

南 華 大 學

自然生物科技學系自然療癒碩士班

碩士論文

扁桃斑鳩菊萃取物之活性成分、抗氧化
及抑制血管收縮素轉化酶能力分析

**Analysis of Active Component, Antioxidative and ACE
Inhibitory Activities of *Vernonia Amygdalina* Extracts**

研 究 生：楊勝平

指 導 教 授：陳秋媛 博士

共 同 指 導 教 授：鄭明清 博士

中 華 民 國 104 年 6 月 29 日

南 華 大 學

自然生物科技學系自然療癒碩士班

碩 士 學 位 論 文

扁桃斑鳩菊萃取物之活性成分、抗氧化及抑制血管 收縮素轉化酶能力分析

研究生： 楊 勝 平

經考試合格特此證明

口試委員： 羅俊智

連秋媛

李祖瑩

鄭明博

指導教授： 連秋媛

鄭明博

系主任(所長)： 李丹子喬

口試日期：中華民國 104 年 6 月 29 日

誌 謝

碩士班兩年求學生涯階段中，承蒙恩師指導教授陳秋媛博士，在她擁有那深厚的中醫藥背景薰陶下如沐春風，又逢校外共同指導教授鄭明清博士，他在永信製藥廠擁有將近二十年的臨床研發與製藥工程經驗下，諄諄善誘不辭辛勞，帶領學生按步就班完成實驗室嚴格要求的每一流程與數據。在實驗或論文撰寫過程中，每遭遇困難常能獲得兩位恩師親切熱誠的指導與斧正，使得論文寫作艱鉅工程，才能順利完成。師恩浩瀚難以回報，永銘我心，是故以為誌首。

論文紙本初成，承蒙恩師 陳秋媛教授、鄭明清教授，林俊宏教授及羅俊智教授，在學期末百忙中，抽空詳加審批、校改、補正，尤其在摘要英文部份，更感謝吳浩群教授不厭其煩巨細靡遺斧正。於口試當下，承蒙宋祖瑩教授、羅俊智教授及兩位指導教授提供更寶貴完整的意見，當一一補闕修正使得論文更臻完善，感謝恩師無私的奉獻教導與提攜。

在中州科技大學保健食品系—保健食品研發暨檢驗中心實驗室，那段將近一年的瓶瓶罐罐試驗生涯階段，感謝學校有一套完整新穎的試驗器材與設備。伙伴們要感謝的有校長曾慶瀛教授、共同指導教授鄭明清博士、陳志瑋博士、邱炫鐘老師，更有我隨時得以請益直接帶我的小老師劉書涵學妹，有您們真好。感謝您們的鼓勵、不斷的指導修正，本論文才能得以如期完全呈現。

「宇宙間的人、事、物、是因緣合和而發生的」世尊如來曾經如是說。

兩年前的一個學期末，在一個偶然機會下和楊淑娥博士同往中州科大保健食品系參訪後，興趣使然及環境考量下，因而觸動了讀碩士班的企圖心，所以楊博士是我應該感謝的第一個貴人，謝謝妳不斷的鼓勵才有今天的我。家人最要感謝的首推牽手——陳秀香女士，無怨無悔忙內忙外，讓我無後顧之憂，得以完成學業，兩年來辛苦了，謝謝您。這份論文屬於關心我的親朋好友、家人、師長的。最最要感謝的是生我育我的父母雙親，給了我強健的體魄，及不笨的頭殼，阿爸、阿母這份榮耀，您們是有功勞的，多謝。請接受我誠摯的祝福，願我恩師、親朋好友、家人，四時無災無病、長命百壽、平和喜樂、心想事成。日後我會更加努力，善盡社會責任，服務更多人群，感謝您們無私的愛及奉獻，滋潤這片賴以維生的大地，充滿感恩的心。

此份榮耀謹此獻給我來不及分享喜悅的阿爸——楊燈酉先生，寡母——楊陳勸女士。

摘要

背景與目的：扁桃斑鳩菊是一種珍貴的藥用植物，被稱為苦葉。扁桃斑鳩菊除了可作為蔬菜用外，亦可被用於瘧疾，糖尿病、腹瀉、性病、肝炎、腸胃病、皮膚病和傷口的治療。而從自然界找尋有效的高抗氧化之天然物質，以降低生物體內之氧化性傷害，是值得進行研究。

研究方法：扁桃斑鳩菊葉及莖以三種不同溶劑(水、酒精、乙酸乙酯)萃取，並進行萃取物的活性測試，以瞭解何種溶劑能萃取出較高的抗氧化活性物質。抗氧化活性的測試包括 DPPH 自由基清除能力、螯合亞鐵離子能力、還原力及清除超氧陰離子能力；對不同萃取物進行類黃酮、總酚、花青素及胺基酸等活性成分含量及血管收縮素轉化酶抑制活性評估。

研究結果：

1. 葉及莖提取物的收率以水萃物含量最高，分別為 24.9 及 27.2 %。
2. 抗氧化試驗中，DPPH 自由基清除能力以酒精萃取物最高（莖優於葉萃取物， EC_{50} 各為 0.52 及 0.78 mg/mL），其次為乙酸乙酯萃取物，水萃物最弱。亞鐵離子螯合能力顯示酒精萃取層效果最強（葉優於莖萃取物 EC_{50} 各為 0.77 及 0.90 mg/mL），葉乙酸乙酯層抗氧化力最弱。還原力測定中以酒精萃取物還原力最好。超氧陰離子清除能力各萃取物皆以莖比葉強，以莖乙酸乙酯萃取物最好（ EC_{50} 為 0.94 mg/mL）。

3. 抗氧化活性成分含量試驗中，花青素含量主要存在於葉及莖水萃物，尤以葉的萃取物最多（1.51 $\mu\text{mole/g}$ ）。總酚含量（葉比莖多）依序為水萃物（687.31 $\mu\text{g/mg}$ ），其次酒精萃取物（111.15 $\mu\text{g/mg}$ ），最少為乙酸乙酯萃取物（49.62 $\mu\text{g/mg}$ ）。類黃酮在各萃取物中，酒精及乙酸乙酯萃取物含量差不多，其中以莖的乙酸乙酯萃取物所含的類黃酮含量最高（29.26 $\mu\text{g/mg}$ ），而在水萃物含量最少。胺基酸含量中明顯看到葉及莖的水萃物含量最為豐富，乙酸乙酯萃取物含量最少。

4. 血管收縮素轉化酶抑制活性中，以葉及莖水層萃取物抑制能力最強（ IC_{50} 分別為 0.19 mg/mL 及 0.82 mg/mL），而莖的酒精萃取物最不具活性。

結論：扁桃斑鳩菊抗氧化試驗中，DPPH、亞鐵離子清除率及還原力主要以酒精萃取物為主，在葉及莖都有不錯抗氧化力；抗氧化有關的活性成分如花青素及總酚主要分佈於葉的水萃取物，類黃酮含量在酒精及乙酸乙酯萃取物分佈差不多；胺基酸組成在水萃取物較多樣且普遍含量較多；血管收縮素轉化酶抑制活性中，以水萃取物最強。綜合上述研究，證實扁桃斑鳩菊葉及莖皆具有不錯的抗氧化力及抗氧化活性成分。

關鍵字：扁桃斑鳩菊、抗氧化、類黃酮、總酚、花青素、胺基酸、血管收縮素轉化酶抑制

ABSTRACT

Background and Purpose: *Vernonia amygdalina* (VA), known as bitter leaf, is a valuable medicinal plant. Besides its use as a vegetable, the plant is also used in the treatment of malaria, diabetes, diarrhea, venereal diseases, hepatitis, gastrointestinal problems, skin diseases and wounds. The aim of this study is to investigate the antioxidative properties of *V. amygdalina* and how it could be used to reduce oxidative damage in the body.

Methods: *V. Amygdalina* leaves and stems were extracted using three different solvents: water, ethanol and ethyl acetate. The following antioxidative activity assays were conducted: α,α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging ability, Fe^{2+} chelating ability, relative reducing power, and superoxide anion scavenging ability. The different extracts were evaluated for angiotensin I-converting enzyme inhibitory (ACEi) activities and active ingredient contents, which included flavonoids, total phenolics, anthocyanins and amino acids.

The results:

1. The aqueous extracts from VA leaves and stems had the highest content (24.9 and 27.2 %, respectively).
2. The antioxidant activities for the VA extracts obtained were as follows: the

ethanolic extract (stem higher than leaf, EC₅₀ values were 0.52 and 0.78 mg/mL, respectively) had the highest DPPH radical scavenging ability compared to the ethyl acetate and water extracts. The ethanolic extract had the highest Fe²⁺ chelating ability (leaf higher than stem, EC₅₀ values were 0.77 and 0.90 mg/mL, respectively), and the ethyl acetate extract from the leaves had the lowest antioxidant capacity. The highest reducing power was detected in the ethanolic extract. Results showed that stems had better ability than leaves in all extractions, with the ethyl acetate extract of stems showing the best superoxide anion scavenging ability (EC₅₀ value was 0.94 mg/mL).

3. The active ingredient content of VA extracts obtained was as follows: the aqueous extracts from VA leaves and stems contained high level of anthocyanins, with the highest concentration found in the leaf extracts (1.51 μmole/g). The aqueous extract had the highest total phenolics content (687.31 μg/mg) (leaf higher than stem), followed by the ethanol and ethyl acetate extracts (111.15 and 49.62 μg/mg, respectively). Similar flavonoid content was detected in the ethanol and ethyl acetate extracts (the highest concentration (29.26 μg/mg) was detected in the ethyl acetate extract of stems), and the lowest content was found in the aqueous extract. The highest amount of amino acids was detected in the aqueous extract of leaves and stems, while the ethyl acetate extract had the least

content.

4. ACE-inhibitory activity of the aqueous extract from the leaves and stems had strong inhibitory activity (0.19 and 0.82 mg/mL, respectively) and the ethanol stem extract had the lowest activity.

Conclusion: The ethanolic extract had the highest antioxidant activity, including DPPH, ferrous ion chelating and reducing power. In addition, both the leaves and stems extracts were found to have good antioxidative capacities. The aqueous extract of VA leaves contained the highest levels of anthocyanins and total phenolics. Flavonoid contents in the ethanolic and ethyl acetate extracts were almost the same. A variety of amino acids was present in the aqueous extract, and its concentration was higher than the other extracts. Aqueous extracts were found to have strong ACEi activities. In summary, leaf and stem extracts of VA showed antioxidant activities. In all the solvents that were used to extract VA, the aqueous and ethanolic extracts were found to have the highest antioxidant activities and active components.

Keywords: ACEi, amino acids, anthocyanins, antioxidant, flavonoids, total phenolics, *Vernonia amygdalina*

目次

誌謝.....	i
摘要.....	iii
ABSTRACT.....	v
目次.....	viii
表目次.....	xi
圖目次.....	xii
第一章 緒論.....	1
1.1 研究背景.....	1
1.2 研究目的.....	2
第二章 文獻回顧.....	3
2.1 扁桃斑鳩菊.....	3
2.1.1 扁桃斑鳩菊植株.....	3
2.1.2 扁桃斑鳩菊一般成分.....	5
2.1.3 藥理作用.....	6
2.2 自由基與抗氧化介紹.....	9

2.2.1 自由基與疾病相關性.....	9
2.2.2 自由基特性與種類.....	10
2.2.3 自由基的清除.....	13
2.3 血管收縮素轉化酶的血壓調控與作用機制.....	17
第三章 材料與方法.....	19
3.1 實驗材料.....	19
3.1.1 扁桃斑鳩菊來源.....	19
3.1.2 實驗試劑與儀器.....	19
3.2 實驗設計.....	21
3.3 實驗方法.....	23
3.3.1 扁桃斑鳩菊葉子及莖萃取方法.....	23
3.3.2 抗氧化測定方法.....	24
3.3.3 花青素、總酚及類黃酮測定方法.....	27
3.3.4 血管收縮素轉化酶抑制活性之測定.....	28
3.3.5 胺基酸測定.....	29

3.3.6 統計方法.....	29
第四章 結果與討論.....	30
4.1 扁桃斑鳩菊葉及莖萃取率	30
4.2 抗氧化活性測定.....	31
4.3 花青素、總酚及類黃酮測定	43
4.4 血管收縮素轉化酶抑制活性	49
4.5 胺基酸分析.....	51
第五章 結 論.....	55
參考文獻.....	56



表目次

表 1 扁桃斑鳩菊葉及莖萃取物回收率	30
表 2 扁桃斑鳩菊不同萃取物清除 DPPH 自由基的能力	33
表 3 扁桃斑鳩菊不同萃取物對 DPPH 清除力之 EC ₅₀	33
表 4 扁桃斑鳩菊不同萃取物螯合亞鐵離子的能力	36
表 5 扁桃斑鳩菊不同萃取物對亞鐵螯合作用之 EC ₅₀	37
表 6 扁桃斑鳩菊不同萃取物還原力吸光值	39
表 7 扁桃斑鳩菊不同萃取物對超氧陰離子清除能力	41
表 8 扁桃斑鳩菊不同萃取物對超氧陰離子清除能力之 EC ₅₀	41
表 9 扁桃斑鳩菊不同萃取物抗氧化能力測定及抗氧化成分之比較表	48
表 10 扁桃斑鳩菊不同萃取物之血管收縮素轉化酶抑制作用	51
表 11 扁桃斑鳩菊不同萃取物之不同胺基酸含量	54

圖目次

圖 1 扁桃斑鳩菊植株 (攝於屏東煌儒藥園)	4
圖 2 哺乳細胞中，氧、氮自由基及其他活性物質移除的途徑	13
圖 3 腎素-血管收縮素系統 (Renin-Angiotensin System, RAS)	18
圖 4 實驗架構.....	22
圖 5 扁桃斑鳩菊不同萃取物對 DPPH 清除作用之百分比	34
圖 6 扁桃斑鳩菊不同萃取物對亞鐵螯合能力之百分比	37
圖 7 扁桃斑鳩菊不同萃取物的還原力吸光值之變化	39
圖 8 扁桃斑鳩菊不同萃取物對超氧陰離子清除能力百分比	42
圖 9 扁桃斑鳩菊不同萃取物之花青素含量	44
圖 10 扁桃斑鳩菊不同萃取物之總酚含量	46
圖 11 扁桃斑鳩菊不同萃取物之類黃酮含量.....	47

