

東海大學食品科學研究所

Graduate Institute of Food Science

Tunghai University

食品科技組

Food Technology Section

碩士論文

Master Thesis

指導教授 (Advisor)

蘇正德教授 (Jeng-De Su, Professor)

玄參溶劑區分物之抗氧化及醣解酵素抑制活性及其正己烷區分物之

油脂含量、組成對  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性抑制作用之影響

**Antioxidative and glycosidase inhibitory activities of solvent fractions**

**from *Scrophularia ningpoensis* roots and effect of fat contents and**

**composition from *n*-hexane fractions on  $\alpha$ -glucosidase**

**inhibitory activity**

研究生: 陳昱翔 撰

Graduate Student : Yu-Hsiang Chen

中華民國一百零三年十一月

November, 2014

碩士論文指導教授推薦

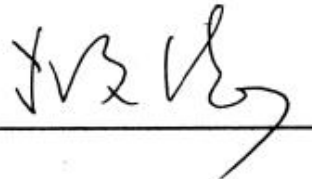
食品科學系碩士班科技組 陳昱翔 君 所提之論文

玄參溶劑區分物之抗氧化及醣解酵素抑制活性及其正己烷  
區分物之油脂含量、組成對  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性抑制作用之影  
響

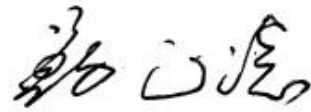
係由本人指導撰述，同意提之審查

以致

食品科學所所長



指導教授：



民國 103 年 11 月 3 日

## 東海大學碩士論文考試委員審定書

食品科學系碩士班食品科技組 陳昱翔 君所提之論文：  
玄參溶劑區分物之抗氧化及醣解酵素抑制活性及其正己烷區分物之  
油脂含量、組成對 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性抑制作用之影響 之研究  
經本委員會審定通過，特此證明。

論文考試委員會

委員：

蔡正宗

研發長 珍果生技股份有限公司

廖錦祺

副教授 東海大學食品科學系

指導教授：蔡正宗

中華民國一百零三年十一月三日

## 謝誌

兩年多的研究生生涯在此即將劃下句點，心中感到萬分的喜悅，終於能朝人生的下一個階段邁進，在研修碩士學位的這段期間經歷了不少波瀾，但正因有這些的考驗才能使我真正的成長茁壯，心中特別感謝恩師 蘇正德老師於實驗、論文及生活上不厭其煩的指導與照顧，與您相處的時光學生畢生難忘，僅以卷首致上最大的謝意。

文稿初成，承蒙 蔡正宗老師與盧錫祺老師，對學生論文詳加審閱並斧正缺失，使論文更趨完整。感謝系上所有師長與助教於專業領域上的知識傳授，在此致上衷心之謝意。

在學期間，感謝學長姐欣怡、建宏、昭伶於實驗技術方面的指導於協助。感謝好友瀚文、明興、文華、貫中、彥碩、宥勝、郁晨、健峰、暉婷、盈吟、威志的陪伴，一起分享生活上的喜怒哀樂，陪我渡過實驗不如意的低潮期，讓我的研究所生涯充滿了許多特別又難忘的回憶。感謝學弟妹筑盈小公主、秉叡、有容、庭瑋小帥哥、柏璋、閔鴻、柏漢在平常實驗空檔時陪我聊天玩樂、打球紓解心情上的煩悶及口試當天的幫忙。特別感謝夥伴皓儀在實驗上的協助，當我實驗遇到瓶頸時，不留私心的教導我，讓我能夠順利的完成。對你們心中只有萬分的感謝與祝福，希望你們也能盡快朝自己的夢想前進。

最後我要感謝我的爸爸、媽媽、弟妹及女友宜萱給予的支持、關心與鼓勵，讓我無後顧之憂的完成學業。我愛你們，沒有你們就沒有今天的我。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。

陳昱翔 謹致於

東海大學食品科學研究所  
食品化學暨食品分析實驗室  
中華民國一百零三年十一月

# 目錄

目錄	I
圖目錄	IV
表目錄	VII
附目錄	VIII
中文摘要	IX
英文摘要	XI
壹、前言	1
貳、文獻回顧	2
一、玄參	2
(1)玄參之介紹	2
(2)玄參之傳統功效	3
(3)玄參之生理活性	3
二、自由基與活性氧	5
(1)自由基與活性氧之種類	5
(2)自由基與活性氧之主要來源	6
(3)自由基與活性氧之危害	7
三、脂質氧化作用	8
四、抗氧化作用	11
1. 抗氧化劑和作用機制	11
2. 體內酵素性抗氧化作用	13
3. 非酵素性抗氧化作用	16
五、自由基與糖尿病之關聯	24
六、糖尿病	25
1. 糖尿病主要類型	26
2. 糖尿病所引起之併發症	28
3. 糖尿病之治療	30
七、胰島素	32
1. 胰島素作用	32
2. 胰島素作用於細胞	33
3. 胰島素細胞層面之傳訊	33
4. 胰島素阻抗性	34
八、高血糖與醣解酵素	35
(1) $\alpha$ -澱粉酶 ( $\alpha$ -amylase)	35
(2) $\alpha$ -葡萄糖苷酶 ( $\alpha$ -glycosidase)	35
九、醣解酵素抑制劑之作用	36
參、研究目的與實驗流程	37
一、研究目的	37
二、實驗流程	38

肆、材料與方法-----	41
一、實驗材料-----	41
二、實驗試劑與溶劑-----	41
(1) 醣解酵素抑制試驗之試藥-----	41
(2) 抗氧化試驗之試藥-----	42
(3) 純化成分層析及光譜分析之溶劑-----	42
三、實驗儀器設備-----	43
四、實驗方法-----	44
1. 樣品萃取-----	44
2. 水分含量測定-----	45
3. 總酚含量測定 ( Total phenolic compound determination )-----	45
4. 總類黃酮含量測定 ( Total flavonoid determination )-----	46
5. DPPH 自由基清除能力測定-----	46
6. 總抗氧化能力測定 ( Trolox equivalent antioxidant capacity; TEAC )-----	47
7. $\alpha$ -amylase 抑制作用測定-----	48
8. $\alpha$ -glucosidase 抑制作用測定-----	49
9. 玄參抗氧化及醣解酵素抑制成分之萃取、分離及純化-----	50
10. 玄參正己烷粗脂肪萃取、GC 脂肪酸種類及 HPLC $\alpha$ -生育醇分析-----	56
11. 統計分析-----	57
伍、結果與討論-----	59
一、玄參甲醇萃取物各區分物之產率-----	59
二、玄參各溶劑區分物之總酚含量-----	60
三、玄參各溶劑區分物之總類黃酮含量-----	60
四、玄參各溶劑區分物之 DPPH 自由基清除能力-----	61
五、玄參各溶劑區分物之總抗氧化能力-----	61
六、玄參各溶劑區分物之醣解酵素抑制活性-----	63
七、玄參正己烷區分物抗氧化及醣解酵素抑制活性成分之分離-----	64
1. 玄參正己烷區分物之矽膠液相管柱層析-----	64
2. 玄參正己烷區分物區分 B 之矽膠液相管柱層析-----	68
3. 玄參正己烷區分物區分 I 之 HPLC 分析及製備-----	72
4. 玄參正己烷區分物區分 II 之 HPLC 分析及製備-----	72
5. 玄參正己烷純化物質之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜解析-----	76
八、玄參乙酸乙酯及正丁醇抗氧化及醣解酵素抑制活性成分之分離-----	81
1. 玄參乙酸乙酯區分物之 XAD-7 液相管柱層析-----	81
2. 玄參正丁醇區分物之 XAD-7 液相管柱層析-----	84
3. 玄參乙酸乙酯區分物區分 B 及正丁醇區分物區分 C 混合之 Comosil 75C <sub>18</sub> -OPN 液相管柱層析-----	88
4. 玄參乙酸乙酯及正丁醇混合區分物區分 (a+b) 之 HPLC 分析及製-----	90
5. 玄參乙酸乙酯及正丁醇混合區分物區分 c 之 HPLC 分析及製備-----	91
6. 玄參乙酸乙酯及正丁醇混合區分物區分 (d+e) 之 HPLC 分析及製-----	92
7. 純化物質 (a+b)-2 之光譜分析-----	95

8. 玄參乙酸乙酯及正丁醇混合區分物純化物質之結構鑑定-----	96
九、玄參正己烷之粗脂肪萃取-----	98
十、玄參正己烷萃取物之脂肪酸組成及生育醇含量分析-----	98
十一、玄參正己烷區分物與各種油脂含量之 $\alpha$ -glucosidase 活性抑制比較 -----	99
陸、結論-----	103
柒、參考文獻-----	104
捌、附表-----	114



## 圖目錄

圖 2-1、玄參。-----	2
圖 2-2、脂質自氧化連鎖反應。-----	9
圖 2-3、油脂自氧化的反應階段。-----	10
圖 2-4、不飽和脂肪酸自氧化反應中最初氫过氧化物的形成。-----	10
圖 2-5、自由基清除劑之抗氧化作用機制。-----	11
圖 2-6、細胞內抗氧化酵素之防禦系統。-----	15
圖 2-7、不同型態抗壞血酸與自由基之反應。-----	16
圖 2-8、苯甲酸及肉桂酸衍生物之結構圖。-----	19
圖 2-9、類黃酮之基本結構圖。-----	22
圖 2-10、類黃酮衍生物之化學結構。-----	22
圖 2-11、胰島素之代謝調控。-----	33
圖 2-12、胰島素之傳訊路徑。-----	34
圖 3-1、玄參正己烷區分物抗氧化及醣解酵素抑制活性成分之分離純化實驗流程圖。-----	39
圖 3-2、玄參正己烷區分物之脂質含量、脂肪酸組成及各種油脂對 $\alpha$ -glycosidase 酵素活性影響之實驗流程圖。-----	39
圖 3-3、玄參乙酸乙酯及正丁醇區分物之抗氧化及醣解酵素抑制活性成分之分離純化實驗流程圖。-----	40
圖 4-1、玄參各種溶劑萃取之製備。-----	44
圖 4-2、DPPH 自由基清除作用之反應式。-----	47
圖 4-3、葡萄糖之呈色反應。-----	50
圖 5-1、玄參不同溶劑區分物 (1 mg/mL) 之 DPPH 自由基清除能力。-----	62
圖 5-2、玄參不同溶劑區分物 (1 mg/mL) 之總抗氧化能力以 ABTS 自由基清除率表示。-----	62
圖 5-3、玄參不同溶劑區分物 (1 mg/mL) 對 $\alpha$ -amylase 之抑制率。-----	63
圖 5-4、玄參不同溶劑區分物 (0.1 mg/mL) 對 $\alpha$ -glucosidase 之抑制率。-----	64
圖 5-5、玄參正己烷區分物之矽膠液相管柱層析圖。-----	65
圖 5-6、玄參正己烷區分物經矽膠液相層析後各沖提區分 (1mg/mL) 之 DPPH 自由基清除能力。-----	66
圖 5-7、玄參正己烷區分物經矽膠液相層析後各沖提區分 (1mg/mL) 之總抗氧化力以 ABTS 自由基清除率表示。-----	67
圖 5-8、玄參正己烷區分物經矽膠液相層析後各沖提區分 (1mg/mL) 之 $\alpha$ -amylase 及各沖提區分 (0.1mg/mL) 之 $\alpha$ -glucosidase 之抑制率。-----	68
圖 5-9、玄參正己烷區分物區分 B 之矽膠液相管柱層析圖。-----	69



圖 5-10、玄參正己烷區分物區分 B 經矽膠液相層析後各沖提區分 (1mg/mL) 之 DPPH 自由基清除能力。-----	70
圖 5-11、玄參正己烷區分物區分 B 經矽膠液相層析後各沖提區分 (1mg/mL) 之總抗氧化力以 ABTS 自由基清除率表示。-----	71
圖 5-12、玄參正己烷區分物區分 B 經矽膠液相層析後各沖提區分 (1mg/mL) 之 $\alpha$ -amylase 及各沖提區分 (0.1mg/mL) 之 $\alpha$ -glucosidase 之抑制率。-----	71
圖 5-13、玄參正己烷區分物區分 I 之製備型 HPLC 圖。-----	73
圖 5-14、玄參正己烷區分物區分 I 經 HPLC 層析後各沖提區分 (1mg/mL) 之 $\alpha$ -amylase 及各沖提區分 (0.1mg/mL) 之 $\alpha$ -glucosidase 之抑制率。-----	74
圖 5-15、玄參正己烷區分物區分 II 之製備型 HPLC 圖。-----	75
圖 5-16、玄參正己烷區分物區分 II 經 HPLC 層析後各沖提區分 (1mg/mL) 之 $\alpha$ -amylase 及各沖提區分 (0.1mg/mL) 之 $\alpha$ -glucosidase 之抑制率。-----	76
圖 5-17、玄參正己烷區分物純化物質 I-3 之 $^1\text{H}$ -核磁共振光譜圖。-----	77
圖 5-18、玄參正己烷區分物純化物質 II-1 之 $^1\text{H}$ -核磁共振光譜圖。-----	78
圖 5-19、玄參正己烷區分物純化物質 II-2 之 $^1\text{H}$ -核磁共振光譜圖。-----	79
圖 5-20、玄參正己烷區分物純化物質 II-3 之 $^1\text{H}$ -核磁共振光譜圖。-----	80
圖 5-21、玄參乙酸乙酯區分物之 XAD-7 液相管柱層析圖。-----	82
圖 5-22、玄參乙酸乙酯區分物經 XAD-7 液相層析後各沖提區分 (1mg/mL) 之 DPPH 自由基清除能力。-----	83
圖 5-23、玄參乙酸乙酯區分物經 XAD-7 液相層析後各沖提區分 (1mg/mL) 之總抗氧化力以 ABTS 自由基清除率表示。-----	83
圖 5-24、玄參乙酸乙酯區分物經 XAD-7 液相層析後各沖提區分 (1mg/mL) 之 $\alpha$ -amylase 及各沖提區分 (1mg/mL) 之 $\alpha$ -glucosidase 之抑制率。-----	84
圖 5-25、玄參正丁醇區分物之 XAD-7 液相管柱層析圖。-----	85
圖 5-26、玄參正丁醇區分物經 XAD-7 液相層析後各沖提區分 (1mg/mL) 之 DPPH 自由基清除能力。-----	86
圖 5-27、玄參正丁醇區分物經 XAD-7 液相層析後各沖提區分 (1mg/mL) 之總抗氧化力以 ABTS 自由基清除率表示。-----	87
圖 5-28、玄參正丁醇區分物經 XAD-7 液相層析後各沖提區分 (1mg/mL) 之 $\alpha$ -amylase 及各沖提區分 (1 mg/mL) 之 $\alpha$ -glucosidase 之抑制率。-----	88
圖 5-29、玄參乙酸乙酯及正丁醇區分物區分 (B+C) 之 Cosmosil 75 C <sub>18</sub> -OPN 液相管柱層析圖。-----	90
圖 5-30、玄參乙酸乙酯及正丁醇混合區分物區分 (a+b) 之製備型 HPLC 圖。-----	94
圖 5-31、玄參乙酸乙酯及正丁醇混合區分物區分 c 之製備型 HPLC 圖。-----	94
圖 5-32、玄參乙酸乙酯及正丁醇混合區分物區分 (d+e) 之製備型 HPLC 圖。-----	95

圖 5-33、玄參乙酸乙酯及正丁醇混合區分物純化物質 ( a+b )-2 之紫外光-可見光譜圖。-----	96
圖 5-34、玄參乙酸乙酯及正丁醇混合區分物純化物質 ( a+b )-2 之 <sup>1</sup> H-核磁共振光譜圖。-----	97
圖 5-35、玄參正己烷萃取之粗脂肪產率。-----	98
圖 5-36、生育醇之高效液相層析圖。-----	100
圖 5-37、玄參正己烷區分物之生育醇高效液相層析圖。-----	100
圖 5-38、玄參正己烷區分物與各種油脂之 $\alpha$ -glucosidase 活性抑制比較。-----	101
圖 5-39、玄參正己烷區分物之氣相層析圖。-----	102



## 表目錄

表 2-1、活性氧族群-----	5
表 2-2、自由基與活性氧之主要來源-----	6
表 2-3、各種自由基的形成及其介入的各種疾病-----	7
表 2-4、類黃酮衍生物之抗氧化性-----	23
表 2-5、A1C 與平均血漿葡萄糖值之對比-----	26
表 2-6、糖尿病之診斷標準-----	26
表 2-7、妊娠性糖尿病篩檢-----	28
表 2-8、口服降血糖藥物-----	31
表 5-1、玄參四種溶劑之萃取物產率-----	59
表 5-2、玄參各種溶劑區分物之總多酚、總類黃酮含量-----	61
表 5-3、玄參正己烷萃取物經矽膠液相層析後各沖提區分之產率-----	66
表 5-4、玄參正己烷萃取物區分 B 經矽膠液相層析後各沖提區分之產率-----	70
表 5-5、玄參正己烷萃取物區分 I 經 HPLC 層析後各沖提區分之產率-----	74
表 5-6、玄參正己烷萃取物區分 II 經 HPLC 層析後各沖提區分之產率-----	75
表 5-7、玄參乙酸乙酯萃取物經 XAD-7 液相層析後各沖提區分之產率-----	82
表 5-8、玄參正丁醇萃取物經 XAD-7 液相層析後各沖提區分之產率-----	86
表 5-9、玄參乙酸乙酯及正丁醇萃取物區分 (B+C) 經 Cosmosil 75 C <sub>18</sub> -OPN 液相層析後各沖提區分之產率-----	89
表 5-10、玄參乙酸乙酯及正丁醇混合萃取物區分 (a+b) 經 HPLC 液相層析後各沖提區分之產率-----	91
表 5-11、玄參乙酸乙酯及正丁醇混合萃取物區分 c 經 HPLC 液相層析後各沖提區分之產率-----	92
表 5-12、玄參乙酸乙酯及正丁醇混合萃取物區分 (d+e) 經 HPLC 液相層析後各沖提區分之產率-----	93

## 附目錄

附錄一、沒食子酸之標準曲線-----	114
附錄二、槲皮酮之標準曲線-----	114
附錄三、Trolox 之標準曲線-----	115
附錄四、BHA 之標準曲線-----	115
附錄五、氣相層析之標準品-----	116
附錄六、 $\alpha$ -生育醇之標準曲線-----	117



## 摘要

糖尿病 (diabetes mellitus) 與胰島素之分泌及作用缺失有相關。高血糖使人體內產生過多活性氧與自由基，造成氧化壓力上升，使相關併發症發生。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。而醣解酵素能參與人體醣類消化作用，並與血糖調節相關，進而影響現代疾病如糖尿病的發生。其中以  $\alpha$ -amylase 及  $\alpha$ -glucosidase 最為重要。中藥材玄參 (*Scrophularia ningpoensis* roots)，文獻證實具有抗發炎、抗菌、降氧化等生理功能，但對於血糖調控之研究卻相當少，因此本研究擬探討玄參之抗氧化性並評估其對醣解酵素之抑制作用，期望玄參具醣解酵素抑制作用進而對糖尿病顯著改善功效。磨碎的玄參先以甲醇萃取後依序利用正己烷、乙酸乙酯及正丁醇等溶劑與二次去離子水等體積混合後進行液液萃取，並以抗氧化及醣解酵素抑制活性作為篩選依據，進行活性成分之分離、純化及結構鑑定。結果得知玄參正己烷區分物具有較佳醣解酵素抑制活性，但其成分  $^1\text{H-NMR}$  光譜鑑定後，大多為不飽和脂肪酸，因此將玄參進行正己烷粗脂肪萃取及 GC 分析，探討其脂肪含量及脂肪酸的種類，並以含相關脂肪酸之油脂和玄參正己烷區分物進行  $\alpha$ -glucosidase 抑制活性比較。結果得知其脂肪酸主要組成為亞麻油酸、油酸、棕櫚酸、硬脂酸及少量的次亞麻油酸，另外分析正己烷區分物  $\alpha$ -生育醇含量為 16.9 mg/100g，同時多數油脂到達一定含量的體積比例後，皆會對  $\alpha$ -glucosidase 的活性造成顯著性抑制；而玄參乙酸乙酯及正丁醇區分物具有較佳的抗氧化性，經液相管柱層析及 HPLC 分離純化，再經 UV 及  $^1\text{H-NMR}$  光譜

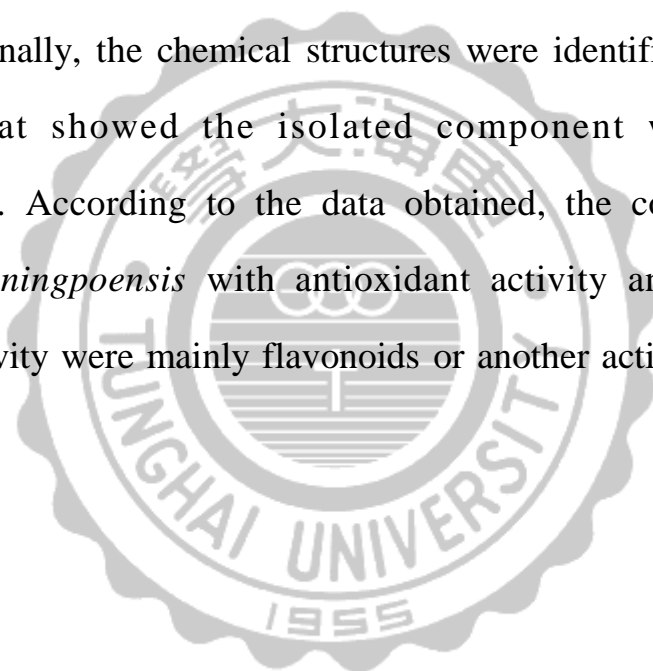
鑑定後，得知一純化物質，其結構推測為 apigenin 5-O-glucoside；因此推測玄參的抗氧化性或醣解酵素抑制活性為眾多含量甚微的類黃酮或其他活性物質因相乘作用發揮出的活性顯現。



## Abstract

Diabetes is associated with deficiencies in insulin secretion or action. Excess reactive oxygen species are built up with chronic hyperglycemia, and are subsequently contributing to oxidative stress and complications. Antioxidants have important roles in disorders involving oxidative stress. Glycosidases are not only involved in human digestion, but also affect the generation of many metabolic diseases such as diabetes, the most important glycosidases are  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. Roots of *Scrophularia ningpoensis* family has been used in traditional Chinese medicine for a long time. Previous studies have demonstrated that *Scrophularia ningpoensis* roots have anti-inflammatory, antibacterial and antioxidant activities. However, possible roles of *Scrophularia ningpoensis* in hypoglycemic regulation have not been explored yet. In the present study, antioxidative and glycosidase inhibitory components of *Scrophularia ningpoensis* were identified, and their hypoglycemic activities were then investigated. *Scrophularia ningpoensis* was extracted with methanol, and the methanol extracts were added distilled deionized water, and then extracted with the proportional *n*-hexane, ethyl acetate and *n*-butanol successively. The result showed the *n*-hexane fraction of *Scrophularia ningpoensis* have better glycosidase inhibitory activity. Using  $^1\text{H-NMR}$  to identified the compositions of *Scrophularia ningpoensis*, and it suggested the *n*-hexane fraction of *Scrophularia ningpoensis* rich in unsaturated fatty acids. In order to investigate the contents and types of lipids from *n*-hexane fraction of *Scrophularia*

*ningpoensis*, it was further analysis by crude fat extraction and gas chromatography ( GC ). It was found fatty acid compositions are linoleic acid, oleic acid, palmitic acid, stearic acid and a small amount of linolenic acid. In addition, the contents of  $\alpha$ -tocopherol were 16.9 mg /100g, and most of the sample oil would significantly inhibit  $\alpha$ -glucosidase activity in the same volume. The EtOAc and *n*-butanol fraction of *Scrophularia ningpoensis* had better resistance to oxidation, after the separation of the liquid column chromatography and HPLC purified effective active ingredients. Finally, the chemical structures were identified by UV and  $^1\text{H-NMR}$ , that showed the isolated component was apigenin 5-O-glucoside. According to the data obtained, the compositions in *Scrophularia ningpoensis* with antioxidant activity and glycosidase inhibitory activity were mainly flavonoids or another active substances .





# 壹、前言

近年來，由於西方文化的進入，造成國人多趨向於高油脂、高糖分及高熱量飲食等不當飲食生活習慣，因此產生了許多包括糖尿病在內的代謝症候群疾病 (metabolic syndrome)。根據衛生福利部 2013 年最新統計資料，糖尿病位居國人十大死因第四位，根據 2012 年國際糖尿病聯盟資料 (IDF) 顯示，全球罹患糖尿病人口為 3.71 億。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型態，約佔罹患率的 95 % 左右，此類型之患者體內無法分泌足夠的胰島素或對胰島素產生阻抗性而無法充分代謝血液中的葡萄糖 (Takeshi *et al.*, 2002)。而控制此病情的首要之務就是適當控制血糖含量，使血糖調節到一定的濃度，降低胰島素阻抗性，以預防各種嚴重併發症的發生。血糖調節主要有三大方法：(1) 膳食療法、(2) 運動療法、(3) 藥物療法，其中以膳食療法最為重要。此外，在進行藥物療法的同時，也需要膳食療法適當的配合，否則藥物療法也將無法發揮其功能，因此，尋求具調節血糖功效之保健食材已成為一項重要的課題。

玄參 (*Scrophularia ningpoensis*) 已證實具有抗發炎、抗菌、降血壓等生理功能，但對於血糖調控之研究卻相當少，因此本研究擬探討玄參之抗氧化性並評估其對醣解酵素之抑制作用，期望玄參具醣解酵素抑制作用進而對糖尿病顯著改善功效，並研發出具相關保健機能之保健食品。

## 貳、文獻回顧

### 一、玄參

#### (1) 玄參之介紹



圖 2-1、玄參。

Fig. 2-1 *Scrophularia ningpoensis* roots.

玄參 (圖 2-1) 別名元參、黑參、烏元參、山當歸、玄台、馥草，為玄參科多年生草本植物玄參 (*Scrophularia ningpoensis*) 的根。含微量揮發油、植物甾醇、油酸、亞麻酸、醣類、左旋天冬醯胺及生物鹼。根類圓柱形，中間略粗或上粗下細，有的微彎曲，長 6~20 cm，直徑 1~3 cm。表面灰黃色或灰褐色，有不規則的縱溝、橫向皮孔及稀疏的橫裂紋和鬚根痕。質堅實，不易摺斷，斷面黑色，微有光澤。氣特異似焦糖，味甘、微苦、鹼；莖具四稜，有溝紋。下部葉對生，上部葉有的互生，卵形至披針形，長 10~15 cm，邊緣具細鋸齒，齒緣反卷，骨質，並有突尖。聚傘圓錐花序大而疏散，軸上有腺毛；花萼 5 裂，裂片邊緣膜片；花冠褐紫色，上唇長於下唇；退化雄蕊近圓形。蒴果卵形。花期 7~8 月，果期 8~9 月。玄參適應性強，喜生於溫暖濕潤性氣候，排水良好的地方均可種植。

## (2) 玄參之傳統功效

玄參在傳統藥理作用上具有清熱涼血、滋陰解毒，主治熱病頻渴、便秘、肺燥咳嗽、骨蒸勞熱、咽喉腫痛、扁桃腺炎、咳血、失眠、癰腫、瘰癧、舌絳煩渴、溫熱症，熱病傷津，熱病發斑、目赤、耳腫、白喉、痰火結核，外治跌打損傷腫痛（中國醫藥大辭典，2003）。

## (3) 玄參之生理活性

### (a) 抗炎作用

玄參萃取物 *angoroside C* 及 *acteoside* 成分具有抗發炎的作用（Paulina *et al.*, 2004）。先以 *E. coli* LPS 誘發巨噬細胞引起發炎反應，再以三種劑量（100  $\mu\text{M}$ 、50  $\mu\text{M}$ 、25  $\mu\text{M}$ ）組別之 *angoroside C* 及 *acteoside* 進行實驗，以 *aminoguanidine*（100  $\mu\text{M}$ ）當作對照組，實驗證實 *angoroside C* 及 *acteoside* 具有抑制 *iNOS* 的活性，進而減少 *NO* 的釋放量，達到抑制發炎及痛的作用；而另一組則是以鈣離子載體 *A23187* 誘發巨噬細胞引起發炎後，以 *NS398*（10  $\mu\text{M}$ ）及 *Dexamethasone*（1  $\mu\text{M}$ ）當作對照組，實驗發現 *acteoside* 具有抑制 *TNF- $\alpha$*  的釋放量及 *COX-2* 的活性，進而減少 *PGE2* 的生成量，達抗發炎的效果。*Harpagoside* 亦有抗發炎效果（Colin *et al.*, 2006）藉由阻斷 *NF- $\kappa$ B* 活性，進而抑制 *COX-2* 及 *iNOS* 的活性，達抗炎作用。

## (b) 保肝作用

研究發現玄參中苯丙苷素具有保肝的作用，其中以 acteoside 最為顯著（孫等，2002），其能夠抑制 D-galactosamine 及 lipopolysaccharide 對肝臟細胞造成的損傷，達保護作用，減少肝細胞的凋亡（Shigetoshi *et al.*, 1999）。

## (c) 抑菌作用

玄參葉萃取物 phenylpropanoid glycosides 具有抑菌的效果，主要以金黃葡萄球菌、鏈球菌最為顯著，白喉菌及傷寒桿菌較弱（陳等，1986）其抑菌作用主要是在於苯丙苷素結構上的甲氧基，造成菌體結構的損害（N Didry *et al.*, 1999）。

## (d) 抗氧化作用

研究證實玄參成分中的苯丙苷素類（phenylpropanoid glycosides），對脫氧核苷酸羥基自由基具有顯著的修復效果（李等，2000）。

## (e) 抗血小板聚集作用

研究發現玄參成分中的苯丙苷素類（phenylpropanoid glycosides）及環烯醚萜類（iridoid glycosides）皆具有抗血小板凝聚的作用，但以苯丙苷素的作用較為強烈，其作用機制主要是使血液中 PGI<sub>2</sub>（前列環素）及 TXA<sub>2</sub>（血栓烷素 A<sub>2</sub>）的釋放量呈平衡狀態，以減少血栓的生成（倪等，2004；黃等，2004）。

## 二、自由基與活性氧

### (1) 自由基與活性氧之種類

自由基 (free radicals) 是指含有一個或多個不成對電子而獨立存在之原子、分子或離子 (Halliwell *et al.*, 1995)。這種不成對的情況非常的不穩定，為使其達到穩定的狀態，其會搶奪鄰近分子的電子形成電子對，使得被搶奪電子的分子變得不穩定，若又具有高度的活動性則會引發連鎖反應 (chain reaction)，促使更多的自由基產生。活性氧族群 (reactive oxygen species; ROS) 是指以氧為中心的自由基及非自由基型態的高反應分子 (Niki, 1992)，如表 2-1 所示。而在活性氧族群中，又以  $\cdot\text{OH}$  之毒性最為強烈，其可輕易通過細胞膜而到達細胞核與 DNA 反應，造成 DNA 突變。另有相關研究指出 ROS 會間接誘發脂質發生氧化反應，進而產生中間代謝物，造成細胞老化、突變致癌甚至死亡 (Shigenage *et al.*, 1989; Moskovitz *et al.*, 2002)。

表 2-1、活性氧族群  
Table 2-1 Reactive oxygen species

Radicals		nonradicals	
Hydroxyl	$\cdot\text{OH}$	Peroxynitrite	$\text{ONOO}^-$
Alkoxy	$\text{L(R)O}\cdot$	<b>Hypochlorite</b>	$^-\text{OCl}$
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 )

## (2) 自由基與活性氧之主要來源

生物體內自由基與活性氧之來源，可分為外在及內在兩方面。外在來源包括環境污染物、香菸、離子輻射及化學藥劑如農藥等所誘發體內產生之 ROS；而細胞進行氧化作用所產生的自由基為主要內在來源（Morrissey and O'Brien, 1998）如表 2-2 所示。一般生物體進行的呼吸作用或某些藥物於體內的代謝過程皆會產生自由基。

表 2-2、自由基與活性氧之主要來源

Table 2-2 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 microsome	Paraquat
Oxidase	Medication oxidation
Xanthine oxidase	Smoking
Indoleamine dioxygenase	Ion irradiation
Tryptophane dioxygenase	Sun light
Galactose oxidase	Food processing
Lipoxygenase	
Monoamine oxidase	
Phagoytic cells	
Neutrophiles	
Monocytes	
Eosinophiles	
Endothelial cell	
Auto oxidation-reduction	
Fe <sup>2+</sup>	

(Morrissey and O'Brien, 1998)

### (3) 自由基與活性氧之危害

正常情況下，人體內自由基的產生和消除呈平衡態，但當自由基產生過多時或人體抗氧化防禦系統出現故障，自由基代謝就會失衡並破壞體內 DNA、RNA、蛋白質、醣類及脂質，引發一系列氧化連鎖反應。長期的體內自由基失衡會導致細胞損傷老化，並引發癌症、心血管、糖尿病、腎病變等其他系統疾病如表 2-3 所示 (Maxwell and Gavin, 1992 ; Gutteridge, 1993 ; Rikans and Hornbrook, 1997 ; McCord, 2000 ; Moskovitz *et al.*, 2002 )。

表2-3、各種自由基的形成及其介入的各種疾病

Table 2-3 The sources of free radicals and involved disease of free radicals

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

( Gutteridge, 1993 ; McCord, 2000 )

### 三、脂質氧化作用

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

#### (1) 起始期 ( initiation stage )

藉由單旋態氧 ( singlet oxygen,  $^1O_2$  )、過渡金屬、光、熱、輻射照射或脂質氧化過程中所產生的脂質自由基 (  $R\cdot$  ) 與脂質自氧化自由基 (  $ROO\cdot$  ) 等高能量物質引發起始反應，這些活性氧或自由基會攻擊尚未氧化的多元不飽和脂肪酸 (  $RH$  )，使多元不飽和脂肪酸的戊二烯雙鍵中間之甲烯基 (  $\alpha$ -methylene ) 脫落一個質子，形成活性極高的脂質自由基 (  $R\cdot$  )。圖2-3 為不飽和脂質自氧化反應在各階段的變化。

#### (2) 連鎖增殖期 ( propagation stage )

此時期的主要反應為正常油脂因受到自由基的攻擊，產生更多的自由基。脂質自由基在連鎖反應的過程中與氧反應形成過氧化自由基 (  $ROO\cdot$  )，過氧化自由基再去攻擊其他不飽和脂肪酸，奪取其質子以

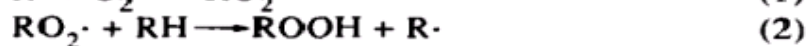


產生新的脂質自由基與脂質氫過氧化物 (lipid hydroperoxides)，此步驟不斷進行直到系統內所有不飽和脂肪酸全部變成自由基為止。圖 2-4 表示脂質自由基的形成，及與環境中之氧反應形成的脂質氫過氧化物 (Gorkum and Bouwman, 2005)。氧化反應初期會先經過氧化誘導期 (induction period)，先形成氫過氧化物，並在氫過氧化物形成累積量達最高峰後開始分解。

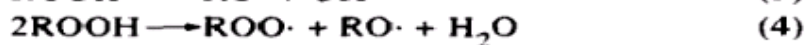
### (3) 終止期 (termination stage)

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

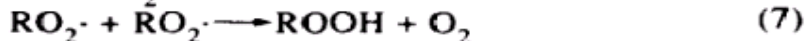
#### Propagation



#### Branching



#### Termination



Where R = Fatty Acid Radical

ROOH	=	Fatty Acid Hydroperoxide
RO <sub>2</sub> ·	=	Peroxy radical
RO·	=	Alkoxy radical

圖 2-2、脂質自氧化連鎖反應。

(Nawar, 1985)

Fig 2-2 Autoxidation chain reaction of lipid.

