科大學學報。31:281-284。(2000)。
- 徐華娥、袁紅宇、歐甯。馬鞭草醇萃取物小劑量時能顯著增加紫杉醇的抗腫瘤活性。南京醫科大學學報(自然科學版)。10:1275-1278。(2008)。
- 高馥君，李敏雄。食品保存與抗氧化劑。食品工業。30(12):17-24。(1998)。
- 郝立智、楊純宜、林興中。第二型糖尿病之診斷和藥物治療趨勢。當代醫學。38(5):368-378。(2011)。
- 梁佳玟、賴怡君、朱燕華。中草藥對於促發炎細胞激素生成之影響。中華醫誌。15(4):293-304。(2004)。
- 陳金滄。馬鞭草水淬取物對四氯化碳誘導大鼠肝損傷之護肝及抗氧化功效評估。大仁科技大學教師研究計畫成果報告。(2009)。
- 郭柏村。高粱薑乙酸乙酯萃取物之抗氧化及調節血糖作用。東海大學食品科學研究所 碩士論文。(2011)。
- 陳佩君。女貞子抗氧化性及揮發性成分之研究。東海大學食品科學研究所 碩士論文。(2003)。
- 陳銘鴻、康玉嬋、王佩文。Acarbose應用於第二型糖尿病合併腎衰竭患者之可能禁忌機轉。內科學誌。20:434-439。(2009)。
- 菅野光男。苦瓜降低血糖值 初版。林鬱文化事業有限公司。(2001)。
- 湯樹良譯。馬鞭草中促進神經生長因數介導的軸突生長的新成分 littorachalcone。國外醫學中醫藥分冊。26:177(2004)。
- 馮播、徐昌芬。馬鞭草C部位(4'-methylether-scutellarein, 4-MS)對人絨毛膜癌細胞增殖的抑制作用。中國腫瘤生物治療雜誌。15:444-447。(2008)。
- 滿田久輝，安本教傳，岩見公和。抗氧化成分對亞麻油酸之自氧化的影響。營養與糧食。19:210-214。(1967)。
- 葉力璋。蔓荊子抗氧化成分之研究。東海大學食品科學研究所 碩士論文。(2007)。
- 遠藤 剛、淺田浩二。活性酸素在生物中之生存、消去、作用。食品

- 工業。5月30日。20-25。(1992)。
- 鄭芳琪。番石榴葉水萃取物降血糖作用及有效成分分離。國立台灣大學生物資源暨農學院食品科學研究所博士論文。(2009)。
- 劉錦秀譯。修復身體的黃金7小時。大是文化。(2011)。
- 樊謙騰。鳳凰花及山竹果殼抗氧化成分與花青素之研究。東海大學食品科學研究所 碩士論文。(1996)。
- 簡永亮。沙苑子、馬櫻丹花抗氧化成分及沙苑子揮發性成分之研究。東海大學食品科學研究所 碩士論文。(2002)。
- 蕭蘇萍譯。沿海馬鞭草中 1 個新的具有促進神經生長因數活性的環烯醚萜糖苷。國外醫學中醫中藥分冊。26：353。(2004)。
- 鍾玉玲。海巴戟天葉、莖及果實粗萃物的抗氧化活性之比較。嘉南藥理科技大學 生物科技研究所 碩士論文。(2003)。
- 顏國欽、劉展罔、韓建國、劉冠汝、李嘉展、陳建元、蘇敏昇、馮惠萍、謝秋蘭、饒家麟、梁弘人、林聖敦、江伯源、李政達、盧更煌、周志輝。食品化學。華格納企業股份有限公司。(2007)。
- 蘇正德、蔡文騰、張基煌、蘇女淳。茶湯與茶渣兒茶酚含量及抗氧化性之調查研究。食品科學18: 234-248。(1991)。
- Ali, H., Houghton, P. J., Soumyanath, A. α -Amylase inhibitory activity of some malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *Journal of Ethnopharmacology* 107: 449–455(2006).
- Ali, H., Houghton, P. J., Soumyanath, A. α -Amylase inhibitory activity of some malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *Journal of Ethnopharmacology* 107: 449–455(2006).
- American Diabetes Association (ADA). Standard of medical care in diabetes-2011. *Diabetes Care*, Supplement 1, 34: S11-S61(2011).
- Anguelova, T.; Warthsen, J. Degradation of lycopene, α -carotene, and β -carotene during lipid peroxidation. *J. Food Sci.* 65: 71-75(2000).
- Aruoma, O. I. Antioxidant actions of plant foods: use of oxidative DNA damage as a tool for studying antioxidant efficacy. *Free Radic. Res.* 30: 419-427(1999).
- Aruoma, O. I. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem.* 72: 145-171(1994).
- Arnao, M. B.; Cano. A.; Hernadez-Ruiz, J.; Carcia-Canovas, F.; Acosta, M. Inhibition by L-ascorbic acid and other antioxidants of 2,2'-azino-bis

