

中國醫藥大學中國醫學研究所碩士論文

編號：GICMS-336

指導教授：賴東淵 博士

共同指導教授：陳悅生 博士

陳惠民 博士

論文題目

應用高效率固定化接受器動態擷取技術
從中草藥篩選 α 葡萄糖苷酶抑制劑的有效成分
High efficiency of screening α -glucosidase inhibitor
from Chinese Herbal medicines using
After Flowing Through Immobilized Receptor (AFTIR)

研究生：陳重嘉

中華民國九十七年六月

目 錄

第一章 前 言	01
1.1 研究動機及研究背景	01
1.2 研究目的	02
第二章 文獻探討	03
2.1 糖尿病之中西醫診療	03
2.1.1 糖尿病流行病學	03
2.1.1.1 全球糖尿病流行病學及未來趨勢	03
2.1.1.2 台灣糖尿病流行病學	05
2.1.2 中醫對糖尿病的認識	08
2.1.2.1 中醫對糖尿病的定义	08
2.1.2.2 從中醫消渴病的病因病機論對糖尿病的認識	09
2.1.2.3 治療糖尿病常用的中草藥	11
2.1.2.3.1 台灣紅豆杉 <i>Taxus sumatrana</i>	11
2.1.2.3.2 含羞草 <i>Mimosa pudica</i> Linn.	12
2.1.2.3.3 白石榴 <i>Punica granatum</i> Linn.	12
2.1.2.3.4 番石榴 <i>Psidium guajava</i> Linn.	13
2.1.3 西醫治療糖尿病	13
2.1.3.1 糖尿病的診斷標準	14
2.1.3.2 西醫臨床使用口服降血糖藥 (OHA) 之現況	15
2.1.3.2.1 磺醯尿素類 (sulfonylureas) 促胰島素分泌藥物	15
2.1.3.2.2 非磺醯尿素類促胰島素分泌藥物	16
2.1.3.2.3 雙胍類 (Biguanides)	16

2.1.3.2.4 唑烷二酮類 (TZDs)	17
2.1.3.2.5 α 葡萄糖苷酶抑制劑 (α -glucosidase inhibitors)	17
2.1.4 糖尿病常見的併發症	21
2.1.4.1 大血管病變	22
2.1.4.2 小血管病變	22
2.1.4.3 足部問題	23
2.2 α -glucosidases 在醣類代謝中扮演的角色	24
2.3 AFTIR 相關理論	26
2.3.1 AFTIR system 作用原理	26
2.3.2 微流體晶片組件	27
2.3.3 SPR 組件	28
2.3.4 層析組件	29
2.3.5 自動注射、回收組件	29
第三章 材料與方法	31
3.1 儀器、材料與藥品	31
3.1.1 使用儀器	31
3.1.2 使用材料與藥品	31
3.2 待測物之製備	33
3.2.1 中草藥及科學中藥之前處理	33
3.2.2 acarbose 前處理	33
3.3 α -glucosidase-CM5 晶片製備原理與最佳化固定條件	35
3.3.1 α -glucosidase-CM5 晶片製備原理	35
3.3.2 α -glucosidase-CM5 晶片的最佳化固定條件	37

3.3.2.1	α -glucosidase 溶液之配製	37
3.3.2.2	α -glucosidase 酵素之固定法與程序	37
3.4	α -glucosidase-CM5 晶片活性及穩定度之確認方法與步驟	37
3.4.1	α -glucosidase-CM5 晶片活性之確認方法與步驟	37
3.4.2	α -glucosidase-CM5 晶片穩定度之確認方法與步驟	38
3.5	α -glucosidase-CM5 晶片篩選樣品條件與步驟	39
3.6	α -glucosidase-CM5 晶片的樣品回收條件與步驟	39
3.7	HPLC 指紋圖譜建立標定方法、條件與步驟	40
3.7.1	經過前處理之待測物與標準品的指紋圖譜分析	40
3.7.2	標的物成分之分析	40
3.8	抑制 α -glucosidase 活性分析與步驟	41
3.9	標的化合物純化之步驟與鑑定	42
第四章	結 果	43
4.1	α -glucosidase 固定於 CM5 晶片的結果	43
4.1.1	α -glucosidase 固定於 CM5 晶片的標準化	43
4.1.2	α -glucosidase 固定於 CM5 晶片的最佳化	44
4.1.3	α -glucosidase 固定化標準程序	45
4.2	EGCG 與 α -glucosidase-CM5 晶片結合的結果與阻斷比之定義	46
4.2.1	EGCG 與 α -glucosidase-CM5 晶片結合的結果	46
4.2.2	EGCG 與 α -glucosidase-CM5 晶片結合的阻斷比之定義	48
4.3	α -glucosidase-CM5 晶片的穩定度測試結果	49
4.4	以 α -glucosidase-CM5 晶片篩選樣品之結果，並與抑制酵素活性分析的結果進行比較	50
4.5	以 α -glucosidase-CM5 晶片回收樣品後之標定結果	56

4.6	綠茶葉純化標定化合物之結構解析	58
4.6.1	綠茶葉萃取物 Peak 2 之結構解析	58
4.6.2	綠茶葉萃取物 Peak 3 之結構解析	59
4.6.3	綠茶葉萃取物 Peak 4 之結構解析	60
4.7	純化標定化合物之抑制 α -glucosidase 活性分析的結果	61
4.8	以 α -glucosidase-CM5 晶片篩選九種中草藥及 acarbose 之結果，並與抑制酵素活性分析的結果進行比較	62
4.9	以 α -glucosidase-CM5 晶片回收紅豆杉後之標定結果	72
第五章	討 論	73
第六章	結 論	76
	參考文獻	77
	英文摘要	80
	謝 辭	81

圖 目 錄

圖 2.1 全球糖尿病盛行率的分布圖.....	04
圖 2.2 西元 2000 年全球糖尿病的盛行率（按年齡別及性別分）.....	05
圖 2.3 西元 2006 年台灣糖尿病死亡率（按年齡別分）.....	06
圖 2.4 歷年糖尿病死亡人數概況（按年齡別分）.....	07
圖 2.5 α 葡萄糖苷酶抑制劑（acarbose、miglitol、voglibose）的化學結構.....	18
圖 2.6 acarbose 作用在麥芽糖酶-葡萄糖澱粉酶活化位置容器（MGAM active-site pocket）的表面圖形.....	20
圖 2.7 澱粉及蔗糖（sucrose）的新陳代謝.....	25
圖 2.8 半乳糖（galactose）的新陳代謝.....	25
圖 2.9 傳統藥物篩選流程（TSM）與 AFTIR 篩選平台的差異性.....	26
圖 2.10 AFTIR system 示意圖.....	27
圖 2.11 α -glucosidase-CM5 晶片篩選生藥中有效成分示意圖.....	28
圖 2.12 表面電漿共振（SPR）原理示意圖.....	29
圖 2.13 Biacore 3000 分析樣本回收原理.....	30
圖 3.1 中草藥及科學中藥前處理流程圖.....	34
圖 3.2 CM5 晶片構造圖.....	35
圖 3.3 EDC/ NHS 活化 CM5 晶片的作用圖.....	36
圖 3.4 α -glucosidase 固定在 CM5 晶片上的作用圖.....	36
圖 3.5 EA 去活化作用圖.....	36
圖 4.1 α -glucosidase 固定於 CM5 晶片標準化的表面電漿共振訊號圖（SPR sensorgram）.....	43
圖 4.2 α -glucosidase 溶於不同 pH 值的醋酸鈉緩衝液之表面電漿共振訊號圖（SPR sensorgram）.....	44
圖 4.3 α -glucosidase 醋酸鈉溶液(pH 4.0)的表面電漿共振訊號圖(SPR sensorgram).....	45
圖 4.4 Ligand（EGCG）試驗.....	46

圖 4.5 EGCG 鍵結親和力 (EGCG binding affinity) 測量.....	47
圖 4.6 生藥萃取物阻斷 EGCG 和 α -glucosidase-CM5 晶片結合作用的 表面電漿共振訊號圖 (SPR sensorgram)。其阻斷比公式之定義 為 $[(A-C) \div A] \times 100\%$	48
圖 4.7 α -glucosidase-CM5 晶片的穩定度測試	49
圖 4.8 黃水茄與 α -glucosidase-CM5 晶片作用的表面電漿共振訊號圖	50
圖 4.9 仙鶴草與 α -glucosidase-CM5 晶片作用的表面電漿共振訊號圖	51
圖 4.10 乾薑與 α -glucosidase-CM5 晶片作用的表面電漿共振訊號圖	51
圖 4.11 石斛與 α -glucosidase-CM5 晶片作用的表面電漿共振訊號圖	52
圖 4.12 益母草與 α -glucosidase-CM5 晶片作用的表面電漿共振訊號圖	52
圖 4.13 綠茶葉 (10 mg/ mL) 與 α -glucosidase-CM5 晶片作用的表面 電漿共振訊號圖	53
圖 4.14 黃水茄、仙鶴草、乾薑、石斛、益母草及綠茶葉的酵素活性分 析試驗	53
圖 4.15 仙鶴草的水萃取液及甲醇萃取液的酵素活性分析試驗	55
圖 4.16 仙鶴草萃取物的 HPLC 指紋圖譜和回收樣品的標定 (UV : 254 nm)	56
圖 4.17 綠茶葉 (GTR-M) 萃取物的 HPLC 指紋圖譜和回收樣品的標定 (UV : 254 nm) ; EGCG (from SIGMA) 濃度為 1 mg/ mL.....	57
圖 4.18 Peak 2 (caffeine) 的 ^1H NMR 光譜及其化學結構.....	58
圖 4.19 Peak 3 (EGCG) 的 ^1H NMR 光譜及其化學結構.....	59
圖 4.20 Peak 4 的 ^1H NMR 光譜，並確認化合物為 ECG.....	60
圖 4.21 標定的 EGCG、ECG 及 caffeine 經純化後，用不同濃度做酵素 活性分析試驗.....	61
圖 4.22 標定的 EGCG、ECG 經純化後，用不同濃度做酵素活性分析試 驗	62
圖 4.23 白龍船與 α -glucosidase-CM5 晶片作用的表面電漿共振訊號圖	63
圖 4.24 白石榴與 α -glucosidase-CM5 晶片作用的表面電漿共振訊號圖	63
圖 4.25 白豬母乳與 α -glucosidase-CM5 晶片作用的表面電漿共振訊號 圖	64

圖 4.26 銅垂玉帶草與 α -glucosidase-CM5 晶片作用的表面電漿共振訊號圖	64
圖 4.27 含羞草與 α -glucosidase-CM5 晶片作用的表面電漿共振訊號圖	65
圖 4.28 芭樂乾與 α -glucosidase-CM5 晶片作用的表面電漿共振訊號圖	65
圖 4.29 破布子根與 α -glucosidase-CM5 晶片作用的表面電漿共振訊號圖	66
圖 4.30 倒地苓與 α -glucosidase-CM5 晶片作用的表面電漿共振訊號圖	66
圖 4.31 紅豆杉與 α -glucosidase-CM5 晶片作用的表面電漿共振訊號圖	67
圖 4.32 acarbose 與 α -glucosidase-CM5 晶片作用的表面電漿共振訊號圖	67
圖 4.33 九種中草藥及 acarbose 的酵素活性分析試驗.....	68
圖 4.34 不同濃度之白石榴、含羞草的酵素活性分析試驗.....	70
圖 4.35 不同濃度之紅豆杉的酵素活性分析試驗.....	70
圖 4.36 不同濃度之 acarbose 的酵素活性分析試驗	71
圖 4.37 紅豆杉萃取物的 HPLC 指紋圖譜和回收樣品的標定 (UV : 210 nm)	72

表 目 錄

表 2.1 預估西元 2000 年及西元 2030 年罹患糖尿病人數，並且摘要其 人口變化（按地區分）	03
表 2.2 台灣每十萬人口死亡率	06
表 2.3 歷年糖尿病死亡概況（按年齡別分）	07
表 2.4 從 Baker's Yeast、多種哺乳類動物小腸取得不同的抑制劑用來 抑制 α -glucosidase 效果的比較	20
表 2.5 口服降血糖藥（OHA）整理	21
表 4.1 用 α -glucosidase-CM5 晶片篩選黃水茄、乾薑、石斛、仙鶴草、 益母草及綠茶葉之結合量（RU）、EGCG 阻斷比（%），以及抑制 酵素活性百分比（%）的結果	54
表 4.2 用 α -glucosidase-CM5 晶片篩選九種中草藥及 acarbose 之結合 量（RU）、EGCG 阻斷比（%），以及抑制酵素活性百分比（%） 的結果	68

應用高效率固定化接受器動態擷取技術 從中草藥篩選 α 葡萄糖苷酶抑制劑的有效成分

陳重嘉

指導教授：賴東淵 博士

中國醫藥大學 中國醫學研究所

糖尿病人數在世界各地快速成長，研究顯示降低血糖值，可延緩糖尿病的發生及預防糖尿病併發症。西醫在臨床上治療糖尿病的口服降血糖藥（OHA）分為五大類，其中 α 葡萄糖苷酶抑制劑由於能延緩碳水化合物的消化和吸收，因此能有效降低餐後血糖值。本研究以此機制為基礎，利用固定化接受器動態擷取技術（After Flowing Through Immobilized Receptor, AFTIR）來篩選中草藥中與 α 葡萄糖苷酶結合的有效成分。

本研究利用綠茶葉及其他中草藥萃取物已成功驗證 α -glucosidase-CM5 晶片為一高效率、高靈敏度及穩定性佳的藥物篩選平台。另一方面，研究結果顯示紅豆杉阻斷 EGCG 和 α -glucosidase 結合的能力雖不明顯（EGCG 阻斷比為 35.9%），但其抑制酵素活性的能力顯著（抑制酵素活性百分比為 73%），由此顯示出紅豆杉微量的有效成分可能具有極佳的抑制酵素活性能力，因此可視為極具開發潛力的先導藥物；其有效成分的確認及化學結構的解析將是本實驗未來進行的工作。

關鍵詞： α 葡萄糖苷酶抑制劑；固定化接受器動態擷取技術；糖尿病；葡萄糖耐受受損（IGT）

第一章 前言

1.1 研究動機及研究背景

臨床上常見長期糖尿病患者視力不佳（因視網膜剝離）、手腳末稍麻木等糖尿病併發症所苦，因而興起對糖尿病進一步認識及研究。糖尿病人數在全球正快速地增加，並且由糖尿病引起視網膜病變、腎臟病變、心血管疾病等併發症造成各國政府財政及醫療上沈重的負擔；依據世界衛生組織（WHO）預測：糖尿病人數在西元 2000 年時有一億七千萬人，在西元 2030 年時將上升至三億六千萬人患有糖尿病；而每年大約有三百萬人死於和糖尿病相關的疾病¹。

如何預防糖尿病或者是預防糖尿病併發症的發生，是現今我們所關注的焦點。血糖值的測定有兩項指標，空腹血糖值和餐後血糖值。有研究顯示餐後血糖值尤為重要，因為它是葡萄糖耐受受損（impaired glucose tolerance, IGT）階段的病人發展成為第二型糖尿病的重要關鍵²；葡萄糖耐受受損（IGT）階段的確會增加第二型糖尿病的發生及心血管疾病的風險^{3,4}；若能早期進行干預，可延緩疾病的進展和預防第二型糖尿病的發生。另外，研究證實餐後高血糖值與心血管疾病關係密切；糖尿病流行病學歐洲診斷標準的合作分析（DECODE）研究顯示，餐後高血糖對糖化血色素（A1C）的影響及對大血管併發症的作用明顯大於空腹高血糖⁵。臨床研究顯示：服用 α 葡萄糖苷酶抑制劑（ α -glucosidase inhibitor）由於能干擾碳水化合物的降解反應，使醣類吸收速率遲緩而能有效降低餐後血糖值，進而可預防糖尿病及預防糖尿病併發症的發生。

本研究想在豐富的天然物資源中尋找能抑制 α 葡萄糖苷酶的有效成分，但若想在短時間內對數以萬計的天然物成分進行有效率的篩選以獲得一些極具潛力的先導藥物，極需一種新的藥物篩選技術。現今有一高效率與高選擇性的藥物篩選平台---固定化接受器動態擷取技術（After Flowing Through Immobilized Receptor, AFTIR）⁶，此技術是利用生物分子與研究藥物間專一性的交互作用，標的

(target) 出天然物成分內的有效成分，因此能有效節省篩選候選化合物所需的時間。透過這套篩選技術，可從種類繁多的中草藥物、複雜的中藥成分中，快速而有效地篩選一些具有特定生物活性的化合物，所以可縮短傳統藥物篩選技術先期開發的盲目尋找過程，大大地增加藥品開發的成功率及提高藥物臨床效果的預測。本研究利用綠茶葉及其他中草藥萃取物已成功驗證用 α -glucosidase 與 CM5 晶片結合成為一高效率、高靈敏度及穩定性佳的藥物篩選平台。

1.2 研究目的

天然物（包括生藥、中藥材及各地民間草藥）提供豐富的醫藥資源，其中含有取之不盡、用之不竭的寶藏等待人類去挖掘，也正因如此，新藥的開發是一項極具挑戰而且冗長費時的工程；若能在短時間內對浩瀚如海的天然物成分進行有效率的篩選，並且在進行昂貴的臨床試驗之前，獲得一些極具潛力的先導藥物，如此可縮短藥物開發的時間表及提高藥品開發的成功率，以加速新藥上市的腳步。

本研究的目的是利用固定化接受器動態擷取技術（AFTIR）建立從天然物篩選 α 葡萄糖苷酶抑制劑有效成分的工作平台，使其成為一高效率、高選擇性的藥物篩選平台。另外，利用所建立的 AFTIR 系統篩選以確定白龍船、白石榴、白豬母乳、銅垂玉帶草、含羞草、芭樂乾、破布子根、倒地苓、紅豆杉等九種台灣草藥是否具有 α 葡萄糖苷酶抑制作用，希望利用此可靠新穎的藥物篩選平台，從中尋找能降低餐後血糖的有效藥物，並期望可以開發新型的 α 葡萄糖苷酶抑制劑。

第二章 文獻探討

2.1 糖尿病之中西醫診療

糖尿病是一種由遺傳因素及環境因素引起的血糖升高，蛋白質、脂肪、電解質異常和酸鹼平衡失調的內分泌代謝紊亂，嚴重時會導致心血管疾病和神經病變等併發症，使患者機能喪失、致殘，甚至死亡。

2.1.1 糖尿病流行病學

2.1.1.1 全球糖尿病流行病學及未來趨勢

由於人口數目成長快速、人口老化、肥胖症、以及缺少運動和都市化生活型態的比例升高，致使糖尿病患者數目增加。

取樣資料來自於 191 個世界衛生組織會員國和已加入聯合國國家的糖尿病盛行率數據¹（表 2.1），此份資料並未區分成年人第一型糖尿病或第二型糖尿病。從西元 2000 年至西元 2030 年糖尿病的

表 2.1 預估西元 2000 年及西元 2030 年罹患糖尿病人數，並且摘要其人口變化（按地區分）¹

Region (all ages)	2000 Number of people with diabetes	2030 Number of people with diabetes	2000 - 2030			
			Percentage of change in number of people with diabetes*	Percentage of change in total population*	Percentage of change in population >65 years of age*	Percentage of change in urban population*
Established market economies	44,268	68,156	54	9	80	N/A
Former socialist economies	11,665	13,960	20	- 14	42	N/A
India	31,705	79,441	151	40	168	101
China	20,757	42,321	104	16	168	115
Other Asia and Islands	22,328	58,109	148	42	198	91
Sub-Saharan Africa	7,146	18,645	161	97	147	192
Latin America and the Caribbean	13,307	32,959	148	40	194	56
Middle Eastern Crescent	20,051	52,794	163	67	194	94
World	171,228	366,212	114	37	134	61

* A positive value indicates an increase, a negative value indicates a decrease.

人口預估將成長兩倍；而且大於 65 歲年齡層的人口比例在人口統計學上有顯著地增加。即使在西元 2030 年時若肥胖的盛行率依然維持穩定，罹患糖尿病的人數成長仍將多於兩倍，這是因為人口老化及都市化生活型態的比例升高所致。

世界衛生組織（WHO）預測：糖尿病的人口在西元 2000 年時有一億七千萬人，在西元 2030 年時將上升至三億六千萬人。全球五大洲在西元 2000 年糖尿病的盛行率及預測西元 2030 年時糖尿病的人口數如下圖⁷：

Prevalence of diabetes

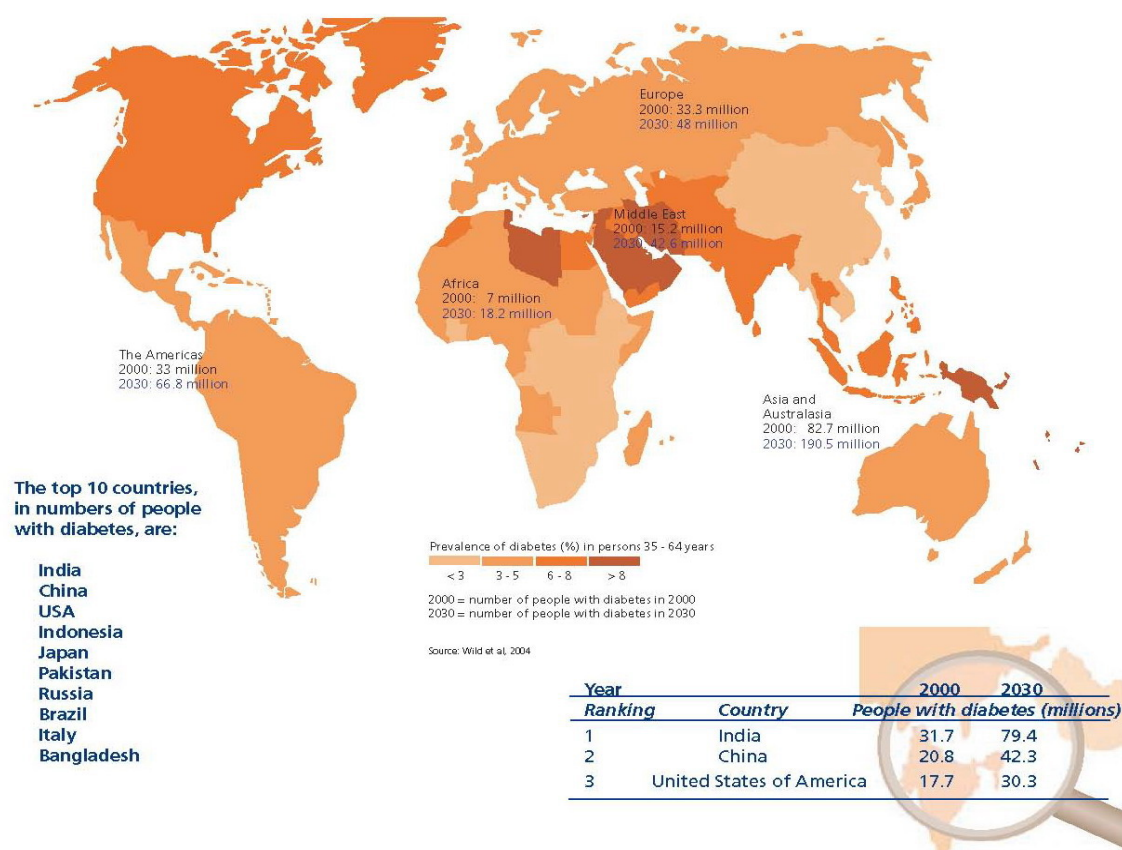


圖 2.1 全球糖尿病盛行率的分布圖⁷

預測糖尿病人口數目成長最快速的地區將發生在中東回教國家、非洲撒哈拉沙漠地區和印度。在現在及未來，糖尿病人數前三名的國家依序為印度、中國大陸及美國。在已開發國家，糖尿病患者的年齡族羣主要分布在大於 64 歲的年齡層，預測在西元 2030 年

時大於 64 歲的族羣罹患糖尿病人數將大於四千八百萬人。而開發中國家，糖尿病患者的年齡族羣主要分布在 45~64 歲的年齡層，預測在西元 2030 年時大於 64 歲的族羣罹患糖尿病人口數將大於八百萬兩百萬人。

關於全球糖尿病流行病學與性別（按年齡別分）的相關性（圖 2.2）¹，在 60 歲之前男性、女性糖尿病盛行率幾乎一樣，男性糖尿病盛行率稍微高於女性的糖尿病盛行率；隨著年齡層的升高，女性糖尿病盛行率明顯高於男性的糖尿病盛行率。

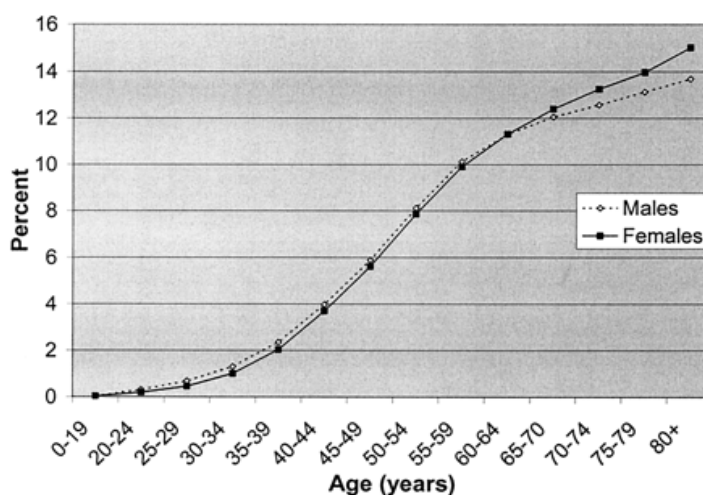


圖 2.2 西元 2000 年全球糖尿病的盛行率（按年齡別及性別分）¹

2.1.1.2 台灣糖尿病流行病學

自西元 1983 年起，糖尿病已列入國人十大死因，近 20 餘年來糖尿病死亡率雖偶有消長，但大致上仍呈現快速上升趨勢；在西元 2006 年因糖尿病疾病死亡人數占總死亡人數之 7.2%，居死亡原因之第四順位，死亡率達每十萬人口 42.5 人，為西元 1996 年之 1.2 倍。西元 2006 年死亡率較西元 2001 年略增 4.1%；與西元 1996 年相較，則增加 21.0%。女性糖尿病死亡率雖高於男性，但男性死亡率增加明顯。以西元 2000 年世界衛生組織（WHO）世界人口年齡結構為基準計算標準化死亡率，西元 2006 年標準化死亡率為 34.9 人，且男性標準化死亡率為女性之 1.0 倍⁸（表 2.2）。

西元 2006 年糖尿病死者死亡年齡，平均歲數為 72.2 歲；與西元 2001 年相較，壽命平均增加 1.4 歲；與西元 1996 年相較，壽命平均數延長 2.9 歲⁸。從性別分析台灣糖尿病死亡概況（按年齡別分）和全球趨勢相似：在 70 歲之前男性糖尿病死亡率稍微高於女性的糖

尿病死亡率；隨著年齡層的升高，女性糖尿病死亡率明顯高於男性的糖尿病死亡率（表 2.2，圖 2.3）。

表 2.2 台灣每十萬人口死亡率⁸

年 別	合 計			男 性			女 性		
	死亡數	死亡率	標準化死亡率	死亡數	死亡率	標準化死亡率	死亡數	死亡率	標準化死亡率
95年	9,690	42.46	34.91	4,712	40.70	34.46	4,978	44.26	35.50
90年	9,113	40.79	39.76	4,311	37.76	36.78	4,802	43.96	42.99
85年	7,525	35.10	39.42	3,469	31.46	34.66	4,056	38.95	44.80
95較90增減%	6.33	4.09	-12.20	9.30	7.79	-6.31	3.67	0.68	-17.42
95較85增減%	28.77	20.97	-11.44	35.83	29.37	-0.58	22.73	13.63	-20.76

附註：標準化死亡率係以2000年WHO世界人口年齡結構為基準

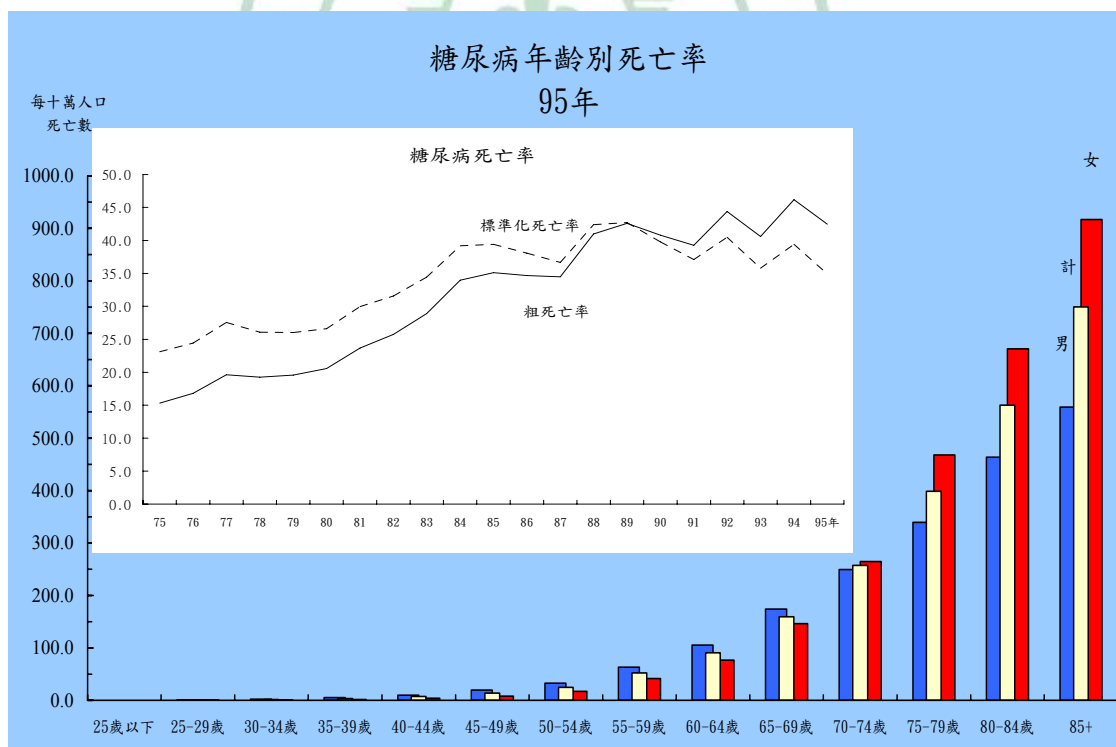


圖 2.3 西元 2006 年台灣糖尿病死亡率（按年齡別分）⁸

按年齡別分析台灣歷年糖尿病死亡情況：糖尿病死亡人數會隨年齡升高而增加，而且糖尿病死亡的年齡族羣主要分布在大於 64

歲的年齡層；雖然台灣歷年糖尿病死亡率偶有消長，但大致上仍呈現快速上升趨勢⁹（表 2.3，圖 2.4）。

表 2.3 歷年糖尿病死亡概況（按年齡別分）⁹

年齒別	西元1986年		西元1991年		西元1996年		西元2001年		西元2006年	
	死亡人數	每十萬人口 死亡數	死亡人數	每十萬人口 死亡數	死亡人數	每十萬人口 死亡數	死亡人數	每十萬人口 死亡數	死亡人數	每十萬人口 死亡數
總計	2970	153	4210	206	7,525	35.1	9,113	408	9,690	425
0-19	6	03	8	04	10	06	2	01	5	04
20-44	103	90	146	98	234	13.0	250	134	259	137
45-64	936	133.6	1,215	1583	1,896	239.7	2,029	2242	1,956	181.9
65+	1,925	1375.5	2,841	16864	5,385	2601.9	6,832	3025.5	7,470	29040