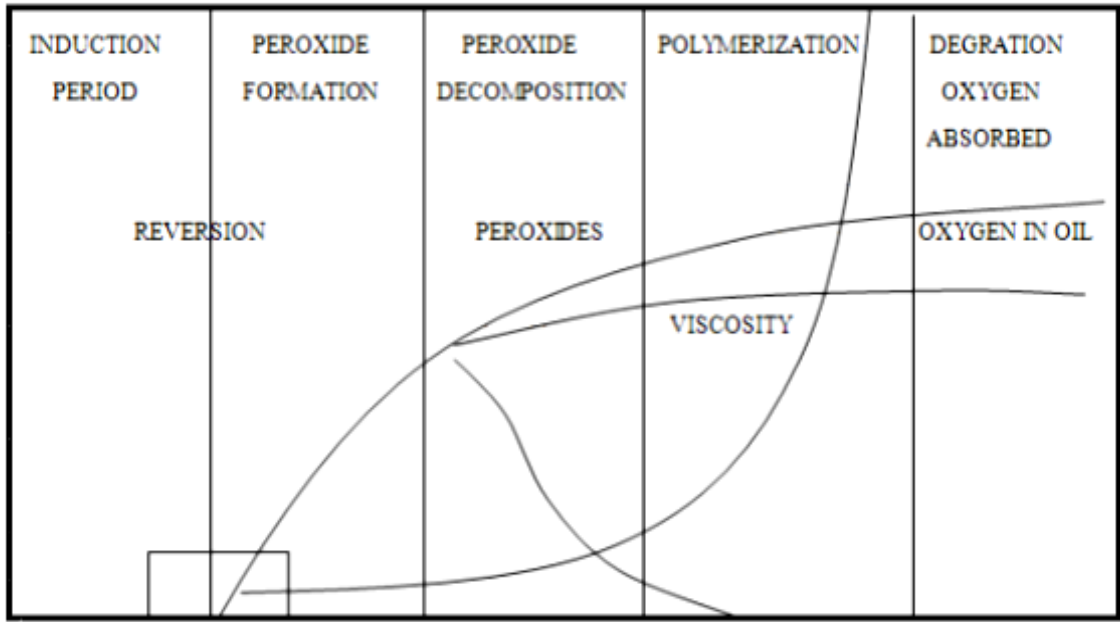
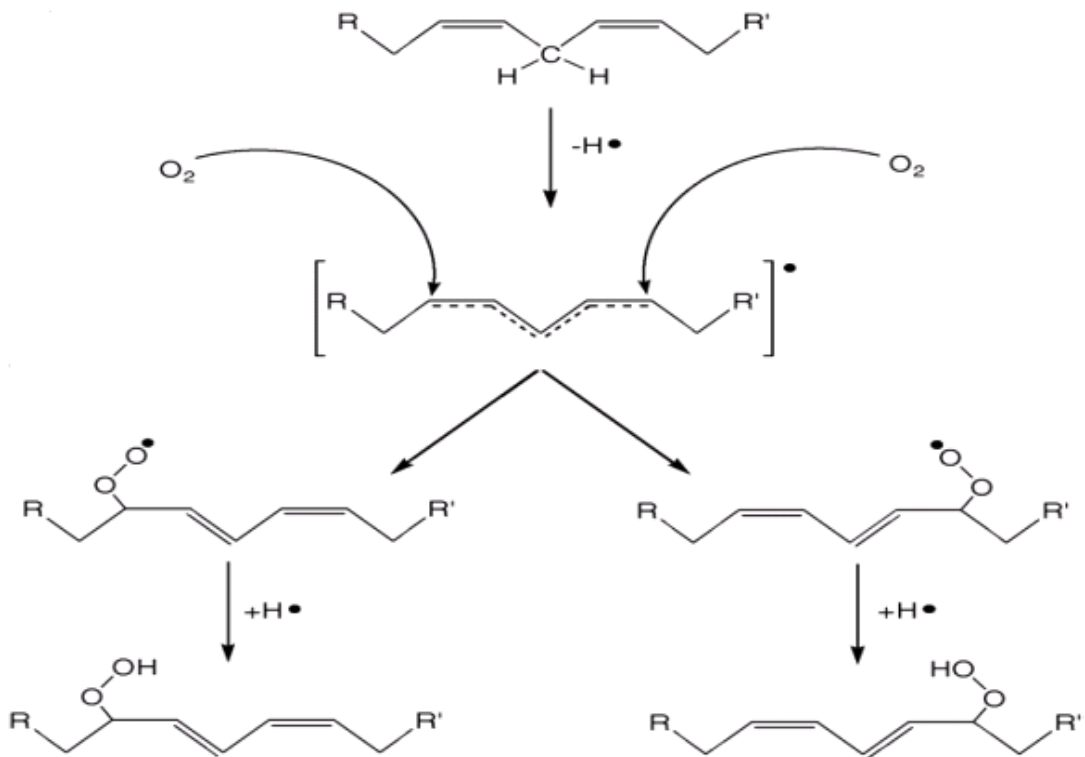


圖2-3、油脂自氧化的反應階段。

(Perkins, 1967)

Fig 2-3 The stages of lipid autoxidation.



(Gorkum and Bouwman, 2005)

圖2-4、不飽和脂肪酸自氧化反應中最初氫過氧化物的形成。

Fig 2-4 Initial hydroperoxide formation in the autoxidation of the unsaturated fatty acid.

#### 四、抗氧化作用 (Antioxidation)

##### 1. 抗氧化劑和作用機制

不同種類抗氧化劑展現不同抗氧化特性，大致分為下列四種：

##### (1) 自由基清除劑 (free radical scavenger)

此類抗氧化劑多為酚類化合物，酚類化合物易釋出氫氧基上的質子，提供一個電子或一個質子與自由基作用，而自身的苯環結構上的不成對電子會轉移而形成穩定的共振結構 (resonating structure)。圖 2-5 表示酚型化合物清除脂質自由基之作用機制。食品中的自由基清除劑以維生素 E 及人工合成抗氧化劑如 butylated hydroxyanisole (BHA)、butylated hydroxytoluene (BHT) 等為最常見，但人工合成之抗氧化劑有安全性上的顧慮 (Branen, 1975)，因此從天然物中尋求天然抗氧化劑是目前相當受到重視的。

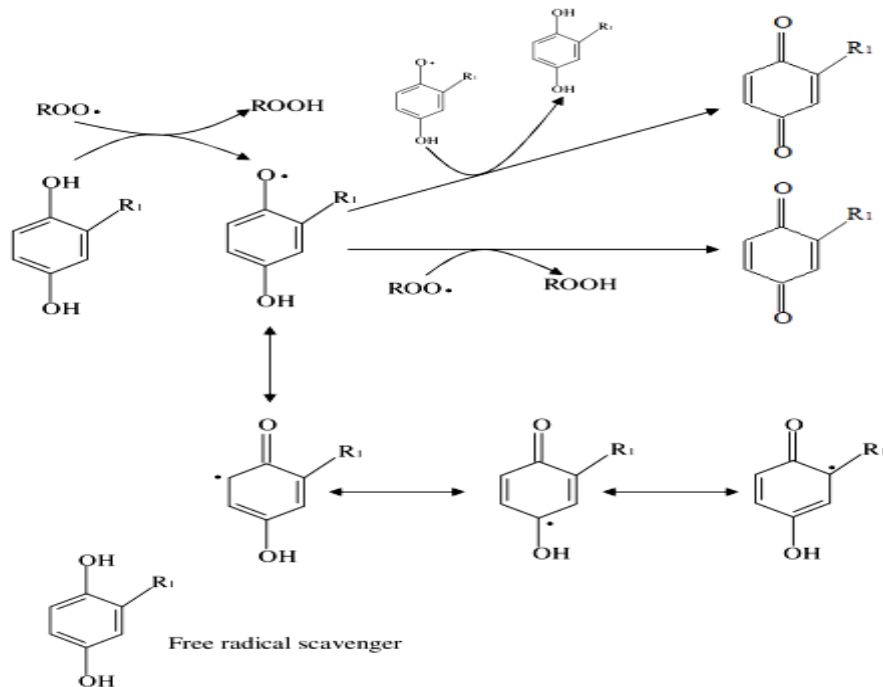


圖2-5、自由基清除劑之抗氧化作用機制。 (Sherwin, 1978)

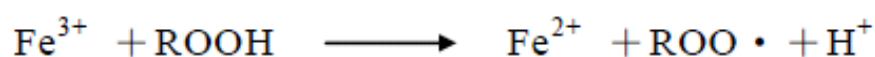
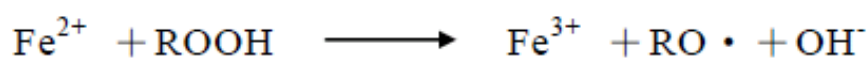
Fig. 2-5 Mechanism of antioxidation for free radical scavenger.

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

空氣中的氧主要以較安定的基態三旋態氧 (triplet oxygen,  $^3\text{O}_2$ ) 狀態存在。由於在食品中常含有一些光增感劑 (photosensitizer) 如葉綠素、血紫質及核黃素等，這些物質會吸收光能，從基態 (ground state) 提升至激發態 (excited state)，當激發態返回基態時，所釋放的過多能量(如光等)便被三旋態氧吸收而提升至單旋態氧 ( $^1\text{O}_2$ )，此單旋態氧極易和食品中的不飽和脂肪酸上的雙鍵反應產生氫過氧化物。此類抗氧化劑包括一些類胡蘿蔔素如 $\beta$ -胡蘿蔔素 ( $\beta$ -carotene) 等，可吸收光增感劑所釋放的過多能量使單旋態氧恢復成穩定的三旋態氧型態，藉此降低與不飽和脂肪酸反應的可能性 (Kellogg and Fridovich, 1975; Bando et al., 2004)。

## (3) 金屬螯合劑 (metal chelator)

過渡金屬離子具有催化脂質形成自由基，促進脂質氧化的能力：



金屬螯合劑本身不具抗氧化性，但能與促氧化之金屬離子如銅及鐵離子結合，消除其催化作用進而抑制脂質氧化反應。例如 EDTA、檸檬酸 (citric acid) 及聚磷酸鹽 (polyphosphate) 等 (Bors, 1999)。

#### (4) 相乘劑 (synergist)

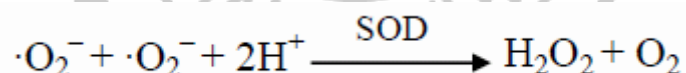
相乘劑本身並不與促氧化因子作用，而是可還原已失去質子之酚型自由基，進而達到增強酚型抗氧化劑的抗氧化能力。在食品系統中的相乘劑以抗壞血酸 (ascorbic acid) 為代表，例如抗壞血酸可還原失去一個質子的  $\alpha$ -生育醇，使得氧化的  $\alpha$ -生育醇恢復抗氧化能力。

## 2. 體內酵素性抗氧化作用

生物體內的酵素性抗氧化系統，可降低 ROS 形成自由基所造成之氧化傷害，並保護細胞，如圖 2-6 所示。

### (1) 超氧歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)

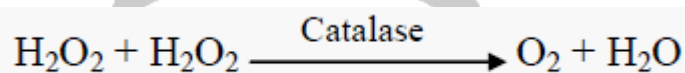
Superoxide dismutase 將超氧陰離子轉變為過氧化氫 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 及氧分子，以減輕超氧陰離子對細胞所造成的傷害 (Beyer, 1994)，其反應式如下：



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)；MnSOD 一般則存在於真核生物之粒線體內；FeSOD 則主要存在於原核生物和植物葉綠體中。

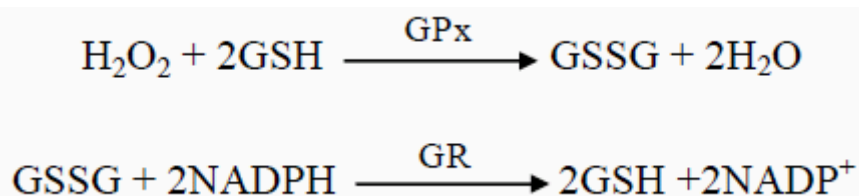
## (2) 觸酶(catalase)

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：



## (3) 麩胱甘肽過氧化酶 (glutathione peroxidase, GPx)

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：



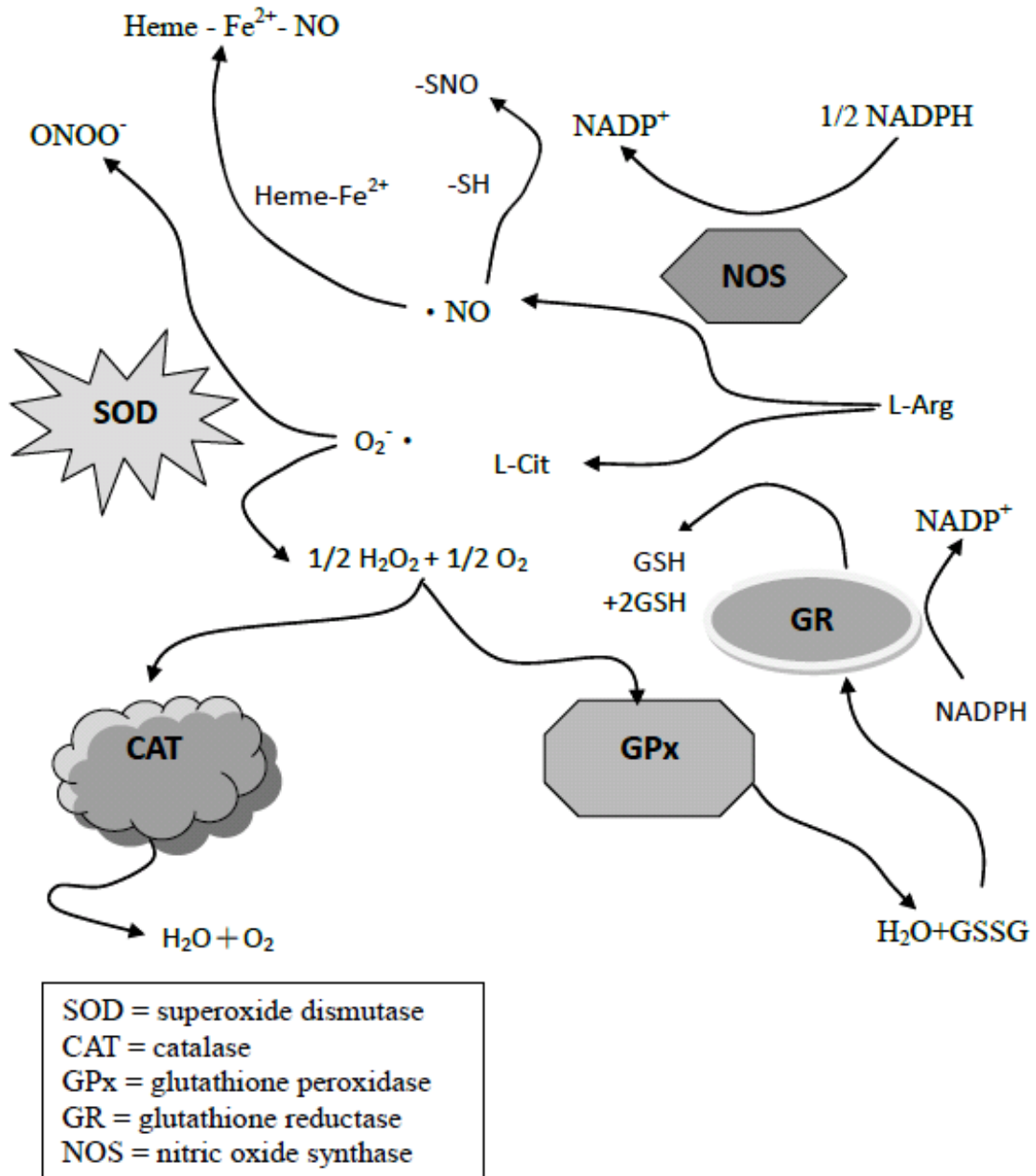


圖2-6、細胞內抗氧化酵素之防禦系統。

Fig. 2-6 Cellular antioxidative enzymatic defense system.

( Mruka *et al*, 2002 )

### 3. 非酵素性抗氧化作用

#### (1) 維生素C ( 抗壞血酸 , ascorbic acid )

抗壞血酸為一種水溶性物質，存在於體內水溶性部分如血漿與細胞間質內。其抗氧化機制在於其 C-2 和 C-3 上有兩個羥基 ( hydroxyl group )，可提供質子來穩定自由基，本身轉變為半脫氫抗壞血酸 ( semidehydroascorbic acid ) ( Beyer, 1994 )。圖 2-7 表示不同型態的抗壞血酸與自由基的反應。若在細胞內，可再經由麩胱甘肽或 NADPH 還原再生成具抗氧化活性的還原態 ( Jacob and Burri, 1996 )。此外，抗壞血酸可還原生育醇恢復至抗氧化狀態，因此在細胞內可以此種相乘性的抗氧化作用預防膜和脂蛋白受到氧化性傷害 ( Aruoma, 1994 ; Beyer, 1994 )。但若抗壞血酸在體內血漿中的濃度過高，或組織受傷後環境中有較高濃度金屬離子，抗壞血酸反而產生促氧化作用，進而導致活性氧分子如羥自由基的生成 ( Halliwell *et al*, 1995 )。

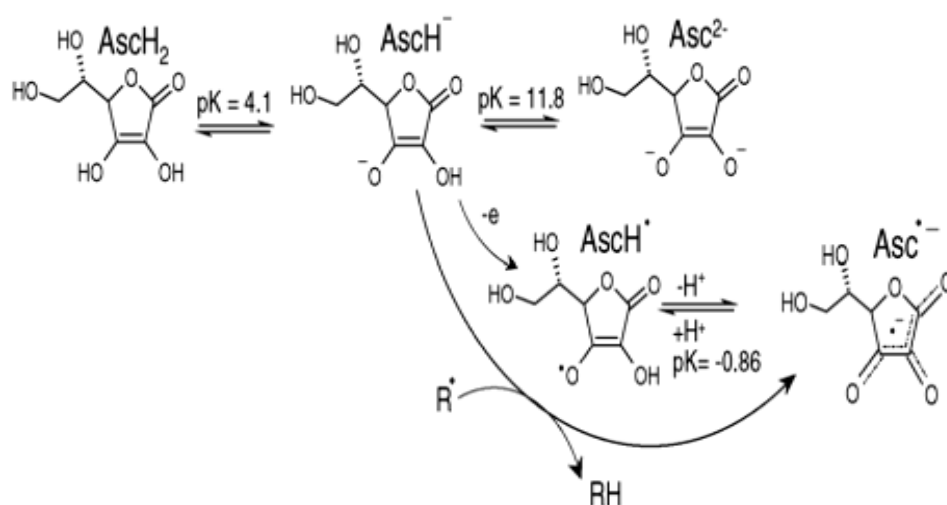


圖2-7、不同型態抗壞血酸與自由基之反應。 ( Valko *et al* , 2006 )

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



## (2) 類胡蘿蔔素 (carotenoids)

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β-胡蘿蔔素 (β-carotene) 因具有共軛雙烯 (conjugated dienes) 結構，可與過氧化自由基作用形成穩定的共振結構，來抑制脂質過氧化反應的發生 (Aruoma, 1999)。Carotenoids 的自由基清除能力視其結構而定，如結構上共軛雙鍵長度及 β-ionone 環上銜接之官能基種類，當共軛雙鍵數較多，則自由基清除能力便較強 (Anguelova and Warthsen, 2000)，例如茄紅素 (lycopene) 含有 11 個共軛雙鍵，其中又以順式結構者具有較強的清除自由基及終止單旋態氧的能力。

## (3) 維生素E (生育醇, tocopherol)

生育醇為一脂溶性維生素，是目前使用最廣泛的抗氧化劑。tocopherol 可分為四型 (α、β、γ、δ)，其中以 γ 型在自然界中分佈最多 (Kamal-Eldin and Appelqvist, 1996)。當生育醇遭受到脂質自由基攻擊時，會將酚基上的質子轉移給脂質過氧化的 peroxy 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)。

#### (4) 麩胱甘肽 (glutathione, GSH)

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

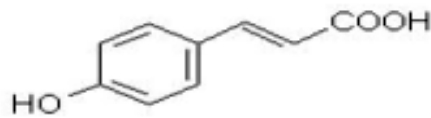
#### (5) 多酚類 (polyphenols)

Polyphenols 為植物中廣泛存在的成分，已知種類至少超過 8000 種，其酚型構造上帶有數個羥基，此羥基與體內的抗氧化作用有關，主要包括酚酸 (phenolic acids)、類黃酮 (flavonoids) 及鞣質 (tannins) 等，以下就幾種主要酚類化合物做介紹：

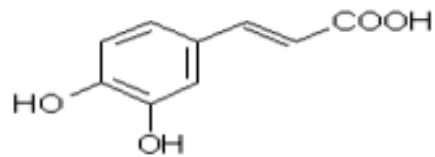
##### (5)-1. 酚酸 (phenolic acids)

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 (圖 2-8)，且雙羥基衍生物之抗氧化性優於單羥基衍生物，如

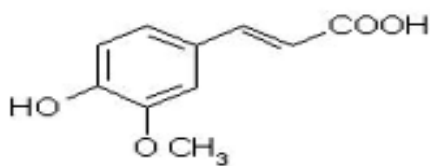
3,4-二羥基肉桂酸 ( caffeic acid ) 在多種抗氧化系統中皆顯示出強抗氧化力 ( Milic *et al.*, 1998 )，若第二個羥基位於苯環的鄰位或對位上，其抗氧化性會增強。此外，研究顯示許多酚酸如 ferulic acid、caffeic acid 等皆具有抑制低密度脂蛋白 ( LDL ) 氧化的能力 ( Bors *et al.*, 1990 )。



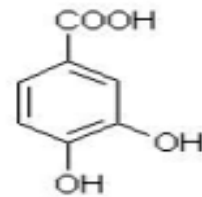
**p-coumaric acid**



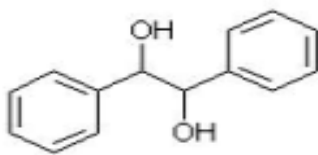
**caffeic acid**



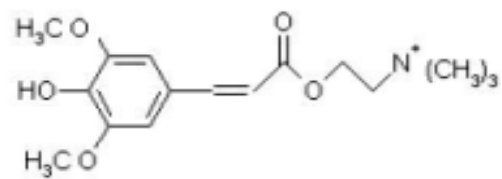
**ferulic acid**



**protocatechuic acid**



**hydrobenzoin**



**sinapine**

圖2-8、苯甲酸及肉桂酸衍生物之結構圖。

( Pokorny, 1987 )

Fig 2-8 The structures of the derivatives of benzoic acid and cinnamic acid.

### (5)-2. 鞣質 ( 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 )。

### (5)-3. 類黃酮 ( Flavonoids )

類黃酮 ( flavonoids ) 屬於水溶性的植物化學物，由三個環狀結構的 diphenyl propane ( C6-C3-C6 ) 型式所構成 (圖2-9)，又稱為生物類黃酮，為含量最豐富的多酚類化合物，具有多樣的結構 (圖2-10)，主要是依其含氧雜環上的氧化程度來區分 ( Tapiero *et al.*, 2002 )，其在溶液中具有清除自由基的能力，是天然的抗氧化劑 ( Lin *et al.*, 2002 )，能加強維生素 C 的作用，幫助維生素 C 再生，其抗

氧化力皆高於維生素 E 及維生素 C，具有抑制癌細胞增生、預防心血管疾病、老年癡呆以及清除自由基等功效，多存在於植物組織中，尤其是葉、花、果實、種子等。依其結構異性可分為黃酮（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2-4）。

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）。

類黃酮之抗氧化性與其結構有很大的關係，其中羥化作用之位置及程度決定其抗氧化活性：(1) 在 A 環 C-5、C-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 C-3'、C-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 位置上具有酮基，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。

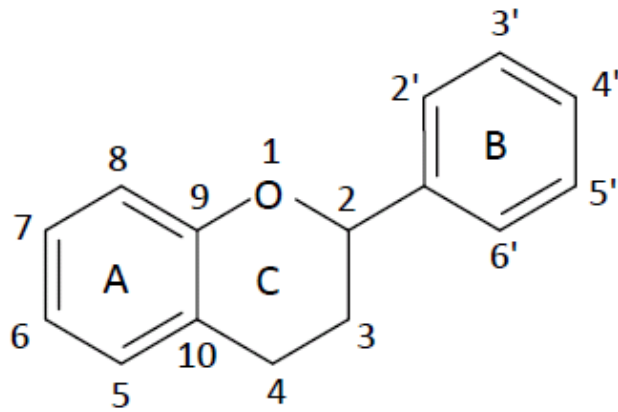


圖2-9、類黃酮之基本結構圖。 (Cook and Samman, 1996)

Fig. 2-9 Structure of flavonoid.

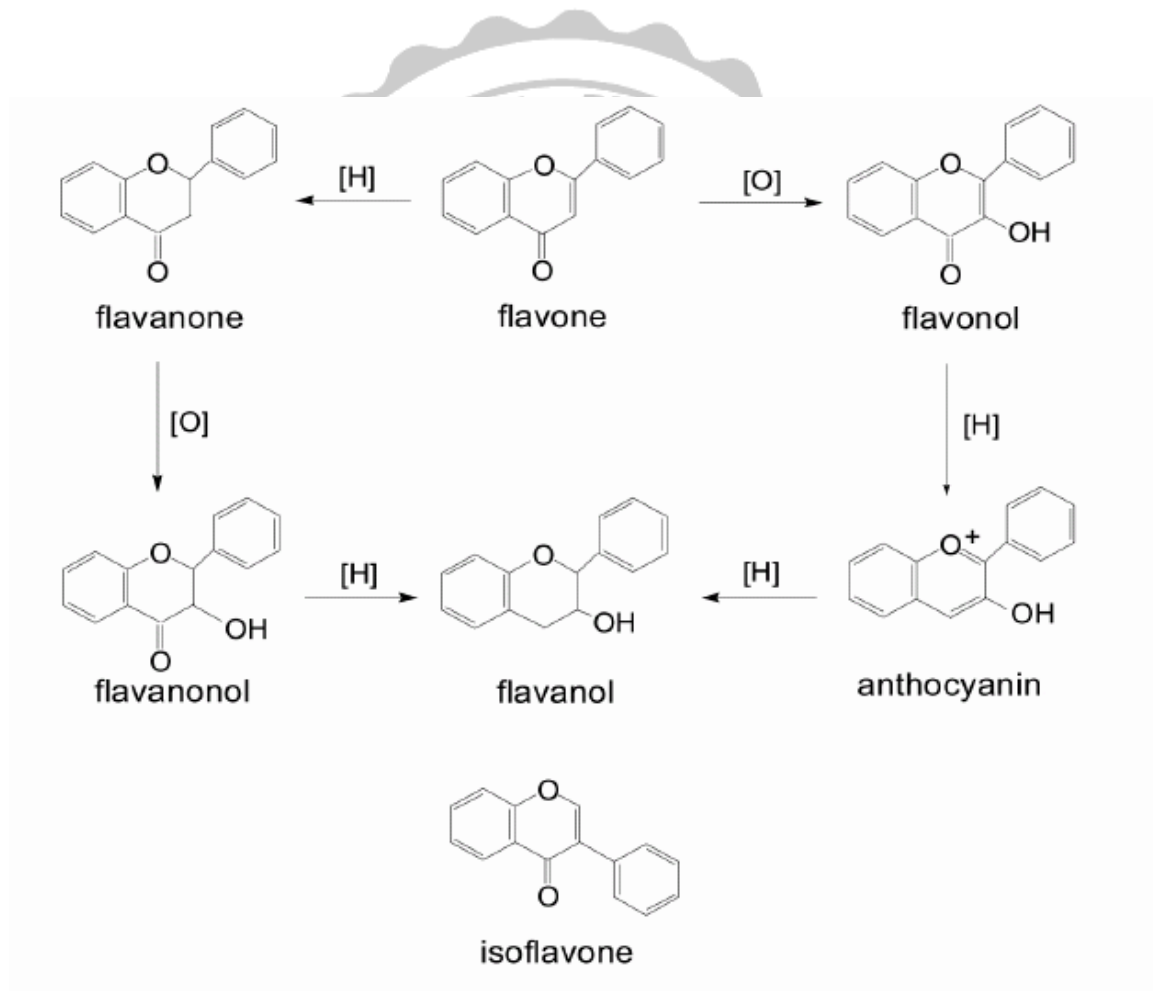
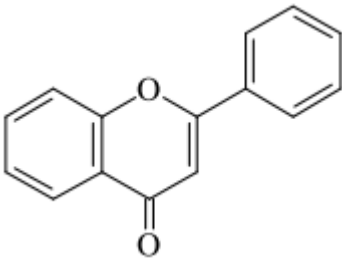
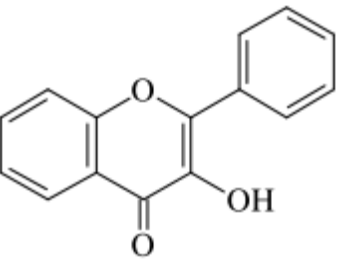
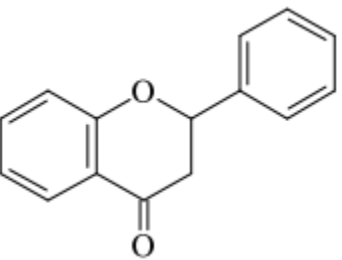
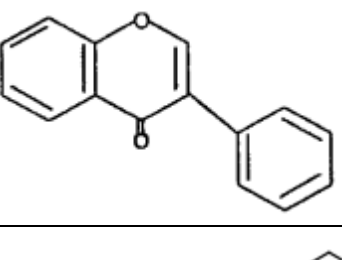
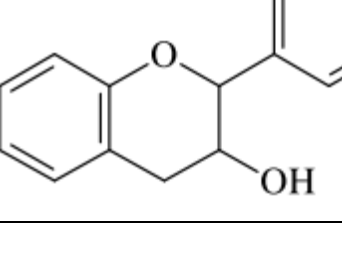


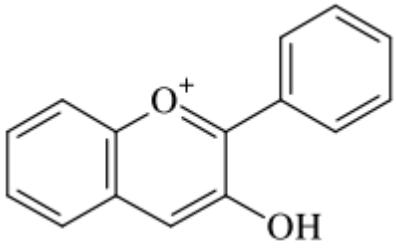
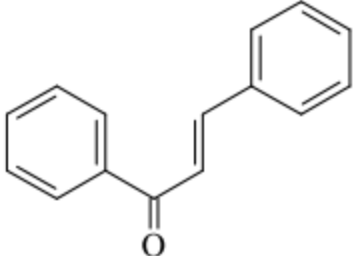
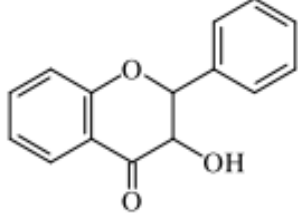
圖2-10、類黃酮衍生物之化學結構。 (蔡和陳, 2006)

Fig 2-10 The chemical structures of flavonoid derivatives.

表2-4、類黃酮衍生物之抗氧化性

Table 2-4 The antioxidative activities of flavonoid derivatives

類黃酮種類	抗氧化性特徵	化學結構	來源
黃酮類 flavones	<p>主要為芸香甘 (Rutin) 以及槲皮素 (Quercetin)</p> <p>* 此結構為在 C 有 2,3 double bond, 4-oxofu, 但沒有 3-OH。</p> <p>* B 環上-OH 越多, A 環在 C5 及 C7 上有-OH, 抗氧化性越強。</p> <p>* 抗氧化性 : lutein &gt; apigenin &gt; chrysin</p>		甜椒、 芹菜
黃酮醇類 flavonols	<p>* 此結構為在 C 有 2,3 double bond, 4-oxofu 且有 3-OH。</p> <p>* B 環上-OH 越多, A 環在 C5 及 C7 上有-OH, 抗氧化性越強。</p> <p>* 抗氧化性 : quercetin &gt; myricetin &gt; morin &gt; kaempferol</p>		紅洋蔥
黃烷酮類 flavanones	<p>* 抗氧化性: Taxifolin &gt; naringenin &gt; hesperitin &gt; hesperidin &gt; naringin 和 OH 的數目及取代位置有關。</p> <p>* 其抗氧化性小於 flavonols 及 flavanones。</p>		柑橘類 水果
異黃酮類 isoflavones	<p>* genistin, daidzein 屬之。</p> <p>* 抗氧化性差, 在天然產物中此類結構較少。</p> <p>* orthodihydroxyl 的結構。</p>		豆類、 綠茶、 芹菜
黃烷醇類 flavanols	<p>* 此類結構由於 C 環為飽和的 heterocyclic 環, 在 AB 環間無法電子非定域化, 抗氧化性較具相同-OH 的 flavones 及 flavonols 差。</p> <p>* 抗氧化性 : catechin-gallate &gt; catechin</p>		綠茶

花青素類 anthocyanins	* 抗氧化性: cyanidin-3-β-D-glucoside * Cyanidin 以 flavylum cation 的形式存在時抗氧化性較佳 (pH2 > pH4 > pH7), B 環結構影響抗氧化性。 * Cyanidin = dephindin > malvidin > pelargonidin		葡萄、櫻桃、覆盆子
查酮 chalcones	* butein, phloretin, phloridzin 屬之。 * 從甘草的成分可分離出具有抗氧化性的物質lichalcone A。 * 具有潛在抗氧化性, dihydrochalcone > chalcone		甘草
黃烷酮醇 flavanonols	* 抗氧化性類似 flavanones, 與 OH 的數目及取代位置有關。 * taxifolin, fustin 屬之。		木豆葉

(Cook and Samman, 1996)

## 五、自由基與糖尿病之關聯

糖尿病病患由於長期處於高血糖狀態，會誘發 ROS 生成機制，因此減低醣化反應能抑制氧化的發生，並達到保護細胞之效果。分泌胰島素之 β 細胞內抗氧化酵素含量較低，易受到氧化壓力之傷害，而高血糖狀態易使粒線體產生大量自由基，造成 β 細胞之損傷，因此降低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)。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)。



研究指出糖尿病鼠體內維生素C、E 及  $\beta$ -胡蘿蔔素均有明顯不足之現象，而具有抗氧化功能之維生素可以降低糖尿病鼠及糖尿病患體內之氧化壓力，運用植物中的抗氧化成分於糖尿病及其併發症之防治，且具有良好之效果 (Rahimi *et al.*, 2005)。

## 六、糖尿病 (Diabetes mellitus, DM)

隨著生活型態的改變，各種慢性疾病的盛行率也逐年增加，糖尿病就是其中之一。根據衛生福利部 2013 年最新統計資料，糖尿病位居國人十大死因第四位，根據 2012 年國際糖尿病聯盟資料 (IDF) 顯示，全球罹患糖尿病人口為 3.71 億。此外，糖尿病亦有年輕化的趨勢。糖尿病是一種複雜的慢性代謝疾病，主要是因為胰臟  $\beta$  細胞之胰島素分泌功能或胰島素作用缺失，抑或兩者的同時缺失，導致血液中的葡萄糖無法進入細胞，而呈現高血糖狀態；吃多、喝多、尿多 (三多)、體重減輕 (一少) 為典型糖尿病的主要病徵，有時候會伴隨各種急、慢性併發症，如糖尿病酮酸血症、心血管疾病、腎病變、視網膜病變、神經病變等，這些併發症更會造成死亡或失能、殘障及生活品質的降低 (台北市醫師公會會刊, 2013)。根據 2014 年美國糖尿病協會 (American Diabetes Association, ADA) 所公布，可藉由測量醣化血色素 (Glycated Hemoglobin, A1C) 換算血漿葡萄糖濃度 (表 2-5)、空腹血糖值 (Fasting Plasma Glucose, FPG)、葡萄糖耐受性試驗 (Oral Glucose Tolerance, OGTT) 及隨機血糖值 (Random Plasma Glucose Test, RPGT) 四種不同方式來評估是否已罹患糖尿病 (表 2-6) (American Diabetes Association, 2014)

表 2-5、A1C 與平均血漿葡萄糖值之對比

Table2-5 Correlation of A1C with average glucose

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

These estimates are based on 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 2-6、糖尿病之診斷標準

Table2-6 Criteria for the diagnosis of diabetes

Result	Normal	Prediabetes	Diabetes
A1C	Less than 5.7%	5.7 to 6.4%	6.5 % or higher
FPG	Less than 100mg/dl	100 to 125 mg/dl	126mg/dl or higher
OGTT	Less than 140mg/dl	140 to 199 mg/dl	200mg/dl or higher
RPGT	Greater than or equal to 200mg/dl		

( American Diabetes Association, 2014 )

## 1. 糖尿病主要類型

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

胰島素依賴型 ( insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM ) 糖尿病起源於濾過性病原菌的感染或自己免疫的原因而侵害蘭氏小島  $\beta$  細胞，而導致胰島素的製造不足(或甚至是完全沒有製造)，佔國人糖尿病患 1-2 % 左右。絕大部分的原因都是因為免疫系統的原因所造成的  $\beta$ -細胞破壞，歸類於 type 1a 型。少數找不出免疫系統問題但仍造成  $\beta$ -細胞破壞的，則歸類於 type 1b 型。

第一型糖尿病通常發生於幼年或是青少年（稱之為幼年型糖尿病）以及無法藉膳食療法、運動療法來改善，必須靠胰島素治療（或是稱胰島素依賴型糖尿病）。疾病正式發病後，病人最終需要注射胰島素，否則會有酮酸血症或是生命危險。此外，此類型糖尿病患由於無法充分利用葡萄糖產生能量，只好分解脂質與蛋白質來生產能量，所以第一型糖尿病患身材多半清瘦。

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

糖尿病患當中，第二型糖尿病約佔有 90-95%，常見於肥胖者病患，此類型糖尿病病患體內雖然可製造胰島素，但血糖濃度仍會上升，其發病原因主要是體內細胞對胰島素產生一個阻抗的現象，胰島素無法發揮其功效，致使在血液中循環的葡萄糖無法進入細胞被當作能量，此類型糖尿病發生年齡層約在 40 歲以後，亦可稱為成年型糖尿病，而此類病患除非是重症，否則不必做胰島素治療，而採用膳食療法、運動療法、口服降血糖藥物治療即可，因此亦被稱為非胰島素依賴型糖尿病。

## (3) 妊娠性糖尿病（Gestational diabetes mellitus，GDM）

指婦女在懷孕期間罹患糖尿病，通常發生於 24~28 週，其原因為懷孕時過多荷爾蒙分泌，使身體產生胰島素阻抗性及高血糖現象，產生後即恢復正常。醫師通常建議孕婦在懷孕 24~28 週及產後 6~12 週期間，可接受妊娠糖尿病篩檢（表 2-7）。

表 2-7、妊娠性糖尿病篩檢

Table 2-7 Screening for and diagnosis of gestational diabetes mellitus

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

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

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

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

GDM: Gestational diabetes mellitus

( ADA, 2011 )

