

# 嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

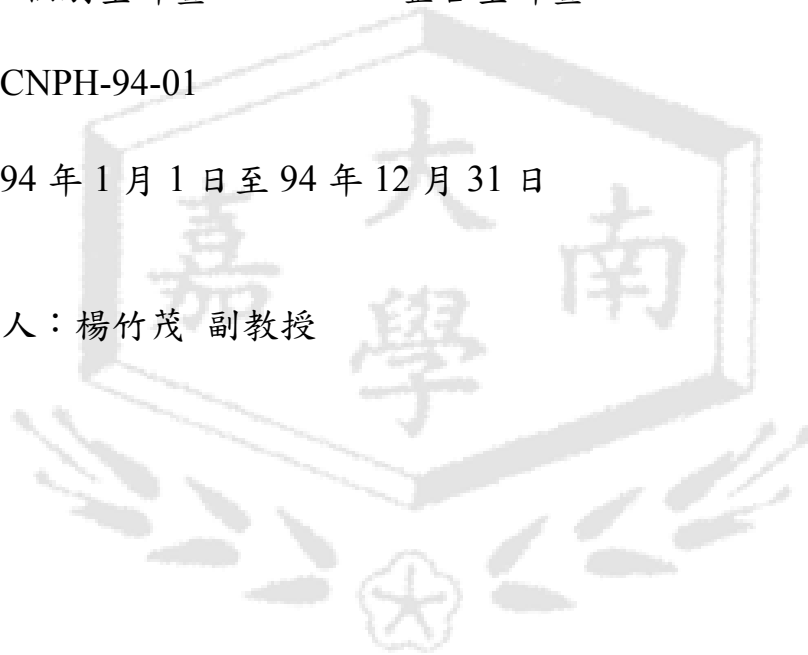
總計畫:中草藥研究與應用開發(I)-台灣民間藥之研究與應用開發  
子計畫:抗糖尿病活性評估及作用機構研究、抗瘀血活性評估及作用機構研究

計畫類別：個別型計畫      整合型計畫

計畫編號：CNPB-94-01

執行期間：94年1月1日至94年12月31日

子計畫主持人：楊竹茂 副教授



執行單位：藥學系

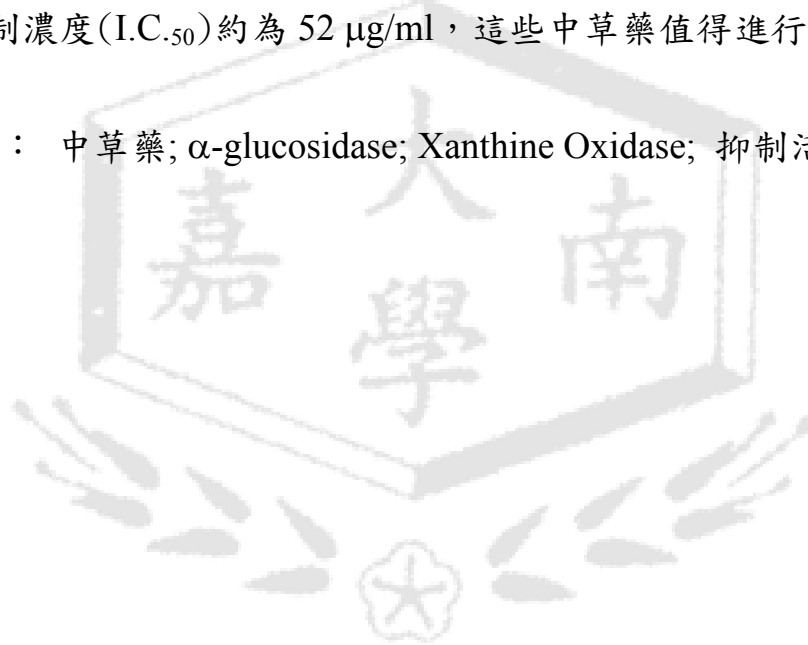
中華民國 94 年 2 月 27 日

## 中文摘要

本研究計劃系群體總計畫中草藥研究與應用開發(I)-台灣民間藥之研究與應用開發之子計畫，主要探討各種中草藥對 $\alpha$ -glucosidase 與 Xanthine Oxidase 之抑制活性，以期能從測定結果發現值得繼續研究以開發具有降血糖及抑制尿酸的中草藥藥物。