(3-ethylbiazoline-6-sulfonic acid) oxidation catalyzed by peroxidase : a new approach for determining total antioxidant status of food. *Analy. Biochem.* 236: 255-261(1996).

Atef A. El-Hela, Hussein A. Al-Amier, Taghreed A. Ibrahimc. Comparative study of the flavonoids of some *Verbena* species cultivated in Egypt by using high-performance liquid chromatography coupled with ultraviolet spectroscopy and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.* 1217: 6388-6393 (2010).

Barry, H.; John, M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford science. (1999).

Bate, S.; Swain, E. C. *Comparative Biochemistry, Vol. 3,* Mason, H. S. and Florin, M., Eds., Academic Press, New York. 764.(1962).

Bando, N.; Hayashi, H.; Wakamatsu, S.; Inakuma, T.; Miyoshi, M.; Nagao, A.; Yamauchi, R.; Terao, J. Participation of singlet oxygen in ultraviolet-a-induced lipid peroxidation in mouse skin and its inhibition by dietary β -carotene: an *ex vivo* study. *Free Radic Biol Med.* 37: 1854-1863(2004).

Bhandari M-R, Nilubon J-A, Hong G, and Kawabata J. α -glucosidase and α -amylase inhibitory activities of Nepalese edicinal herb Pakhanbhed(*Bergenia ciliate*, Haw). *Science Direct*, 106: 247252(2008).

Bilia, A.R., Giomi, M., Innocenti, M., Gallori, S., Vincieri, F.F. HPLC–DAD–ESI–MS analysis of the constituents of aqueous preparations of verbena and lemon verbena and evaluation of the antioxidant activity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 46 : 463–470(2008).

Branen, A. C. Toxicologes and biochemistry of butylated hydroxyanisole. and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 52: 59-63(1975).

Bros, W. ; Heller, W. ; Michel, C.; Saran, M. Flavonoids as antioxidants : Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* 186: 343-355(1990).

Burton, G. W. Vitamin E: molecular and biological function. *Pro. Nutr. Soc.* 53: 251-262(1994).

Calvo, M.I., Vilalta , N., Julian, A. S. and Fernandez , M. Anti-inflammatory activity of leaf extract of *Verbena officinalis* L. *Phytomedicine*, Vol. 5(6): 465-467(1998).

Calvo, M.I. Anti-inflammatory and analgesic activity of the topical preparation of *Verbena officinalis* L. *Journal of Ethnopharmacology* 107: 380-382 (2006).

