

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)

小葉山葡萄莖正丁醇萃取物及純化物質之抗氧化及醣解酶  
素抑制作用

Antioxidant and glycosidase inhibitory activity of *n*-butanol  
extract and isolated components from  
*Vitis thunbergii* stems

研究生：陳建宏 (Jian-Hong Chen) 撰

中華民國一百零二年七月

July, 2013

## 謝誌

研究所的求學生涯在此即將畫下休止符，從一個懵懂的大學畢業生，開始學習思索如何開拓未來，慢慢與食品界產生了更緊密的羈絆，這段期間經歷了不少喜怒哀樂與難忘的回憶，還好有身邊的朋友一起打拼與努力。許多前輩的協助讓我今日的學業得以完成，內心滿是感恩。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、吳明昌教授、蔡正宗教授及江文德教授對學生論文詳加審閱及斧正，使論文更趨完整。特別感謝蔡正宗教授在實驗上的指導並給予很多檢測食品的機會。

在學期間，感謝學長姐欣怡、瑄閔、柏村、怡慧、綱存、瑋翔、彥蘋、昱仁的關懷與實驗技術的傳授與協助。感謝同窗好友中愷、俊智、佩君、昭伶、昭蓁、虹每、彥甫的一路相挺，有你們真好。感謝學弟妹皓儀、昱翔、瀚文、宛汝、子閔、憶庭、昱伶在實驗之餘的陪伴與支持。特別感謝芳真學姊在求職就業的路程上給予很多的建議。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。

最後感謝一路拉拔我長大的爸、媽媽及姐姐，對我的關心總是擺在第一順位，使我總能無後顧之憂的做我想做的事情，現在該是我接下責任的時候了，為家庭也為社會付出這些年我所學習到的知識。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。

陳建宏 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  
中華民國一百零二年七月

# 目錄

| 頁   | 數    |
|---|------|
| 目錄.....                                   | I    |
| 圖目錄.....                                  | IV   |
| 表目錄.....                                  | VII  |
| 附目錄.....                                  | VIII |
| 中文摘要.....                                 | IX   |
| 英文摘要.....                                 | X    |
| 第一章、前言.....                               | 1    |
| 第二章、文獻回顧.....                             | 2    |
| 2-1 糖尿病.....                              | 2    |
| 2-1-1 糖尿病主要類型.....                        | 4    |
| 2-1-2 胰島素與血糖之維持恆定.....                    | 6    |
| 2-1-3 胰島素阻抗性與發炎反應.....                    | 7    |
| 2-1-4 糖尿病併發症.....                         | 8    |
| 2-1-5 糖尿病之治療.....                         | 9    |
| 2-2 高血糖與活性氧族群.....                        | 10   |
| 2-2-1 活性氧族群.....                          | 10   |
| 2-2-2 高血糖誘導活性氧之生成機制.....                  | 13   |
| 2-2-3 抗氧化系統.....                          | 24   |
| 2-2-4 抗氧化劑與糖尿病.....                       | 33   |
| 2-3 高血糖與醣解酵素.....                         | 35   |
| 2-3-1 $\alpha$ -澱粉酶與 $\alpha$ -葡萄糖苷酶..... | 35   |
| 2-3-2 醣解酵素之抑制作用對於高血糖症狀之改善.....            | 35   |
| 2-4 糖尿病之治療.....                           | 38   |
| 2-5 小葉山葡萄背景介紹.....                        | 41   |
| 2-5-1 植物介紹.....                           | 41   |
| 2-5-2 細本山葡萄之傳統功效.....                     | 41   |
| 2-5-3 小葉山葡萄之生理活性.....                     | 43   |

|   |    |
|---|----|
| 第三章、研究動機與實驗架構.....  | 48 |
| 3-1 研究動機.....   | 48 |
| 3-2 實驗架構.....   | 49 |
| 第四章、材料與方法.....  | 51 |
| 4-1 實驗材料.....   | 51 |
| 4-2 實驗試藥與溶劑.....  | 51 |
| 4-2-1 抗氧化試驗之試藥.....                                       | 51 |
| 4-2-2 醣解酵素抑制試驗之試藥.....                                    | 52 |
| 4-2-3 純化成分分析及光譜分析之溶劑.....                                 | 52 |
| 4-3 實驗儀器設備.....   | 52 |
| 4-4 實驗方法.....   | 54 |
| 4-4-1 樣品萃取.....   | 54 |
| 4-4-2 水分含量測定.....   | 55 |
| 4-4-3 總酚含量測定(total phenolic compounds determination)..... | 55 |
| 4-4-4 總類黃酮含量測定(Flavonoid determination).....              | 56 |
| 4-4-5 DPPH 自由基清除能力試驗.....                                 | 56 |
| 4-4-5 ABTS 自由基清除試驗(ABTS radical-scavenging assay).....    | 57 |
| 4-4-6 $\alpha$ -amylase 抑制能力測定.....                       | 59 |
| 4-4-7 $\alpha$ -glucosidase 抑制能力測定.....                   | 59 |
| 4-4-8 小葉山葡萄莖抗氧化及醣解酵素抑制成分之萃取、分離與純化。.....                   | 60 |
| 4-4-8-1 區分 I-I-I 分析型高效液相層析【區分 1~3】.....                   | 62 |
| 4-4-8-2 區分 I-I-I 製備型高效液相層析【區分 1~3】.....                   | 62 |
| 4-4-8-3 區分 I-I-I-2 分析型高效液相層析【純化物質 1、純化物質 2】.....          | 62 |
| 4-4-8-4 區分 I-I-I-2 製備型高效液相層析【純化物質 1、純化物質 2】.....          | 62 |
| 4-4-8-5 區分 I-I-I-3 分析型高效液相層析【純化物質 3、純化物質 4】.....          | 63 |
| 4-4-8-6 區分 I-I-I-3 製備型高效液相層析【純化物質 3、純化物質 4】.....          | 63 |
| 4-4-9 純化物質之結構鑑定.....                                      | 63 |
| 4-4-10 統計分析.....  | 64 |

|  |     |
|--|-----|
| 第五章、結果.....  | 66  |
| 5-1 小葉山葡萄莖不同溶劑萃取物之產率.....  | 66  |
| 5-2 小葉山葡萄莖不同溶劑萃取物之總酚含量.....  | 66  |
| 5-3 小葉山葡萄莖不同溶劑萃取物之總類黃酮含量.....  | 68  |
| 5-4 小葉山葡萄莖不同溶劑萃取物之抗氧化能力.....   | 68  |
| 5-5 小葉山葡萄莖不同溶劑萃取物之醣解酵素抑制活性.....  | 68  |
| 5-6 小葉山葡萄莖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.....                               | 72  |
| 5-6-1 小葉山葡萄莖正丁醇萃取物之第一次 XAD-7 液相層析.....                                 | 72  |
| 5-6-2 小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I 之第二次 XAD-7 液相層析.....                            | 76  |
| 5-6-3 小葉山葡萄莖萃正丁醇萃取物區分 I-I 之 Cosmosil 75 C <sub>18</sub> -OPN 液相層析..... | 80  |
| 5-6-4 小葉山葡萄莖萃正丁醇萃取物區分 I-I-I 之 HPLC 分析.....                             | 84  |
| 5-6-5 小葉山葡萄萃正丁醇萃取物區分 2 之 HPLC 分析.....                                  | 88  |
| 5-6-6 小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 3 之 HPLC 分析.....                                  | 90  |
| 5-7 小葉山葡萄莖正丁醇萃取物純化物質之結構鑑定.....   | 92  |
| 5-7-1 純化物質 1 之結構鑑定.....  | 93  |
| 5-7-2 純化物質 2 之結構鑑定.....  | 97  |
| 5-7-3 純化物質 3 之結構鑑定.....  | 100 |
| 5-7-4 純化物質 4 之結構鑑定.....  | 103 |
| 第六章、結論.....  | 106 |
| 第七章、參考文獻.....  | 107 |
| 第八章、附錄.....  | 121 |

# 圖目錄

| 圖次  | 頁數 |
|---|----|
| 圖 2-1、高糖誘發粒線體產生過量超氧陰離子 $O_2^{\cdot-}$ 而活化導致高血糖傷害之途徑。.....                 | 14 |
| 圖 2-2、醛糖還原酶與多元醇代謝途徑。.....   | 16 |
| 圖 2-3、己醯胺代謝途徑。.....   | 18 |
| 圖 2-4、高糖誘發 PKC 活化機制.....  | 20 |
| 圖 2-5、高糖誘發 PKC 活化之效應。.....  | 21 |
| 圖 2-6、AGEs 前驅物造成細胞損傷之三種方式。.....   | 23 |
| 圖 2-7、細胞內抗氧化酵素之防禦系統。.....   | 26 |
| 圖 2-8、不同型態抗壞血酸與自由基之反應。.....   | 27 |
| 圖 2-9、類黃酮之基本結構圖。.....   | 30 |
| 圖 3-1、山葡萄莖正丁醇萃取物抗氧化及醣解酵素抑制成分之純化流程圖。..                                     | 50 |
| 圖 4-1、小葉山葡萄莖各種溶劑萃取物之製備。.....  | 54 |
| 圖 4-2、DPPH 自由基清除作用之反應式。.....  | 57 |
| 圖 4-3、葡萄糖之呈色反應。.....  | 58 |
| 圖 4-4、山葡萄正丁醇莖萃取物抗氧化及醣解酵素抑制成分之純化流程圖。.                                      | 65 |
| 圖 5-1、小葉山葡萄莖不同溶劑萃取物之 DPPH 自由基清除能力。.....                                   | 69 |
| 圖 5-2、小葉山葡萄莖不同溶劑萃取物之 ABTS <sup>+</sup> 清除能力。.....                         | 70 |
| 圖 5-3、小葉山葡萄莖不同溶劑萃取物對 $\alpha$ -amylase 之抑制率。.....                         | 70 |
| 圖 5-4、小葉山葡萄莖不同溶劑萃取物對 $\alpha$ -glucosidase 之抑制率。.....                     | 70 |
| 圖 5-5、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物之第一次 XAD-7 液相層析圖。.....                                  | 73 |
| 圖 5-6、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物經第一次 XAD-7 液相層析後各沖提區分之 DPPH 自由基清除能力。.....               | 74 |
| 圖 5-7、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物經第一次 XAD-7 液相層析後各沖提區分之 ABTS <sup>+</sup> 清除能力。.....     | 74 |
| 圖 5-8、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物經第一次 XAD-7 液相層析後各沖提區分對 $\alpha$ -amylase 之抑制率。.....     | 75 |
| 圖 5-9、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物經第一次 XAD-7 液相層析後各沖提區分對 $\alpha$ -glucosidase 之抑制率。..... | 75 |

|  |    |
|--|----|
| 圖 5-10、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I 之第二次 XAD-7 液相層析圖。  | 77 |
| 圖 5-11、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I 經第二次 XAD-7 液相層析後各沖提區分之 DPPH 自由基清除能力。   | 78 |
| 圖 5-12、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I 經第二次 XAD-7 液相層析後各沖提區分之 ABTS <sup>+</sup> 清除能力。                                 | 78 |
| 圖 5-13、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I 經第二次 XAD-7 液相層析後各沖提區分之 $\alpha$ -amylase 抑制率。                                  | 79 |
| 圖 5-14、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I 經第二次 XAD-7 液相層析後各沖提區分之 $\alpha$ -glucosidase 抑制率。                              | 79 |
| 圖 5-15、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I-I 之 Cosmosil 75 C <sub>18</sub> -OPN 液相層析圖。                                    | 81 |
| 圖 5-16、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I-I 經 Cosmosil 75 C <sub>18</sub> -OPN 液相層析後各沖提區分之 DPPH 自由基清除能力。                 | 82 |
| 圖 5-17、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I-I 經 Cosmosil 75 C <sub>18</sub> -OPN 液相層析後各沖提區分之 ABTS <sup>+</sup> 清除能力。       | 82 |
| 圖 5-18、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I-I 經 Cosmosil 75 C <sub>18</sub> -OPN 液相層析後各沖提區分之 $\alpha$ -amylase 之抑制率。       | 83 |
| 圖 5-19、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I-I 經 Cosmosil 75 C <sub>18</sub> -OPN 液相管柱層析後各沖提區分之 $\alpha$ -glucosidase 之抑制率。 | 83 |
| 圖 5-20、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I-I-I 之製備型 HPLC 圖。   | 85 |
| 圖 5-21、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I-I-I 經 HPLC 層析後各沖提區分之 DPPH 自由基清除能力。   | 86 |
| 圖 5-22、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I-I-I 經 HPLC 層析後各沖提區分之 ABTS <sup>+</sup> 清除能力。                                   | 86 |
| 圖 5-23、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I-I-I 經 HPLC 層析後各沖提區分之 $\alpha$ -amylase 之抑制率。                                   | 87 |
| 圖 5-24、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I-I-I 經 HPLC 層析後各沖提區分之 $\alpha$ -glucosidase 之抑制率。                               | 87 |
| 圖 5-25、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 2 之分析型 HPLC 圖。   | 89 |
| 圖 5-26、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 3 之分析型 HPLC 圖。   | 91 |

圖 5-27、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物純化物質 1 之紫外線-可見光光譜。...94  
圖 5-28、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物純化物質 1 之  $^1\text{H}$ -核磁共振光譜圖。.....95  
圖 5-29、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物純化物質 1 之  $^{13}\text{C}$ -核磁共振光譜圖。...96  
圖 5-30、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物純化物質 2 之紫外線-可見光光譜。.....98  
圖 5-31、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物純化物質 2 之  $^1\text{H}$ -核磁共振光譜圖。.....99  
圖 5-32、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物純化物質 3 之紫外線-可見光光譜。....101  
圖 5-33、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物純化物質 3 之  $^1\text{H}$ -核磁共振光譜圖。....102  
圖 5-34、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物純化物質 4 之紫外線-可見光光譜。...104  
圖 5-35、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物純化物質 4 之  $^1\text{H}$ -核磁共振光譜圖。...105





## 表目錄

| 表次   | 頁數 |
|--|----|
| 表 2-1、糖尿病之診斷標準.....  | 3  |
| 表 2-2、可能具糖尿病風險患者之診斷標準.....   | 3  |
| 表 2-3、妊娠性糖尿病篩檢.....  | 6  |
| 表 2-4、活性氧族群.....   | 10 |
| 表 2-5、自由基及活性氧之主要來源.....  | 11 |
| 表 2-6、類黃酮之抗氧化性.....  | 31 |
| 表 2-7、具抗氧化能力對糖尿病產生正面作用之植物.....   | 34 |
| 表 2-8、類黃酮對大鼠小腸 $\alpha$ -glucosidase 與豬胰臟 $\alpha$ -amylase 之抑制率.....              | 37 |
| 表 2-9、植物中具有降血糖功能之活性物質.....   | 39 |
| 表 2-10、小葉山葡萄之主治功用及典籍.....  | 42 |
| 表 5-1、小葉山葡萄莖不同溶劑萃取物之產率.....  | 67 |
| 表 5-2、小葉山葡萄莖不同溶劑萃取物之總多酚與總類黃酮含量.....  | 67 |
| 表 5-3、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物經第一次 XAD-7 液相層析後各沖提區<br>分產率.....                                 | 73 |
| 表 5-4、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I 之第二次 XAD-7 液相層析後各<br>沖提區分之產率.....                           | 77 |
| 表 5-5、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I-I 之 Cosmosil 75 C <sub>18</sub> -OPN 液相層<br>析後各沖提區分之產率..... | 81 |
| 表 5-6、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I-I-I 之 HPLC 液相層析後各沖提<br>區分之產率.....                           | 85 |

## 附目錄

| 次序                 | 頁數  |
|--------------------|-----|
| 附錄一、沒食子酸之標準曲線..... | 121 |
| 附錄二、槲皮酮之標準曲線.....  | 121 |



## 中文摘要

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 $\alpha$ -澱粉酶( $\alpha$ -amylase)及 $\alpha$ -葡萄糖苷酶( $\alpha$ -glucosidase)最為重要。中藥材小葉山葡萄科(*Vitis thunbergii*)，文獻證實具有抗氧化、降血脂、抑菌性等生理功能，但對於血糖調控之研究卻相當少，因此本研究探討小葉山葡萄莖之抗氧化性並評估其對醣解酵素之抑制作用，期望小葉山葡萄莖具醣解酵素抑制作用進而對糖尿病顯現改善功效。新鮮中藥材小葉山葡萄莖先以甲醇萃取，再依序利用水、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。結果得知小葉山葡萄莖正丁醇萃取物的抗氧化及醣解酵素抑制作用較佳，此萃取物接續利用層析膠體(Amberlite XAD-7 及 Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN)進行區分，再以 HPLC 純化出 4 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 <sup>1</sup>H、<sup>13</sup>C-NMR 推測其結構為 uridine、isorhamnetin 7-O-glucoside、kaempferol 7-O-glucoside 及 quercetin 7-O-glucoside。

## 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 related 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  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. *Vitis thunbergii*, has long been used in traditional Chinese medicine. Previous studies have demonstrated that *V. thunbergii* have antioxidant, cholesterol-lowering, antibacterial activity. However, possible roles of *V. thunbergii* stems on hypoglycemic regulation have not yet been explored. In the present study, antioxidative and glycosidase inhibitory components of *V. thunbergii* stems were identified, and their hypoglycemic activities were also investigated. *V. thunbergii* stems were extracted with methanol, and the methanol extract was extracted by water with *n*-hexane, ethyl acetate and *n*-butanol successively. These extracts were analysed for potential health promoting properties including their inhibitory effects on starch digestive enzymes and antioxidant activities. The *n*-butanol extract of *V. thunbergii* stems showed strong antioxidant and inhibitory properties against both  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. The extract was further separated successively by Amberlite XAD-7, Comosil 75C<sub>18</sub>-OPN and reversed HPLC chromatographies to obtain four components. The isolated components were presumed to be uridine, isorhamnetin 7-O-glucoside, kaempferol 7-O-glucoside and quercetin 7-O-glucoside by MS, UV and <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-NMR analyses.

# 第一章、前言

近年來，由於西方文化的進入、工作壓力的影響，以及生活觀念的不同，造成飲食習慣逐漸改變，促使國人健康亮起了紅燈，國人多趨向於缺乏運動、高油脂及高熱量飲食等不當生活習慣，因此產生了許多包括糖尿病在內的代謝症候群症(metabolic syndrome disease)。根據行政院衛生署 2013 年發表的統計資料指出 2012 年糖尿病位居國人十大死因第五位，全球罹患糖尿病人口數大約一億七千萬人，估計到西元 2030 年糖尿病患將增加一倍以上(Wild *et al.*, 2004)。而糖尿病的患者也有慢慢年輕化的趨勢。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%，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)。所以適當控制血糖，降低胰島素阻抗性(insulin resistance)，是預防這些疾病惡化的重要步驟。糖尿病患者控制病情的首要之務就是控制血糖，使血糖調節到一定濃度，以避免併發症的發生。基本上，血糖調節的三大方法：(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，據估計約 50% 以上的患者可以因良好的膳食攝取方式而改善病情。此外，在進行藥物療法的同時，膳食療法也需要適當的配合，否則藥物療法也將無法發揮其功能，因此，尋求具調節血糖功效之保健食材已成為一項重要的課題。傳統中藥材小葉山葡萄(*Vitis thunbergii*)，文獻證實具有抗氧化、降血脂、抑菌性等生理功能，但對於血糖調控之研究卻相當少，因此本研究探討小葉山葡萄莖之抗氧化性並評估其對醣解酵素之抑制作用，期望小葉山葡萄莖具醣解酵素抑制作用進而對糖尿病顯現改善功效，並研發做為糖尿病人適用的保健食品。

## 第二章 文獻回顧

### 2-1 糖尿病

糖尿病是一種胰島素分泌不足或胰島素作用缺失所導致的一種醣類代謝的慢性疾病，好發於中老年人，但偶爾也會發生於兒童、青少年或孕婦，根據行政院衛生署 2013 年最新統計資料，2012 年糖尿病位居國人十大死因第五位，且罹患糖尿病人口數有不斷上升的趨勢，根據統計，全球罹患糖尿病人口數大約一億七千萬人，估計到西元 2030 年糖尿病患將增加一倍以上(Wild *et al.*, 2004)。糖尿病屬於一種新陳代謝異常之疾病，主要原因為體內胰島素缺乏或胰島素分泌功能有缺陷，對葡萄糖的利用能力減低，而造成高血糖現象，若是血糖濃度超過 180 mg/dl，腎臟無法回收，便會由尿液排出，糖尿病之名就是由此而來，多喝、多尿、多吃(三多)、疲倦等為主要症狀；有時候會有手腳麻痺、視覺模糊、皮膚傷口不易癒合、女性會陰部發癢等症狀。糖尿病最可怕的地方在於它有許多併發症，急性併發症譬如酮酸血症、高血糖高滲透壓昏迷等；慢性併發症譬如視網膜病變、神經病變、動脈硬化症等，以上症狀已證實與醣化作用有相當大的關聯性，且如及時無適當處置，可能導致器官完全失能等後遺症甚或死亡(Singh, 2001；林，2003)。

依據 2011 年由美國糖尿病學會(American Diabetes Association, ADA)所公布，可藉由測量醣化血色素(glycated hemoglobin, A1C)換算血漿葡萄糖濃度(表 2-1)、空腹血糖值(fasting plasma glucose, FPG)、葡萄糖耐受性試驗(oral glucose tolerance test, OGTT)及隨機血糖值等四種不同形式來評估是否已罹患糖尿病(表 2-2)。

表2-1、A1C與平均血漿葡萄糖值之對比

Table 1-3 Correlation of A1C with average glucose

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

These estimates are based on ADAG data of ~2,700 glucose measurements over 3 months per A1C measurement in 507 adults with type 1, type 2, and no diabetes. The correlation between A1C and average glucose was 0.92 . A calculator for converting A1C results into estimated average glucose (eAG), in either mg/dl or mmol/l, is available at [http:// professional.diabetes.org/eAG](http://professional.diabetes.org/eAG). (ADA, 2011)

表2-2、糖尿病之診斷標準

Table 1-1 Criteria for the diagnosis of diabetes

A1C  $\geq$  6.5%: The test should be performed in a laboratory using a method that is NGSP certified and standardized to the DCCT assay.\*

Or

FPG  $\geq$  126 mg/dl (7.0 mmol/l): Fasting is defined as no caloric intake for at least 8 h.\*

Or

2-h plasma glucose  $\geq$  200 mg/dl (11.1 mmol/l) during an OGTT: The test should be performed as described by the World Health Organization, using a glucose load containing the equivalent of 75 g anhydrous glucose dissolved in water.\*

Or

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

\*In the absence of unequivocal hyperglycemia, result should be confirmed by repeat testing. (ADA, 2011)

## 2-1-1 糖尿病主要類型

### (1) 第一型糖尿病(胰島素依賴型, insulin-dependent diabetes mellitus , IDDM)

第一型糖尿病主要是因為胰臟內的 $\beta$ 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或幼年型(early-onset diabetes)糖尿病，其約佔糖尿病患者人口數 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。

### (2) 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，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 $\beta$ 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、 $\beta$  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)。

### (3) 其他特殊型糖尿病

根據「美國糖尿病協會」在「胰島素使用要領(Lisulin Administraton)」中所發表的申明，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。

### (4) 妊娠性糖尿病

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 2-3)。

表2-3、妊娠性糖尿病篩檢

Table 2-3 Screening for 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)

### 2-1-2 胰島素與血糖之維持恆定

食物中的碳水化合物經由經消化吸收後，以葡萄糖型式進入到身體的血液循環中，胰臟中一種內分泌 $\beta$ 細胞會分泌胰島素並隨著血液循環到全身，刺激各種組織細胞利用血液中之葡萄糖，而葡萄糖在行糖解作用(glycolysis)後，進入TCA循環產生能量，提供各組織利用。當能量足夠供應時，多餘的葡萄糖轉變成肝糖(glycogen)或三酸甘油酯(tri-glycerol)等型式儲存能量。若血糖濃度不足時，肝臟進行肝糖分解(glycogenolysis)及糖質新生作用(gluconeogenesis)，產生葡萄糖；脂肪組織也會經由脂解作用(lipolysis)產生游離脂肪酸(free fatty acid)，成為能量的主要來源，並維持血糖之正常濃度(Crawford and Contran, 1999；Bessesen, 2001)。

胰島素為體內調節代謝的荷爾蒙之一，主要作用是促進醣類、脂肪及蛋白質之合成與儲存，並抑制其分解與釋放至血液循環中。胰島素的分泌主要是因為血糖濃度升高，刺激胰臟 $\beta$ 細胞膜上的葡萄糖轉運蛋白(glucose transporter 2；Glut 2)，將胞外葡萄糖運送至胞內，經由代謝後產生ATP。當細胞內ATP/ADP比值上升，使鉀離子通道關閉，而細胞內鉀離子濃度上升使細胞膜去極化，誘發對膜電位敏感的

鈣離子通道打開，使胞外鈣離子流入，進而促進細胞進行顆粒性胞泄作用(*granule exocytosis*)，導致胰島素釋放至血液，作用於各組織細胞上，促使葡萄糖轉運蛋白由細胞內小體微泡(*intracellular endosome vesicle*)移往細胞膜上，將葡萄糖帶入細胞內，而降低血糖濃度(Darnell *et al.*, 1990)。胰島素作用的三個重要臟器為肝臟、肌肉及脂肪，其中肝臟是維持血糖平衡的最重要組織，藉由葡萄糖帶入或釋出的調節來維持血糖的平衡(Nordlie *et al.*, 1999；Zierath, 2003)。

### 2-1-3 胰島素阻抗性與發炎反應

胰島素阻抗性是指血液循環中之胰島素調節體內能量代謝的能力下降，也就是細胞對胰島素的感應不佳，導致胰島素與受器結合後無法使葡萄糖轉運蛋白移動到細胞膜，以讓葡萄糖進入細胞提供營養(Zick, 2001)。雖然造成胰島素阻抗性的分子機制尚未完全明瞭，但是有部分證據指出其與低程度的發炎反應有關，而此種發炎狀態與糖尿病及心血管疾病亦有所關聯(Hsueh *et al.*, 2003；Hotamisligil, 2006；Shoelson *et al.*, 2006)。長期營養過剩會使巨噬細胞滲透到脂肪組織中，導致局部發炎反應而形成胰島素阻抗性(Weisberg *et al.*, 2003；Xu *et al.*, 2003)。胰島素阻抗性所造成的影響包括肝臟葡萄糖製造的增加、末梢組織對葡萄糖攝入能力減低、異常的脂肪分解等，造成大量葡萄糖產生並釋出至血液中，隨著胰島素阻抗性加劇以及胰臟分泌胰島素之能力逐漸喪失，導致高血糖病症發作，所以胰島素阻抗性被認為是糖尿病發生的重要病因之一(Lillioja *et al.*, 1993；Reaven *et al.*, 1993；Bessesen, 2001)。除了糖尿病之外，胰島素阻抗性也被認為是高血壓、高血脂及心血管疾病等慢性代謝疾病之危險因子(Kahn and Flier, 2000)。

#### 2-1-4 糖尿病併發症

糖尿病的併發症可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；高血糖的代謝異常所引發的神經障礙有手腳麻痺、目眩、噁心等症狀，糖尿病性神經障礙、糖尿病視網膜症及糖尿病腎症為糖尿病之三大併發症(本田，2004)。

##### (1) 糖尿病性神經障礙

在高血糖狀態下的血液會非常黏稠，流動並不順暢，難以進入細小血管中，所以末梢血液會循環不良，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的影響，進而產生疼痛感和發麻感。

##### (2) 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。

##### (3) 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。

##### (4) 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積堆積下來，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，血栓不易形成，此狀態若出現在心臟，就會引起心肌梗塞(王，2001；管野，2001)。

#### (5) 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。

#### 2-1-5 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覷的。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。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。

近年來興起健康養身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)亦受到重視。因此，促使具預防及改善高血醣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性或代謝症候群之保健天然植物上，如人參、苦瓜、兒茶素及發酵乳等皆有文獻指出其可透過不同機制達到改善高血醣、胰島素阻抗及對抗肥胖等(郝等，2011；朱，2009)。

## 2-2 高血糖與活性氧族群

### 2-2-1 活性氧族群

所謂的活性氧族群(reactive oxygen species ; ROS)即是指含氧的高反應分子(Niki, 1992)，它的種類繁多而大致可分為自由基類與非自由基類，如表 2-4 所示。活性氧族群具有開啟氧化之能力，進而產生更多自由基，對生物體造成嚴重的氧化傷害(Sheldon, 2003)，其中以  $\cdot\text{OH}$  毒性最強，可以輕易通過細胞膜而到達細胞核與 DNA 反應，造成 DNA 突變。另有研究指出 ROS 間接誘發脂質氧化反應產生之中間代謝產物，會造成蛋白質損傷、細胞老化、突變癌化甚至死亡(Shigenage *et al.*, 1989 ; Rikans *et al.*, 1997 ; Moskovitz *et al.*, 2002)。

表 2-4、活性氧族群

Table 2-4 Reactive oxygen specie

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

(Abuja and Albertini, 2001)

活性氧族群的來源大致可分為外在及內在兩方面。外在來源包括環境污染物、香菸、離子輻射及化學藥劑等所誘發體內產生之 ROS，細胞行呼吸作用所產生的 ROS 為主要內在來源(Morrissey and O'Brien, 1998)如表 2-5 所示。人體內之自由基的產生大約可分為四類，第一類來自生物合成(biosynthesis)，此類自由基在人體內會因生理需

表 2-5、自由基及活性氧之主要來源

Table 2-5 The major sources of free radicals and reactive oxygens

| Intrinsic Source                         | Extrinsic Source     |
|--|----------------------|
| Electron transport chain of mitochondria | Red-ox substrate     |
| Electron transport chain of microsomes   | Paraquat             |
| Oxidase                                  | Medication oxidation |
| Xanthine oxidase                         | Smoking              |
| Indoleamine dioxygenase                  | Ion irradiation      |
| Tryptophan dioxygenase                   | Sun light            |
| Galactose oxidase                        | Food processing      |
| Lipoxygenase                             |                      |
| Monoamine oxidase                        |                      |
| Phagocytic cells                         |                      |
| Neutrophils                              |                      |
| Monocytes                                |                      |
| Eosinophils                              |                      |
| Endothelial cell                         |                      |
| Auto oxidation-reduction                 |                      |
| Fe <sup>2+</sup>                         |                      |

(Morrissey and O'Brien, 1998)

求而由胺基酸合成，為人體不可或缺，例如：一氧化氮自由基( $\cdot\text{NO}$ )，乃由 L-arginine 在一氧化氮合成酶(NO synthase)的作用下所產生，其不但是人類神經系統傳遞訊息的分子，更對人體免疫系統有所貢獻。第二類來自新陳代謝(metabolism)，這些自由基的產量多寡會因人而異，通常需依賴酵素催化才代謝的機轉中形成，其中最主要的為超氧自由基、羥自由基等(Halliwell, 1994)。第三類由外來物質所引起，包括空氣或水汙染，某些藥物、農藥或防腐劑，或食入燒焦肉類中的多環碳氫化合物(如 benzo  $[\alpha]$  pyrene 或 benzanthracene 等)等，進而對人體產生危害。第四類由不良生活習慣引起，包括長時間情緒緊張，或抽菸使身體持續暴露在充滿外生性及內生性自由基環境中，因而造成傷害(Maxwell, 1992)。





## 2-2-2 高血糖誘導活性氧之生成機制

糖尿病患中發現體內各種組織之 ROS 有明顯增加的現象，體內若長期維持高血糖，葡萄糖會自我氧化產生過多的 ROS，並消耗體內的抗氧化因子，且會使體內蛋白質產生醣化作用，造成細胞損傷，蛋白質醣化過程亦會產生大量 ROS，再度加強蛋白質醣化作用。而在惡性循環之下，導致體內抗氧化系統失衡與不可逆轉之糖尿病所誘發的各種併發症有很大的相關性(Dandona *et al.*, 1996；Baynes *et al.*, 1999；Nishikawa *et al.*, 2000；Brownlee, 2001)。人體內在持續高血糖的情況下，粒線體中超氧陰離子  $O_2^{\cdot-}$  的增加可能是導致糖尿病各種併發症發生的源頭(Korshunov *et al.*, 1997；吳，2004；Jezek *et al.*, 2005)，圖 2-1 表示高糖誘發粒線體產生過量  $O_2^{\cdot-}$ ，而活化導致高血糖傷害之途徑(Brownlee, 2001)。高糖環境下，葡萄糖會透過主要四條途徑，包括：多元醇途徑、己醣胺代謝途徑、PKC 活化效應及後期醣化終產物，而伴隨著 ROS 之生成，造成組織損傷。以下針對四種路徑加以說明。

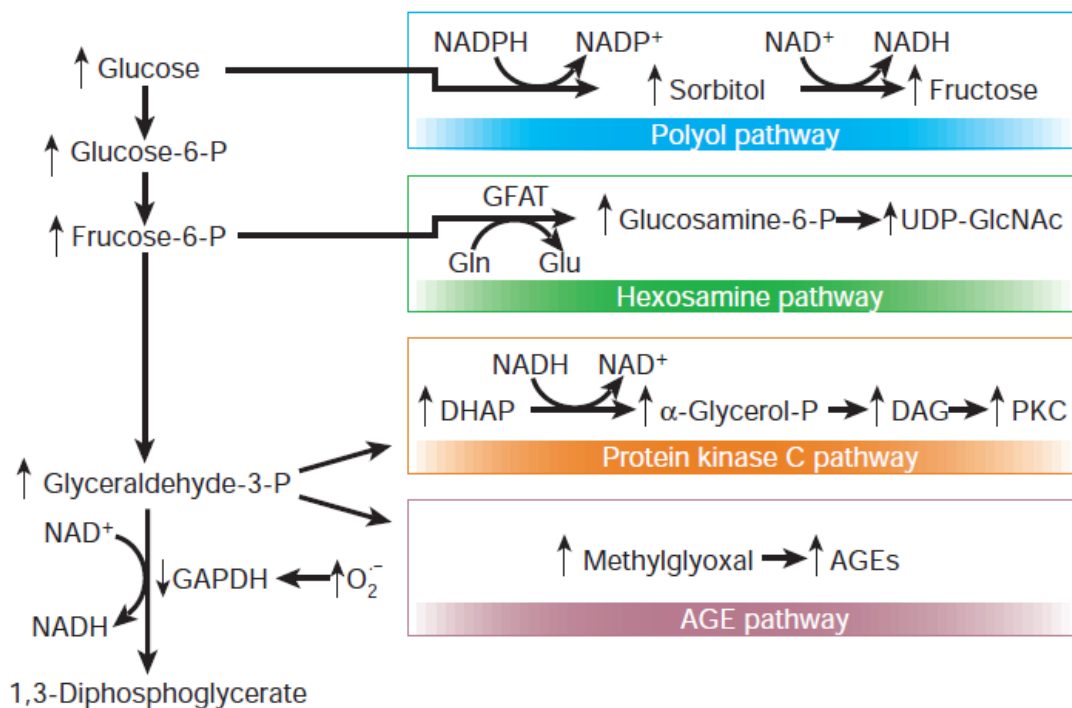


圖 2-1、高糖誘發粒線體產生過量超氧陰離子  $O_2^{\cdot -}$  而活化導致高血糖傷害之途徑

Fig. 2-1 Potential mechanism by which hyperglycaemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates four pathways of hyperglycaemic damage. Excess superoxide partially inhibits the glycolytic enzyme GAPDH, thereby diverting upstream metabolites from glycolysis into pathways of glucose overutilization. This results in increased flux of dihydroxyacetone phosphate (DHAP) to DAG, an activator of PKC, and of triose phosphates to methylglyoxal, the main intracellular AGE precursor. Increased flux of fructose-6-phosphate to UDP-N-acetylglucosamine increases modification of proteins by O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) and increased glucose flux through the polyol pathway consumes NADPH and depletes GSH. (Brownlee, 2001)