實驗中，採用基質與酵素反應之終點產物吸光度測定法，前者以 p-nitrophenyl glucopyranoside (pNPG) 為基質，測定與 $\alpha$ -glucosidase 反應後終點產物 p-Nitrophenol 之吸光度；後者以 Xanthine 為基質，測定與 Xanthine Oxidase 反應後之終點產物 Uric Acid 之吸光度。實驗結果發現，在各種中草藥萃取物中，**早年草**及**仙鶴草**對 alpha-Glucosidase 具有較顯著的抑制活性；而在篩檢對 Xanthine Oxidase 之抑制活性，則以代號 **BC** 之酒精萃取物最具有意義的活性，其 50% 抑制濃度(I.C.<sub>50</sub>)約為 52  $\mu$ g/ml，這些中草藥值得進行接續的研究

關鍵字： 中草藥;  $\alpha$ -glucosidase; Xanthine Oxidase; 抑制活性



## 計畫緣由與目的

本計畫為總計劃「中草藥研究與應用開發(I)-台灣民間藥之研究與應用開發」之子計畫。本計劃旨在評估由總計劃主持人所提供數十種中草藥之萃取物之生物活性，其中包括對  $\alpha$ -glucosidase 與 Xanthine Oxidase 之抑制活性，其目的在篩選具有抑制降血糖及抑制尿酸活性的中草藥。在經過分析篩選後，仙鶴草水萃取物具有最強的  $\alpha$ -glucosidase 抑制活性；至於對 Xanthine Oxidase 的抑制活性則以代號 BC 之酒精萃取物最強，此二種中草藥有值得繼續進行包括依成分極性分劃(fractionation)及動物實驗研究之必要。

## 材料與方法

I. 試藥及其他耗材：  $\alpha$ -glucosidase、Xanthine Oxidase、Xanthine、p-nitrophenyl glucopyranoside (pNPG)等試藥皆採購自 Sigma 公司，其他分析試藥皆為西德 E. Merck 產品。

II. 儀器： Lambda 25 UV/VIS Spectrometer (Perkin-Elmer)及 Microplate Reader (Model 680, Bio-Rad)

III. 藥材萃取物： 由總計劃主持人供應，品項及代號詳如結果中所示。

### IV. 實驗方法

#### 1. $\alpha$ -glucosidase 抑制活性之測定

$\alpha$ -Glucosidase (0.085 unit)與萃取物混合(0.01–200  $\mu$ g/mL)後，以 p-nitrophenyl glucopyranoside (pNPG)作為基質，在 phosphate buffer 存在下加入混合物中開始反應。反應液在 37°C 水浴中加熱30鐘，加入2mL 0.1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 終止反應。 $\alpha$ -glucosidase 活性以415 nm波長測定反應所釋出之p-nitrophenol之吸光度。反應中同時進行控制組(不含藥物)與空白試驗(不含酵素)，抑制百分比以下列公式計算：

抑制% =  $[C - (A - B)] * 100 / C$     C: 控制組(不含萃取物)    A: 含萃取物之吸光度  
B: 空白試驗 (不含酵素)

PBS 0.01 M (H 7.4)	100 $\mu$ l
$\alpha$ -glucosidase (0.0085 unit/ $\mu$ l)	10 $\mu$ l
PNPG (3 mg/ml)	100 $\mu$ l
Incubated at 37°C for exact 30 min.	
$\text{Na}_2\text{CO}_3$ (1 M)	40 $\mu$ l to stop reaction

Measure Absorbance at 415 nm using Micro Plate Reader

以上每一種萃取物重複做三次，取平均值計算

## 2. Xanthine Oxidase 抑制活性之測定

### 藥品配製

#### A. PBS (0.2 M, PH 7.5) 配製

(1) 先配置 0.2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

取  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  27.6 g 或  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  31.2 g 加水至 1000 ml

(2) 先配置 0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

取  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  35.61 g 或  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  71.6 g 加水至 1000 ml

取(1) 870 ml 加 (2) 約 130 ml (測 PH 至 7.5)

#### B. Xanthine 40 ug/ml 之配製

取 4 mg Xanthine 以 PBS solu 溶解並稀釋至 100 ml

#### C. EDTA 0.164 ug/ml 之配製

取 16.4 mg 加 PBS 至 100 ml

#### D. 0.58 M HCl 之配製

取濃鹽酸 (37%) 約 6 ml 加水至 100 ml

#### E. Xanthine Oxidase 之配製 0.01 IU/ml

(當天配製,故須先預估當天使用量,以避免過多造成浪費,配過少而重配時,造成誤差)

原液: 每 ml 含 10.82 IU(使用前稍微搖動,因其為懸濁液)