Cardinali A, Pati S, Minervini F, D'Antuono I, Linsalata V, Lattanzio V. Verbascoside, isoverbascoside, and their derivatives recovered from

- olive mill wastewater as possible food antioxidants. *J Agric Food Chem.* 60(7): 1822-9(2012).
- Calvo, M. I., San Julian ,A., Fernandez ,M. Identification of the Major compounds in extracts of *Verbena officinalis* L. (Verbenaceae) by HPLC with post-column derivatization. *Chromatographia* Vol.46, No. 5-6(1997).
- Campo G, Marchesini J, Bristot L, Monti M, Gambetti S, Pavasini R, Pollina A, Ferrari R. The *in vitro* effects of verbascoside on human platelet aggregation. *J Thromb Thrombolysis.* Jun 22 (2012).
- Ceriello, A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a “causal” antioxidant therapy. *Diabetes Care* 26: 1589-1596(2003).
- Chen Rui-Chuan, SU Jin-Hua, Yang Shan-Min, LI Ji, Wang Tian-Jiao, Zhou Hong. Effect of isoverbascoside, a phenylpropanoid glycoside antioxidant, on proliferation and differentiation of human gastric cancer cell. *Acta Pharmacol Sin* ,23 (11): 997-1001(2002).
- Cook, N. C.; Samman, S. Flavonoids: Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.* 7: 66-76(1996).
- Deepak M, Sukhdev S, Handa. Antiinflammatory activity and composition of extracts of *Verbena officinalis*. *Phytotherapy Res*,14: 463-465(2000).
- Deepak M, Handa SS. Antiinflammatory activity and chemical composition of extracts of *Verbena officinalis*. *Phytother. Res.* 14: 463-465 (2000).
- Dickinson P-J, Carrington A-L, Forst G-S, Boulton A. J. M. Neurovascular disease, antioxidants and glycation in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 18: 260-272(2002).
- Duman, B. S., Turkoglu, C., Gunay, D., Cagatay, P., Demiroglu, C., Buyukdevrim, A. The interrelationship between insulin secretion and action in type 2 diabetes mellitus with different degrees of obesity: evidence supporting central obesity. *Diabetes Nutr. Metab.* 16: 243-250(2003).
- E. Casanova & J. M. García-Mina & M. I. Calvo. Antioxidant and antifungal activity of *Verbena officinalis* L. Leaves. *Plant Foods Hum Nutr*63: 93–97(2008).
- Fang, Y. Z. Free radicals and nutrition. In: Fang, Y. Z.; Zheng, R. L.,(Ed.). *Theory and application of free radical biology.* Beijing: Scientific Press, 647(2002).
- Fernández M. *Las plantas en la medicina popular.* (navarra 1.Navarra húmeda del noroeste) . Pamplona: Eusko Ikaskuntza(1981).

Fridovich, I. Superoxide radical and superoxide dismutase. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 97-112(1995).

Frandsen, T.P., Svensson, B. Plant α -glucosidases of the glycoside hydrolase family 31. Molecular properties, substrate specificity, reaction mechanism, and comparison with family members of different origin. *Plant Molecular Biology* 37: 1-13(1998).

Funes, L., Fernandez-Arroyo, S. Laporta, O., Pons ,A., Roche, E., Segura-Carretero , A., Fernandez-Gutierrez , A., Micol , V. Correlation between plasma antioxidant capacity and verbascoside levels in rats after oral administration of lemon verbena extract. *Food Chemistry* 117: 589–598(2009).

George, K. B.; Lopes, Herbert, M.; Scschulman and Marcelo, H. L. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1472: 142-152(1999).

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

Gutteridge, J. M. Anthracycline toxicity, iron and oxygen radicals, and chelation therapy. *J. Lab. Clin. Med.* 122: 228-229(1993).

Halliwell, B. and Gutteridge, J. M.C. In “Antioxidants in nutrition, health and disease.” , 90-110(1994).

Halliwell, B.; Murcia, M. A.; Chirico, S.; Aruoma, O. I. Free radicals and antioxidants in food and *in vivo*: What they do and how they work. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35: 7-20(1995).

Hernandez NE , Tereschuk ML , Abdala LR. Antimicrobial activity of the flavonoids in medicinal plants from Taft del Valle (Tucumbn, Argentina). *J Ethnopharmacol*,73: 317-322(2000).