第一章 緒論

1.1 研究背景

國人十大死因包含癌症、心臟疾病、腦中風、糖尿病、高血壓及慢性下呼吸道等疾病，皆與自由基(free radical)有相關。人體在代謝過程中會自然產生活性氧(reactive oxygen species, ROS)，若暴露在不良的環境下，亦會產生自由基，如：菸害、臭氧、化學藥品、藥物、輻射線、高氧環境、熬夜、情緒低落等(Aruoma, 1998)。當體內有足夠的抗氧化酵素及抗氧化物則可將自由基清除，減少自由基攻擊DNA、胺基酸、蛋白質及攻擊細胞膜上的不飽和脂肪酸，引起脂質過氧化作用，造成正常細胞的氧化傷害，進而導致相關疾病的發生。目前已有許多疾病被證實與自由基有關，包括癌症、關節炎、發炎反應、糖尿病、動脈粥狀硬化、阿茲海默症、帕金森症、及中風與高血壓等疾病(Caciuttolo et al., 1993；Olanow 1993)。此外，抗氧化劑廣泛用於膳食補充劑，並有研究指出抗氧化物具有預防癌症、抑制低密度脂蛋白氧化，降低動脈粥狀硬化。因此，增加抗氧化物的攝取可以預防自由基和活性氧引起的相關疾病(Kähkönen et al., 1999)。目前食安安全議題時而所見，吃進有問題食品亦會造成體內自由基形成，造成

人心惶惶。因此，從自然界找尋有效的高抗氧化力且無毒之天然物質，以降低生物體內之氧化性傷害，進而減少罹患上述疾病可能性，是值得研究的方向。

1.2 研究目的

扁桃斑鳩菊 (*Vernonia amygdalina* Del.) 為菊科斑鳩菊屬多年生灌木植物又稱苦葉，主要採用葉的部位。在非洲主要當蔬菜食用外，亦當藥用於瘧疾，糖尿病、腹瀉、性病、肝炎、腸胃病、皮膚病和傷口的治療(Akah & Ekekwe, 1995; Bullough & Leary, 1982; Hamill et al., 2000; Johns et al., 1995; Kambizi & Afolayan, 2001; Otshudi et al., 2000; Riley, 1963)。目前台灣對扁桃斑鳩菊（俗稱肝薑草）無正式相關研究報告，但在台灣民間早已口耳相傳，廣為當青草藥使用久矣。本研究僅先針對葉及莖以水、95%酒精、乙酸乙酯溶劑得到萃取物，進行基礎性之抗氧化能力及其活性成分分析，並探討其對血管收縮素轉換酶活性抑制作用，以確認它的營養價值和藥用潛力，以利往後做本土性研究提供相關參考及應用。

第二章 文獻回顧

2.1 扁桃斑鳩菊

扁桃斑鳩菊(*Vernonia amygdalina* Del.)，菊科(Asteraceae 或 Compositae)之斑鳩菊屬多年生灌木，又稱扁桃葉斑鳩菊、桃葉斑鳩菊、杏葉斑鳩菊、斑鳩菊、苦葉樹、苦葉、南非葉、苦膽葉、南非樹，原產於熱帶非洲、南美。常在東南亞被稱為南非葉，但其實在西非最常見，廣泛生長於非洲赤道地區的 2-5 米高，需要充足的陽光，可耐旱，但更常生長在潮濕接近水源的草原及森林地區，且容易在各種土壤類型生長，為多年生喬木或小灌木。全年可採集其葉，南非等地常當蔬菜用，但葉性味苦、澀、性寒，洗淨鮮用或曬乾備用，亦可當藥用植物（楊，2013）。

2.1.1 扁桃斑鳩菊植株

在東南亞地區，多為直立小灌木，枝幹高可達 3 m，直徑 2~4 cm，樹皮呈灰色或褐色，光滑，有縱向裂隙，枝幹基部即分枝，單枝一般不分枝或上部有一些分枝，嫩枝有明顯的皮孔，幼枝密被白色短柔毛後脫落；葉柄，柄長約 1~3.5 cm，樹葉呈橢圓形、披針形或橢圓形，葉緣呈疏鋸齒狀，一般長 4~15 cm，最長達 28 cm，寬 1.2~4cm，最寬者 15 cm，上表面被粉

狀短柔，成熟即光滑，背面無毛或沿中脈被疏毛。由於葉子具有獨特的氣味和苦澀感，因而經常被稱之為苦葉。頭狀花序可見 10~24 朵小花，花冠白色，少數略帶淡紫色、紫紅色或粉紅色（如圖 1）。在熱帶雨水足夠環境下，南非葉生長茂盛，其地下根蔓延，可以扦插種植，在 1~2 個月內即長至 1 公尺高，在非洲可高達 10 公尺（楊，2013）。



圖 1 扁桃斑鳩菊植株（攝於屏東煌儒藥園）

2.1.2 扁桃斑鳩菊一般成分

楊（2013）對扁桃斑鳩菊的成分進行了初步分析，包括無機元素、揮發性成分和有機成分。扁桃斑鳩菊中的無機物：Na、Mg、Ca、Al、B、Cu、Ba、Zn、Sr、V、Mo、Ni、Mn 和 Fe 共 14 種無機物。其中 Ca 和 Mg 的含量最高，其次為 Al、Fe 和 Mn，而 Ni 只能定性檢測。在其揮發性成分中，單萜和倍半萜類化合物占總含量的 77%，具有多種生理活性，其中單萜類化合物含量約為 20%，倍半萜類化合物約為 57%。含量最大的三個化合物分別為：4(14),11-桉葉二烯(20.90%)、石竹烯(18.53%)和百里酚(15.07%)（楊，2013）。

扁桃斑鳩菊葉活性成分主要有：皂苷(saponins)、生物鹼(alkaloids)(Muraina et al., 2010)，萜類(terpenes)、類固醇(steroids)、黃酮類(flavonoids)、香豆素類(coumarins)、酚酸類(phenolic acids)、木酚素(lignans)、氧雜蒽酮(xanthones)、蒽醌類(anthraquinone)(Tona et al., 2004)，edotides (Izevbigie, 2003)和倍半萜(sesquiterpenes)(Kupchan et al., 1969)等。目前研究指出，從扁桃斑鳩菊葉已分離得到 5 大類活性成分，分別為 1 種甾醇類化合物(steroidal alcohol)、3 種黃酮類化合物(flavonoids)、10 種甾體皂苷類化合物(steroidal saponins)、12 種脂肪酸類化合物和 6 種倍半萜烯內酯類化合

物 (sesquiterpene lactones ; vernolide, vernodalol, 11,13-dihydrovernodalol, vernodalin, vernomygdin 和 hydroxyvernolide), 共計有 32 種化合物(Luo et al., 2011)。

2.1.3 藥理作用

扁桃斑鳩菊即南非葉，原產於熱帶非洲，具有明確的抗腫瘤效果，在東南亞、臺灣等地民間使用較多。主要是當作蔬菜用，亦是一種藥用植物，被稱為苦葉。在非洲當地將葉用於發燒、防腸蟲，抗瘧藥、潤腸通便的瀉藥、灌腸、祛痰及用於有生育力問題的婦女(Farombi and Owoeye, 2011)。本植物除了上述民間用法外，還可用於瘧疾，糖尿病、腹瀉、性病、肝炎、腸胃病、皮膚病和傷口的治療(Akah & Ekekwe, 1995 ; Bullough & Leary, 1982 ; Hamill et al., 2000 ; Johns et al., 1995 ; Kambizi & Afolayan, 2001 ; Otshudi et al., 2000 ; Riley, 1963)。

自 1969 年開始抗癌研究，發現其氣仿提取物可分離得到 2 個倍半萜烯內酯化合物 Vernodalol 和 Vernomygdin，對體外培養的鼻咽癌細胞有顯著抑制作用(Kupchan et al., 1969)。在 1993 年陸續有相關研究指出，南非葉有防癌、抗癌和抗菌作用 (Jisaka et al., 1993)、具有抗突變作用(Obaseiki-Ebor et al., 1993)、氣仿提取物對白血病細胞具有細胞毒性作用 (Tadesse et al., 1993)。

從 2000 年起，很多研究進行南非葉抗腫瘤機制和有效成分提取的研究，可用於乳癌細胞的抗癌作用，對細胞生長抑制，造成 DNA 斷裂引起 DNA 合成抑制，進而影響細胞膜通透性影響，造成細胞死亡。在水及氯仿萃取物等發現在人類乳腺癌 MCF-7 細胞會干擾 DNA 合成的作用(Izevbigie, 2003 ; Howard et al., 2003);藉由影響 ERKs(extracellular signal-regulated kinases) 的活性，而對人類乳腺癌細胞有抑制作用 (Izevbigie et al., 2004 ; Opata and Izevbigie, 2006)。對亞硝酸鹽所致突變具拮抗作用，而減少胃癌發病率 (Onyesom and Okoh, 2006)。對 MCF-7 細胞有抑制作用(Yedjoa et al., 2008) , 並可抑制人類乳腺癌 BT-549 細胞 DNA 的合成 (Gresham et al., 2008)。

早在 2005 年 Iwalewa 等學者發現扁桃斑鳩菊葉甲醇萃取物具有清除 DPPH 自由基活性，呈現顯著的抗氧化性。接著在小鼠研究中，事前給予葉的水萃物可拮抗 acetaminophen 引起的肝毒性和並可抑制 acetaminophen 引起脂質過氧化作用及氧化壓力(Iwalewa et al., 2006)。Adesanoye 及 Farombi 兩位學者研究指出，扁桃斑鳩菊可藉由誘導抗氧化和 phase 2 enzymes 的作用機制，以防止四氯化碳引起的肝損傷(Adesanoye 及 Farombi, 2010)。Ho 等在 2015 年亦提出水萃取物對酒精引起的肝臟損傷具保護作用，是經增加超氧化物歧化酶(SOD)，亞鐵離子還原能力，並減少肝臟內一氧化氮(NO)和丙二醛(MDA)的含量而具有保肝作用。對脂質過氧化方面，在甲醇萃

取物藉由對超氧化歧化酶(SOD)作用而降低大鼠結腸的 cycasin 誘導所造成的脂質過氧化作用(Lolodi O and Eriyamremu, 2013)。扁桃斑鳩菊抗氧化活性主要是因為含有類黃酮成分，在 Igile 等人的研究指出，主要有三種類黃酮成分：luteolin、luteolin 7-O- β -glucuronoside 和 luteolin 7-O- β -glucoside，其中以 luteolin 抗氧化活性最強(Igile et al., 1994)。另外，在葉甲醇提取物主要含有 12 種必需脂肪酸及黃酮類而有高抗氧化活性(Erasto et al., 2007；Fasakin et al., 2011; Igile et al., 1994)。在神經毒性研究，發現其所含的類黃酮可以穿過血腦屏障而有神經保護作用；大鼠給予甲醇萃取物可保護經 γ -輻射所造成的損傷 (Youdim et al., 2003；Owoeye et al., 2011)。

扁桃斑鳩菊葉提取物除了抗腫瘤及抗氧化相關研究外，亦有研究指出可抗菌、抗瘧疾、降血糖和降血脂等作用。抗菌作用中，vernolide、vernodalol 兩種化合物對革蘭氏陽性菌普遍有效。對革蘭氏陰性菌缺乏抗菌作用，只對沙門氏菌有效。抗真菌試驗中，vernolides 作用比 vernodalol 強 (Akinpelu,1999；Erasto et al., 2006)。抗瘧疾試驗中，從葉和根皮萃取物對小鼠體內抗瘧活性結果顯示葉的效果優於根皮(Masaba, 2000；Abosi and Raseroka, 2003)。在降血糖研究，扁桃斑鳩菊葉與 *Azadirachta indica* 一起合用優於單獨使用時的降血糖效果，其協同作用機制是藉由減少氧化應激壓力(oxidative stress)、胰島素模擬作用(insulin mimetic action)和 β 細胞再生

作用(β -cell regeneration)所致。進一步針對扁桃斑鳩菊葉對糖尿病作用，是藉由同時抑制糖質新生(gluconeogenesis)和葡萄糖氧化增強作用通過戊糖磷酸途徑(pentose phosphate pathway)而有降血糖作用(Atangwho et al., 2012 ; Atangwho et al., 2014)。降血脂研究方面，甲醇萃取物具有降低總膽固醇、三酸甘油酯及低密度脂蛋白並增加高密度脂蛋白含量，及降低脂質過氧化含量 (Adaramoye et al., 2008)。

2.2 自由基與抗氧化介紹

2.2.1 自由基與疾病相關性

生物體內的正常生理過程會產生自由基(Free radicals)，然而，外在因素亦會影響體內自由基產生。人體內本身發展出一套抗氧化系統，包含抗氧化酵素 (antioxidant enzymes) 以及抗氧化物 (antioxidants) 可對抗自由基造成的氧化傷害。當無法清除的自由基過多時則會引起氧化傷害，會開始對身體進行攻擊，攻擊的對象可能是細胞膜上磷脂質、蛋白質酵素、低密度脂蛋白(LDL)、甚至是遺傳物質，最後則會造成細胞變異、傷害甚至導致疾病的發生(Foyer and Fletcher, 2001)。體內存在的自由基被證實與許多疾病有關，包括癌症、關節炎、發炎反應、糖尿病、動脈粥狀硬化、阿茲海默

症、帕金森症、及中風與高血壓等(Caciuttolo et al., 1993 ; Olanow, 1993)。

2.2.2 自由基特性與種類

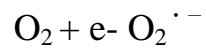
自由基(free radical)指的是任何帶有不成對電子的原子或分子，會攫取附近的原子或分子上的電子，使後者形成另一個自由基，又會攻擊附近的原子或分子，進而引發一連串的連鎖反應(chain reaction) (Halliwell et al., 1995)。人體中典型的自由基種類主要包括有活性氧(ROS, reactive oxygen species)及活性氮(RNS, reactive nitrogen species)，但是活性氧及活性氮並不全都屬於自由基的型態。活性氧即是含有氧原子的自由基，而含有氮原子的則稱為活性氮 (Lander 1997)。另外，還有硫的硫自由基(thiyl radical)、以碳為主的三氯化碳自由基($\text{CCl}_3\cdot$)以及以磷為中心的自由基等(蔡坤志，2002；Fang et al., 2002；Wickens, 2001)。