FPG: Fasting Plasma Glucose

OGTT: Oral Glucose Tolerance

#### (4) 其他特異性糖尿病 ( Other specific types of diabetes mellitus )

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

## 2. 糖尿病所引起之併發症

糖尿病之併發症可依原因而分為“神經病變”、“大血管疾病 ( macrovascular disease )”及“小血管疾病 ( microvascular disease )”等三類，由高血糖的代謝異常所引發的神經病變，會造成患者手腳麻痺、肌肉痠痛、頭暈目眩、噁心等症狀，而大血管疾病包括冠狀動脈心臟病 ( 心肌梗塞 )、中風及周邊動脈疾病等，小血管疾病主要是因

為高血糖使毛細血管等細小血管發生異常，其中最具代表性的疾病為視網膜病變及腎病變。

### (1) 糖尿病神經病變

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

### (2) 大血管疾病

冠心病主要是因為粥樣動脈硬化，糖尿病患者本身就常合併有高血壓、血脂異常及肥胖症，這些都會促成粥樣動脈硬化；由於糖尿病患者身體無法有效利用血糖，故使用脂肪組織代替血糖做為熱量來源，但脂肪組織被分解時會產生游離脂肪酸，最後形成血脂肪沉積在血管壁裡，使血管壁增厚、彈性消失、管腔狹窄，因而造成高血壓，進而引發其他機轉，如血管內皮功能失常、血小板活化及凝血系統異常，導致冠狀動脈血流變差，心肌缺氧更嚴重、血栓形成的風險增加，最終演變成心肌梗塞、中風等疾病（張等，2014）。

### (3) 小血管疾病（視網膜病變）

視網膜病變主要是因為長期血糖升高，使血小板凝集力上升，造成視網膜微血管受損，引起微血管局部膨大、滲漏、出血、阻塞等現象，進而影響視力（張等，2014）。

#### (4) 小血管疾病 (腎病變)

糖尿病腎病變則是過濾血液的腎絲球產生病變，主要是因為高血糖造成腎絲球內基質擴張、基底膜流失及腎絲球壓力提高，而此病變隨著病情的進展，分為高過濾期、靜止期、微白蛋白尿期、明顯白蛋白尿期及最終的末期腎臟病變等五個階段 (張等，2014)。

### 3. 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。然而藥物治療目前國內第一型糖尿病患者主要為注射胰島素，第二型糖尿病患者除了胰島素外，還有口服降血糖藥物 (oral hypoglycemic agent, OHA) 可選擇。OHA 主要作用是刺激胰島素的分泌、改善胰島素阻抗性、減緩腸胃道對醣類的吸收，進而改善血糖值的異常，達到穩定血糖之效果 (沈等，2008)。常見的 OHA 分為下列幾種類型：胰島素分泌促進劑 (insulin secretagogues)、雙胍類 (biguanide)、 $\alpha$ -glucosidase inhibitor 及 thiazolidinediones (或稱 glitazones) 為胰島素增敏劑如 (表2-8) 所示。

表2-8、口服降血糖藥物

Table 2-8 Oral hypoglycemic agent

分類	藥物	平均降低 HbA1c 作用	作用機轉	副作用
胰島素分泌促進劑 ( Sulfonylurea 磺酸尿類 )	Glimepiride 、 Glipizide 、 Glyburide 和 第一 代的Sulfonylureas	↓ 0.8-2.0%	加強胰臟β細胞對葡 萄糖敏感度，並刺激 β細胞分泌胰島素	低血糖及體重 增加
胰島素分泌促進劑 ( Non- Sulfonylurea 非磺 酸尿類 )	Repaglinide 、 Nateglinide	↓ 0.5-2.0%	直接刺激胰島分泌 胰島素	低血糖及體重 增加，但其發生 機會較 Sulfonylurea低
雙胍類( Biguanide )	Metformin	↓ 1.0-2.0%	抑制肝臟葡萄糖之 糖質新生用、減少葡 萄糖在腸道吸收、促 進細胞組織對胰島 素的敏感性，並無直 接刺激胰島素分泌 之作用	一開始使用會 發生胃腸不適 情形，乳酸中毒 罕見
α-Glucosidase inhibitor	Acarbose	↓ 0.5-1.0%	作用為競爭型抑制 腸黏膜刷狀緣上 α-Glucosidase 之酵 素活性，減緩澱粉及 雙糖類在腸道分解 的速度，延緩腸道對 葡萄糖的吸收	最主要為胃腸 副作用，包括脹 氣、腹脹、腹 痛、腹瀉及腹鳴
Thiazolidinedione 類 衍 生 物	Pioglitazone 、 Rosiglitazone	↓ 1.0-2.0%	作用機轉為活化 PPAR-γ，增加脂 肪細胞攝取游離脂 肪酸及增加骨骼肌 攝取葡萄糖	體重增加及水 腫，引發心衰竭

(李等，2009)

## 七、胰島素( Insulin )

人體胰島素由胰臟蘭氏小島之  $\beta$  細胞所分泌，為兩條胜肽（21 個胺基酸之 A 鏈及 30 個胺基酸之 B 鏈）藉由兩個雙硫鍵鍵結而成的蛋白激素，其分子量約 6000 Da，主要功能為調解血糖 ( Dodson and Steiner, 1998 ; Wilcox, 2005 )。

### 1. 胰島素作用

胰島素不僅維持血糖之恆定，亦參與體內醣類、蛋白質及脂質之代謝 ( Dimitriadis *et al.*, 2011 ) (圖 2-11)。

#### (1) 醣類代謝

抑制糖質新生作用 ( gluconeogenesis )、降低葡萄糖之生成、刺激肝醣合成 ( glycogen )、抑制肝醣分解作用 ( glycogenolysis ) 及促進葡萄糖分解 ( Shepherd and Kahn, 1999 )。

#### (2) 蛋白質代謝

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

#### (3) 脂質代謝

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



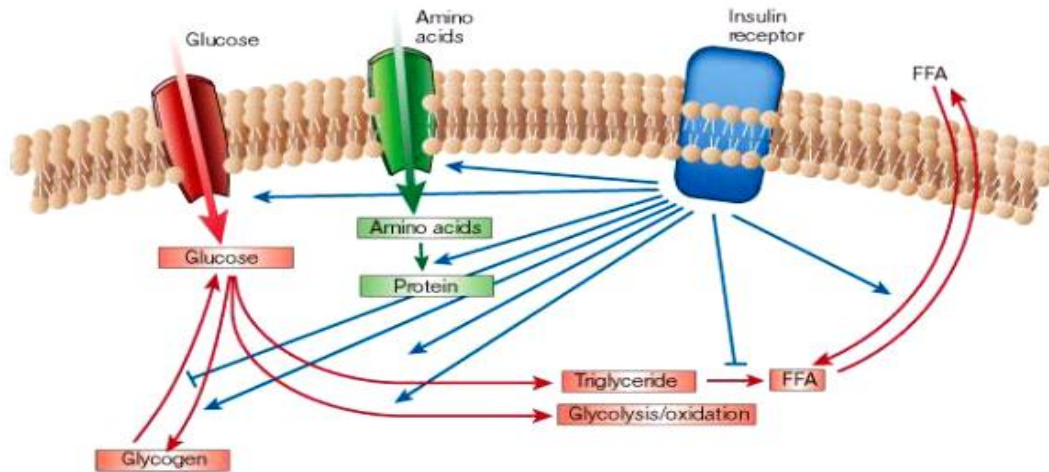


圖2-11、胰島素之代謝調控。

( Saltiel and Kahn, 2001 )

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

## 2. 胰島素作用於細胞

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

## 3. 胰島素細胞層面之傳訊

胰島素受器（insulin receptor, IR）由兩個  $\alpha$ -subunit 及兩個  $\beta$ -subunit 組成一個四聚體，而  $\alpha$ -subunit 位於細胞膜外會與胰島素結合，受器構型改變引發  $\beta$ -subunit 的自磷酸化（auto-phosphorylation），催化一連串的訊息傳遞作用，胰島素的訊息進入可活化 Protein B（PKB/Akt）激酶等下游因子，使 Akt 被磷酸化，產生一連串代謝反應，造成葡萄糖代謝、肝醣及脂質合成、蛋白質合成等作用，如圖2-12（Saltiel and Kahn, 2001; Taniguchi, 2006）。

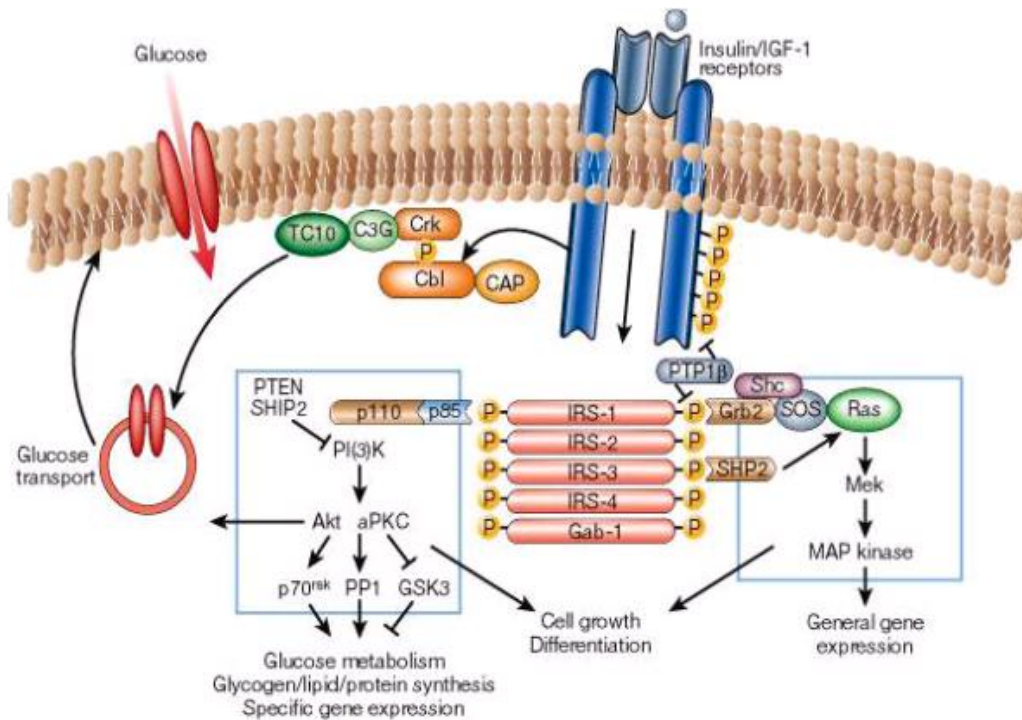


圖2-12、胰島素之傳訊路徑。( Saltiel and Kahn, 2001 )

Fig. 2-12 Signal transduction in insulin action.

#### 4. 胰島素阻抗性

胰島素阻抗性是指細胞對胰島素的靈敏度下降，導致胰島素與受器結合後無法使葡萄糖進入細胞，使血液循環中之胰島素調節體內能量代謝的能力下降 ( Zick, 2001 )。胰島素阻抗性會導致肝臟葡萄糖製造的增加、末梢組織對葡萄糖攝入能力減低、異常的脂肪分解等影響，並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  $\beta$  細胞分泌胰島素之能力逐漸喪失，會引發高血糖病症，所以胰島素阻抗性被認為是糖尿病發生的重要病因之一，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 ( Lillioja *et al.*, 1993 ; Reaven *et al.*, 1993 ; Bessesen, 2001 )。

## 八、高血糖與醣解酵素

碳水化合物為人體能量的主要來源，食物中澱粉多醣經由唾液、胃液或胰臟之  $\alpha$ -amylase 分解成較小分子的糊精、寡醣、雙醣，最後透過小腸膜表面絨毛刷緣上的  $\alpha$ -glucosidase 轉換成單醣的型式進入血液循環系統。而利用醣解酵素抑制劑可有效延緩碳水化合物的消化與葡萄糖的吸收，改善餐後高血糖之現象 (Tadera *et al.*, 2003)。

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

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

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

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

## 九、醣解酵素抑制劑之作用

醣解酵素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 )。

目前市面上常見之  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制劑 (  $\alpha$ -glucosidase inhibitor ) 為 acarbose 及 voglibose 等藥物，此類藥物能有效降低飯後血糖及胰島素濃度，但亦會引起病患出現腹鳴、下痢與頻頻排氣等腸胃不適之副作用，主要是因腸道中食物的消化吸收受到延遲，一部分未被消化完全的食物到達結腸，進而引發腸道菌的產氣發酵，通常情形不嚴重，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 )。

天然醣解酵素抑制劑包括類黃酮化合物，對於  $\alpha$ -glucosidase 與  $\alpha$ -amylase 具有良好的抑制作用，其中類黃酮 B 環上 C3'、C4'及 C5' 三個取代之 OH 基數目越多，其抑制效果越好；C2 與 C3 之間是雙鍵、3-OH、4-CO、5-OH 對於醣解酵素抑制都具有提升之作用 ( Tadera *et al.*, 2006 )。

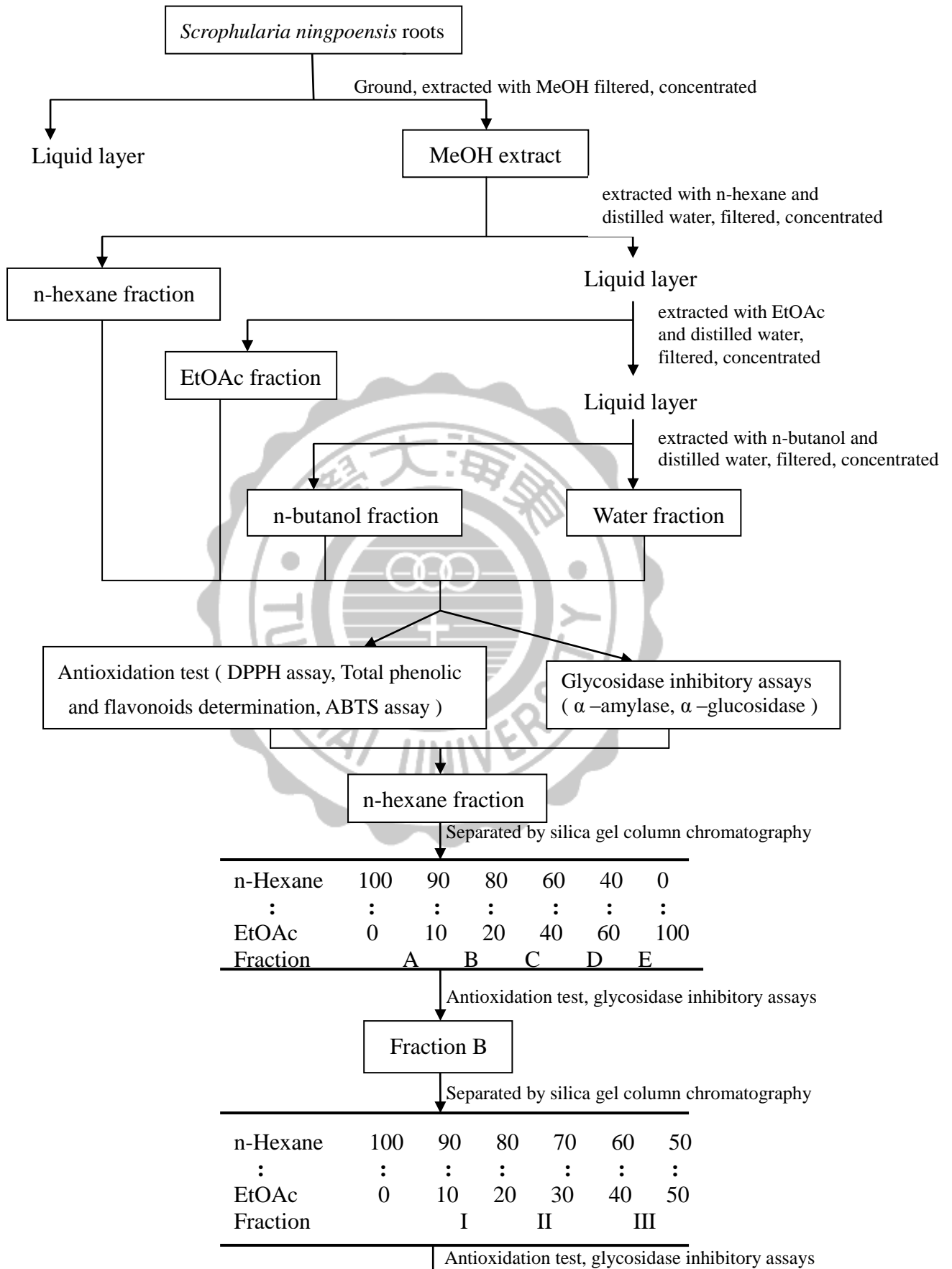
## 參、研究目的與實驗流程

### 一. 研究目的

消化性醣類會增加體內自由基，促使糖尿病發生的機率提高。長期高血糖促使葡萄糖自我氧化產生過多的自由基，並消耗體內中和自由基毒素的抗氧化因子，此外，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。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。

中藥材玄參 (*Scrophularia ningpoensis* roots)，文獻證實具有抗發炎、抗菌、降血壓等生理功能，但對於血糖調控之研究卻相當少，因此本研究探討玄參之抗氧化性並評估其對醣解酵素之抑制作用，期望玄參具醣解酵素抑制作用進而對糖尿病顯著改善功效。實驗中途因發現玄參正己烷萃取物富含脂質，且具有很強的  $\alpha$ -glucosidase 酵素抑制活性，所以特別針對不同油脂種類、含量及玄參脂肪酸組成對於  $\alpha$ -glucosidase 酵素活性之影響進行探討。

## 二. 實驗流程



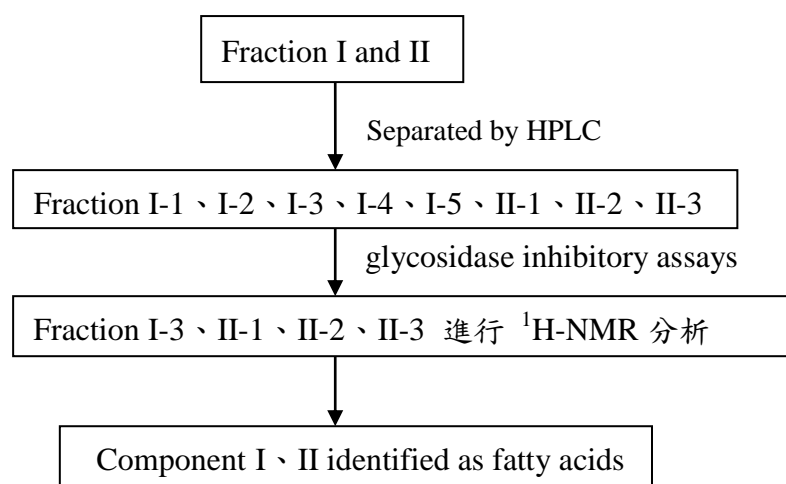


圖3-1、玄參正己烷區分物抗氧化及醣解酵素抑制活性成分之分離純化實驗流程圖。

Fig. 3-1 Scheme on isolated of antioxidative and glycosidase inhibitory components from n-hexane fraction of Stems of *Scrophularia ningpoensis*.

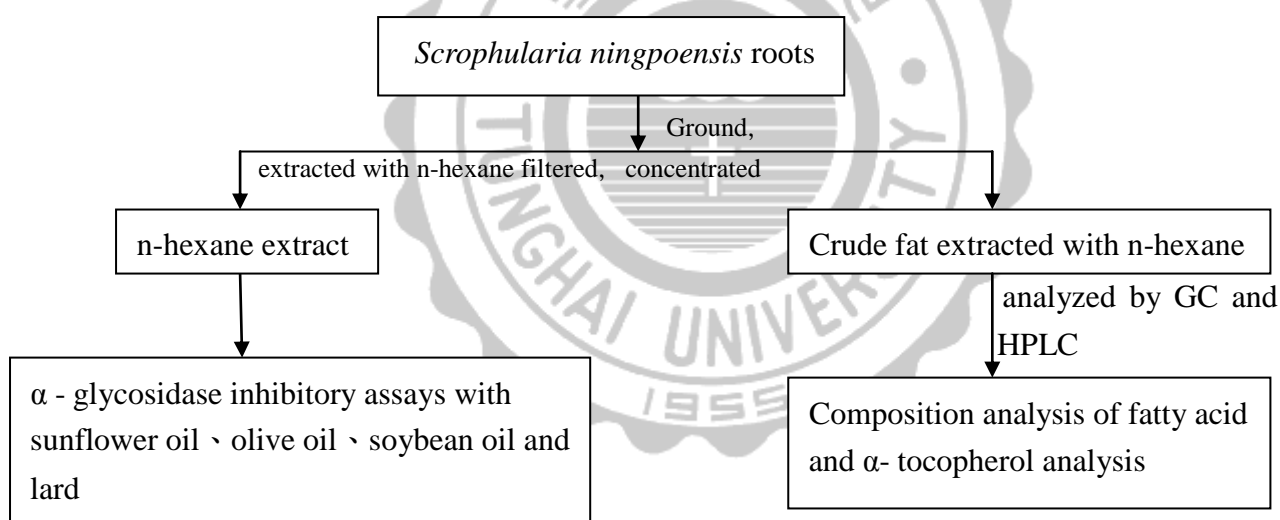


圖3-2、玄參正己烷區分物之脂質含量、脂肪酸組成、 $\alpha$ -生育醇含量及各種油脂對  $\alpha$ -glycosidase 酵素活性影響之實驗流程圖。

Fig. 3-2 Scheme on  $\alpha$ -glycosidase inhibitory activity and fatty acid composition and  $\alpha$ - tocopherol analysis of n-hexane fraction from *Scrophularia ningpoensis* roots and various edible oils.

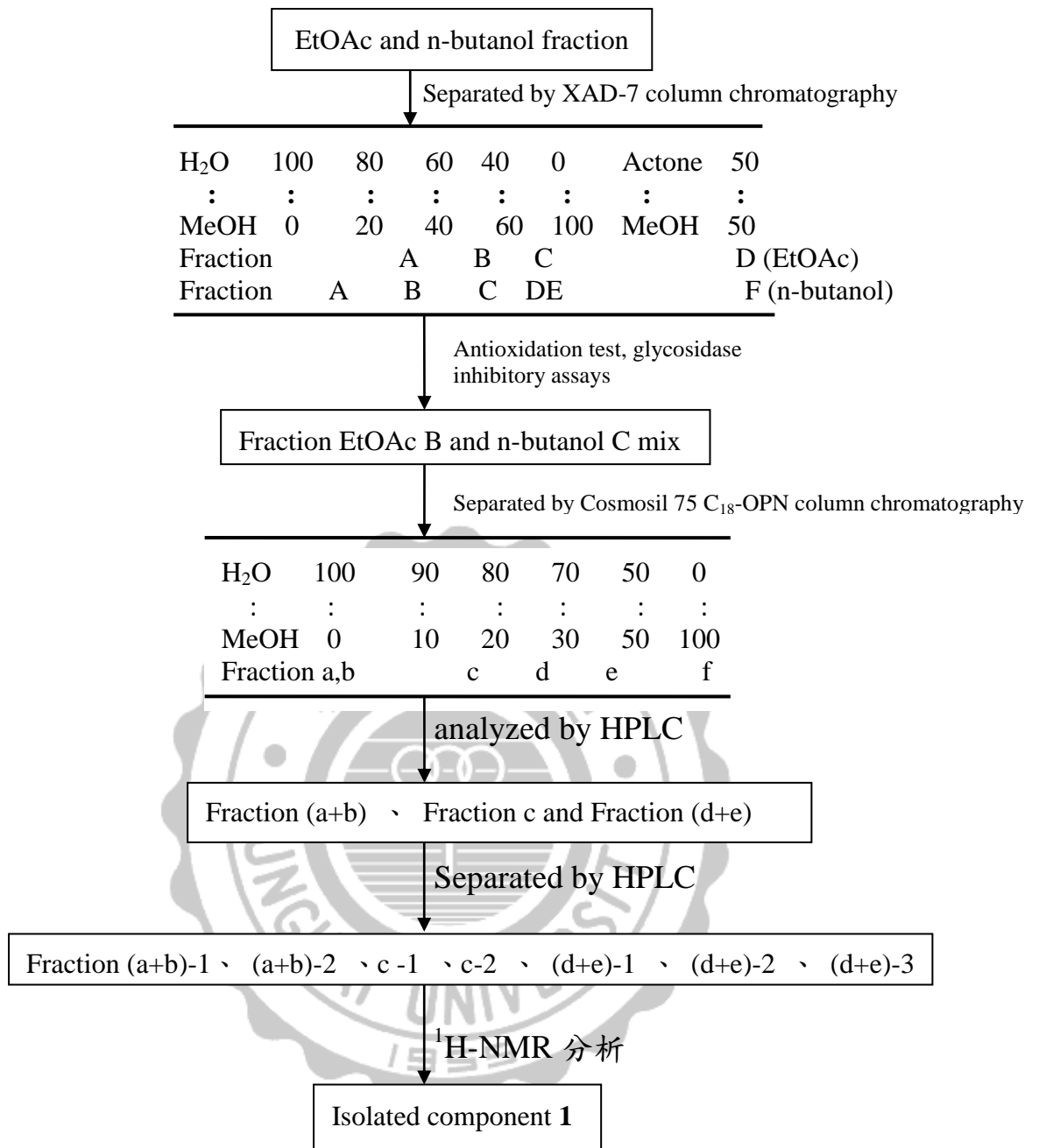


圖3-3、玄參乙酸乙酯及正丁醇區分物之抗氧化及醣解酵素抑制活性成分之分離純化實驗流程圖。

Fig. 3-3 Scheme on isolated of antioxidative and glycosidase inhibitory components from EtOAc and n-butanol fraction of *Scrophularia ningpoensis* roots.



## 肆、材料與方法

### 一、實驗材料

本實驗樣品為中藥材玄參 ( *Scrophularia ningpoensis* roots )，購自台中市龍井區中藥行，購買量 6 公斤，樣品利用磨粉機及刀口瓶磨碎以備用。

### 二、實驗試劑與溶劑

#### (1) 醣解酵素抑制試驗之試藥

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

## (2) 抗氧化試驗之試藥

品名	廠商
Gallic acid	Sigma-Aldrich ( USA )
Quercetin	Sigma-Aldrich( USA )
Sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	Sigma-Aldrich ( USA )
Folin-Ciocalteu's phenol reagent	Sigma-Aldrich ( USA )
Butylated hydroxyanisole ( BHA )	Sigma-Aldrich ( USA )
Aluminium nitrate ( $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ )	Merck ( Germany )
Potassium acetate ( $\text{CH}_3\text{COOK}$ )	Riedel-de Haën
2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl ( DPPH )	Fluka ( Buchs,Switzerland )
2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)( ABTS )	Sigma ( USA )
6-Hydroxy-2,5,7,8-teramethyl-2-2carboxylic acid ( trolox )	Aldrich ( USA )
Hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	Riedel-de Haën ( Seelze, Germany )
Peroxidase from horseradish ( 59 units/mg solid )	Sigma ( USA )
$\alpha$ -tocopherol	Sigma ( USA )

## (3) 純化成分層析及光譜分析之溶劑

品名	廠商
Methanol (工業級)	華興化學原料行
Acetone、Methanol、n-hexane、n-butanol、Ethyl acetate ( HPLC 級)	華興化學原料行
Methanol-D <sub>4</sub>	CIL 公司( USA)
Chloroform-d	友和貿易股份有限公司
Trifluoroacetic acid (TFA)	華興化學原料行

### 三、實驗儀器設備

#### (1) 充填式膠體液相層析管柱

- Silica gel 60 樹脂 ( 70-230 mesh ) 購自 Merck ( Germany )
- XAD-7 樹脂( 20-60 mesh )購自 Sigma 公司(St. Louis, MO, USA)
- ODS 層析充填劑 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 )
- 光二極體陣列層析器 ( L-7450A ) 購自 Hitachi 公司 ( Japan )
- 光二極體陣列層析器 ( L-7420A ) 購自 Hitachi 公司 ( Japan )
- 層析控制與資料處理器 ( D-7000 ) 購自 Hitachi 公司( Japan )
- 積分儀 ( D-7500 ) 購自 Hitachi 公司( Japan )
- 以下高效層析液相管柱 Develosil C30-5 ( 250×4.6 mm )、Develosil C60-5 ( 250×20 mm )、Develosil ODS-5 ( 250×4.6 mm )、Develosil ODS-5 ( 250×20 mm ) 均購自 Nomura Chemicals 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 300 MHz

#### (6) 40 °C 循環式恆溫烘箱購自華興化學原料行代理

#### (7) 氣相層析儀

#### (8) 手動式油脂萃取裝置

## 四、實驗方法

### 1. 樣品萃取

使用浸漬萃取方法，將 5281.8 g 乾燥中藥玄參顆粒，先以 20 L 工業級甲醇於室溫下分別重複萃取三次，抽氣過濾、濃縮後，依序利用正己烷、乙酸乙酯及正丁醇等溶劑與二次去離子水等體積混合後進行液液萃取，各二重複，以抽氣過濾收集上清液，所獲得之正己烷、乙酸乙酯、正丁醇及水層等四種萃取液在低於 40 °C 下以旋轉式減壓濃縮機濃縮至適當體積，並計算產率後充氮儲藏於 4 °C 冰箱備用。玄參各種溶劑萃取物及製備流程如 (圖4-1) 所示。

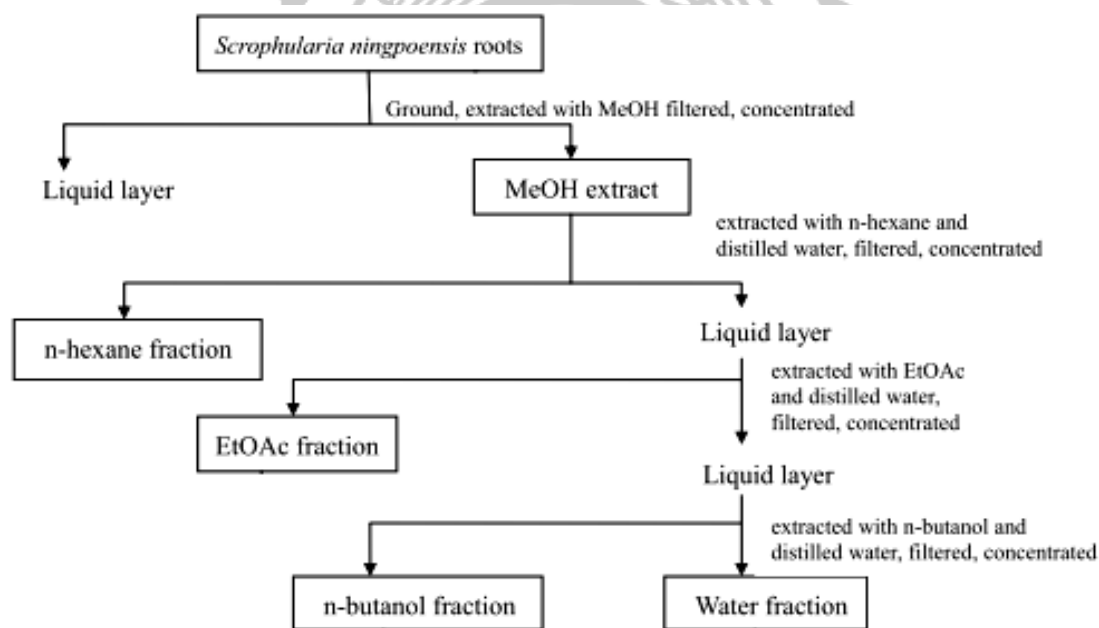


圖4-1、玄參各種溶劑萃取物之製備。

Fig. 4-1 The solvent extracts prepared from *Scrophularia ningpoensis* roots.

## 2. 水分含量測定

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

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

$W_0$ ：秤量瓶淨重 (g)

$W_1$ ：樣品 + 秤量瓶重 (g)

$W_n$ ：乾燥達恆重時樣品 + 秤量瓶重 (g)

## 3. 總酚含量測定 (total phenolic compounds determination)

原理：Folin-Ciocalteu's phenol reagent 與酚類化合物之 OH 基反應，並產生由黃變藍之顏色變化，並檢測波長 735 nm 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  $\mu$ L 樣品及不同濃度之沒食子酸 (gallic acid) 標準品，加入 1 mL  $H_2O$  及 500  $\mu$ L Folin-Ciocalteu's phenol reagent，用力搖勻混合，再加入 2.5 mL 20 %  $Na_2CO_3$ ，混合均勻，於室溫下靜置 20 分鐘，以分光光度計檢測波長 735 nm 下之吸光值。另外再以不添加 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 之試驗當作空白對照組。製

作標準曲線 (附錄一)，以換算相對之沒食子酸當量，以 mg gallic acid equivalent / g 玄參萃取物表示。

#### 4. 總類黃酮含量測定 (Flavonoid determination)

原理：類黃酮化合物於鹼性條件下可與硝酸鋁形成穩定的黃色錯合物，並檢測波長 415 nm 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  $\mu$ L 樣品及不同濃度之槲皮素 (quercetin) 標準品，加入 10 % 硝酸鋁及 1 M 醋酸鉀各 50  $\mu$ L，再加入 1.4 mL 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 415 nm 下之吸光值。另外再以不添加硝酸鋁之試驗當作空白對照組。製作標準曲線 (附錄二)，以換算相對之槲皮素當量，以 mg quercetin equivalent / g 玄參萃取物表示。

#### 5. DPPH 自由基清除能力試驗

參照 Shimada *et al.* (1992) 的方法測定，DPPH 自由基清除能力常用來評估抗氧化物其提供質子的能力。帶有自由基的 DPPH 甲醇溶液本身為一深紫色化合物，此化合物在 517 nm 下有最大吸光值，當加入具抗氧化作用之物質時，抗氧化物質會提供質子給 DPPH 自由基 (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical)，使其形成一個非自由基的 DPPH，而不帶電子的 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 的顏色較淡，吸光值亦會隨之降低，利用相對於控制組之吸光值下降百分比，可判斷樣品清除 DPPH 自

由基能力之強弱。DPPH 自由基清除能力隨吸光值下降，清除能力越佳。

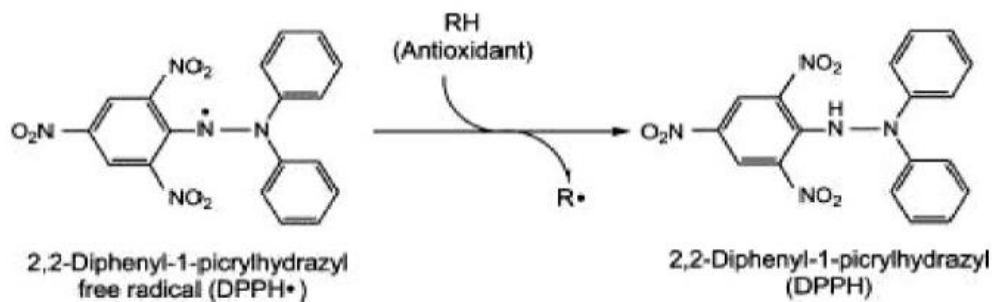
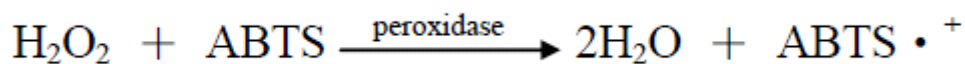


圖4-2、 DPPH 自由基清除作用之反應式。

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

## 6. 總抗氧化能力測定(Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC )

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



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

## 7. $\alpha$ -amylase 抑制作用測定

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

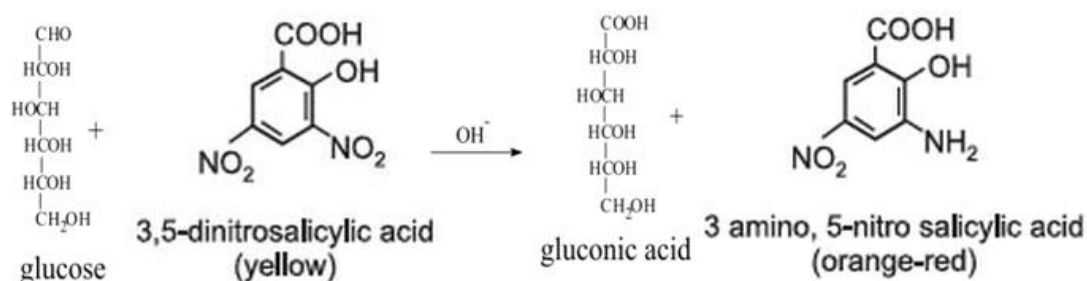


圖4-3、葡萄糖之呈色反應。

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



## 8. $\alpha$ -glucosidase 抑制作用測定

參考 Shim (2003) 及林 (2008) 等人之方法並稍加修飾，將欲檢測之樣品濃度配製成 (0.1mg/mL)，取 100  $\mu$ L 待測樣品與 20  $\mu$ L 之  $\alpha$ -glucosidase 酵素液 (1U/mL) 於 1.5 mL 離心管當中，隨之加入 380  $\mu$ L 0.53 mM 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)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  充分混合，使酵素失活終止其反應，以分光光度計測其在 400 nm 下的吸光值。而控制組則以 0.1 M 的磷酸緩衝液 (pH 6.8) 取代萃取液，背景組是指只有萃取物的吸光值，僅需加入萃取物，而酵素與 p-NPG 皆以磷酸緩衝液代替。