附註：死因統計自民國八十三年起含金門縣及連江縣。

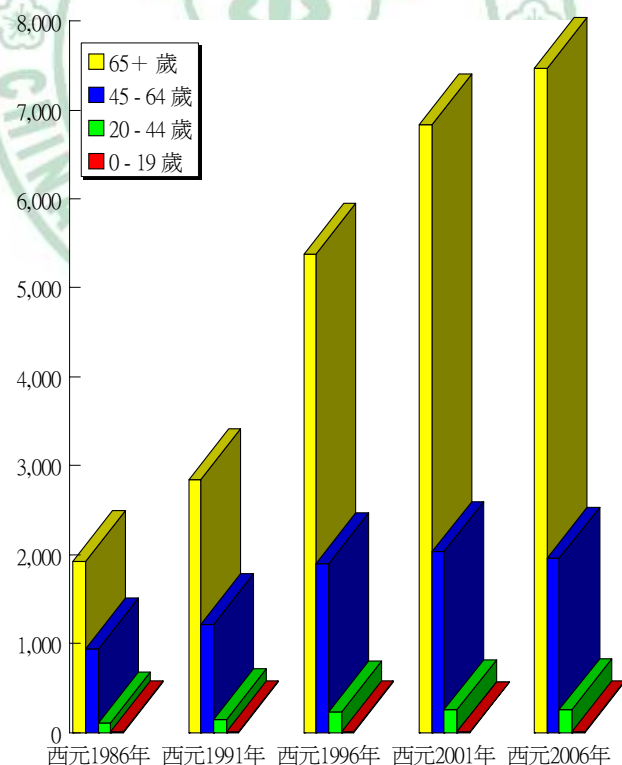


圖 2.4 歷年糖尿病死亡人數概況（按年齡別分）

西元 2006 年國人十大死亡主要原因，依序分別為：1.惡性腫瘤；2.腦血管疾病；3.心臟疾病；4.糖尿病；5.事故傷害；6.肺炎；7.慢性肝病及肝硬化；8.腎炎、腎徵候群及腎性病變；9.自殺；10.高血壓性疾病⁹。事實上，糖尿病與十大死亡原因中之腦血管疾病(中風)、心臟疾病、腎病徵候群及腎性病變無不息息相關，其嚴重性不可言喻。

糖尿病人數持續增加的原因，在於全球人口成長快速，人類的壽命延長；加上都市化生活型態的人口比例升高，使人類營養過剩卻缺乏適當的運動，造成肥胖人數增加，而肥胖症會使有糖尿病傾向的人誘發糖尿病。另一方面，由於糖尿病檢驗技術的進步，並可普遍進行糖尿病的診察，使糖尿病患者因能獲得較妥善的照顧而延長壽命；由於糖尿病患者壽命延長，繁衍具有糖尿病基因的子代越來越多，所以會出現更多可能成為糖尿病的患者。基於以上種種原因，糖尿病人數持續增加是必然的趨勢，如何預防糖尿病及其併發症的發生為世人所必須正視的衛生保健問題。

2.1.2 中醫對糖尿病的認識

“糖尿病”是現代醫學的疾病名稱，在中醫經典古籍中並無此病名；但從消渴病的多食、多飲、多尿、久則身體消瘦或尿有甜味等臨床證候及病機傳變特點而言，消渴病與西醫的糖尿病有許多相似之處。

“消渴”之名，首見於《素問·奇病論》：「帝曰：有病口甘者，病名為何？何以得之？岐伯曰：此五氣之滯也，名曰脾瘴，…此肥美之所發也。此人必數食甘美而多肥也；肥者令人內熱，甘者令人中滿，故其氣上溢，轉為消渴…」。由此可知在世界醫學史上，中醫學對本病的認識最早。

2.1.2.1 中醫對糖尿病的定義¹⁰

消渴是以渴飲、尿多、能食而瘦或尿有甜味等主要症狀的病證，它是一種慢性消耗性疾病。

病名“消渴”，“渴”是指患者常出現口渴症狀而言。

至於“消”，則有以下幾種解釋：

- (1) 指消化：如《素問·陰陽別論》：「二陽結謂之消」，王冰注：「善消水穀」，馬蒔注：「胃中熱盛…水穀即消」。
- (2) 指火燒、消灼：金代張元素《儒門事親·三消當從火斷》：「消者、燒也，如火烹燒，物之理也。」
- (3) 指消耗、消削：明代張介賓《景岳全書·消渴》：「消，消爍也，亦消耗也。凡陰陽氣血日見消敗者，皆謂之消。」

以上(1)是指水穀食入易消而言；(2)、(3)是從本病病機上多“火”、多“虛”的特性而言，分別從不同角度去解析本病的病理特點。實際上《內經》的“消”是一種病證，即“消瘴”、“消中”、“內消”的簡稱。多食、消、渴，為本病臨床上的“三多”之候。

2.1.2.2 從中醫消渴病的病因病機論對糖尿病的認識

消渴病之渴多久渴、飲不解渴，多兼見小便多、尿有甜味，消穀善飢，肌肉瘦消、脛腿乾細等症狀的病證。其起因多與五志過極，耽飲、多嗜肥美飲食，漁色房勞有關，部分也有遺傳因素。消渴病的病因，歸納多為以下幾種：

(1) 心氣耗傷：五志過極，勞傷心志，用心過度，損耗心營的結果，致心火內燔、鬱熱傷津，產生消渴。《類證治裁》云：「凡消渴起因，或有因勞心憂思太過，憂傷心、思傷脾，鬱結不遂，心營暗耗，以致陰不涵陽，心火內燔，胃陽失於通潤」。

(2) 多嗜肥甘酒醴：多食肥甘膏粱，鹵味太過，導致厚味釀熱，熱氣內積，因而消穀耗津，產生消渴，此即《素問·通評虛實論》：「消瘴撲擊，肥貴人則膏粱之疾也。」；《素問·奇病論》：「肥者令人內熱、甘者令人中滿，故其氣上溢，轉為消渴…」此外，《備急千金要方·消渴》指出飲酒之害：「凡積久飲酒，未有不成消渴…酒性酷熱，物無以加，…積年長夜，酣興不解，遂使三焦猛熱，五臟乾燥，木石猶且焦枯，在人何能不渴。」這些都說明長期飲食肥甘

酒醴對身體的戕害。

(3) 房室不節：《黃帝內經》論及許多房室養生的觀念，如「若入房過度則傷腎」，若性慾不加節制，則會傷精折壽；故《素問·上古天真論》說：「以欲竭其精，以耗散其真…故半百而衰也。」所以古代醫家認為，房勞過度，不僅會令人早衰短壽，還可誘發本病。《備急千金要方·消渴》說：消渴由於「凡人生放恣者眾，盛壯之時，不自慎惜，快情縱欲，極意房中，稍至年長，腎氣虛竭，…此皆由房室不節之所致也。」《外台秘要·消渴消中》云：「房室過度，致令腎氣虛耗故也，下焦生熱，熱則腎燥，腎燥則渴。」說明房室過度導致腎燥精虛，與本病的發生有一定的關係。因此和諧有節制的性生活對於養生保健是很重要的。

(4) 先天稟賦不足：《靈樞·五變》云：「五臟皆柔弱者，善病消瘵。」指出五臟虛弱是發生消渴病的重要因素。以現在的觀點認為糖尿病的發生與遺傳、體質等因素有關。所以五臟虛弱者，尤其是腎臟不足者每多易發本病。

西醫將多喝、多尿及不明原因體重下降等症狀列為糖尿病臨床診斷標準之一；至於中醫對消渴病的渴飲、能食而瘦、尿多或尿有甜味等主要症狀的認識，我們可從中醫病機的闡明略窺一二。

渴飲：肺主治節、敷陳津液之意，以生陰津、潤肺燥為宗旨；若肺氣虛燥，損傷津液，導致煩渴多飲。中消證初起有胃火，後亦多虛。初期胃火堅燥、腸胃燥熱，因而引水自救，口渴多飲；後期病深，多見脾胃已虛，而口渴能食等症仍存，或竟不能食的，則此時口渴乃脾虛不能正常敷布津液的結果。在明代，命門學說的興盛，對消渴病已注意到腎陽不能蒸騰水氣引起上燥渴的現象；《醫貫·消渴論》云：「命門火衰，不能蒸腐水穀，水穀之氣，不能熏蒸上潤乎肺，如釜底無薪，鍋蓋乾燥，故渴…」；許叔微說：「肺為五臟之華蓋，暖氣上蒸則肺潤；若下元虛冷，則陽氣不能上升，故肺乾而渴」。

能食而瘦：由於久食肥甘厚味，壅鬱化火，胃火（邪火）殺穀，引食自救，而為消穀善飢，此即《靈樞·師傳》：「胃中熱則消穀，令人懸心善飢」；由於腸胃燥熱，食入於胃，化而不收，穀氣下泄，

肌肉失養，故雖能食卻形體消瘦。

尿多或尿有甜味：上焦肺的主要病變是肺氣虛燥，不能輸布水精之氣，導致三焦結滯，腠理閉塞，肌肉失養而生消渴；水氣不入，直趨而下故尿多而甘。《外台秘要·引近效祠部李郎中消渴方》：「消渴者，原其發動，此則腎虛所致，每發即小便至甜。…腰腎既虛冷，則不能蒸於上，穀氣則盡下為小便者，故甘味不變…」，從這方面對本病尿甜、口乾做了解析。

隨著對消渴病認識的深化，在臟腑病位方面，明確地用上、中、下三焦病位分為“上消”、“中消”、“下消”做為辨證論治的依歸：凡口渴多飲為“上消”；消穀善飢為“中消”；小便或多或少渾濁為“下消”。但它們每多互相參見，實為同一病證的三種證型，常合併討論，統稱“三消”。張子和《三消之說當從火斷》認為：「火在上者善渴，火在中者消穀善飢，火在上中者善渴多飲而數溲，火在中下者不渴而溲白液，火偏上中下者飲多而溲數」。

2.1.2.3 治療糖尿病常用的中草藥

民間有許多治療糖尿病的驗方，本研究收集白龍船、白石榴、白豬母乳、銅垂玉帶草、含羞草、芭樂乾、破布子根、倒地苓、紅豆杉等九種台灣草藥做為實驗材料，以進行有效成分的篩選。

2.1.2.3.1 台灣紅豆杉 *Taxus sumatrana*

全世界紅豆杉屬植物共有11種，台灣紅豆杉、亦稱南洋紅豆杉（*Taxus sumatrana*）廣泛分布於亞洲、歐洲和北美洲，為一世界性分布的溫帶植物，生長環境海拔2500~3000公尺。台灣紅豆杉樹幹皮灰紅色，為一種結有漿果的常綠性喬木或灌木。

在中國傳統醫學寶庫中，關於紅豆杉的藥用價值早有記載。西元1966年，由Wani等人從太平洋紅豆杉（*Taxus brevifolia*）樹皮萃取分離得到天然抗腫瘤藥物紫杉醇（taxol）¹¹。從此，紅豆杉的藥用價值引起各國研究機構和藥廠的高度關注，且在世界普遍地展開研究、開發應用這一抗癌植物資源。

傳統藥用價值：夏、秋季採集枝、葉入藥，性味微苦、辛溫，功用為利尿通經；主治腎炎浮腫，小便不利，月經不調，糖尿病等症¹²。據《本草推陳》：「用皮易引起嘔吐，用木部及葉則不吐，且利尿、通經。治腎臟病、糖尿病。」

現代藥用價值：紫杉醇的抗癌作用為有絲分裂的抑制劑，其機轉為抑制微管蛋白的分解¹³⁻¹⁵。細胞有絲分裂過程中形成紡錘絲的微管蛋白，微管蛋白能維持細胞的形狀，並且參與染色體的分離；紫杉醇和微管蛋白結合形成一穩定結構，使中心粒的水解酶不能把紡錘絲分解掉，造成染色體無法排列在赤道板上，讓細胞無法產生凹溝，以致於無法完成有絲分裂直至腫瘤細胞死亡；同時紫杉醇還具有抑制腫瘤細胞擴散等作用。目前紫杉醇治療的適應症為轉移性卵巢癌及轉移性乳癌，另外對白血病、肺癌、黑色素瘤亦有顯著療效。

2.1.2.3.2 含羞草 *Mimosa pudica* Linn.

含羞草別名知羞草、怕羞草，見笑草。原產地位在熱帶美洲；臺灣於西元 1645 年自荷蘭引入，今可見分布在臺灣各地平野至低海拔山區村落、路旁散生或成群繁衍。通常在夏季時採收含羞草全草，曬乾，以方便儲存。本實驗是用含羞草的根做為實驗材料。

含羞草全草成分含有黃酮類、酚類有機物，氨基酸，有機酸及含羞草鹼（mimosine）。根含有生物鹼，內酯性物質，黃酮苷。全草的功用有清熱，安神，消積，解毒之效；可治腸炎，胃炎，小兒疳積，目熱腫痛，失眠，深部膿腫，帶狀疱疹。根的功用有和胃消積，利濕通絡，止咳祛痰、抗菌及舒張平滑肌的作用；可治慢性胃炎，小兒消化不良，風濕疼痛，腰痠背痛，支氣管炎，糖尿病¹⁶。

2.1.2.3.3 白石榴 *Punica granatum* Linn.

白石榴別名安石榴、珍珠石榴，在臺灣叫榭榴。原產亞洲，臺灣於西元 1820 年由華南引入，西元 1970 年由伊朗引種，今各地零星栽培。白石榴的根（皮），葉、花、果實均分別供藥用，隨時採集曬乾用。果實皮則採完熟初裂開者，除去種子及隔瓢，切片曬乾或

微火烘乾。本實驗是用白石榴的根做為實驗材料。

白石榴根皮含異石榴皮鹼 (isopelletierine)、 β -穀固醇、甘露醇。樹皮亦含異石榴鹼、偽石榴皮鹼 (pseudopelletierine)、甲基異石榴皮鹼 (methyloisopelletierine)。果皮含鞣質、樹脂、樹膠、甘露醇、粘液質，沒食子酸、蘋果酸、異槲皮苷 (isoquercitrin)、果膠、草酸鈣。根及樹皮具有驅蟲、抗菌、抗病毒等藥理作用；治蛔蟲、絲蟲，久瀉、久痢、赤白帶。果皮具有殺蟲、瀉腸、止血之效；治久瀉、久痢、便血、脫肛、滑精、崩漏、帶下、蟲積腹痛、疥癬¹⁷。

2.1.2.3.4 番石榴 *Psidium guajava* Linn.^{18, 19}

番石榴原產熱帶美洲，臺灣約 250 年前即有栽培，品種甚多，果實大小、顏色、風味不同，普通果實形如石榴，因來自國外，故名番石榴。臺灣民間習稱菝仔、那拔、草拔仔、藍菝、扒仔等名。台灣全境栽培及野生種隨處可見。全年採根，洗淨、切片、曬乾；採根皮或樹皮，切碎、曬乾；採嫩心葉，鮮用或曬乾用。採未成熟果實，切片，曬乾，稱芭樂乾。本實驗使用芭樂乾做為實驗材料。

根含番石榴攬仁酸 (arjunolic acid)。樹皮含訶子鞣質酸 (luteic acid)、山楂酸 (cratogeomollin)、並沒食子酸 (ellagic acid) 及有機酸、鞣質。果實含 β -穀固醇、番石榴苷、蒽醌、維生素、槲皮素、無色矢車菊素、沒食子酸 (gallic acid)、並沒食子酸、纈氨酸、丙氨酸、蘇氨酸、天門冬氨酸、穀氨酸、胱氨酸、鼠李糖、木糖、核糖、阿拉伯糖、阿拉伯聚糖、果糖、葡萄糖、半乳糖、蔗糖。

根有收斂，止血，抑制性慾之效；治牙痛、胃痛、腹痛、糖尿病、痢疾、瘡瘍。皮有收斂，止血，消炎之效；治牙痛、胃痛、瀉痢、癩瘡、濕毒瘡瘍。果實有健脾胃，抑制胃酸，驅蟲，滋養之效；治消化不良、胃酸過多、糖尿病。

2.1.3 西醫治療糖尿病

糖尿病一般主要分為兩型：第一型糖尿病 (即胰島素依賴型, IDDM)，主要是由於胰臟 β 細胞破壞致使血漿中胰島素濃度低於標

準值引起的。第二型糖尿病（即非胰島素依賴型，NIDDM）是最常見的類型，約佔糖尿病人數 85~90%左右，且發病年齡有日趨年輕化。由於糖尿病人數持續增加及糖尿病發病年齡日趨下降，如何預防糖尿病或是預防糖尿病併發症的發生，是我們所關切的焦點。

血糖值測定有兩項指標，空腹血糖值和餐後血糖值。有研究顯示餐後血糖值尤為重要，因為它是葡萄糖耐受受損（impaired glucose tolerance, IGT）階段的病人發展為第二型糖尿病的重要因素²。葡萄糖耐受受損（IGT）階段是介於正常和糖尿病之間的過渡狀態，但葡萄糖耐受受損（IGT）階段是糖尿病疾病進程中非常強烈的危險指標，並且與增加心血管疾病（CVD）的風險有關^{3,4}；若能早期進行干預，可延緩疾病的進展及預防第二型糖尿病的發生。

另外，英國前瞻性糖尿病研究（UKPDS）證實嚴格控制高血糖，能顯著降低糖尿病患者慢性併發症的發生及病死率²⁰。現已確認糖尿病為心血管疾病（CVD）死亡率（mortality）的獨立危險因子，其主要死因是起因於加快心血管及腦血管的動脈硬化。多項研究證實，餐後高血糖值與心血管疾病關係密切；糖尿病流行病學歐洲診斷標準的合作分析（Diabetes Epidemiology: Collaborative analysis Of Diagnostic criteria in Europe, DECODE）研究顯示：餐後高血糖對糖化血色素（A1C）的影響及對大血管併發症的作用明顯大於空腹高血糖⁵。

2.1.3.1 糖尿病的診斷標準

血糖是診斷糖尿病的主要依據。隨著就血糖值對人類健康影響的研究及深入的瞭解，糖尿病診斷標準中的血糖值將會不斷地被修正。從血糖值修正的軌跡來看，人類意識到高血糖對健康的危害程度比過去所瞭解的更為嚴重；所以修訂的血糖值比以往都更嚴格一些。以下引用的診斷數據是美國糖尿病學會（American Diabetes Association, ADA）2008年出版的最新糖尿病診斷標準²¹。

一般正常人的血糖標準為空腹血糖值（fasting plasma glucose, FPG）< 100 mg/dL（5.6 mmol/L）、飯後（p.c.）血糖值 < 140 mg/

dL (7.8 mmol/L)。雖然葡萄糖耐受受損 (IGT) 階段是介於正常和糖尿病之間的過渡狀態，還未達到罹患糖尿病的階段，因此葡萄糖耐受受損 (IGT) 階段的血糖標準為 140 mg/dL (7.8 mmol/L) \leq OGTT $< 199 \text{ mg/dL}$ (11.0 mmol/L)。

糖尿病診斷標準須符合以下條件中的其中一條，再經過非同日重複一次得到即可確診為糖尿病：

- (1) 糖尿病症狀 (例如多喝、多尿及不明原因體重下降)，再加上任意時間的血糖值 $\geq 200 \text{ mg/dL}$ (11.1 mmol/L)；或
- (2) 無進食熱量至少8小時的空腹血糖值 (FPG) $\geq 126 \text{ mg/dL}$ (7.0 mmol/L)；或
- (3) 口服葡萄糖耐量試驗 (OGTT) $\geq 200 \text{ mg/dL}$ (11.1 mmol/L)。

當確定罹患糖尿病時，我們希望控制糖尿病患者血糖的目標為飯前 (a.c.) 血糖值介於 $70 \sim 130 \text{ mg/dL}$ ($3.9 \sim 7.2 \text{ mmol/L}$) 之間，飯後 (p.c.) 血糖值小於 180 mg/dL (10.0 mmol/L)，並且其糖化血色素 (A1C) 值為小於 7.0% 。

通常，口服葡萄糖耐量試驗 (Oral Glucose Tolerance Test, OGTT) 是指服用 75 g 葡萄糖水溶液 2 小時後，測其血漿葡萄糖數值，此項試驗須符合世界衛生組織 (WHO) 規範。另一方面，正常人的糖化血色素 (glycated hemoglobin; A1C) 值是介於 $4.0\% \sim 6.0\%$ 之間。

2.1.3.2 西醫臨床使用口服降血糖藥 (OHA) 之現況

2.1.3.2.1 磺醯尿素類 (sulfonylureas) 促胰島素分泌藥物

磺醯尿素類藥物 (臨床上代表藥物見表 2.5) 的主要作用為刺激胰臟 β 細胞分泌胰島素，在分子機制上是先與胰臟 β 細胞膜表面的磺醯尿素類受體結合，關閉依賴性電位 K_{ATP} 通道 (β 細胞內鉀離子濃度升高) 使細胞膜去極化；再開啓細胞膜上鈣離子通道使鈣離子流入細胞內，最後促進胰島素分泌。由於此類藥物經肝臟代謝後再經由腎臟排除，因此肝或腎功能嚴重受損的病人須小心使用。

使用磺醯尿素類藥物應注意避免發生低血糖症之情形。此類藥物另外的副作用為體重增加，因此體重過重的病人較不適合；少數患者會發生皮疹、多形性紅斑或膽汁性黃膽，偶見肝功能異常。依據英國前瞻性糖尿病研究（UKPDS）結果顯示使用磺醯尿素類藥物控制血糖可預防小血管病變，如視網膜、腎臟及周邊神經病變，但卻無法顯著預防大血管病變。

2.1.3.2.2 非磺醯尿素類促胰島素分泌藥物

非磺醯尿素類促胰島素分泌藥物為苯丙胺酸衍生物（Meglitinides）。此類藥物（臨床上代表藥物見表 2.5）的作用機轉與磺醯尿素類藥物相似，皆作用在胰臟 β 細胞來刺激胰島素分泌；不同的是此類藥物作用快且半衰期較短，可有效降低飯後高血糖。在分子機制上與磺醯尿素類藥物相同是先與胰臟 β 細胞膜表面的磺醯尿素類受體結合，關閉依賴性電位 K_{ATP} 通道使細胞膜去極化；再開啓細胞膜上鈣離子通道，促進胰島素分泌。

非磺醯尿素類促胰島素分泌藥物的副作用包括低血糖和體重增加，但發生機率比磺醯尿素類藥物為低。此類藥物的缺點是須隨餐服用，因此服藥的次數較頻繁。由於此類藥物經肝臟代謝後再經由腎臟排除，因此肝或腎功能異常的病人須小心使用。

2.1.3.2.3 雙胍類（Biguanides）

雙胍類藥物（臨床上代表藥物見表 2.5）的主要作用是抑制肝臟製造與釋出葡萄糖，部分增加末梢對葡萄糖的利用，改善胰島素之阻抗，可以減輕體重，降低血中三酸甘油酯、低密度脂蛋白膽固醇（LDL）濃度及增加高密度脂蛋白膽固醇（HDL）來改善脂質代謝，無低血糖反應；故適用於糖尿病伴隨肥胖、高血脂、飯後血糖偏高之病人。

雙胍類藥物的副作用主要為腸胃道不適，如噁心、腹痛及腹瀉。有可能造成乳酸中毒，但發生率極低。對於腎臟功能有缺損之糖尿病患者，不適合使用 Metformin 藥物。

2.1.3.2.4 噻烷二酮類 (Thiazolidinediones, TZDs)

亦稱 PPAR- γ agonists。TZDs (臨床上代表藥物見表 2.5) 作用在胰島素主要的標的器官 (即肝臟、骨骼肌及脂肪組織)，主要作用是增進胰島素之作用，促進葡萄糖在末梢的利用，抑制肝臟葡萄糖的輸出，可以降低血中胰島素、三酸甘油酯，並有抗氧化作用；在分子機制上是作用在細胞核受體過氧化物酶體增植物激活受體- γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR- γ)，調節某些特定基因的轉錄，致使血中三酸甘油酯分解，增加脂肪組織三酸甘油酯的合成，以及增強胰島素的敏感性。

TZDs 的副作用包括體重增加及水腫，較常見於合併使用胰島素的病人；在歐洲建議 TZDs 應避免與胰島素併用，但美國糖尿病學會(ADA)認為在心臟功能正常的患者上，並無足夠證據顯示 TZDs 與胰島素合併使用會導致心臟衰竭。另外，因 troglitazone 造成肝細胞損害而被禁止使用，現已被 pioglitazone、rosiglitazone 取代；雖然目前使用 pioglitazone、rosiglitazone 未發生引起急性肝衰竭的證據，但美國食品藥物管理局 (FDA) 建議服用 TZDs 的病人應定期追蹤肝功能。

2.1.3.2.5 α 葡萄糖苷酶抑制劑 (α -glucosidase inhibitors)

在人類小腸刷狀緣 (small-intestinal brush-border) 上的 α -glucosidases 是負責分解糊精(dextrins)的酵素；而 α -glucosidase inhibitors 則為競爭性抑制腸道這類酵素的藥物，其作用機轉主要是延緩醣類分解成葡萄糖，減少腸道吸收葡萄糖進入全身循環，因此可延遲並減少飯後血糖升高，進而減少平均血糖值。

目前臨床上應用的 α -glucosidase inhibitors 有三種：acarbose (Glucobay[®])、miglitol (Glyset[®])、voglibose (Basen[®])，這些藥物的化學結構 (圖 2.5) 和葡萄糖分子結構相類似。acarbose 對 α -glucosidase 之親合力比醣類大，因此可競爭性抑制食物中的醣類轉化成身體可吸收的葡萄糖。miglitol 為可溶性，在小腸被吸收效果佳，其抑制蔗糖酶和麥芽糖酶的作用強於 acarbose，胃腸道的副作

用反應較少，故適合用於老年人。voglibose 對 α -glucosidase 抑制作用較 acarbose 強、抑制澱粉酶 (α -amylase) 的作用弱，部分未轉化為雙糖前的澱粉已被降解吸收而未進入大腸內產酸、產氣，因此用量小、腸胃副作用較小²²。

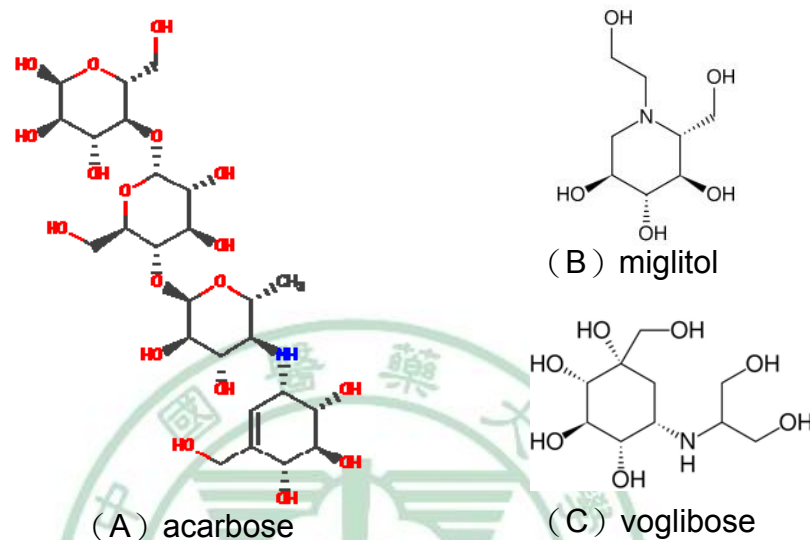


圖 2.5 α 葡萄糖苷酶抑制劑 (acarbose、miglitol、voglibose) 的化學結構

acarbose 是目前經臨床實驗證實可干預葡萄糖耐受受損 (IGT) 階段的藥物，在預防第二型糖尿病臨床研究 (STOP-NIDDM) 顯示：acarbose 可預防或延緩 IGT 階段轉變成第二型糖尿病²³；而且能顯著降低心血管疾病及高血壓併發症的發生率²⁴；及減少動脈硬化的風險²⁵。Kim 等研究結果顯示：voglibose 能矯正葡萄糖新陳代謝異常，並且可改善 IGT 階段患者 (已罹患擴張型心臟病變 (dilated cardiomyopathy, DCM)) 的慢性心臟衰竭²⁶，因此 α -glucosidase inhibitors 被視為慢性心臟衰竭的新治療藥物。

α -glucosidase inhibitors 主要有胃腸的副作用，原因為未吸收的醣類在腸道中發酵，會引起胃腸不適，如脹氣、腹痛、腹瀉及腸鳴。服用這三種藥均會出現胃腸的副作用，但不同藥物產生的副作用大小各不相同。

第 31 醣基水解酶家族 (glycosyl hydrolase family 31, GH31)

包含多種酵素，並且依據不同的作用及基質特異性（substrate specificities）分成四個小組²⁷。GH31 第一小組（subgroup 1）包含所有已知的 α -glucosidases，並且廣泛分布於生物體中，包括植物、動物、昆蟲、黴菌（fungi）及細菌；所以，人類的麥芽糖酶-葡萄糖澱粉酶（MGAM）及本實驗使用的酵素來自於 Baker's Yeast 皆是 GH31 第一小組。

在澱粉消化水解的過程中，人類的麥芽糖酶-葡萄糖澱粉酶（maltase-glucoamylase, MGAM）負責催化產生葡萄糖的最後一個步驟。根據研究顯示²⁸：acarbose 作用在麥芽糖酶-葡萄糖澱粉酶的活化位置結構，是由催化作用區域（catalytic domain）、N 末端環（N-terminal loop）、鑲嵌物 1（Insert 1）及鑲嵌物 2（Insert 2）所構成的容器（pocket），acarbose 利用其偽四澱粉（pseudo-tetrasaccharide）的化學結構，和麥芽糖酶-葡萄糖澱粉酶（MGAM）的活化位置結合而達到抑制酵素催化的作用（圖 2.6）。

acarbose 雖為當前在市場上廣泛使用的 α 葡萄糖苷酶抑制劑之一，但根據多項研究顯示：acarbose 對 α -glucosidases（MGAM）活性抑制效果相對地較弱^{30, 31}。另外，acarbose 抑制 α -glucosidases（Baker's Yeast）的能力並不明顯³²（表 2.4）。本實驗以此機轉做為篩選模型，將 α -glucosidase 固定在晶片上進行研究。

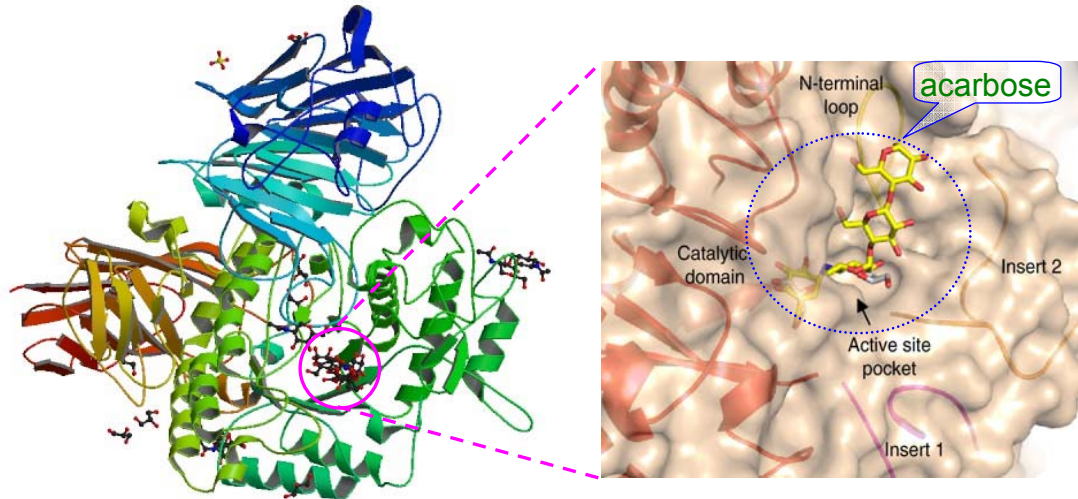


圖 2.6 acarbose 作用在麥芽糖酶-葡萄糖澱粉酶活化位置容器 (MGAM active-site pocket) 的表面圖形^{28, 29}。右圖 acarbose 用黃色條狀表示；MGAM 活化位置容器結構的組成元素包括催化作用區域 (catalytic domain; 紅色顯示)、N 末端環 (N-terminal loop; 黃色顯示)、鑲嵌物 1 (Insert 1; 紫色顯示) 和鑲嵌物 2 (Insert 2; 橙色顯示)。

表 2.4 從 Baker's Yeast、多種哺乳類動物小腸取得不同的抑制劑用來抑制 α -glucosidase 效果的比較³²

origin	IC ₅₀ ^a (mM)			
	voglibose	acarbose	(+)-catechin	glucono-1,5-lactone
baker's yeast	2.6×10^{-2} ^b	NI ^c	1.3×10^{-1} ^b	NI
rat small intestine	7.3×10^{-5}	6.3×10^{-2}	NI	2.5
rabbit small intestine	1.4×10^{-4}	6.2×10^{-2}	NI	9.5×10^{-1}
pig small intestine	1.7×10^{-6}	8.7×10^{-2}	NI	1.4×10^{-1}

^a IC₅₀ value is defined as the concentration of α -glucosidase inhibitor to inhibit 50% of its activity under the assayed conditions, and 0.7 mM *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (PNP-G) was used as a substrate in this assay.