取 10 ul 加 PBS 至 10 ml

### Sample 配置

Sample 濃度 100 ug/ml 50 ug/ml 10 ug/ml

### 水抽樣品

(A) 秤取 10 mg 溶於 1 ml 水 在加入 9 ml PBS (Sample 濃度 1000ug/ml)

(B) 取(A) 5ml 加 PBS 至 25 ml (Sample 濃度 100ug/ml)

(C) 取(B) 5ml 加 PBS 至 10 ml (Sample 濃度 50ug/ml)

(D) 取(B) 1ml 加 PBS 至 10 ml (Sample 濃度 10ug/ml)

### 每一濃度各做三次

### 反應

Xanthine Oxidase 1 ml

Sample soln\* 1 ml

水浴(37°C)震盪 10 分鐘  
PBS 1 ml  
EDTA 1 ml  
Xanthine 1 ml  
水浴(37°C)震盪 30 分鐘  
0.58 M HCl 0.5 ml

---

Blank 反應(不含 Xanthine Oxidase)

Sample solution 1 ml  
PBS 2 ml  
EDTA 1 ml  
Xanthine 1 ml  
水浴(37°C)震盪 30 分鐘  
0.58 M HCl 0.5 ml

---

Control (不含藥物) 各做四次

Xanthine Oxidase 1 ml  
PBS 2 ml  
EDTA 1 ml  
Xanthine 1 ml  
水浴(37°C)震盪 30 分鐘  
0.58 M HCl 0.5 ml

---

以上試劑以 290 nm UV 波長做檢測

## 結果與討論

### 1. $\alpha$ -glucosidase 抑制活性

藥材	濃度 (mg/ml)	抑制%	藥材	濃度 (mg/ml)	抑制%	藥材	濃度 (mg/ml)	抑制%
駱梨子	1.0	92.59	虎杖	1.0	78.52	扁柏	1.0	76.91
	0.5	71.73		0.5	61.48		0.5	67.78
	0.1	70.37		0.1	58.52		0.1	59.87
旱年草	1.0	106.79	仙鶴草	1.0	95.68	牡丹皮	1.0	94.81
	0.5	81.85		0.5	73.46		0.5	70.50
	0.1	61.73		0.1	65.43		0.1	67.16
黃金桂根	1.0	-	首烏	1.0	81.48			
	0.5	71.60		0.5	74.57			
	0.1	61.23		0.1	62.72			
<b>PL</b>	0.1	57.75	<b>FA</b>	0.1	59.69	<b>(FH)FEB</b>	0.1	38.37
<b>BL</b>	0.1	51.16	<b>HT</b>	0.1	49.61	<b>(FEB)FH</b>	0.1	41.09
<b>KJ</b>	0.1	41.47	<b>DR</b>	0.1	51.94	<b>Cajan</b>	0.1	56.20
<b>UM</b>	0.1	63.57	<b>PGM</b>	0.1	46.12	<b>Fraxinus-1</b>	0.1	33.72
<b>MR</b>	0.1	46.90	<b>CKW</b>	0.1	44.57	<b>Fraxinus-2</b>	0.1	46.12
<b>CA</b>	0.1	59.30	<b>POS</b>	0.1	54.65			
<b>AE</b>	0.1	61.95	<b>ZN</b>	0.1	60.60	<b>TB</b>	0.1	58.24
<b>CC</b>	0.1	59.59	<b>SS</b>	0.1	53.87	<b>BC</b>	0.1	43.77
<b>CD</b>	0.1	47.13	<b>RT</b>	0.1	58.58	<b>PC</b>	0.1	37.71
<b>CF</b>	0.1	48.14	<b>LC</b>	0.1	64.98	<b>MM</b>	0.1	41.41