Horn, R. C.; Vargas, V. M. Antimutagenic activity of extracts of natural substances in the Salmonella/microsome assay. *Mutagenesis.* 18: 113-118(2003).

Huang, M. T.; Chang, R. L.; Wood, A. W.; Newmark, H. L.; Sayer, J. M.; Yagi, H.; Jerina, D. M.; Conney, A. H. Inhibition of the mutagenicity of bay-region diol-epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by tannic acid, hydroxylated anthraquinones and hydroxylated cinnamic acid derivatives. *Carcinogenesis.* 6: 237-242(1985).

Hudson, B. J. F. Food antioxidants, Elsevier science Publishing Co. New York. (1990).

IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of

Chemicals to Humans. Some Naturally Occurring and Synthetic Food Components, Furocoumarins and Ultraviolet Radiation. Butylated hydroxytoluene (BHT), International Agency for Research on Cancer, Lyon., 40: 161-206(1986b).

IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans. Some Naturally Occurring and Synthetic Food Components, Furocoumarins and Ultraviolet Radiation. Butylated hydroxyanisole (BHA). International Agency for Research on Cancer, Lyon. 40: 123-159(1986a).

Jacob, R. A. Nutrition, health and antioxidants. INFORM. 11: 1271-1275(1994).

Julkunen-Tiitto R. Phenolic constituents in the leaves of Northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. Journals of Agricultural and Food Chemistry, 33: 213-217(1985).

Kellogg, E. W. III; Fridovich, . Superoxide, hydrogen peroxide and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. J. Biol. Chem. 250: 8812-8815(1975).

Kunfeng Duan, Zhi fang Yuan, WeiGuo, Yan Meng, YangCui,Dezhi Kong, Lan tong Zhang, Na Wang. Review. LC-MS/MS determination and pharmacokinetic study of five flavones components after solvent extraction/acid hydrolysis in rat plasma after oral administration of *Verbena officinalis* L. extract. Journal of Ethnopharmacology 135(2):201-208 (2011).

Larson, R. A. The antioxidants of higher plants. Phytochem. 27: 969-978(1998).

Li Ji, Zhou Hong, Zheng Yun, Ling Bingzheng, Zheng Rongliang, Jia Zhongjian. Effect of natural antioxidant isoverbascoside on the multiplication and ultrastructure of human gastric adenocarcinoma cells. Journal of Xiamen University (Natural Science)R96: 05-24(1995).

Lodovici, M., Guglielmi, F., Casalini, C., Meoni, M., Cheynier, V, Dolaro. Antioxidant and radical scavenging properties *in vitro* of polyphenolic extracts from red wine. Eur. J. Nutr. 40: 74-77(2001).

Matschinsky FM. Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator pancreatic β -cells and hepatocytes. Diabetes. 39: 647-652(1990).

Mayer JP, Zhang F, DiMarchi RD. Insulin structure and function. Biopolymers. 88(5): 687-713(2007).

Maarten, F. C.M.; Petra, L. M.; Wilbert, H. M.; Eric, A. P. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction a review. European

Journal of Obs. Gynecol. Reprod. Biol. 82: 171-184(1999).

McCord, J. M. The evolution of free radicals and oxidative stress. Am. J. Med. 108(8): 652-659(2000).

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

Miller, N. J.; Rice-Evans, C. A.; Davies, M. J.; Gopinathan, V.; Milner, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant capacity and its application to neonates. Clin. Sci. 84: 407-412(1993).

Moskovitz, J.; Yim, M. B.; Chock, P. B. Free radicals and diseases. Arch. Biochem. Biophys. 397(2): 354-359 (2002).

Mohammed Hosny and John P. N. Rosazza. Structures of ferulic acid glycoside esters in corn hulls. Journal of Natural Products, 60: 219-222 (1997).