在一般情況下，生物體正常的生理反應會產生活性氧分子，若暴露在不良的環境下，亦會產生活性氧(ROS)，如：菸害、臭氧、化學藥品、藥物、輻射線、高氧環境、熬夜、情緒低落等生(Aruoma 1998)。自由基與活性氧的種類繁多，其中可歸類五大類對人體的影響最大，如下：

1. 超氧陰離子(superoxide anion radical； $\cdot\text{O}_2^-$)

最初且最常產生的一種 ROS，是由氧分子進行一個氧化還原作用而形

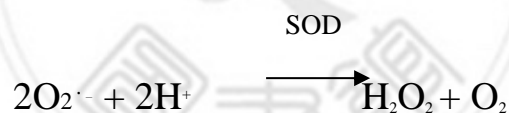
成，超氧陰離子是一個以氧為中心的自由基，即不成對電子是位於氧原子上：



在粒線體的電子傳遞過程及活化的白血球中均會產生超氧陰離子，而白血球是人體內產生最多活性氧物質的細胞(Rosen et al., 1995)。因 $\cdot\text{O}_2^-$ 的半衰期極短，本身很少直接對生物體造成傷害，但其連鎖反應形成的活性氧物質，會對人體產生更嚴重的傷害(Barotosz, 2003)。

2. 過氧化氫(hydrogen peroxide ; H_2O_2)

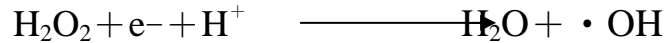
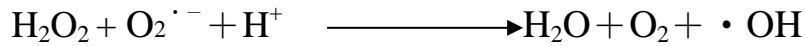
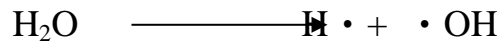
人體內具有超氧歧化酶(superoxide dismutase, SOD)存在於細胞質及粒線體中，能將超氧陰離子轉變生成過氧化氫。



過氧化氫分子結構與水相似，是一種很穩定的活性氧，對細胞及組織的傷害很大，能進入細胞內，和細胞內的金屬離子(Fe^{2+} , Cu^+)交互作用產生更具高活性及傷害性的羥自由基(Ahsan et al., 2003)。

3. 羥自由基(hydroxyl radical ; $\cdot\text{OH}$)

$\cdot\text{OH}$ 是一種活性極強的自由基，當人體接受X-ray、電磁波等放射線時，體內水分子會裂解產生大量的羥自由基($\cdot\text{OH}$)；也可從過氧化氫及超氧陰離子的作用或從其它的電子及原子而來：



·OH會從周遭環境中搶得電子，造成體內脂質過氧化作用，進而傷害細胞，因此將此自由基清除對保護細胞及其各組成分子是很重要。

4.單重態氧((singlet oxygen ; $^1\text{O}_2$)

單重態氧 $^1\text{O}_2$ 是屬於非自由基型態的活性氧物質，比一般氧氣(三重態 $^3\text{O}_2$)更具高能量及活性。極容易和氫反應，造成脂質氧化及形成其他自由基 (Halliwell, 1995)。

5.過氧化脂質(lipid hydroperoxide ; LOOH)

不飽和脂肪酸較飽和脂肪酸對自由基引起的氧化特別敏感。體內細胞膜磷脂質或其他部位之多元不飽和脂肪酸(PUFA, polyunsaturated fatty acids, LH)受到自由基攻擊後產生脂自由基(L·)，並會迅速地與氧分子作用成為脂過氧化物(LOO· or $\text{LO}_2\cdot$)；L·和LOO·兩種自由基被氧化後會造成連鎖反應導致大量的自由基及LOOH產生。過氧化脂質除非遇到終止反應(termination)出現，或是自由基被抗氧化物質作用才能清除(Halliwell, 1994)。

2.2.3 自由基的清除

抗氧化系統分為酵素系統與非酵素系統兩大類，其都具有移除或抑制自由基與活性氧的能力（圖2）。

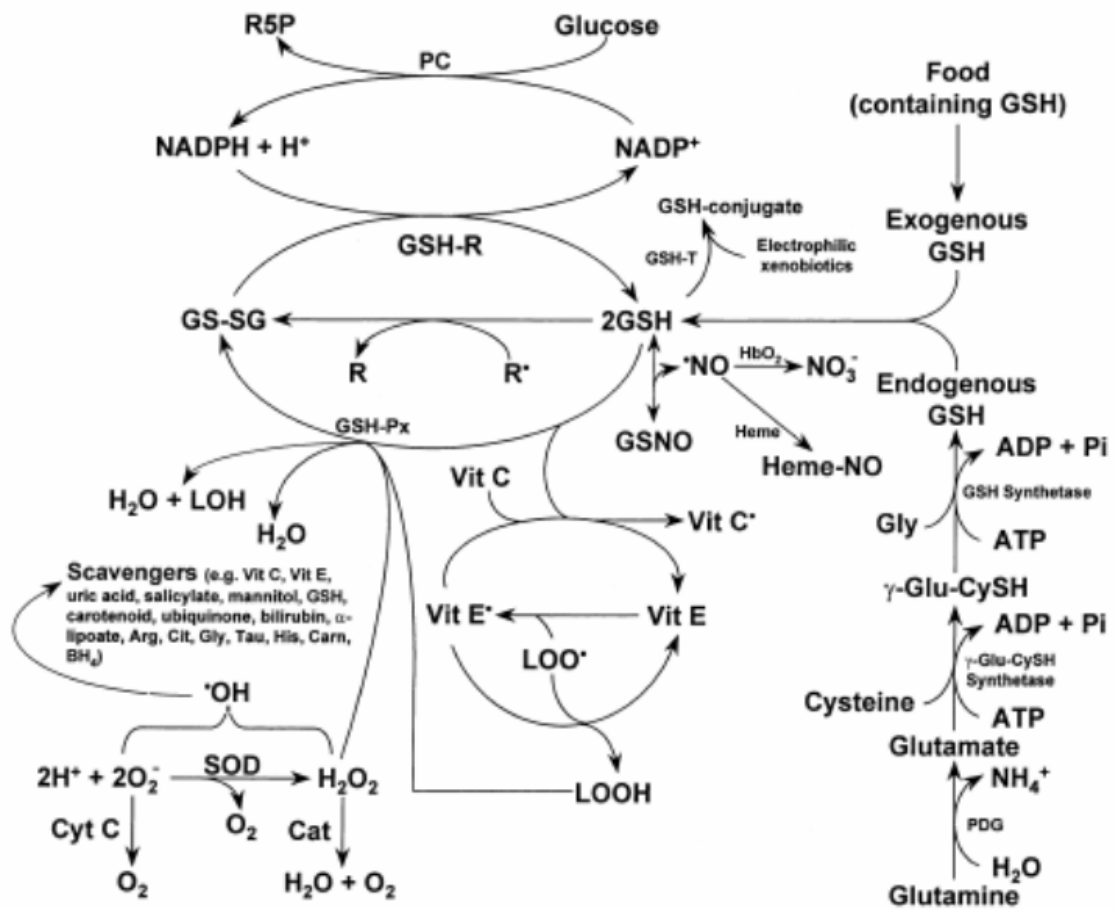


圖 2 哺乳細胞中，氧、氮自由基及其他活性物質移除的途徑

(Fang *et al.*, 2002)

抗氧化酵素系統包括：超氧歧化酶(superoxide dismutase；SOD)、過氧化氫酶(catalase；CAT)、麩胱甘肽過氧化酶(glutathione peroxidase；GSH-Px)等。酵素系統需結合微量元素如鋅、銅、鎂、鐵、砷等，才能進行抗氧化作用。

1. SOD：能將超氧陰離子轉變為過氧化氫。在細胞質中，SOD需鋅(Zn)元素與銅(Cu)元素；而在粒線體中則需有錳(Mn)元素參與反應。
2. Catalase：過氧化氫酶可迅速清除 H_2O_2 轉換成 H_2O 及 O_2 ，此酵素是抗氧化需鐵(Fe)元素，並大多存在於細胞的過氧化物酶體(peroxisome)內，也有一些存在於細胞質、微粒體、粒線體中(Halliwell, 1994；Wickens, 2001)。
3. GSH-Px (Glutathione peroxidase)：和catalase一樣有清除過氧化氫的能力，並可把油脂或非油脂過氧化物還原。普遍存在於細胞質、粒線體以及血漿，是一種人體內非常重要的抗氧化酵素。GSH-Px 需要硒(selenium)元素進行抗氧化作用，故體內硒元素含量不足時會影響其抗氧化活性。GSH-Px會將還原態的麩胱甘肽(glutathione；GSH)氧化為氧化態的麩胱甘肽硫化物(glutathione disulfide；GSSG)而清除 H_2O_2 。而麩胱甘肽還原酶(glutathione reductase；GSH-R)則以NADPH 為還原力將GSSG 再生成GSH。因此，若是NADPH無法被生成，則會抑制GSH-Px 抗氧化活性系統。此現象在蠶豆

症患者發生，因其缺乏G6PD(glucose-6-phosphate dehydrogenase)而影響NADPH生成，最後紅血球細胞膜遭氧化破裂(Hatherill et al., 1991)。

抗氧化非酵素系統可大約分為水溶性及油溶性兩類抗氧化物。水溶性者如：抗壞血酸(ascorbic acid)、uric acid、麩胱甘肽(glutathione；GSH)等；油溶性如 β -胡蘿蔔素(β -carotene)、ubiquinol-10、維生素E(tocopherol)、melanin等(Bast et al., 1991)。抗氧化物是可清除自由基的物質，並在自由基對人體造成傷害之前有效的清除自由基。下列針對常見的三大抗氧化物質進行介紹：

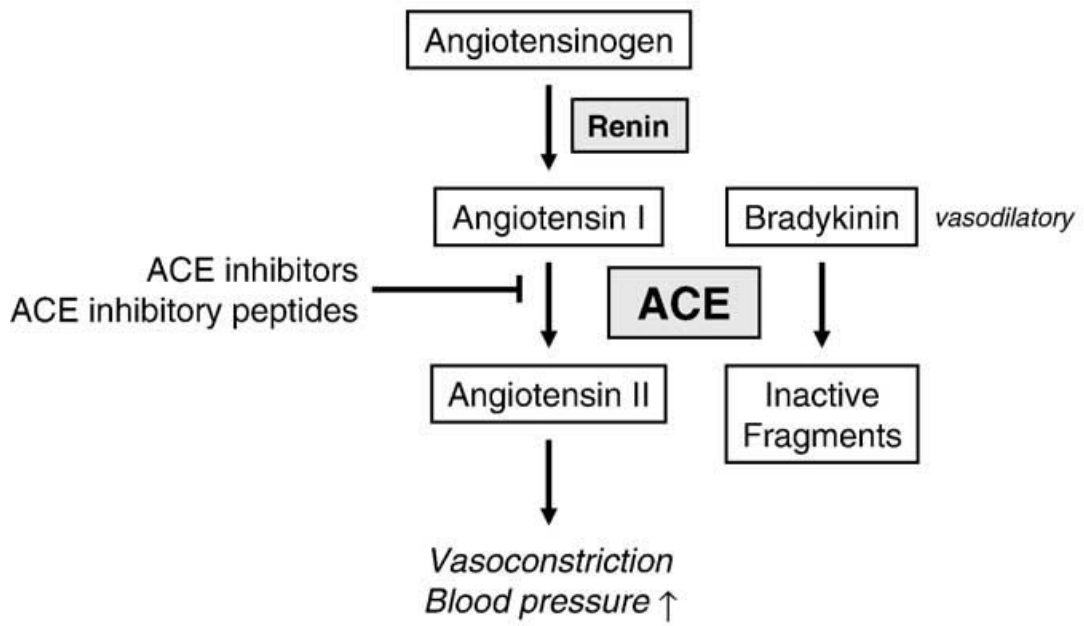
1. 抗壞血酸(ascorbic acid)：即維生素C，其抗氧化力就是因為維生素C是電子的提供者，可提供電子將超氧陰離子還原形成過氧化氫及氧化態抗壞血酸(dehydroascorbate；DHAA)。抗壞血酸亦能將過氧化氫有效的清除轉化成DHAA及水，抑制細胞內過氧化氫的累積，因此維生素C可保護細胞和組織內的水溶性化合物以避免被氧化(Frei et al., 1989)。
2. 維生素E：為抑制油脂過氧化最有效的酚類抗氧化物，也是存在於細胞膜及脂蛋白上主要的脂溶性抗氧化物。維生素E的抗氧化能力主要為提供其C6位置酚基上的氫原子(phenolic hydrogen)進行還原作用，而在提供電子後，自身會形成帶有不成對電子的自由基，但隨後該電子經過自身共振過程則又形成穩定的狀態，因此維生素E可作為終止鏈鎖反應的抗

氧化物質。維生素E可抑制脂質過氧化基(lipid peroxy radical)產生活性氧，預防磷脂膜上的不飽和脂肪酸被氧化及膜的損傷(Fang et al., 2002；Kaur and Kapoor, 2001)。

3. 類胡蘿蔔素(carotenoids): 具有吸光性質及光保護(photo-protection)作用，是一種脂溶性抗氧化物。類胡蘿蔔素可清除單重態氧 $^1\text{O}_2$ ，主要是其特有的共軛雙烯結構(conjugated dienes)可以直接與 $^1\text{O}_2$ 反應，形成較穩定的三重態氧($^3\text{O}_2$)，防止其他破壞反應的發生力(Diplock 1991)。 β -胡蘿蔔素的抗氧化活性與氧的濃度有關，隨氧的濃度增加而降低，在低氧時則活性較高。大部分抗氧化酵素及其他抗氧化物質大都是在正常氧濃度下最為有效，所以 β -胡蘿蔔素可以補足其他抗氧化物如維生素E及維生素C的作用(朱燕華，2001)。