^b Matsui et al. (1996).

^c NI, no inhibition.

表 2.5 口服降血糖藥 (OHA) 整理

種類	代表藥物	作用機轉	優點	缺點/副作用
磺醯尿素類 (sulfonylureas)	glipizide glimepiride glyburide	刺激胰島素分泌	1.減少小血管病變	1.低血糖 2.體重增加 3.血中胰島素濃度增加
非磺醯尿素類 (Meglitinides)	repaglinide nateglinide	刺激胰島素分泌	1.降低飯後血糖 2.比磺醯尿素類藥物較少引起低血糖及體重增加	1.低血糖 2.體重增加 3.血中胰島素濃度增加
雙胍類 (Biguanides)	metformin	降低肝臟葡萄糖輸出，及增加肌肉胰島素的敏感性。	1.減輕體重，減少大血管的病變 2.不會引起低血糖 3.降低血脂及高胰島素血症，增加纖維溶解	1.腸胃道症狀 2.乳酸中毒(少見)
噻烷二酮類 (TZDs)	pioglitazone rosiglitazone troglitazone	改善肝臟及週邊胰島素的敏感性。	1.改善第二型糖尿病的主要障礙 2.不會引起低血糖 3.降低血脂肪及高胰島素血症；增加纖維溶解，改善血管內皮細胞功能	1.須追蹤肝功能 2.體重增加、水腫 3.藥物作用時間慢
葡萄糖苷酶抑制劑 (α -glucosidase inhibitors)	acarbose miglitol voglibose	抑制腸道多醣類的分解。	1.降低飯後血糖 2.不會引起低血糖 3.幾無全身性作用	1.腸胃道副作用 2.服藥次數多

2.1.4 糖尿病常見的併發症

糖尿病併發症是引起糖尿病死亡率升高的因素之一，而糖尿病併發症約可分為兩大類：一種是大血管病變，包括心臟冠狀動脈、腦部及週邊之血管病變；另一種是小血管病變，包括視網膜病變、腎病變及神經病變。流行病學研究顯示，高血糖值會比標準血糖值在高血壓、高血脂症及心血管疾病有較高的發生率，所以高血糖會引起以上併發症的重要因素³³。

若剛發病或病情惡化時能即時控制，或肥胖者攝取較少熱量來減輕體重，或者增加運動量等，皆可改善葡萄糖耐受性。只要糖尿病患者能控制血糖在標準值內或近乎正常，將會降低併發症發生的機率。

2.1.4.1 大血管病變

長期糖尿病患者發生血管病變是很普遍的，而糖尿病患者發生大血管病變（如中風、高血壓、冠狀動脈疾病）的機率為非糖尿病患者 2~4 倍以上，大血管病變為糖尿病的主要死因。研究資料顯示糖尿病患者降低膽固醇、控制血壓、戒菸，均能降低心臟血管疾病的發生。

2.1.4.2 小血管病變

糖尿病發生小血管病變的機率，常與糖尿病病史長短、血糖控制之好壞、是否合併有高血壓、以及遺傳等因素有關：

（1）糖尿病視網膜病變：糖尿病合併視網膜病變為目前成年人引起失明之主因，可分為兩大類，即單純性視網膜病變和增殖性視網膜病變，兩者早期的變化是視網膜微血管通透性增加，剛開始並不會明顯影響視力，但最後可能會導致失明³⁴。而且糖尿病病史愈長，失明發生的機率愈高，不管是那一型的糖尿病，約有 85% 患者終究會有某種程度的視網膜病變；第 2 型糖尿患者約 20%~30% 會有視網膜病變，在發病 20 年後，則罹病率有增多之趨勢。故小於 30 歲（糖尿病病史 5 年以上）或大於 30 歲的患者，每年至少應接受一次視力及眼底檢查，以期早期發現病變及治療。

（2）糖尿病腎病變：腎病變在糖尿病初起時是毫無症狀的，當開始有症狀時往往是以「功能亢進」來表現，接著才出現蛋白尿；一旦蛋白尿出現時，腎絲球過濾率將呈穩定性下降。因此當從尿液中檢查有微量白蛋白來偵測早期腎病變，此時應加強控制血糖和血壓，預防並治療尿路感染，避免食用會增加腎臟負擔的食物（如高鹽、高蛋白）、及使用有腎毒性的藥物等，以減緩腎功能下降。

(3) 糖尿病神經病變：糖尿病神經病變常見的表徵是多發性周邊神經病變：常見於第二型糖尿病患者身上，其症狀往往是兩側性、遠端性，大部份是末梢感覺功能異常，包括感覺異常或麻木、嚴重過敏及疼痛，踝反射通常減弱或消失；而且通常會合併自主神經病變，症狀有姿態性低血壓、排汗異常、陽萎、逆行性射精、膀胱功能障礙、胃排空減緩、食道功能障礙、便秘或泄瀉等。另外，急性、疼痛性單一神經病變可能發生在年老的糖尿病患者身上，其症狀往往在數週到數月之內消失³⁴。當糖尿病患者發生神經病變的症狀時，除了要加強控制血糖外，並針對症狀給予治療，同時亦應加強病患衛教，做好自我防護措施。

2.1.4.3 足部問題

足部問題常是糖尿病患住院的主因，其截肢率佔無外傷截肢病人的 50% 以上。糖尿病足部潰瘍 (diabetic foot ulcers) 的發生在於神經病變致使足部壓力感覺異常，由於足部無法適當轉換壓力，造成血液循環不佳導致潰瘍壞死。造成糖尿病足部潰瘍的三大因素，分別為下肢血管病變、神經病變與局部感染。而易造成糖尿病足部潰瘍的危險因子，包括年齡 40 歲以上、抽菸、糖尿病病史超過 10 年、末梢感覺遲鈍、有足部潰瘍或截肢病史等；通常建議患者應養成經常檢視足部的習慣和避免穿戴新鞋，以降低足部病變的潛在性威脅。

2.2 α -glucosidases 在醣類代謝中扮演的角色

人類最主要且直接的能量來源是葡萄糖，而葡萄糖大部分是由植物澱粉催化水解所產生；在澱粉催化水解產生葡萄糖的過程中，需要多種酵素參與：唾液和胰臟的 α 澱粉酶 (α -amylases; EC 3.2.1.1) 負責打斷澱粉內部 α (1-4) 糖苷鍵，水解形成較短的直鏈和支鏈的低聚醣 (oligosaccharides; 或稱糊精 (dextrins))。隨後，藉由小腸刷狀緣 (small intestinal brush-border) 上的兩個外水解酶 (exohydrolases) 的作用，使糊精 (dextrins) 進一步被水解形成葡萄糖。

小腸絨毛膜刷狀緣上皮細胞上的兩個外水解酶是種膜附酵素 (membrane-bound enzymes)，分別為麥芽糖酶-葡萄糖澱粉酶 (maltase-glucoamylase, MGAM; EC 3.2.1.20 和 3.2.1.3) 及蔗糖酶-異麥芽糖酶 (sucrase-isomaltase, SI; EC 3.2.1.48 和 3.2.1.10)。而麥芽糖酶-葡萄糖澱粉酶 (MGAM) 即是 α -glucosidases，負責將 1,4-linked α -D-glucose residues 末端非還原部份進一步水解產生 α -D-glucose (圖 2.7 和圖 2.8)^{35, 36}。 α -glucosidases 廣泛分布於生物體中，參與食物碳水化合物的消化、醣蛋白的生合成、多醣及醣複合物的合成與分解等生化代謝反應，在機體的代謝過程中扮演重要的角色。

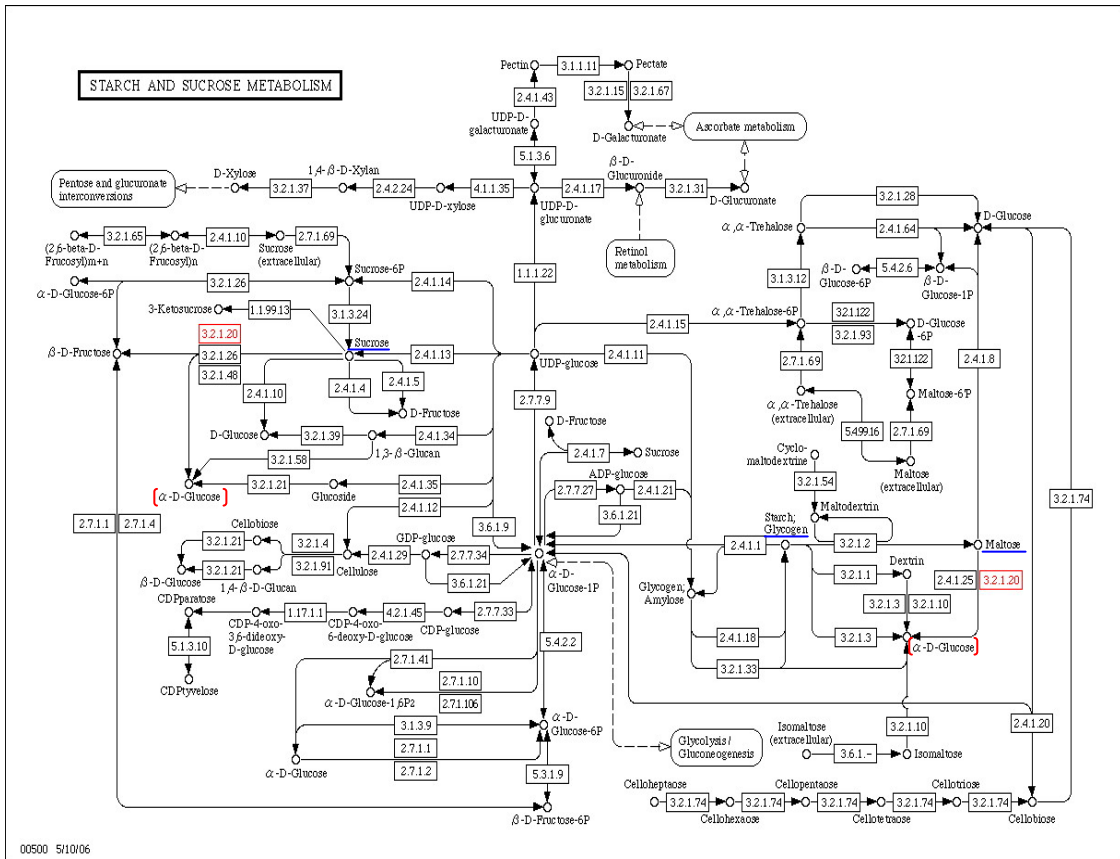


圖 2.7 澱粉及蔗糖 (sucrose) 的新陳代謝 35

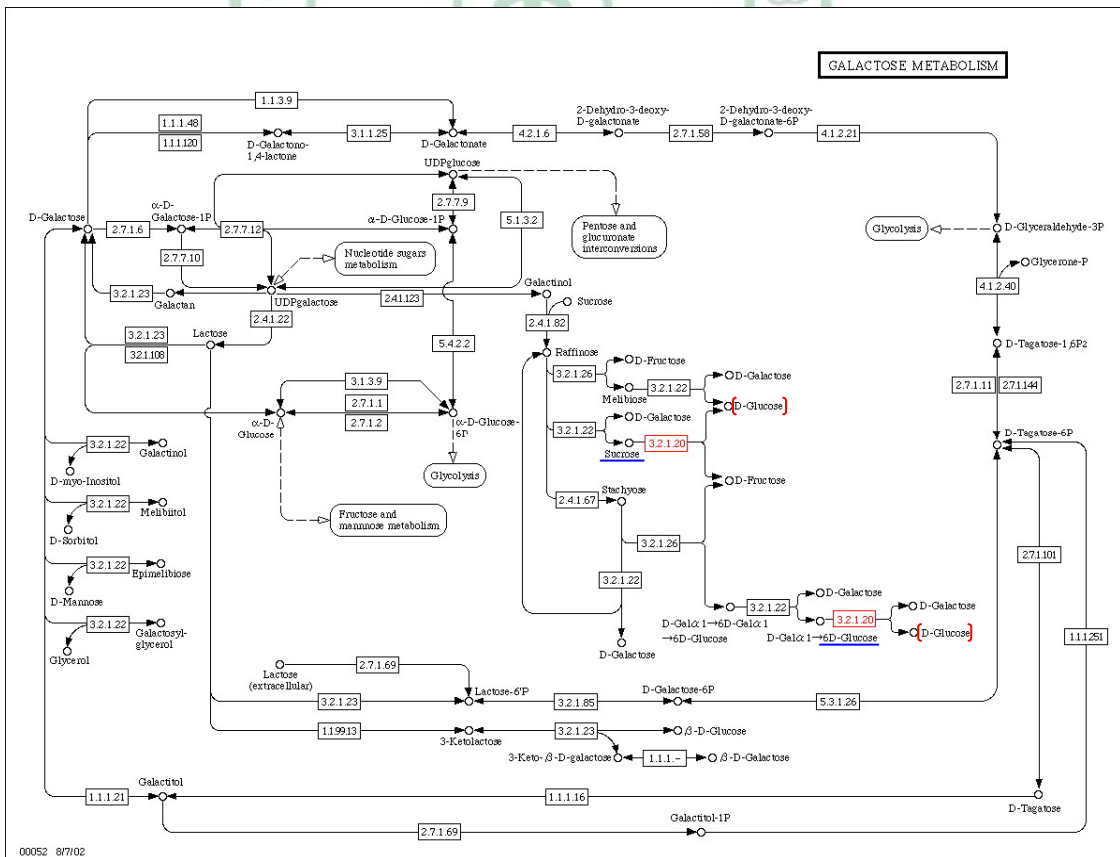


圖 2.8 半乳糖 (galactose) 的新陳代謝 36

2.3 AFTIR 相關理論

2.3.1 AFTIR system 作用原理

傳統藥物篩選流程（traditional screening method, TSM）在評估天然物中的有效成分時，須先將複雜成分依照化學性質的差異分成不同的羣組，接著再以生物檢定法（bioassay）篩選具有潛力的候選化合物（圖 2.9 左）。但在篩選過程中，須不斷重複進行成分分離與鑑定等程序，會耗費不少時間及精力，往往使篩選傳統藥物有效成分過程曠日費時。

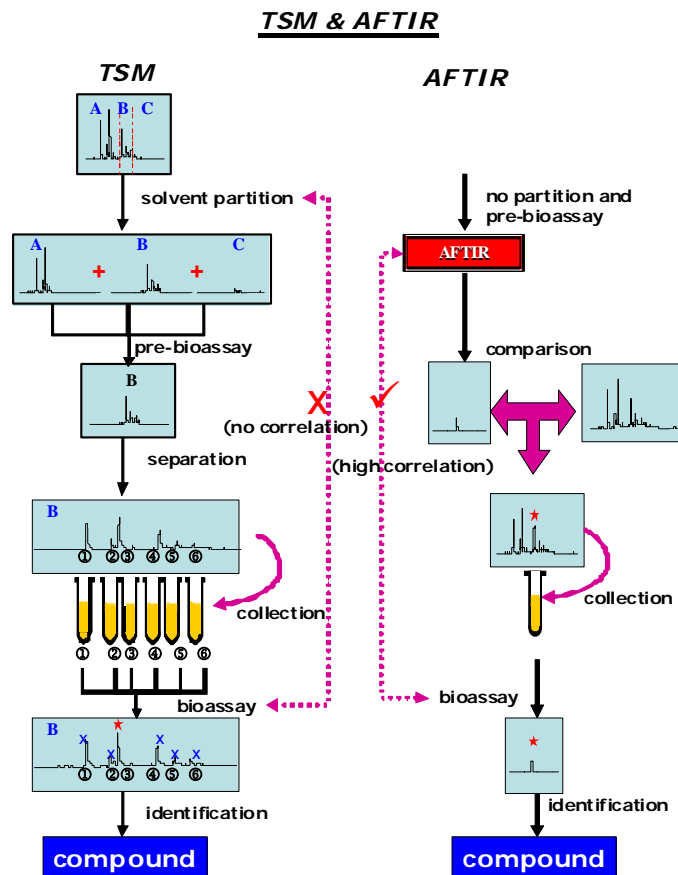


圖 2.9 傳統藥物篩選流程（TSM）與 AFTIR 篩選平台的差異性⁶

現今中央研究院陳惠民博士等人著手開發一高效率與高選擇性的藥物篩選平台——固定化接受器動態擷取技術（After Flowing Through Immobilized Receptor, AFTIR）⁶，此技術是利用生物分子

與研究藥物間專一性交互作用的特性，標的 (target) 出天然物內的有效成分，因此能有效節省篩選候選化合物所需的時間(圖 2.9 右)。AFTIR system 是由微流體晶片組件、SPR 組件、層析組件與自動注射、回收組件等所組成 (圖 2.10)。

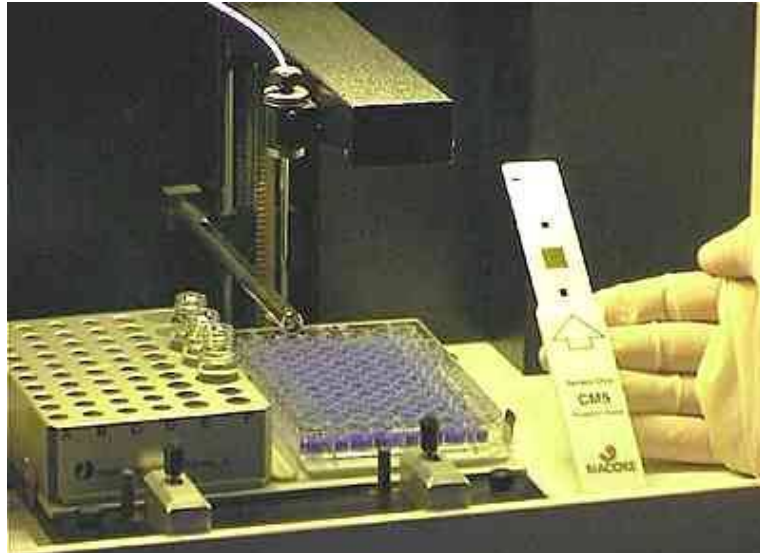


圖 2.10 AFTIR system 示意圖 (引用自 Biacore AB 公司使用手冊)

2.3.2 微流體晶片組件

固定化接受器動態擷取技術 (AFTIR) 是將所選定的接受器 (如蛋白質、DNA 等生物分子；本實驗用 α -glucosidase 當接受器) 固定在晶片 (本實驗選用 CM5 晶片) 上之後，利用微流體技術將混合物通過接受器，藉以標定或純化出天然物內與選定之接收器具有特异性鍵結的特定分子 (圖 2.11)。

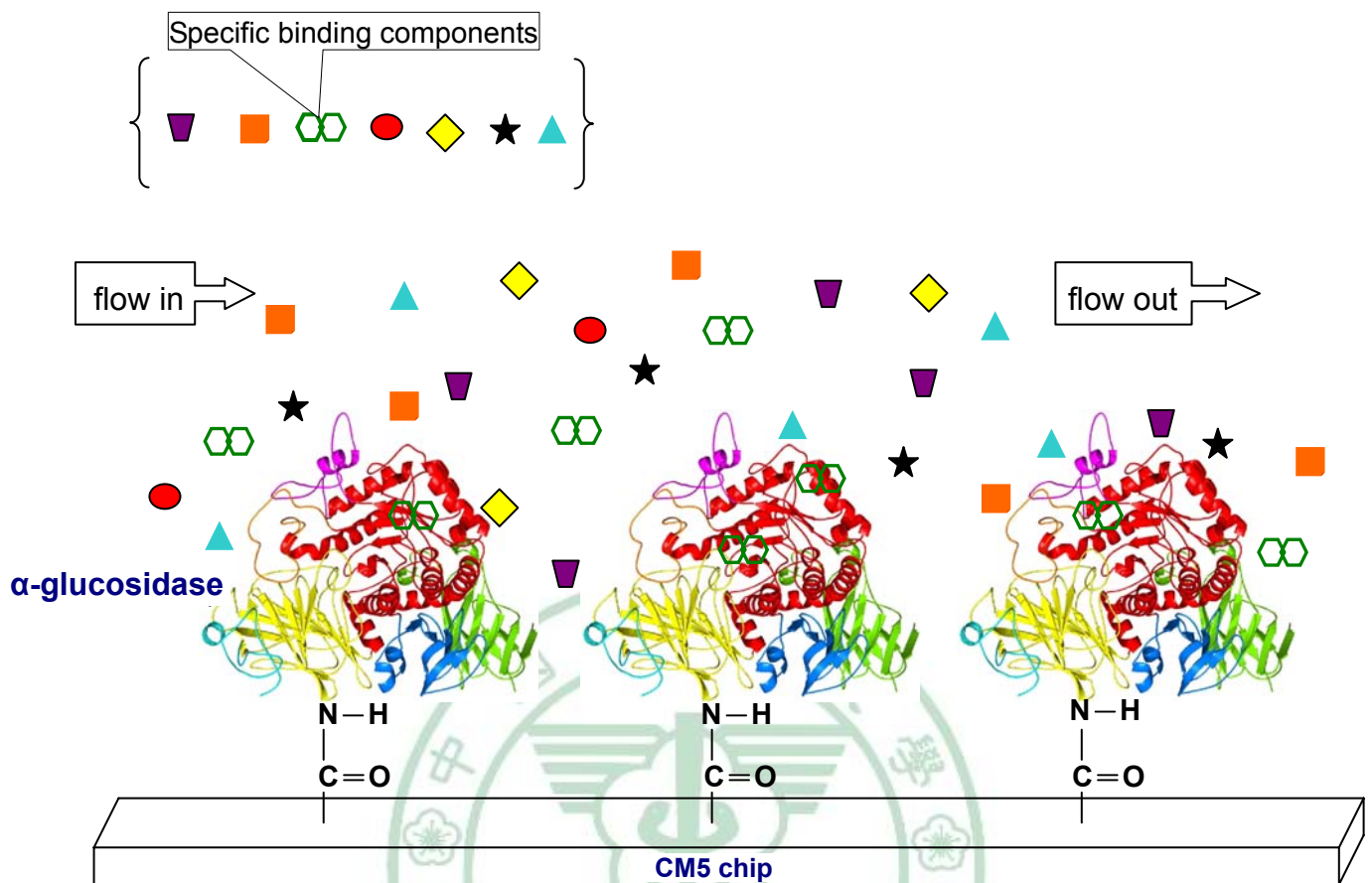


圖 2.11 α -glucosidase-CM5 晶片篩選生藥中有效成分示意圖

2.3.3 SPR 組件

當金箔表面發生電漿共振 (surface plasma resonance, SPR) 時，入射光的能量將完全被金箔的自由電子吸收，因此在反射光譜上產生一條暗帶，此時反射光形成的折射角度稱為共振角；由於反射光會隨著鄰近金箔介質質量變化發生偏移，亦即金箔表面的質量變化將導致共振角之移動³⁷⁻³⁹。

利用此表面電漿共振的光學原理，直接偵測金箔表面上生物分子因相互作用發生結合、解離導致的質量改變，所以不必將反應物先做純化及標定的繁雜程序。由於利用此原理做為偵測的工具，所需樣品質量非常少；同時能精確控制反應組成的接觸時間與流速，並且能立即顯示反應分子結合解離的情況，進而獲得反應動力常

數。本實驗使用瑞典 Biacore AB 公司生產的 Biacore 3000 機型，用來研究生藥成分與接受器間相互作用的情形（圖 2.12）。

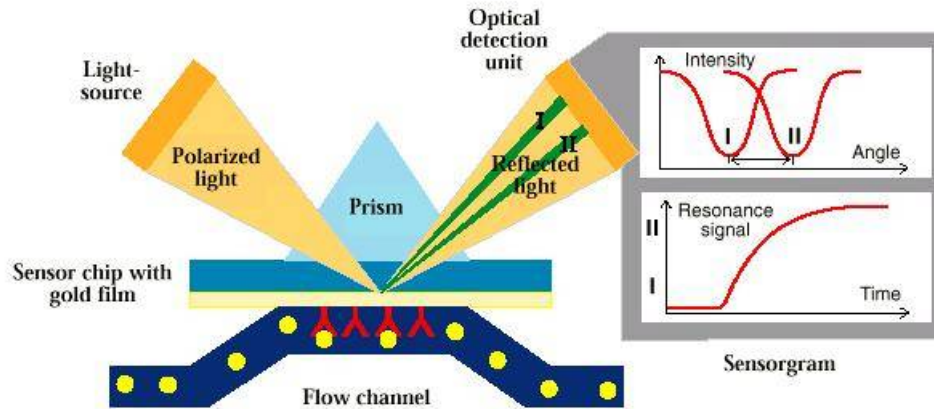


圖 2.12 表面電漿共振 (SPR) 原理示意圖 (引用 Biacore AB 公司使用手冊)

2.3.4 層析組件

由於高效能液相層析儀 (HPLC) 具有高靈敏度與高穩定性的優點，可精確執行定性及定量的分析，因此近年來常使用 HPLC 做為微量分析的工具。而 HPLC 的基本原理是用高壓來促進液體移動相 (mobile phase) 在沖提過程中帶動天然物內的成分流過固定相 (stationary phase)，利用不同物質與固定相結合力強弱的差異性，使不同成分在管柱中會有不同的滯留時間而被移動相帶出，所以能將天然物內不同的物質逐一分離，再經由偵測器 (detector) 測定出來。

本實驗使用 Hewlett Packard 1100 型高效能液相層析儀做為層析組件，一方面是用來建立生藥初萃取物的指紋圖譜；另一方面將欲回收的成分樣品進行分析。

2.3.5 自動注射、回收組件

Biacore 3000 儀器為全自動生物分子相互作用分析系統，其儀器具有自動注射和回收分析樣品的功能。當欲分析的樣品與晶片上

接受器（如蛋白質、DNA 等生物分子）發生親和性結合（bioaffinity binding）時，利用 3~7 μL 適當溶液（強酸或強鹼），將和接受器發生作用之物質自晶片表面溶蝕下來，如圖 2.13。

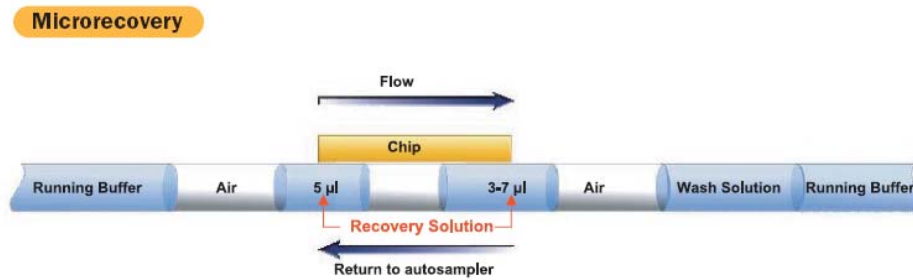


圖 2.13 Biacore 3000 分析樣本回收原理（引用自 Biacore AB 公司使用手冊）

AFTIR system 由於使用 SPR 組件做為偵測器，用來偵測生物分子間相互作用的動態反應，一方面所需樣品質量非常少，僅需約數十微升（ μL ）左右；另一方面利用生物分子與研究藥物間專一性交互作用的特性，標的出天然物內的有效成分，不必將待測的混合物先做純化及標定的繁雜程序，所以能有效節省篩選候選化合物所需的時間。

第三章 材料與方法

3.1 儀器、材料與藥品

3.1.1 使用儀器

- (1) 桌上型高速冷凍離心機 Sigma 3K18；
- (2) 旋轉減壓濃縮機 EYELA N-N 系列；
- (3) 超低溫冷凍櫃 Thermo Forma Model 725；
- (4) 冷凍乾燥機 EYELA FD-1000；
- (5) 全自動生物分子相互作用分析系統 (Amersham Biomolecular Interaction Analysis System) Biacore 3000：Biacore AB；
- (6) 高效能液相層析儀：Hewlett Packard 1100 型，配備有 Model G1322A 真空脫氣機 (Vacuum Degasser)、Model G1311A 四溶媒梯度幫浦 (Quaternary Pump)、Model G1313A ALS 自動進樣器 (auto sampler)、Model G1328A 手動進樣器 (manual injector)、Model G1315A DAD 光電二極管陣列檢測器 (Diode Array Detector)。
- (7) 酵素免疫分析儀 (ELISA reader)：Multiskan EX，Thermo；
- (8) 分液收集器 (fraction collector)：型號 FC203B，Gilson；