### (一)高血糖與多元醇代謝途徑

細胞內的葡萄糖經由醛糖還原酶(aldose reductase)催化下，藉由 NADPH 還原生成山梨糖醇(sorbitol)，山梨糖醇去氫酶(sorbitol dehydrogenase; SDH)還原  $\text{NAD}^+$ ，並將山梨糖醇氧化形成果糖(fructose)的路徑稱為多元醇路徑。圖 2-2 所示為醛糖還原酶與多元醇代謝途徑，醛糖還原酶對葡萄糖之親合性較低，在正常血糖濃度下僅有少量葡萄糖走向多元醇途徑；反之在高血糖情況下，有活化多元醇途徑使得山梨糖醇堆積，造成細胞內滲透壓改變、增加  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  比值及 NADPH 含量減少，影響細胞膜正常代謝而改變膜原本的功能，導致腎臟、周邊神經、視網膜及水晶體等組織傷害(Brownlee, 2001；Nishikawa *et al*, 2000；Yamagishi and Imaizumi, 2005)。山梨糖醇的氧化作用會提升細胞內  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  比值，而抑制醣解代謝酵素 GAPDH 之活性，使 triose phosphate 累積，進而產生 methylglyoxal (MG) 及 diacylglycerol (DAG, PKC 活化物質)。此途徑也會被高糖誘導之 ROS 生成及 DNA 斷裂所活化，而活化的雙羰基化合物(dicarbonyls)，會促進醣化作用(glycation)及後期醣化終產物(advanced glycation end products, AGEs)之形成，且梅納反應中醣類與蛋白質也造成 ROS 之生成(Well-Knecht *et al.*, 1995)。麩胱甘肽還原酶(glutathione reductase)之輔酶 NADPH 若消耗過多，會降低 GSH 之生成，且在糖尿病模式老鼠中也發現眼睛水晶體之多元醇途徑造成氧化壓力升高及減少 GSH 之含量，而利用醛糖還原酶抑制劑(aldose reductase inhibitor)可有效預防 NADPH 之消耗。多元醇的最終產物果糖不易代謝，而且比葡萄糖更容易與蛋白質進行醣化作用，形成後期醣化終產物對身體產生傷害(Brownlee, 2001)。因此，高糖會同時伴隨著醣化作用及氧化壓力，引起更多的併發症。

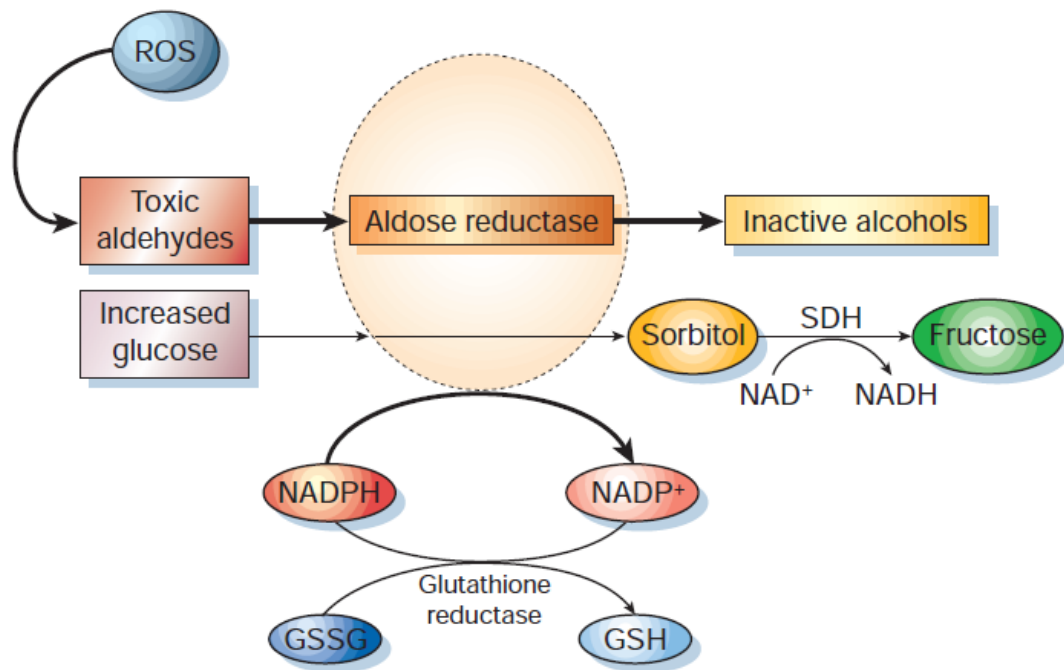


圖 2-2、醛糖還原酶與多元醇代謝途徑

Fig. 2-2 Aldose reductase and the polyol pathway. Aldose reductase reduces aldehydes generated by reactive oxygen species (ROS) to inactive alcohols, and glucose to sorbitol, using NADPH as a co-factor. In cells where aldose reductase activity is sufficient to deplete reduced glutathione (GSH), oxidative stress is augmented. Sorbitol dehydrogenase (SDH) oxidizes sorbitol to fructose using  $\text{NAD}^+$  as a co-factor. (Brownlee, 2001)

## (二)高血糖與己醣胺/六碳醣胺代謝途徑

正常的生理狀態下，只有少量 1-3% 葡萄糖會經由己醣胺途徑進行代謝，然而當細胞內葡萄糖含量升高會使得 fructose-6-phosphate 經由酵素 glutamine: fructose-6-phosphate aminotransferase (GFAT) 催化生成 glucosamine-6-phosphate 再經由 *O*-GlcNAc transferase 轉換成 UDP-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc)。此產物的累積會幫助 proteoglycan 合成及形成 *O*-linked glycoprotein，而 *O*-GlcNAc 會修飾轉錄因子而導致基因轉錄之改變(圖 2-3)。在血管平滑肌細胞中高血糖可透過調節轉錄因子 Sp1 的結合位置而促進胰島素阻抗性相關轉錄因子 PAI (plasminogen activator inhibitor-1)、TGF- $\alpha$  (transforming growth factor- $\alpha$ )、TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) 之活性的增加。研究發現肝臟、脂肪及肌肉組織中過度表現之 GFAT 會造成胰島素阻抗性(Marshall *et al.*, 1991 ; Brownlee *et al.*, 2001)。在老鼠及人類中注射 glucosamine 後，發現會干擾胰島素及  $\beta$  細胞對葡萄糖的敏感性(Monauni *et al.*, 2000)。另外，glucosamine 會誘導  $H_2O_2$  之增加，然而加入抗氧化劑 N-acetylcysteine 可降低 GFAT 之表現。因此，高血糖所誘發之己醣胺途徑會改變許多基因之表現及蛋白質功能異常，使細胞對胰島素產生阻抗性，進而促使糖尿病慢性併發症發生(Brownlee *et al.*, 2001 , Buse, 2006)。

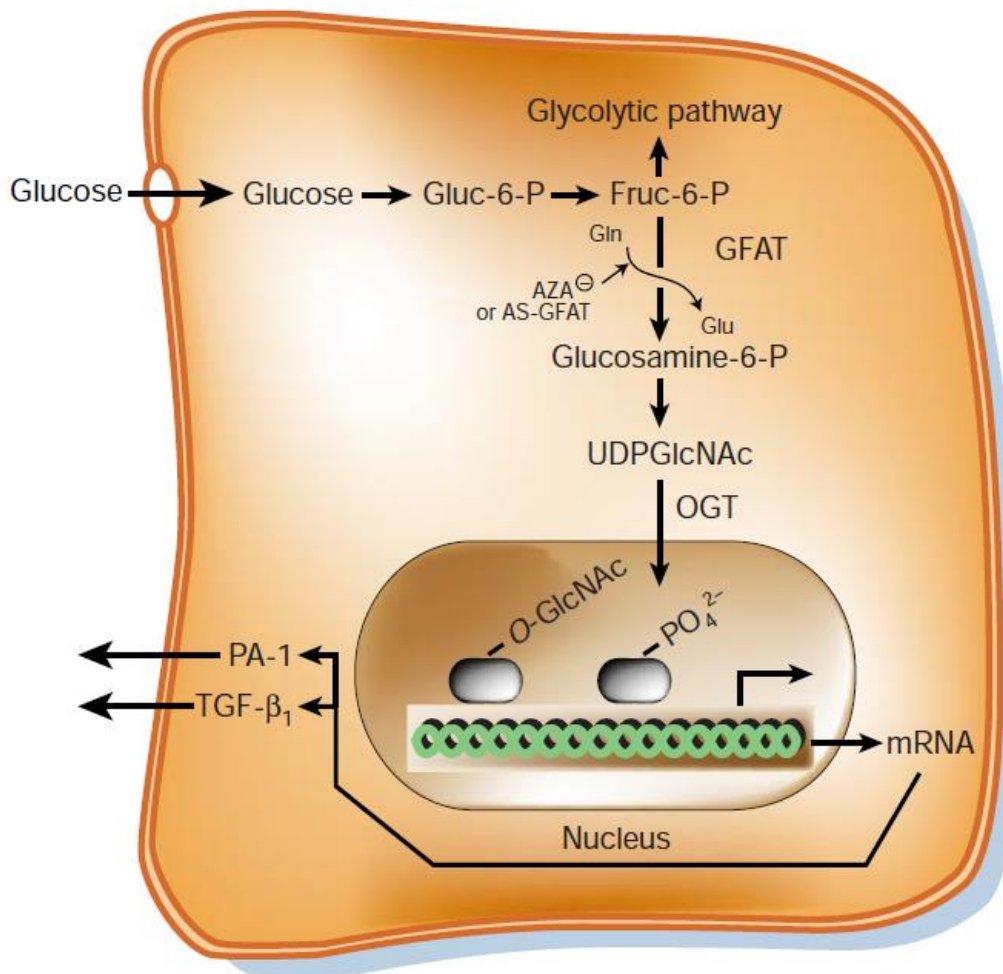


圖 2-3、己糖胺代謝途徑

Fig. 2-3 The hexosamine metabolic pathway. The glycolytic intermediate fructose-6-phosphate (Fruc-6-P) is converted to glucosamine-6-phosphate by the enzyme glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT). Intracellular glycosylation by the addition of N-acetylglucosamine (GlcNAc) to serine and threonine is catalysed by the enzyme O-GlcNAc transferase (OGT). Increased donation of GlcNAc moieties to serine and threonine residues of transcription factors such as Sp1, often at phosphorylation sites, increases the production of factors as PAI-1 and TGF-β<sub>1</sub>. AZA, azaserine; AS-GFAT, antisense to GFAT. (Brownlee, 2001)

### (三)高血糖與 protein kinase C (PKC)之活化

PKC 參與許多細胞的訊息傳遞過程，已知 PKC 的活化會影響細胞增生及分化、腫瘤成長、基因表現及造成血管受損等。PKC 至目前為止至少有十一種異構物，其中有九種可藉由第二傳訊者 DAG 來活化。DAG 的主要來源為醣解代謝產物之中間產物 DHAP (dihydroxyacetone phosphate)，經由 DAG 合成途徑及 phosphocholine (PC)水解而來(圖 2-4)。AGEs 與細胞表面接受體(AGEs receptor, RAGE)的鍵結及多元醇途徑的活化，都可激活 PKC 之表現(Brownlee, 2001)。糖尿病動物及人體實驗發現，DAG 之增加造成糖尿病併發症相關組織，包括肝臟、肌肉、視網膜、心臟、腎小球等胰島素敏感性降低。研究指出高糖誘導血管或內皮細胞，會經由活化 NADPH oxidase 生成 ROS，當以 PKC 抑制劑處理後，發現 ROS 會降低，因此當 PKC 受到抑制時，會降低由高糖所引起之氧化壓力(Inoguchi *et al.*, 2000)。PKC 之活化也會提升 NAD(P)H 氧化酵素、NF- $\kappa$ B 等因子之表現，引發不同生理效應(圖 2-5)。

### Glycolysis

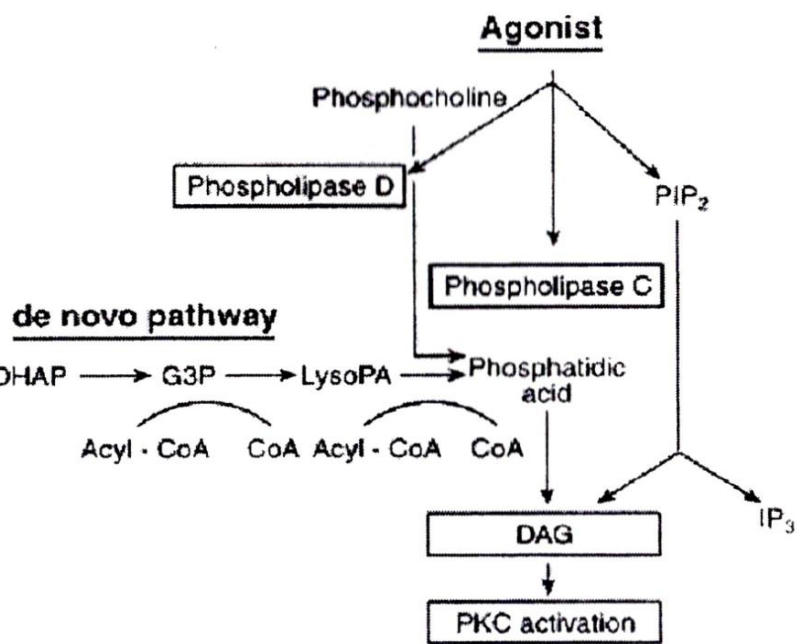
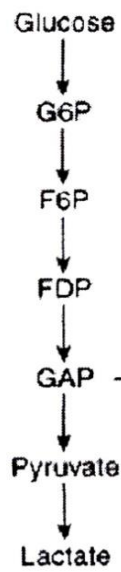


圖 2-4、高糖誘發 PKC 活化機制(Koya and King, 1998)

Fig. 2-4 Mechanisms of hyperglycemia-induced protein kinase C (PKC) activation.



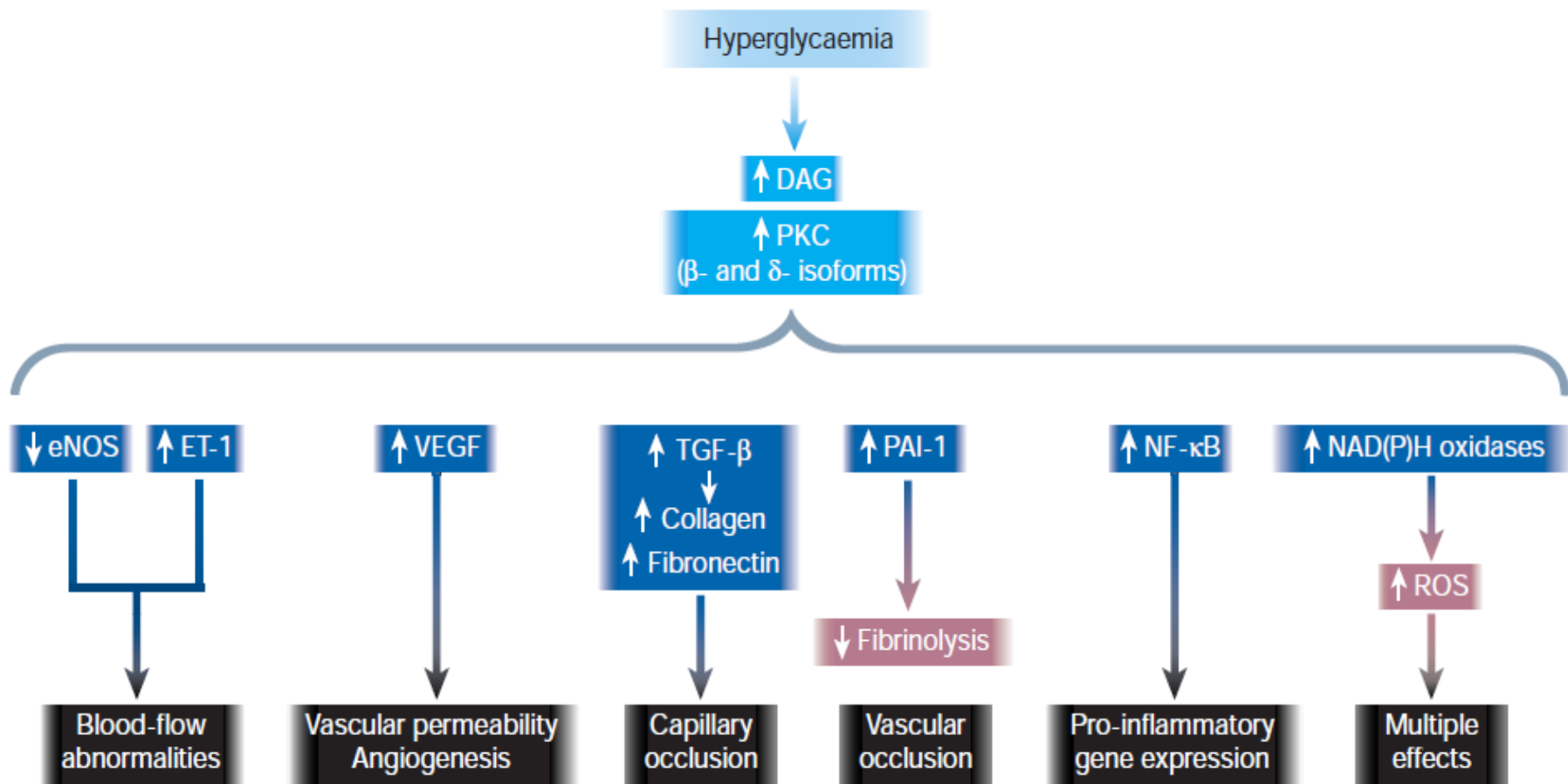


圖 2-5、高糖誘發 PKC 活化之效應

Fig. 2-5 Consequences of hyperglycaemia-induced activation of protein kinase C (PKC). Hyperglycaemia increases diacylglycerol (DAG) content, which activates PKC, primarily the  $\beta$ - and  $\delta$ -isoforms. Activation of PKC has a number of pathogenic consequences by affecting expression of endothelial nitric oxide synthetase (eNOS), endothelin-1 (ET-1), vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )

and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), and by activating NF- $\kappa$ B and NAD(P)H oxidases. (Brownlee, 2001)



#### (四)高血糖與後期醣化終產物

蛋白質的非酵素性醣化作用中，葡萄糖或其它還原性的醣分子的酮基官能基，與蛋白質分子上的胺基之間脫水形成一個希夫氏鹼 (Schiff's base)，造成分子重新排列成 Amadori product，而氧化 Amadori product 會生成具有毒性、抗原性的不可逆物質—後期醣化終產物 AGEs，而長期存在人體內。由於 AGE 產生組織內自由基的速率比沒有經過醣化反應的蛋白質快很多，因此 AGEs 對糖尿病引起的併發症有很大的相關性，譬如動脈硬化症、腎衰竭、白內障、阿茲海默等(劉，2008)。正常人體內的 AGEs 生成是相當緩慢的，因此大多是半衰期 (half-life)較長的蛋白質容易產生 AGEs 堆積現象(Reddy and Beyaz, 2006)。三種胞內雙羰基化合物 glyoxal、3-deoxyglucosone、methylglyoxal 為 AGEs 前驅物，可與細胞內外的蛋白質形成 AGEs (Imanaga *et al.*, 2000)。細胞內 AGEs 前驅物可透過 3 種方式造成細胞傷害(圖 2-6)：(1)細胞內蛋白質因 AGEs 修飾而改變原來的功能；(2)經 AGEs 前驅物修飾之細胞外基質(matrix)與其它基質相互作用，並與細胞上之基質接受體(integrins)結合而誘發訊號傳導途徑；(3)血漿蛋白質經 AGEs 修飾後與內皮細胞、mesangial cell 及巨噬細胞上之 AGE 接受體結合，於細胞內產生 ROS 而活化 NF- $\kappa$ B 導致異常的基因表現(劉，2008)。因此當體內葡萄糖含量過高可能透過此途徑，造成過多的 ROS 生成，引發疾病的產生。

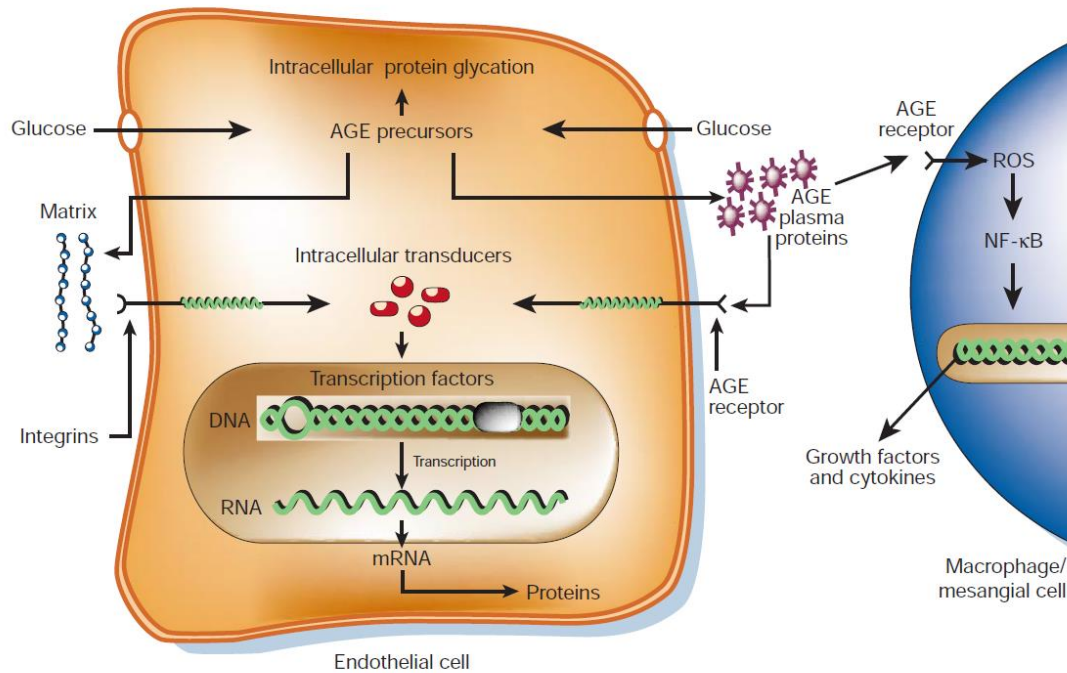


圖 2-6、AGEs 前驅物造成細胞損傷之三種方式

Fig. 2-6 Mechanisms by which intracellular production of advanced glycation end-product (AGE) precursors damages vascular cells. Covalent modification of intracellular proteins by dicarbonyl AGE precursors alters several cellular functions. Modification of extracellular matrix proteins causes abnormal interactions with other matrix proteins and with integrins. Modification of plasma proteins by AGE precursors creates ligands that bind to AGE receptors, inducing changes in gene expression in endothelial cells, mesangial cells and macrophages. (Brownlee, 2001)

### 2-2-3 抗氧化系統

ROS 會對細胞造成氧化傷害，然而生物體內自有一套完整的抗氧化防禦系統可供保護細胞，降低 ROS 對細胞之傷害(圖 2-7)，其大致可分為酵素性抗氧化作用(enzymatic antioxidation)及非酵素性抗氧化作用(non- enzymatic antioxidation)( Valko *et al.*, 2007)。酵素性抗氧化作用包括：超氧歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、麩胱甘肽過氧化酶(glutathione peroxidase, GPx)、麩胱甘肽還原酶(GR)、觸媒(catalase, CAT)、一氧化氮合成酶(NOS)等；而主要非酵素性抗氧化作用成分則包括維生素 C (ascorbic acid)、維生素 E (tocopherol)、麩胱甘肽 (glutathione)、類胡蘿蔔素 (carotenoids)、多酚類 (polyphenols)等。

#### (一) 酵素性抗氧化作用

##### A. 超氧歧化酶

Superoxide dismutase 將超氧陰離子轉變為過氧化氫(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)及氧分子，以減輕超氧陰離子對細胞所造成的傷害 (Beyer, 1994)，其反應式如下：

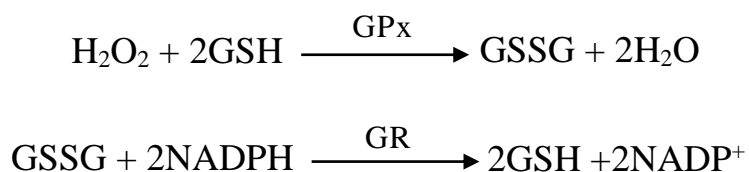


SOD 可分成三類：(1) Cu-Zn SOD，(2) Mn SOD，(3) Fe SOD。Cu-Zn SOD 主要存在於真核生物之細胞質、溶酶體、細胞核及粒線體的內外膜間(Fridovich, 1995)；Mn SOD 一般則存在於真核生物之粒線體內；Fe SOD 則主要存在於原核生物和植物葉綠體中。

##### (B) 麩胱甘肽過氧化酶

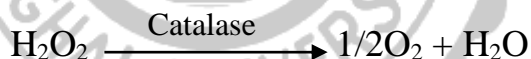
Glutathione peroxidase 一般多存在於血液、肝臟、粒線體及細

胞質中，需要硒 (selenium)作為 cofactor (Jacob, 1994)。其作用機制是將還原態的 glutathione (GSH)氧化為氧化態的 glutathione (GSSG)來清除過氧化氫。另有 glutathione reductase (GR)以 NADPH 為還原力來源，催化 GSSG 再生成 GSH，其反應式如下：



### (C) 觸酶

Catalase 屬於  $\text{Fe}^{3+}$ -heme protein，大多存在於 peroxisomes 內，能將過氧化氫 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 催化為水分子 ( $\text{H}_2\text{O}$ ) 與氧分子 ( $\text{O}_2$ )，然而在許多細胞內如內皮細胞、神經細胞等，其 catalase 含量不足以清除體內所產生的過氧化氫，因此必須依賴 GSH-Px 來清除過氧化氫，以保護細胞不受氧化傷害 (Meyer and Isaksen, 1995)。其反應式如下：



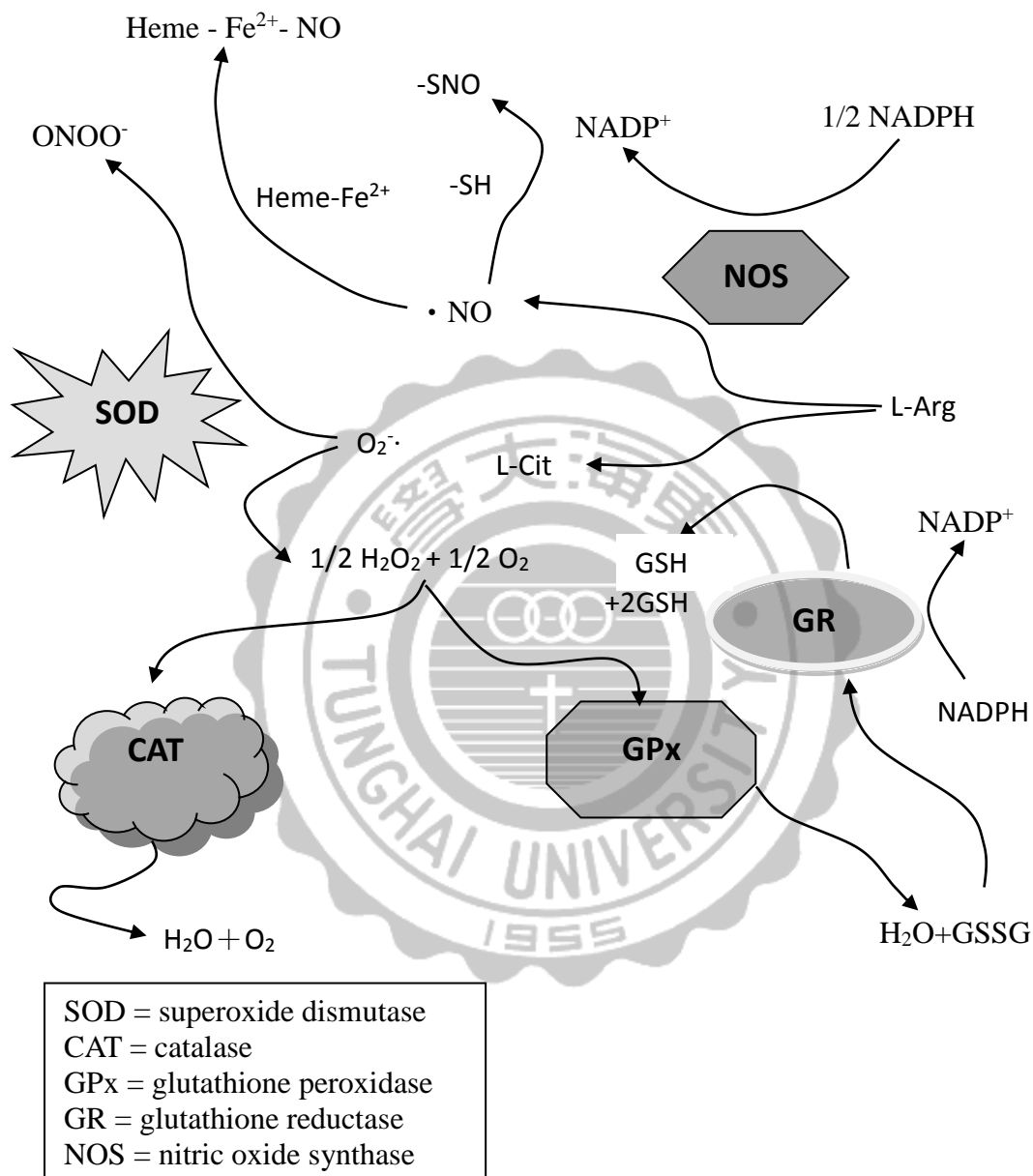


圖2-7、細胞內抗氧化酵素之防禦系統

Fig. 2-7 Cellular antioxidative and enzymatic defense system. (Mruka *et al.*, 2002)

## (二)非酵素性抗氧化作用

### A.維生素 C

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 2-8 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羥自由基的生成 (Halliwell *et al*, 1995)。

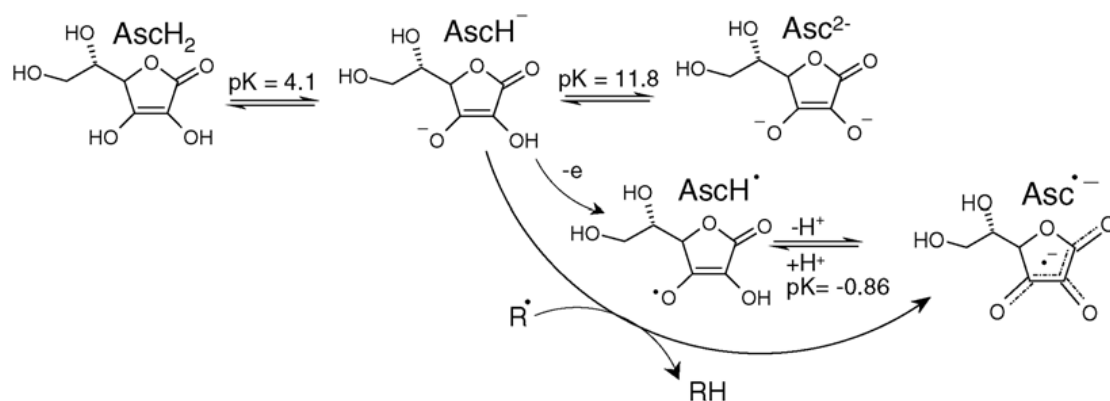


圖2-8、不同型態抗壞血酸與自由基之反應

Fig. 2-8 Various forms of ascorbic acid and its reaction with radicals (R•).