Mundkinajeddu D. and Sukhdev S. H. Quantitative determination of the major constituents of *Verbena officinalis* using high performance thin layer chromatography and high pressure liquid chromatography. Phytochem. Anal. 11: 351-355 (2000).

Nawar, W. W. Lipid in "Food Chemistry". Fennema, O. R. Ed., Marcel Dekker, INC., New York. 139-244(1985).

Papas, A. M. Diet and antioxidant status. Food Chem. Toxic. 37: 999-1007(1999).

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

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

Poitout, V., Robertson, R. P. Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes-a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. Endocrinology 143: 339-342(2002).

Prentki, M., Nolan, C. J. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. J. Clin. Invest. 116: 1802-1812(2006).

Quirantes P., Funes, L., Micol, V., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. High-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem mass spectrometry to identify phenolic compounds from a lemon verbena extract. Journal of Chromatography A, 1216: 5391-5397(2009).

Rahimi, R., Nikfar, S., Larijani, B., and Abdollahi, M. A review on the

role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomed. Pharmacother.* 59: 365-373(2005).

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

Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20: 933-956(1996).

Rikans, L. E.; Hornbrook, K. R. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim. Biophys. Acta.*,1362: 116-127(1997).

Ross S, Gulve E, and Wang M. Chemistry and Biochemistry of Type 2 Diabetes. *Chemical Reviews*,104: 1255-1282(2004).

Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 414: 799-806(2001).

Sau-Wan Lai, Man-Shan Yu, Wai-Hung Yuen, Raymond Chuen-Chung Chang. Novel neuroprotective effects of the aqueous extracts from *Verbena officinalis* Linn. *Neuropharmacology* 50:641-650(2006).

Scalbert, A.; Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130: 2073-2085(2000).

Schildermann, P. A. E. L.; Ten Hoor, F.; Kleinjas, J. C. S. Induction of oxidative DNA damage and early lesions in rat gastro-intestinal epithelium in relation to prostaglandin H synthase-mediated metabolism of butylated hydroxyanisole. *Food Chemistry*.33: 99-109(1995).

Sen, C. K. Nutritional biochemistry of cellular glutathione. *Nutrl. Biochem.* 8: 660-672(1997).

Shigenaga, M. K.; Gimeno, C. J.; Ames, B. N. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 86: 9697-9701(1989).

Shepherd, P.R., and B.B. Kahn. Glucose transporters and insulin action: Implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*341(4): 248-257(1999).

Sheyla Rehecho, Olman Hidalgo, Mikel García-Iñiguez de Cirano, Iñigo Navarro, Iciar Astiasarán, Diana Ansorena, Rita Yolanda Cavero, María Isabel Calvo. Chemical composition, mineral content and antioxidant activity of *Verbena officinalis* L. *LWT - Food Science and Technology* 1-8 (2010).

Sherwin, E. R. Oxidation and antioxidants in fat and oil processing. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 55: 809-814(1978).

Shimada K, Fujikawa F, Yahara K, and Nakamura T. Antioxidative

properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 945-948(1992).

Shim, Y. J., Doo, H. K., Ahn, S. Y., Kim, Y. S., Seong, J. K., Park, I. S., Min, B. H. Inhibitory effect of aqueous extract from the gall of *Rhus chinensis* on alpha-glucosidase activity and postprandial blood glucose. *Journal of Ethnopharmacology* 85: 283–287(2003).

Simic, M. G. Mechanisms of inhibition of free-radical processes in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.* 202: 377-386(1988).

Susana Manzano and Gary Williamson. Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple decrease glucose uptake and transport by human intestinal Caco-2 cells. *Molecular Nutrition and Food Research*. 54: 1773–1780 (2010).

Tang, Y. F., Huang, D.F., Xie, M. Y. Effects of verbascoside and isoverbascoside on proliferation of dendritic Cells. *Chinese Pharmaceutical Journal*, V43(23): 1785-1787(2008).

Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K., Matsuoka, T. Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids. *J Nutr Sci Vitaminol* 52: 149-153(2006).