3.1.2 使用材料與藥品

- (1) CM5 晶片：Code No. BR-1000-14，Biacore AB；
- (2) HPLC 分析型管柱：Discovery[®] BIO Wide Pore C18, 25 cm x 4.6 mm, 5 μ m，SPELCO；
- (3) HPLC 製備型管柱：Discovery[®] BIO Wide Pore C5, 25 cm x 10 mm, 5 μ m，SPELCO；
- (4) 過濾膜：0.22 μ m，MILLEX[®]GS，MILLIPORE；
0.45 μ m，MILLEX[®]HA，MILLIPORE；
- (5) α -glucosidase (EC 3.2.1.20)：固定晶片用濃度為 1 mg/ mL、
酵素活性分析使用濃度為 14 units/ mg protein/ mL，G-5003，

- 1000 units, from Bakers Yeast (Type I), SIGMA ;
- (6) HBS-EP buffer: 成分為 10 mM HEPES、 0.15 M NaCl、3 mM EDTA、 0.005% (v/v) Surfactant P20、 pH 7.4 , Code No. BR-1001-88 , Biacore AB ;
- (7) 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (縮寫 EDC) : Biacore AB ;
- (8) *N*-hydroxysuccinimide (縮寫 NHS) : Biacore AB ;
- (9) ethanolamine HCl (縮寫 EA) : Biacore AB ;
- (10) phosphate buffer solution (縮寫 PBS) : 10X concentrated , GeneMark ;
- (11) (–)-epigallocatechin gallate (縮寫 EGCG) : 用 PBS 配製 濃度如下 3 mg/ mL、 1 mg/ mL、 0.5 mg/ mL、 0.1 mg/ mL、 0.05 mg/ mL , E4143-50MG, from green tea , SIGMA ;
- (12) 醋酸鈉緩衝液 : pH 4、 pH 7 , Biacore AB ;
- (13) NaOH : 50 mM ;
- (14) 西藥 : acarbose (糖祿錠 (Glucobay[®]), 50 mg/ Tab., 德國拜耳藥廠) ;
- (15) 科學濃縮中藥 : 仙鶴草、乾薑、黃水茄、石斛、益母草 , 順天堂藥廠股份有限公司 ;
- (16) 中草藥 : 綠茶、白龍船、白石榴、白豬母乳、銅垂玉帶草、含羞草、芭樂乾、破布子根、倒地苓、紅豆杉 ;
- (17) 10% (v/v) HCl_(aq) ;
- (18) 甲醇 (試藥級) : Fluka ;
- (19) 甲醇 (HPLC 級) : Riedel-deHaen ;
- (20) Acetonitrile (縮寫 ACN , HPLC 級) : J.T. Baker ;
- (21) *p*-Nitrophenyl α -D-Glucopyranoside (縮寫 *p*NPG , HPLC 級) : Fluka ;
- (22) 酵素緩衝液 : 0.1M pH 7.0 磷酸緩衝液 , 內含 0.2% BSA 及 0.02% NaN₃ .
- (23) caffeine (HPLC 級) : Fluka ;

(24) (-)-epicatechin gallate (縮寫 ECG) : E3893-10MG, from green tea , SIGMA-ALDRICH ;

3.2 待測物之製備

3.2.1 中草藥及科學中藥之前處理

取 50 克科學中藥粉末或中草藥研碎，至錐形瓶中，再加入 250 mL 甲醇 (methanol) 浸泡；用超音波震盪 1 小時，以上步驟重覆三次後，將甲醇萃取液集中後過濾去除殘渣。以減壓濃縮方式將萃取液之甲醇溶劑抽乾。再以 1000 mL d.d.water 回溶抽乾的萃取出物，用震盪或攪拌方式儘量使其溶解後，以抽氣過濾去除不溶物，再將濾液減壓濃縮至 50 mL 以下。

接著將濃縮後之濾液倒入 50 mL 離心管中，使用 5000 g 之相對離心力 (relative centrifuge field, RCF) 進行離心 10 分鐘。離心後，取上層澄清液體，以減壓濃縮至約 10~20 mL 的體積，並將此濃縮液放入 -80 °C 冰箱一天，最後置於冷凍乾燥機脫乾水分，便完成樣品前處理步驟 (圖 3.1)。

3.2.2 acarbose 前處理

取 10 顆 (500 mg) acarbose 研磨成粉狀，至錐形瓶中，再加入 250 mL 10% (v/v) HCl_(aq) 浸泡 acarbose 粉末；用超音波震盪 1 小時，以上步驟重覆三次後；用震盪或攪拌方式儘量使其溶解後，將鹽酸萃取液集中後以抽氣過濾法去除不溶物，再將濾液減壓濃縮至 50 mL 以下。

接著將濃縮後之濾液倒入 50 mL 離心管中，使用 5000 g 之相對離心力 (relative centrifuge field, RCF) 進行離心 10 分鐘。離心後，取上層澄清液體，以減壓濃縮至約 20 mL 的體積，並將此濃縮液放入 -80 °C 冰箱一天，最後置於冷凍乾燥機脫乾水分，便完成樣品前處理步驟。

50 g科學中藥或中草藥樣品+ 250 mL 甲醇

↓ 超音波震盪 1 hr，至少重覆三次

↓ 減壓濃縮方式將甲醇溶劑抽乾

↓ 1000 mL d.d.water 回溶

↓ 減壓濃縮方式濃縮至 50 mL 以下

↓ 離 心

↓ 取上層澄清液

↓ 濃縮至 10~20 mL

↓ - 80 °C 冷凍一天

↓ 冷凍乾燥，得萃取物粉末

圖 3.1 中草藥及科學中藥前處理流程圖

3.3 α -glucosidase-CM5 晶片製備原理與最佳化固定條件

3.3.1 α -glucosidase-CM5 晶片製備原理

Biacore AB 公司生產的 CM5 晶片是以玻璃為基材，玻璃表面覆蓋一層厚度約為 50 nm 的金膜，在金膜層表面上再覆蓋一層羧基化的葡萄聚醣 (carboxymethylated dextran)。由於 Biacore AB 公司所推出 CM5 晶片已被大量使用在生化研究及分析上，而且蛋白質固定化 (immobilization) 的方式已經有許多商業化程序可依循，所以為本實驗考量選擇此 CM5 晶片的原因 (圖 3.2)。

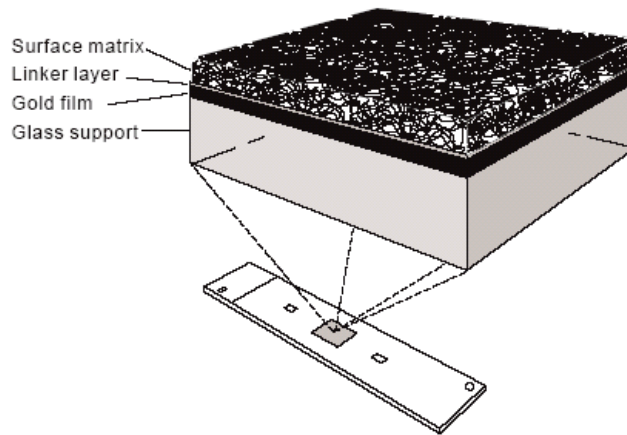


圖 3.2 CM5 晶片構造圖

SIGMA 公司所生產的 G-5003 系列產品是從 Bakers Yeast (Type I) 取得 α -glucosidase (EC 3.2.1.20)，而不是從哺乳類動物 (Type II) 的小腸抽取而來，所以 α -glucosidase 的純度高。利用這種已商業化的酵素，依照蛋白質固定步驟，將其固定在 CM5 晶片上。

當以上實驗材料準備及緩衝溶液 pH 值設定好後，接下來需將 α -glucosidase 固定在 CM5 晶片上。本實驗是先利用 EDC/NHS 的混合液活化 CM5 晶片表面上葡萄聚醣 (dextran) 的羧基 (圖 3.3)；然後將配置的 α -glucosidase 溶液在 CM5 晶片表面上流動，使 α -glucosidase 的胺基能和葡萄聚醣 (dextran) 的羧基形成醯胺鍵結而固定在晶片上 (圖 3.4)。最後注入 EA，將未與 α -glucosidase 作用之葡萄聚醣 (dextran) 上的活化羧基去活化 (圖 3.5)。

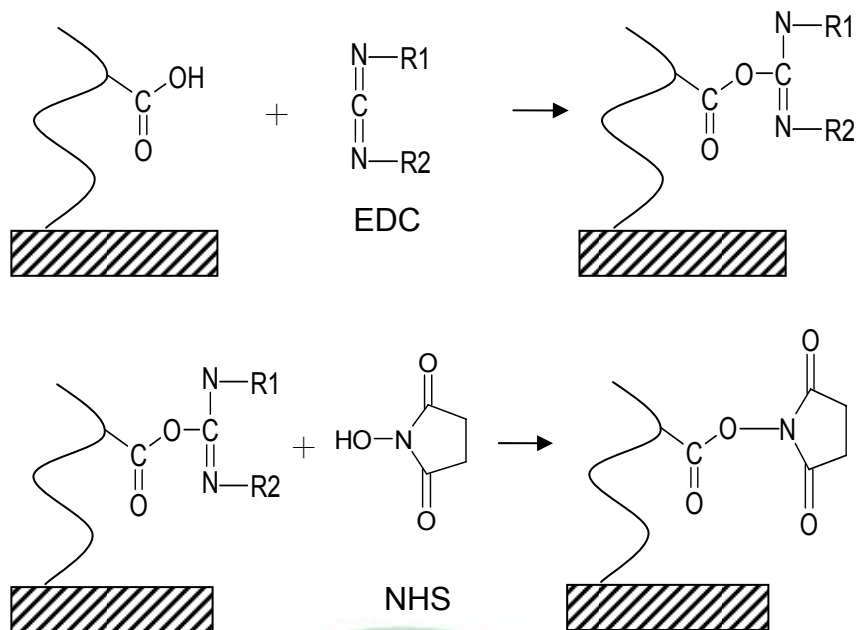


圖 3.3 EDC/ NHS 活化 CM5 晶片的作用圖

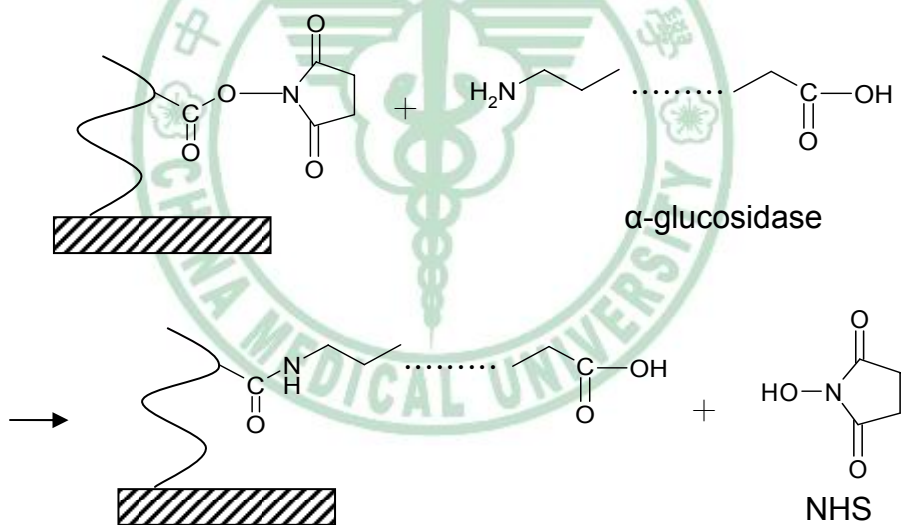


圖 3.4 α -glucosidase 固定在 CM5 晶片上的作用圖

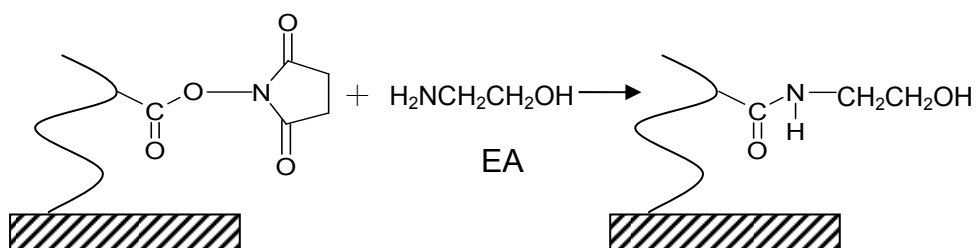


圖 3.5 EA 去活化作用圖

選擇 Biacore AB 公司推出 CM5 晶片做為本實驗的生物晶片。選購自 SIGMA 公司所生產的 α -glucosidase (G-5003)，做為晶片上的酵素接受器，並依照 3.3.2.2 節所敘述的方式，將本酵素固定在 CM5 晶片上。並利用金屬表面電漿共振 (SPR) 的光學原理，直接偵測金屬表面上的質量改變，同時能精確的控制反應組成的接觸時間與流速，並且可立即顯示反應分子結合、解離的情形。

3.3.2 α -glucosidase-CM5 晶片的最佳化固定條件

3.3.2.1 α -glucosidase 溶液之配製

將 α -glucosidase 分別以不同 pH 值 (pH 4.0、7.0) 的醋酸鈉緩衝液，配製成 1 mg/ mL 的溶液，以 HBS buffer 當 running buffer，將流速設定在 5 μ L/ min，分別注射不同 pH 值的 α -glucosidase 醋酸鈉溶液，觀察其與 CM5 晶片間的作用情形。

3.3.2.2 α -glucosidase 酵素之固定法與程序

將 CM5 晶片放入 Biacore 3000 儀器中，先用 HBS buffer 為流動相沖洗儀器內的管路，待表面電漿共振訊號圖 (SPR sensorgram) 的基線穩定後，開始 α -glucosidase 之固定。

首先，將流速設定為 5 μ L/ min，注射 70 μ L EDC/ NHS 的混合液 (1:1 比例混合，濃度為 5 μ L/ mL)；接下來，注入 100 μ L 由醋酸鈉緩衝液 (pH 4.0) 配置約 1 mg/ mL 的 α -glucosidase 溶液；最後注入 70 μ L 的 EA。

3.4 α -glucosidase-CM5 晶片活性及穩定度之確認方法與步驟

3.4.1 α -glucosidase-CM5 晶片活性之確認方法與步驟

由於酵素和受質的結合具有專一性，利用受質會作用在酵素特定結合位置的特性，選擇適當的 ligand 在本實驗中扮演重要的角

色。通常 ligand 的選取最好能具備下列幾項條件：

(1) 具有重覆性：ligand 可和接受器進行可逆性鍵結，這樣生物晶片才能重覆使用來篩選樣本。

(2) 具有競爭性抑制能力：本實驗期望能從生藥中尋找可抑制 α -glucosidase 作用的有效成分，因此選擇適當的 ligand 也需具備某種程度能和生藥中的有效成分形成競爭性抑制 α -glucosidase 的能力。

(3) 具有訊號放大作用：希望表面電漿共振訊號圖 (SPR sensorgram) 上呈現的訊號曲線明顯。

選擇 EGCG 當作本實驗的 ligand (或 inhibitor)。因為從 EGCG 抑制 α -glucosidase 效能的研究⁴⁰中，可知其抑制 α -glucosidase 百分之五十的有效濃度 (IC_{50}) 是 $50.9 \mu\text{M}$ 。

首先，先用 PBS 製備 1 mg/mL EGCG 溶液。隨後，將已固定 α -glucosidase 的 CM5 晶片 (簡稱 α -glucosidase-CM5 晶片) 放入 Biacore 3000 儀器中，利用 PBS 當 running buffer，將流速固定在 $10 \mu\text{L/min}$ 的條件下進行，EGCG 溶液的注射量為 $60 \mu\text{L}$ ；等待表面電漿共振訊號圖 (SPR sensorgram) 的 EGCG 訊號線執行結束後，注入 NaOH (50 mM) $5 \mu\text{L}$ 清洗晶片上的 EGCG 兩次。以上步驟重覆至少兩次以上。

其次，用 PBS 製備五種不同濃度的 EGCG 溶液 (0.05 mg/mL 、 0.1 mg/mL 、 0.5 mg/mL 、 1 mg/mL 、 3 mg/mL)，接下來的操作步驟如同上。

3.4.2 α -glucosidase-CM5 晶片穩定度之確認方法與步驟

將 α -glucosidase-CM5 晶片放入 Biacore 3000 儀器中，利用 PBS 當 running buffer，將流速固定在 $5 \mu\text{L/min}$ 的條件下進行，EGCG (1 mg/mL) 的注射量為 $60 \mu\text{L}$ ；等待表面電漿共振訊號圖 (SPR sensorgram) 的 EGCG 訊號線執行結束後，注入 NaOH (50 mM) $5 \mu\text{L}$ 清洗晶片上的 EGCG 兩次。以上步驟重覆至少 50 次以上。

3.5 α -glucosidase-CM5 晶片篩選樣品條件與步驟

將經過前處理之科學中藥及中草藥，用 PBS 配製成 10 mg/ mL 的溶液，並使用過濾膜 (0.22 μ m) 過濾去除微粒，避免造成 Biacore 儀器內通道的阻塞。設定 Biacore 流速在 10 μ L/ min 的情況下，分別注入 60 μ L、濃度為 10 mg/ mL 的科學中藥溶液或中草藥溶液，觀察其與 α - glucosidase 接受器作用的情形。

同樣地，將經過前處理之 acarbose，用 PBS 配製成 100 mg/ mL 的溶液，並使用過濾膜 (0.22 μ m) 過濾去除微粒，設定 Biacore 流速在 10 μ L/ min 的情況下，注入 60 μ L、濃度為 100 mg/ mL 的 acarbose 溶液，觀察其與 α - glucosidase 接受器作用的情形。

3.6 α -glucosidase-CM5 晶片的樣品回收條件與步驟

將欲回收之科學中藥、中草藥和 acarbose 的粉狀樣品，以磷酸鹽緩衝溶液 (PBS) 配製成 10 mg/ mL 溶液，並用過濾膜 (0.22 μ m) 過濾，以去除微粒。利用 Biacore 3000 儀器的分析物回收 (analyte recovery) 功能，選定當天實驗所使用的 flow cell，將磷酸鹽緩衝溶液流速設定為 10 μ L/ mL，樣品的注射時間為 3 分鐘。回收時的滯留時間設為 10 秒，按照 Biacore 3000 儀器內套裝的軟體指示，依次將裝有 50 mM NaOH、水、磷酸鹽緩衝溶液、生藥溶液及空的回收瓶放入樣品架內，以進行分析樣品的回收。

3.7 HPLC 指紋圖譜建立標定方法、條件與步驟

3.7.1 經過前處理之待測物與標準品的指紋圖譜分析

將經過前處理之科學中藥、中草藥和標準品，用 d.d.water 配製成 1 mg/ mL 的溶液；acarbose 用 d.d.water 配製成 100 mg/ mL 的溶液。接下來，使用過濾膜（0.45 μm ）過濾去除微粒，避免高效能液相層析儀（HPLC）內的管柱阻塞。本實驗使用 Hewlett Packard 1100 型高效能液相層析儀建立生藥初萃取物的指紋圖譜。

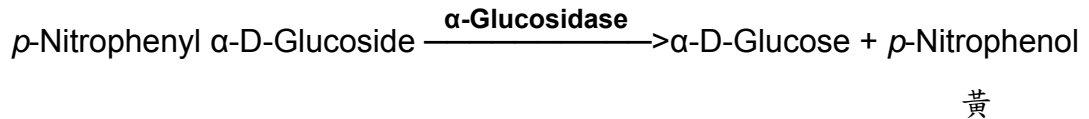
本實驗使用的分析型管柱為 SUPELCO 公司製造 Discovery® BIO Wide Pore C18（25 cm x 4.6 mm, 5 μm ）。其沖提條件為：流速設定為 1.0 mL/ min，以 95%水+ 5%甲醇為起始沖提 5 分鐘後逐漸增加甲醇比例沖提 15 分鐘後到達 40%水+ 60%甲醇，接下來維持相同比例繼續沖提 10 分鐘後繼續逐步增加甲醇比例沖提 20 分鐘至 100%甲醇，最後以 100%甲醇沖提 10 分鐘後結束。以光二極體陣列檢測器進行偵測，並以固定波長 210nm、254 nm、280 nm、330 nm 等繪製層析圖。

3.7.2 標的物成分之分析

利用之前 3.6 節敘述的回收方法所收集到的樣品，隨後將樣品體積濃縮至約 20 μL ，以高效能液相層析儀進行分析。其分析條件與經過前處理之待測物的指紋圖譜分析相同。

3.8 抑制 α -glucosidase 活性分析與步驟

利用酵素活性分析 (enzyme activity assay) 試驗的原理來做抑制 α -glucosidase 活性的分析，酵素活性分析試驗的作用原理如下：



α -glucosidase 具有活性作用時，會將 p -Nitrophenyl α -D-Glucoside (p NPG) 分解成 α -D-Glucose 和 p -Nitrophenol 而使試劑呈現黃色；當 α -glucosidase 活性被抑制時，則分解反應進行遲緩，因此試劑變色緩慢，甚至沒有變色。

先取 7 mg α -glucosidase 粉末溶於 5 mL 酵素緩衝液配製成甲溶液；另外取 6.04 mg p NPG 溶於 4 mL 酵素緩衝液配製成乙溶液；再將生藥萃取物樣品或標準品依所需濃度配製成丙溶液。

首先，將 50 μ L 甲溶液和 10 μ L 丙溶液混合於 96 孔盤的孔內；然後以酵素免疫分析儀 (ELISA reader) 下利用波長 405 nm 測量吸收值 (假設吸收值為 $A_{\text{樣品}}$)，接著置於室溫下 5 分鐘後，再加入 50 μ L 乙溶液，繼續在室溫下放置 5 分鐘後，再一次以波長 405 nm 測量吸收值 (假設吸收值為 $B_{\text{樣品}}$)。

酵素活性百分比的計算方式如下：

(1) 若丙溶液不含任何樣品或標準品時 (blank)：令

$$D_{\text{blank}} = \text{吸收值 } B_{\text{blank}} - \text{吸收值 } A_{\text{blank}}$$

(2) 若丙溶液含生藥萃取物樣品或標準品時：令

$$D_{\text{樣品}} = \text{吸收值 } B_{\text{樣品}} - \text{吸收值 } A_{\text{樣品}}$$

(3) 則某樣品之酵素活性百分比

$$\text{Activity (\%)} = (D_{\text{樣品}} / D_{\text{blank}}) \times 100\%$$

3.9 標的化合物純化之步驟與鑑定

實驗室常用層析法來分離混合物，當需要對某一組成分做進一步鑑定時，常會使用分液收集器 (fraction collector) 在層析管柱出口處收集所需的溶液。本實驗利用 HPLC 回收標的樣品中的有效成分，使用 Gilson 公司生產的分液收集器 (型號 FC203B) 進行標的樣本有效成分的收集；由於分析型管柱的產量有限，為了要達到大容量樣品的快速分離，必須改採製備型管柱進行標的樣本有效成分的純化。

經過多次測試，最後使用的回收條件為：以 SUPELCO 公司製造的製備型管柱 Discovery[®] BIO Wide Pore C5 (25 cm × 10 mm, 5 μm)，檢測波長定為 280 nm，注入量為 100 μL，其沖提條件為：流速設定為 3.8 mL/min，以 95%水+ 5%甲醇為起始沖提 5 分鐘後逐漸增加甲醇比例沖提 15 分鐘後到達 40%水+ 60%甲醇，接下來維持相同比例繼續沖提 10 分鐘後繼續逐步增加甲醇比例沖提 20 分鐘至 100%甲醇，最後以 100%甲醇沖提 10 分鐘後結束。以光二極體陣列檢測器進行偵測，以固定波長 210nm、254 nm、280 nm、330 nm 等繪製層析圖，並利用自動分次收集器收集所需成分。

第四章 結果

4.1 α -glucosidase 固定於 CM5 晶片的結果

4.1.1 α -glucosidase 固定於 CM5 晶片的標準化

α -glucosidase 固定於 CM5 晶片的表面電漿共振訊號圖 (SPR sensorgram) 如圖 4.1。

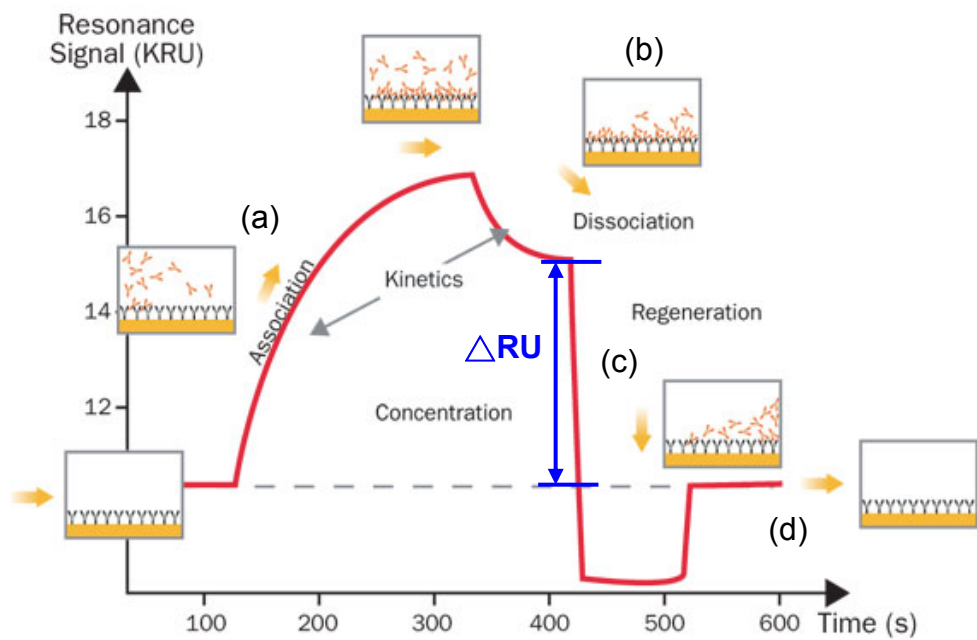


圖 4.1 α -glucosidase 固定於 CM5 晶片標準化的表面電漿共振訊號圖 (SPR sensorgram)

本實驗利用金屬表面電漿共振 (surface plasmon resonance, SPR) 的光學原理，直接監測金屬表面上生物分子因相互作用導致質量變化所呈現的表面電漿共振訊號圖 (SPR sensorgram)。在一般情形 (圖 4.1)，CM5 晶片上有接受器時，呈現基線 (水平灰色虛線)；當混合物接近 CM5 晶片的過程稱結合作用 (association)，呈現圖 4.1 (a) 訊號曲線；混合物離開 CM5 晶片的過程稱解離作用 (dissociation)，呈現圖 4.1 (b) 訊號曲線；訊號曲線轉折點至基線為晶片上接受器特异性鍵結物質的結合量 (Δ RU)；當用強酸

或強鹼清洗 CM5 晶片表面上的物質時，訊號線會降至基線以下後再回到基線（呈現圖 4.1 (c) 訊號曲線），此過程叫 regeneration。若 CM5 晶片表面上無任何物質時，訊號線會落在基線上，呈現圖 4.1 (d) 訊號線。通常金屬表面上生物分子相互作用的反應是種動態平衡，亦即結合作用（association）和解離作用（dissociation）同時進行，訊號線則呈現兩者的淨反應。

4.1.2 α -glucosidase 固定於 CM5 晶片的最佳化

將 α -glucosidase 溶於不同 pH 值的醋酸鈉緩衝液中獲得的結果如圖 4.2。

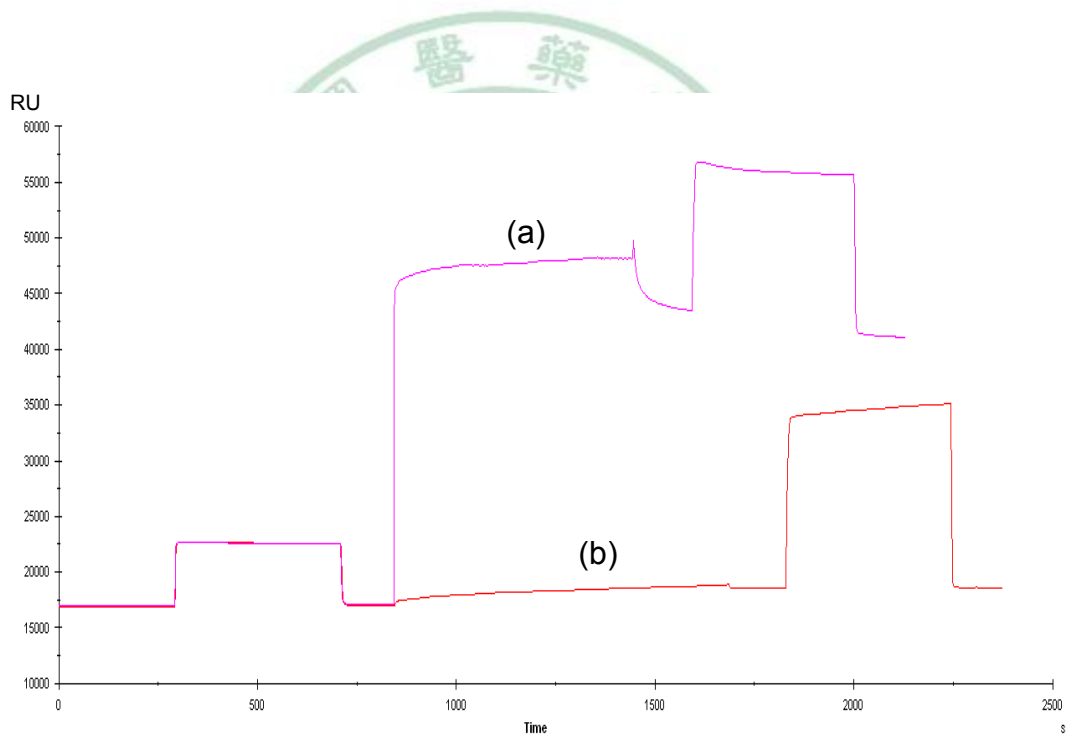


圖4.2 α -glucosidase溶於不同pH值的醋酸鈉緩衝液之表面電漿共振訊號圖 (SPR sensorgram) (a) 注射30 μ L、pH 4.0溶液；(b) 注射40 μ L、pH 7.0溶液。

不同 pH 值的緩衝液會影響 α -glucosidase 固定在晶片上的效率（圖 4.2）。若使用 pH 7.0 醋酸鈉緩衝液，即使注射量為 40 μ L， α -glucosidase 固定在晶片上的效率仍然很差（ < 1000 RU，NaOH 沖洗前；圖 4.2 (b)）。當使用 pH 4.0 醋酸鈉緩衝液時，注射量雖為 30 μ L， α -glucosidase 固定在晶片上的效能很高（ ≈ 28000 RU，