抑制率之計算方式如下：

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

A. 實驗組: 酵素+基質+萃取物

B. 控制組: 酵素+基質+甲醇

C. 背景組: Buffer+基質+萃取物

## 9. 玄參抗氧化及醣解酵素抑制成分之萃取、分離與純化

玄參之甲醇萃取物及正己烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取物，利用醣解酵素抑制作用之結果顯示，其正己烷萃取物顯現較佳抑制率，經總酚、總類黃酮含量及 DPPH 自由基清除率和總抗氧化能力分析發現乙酸乙酯及正丁醇萃取物含較多總酚和總類黃酮含量，清除 DPPH 自由基能力也較高，故選取正己烷、乙酸乙酯及正丁醇三者萃取物進行抗氧化及醣解酵素抑制成分之分析。玄參正己烷、乙酸乙酯及正丁醇三者萃取物之抗氧化醣解酵素抑制成分之分離與純化流程。

### (1) 玄參正己烷萃取物矽膠充填式膠體液相管柱層析

首先以 Silica gel 充填於玻璃管柱 (950×40 mm)，再將具強醣解酵素抑制活性及抗氧化性之玄參正己烷萃取物溶解於甲醇後充填至管柱最頂層，其沖提液條件依序為正己烷：乙酸乙酯 (v/v) = 100:0、90:10、80:20、60:40、40:60、0:100 之混合溶劑，沖提液以每 250 mL 為收集單位，並以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，偵測波長 270 nm 之吸光值對收集瓶作圖進行區分，而後檢測各區分濃縮物之總抗氧化力、DPPH 自由基清除能力及醣解酵素抑制等活性。

### (2) 矽膠充填式膠體液相管柱層析

使用 Silica gel 充填於玻璃管柱 (950×40 mm)，再將具強醣解酵素抑制活性及抗氧化性之玄參正己烷萃取物沖提區分 B 溶解於甲醇後充填至管柱最頂層，其沖提液條件依序為正己烷：乙酸乙酯 (v/v) = 100:0、90:10、80:20、70:30、60:40、50:50 之混合溶

劑，沖提液以每 250 mL 為收集單位，並以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，偵測波長 270 nm 之吸光值對收集瓶作圖進行區分，而後檢測總抗氧化力、DPPH 自由基清除能力及醣解酵素抑制測試檢測各區分濃縮物之活性。

### (3) 高效液相層析分析

將上述量較多且醣解酵素抑制活性較佳之成分區分利用高效液相層析儀進行區分，先以分析型高效液相層析找尋分離條件，再依其沖提條件套用於製備型高效液相層析，重複收取及分離成八個區分，區分 I-1、I-2、I-3、I-4、I-5、II-1、II-2、II-3，而後利用總抗氧化力及醣解酵素抑制測試檢測各區分濃縮物之活性，最後選取醣解酵素抑制活性較佳之 I-3、II-1、II-2、II-3 四個區分濃縮定量後，進行結構鑑定。

高效液相層析條件敘述如下：

#### (3-1) 分析型高效液相層析【區分 I】

管柱：Develosil Si 30-5 ( 250×4.6 mm，日本Nomura 公司 )

沖提液：Hexane：EtOAc ( v/v )=90：10

流速：0.7 mL/min

偵測器：275 nm

(3-2) 製備型高效液相層析【區分 I】

管柱：Develosil Si 60-5 (250×20 mm，日本Nomura 公司)

沖提液：Hexane：EtOAc (v/v)=90：10

流速：2.5 mL/min

偵測器：275 nm

(3-3) 分析型高效液相層析【區分 II】

管柱：Develosil Si 30-5 (250×4.6 mm，日本Nomura 公司)

沖提液：Hexane：EtOAc (v/v)=80：20

流速：0.7 mL/min

偵測器：270 nm

(3-3) 製備型高效液相層析【區分 II】

管柱：Develosil Si 60-5 (250×20 mm，日本Nomura 公司)

沖提液：Hexane：EtOAc (v/v)=80：20

流速：2.5 mL/min

偵測器：270 nm

(4) 玄參乙酸乙酯萃取物 XAD-7 液相管柱層析

首先使用用 XAD-7 膠體充填於玻璃管柱 (510×56 mm)，再將具強抗氧化性及醣解酵素抑制活性之玄參乙酸乙酯萃取物溶解於甲醇後充填至管柱最頂層，其沖提液條件依序為水：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 250 mL 為收集單位，並以紫外線-可見光光譜儀掃描，偵測波長 260 nm 之吸光值對收集瓶作圖進行區分，而

後檢測各區分濃縮物之總抗氧化力、DPPH 自由基清除能力及醣解酵素抑制等活性。

#### (5) 玄參正丁醇萃取物 XAD-7 液相管柱層析

首先使用 XAD-7 膠體充填於玻璃管柱 (510×56 mm)，再將具強抗氧化性及醣解酵素抑制活性之玄參正丁醇萃取物溶解於甲醇後充填至管柱最頂層，其沖提液條件依序為水：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 250 mL 為收集單位，並以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，偵測波長 260 nm 之吸光值對收集瓶作圖進行區分，而後檢測各區分濃縮物之總抗氧化力、DPPH 自由基清除能力及醣解酵素抑制等活性。

#### (6) Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 液相管柱層析

使用 Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 膠體充填於玻璃管柱 (510×47 mm)，再將具強抗氧化性及醣解酵素抑制活性之玄參乙酸乙酯區分 B 及正丁醇區分 C 混合後溶解於甲醇充填至管柱最頂層，其沖提液條件依序為水：甲醇 (v/v)=100：0、90：10、80：20、70：30、50：50、0：100 之混合溶劑，沖提液以每 200 mL 為收集單位，並以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，偵測波長 260 nm 之吸光值對收集瓶作圖進行區分，而後檢測各區分濃縮物之總抗氧化力及 DPPH 自由基清除能力等活性。

## (7) 高效液相層析分析

將上述的沖提區分 a~e 利用高效液相層析儀進行區分，先以分析型高效液相層析找尋分離條件，再依其沖提條件套用於製備型高效液相層析，重複收及分離成七個區分，區分 (a+b)-1、(a+b)-2、c-1、c-2、(d+e)-1、(d+e)-2、(d+e)-3，最後將這七個區分濃縮定量後，進行結構鑑定。

高效液相層析條件敘述如下：

### (7-1) 分析型高效液相層析【區分 (a+b)】

管柱：Develosil ODS-5 (250×4.6 mm，日本Nomura 公司)

沖提液：H<sub>2</sub>O：醋酸 (v/v)=99.5：0.5

流速：0.7 mL/min

偵測器：260 nm

### (7-2) 製備型高效液相層析【區分 (a+b)】

管柱：Develosil ODS-5 (250×20 mm，日本Nomura 公司)

沖提液：H<sub>2</sub>O：醋酸 (v/v)=99.5：0.5

流速：2.5 mL/min

偵測器：260 nm

(7-3) 分析型高效液相層析【區分 c、(d+e)】

管柱：Develosil ODS-5 (250×4.6 mm，日本Nomura 公司)

沖提液：H<sub>2</sub>O：MeOH (v/v)=95：5

流速：0.7 mL/min

偵測器：260 nm

(7-4) 製備型高效液相層析【區分c、(d+e)】

管柱：Develosil ODS-5 (250×20 mm，日本Nomura 公司)

沖提液：H<sub>2</sub>O：MeOH (v/v)=95：5

流速：2.8 mL/min

偵測器：260 nm

(8) 純化物質之結構鑑定

<sup>1</sup>H-核磁共振 (<sup>1</sup>H-NMR) 光譜測定敘述如下：將純化之樣品依其極性溶於 methanol-d<sub>4</sub> 或 chloroform-d 中，以 VXR-300/51 型核磁共振光譜儀 (<sup>1</sup>H-NMR 以300MHz) 測定，獲得其 <sup>1</sup>H-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。

## 10. 玄參正己烷粗脂肪萃取、GC 脂肪酸種類 及 HPLC $\alpha$ -生育醇分析

### (1) 粗脂肪萃取

本實驗方法參考 (CNS5036, 2013)，原理：食品中脂肪含量的測定通常使用索氏 (Soxhlet) 萃取裝置，加入正己烷萃取，溶劑揮發冷凝後，再重覆利用溶劑，萃取出樣品之粗脂肪，經蒸發回收正己烷後，秤量受器，增加的重量即可求得正己烷萃出之物為粗脂肪 (crude fat)。精稱已成粉末之檢體 (3~5 g)，放入圓筒濾紙中，其上下輕塞適量脫脂棉後，置適當容器內於 100~105 °C 烘箱中乾燥 2~3 小時 (除去水分後，含有水分時，水溶性物質也同時溶出)，於乾燥器放冷，將圓筒濾紙置入萃取套管中，加入約 2/3 燒瓶容量之正己烷，置於 60~70 °C 加熱器上，萃取至少 8 小時後，取出圓筒濾紙，再將正己烷回收至圓底燒杯，使其揮發乾後，置於 100~105 °C 之烘箱中乾燥約 30 分鐘，移入乾燥器中放冷，稱重。

粗脂肪計算公式如下：

$$\text{粗脂肪}(\%) = \frac{W - W_0}{S} \times 100$$

$W_0$  = 圓底燒瓶之重量 (g)

$W$  = 抽出粗脂肪經乾燥後連燒瓶之重量 (g)

$S$  = 檢體重量 (g)



## (2) 利用 GC 進行脂肪酸種類分析

本實驗方法參考 (CNS6370, 2009) 首先將萃取的粗脂肪以正己烷溶解並定容至 10 mL，接著精取 1 mL 置入褐色玻璃瓶中，加入 1 N 氫氧化鈉甲醇溶液 1 mL，栓緊瓶蓋並以旋渦混合器震盪 30 秒，接著置入加熱器中，以 80 °C 皂化 15 分鐘，取出冷卻。加入 14 % 三氟化硼甲醇溶液 1 mL，栓緊瓶蓋，以旋渦混合器震盪 30 秒後，置於加熱器中，以 110 °C 酯化 15 分鐘，取出冷卻。精確量取正己烷 1 mL，加入上述之褐色玻璃瓶內，栓緊瓶蓋，以旋渦混合器震盪 1 分鐘，加入飽和氯化鈉溶液 6 mL，栓緊瓶蓋，輕輕震搖，靜置分層，取上層液至褐色樣品瓶中，加入少量無水硫酸鈉，供作檢液。接著精確量取檢液及標準溶液各 1  $\mu$ L，注入氣相層析儀中進行層析，就檢液與標準品所得波峰之滯留時間圖比較鑑別之。

## (3) 利用 HPLC 進行 $\alpha$ -生育醇分析

本實驗方法參考 (蘇, 1993)，首先將玄參正己烷區分物取一克的量，接著加入 12 ml 6 % BHA 甲醇溶液及 8 ml 60 % KOH 溶劑，置入圓底燒瓶後再加入 30 ml 甲醇進行冷凝回流 30 min，接著將皂化液濃縮至乾後以水：正己烷=20:20的比例回溶，並放置分液漏斗中，留下上層液後以去離子水將其洗至中性，最後加入無水硫酸鈉過夜，接著將其濃縮乾後以最少量的正己烷回溶，作為檢液。以中藥材芡實當作標準品對照 tocopherol 的種類，並以  $\alpha$ -tocopherol 作標準曲線計算玄參正己烷區分物中  $\alpha$ -tocopherol 的含量。

高效液相層析條件敘述如下：

管柱：Develosil Si 60-5 ( 250×4.6 mm ， 日本Nomura 公司 )

沖提液：*n*-hexane：dioxane：ethanol ( v/v/v )=958：40：2

流速：1.0 mL/min

偵測器：298 nm

## 11. 統計分析

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



## 伍、結果與討論

### 一、玄參甲醇萃取物各區分物之產率

使用浸漬萃取方法，將 5281.8 g 乾燥中藥玄參粉末，先以 20 L 工業級甲醇於室溫下分別重複萃取三次，抽氣過濾、濃縮後，再依序使用等體積的 HPLC 級正己烷、乙酸乙酯及正丁醇進行液液萃取，各二重複，以抽氣過濾收集上清液，所獲得之正己烷、乙酸乙酯、正丁醇及水層等四種區分物在低於 40 °C 下以旋轉式減壓濃縮機濃縮至適當體積後，產率如表5-1所示，以水層萃取物產率較高，濕重產率為 10.48 %，乾重產率為 11.9 %，其次為正己烷萃取物濕重產率為 1.01 %，乾重產率為 1.15 %，而乙酸乙酯萃取物濕重產率為 0.58 %，乾重產率為 0.66 %，而正丁醇濕重產率為 0.83 %，乾重產率為 0.94 %。

表 5-1、玄參四種溶劑之區分物產率

Table 5-1 Yields of the solvent fractions from *Scrophularia ningpoensis* roots

Extract	weight (g)	wet weight yeild (%)	dry weight yeild (%)
n-hexane	60.72	1.01	1.15
EtOAc	35.96	0.58	0.66
n-butanol	49.79	0.83	0.94
Water	628.73	10.48	11.9
Total	775.2	12.9	14.65

Sample wet weight: 4372.28 g

Sample dry weight: 4350.41 g

## 二、 玄參各溶劑區分物之總酚含量

由文獻得知植物之多酚類化合物對於其抗氧化性及生物活性扮演重要之角色 ( Castelluccio et al., 1995 ; Kalt et al., 1999 ) , Folin-Ciocalteu's assay 為一種廣泛應用於測量總酚類化合物的方法 , Folin-Ciocalteu's phenol reagent 可作用於酚類化合物結構上的 OH 基 , 並產生由黃變藍的呈色反應 ( Julkunen-Titto, 1985 ) 。本實驗以沒食子酸作為標準品 , 換算相對沒食子酸之當量。將四種溶劑 ( 正己烷、乙酸乙酯、正丁醇、水 ) 萃取物 , 進行總酚類化合物含量分析 , 從實驗結果 ( 表5-2 ) 顯示玄參四種萃取物中以正丁醇萃取物具有最高的總酚含量。

## 三、 玄參各溶劑區分物之總類黃酮含量

類黃酮 ( flavonoids ) 屬於酚類化合物之類物質 , 存在於許多蔬菜、水果中 , 類黃酮化合物於鹼性條件下可與硝酸鋁形成穩定的黃色錯合物 ( 唐等人 , 1996 ; 鍾 , 2003 ) 。本實驗以槲皮素作為標準品 , 換算相對槲皮素之當量。將四種溶劑 ( 正己烷、乙酸乙酯、正丁醇、水 ) 萃取物 , 進行總類黃酮化合物含量分析 , 從實驗結果 ( 表5-2 ) 顯示玄參正己烷萃取物具有較高的總類黃酮含量。

表 5-2、玄參各種溶劑區分物之總多酚、總類黃酮含量

Table 5-2 The total polyphenol and total flavonoid contents of different solvent extracts from *Scrophularia ningpoensis* roots.

Extract	Total polyphenol content	Total flavonoid content
n-hexane	18.82±0.006	18.79±0.002
EtOAc	103.93±0.005	3.36±0.014
n-butanol	133.71±0.003	1.29±0.003
Water	6.16±0.004	0.18±0.002

\*Total polyphenol content : mg gallic acid equivalent/ g *S. ningpoensis* roots extract

\*Total flavonoid content : mg quercetin equivalent/ g *S. ningpoensis* roots extract

#### 四、玄參各溶劑區分物之 DPPH 自由基清除能力

本實驗檢測四種溶劑（正己烷、乙酸乙酯、正丁醇、水）區分物之 DPPH 自由基消除作用。檢測結果顯示四種溶劑區分物中以玄參正丁醇區分物之消除 DPPH 自由基抗氧化性最好，其清除率達 93.56 % (圖5-1)。

#### 五、玄參各溶劑區分物之總抗氧化能力

本實驗檢測四種溶劑（正己烷、乙酸乙酯、正丁醇、水）區分物之總抗氧化能力以 ABTS 自由基清除能力表示。結果顯示四種溶劑區分物中以玄參正丁醇區分物之 ABTS 自由基清除能力較佳，其清除率達 99.18 % (圖 5-2)。

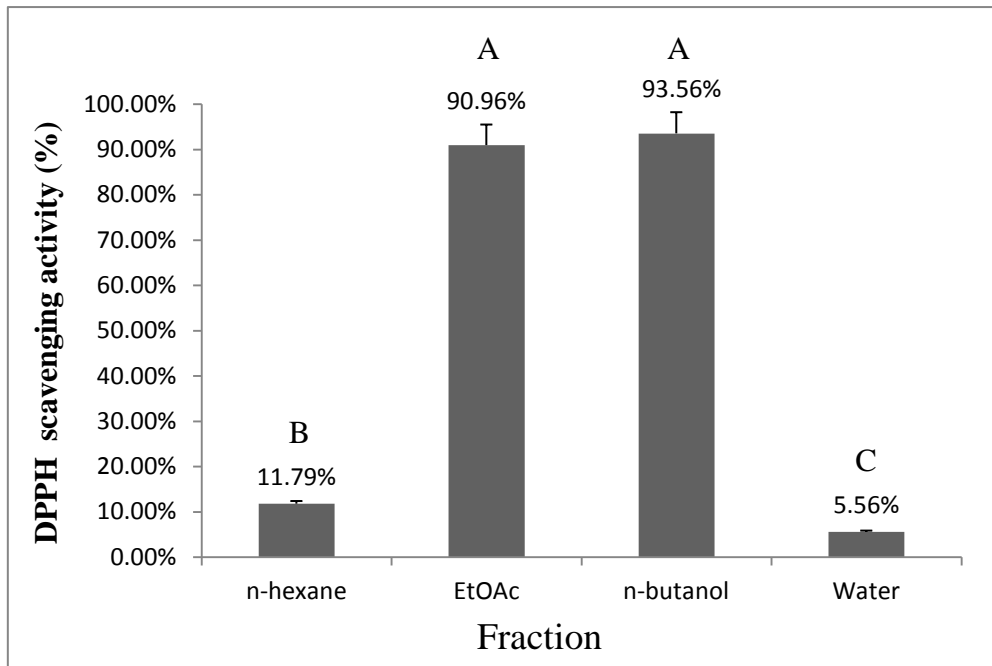


圖 5-1、玄參不同溶劑區分物 (1 mg/mL) 之 DPPH 自由基清除能力。

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

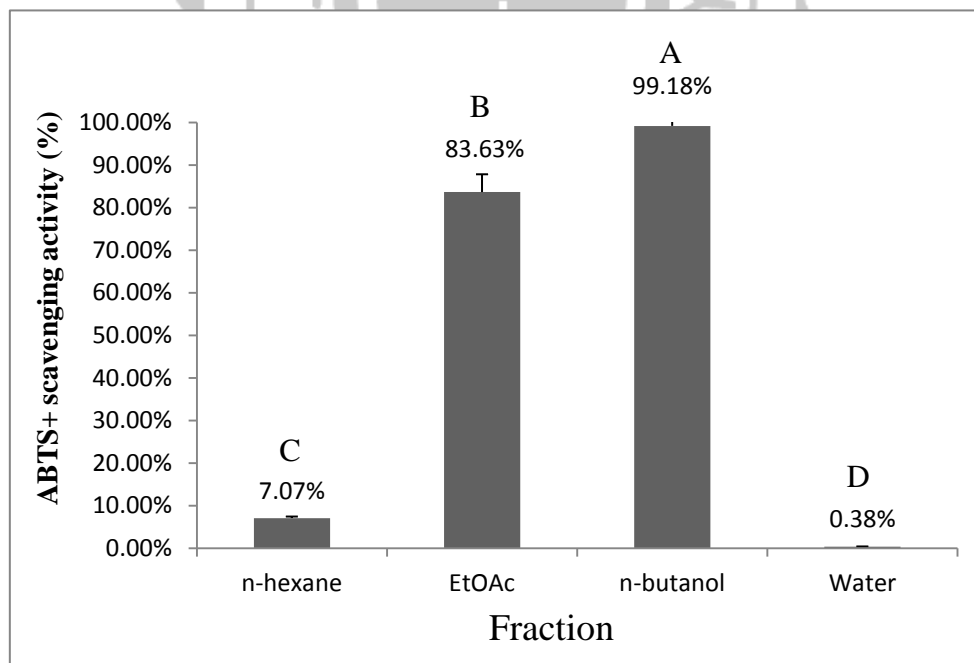


圖5-2、玄參不同溶劑區分物 (1 mg/mL) 之總抗氧化能力以 ABTS 自由基清除率表示。

Fig. 5-2 Scavenging activity of different solvent fractions at 1mg/mL level from *S. ningpoensis* roots on ABTS radical. Bars represent means±SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

## 六、 玄參各溶劑區分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 二種，玄參四種溶劑區分物進行  $\alpha$ -amylase 酵素抑制分析，實驗結果 (圖5-3) 顯示正丁醇區分物有較高之抑制率 15.94 %；此四種溶劑區分物進行  $\alpha$ -glucosidase 酵素抑制分析，實驗結果 (圖5-4) 顯示正己烷區分物有最高之抑制率 77.48 %。

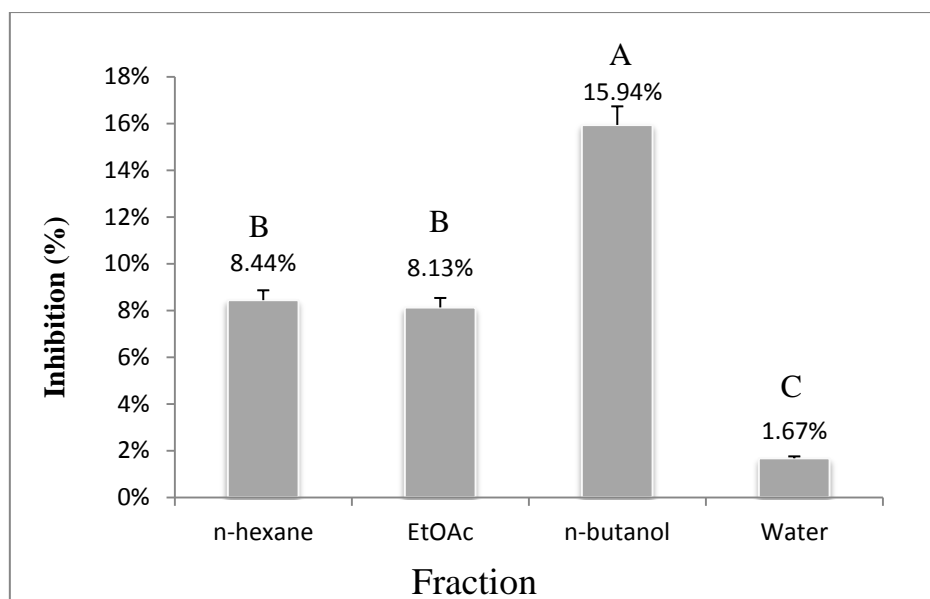


圖5-3、玄參不同溶劑區分物 (1 mg/mL) 對  $\alpha$ -amylase 之抑制率。

Fig. 5-3  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of different solvent fractions at 1mg/mL level from *S. ningpoensis* roots. Bars represent means $\pm$ SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

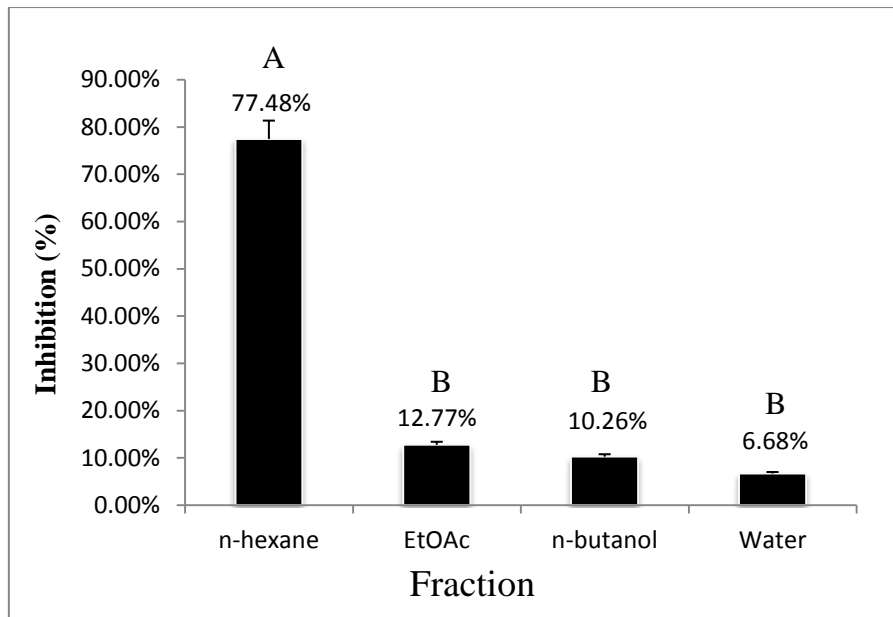


圖5-4、玄參不同溶劑區分物 (0.1 mg/mL) 對  $\alpha$ -glucosidase 之抑制率。  
 Fig. 5-4  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of different solvent fractions at 0.1mg/mL level from *S. ningpoensis* roots. Bars represent means $\pm$ SD, n=3. Means with different letters are significant different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

## 七、玄參正己烷區分物抗氧化及醣解酵素抑制活性成分之分離

### 1. 玄參正己烷區分物之矽膠液相管柱層析

玄參正己烷萃取物預先以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，因其在波長 270 nm 具有最大吸收值，故選取 270 nm 為液相管柱層析物質之偵測波長。首先以 Silica gel 充填於玻璃管柱 (950×40 mm)，其沖提液條件依序為正己烷:乙酸乙酯 (v/v) =100:0、90:10、80:20、60:40、40:60、0:100 之混合溶劑，沖提液以每 250 mL 為收集單位，並以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，偵測波長 270 nm 之吸光值對收集瓶作圖進行區分，共取 5 個區分，將 5 個區分物依序命名為區分 A、B、C、D、E (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)、總抗氧化能力(圖5-7)檢



測，及醣解酵素抑制作用測試(圖5-8)。綜合抗氧化測試及醣解酵素抑制活性試驗結果，五個區分物中，以區分 A 具較佳的抗氧化活性，而區分 B 則具有較佳的醣解酵素抑制作用，因此以醣解酵素抑制作用為主，將區分 B 進行更進一步分析。

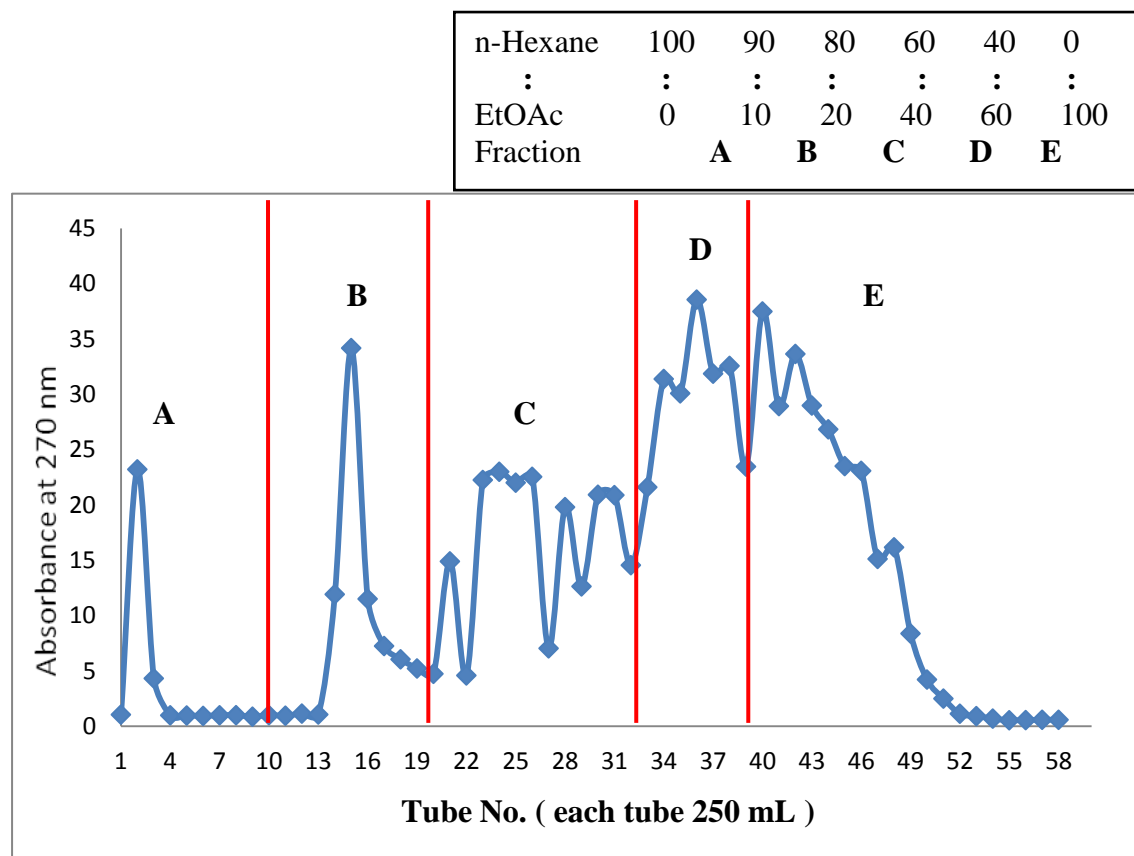


圖5-5、玄參正己烷區分物之矽膠液相管柱層析圖。

Fig. 5-5 Silica gel liquid column chromatogram of eluted fractions from *n*-hexane fraction of *S. ningpoensis* roots.

表 5-3、玄參正己烷區分物經矽膠液相層析後各沖提區分之產率

Table 5-3 Yields of fractions eluted from *n*-hexane fraction of *S. ningpoensis* roots by silica gel liquid column chromatography

Fraction	Weight (g)	Yield (%) <sup>a</sup>
A	4.82	7.93
B	20.5	33.76
C	3.36	5.53
D	0.51	0.83
E	1.85	3.04

<sup>a</sup>Sample weight : 60.72 g

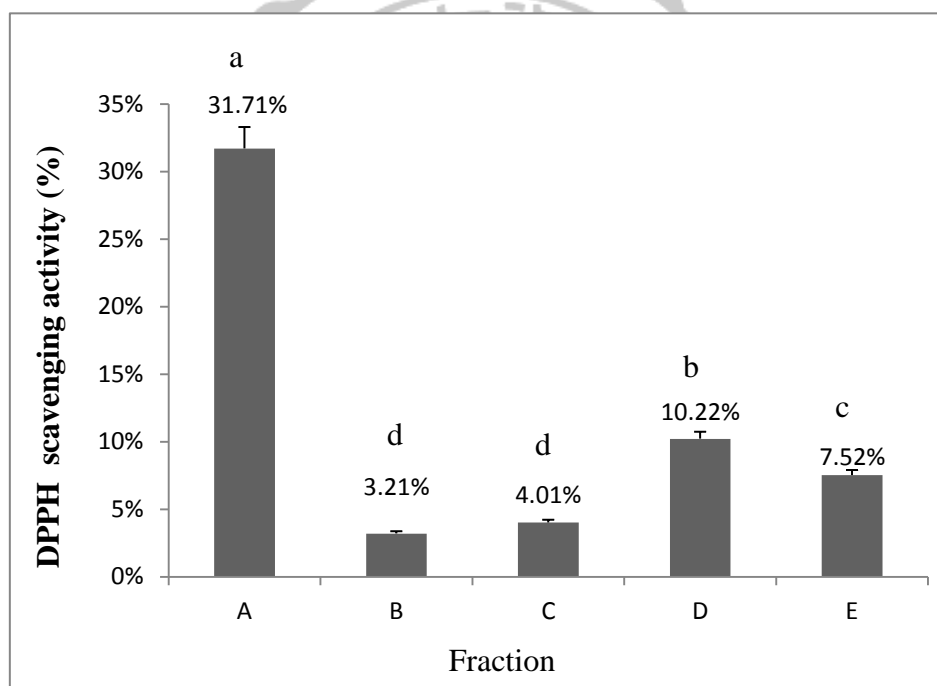


圖5-6、玄參正己烷區分物經矽膠液相層析後各沖提區分（1 mg/mL）之 DPPH 自由基清除能力。

Fig. 5-6 DPPH radical scavenging activity of eluted fractions at 1mg/mL level from *n*-hexane fraction of *S. ningpoensis* roots by silica gel liquid column chromatogram. Bars represent means±SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

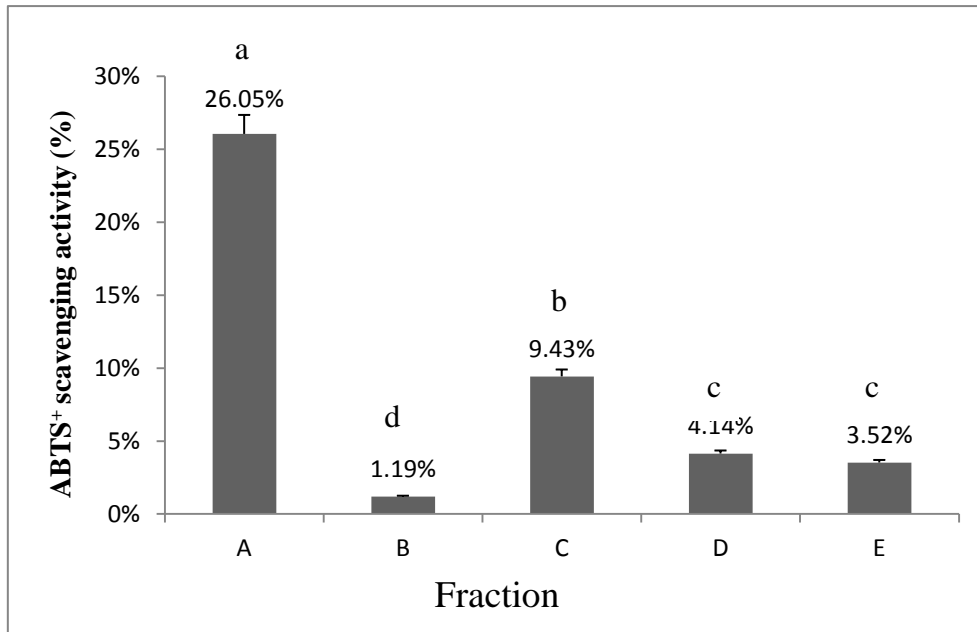


圖5-7、玄參正己烷區分物經矽膠液相層析後各沖提區分（1 mg/mL）之總抗氧化力以 ABTS 自由基清除率表示。

Fig. 5-7 ABTS radical scavenging activity of eluted fractions at 1mg/mL level from *n*-hexane fraction of *S. ningpoensis* roots by silica gel liquid column chromatography. Bars represent means±SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

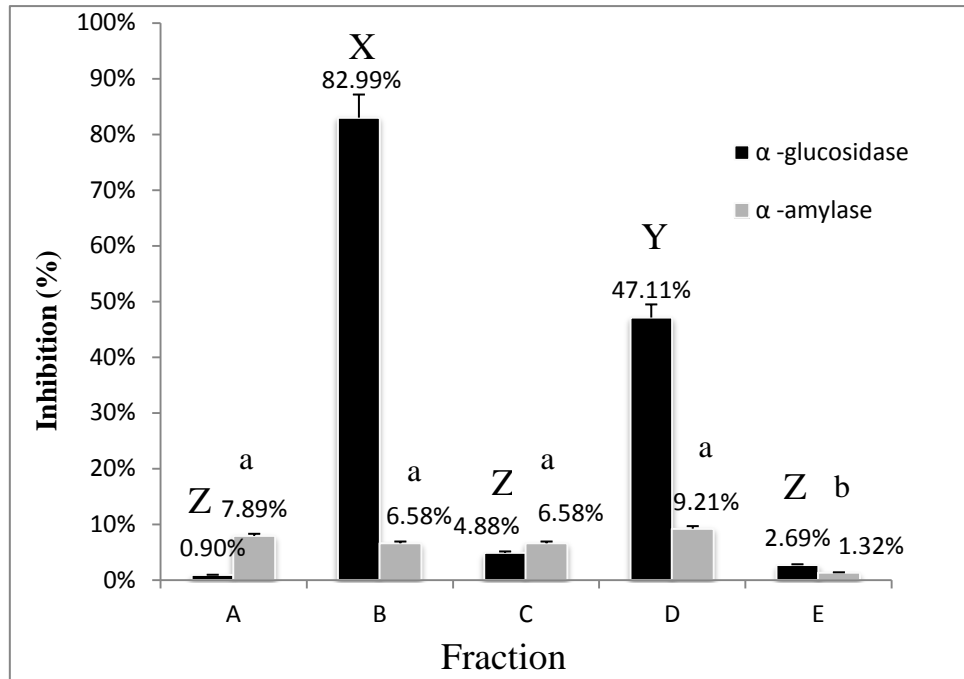


圖5-8、玄參正己烷區分物經矽膠液相層析後各沖提區分 (1mg/mL) 之  $\alpha$ -amylase 及各沖提區分 (0.1 mg/mL) 之  $\alpha$ -glucosidase 之抑制率。  
 Fig. 5-8  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of eluted fractions at 1mg/mL level and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of eluted fractions fractions at 0.1mg/mL level from *n*-hexane fraction of *S. ningpoensis* roots by silica gel liquid column chromatography. Bars represent means $\pm$ SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

## 2. 玄參正己烷區分物區分 B 之矽膠液相管柱層析

如同上述，將區分 B 沖提區分液預先以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，因其在波長 270 nm 具有最大吸收值，故選取 270 nm 為液相管柱層析物質之偵測波長。將上述區分 B 濃縮物懸浮置入充填 Silica gel 膠體之玻璃管柱 (950 $\times$  40 mm) 進行液相管柱層析，其沖提液條件依序為正己烷:乙酸乙酯 (v/v) = 100:0、90:10、80:20、70:30、60:40、50:50 之混合溶劑，沖提液以每 250 mL 為收集單位，並以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，偵測波長 270 nm 之吸

光值對收集瓶作圖進行區分，共取 3 個區分，將個區分物依序命名為區分 I、II、III (圖5-9)，其產率如表5-4所示。將此 3 個區分進行DPPH 自由基清除能力(圖5-10)、總抗氧化能力(圖5-11)檢測，及醣解酵素抑制作用測試(圖5-12)。結果顯示 I、II、III 三者的抗氧化能力並沒有很強，最後以產率及醣解酵素抑制作用為主，選取區分 I 及 II 進行 HPLC 之純化分離。

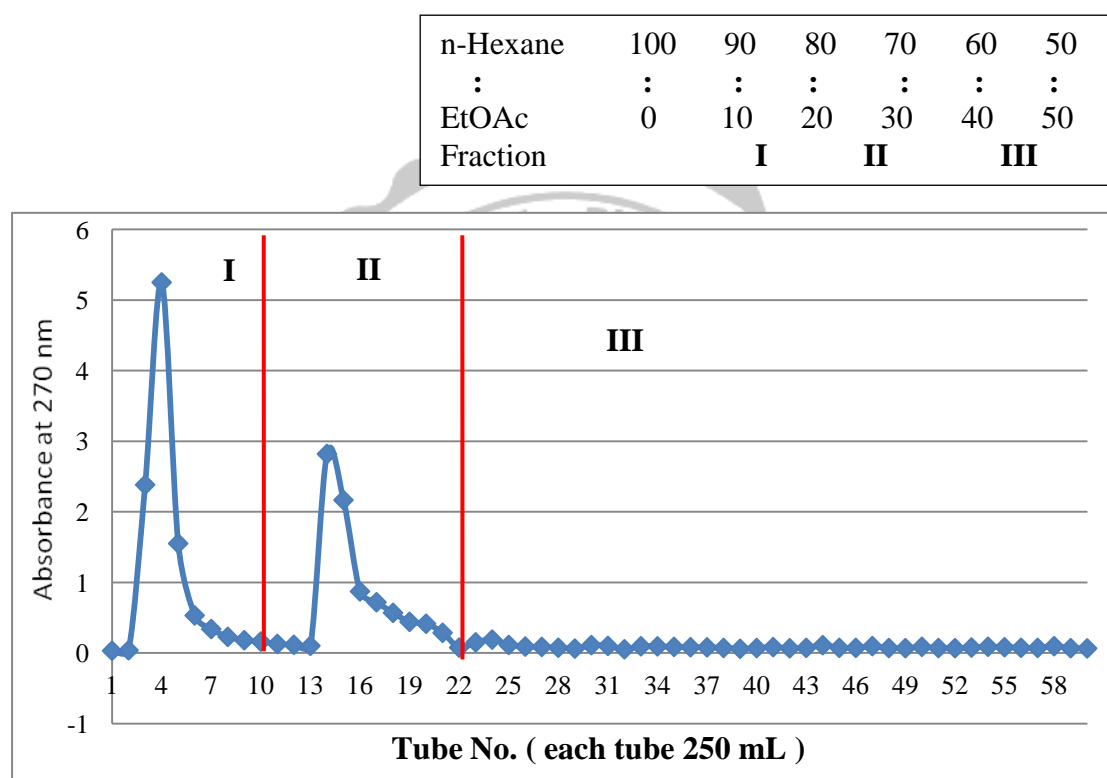


圖5-9、玄參正己烷區分物區分 B 之矽膠液相管柱層析圖。

Fig. 5-9 Silica gel liquid column chromatogram of eluted fractions from fraction B of *n*-hexane fraction of *S. ningpoensis* roots.