(Valko *et al*, 2006)



## B. 維生素E

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( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ )，其中以 $\gamma$ 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)。

## C. 類胡蘿蔔素

Carotenoids 具有多重共軛雙鍵之長鏈多烯結構，可抑制單旋態氧及捕捉過氧化自由基，以終止自由基連鎖反應。例如  $\beta$ -胡蘿蔔素( $\beta$ -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  $\beta$ -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。

#### D. 麩胱甘肽

GSH 是由麩胺酸(glutamic acid)、半胱胺酸(cysteine)及甘胺酸(glycine)等三種胺基酸所組成，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)。

#### E. 多酚類

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：

##### E-1. 類黃酮

類黃酮是由三個環狀結構的 diphenyl propane(C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)型式所構成(圖 2-9)，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 2-6)。

大多數類黃酮會與醣類形成配醣體以醣苷(glycosides)的形式存在，經過酸、鹼及熱水解後可產生配質(aglycones)和醣基，而 flavonoid glycosides 的抗氧化性比 flavonoid aglycone 來得弱，顯示醣化作用會影響類黃酮的化學、物理及生物特性(Rice-Evans *et al.*, 1996; Scalbert and Williamson, 2000)。

類黃酮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( $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ )有螯合作用，間接抑制脂質過氧化反應的發生。(3)若在 C 環上的 2、3 位置有雙鍵與 4 位置上有酮基，則會與 B 環形成共軛結構。(4)若在 A、C 環上 2、5 位置有羥基與 C 環上 4 位置有酮基，則會形成分子內氫鍵，具有清除自由基與螯合金屬離子的能力。

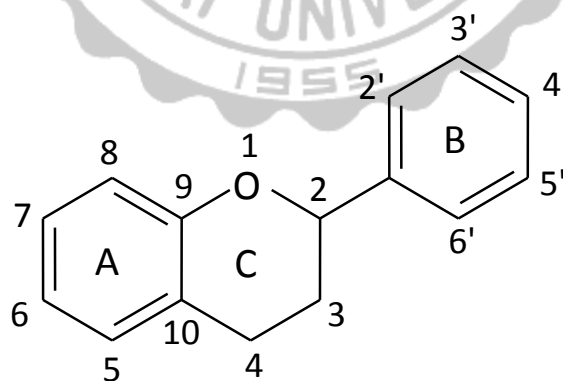


圖 2-9、類黃酮之基本結構圖

Fig. 2-9 Structure of flavonoid. (Cook and Samman, 1996)

表 2-6、類黃酮之抗氧化性

Table 2-6 The antioxidative activities of flavonoids

| 類黃酮類別   | 抗氧化性特徵  |
|---|---|
| <br>黃酮 (flavones)            | *此結構為在 C 環有 2,3 double bond, 4-oxofu, 但沒有 3-OH。<br>*B 環上-OH 越多, A 環在 C5 及 C7 上有-OH, 抗氧化性越強。<br>*抗氧化性: lutein > apigenin > chrysin   |
| <br>黃酮醇 (flavonols)          | *此結構為在 C 有 2,3 double bond, 4-oxofu 且有 3-OH。<br>*B 環上-OH 越多, A 環在 C5 及 C7 上有-OH, 抗氧化性越強。<br>*抗氧化性: quercetin > myricetin > morin > kaempferol                             |
| <br>黃烷酮 (flavanones)         | *抗氧化性: taxifolin > naringenin > hesperitin > hesperidin > naringin<br>和 OH 的數目及取代位置有關。<br>*其抗氧化性小於 flavonols 及 flavanones。  |
| <br>異黃酮 (isoflavones)       | *genistin, daidzein 屬之。<br>*抗氧化性差, 在天然產物中此類結構較少。<br>*orthodihydroxyl 的結構。   |
| <br>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。<br>*抗氧化性: catechin-gallate > catechin  |
| <br>查酮 (chalcones)         | *butein, phloretin, phloridzin 屬之。<br>*從甘草的成分可分離出具有抗氧化性的物質 lichenalchone A。<br>*具有潛在抗氧化性, dihydrochalcone > chalcone  |
| <br>花青素配質 (anthocyanidins) | *抗氧化性: cyanidin > cyanidine-3-β-D-glucoside<br>*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。<br>*Cyanidin=dephindin > malvidin > pelargonidin |
| <br>黃烷酮醇 (flavanonols)     | *抗氧化性類似 flavanones, 與 OH 的數目及取代位置有關。<br>*taxifolin, fustin 屬之。  |

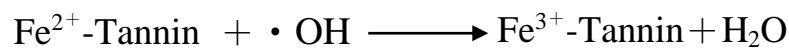
(Cook and Samman, 1996)

## E-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)。

## E-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)。

#### 2-2-4 抗氧化劑與糖尿病

糖尿病病患體內由於長期處於高血糖狀態，會誘發前面所提到的四種高糖誘導 ROS 生成機制，所以從減低醣化反應的角度抑制氧化的發生，可以達到保護細胞的效果。預防粒線體的氧化壓力損傷也被認為是治療糖尿病的一種策略(Green *et al.*, 2004)。由於主要分泌胰島素的胰島β細胞內抗氧化酵素含量較低，對於高糖所引發之 ROS 也較為敏感(Lenzen *et al.*, 1996；Tiedge *et al.*, 1997)，因此會影響胰島β細胞調控胰島素基因之表現而導致其無法正常分泌胰島素。人體的細胞雖然容易受 ROS 攻擊，但可透過體內的許多抗氧化酵素 SOD、catalase 及 GPx 等來清除(Ceriello, 2003)。研究指出，第一型糖尿病患血漿中的抗氧化能力比一般健康的人低 16%，而以鏈佐黴素(streptozotocin, STZ)誘導的糖尿病鼠中發現，其腎臟內抗氧化酵素 SOD 及 catalase 有降低之趨勢(Vessby *et al.*, 2002)。另有文獻指出，糖尿病人即糖尿病鼠體內維生素 C、E 及β-胡蘿蔔素有明顯不足之現象，而具有抗氧化功能之維生素可以降低糖尿病鼠及糖尿病患體內之氧化壓力(Rahimi *et al.*, 2005)。許多研究也運用植物中的抗氧化成分於糖尿病及其併發症之治療，且具有良好的效果，如表 2-7 所示。

表 2-7、具抗氧化能力對糖尿病產生正面作用之植物

Table 2-7 Plant with positive effects in diabetes by their antioxidant properties

| Scientific name                                    | Target                                   | Active ingredients          | Mechanism of action and/or effects  |
|--|--|-----------------------------|---|
| <i>Anoectochilus formosanus</i>                    | STZ-induced diabetic rats                | —                           | ↓renal LP, ↑renal GSH, activity of kidney catalase  |
| <i>Trifolium alexandrinum</i>                      |  | flavonoids                  | scavenging free radicals, ↓LP, ↑hepatic GSH   |
| <i>Viburnum dilatatum</i>                          |  | cyaniding<br>3-sambubioside | scavenging free radical, ↓LP  |
| Ever green shrubs such as <i>Larrea divaricata</i> |  | nordihydroguaiaretic acid   | xanthine oxidase inhibition, ion chelation, scavenging free radicals, ↓systolic BP, prevention of renal morphological alteration, improvement in renal function |
| <i>Aralia elata</i>                                |  | —                           | aldose reductase inhibition, anticataractogenic activity  |
| <i>Viscum album</i>                                |  | —                           | ↓biomarker of oxidative stress, ↑GSH in heart & kidney  |
| Many plants  |  | quercetin                   | ion chelation, scavenging free radicals, ↓LP  |
| <i>Fomes fomentarius</i>                           |  | —                           | alteration of SOD, CAT, and GSH-Px activities, ↓biomarker of oxidative stress   |
| <i>Allium sativum</i>                              |  | s-allyl cysteine sulfoxide  | ↑GST, ↑SOD in liver & kidney, ↓LP   |
| <i>Eugenia jambolana</i>                           |  | flavonoids                  | scavenging free radical   |
| <i>Aloe vera</i>                                   |  | —                           | ↑GSH, SOD, CAT, GSH-Px, and GST in liver & kidney, ↓LP  |
| <i>Scoparia dulcis</i>                             |  | —                           | ↑GSH, SOD, CAT, GSH-Px, and GST, ↓LP  |
| <i>Juglans regia</i>                               | Type 2 diabetic mice                     | pedunculagin                | ↓biomarker of oxidative stress  |
| Plants like <i>ferula assa-foetida</i>             | STZ-induced diabetic mice and KK-Ay mice | ferulic acid                | scavenging free radicals, ↓LP   |
| <i>Vitis vinifera</i>                              | alloxan-induced diabetic rats            | proanthocyanidins           | scavenging free radicals, ↑pancreatic GSH, ↓LP  |
| <i>Cassia fistula</i>                              |  | —                           | ↑SOD, CAT, GSH-Px and GR activities in the cardiac tissues, ↓LP in heart  |
| <i>Allium cepa</i>                                 |  | s-methyl cysteine sulfoxide | scavenging free radicals  |
| <i>Allium sativum</i>                              |  | s-allyl cysteine sulfoxide  | scavenging free radicals, ↓LP   |
| <i>Panax ginseng</i>                               | Type 2 diabetic rats                     | —                           | scavenging free radicals, prevention of erectile dysfunction  |
| <i>Panax ginseng</i>                               | alloxan-induced diabetic rabbits         | —                           | lipid lowering effect   |

STZ = streptozocin, LP = lipid peroxidation, GSH = reduced glutathione, BP = blood pressure, GSH-Px = glutathione peoxidase, GR = glutathione reductase, SOD = superoxide dismutase, CAT = catalase (STZ- and alloxan-induced diabetes are models of type 1 diabetes mellitus, KK-Ay is a model of type 2 diabetes mellitus). (Rahimi *et al.*, 2005)

## 2-3 高血糖與醣解酵素

碳水化合物分為單醣、雙醣及多醣類，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)。使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)。

### 2-3-1 $\alpha$ -澱粉酶與 $\alpha$ -葡萄糖苷酶

#### (一) $\alpha$ -澱粉酶

$\alpha$ -amylase 為內切型醣解酵素，主要存在於哺乳動物之唾液及胰液中，可將多醣之  $\alpha$ -1,4-glycosidic linkage 水解成葡萄糖、麥芽糖、寡麥芽糖或糊精。 $\alpha$ -澱粉酶廣泛存在於微生物、植物與動物組織中，動物的唾液和胰臟也皆能分泌  $\alpha$ -澱粉酶 (Aquino *et al.*, 2003; Vasekaran, *et al.*, 2010)。

#### (二) $\alpha$ -葡萄糖苷酶

$\alpha$ -glucosidase 屬於外切型醣解酵素，主要存在小腸上皮細胞表面的絨毛刷緣(brush border)中，可將多醣經由此酵素催化並釋放非還原端的 D-葡萄糖，其包括 glucoamylase、sucrase、maltase 及 isomaltase 等酵素，通稱為  $\alpha$ -葡萄糖苷酶(Frandsen and Svensson, 1998; 李，2006; Shobana *et al.*, 2009)。

### 2-3-2 醣解酵素之抑制作用對於高血糖症狀之改善

$\alpha$ -amylase 抑制劑及  $\alpha$ -glucosidase 抑制劑，可延緩多醣水解成葡萄糖之速率，進而降低葡萄糖之吸收，以減緩飲食後所造成之血糖急速



上升，維持血糖之穩定(Baron, 1998；McCue and Shetty, 2004；Fred-Jaiyesimi *et al.*, 2009)。使用醣解酵素抑制劑後，因食物消化吸收受到延遲，一部分未被消化完全的食物到達結腸，引發腸道菌的產氣發酵，因而在病患中出現腹鳴、下痢與頻頻排氣等腸胃不適之副作用，但投予適當之劑量與持續服藥後，此副作用會逐漸降低。(Yee & Fong, 1996；Fujisawa *et al.*, 2005；Fred-Jaiyesimi *et al.*, 2009)。所以尋找天然的醣解酵素抑制劑，有助於改善糖尿病患者餐後高血糖之症狀，也可補足因胰島素分泌不足，而無法即時調降血糖之問題，並且讓一直忙於分泌胰島素的 $\beta$ 細胞得以短暫歇息，受傷的細胞能夠有機會恢復，不再因飲食後大量葡萄糖進入血液而需疲於分泌更多量胰島素(胡，2002)。

Tadera (2006)等人研究指出，類黃酮化合物對於 $\alpha$ -glucosidase與 $\alpha$ -amylase具有良好的抑制作用，其中花青素、異黃酮及黃酮醇類對於酵母菌萃取的 $\alpha$ -glucosidase抑制之 $IC_{50}$ 值皆小於 $15\mu M$ ；再將16種類黃酮以 $0.5mM$ 當作反應濃度，對大鼠腸道的 $\alpha$ -glucosidase及豬胰臟的 $\alpha$ -amylase之抑制率作測定。如表2-8所示，發現以黃酮醇及黃酮類之抑制效果最佳，其中類黃酮類化合物對於 $\alpha$ -amylase之抑制率皆大於 $\alpha$ -glucosidase。Tadera等人進一步從類黃酮結構分析，推測B環上C3'、C4'及C5'三個取代之OH基數目越多，其抑制效果越好；C2與C3之間是雙鍵、3-OH、4-CO、5-OH對於酵素抑制都具有提升之作用。另有文獻指出，測定兒茶素類對 $\alpha$ -glucosidase之抑制能力中，以化合物epigallocatechin-3-O-gallate之 $IC_{50}$ 值 $40\mu M$ 為佳，其與galloyl group之數目有關(Matsui *et al.*, 2007)。

表 2-8、類黃酮對大鼠小腸  $\alpha$ -glucosidase 與豬胰臟  $\alpha$ -amylase 之抑制率

Table 2-8 Inhibitory activity of flavonoid against rat small intestinal  $\alpha$ -glucosidase and porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase

| Flavonoid  | $\alpha$ -Glucosidase            |                                  |   | Flavonoid        | $\alpha$ -Amylase                |                                  |   |
|------------|----------------------------------|----------------------------------|---|------------------|----------------------------------|----------------------------------|---|
|            | Inhibition <sup>a,b</sup><br>(%) | Inhibition <sup>a,b</sup><br>(%) | IC <sub>50</sub> <sup>a,c</sup><br>(mM) |                  | Inhibition <sup>a,b</sup><br>(%) | Inhibition <sup>a,b</sup><br>(%) | IC <sub>50</sub> <sup>a,c</sup><br>(mM) |
| Flavonol   |                                  |                                  |   | Isoflavone       |                                  |                                  |   |
| Myricetin  | 29                               | 64                               | 0.38                                    | Daidzein         | 0                                | 19                               | >0.50                                   |
| Quercetin  | 28                               | 50                               | 0.50                                    | Genistein        | 2                                | 33                               | >0.50                                   |
| Kaempferol | 8                                | 18                               | >0.50                                   | Flavan-3-ol      |                                  |                                  |   |
| Fisetin    | 26                               | 33                               | >0.50                                   | Catechin         | 1                                | 4                                | >0.50                                   |
| Flavone    |                                  |                                  |   | Epicatechin      | 5                                | 14                               | >0.50                                   |
| Luteolin   | 19                               | 61                               | 0.36                                    | Epigallocatechin | 7                                | 5                                | >0.50                                   |
| Apigenin   | 3                                | 21                               | >0.50                                   | Epigallocatechin | 32                               | 21                               | >0.50                                   |
| Baicalein  | 16                               | 31                               | >0.50                                   | gallate          |                                  |                                  |   |
| Flavanone  |                                  |                                  |   | Anthocyanidin    |                                  |                                  |   |
| Naringenin | 1                                | 5                                | >0.50                                   | Cyanidin         | 6                                | 37                               | >0.50                                   |
| Hesperetin | 2                                | 16                               | >0.50                                   |                  |                                  |                                  |   |

The activity of rat small intestinal  $\alpha$ -glucosidase was estimated by measuring glucose liberated from maltose, and that of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase by measuring *p*-nitrophenol from BPNPG7. Experimental details are described in “Materials and Methods.”

<sup>a</sup> The result was an average of three determinations.

<sup>b</sup> Inhibition by 0.50 mM flavonoid.

<sup>c</sup> Concentration of flavonoid required for 50% inhibition of the enzyme activity under the assay conditions. (Tadera *et al.*, 2006)

## 2-4 糖尿病之治療

糖尿病是相當錯綜複雜之慢性代謝疾病，其所引發之併發症也相當多，如糖尿病的腎病變、視網膜病變、神經性病變及心血管疾病等。研究證實有效控制糖尿病患者的血糖濃度，對於第一型或第二型糖尿病患的慢性併發症具有延緩或減弱的效果(劉，2008)。目前針對糖尿病患之降血糖的策略有(1)刺激胰島素分泌(2)改善胰島素阻抗性(3)增進末梢組織葡萄糖的利用(4)抑制醣類在腸道內的吸收(5)調節脂質代謝(6)抑制肝臟內生葡萄糖產生及(7)保護 $\beta$ 細胞，以達到降血糖之目的(陳，2002)。

第一型糖尿病患者，需每天注射胰島素以補足胰臟無法製造之胰島素，另有研究顯示，補充 $\alpha$ -glucosidase抑制劑，有助於改善其飯後血糖急速上升之情形。第二型糖尿病患者血糖過高之情況，主要透過飲食控制、規律作息、壓力紓解、體重控制、定期運動並搭配藥物的幫助才能達到適度的血糖調控(Ceriello, 1998；Cheng and Fantus, 2005)。降血糖的藥物類型有磺醯尿素類(sulfonylurea)、雙胍類、 $\alpha$ -glucosidase抑制劑、胰島素阻抗性改善劑等，這些藥物雖然有效，但也伴隨副作用之產生，只能治標性的減輕部分因糖尿病所造成的代謝紊亂，無法治本的改善身體中根本的生化損傷(胡，2002)。目前已有許多植物或其萃取物被證實有益於糖尿病之改善或治療，表 2-9 所示為植物中具有降血糖功能之活性物質，主要包括：生物鹼(alkaloids)、配醣體(glycosides)、多醣類、二硫化物及其它物質，這些植物可作為製造口服降血糖藥物的來源，或是以食物添加物之方式搭配現有藥物治療。

表 2-9、植物中具有降血糖功能之活性物質

| 植物    | 食用地區  | 具活性部位 | 活性物質                       | 活性物質分類      | 驗證模式               |
|-------|-------|-------|----------------------------|-------------|--------------------|
| 川烏    | 東方    | 根部    | Aconitan A                 | 多醣類         | 糖尿病小鼠              |
| 洋蔥    | 亞歐洲中東 | 球莖    | Alkyldisulfides            | 二硫化物        | 糖尿病大鼠              |
| 大蒜    | 亞歐洲中東 | 球莖    | Alkyldisulfides            | 二硫化物        | 健康兔                |
| 蒟蒻    | 東方    | 塊莖    | Glucomannan                | 多醣類         | IDDM 與<br>NIDDM 病患 |
| 知母    | 東方    | 地下莖   | Anemaran A                 | 多醣類         | 糖尿病小鼠              |
| 日日春   | 亞歐非澳  | 葉     | Alkaloids                  | 生物鹼         | 健康大鼠               |
| 山藥    | 東方    | 根     | Dioscoran C                | 多醣類         | 糖尿病小鼠              |
| 麻黃    | 東方    | 地上部   | Ephedran A                 | 多醣類         | 糖尿病小鼠              |
| 法國紫丁香 | 歐洲    | 葉     | Guanidine                  | Guanidine   | NIDDM 病患           |
| 靈芝    | 東方    | 子實體   | Ganoderan A                | 多醣類         | 糖尿病小鼠              |
| 苦瓜    | 亞歐非   | 地上部   | Glycoside and<br>alkaloids | 多醣類和<br>生物鹼 | NIDDM 病患           |
| 高麗人蔘  | 東方    | 根     | Panaxans                   | 多醣類         | 糖尿病小鼠              |
| 甘蔗    | 東方    | 莖     | Saccharan C                | 多醣類         | 糖尿病小鼠              |
| 葫蘆巴   | 亞洲歐洲  | 種子    | Trigonelline               | 生物鹼         | 糖尿病動物              |
| 覆盆子   | 歐洲北美  | 葉     | Neomyrtillin               | 配醣體         | 糖尿病病患              |
| 黃鐘花   | 非洲中東  | 葉     | Alkaloids                  | 生物鹼         | 糖尿病兔子              |
| 西洋蔘   | 東方    | 根     | Quinquefolans              | 多醣類         | 糖尿病小鼠              |
| 叢豆    | 亞洲    | 種子與豆莢 | Galatomannan               | 多醣類         | IDDM 與<br>NIDDM 病患 |
| 埃及羽扇豆 | 中東    | 種子    | Quinolizidine<br>alkaloids | 生物鹼         | 糖尿病大鼠              |
| 孟加拉榕  | 亞洲    | 樹皮    | Glycoside                  | 配醣體         | 健康鼠                |
| 來吉果   | 美非洲   | 未熟果   | Hypoglycins                | Hypoglycins | IDDM 與<br>NIDDM 病患 |
| 五加皮   | 東方    | 根     | Eleutherans                | 多醣類         | 糖尿病小鼠              |
| 紅瓜    | 亞洲    | 葉     | Alkaloids                  | 生物鹼         | NIDDM 病患           |

(胡， 2002)

現今的糖尿病用藥大部分都有其副作用，如過敏、腸胃不適、體重增加和肝臟損傷等。因此尋找一個天然而無副作用的植物或食物來協助或治療糖尿病，使其更有效控制血糖、改善胰島素阻抗性等效用，並降低糖尿病併發症之發生機率，為現今研究糖尿病的重要方向。



## 2-5 小葉山葡萄背景介紹

### 2-5-1 植物介紹

小葉山葡萄(*Vitis thunbergii*)又名小本山葡萄，屬於葡萄屬植物，莖為木質之藤本，幼莖有稜，被紅褐色或白色茸毛。卷鬚與葉對生，葉互生，卵形或三角狀卵形，3~5 裂，背面被灰白色茸毛。花序與葉對生，花兩性或單性，圓錐花序，為台灣民間常用草藥，有補腎明目、祛風、解毒、補血之功效，主治眼疾、風濕、腎虧、亦治肺疾、乳癰、無名腫毒及肝炎(甘，1980)。

### 2-5-2 細本山葡萄之傳統功效

台灣民間常以山葡萄入藥，東亞古籍中多有記載，宋朝吳其濬先生植物名實圖考記載：「酸藤洗瘡毒。」，其中酸藤即指山葡萄；泉州本草記載其味性：「甘，忤，無毒。」；另江蘇藥材誌記載：「藤莖，煎服，治風疹。」。其葉含單寧酸 (tannin)。果實含醣類及有機酸類，如蘋果酸，檸檬酸，酒石酸，維生素，脂肪。民間效用中提到；根及莖有清熱，利尿，祛濕，解毒，消腫止血，生肌之效。治痛風關節痛，風濕痺痛，腳氣腫，肝炎黃疸，痢疾，淋病，小便不利，癰癤，腫毒，跌打損傷。枝葉有祛風，除濕，解毒，消腫之效。治皮膚濕疹，外傷出血。莖汁治中耳炎，耳癰。果實有滋養，強壯之效。造酒治低血壓

症，冷感症，不眠症，慢性腸炎(邱，1998；古，2006)。並歸類於表 2-10。

表 2-10、小葉山葡萄之主治功用及典籍

|   |                                    |          |
|---|------------------------------------|----------|
| 莖 | 祛濕、利小便、解毒、治黃疸、濕痹、痢疾、痹痛、間證、歲逆、乳癰、濕疹 | 中藥大辭典    |
|   | 治歲逆大善、傷寒後嘔歲更良                      | 堂草本      |
|   | 汁滴目中、治翳赤障                          | 本草拾遺     |
| 葉 | 止渴、利小便                             | 綱目       |
|   | 涼血、止血、消腫解毒                         | 福建中草藥    |
| 根 | 清濕熱、消腫毒、治黃疸、濕痹、痢疾、熱淋、腫毒、癩歷、跌打損傷    | 中藥大辭典    |
|   | 下焦熱痛、淋悶、消腫毒                        | 綱目       |
|   | 胃痛、療痔瘡、通經利尿                        | 民間常用草藥彙編 |
|   | 消腫、外用於跌打損傷、治療筋骨疼痛、接骨               | 貴州民間方草藥集 |
|   | 通經絡、祛風濕                            | 福建中草藥    |

## 2-5-3 小葉山葡萄之生理活性

### 〈1〉 抗氧化作用

針對台灣產市售生藥細葉山葡萄、杭菊等十七種的抗氧化活性探討。以 Cytochrome C 還原比色法測試清除  $O_2^-$  自由基的能力及利用 xanthine oxidase inhibition 試驗來測試抑制  $O_2^-$  自由基的能力；最後再以 TBA 法來評估對於因自由基所導致的脂質過氧化情形是否具有抑制作用。在清除  $O_2^-$  自由基的能力中實驗結果顯示，在原生藥抽取物，除了麥門冬、白鳳豆、一條根不到 50 % 的抑制作用外，其餘生藥都具有 50 % 的抑制作用，以杭菊、白鶴靈芝、靈芝及細葉山葡萄最具效果。另外在抑制  $\cdot O_2^-$  自由基的能力實驗結果顯示，以洛神花、愛玉、細葉山葡萄、杭菊較具抑制效果，其餘生藥並無明顯的具有抑制自由基形成的作用。在氯化亞鐵-抗壞血酸誘發脂質過氧化試驗中的結果顯示，靈芝及苧麻都確實有較強的抑制脂質過氧化的作用活性，而杭菊、愛玉、絞股藍、細葉山葡萄次之(林，2000)。

### 〈2〉 降血脂作用

測試餵食倉鼠或兔子高膽固醇飲食再合併給予小葉山葡萄，對於動物血脂量的影響。另外，也利用細胞實驗探討其降血脂抗氧化的機轉。動物在餵食這些飼料後，收集血清測其生化數據，結果顯示給予小葉山葡萄可明顯降低血清膽固醇、LDL、三酸甘油酯含量，在兔子



肝臟蛋白質方面，山葡萄亦可使 Catalase 表現量及 ACC 磷酸化程度上升。細胞實驗部分，給予小葉山葡萄萃取物後可顯著提升 HepG2 中 Catalase 的表現量。綜合以上結果顯示，小葉山葡萄降血脂抗氧化的效果對於動脈粥狀硬化的發生有預防的效果。(張，2008)

### 〈3〉 抑菌性

小葉山葡萄根萃取物中之主要活性成分以製備型薄層層析 (preparative thin layer chromatography, PTLC) 及再結晶法 (recrystallization) 分離純化，並將純化所得之化合物進行紫外光譜 (ultraviolet spectroscopy)、質譜 (mass spectroscopy) 及核磁共振 (nuclear magnetic resonance) 分析；鑑定發現其主要活性成分為 Heyneanol A。進一步試驗以液體微量稀釋法 (liquid microdilution method) 分析純化所得之 Heyneanol A 之抑菌能力，結果顯示 Heyneanol A 對於腸球菌 (*Enterococcus faecium*)、枯草桿菌、金黃色葡萄球菌和抗藥性金黃色葡萄球菌具有抑制效果，最小抑菌濃度為 2  $\mu$ g/mL。此外其對於表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、無乳鏈球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、釀膿鏈球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 和馬鏈球菌 (*Streptococcus equinus*) 亦具抑制效果，最小抑菌濃度為 4-8  $\mu$ g/mL。(Peng *et al.*, 2008)。

#### 〈4〉抑制血小板凝集

由小葉山葡萄的乾燥根所萃取出成分中，其中有三個純化物質屬於 resveratrol polymer：ampelopsin C (A11)、 miyabenol A (A31)、 vitisin A (A32)。Resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene)存在於葡萄等植物中，於紅酒中也存在，此成分已被報導具有預防冠狀動脈疾病、抗發炎、抗腫瘤及抗氧化等作用。另外也有文獻指出 resveratrol 可抑制血小板的凝集，但 resveratrol polymers 對血小板的作用機轉，則尚未被詳細探討。因此研究使用 ampelopsin C、 miyabenol A、 vitisin A 來探討其抑制花生四烯酸(AA)誘導血小板凝集的作用及相關之可能作用機轉。以 AA 作為刺激劑，發現這三個藥物皆可抑制凝集，其 IC50 分別為 ampelopsin C： $8.1 \pm 1.1$ 、 miyabenol A： $9.0 \pm 1.6$ 、 vitisin A： $10.3 \pm 1.2$  mM。在血小板中，AA 產生凝集主要來自於血栓素 A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) 的生成。但由測量其代謝物丙二醛(MDA)的結果得知，此三種 resveratrol 聚合物與 resveratrol 不同，並不會抑制 TXA<sub>2</sub> 的生成。並且使用 TXA<sub>2</sub> 的類似物 U46619 作為刺激劑時，發現其皆可顯著地抑制凝集，IC50 分別為 ampelopsin C： $5.9 \pm 0.9$ 、 miyabenol A： $7.5 \pm 2.0$ 、 vitisin A： $13.3 \pm 2.1$  mM。由以上的結果推測，此三種 resveratrol 聚合物會抑制 TXA<sub>2</sub> 的作用。但由競爭性結合實驗得知，此抑制作用並非來自於與 TXA<sub>2</sub> 競爭接受器的結合位置。而由細胞內鈣離子的測定

與 PKC (protein kinase C)的測定可知，此抑制作用與抑制細胞內鈣離子的增加及抑制 PKC 的 translocation 有關。(陳，2001)。

#### 〈5〉預防骨質疏鬆(抑制成熟蝕骨細胞數目)

本研究所採用的台灣產民間藥分別為：有骨消 (*Sambucus formosana* Nakai)；刺仔頭 (*Acacia farnesiana* (L.) Willd.)；小葉山葡萄 (*Vitis thunbergii* Sieb. & Zucc. var. *adstricta* (Hance) Gahnep)；肺形草 (*Tripterospermum taiwanense* (Masamune) Satake)及黃金桂 (*Cudraniacochin chinensis* (Lour.) Kudo et Masam. var. *gerontogea* (Sieb. & Zucc.) Kudo et Masam.)。在體外研究模式中結果發現，在 50 $\mu$ g/ml 濃度時，除刺仔頭組不具顯著差異外，其餘均可明顯抑制成熟蝕骨細胞的生長。且對蝕骨細胞之抑制為可逆現象。接著以 MTT 偵測技術分析細胞的存活率，在成骨細胞方面，發現上述藥物抽出物對於成骨細胞不具毒性作用，在蝕骨細胞方面，濃度為 50、500  $\mu$ g/ml 之上述五種藥物抽出物，均有明顯降低蝕骨細胞生長。雌激素在蝕骨細胞的分化及活化過程中，為一重要調控因子，結果發現此五種藥物抽出物，可降低因雌激素缺乏所導致之蝕骨細胞活化作用，對其生長具抑制作用。再來以 17 b-Estradiol kit 測得 17 b-Estradiol 的含量，在第四天偵測，發現 50、500 $\mu$ g/ml 濃度之各加藥組中，17 b-Estradiol 量較控制組 (1 a,25-(OH)2D3) 明顯增高許多。這說明了，此五種台灣民間藥抽出物，可能具有類似 17 b-Estradiol 結構之植物性雌激素。另一方面，

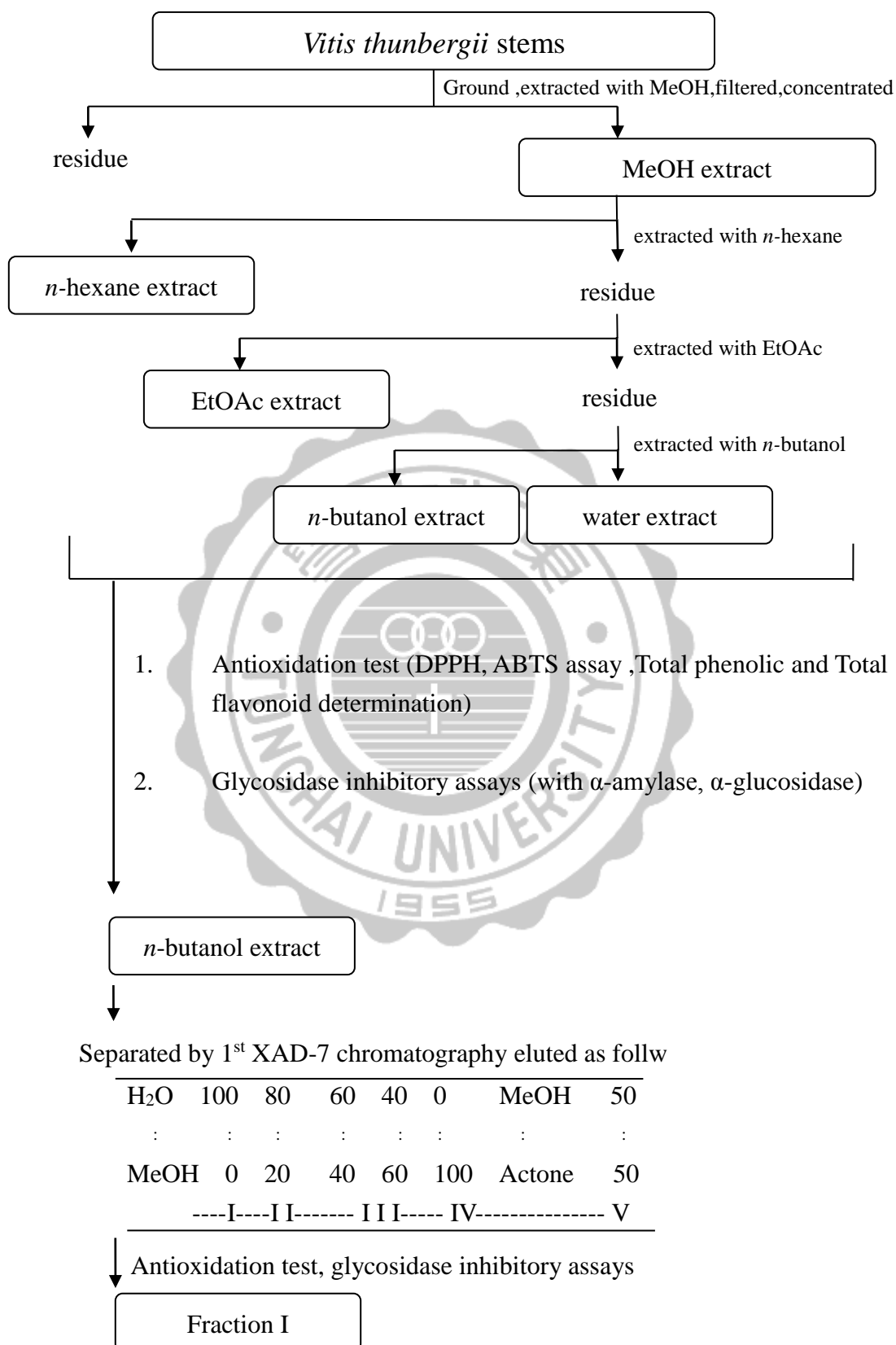
和蝕骨作用有關的細胞激素（如：IL-1 a, IL-6, TNF- a, PGE<sub>2</sub>）已經被證實可促進成熟蝕骨細胞的形成，進而導致骨質流失。以 ELISA 的方法，測骨髓細胞培養系中細胞懸浮液之 IL-1 a, IL-6, TNF- a, PGE<sub>2</sub> 濃度，觀察這些台灣產民間藥之所以能抑制蝕骨細胞生長，是否藉由降低蝕骨作用有關的細胞激素而達到抑制的作用。結果發現 50µg/ml、500µg/ml 濃度之五種台灣民間藥，可藉由降低 IL-1 a, IL-6, TNF- a 而達到成熟蝕骨細胞抑制的作用，然而本實驗中 PGE<sub>2</sub> 並無顯著差異。從上述結果推論，所採用之五種台灣民間藥，可能藉由降低蝕骨作用相關的細胞激素（IL-1 a, IL-6, TNF- a），進而達到抑制成熟蝕骨細胞數。另外這些台灣民間藥可能含有一些植物性雌激素，經由這些植物性雌激素的作用，而達到抑制成熟蝕骨細胞數目。（侯，2003）。

## 第三章、研究動機與實驗架構

### 3-1 研究動機

糖分過多會增加體內自由基讓糖尿病的發生機會增加。由於長期高血糖，葡萄糖會自氧化產生過多的自由基，並消耗體內中抗氧化因子，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。中藥材小葉山葡萄(*Vitis thunbergii*)，在先前研究證實具有良好的抗氧化、降血脂作用及抗菌性，但對於血糖調控之相關研究卻相當少，因此本研究探討小葉山葡萄莖之抗氧化性與抑制醣解酵素能力並評估對血糖調控之能力，期望小葉山葡萄莖對於糖尿病之改善具有潛在價值。

### 3-2 實驗架構



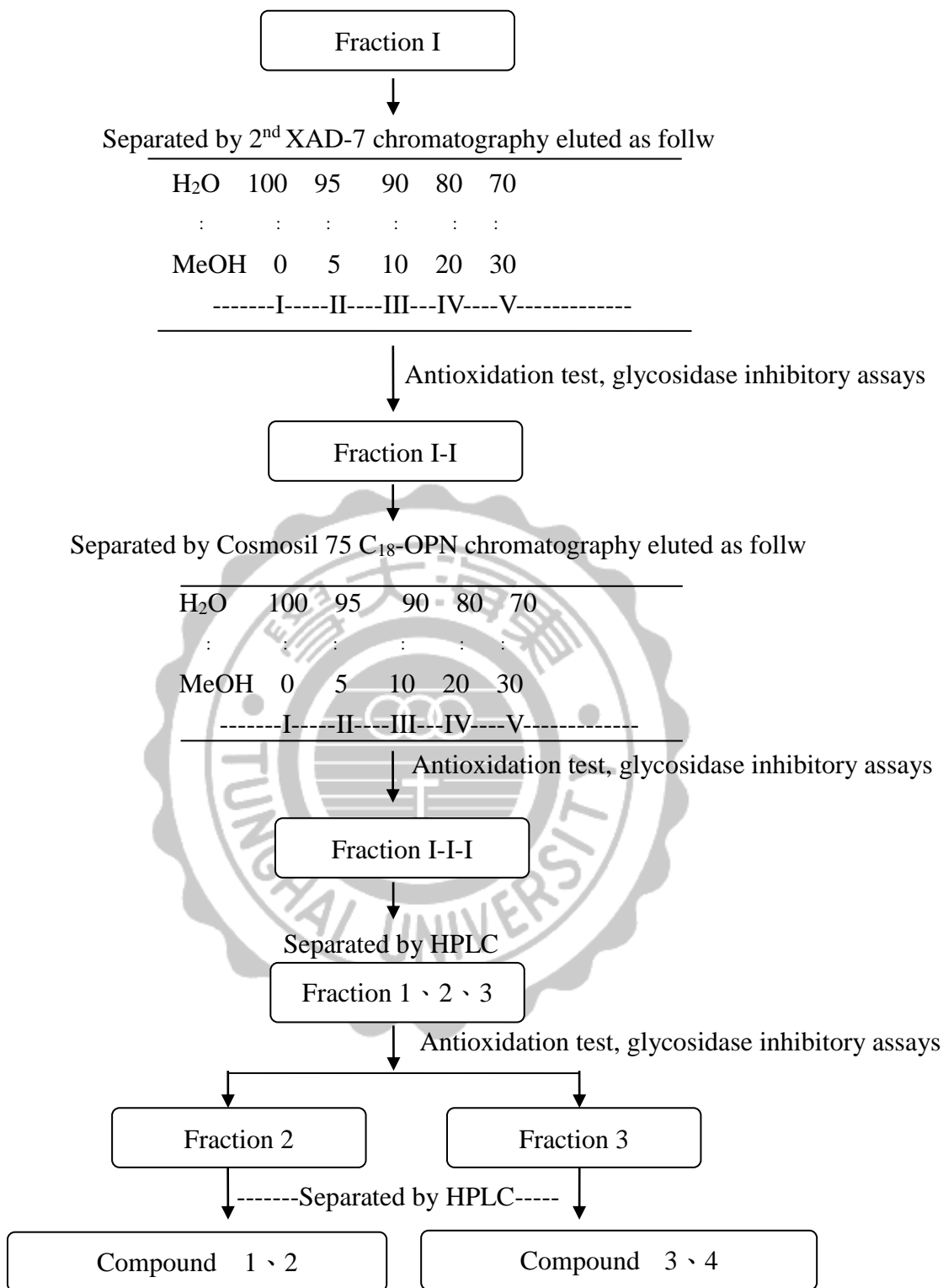


圖 3-1、山葡萄莖正丁醇萃取物抗氧化及糖解酵素抑制成分之純化流程圖  
 Fig. 3-1 Isolation of antioxidant and glycosidase inhibitory components from *n*-butanol extract of *Vitis thunbergii* stems.

