

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計 畫 *
* : 白鳳菜抗醣解與 AGE 抑制作用 *
* 名 稱 *
* ***** *

執行計畫學生： 姚品如
學生計畫編號： MOST 106-2813-C-041-008-B
研 究 期 間： 106 年 07 月 01 日至 107 年 02 月 28 日止，計 8 個月
指 導 教 授： 蕭慧美

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2 年後可公開查詢

執 行 單 位： 嘉藥學校財團法人嘉南藥理大學保健營養系
(含碩士班)

中華民國

107 年 03 月 12 日

白鳳菜水萃物之抗醣解作用

Inhibition of α -amylase and α -glucosidase activity by water extract from *Gynura formosana*

摘要

白鳳菜(*Gynura formosana*) 為台灣特有種植物，使用於護肝、消炎、降尿酸及糖尿或結石等疾病；此外，本實驗室發現將水萃白鳳菜乾燥粉末餵食高脂肥胖小鼠後，具有降血糖之作用。因此本實驗將白鳳菜以熱水萃取乾燥後進行多酚與類黃酮含量分析，並以體外試驗探討白鳳菜水萃物對人體小腸中主要的醣類消化酵素 α -澱粉酶(α -amylase)和 α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase)之抑制作用，以預測其抗糖解效用及未來在降血糖之應用潛力。實驗結果顯示，白鳳菜僅對於 α -葡萄糖苷酶具抑制作用($IC_{50}=26.7\pm1.5\text{mg/ml}$)。推測其 α -葡萄糖苷酶抑制能力和酚類化合物含量之間具有關聯性。

實驗目的

糖尿病病人長期血糖控制不穩定會使體內氧化壓力逐漸增加，導致 advanced glycation end products (AGE)、脂質過氧化產物、OX-LDL 之生成，進而造成腎衰竭、心血管疾病等併發症，並增加死亡率，而 AGEs 亦與助長發炎、氧化損傷的致病相關 (Yamagishi, 2009)，因此血糖的控制十分重要，故 AGEs 與疾病的研究以糖尿病為多。

本實驗室發現白鳳菜水萃物乾燥粉末餵食高脂肥胖小鼠後，除有降尿酸外同時有降低血糖之現象。雖然白鳳菜在坊間常被用來降血糖，但是對於白鳳菜降血糖的科學報告並不多，因此本實驗想先行利用體外試驗探討白鳳菜對於醣類分解酵素的抑制情形以及抗糖化效應，是否有降血糖的功效以供未來進一步的研究。

白鳳菜學名為 *Gynura formosana*，為臺灣固有種的菊科(Compositae)藥用植物，其性涼、味甘淡、無毒，莖葉肉質脆嫩肥厚，具有密實短絨毛。主入肝、肺、腎、大小腸諸經，有消炎、解熱、解毒、利尿、降血壓等功效，主治肝炎、肝硬化、肺炎、高血壓、感冒、腎炎、水腫、便秘和腸炎等。民間亦流傳使用於利尿、尿酸、糖尿與結石等疾病。白鳳菜相關的科學報告並不多，如：白鳳菜之 70% 丙酮萃取物，具有 DPPH 自由基清除活性及鐵還原能力且其含有的酚性成分與清除自由基之活性相關 (黃氏, 2002)，白鳳菜的氯仿分離物在 HL-60 細胞株模式下具有抑制增生的效果 (陳氏等人 2003)。發現白鳳菜在鎮痛、抗炎、急性藥物誘發肝損傷之預防作用及四氯化碳誘發慢性肝損傷之護肝功能方面皆具有一定之效果 (謝氏

2004)。本實驗室發現白鳳菜水草物在高尿酸動物模式中具有降血清尿酸作用（王氏 2015）。以白鳳菜水草物乾燥粉末餵食高脂肥胖小鼠後，除降尿酸外同時也具有降低血糖之現象蔡氏（2012）。雖白鳳菜在坊間常使用於降血糖，但目前對白鳳菜降血糖之相關研究仍不足，因此本實驗想採用體外試驗探討白鳳菜對於醣類分解酵素的抑制情形及抗糖化效應。