2.3 血管收縮素轉化酶的血壓調控與作用機制

人體內調控血壓可透由腎素-血管收縮素系統 (renin-angiotensin system, RAS)來進行，藉由血管收縮素轉化酶(Angiotensin I Converting Enzyme，ACE)，為含有鋅離子的金屬蛋白酶(metalloprotease)，普遍存在身體各組織及細胞中。ACE 在 RAS 是主要的調控血壓的機轉，是將未活化型態的血管收縮素 I (Angiotensin-I，Ang-I) 轉化成活化型態的血管收縮素 II (Angiotensin-II，Ang-II)則可以使血管收縮，血壓上升，並促進腎上腺皮質釋放醛固酮，增加腎臟對鈉離子的吸收並增加血液容積，因而使血壓升高。而血管舒張素(bradykinin) 亦會被 ACE 水解，切除其羧端的 Phe-Arg，使得 bradykinin 失去活性，失去舒張血管的功能。ACE 具有兩個活性作用區域，可提供 ACE 抑制胜肽或 ACE 抑制劑藥物與酵素的活性區域親和力較強，親合度比 angiotensin I 或 bradykinin 強，而且亦不易從 ACE 活性區釋放，則抑制血管收縮素I轉化成活性型血管收縮素II 而可達到降低血壓作用(圖 3, Erdmann et al., 2008)。已知目前合成的 ACE 抑制劑已經長期被用作抗高血壓藥。且近年來，來自食物的蛋白質也被證實為 ACE 抑制胜肽(ACE inhibitory peptides)的來源，這些食物來源的胜肽已受到相當重視，它們具有預防和治療高血壓的效能 (Vercruysse et al., 2005)。



(Erdmann et al.,2008)

圖 3 腎素-血管收縮素系統 (Renin-Angiotensin System, RAS)

第三章 材料與方法

3.1 實驗材料

3.1.1 扁桃斑鳩菊來源

Vernonia amygdalina (VA) 的莖、葉乾燥鮮品粉末各 300 g (取自屏東車埕煌儒藥園)。

3.1.2 實驗試劑與儀器

1. 實驗試劑：

Potassium hexacyanoferrate (III) ; Ferric chloride, anhydrous ; Ferrous chloride, tetrahydrate ; Ferro Zine ; Potassium acetate ; Sodium carbonate anhydrous ; Sodium phosphate monobasic ; Dibasic potassium phosphate ; Trichloroacetic acid ; 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ; Nicotinamide adenine dinucleotide(NADH) ; Nitroblue tetrazolium (NBT) ; Phenazine methosulfate (PMS) ; Methanol ; Gallic acid ; Quercetin ; Alumium nitrate, 9-hydrate ; Folin-Ciocalteu's phenol reagent ; Trifluoroacetic acid ; HIPURYL-HIS-LEUFREE BASE (HHL) ; Angiotensin Converting Enzyme ; Amino Acids Mixture Standard Solution, Type H

2. 儀器：

- (1) 研磨粉碎機：購自 RT 型號: RT-08
- (2) 恆溫水浴槽：購自 YIH DER 型號: BH-230D
- (3) 電動天秤：購自 Precisa 型號 :BJ 1000C
- (4) 微量電動天秤：購自 AND 型號 :GR-200
- (5) 冷凍乾燥機：購自 EYELA 型號 :FDU-1100
- (6) 冷卻循環機：購自 AND 型號: CR-200
- (7) 減壓濃縮機：購自 EYELA
- (8) 高速離心機：購自 HITACHI 型號:CF 15R II
- (9) 高效液相層析儀：購自 HITACHI-PUMP 型號:L-2130/AUTOSAMPLE
L-2200/UV Detector L-2400
- (10) 分光光度計：購自 Thermo 型號:EVOLUTION 201
- (11) 胺基酸分析儀：購自 HITACHI 型號:L-8900

3.2 實驗設計

以扁桃斑鳩菊的葉及莖兩部位為主要研究材料，分別以水、95%酒精及乙酸乙酯三種不同溶劑進行抽提。將所得不同的萃取物進行功能性評估包含抗氧化活性及抑制血管收縮素活性。抗氧化活性試驗有清除 DPPH 自由基、螯合亞鐵離子能力、還原能力及超氧陰離子清除能力四項測試。另外，為更瞭解試驗樣品的抗氧化能力來源，則採測定花青素、總酚類及類黃酮含量的測試。另外，對不同萃取物進行胺基酸含量的測定（圖 4）。



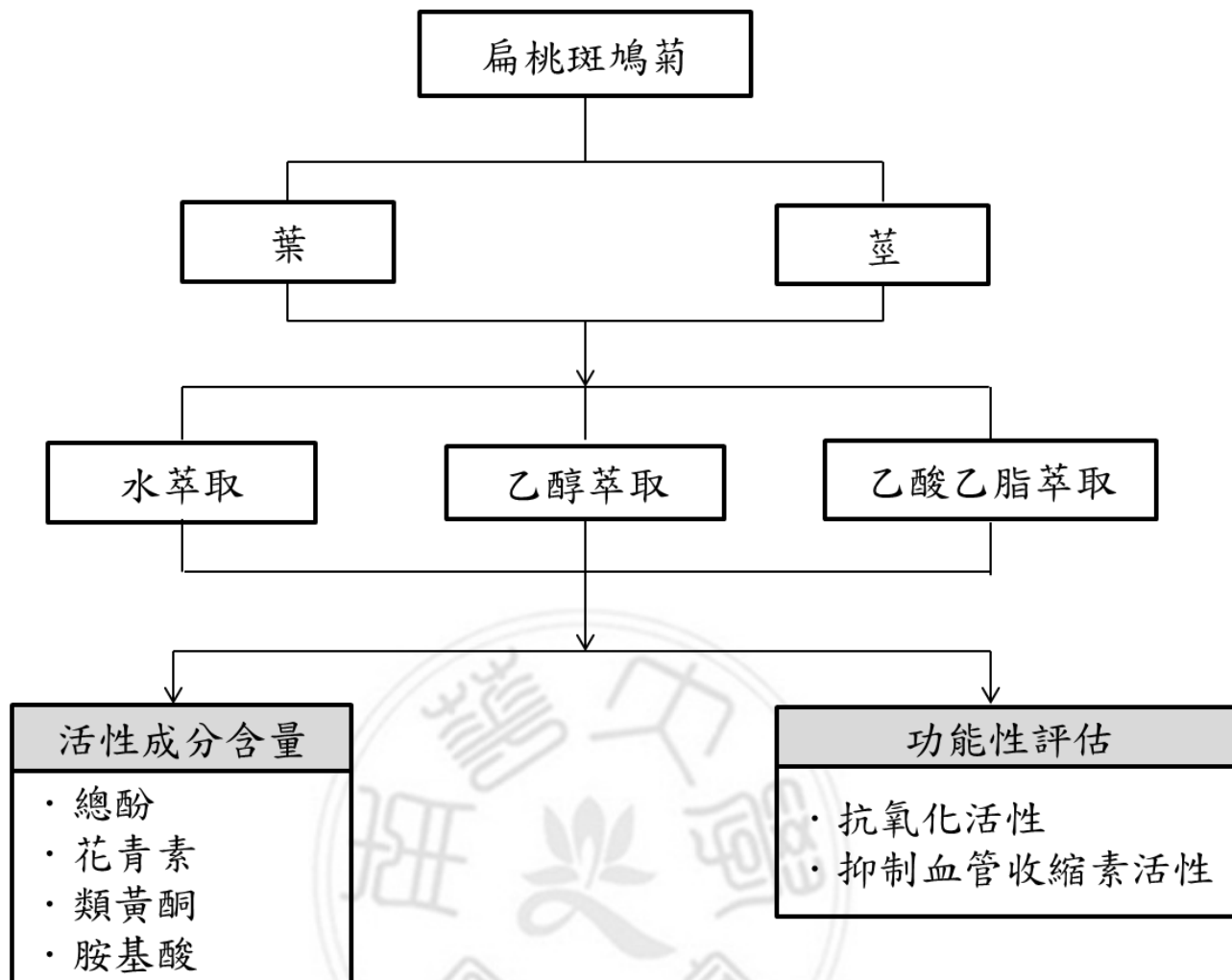


圖 4 實驗架構

3.3 實驗方法

3.3.1 扁桃斑鳩菊葉子及莖萃取方法

(1) 扁桃斑鳩菊葉子及莖的水萃取方法

取扁桃斑鳩菊葉子及莖乾品以小型的粉碎機粉碎，精稱 100 g 粉末，加入純水 500 mL，加熱至迴流，保持溫度 100 °C 反應 2 小時，過濾，收集濾液，重複萃取二次，合併二次濾液，以減壓濃縮機，濃縮去除水至乾，以冷凍乾燥儲存。本研究每次的實驗皆重複二次，取其平均值。

(2) 扁桃斑鳩菊葉子及莖的乙醇萃取方法

取扁桃斑鳩菊葉子及莖乾品以小型的粉碎機粉碎，精稱 100 g 粉末，加入乙醇 500 mL，加熱至迴流，保持溫度 80 °C 反應 2 小時，過濾，收集濾液，重複萃取二次，合併二次濾液，以減壓濃縮機，濃縮去除乙醇至乾，以冷凍乾燥儲存。本研究每次的實驗皆重複二次，取其平均值。

(3) 扁桃斑鳩菊葉子及莖的乙酸乙酯萃取方法

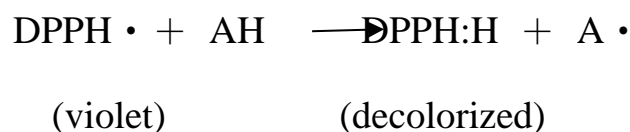
取扁桃斑鳩菊葉子及莖乾品以小型的粉碎機粉碎，精稱 100 g 粉末，加入乙醇 500 mL，加熱至迴流，保持溫度 80 °C 反應 2 小時，過濾，收集濾

液，重複萃取二次，合併二次濾液，以減壓濃縮機，濃縮去除乙酸乙酯至乾，以冷凍乾燥儲存。本研究每次的實驗皆重複二次，取其平均值。

3.3.2 抗氧化測定方法

(1) 清除 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 自由基能力

參考 Lin (2008) 之方法加以修正，取 5 mL 不同濃度之扁桃斑鳩菊萃取物，加入 1 mL 之 0.2 mM DPPH 甲醇溶液，混合靜置 30 分鐘，於波長 517 nm 測其吸光值。DPPH 是一穩定的自由基，在波長 517 nm 下會呈現紫色，當 DPPH 與抗氧化成分提供的氫質子結合時，紫色會慢慢褪去，藉以計算出捕捉效應，紫色褪去越多，代表抗氧化劑提供氫質子的能力愈高，具有較良好之抗氧化力。DPPH 之甲醇溶液於 517 nm 下較強吸光值，若 DPPH 自由基被抗氧化物質清除時則吸光值降低，因此吸光值越低表示樣品清除能力越強。其反應如下：



$$\text{清除率(\%)} = \left[\frac{\text{A}_{517 \text{ nm, blank}} - \text{A}_{517 \text{ nm, sample}}}{\text{A}_{517 \text{ nm, blank}}} \right] \times 100$$

A_{517 nm, sample}: 樣品於 517 nm 的吸光值; A_{517 nm, blank}: 空白組於 517 nm 的吸光值。

(2) 亞鐵離子螯合能力

參考 Lin (2008) 之方法加以修正，取 5 mL 不同濃度之扁桃斑鳩菊萃取物，加入 2 mM FeCl₂ 溶液 0.1 mL 及 5 mM ferrozine 溶液 0.2 mL，反應 10 分鐘，於波長 562 nm 測其吸光值。Fe²⁺ 與 ferrozine 所形成的複合物在 562 nm 較強的吸收，其吸光值越低，表示亞鐵離子螯合能力越強。

$$\text{清除率(\%)} = \left[\frac{(A_{562 \text{ nm, blank}} - A_{562 \text{ nm, sample}})}{(A_{562 \text{ nm, blank}})} \right] \times 100$$

A_{562 nm, sample}: 樣品於 562 nm 的吸光值; A_{562 nm, blank}: 空白組於 562 nm 的吸光值。

(3) 還原力測定

參考 Oyaizu (1986) 方法加以修正，取 10 mL 不同濃度之扁桃斑鳩菊萃取物，加入 2.5 mL 之 0.2 M pH 6.6 磷酸鈉緩衝溶液及加入 2.5 mL 之 1% 赤血鹽溶液 (potassium ferricyanide) 溶液，於 50 °C 水浴 20 分鐘後冷卻，再加入 2.5 mL 10% 之三氯醋酸 (trichloroacetic acid) 溶液，於 3000 rpm 下離心 10 分鐘，取上清液 5 mL 再加入 5 mL 蒸餾水與 1 mL 0.1% 氯化鐵 (ferric chloride, FeCl₃ · 6H₂O) 溶液，混合靜置 10 分鐘，於波長 700 nm 測其吸光值。樣品藉由電子的提供而將 Fe³⁺ 還原成 Fe²⁺ 之能力，當將 Fe³⁺ 還原成 Fe²⁺ 的能力愈強。

還原劑 (reductant) 是指可將其他分子予以還原而本身氧化的物質，

亦即能提供氫或供給電子的物質。本實驗還原力的測試則是以普魯士藍 ($\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$, Prussian blue) 的生成量來判定還原力的高低，主要的原理是當試驗樣品將赤血鹽 ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) 還原成黃血鹽 ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$) 後，再利用 Fe^{3+} 與之反應形成普魯士藍，經由檢測 700 nm 波長下的吸光值來代表還原力的強弱；吸光值愈高，則代表還原力愈強。其反應式如下：



(4) 超氧陰離子清除能力

參考 Gülcin 等人(2004)方法加以修正，以 0.1 M phosphate buffer (pH : 7.4) 配置 120 μM phenazine methosulfate (PMS)、936 μM 之 nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)、300 μM 之 Nitroblue tetrazolium (NBT)。取 1 mL 的樣品溶液(1 mg/mL)依序與等體積之 PMS、NADH、NBT 溶液均勻混合，反應 5 分鐘，於波長 560 nm 測其吸光值。清除超氧陰離子能力測定原理為在非酵素系統中，藉由 PMS 與 NADH 作用生成超氧陰離子，再進一步將 NBT 還原成藍黑色產物，吸光值越低表示樣品清除超氧陰離子之能力越強。

3.3.3 花青素、總酚及類黃酮測定方法

(1) 花青素含量測定

根據Padmavat等人(1997)方法，取樣品2 g 萃取物，用10 mL 中含1 % 之鹽酸之甲醇進行攪拌萃取3分鐘，以3000 rpm 離心15分鐘，取其上清液，之後再加入10 mL含1 %之鹽酸之甲醇攪拌萃取30分鐘，以3000 rpm 離心15分鐘，合併上清液分別於657、530 nm 測其吸光值，其吸光係數為31.6 mM。

$$\mu\text{mole/g} = (A_{530} - 0.33 A_{657}) / 31.6 \times \text{萃取液體積} \times \text{稀釋倍數} / \text{樣品重量(g)}$$