表 5-4、玄參正己烷區分物區分 B 經矽膠液相層析後各沖提區分之產率  
 Table 5-4 Yields of eluted fractions from fraction B of *n*-hexane fraction of *S. ningpoensis* roots by silica gel liquid column chromatography

Fraction	Weight (g)	Yield (%) <sup>a</sup>
I	2.42	11.82
II	5.28	25.78
III	1.04	5.1

<sup>a</sup>Sample weight ( Fr .B ) : 20.5 g

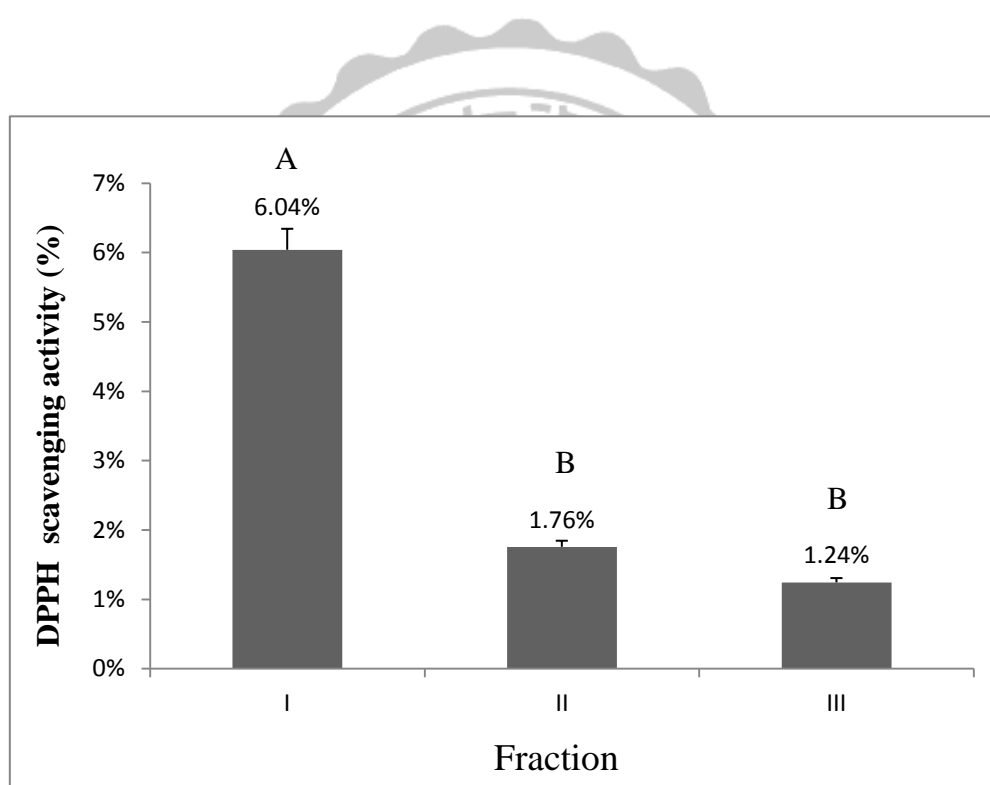


圖5-10、玄參正己烷區分物區分 B 經矽膠液相層析後各沖提區分 (1 mg/mL) 之 DPPH 自由基清除能力。

Fig. 5-10 DPPH radical scavenging activity of eluted fractions at 1mg/mL level from fraction B of *n*-hexane fraction of *S. ningpoensis* roots by silica gel liquid column chromatography. Bars represent means±SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

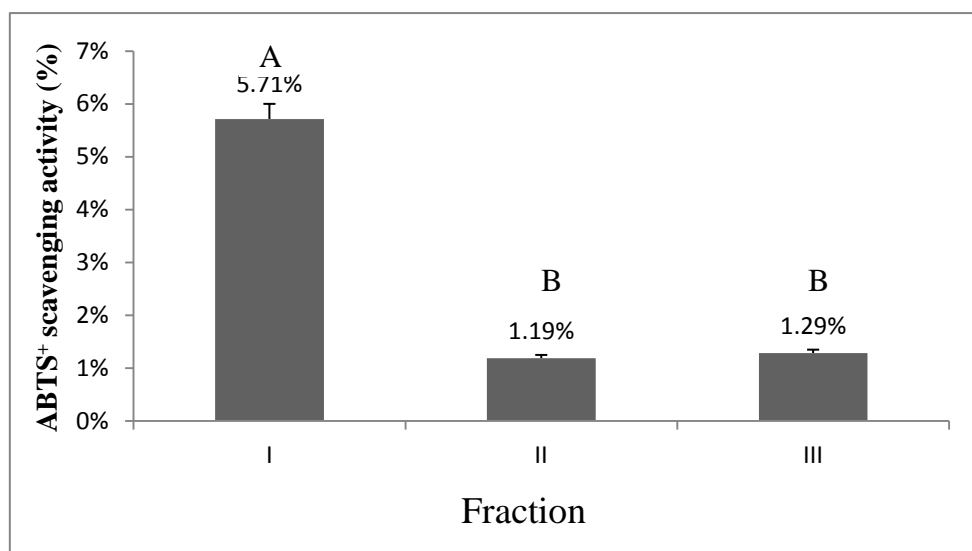


圖5-11、玄參正己烷區分物區分 B 經矽膠液相層析後各沖提區分 ( 1 mg/mL ) 之總抗氧化力，以 ABTS 自由基清除率表示。

Fig. 5-11 ABTS radical scavenging activity of eluted fractions at 1mg/mL level from fraction B of *n*-hexane fraction of *S. ningpoensis* roots by silica gel liquid column chromatography. Bars represent means±SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

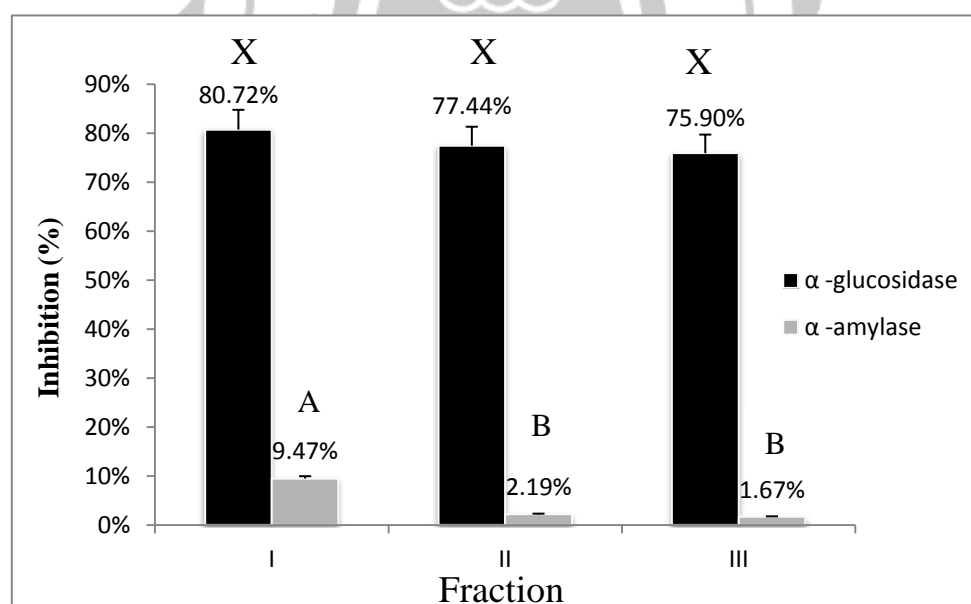


圖5-12、玄參正己烷區分物區分 B 經矽膠液相層析後各沖提區分 (1 mg/mL ) 之 $\alpha$ -amylase 及各沖提區分 (0.1 mg/mL ) 之 $\alpha$ -glucosidase 之抑制率。

Fig. 5-12  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of eluted fractions at 1mg/mL level and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of eluted fractions at 0.1mg/mL level from fraction B of *n*-hexane fraction of *S. ningpoensis* roots by silica gel liquid column chromatography. Bars represent means±SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

### 3. 玄參正己烷區分物區分 I 之 HPLC 分析及製備

將上述量較多且醣解酵素抑制活性佳之成分區分 I 沖提液，預先以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，因其在波長 275 nm 具有最大吸收值，故選取 275 nm 為液相管柱層析物質之偵測波長。將玄參正己烷萃取物區分 I 濃縮至乾，爾後溶於甲醇，經由 0.45  $\mu\text{m}$  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 Hexane : EtOAc (v/v) = 90 : 10，流速 0.7 ml/min，偵測波長為 275 nm。接著利用相同的移動相與波長條件，流速為 2.5 mL/min 之製備型高效液相層析儀進行分離，重覆收集層析圖上滯流時間相同主要波峰之沖提區分，得到 I-1、I-2、I-3、I-4、I-5 五個區分(圖5-13)，其產率如表5-5，同時進行醣解酵素抑制作用(圖5-14)檢測各區分濃縮物之活性，最後選取 I-3 檢測  $^1\text{H-NMR}$  的光譜(圖5-17)，再解析光譜及比對文獻資訊進行結構鑑定。

### 4. 玄參正己烷區分物區分 II 之 HPLC 分析及製備

將上述量較多且醣解酵素抑制活性次佳之成分區分 II 沖提液，預先以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，因其在波長 270 nm 具有最大吸收值故選取 270 nm 為液相管柱層析物質之偵測波長。將玄參正己烷萃取物區分 II 濃縮至乾，爾後溶於甲醇，經由 0.45  $\mu\text{m}$  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 Hexane : EtOAc (v/v) = 80 : 20，流速 0.7 ml/min，偵測波長為 270 nm。接著利用相同的移動相與波長條件，流速為 2.5 mL/min 之製備型高效液相層析儀進行分離，重覆收集層析圖上滯流



時間相同主要波峰之沖提區分，得到 II-1、II-2、II-3 三個區分 (圖5-15)，其產率如表5-6，同時進行醱解酵素抑制作用(圖5-16)檢測各區分濃縮物之活性，最後將三者檢測  $^1\text{H-NMR}$  的光譜(圖5-18、5-19、5-20)，再解析光譜及比對文獻資訊進行結構鑑定。

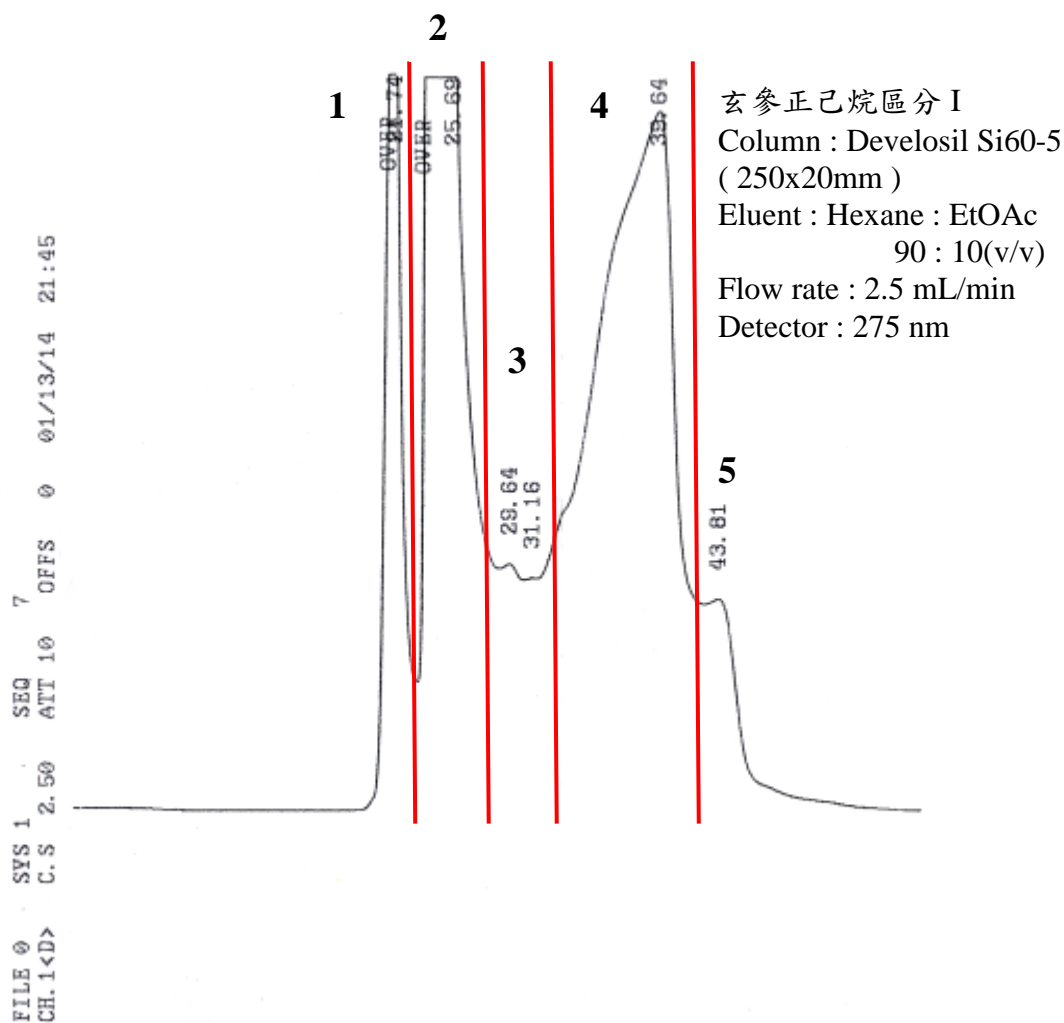


圖5-13、玄參正己烷區分物區分 I 之製備型 HPLC 圖。

Fig. 5-13 Preparative HPLC chromatogram of isolated components from fraction I of *n*-hexane fraction of *S. ningpoensis* roots.

表 5-5、玄參正己烷區分物區分 I 經 HPLC 層析後各沖提區分之產率  
 Table 5-5 Yields of eluted fractions from fraction I of *n*-hexane fraction of *S. ningpoensis* roots by HPLC chromatography

Fraction	Weight(g)	Yield(%) <sup>a</sup>
I-1	0.368	15.2
I-2	1.21	50
I-3	0.06	2.48
I-4	0.137	5.66
I-5	0.17	7.02

<sup>a</sup>Sample weight ( Fr.I ): 2.42 g

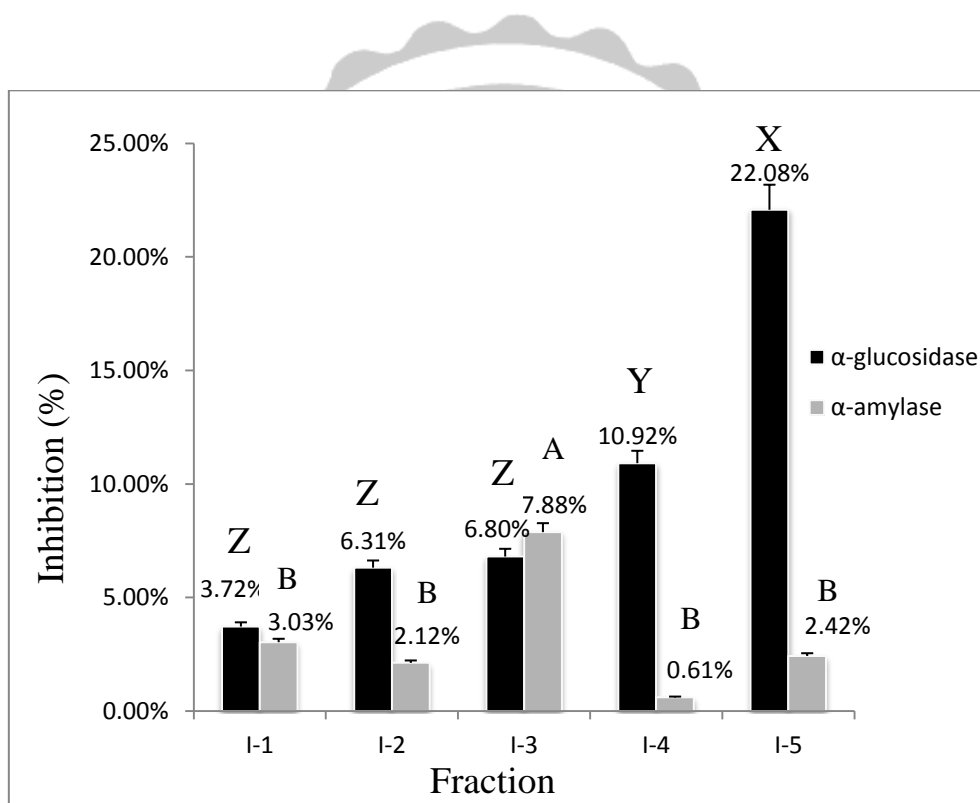


圖5-14、玄參正己烷區分物區分 I 經 HPLC 層析後各沖提區分 ( 1 mg/mL ) 之  $\alpha$ -amylase 及各沖提區分 ( 0.1 mg/mL ) 之  $\alpha$ -glucosidase 之抑制率。

Fig. 5-14  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of eluted fractions at 1mg/mL level and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of eluted fractions at 0.1mg/mL level from fraction I of *n*-hexane fraction of *S. ningpoensis* roots by HPLC chromatography. Bars represent means $\pm$ SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

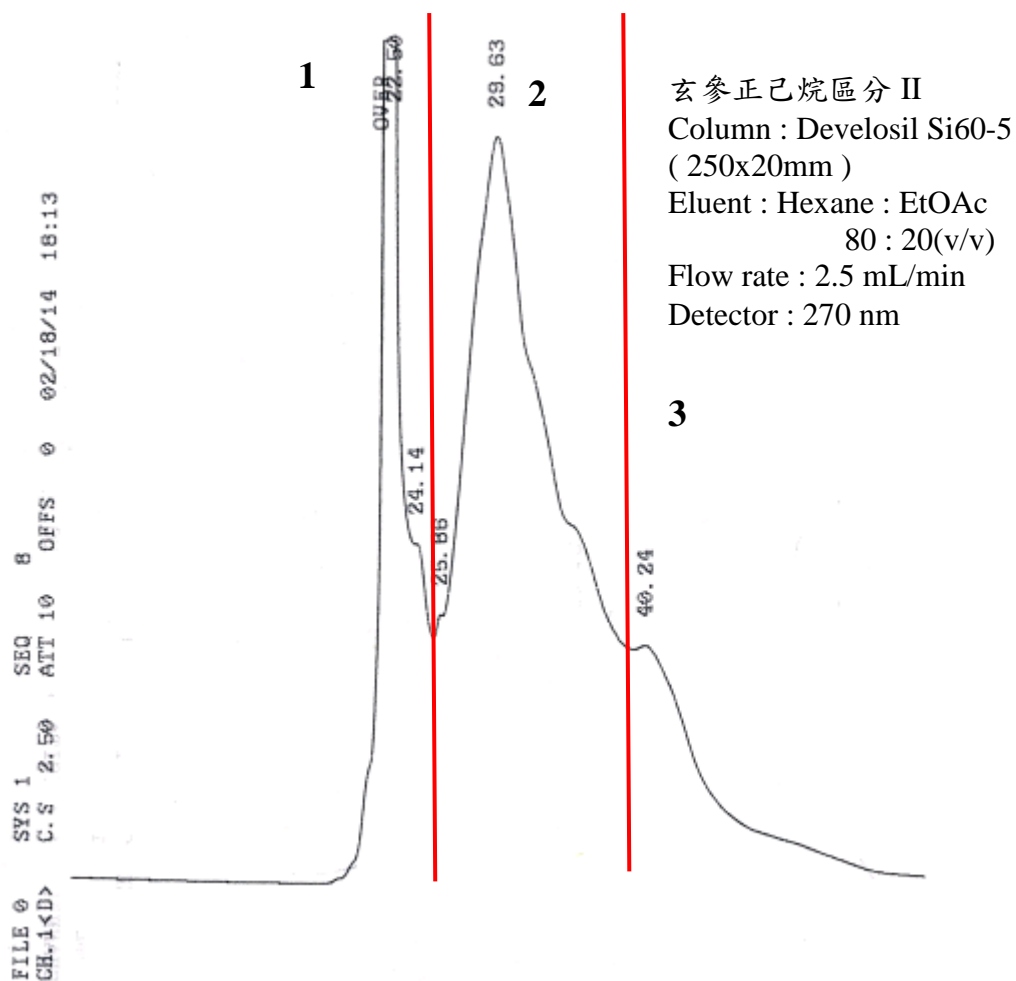


圖5-15、玄參正己烷區分物區分 II 之製備型 HPLC 圖。

Fig. 5-15 Preparative HPLC chromatogram of isolated components from fraction II of *n*-hexane fraction of *S. ningpoensis* roots.

表 5-6、玄參正己烷區分物區分 II 經 HPLC 層析後各沖提區分之產率

Table 5-6 Yields of eluted fractions from fraction II of *n*-hexane fraction of *S. ningpoensis* roots by HPLC chromatography

Fraction	Weight (g)	Yield (%) <sup>a</sup>
II-1	0.56	10.6
II-2	0.67	12.7
II-3	3.34	63.6

<sup>a</sup>Sample weight (Fr .II ) : 5.28 g

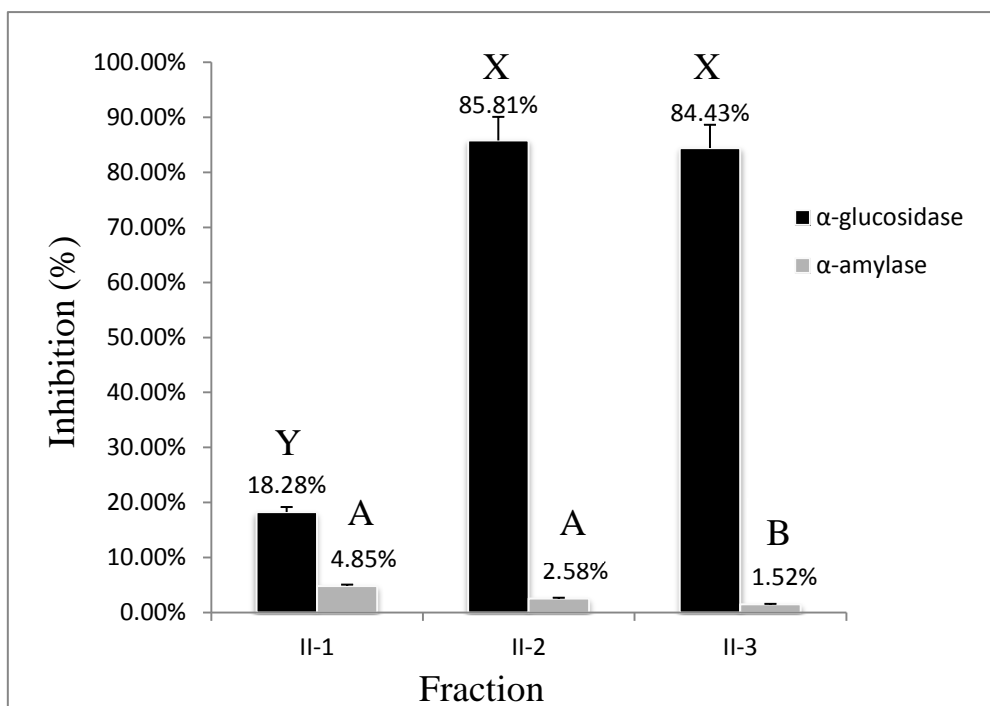


圖5-16、玄參正己烷區分物區分 II 經 HPLC 層析後各沖提區分 (1 mg/mL) 之  $\alpha$ -amylase 及各沖提區分 (0.1 mg/mL) 之  $\alpha$ -glucosidase 之抑制率。

Fig. 5-16  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of eluted fractions at 1mg/mL level and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of eluted fractions at 0.1mg/mL level from fraction II of *n*-hexane fraction of *S. ningpoensis* roots by HPLC 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. 玄參正己烷純化物質之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜解析

圖 5-15 至圖 5-20 顯示純化物質 I-3、II-1、II-2、II-3 之  $^1\text{H-NMR}$  質子波訊，高磁場徑  $\delta$  0.85-4.07 顯示多數飽和脂肪酸於  $\text{CH}_3$ 、 $\text{CH}_2$ 、 $\text{CH}$  之質子波訊，較低磁場  $\delta$  5.36 則為雙鍵之質子波訊，推測這 4 個純化物質為單元或多元不飽和脂肪酸，由玄參低極性正己烷區分物分離出的純化物質因不事先前預期的多酚類化合物，由於 GC 脂肪酸組成分析結果得知，其為 linoleic acid (48.89%)、oleic acid (39.65%) 及 linolenic acid 等單元或多元不飽和脂肪酸。所以沒進一步檢測各種光譜資訊，轉向其他區分物繼續分離、純化可能的活性成分。

isolated component I-3

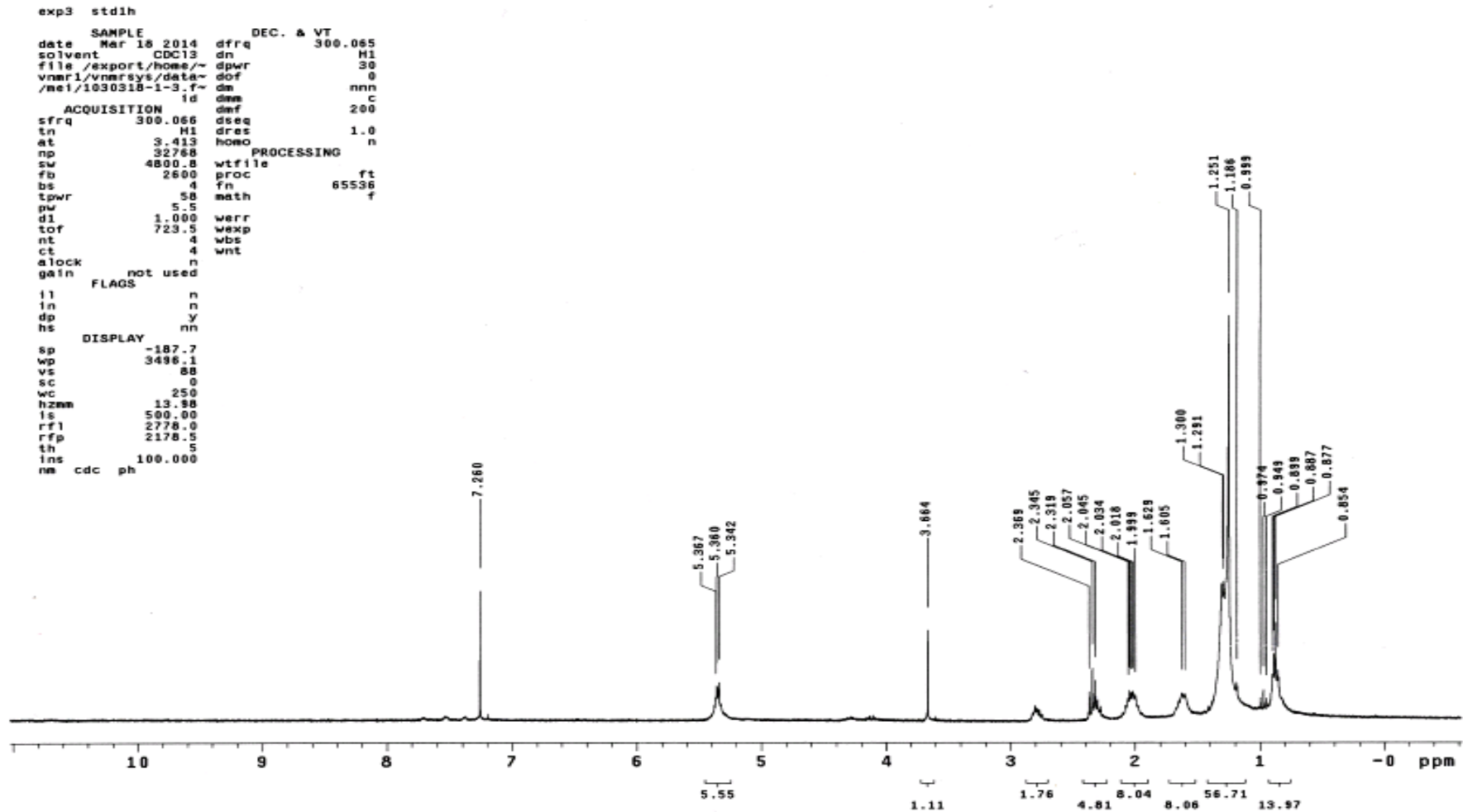


圖5-17、玄參正己烷區分物純化物質 I-3 之  $^1\text{H}$ -核磁共振光譜圖。

Fig. 5-17  $^1\text{H}$ NMR spectrum for the isolated component **I-3** from *n*-hexane fraction of *S. ningpoensis* roots.

isolated component II-1

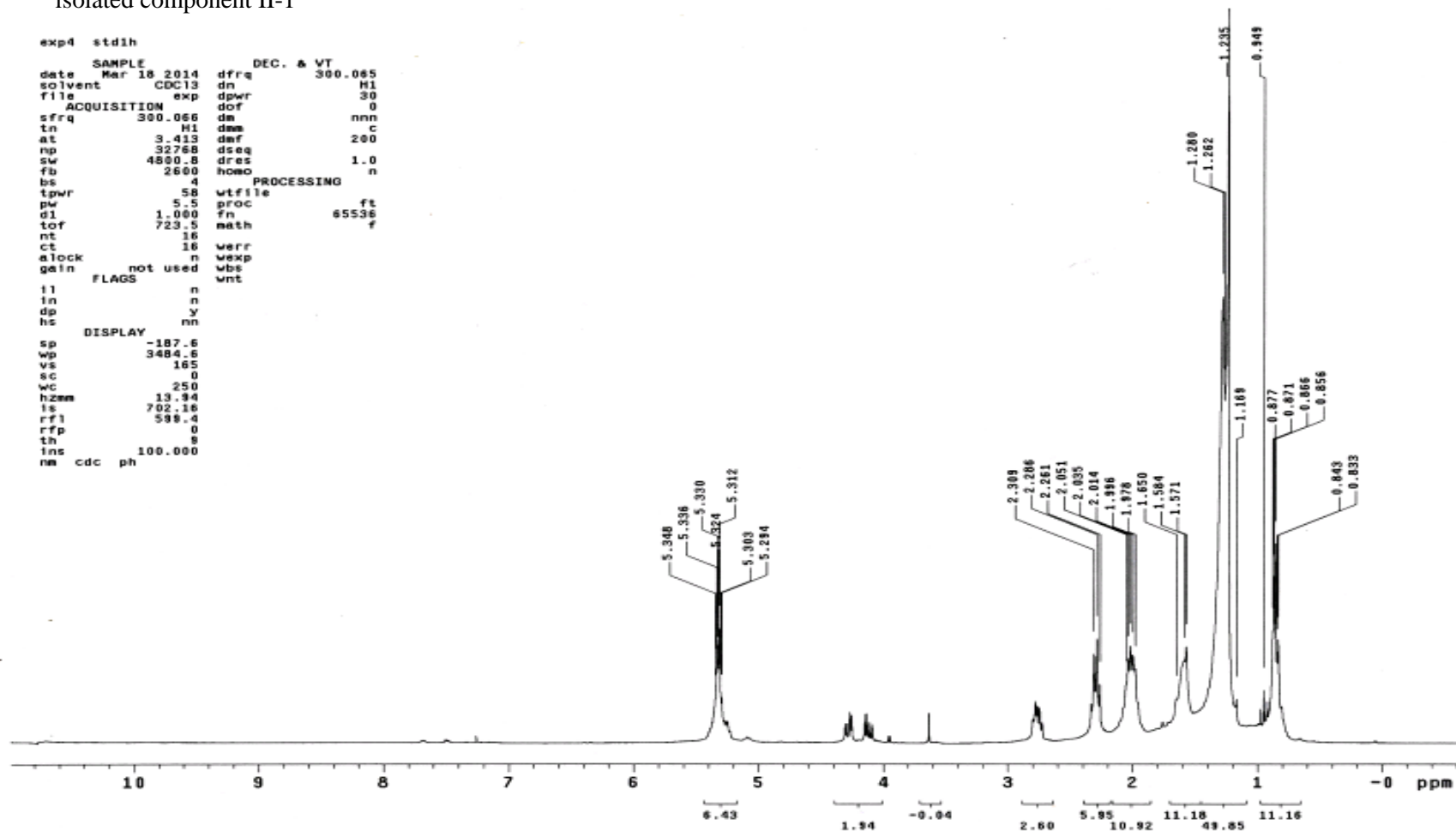


圖5-18、玄參正己烷區分物純化物質 II-1 之  $^1\text{H}$ -核磁共振光譜圖。

Fig. 5-18  $^1\text{H}$ NMR spectrum for the isolated component **II-1** from *n*-hexane fraction of *S. ningpoensis* roots.