NaOH 沖洗前；圖 4.2 (a))；由此可知 α -glucosidase 固定於 CM5 晶片最佳化的 pH 值為 4.0。

4.1.3 α -glucosidase 固定化標準程序

在醋酸鈉緩衝液 pH 4.0 實驗條件下， α -glucosidase 固定量大約 12000 RU (圖 4.3)。

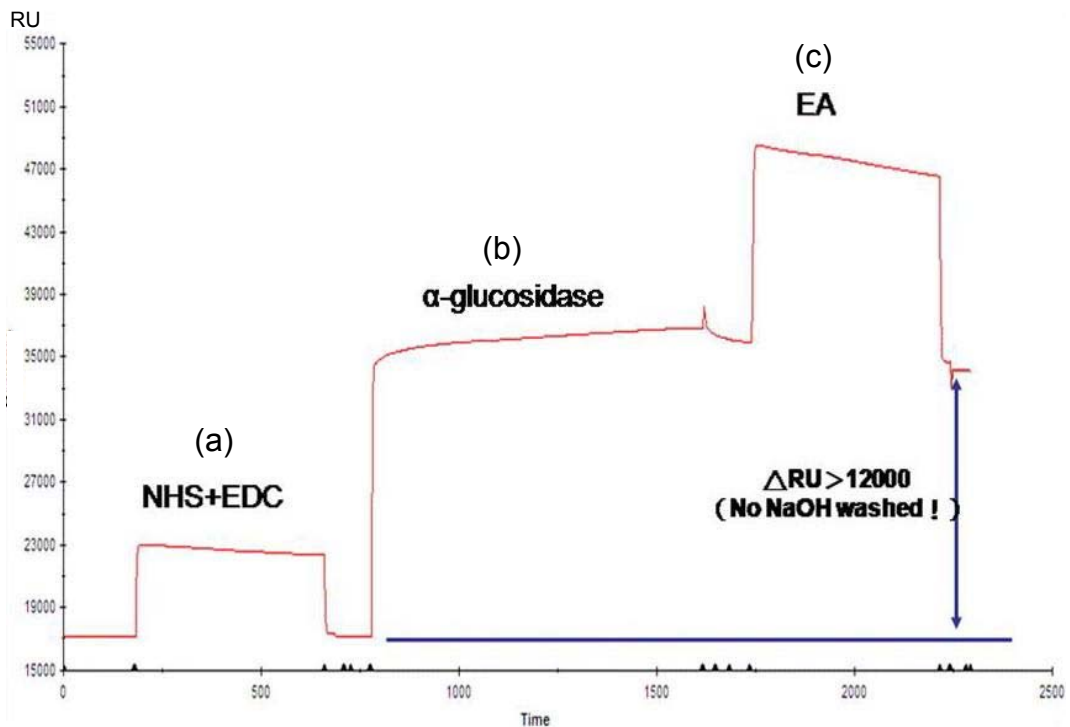


圖 4.3 α -glucosidase 醋酸鈉溶液 (pH 4.0) 的表面電漿共振訊號圖 (SPR sensorgram)， α -glucosidase 在 CM5 晶片上的固定量大約 12000 RU。

從之前實驗結果 (4.1.2 節) 可知 α -glucosidase 固定於 CM5 晶片最佳化的 pH 值為 4.0，因此在醋酸鈉緩衝液 pH 4.0 實驗條件下，先利用 EDC/ NHS 的混合液活化 CM5 晶片表面上葡萄聚糖 (dextran) 的羧基 (圖 4.3 (a))；然後將配置好的 α -glucosidase 溶液在 CM5 晶片表面上流動，使 α -glucosidase 能固定在 CM5 晶片上 (圖 4.3 (b))；最後注入 EA，將未與 α -glucosidase 作用之葡萄聚糖 (dextran) 上的活化羧基去活化 (圖 4.3 (c))。從表面電漿

共振訊號圖 (SPR sensorgram) 知道 α -glucosidase 在 CM5 晶片上的固定量大約 12000 RU。

4.2 EGCG 與 α -glucosidase-CM5 晶片結合的結果與阻斷比之定義

4.2.1 EGCG 與 α -glucosidase-CM5 晶片結合的結果

單一濃度的 EGCG 溶液重覆測試 (圖 4.4) 和五種不同濃度的 EGCG 溶液測試 (圖 4.5)。

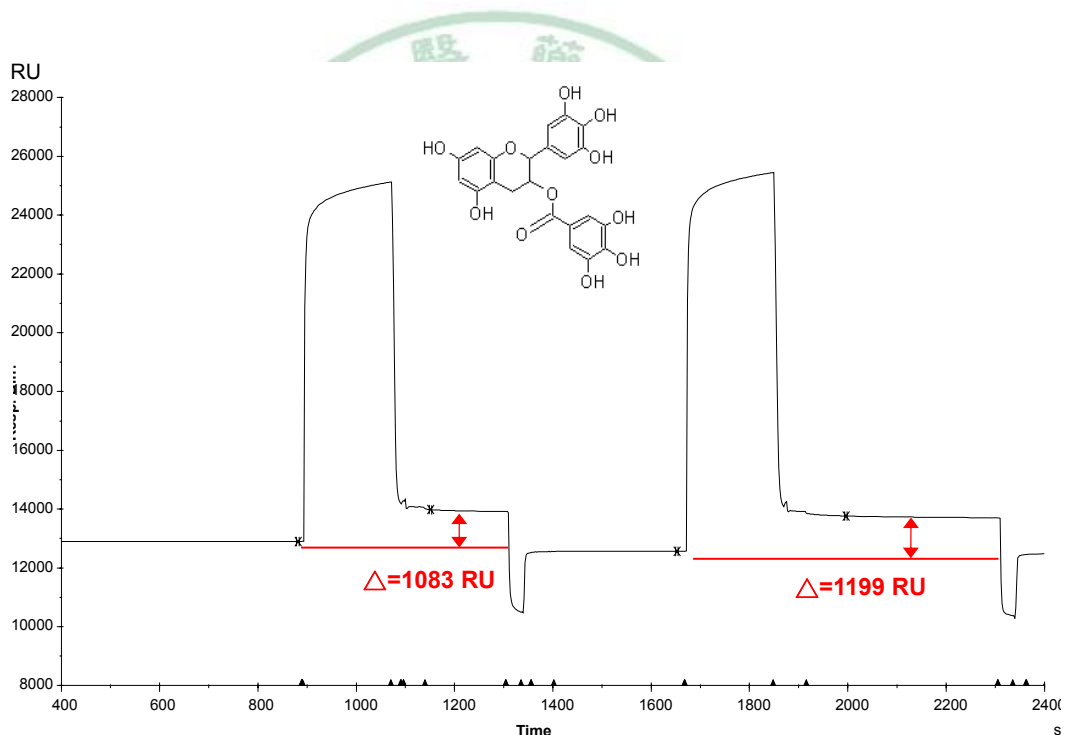


圖4.4 Ligand (EGCG) 試驗。EGCG與 α -glucosidase-CM5晶片效果佳，其結合量 (Δ RU) 約1000~1200 RU。

單一濃度的 EGCG 溶液重覆測試 (圖 4.4) 中發現：表面電漿共振訊號圖 (SPR sensorgram) 上呈現的訊號曲線再現性高，EGCG 和 α -glucosidase 結合量約在 1100 RU 左右 (α -glucosidase 和 EGCG 結合比例約為 1 : 14)；顯示出 EGCG 具有重覆性、訊號放大作用的特性及對 α -glucosidase 具有競爭性抑制的能力，均符合當一個 ligand (或 inhibitor) 所應具備的條件。

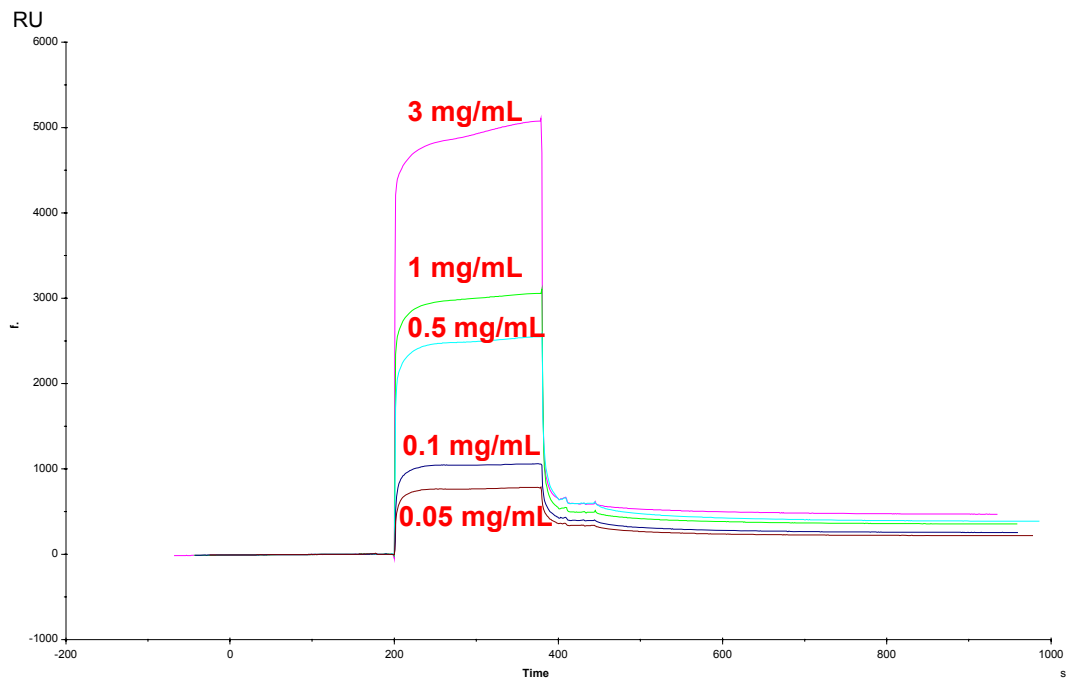


圖4.5 EGCG鍵結親和力 (EGCG binding affinity) 測量。使用 BiaEvolution software計算動能值 (Ka) 為 4.15×10^4 (1/M)。

用五種不同濃度 (3, 1, 0.5, 0.1 及 0.05 mg/ mL) 的 EGCG 溶液來觀察 EGCG 和 α -glucosidase 的親和力 (affinity) (圖 4.5)。使用 BiaEvolution software 計算其動能值 (Kinetic value ; Ka) 為 4.15×10^4 (1/M)。

4.2.2 EGCG 與 α -glucosidase-CM5 晶片結合的阻斷比之定義

為了知道生藥的有效成分阻斷 EGCG 的能力，本實驗設計一個公式來幫助了解（圖 4.6）：

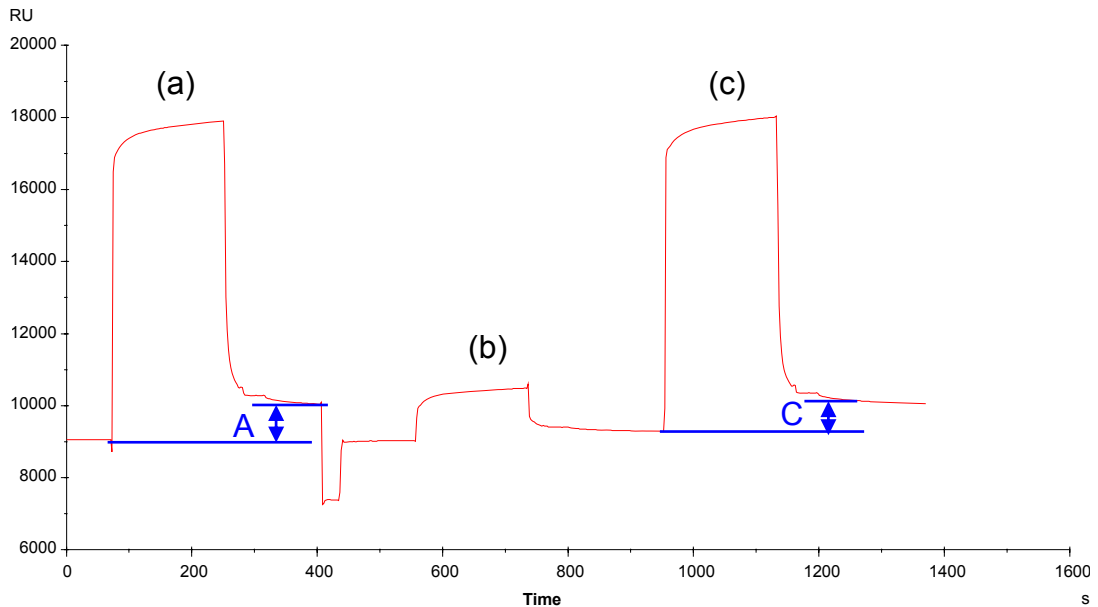


圖 4.6 生藥萃取物阻斷 EGCG 和 α -glucosidase-CM5 晶片結合作用的表面電漿共振訊號圖（SPR sensorgram）。其阻斷比公式之定義為 $[(A - C) \div A] \times 100\%$ 。

圖 4.6 (a) 訊號線表示在未和生藥萃取物樣品作用前， α -glucosidase-CM5 晶片和 EGCG 的結合量為 A；接著圖 4.6 (b) 的訊號線表示 α -glucosidase-CM5 晶片和生藥萃取物樣品結合；最後，圖 4.6 (c) 訊號線表示已和生藥萃取物樣品作用後， α -glucosidase-CM5 晶片和 EGCG 的結合量為 C。本實驗定義 EGCG 的阻斷比公式：

$$\text{EGCG blocking ratio} = [(A - C) \div A] \times 100\%。$$

4.3 α -glucosidase-CM5 晶片的穩定度測試結果

EGCG 在 α -glucosidase-CM5 晶片的接受器 (α -glucosidase) 上重覆多次結合、洗除後，其表面電漿共振訊號圖 (SPR sensorgram) 如圖 4.7。

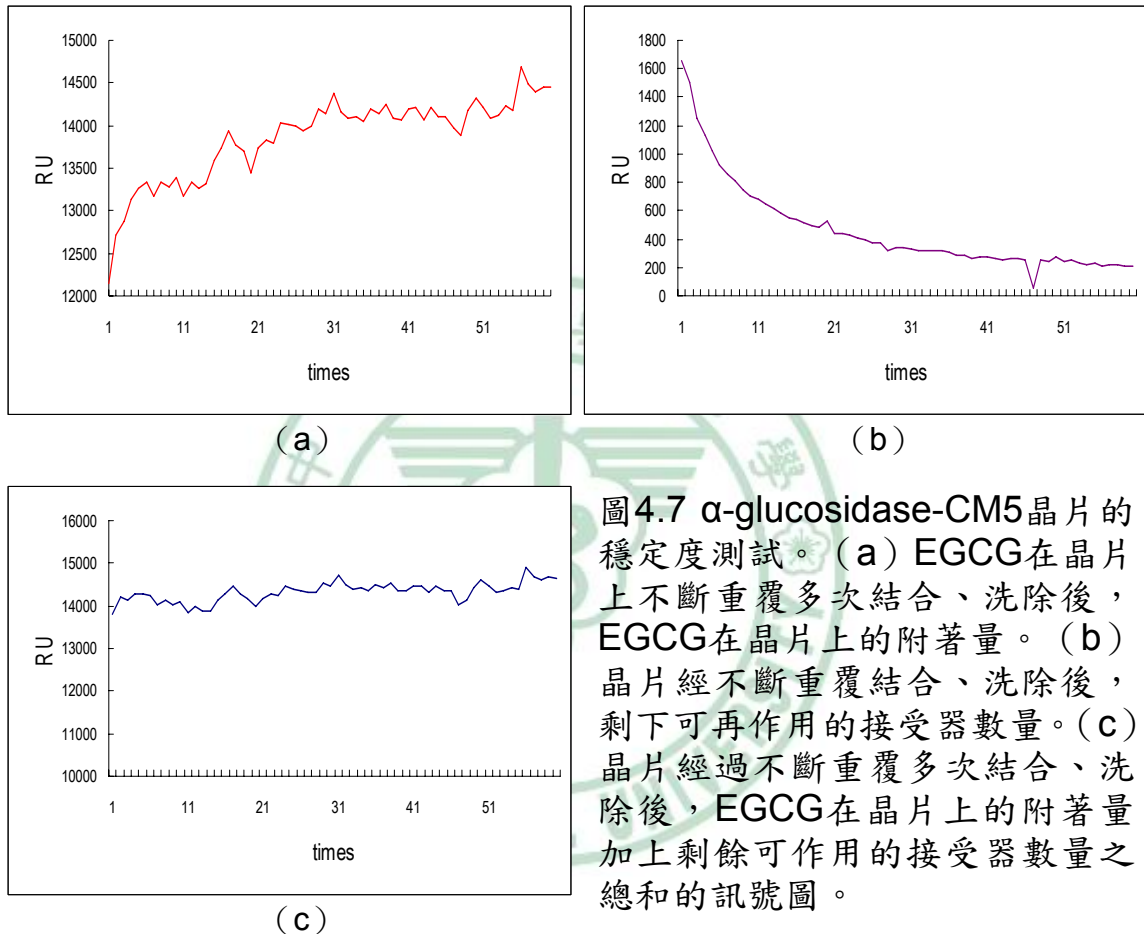


圖4.7 α -glucosidase-CM5晶片的穩定度測試。(a) EGCG在晶片上不斷重覆多次結合、洗除後，EGCG在晶片上的附著量。(b) 晶片經不斷重覆結合、洗除後，剩下可再作用的接受器數量。(c) 晶片經過不斷重覆多次結合、洗除後，EGCG在晶片上的附著量加上剩餘可作用的接受器數量之總和的訊號圖。

當 α -glucosidase 已固定在晶片(以下簡稱 α -glucosidase-CM5 晶片)後，晶片上 α -glucosidase 的活性與穩定度是本實驗考量的重點，因為這關係著 AFTIR 工作平台是否可重覆操作用來篩選生藥的有效成分。圖 4.7 (a) 曲線呈鋸齒狀向上，表示在 CM5 晶片上生藥萃取物樣品的混合物被洗除不夠徹底，亦即晶片上的接受器 (α -glucosidase) 被樣品的混合物佔用，將會使晶片的使用效率愈來愈低。圖 4.7 (b) 曲線呈鋸齒狀向下，表示 CM5 晶片上被佔用的接受器愈來愈多，可使用的接受器將愈來愈少。將圖 4.7 (a) 和

(b) 的曲線相加即是圖 4.7 (c) 的曲線；圖 4.7 (c) 曲線呈現鋸齒狀水平 (標準偏差為 $\pm 1.56\%$)，顯示晶片上的接受器活性正常，亦即穩定度高，代表此 AFTIR 工作平台可重覆操作來篩選生藥的有效成分。若呈現不水平曲線，表示晶片上的 α -glucosidase 失去活性。

4.4 以 α -glucosidase-CM5 晶片篩選樣品之結果，並與抑制酵素活性分析的結果進行比較

黃水茄、仙鶴草、乾薑、石斛、益母草等科學中藥及綠茶葉與 α -glucosidase-CM5 晶片作用結果如圖 4.8~圖 4.13 和表 4.1；以及酵素活性分析試驗結果如圖 4.14 和表 4.1：