Takeshi K, shoichi N, Jo S, Yansunori K, Yasuhiko I, Masashi K, Kisiho N, Akira S, Yutaka S, Chikako I, Kenji S, Kyohei N, and Takashi K. Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus, *Diabetes Research and Clinical Practice*. 55: 65-85(2002).

Topinka, J.; Bincova, B.; Sram, R. J.; Erin, A. N. The influence of α -tocopherol and pyritinol on oxidative DNA damage and lipid peroxidation in human lymphocytes. *Mutat Res.* 255: 131(1989).

Valko, M.; Rhodes, C. J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160: 1-40(2006).

Wang TJ, Yang SM, Huang ZP, Li QF, Li QG, Zhou H, Zheng RL, Jia ZJ. Induced-differentiation and cytotoxicity of isoverbascoside on HL-60 cells. *Acta Biologiae Experimentalis Sinica*. 32(4): 321-7(1999).

White MF, Kahn CR. *J Biol Chem*. The insulin signaling system. *Jan* 7;269(1): 1-4(1994).

Wu, G.; Fang, Y. Z.; Yang, S.; Lupton, J. R.; Turner, N. D. Glutathione metabolism and its implications for health. *Nutr. Sci.* 18: 489-492(2003).

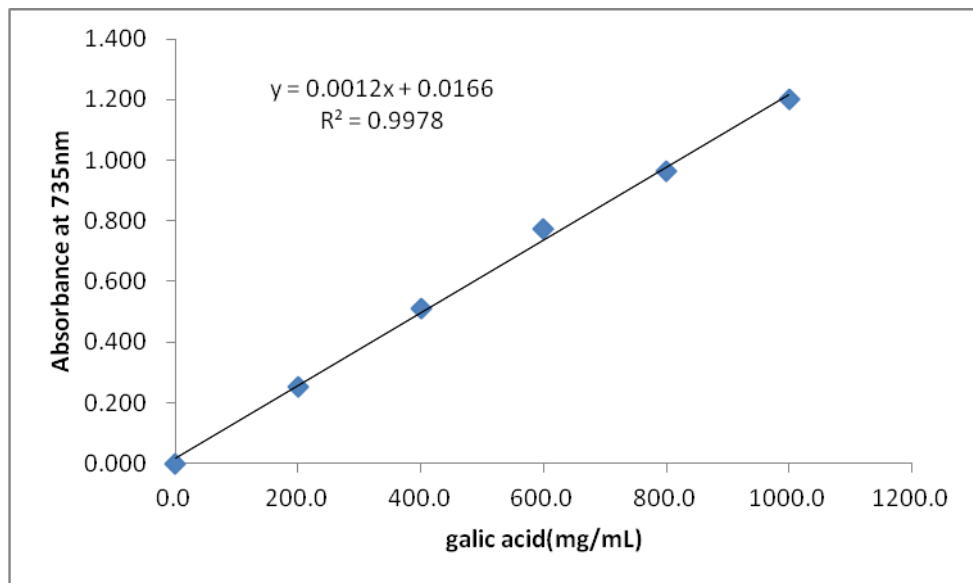
Yenny Adriana Gomez-Aguirre, Alejandro Zamilpa, Manases Gonzalez-Cortazar, Gabriela Trejo-Tapia. Adventitious root cultures of *Castilleja tenuiflora* Benth. as a source of phenylethanoid glycosides. *Industrial Crops and Products* 36: 188–195 (2012).

Yokozaawa, T.; Cho, E. J.; Hara, Y.; Kitaani, K. Antioxidative activity of

green tea treeayed with radical initiator 2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride. *J. Agric. Food Chem.* 48: 5068-5073(2000).