(2) 總酚含量測定

此分析方法則參考 Julkunen 等人(1985)方法之加以修正，測定總酚類化合物含量是以沒食子酸(gallic acid)當為標準品。將樣品離心 (3500 ×g，20 min)後取 0.1 mL 上清液，加蒸餾水至 4 mL，再加入 1 mL 之 Folin-Ciocalteu phenol(1 N) reagent 搖勻，最後加入 2.5 mL 20 % (w/v)碳酸鈉溶液，充分混合後靜置 20 分鐘，以分光光度計測定樣品在 765 nm 下之吸光值。

(3) 類黃酮含量測定

採 AlCl_3 呈色法原理，分析流程則參考 Jia 等人(1999) 方法之加以修正，

取稀釋 10 倍後之萃取樣品 0.5 ml 加入 1.5 ml 95 % 乙醇，再加入 0.1 ml (10 %) AlCl_3 、0.1 ml (1M) CH_3COOK 與 2.8 ml 去離子水，室溫下靜置 40 分鐘，測其 415 nm 吸光值。利用槲皮素(Quercetin)製作之標準曲線計算樣品中之類黃酮含量，並以槲皮素當量(Quercetin equivalents, QE %, w/w)表示樣品之類黃酮含量。

3.3.4 血管收縮素轉化酶抑制活性之測定

參考 Miguel 等人(2004)方法加以修正，取 30 μL 之 5.0 mM (HIPURYL-HIS-LEUFREE BASE ; HHL)溶液與 10 μL 扁桃斑鳩菊萃取液混合，於 37 $^\circ\text{C}$ 水浴 5 分鐘，加入 20 μL 之 ACE 溶液(100 milliunits/mL)混合，於 37 $^\circ\text{C}$ 水浴 60 分鐘，再加入 50 μL 之 2 M HCl 終止反應，以 C18-Column(新丹 LUNA 5U C18(2)250 \times 4.6mm)置於 HPLC 進行分析，注入量 20 μL ，沖提液：含 45 % Methanol、0.1 % TFA (Trifluoroacetic acid)，所需時間為 25 min，流速為 1 mL/min，UV 偵測器 228 nm。測定對 ACE 的抑制能力之後，將濃度取對數與抑制能力作圖，求得迴歸曲線，並依此迴歸方程式，求得抑制 ACE 活性 50 % 所需之萃取物濃度，即為 IC_{50} 值。因此，數值越低表示抑制 ACE 的效果越好。

3.3.5 胺基酸測定

根據 Horie 方法(2000)加以修正，螺旋試管中添加 0.1 g 樣品及 10 mL 之 6 N HCl，將試管中空氣置換成氮氣，防止胺基酸氧化，於 110 °C 酸水解 22 小時，使樣品中的蛋白質完全水解成胺基酸，之後進行常溫冷卻，以 60 °C 減壓濃縮至乾，再以 5 mL 之 0.02 N HCl 回溶，最後用 0.45 μM 過濾膜酸水解之樣品，利用胺基酸分析儀分析各種不同萃取條件之萃取物胺基酸的含量。

3.3.6 統計方法

本論文實驗結果以平均值±標準偏差 (Mean±SD) 表示，使用 SPSS 12.0 軟體進行統計分析，以 ANOVA 程式做變異分析，並且以 Duncan's multiple range test ($p < 0.05$) 比較平均值之顯著差異。

第四章 結果與討論

4.1 扁桃斑鳩菊葉及莖萃取率

將扁桃斑鳩菊的葉子及莖依不同的溶劑：水、酒精及乙酸乙酯進行萃取，由表 1 結果顯示，以水萃取物收率最高，莖的收率 27.2 %。葉子的水萃取物收率 24.9 %；酒精萃取物收率居次，葉子層 19.7 %、莖萃取物為 8.7 %；葉子乙酸乙酯萃取物 7.9 %，收率最少為莖乙酸乙酯萃取物，只有 1.1 %。由收率結果顯示，扁桃斑鳩菊葉子及莖萃取物主要是極性較高物質，不管葉或莖絕大部分的成分存在水及酒精中，其中又以水的萃取物所含的量為最高，其次為酒精萃取物，最少為乙酸乙酯萃取物。

表 1 扁桃斑鳩菊葉及莖萃取物回收率

部位	萃取層	每 100 g		
	Water	EtOH	乙酸乙酯	
葉子	24.9 ± 0.4	19.7 ± 0.1	7.9 ± 0.2	
莖	27.2 ± 1.6	8.7 ± 0.9	1.1 ± 0.0	

4.2 抗氧化活性測定

(1) DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 自由基清除能力

在不同溶劑的扁桃斑鳩菊萃取物，表 2 結果顯示，在不同濃度 (0.1、0.2、0.5、1 及 2 mg / mL)，對 DPPH 自由基清除力隨濃度增加而增加。在葉的水萃取物隨濃度增加對 DPPH 自由基清除能力，從 7.05、21.16、55.80、79.96 至 9.43 %；莖的水萃取物在相同濃度下對 DPPH 清除率分別為 0.40、2.75、12.77、24.69 及 46.71 %。扁桃斑鳩菊水萃取物，葉的清除力遠高於莖的萃取物。另外，酒精萃取物對 DPPH 清除力方面，莖的清除力高於葉的萃取物，於 0.1 mg / mL 中葉酒精萃取物為 12.11 %，遠低於莖酒精萃取物的 35.20 %。在三種不同濃度 (0.5、1 及 2 mg / mL) 的莖、葉酒精萃取物 DPPH 清除率則差不多，其中又以莖比葉酒精萃取物清除率高。在乙酸乙酯萃取物中，隨濃度對 DPPH 清除率亦增加，0.1 mg / mL 莖萃取物的清除率 (16.15 %) 效果相當於 0.5 mg / mL 葉萃取物 (14.87 %)，且在同濃度的萃取物中莖遠比葉的萃取物 DPPH 清除率高甚多。

綜合以上數值及表 3 對 DPPH 清除力之 EC_{50} 顯示，扁桃斑鳩菊酒精萃取物對 DPPH 自由基清除能力比水層及乙酸乙酯層明顯高，其中以莖酒精層 (EC_{50} : 0.52 mg/mL) 最高，其次為莖乙酸乙酯層 (EC_{50} : 0.68 mg/mL)、葉酒精層 (EC_{50} : 0.78 mg/mL)、葉水層 (EC_{50} : 0.87 mg/mL)、葉乙酸乙酯

層 (EC_{50} : 1.68 mg/mL)，清除力最弱的為莖的水層萃取物 (EC_{50} : 2.10 mg/mL)，並觀察即使在 2 mg / mL 最高濃度下，葉的乙酸乙酯萃取物及莖的水萃取物，其對 DPPH 自由基清除作用皆少於 60% (圖 5)。



表 2 扁桃斑鳩菊不同萃取物清除 DPPH 自由基的能力

	Scavenging effects (%)				
	0.1 mg/mL	0.2 mg/mL	0.5 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL
葉-Water	7.05±0.45 ^c	21.16±0.13 ^c	55.80±3.16 ^c	79.96±0.36 ^c	79.43±1.11 ^c
莖-Water	0.40±0.34 ^a	2.75±0.22 ^a	12.77±0.07 ^a	24.69±0.20 ^a	46.71±0.05 ^a
葉-95% EtOH	12.11±0.01 ^d	23.67±0.36 ^d	56.54±0.82 ^c	84.38±0.08 ^d	85.07±0.27 ^d
莖-95% EtOH	35.20±0.82 ^f	43.90±0.58 ^f	67.70±0.27	88.59±0.04 ^e	88.74±0.11 ^e
葉-乙酸乙酯	1.71±0.0 ^b	4.84±0.90 ^b	14.87±0.15 ^b	30.94±0.54 ^b	58.97±0.62 ^b
莖-乙酸乙酯	16.15±0.57 ^e	30.94±0.54 ^e	70.33±0.18 ^e	85.16±0.02 ^d	85.85±0.02 ^d

Values in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

表 3 扁桃斑鳩菊不同萃取物對 DPPH 清除力之 EC₅₀

萃取物	EC ₅₀ (mg/mL)
葉-Water	0.87
莖-Water	2.10
葉-95% EtOH	0.78
莖-95% EtOH	0.52
葉-乙酸乙酯	1.68
莖-乙酸乙酯	0.68

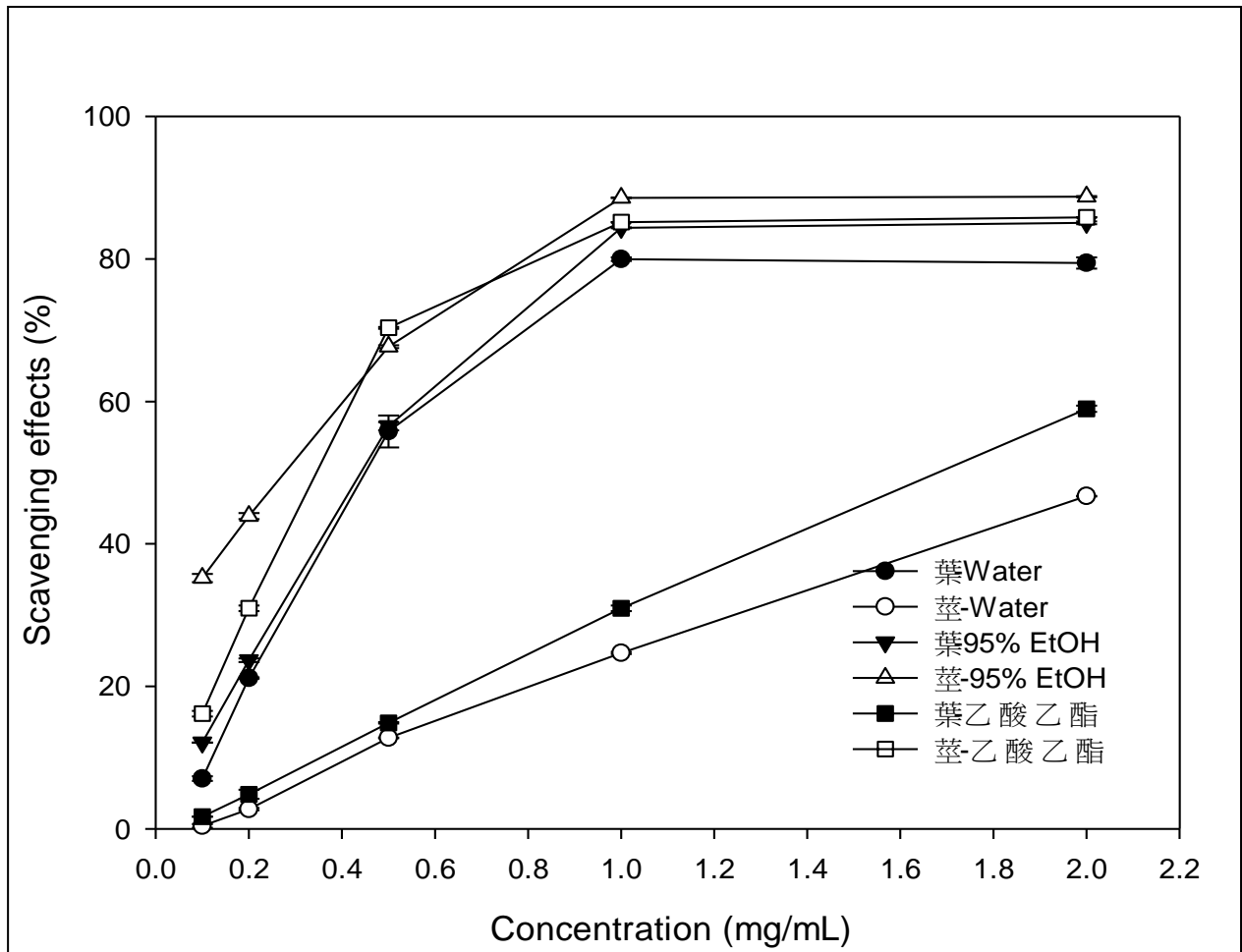


圖 5 扁桃斑鳩菊不同萃取物對 DPPH 清除作用之百分比

(2) 金屬螯合能力

金屬離子可將脂質催化造成脂質過氧化，只要少量的金屬離子存在就會加速脂質過氧化的反應。因此，若能螯合體內金屬離子，則能減緩脂質過氧化的程度。其原理為加入試驗樣品與亞鐵離子(Fe^{2+})反應，再加入 ferrozine 與亞鐵離子有特殊結合能力而呈現紫紅顏色，在 562 nm 下有最大吸光值；若試驗樣品能有效螯合亞鐵離子，則和 ferrozine 作用的游離亞鐵離

子就會減少，因此吸光值愈低，則表示試驗樣品能抑制脂質過氧化而具抗氧化力。扁桃斑鳩菊萃取物對亞鐵離子螯合的能力（表4），在此不同溶劑萃取物中會隨濃度增加而提升對亞鐵離子的螯合能力。在水萃取物(0.1 mg/mL)中葉萃取物的作用是莖的六倍多，水萃取物濃度增加而增加對亞鐵離子螯合能力，葉的萃取物（13.37%）則優於莖（2.49%），但螯合能力皆是偏低的。在酒精萃取物中隨濃度增加其亞鐵離子螯合能力同步增加，在0.1 mg/mL濃度下葉的螯合能力為22.3 %，莖為16.57 %；在0.2 mg/mL濃度下葉的螯合能力為30.6 %，莖為25.47 %；在0.5 mg/mL濃度下葉的螯合能力為65.84 %，莖為50.93 %；1 mg/mL的葉及莖萃取物效力差不多，各為70.58及71.66 %；在2 mg/mL濃度下對亞鐵離子螯合能力達到最高比水及乙酸乙酯萃取物都高，其葉的螯合力為81.04 %，莖為77.49 %，整體上酒精萃取物中以葉的螯合力優於莖。在乙酸乙酯萃取物中，在葉萃取物在0.1、0.2 mg/mL萃取物對亞鐵離子沒有螯合能力，但從0.5 mg/mL即有螯合能力增加為6.18 %，而莖萃取物在0.2 mg/mL才開始具亞鐵離子螯合能力為2.39 %，在2 mg/mL則達到66.83 %，顯示莖乙酸乙酯萃取物螯合亞鐵離子能力優於葉。在表5對亞鐵螯合能力之 EC_{50} 及圖6中扁桃斑鳩菊萃取物對亞鐵離子螯合能力，酒精萃取物螯合力為最強，優於水及乙酸乙酯萃取物。排序以葉酒精萃取物效果最強（ EC_{50} 為0.77 mg/mL），其次為莖酒精萃取物（ EC_{50} 為0.90

mg/mL)、葉水萃取物 (EC₅₀為1.12 mg/mL)、莖乙酸乙酯萃取物 (EC₅₀為1.33 mg/mL)、莖水萃取物 (EC₅₀為1.56 mg/mL)。最差為葉的乙酸乙酯萃取物 (EC₅₀為2.08 mg/mL)。