蔬果中不僅含有維生素、礦物質或纖維素，也富含植化素(Phytochemicals)。此植物性化學成分 phytochemicals 有益人體健康，是目前學術界所了解的議題，其中 phytochemicals 的種類以植物多酚的研究最多，這些富含酚環的 phytochemicals 又可區分為四大類：類黃酮、酚酸、stilbene（以 resveratrol 為代表）、lignans，又以類黃酮最為常見。許多流行病學與臨床研究也指出飲食中所富含的多酚類具抗氧化作用亦有助於降低第二型糖尿病之發生率。關於降血糖的相關機制可包含攝食後的吸收、細胞攝入、細胞利用與代謝等，簡單說明如下：

1. 小腸對醣類的消化吸收：參與小腸對醣類消化的酵素以 α -澱粉酶、 α -葡萄糖苷酶為最主要。各種莓果如草莓、蔓越莓、藍莓與黑醋栗（McDoig et al, 2005）以及綠茶紅茶等（Koh et al, 2010）之萃出物都具有體外抑制 α -澱粉酶、 α -葡萄糖苷酶活性之作用。
2. 細胞對葡萄糖的攝入：黑豆籽之外皮富含多酚類物質，如：花青素和原花青素。研究發現，其中含有的花青素透過活化骨骼肌與肝臟的蛋白激酶（AMPK），進而改善高血糖和胰島素敏感性，此外亦促進骨骼肌中葡萄糖轉運蛋白 4 (GLUT-4) 的和抑制肝臟中糖質新生，使得高血糖現象改善(Kurimoto et al. 2013)。茶葉中（綠茶、烏龍茶和紅茶），具抑制人唾液 α -澱粉酶和哺乳動物 α -葡萄糖苷酶酵素之能力，其抑制率與多酚類中的兒茶素及茶黃素具相關性 (Zhang et al. 2010)。
3. 胰島細胞的分泌功能：研究指出長期高血糖會增加細胞內自由基生成，並干擾細胞粒線體功能，因而造成胰島細胞分泌胰島素的功能受損 (Cai et al. 2009)。STZ-誘導糖尿病大鼠實驗發現 Quercetin 具有降低氧化傷害、保護胰島細胞之完整性的作用(Coskun et al. 2005)。

研究方法

一、 樣品製備

1. 白鳳菜

將白鳳菜葉片以水清洗乾淨後晾乾，去除水分秤重，至於-80°C 冷凍 24 小時再以真空冷凍乾燥機進行乾燥。取乾燥粉末 10g 加入 1000ml RO 水後，加熱煮沸 10 分鐘，以 3000rpm 離心 5 分鐘取得上清液，再經由減壓

濃縮機去除大部分水分，再轉以冷凍乾燥造至全乾，得到乾燥萃取物秤重後儲存於-20°C 備用。

二、成分分析

1. 總多酚類含量

利用 Folin-Ciocalteu 比色法測定總多酚類含量，以濃度範圍 0.5~0mg/mL 的 gallic acid 作為標準曲線，換算樣品之 gallic acid 含量。取 0.1mL 的樣品，加入 2mL 的 2%Na₂CO₃ 反應 2 分鐘，最後加入 0.1mL 的 Folin-Ciocalteu's phenol reagent，室溫下反應 30 分鐘後，以分光光度計於 750nm 下測定吸光值。

2. 類黃酮類含量

利用 2-aminoethyl diphenyl broate reagent 氧化測定類黃酮含量，以濃度範圍 0.8~0mg/mL 的 rutin 作為標準曲線，換算樣品之 rutin 含量。實驗組取 0.5mL 的樣品，首先加入 1.5mL 的 95% Ethanol，然後加入 0.1mL 的 10%AlCl₃，再加入 0.1mL 的 1M CH₃COOH，最後加入 2.8mL 的二次水，室溫下反應 30 分鐘，以分光光度計於 415nm 下測定吸光值。扣色組則是將加入 0.1mL 的 10%AlCl₃ 改為加入 0.1mL 的二次水，其他步驟與實驗組並無差異。