## 第四章、材料與方法

### 4-1 實驗材料

本實驗樣品為中藥材小葉山葡萄產地為彰化縣，取小葉山葡萄之莖部，在未經任何處理下直接將樣品剁碎後利用磨粉機磨打碎後備用。

### 4-2 實驗試藥與溶劑

#### 4-2-1 抗氧化試驗之試藥

| 品名  | 廠商                             |
|---|--------------------------------|
| 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS) | Sigma(USA)                     |
| $\alpha$ -tocopherol  | Sigma-Aldrich(St.louis,MO,USA) |
| butyl hydroxyl anisole (BHA)                                  | Sigma (St.louis,MO,USA)        |
| folin-Ciocalteu's phenol reagent                              | Sigma-Aldrich(USA)             |
| peroxidase from horseradish<br>(253 units/mg solid)           | Sigma (USA)                    |
| hydrogen peroxide (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )            | Riedel-de haën(Seelze,Germany) |
| sodium carbonate (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )           | Riedel-de haën(Seelze,Germany) |
| Gallic acid   | Sigma-Aldrich(USA)             |
| 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl(DPPH)                          | Fluka(Buchs,Switzerland)       |
| potassium acetate(CH <sub>3</sub> COOK)                       | Riedel-de haën(Seelze,Germany) |
| quercetin   | Sigma-Aldrich(USA)             |
| 6-hydroxy-2,5,7,8-teramethyl-2,2-carboxylic acid (trolox)     | Sigma-Aldrich(USA)             |



#### 4-2-2 醣解酵素抑制試驗之試藥

| 品名   | 廠商                             |
|--|--------------------------------|
| potassium phosphate, monobasic<br>(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )         | 林純藥工業株式會社(Osaka, Japan)        |
| disodium hydrogenphosphate, anhydrous<br>(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) | 和光純藥工業公司(Wako, Japan)          |
| starch   | 島久藥品株式會社                       |
| sodium chloride(NaCl)  | Merk 公司(Darmstadt,Germany)     |
| sodium hydroxide (NaOH)  | 片山化學工業株式會社                     |
| 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)  | Sigma-Aldrich(St.louis,MO,USA) |
| $\alpha$ -amylase  | Sigma-Aldrich (Japan)          |
| $\alpha$ -glucosidase  | Sigma-Aldrich (USA)            |
| 4-nitrophenyl $\alpha$ -d-glucopyranoside<br>( <i>p</i> NPG)                 | Sigma-Aldrich (USA)            |

#### 4-2-3 純化成分分析及光譜分析之溶劑

| 品名  | 廠商              |
|---|-----------------|
| ethyl acetate、 <i>n</i> -hexane、methanol<br>(工業級) | 李長榮化學工業         |
| <i>n</i> -butanol(HPLC 級)                         | Burdick&Jackson |
| methanol(HPLC 級)                                  | Burdick&Jackson |
| 重甲醇&重水  | Burdick&Jackson |

#### 4-3 實驗儀器設備

##### 化學試驗之儀器設備

##### (1) 充填式膠體液相層析管柱

- XAD-7 樹脂(20-60mesh)購自 Sigma 公司(St.louis,MO,USA)

• ODS 層析填充劑 Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN，購自 Nacalai Tesque Inc. (Kyoto, Japan)。

(2) 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 公司(Japan)。

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

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

(5) 核磁共振光譜儀(VXR-300/51)

<sup>1</sup>H-NMR 以 300MHz、<sup>13</sup>C-NMR 以 75MHz 檢測。

## 4-4 實驗方法

### 4-4-1 樣品萃取

使用浸漬萃取方法，將 9200g 新鮮中藥材小葉山葡萄莖剝碎後利用磨粉機磨打碎後，將樣品浸漬於工業級甲醇，甲醇使用量以能淹沒樣品為準，並於室溫下分別重複萃取三次，每次三天，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 HPLC 級正丁醇進行液液萃取，各三重複，以抽氣過濾收集各區分液，所獲得之正己烷、乙酸乙酯及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，並計算產率後充氮氣儲藏於 4°C 冰箱備用。小葉山葡萄莖各種溶劑萃取及製備流程如(圖 4-1 所示)

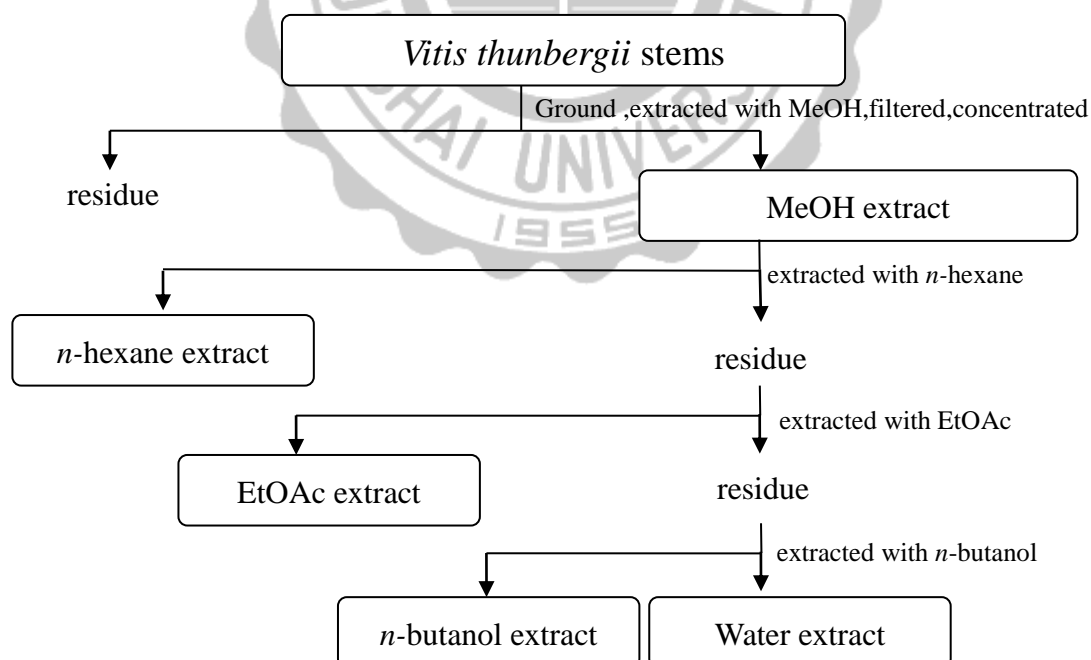


圖 4-1、小葉山葡萄莖各種溶劑萃取物之製備

Fig.4-1 The solvent extracts prepared from *Vitis thunbergii* stems.

#### 4-4-2 水分含量測定

以常壓乾燥法測定(A.O.A.C,1984)。將先預先烘乾的秤量瓶放入乾燥皿中冷卻後稱重( $W_0$ )，秤取小葉山葡萄莖粉末樣品約 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 18 小時後，將其移到乾燥器中冷卻至少 30 分鐘，稱重並記錄( $W_2$ )，再放入  $100^\circ\text{C}$  烘箱中 30 分鐘後，移到乾燥器中冷卻並稱重，反覆操作直到恆重為止 ( $W_N$ )，最後計算樣品水分含量。

$$\text{水分含量(\%)} = \left( \frac{W_1 - W_N}{W_1 - W_0} \right) \times 100\%$$

$W_0$  = 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)

#### 4-4-3 總酚含量 (total phenolic compounds) 測定

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 $\mu\text{l}$  樣品及不同濃度之 gallic acid 標準品，加入 1mL  $\text{H}_2\text{O}$  及 500 $\mu\text{l}$  Folin-Ciocalteu's phenol reagent，用力搖勻混合，再加入 2.5mL 20%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ，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 8-1)，以換算相對之 gallic acid 當量，以  $\mu\text{g gallic acid equivalent}/\text{mg}$  小葉山葡萄萃取物。

#### 4-4-4 總類黃酮含量(total flavonoid) 測定

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 $\mu\text{l}$  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 $\mu\text{l}$ ，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 8-2)，以換算相對之 quercetin 當量，以 mg quercetin equivalent/g 小葉山葡萄萃取物。

#### 4-4-5 DPPH 自由基清除能力試驗

##### 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 甲醇溶液本身為一個深紫色化合物，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·

$\langle 2, 2\text{-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical} \rangle$ ，使其形成一個非自由基的 DPPH，而不帶電子的 DPPH $\langle 2, 2\text{-diphenyl-1-picrylhydrazyl} \rangle$  的顏色較淡，吸光值亦會隨之降低，利用相對於控制組織吸光值下降

百分比，可判斷樣品清除 DPPH 自由基能力之強弱。DPPH 自由基清除能力隨吸光值下降，清除能力越佳。

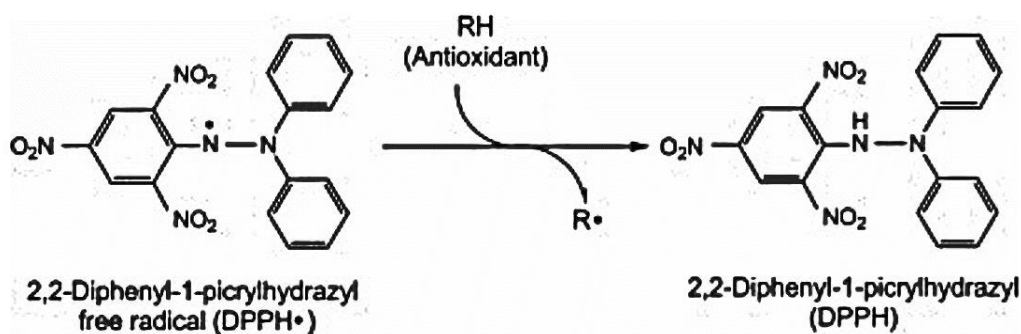
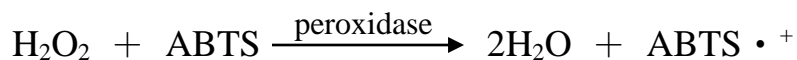


圖 4-2、DPPH 自由基清除作用之反應式

Fig. 4-2 Reaction of scavenging activity on DPPH radical.

#### 4-4-5 ABTS 自由基清除試驗(ABTS radical-scavenging assay)

原理：horseradish peroxidase 會催化  $H_2O_2$  及 ABTS 反應形成  $ABTS \cdot^+$ ，此為穩定的藍綠色自由基物質，其在波長 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(1996)等人之方法，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  $100\mu M$ 、 $4.4 \text{ unit/mL}$  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 ( $mg/mL$ )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。

#### 4-4-6 $\alpha$ -amylase 抑制能力測定

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 離心管中，隨後加入  $\alpha$ -amylase 受質 0.5%(w/v)之澱粉溶液 400  $\mu$ L，再加入 200  $\mu$ L (4U/ mL)酵素液，於 25 $^{\circ}$ C 下反應 3 分鐘後，自此混合物中取出 200  $\mu$ L 加入新的 1.5mL 離心管中，加入溶於 5.31M 酒石酸鉀鈉溶液的二硝基水楊酸呈色溶液 (3,5-dinitrosalicylic acid,DNS)100  $\mu$ L，在水浴 85 $^{\circ}$ C 下加熱 15 分鐘後，再加入 900  $\mu$ L 去離子水，並測其在 540nm 下的吸光值。

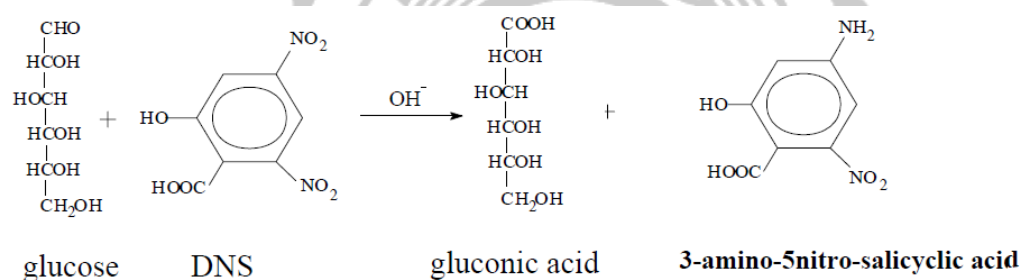


圖 4-3、葡萄糖之呈色反應

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

#### 4-4-7 $\alpha$ -glucosidase 抑制能力測定

參考 Shim(2003)及林(2008)等人之方法並稍加修飾，將欲檢測之樣品濃度配製成 0.1mg/mL，取 100  $\mu$ L 待測樣品與 20  $\mu$ L 之  $\alpha$ -glucosidase 酵素液(1U/ mL)於 1.5mL 離心管中，隨之加入 380  $\mu$ L 0.53Mm 的受質 4-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside (*p*NPG)溶液，於 37  $^{\circ}$ C 下反應 20 分鐘後，加入 500  $\mu$ L (0.1M)Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 充分混合，使酵素失活終止其反應，以分光光度計測其在 400nm 下的吸光值。而控制組則以 0.1M 的磷酸緩衝溶液(pH6.8)取代萃取物，背景組為只有萃取物的吸光值，僅需加入萃取液，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



#### 4-4-8 小葉山葡萄莖抗氧化及醣解酵素抑制成分之萃取、分離與純化。

小葉山葡萄莖之正己烷、乙酸乙酯及正丁醇及水萃取物，利用醣解酵素抑制作用與抗氧化能力之結果顯示，其正丁醇萃取物顯示有較佳醣解酵素抑制率，在總酚和類黃酮含量及清除 DPPH 自由基能力試驗，亦發現其總酚與類黃酮含量較高，且 DPPH 自由基清除能力與總抗氧化能力佳，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。小葉山葡萄莖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圖如圖 4-4 所示。

##### (1) 小葉山葡萄莖正丁醇萃取物之第一次 XAD-7 液相層析

使用 XAD-7 填充於玻璃管柱(700×45mm)，再將具強抗氧化性及醣解酵素抑制活性之小葉山葡萄莖正丁醇萃取濃縮物以去離子回溶水後充填至管柱最頂層，其沖提條件依序是水：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 250mL 為收集單位，並以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，偵測波長 280nm 之吸光值對收集瓶作圖進行區分，而後利用抗氧化及醣解酵素抑制測試檢測各區分濃縮物之活性。

##### (2) 小葉山葡萄莖正丁醇萃取物之第二次 XAD-7 液相層析

使用 XAD-7 樹脂填充於玻璃管柱(600\*24.5mm)，再將具強抗氧化性及醣解酵素抑制活性之小葉山葡萄莖萃取物沖提區分 I 濃縮液回溶

於去離子水後充填至管柱最頂層，其沖提條件依序是水：甲醇(v/v)=100：0、95：5、90：10、80：20、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 275nm 之吸光值對收集瓶作圖進行區分，而後利用抗氧化及醣解酵素抑制測試檢測各區分濃縮物之活性。

### (3) 小葉山葡萄莖正丁醇萃取物之 Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 液相層析

使用 Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 樹脂填充於玻璃管柱(600×24.5mm)，再將具有強抗氧化性及醣解酵素抑制活性之小葉山葡萄莖萃取物沖提區分 I-I 濃縮液回溶於去離子水後充填至管柱最頂層，其沖提條件依序是水：甲醇(v/v)= 100：0、95：5、90：10、80：20、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 275nm 之吸光值對收集瓶作圖進行區分，而後利用抗氧化及醣解酵素抑制測試檢測各區分濃縮物之活性。

### (4) HPLC 分析

將活性高且抗氧化性佳的區分 I-I-I 利用高效液相層析進行分析，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，重複分離抗氧化成分。將經高效液相層析分離純化單一波峰之各成分濃縮後，進行結構鑑定。高效液相層析條件如下所示：

4-4-8-1 區分 I-I-I 分析型高效液相層析【區分 1~3】

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

沖提劑：H<sub>2</sub>O：MeOH (v/v) = 90：10

流 速：0.5 mL/min

偵測器：270 nm

4-4-8-2 區分 I-I-I 製備型高效液相層析【區分 1~3】

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

沖提劑：H<sub>2</sub>O：MeOH (v/v) = 90：10

流 速：2.5 mL/min

偵測器：270 nm

4-4-8-3 區分 I-I-I-2 分析型高效液相層析【純化物質 1、純化物質 2】

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

沖提劑：H<sub>2</sub>O：MeOH (v/v) = 95：5

流 速：0.6 mL/min

偵測器：260 nm

4-4-8-4 區分 I-I-I-2 製備型高效液相層析【純化物質 1、純化物質 2】

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

沖提劑：H<sub>2</sub>O：MeOH (v/v) = 95：5

流 速：2.8 mL/min

偵測器：260 nm

4-4-8-5 區分 I-I-I-3 分析型高效液相層析【純化物質 3、純化物質 4】

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

沖提劑：H<sub>2</sub>O：MeOH (v/v) = 90：10

流 速：1 mL/min

偵測器：280 nm

4-4-8-6 區分 I-I-I-3 製備型高效液相層析【純化物質 3、純化物質 4】

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

沖提劑：H<sub>2</sub>O：MeOH (v/v) = 90：10

流 速：3.3 mL/min

偵測器：280 nm

4-4-9 純化物質之結構鑑定

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

將純化之樣品溶於 methanol-d<sub>4</sub> 與 methyl sulfoxide-d<sub>6</sub> 中，以 VXR-300/51 型核磁共振光譜儀 (<sup>1</sup>H-NMR 以 300MHz，<sup>13</sup>C-NMR 以 75MHz) 測定，獲得其 <sup>1</sup>H-及 <sup>13</sup>C-NMR 光譜。光譜解析以  $\delta$  表示化學位移 (chemical shift)，並以 TMS (tetramethylsilane) 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。

#### 4-4-10 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) 9.0 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。



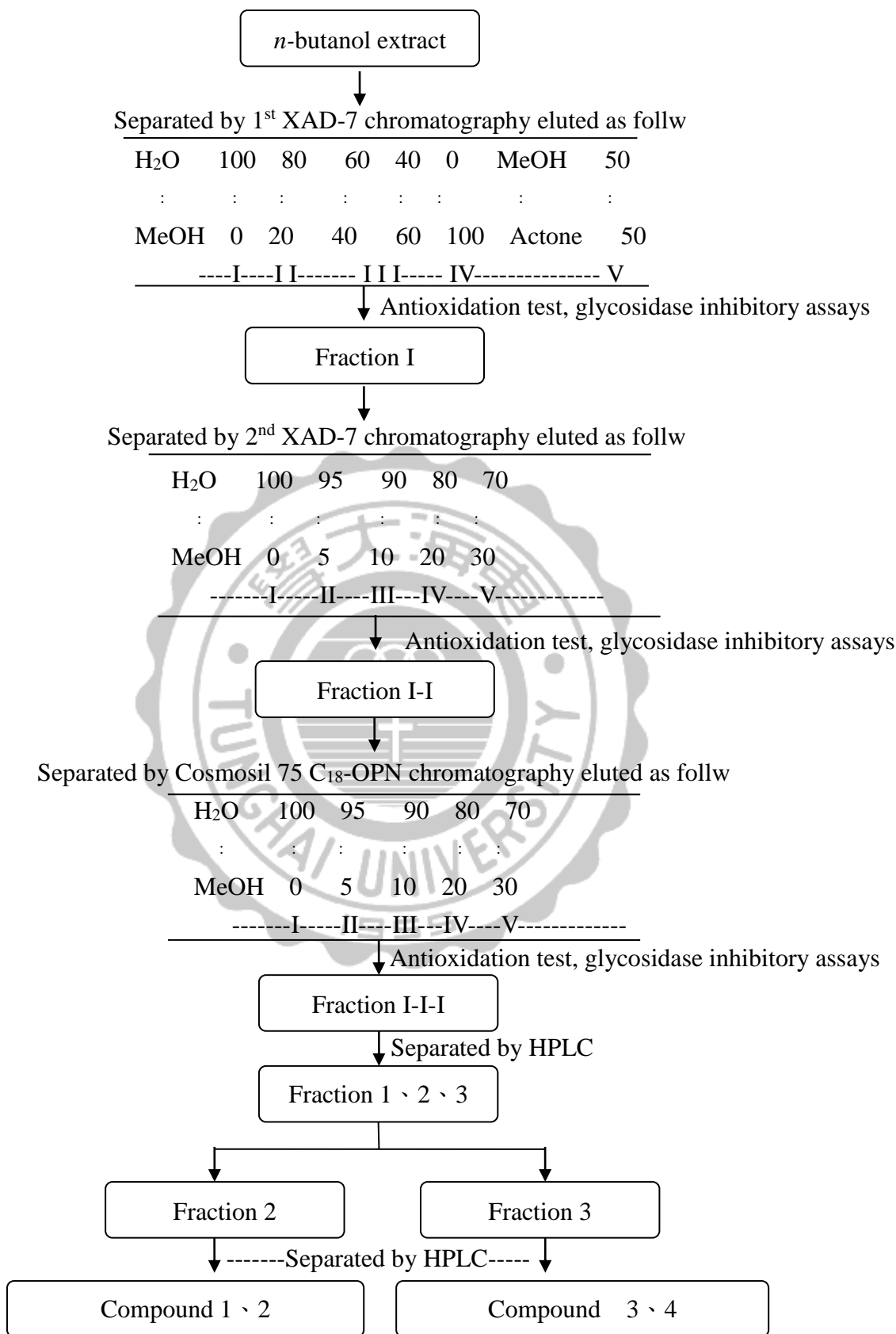


圖 4-4、山葡萄正丁醇莖萃取物抗氧化及糖解酵素抑制成分之純化流程圖  
 Fig. 4-4 Isolation of antioxidant and glycosidase inhibitory components from n-butanol extract of *Vitis thunbergii* stems.

## 第五章、結果與討論

### 5-1 小葉山葡萄莖不同溶劑萃取物之產率

本實驗使用浸漬萃取方法，將 9200 g (水分含量 47%) 新鮮中藥小葉山葡萄莖以手搖式磨粉機打碎，以靜置萃取方式將小葉山葡萄莖粉碎物完全浸泡在甲醇溶液中，甲醇量以能完全淹沒小葉山葡萄莖為基準，並於室溫下重複萃取三次、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 HPLC 級正丁醇進行液液萃取，各三重複，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，以水萃取物產率較高 3.23%，其次為乙酸乙酯 1.61%、正丁醇 1.58%、正己烷 0.67%。

### 5-2 小葉山葡萄莖不同溶劑萃取物之總酚含量

由文獻得知植物之多酚類化合物對於抗氧化性與其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)顯示小葉山葡萄莖四種萃取物中，以乙酸乙酯萃取物具有最高的總酚含量，且正丁醇萃取物次之。

表 5-1、小葉山葡萄莖不同溶劑萃取物之產率

Table 5-1 Yields of the different solvent extracts from *Vitis thunbergii* stems

| Extract           | Weight(g) | Yield(extrat weight/total dry weight)(%) |
|-------------------|-----------|--|
| <i>n</i> -hexane  | 32.46     | 0.67                                     |
| EtOAc             | 78.55     | 1.61                                     |
| <i>n</i> -butanol | 77.06     | 1.58                                     |
| Water             | 157.12    | 3.23                                     |
| Total             | 345.19    | 7.09                                     |

Sample wet weight : 9200.00 g

Sample dry weight : 4871.61 g

表 5-2、小葉山葡萄莖不同溶劑萃取物之總酚與總類黃酮含量

Table 5-2 The total phenolic compounds and total flavonoid contents of different solvent extracts from *Vitis thunbergii* stems

| Extract           | Total polyphenol | Total flavonoid |
|-------------------|------------------|-----------------|
| <i>n</i> -hexane  | 41.93 ± 0.77     | 12.35 ± 0.01    |
| EtOAc             | 364.70 ± 2.91    | 6.28 ± 0.09     |
| <i>n</i> -butanol | 245.07 ± 2.52    | 7.06 ± 0.07     |
| Water             | 85.81 ± 2.33     | 1.91 ± 0.23     |

\* Total phenolic compounds content : µg gallic acid equivalent / mg *Vitis thunbergii* stems extract

\* Total flavonoid content : µg quercetin equivalent / mg *Vitis thunbergii* stems extract



### 5-3 小葉山葡萄莖不同溶劑萃取物之總類黃酮含量

類黃酮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，進行總類黃酮含量分析，從實驗結果(表 5-2)顯示小葉山葡萄莖四種萃取物中，以正己烷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。

### 5-4 小葉山葡萄莖不同溶劑萃取物之抗氧化能力

本實驗檢測五種溶劑(正己烷、乙酸乙酯、正丁醇、水、甲醇)萃取物之 DPPH 自由基清除能力與 ABTS。綜合兩種抗氧化性檢測結果顯示四種溶劑萃取物中以正丁醇萃取物抗氧化能力佳，在清除 DPPH 自由基達 94.27%(圖 5-1)且消除 ABTS 自由基達 98.85%(圖 5-2)。

### 5-5 小葉山葡萄莖不同溶劑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  $\alpha$ -amylase 及  $\alpha$ -glucosidase 兩種，小葉山葡萄莖四種溶劑(正己烷、乙酸乙酯、正丁醇、水)萃取物進行  $\alpha$ -amylase 酵素抑制分析，實驗結果(圖 5-3)顯示小葉山葡萄莖正丁醇

萃取物有較高之抑制率 38.05%；此五種溶劑進行  $\alpha$ -glucosidase 酵素抑制分析，實驗結果(圖 5-4)乙酸乙酯(96.78%)與正丁醇(96.58)萃取物均有相對較高的  $\alpha$ -glucosidase 抑制能力。

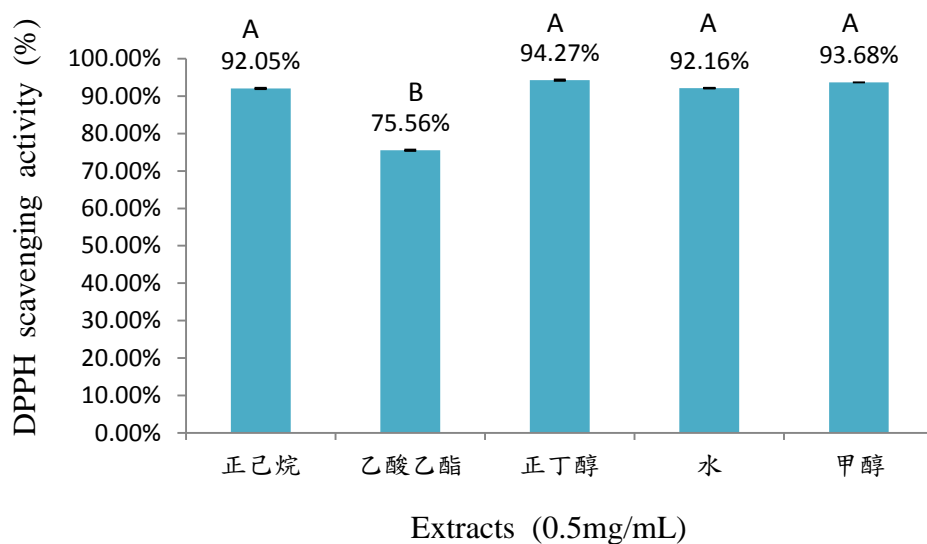


圖5-1、小葉山葡萄莖不同溶劑萃取物之DPPH自由基清除能力

Fig.5-1 DPPH radical scavenging activity of different solvent extracts from *Vitis thunbergii* stems. Bars represent means $\pm$ SD, n=3. Means with different letters are significant different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.



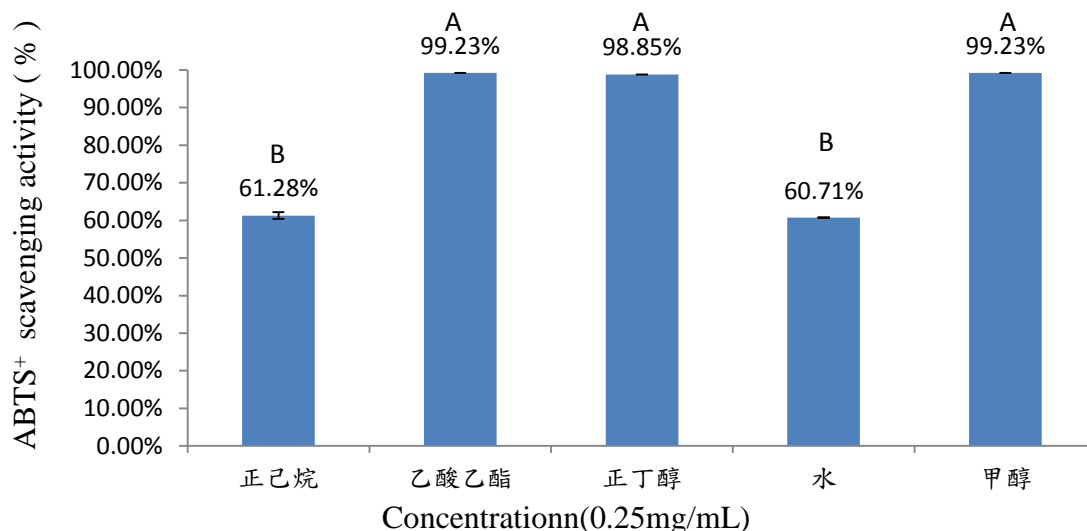


圖5-2、小葉山葡萄莖不同溶劑萃取物之ABTS<sup>+</sup>清除能力

Fig 5-2 The ABTS<sup>+</sup> radical scavenging of different solvent extracts from *Vitis thunbergii* stems Bars represent means±SD,n=3. Means with different letters are significant different(p<0.05) by Duncan's multiple range test. Bars represent means±SD,n=3. Means with different letters are significant different(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

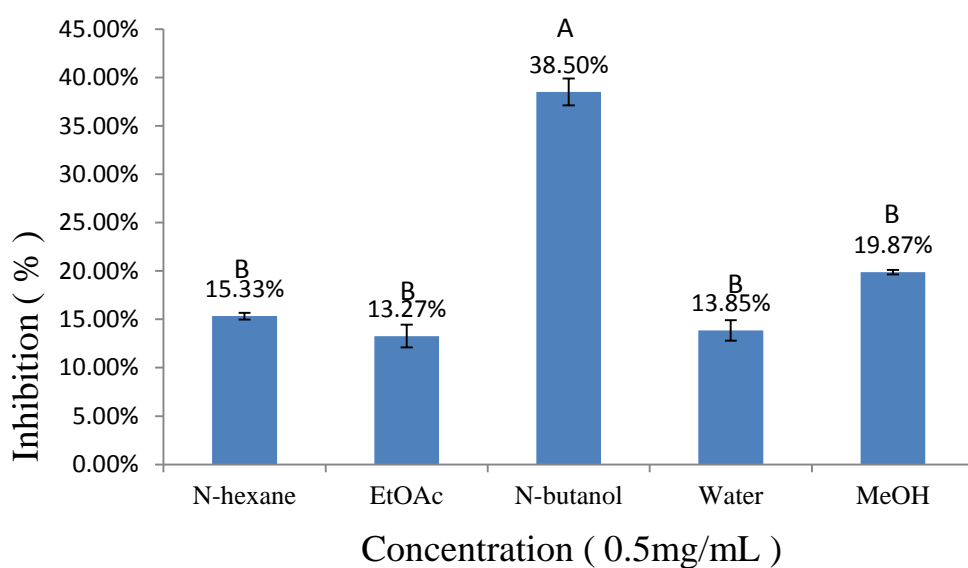


圖5-3、小葉山葡萄莖不同溶劑萃取物對α-amylase之抑制率

Fig. 5-3 α-amylase inhibitory activity of different solvent extracts from *Vitis thunbergii* stems Bars represent means±SD,n=3. Means with different letters are significant different(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

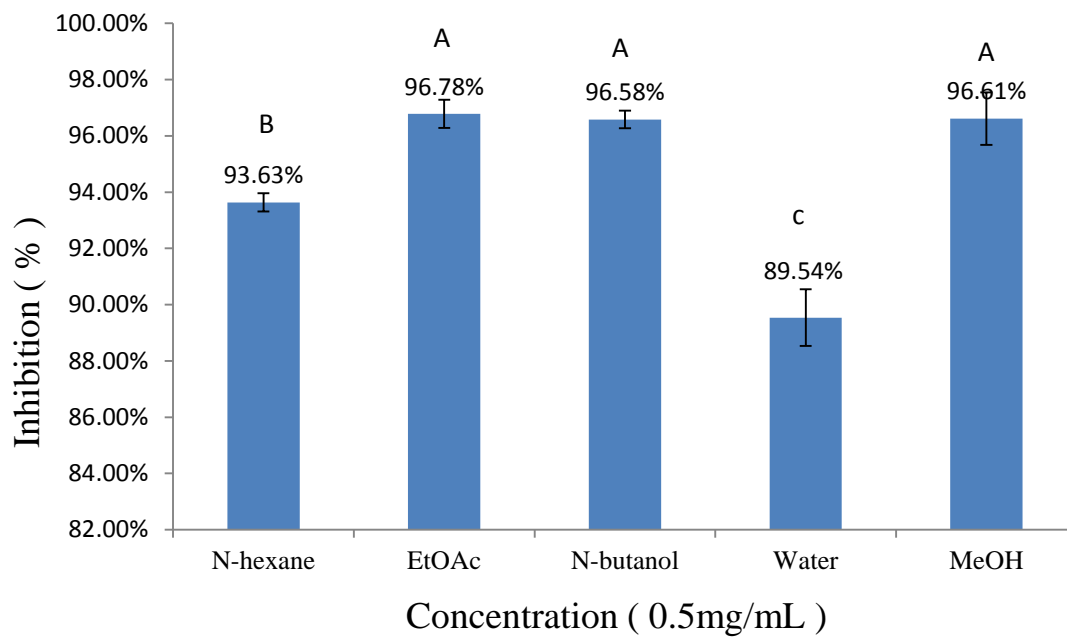


圖5-4、小葉山葡萄莖不同溶劑萃取物對 $\alpha$ -glucosidase之抑制率

Fig. 5-4  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of different solvent extracts from *Vitis thunbergii* stems Bars represent means $\pm$ SD, n=3. Means with different letters are significant different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.