綜合上述結果顯示，扁桃斑鳩菊葉及莖的三種溶劑萃取物對亞鐵離子螯合能力，皆隨濃度增加而提升對亞鐵離子螯合能力。在水及酒精萃取物中，葉比莖對亞鐵離子螯合能力強，但在乙酸乙酯萃取物則以莖的螯合能力較好。

表 4 扁桃斑鳩菊不同萃取物螯合亞鐵離子的能力

	Chelating activity (%)				
	0.1 mg/mL	0.2 mg/mL	0.5 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL
葉-Water	13.37±1.05 ^b	25.86±0.18 ^c	45.18±0.35 ^d	57.75±0.26 ^d	67.89±0.27 ^c
莖-Water	2.49±0.62 ^a	5.80±0.09 ^b	21.23±0.49 ^b	40.48±0.14 ^b	58.85±0.25 ^b
葉-95% EtOH	22.30±0.12 ^d	30.60±0.06 ^d	65.84±0.79 ^f	70.58±0.91 ^e	81.04±0.96 ^f
莖-95% EtOH	16.57±1.83 ^c	25.47±0.73 ^c	50.93±1.04 ^e	71.66±0.05 ^e	77.49±0.15 ^d
葉-乙酸乙酯	-	-	6.18±0.59 ^a	17.16±0.97 ^a	51.15±0.81 ^a
莖-乙酸乙酯	-	2.39±0.57 ^a	24.99±0.29 ^c	52.14±1.05 ^c	66.83±1.55 ^c

- : not effects

Values in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

表 5 扁桃斑鳩菊不同萃取物對亞鐵螯合作用之 EC₅₀

萃取物	Fe ²⁺ Chelating activity -EC ₅₀ (mg/mL)
葉-Water	1.12
莖-Water	1.56
葉-95% EtOH	0.77
莖-95% EtOH	0.90
葉-乙酸乙酯	2.08
莖-乙酸乙酯	1.33

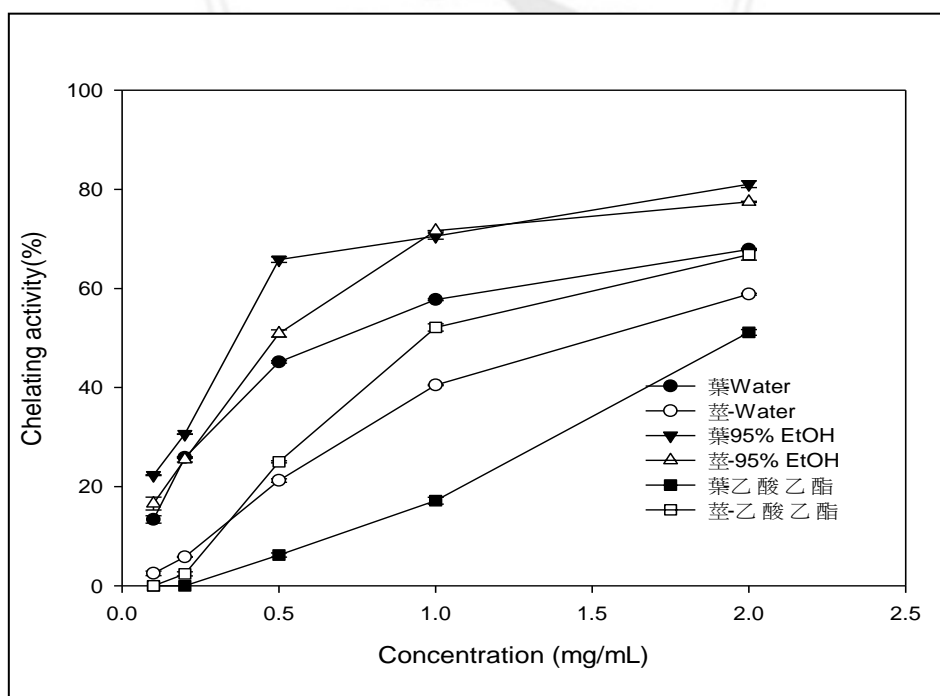


圖 6 扁桃斑鳩菊不同萃取物對亞鐵螯合能力之百分比

(3) 還原力測定

還原力主要以普魯士藍 (prussian blue) 生成量為指標，當赤血鹽被樣本還原為黃血鹽 (potassium hexacyanoferrate(II)) 後，再與三價鐵離子反應生成亞鐵氰化鐵 (ferric ferrocyanide)，即普魯士藍，並以分光光度計於 700 nm 波長下測定吸光值吸光值愈高代表還原力愈強，可當抗氧化活性的重要指標。

扁桃斑鳩菊葉及莖以不同溶劑萃取物對還原力的影響可以從吸光值的測得，吸光值越高表示還原能力越強。利用五種濃度分別為 0.1、0.2、0.5、1 及 2 mg/mL，測定其還原力，在表 6 中結果顯示，在三種溶劑萃取物中其吸光值在不同濃度中隨濃度而增加，其還原力亦增加。在水萃取物中以葉的吸光值高於莖；在酒精萃取物中以莖還原力略高於葉，兩者的還原力相當接近；在乙酸乙酯萃取物中，以莖的萃取物吸光值高於葉。從圖 7 中還原力作用，以酒精萃取物為最佳，而莖水萃取物及葉的乙酸乙酯萃取物為最差，但兩者的還原力相差不多。以上結果顯示，扁桃斑鳩菊葉及莖以不同溶劑萃取物皆會增加還原力，其中以酒精萃取物的還原力為最強。

表 6 扁桃斑鳩菊不同萃取物還原力吸光值

	Absorbance at 700 nm				
	0.1 mg/mL	0.2 mg/mL	0.5 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL
葉-Water	0.33±0.0 ^b	0.63±0.0 ^b	1.32±0.02 ^b	1.81±0.0 ^c	2.43±0.0 ^d
莖-Water	0.10±0.0 ^a	0.18±0.0 ^a	0.44±0.0 ^a	0.85±0.0 ^a	1.44±0.0 ^a
葉-95% EtOH	0.41±0.02 ^d	0.76±0.03 ^c	1.75±0.00 ^b	2.24±0.02 ^f	2.31±0.01 ^c
莖-95% EtOH	0.40±0.0 ^d	0.83±0.01 ^d	1.81±0.03 ^b	2.25±0.0 ^f	2.33±0.01 ^c
葉-乙酸乙酯	0.10±0.0 ^a	0.20±0.0 ^a	0.48±0.0 ^a	0.89±0.0 ^b	1.55±0.01 ^b
莖-乙酸乙酯	0.38±0.0 ^c	0.77±0.0 ^c	1.46±0.0 ^b	2.17±0.0 ^d	2.28±0.0 ^c

Values in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

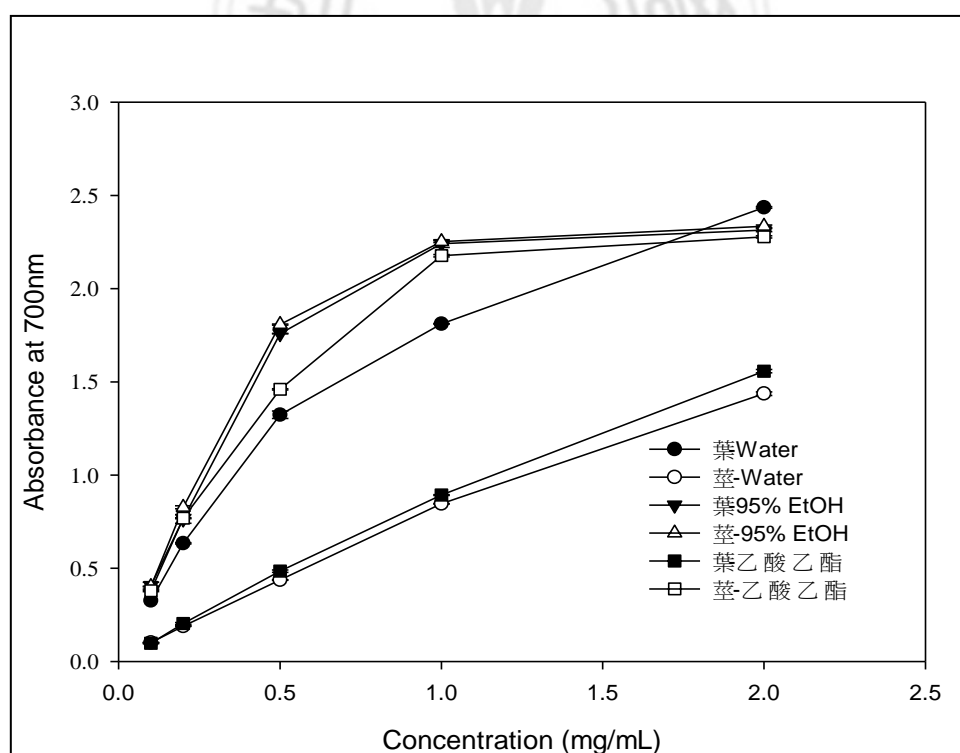


圖 7 扁桃斑鳩菊不同萃取物的還原力吸光值之變化

(4) 超氧陰離子清除能力

超氧陰離子最初且最常產生的一種活性氧 (ROS)，接觸到活性氧導致正常細胞之功能的損壞 (Barotosz, 2003)。清除超氧陰離子能力測定原理為在非酵素系統中，藉由 PMS 與 NADH 作用生成超氧陰離子，再進一步將 NBT 還原成藍黑色產物，吸光值越低表示樣品清除超氧陰離子之能力越強。

在表 7 扁桃斑鳩菊水萃取物，葉在 0.5 mg/mL 才具有清除超氧陰離子抑制能力 31.91 %，而莖水萃取物在 0.2 mg/mL 已有 12.06 % 清除能力，隨濃度增加莖萃取物對超氧陰離子清除力也略高於葉萃取物。在酒精萃取物中葉在 0.5 mg/mL 才開始有清除作用，清除能力為 10.75 %，此萃取物並隨濃度而增加清除能力；莖 0.1 mg/mL 萃取物已具有 27.85 % 清除能力，其清除能力從 0.2~2 mg/mL 不隨濃度增加，清除能力約為 49 %。在乙酸乙酯中葉萃取物 0.5 mg/mL 才開始有清除能力為 7.02 %，並隨濃度而增加其清除能力；莖萃取物從 0.2 mg/mL 開始有清除能力為 10.75 %，在濃度為 2 mg/mL 時則達到最高 96.49 %。其餘萃取層在 2 mg/mL 均接近 50 % 或以上，除葉乙酸乙酯萃取物為 25.44 %。從表 8 扁桃斑鳩菊萃取物對超氧陰離子清除力 EC_{50} 及圖 8 中，以莖乙酸乙酯萃取物清除能力為最強 (EC_{50} 為 0.94 mg/mL)，最弱為葉乙酸乙酯萃取物 (EC_{50} 為 3.68 mg/mL)。若以莖及葉的萃取物應

用在超氧陰離子清除能力試驗中，莖比葉在較低濃度即具有清除能力。

表 7 扁桃斑鳩菊不同萃取物對超氧陰離子清除能力

	SA scavenging capability (%)				
	0.1 mg/mL	0.2 mg/mL	0.5 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL
葉-Water	-	-	31.91±0.67 ^c	48.46±1.71 ^c	50.22±1.39 ^c
莖-Water	-	12.06±0.58 ^b	38.92±0.96 ^d	51.21±0.61 ^e	56.79±1.37 ^e
葉-95% EtOH	-	-	10.75±0.96 ^b	40.79±0.49 ^b	54.71±0.01 ^d
莖-95% EtOH	27.85±0.53 ^a	44.95±0.13 ^c	49.23±0.62 ^f	49.45±0.62 ^d	49.23±1.23 ^b
葉-乙酸乙酯	-	-	7.02±1.21 ^a	16.23±0.67 ^a	25.44±0.85 ^a
莖-乙酸乙酯	-	10.75±0.03 ^a	39.80±0.58 ^e	62.06±0.19 ^f	96.49±0.29 ^f

- : not effects

Values in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

表 8 扁桃斑鳩菊不同萃取物對超氧陰離子清除能力之 EC₅₀

萃取物	SA scavenging capability-EC ₅₀ (mg/mL)
葉-Water	1.63
莖-Water	1.42
葉-95% EtOH	1.69
莖-95% EtOH	1.49
葉-乙酸乙酯	3.68
莖-乙酸乙酯	0.94