isolated component II-2

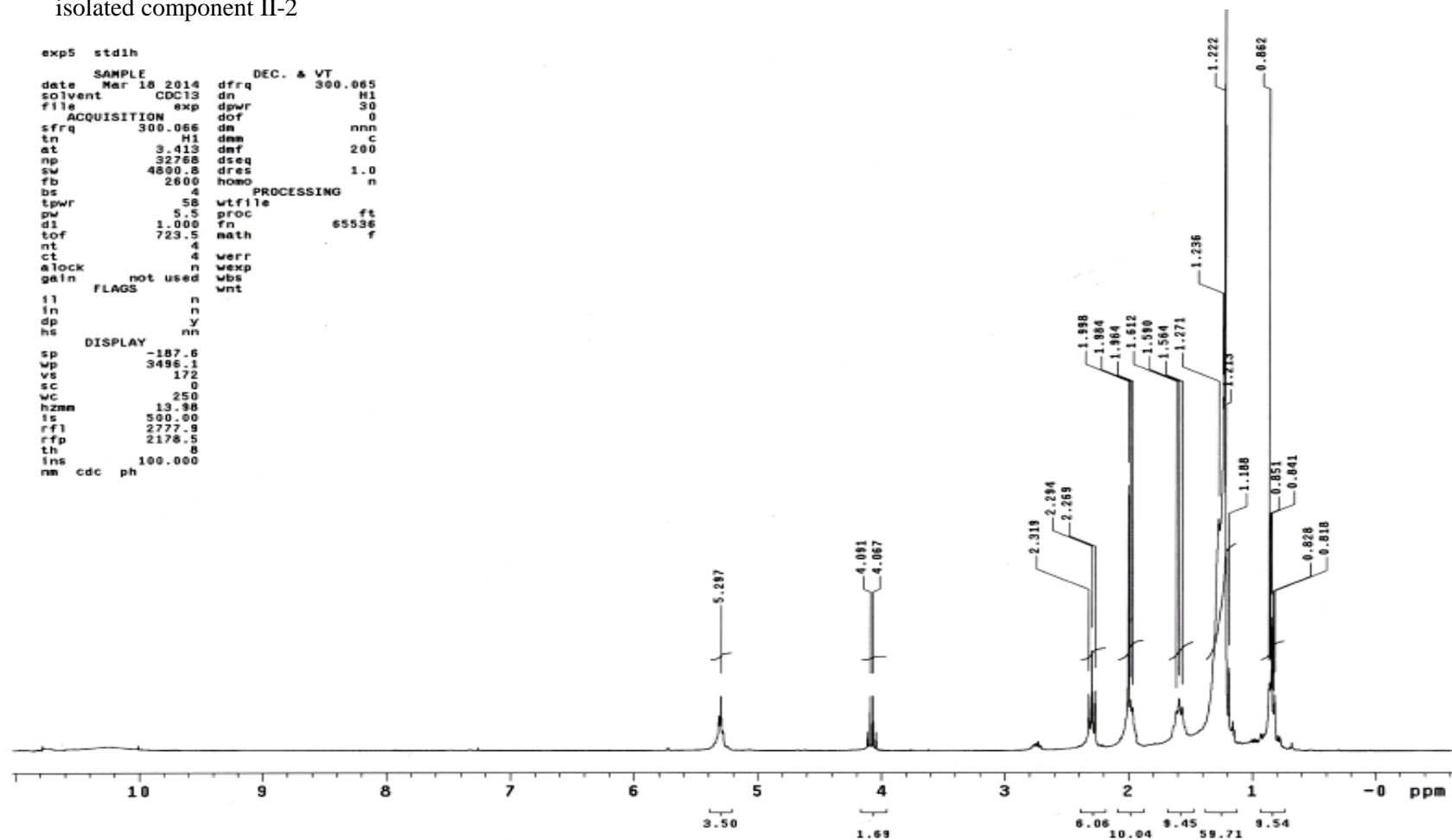


圖5-19、玄參正己烷區分物純化物質 II-2 之  $^1\text{H}$ -核磁共振光譜圖。

Fig. 5-19  $^1\text{H}$ NMR spectrum for the isolated component **II-2** from *n*-hexane fraction of *S. ningpoensis* roots.

isolated component II-3

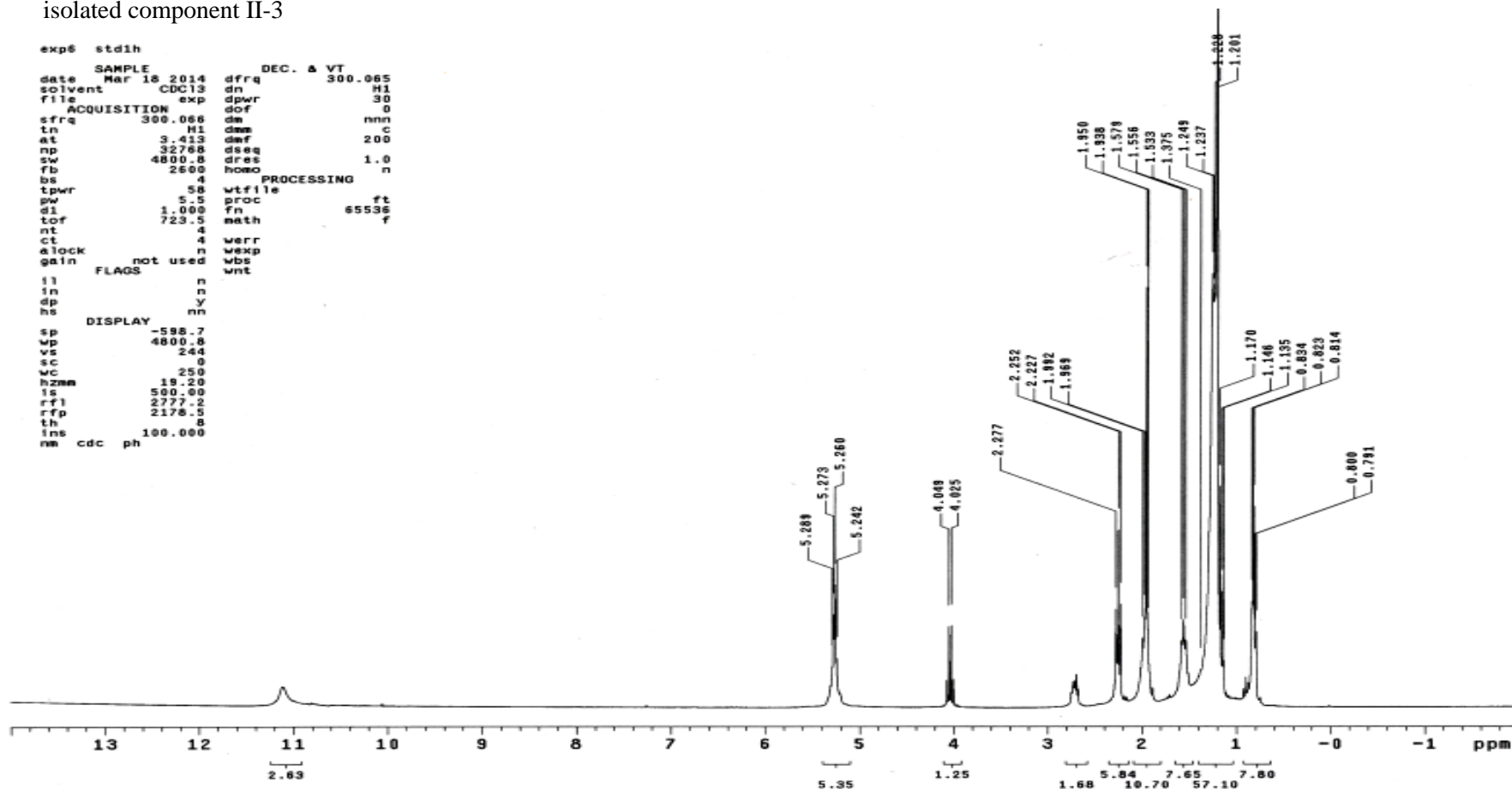


圖5-20、玄參正己烷區分物純化物質 II-3 之  $^1\text{H}$ -核磁共振光譜圖。

Fig. 5-20  $^1\text{H}$ NMR spectrum for the isolated component **II-3** from *n*-hexane fraction of *S. ningpoensis* roots.



## 八、 玄參乙酸乙酯及正丁醇抗氧化及醣解酵素抑制活性成分之分離

### 1. 玄參乙酸乙酯區分物之 XAD-7 液相管柱層析

玄參乙酸乙酯區分物預先以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，因其在波長 260 nm 具有最大吸收值，故選取 260 nm 為液相管柱層析物質之偵測波長。首先將 XAD-7 充填於玻璃管柱 (510×56 mm)，進行液相管柱層析，其沖提液條件依序為水：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 250 mL 為收集單位，並以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，偵測波長 260 nm 之吸光值對收集瓶作圖進行區分，共取 4 個區分，將 4 個區分物依序命名為區分 A、B、C、D (圖5-21)，其產率如表5-7 所示。將 4 個區分物進行 DPPH 自由基清除能力(圖5-22)、總抗氧化能力(圖5-23)檢測，及醣解酵素抑制作用測試(圖5-24)。結果顯示區分 B 有較佳抗氧化活性，區分 B 及C 的醣解酵素抑制率無顯著差異，因此以區分 B 進行更進一步分析。

H <sub>2</sub> O	100	80	60	40	0	Actone	50
:	:	:	:	:	:	:	:
MeOH	0	20	40	60	100	MeOH	50
Fraction		<b>A</b>		<b>B</b>	<b>C</b>		<b>D</b>

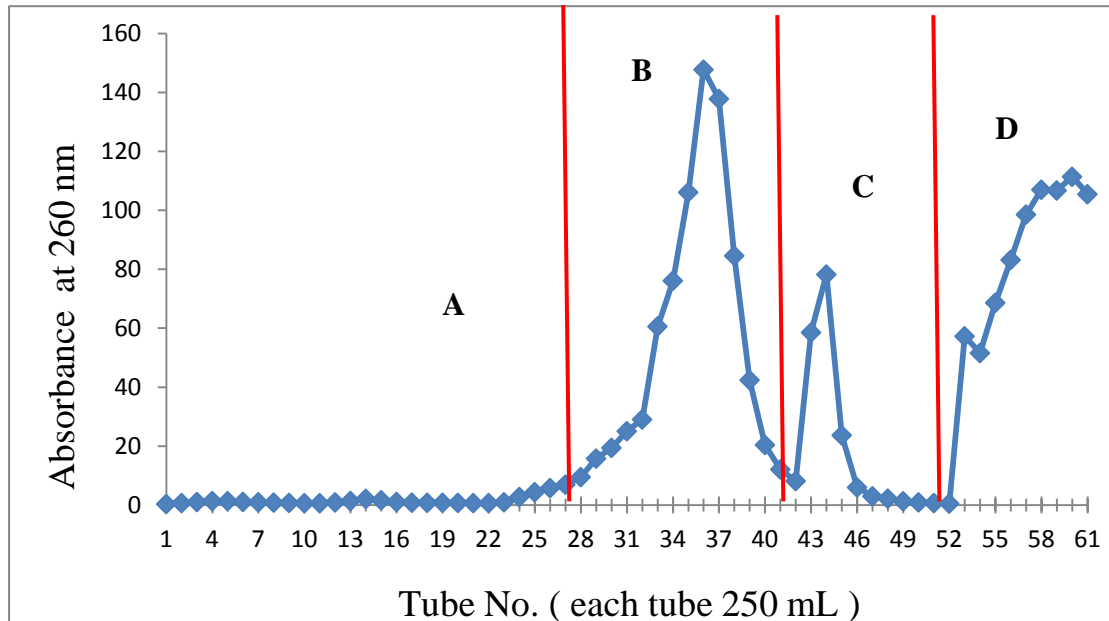


圖5-21、玄參乙酸乙酯區分物之 XAD-7 液相管柱層析圖。

Fig. 5-21 The XAD-7 column chromatogram of eluted fractions from EtOAc fraction of *S. ningpoensis* roots.

表 5-7、玄參乙酸乙酯區分物經 XAD-7 液相層析後各沖提區分之產率

Fig. 5-7 Yields of eluted fractions from EtOAc fraction of *S. ningpoensis* roots by XAD-7 column chromatography

Fraction	Weight (g)	Yield (%) <sup>a</sup>
A	4.3	12.0
B	5.67	15.77
C	5.54	15.41
D	0.4	1.11

<sup>a</sup>Sample weight : 35.96 g

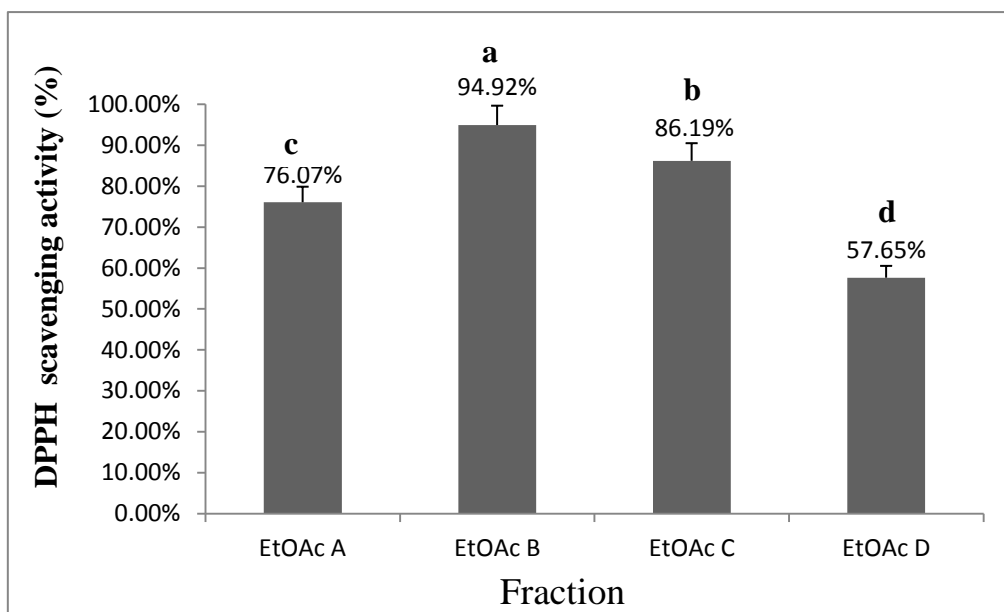


圖5-22、玄參乙酸乙酯區分物經 XAD-7 液相層析後各沖提區分 ( 1mg/mL ) 之DPPH 自由基清除能力。

Fig. 5-22 DPPH radical scavenging activity of eluted fractions at 1mg/mL level from EtOAc fraction of *S. ningpoensis* roots by XAD-7 column chromatography. Bars represent means $\pm$ SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

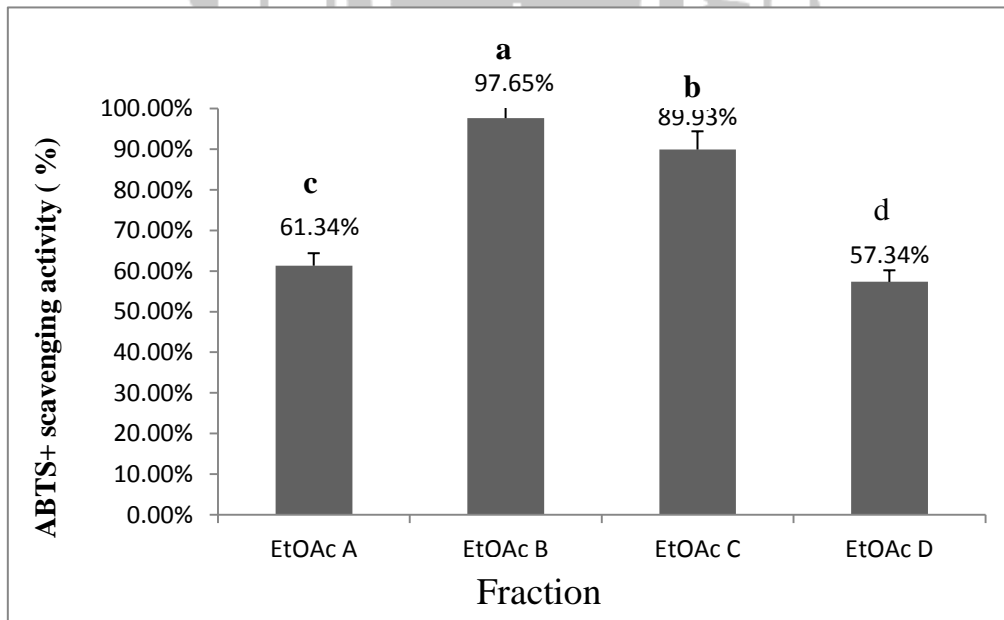


圖5-23、玄參乙酸乙酯區分物經 XAD-7液相層析後各沖提區分 ( 1mg/mL ) 之總抗氧化力以 ABTS 自由基清除率表示。

Fig. 5-23 ABTS radical scavenging activity of eluted fractions at 1mg/mL level from EtOAc fraction of *S. ningpoensis* roots by XAD-7 column chromatography. Bars represent means $\pm$ SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

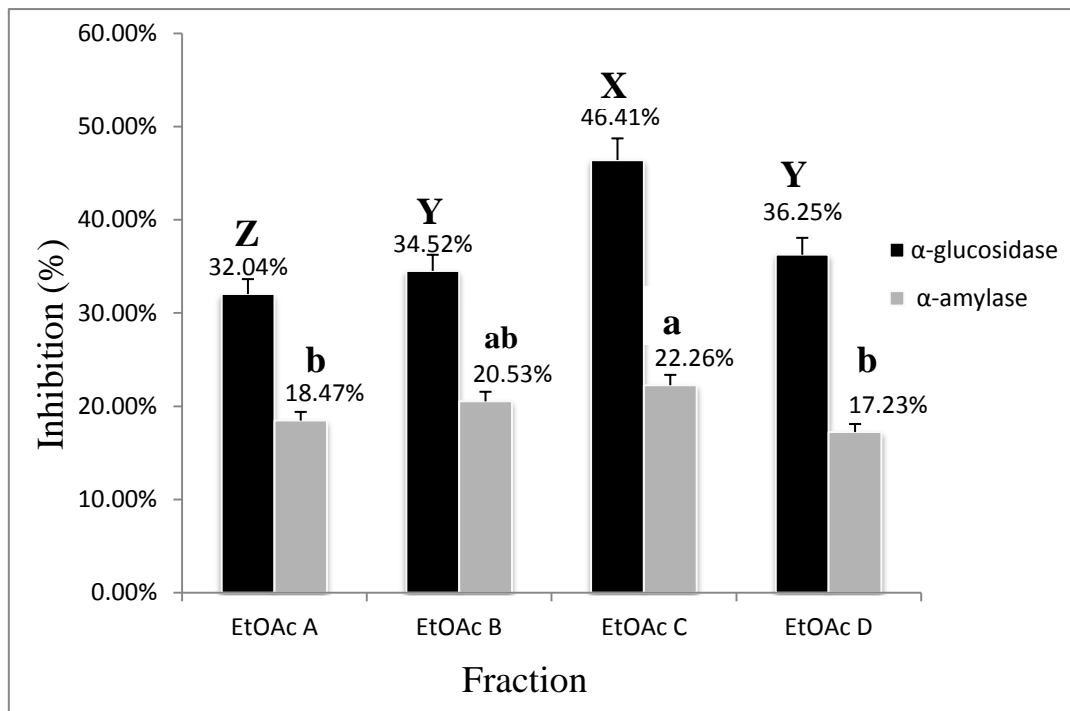


圖5-24、玄參乙酸乙酯區分物經 XAD-7 液相層析後各沖提區分 (1mg/mL) 之  $\alpha$ -amylase 及各沖提區分 (1 mg/mL) 之  $\alpha$ -glucosidase 之抑制率。

Fig. 5-24  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of eluted fractions at 1mg/mL level and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of eluted fractions fractions at 1mg/mL level from EtOAc fraction of *S. ningpoensis* roots. Bars represent means $\pm$ SD, n=3. Means with different letters are significant different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

## 2. 玄參正丁醇區分物之 XAD-7 液相管柱層析

玄參正丁醇區分物預先以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，因其在波長 260 nm 具有最大吸收值，故選取 260 nm 為液相管柱層析物質之偵測波長。首先將 XAD-7 充填於玻璃管柱 (510 $\times$  56 mm)，進行液相管柱層析，其沖提液條件依序為水：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 250 mL 為收集單位，並以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，偵測波長 260 nm 之吸光值對收集瓶作圖進行區分，共取 6 個區分，將 6 個區分物依序命名為區分 A、B、C、D、E、F (圖

5-25)，其產率如表5-8所示。將 6 個區分物進行 DPPH 自由基清除能力(圖5-26)、總抗氧化能力(圖5-27)檢測，及醣解酵素抑制作用測試 (圖5-28)。結果顯示區分 C 有較佳抗氧化活性，而醣解酵素抑制作用的部分顯著差異性不大，因此選擇區分 C 進行更進一步的分析。

H <sub>2</sub> O	100	80	60	40	0	Actone	50
:	:	:	:	:	:	:	:
MeOH	0	20	40	60	100	MeOH	50
Fraction	<b>A</b>		<b>B</b>	<b>C</b>	<b>DE</b>		<b>F</b>

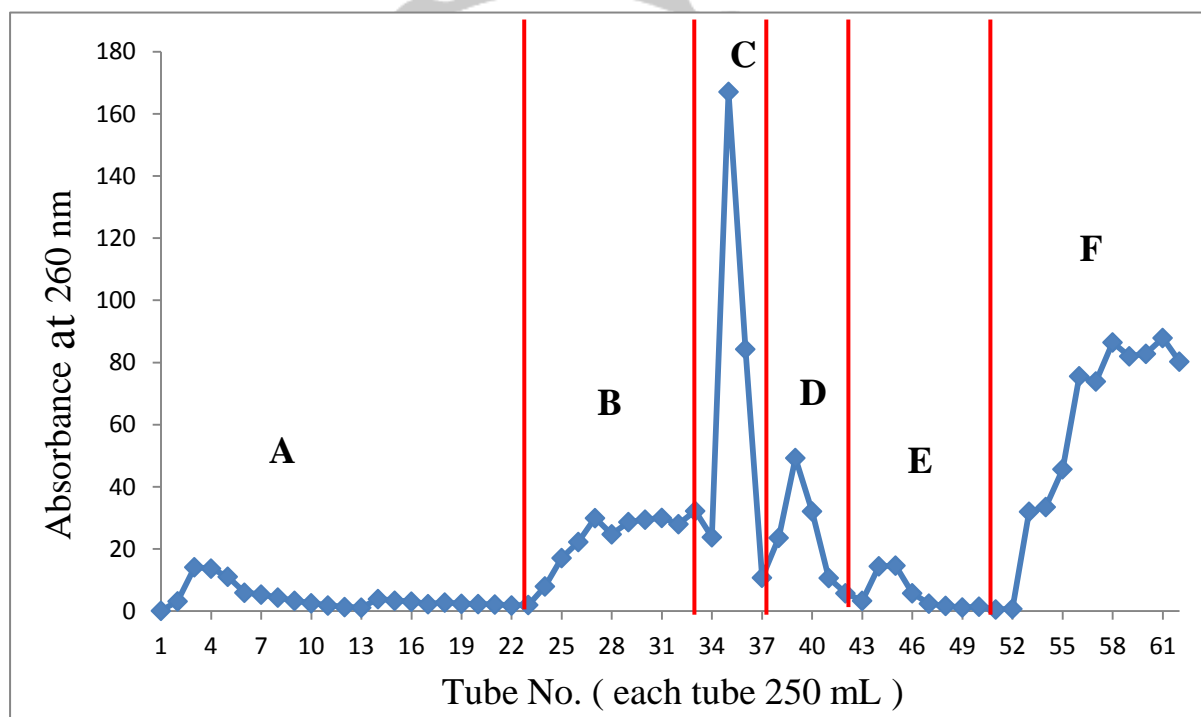


圖5-25、玄參正丁醇區分物之 XAD-7 液相管柱層析圖。

Fig. 5-25 The XAD-7 column chromatogram of eluted fractions from *n*-butanol fraction of *S. ningpoensis* roots.

表 5-8、玄參正丁醇區分物經 XAD-7 液相層析後各沖提區分之產率

Fig. 5-8 Yields of eluted fractions from *n*-butanol fraction of *S. ningpoensis* roots by XAD-7 column chromatography

Fraction	Weight(g)	Yield(%) <sup>a</sup>
A	15.27	30.67
B	4.82	9.68
C	4.46	8.96
D	2.59	5.20
E	0.92	1.85
F	0.35	0.70

<sup>a</sup>Sample weight : 49.79g

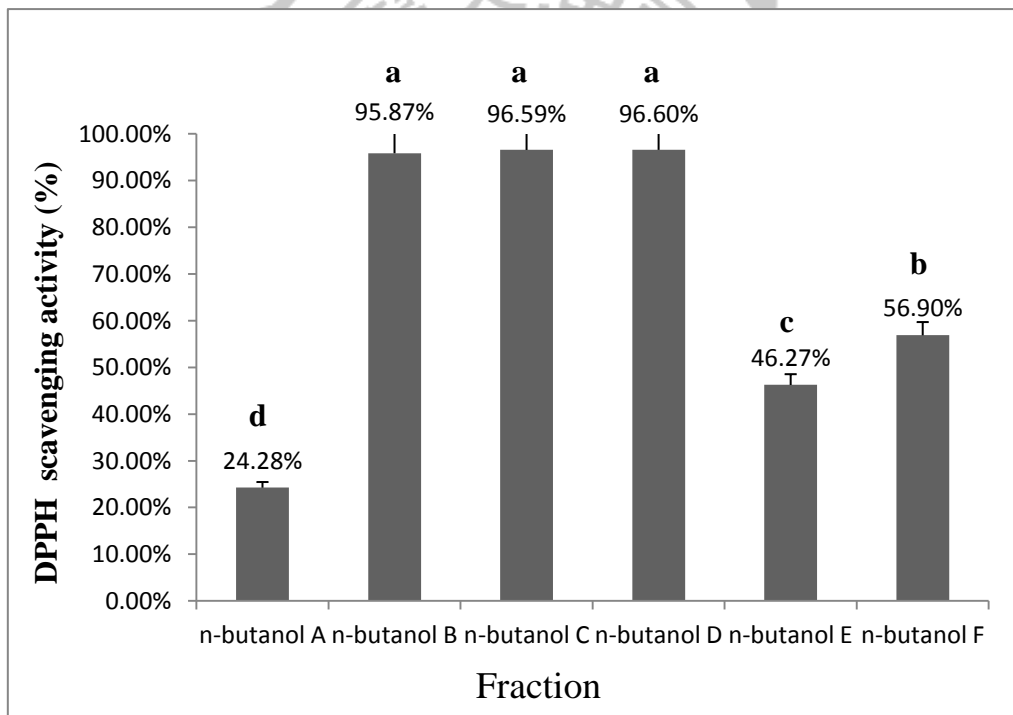


圖5-26、玄參正丁醇區分物經 XAD-7 液相層析後各沖提區分 (1mg/mL) 之 DPPH 自由基清除能力。

Fig. 5-26 DPPH radical scavenging activity of eluted fractions at 1mg/mL level from *n*-butanol fraction of *S. ningpoensis* roots. by XAD-7 column chromatography. Bars represent means±SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

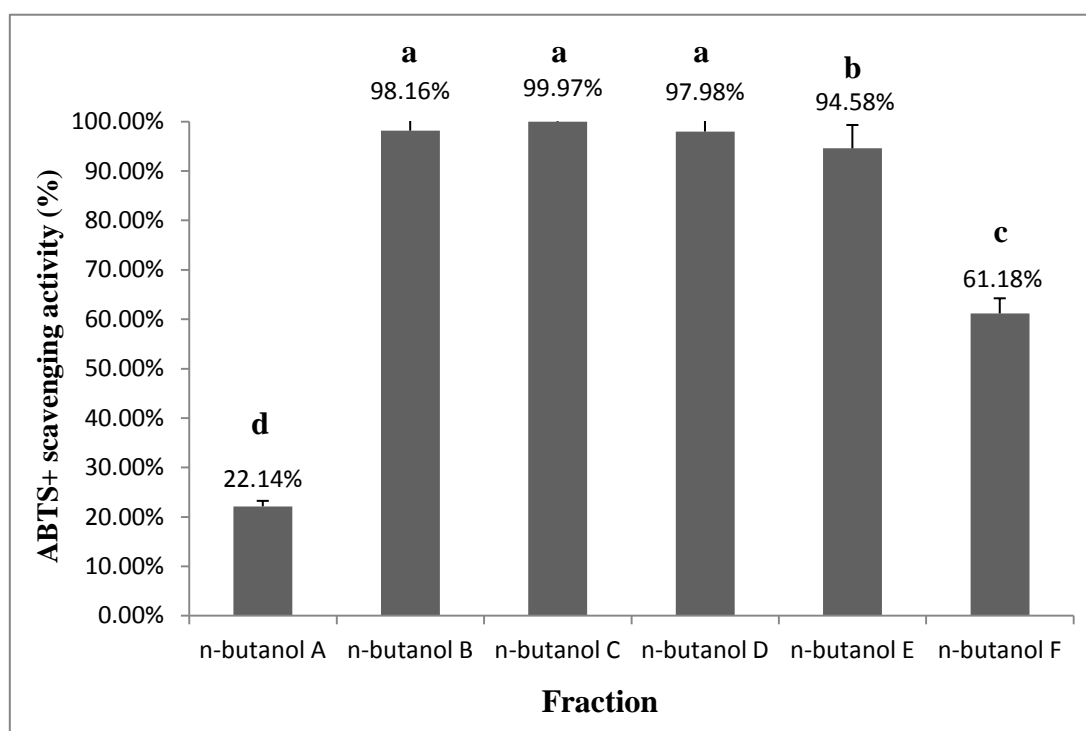


圖5-27、玄參正丁醇區分物經 XAD-7 液相層析後各沖提區分 (1mg/mL) 之總抗氧化力以 ABTS 自由基清除率表示。

Fig. 5-27 ABTS radical scavenging activity of eluted fractions at 1mg/mL level from *n*-butanol fraction of *S. ningpoensis* roots by XAD-7 column chromatography. Bars represent means±SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

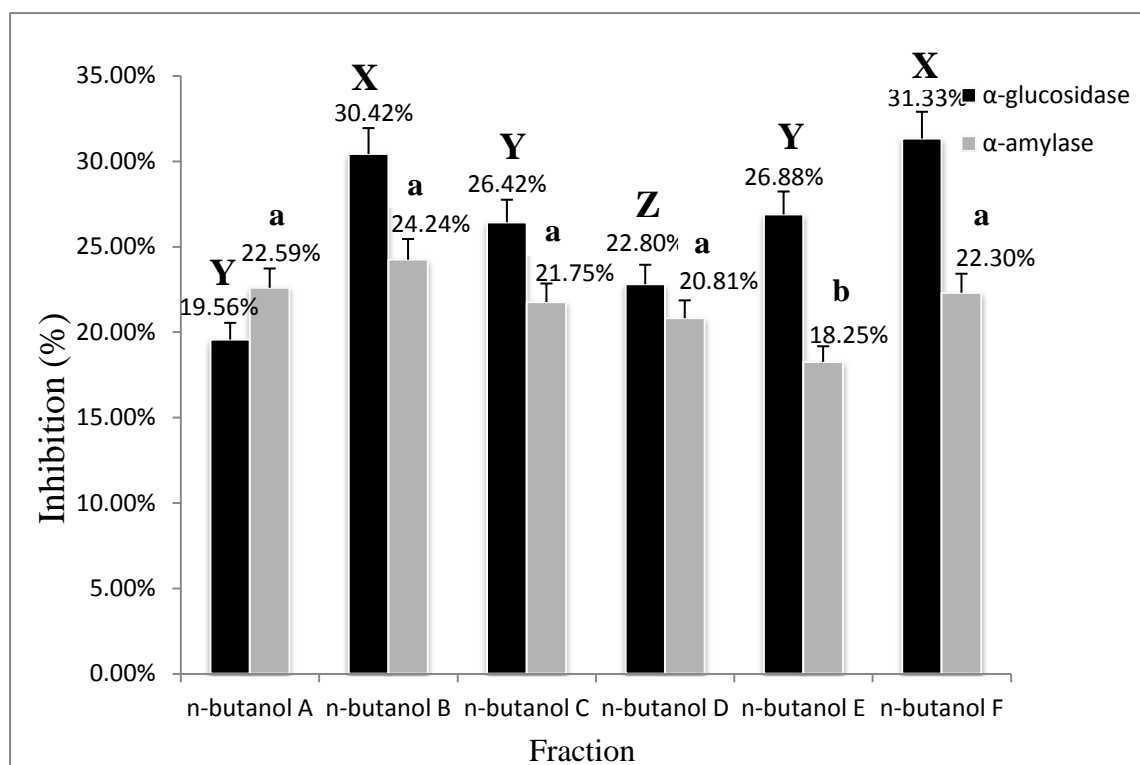


圖5-28、玄參正丁醇區分物經 XAD-7 液相層析後各沖提區分 (1 mg/mL)之  $\alpha$ -amylase及各沖提區分 (1 mg/mL)之  $\alpha$ -glucosidase之抑制率。

Fig. 5-28  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of eluted fractions at 1mg/mL level and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of eluted fractions at 1mg/mL level from *n*-butanol fraction of *S. ningpoensis* roots. Bars represent means $\pm$ SD, n=3. Means with different letters are significant different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

### 3. 玄參乙酸乙酯區分物區分 B 及正丁醇區分物區分 C 混合之 Comosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 液相管柱層析

將上述 EtOAc B 及 *n*-butanol C，經 HPLC 分析後，此兩區分之 HPLC 層析圖譜類似，推測可能含有相近的物質，因此再將此兩個區分沖提物混合後，進行 Comosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 液相管柱層析。將兩區分 (Et. B+n-bu. C) 混合沖提液預先以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，因其在波長 260 nm 具有最大吸收值，故選取 260 nm 為液相管柱層析物質之偵測波長。將上述區分 (Et. B+n-bu. C) 濃縮物置



入充填 Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 之膠體玻璃管柱充填於玻璃管柱 (510×47 mm) 進行Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 液相管柱層析，調整後的沖提劑條件依序為水：甲醇 (v/v)=100：0、90：10、80：20、70：30、50：50、0：100 之混合溶劑，沖提液以每 200 mL 為收集單位，並以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，偵測波長 260 nm 之吸光值對收集瓶作圖進行區分，共取 6 個區分，將 6 個區分物依序命名為區分 a、b、c、d、e、f (圖5-29)，其產率如表5-9所示，而後利用高效液相層析儀 (high performance liquid chromatography, HPLC) 對各活性成分進行分析及製備。

表 5-9、玄參乙酸乙酯及正丁醇混合區分物區分 (B+C) 經 Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 液相層析後各沖提區分之產率

Fig. 5-9 Yields of eluted fractions from fraction( B + C )from EtOAc and *n*-butanol mixes fractions of *S. ningpoensis* roots. by Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN column chromatography

Fraction	Weight (g)	Yield (%) <sup>a</sup>
a	0.816	8.06
b	0.979	9.66
c	2.743	27.08
d	1.666	16.45
e	1.771	17.48
f	2.006	19.8

<sup>a</sup>Sample weight : 10.13g

H <sub>2</sub> O	100	90	80	70	50	0
:	:	:	:	:	:	:
MeOH	0	10	20	30	50	100
Fraction	<b>ab</b>		<b>c</b>	<b>d</b>	<b>e</b>	<b>f</b>

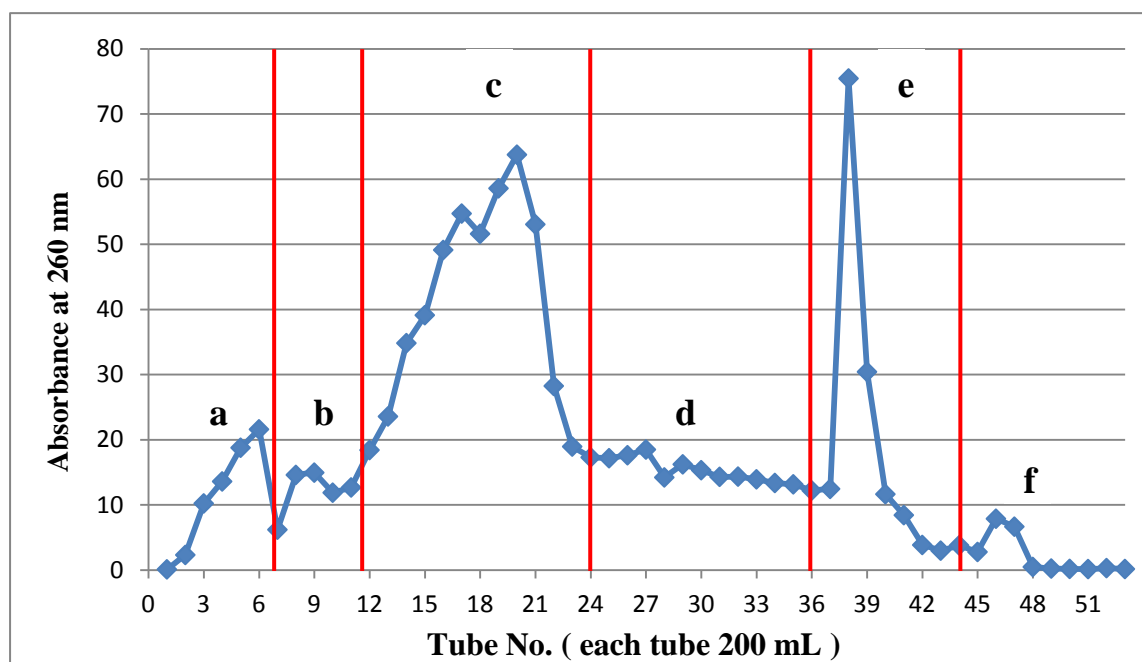


圖5-29、玄參乙酸乙酯及正丁醇混合區分物區分 (B+C) 之Cosmosil 75

C<sub>18</sub>-OPN 液相管柱層析圖。

Fig. 5-29 The Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN column chromatogram of eluted fractions from fraction (B+C) of EtOAc and *n*-butanol mixed fractions of *S. ningpoensis* roots.