以上樣品皆為水萃取物

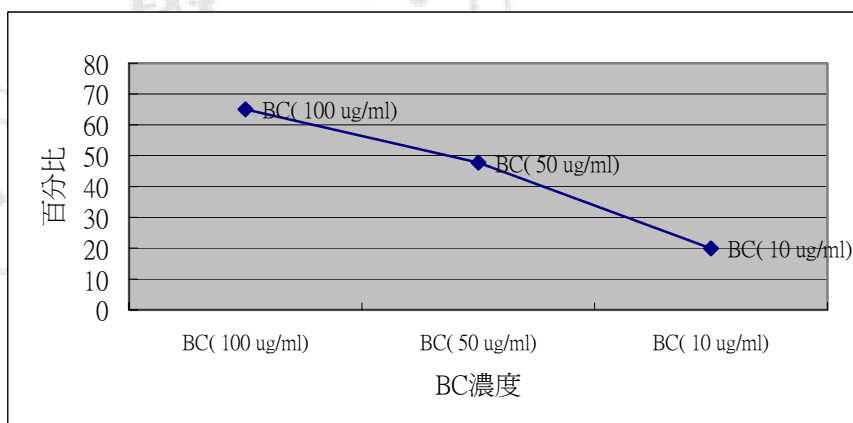
## 2. Xanthine Oxidase 抑制活性

藥材	濃度 (mg/ml)	抑制%		藥材	濃度 (mg/ml)	抑制%		藥材	濃度 (mg/ml)	抑制%	
		H <sub>2</sub> O	Alc			H <sub>2</sub> O	Alc			H <sub>2</sub> O	Alc
CD	0.1	21.38	18.78	POS	0.1	11.86	11.75	RSR	0.1	12.46	1.50
CC	0.1	16.41	25.08	HT	0.1	12.71	10.35	FH	0.1	16.31	-
BC	0.1	25.83	66.85	Fraxinus-1	0.1	-	6.62	DLW	0.1	8.81	-
DR	0.1	14.90	14.29	Fraxinus	0.1	11.82	10.03	DP	0.1	7.63	-
AF	0.1	7.60	5.04	LC	0.1	0	0	CF	0.1	13.56	-
RT	0.1	11.62	11.17	MR	0.1	7.74	-	AE	0.1	14.33	-
PC	0.1	20.90	22.84	AS	0.1	15.92	-	BM	0.1	29.62	-
CKW	0.1	26.03	29.49	GJ	0.1	11.20	-	(FH)FEB	0.1	-	7.62
SS	0.1	35.53	34.94	TB	0.1	14.47	13.99	KJ	0.1	-	8.25
PGM	0.1	11.15	10.61	UM	0.1	16.52	18.56	蘆莉草	0.1	12.83	-
FEB	0.1	12.39	17.76								

H<sub>2</sub>O：以水萃取；Alc：以酒精萃取

BC (Alc. Extracted) I.C.<sub>50</sub> 之測定

濃度 (ug/ml)	I.C. %
100	65.04
50	47.77
10	19.88



由圖中以內插法可得 BC 之 I.C.<sub>50</sub> 約為 52  $\mu$ g/ml。

### 結論

1. 各種中草藥萃取物在測定對 alpha-Glucosidase 之抑制活性結果顯示早年草及仙鶴草具有較顯著的活性，值得繼續進行研究。
2. 在篩檢對 Xanthine Oxidase 抑制活性的各種中草藥萃取物中，以代號 BC 之酒精萃取物顯示最具意義的抑制活性，其 50% 抑制濃度約為 52 mg/ml，值得進行接續研究。

### References

- J.M.A. Hannan, B. Rokeya, O. Faruque, N. Nahar, M. Mosihuzzaman, A.K. Azad Khan, and L. Ali, Effect of soluble dietary fraction of *Trigonella foenum graecum* on glycemic, insulinemic, lipidemic and platelet aggregation status of Type 2 diabetic model rats, *Ethnopharmacology*, 88: 73-77 (2003)
2. Muhammand Shoaib Akhtar, Kausar Almas, Tasneem Kausar, Thomas M.S. Wolever, Blood glucose responses to traditional South Asian vegetable dishes in normal and diabetic human subjects, *Nutrition Research*, 22:989-996 (2002)
  3. Yoon J.W and Jun H.S., Medicinal herbal compounds for the prevention and treatment of diabetes, US Patent Number WO02089825
  4. Seigo Ishibuchi, Hiroshi Morimoto, Takanori Oe, Tsuguo Ikebe, Hiroyoshi Inoue, Atsushi Fukunari, Miho Kamezawa, Ichimaro Yamada and Yoichi Naka, Synthesis and Structure–Activity Relationships of 1-Phenylpyrazoles a Xanthine Oxidase Inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 11: 879–882 (2001)
  5. Yamada H. Kotaki H. Furitsu H. Sawada Y. Iga T., Mechanism of the uricosuric action of the anti-inflammatory drug E3040 used to treat inflammatory bowel disease I: study using a rat model of hyperuricemia, *Biopharmaceutics & Drug Disposition*. 20:77-83 (1999)
  6. Mazzali, Marilda; Hughes, Jeremy; Kim, Yoon-Goo; Jefferson, J. Ashley; Kang, Duk-Hee; Gordon, Katherine L.; Lan, Hui Y.; Kivlighn, Salah; Johnson, Richard J., Elevated Uric Acid Increases Blood Pressure in the Rat by a Novel Crystal-Independent Mechanism, *Hypertension*, 38: 1101-1106 (2001)