三、體外 α-澱粉酶(α-amylase)和 α-葡萄糖苷酶(α-glucosidase)抑制能力

1. α-澱粉酶(α-amylase) 抑制能力

以濃度範圍 0.3~0.1mg/mL 的 acarbose 作為標準曲線，對照樣品之抑制效率。取 0.05ml 樣品(acarbose)溶液加入 0.1ml 1%starch 均勻混合後，使用振盪器震盪混勻後放入 37°C 水浴 5 分鐘後，再加入 0.1ml α-amylase(5U/ml)，置入 37°C 水域反應 10 分鐘，接著加入 0.6ml DNS(1% 3,5-dinitrosalicylic acid 及 12% sodium potassium tartrate，溶於 0.4M NaOH)試劑終止反應，置入沸水域反應 10 分鐘。最後加入 1ml 蒸餾水稀釋，待至溶液回溫到室溫再於 540nm 下測定吸光值。

酵素活性抑制百分比 (%) = $1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{background}}) / A_{\text{control}} \times 100$

2. α-葡萄糖苷酶(α-glucosidase)抑制能力

以濃度範圍 4~0.25mg/mL 的 acarbose 作為標準曲線，對照樣品之抑制效率。取 0.1ml 樣品(acarbose)溶液加入 0.05ml α-glucosidase(4U/ml)均勻混合後，再加入 0.1ml pNPG(6mol/L)，置入 37°C 水域反應 30 分鐘。最後加入 3ml Na₂CO₃(1mol/L)終止反應，再於 420nm 下測定吸光值。

酵素活性抑制百分比 (%) = $1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{background}}) / A_{\text{control}} \times 100$

結果與討論

在萃取過程中，白鳳菜原重大約為 10g，其抽出的比率為 10.58% (表一)。白鳳菜的抽出物溶於水後較黏稠，呈現橘褐色半透明。

在 α -澱粉酶(α -amylase) 抑制能力實驗中，以 acarbose 作為實驗中的標準品，acarbose $IC_{50} = 0.2 \pm 0.0$ (mg/ml)。實驗結果顯示，白鳳菜無呈現任何抑制 α -amylase 之活性。

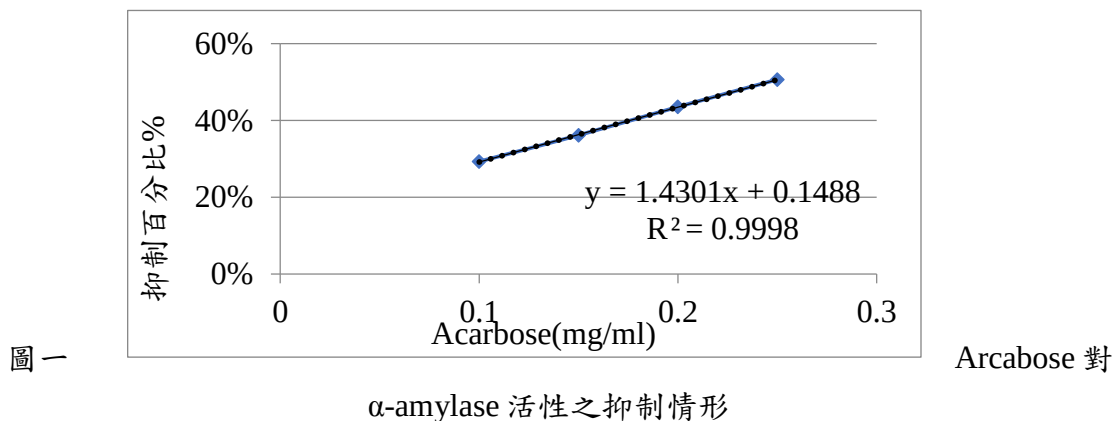
在 α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase) 抑制能力實驗中，以 acarbose 作為實驗中的標準品。如表三所示，白鳳菜與 acarbose IC_{50} 的 α -glucosidase 活性，兩者之需求量具有顯著性的落差，白鳳菜需 26.7 ± 1.5 (mg/ml)而 acarbose 只需 2.9 ± 0.2 (mg/ml)。白鳳菜類黃酮含量(15.9 ± 0.9 mg/g extract)，總多酚含量為 63.0 ± 6.9 mg/g extrac。因此推測 α -glucosidase 抑制能力和酚類化合物含量之間具有高相關性。