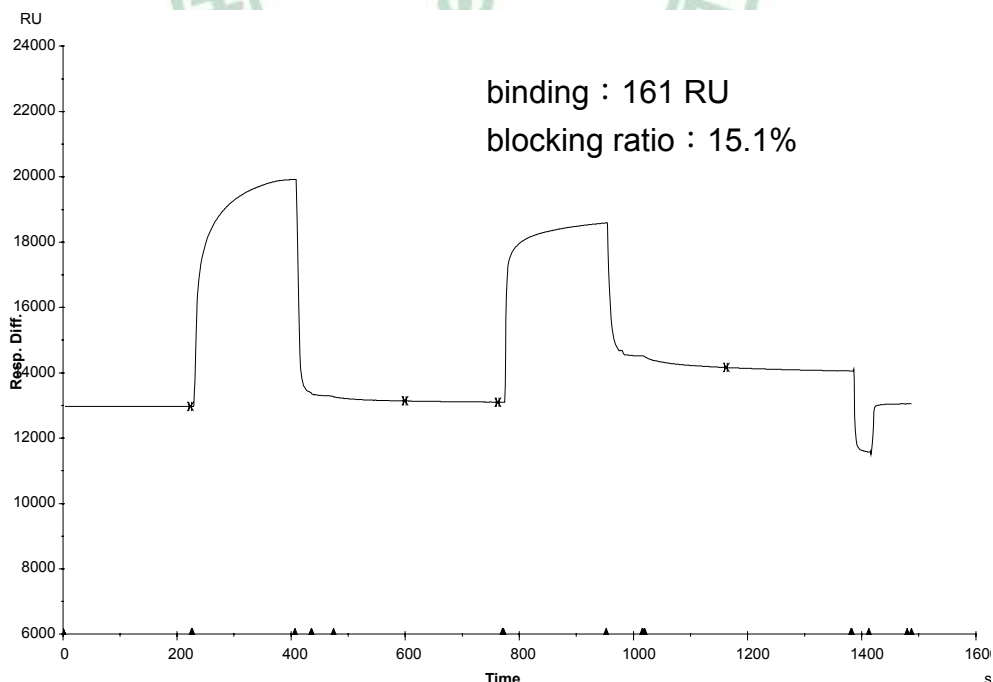


圖 4.8 黃水茄與 α -glucosidase-CM5 晶片作用的表面電漿共振訊號圖。

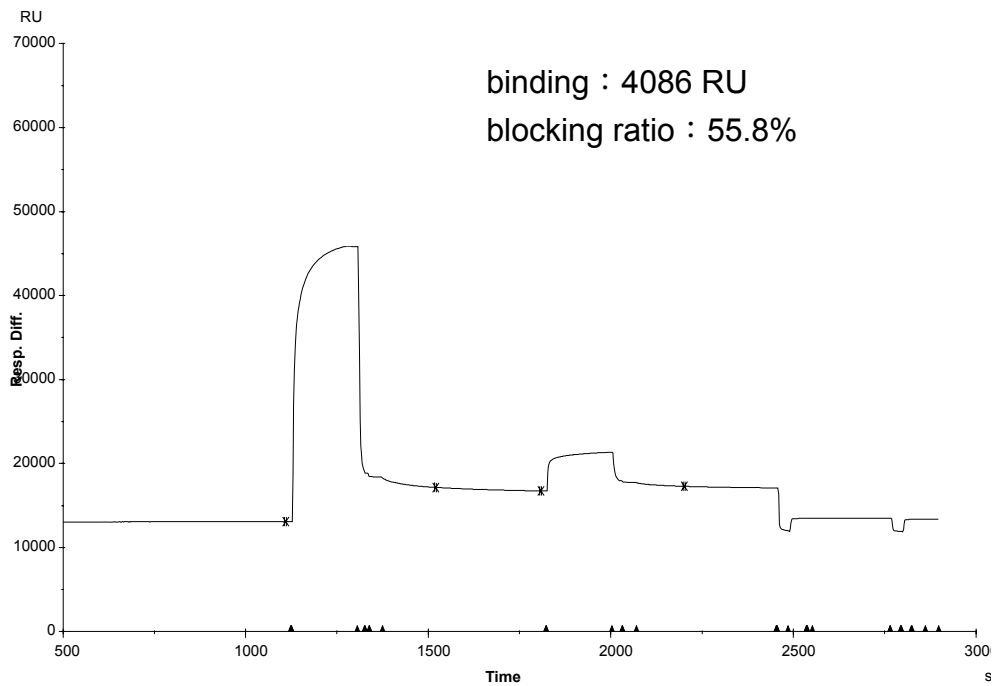


圖 4.9 仙鶴草與 α -glucosidase-CM5 晶片作用的表面電漿共振訊號圖。

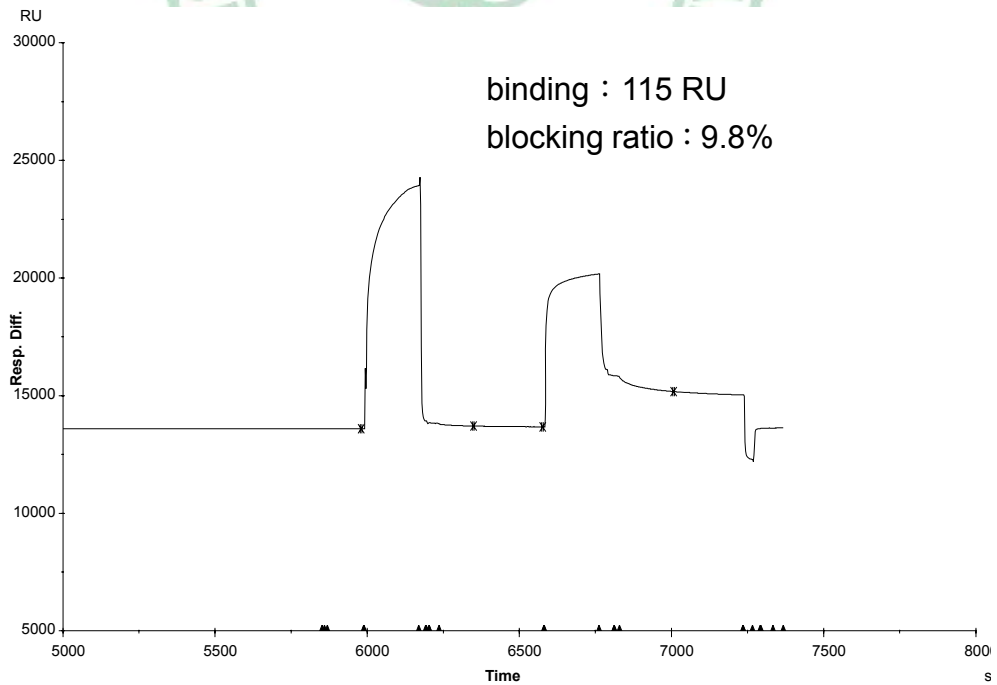


圖 4.10 乾薑與 α -glucosidase-CM5 晶片作用的表面電漿共振訊號圖。

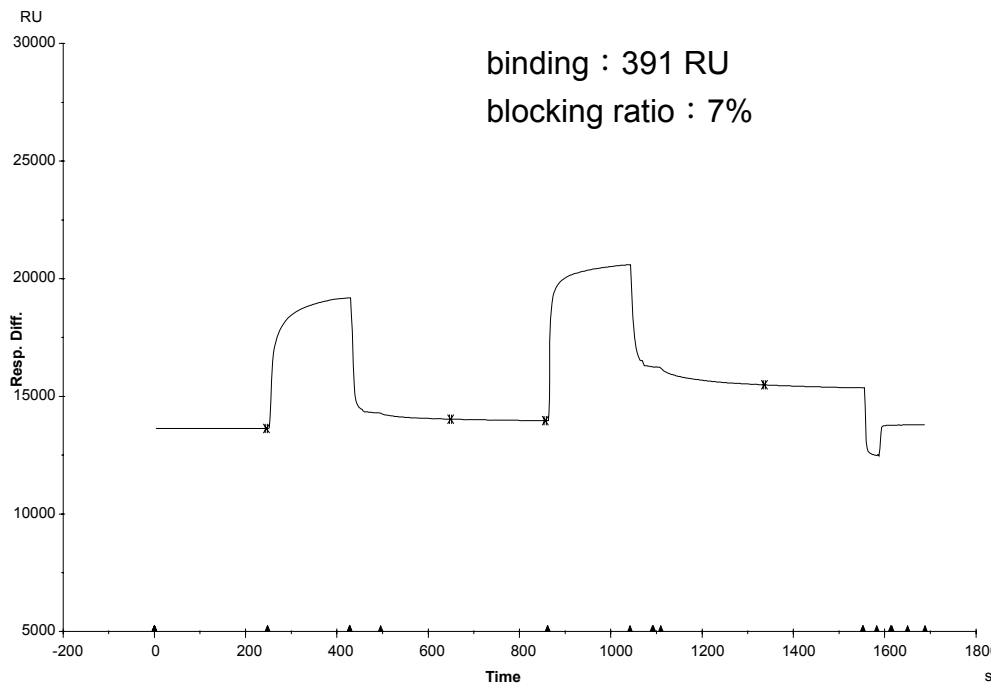


圖4.11 石斛與 α -glucosidase-CM5晶片作用的表面電漿共振訊號圖。

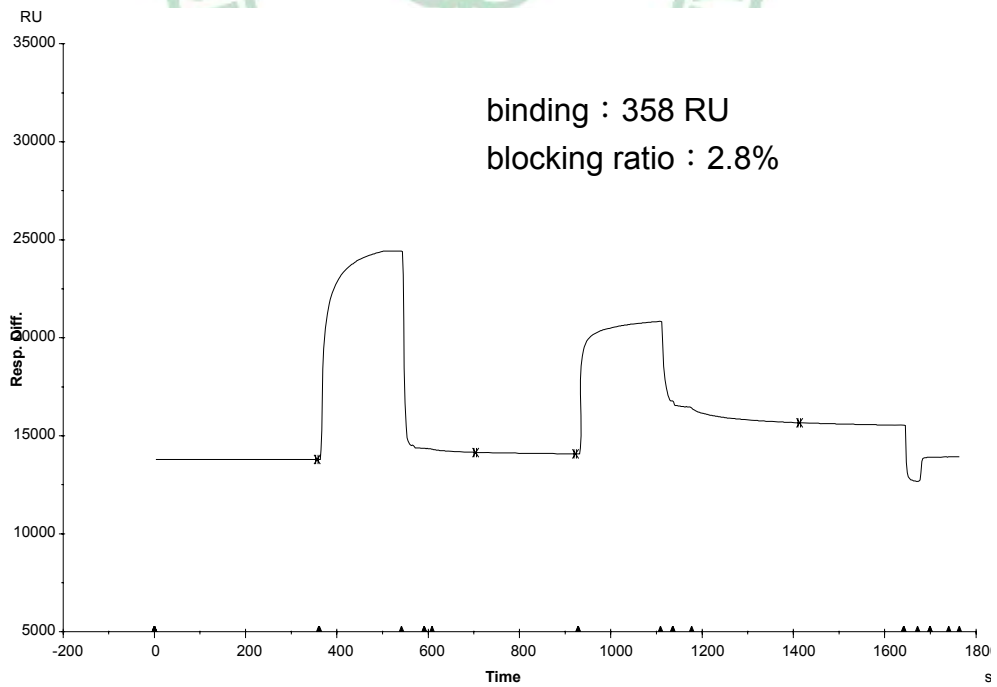


圖 4.12 益母草與 α -glucosidase-CM5 晶片作用的表面電漿共振訊號圖。

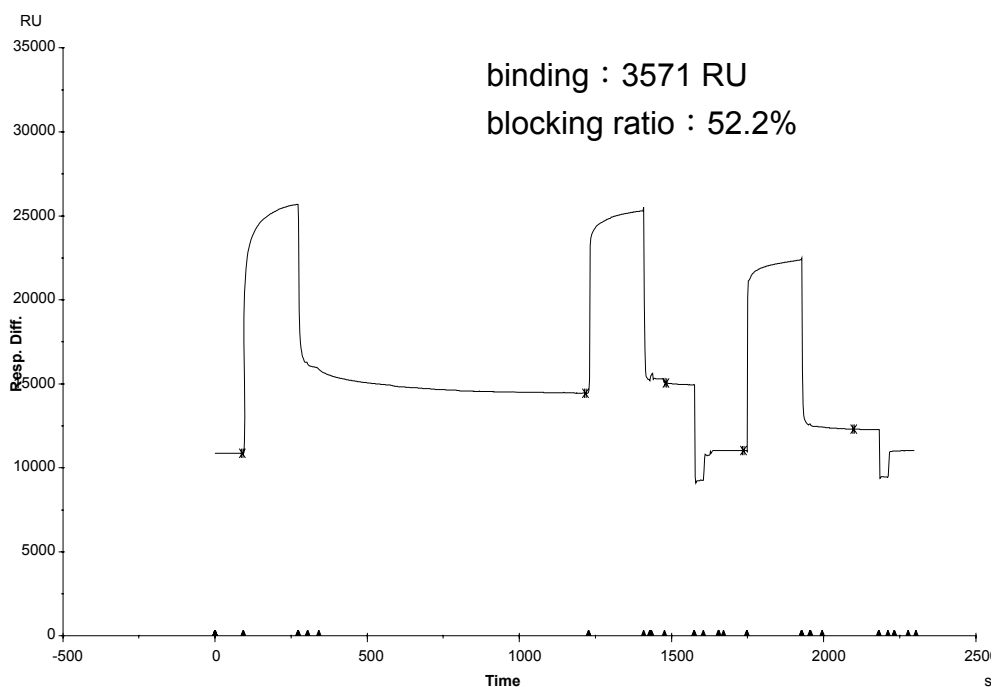


圖4.13 綠茶葉 (10 mg/ mL) 與 α -glucosidase-CM5晶片作用的表面電漿共振訊號圖。

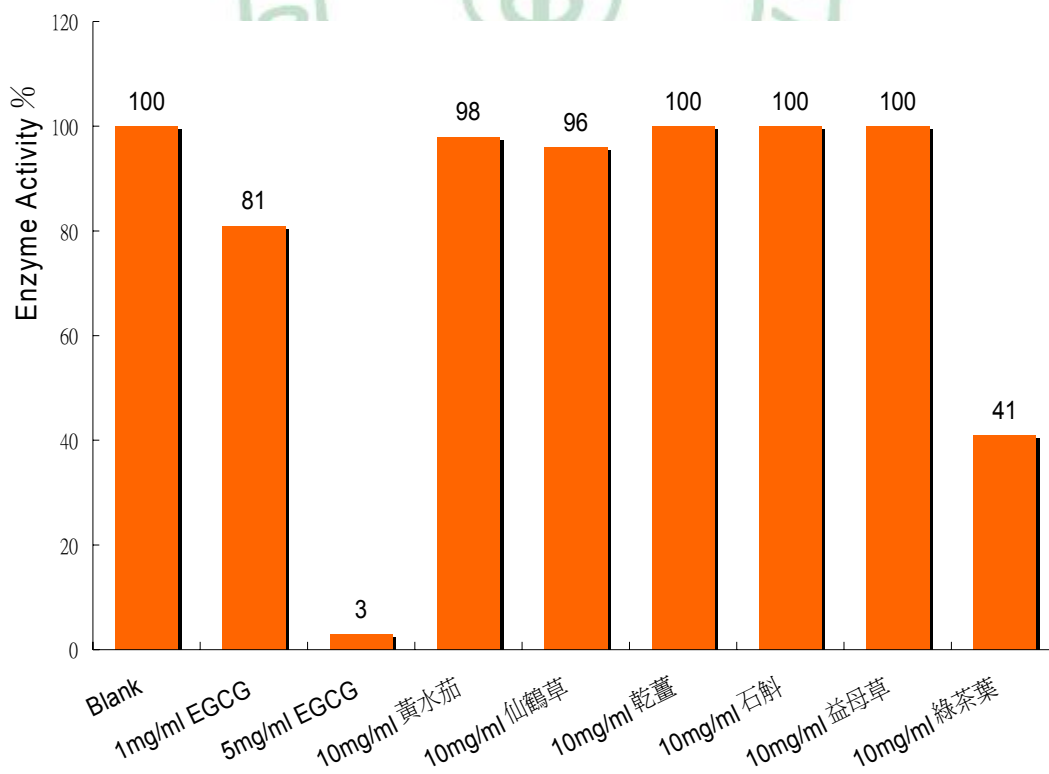


圖4.14 黃水茄、仙鶴草、乾薑、石斛、益母草及綠茶葉的酵素活性分析試驗

表 4.1 用 α -glucosidase-CM5 晶片篩選黃水茄、乾薑、石斛、仙鶴草、益母草及綠茶葉之結合量 (RU)、EGCG 阻斷比 (%), 以及抑制酵素活性百分比 (%) 的結果。

藥材名稱	樣品結合量 (RU)	EGCG 阻斷比 (%)	抑制酵素活性百分比 (%)
黃水茄	161	15.1%	2%
仙鶴草	4086	55.8%	4%
乾薑	115	9.8%	0%
石斛	391	7.0%	0%
益母草	358	2.8%	0%
綠茶葉	3571	52.2%	59%

由表 4.1、圖 4.8~圖 4.13 及圖 4.14 顯示用 α -glucosidase-CM5 晶片篩選黃水茄、仙鶴草、乾薑、石斛、益母草等科學中藥及綠茶葉之結合量、EGCG 阻斷比，以及抑制酵素活性百分比的結果：在五種科學中藥及綠茶葉中知道 EGCG 阻斷比除了仙鶴草 (55.8%)、綠茶葉 (52.2%) 較明顯外，其餘的科學中藥 EGCG 阻斷比效果並不好。在抑制酵素活性項目中，只有綠茶葉有較佳的抑制作用。

圖 4.15 顯示仙鶴草的水萃取液及甲醇萃取液的酵素活性分析試驗發現：用甲醇或水來萃取仙鶴草，其抑制酵素活性的結果相差不大。本實驗決定用甲醇萃取生藥樣品，原因如下：第一，甲醇具有與水接近的極性和較佳的細胞滲透性，因此可從生藥中萃取出比水萃物更多種類的不同成分。第二，由於 CM5 晶片特性容易與醣類產生非特異性吸附，因此採取甲醇萃取出亦可減少醣類的萃取。第三，由於生藥內的蛋白質成分也容易與固定在晶片上的蛋白質酵素產生非特異性鍵結，採用甲醇作為萃取溶液將可避免萃取出生藥內蛋白質的成分。在萃取過程中，先將甲醇萃取液集中後過濾去除殘

渣，以減壓濃縮方式將萃取液之甲醇溶劑抽乾；再用水回溶抽乾萃
取物，以抽氣過濾去除不溶物後，再將濾液減壓濃縮，如此就無甲
醇殘餘生藥樣品的問題。

另一方面，在酵素活性分析試驗中 Blank 當對照組，EGCG 當
控制組；就 EGCG 而言，其濃度愈高，抑制 α -glucosidase 效果愈
好；當濃度在 5 mg/ mL 時，其抑制酵素活性百分比已達到 97%。

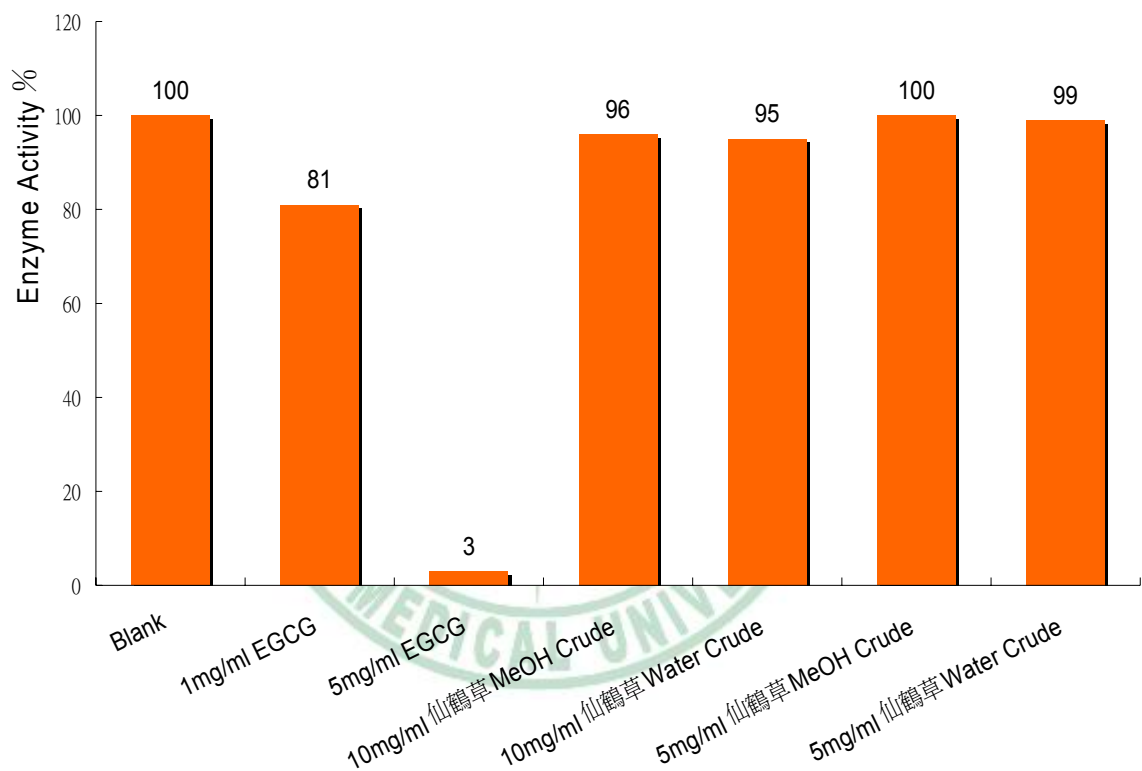


圖4.15 仙鶴草的水萃取液及甲醇萃取液的酵素活性分析試驗

4.5 以 α -glucosidase-CM5 晶片回收樣品後之標定結果

仙鶴草萃取物的 HPLC 圖譜(圖 4.16)及綠茶葉萃取物的 HPLC 圖譜(圖 4.17)：

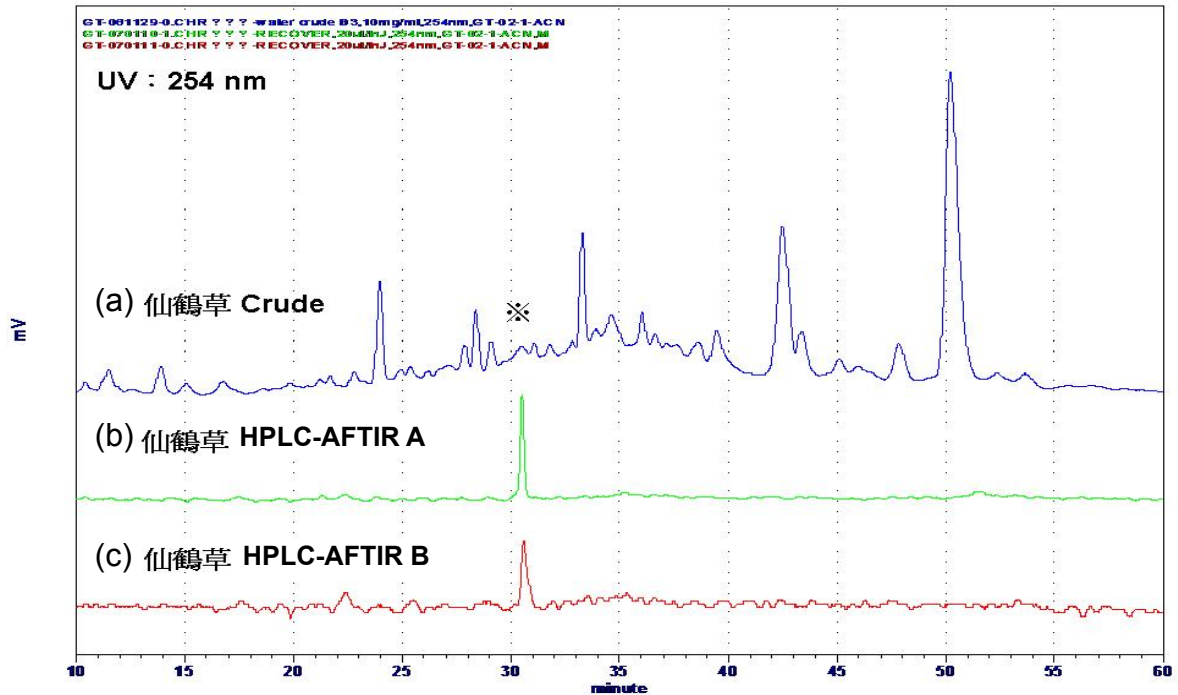


圖 4.16 仙鶴草萃取物的 HPLC 指紋圖譜和回收樣品的標定 (UV : 254 nm)

通常想要知道待測物(如科學中藥或者是中草藥)含有那些成分時,首先要先建立高效能液相層析儀(HPLC)指紋圖譜,然後再從中標定我們想要的有效成分。

圖 4.16 (a) 為建立仙鶴草萃取物的 HPLC 指紋圖譜;圖 4.16 (b)、(c) 為仙鶴草經由 Biacore 3000 儀器回收樣品的功能將仙鶴草的有效成分收集後,再做高效能液相層析儀(HPLC)分析。由圖 4.16 (b)、(c) 訊號曲線和 (a) 的 HPLC 指紋圖譜進行比對,可看出有效成分(用※標明)在仙鶴草萃取物中含量並不多。此外,從圖 4.16 (b)、(c) 訊號曲線可知,經由 AFTIR 平台篩選出來的有效成分,其再現性高。

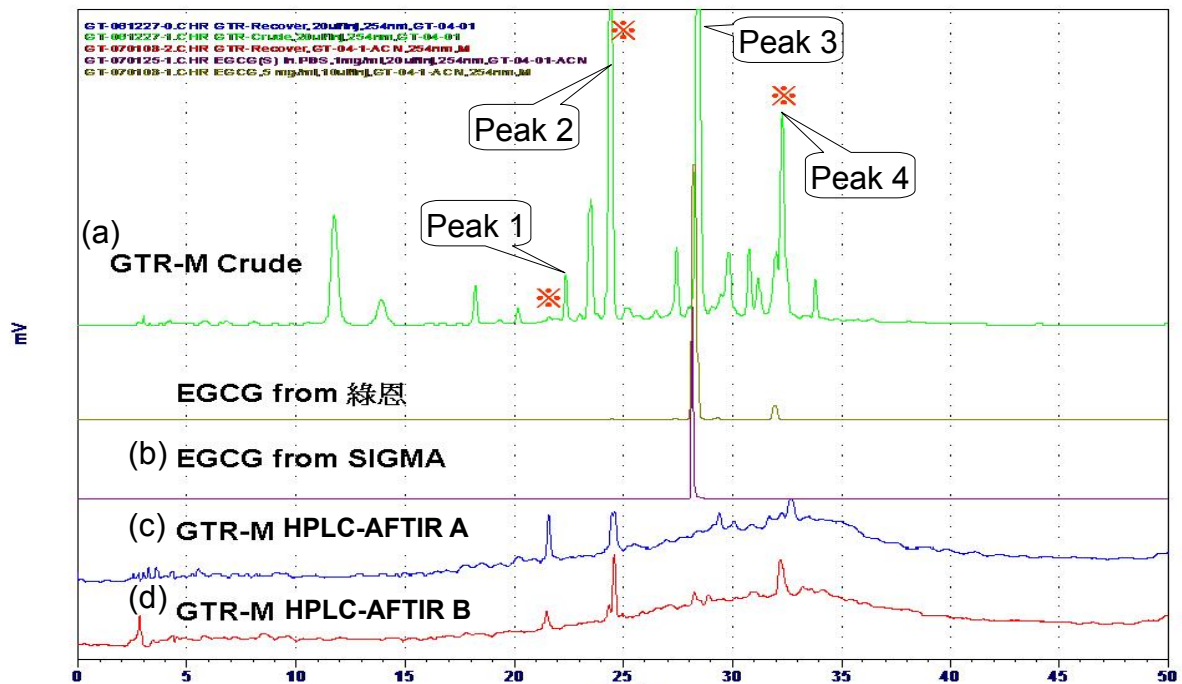


圖 4.17 綠茶葉 (GTR-M) 萃取物的 HPLC 指紋圖譜和回收樣品的標定 (UV: 254 nm); EGCG (from SIGMA) 濃度為 1 mg/mL。

接著，本實驗篩選綠茶葉的有效成分：首先，先建立綠茶葉萃取物的 HPLC 指紋圖譜 (圖 4.17 (a))，然後將綠茶葉的回收樣品 (圖 4.17 (c)、(d)) 及 EGCG (濃度 1 mg/mL，來源為 SIGMA 公司) 純物質 (圖 4.17 (b)) 進行 HPLC 分析。經由 HPLC 指紋圖譜比對，發現有四個尖峰訊號 (peak)，在此分別命名 Peak 1 ~ Peak 4；Peak 3 經由 HPLC 和其他標準品純物質初步比對後，推測可能為 EGCG (圖 4.17 (b))，但仍需進一步純化後進行化合物之光譜結構解析才能確認。因此，後續便將其純化並進行光譜解析。

4.6 綠茶葉純化標定化合物之結構解析

4.6.1 綠茶葉萃取物 Peak 2 之結構解析

經 HPLC 純化後之 Peak 2 化合物經冷凍乾燥後為白色粉末，經 500 MHz 之 ^1H NMR 光譜測定後得到之光譜圖（圖 4.18），由光譜顯示該化合物具有三組 $\text{CH}_3\text{-N=}$ 官能基（ δppm 3.27, s, 3H； δppm 3.45, s, 3H； δppm 3.89, s, 3H）與一組 purine 環上之 CH （ δppm 7.60, s, 1H），為典型 caffeine 的圖譜，經與標準品圖譜比對後，證明 Peak 2 化合物為 caffeine（化學結構見圖 4.18 右上角）。

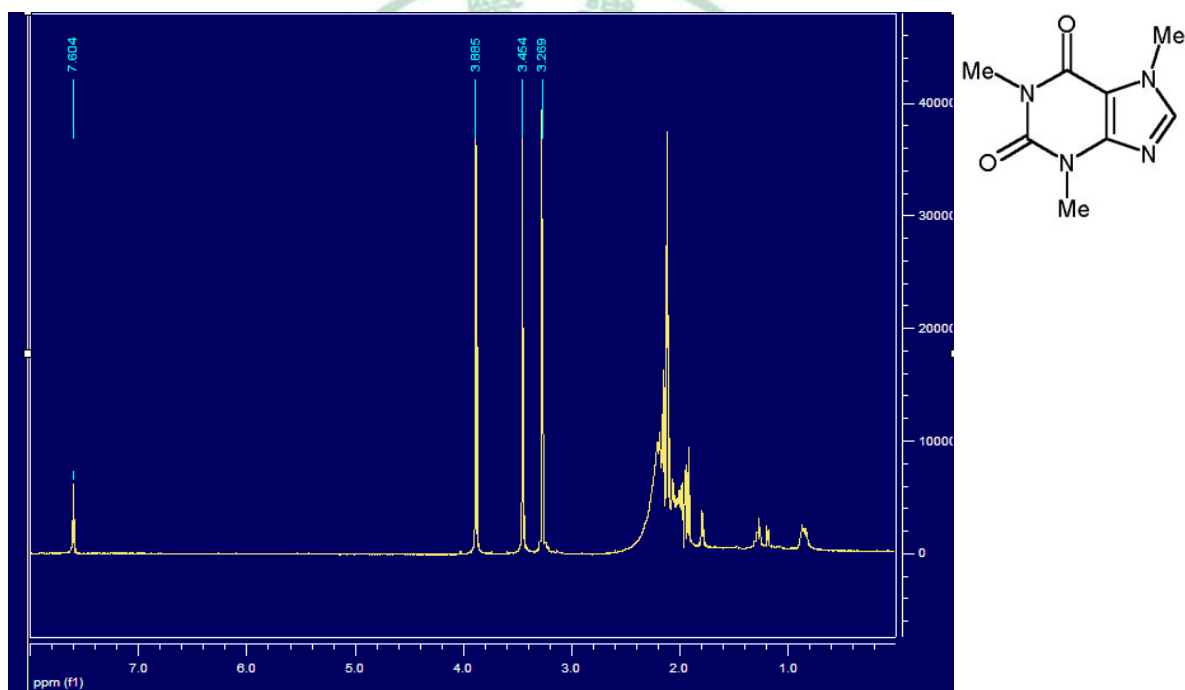


圖 4.18 Peak 2 (caffeine) 的 ^1H NMR 光譜及其化學結構（右上角）。

4.6.2 綠茶葉萃取物 Peak 3 之結構解析

經 HPLC 純化後之 Peak 3 化合物經冷凍乾燥後為白色粉末，經 500 MHz 之 ^1H NMR 光譜測定後得到之光譜圖（圖 4.19），由光譜顯示該化合物具有兩組苯環上的對稱間位氫原子（ δppm 6.90 (s, 2H), 6.49 (s, 2H)) 與一組苯環上的不對稱間位氫原子（ δppm 5.97 (d, $J = 15.72$ Hz, 2H)），還具有兩組 $-\text{CH}-\text{O}$ 官能基（5.53-5.42 (m, 1H), 4.99 (s, 1H)），另外也具有 $-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{O}$ 官能基（3.01-2.88 (m, 1H), 2.86-2.72 (m, 1H)），經與標準品圖譜比對後，證明 Peak 3 化合物為 epigallocatechin gallate (EGCG)（化學結構見圖 4.19 右上角）。

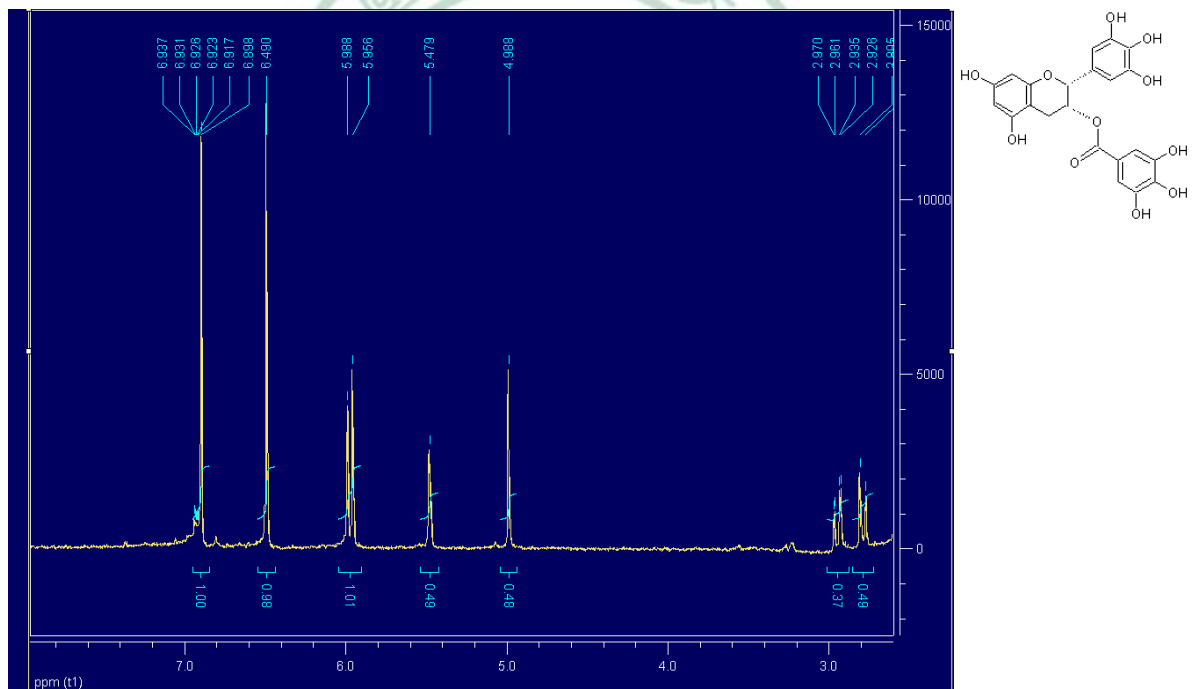


圖 4.19 Peak 3 (EGCG) 的 ^1H NMR 光譜及其化學結構（右上角）。

4.6.3 綠茶葉萃取物 Peak 4 之結構解析

經 HPLC 純化後之 Peak 4 化合物經冷凍乾燥後為白色粉末，經 500MHz 之 ^1H NMR 光譜測定後得到之光譜圖（圖 4.20），由光譜顯示的資料我們發現 Peak 4 具有與 Peak 3（EGCG）類似的骨架結構，例如 Peak 4 同樣具有 $-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{O}$ 官能基（ δppm 3.04-2.72（m, 2H）），兩組 $-\text{CH}-\text{O}$ 官能基（ δppm 5.06（s, 1H），5.54-5.42（m, 1H））；與 Peak 3（EGCG）不同點則在於其苯環上的氫原子排列方式（ δppm 5.97（dd, $J = 16.49, 2.11$ Hz, 1H），6.96-6.86（m, 1H），6.86-6.78（m, 1H），6.75（s, 1H）），推測其苯環上少了一組 $-\text{OH}$ 官能基而由氫原子取代，因此推測 Peak 4 應為 EGCG 家族中的 epicatechin gallate（ECG），經與標準品圖譜比對後，證明 Peak 4 化合物確實為 epicatechin gallate（ECG）（化學結構見圖 4.20）。

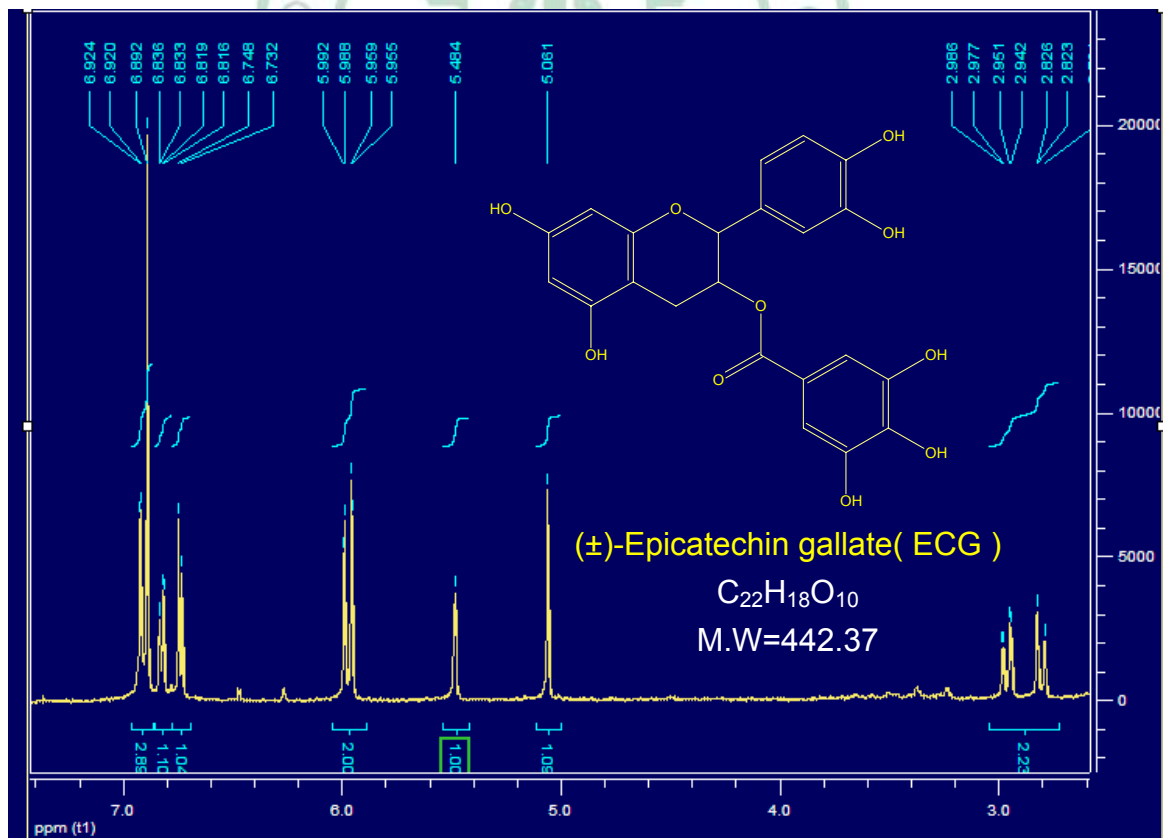


圖 4.20 Peak 4 的 ^1H NMR 光譜，並確認化合物為 ECG。

4.7 純化標定化合物之抑制 α -glucosidase 活性分析的結果

經由 Biacore 3000 儀器回收樣品的標定化合物，仍需做抑制 α -glucosidase 的活性分析。純化的標定化合物 Peak 2 (caffeine)、Peak 3 (EGCG)、Peak 4 (ECG) 用不同濃度做抑制 α -glucosidase 活性分析試驗 (圖 4.21)。由圖 4.21 可知：Peak 2 (caffeine) 並無抑制 α -glucosidase 活性的能力；Peak 3 (EGCG) 用 10 mg/mL 就可完全抑制 α -glucosidase 的活性 (抑制酵素活性百分比接近 100%)；而 Peak 4 (ECG) 抑制 α -glucosidase 活性的能力在此並未顯現出來。