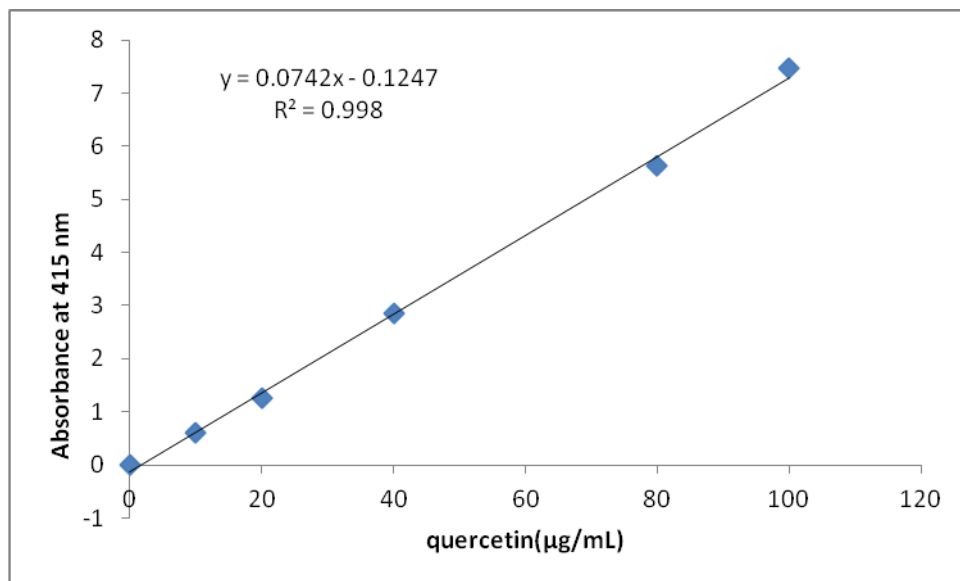
Zimmet, P., Alberti, K. G., Shaw, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414: 782-787(2001).

捌、附表



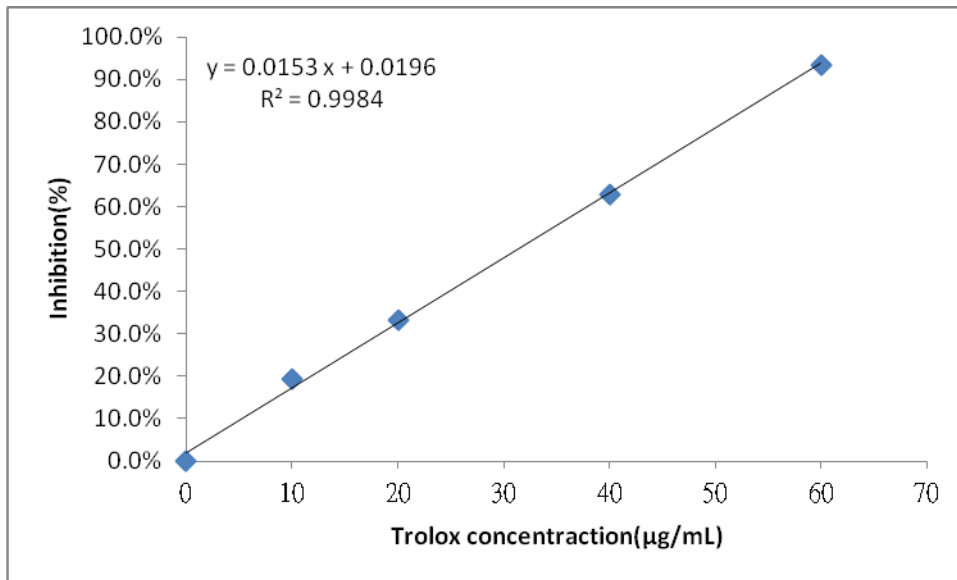
附錄 7-1、沒食子酸之標準曲線圖。

Appendix 7-1 Standard curve of gallic acid.



附錄 7-2、槲皮酮之標準曲線圖。

Appendix 7-2 Standard curve of quercetin.



附錄 7-3、Trolox之標準曲線圖。

Appendix 7-3 Standard curve of trolox.