表一、樣品之萃出率(%)

樣品	原總葉重(g)	抽出乾物重(g)	抽出比率%
白鳳菜 (2017.06.28 採收)	10.00	2.8	28.66

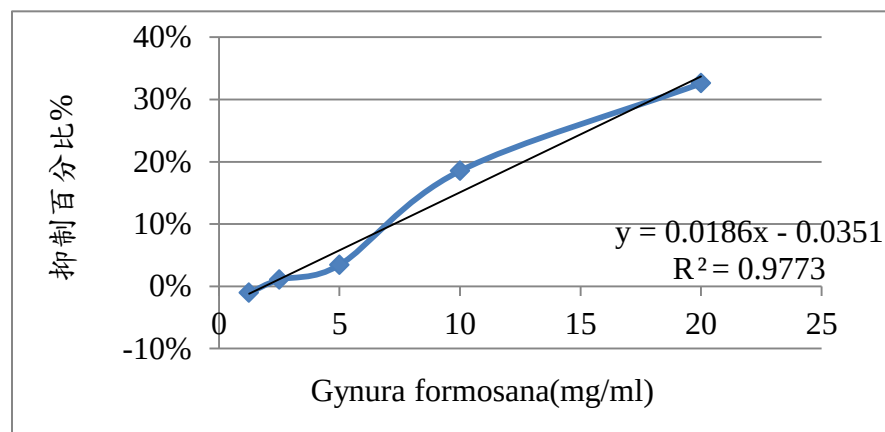
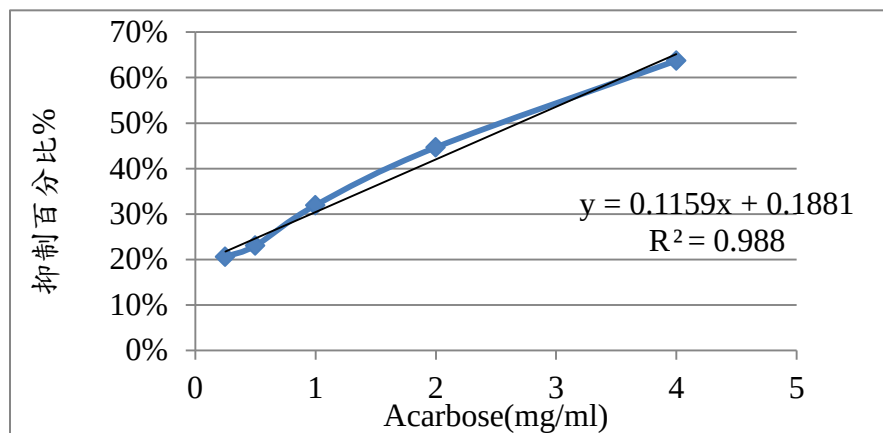
表二、 α -amylase 活性抑制率(IC_{50})

sample	α -amylase IC_{50} (mg/ml)
Acarbose	0.2 ± 0.0



表三、白鳳菜對 α -glucosidase 活性抑制率(IC_{50})

sample	α -glucosidase IC ₅₀ (mg/ml)
Acarbose	2.9 ± 0.2
<i>Gynura formosana</i>	26.7 ± 1.5