#### 4. 玄參乙酸乙酯及正丁醇混合區分物區分 (a+b) 之 HPLC 分析及製備

將上述區分 a 及 b 經 HPLC 分析後，此兩區分之 HPLC 層析圖譜類似，推測可能含有相近的物質，因此再將此兩個區分沖提物混合後，進行 HPLC 之分析及製備，先以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，因其在波長 260 nm 具有最大吸收值，故選取 260 nm 為液相管柱層析物質之偵測波長。將玄參乙酸乙酯及正丁醇混合萃取物區分 (a+b) 濃縮至乾，爾後溶於甲醇，經由 0.45 μm 之過濾膜過濾後進行 HPLC 分析，並以分析型高效液相層析儀尋找良好的分離條件為

H<sub>2</sub>O:醋酸 (v/v)=99.5:0.5, 流速 0.7 ml/min, 偵測波長為 260 nm。接著利用相同的移動相與波長條件, 流速為 2.5 mL/min 之製備型高效液相層析儀進行分離, 重覆收集層析圖上滯流時間相同主要波峰之沖提區分, 得到 (a+b)-1、(a+b)-2 兩個區分(圖5-30), 其產率如表 5-10, 而後將兩者檢測 <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, 但因產率值及濃度太低只有 (a+b)-2 才能檢測 UV、<sup>1</sup>H-NMR 等光譜(圖5-34)。

表 5-10 玄參乙酸乙酯及正丁醇混合區分物區分 (a+b) 經 HPLC 液相層析後各沖提區分之產率

Fig. 5-10 Yields of eluted fractions from fraction (a+b) from EtOAc and *n*-butanol mixed fractions of *S. ningpoensis* roots by HPLC chromatography

Fraction	Weight (g)	Yield (%) <sup>a</sup>
(a+b)-1	0.00868	0.484
(a+b)-2	0.01712	0.954

<sup>a</sup>Sample weight : 1.795g

##### 5. 玄參乙酸乙酯及正丁醇混合區分物區分 c 之 HPLC 分析及製備

將上述區分 c 先以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描, 因其在波長 260 nm 具有最大吸收值, 故選取 260 nm 為液相管柱層析物質之偵測波長。將玄參乙酸乙酯及正丁醇混合區分物區分 c 濃縮至乾, 爾後溶於甲醇, 經由 0.45 μm 之過濾膜過濾後進行 HPLC 分析, 並以分析型高效液相層析儀尋找良好的分離條件為 H<sub>2</sub>O:MeOH (v/v) =95:5, 流速0.7 ml/min, 偵測波長為 260 nm。接著利用相同的移

動相與波長條件，流速為 2.5 mL/min 之製備型高效液相層析儀進行分離，重覆收集層析圖上滯流時間相同主要波峰之沖提區分，得到 c-1、c-2、c-3 三個區分(圖5-31)，其產率如表5-11，而後將三者檢測 <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，但因產率值及濃度太低，無法獲得足夠的光譜資訊以供解析。

表 5-11、玄參乙酸乙酯及正丁醇混合區分物區分 c 經 HPLC 液相層析後各沖提區分之產率

Fig. 5-11 Yields of eluted fractions from fraction c from EtOAc and *n*-butanol mixed fractions of *S. ningpoensis* roots by HPLC chromatography

Fraction	Weight (g)	Yield (%) <sup>a</sup>
c-1	0.00852	0.311
c-2	0.0161	0.587
c-3	0.00816	0.297

<sup>a</sup>Sample weight : 2.743g

## 6. 玄參乙酸乙酯及正丁醇混合區分物區分 (d+e) 之HPLC分析及製備

將上述區分 d 及e 經 HPLC 分析後，此兩區分之 HPLC 層析圖譜類似，推測可能含有相近的物質，因此再將此兩個區分沖提物混合後，進行 HPLC 之分析及製備，先以紫外線-可見光吸光光譜儀掃描，因其在波長 260 nm 具有最大吸收值，故選取 260 nm 為液相管柱層析物質之偵測波長。將玄參乙酸乙酯及正丁醇混合區分物區分 (d+e) 濃縮至乾，爾後溶於甲醇，經由 0.45 μm 之過濾膜過濾後進行 HPLC 分析，並以分析型高效液相層析儀尋找良好的分離條件為

H<sub>2</sub>O : MeOH ( v/v )=95 : 5，流速 0.7 ml/min，偵測波長為 260 nm。接著利用相同的移動相與波長條件，流速為 2.5 mL/min 之製備型高效液相層析儀進行分離，重覆收集層析圖上滯流時間相同主要波峰之沖提區分，得到 ( d+e )-1、( d+e )-2、( d+e )-3 三個區分(圖5-32)，其產率如表5-12，而後將三者檢測 <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，但因產率值及濃度太低，也無法獲得足夠的光譜資訊以供解析。

表 5-12、玄參乙酸乙酯及正丁醇混合區分物區分 ( d+e ) 經 HPLC 液相層析後各沖提區分之產率

Fig. 5-12 Yields of eluted fractions from fraction ( d+e ) from EtOAc and *n*-butanol mixed fractions of *S. ningpoensis* roots by HPLC chromatography

Fraction	Weight (g)	Yield (%) <sup>a</sup>
(d+e)-1	0.0103	0.3
(d+e)-2	0.0076	0.22
(d+e)-3	0.01044	0.3

<sup>a</sup>Sample weight : 3.437g

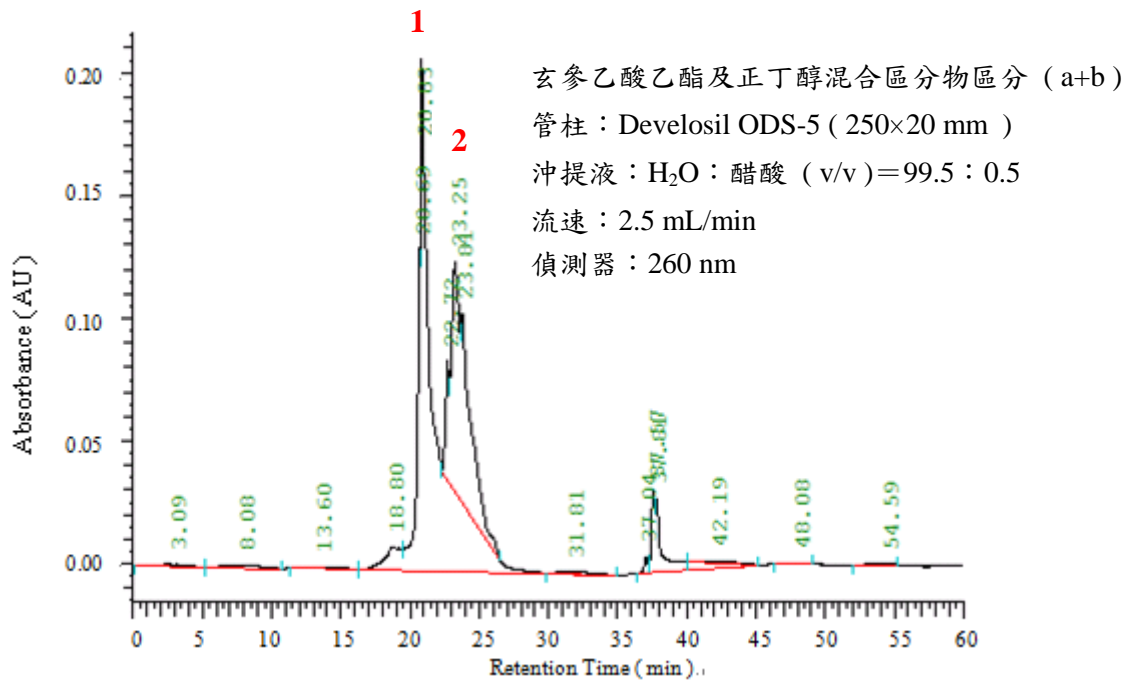


圖5-30、玄參乙酸乙酯及正丁醇混合區分物區分 (a+b)之製備型 HPLC 圖。  
 Fig. 5-30 Preparative HPLC chromatogram of isolated components from fraction (a+b) from EtOAc and *n*-butanol mixed fractions of *S. ningpoensis* roots.

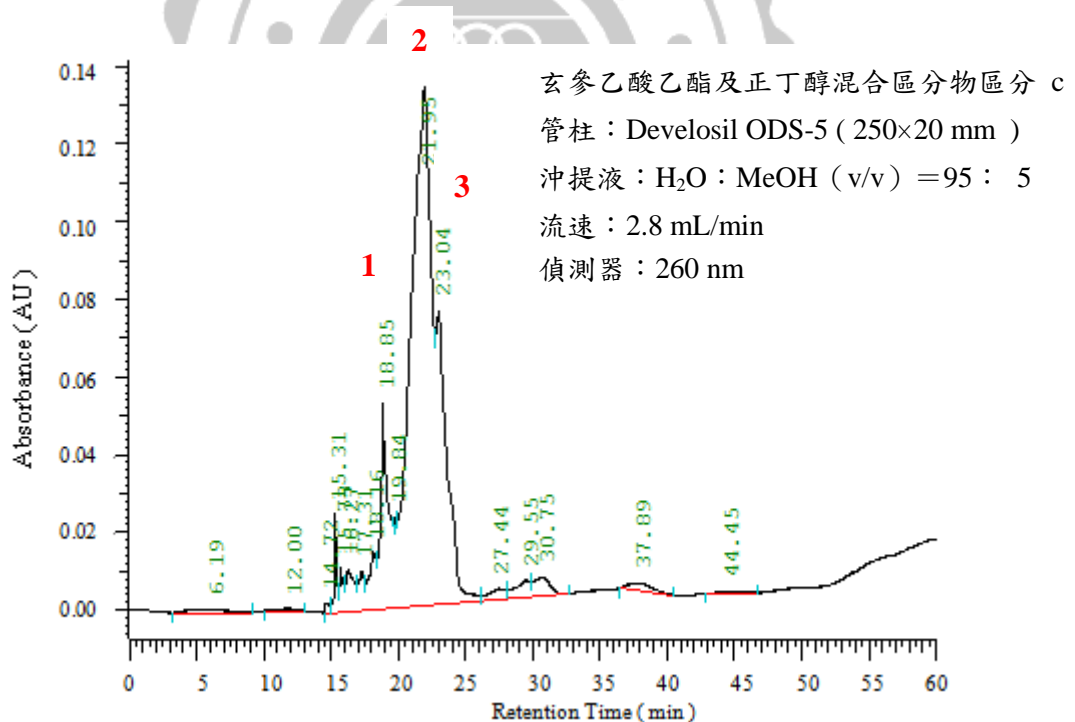


圖5-31、玄參乙酸乙酯及正丁醇混合區分物區分 c 之製備型 HPLC 圖。  
 Fig. 5-31 Preparative HPLC chromatogram of isolated components from fraction c from EtOAc and *n*-butanol mixed fractions of *S. ningpoensis* roots.

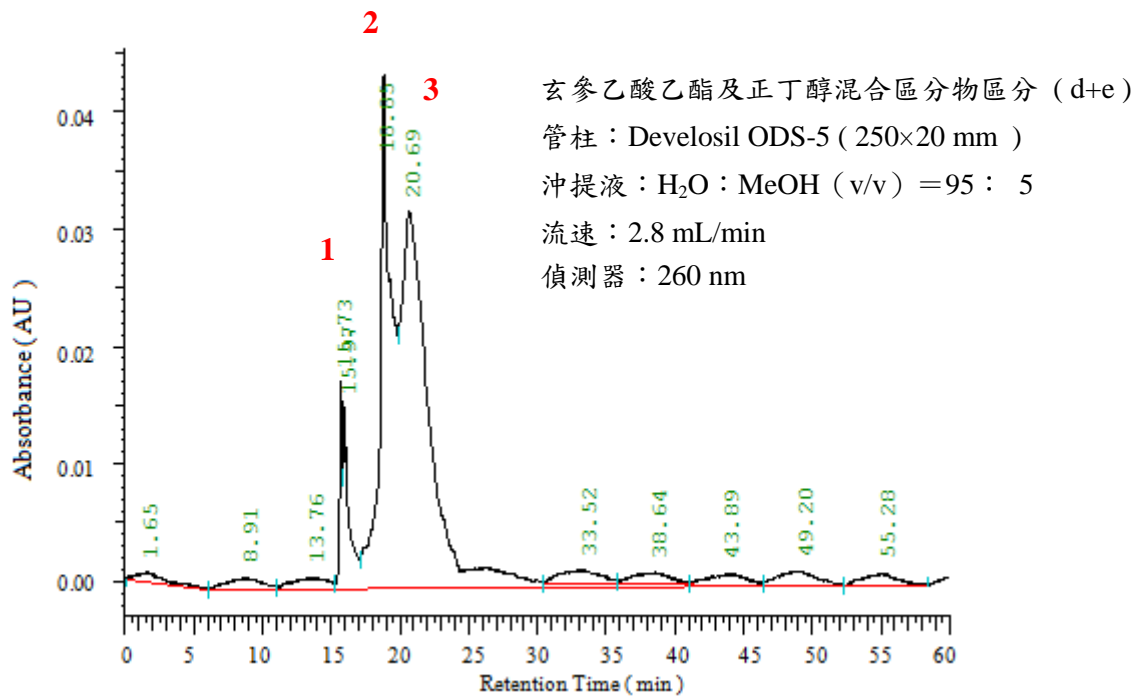


圖5-32、玄參乙酸乙酯及正丁醇混合區分物區分 (d+e) 之製備型 HPLC 圖。  
 Fig. 5-32 Preparative HPLC chromatogram of isolated components from fraction (d+e) from EtOAc and *n*-butanol mixed fractions of *S. ningpoensis* roots.

## 7. 純化物質 (a+b)-2 之光譜分析

由 UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) nm: 265, 325 (圖5-33) 推測為類黃酮化合物，再由 <sup>1</sup>H-NMR 光譜，高磁場領域  $\delta$  3.29-3.78 顯示 5 個葡萄糖基之質子波訊，低磁場領域  $\delta$  6.81 (d, J=8.7), 7.86 (d, J=8.7) 推測為類黃酮 B 環上 H-3'、5' 與 H-2'、6' 互為耦合的質子波訊，另外  $\delta$  6.85、6.72、6.58 推測為類黃酮 H-3、H-6、H-8 的質子波訊，經與文獻 (Harbore, 1994) 比對，推測 (a+b)-2 之結構為 apigenin 5-O-glucoside。

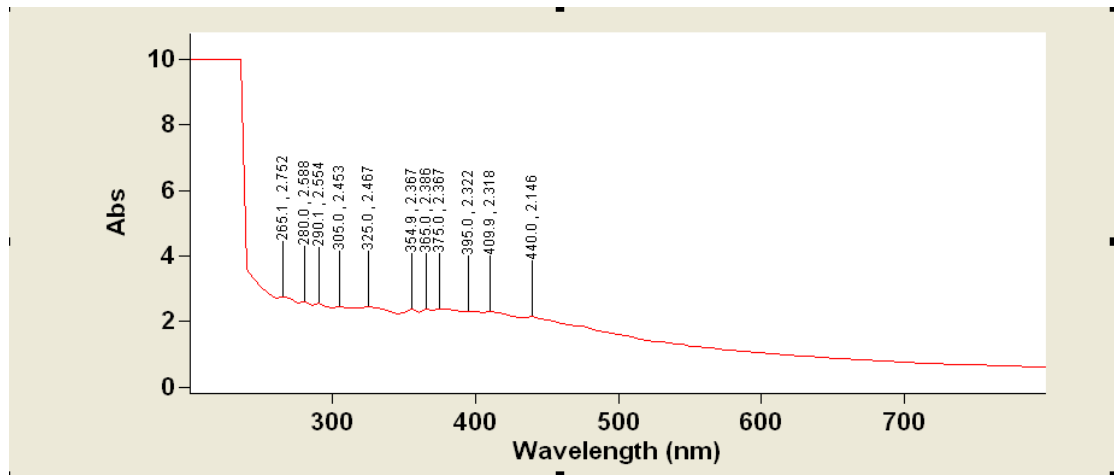


圖5-33、玄參乙酸乙酯及正丁醇混合區分物純化物質 (a+b)-2之紫外光-可見光譜圖。

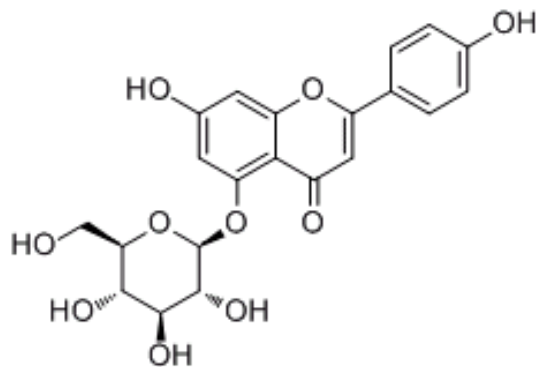
Fig.5-33 UV-visible spectrum for the isolated component (a+b)-2 from EtOAc and *n*-butanol mixed fractions of *S. ningpoensis* roots.

## 8. 玄參乙酸乙酯及正丁醇混合區分物純化物質之結構鑑定

\*純化物質 (a+b)-2之結構鑑定

Identification of isolated component (a+b)-2

純化物質 (a+b)-2: Apigenin 5-O- glucoside



Formula:  $C_{21}H_{20}O_{10}$

MW: 432.39

UV  $\lambda$  max ( MeOH ) nm: 265,325

$^1H$ -NMR:( 300 MHz,  $CD_3OD$  )

$\delta$ 7.86 ( 2H, d, $J$ =8.7 Hz, H-2', H-6'), 6.85 ( 1H, d, H-8 ), 6.81 ( 2H, d, $J$ =8.7Hz, H-3', H-5'), 6.72 ( 1H, d, H-6), 6.56 ( 1H, d, H-3 )

$\delta$  3.81-3.57 glucosyl 5H



isolated component (a+b)-2

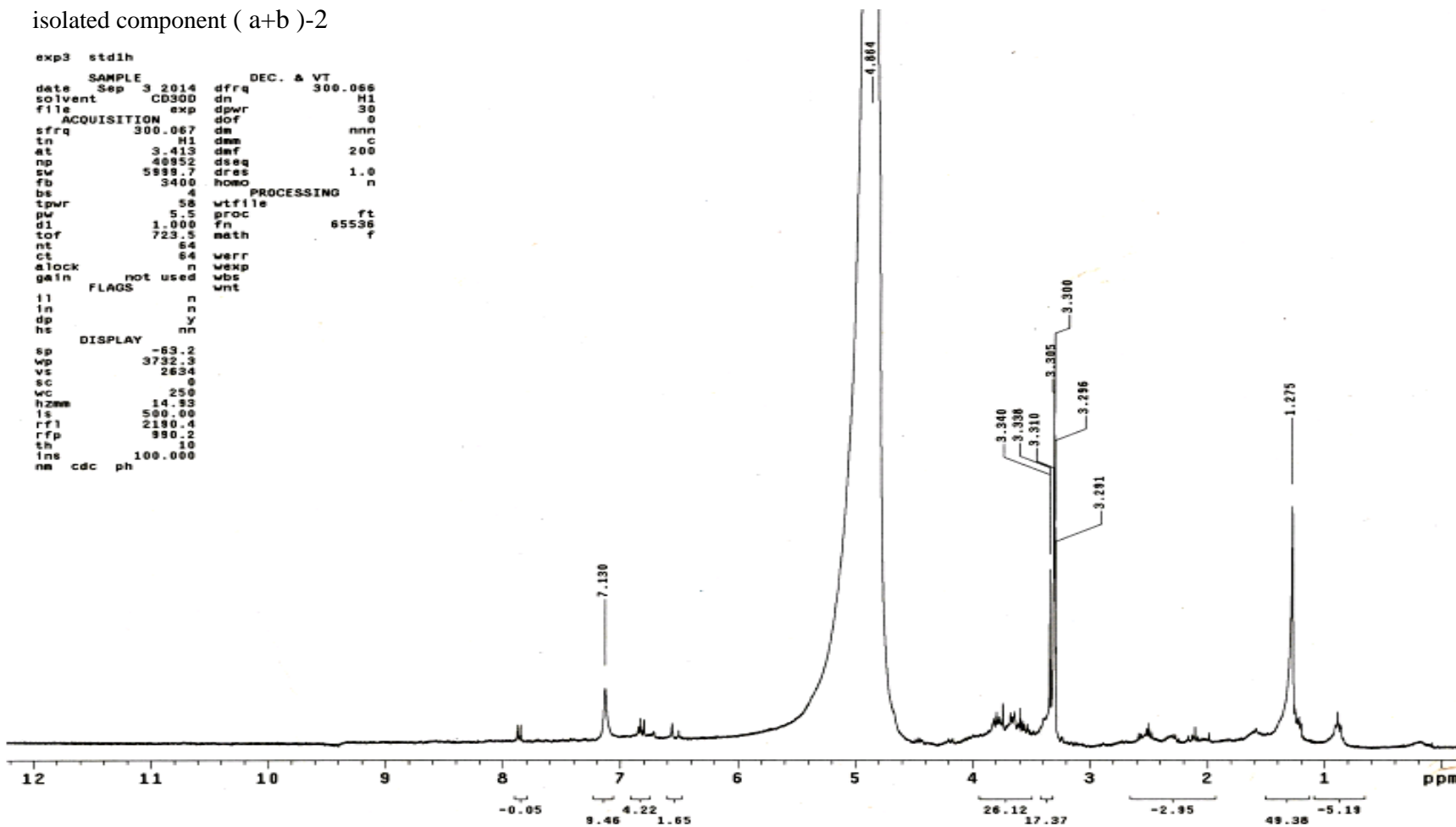
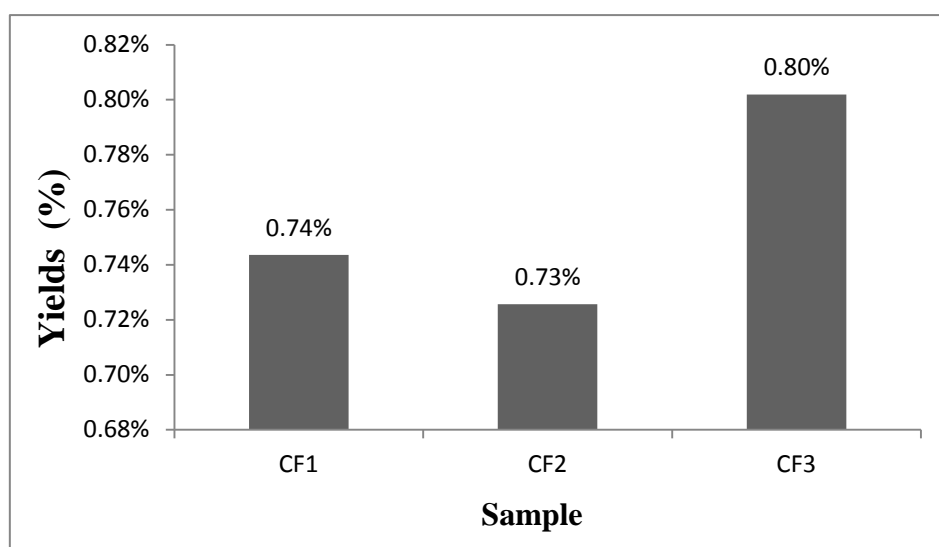


圖5-34、玄參乙酸乙酯及正丁醇混合區分物純化物質 (a+b)-2 之  $^1\text{H}$ -核磁共振光譜圖。

Fig. 5-34  $^1\text{H}$ -NMR spectrum for the isolated component (a+b)-2 from EtOAc and *n*-butanol mixed fractions of *S. ningpoensis* roots.

## 九、玄參正己烷之粗脂肪萃取

由於玄參正己烷萃取物經  $^1\text{H-NMR}$  檢測後，發現其純化成分大多為不飽和脂肪酸，因此利用索氏萃取法進行粗脂肪萃取，檢測其粗脂肪含量以利接下來的實驗操作，而產率結果如圖5-35，得知後再利用樣品重（5.0 g）及玄參正己烷萃取物的總重（60.72 g）推算出玄參正己烷區分物中的粗脂肪含量約為 9 %。



\*CF : Crude Fat

圖5-35、玄參正己烷區分物之粗脂肪產率。

Fig. 5-35 Yields of crude fat from *n*-hexane fraction of *S. ningpoensis* roots.

## 十、玄參正己烷區分物之脂肪酸組成分析及生育醇含量分析

玄參正己烷萃取物經  $^1\text{H-NMR}$  檢測後，發現其成分大多為不飽和脂肪酸，且含量甚富（0.73-0.8 %），但在醣解酵素（ $\alpha$ -glycosidase）抑制作用上卻有顯著性的效果，因此利用氣相層析（gas chromatography）分析其脂肪酸的種類，再利用標準品(附錄五)進行比對得知其主要脂肪酸為亞麻油酸（48.89 %）、油酸（39.65 %）、

棕櫚酸 ( 13.42 % )、硬脂酸 ( 6.04 % )及少量的次亞麻油酸(圖5-39)，因其富含多元不飽和脂肪酸，推測亦含天然抗氧化劑生育醇，預備實驗與文獻圖(圖5-36)比較，其生育醇型態主要為  $\alpha$ -生育醇(圖5-37)，所以亦利用 HPLC 進行  $\alpha$ -生育醇之定量分析，結果經由(附錄六)推算得知  $\alpha$ -生育醇的含量為 27.9 mg/100g，再經由玄參正己烷區分物的樣品總重 ( 60.72 g ) 推算得知其  $\alpha$ -生育醇的含量為 16.9 mg/100g。

#### 十一、玄參正己烷區分物與各種油脂之 $\alpha$ -glucosidase 活性抑制比較

經由上述實驗結果得知玄參正己烷區分物之脂肪酸組成及  $\alpha$ -生育醇的含量後，再利用含相關脂肪酸之油脂與玄參正己烷區分物進行  $\alpha$ -glucosidase 活性抑制比較，結果如(圖5-38)。而油脂體積的含量比主要是依粗脂肪萃取得知的 9 %，選取適當的範圍進行探討。而也有相關文獻證實 oleic acid、linoleic acid 具有強  $\alpha$ -glucosidase 抑制活性，它們會和  $\alpha$ -glucosidase 結合形成複合物使其失去效用 (Lean *et al.*, 2013)。

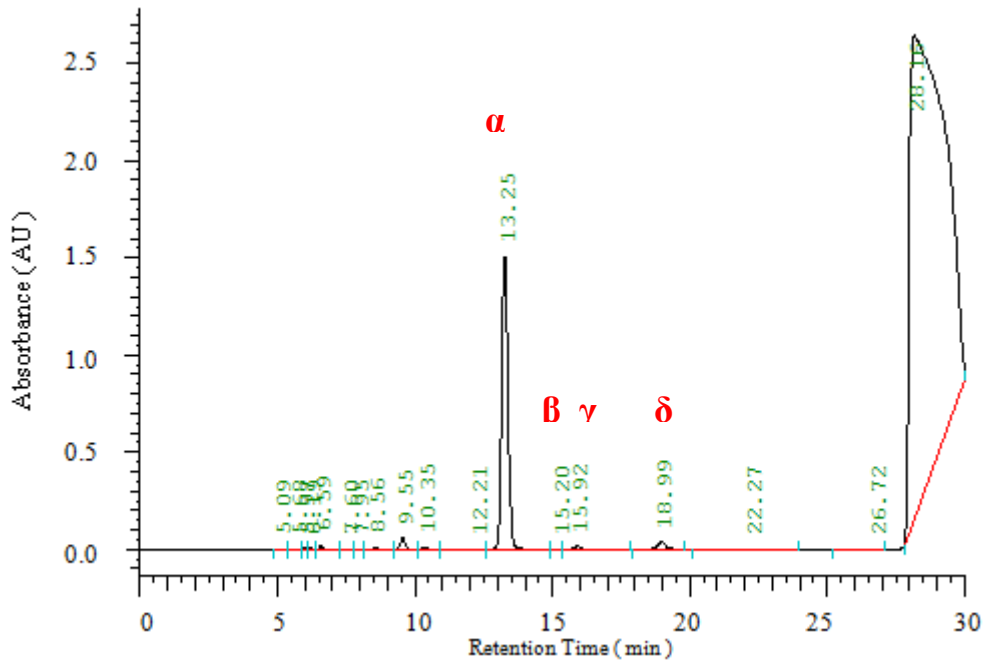


圖5-36、生育醇之高效液相層析圖。

Fig. 5-36 HPLC chromatogram of tocopherol.

管柱：Develosil Si 60-5 (250×4.6 mm)  
 沖提液：*n*-hexane：dioxane：ethanol (v/v/v)  
 =958：40：2  
 流速：1.0 mL/min  
 偵測器：298 nm

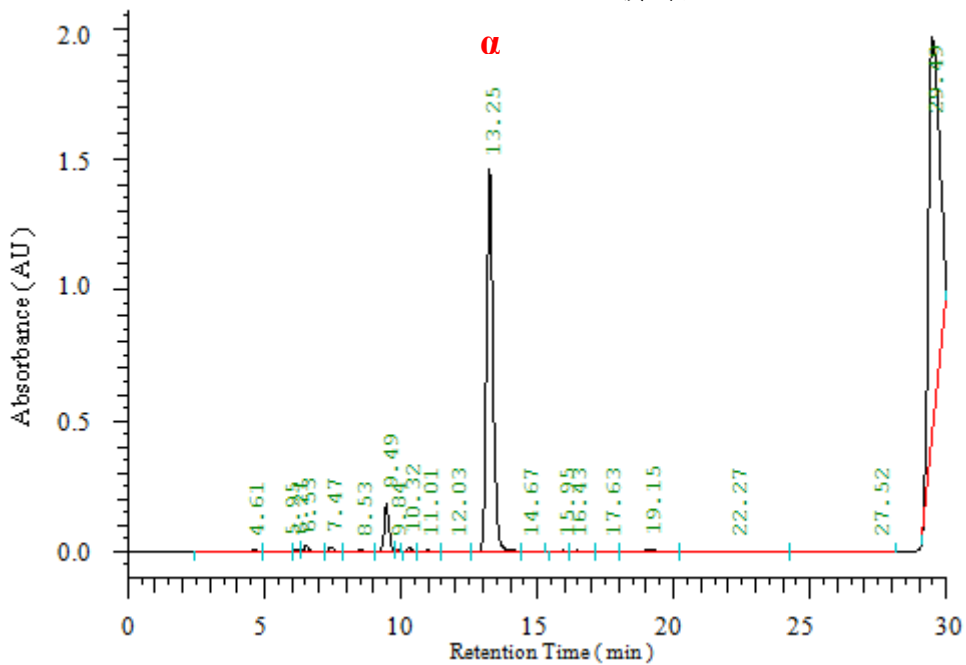


圖5-37、玄參正己烷區分物之生育醇高效液相層析圖。

Fig. 5-37 HPLC chromatogram of tocopherol from *n*-hexane fraction of *S. ningpoensis* roots.

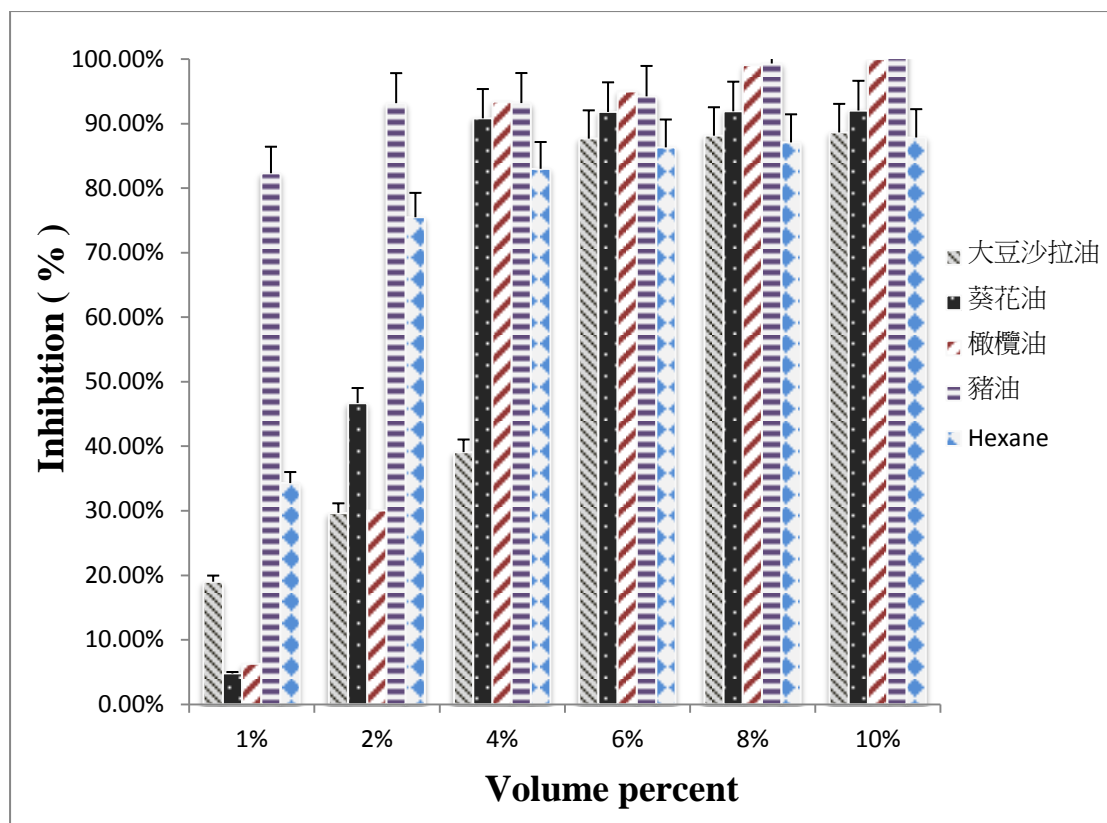


圖5-38、玄參正己烷區分物與各種油脂之 $\alpha$ -glucosidase活性抑制比較

Fig. 5-38  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of various edible oils with *n*-hexane fraction of *S. ningpoensis* roots at 1~10% level.

Analysis Date & Time : 2014/9/17 上 11:36:08  
 Vial# : 3  
 Sample Name : 2  
 Sample Type : Unknown  
 Injection Volume : 1.00

Peak#	Ret. Time	Area	Area%	Name
1	19.858	1374849	13.4178	C16:0
2	23.509	619342	6.0444	C18:0
3	24.210	4062259	39.6454	C18:1 n9c
4	25.318	4190042	40.8925	C18:2 n6c
Total		10246492	100.0000	

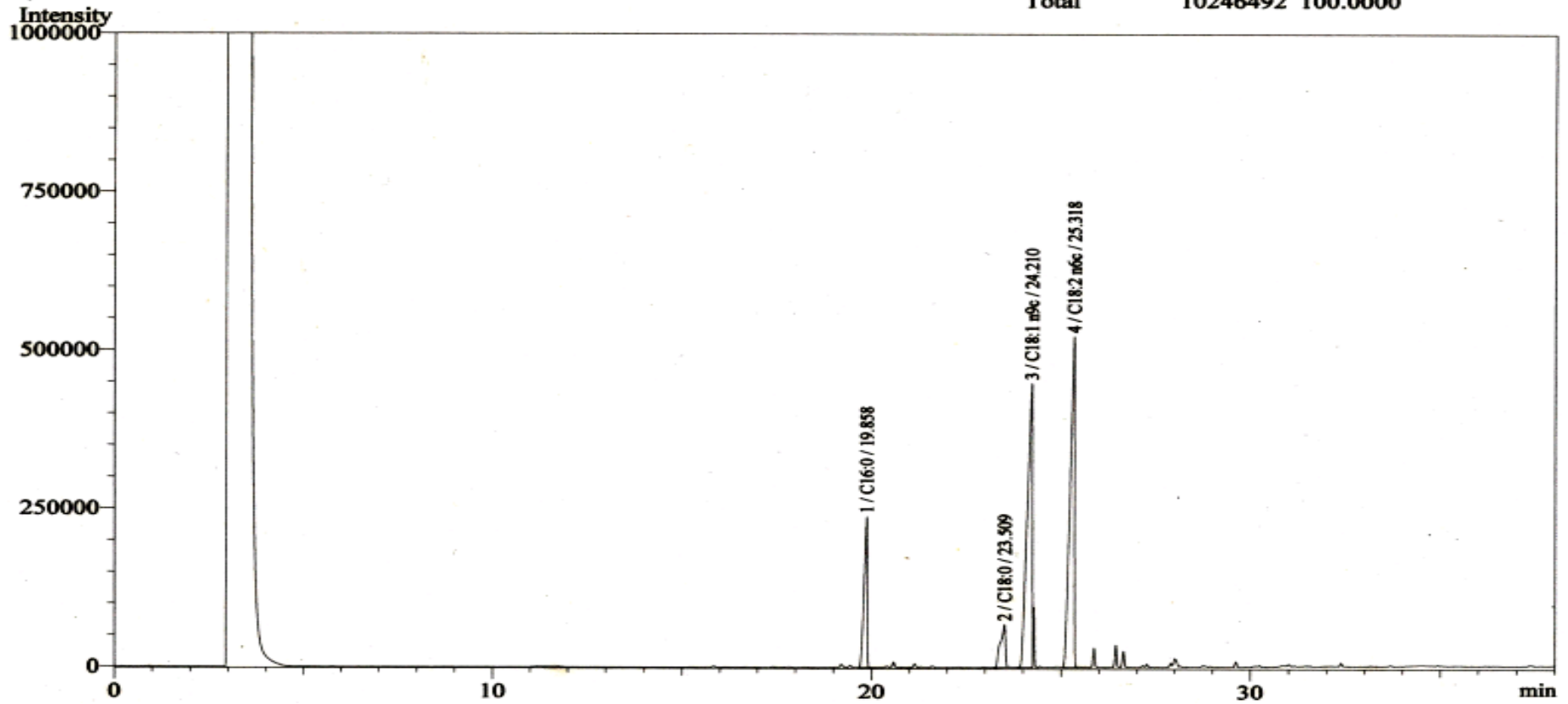


圖5-39、玄參正己烷區分物之氣相層析圖。

Fig. 5-39 The gas chromatogram of eluted fractions from *n*-hexane fraction of *S. ningpoensis* roots.