## 5-6 小葉山葡萄莖萃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

### 5-6-1 小葉山葡萄莖萃正丁醇萃取物之第一次 XAD-7 液相層析

小葉山葡萄莖萃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) 進行第一次液相大管柱層析，其沖提條件依序為 deionized water : MeOH(v/v)= 100 : 0、80 : 20、60 : 40、40 : 60、0 : 100、Acetone : MeOH (v/v)=50 : 50 之混合溶劑，每種沖提條件各 2L，並以每瓶 250mL 為收集單位，以波長 280nm 之吸光值對收集瓶做圖，共取 5 個區分，將 5 個區分物依序命名為區分 I、II、III、IV、V(圖 5-5)。其產率如表 5-3 所示。將 5 個區分物進行 DPPH 自由基清除能力(圖 5-6)及 ABTS(圖 5-7)之抗氧化性檢測，及醣解酵素抑制作用測試(圖 5-8)(圖 5-9)，綜合抗氧化測試及醣解酵素抑制活性之結果，五個區分物中，以區分 I 的產率最多且在抑制  $\alpha$ -amylase 能力最高(45.64%)，並在抑制  $\alpha$ -glucosidase 能力有 69.71% 之抑制能力，雖抗氧化能力較差但考量產率以及酵素抑制能力，故選區分 I 進行更進一步之分析。

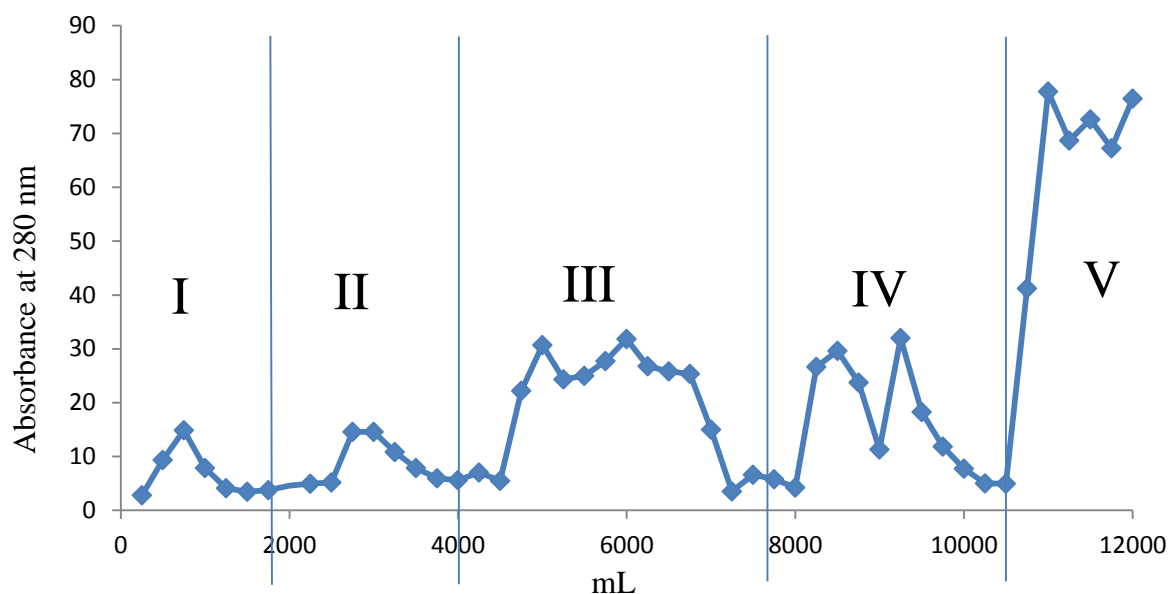


圖5-5、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物之第一次XAD-7液相層析圖

Fig.5-5 1<sup>st</sup> XAD-7 chromatographer of eluted fractions from *n*-butanol extract of *Vitis thunbergii* stems.

表 5-3、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物經第一次 XAD-7 液相層析後各沖提區分產率

Table 5-3 Yields of fractions eluted from *n*-butanol extract of *Vitis thunbergii* stems by 1<sup>st</sup> XAD-7 chromatography

| Fraction | Weight(g) | Yield(%) <sup>a</sup> |
|----------|-----------|-----------------------|
| I        | 22.66     | 29.41                 |
| II       | 2.87      | 3.72                  |
| III      | 11.39     | 14.78                 |
| IV       | 12.05     | 15.64                 |
| V        | 0.35      | 0.46                  |

<sup>a</sup>Sample dry weight:77.06g

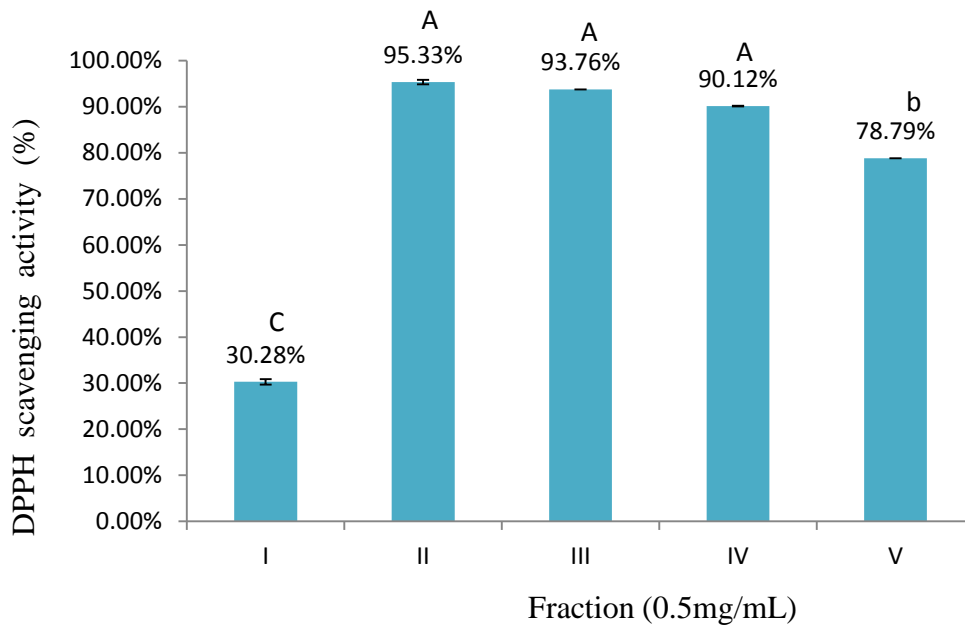


圖5-6、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物經第一次XAD-7液相層析後各沖提區分物之DPPH自由基清除能力

Fig.5-6 DPPH radical scavenging activity of eluted fractions from *n*-butanol extract of *Vitis thunbergii* stems by 1<sup>st</sup> XAD-7 chromatography. Bars represent means±SD,n=3. Means with different letters are significant different( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

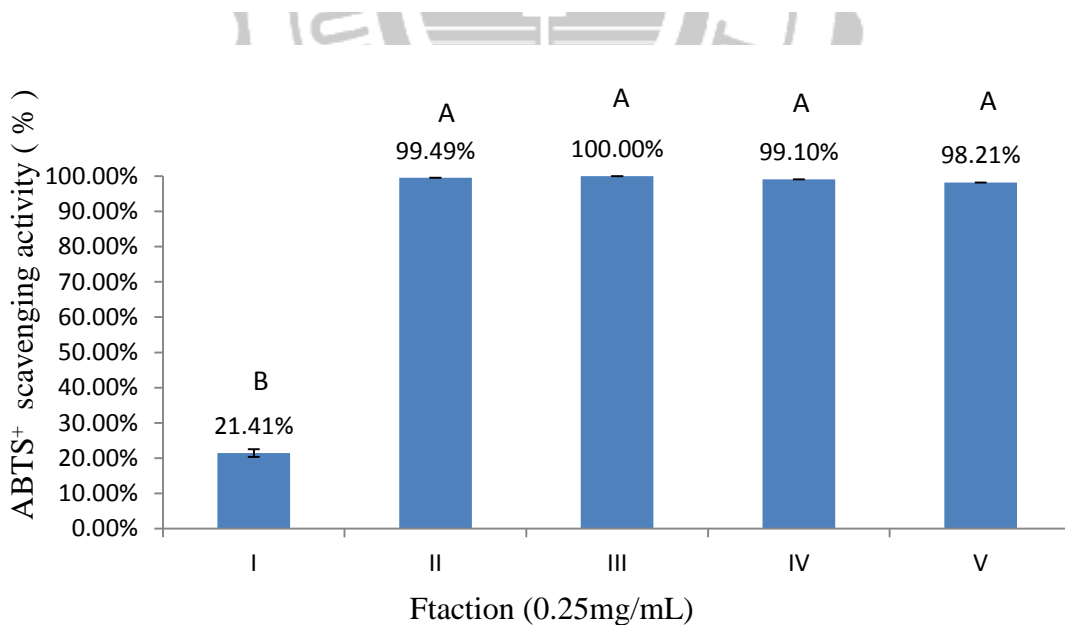


圖5-7、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物經第一次XAD-7液相層析後各沖提區分物之ABTS<sup>+</sup>清除能力

Fig 5-7 The ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity of eluted fractions from *n*-butanol extract of *Vitis thunbergii* stems by 1<sup>st</sup> XAD-7 chromatography. Bars represent means±SD,n=3. Means with different letters are significant different( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

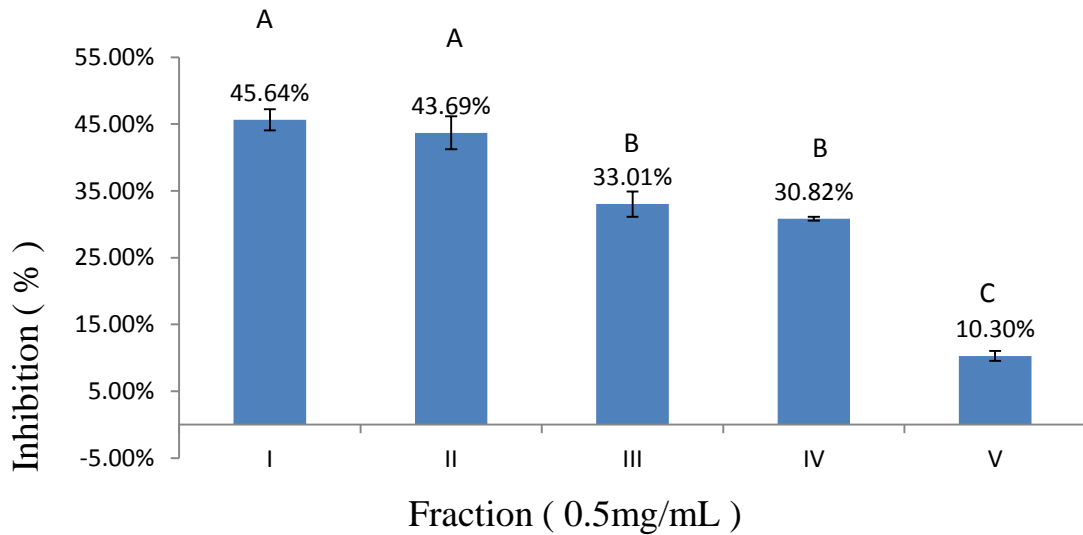


圖5-8、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物經第一次XAD-7液相層析後各沖提區分物對 $\alpha$ -amylase之抑制率

Fig. 5-8  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of eluted fractions from *n*-butanol extract of *Vitis thunbergii* stems by 1<sup>st</sup> 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.

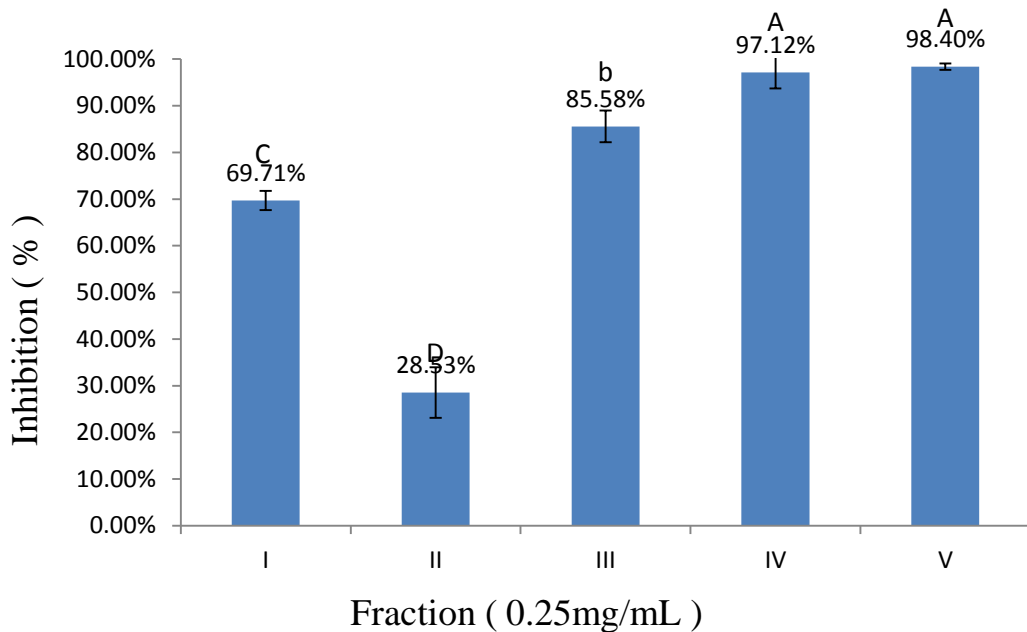


圖5-9、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物經第一次XAD-7液相層析後各沖提區分物對 $\alpha$ -glucosidase之抑制率

Fig. 5-9  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of eluted fractions from *n*-butanol extract of *Vitis thunbergii* stems by 1<sup>st</sup> 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.



## 5-6-2 小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I 之第二次 XAD-7 液相層析

如同上述，將區分 I 預先以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，因其在波長 275nm 具有最大吸收值，故選取 275nm 為液相層析物質之偵測波長。首先將 XAD-7 充填於玻璃管柱(600 × 24.5 mm)進行第一次液相小管柱層析，其沖提條件依序為 deionized water:MeOH(v/v) = 100 : 0、95 : 5、90 : 10、80 : 20、70 : 30 之混合溶劑，每個沖提比例使用 900mL 溶劑，沖提液以每瓶 50mL 為收集單位，以波長 275nm 之吸光值對收集瓶做圖，共取 5 個區分，將 5 個區分物依序命名為區分 I-I、I-II、I-III、I-IV、I-V (圖 5-10)。其產率如表 5-4 所示。將 5 個區分物進行 DPPH 自由基清除能力(圖 5-11)及 ABTS(圖 5-12)之抗氧化性檢測，及醣解酵素抑制作用測試(圖 5-13)(圖 5-14)，綜合抗氧化測試及醣解酵素抑制活性之結果，五個區分物中，以區分 I-V 在抗氧化能力與抑制醣解酵素能力表現出最佳能力，但是由於產率的限制，區分 I-V (50mg)無法達到液相層析所需的量，故以產量最多的區分 I-I 進行更進一步之分析。

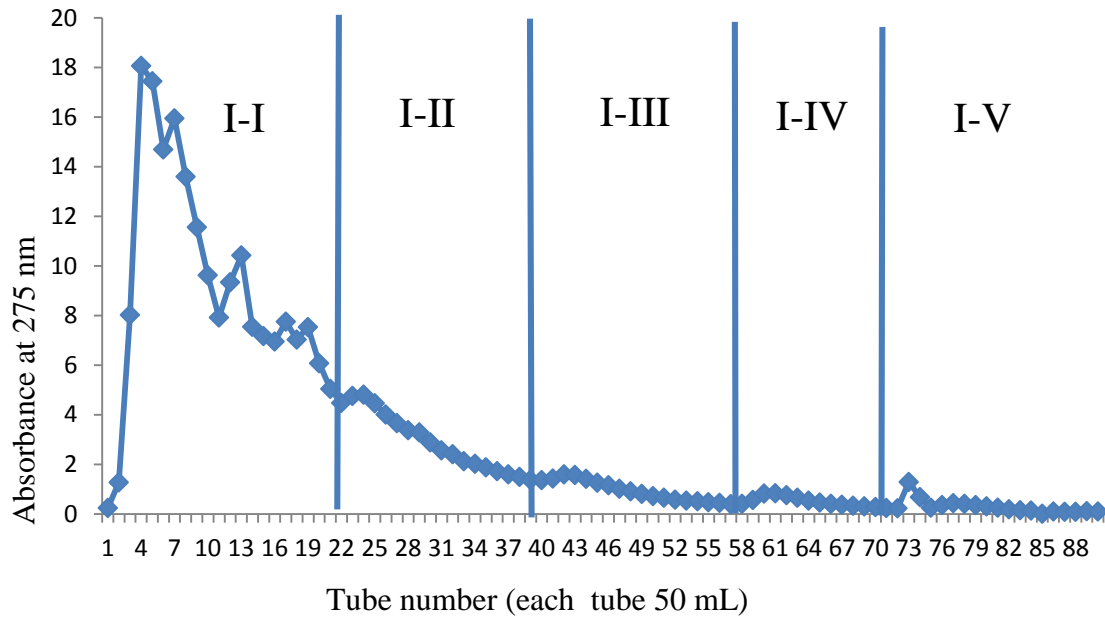


圖5-10、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I 之第二次XAD-7液相層析圖  
 Fig.5-10 2<sup>nd</sup> XAD-7 chromatographer of eluted fractions from fraction I of *n*-butanol extract of *Vitis thunbergii* stems.

表 5-4、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I 之第二次 XAD-7 液相層析後各沖提區分之產率

Table 5-4 Yields of fractions from fraction I of *n*-butanol extract of *Vitis thunbergii* stems by 2<sup>nd</sup> XAD-7 chromatography

| Fraction | Weight(g) | Yield(%) <sup>a</sup> |
|----------|-----------|-----------------------|
| I-I      | 18.34     | 80.94                 |
| I-II     | 0.23      | 1.00                  |
| I-III    | 0.09      | 0.38                  |
| I-IV     | 0.04      | 0.19                  |
| I-V      | 0.05      | 0.21                  |

<sup>a</sup>Sample weight I : 22.66g

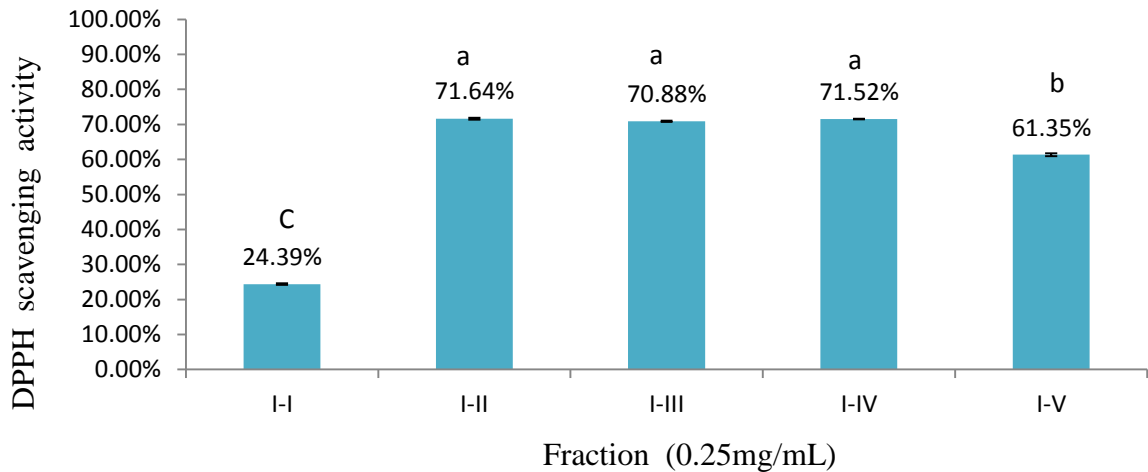


圖5-11、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I 經第二次XAD-7液相層析後各沖提區分物之DPPH自由基清除能力

Fig.5-11 DPPH radical scavenging activity of eluted fractions from fraction I of *n*-butanol extract of *Vitis thunbergii* stems by 2<sup>nd</sup> XAD-7 chromatography with. Bars represent means±SD,n=3. Means with different letters are significant different(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

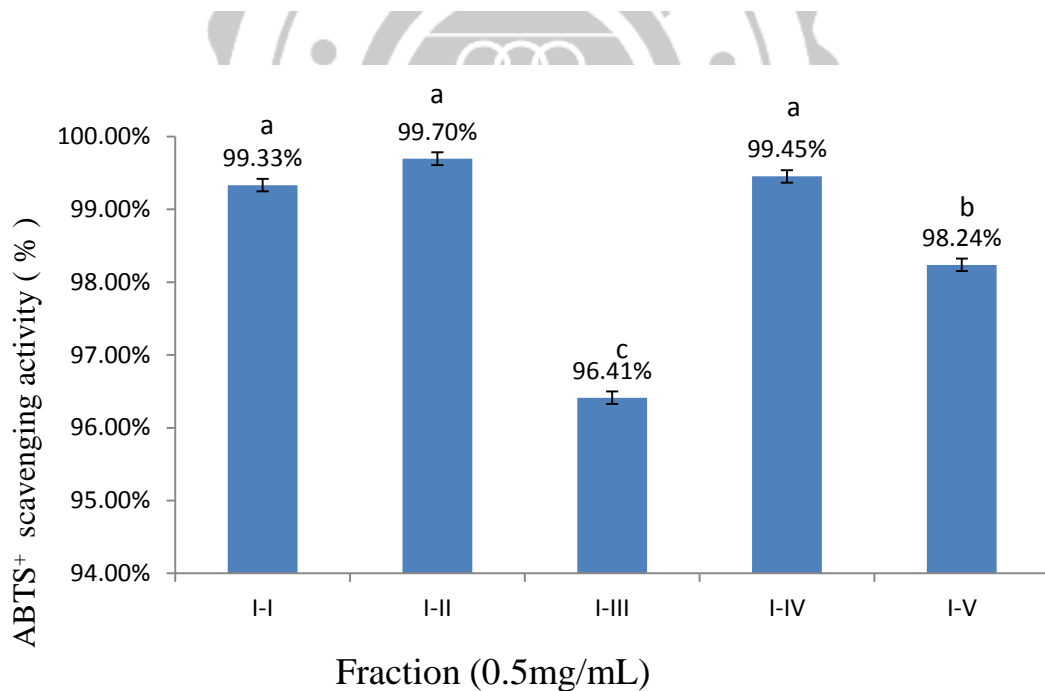


圖5-12、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I 經第二次XAD-7液相層析後各沖提區分物之ABTS<sup>+</sup>清除能力

Fig 5-12 The ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity of eluted fractions from fraction I of *n*-butanol extract of *Vitis thunbergii* stems by 2<sup>nd</sup> XAD-7 chromatography with. Bars represent means±SD,n=3. Means with different letters are significant different(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

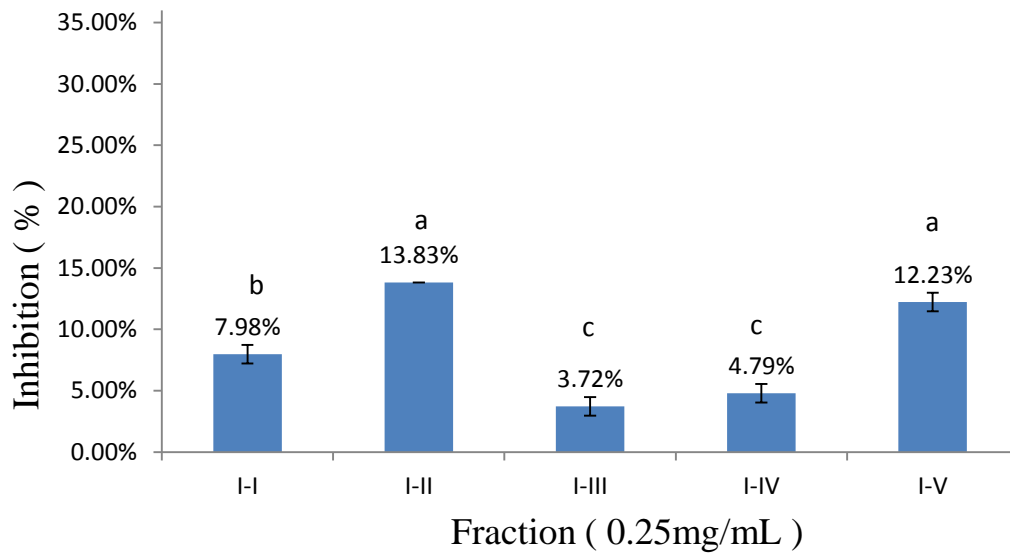


圖5-13、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I 經第二次XAD-7液相層析後各沖提區分物之 $\alpha$ -amylase抑制率

Fig. 5-13  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of eluted fractions from fraction I of *n*-butanol extract of *Vitis thunbergii* stems by 2<sup>nd</sup> 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.

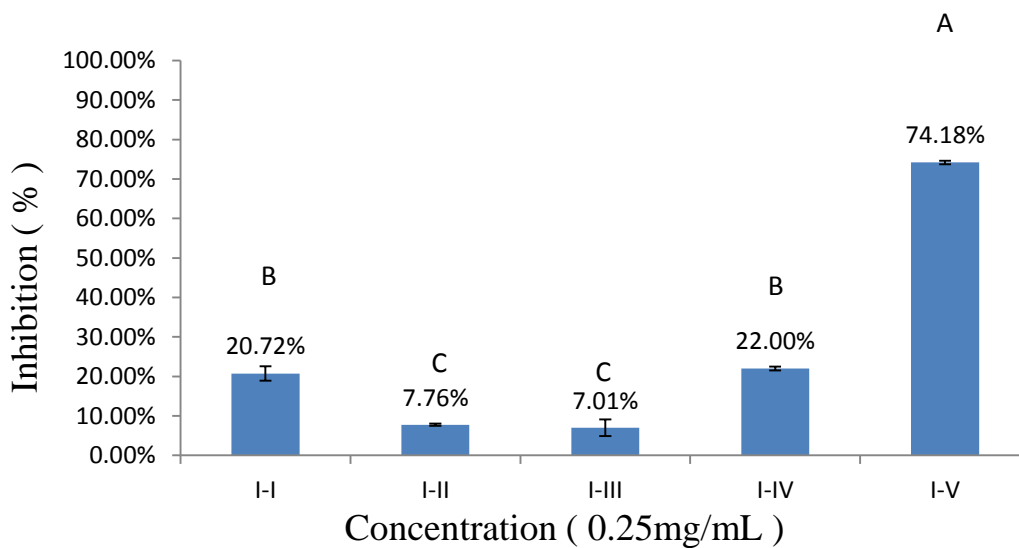


圖5-14、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I 經第二次XAD-7液相層析後各沖提區分之 $\alpha$ -glucosidase抑制率

Fig. 5-14  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of eluted fractions from fraction I of *n*-butanol extract of *Vitis thunbergii* stems by 2<sup>nd</sup> 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.

### 5-6-3 小葉山葡萄莖萃正丁醇萃取物區分 I-I 之 Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN

#### 液相層析

如同上述，將區分 I-I 預先以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，因其在波長 275nm 具有最大吸收值，故選取 275nm 為液相層析物質之偵測波長。首先將 Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 充填於玻璃管柱(600 × 24.5 mm)進行液相層析，其沖提條件依序為 deionized water : MeOH(v/v)= 100 : 0、95 : 5、90 : 10、80 : 20、70 : 30 之混合溶劑，每個沖提比例使用 700mL 溶劑，沖提液以每瓶 50mL 為收集單位，以波長 275nm 之吸光值對收集瓶做圖，共取 5 個區分，將 5 個區分物依序命名為區分 I-I-I、I-I-II、I-I-III、I-I-IV、I-I-V (圖 5-15)。其產率如表 5-5 所示。將 5 個區分物進行 DPPH 自由基清除能力(圖 5-16)及 TEAC(圖 5-17)之抗氧化性檢測，及醣解酵素抑制作用測試(圖 5-18)(圖 5-19)，綜合抗氧化測試及醣解酵素抑制活性之結果，五個區分物中，以區分 I-I-I 雖抗氧化能力不佳，但是產率最多且醣解酵素抑制能力最佳，故以區分 I-I-I 進行更進一步之分析。

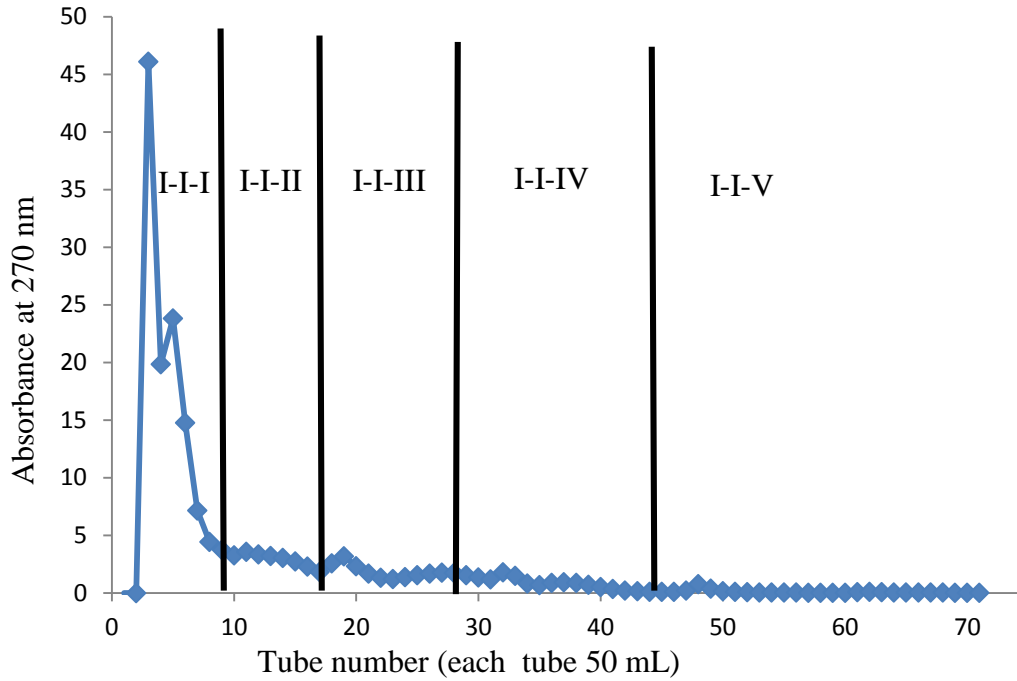


圖5-15、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I-I之Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN液相層析圖  
 Fig.5-15 Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN chromatographer of eluted fractions from fraction I-I of *n*-butanol extract of *Vitis thunbergii* stems.