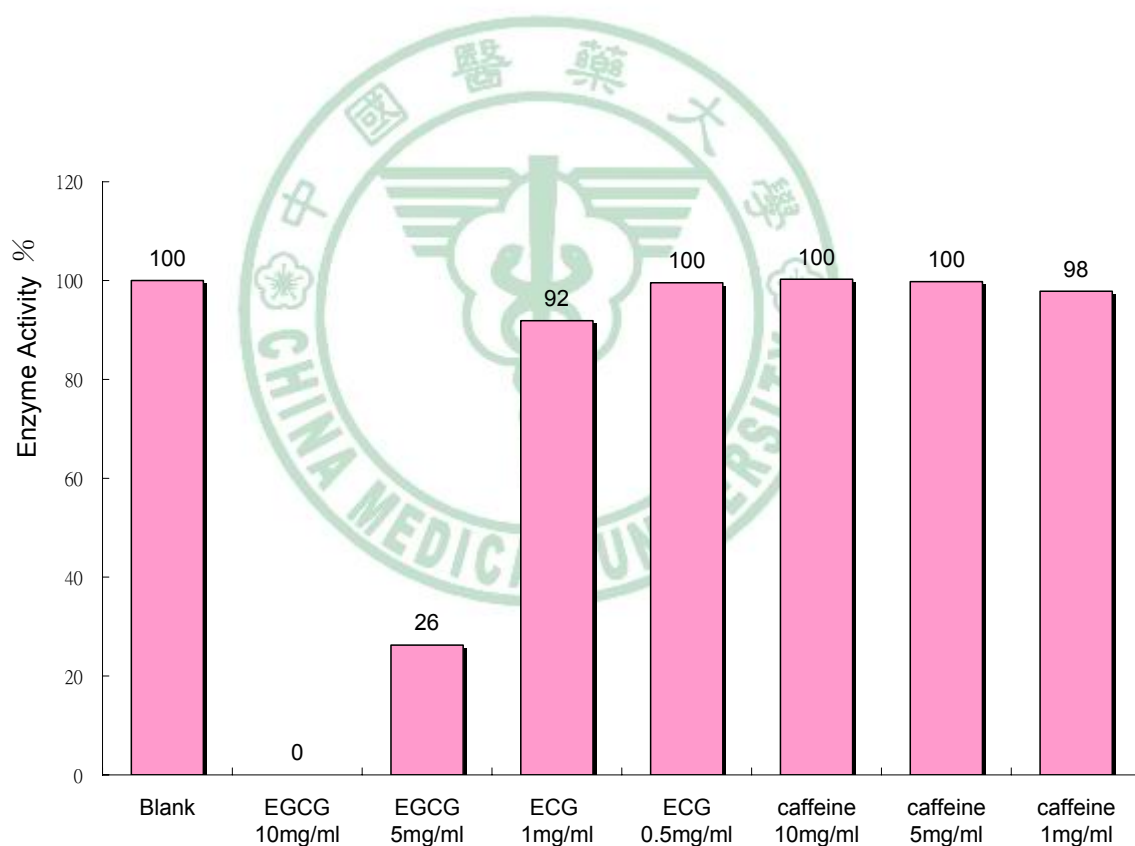


圖 4.21 標定的 EGCG、ECG 及 caffeine 經純化後，用不同濃度做酵素活性分析試驗。

接著，繼續用不同濃度(10, 5, 1 mg/ mL)的 Peak 3(EGCG)、Peak 4(EGC)來做抑制 α -glucosidase 活性分析試驗(圖 4.22)，從圖 4.22 已可看出：Peak 4(EGC)和 Peak 3(EGCG)互相比較，Peak 4(EGC)的抑制 α -glucosidase 活性的能力比 Peak 3(EGCG)稍差；但 Peak 4(EGC)在 10 mg/ mL 的濃度時，其抑制酵素活性百分比也達到 88%。

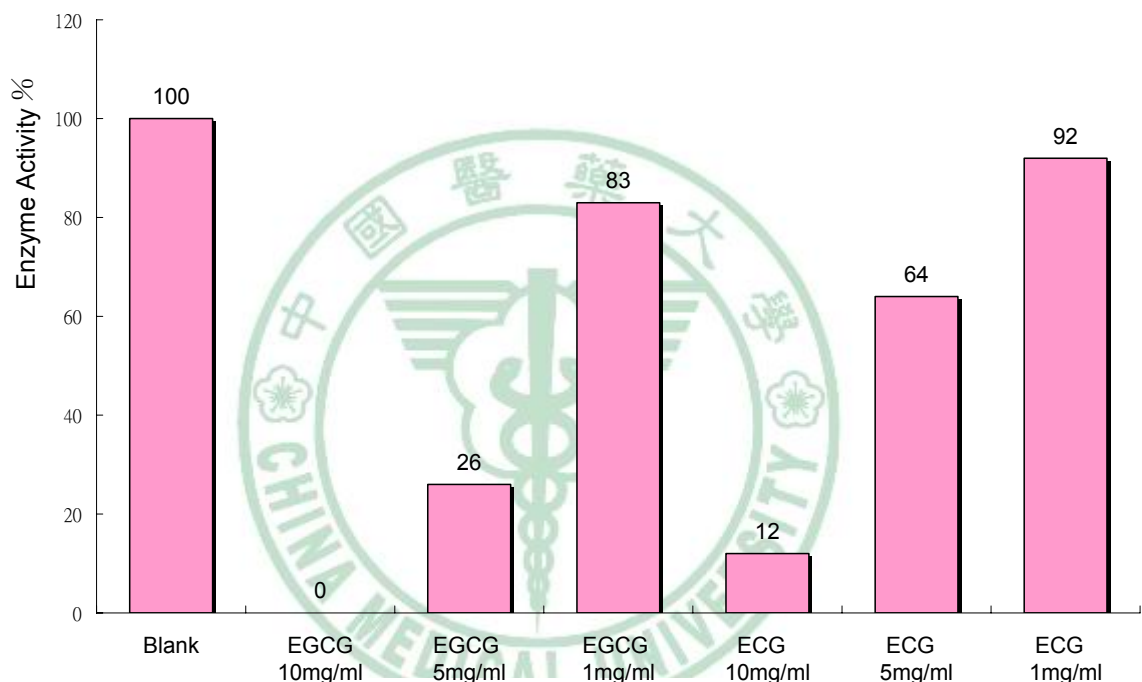


圖 4.22 標定的 EGCG、ECG 經純化後，用不同濃度做酵素活性分析試驗。

4.8 以 α -glucosidase-CM5 晶片篩選九種中草藥及 acarbose 之結果，並與抑制酵素活性分析的結果進行比較

九種中草藥及 acarbose 與 α -glucosidase-CM5 晶片作用結果如圖 4.23~圖 4.32 和表 4.2；以及酵素活性分析試驗結果如圖 4.33 和表 4.2：

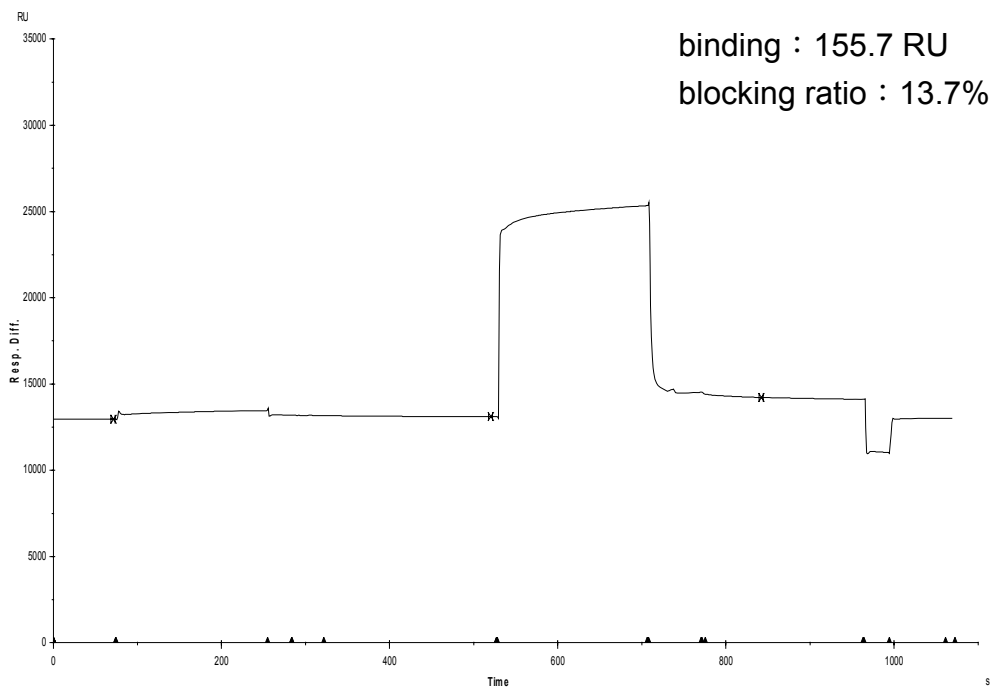


圖 4.23 白龍船與 α -glucosidase-CM5 晶片作用的表面電漿共振訊號圖。

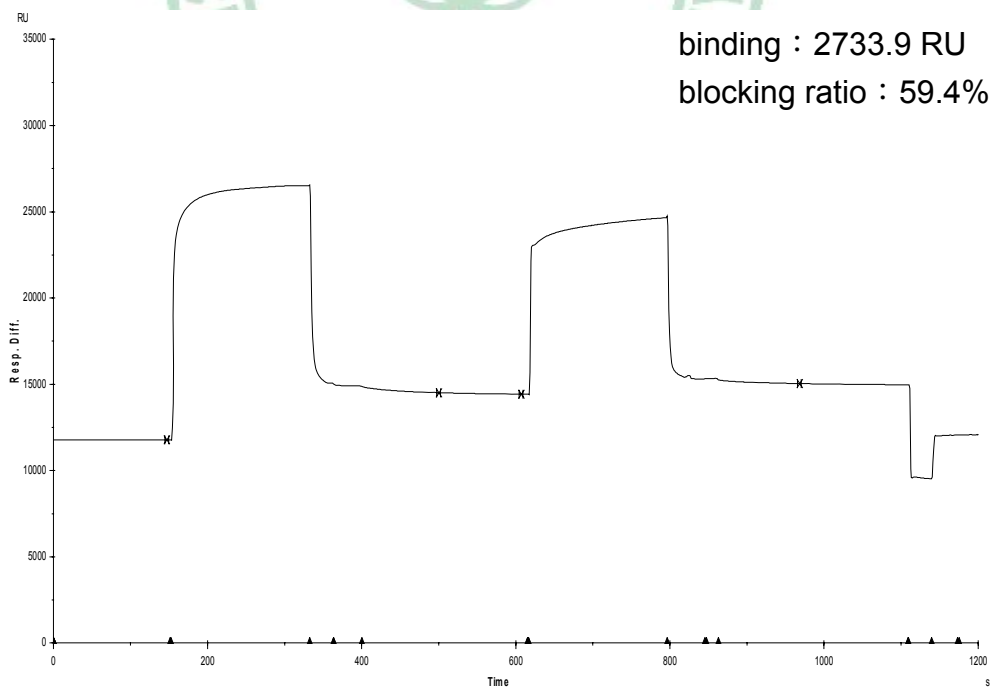


圖 4.24 白石榴與 α -glucosidase-CM5 晶片作用的表面電漿共振訊號圖。

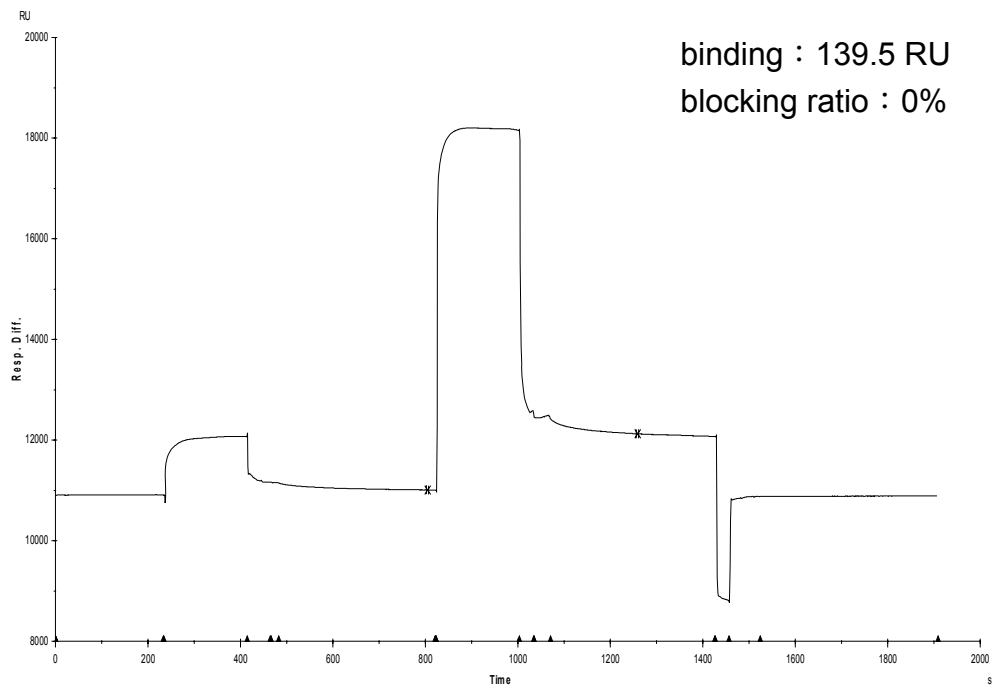


圖 4.25 白豬母乳與 α -glucosidase-CM5 晶片作用的表面電漿共振訊號圖。

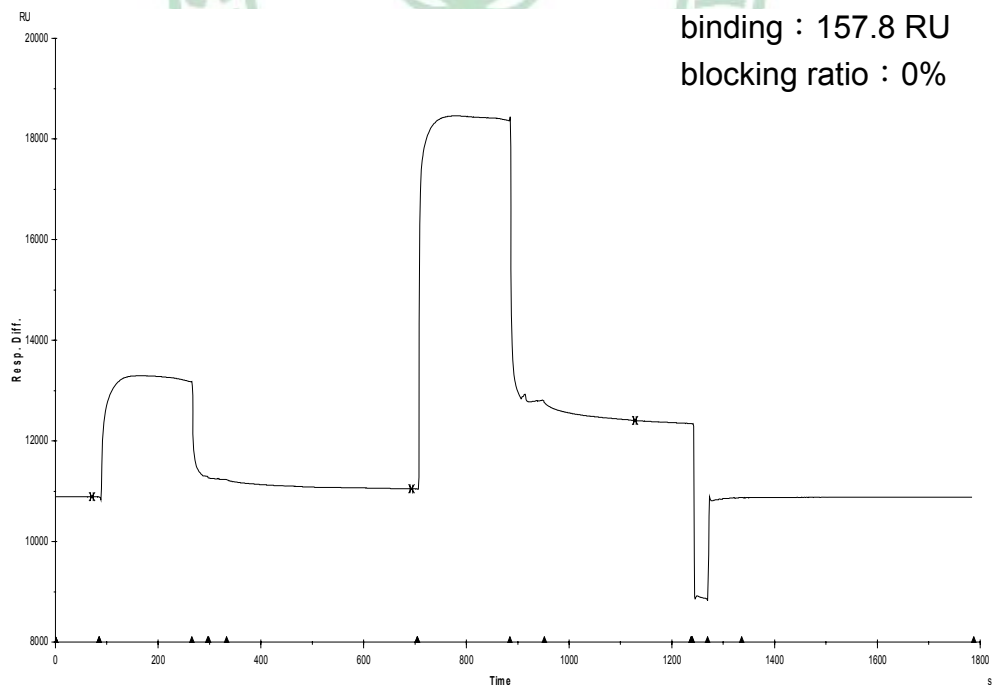


圖 4.26 銅垂玉帶草與 α -glucosidase-CM5 晶片作用的表面電漿共振訊號圖。

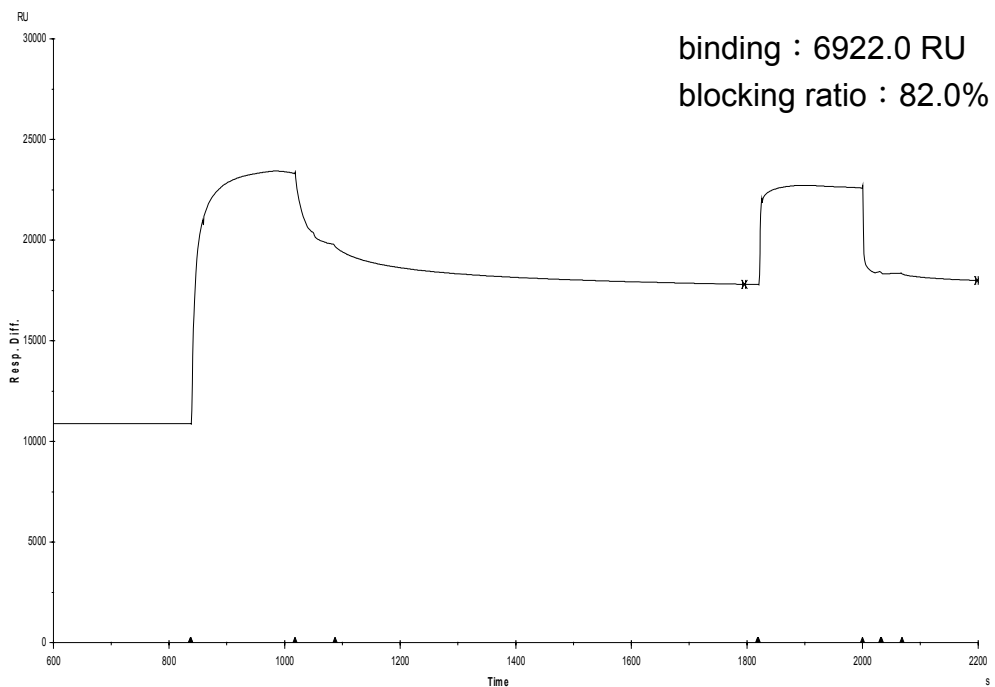


圖 4.27 含羞草與 α -glucosidase-CM5 晶片作用的表面電漿共振訊號圖。

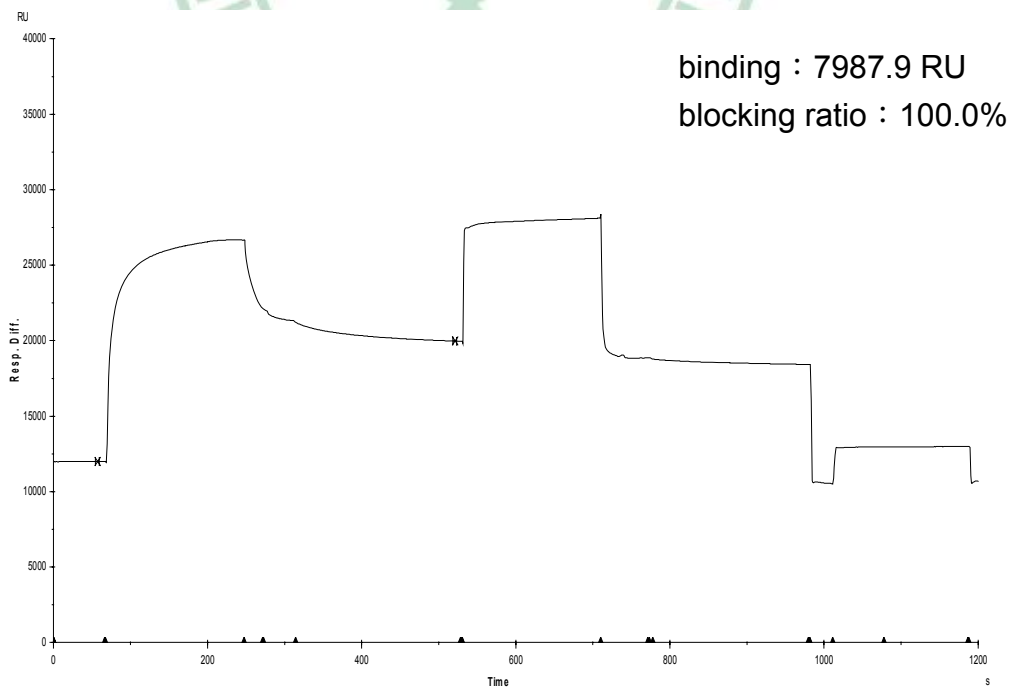


圖 4.28 芭樂乾與 α -glucosidase-CM5 晶片作用的表面電漿共振訊號圖。

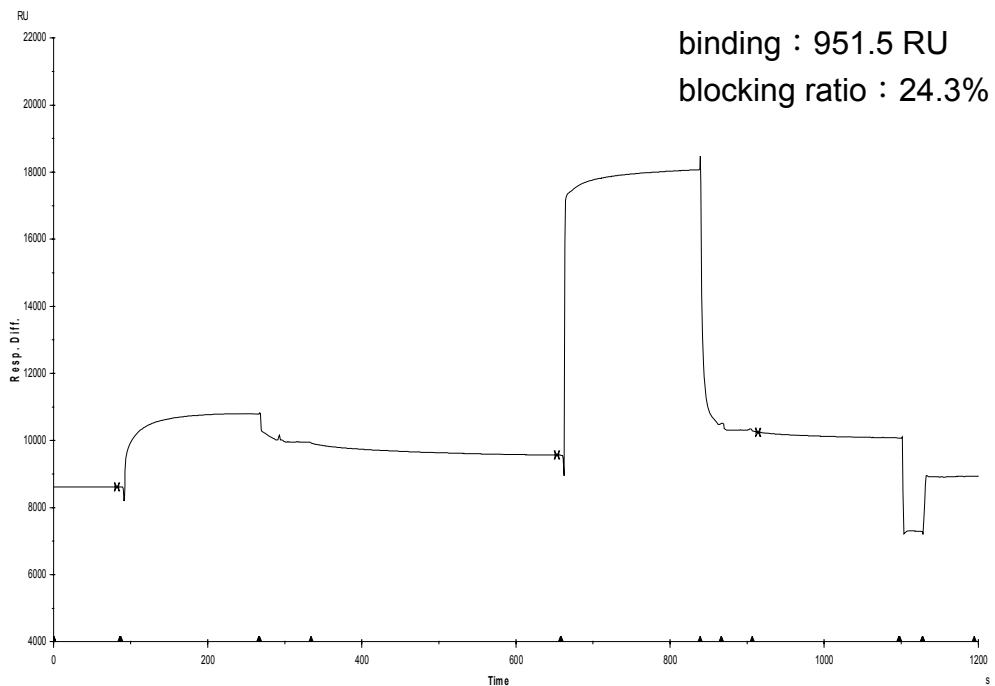


圖 4.29 破布子根與 α -glucosidase-CM5 晶片作用的表面電漿共振訊號圖。

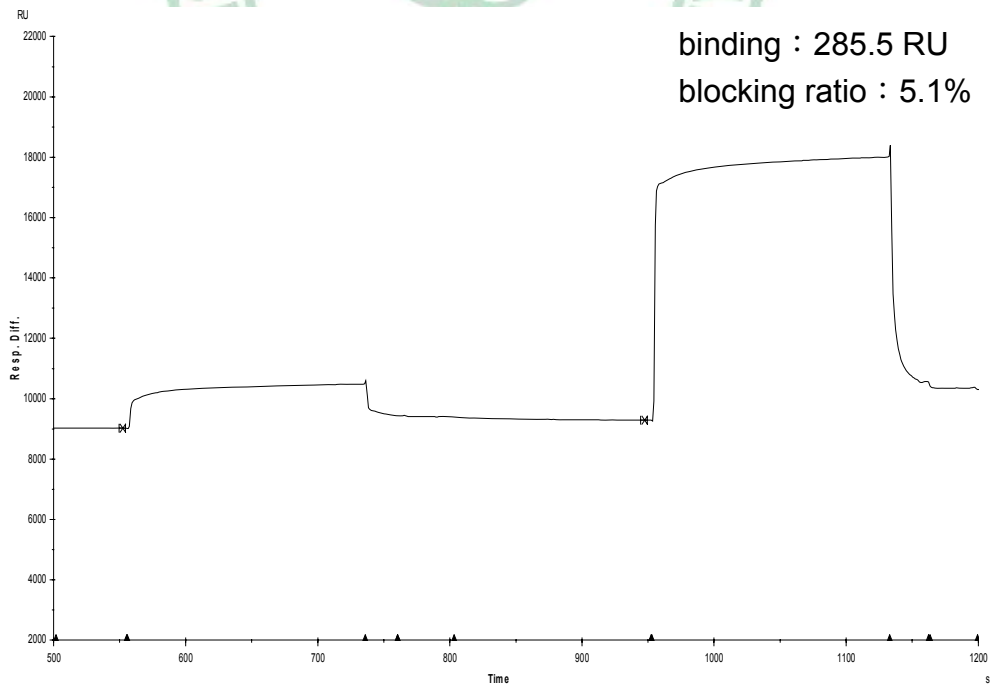


圖 4.30 倒地苓與 α -glucosidase-CM5 晶片作用的表面電漿共振訊號圖。

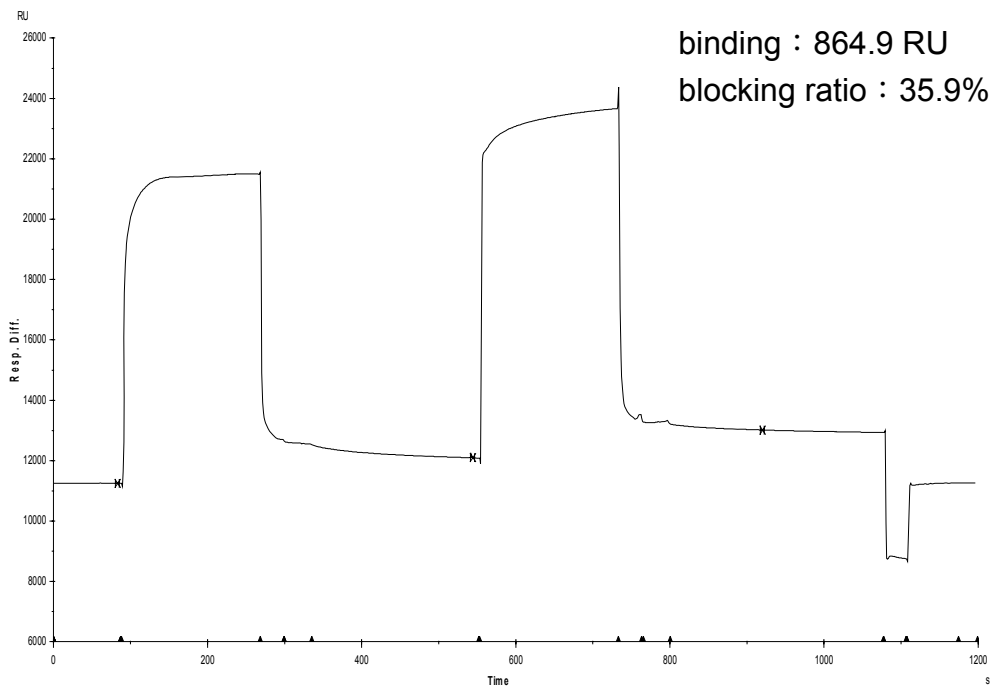


圖 4.31 紅豆杉與 α -glucosidase-CM5 晶片作用的表面電漿共振訊號圖。

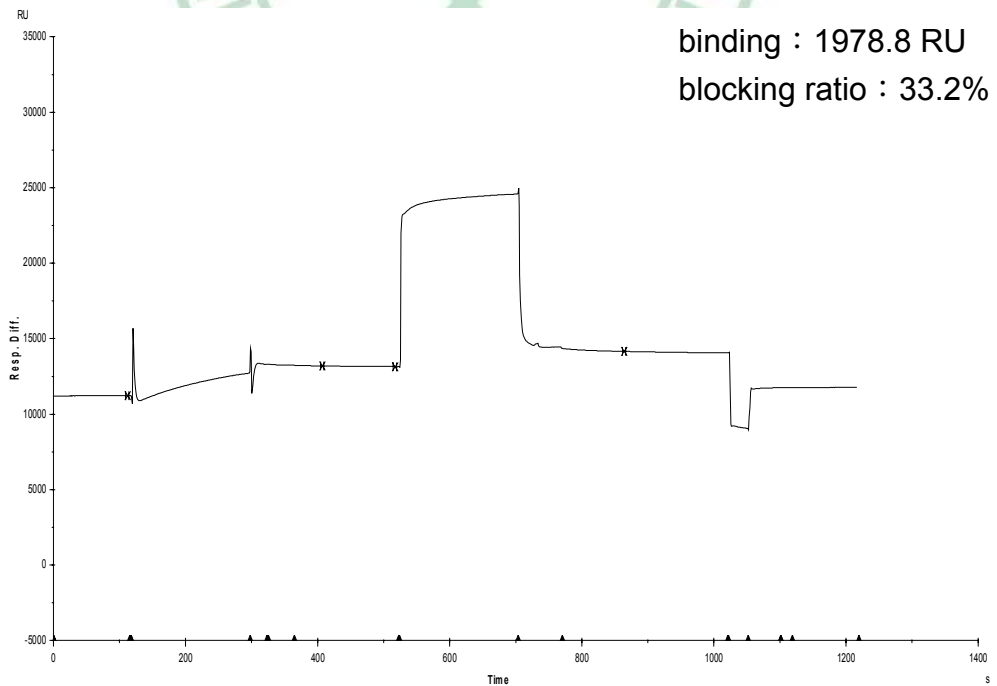


圖 4.32 acarbose 與 α -glucosidase-CM5 晶片作用的表面電漿共振訊號圖。

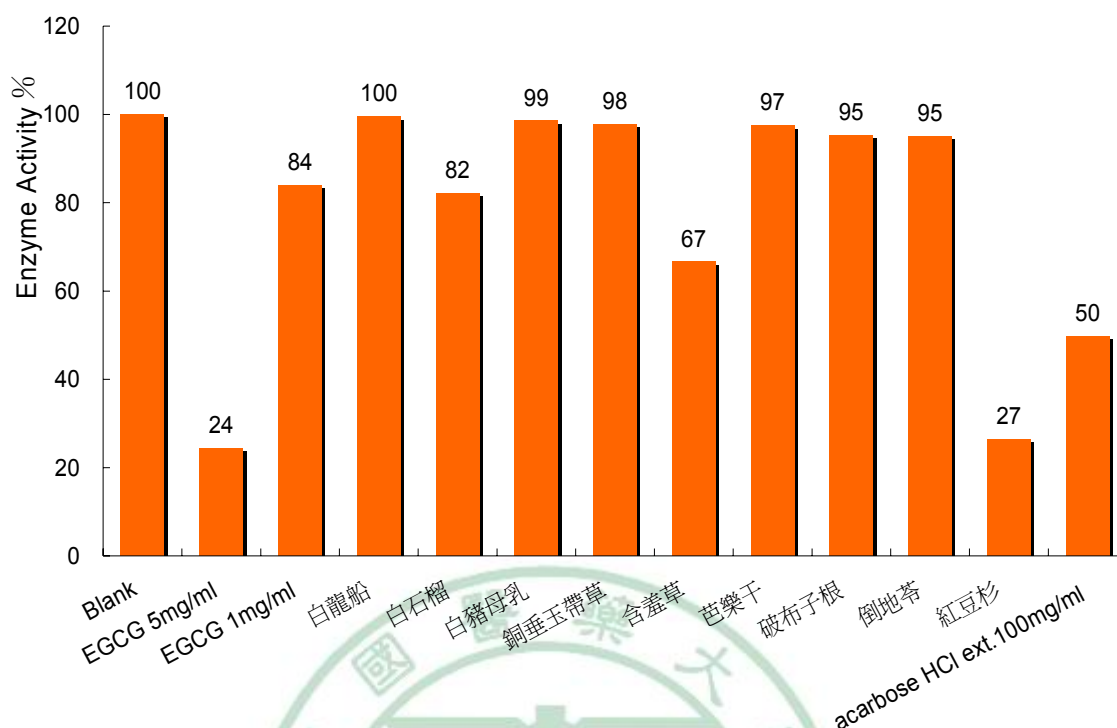


圖4.33 九種中草藥及acarbose的酵素活性分析試驗

表 4.2 用 α -glucosidase-CM5 晶片篩選九種中草藥及 acarbose 之結合量 (RU)、EGCG 阻斷比 (%), 以及抑制酵素活性百分比 (%) 的結果。