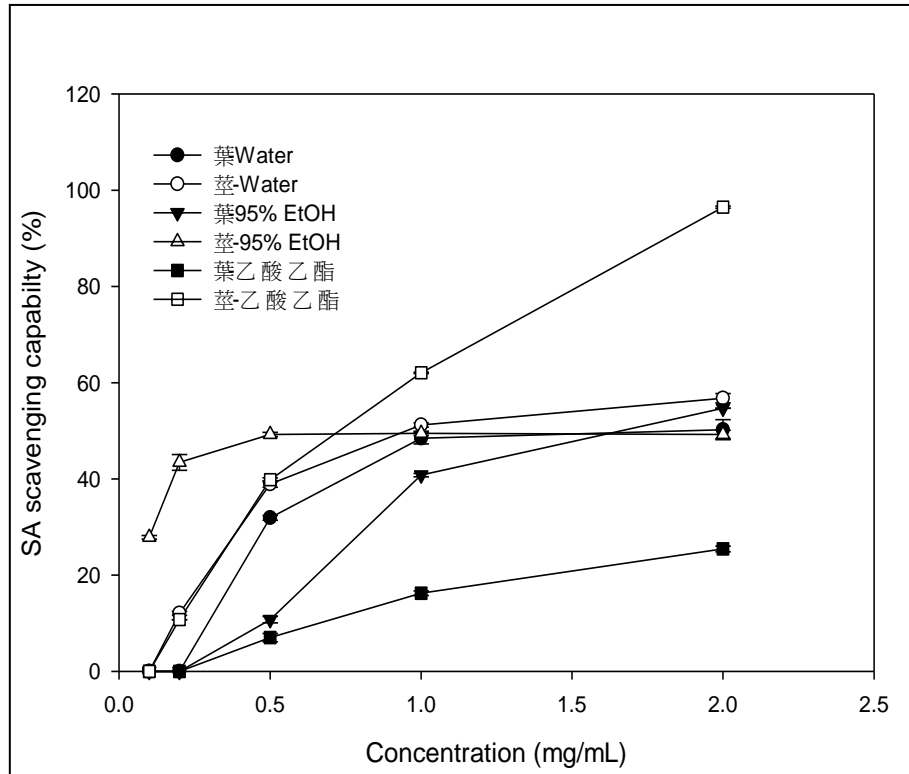


圖 8 扁桃斑鳩菊不同萃取物對超氧陰離子清除能力百分比

先前研究皆只有針對扁桃斑鳩菊的葉子進行抗氧化相關試驗，研究指出冷水、熱水及甲醇萃取物均對 DPPH 可清除而有細胞保護作用 (Iwalewa et al., 2005)；葉的水萃取物具有降血脂和抗氧化性能 (Nwanjo, 2005)，且水萃取物可對抗 acetaminophen 所誘發的肝毒性和氧化壓力 (Iwalokun et al., 2006)；在 Erasto 等人 (2007) 研究，扁桃斑鳩菊葉應用於人類飲食具有抗氧化活性，發現在甲醇萃取物對清除 DPPH 自由基效力最強，其次為丙酮萃取物，但水萃取物對 DPPH 清除力效果最弱，且甲醇萃取物清除自由基效果比丁基化羥基甲苯(BHT)更高。Atangwho 等人 (2015) 利用 DPPH 和

ABTS 自由基清除以及亞鐵螯合力測定，葉萃取物顯示出下列溶劑有效的抗氧化活性：水提取物>甲醇提取物>氯仿萃取>和石油醚提取物並有劑量依賴性的趨勢。在丙酮萃取物對 ABTS，DPPH，FRAP 抗氧化劑試驗具有活性，並有抗炎和鎮痛作用(Adedapo et al., 2014)。而在本研究以葉及莖兩個部分進行不同溶劑萃取後對抗氧化能力之測定，研究結果發現葉及莖均對 DPPH 自由基具有清除能力、對亞鐵離子有螯合能力及對超氧陰離子具清除能力並可增加還原力。綜合本研究結果與其他研究結果顯示，可能因不同部位、萃取溶劑，所萃取之有效抗氧化成分有所差異，導致抗氧化能力有所差異。

4.3 花青素、總酚及類黃酮測定

(1) 花青素含量測定

由圖 9 扁桃斑鳩菊萃取物的花青素含量，顯示在水萃取物中葉的含量為 1.51 $\mu\text{mole/g}$ 是莖 (0.67 $\mu\text{mole/g}$) 兩倍多。在酒精萃取物中只有莖可測到含少量的青花素 0.28 $\mu\text{mole/g}$ ，但在乙酸乙酯萃取物中則皆沒有花青素存在。花青素是屬於類黃酮族群的天然色素，屬於水溶性的色素。本研究所測得的花青素依其水溶性特性，明顯存在於水萃取物中，而不存於乙酸乙酯萃取物。Wang 等人研究指出花青素的抗氧化力與其結構有很大的關係 (Wang et al., 1997)。花青素可以減少 LDL 的氧化和活性氧自由基清除，預

防心血管疾病、糖尿病發生，具有抗發炎、抗癌的效用 (Tsuda et al., 1996；謝衣娟，2001；Yousuf et al., 2015)。在流行病學研究表明，花青素可降低心血管疾病的死亡率(Wallace, 2011)。在富含花青素的紫玉米乙醇萃取物能改善胰島素抵抗，降低糖尿病所引發的併發症，此結果表明花青素可能具有預防糖尿病和糖尿病併發症 (Huang et al., 2015)。另外，花青素對血管收縮素具有抑制活性而具有降壓作用(Ojeda et al.,2010)。綜合前人研究及扁桃斑鳩菊葉在民間療法使用於糖尿病及心血管疾病上，而本研究所測得葉及莖的水萃取物含高量的花青素，因此未來可進一步對糖尿病及心血管疾病進行研究。

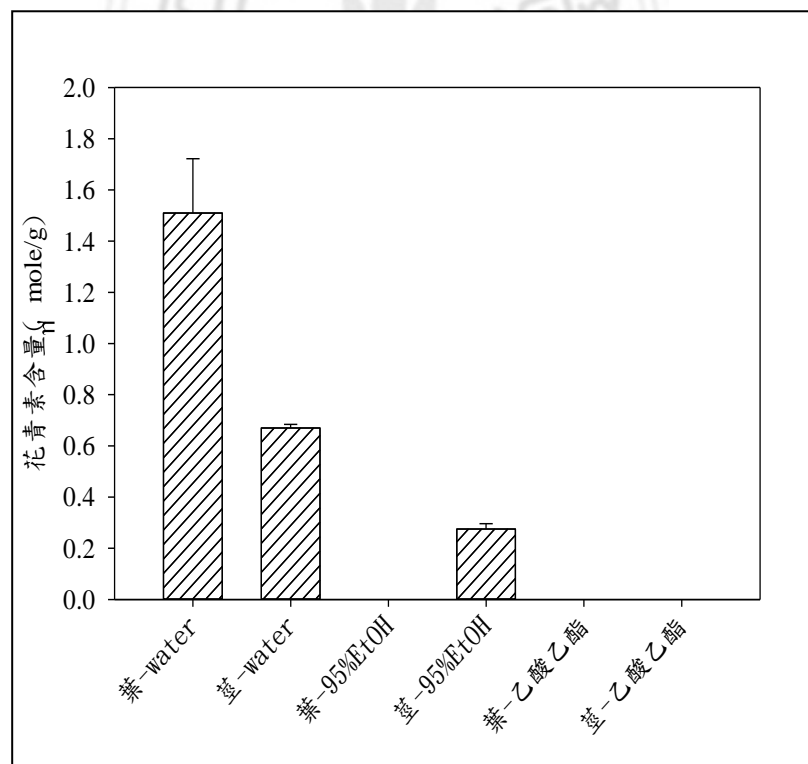


圖 9 扁桃斑鳩菊不同萃取物之花青素含量

(2) 總酚含量測定

多酚類為具有抗氧化能力的化學結構之一，此類化合物也具有抑制 LDL 氧化的功能。Folin-Ciocalteu 比色法是最普遍應用於檢測抗氧化總酚含量的方法，定量上常以沒食子酸(gallic acid)作為總酚相對當量含量表示。在扁桃斑鳩菊萃取物之總酚含量測定(圖 10)，在水萃取物中所含的總酚量以葉萃取物 687.31 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 含量最豐富是莖萃取物 221.26 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 的三倍多；另在酒精萃取物中，葉及莖的總酚量各為 111.15 及 106.93 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ；乙酸乙酯萃取物中葉的總酚含量最低只有 49.62 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ，而莖萃取物則含有 122.49 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。綜合結果顯示，水萃取物中所含總酚量為最多，其次為酒精萃取物，乙酸乙酯萃取物最少。在 Ho 等人 2015 年研究，指出在葉的水萃取物含豐富總酚，具抗氧化及保肝作用。扁桃斑鳩菊葉乙醇萃取物含大量的多酚(其主要成分為 1,5-dicaffeoyl-quinic acid, dicaffeoyl-quinic acid, chlorogenic acid and luteolin-7-O-glucoside) 對 streptozotocin 所誘導的糖尿病大鼠有抗糖尿病作用 (Ong et al., 2011)。由上述研究及本實驗所得的結果，在水及酒精萃取物中含有豐富的總酚，並有抗氧化作用。

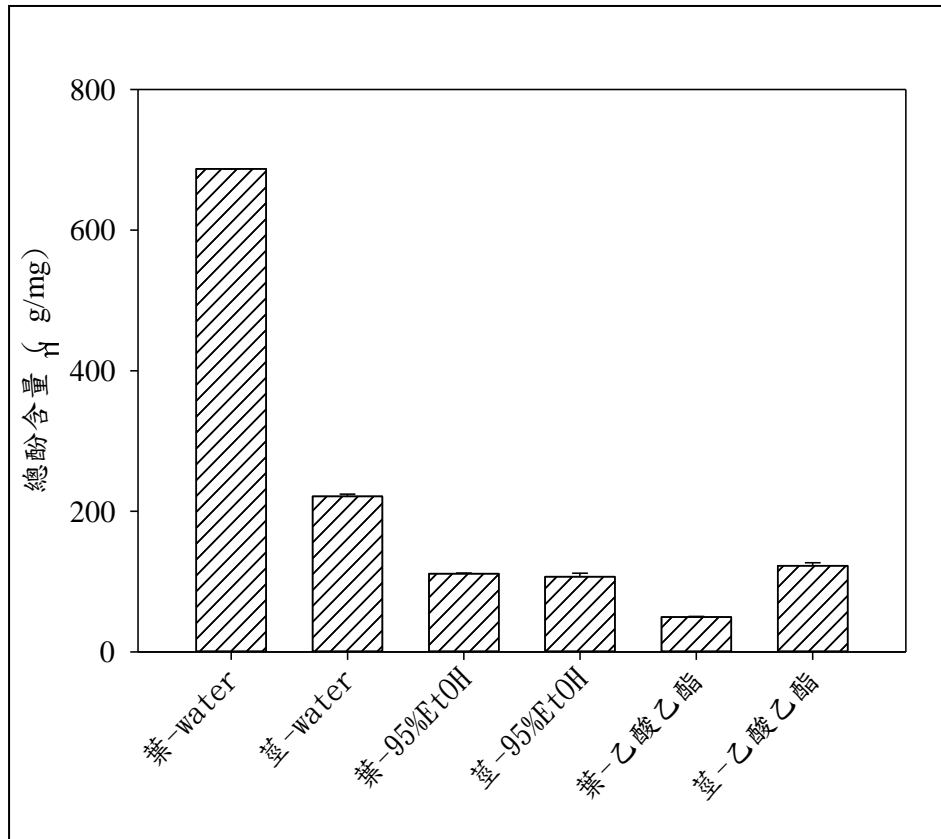


圖 10 扁桃斑鳩菊不同萃取物之總酚含量

(3) 類黃酮含量測定

類黃酮是普遍存在植物中的天然多酚類(Ratty and Das, 1988)。類黃酮可以清除羥基、超氧陰離子、氮氧基(nitric oxide; NO·)和 DPPH 等自由基，並具有螯合金屬離子的能力(Kähkönen et al., 1999)。各種類黃酮又以槲皮素(Quercetin)研究最多(Hertog et al, 1993)。本研究利用槲皮素當標準品來測量扁桃斑鳩菊萃取物之類黃酮含量。在圖 11 結果顯示，在水層中只有在葉萃取物能測得類黃酮含量 13.28 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ；而在葉酒精萃取物之類黃酮量略高於莖萃取物，各為 25.25 及 22.08 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ；乙酸乙酯萃取物中莖所含類黃酮

(29.26 $\mu\text{g}/\text{mg}$) 遠高於葉萃取物 (17.51 $\mu\text{g}/\text{mg}$)。本研究三種溶劑萃取物，除了莖的水萃取物偵測不到類黃酮外，其他均含有豐富的類黃酮成分，其中以酒精及乙酸乙酯萃取物含量最多且具抗氧化作用。有關類黃酮研究在 Igile 及 Ho 等學者及本研究中皆證實扁桃斑鳩菊葉及莖在不同萃取溶劑可萃取出黃酮類且具有高度抗氧化能力，可用於人類飲食具有抗氧化活性 (Igile et al., 1994 ; Ho et al., 2015)。

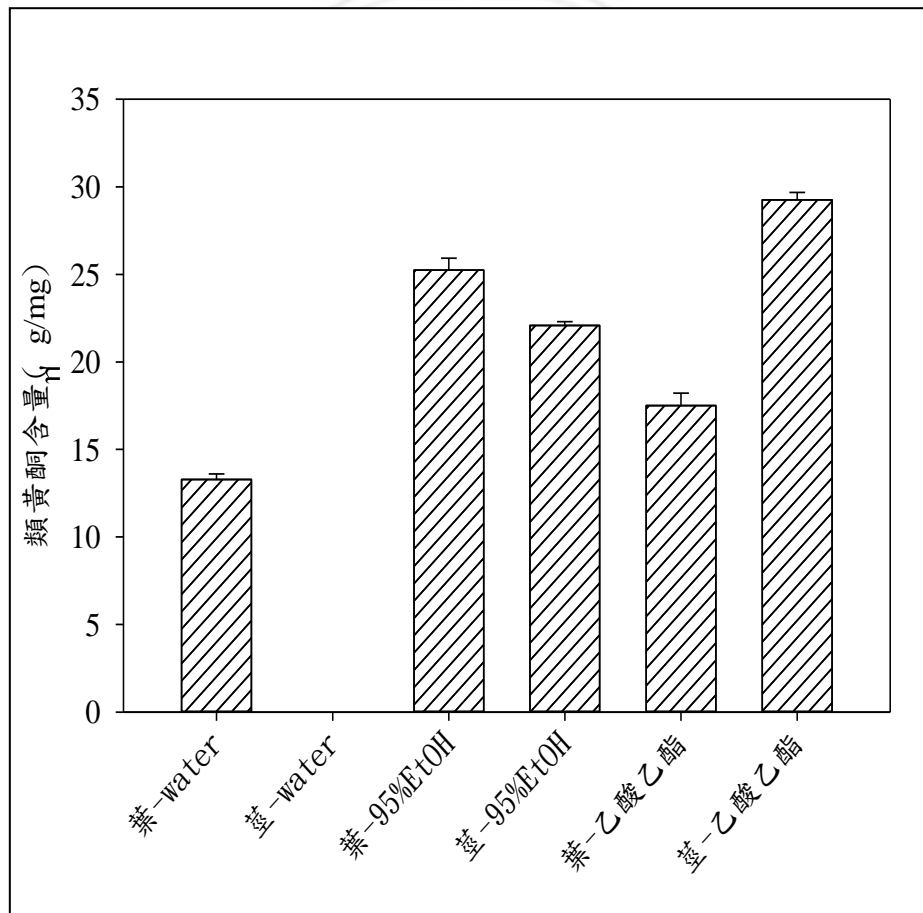


圖 11 扁桃斑鳩菊不同萃取物之類黃酮含量

表 9 扁桃斑鳩菊不同萃取物抗氧化能力測定及抗氧化成分之比較表

	葉-Water	莖-Water	葉-95% EtOH	莖-95% EtOH	葉-乙酸乙酯	莖-乙酸乙酯
DPPH scavenging effect EC ₅₀ (mg/mL)	0.87	2.1	0.78	0.52	1.68	0.68
Fe ²⁺ chelating activity EC ₅₀ (mg/mL)	1.12	1.56	0.77	0.9	2.08	1.33
SA scavenging capability EC ₅₀ (mg/mL)	1.63	1.42	1.69	1.49	3.68	0.94
Reducing power 0.5 mg/mL(O.D.)	1.32	0.44	1.75	1.81	0.48	1.46
花青素(μmole/g)	1.51 ± 0.21	0.67 ± 0.01	0	0.28 ± 0.02	0	0
總酚(μg/mg)	687.31 ± 0.02	221.26 ± 3.17	111.15 ± 0.98	106.93 ± 4.99	49.62 ± 0.74	122.49 ± 4.23
類黃酮(μg/mg)	13.28 ± 0.31	0	25.25 ± 0.68	22.08 ± 0.22	17.51 ± 0.71	29.26 ± 0.42