表 5-5、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I-I 之 Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 液相層析後各沖提區分之產率

Table 5-5 Yields of fractions from fraction I-I of *n*-butanol extract of *Vitis thunbergii* stems by Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN chromatography

| Fraction | Weight(g) | Yield(%) <sup>a</sup> |
|----------|-----------|-----------------------|
| I-I-I    | 14.32     | 78.10                 |
| I-I-II   | 0.14      | 0.79                  |
| I-I-III  | 0.19      | 1.05                  |
| I-I-IV   | 0.10      | 0.55                  |
| I-I-V    | 0.07      | 0.36                  |

<sup>a</sup>Sample weight I-I: 18.34g

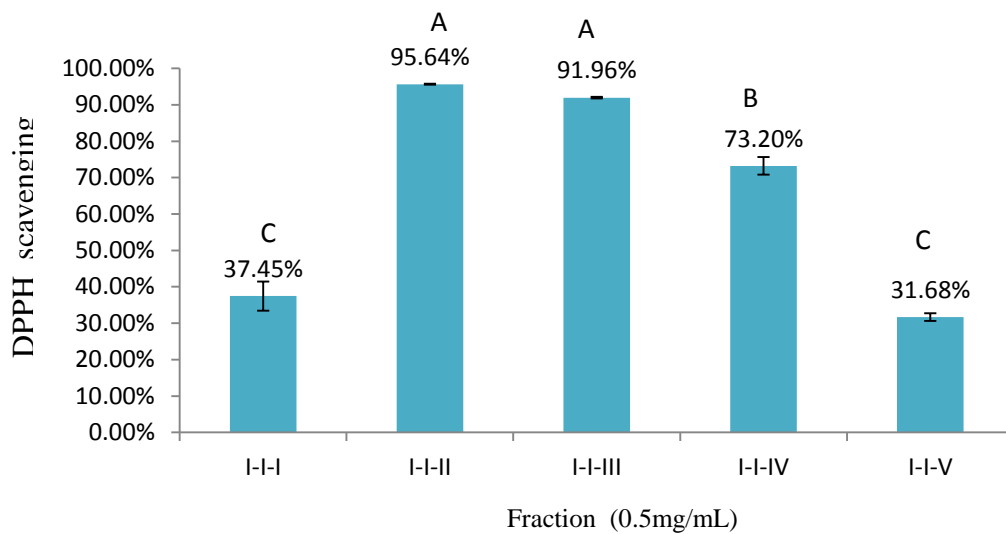


圖5-16、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I-I 經Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN液相層析後各沖提區分物之DPPH自由基清除能力

Fig.5-16 DPPH radical scavenging activity of eluted fractions from fraction I-I of *Vitis thunbergii* stems by Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN chromatography. Bars represent means±SD, n=3. Means with different letters are significant different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

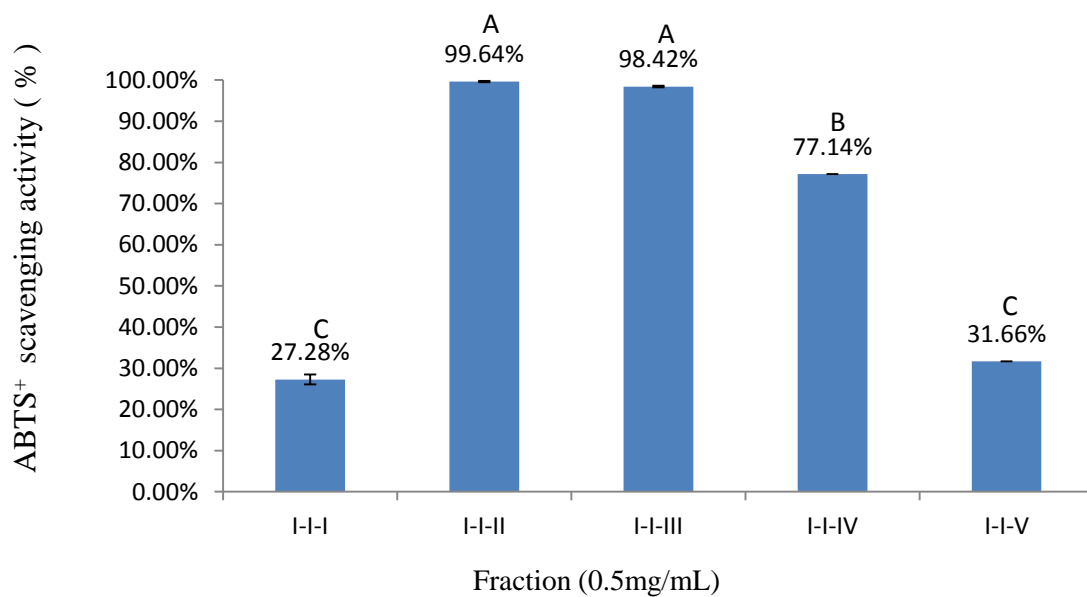


圖5-17、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I-I 經Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN液相層析後各沖提區分物之ABTS<sup>+</sup>清除能力

Fig 5-17 The ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity of eluted fractions from fraction I-I of *Vitis thunbergii* stems by Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN chromatography. Bars represent means±SD, n=3. Means with different letters are significant different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

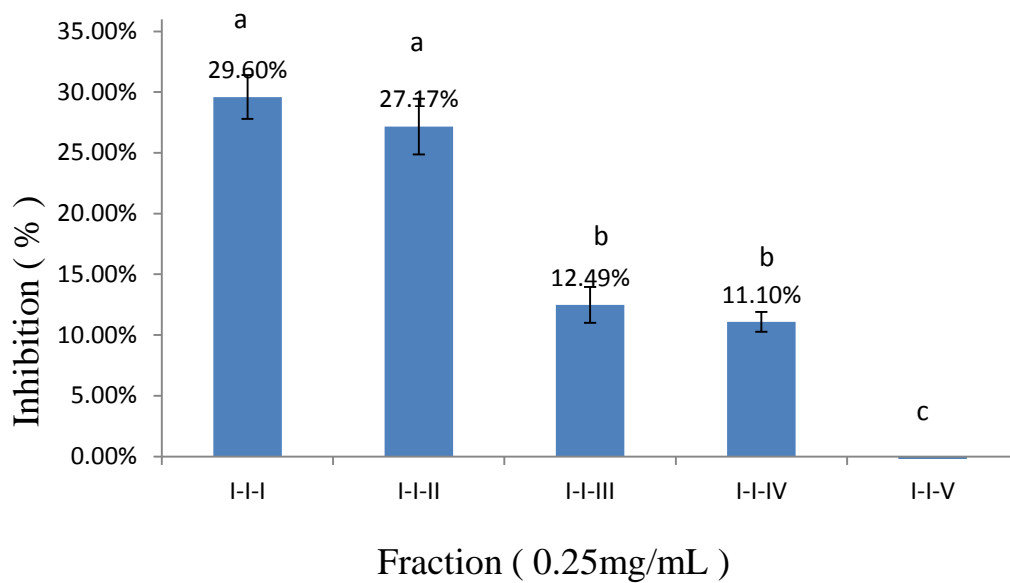


圖5-18、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I-I 經Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN液相層析後各沖提區分物之 $\alpha$ -amylase之抑制率

Fig. 5-18  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of eluted fractions from fraction I-I of *Vitis thunbergii* stems by Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN chromatography. Bars represent means $\pm$ SD,n=3. Means with different letters are significant different(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

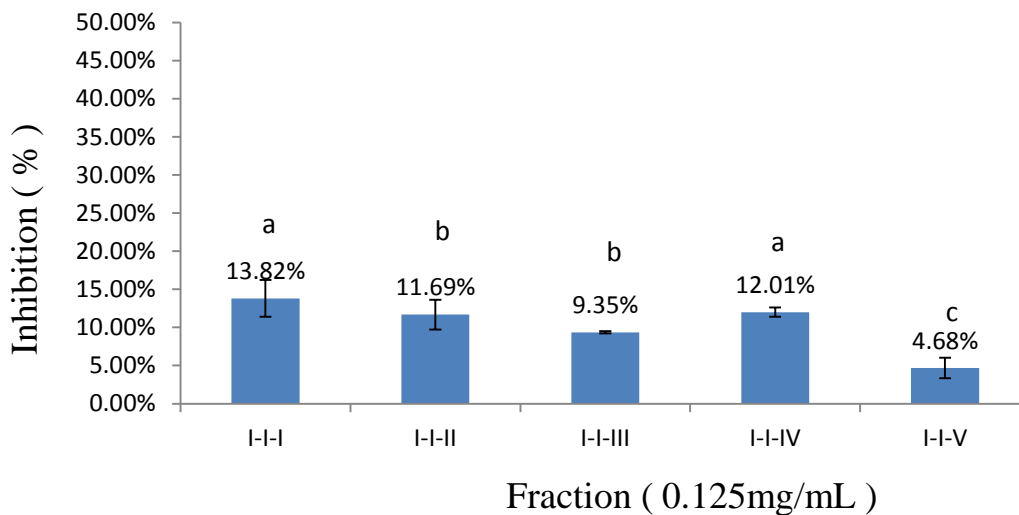


圖5-19、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I-I 經Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN液相管柱層析後各沖提區分物之 $\alpha$ -glucosidase之抑制率

Fig. 5-19  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of eluted fractions from fraction I-I of *Vitis thunbergii* stems by Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN chromatography. Bars represent means $\pm$ SD,n=3. Means with different letters are significant different(p<0.05) by Duncan's multiple range test.



#### 5-6-4 小葉山葡萄莖萃正丁醇萃取物區分 I-I-I 之 HPLC 分析

由於未知物多在第一沖提條件下就被沖提出來，推斷 XAD-7 與 Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 充填之液相層析無法有效將區分物分離，故接下來以 HPLC 分離純化正丁醇萃取物區分 I-I-I，將區分 I-I-I 預先以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，因其在波長 270nm 具有最大吸收值，故選取 270nm 為液相管柱層析物質之偵測波長。將正丁醇萃取物區分 I-I-I 濃縮至乾後回溶於溶劑(甲醇:水=10:90)，經由 0.45  $\mu$ m 之過濾膜過濾後進行 HPLC 分析，並以製備型高效液相層析儀尋找良好的分離條件為管柱 Develosil ODS-HG-5，deionized water : MeOH(v/v)=90 : 10，流速 2.5mL/min，偵測波長 270nm，結果顯示於圖 5-19，由於還沒有將物質分離，因此重複收集分離成三個區分，區分 1、2、3(5-20)，其產率如表 5-6 所示。同樣進行 DPPH 自由基清除能力(圖 5-21)及 ABTS(圖 5-22)之抗氧化性檢測，及醣解酵素抑制作用測試(圖 5-23)(圖 5-24)，由結果顯示在醣解酵素抑制能力試驗上不管是對  $\alpha$ -amylase 或  $\alpha$ -glucosidase 三區分間並無顯著差異，但在抗氧化性試驗上區分 2 以及區分 3 相較於區分 1 顯示出具有極顯著差異，最後選取抗氧化力及醣解酵素抑制活性較佳之區分 2、區分 3 等兩個區分繼續用 HPLC 進行純化。

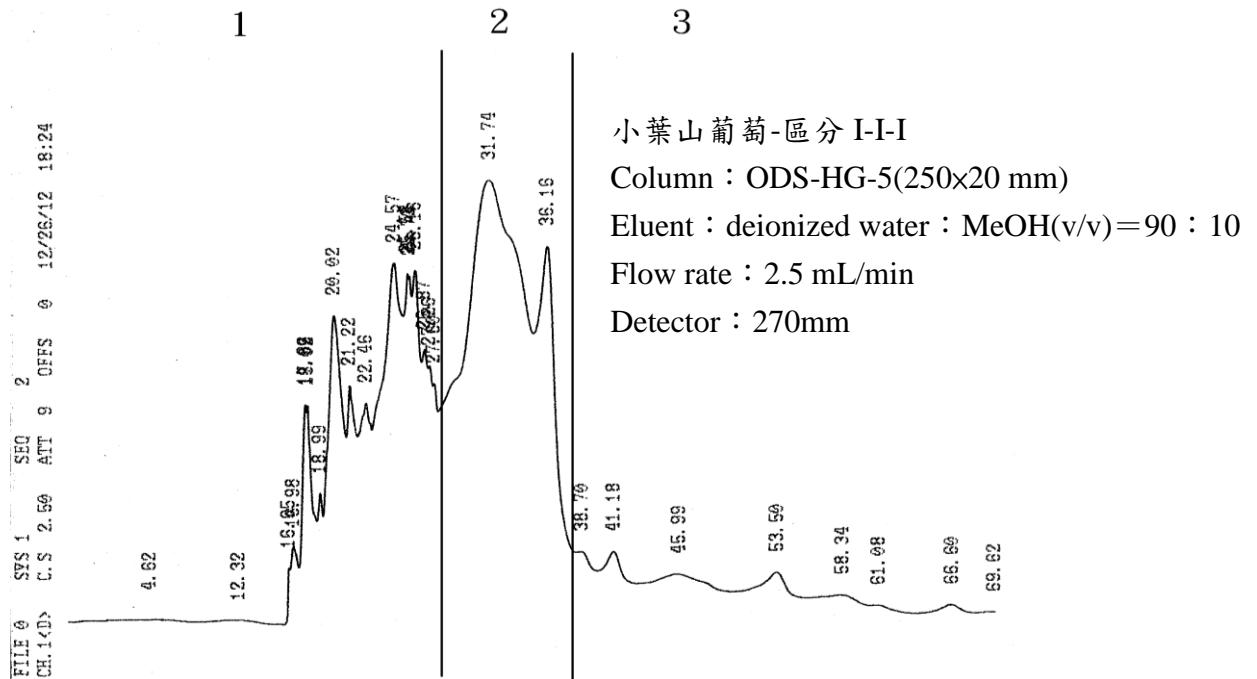


圖 5-20、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I-I-I 之製備型 HPLC 圖

Fig. 5-20 Preparative HPLC chromatogram of fraction I-I-I of *n*-butanol extract of *Vitis thunbergii* stems.

表 5-6、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I-I-I 之 HPLC 液相層析

後各沖提區分之產率

Table 5-6 Yields of fractions from fraction I-I-I of *n*-butanol extract of *Vitis thunbergii* stems by HPLC chromatogram

| Fraction | Weight(g) | Yield(%) <sup>a</sup> |
|----------|-----------|-----------------------|
| 1        | 12.14     | 94.47                 |
| 2        | 0.27      | 2.14                  |
| 3        | 0.44      | 3.39                  |

<sup>a</sup>Sample dry weight I-I-I: 12.85g

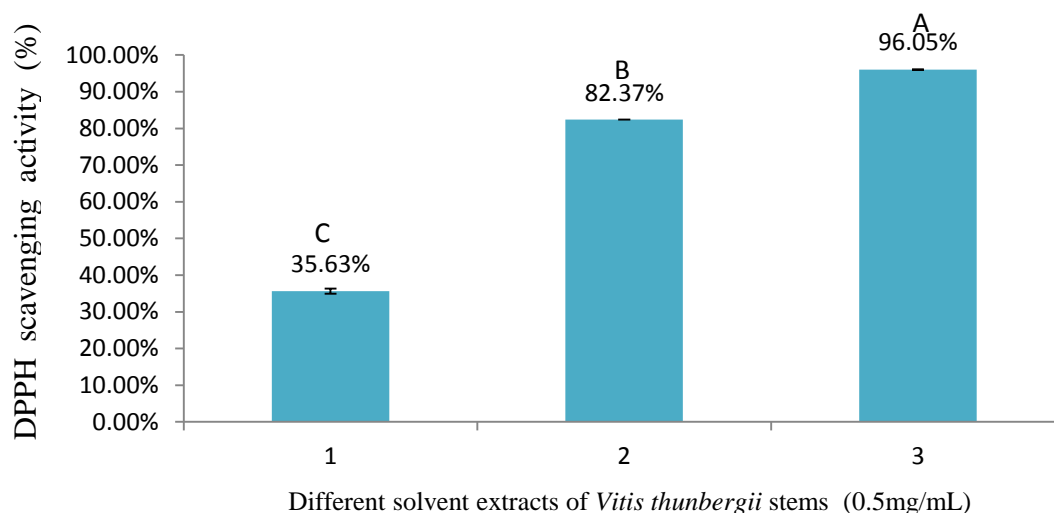


圖5-21、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I-I-I 經 HPLC 層析後各沖提區分之 DPPH 自由基清除能力

Fig.5-21 DPPH radical scavenging activity of eluted fractions from fraction I-I-I of n-butanol extract of *Vitis thunbergii* stems by HPLC chromatogram. Bars represent means $\pm$ SD, n=3. Means with different letters are significant different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

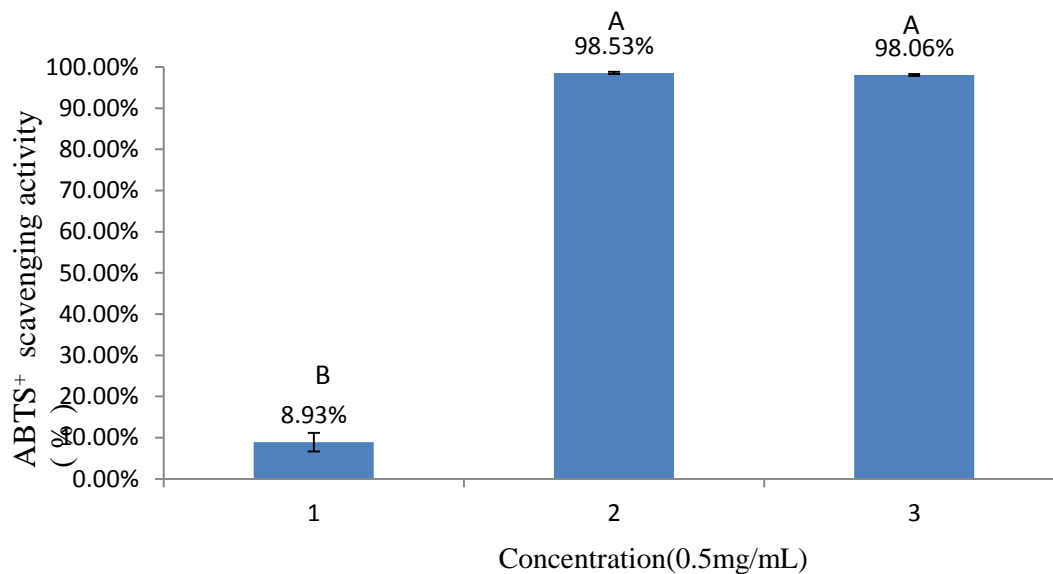


圖5-22、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I-I-I 經 HPLC 層析後各沖提區分之 ABTS<sup>+</sup> 清除能力

Fig. 5-22 The ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity of eluted fractions from fraction I-I-I of n-butanol extract of *Vitis thunbergii* stems by HPLC chromatogram. Bars represent means $\pm$ SD, n=3. Means with different letters are significant different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

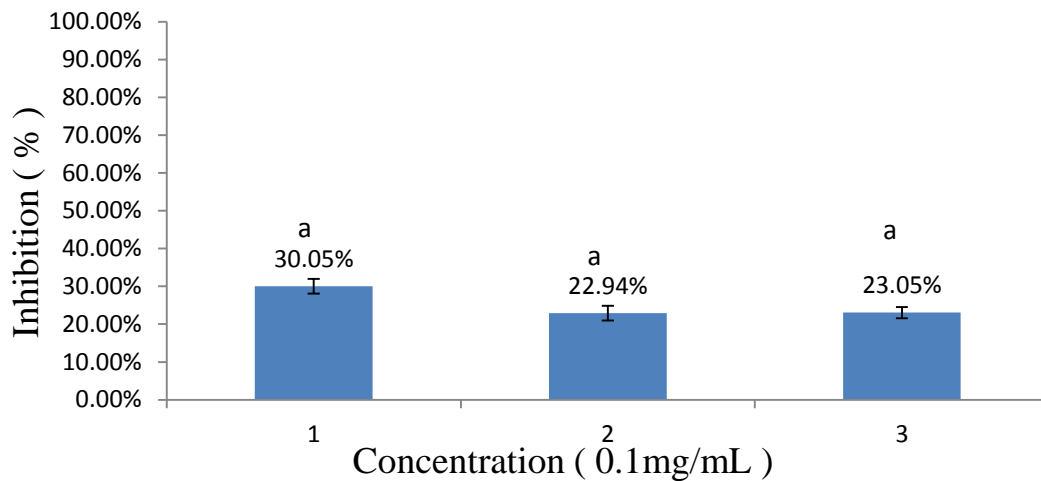


圖5-23、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I-I-I 經HPLC層析後各沖提區分之 $\alpha$ -amylase之抑制率

Fig. 5-23  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of eluted fractions from fraction I-I-I of n-butanol extract of *Vitis thunbergii* stems by HPLC chromatogram. Bars represent means $\pm$ SD, n=3. Means with different letters are significant different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

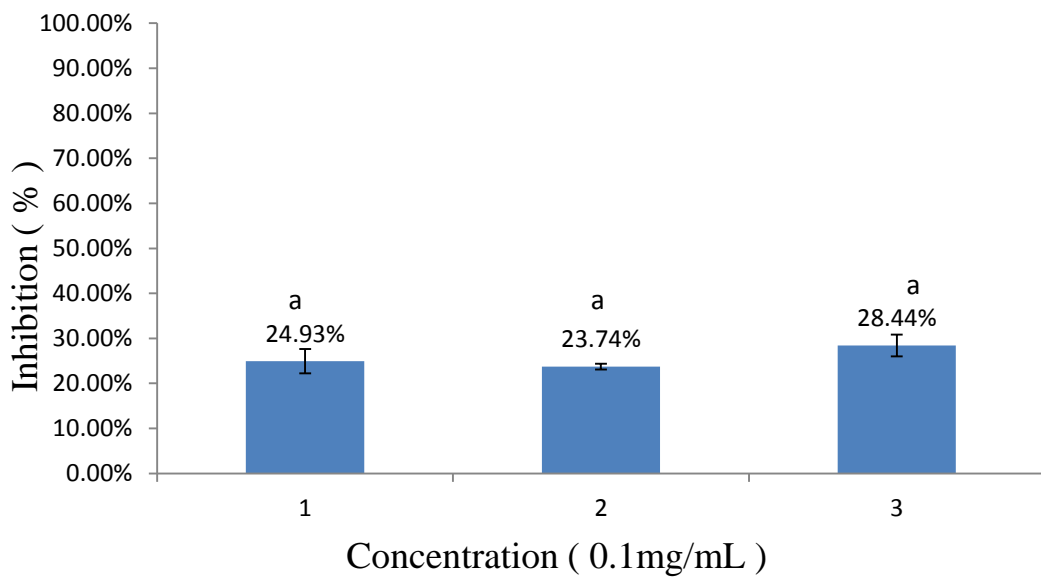


圖5-24、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 I-I-I 經HPLC層析後各沖提區分之 $\alpha$ -glucosidase之抑制率

Fig. 5-24  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of eluted fractions from fraction I-I-I of n-butanol extract of *Vitis thunbergii* stems by HPLC chromatogram. Bars represent means $\pm$ SD, n=3. Means with different letters are significant different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

#### 5-6-5 小葉山葡萄萃正丁醇萃取物區分 2 之 HPLC 分析

將區分 2 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 270nm 具有最大吸收值，故選取 270nm 為液相管柱層析物質之偵測波長。將正丁醇萃取物區分 2 濃縮至乾後回溶於溶劑(甲醇:水=10:90)，經由 0.45  $\mu$ m 之過濾膜過濾後進行 HPLC 分析，並以分析型高效液相層析儀尋找良好的分離條件為管柱 Develosil ODS-HG-5，deionized water:MeOH(v/v)=95:5，流速 0.6mL/min，偵測波長 260nm，結果顯示於圖 5-25，將圖中的二個主要波峰，利用相同的移動相與波長條件，流速為 2.7 mL/min 之製備型高效液相層析儀進行分離，重複收集層析圖上滯留時間相同主要波峰之沖提區分，得到純化物質 1、純化物質 2 之 2 個純化物質，同時檢測 UV， $^1\text{H-NMR}$  及  $^{13}\text{C-NMR}$  的光譜，再解析光譜及比對文獻資訊進行結構鑑定。

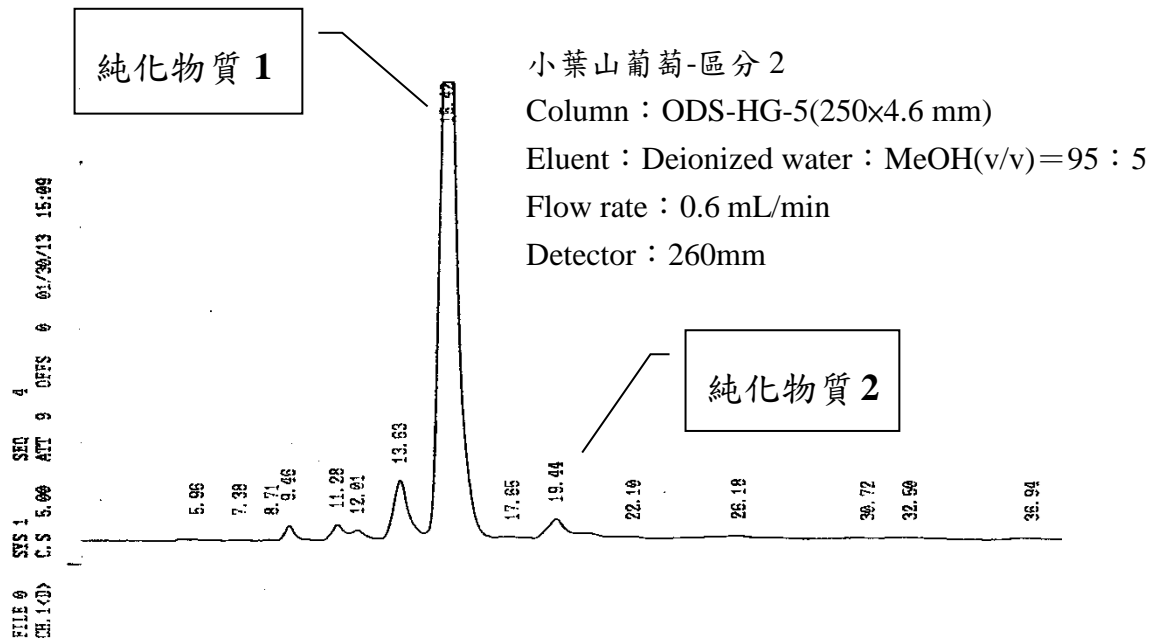


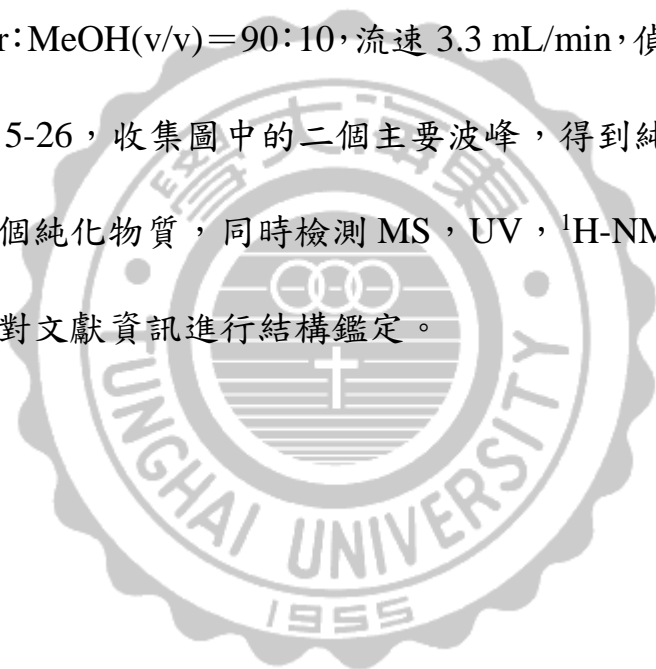
圖 5-25、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 2 之分析型 HPLC 圖

Fig. 5-25 Analytical HPLC chromatogram of fraction 2 of *n*-butanol extract of *Vitis thunbergii* stems.



### 5-6-6 小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 3 之 HPLC 分析

將區分 3 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 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。將正丁醇萃取物區分 3 濃縮至乾後回溶於溶劑(甲醇:水=10:90)，經由 0.45  $\mu$ m 之過濾膜過濾後進行 HPLC 分析，並以製備型高效液相層析儀尋找良好的分離條件為管柱 Develosil ODS-HG-5，deionized water:MeOH(v/v)=90:10，流速 3.3 mL/min，偵測波長 280nm，結果顯示於圖 5-26，收集圖中的二個主要波峰，得到純化物質 3、純化物質 4 之 2 個純化物質，同時檢測 MS，UV，<sup>1</sup>H-NMR 的光譜，再解析光譜及比對文獻資訊進行結構鑑定。



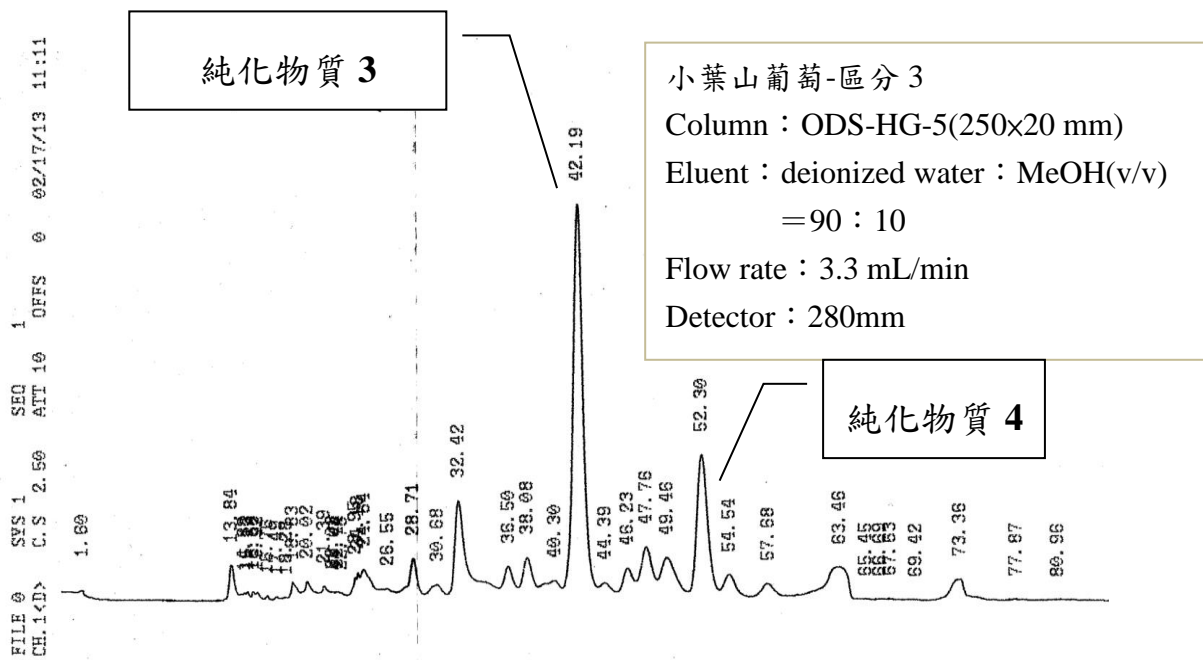


圖 5-26、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物區分 3 之分析型 HPLC 圖

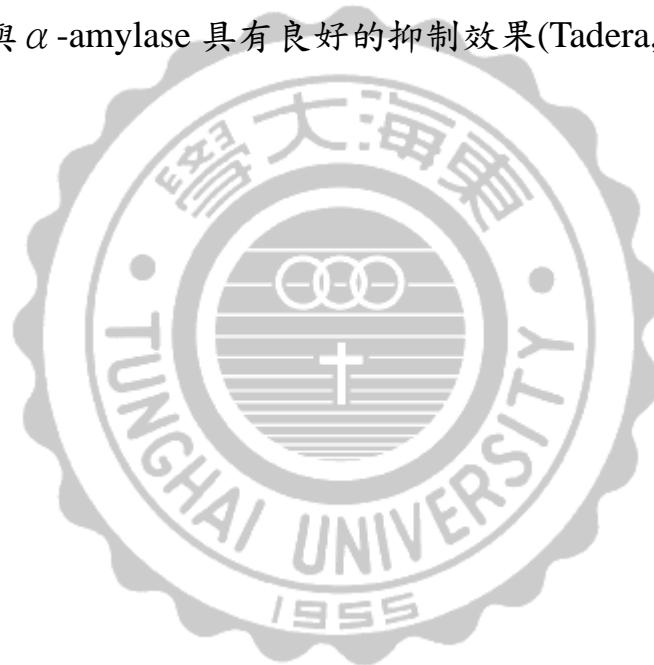
Fig. 5-26 Analytical HPLC chromatogram of fraction 3 of *n*-butanol extract of *Vitis thunbergii* stems.





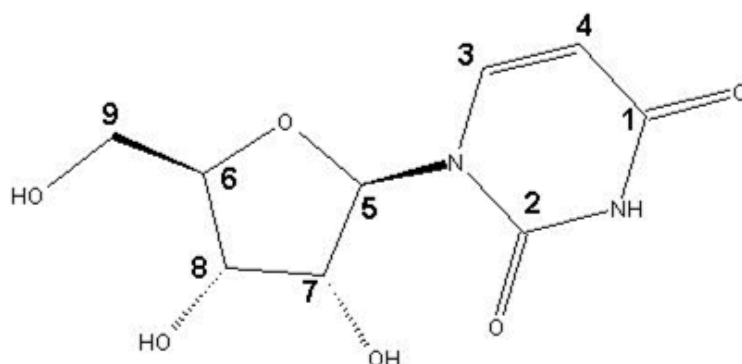
## 5-7 小葉山葡萄莖正丁醇萃取物純化物質之結構鑑定

自小葉山葡萄莖正丁醇萃取物活性區分物純化出的純化物質分別利用 MS, UV,  $^1\text{H-NMR}$  及  $^{13}\text{C-NMR}$  進行結構鑑定。並鑑定出四種純化物質分別為: uridine (1)、isorhamnetin 7-O-glucoside(2)、kaempferol 7-O-glucoside(3)及 quercetin 7-O-glucoside(4)。後三種純化物質皆為類黃酮類物質，且文獻指出具有強抗氧化性的類黃酮對於醣解酵素  $\alpha$ -glucosidase 與  $\alpha$ -amylase 具有良好的抑制效果(Tadera, 2006)。



### 5-7-1 純化物質 1 之結構鑑定

#### Uridine



小葉山葡萄莖純化物質 1 由 UV  $\lambda_{\max}$ (MeOH, nm) 260.0 顯示為共軛 en-one K-band 的特徵吸收帶；質譜  $m/z$  243  $[M+H]^+$ ； $^{13}\text{C}$ -NMR 光譜上顯現出文獻上 Uridine 的 9 個碳原子波訊，依序為  $\delta\text{C-1}$ (166.36), C-2(151.80), C-3(141.96), C-4(102.41), C-5(84.52), C-6(84.33), C-7(73.81), C-8(69.55)及 C-9(60.87)； $^1\text{H}$ -NMR 光譜亦支持  $^{13}\text{C}$ -NMR 光譜的推論， $\delta$  7.74(1H, d,  $J=8.1\text{Hz}$ , H-3), 5.79(H, d,  $J=8.1\text{Hz}$ , H-4), 5.75(2H, d, H-5), 4.15(1H, dd, H-7), 4.08(1H, dd, H-8), 3.82(1H, m, H-6), 3.76(1H, dd, H-9), 3.54(1H, dd, H-9)。比對文獻值(George *et al*, 2002)，1 的結構鑑定為 uridine。

Uridine 為西藥原料，在治療上常用於高血壓、肌肉萎縮症、腦中風後遺症、狹心症等疾病(蔡，2000)，且在臨床試驗上顯示口服 uridine 具有改善妄想型精神分裂症(Parenti, f., 1992)、癲癇(Bonavit *et al*, 1975)、遺傳性乳清酸尿症(Scriver *et al*, 1995)、(Becroft *et al*, 1969)及糖尿病引起的周圍神經痛症狀(Gallai *et al*, 1992)等。

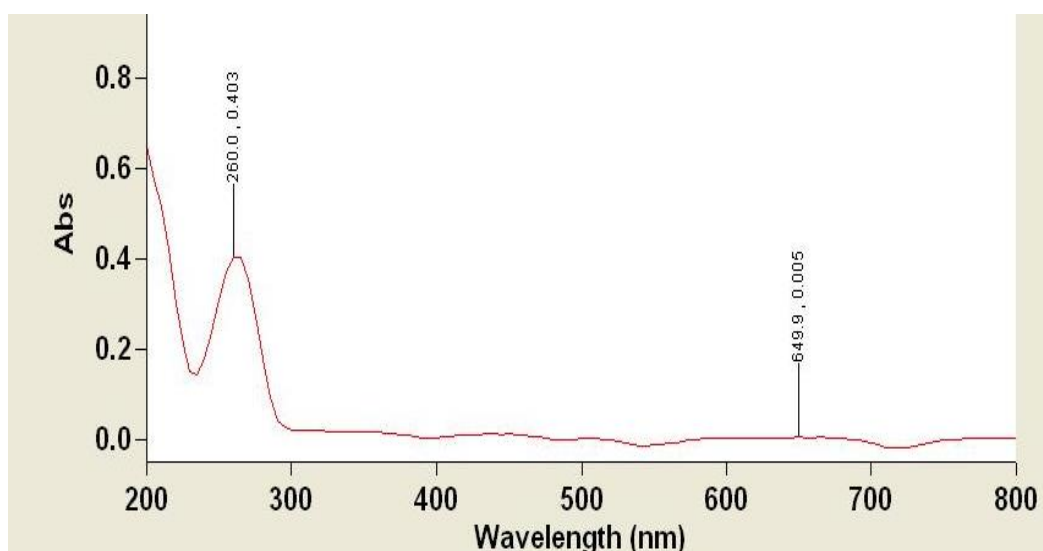
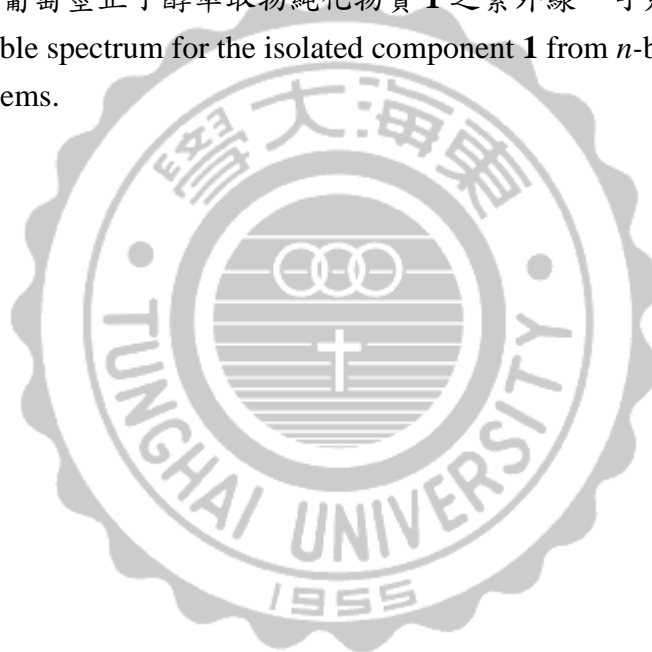


圖 5-27、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物純化物質 **1** 之紫外線—可見光光譜

Fig. 5-27 UV-visible spectrum for the isolated component **1** from *n*-butanol extract of *Vitis thunbergii* stems.