藥材名稱	樣品結合量 (RU)	EGCG 阻斷比 (%)	抑制酵素活性百分比 (%)
白龍船	155.7	13.7%	0%
白石榴	2733.9	59.4%	18%
白豬母乳	139.5	0%	1%
銅垂玉帶草	157.8	0%	2%
含羞草	6922.0	82.0%	33%
芭樂乾	7987.9	100.0%	3%
破布子根	951.5	24.3%	5%
倒地苓	285.5	5.1%	5%
紅豆杉	864.9	35.9%	73%
acarbose	1978.8	33.2%	50%

由表 4.2、圖 4.23~圖 4.32 及圖 4.33 顯示 α -glucosidase-CM5 晶片篩選九種中草藥及 acarbose 之結合量、EGCG 阻斷比以及抑制酵素活性百分比的結果：九種中草藥在 EGCG 阻斷比項目中效果最好的前三名依序為芭樂乾（100.0%）、含羞草（82.0%）和白石榴（59.4%）；在抑制酵素活性百分比項目中效果最好的前三名依序為紅豆杉（73%）、含羞草（33%）及白石榴（18%）。雖然芭樂乾阻斷 EGCG 和 α -glucosidase 結合的能力極佳（EGCG 阻斷比為 100.0%），但很顯然地抑制 α -glucosidase 酵素活性的能力極差（抑制酵素活性百分比為 3%），所以不再做進一步研究分析。而紅豆杉阻斷 EGCG 和 α -glucosidase 結合的能力雖不明顯（EGCG 阻斷比為 35.9%），但其抑制酵素活性的能力顯著（抑制酵素活性百分比為 73%）。此外，由表 4.2 及圖 4.32 顯示 acarbose 阻斷 EGCG 和 α -glucosidase 結合的能力為 33.2%，但其抑制 α -glucosidase 的能力並不明顯（抑制酵素活性百分比為 50%）。

由於含羞草和白石榴在 EGCG 阻斷比項目中效果較佳（分別為 82.0%、59.4%），因此對這兩種中草藥做酵素活性分析試驗（圖 4.34），以便進一步了解這兩種中草藥對 α -glucosidase 的抑制能力。白石榴隨著濃度的增加，抑制 α -glucosidase 的能力也隨之增強，當濃度升至 40 mg/ mL 時，其抑制酵素活性百分比幾乎達到 100%。含羞草隨著濃度的增加，抑制 α -glucosidase 的能力趨緩，當濃度升至 30 mg/ mL 時，其抑制酵素活性百分比達到 50%；但濃度至 50 mg/ mL 時，其抑制酵素活性百分比為 39%，因此含羞草抑制 α -glucosidase 的能力顯然不及白石榴。

接著，將紅豆杉進一步做酵素活性分析試驗（圖 4.35）可知隨著濃度的增加，抑制 α -glucosidase 的能力也持續增強，當濃度升至 10 mg/ mL 時，其抑制酵素活性百分比已達到 37%；由於紅豆杉抑制酵素活性的效果佳，因此可視為極具開發潛力的先導藥物。

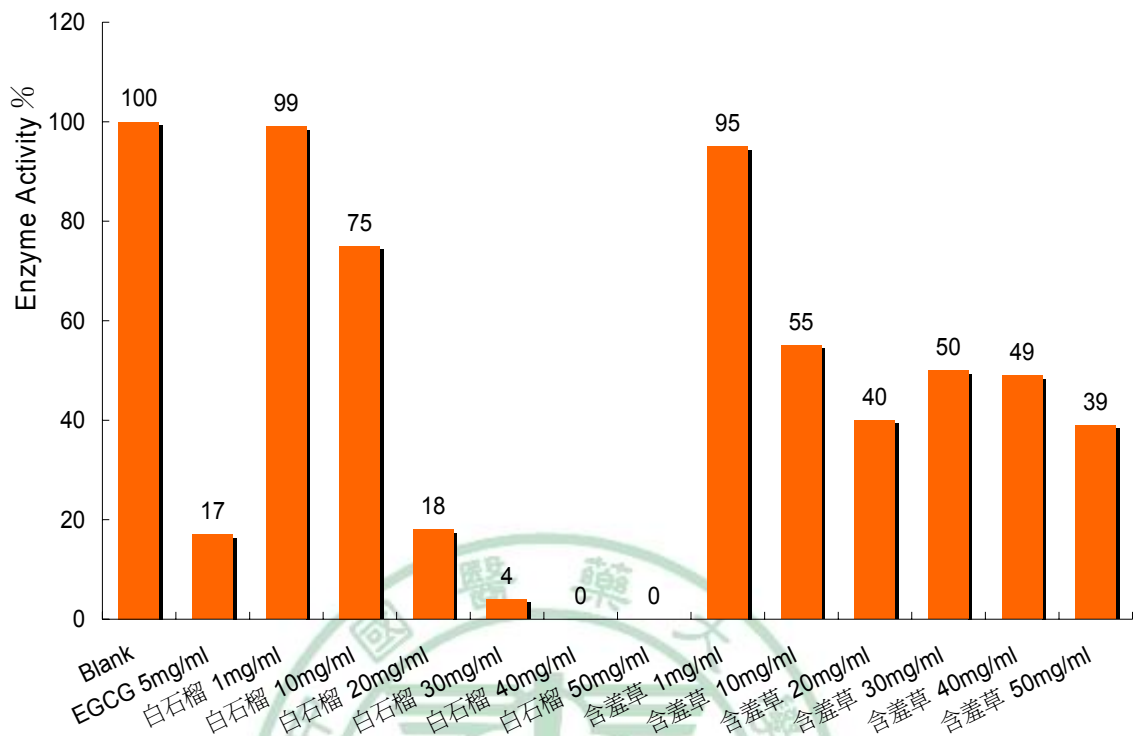


圖4.34 不同濃度之白石榴、含羞草的酵素活性分析試驗

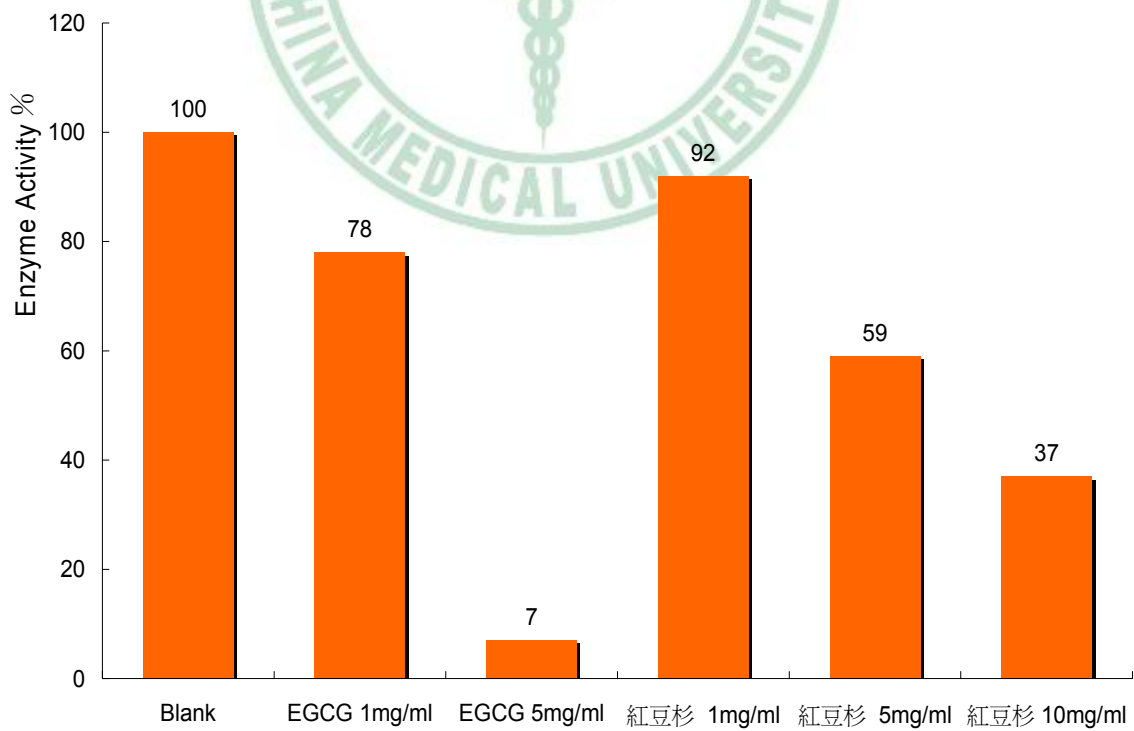


圖4.35 不同濃度之紅豆杉的酵素活性分析試驗

將 acarbose 進一步做酵素活性分析試驗（圖 4.36）可知隨著濃度的增加，抑制 α -glucosidase 的能力增強；但 acarbose 在 5 mg/mL 及 10 mg/mL 鹽酸水溶液時，對 α -glucosidase 幾乎沒有抑制作用；即使濃度達到 100 mg/mL 鹽酸水溶液時，其抑制酵素活性百分比也只好到 50%而已。

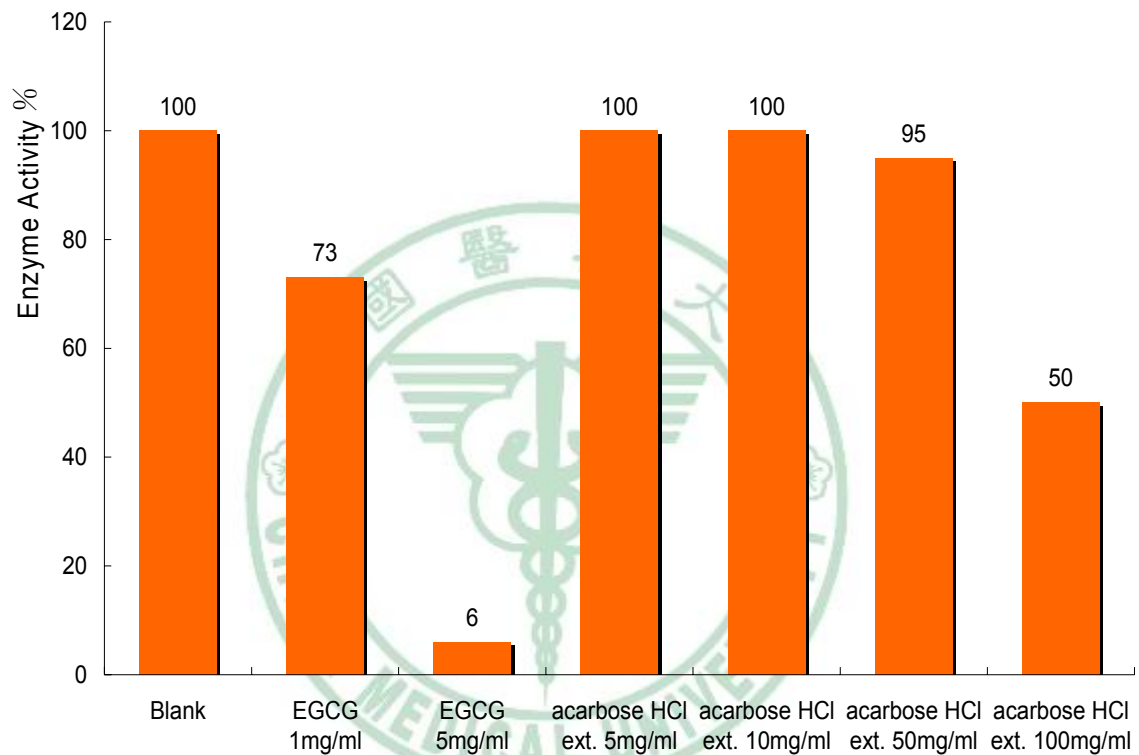


圖4.36 不同濃度之acarbose的酵素活性分析試驗

4.9 以 α -glucosidase-CM5 晶片回收紅豆杉後之標定結果

紅豆杉萃取物的 HPLC 圖譜如圖 4.37：

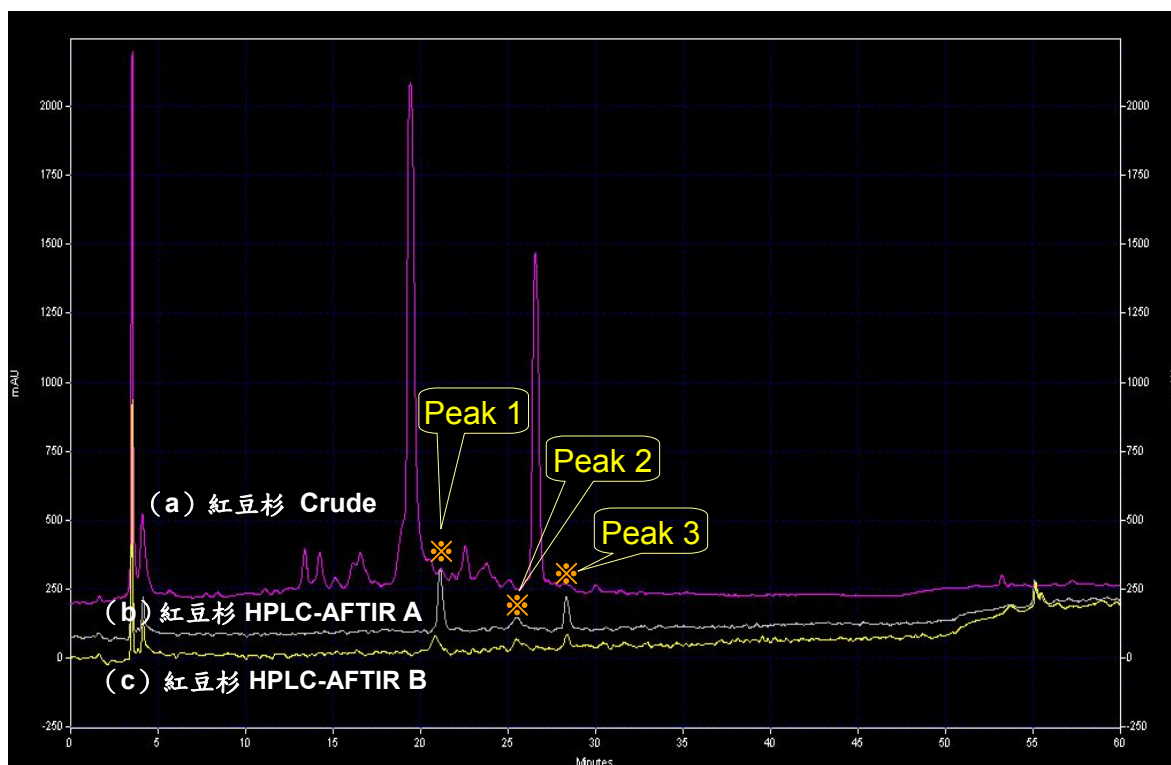


圖 4.37 紅豆杉萃取物的 HPLC 指紋圖譜和回收樣品的標定 (UV : 210 nm)

圖 4.37 (a) 為先建立紅豆杉萃取物的 HPLC 指紋圖譜 (UV : 210 nm) ; 圖 4.37 (b) 、 (c) 為紅豆杉經由 Biacore 3000 儀器回收樣品的功能將紅豆杉的有效成分收集後，再做高效能液相層析儀 (HPLC) 分析。由圖 4.37 (b) 、 (c) 和 (a) 的 HPLC 指紋圖譜進行比對，可看出經標定後之有效成分 (用 * 標明) 在紅豆杉萃取物中並非主要成分 (亦即有效成分微量)，但其萃取物抑制酵素活性的能力顯著 (抑制酵素活性百分比為 73%) ; 至於那一個 Peak 為抑制酵素活性的有效成分，仍需進一步地研究分析。

第五章 討論

自從 AFTIR 被設計用來篩選中草藥的有效成分以來，已成功運用在免疫調節性藥物⁶及抗骨質疏鬆藥物的篩選，以上分別使用 CD28 及雌激素接受器 (ER α) 固定在晶片上當接受器，用以標定或純化出天然物內與選定之接收器具有特異性鍵結的特定分子；這些固定在晶片上的接受器均為細胞膜與細胞核膜上的訊號傳遞型接受器 (signal transmissive receptor)。本研究則首度以膜附酵素 (membrane-bound enzymes) α -glucosidase 成功固定在晶片上當接受器，透過微流體技術及表面電漿共振 (SPR) 的偵測來篩選中草藥內抑制此酵素的 effective 成分。

本研究利用綠茶葉及其他生藥萃取物已成功驗證 AFTIR 系統 (α -glucosidase-CM5 晶片) 為一高效率、高靈敏度及穩定性佳的藥物篩選平台，而且可純化、鑑定出有效成份。由於 AFTIR 系統利用表面電漿共振 (SPR) 光學原理做為偵測的工具，所需樣品質量非常少，並且能精確控制反應組成的接觸時間與流速，而且能立即顯示反應分子結合、解離的情形。從本研究仙鶴草、紅豆杉的結果 (表 4.1、圖 4.16；表 4.2、圖 4.37) 可以了解：中草藥中即使含有微量的有效成分，仍可透過 AFTIR 技術偵測出並標定出來。雖然仙鶴草、紅豆杉含有微量的有效成分可抑制 α -glucosidase 活性，從其萃取物抑制酵素活性百分比 (仙鶴草 4%，紅豆杉 73%) 來看，顯然仙鶴草抑制酵素活性的能力不及紅豆杉，由此可知紅豆杉微量的有效成分可能具有極佳的抑制酵素活性能力。此外，本研究所建立的篩選平台 (α -glucosidase-CM5 晶片) 在重覆進行超過 50 次以上的篩選工作後，晶片上的 α -glucosidase 仍然保有酵素活性 (圖 4.7)。由以上論點可知，本研究所建立的藥物篩選平台在穩定性、敏感度及重複使用率上已達到預期的標準。

本研究採用的九種台灣草藥，為民間治療糖尿病的驗方，在臨床上常用來降低血糖皆有不錯的療效。但經由實驗篩選後，結果發現僅紅豆杉能有效抑制 α -glucosidase 酵素活性。此結果不代表其

他八種台灣草藥（白龍船、白石榴、白豬母乳、銅垂玉帶草、含羞草、芭樂乾、破布子根、倒地苓）降血糖方面不具有療效，有可能是這些台灣草藥的降血糖機轉不是在於抑制 α -glucosidase 酵素活性方面，而是具有多靶點（poly targets）作用，這或許跟台灣草藥某些成分的非特異性有關，仍須進一步深入研究去探討。

此外，雖然在 AFTIR 的篩選測試中，芭樂乾阻斷 EGCG 和 α -glucosidase 結合的能力極佳（EGCG 阻斷比為 100.0%），但在後續的酵素活性測試上卻顯示抑制 α -glucosidase 酵素活性的能力不佳（抑制酵素活性百分比為 3%）；從芭樂乾的 AFTIR 圖譜型態（圖 4.28）中發現拖曳情形十分明顯，推測可能原因為芭樂乾的某些成分大量堆積（aggregation）在接受器上，加上與接受器結合方位（orientation）的影響，形成各種可能的立體障礙結構，雖然阻擋了 EGCG 而使其無法鍵結上去，但卻可能讓其他不同的化合物通過障礙而進入到酵素活性位置中，產生了所謂選擇性鍵結，也因此形成了在後續的酵素活性測試中，pNPG 依舊可以進入到 α -glucosidase 的活性位置上被催化形成水解而顯色；但由於實際情形無法證實，且已超出本論文的研究範圍，未來可能需要以其他的實驗方式來加以驗證。

值得注意的事是紅豆杉阻斷 EGCG 和 α -glucosidase 結合的能力並不算很強（EGCG 阻斷比為 35.9%），但其抑制酵素活性的能力仍然很顯著（抑制酵素活性百分比為 73%）；而在後續回收成分的 HPLC 標定圖譜（圖 4.37）上顯示出紅豆杉具有阻斷能力的有效成分在紅豆杉中僅屬於微量成分，由此看出紅豆杉的這些微量有效成分可能具有極佳的抑制酵素活性能力，因此可視為極具開發潛力的先導藥物；或者亦可將紅豆杉萃取物開發成健康食品。由於本研究在紅豆杉標定後尚未進行後續的純化、純化標定化合物之結構解析及進一步抑制 α -glucosidase 的活性分析等，這些將是本實驗未來後續進行的工作。

acarbose 為現今臨床上已使用的 α -glucosidase 抑制劑，本實驗亦對此藥進行酵素結合抑制作用分析。acarbose 阻斷 EGCG 和

α -glucosidase 結合的能力和紅豆衫相差不多 (acarbose 和紅豆衫的 EGCG 阻斷比分別為 33.2%、35.9%)，但抑制 α -glucosidase 的能力並不顯著 (抑制酵素活性百分比為 50%)，反而比紅豆衫抑制酵素的能力差 (抑制酵素活性百分比為 73%；表 4.2)；另一方面，利用不同濃度的 acarbose 進一步做酵素活性分析試驗(圖 4.36)可知隨著濃度的增加，抑制 α -glucosidase 的能力雖然增強，但 acarbose 在濃度達到 100 mg/ mL 鹽酸水溶液時，其抑制酵素活性百分比也只到 50%而已，顯然不論是在 AFTIR 篩選過程中或是酵素活性測試的實驗中，acarbose 抑制 α -glucosidase 的效果都不佳，究其原因是本實驗使用的 α -glucosidase 是從 Bakers Yeast (Type I) 中獲得，從過去的研究³²知道 acarbose 抑制 α -glucosidase (Type I) 的能力並不明顯 (表 2.4)，本次研究也從生物晶片的角度與實驗中再次驗證 acarbose 抑制 α -glucosidase (Type I) 的能力並不顯著。



第六章 結 論

本研究所建立的篩選平台雖在穩定性、敏感度及重覆使用率上已達預期的標準，為了提升生物晶片的篩選效率及靈敏度，可在晶片上接受器結合方位 (orientation) 進一步改良，這將是本研究未來的重點。

此外，從本研究實驗結果可知紅豆杉為極具開發潛力的先導藥物，但由於紅豆杉為稀有藥材，取得資源有限，希望未來能將其有效成分鑑定確認後，用半合成方式或合成方式取得同類成分的藥物，期望能開發出新型的 α 葡萄糖苷酶抑制劑。



參考文獻

1. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004; 27(5): 1047-1053.
2. Mahler RJ, Adler ML. Type 2 diabetes mellitus: update on diagnosis, pathophysiology, and treatment. *J. Clin. Endocrinol Metab*. 1999; 84: 1165-1171.
3. Harris MI. Impaired glucose tolerance--prevalence and conversion to NIDDM. *Diabetic Medicine*. 1996; 13(3 Suppl 2): S9-11.
4. Donahue RP, Orchard TJ. Diabetes mellitus and macrovascular complications: an epidemiological perspective. *Diabetes Care*. 1992; 15: 1141-1155.
5. The DECODE Study Group. Glucose tolerance and mortality : comparison of WHO and American Diabetes Association diagnostic criteria. *Lancet*. 1999; 354: 617-621.
6. Dong GC, Chuang PH, Forrest MD., Lin YC, and Chen HM. Immuno-suppressive Effect of Blocking the CD28 Signaling Pathway in T-cells by an Active Component of Echinacea Found by a Novel Pharmaceutical Screening Method. *J. Med. Chem*. 2006; 49(6): 1845-1854.
7. World Health Organization(www.who.int/diabetes/actionnow/en/mapdiabprev.pdf)
8. 徐培原：死因統計。95年衛生統計系列 2007；貳-15。
9. 行政院衛生署 (http://www.doh.gov.tw/cht2006/index_populace.aspx)
- 10.張伯史、董建華、周仲瑛：中醫內科學，知音出版社，台北 2002；pp. 564-590。
- 11.Wani MC, Taylor HI, Wall ME et al. Plant antitumor agents VI: The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am Chem Soc*. 1971; 93(9): 2325.
- 12.詹亞華：中國神農架中藥資源，湖北科學技術出版社，武漢 1994；pp. 41。
- 13.Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature*. 1979; 277(5698): 665-667.
- 14.Shannon KB, Canman JC, Ben Moree C, Tirnauer JS, Salmon ED. Taxol-stabilized microtubules can position the cytokinetic furrow in mammalian cells. *Molecular Biology of the Cell*. 2005; 16(9): 4423-4436.
- 15.Parekh H, Simpkins H. The transport and binding of taxol. *General Pharmacology*. 1997; 29(2): 167-172.
- 16.邱永年、張光雄：原色台灣藥用植物圖鑑(一)，南天書局，台北 1999；pp. 99。

- 17.邱永年、張光雄：原色台灣藥用植物圖鑑（一），南天書局，台北 1999；pp. 127。
- 18.台灣藥用植物資源名錄，行政院衛生署中醫藥委員會，臺北 2003；pp.338.
- 19.邱永年、張光雄：原色台灣藥用植物圖鑑（五），南天書局，台北 1998；pp. 143-144。
20. Anonymous. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet*. 1998; 352(9131): 837-853.
21. Standards of Medical Care in Diabetes—2008 American Diabetes Association, *Diabetes Care* 2008 31: S12-S54.
22. 衡先培、朱章志、鄭健：實用糖尿病中西醫治療，人民軍醫出版社，北京 2006；pp. 161。
23. Chiasson JL, Gomis R, Hanefeld M, Josse RG, Karasik A, Laakso M. The STOP-NIDDM Trial: an international study on the efficacy of an alpha-glucosidase inhibitor to prevent type 2 diabetes in a population with impaired glucose tolerance: rationale, design, and preliminary screening data. *Study to Prevent Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. Diabetes Care*. 1998; 21(10): 1720-1725.
24. Chiasson JL, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A, Laakso M, for the STOP-NIDDM trial research group. Acarbose treatment and the risk of cardiovascular disease and hypertension in patients with impaired glucose tolerance: the STOP-NIDDM trial. *JAMA*. 2003; 290(4): 486-494.
25. Hanefeld M, Chiasson JL, Koehler C, Henkel E, Schaper F, and Temelkova-Kurktschiev T. Acarbose Slows Progression of Intima-Media Thickness of the Carotid Arteries in Subjects With Impaired Glucose Tolerance. *Stroke*. 2004; 35(5): 1073-1078.
26. Kim J, Nakatani S, Hashimura K, et al. Abnormal glucose tolerance contributes to the progression of chronic heart failure in patients with dilated cardiomyopathy. *Hypertens Res*. 2006; 29: 775-782.
27. Ernst HA, Leggio LL, Willemoës M, Leonard G, Blum P and Larsen S. Structure of the *Sulfolobus solfataricus* alpha-glucosidase: implications for domain conservation and substrate recognition in GH31. *J. Mol. Biol*. 2006; 358: 1106-1124.
28. Sim L, Quezada-Calvillo R, Sterchi EE, Nichols BL, Rose DR. Human intestinal maltase-glucoamylase: crystal structure of the N-terminal catalytic subunit and basis of inhibition and substrate specificity. *J. of Molecular Biology*. 2008; 375(3): 782-792.
29. RCSB PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)

30. Breitmeier D, Günther S and Heymann H. Acarbose and 1-deoxynojirimycin inhibit maltose and maltooligosaccharide hydrolysis of human small intestinal glucoamylase–maltase in two different substrate-induced modes. *Arch. Biochem. Biophys.* 1997; 346: 7–14.
31. Rossi EJ, Kuntz DA, Sim L, Hahn D, Johnston BD and Ghavami A et al. Inhibition of recombinant human maltase glucoamylase by salacinol and derivatives. *FEBS J.* 2006; 273: 2673-2683.
32. Tomoyuki Oki, Toshiro Matsui, Yutaka Osajima. Inhibitory Effect of α -Glucosidase Inhibitors Varies According to Its Origin. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47(2): 550-553.
33. Gaster B, Hirsch I B. The effects of improved glycemic control on complications in type2 diabetes. *Arch. Intern. Med.* 1998; 158: 134-141.
34. 林昭庚：中西醫病名對照大辭典，國立中國醫藥研究所，台北 2001；pp. 497-532
35. KEGG PATHWAY(http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/show_pathway?map00500+3.2.1.20)
36. KEGG PATHWAY(http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/show_pathway?map00052+3.2.1.20)
37. Wood, R. W. A suspected case of the electrical resonance of minute metal particles for light-waves. A new type of absorption. *Philosophical Magazine* 1902, 3: 396-410.
38. Fano, U. The theory of anomalous diffraction gratings and of quasi-stationary waves on metallic surfaces (Sommerfeld's waves). *J Opt Soc Am* 1941, 31: 213-222.
39. Hessel, Oliner A, A A. A New Theory of Woods Anomalies on Optical Gratings. *Applied Optics* 1965, 4: 1275-1297.
40. Gamberucci A, Konta L, Colucci A, Giunti R, Magyar JE, Mandl J, Banhegyi G, Benedetti A, Csala M. Green tea flavonols inhibit glucosidase II. *Biochemical Pharmacology.* 2006; 72(5): 640-646.

High efficiency of screening α -glucosidase inhibitor from Chinese Herbal medicines using After Flowing Through Immobilized Receptor (AFTIR)

Chung-Chia Chen

Major Professor : Tung-Yuan Lai

Graduate Institute of Chinese Medical Science

China Medical University

The number of diabetes patients is growing fast all over the world. Previous reports showed that lowering blood glucose levels may delay the occurrence of diabetes. Western medicines in clinical treatment of diabetes use oral hypoglycemic agents include α -glucosidase inhibitors which can effectively reduce postprandial blood glucose levels. In this study, AFTIR technology via the immobilization of α -glucosidase on chip was used to find several effective herbal extracts and has been verified as an effective method via finding the epicatechin gallate from green tea. Furthermore, the results show that Taxus blocks epigallocatechin gallate and α -glucosidase with blocking ratio of 35.9% and the activity of inhibiting α -glucosidase is significant. With the observations above, Taxus can therefore be a potential agent used for curing the diabetes patients in the future.

Key words : α -glucosidase inhibitors ; AFTIR ; Diabetes ; IGT.

謝 辭

凡事能圓滿成就，皆是眾緣和合所成，而今我的論文完成及碩士學業能如期畢業，亦是如此。在這段期間，承蒙許多人的照顧及指導，由於內心要感謝的人很多，只能儘量用筆墨表達自己感恩的心！

首先誠摯的感謝指導教授賴東淵博士及陳悅生博士、陳惠民博士，老師們悉心的教導使我在學術領域中得以擴展視野的廣度與學習的深度，諄諄的教誨並指點我研究的方向，使我在這些年中受益匪淺；並且感謝口試委員林景彬教授，對於論文惠賜寶貴的意見，使本論文更趨於完善。諸位老師治學的嚴謹是值得我輩學習的典範。

非常感謝林昭庚教授、臺北市立聯合醫院鄭振鴻副院長等諸位的鼓勵，讓我在從事臨床工作之餘，得以回到學校進修做學術研究。感謝臺北市立聯合醫院林森院區諸位長官及中醫醫療部長官惠予我進修的機會與支持。本論文的完成亦得感謝研究助理莊秉憲先生大力協助實驗進行並惠予指教。在此感謝其他所有曾經在研究上給予我協助的貴人。

最後，要感謝的是我的雙親與家人，你們永遠是我最大的精神支柱，謹以此論文獻上我最誠摯的感恩！

陳重嘉 謹誌