## 陸、結論

1. 玄參四種正己烷、乙酸乙酯、正丁醇及水區分物，經由抗氧化性及醣解酵素抑制作用測試，顯示玄參正己烷區分物具最佳醣解酵素抑制作用，而玄參正丁醇萃取物具最佳的抗氧化活性。
2. 玄參正己烷區分物經粗脂肪萃取，其粗脂肪含量約為 9%。
3. 玄參正己烷區分物製備出的純化物質分別利用 UV,  $^1\text{H-NMR}$  及 GC 進行鑑定，分別為亞麻油酸 (48.89%)、油酸 (39.65%)、棕櫚酸 (13.42%)、硬脂酸 (6.04%) 及少量的次亞麻油酸；再利用高效液相層析分析生育醇含量，得知玄參正己烷區分物之  $\alpha$ -生育醇含量為 16.9 mg/100g。
4. 玄參正己烷萃取物具有最佳  $\alpha$ -glucosidase 活性抑制，但經由分析後其成分多數為不飽和脂肪酸，因此和其他四種含相關性之脂肪酸的食用油脂進行  $\alpha$ -glucosidase 活性抑制，結果得知當環境中油脂含量過多時會使  $\alpha$ -glucosidase 失去效用；高含量亞麻油酸與油酸會與  $\alpha$ -glucosidase 形成複合物，降低其活性之顯現。
5. 玄參乙酸乙酯及正丁醇混合區分物，經 UV,  $^1\text{H-NMR}$  進行鑑定為 apigenin 5-O-glucoside，其屬類黃酮的一種。
6. 推測玄參的抗氧化性或醣解酵素抑制活性為眾多含量甚微的類黃酮或是其他相關的活性物質因相乘作用發揮出的活性顯現，而非出自一、兩種含量較多的活性物質上。

## 柒、參考文獻

- 洪欣怡。2012。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 食品科學系 碩士論文。
- 陳建宏。2013。小葉山葡萄經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 食品科學系 碩士論文。
- 王瑄閔。2011。甘草中具抑制醣解酵素活性萃取物及純化物質之調節葡萄糖恆定作用。東海大學食品科學研究所 碩士論文。
- 郭柏村。2011。高粱薑乙酸乙酯萃取物之抗氧化及調節血糖作用。東海大學食品科學研究所 碩士論文。
- 張昭伶。2014。秋葵萃取物及其純化物質之抗氧化及葡萄糖恆定作用。東海大學食品科學研究所 碩士論文。
- 熊皓儀。2014。核桃仁乙酸乙酯區分物及純化物質之抗氧化及醣解酵素抑制作用。東海大學 食品科學系 碩士論文。
- 巫熒。2009。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。
- 王煊。2001。糖尿病安全手冊 初版。林鬱文化事業有限公司 p47-77。
- 蘇正德。1993。維生素E快速檢測法及其在食品上應用之研究。Journal of Food and Drug Analysis 1 (1) : 61-70。
- 中藥大辭典。2003。江蘇新醫學院編。上海科學技術出版社。
- 林宏達。2003。認識糖尿病。台灣糖尿病協會。
- 沈德昌、顏兆熊。2008。第2型糖尿病藥物治療新知。台灣醫界 55:11。
- 林念穎。2009。茜草根正己烷及乙酸乙酯萃取物之抗氧化成分。東海大學食品科學研究所 碩士論文。
- 李醫明，蔣山好，朱大元。玄參屬植物化學成分與藥理活性研究進展 [J]。中草藥，1999，30(4)：307-310。
- 李醫明，曾華武，賀祥，等。玄參提取物的抗炎和抗氧化活性 [J]。第二軍



- 醫大學學報，1999，20(9)：614-616。
- 李醫明，曾華武，賀祥，等。玄參中環烯醚萜苷和苯丙素苷對 LTB<sub>4</sub> 產生及血小板聚集的影響 [J]。第二軍醫大學學報，1999，20(5)：301-303。
- 孫奎，姜華。玄參中苯丙素苷對肝細胞損傷保護作用的研究 [J]。藥學實踐雜誌，2002，20(4)：234-235。
- 李醫明，韓鎮輝，蔣山好，等。玄參中苯丙素苷對脫氧核苷酸羥基加成自由基的快速修復作用 [J]。中國藥理學報，2000，21(12)：1125-1128。
- 黃才國，李醫明，賀祥，等。玄參中苯丙素苷 XS-8 對兔血小板 cAMP 和兔血漿中 PGI<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub> 的影響 [J]。第二軍醫大學學報，2004，25(8)：920-921。
- 陳佩君。2003。女貞子抗氧化性及揮發性成分之研究。東海大學食品科學研究所 碩士論文。
- 倪正，蔡雪珠，黃一平，等。玄參提取物對大鼠血液流變性、凝固性和纖溶活性的影響 [J]。中國微循環，2004，8(3)：152-153。
- 陳少英。玄參葉的抗菌和毒性作用。福建中醫藥，1986，17(4)：57。
- 胡瑛瑛；黃真；玄參的化學成分及藥理作用研究進展 [J]；浙江中醫藥大學學報；2008 年 02 期。
- 謝麗華，劉洪宇，錢瑞琴，張春英，王建華，蔡少青；哈巴苷與哈巴俄苷對陰虛小鼠免疫功能及血漿環化核苷酸的影響 [J]；北京大學學報(醫學版)；2001 年 03 期。
- 黃蘭菁、李貫廷、李育霖、楊偉勛、黃國晉。美國糖尿病學會臨床治療指引摘要。2013。
- 張凱為，詹貴川。糖尿病與心臟血管疾病。2014。
- 李建瑩、施宏哲、蔡敏鈴、羅美婷。治療第二型糖尿病藥物簡介。2009。
- 鍾玉玲。2003。海巴戟天葉、莖及果實粗萃物的抗氧化活性之比較。嘉南藥理科技大學 生物科技研究所 碩士論文。
- 唐孟成、賈之慎、朱祥瑞和呂順霖。1996。春秋桑葉中黃酮類化合物總量及

- 提取方法比較。浙江農業大學學報 22 ( 4 ) : 394-398。
- 林建谷。2008。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。
- 鄭芳琪。2009。番石榴葉水萃取物降血糖作用及有效成分分離。國立台灣大  
學生物資源暨農學院食品科學研究所博士論文。
- Abuja, PM. And R. Albertini. 2001. Methods for monitoring oxidative stress,  
lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin Chim Acta.*,  
306(1-2):1-17.
- Ali, H., Houghton, P. J., Soumyanath, A. 2006.  $\alpha$ -Amylase inhibitory activity of  
some malaysian plants used to treat diabetes ; with particular reference to  
*Phyllanthus amarus*. *Journal of Ethnopharmacology* 107: 449–455.
- American Diabetes Association (ADA).2014. Standard of medical care in  
diabetes-2014. *Diabetes Care*, Supplement 1, 37: S14-S80.
- Anguelova, T. and J.Warthsén. 2000. Degradation of lycopene,  $\alpha$ -carotene, and  
 $\beta$ -carotene during lipid peroxidation. *J. Food Sci.*, 65:71-75.
- Arnao, M. B., A. Cano, J. Hernadez-Ruiz, F. Carcia-Canovas, and M. Acosta.  
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*, 72: 145-171.
- Bando, N. and H. Hayashi, S. Wakamatsu, T. Inakuma, M. Miyoshi, A. Nagao, R.  
Yamauchi and J. Terao. 2004. Participation of singlet oxygen in  
ultraviolet-a-induced lipid peroxidation in mouse skin and its inhibition by  
dietary  $\beta$ -carotene: an *ex vivo* study. *Free Radic Biol Med.*, 37: 1854-1863.
- Barry, H. and M. C. John. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford

science.

- Bate, S. and E. C. Swain. 1962. Comparative Biochemistry, Vol. 3, Mason, H. S. and Florkin, M., Eds., Academic Press, New York. 764.
- 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.
- Bhandari M-R, Nilubon J-A, Hong G, and Kawabata J. 2008.  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory activities of Nepalese edicinal herb Pakhanbhed (*Bergenia ciliate*, Haw ). *Science Direct*, 106: 247252.
- Bors, W. and C. Michel. 1999. Antioxidant capacity of flavonols and gallate esters: pulse radiolysis studies. *Free Radic. Biol. Med.*, 27:1413-1426
- Bros, W., W. Heller, C. Michel and M. Saran. 1990. Flavonoids as antioxidants : Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.*, 186: 343-355.
- Burton, G. W. 1994. Vitamin E: molecular and biological function. *Pro. Nutr. Soc.*, 53: 251-262
- Ceriello, A. 2003. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a “causal” antioxidant therapy. *Diabetes Care*, 26: 1589-1596.
- Colin, C. D., Tom H.-W. H., Van, H. T., Rujee, K. D., Sharon., Tan., Sigrun, C. and Basil, D. R. 2006. Harpagoside suppresses lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 expression through inhibition of NF- $\kappa$ B activation. *J. Ethnopharmacology.*, 104: 149–155.
- Cook, N. C. and S. Samman. 1996. Flavonoids: Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.*, 7: 66-76.
- Da, Y. Z. ; Yi, M. L. ; S, H. J. and W, Y. G. 2000. Phenylpropanoid glycosides from *Scrophularia ningpoensis*. *Phytochemistry* 54 : 923-925.
- Dimitriadis, G., P. Mitrou, V. Lambadiari, E. Maratou and SA. Raptis. 2011.

- Insulin effect in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 93:S52-S59.
- Dodson, G. and D. Sieiner. 1998. The role of assembly in insulin's biosynthesis. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 8: 189-194.
- Fang, Y. Z. 2002. Free radicals and nutrition. In: Fang, Y. Z., Zheng, R. L.,(Ed.). Theory and application of free radical biology. *Beijing: Scientific Press*, 647.
- Frandsen, T. P., 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.
- Fridovich, I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutase. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 97-112.
- Fujisawa, T., H. Ikegami, K. Inoue, Y. Kawabata and T. Ogihara, 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.
- George, K. B.; Lopes, Herbert, M.; Scchulman and Marcelo, H. L. 1999. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1472:142-152.
- Gorkum, R. V.; Bouwman, E. 2005. The oxidative drying of alkyd paint catalysed by metal complexes. *Coord. Chem. Rev.* 249: 1709-1728.
- Green, K., M. D. Brend and M. P. Murphy. 2004. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic stratege in diabetes. *Diabetes*, 53: S110-S118.
- Gutteridge, J. M. 1993. Anthracycline toxicity, iron and oxygen radicals, and chelation therapy. *J. Lab. Clin. Med.* 122: 228-229.
- Halliwell, B., M. A. Murcia, S. Chirico and O. I. Aruoma. 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.

- Horn, R. C., and V. M. Vargas. 2003. Antimutagenic activity of extracts of natural substances in the Salmonella/microsome assay. *Mutagenesis* 18:113-118.
- Huang, M. T., R. L. Chang, A. W. Wood, H. L. Newmark, J. M. Sayer, H. Yagi, D. M. Jerina and A. H. Conney. 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.
- Jacob, R. A. 1994. Nutrition, health and antioxidants. *Inform*, 11: 1271-1275.
- Jacob, R. A. and B. J. Burri. 1996. Oxidative damage and defense. *American Journal of Clinical Nutrition*, 63: 985S–990S.
- J. B. Harborne ( ED. ). The flavonoids—Advances in research since 1986 Chapman & Hall, London, U.K. 1994. 675 pp. ISBN 0-412-28070-0.
- Kamal-Eldin, A. and L. A. Appelqvist. 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31: 671-701.
- Kellogg, E. W. III and I. Fridovich. 1975. Superoxide, hydrogen peroxide and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *J. Biol. Chem.* 250: 8812-8815.
- Khaled, H., K. Henda, B. Sahla, M. Kais, f. Abdelfattah and A. Noureddine. 2011. Inhibitory potential of omega-3 fatty and fenugreek essential oil on key enzymes of carbohydrate-digestion and hypertension in diabetes rats. *Lipids in Health and Disease*, 10:226
- L.-T. Ng, C.-H. Hsu and C.-H. Su. 2013. Inhibitory potential of fatty acids on key enzymes related to type 2 diabetes. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* Volume 39, Number 4, July/August, Pages 415–421.
- Lillioja, S., D. M. Mott, M. Spraul, R. Ferraro, J. E. Foley, E. Ravussin, W. C. Knowler, P. H. Bennett and C. Bogardus. 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., F. Guglielmi, C. Casalini, M. Meoni, V. Cheynier and P. Dolara. 2001. Antioxidant and radical scavenging properties *in vitro* of polyphenolic extracts from red wine. *Eur. J. Nutr.* 40: 74-77.
- Maarten, F. C. M., L. M. Petra, H. M. Wilbert and A. P. Eric. 1999. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction a review. *European Journal of Obs. Gynecol. Reprod. Biol.* 82: 171-184.
- Maxwell, L. and J. Gavin. 1992. Anti-oxidant therapy improves microvascular ultrastructure and perfusion in postischemic myocardium. *Microvasc. Res.* 43: 255-266.
- McCord, J. M. 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.* 108(8): 652-659.
- Meyer, A. S. and A. Isaksen. 1995. Application of enzymes as food antioxidants. *Trends in Food Sci. and Tech.* 6: 300-304.
- Milic, B. L., S. M. Djilas and J. M. Canadanovic-Brunet. 1998. Antioxidative activity of phenolic compounds on the metal-ion breakdown of lipid peroxidation system. *Food Chem.* 61: 443-447.
- Miller, N. J., C. A. Rice-Evans, M. J. Davies, V. Gopinathan and A. Milner. 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.
- Morrissey, P. A. and N.M. O'Brien. 1998. Dietary antioxidants in health and disease. *Int. Dairy J.* 8: 463-472.
- Moskovitz, J., M. B. Yim, and P. B. Chock. 2002. Free radicals and disease. *Arch. Biochem. Biophys.* 397(2): 354-359.
- Mruka, D. D., B. Silvestrinib, M. Y. Moa, and C. Y. Chenga. 2002. Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception.* 67: 305-311.
- Nawar, W. W. 1985. Lipid in "Food Chemistry". Fennema, O. R. Ed., Marcel Dekker, INC., New York. 139-244.

- N. Didry, V. Seidel, L. Dubreuil, F. Tillequin, F. Bailleul. 1999. Isolation and antibacterial activity of phenylpropanoid derivatives from *Ballota nigra* [ J ] .  
*J. Ethnopharmacol*, 67(2) : 197.
- Niki, E. 1992. Active oxygens and free radicals in biology. *Yukagaku*, 41(9): 768-773.
- Paulina, B., M. D. Ana, F. Lidia, D. S. Javier, J. A. Mari´a and M. S. Ana 2004. Phenylpropanoid glycosides from *Scrophularia scorodonia* : In vitro anti-inflammatory activity. *Life Sciences*, 74 : 2515-2526.
- Perkins, E. G. 1967. Formation of nonvolatile decomposition products in heated fats and oils. *Food Technol.*, 21: 125-134.
- Rahimi, R., S. Nikfar, B. Larijani and M. abdollahi. 2005. A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomed. Pharmacother.*, 59: 365-373.
- Reaven, G. M., Y. D. Chen, C. B. Hollenbeck, W. H. Sheu, D. Ostrega and K. S. Polonsky. 1993. Plasma insulin C-peptide, and proinsulin glucose tolerance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 76: 44-48.
- Rhabasa-Lhoret, R. and J. L. Chiasson. 2004. Alpha-glucosidase inhibitors (3rd ed.). In R. A. Defronzo, E. Ferrannini, H. Keen and P. Zimmet (Eds.). *International textbook of diabetes mellitus* (Vol. 1). UK: John Wiley.
- Rice-Evans, C. A., N. J. Miller and G. Paganga. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20:933-956.
- Rikans, L. E. and K. R. Hornbrook. 1997. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim. Biophys. Acta.* 1362: 116-127.
- Saltiel, AR. and CR. Kahn. 2001. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 414: 799-806.
- Scalbert, A. and G. Williamson. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130: 2073-2085.
- Sen, C. K. 1997. Nutritional biochemistry of cellular glutathione. *Nutrl. Biochem.*

8: 660-672.

- Shepherd, P.R., and B.B. Kahn. 1999. Glucose transporters and insulin action: Implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 341(4): 248-257.
- Shigenaga, M. K., C. J. Gimeno, and B. N. Ames. 1989. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 9697-9701.
- S. Kadota, Q. Xiong, K. Hase, Y. Tezuka and T. Namba. 1999. Acteoside inhibits apoptosis in D-galactosamine and lipopolysaccharide-induced liver injury. *Life Sciences*, Vol. 65, No. 4, pp. 421-430.
- Shim, Y.-J., H.-K. Doo, S.-Y. Ahn, Y.-S. Kim, J.-K. Seong, I.-S. Park and B.-H. Min. 2003. Inhibitory effect of aqueous extract from the gall of *Rhus chinensis* on alpha-glucosidase activity and postprandial blood glucose. *J. Ethnopharmacology* 85: 283–287.
- Tadera, K., Y. Minami, K. Takamatsu and T. Matsuoka. 2006. Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase by flavonoids. *J Nutr Sci Vitaminol* 52:149–153.
- Takeshi, K., N. shoichi, S. Jo, K. Yansunori, I. Yasuhiko, K. Masashi, N. Kisihio, S. Akira, S. Yutaka, I. Chikako, S. Kenji, N. Kyohei and K. Takashi .2002. Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus, *Diabetes Research and Clinical Practice.* 55: 65-85.
- Topinka, J., B. Bincova, R. J. Sram and A. N. Erin. 1989. The influence of  $\alpha$ -tocopherol and pyritinol on oxidative DNA damage and lipid peroxidation in human lymphocytes. *Mutat Res.* 255: 131.
- Wilcox, G. 2005. Insulin and insulin resistance. *Clinical Biochemist Reviews*, 26(2):19-39.
- Wu, G., Y. Z. Fang, S. Yang, J. R. Lupton and N. D. Turner. 2003. Glutathione metabolism and its implications for health. *Nutr. Sci.* 18: 489-492.
- Y. Li, L. Zhang, L.i Feng , Q. Jia , J. Xu, R. Wang , Z. Wang and Y. Wu. 2011.



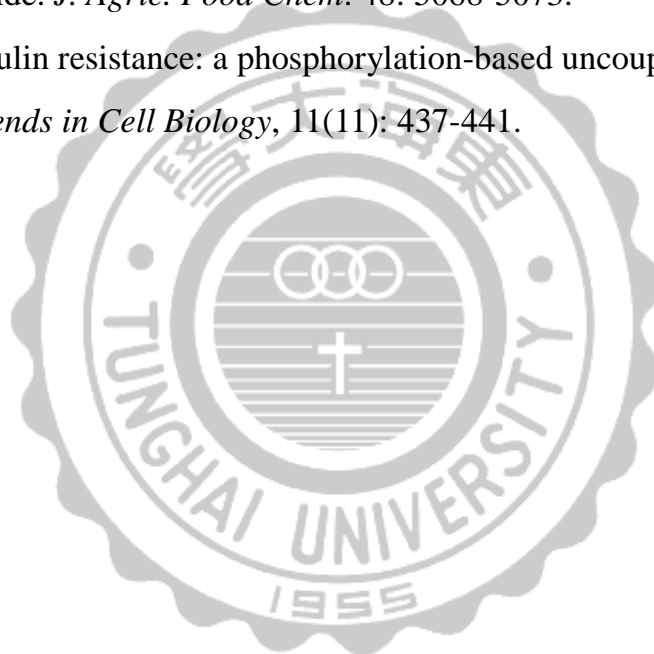
Effects of  $\beta$ -glucosidase hydrolyzed products of harpagide and harpagoside on cyclooxygenase-2 (COX-2) in vitro. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 19 (2011) 4882–4886.

Y. C. Kim, E. J. Jeong, K. Y. Lee, S. H. Kim and S. H. Sung. 2008.

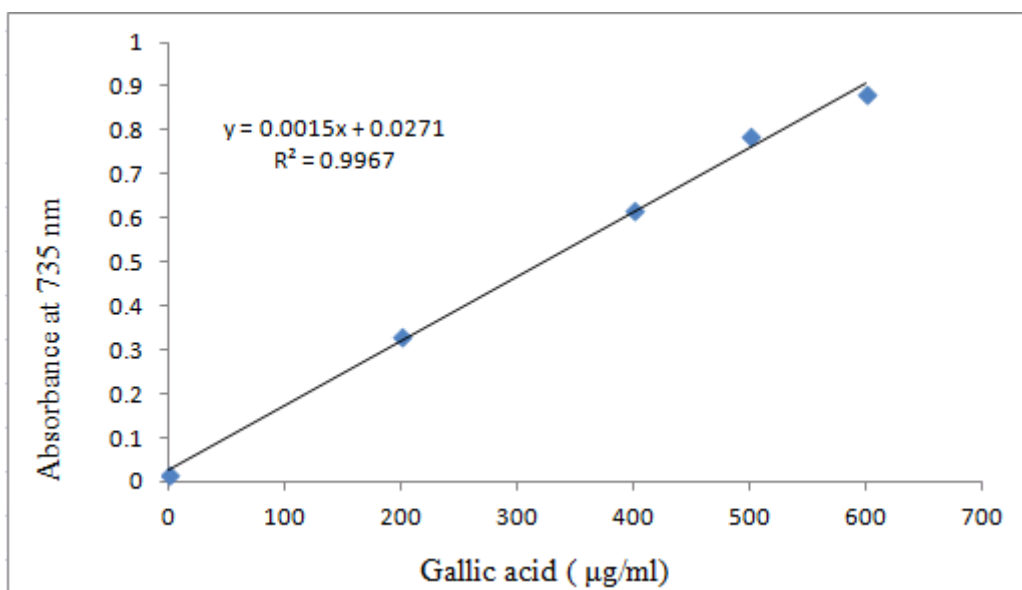
Cognitive-enhancing and antioxidant activities of iridoid glycosides from *Scrophularia buergeriana* in scopolamine-treated mice. *European J. Pharmacology*, 588 (2008) 78–84.

Yokozawa, T., E. J. Cho, Y. Hara and K. Kitaani. 2000. Antioxidative activity of green tea treat with radical initiator 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride. *J. Agric. Food Chem.* 48: 5068-5073.

Zick, Y. 2001. Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling. *Trends in Cell Biology*, 11(11): 437-441.

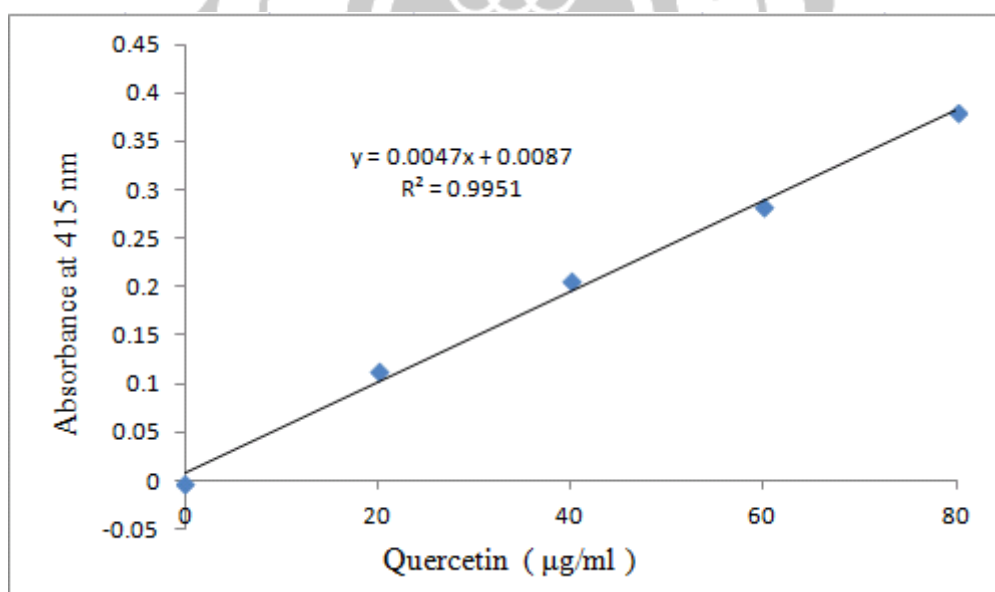


## 捌、附錄



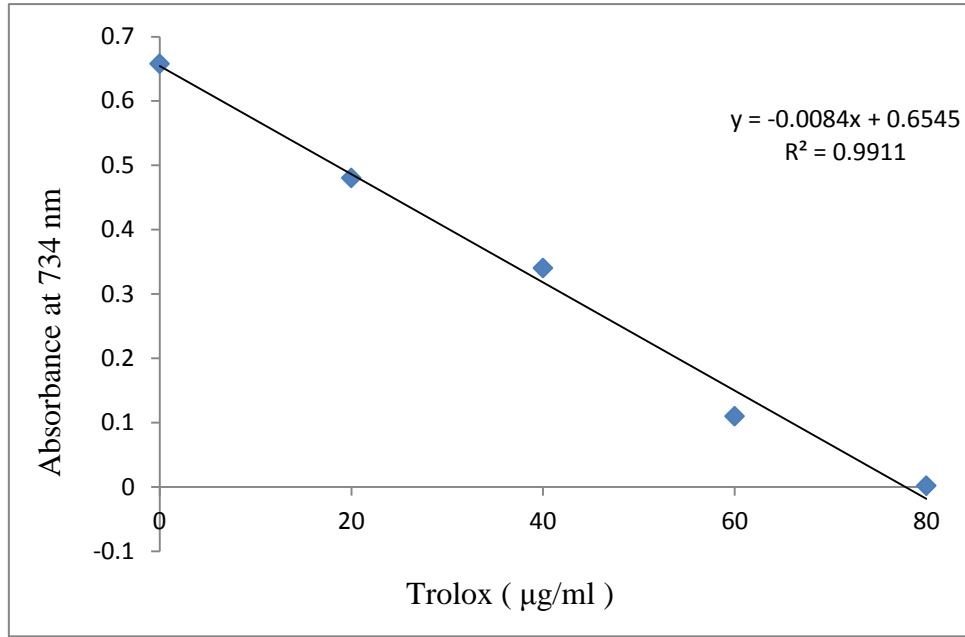
附錄一、沒食子酸之標準曲線。

Appendix 1 Standard curve of gallic acid.

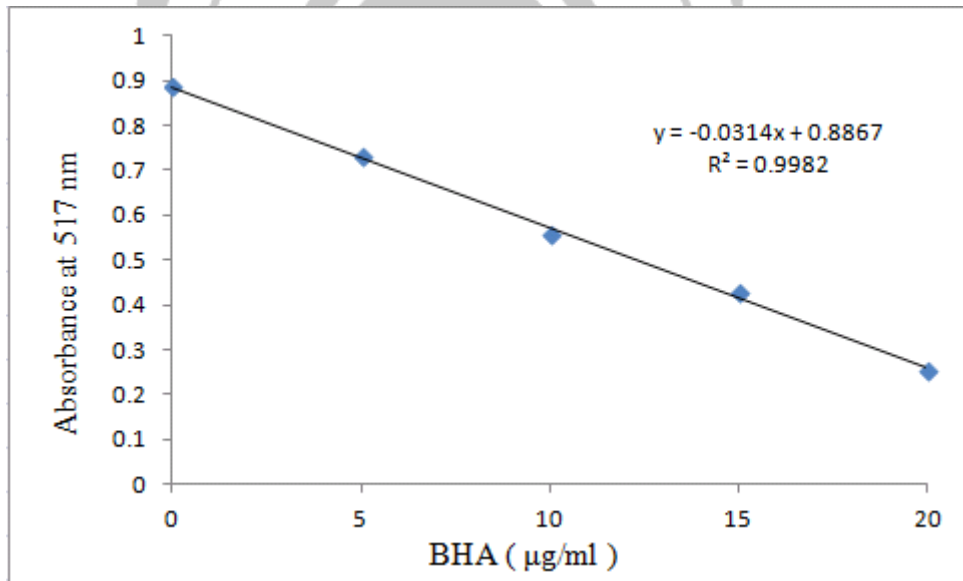


附錄二、槲皮酮之標準曲線。

Appendix 2 Standard curve of quercetin.

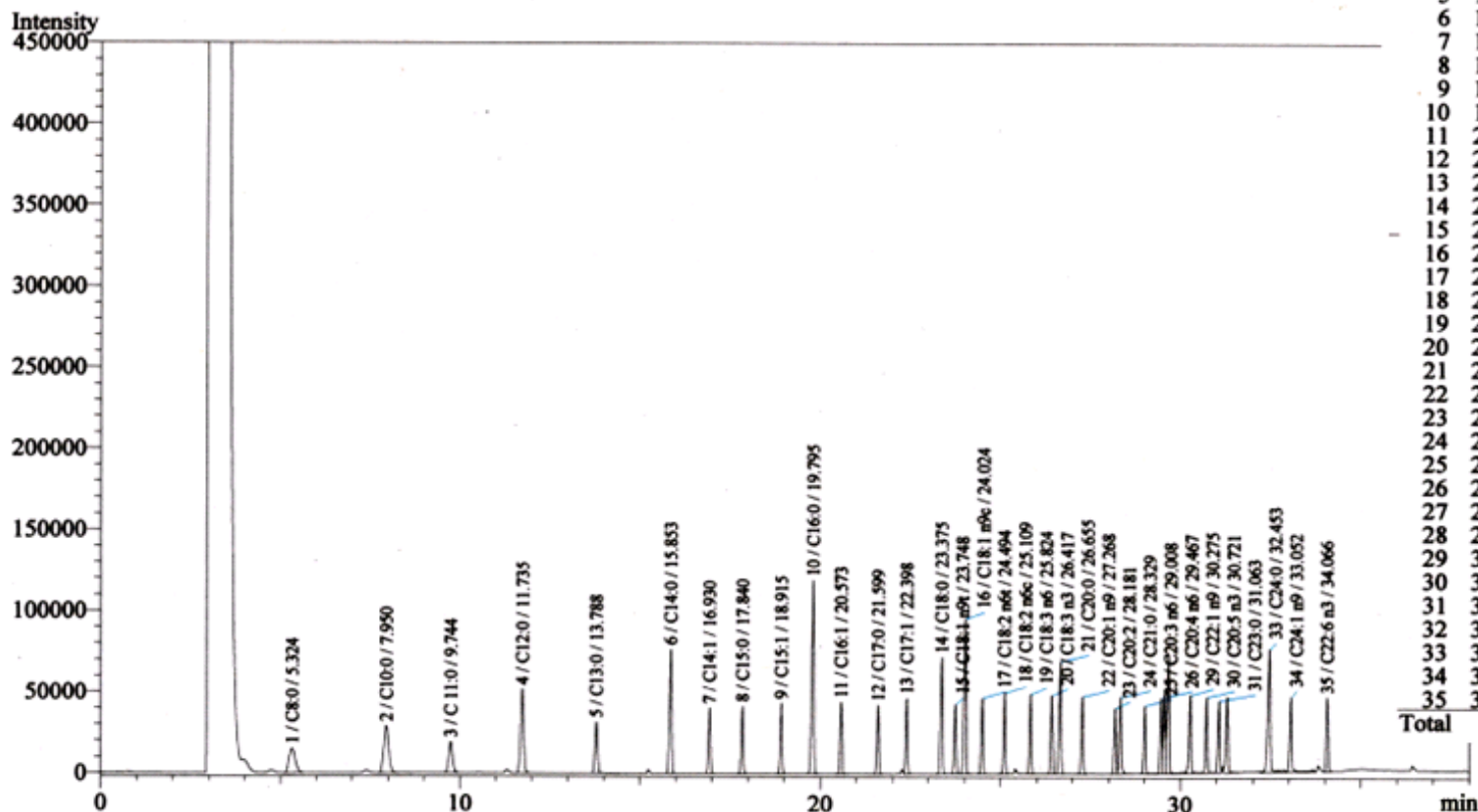


附錄三、Trolox 之標準曲線。  
Appendix 3 Standard curve of trolox.



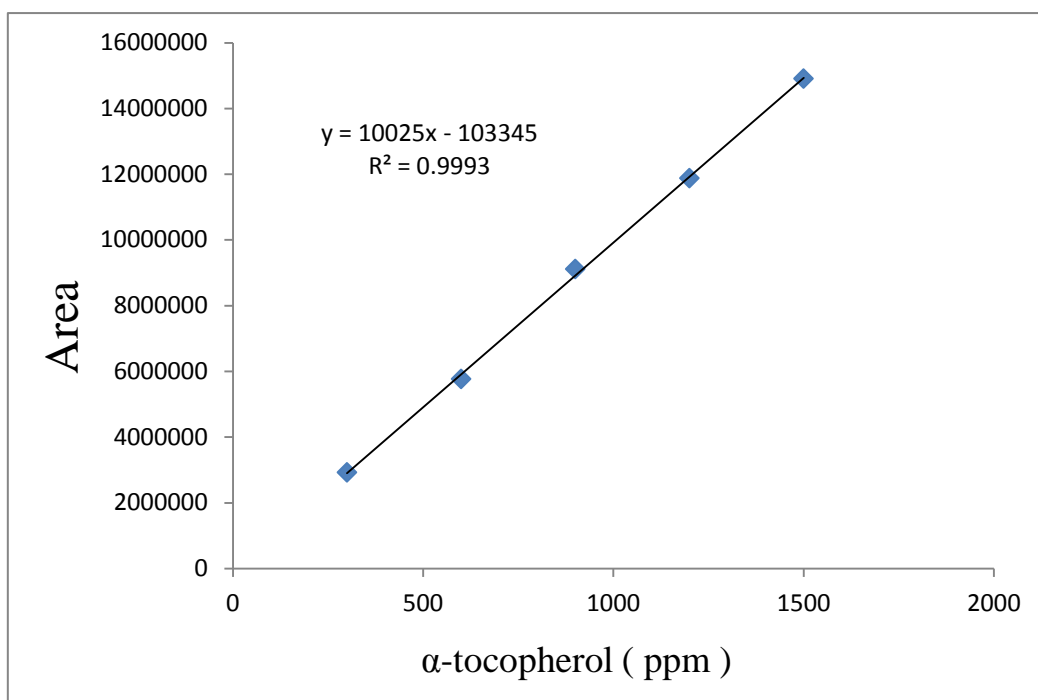
附錄四、BHA之標準曲線。  
Appendix 4 Standard curve of BHA.

Analysis Date & Time : 2014/9/17 下 12:18:09  
 Vial# : 4  
 Sample Name : s2  
 Sample Type : Unknown  
 Injection Volume : 1.00



Peak#	Ret.Time	Area	Area%	Name
1	5.324	186292	2.4867	C8:0
2	7.950	273564	3.6516	C10:0
3	9.744	145177	1.9379	C11:0
4	11.735	308846	4.1226	C12:0
5	13.788	158783	2.1195	C13:0
6	15.853	330981	4.4181	C14:0
7	16.930	160784	2.1462	C14:1
8	17.840	161237	2.1523	C15:0
9	18.915	168935	2.2550	C15:1
10	19.795	512459	6.8405	C16:0
11	20.573	160299	2.1397	C16:1
12	21.599	154421	2.0613	C17:0
13	22.398	169212	2.2587	C17:1
14	23.375	300754	4.0146	C18:0
15	23.748	163015	2.1760	C18:1 n9
16	24.024	366780	4.8959	C18:1 n9
17	24.494	166623	2.2242	C18:2 n6
18	25.109	178076	2.3770	C18:2 n6
19	25.824	169665	2.2648	C18:3 n6
20	26.417	169062	2.2567	C18:3 n3
21	26.655	288923	3.8567	C20:0
22	27.268	174550	2.3300	C20:1 n9
23	28.181	147836	1.9734	C20:2
24	28.329	187043	2.4967	C21:0
25	29.008	152044	2.0295	C20:3 n6
26	29.467	166830	2.2269	C20:4 n6
27	29.560	175366	2.3409	C20:3 n3
28	29.672	320202	4.2742	C22:0
29	30.275	194457	2.5957	C22:1 n9
30	30.721	169581	2.2636	C20:5 n3
31	31.063	167908	2.2413	C23:0
32	31.286	186199	2.4855	C22:2
33	32.453	390274	5.2095	C24:0
34	33.052	201397	2.6883	C24:1 n9
35	34.066	163957	2.1886	C22:6 n3
Total		7491532	100.0000	

附錄五、氣相層析之標準品。  
 Appendix 5 The standard of gas chromatogram.



附錄六、α-生育醇之標準曲線。  
Appendix 6 Standard curve of α-tocopherol.