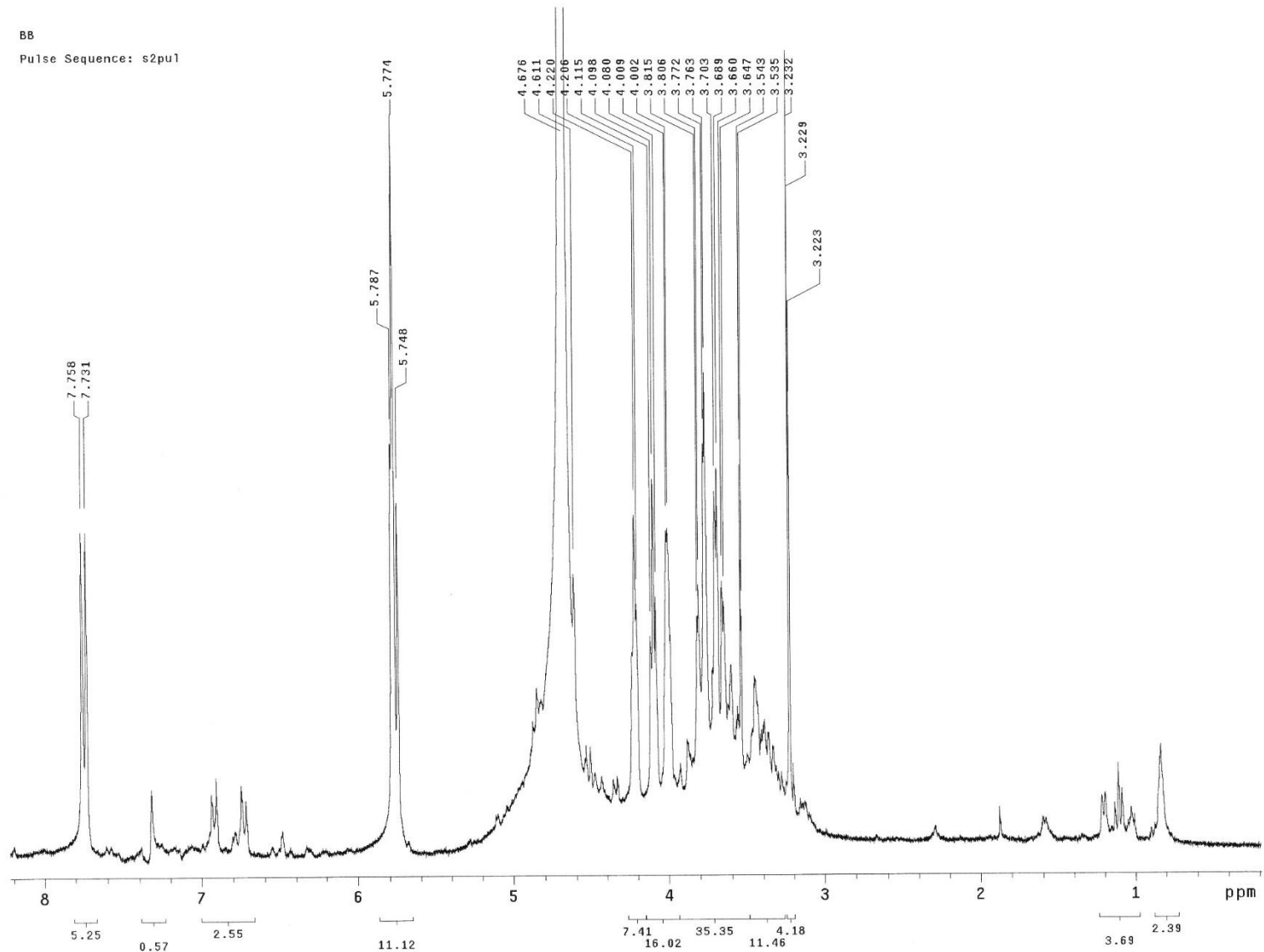


圖 5-28、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物純化物質 **1** 之  $^1\text{H}$ -核磁共振光譜圖

Fig. 5-28  $^1\text{H}$ -NMR spectrum for the isolated component **1** from *n*-butanol extract of *Vitis thunbergii* stems.

# Uridine

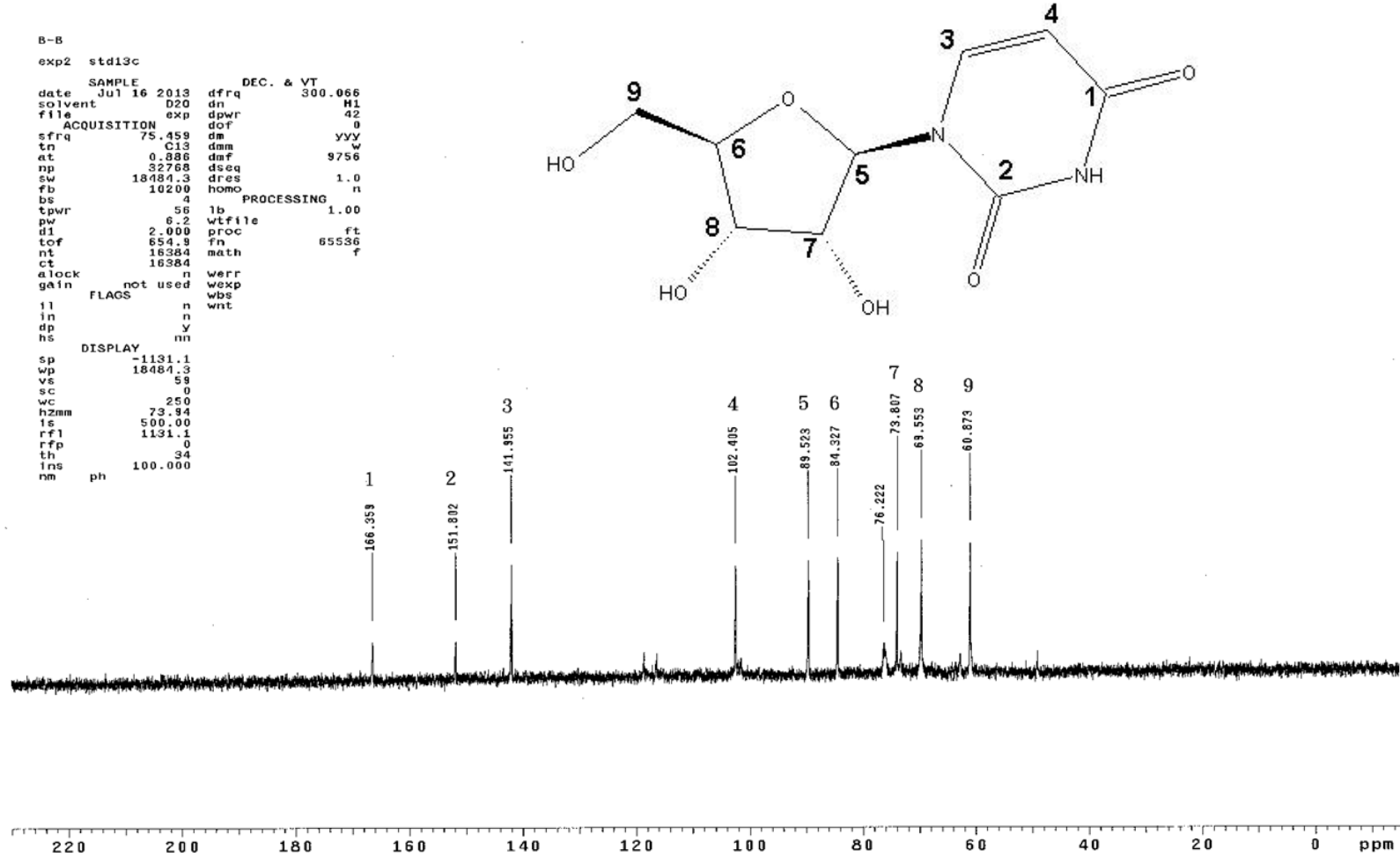
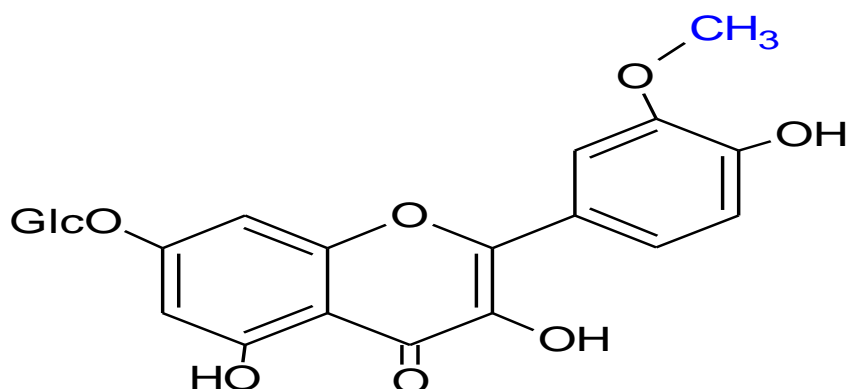


圖 5-29、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物純化物質 **1** 之 <sup>13</sup>C-核磁共振光譜圖

Fig. 5-29 <sup>13</sup>C-NMR spectrum for the isolated component **1** from *n*-butanol extract of *Vitis thunbergii* stems.

## 5-7-2 純化物質 2 之結構鑑定

### Isorhamnetin 7-O-glucoside



Molecular Weight :  $[m/z]=479 [M+H]^+$

由 UV 光譜推測有類黃酮 A 環 275 nm、B 環 357 nm 的特有吸收帶；由  $^1\text{H-NMR}$   $\delta$  3.85(3H, s, OMe), 5.05(1H, d,  $J=7.32$  Hz, H-1''), 6.43(1H,  $J=2.1$  Hz, H-6), 6.85(1H, d,  $J=2.1$  Hz, H-8), 6.95(1H, d,  $J=8.9$  Hz, H-5'), 7.73(1H, dd,  $J=2.1$  & 8.9 Hz, H-6')及 7.77(1H, d,  $J=2.1$  Hz, H-2'),推測為類黃酮 isorhamnetin aglycone 結構，再由  $\delta$  5.05(glc-H<sub>1</sub> 接在 7-O), 3.26~3.75(glc 5 個質子波訊)，此純化物質推測為 isorhamnetin 7-O-glucoside。Sonia *et al.*(2012)的研究指出少了葡萄糖基的 isorhamnetin 7-O-glucoside 是一種  $\alpha$ -glucosidase 抑制劑( $\text{IC}_{50}=0.16$  mM)，比起商業化 acarbose ( $\text{IC}_{50}=0.34$  mM)的效果更好。

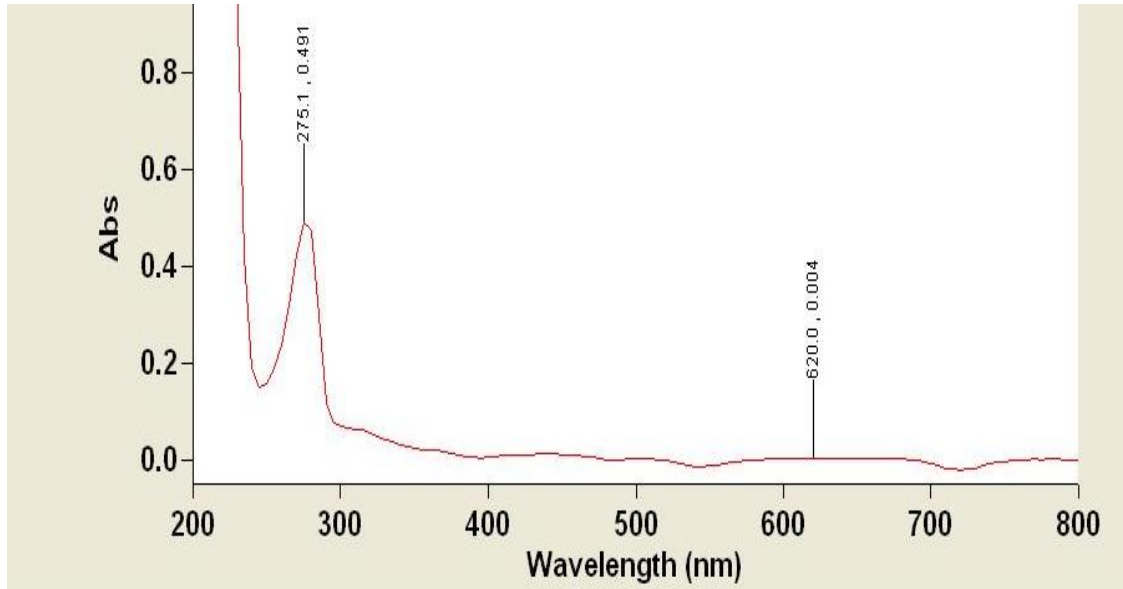


圖 5-30、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物純化物質 2 之紫外線—可見光光譜

Fig. 5-30 UV-visible spectrum for the isolated component 2 from *n*-butanol extract of *Vitis thunbergii* stems.



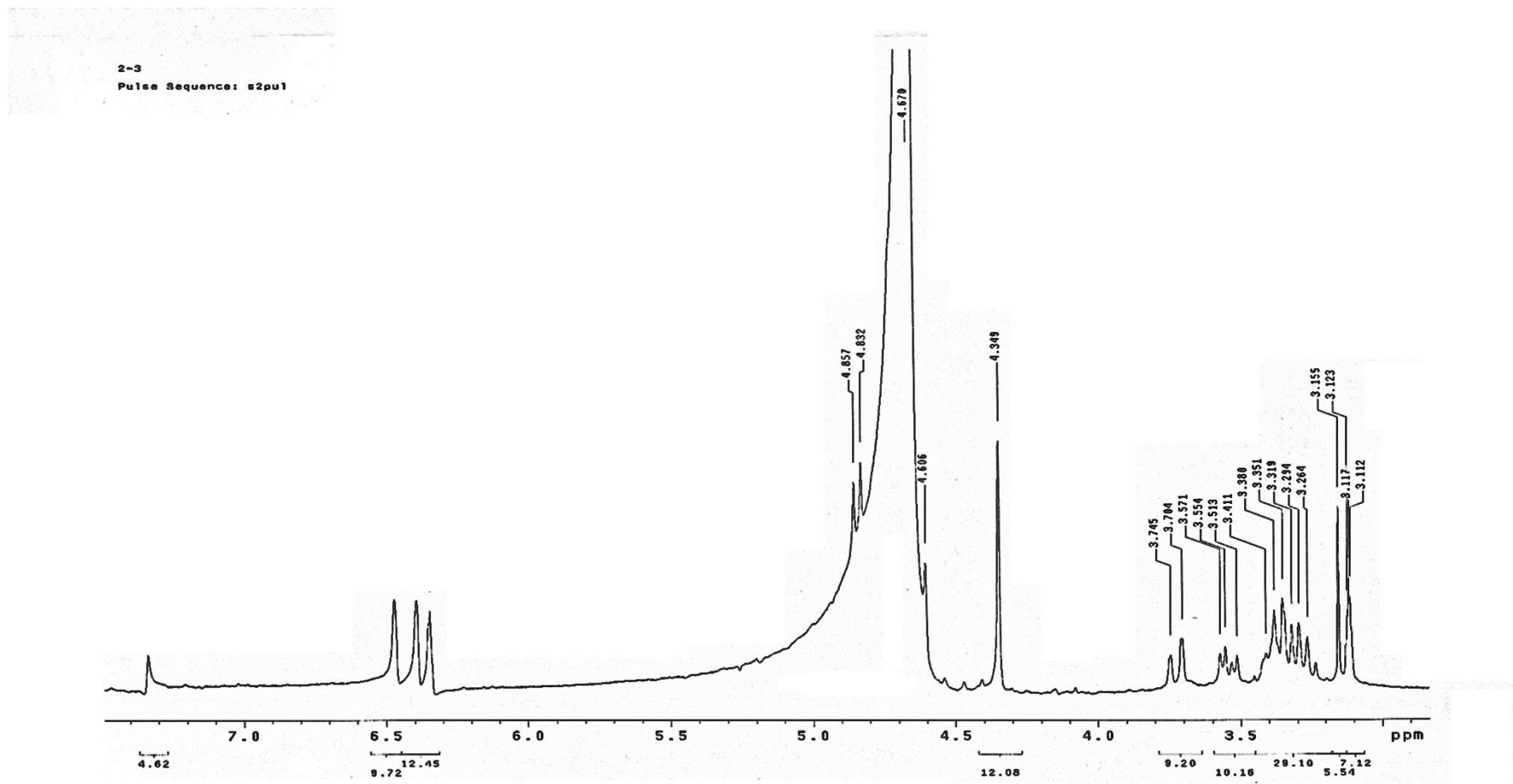


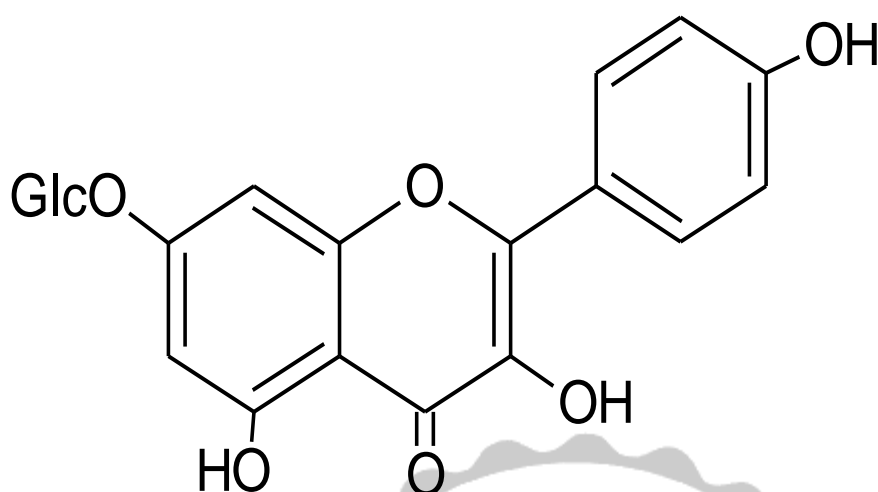
圖 5-31、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物純化物質 **2** 之  $^1\text{H}$ -核磁共振光譜圖

Fig. 5-31  $^1\text{H}$ -NMR spectrum for the isolated component **2** from *n*-butanol extract of *Vitis thunbergii* stems.



### 5-7-3 純化物質 3 之結構鑑定

#### Kaempferol 7-O-glucoside



Molecular Weight :  $[m/z]=447 [M+H]^+$

純化物質 3 與純化物質 2 結構亦相近，由 UV 光譜推測亦有類黃酮 A 環 280 nm、B 環 374 nm 的特有吸收帶，再比對  $^1\text{H-NMR}$   $\delta$  6.04(2H), 6.68(2H), 6.80(1H), 7.16(1H)，低磁場處  $\delta$  5.19, 3.12~3.72(glc 基質子波訊)，因此純化物 2 推測為 kaempferol 7-O-glucoside。Jin-feng We *et al.*(2012)的研究指出少了葡萄糖基的 kaempferol 7-O-glucoside 是一種  $\alpha$ -glucosidase 抑制劑( $\text{IC}_{50}=73.69\pm 0.07$ )，比起商業化 acarbose ( $\text{IC}_{50}=1081.27\pm 0.04\mu\text{g/ml}$ )的效果更好。

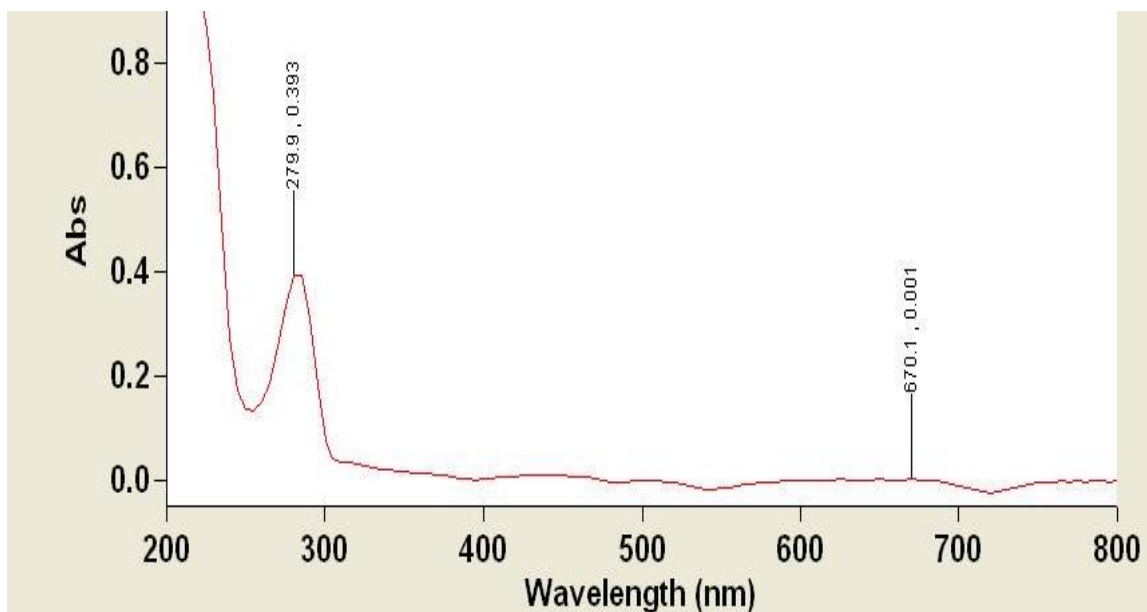


圖 5-32、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物純化物質 **3** 之紫外線—可見光光譜

Fig. 5-32 UV-visible spectrum for the isolated component **3** from *n*-butanol extract of *Vitis thunbergii* stems.



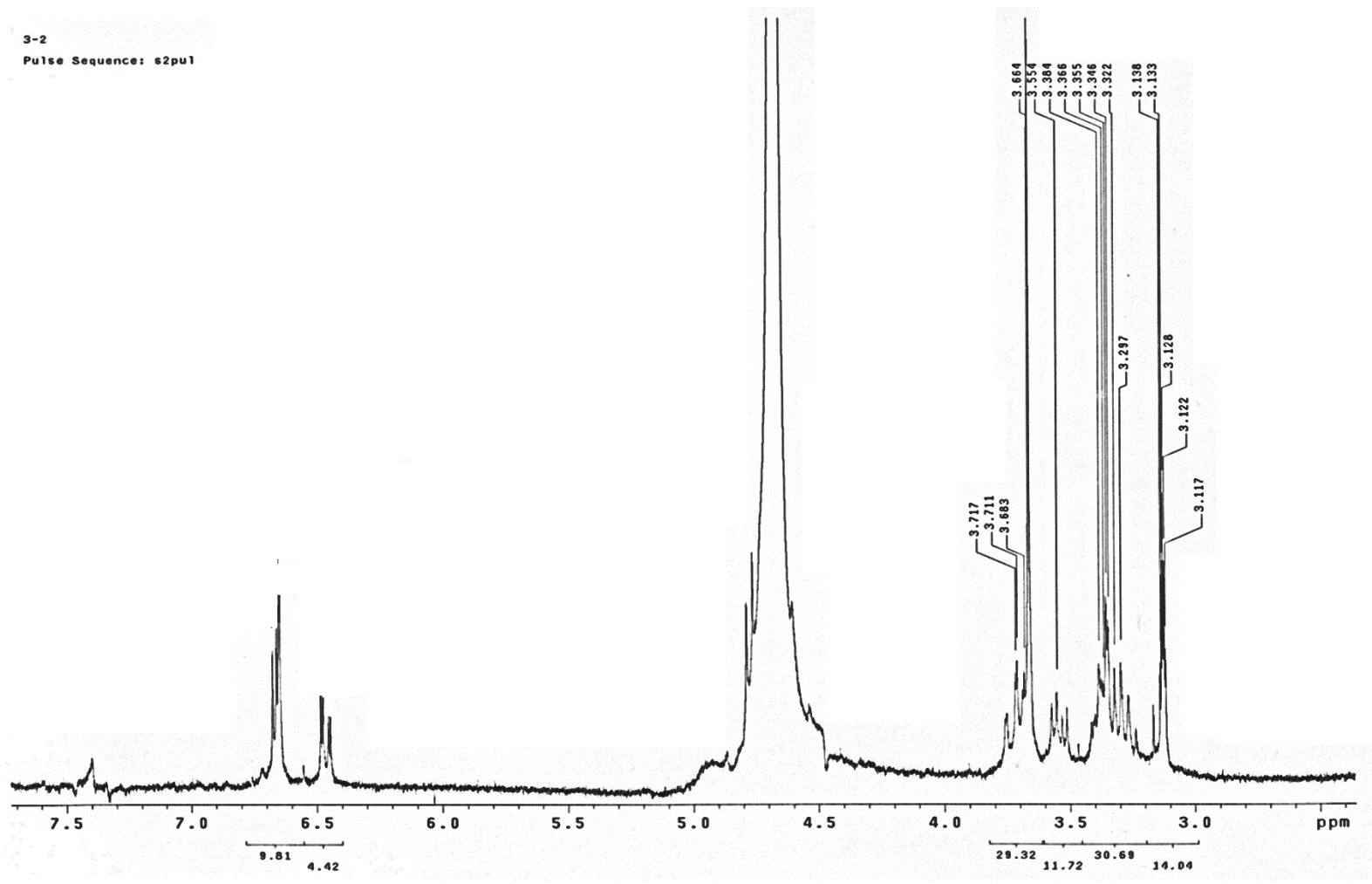
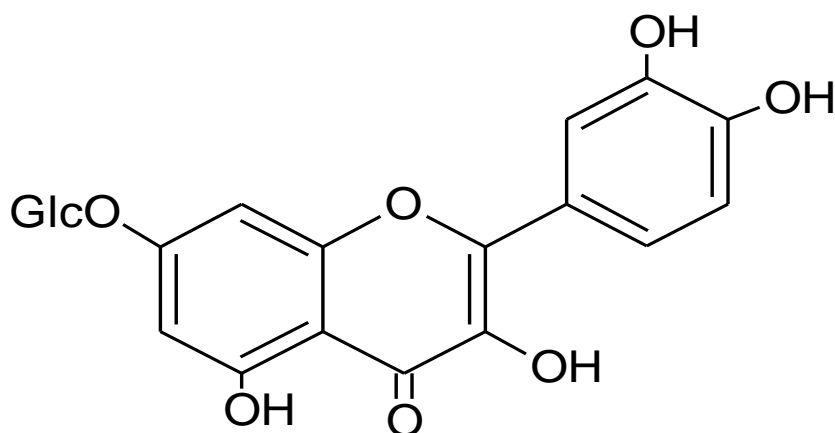


圖 5-33、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物純化物質 **3** 之  $^1\text{H}$ -核磁共振光譜圖

Fig. 5-33  $^1\text{H}$ -NMR spectrum for the isolated component **3** from *n*-butanol extract of *Vitis thunbergii* stems.

#### 5-7-4 純化物質 4 之結構鑑定

##### Quercetin 7-O-glucoside



Molecular Weight :  $[m/z]=463 [M+H]^+$

純化物質 4 與純化物質 2 結構亦極為相近，由 UV 光譜推測亦有類黃酮 A 環 280 nm、B 環 374 nm 的特有吸收帶，再比對  $^1\text{H-NMR}$   $\delta$  6.46(1H, d,  $J=2.0$  Hz), 6.76(1H, d,  $J=2.0$  Hz), 6.88(1H, d,  $J=8.7$  Hz), 7.16(1H, dd,  $J=2.0, 8.5$  Hz), 7.76(1H, d,  $J=2.0$  Hz)，低磁場處  $\delta$  4.89, 3.26~3.75，為鍵結在 C-7-O-位的葡萄糖基質子波訊，與純化物 2 唯一不同的是缺 3.85(OCH<sub>3</sub>)的波訊，因此純化物質 4 結構推測為 quercetin 7-O-glucoside。

Li YQ *et al.*(2009)的研究指出少了葡萄糖基的 quercetin 7-O-glucoside 是一種  $\alpha$ -glucosidase 抑制劑( $\text{IC}_{50}=0.017 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )，比起商業化 acarbose ( $\text{IC}_{50}=0.091 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )的效果更好。

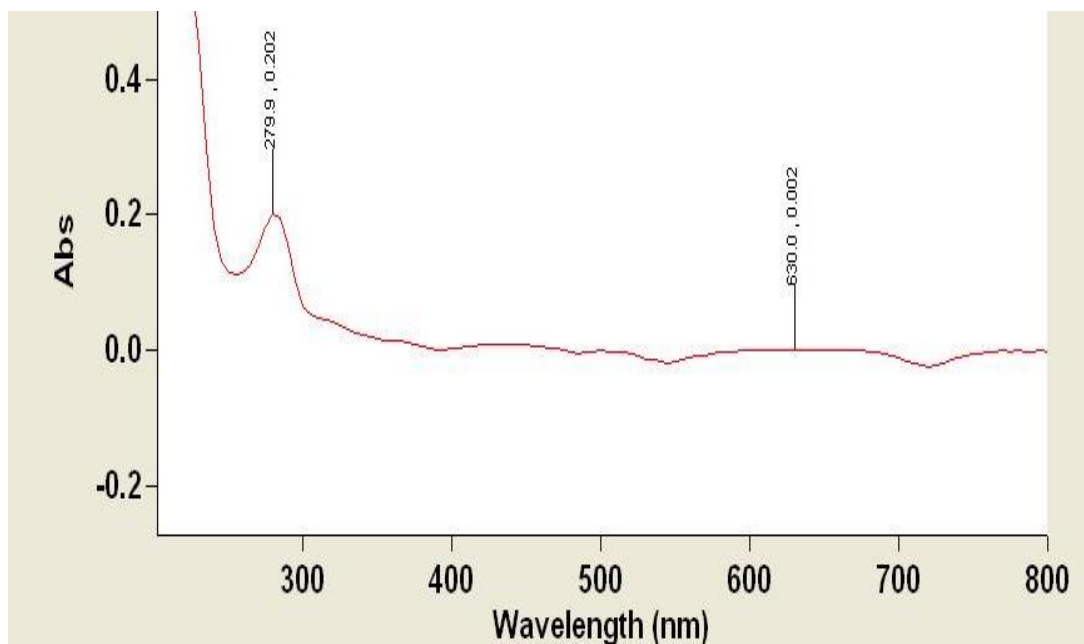
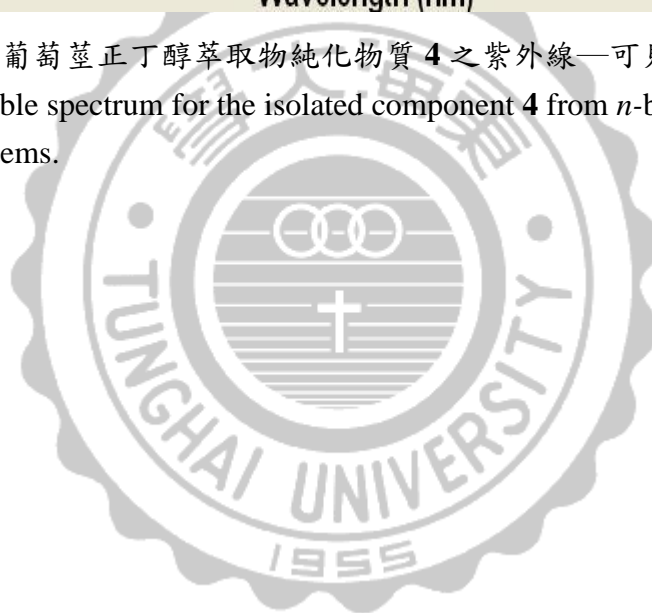


圖 5-34、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物純化物質 4 之紫外線—可見光光譜

Fig. 5-34 UV-visible spectrum for the isolated component 4 from *n*-butanol extract of *Vitis thunbergii* stems.