圖二 Arcabose 與白鳳菜對 α -glucosidase 活性之抑制情形

表六、成分分析

成分	白鳳菜 (<i>Gynura formosana</i>)
	mg/g extract
類黃酮含量	15.9 ± 0.9
總多酚含量	63.0 ± 6.9

結論

調節血糖可藉由攝食後的吸收、細胞攝入、細胞利用與代謝等多種作用機制，降低第二型糖尿病的發生，有效控制血糖在正常範圍。本實驗室將白鳳菜水草物乾燥粉進行體內試驗時發現餵食高脂肥胖小鼠後，除有降尿酸外同時有降低血糖之現象；體外試管研究也顯示，其能抑制腸道中的 α -glucosidase。因此 α -glucosidase 抑制能力和酚類化合物含量之間存有關聯性，未來可以作為參考添加入食品中，或進一步開發為健康食品。

參考文獻

王明雄、洪碩駿、蔡孟憲、蕭慧美，七層塔或白鳳菜水草物可降低以 Oxonate 誘導高尿酸小鼠之血漿濃度。台灣營養學會雜誌，2015, 40:143 -152.

陳勝智、洪儷玲、張琮揚、陳俊仁、徐美華、黃元照、黃太鴻、郭盛助，Antiproliferative Constituents from *Gynura Divaricata* Subsp. *Formosana* The Chinese Pharmaceutical Journal；55 卷 2 期，2008; 109 - 119.

黃盈華，2002 年，白鳳菜酚性成分及其自由基清除活性研究。台北醫學大學生藥學研究所碩士論文。

蔡孟憲，2012 年，白鳳菜和荔枝核水草物對於高脂及高糖飲食誘導小鼠胰島素抵抗之改善作用，嘉南藥理大學保健營養系碩士論文。

謝伯舟，2004 年，白鳳菜鎮痛、抗發炎及保肝活性研究。中國醫藥大學中國藥學研究所碩士論文。

Cai EP, Lin JK.(2009) Epigallocatechin gallate (EGCG) and rutin suppress the glucotoxicity through activating IRS2 and AMPK signaling in rat pancreatic beta cells. J Agric Food Chem.57(20):9817-27.

Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S.(2005) Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. Pharmacol Res. 51(2):117-23.

Koh LW, Wong LL, Loo YY, Kasapis S, Huang D.(2010) Evaluation of different teas against starch digestibility by mammalian glycosidases. J Agric Food Chem. 13;58(1):148-54

Kurimoto Y, Shibayama Y, Inoue S, Soga M, Takikawa M, Ito C, Nanba F, Yoshida T, Yamashita Y, Ashida H, Tsuda T.(2013) Black soybean seed coat extract ameliorates

hyperglycemia and insulin sensitivity via the activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice. *J Agric Food Chem.* 61(23) : 5558-64

Ma T, Sun X, Tian C, Luo J, Zheng C, Zhan J. (2015) Enrichment and purification of polyphenol extract from *Spatholobus suberectus* stems and leaves and in vitro evaluation of DNA damage-protective activity and inhibitory effects of α -amylase and α -glucosidase. *Molecules* 20, 21442–21457

McDougall GJ, Shpiro F, Dobson P, Smith P, Blake A, Stewart D. (2005) Different polyphenolic components of soft fruits inhibit α -amylase and α -glucosidase. *J Agric Food Chem.* 53(7):2760-6.

Sato, MN. Ramarathnam, Y. Suzuki, T. Ohkubo, M. Takeuchi and H. Ochi: Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. *J. Agric. Food Chem.*, 44: 37-41 (1996).

Waltner-Law ME, Wang XL, Law BK, Hall RK, Nawano M, Granner DK. (2002) Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production. *J Biol Chem.* 277(38):34933-40.

Yamagishi, S. (2009). Advanced glycation end products and receptor-mediated oxidative stress system in diabetic vascular complications. *Thromb Haemostasis*, 13 (6), 534-539. doi: 10.1111/j.1744-9987.2009.00775.x