3-3  
STANDARD 1H OBSERVE  
Pulse Sequence: s2pul

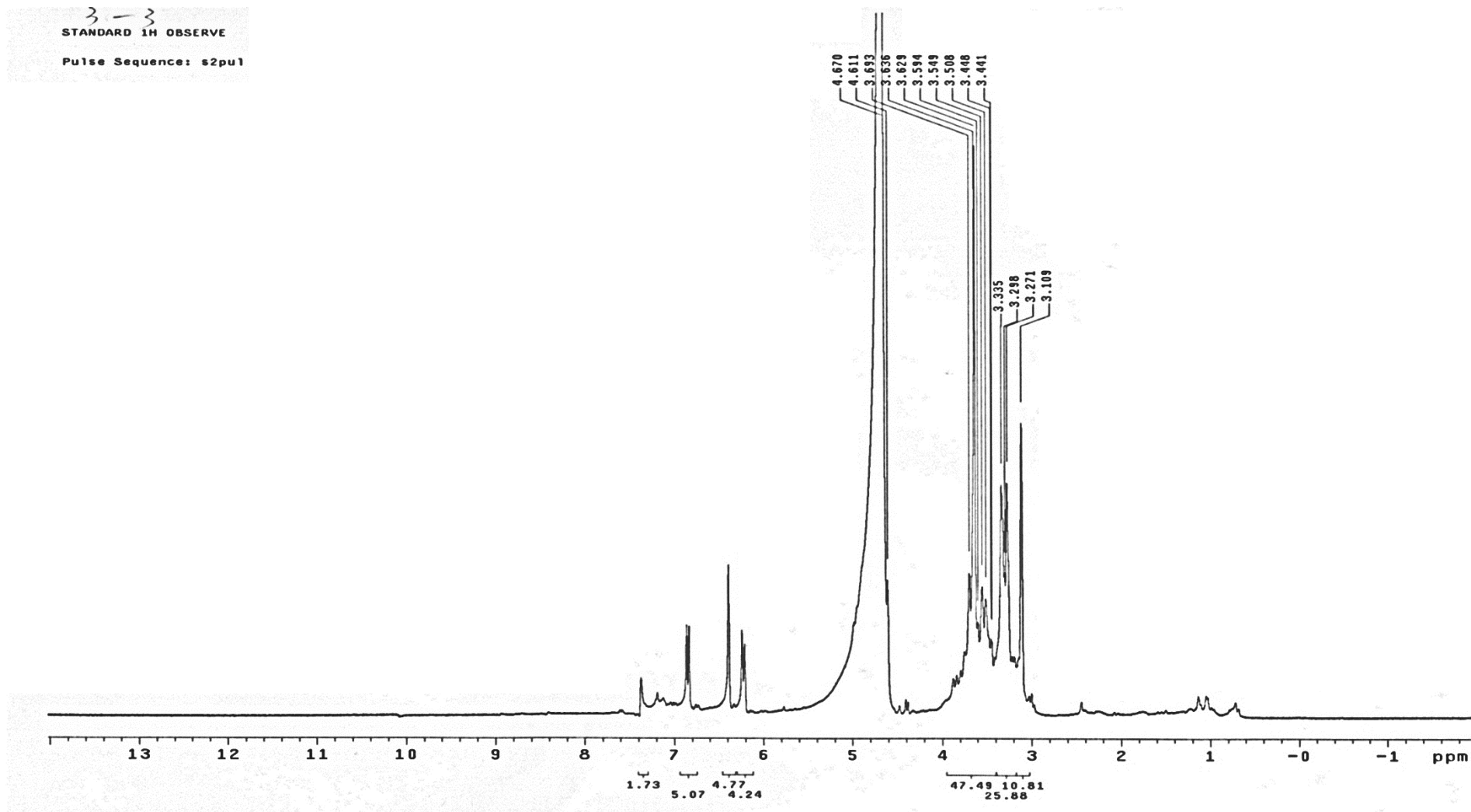


圖 5-35、小葉山葡萄莖正丁醇萃取物純化物質 **4** 之 <sup>1</sup>H-核磁共振光譜圖

Fig. 5-35 <sup>1</sup>H-NMR spectrum for the isolated component **4** from *n*-butanol extract of *Vitis thunbergii* stems.

## 第六章、結論

- 一.本實驗顯示小葉山葡萄莖甲醇萃取物，在經由液液分配萃取後，得到為正己烷、乙酸乙酯、正丁醇及水等四種區分，經抗氧化能力及酵素抑制活性分析後，以正丁醇區分顯示出較佳的活性。
- 二.活性較佳的正丁醇區分依序以 XAD-7 與 Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 液相管柱層析法、分析型及製備型 HPLC 進行分離純化，共獲得量較多的四種純化物質。
- 三.四種純化物質分別利用 MS，UV，<sup>1</sup>H-NMR 及 <sup>13</sup>C-NMR 進行結構鑑定，結構推測為：uridine(1)、isorhamnetin 7-O-glucoside(2)、kaempferol-7-O-glucoside(3)及 quercetin 7-O-glucoside(4)。後三種純化物質皆為類黃酮類物質，且文獻指出具有強抗氧化性的類黃酮對於醣解酵素  $\alpha$ -glucosidase 與  $\alpha$ -amylase 具有良好的抑制效果，可改善糖尿病患者飯後血糖急速上升，本研究亦證實小葉山葡萄莖具抗氧化及調節血糖保健食品的研發潛力。

## 第七章、參考文獻

- 王玉虹。茉莉脂氧合酶抑制劑的特性。高雄海洋科技大學 水產食品科學研究所 碩士論文(2011)。
- 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。甘草中具醣解酵素抑制活性萃取物及純化物質之調節葡萄糖恆定作用。東海大學食品科學研究所 碩士論文。(2011)。
- 中藥大辭典。江蘇新醫學院編。上海科學技術出版社。(2003)。
- 古為榮。咖啡果肉抗氧化及揮發性成份之研究。東海大學 食品科學系 碩士論文。(2006)。
- 古源翎。常用中草藥圖說精彙,財團法人醫藥工業技術發展中心, 第二冊, 133-134。(2006)。
- 本田正志。糖尿病診斷療法。初版三刷。信宏出版社。(2004)。
- 甘偉松。台灣藥用植物誌。國立中國醫藥研究所。 p497-498。(1980)。
- 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)。
- 巫熒。綠藻水解物對  $\alpha$ -葡萄糖苷酶與  $\alpha$ -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)。
- 李旻。綠藻中  $\alpha$ -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)。
- 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)。
- 吳崇榮。糖尿病慢性併發症的致病機轉和未來展望。台灣醫界 47(6): 13-18。(2004)。
- 林宏達。認識糖尿病。台灣糖尿病協會。(2003)。
- 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)。
- 林俊清：傳統方劑與生藥之抗氧化活性資源開發研究。高雄醫學大學碩士論文。(2000)。



- 侯淑真。數種台灣產民間藥在脛骨骨髓細胞培養系中對成熟蝕骨細胞之影響及細胞激素在其中所扮演的角色。嘉南藥理科技大學 碩士論文，(2003)。
- 洪欣怡。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。東海大學食品科學研究所 碩士論文。(2012)。
- 胡智伯。2002。口服降血糖製劑與天然調節血糖物質。食品工業。34(6): 19-37。
- 陳泓云、蔡維仁、楊行義。小本山葡萄萃取之 resveratrol 聚合物在兔子血小板的作用機轉。國立陽明大學碩士論文。(2001)。
- 郭柏村。高良薑乙酸乙酯萃取物之抗氧化成分及調節血糖作用。東海大學食品科學研究所 碩士論文。(2010)。
- 菅野光男。苦瓜降低血糖值 初版。林鬱文化事業有限公司。(2001)。
- 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)。
- 邱年永。原色台灣藥用植物圖鑑, 台北南天書局。(1998)。
- 張智軒。探討細本山葡萄降血脂及抗氧化之分子機轉。中國醫藥大學生物科技學系 碩士論文。(2008)。
- 蔡靖彥。常用藥品手冊，杏輝藥品。(2000)。
- Abuja, P. M. and Albertini, R. 2001. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin. Chim. Acta.* 306: 1-17.
- Ali, H., Houghton and P. J., Soumyanath, A. 2006.  $\alpha$ -Amylase inhibitory activity of some malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *Journal of Ethnopharmacology* 107: 449-455.
- American Diabetes Association (ADA). 2011. Standard of medical care in diabetes. 2011. *Diabetes Care*, Supplement 1, 34: S11-S61
- An, N., Zou, Z.-M., Tian, Z., Luo X.-Z., Yang, S.-L., Xu and L.-Z. 2008  
Diarylheptanoids from the rhizomes of *Alpinia officinarum* and their anticancer activity. *Fitoterapia* 79: 27-31.
- An, N., Zhang, H.-W., Xu, L.-Z., Yang, S.-L., Zou and Z.-M. 2010. New diarylheptanoids from the rhizome of *Alpinia officinarum* hance. *Food Chemistry* 119: 513-517.

- Anguelova, T. and Warthsen, J. 2000. Degradation of lycopene,  $\alpha$ -carotene, and  $\beta$ -carotene during lipid peroxidation. *J. Food Sci.* 65: 71-75.
- Aquino, A., Jorge, J., Terenzi, H. and Polizeli, M. 2003. Studies on a thermostable  $\alpha$ -amylase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61:323-328.
- Arnao, M. B., Cano. A., Hernández-Ruiz, J., Carcía-Cánovas, F. and Acosta, M. 1996 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.
- Aruoma, O. I. 1994. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food and Chemical Toxicology* 32: 671-683.
- Baron, A.D. 1998. Postprandial hyperglycaemia and  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *Diabetes Research and Clinical Practice* 40 Suppl: S51-S55.
- Barry, H. and John, M. C. 1999. Free radicals in biology and medicine. Oxford Scienc.
- Bate, S. and Swain, E. C. 1962. Comparative biochemistry, Vol. 3, Mason, H. S. and Florkin, M., Eds., Academic Press, New York. 764.
- Baynes, J. W. and Thorpe, S. R. 1999. Role of oxidative stress in diabetic complication: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 48: 1-9.
- Becroft, D. M. O., Philips, L. I. and Simmonds, A. (1969) *Pediatr.Pharmacol. Ther.* 75, 885-891
- Bergonzi, M. C., Bilia, A. R., Bari, L. D., Mazzi, G. and Vincieri, F. F. 2007. Studies on the interactions between some flavonols and cyclodextrins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 17: 5744-5748.
- Bessesen, D. H. 2001. The role of carbohydrates in insulin resistance. *J. Nutr.* 131: 2782S-2786S
- Beyer, R. E. 1994 The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: interaction with vitamin E and coenzyme Q. *J. Bioenerg. Biomembr.* 26(4):349-58.
- Bonavita, V., Piccoli, F., Savettieri, G. and Zito, M. (1975) *Acta Neurol.* 30, 30-34

- Bros, W., Heller, W., Michel, C. and Saran, M. 1990. Flavonoids as antioxidants : Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* 186: 343-355.
- Brownlee, M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complication. *Nature* 414: 813-820
- Burton, G. W. 1994. Vitamin E: molecular and biological function. *Pro. Nutr. Soc.* 53: 251-262.
- Buse, M. G. 2006. Hexosamines, insulin resistance, and complications of diabetes: current status. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 290: E1-E8
- Ceriello, A. 1998. The emerging role of post-prandial hyperglycaemic spikes in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetic Medicine* 15: 188–193.
- Ceriello, A. 2003. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a “causal” antioxidant therapy. *Diabetes Care* 26: 1589-1596.
- Chauhan, J. S., Srivastava, S. K. and Srivastava, S. D. 1979. Two glycoflavanones from the roots of *Cleome viscosa*. *Ind. J. Chem.* 17(b): 300-302.
- Cheng, A. Y. Y. and Fantus, I. G. 2005. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Cmaj.* 172: 213-226.
- Cheng, H. L., Huang, H. K., Chang, C. I., Tsai, C. P. and Chou, C. H. 2008. A cell-based screening identifies compounds from the stem of *Momordica charantia* that overcome insulin resistance and activate AMP-activated protein Kinase. *J. Agric. Food Chem.* 56: 6835-6843
- Cholbi, M.R., Paya, M. and Alcaraz, M.J. 1991. Inhibitory effects of phenolic compounds on CCl<sub>4</sub>-induced microsomal lipid peroxidation. *Experientia* 47: 195– 199.
- Cook, N. C. and Samman, S. 1996. Flavonoids: Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.* 7: 66-76.
- Crawford, J. M. and Cotran, R. S. 1999. The pancreas. Cortran, R. S., Kumar, V., and Collins, T. (ed), Pathologic basis of disease. 6<sup>th</sup>. Ch 20.
- Dandona, P., Thusu, K., Cook, S., Snyder, B., Makowski, J. and Armstrong, D., Nicotera, T. 1996. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet* 347:

444-445.

- Darnell, J., Lodish, H. and Baltimore, D. 1990. Cell-to-cell signaling: Hormones and receptors. In *Molecular cell biology*, Ch. 19. Scientific American Books, Inc. New York.
- Duman, B. S., Turkoglu, C., Gunay, D., Cagatay, P. and Demiroglu, C., Buyukdevrim, A. 2003. The interrelationship between insulin secretion and action in type 2 diabetes mellitus with different degrees of obesity: evidence supporting central obesity. *Diabetes Nutr. Metab.* 16: 243-250.
- Facundo, V. A. and Morais, S. M. 2003. Constituents of *Piper aleyreanum* (Piperaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 31: 111-113.
- Fan, G.-J., Kang, Y.-H., Han, Y. N. and Han, B. H. 2007. Platelet-activating factor (PAF) receptor binding antagonists from *Alpinia officinarum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 17: 6720–6722
- Fang, Y. Z. 2002. Free radicals and nutrition. In: Fang, Y. Z. and Zheng, R. L., (Ed.). *Theory and application of free radical biology*. Beijing: Scientific Press: 647.
- Ferraro, G. E., Norbedo, C. and Coussio, J. D. 1981 Polyphenols from *Achyrocline satureioides*. *Phytochemistry*. 20(8): 2053-2054.
- Frandsen, T.P. and Svensson, B. 1998. Plant  $\alpha$ -glucosidases of the glycoside hydrolase family 31. Molecular properties, substrate specificity, reaction mechanism, and comparison with family members of different origin. *Plant Molecular Biology* 37: 1–13.
- Fred-Jaiyesimi, A., Kio, A. and Richard, W. 2009.  $\alpha$ -Amylase inhibitory effect of 3 $\beta$ -olean-12-en-3-yl (9Z)-hexadec-9-enoate isolated from *Spondias mombin* leaf. *Food Chemistry* 116: 285–288.
- Fridovich, I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutase. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 97-112.
- Fujisawa, T., Ikegami, H., Inoue, K., Kawabata, Y. and Ogihara, T. 2005. Effect of two  $\alpha$ -glucosidase inhibitors, voglibose and acarbose, on postprandial hyperglycemia correlates with subjective abdominal symptoms. *Metabolism- Clinical and Experimental* 54: 387-390.

- Gallai, V., Mazzotta, G., Montesi, S., Sarchielli, P. and Del Gatto, F.(1992) *Acta Neurol. Scand.* 86, 3-7
- Gao, M., Zhang, W.-C., Liu, Q.-S., Hu, J.-J., Liu, G.-T. and Du, G.-H. 2008. Pinocembrin prevents glutamate-induced apoptosis in SH-SY5Y neuronal cells via decrease of *bax/bcl-2* ratio. *European Journal of Pharmacology* 591: 73–79.
- George B., Dionissios P. and Anastassios T. 2002. Configuration and conformation of a novel uridine analogue:  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of (5'S)-1-[2'-(2-hydroxyethyl)tetrahydropyran-5'-yl]-1H-pyrimidine-2,4-dione. *Magnetic Resonance in Chemistry*. Volume 40, Issue 3, pages 244–246, March
- Green, K., Brend, M. D., Murphy, M. P. 2004. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes* 53: S110-S118.
- Halliwell, B. 1994. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence?. *Lancet* 344: 721-723.
- Halliwell, B., Murcia, M. A., Chirico, S. and Aruoma, O. I. 1995. Free radicals and antioxidants in food and *in vivo*: what they do and how they work. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35: 7-20.
- Harbone, J. B. 1994. The flavonoids: advances in research since 1986. Chapman & Hall, London, UK.
- Heo, M.Y., Lee, J.H., Sohn, S.J. and Au, W.W. 1996. Anticlastogenic effects of galangin against mitomycin C-induced micronuclei in reticulocytes of mice. *Mutation Research* 360: 37– 41.
- Horn, R. C. and Vargas, V. M. 2003. Antimutagenic activity of extracts of natural substances in the Salmonella/microsome assay. *Mutagenesis* 18: 113-118.
- Hotamisligil, G. S. 2006 Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444:860-867.
- Hsueh, W. A. and Law, R. E. 2003. PPAR $\gamma$  and atherosclerosis: effects on cell growth and movement. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21: 1891-1895.
- Huang, D. W., Shen, S. C. and Wu J. S. B. 2009. Effect of caffeic acid and cinnamic acid on glucose uptake in insulin-resistant mouse hepatocytes. *J. Agric. Food Chem.* 57: 7687-7692.
- Huang, M. T., Chang, R. L., Wood, A. W., Newmark, H. L., Sayer, J. M., Yagi, H.,

- Jerina, D. M., Conney, A. H. 1985. 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.
- Imamura, Y., Migita, T., Uriu, Y., Otagiri, M. and Okawara, T. 2000. Inhibitory effects of flavonoids on rabbit heart carbonyl reductase. *Journal of Biochemistry* 127: 653–658.
- Imanaga, Y., Sakata, N. and Takebayashi, S. 2000. *In vivo* and *in vitro* evidence for the glycoxidation of low density lipoprotein in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 150: 343-355.
- Inoguchi, T., Li, P., Umeda, F., Yu, H. Y., Kakimoto, M., Imamura, M., Aoki, T., Etoh, T., Hashimoto, T., Naruse, M., Sano, H., Utsumi, H. and Nawata, H. 2000. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 49: 1939-1945
- Isomaa, B. 2003. A major health hazard: the metabolic syndrome. *Life Sci.* 73: 2395-2411.
- Itokawa, H., Morita, M. and Mihashi, S. 1981. Two new diarylheptanoids from *Alpinia officinarum* Hance. *Chem. Pharm. Bull.* 29(8): 2383-2385.
- Jacob, R. A. 1994. Nutrition, health and antioxidants. *Inform* 11: 1271-1275.
- Jacob, R. A. and Burri, B. J. 1996. Oxidative damage and defense. *American Journal of Clinical Nutrition.* 63: 985S–990S.
- Jezek P. and Hlavata L. 2005. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol* 37:2478-2503.
- Jin-feng Wei, Yi-bing Zhang and Wen-yi Kang. 2012. Antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory compounds in *Lysimachia clethroides*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* Vol. 6(46), pp. 3230-3234, 15 December
- Julkunen-Titto, R. 1985. Phenolic constituents in the leaves of Northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics. *J. Agric. Food Chem.* 33: 213-217.
- Kahn, B. B. and Flier, J. S. 2000. Obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106:

473-481.

- Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L. A. 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31: 671-701.
- Kaufman, F. 2002. Stop diabetes in its tracks. *Nurs. Manage. Suppl*: 2-6.
- Korshunov, S. S., Skulachev, V. P. and Starkov A. A. 1997. High protonic potential actuates a mechanism of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Letters* 416: 15-18.
- Koya, D., King, G. L. 1998. Protein kinase C activation and the development of diabetic complication. *Diabetes* 47: 859-866.
- Lawrence, 1961. Microdetermination of glycogen with anthrone reagent. Department of Anatomy, University of Kansas, Received for publication April 21.
- Lee, C. C. and Houghton P. 2005. Cytotoxicity of plants from malaysia and thailand used traditionally to treat cancer. *Journal of Ethnopharmacology* 100: 237-243.
- Lee, J., Kim, K. A., Jeong, S., Lee, S., Park, H. J., Kim, N. J. and Lim, S. 2009. Anti-inflammatory, anti-nociceptive, and anti-psychiatric effects by the rhizomes of *Alpinia officinarum* on complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 126: 258-264.
- Lee, S. E., Hwang, H. J., Ha, J.-S., Jeong, H.-S. and Kim, J. H. 2003. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Life Sciences* 73: 167-179.
- Lenzen, S., Drinkgern, J. and Tiedge, M. 1996. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic. Biol. Med.* 20: 463-466.
- Li YQ., Zhou FC., Gao F., Bian JS. and Shan F. 2009 Comparative evaluation of quercetin, isoquercetin and rutin as inhibitors of alpha-glucosidase. *J Agric Food Chem.* Dec 23;57(24)
- Lillioja, S., Mott, D. M., Spraul, M., Ferraro, R., Foley, J. E., Ravussin, E., Knowler, W. C., Bennett, P. H. and Bogardus, C. 1993. Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin dependent diabetes mellitus: Prospective studies of Pima Indians. *N. Engl. J. Med.* 329: 1988-1992.
- Lodovici, M., Guglielmi, F., Casalini, C., Meoni, M., Cheynier, V. and Dolara, P. 2001.

- Antioxidant and radical scavenging properties *in vitro* of polyphenolic extracts from red wine. *Eur. J. Nutr.* 40: 74-77.
- Lopes, G. K. B., Scschulman, H. M. and Hermes-Lima, M. 1999. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1472: 142-152.
- Ly, T.N., Shimoyamada, M., Kato, K. and Yamauchi, R. 2003. Isolation and characterization of some antioxidative compounds from the rhizomes of smaller galanga (*Alpinia officinarum* Hance). *J. Agric. Food Chem.* 51: 4924-4929.
- Maarten, F. C.M., Petra, L. M., Wilbert, H. M. and Eric, A. P. 1999. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction a review. *European Journal of Obs. Gynecol. Reprod. Biol.* 82: 171-184.
- Marshall, S., Bacote, V. and Traxinger, R. R. 1991. Complete inhibition of glucose-induced desensitization of the glucose transport system by inhibitors of mRNA synthesis evidence for rapid turnover of glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase. *J. Bio. Chem.* 266: 10115-10161.
- Matsuda, H., Ando, S., Kato, T., Morikawa, T. and Yoshikawa, M. 2006. Inhibitors from the rhizomes of *Alpinia officinarum* on production of nitric oxide in lipopolysaccharide-activated macrophages and the structural requirements of diarylheptanoids for the activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 14: 138-142.
- Matsuda, H., Nakashima, S., Oda, Y., Nakashima, S. and Yoshikawa, M. 2009. Melanogenesis inhibitors from the rhizomes of *Alpinia officinarum* in B16 melanoma cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 17: 6048-6053.
- Matsui, T., Oki, T. and Osajima, Y. 2007.  $\alpha$ -glucosidase inhibitory profile of catechins and theaflavins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 99-105.
- Maxwell, L., Gavin, J. 1992. Anti-oxidant therapy improves microvascular ultrastructure and perfusion in postischemic myocardium. *Microvasc. Res.* 43: 255-266.
- McCue, P. and Shetty, K. 2004. Inhibitory effects of rosmarinic acid extracts on porcine pancreatic amylase *in vitro*. *Asia Pacific of Clinical Nutrition* 13:



- 101-106.
- Meyer, A. S. and Isaksen, A. 1995. Application of enzymes as food antioxidants. *Trends in Food Sci. and Tech.* 6: 300-304.
- Milic, B. L., Djilas, S. M. and Canadanovic-Brunet, J. M. 1998. Antioxidative activity of phenolic compounds on the metal-ion breakdown of lipid peroxidation system. *Food Chem.* 61: 443-447.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C. A., Davies, M. J., Gopinathan, V. and Milner, A. 1993. 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.
- Monauni, T., Zenti, M. G., Cretti, A., Daniels, M. C., Targher, G., Caruso, B., Caputo, M., McClain, D., Del Prato, S., Giaccari, A., Muggeo, M., Bonora, E. and Bonadonna, R. C. 2000. Effects of glucosamine infusion on insulin secretion and insulin action in humans. *Diabetes* 49: 929-935.
- Morrissey, P. A. and O'Brien, N.M. 1998. Dietary antioxidants in health and disease. *Int. Dairy J.* 8: 463-472.
- Moskovitz, J., Yim, M. B. and Chock, P. B. 2002. Free radicals and disease. *Arch. Biochem. Biophys.* 397(2): 354-359.
- Mruka, D. D., Silvestrinib, B., Moa, M. Y. and Chenga, C. Y. 2002. Antioxidant superoxide dismutase-a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception.* 67: 305-311.
- Niki, E., 1992. Active oxygens and free radicals in biology. *Yukagaku* 41(9): 768-773.
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X. L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M. A., Beebe, D., Oates, P. J., Hammes, H. P., Giardion, I., Brownlee, M. 2000. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404: 787-790.
- Nordlie, R.C. and Fostem, J.D. 1999. Regulation of glucose production by the liver. *Annurev. Nutr.* 19: 379-406.
- Parenti, F. (1992) *Clin. Neuropharmacol.* 15, 369-372
- Pepeljnjak, S., Jalsenjaj, I. and Maysinger, D. 1985. Flavonoid content in propolis

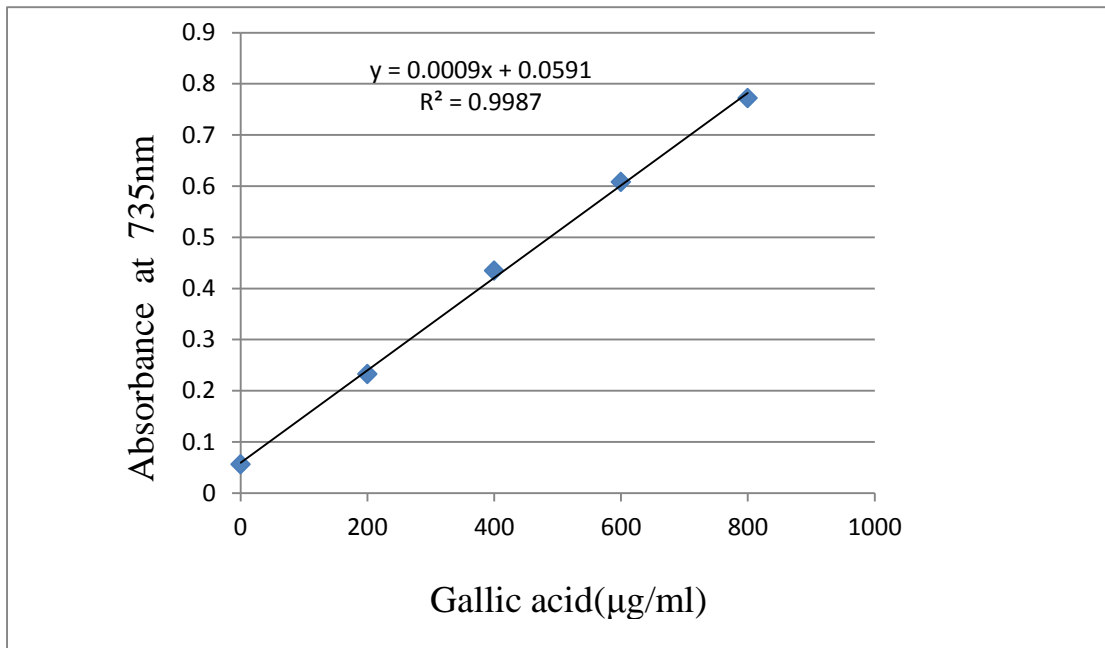
- extracts and growth inhibition of *Bacillus subtilis*. *Pharmazie* 40: 122–123.
- Poitout, V. and Robertson, R. P. 2002. Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes-a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology* 143: 339-342.
- Prentki, M. and Nolan, C. J. 2006. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.* 116: 1802-1812.
- Rahimi, R., Nikfar, S., Larijani, B., and Abdollahi, M. 2005. A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomed. Pharmacother.* 59: 365-373.
- Reaven, G. M., Chen, Y. D., Hollenbeck, C. B., Sheu, W. H., Ostrega, D. and Polonsky, K. S. 1993. Plasma insulin C-peptide, and proinsulin glucose tolerance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76: 44-48.
- Reddy, V. P., and Beyaz, A. 2006. Inhibitor of the maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. *Drug Discov. Today* 11: 646-654
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. and Paganga, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20: 933-956.
- Rikans, L. E. and Hornbrook, K. R. 1997. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim. Biophys. Acta.* 1362: 116-127.
- Sala, A., Recio, M.C., Schinella, G.R., Manez, S., Giner, R.M., Cerda-Nicolas, M. and Rosi, J.L. 2003. Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. *Eur. J. Pharmacol.* 461: 53–61.
- Santos, A. C., Uyemura, S. A., Lopes, J. L., Bazon, J. N., Mingatto, F. E. and Curti, C. 1998. Effect of naturally occurring flavonoids on lipid peroxidation and membrane permeability transition in mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* 24: 1455–1461.
- Scalbert, A. and Williamson, G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130: 2073-2085.

- Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S. and Valle, D., eds (1995) in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Vol. II) (7th edn.), McGraw-Hill
- Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofzinger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D. and Boyd, M. 1988. Evaluation of soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research* 48:4827-4833.
- Sen, C. K. 1997. Nutritional biochemistry of cellular glutathione. *Nutrl. Biochem.* 8: 660-672.
- Sheldon, R., Pinnell, M. D., Durham, N. C. 2003. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *J. Am. Acad. Dermatol.* 48: 1-19.
- Shigenaga, M. K., Gimeno, C. J. and Ames, B. N. 1989. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of *in vivo* oxidative DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 86: 9697-9701.
- Shih, H., Pickwell, G.V. and Quttrochi, L.C. 2000. Differential effects of flavonoid compounds on tumor promoter-induced activation of the human CYP1A1 enhancer. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 373: 287–294.
- Shim, Y.-J., Doo, H.-K., Ahn, S.-Y., Kim, Y.-S., Seong, J.-K., Park, I.-S. and Min, B.-H. 2003. 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.
- Shin, J.-E., Han, M.J. and Kim, D.-H., 2003. 3-Methylethergalangin isolated from *Alpinia officinarum* inhibits pancreatic lipase. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 26: 854–857.
- Peng, S. C., Cheng, C. Y., Sheu, F. and Su, C. H. The antimicrobial activity of heyneanol A extracted from the root of taiwanese wild grape. *Journal of Applied Microbiology* 2008, 105, 485-491.
- Shobana, S., Sreerama, Y. N. and Malleshi, N. G. 2009. Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet (*Eleusine coracana* L.) seed coat phenolics: Mode of inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic amylase. *Food Chemistry* 115: 1268–1273.

- Shoelson, S. E., Lee, J. and Goldfine, A. B. 2006. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 116:1793-1801.
- Singh, R., Barden, A., Mori, T. and Beilin, L. 2001. Advanced glycation end-products: A review. *Diabetologia* 44: 129-146.
- Sonia E. R., Martin G. A., Robert B., Edelmira L., Andrés N., and Rachel M..  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors from *Brickellia cavanillesii*. *J. Nat. Prod.*, 2012, 75 (5), pp 968–974
- Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K. and Matsuoka, T. 2006. Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase by flavonoids. *J Nutr Sci Vitaminol* 52: 149–153.
- Tiedge, M., Lortz, S., Drinkgern, J. and Lenzen, S. 1997. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cell. *Diabetes* 46: 1733-1742.
- Topinka, J., Bincova, B., Sram, R. J. and Erin, A. N. 1989. The influence of  $\alpha$ -tocopherol and pyritinol on oxidative DNA damage and lipid peroxidation in human lymphocytes. *Mutat Res.* 255: 131.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. and Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:44-84.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160: 1-40.
- Vaseekaran, S., Balakumar. S. and Arasaratnam, V. 2010. Isolation and identification of a bacterial strain producing thermostable  $\alpha$ - amylase. *Tropical Agricultural Research* 22(1): 1-11.
- Vessby, J., Basu, S., Mohsen, R., Berne, C. and Vessby, B. 2002. Oxidative stress and antioxidant status in type 1 diabetes mellitus. *J. Intern. Med.* 251: 69-76.
- Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R. and King, H. 2004. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27: 1047-1035.

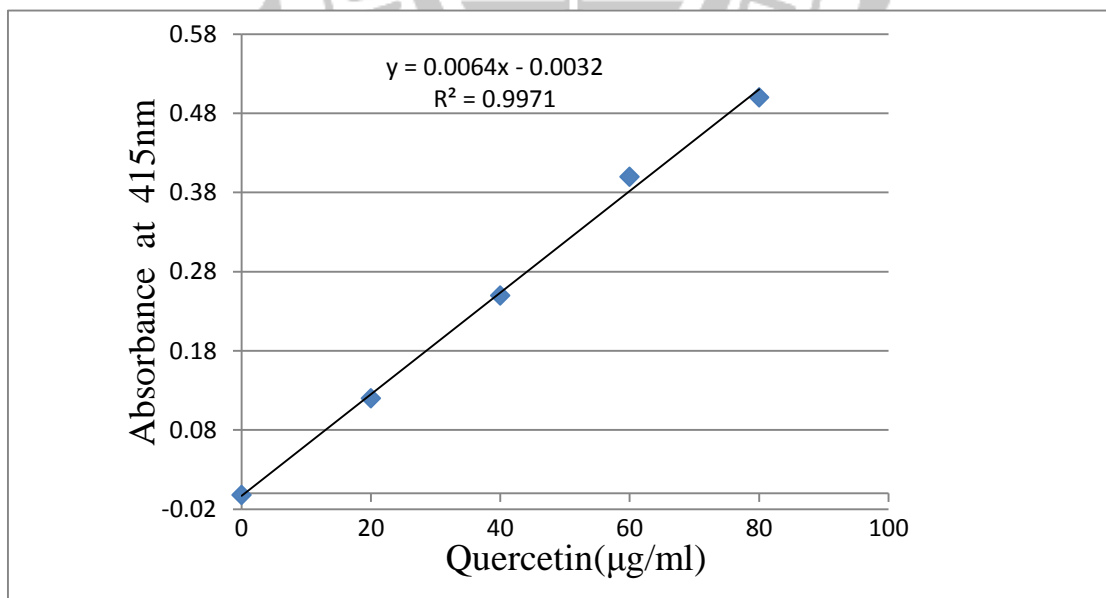
- Wu, G., Fang, Y. Z., Yang, S., Lupton, J. R. and Turner, N. D. 2003. Glutathione metabolism and its implications for health. *Nutr. Sci.* 18: 489-492.
- Yamagishi, S. and Imaizumi, T. 2005. Diabetic vascular complications: pathophysiology, biochemical basis and potential therapeutic strategy. *Curr. Pharm. Des.* 11: 2279-2299
- Yee, HS. and Fong, NT. 1996. A preview of the safety and efficacy of acarbose in diabetes mellitus. *Pharmacotherapy* 16: 792-805.
- Yokozawa, T., Cho, E. J., Hara, Y. and Kitaani, K. 2000. Antioxidative activity of green tea treat with radical initiator 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride. *J. Agric. Food Chem.* 48: 5068-5073.
- Yoshioka, K., Takahashi, H., Homma, T., Saito, M., Oh, K. B., Nemoto, Y. and Matsuoka, H. 1996. A novel fluorescent derivative of glucose applicable to the assessment of glucose uptake activity of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1289: 5-9.
- Zierath, J. R. and Kawano Y. 2003. The effect of hyperglycaemia on glucose disposal and insulin signal transduction in skeletal muscle. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 17: 385-398.
- Zimmet, P., Alberti, K. G. and Shaw, J. 2001. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414: 782-787.
- Zou, C., Wang, Y. and Shen, Z. 2005. 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement. *J. Biochem. Biophys. Methods* 64: 207-215.

## 第八章、附錄



附錄一、沒食子酸之標準曲線。

Appendix 1 Standard curve of gallic acid.



附錄二、槲皮酮之標準曲線。

Appendix 2 Standard curve of quercetin.