O.D.(Optical Density)

4.4 血管收縮素轉化酶抑制活性

由抑制 ACE 能力反應曲線可求得扁桃斑鳩菊萃取物之 IC_{50} 值， IC_{50} 值為抑制 ACE 50 % 所需的濃度。因此，數值越低就代表抑制效果越佳。表 10 結果顯示，扁桃斑鳩菊萃取物中以莖的酒精萃取物對血管收縮素轉化酶(ACEi)之 IC_{50} 活性最差為 50.54 mg/mL；乙酸乙酯中葉萃取物為 37.74 mg/mL，莖萃取物為 37.92 mg/mL，而對 ACEi 活性最強的為水萃取物，葉及莖分別為 0.19 及 0.82 mg/mL。一般的降血壓藥大部分具有不良副作用，而 ACE 抑制物的降血壓研究中，食物蛋白之水解胜肽，如：大豆蛋白 (Wu et al., 2002)、蛋的白蛋白 (Yu et al., 2012) 及芝麻蛋白等 (邱, 2013)，其主要為競爭型抑制劑，可用來進行血壓評估。已知在各種食品原料得到的胜肽各有其 ACEi 活性，如蛋的蛋白取得的胜肽 IC_{50} 活性為 0.05 mg/mL，芝麻胜肽粗抽物 IC_{50} 活性為 0.26 mg/mL；在天然物中對降血壓功能研究中，鱉粉水萃物抑制能力 IC_{50} 為 1.46 mg/mL (王, 2008)，黑木耳水萃物抑制血管收縮素的能力，其 IC_{50} 為 0.01~0.04 mg/mL (陳, 2010)。目前對扁桃斑鳩菊相關研究證實，丙酮萃取後分離的極性與非極性的扁桃斑鳩菊葉之多酚類萃取物會與 ACEi 酶蛋白作用，而有抑制 ACE

和腎素活性(Ajibola et al., 2011)。然而，在本研究中，桃葉斑鳩菊葉及莖水萃取物對血管收縮素轉化酶(ACEi) IC_{50} 活性分別為 0.19 及 0.82 mg/mL，顯示水萃取物的活性成分可能是主要具有血管收縮素轉化酶的抑制能力。研究指出花青素對血管收縮素具有抑制活性而具有降壓作用(Ojeda et al.,2010)，而本論文在葉及莖的水萃取物可測得含高量的花青素。因此，可進一步分析水萃取物，研究其具降壓作用的活性成分。



表 10 扁桃斑鳩菊不同萃取物之血管收縮素轉化酶抑制作用

萃取物	ACEi-IC ₅₀ (mg/mL)
葉-Water	0.19
莖-Water	0.82
葉-95% EtOH	19.39
莖-95% EtOH	50.54
葉-乙酸乙酯	37.94
莖-乙酸乙酯	37.92

4.5 胺基酸分析

胺基酸普遍存在於食物中，其中有 9 種是人體無法自行製造合成，必需由食物中補充，稱為必需胺基酸，包含有：組胺酸、異白胺酸、白胺酸、色胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、羥丁胺酸、離胺酸及纈胺酸。針對不同溶劑的扁桃斑鳩菊萃取物的不同胺基酸含量測定，共鑑定到 15 種胺基酸，少了色胺酸此種必需胺基酸。如表 11 中所示，不論在葉或莖水萃取物的各種胺基酸含量較為豐富，其次是酒精萃取物，而乙酸乙酯的含量最少。針對苦味胺基酸(異白胺酸，白胺酸，組胺酸)進行研究，異白胺酸主要存在水萃取物，各萃取物中以葉含量最高，在葉的水萃取物含量最高達 1451.5 $\mu\text{mol/g}$ 、葉的酒精萃取物 713.3

$\mu\text{mol/g}$ ；白胺酸也是在水萃取物含量最高，葉含量遠比莖多，尤其在葉的水萃取物中含量達 $1910.8 \mu\text{mol/g}$ ；組胺酸在水萃取物含量最豐富，莖含量比葉多，以莖的水萃取物含量 $897.6 \mu\text{mol/g}$ 最高。由以上結果顯示，扁桃斑鳩菊的葉及莖的苦味成分主要來自於異白胺酸、白胺酸、組氨酸三種胺基酸且含量豐富，主要以水萃取物含量最多。

胺基酸是三大營養素之一與第 2 型糖尿病的關係在近幾年被研究提出，大部分胺基酸為可以幫助體內葡萄糖生成，另外有胺基酸如精胺酸、白胺酸等可促進胰島素分泌（陳濤及田浩明，2012）。本研究結果顯示，莖中所含的精胺酸多餘葉中的含量，以莖的水萃取物抽提量最高有 $15785.3 \mu\text{mol/ml}$ ，在莖的酒精萃取物及葉的水萃取物含量豐富各為 $6689.0 \mu\text{mol/ml}$ 及 $2334.8 \mu\text{mol/ml}$ ，而在乙酸乙酯中含量最少葉及莖各別為 11.3 和 $27.4 \mu\text{mol/ml}$ 。另有研究指出 3 種支鏈氨基酸(纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、)與 2 型糖尿病具有相關性(Adeva et al., 2012)。纈胺酸在葉較莖含量多，尤以葉水萃取物最高 $2467.2 \mu\text{mol/ml}$ ，其次以酒精萃取物 $1507.8 \mu\text{mol/ml}$ 。而白胺酸是唯一可以在無葡萄糖和其他胺基酸存在的條件下直接促進胰島素釋放的胺基酸，是除葡萄糖外促胰島素分泌最強的生理物質和 mTOR-S6K1 信號

途徑最強的啟動胺基酸(Newsholme et al., 2005)。甘氨酸(Glycine)研究中提出其在糖質新生(gluconeogenesis)，並與胰島素阻抗(insulin resistance)及氧化壓力(oxidative stress)有關(Wittenbecher et al., 2015)。本研究結果，甘氨酸在葉及莖水層抽取物含量各為 1693.1、1056.9 $\mu\text{mol/g}$ ，比其他溶劑萃取物高出甚多。另有研究報告中指出，以扁桃斑鳩菊葉水萃取物與二甲雙胍降血糖藥(metformin)併用，可以降低血糖(Michael et al., 2011)。綜合以上結果及相關研究顯示，扁桃斑鳩菊其內所含的豐富胺基酸不論葉或莖的水或酒精萃取物皆可能對糖尿病的血糖能有效控制，此部分需進一步研究才能證實。

表 11 扁桃斑鳩菊不同萃取物之不同胺基酸含量

單位：

 $\mu\text{mol/g}$

Amino acid	葉-Water	莖-Water	葉-95% EtOH	莖-95% EtOH	葉-乙酸乙酯	莖-乙酸乙酯
天門冬胺酸(Asp)	2653±179.4	5019.3±808.3	301.3±104.2	1733.5±312.1	15.85±1.3	27.9±1.8
羧丁胺酸(Thr)	5504.7±446.1	7268.6±996.3	354.7±171.8	2500.1±1290.8	32.35±28.2	50.5±32.1
絲胺酸(Ser)	3075.3±107.1	231.2±4.3	229.5±49.4	259.8±31.1	53.1±5.8	101.6±0.0
甘胺酸(Gly)	1693.1±23.3	1056.9±58.2	287.0±148.2	383.4±110.2	197.9±16.1	115.8±3.4
丙胺酸(Ala)	3400±267.5	1648.1±23.1	1115.1±193.3	1580.4±19.4	54.7±1.2	57.2±1.9
纈胺酸(Val)	2467.2±175.0	634.9±21.0	1507.8±62.4	705.5±13.8	106.9±11.3	45.0±0.9
甲硫胺酸(Met)	494.8±86.4	257.7±13.4	72.5±6.2	281.3±11.8	0	6.8±6.5
異白胺酸(Ile)	1451.5±128.2	347.5±12.5	713.3±5.7	376.2±3.5	68.5±6.2	33.7±2.8
白胺酸(Leu)	1910.8±153.7	435.3±16.1	540.9±66.3	307.0±8.3	73.5±5.6	55.4±6.5
酪胺酸(Tyr)	710.7±9.8	161.8±5.1	151.9±9.4	111.8±3.7	19.9±0.0	60.9±1.1
苯丙胺酸(Phe)	1443.8±32.1	262.2±7.7	782.6±67.0	197.5±0.1	136.7±2.5	46.4±1.1
離胺酸(Lys)	17705.8±709.1	6041.7±216.5	820.4±125.1	1160.0±24.0	249.2±15.4	193.6±48.6
組胺酸(His)	502.7±29.7	897.6±25.5	118.5±4.6	444.2±13.3	21.35±0.7	22.95±2.7
精胺酸(Arg)	2334.8±46.8	15785.3±481.0	347.5±27.5	6689.0±143.9	11.3±1.4	27.4±4.7
脯胺酸(Pro)	4108.2±280.2	1893.3±663.9	1747.1±260.9	3566.2±53.7	51.6±8.4	52.2±8.9

第五章 結論

在本研究中進行扁桃斑鳩菊的葉及莖兩個部位，以水、95 % 乙醇及乙酸乙酯三種溶劑進行萃取。由表 9 歸納出，在抗氧化試驗中清除 DPPH 自由基能力、亞鐵離子螯合能力及還原力主要以酒精萃取物的效果最好，對清除超氧陰離子能力則以乙酸乙酯萃取物較顯著。抗氧化的活性成分如花青素及總酚主要分佈於葉的水萃取物，類黃酮含量在酒精及乙酸乙酯萃取物則差不多；對血管收縮素轉化酶抑制能力中，葉及莖的水萃取物抑制能力最強；胺基酸組成主要存在水萃取物較豐富且含量較多。

綜合上述研究，扁桃斑鳩菊其具有營養價值和開發為保健食品的潛力，可將葉及莖一起合併使用，則更具抗氧化力及所含的抗氧化活性成分量更多。在血管收縮素轉化酶抑制活性研究中，指出扁桃斑鳩菊的葉及莖水萃取物的活性成分才是主要具有血管收縮素轉化酶抑制作用。因此可進一步分析水萃物，研究其具降壓作用的活性成分。在含量豐富的胺基酸中，尤以精胺酸、纈胺酸、白胺酸及異白胺酸可能對血糖進行調控而有降血糖作用，對糖尿病是一不錯的另類療法的選擇。

參考文獻

中文文獻

- 王姝勻 (2008)。鱉粉抗氧化能力及降血壓功能評估。實踐大學。食品營養與保健生技研究所。
- 朱燕華 (2001)。類胡蘿蔔素簡介。食品工業， 33， 1-5。
- 江燕 (2010)。抗癌植物扁桃斑鳩菊化學成分的研究。南寧：廣西大學。
- 邱炫鐘 (2013)。具有血管收縮素轉化酶抑制活性之芝麻胜肽的製備與鑑定。中州科技大學。保健食品系。
- 陳濤及田浩明 (2012)。胺基酸代謝與2型糖尿病。中華內分泌代謝雜誌， 28， 773-776。
- 陳俊宏 (2010)。黑木耳水萃物抗氧化能力、抑制血管收縮素轉化酶及降血壓之功能評估。實踐大學。食品營養與保健生技學系碩士班。
- 楊早 (2013)。南非葉化學成分及藥理作用研究進展。南京中醫藥大學學報， 29， 397-400。
- 蔡坤志 (2002)。自由基簡介與其臨床應用。臨床醫學， 49， 123-129。
- 謝衣鵬 (2001)。花青素簡介。食品工業， 33， 6-10。

英文文獻

- Abosi, A. O., & Raseroka, B. H. (2003). In vivo antimalarial activity of *Vernonia amygdalina*. *Br J Biomed Sci*, 60 (2), 89-91.
- Adaramoye, O. A., Akintayo, O., Achem, J., & Fafunso, M. A. (2008). Lipid-lowering effects of methanolic extract of *Vernonia amygdalina* leaves in rats fed on high cholesterol diet. *Vasc Health Risk Manag*, 4(1), 235-241.
- Adedapo, A. A., Aremu, O. J., & Oyagbemi, A. A. (2014). Anti-oxidant, anti-inflammatory and antinociceptive properties of the acetone leaf extract of *vernonia amygdalina* in some laboratory animals. *Adv Pharm Bull*, 4(Suppl 2), 591-598.
- Adesanoye, O. A., & Farombi, E. O. (2010). Hepatoprotective effects of *Vernonia amygdalina* (astereaceae) in rats treated with carbon tetrachloride. *Exp Toxicol Patho*, 62(2), 197-206.
- Adeva, M. M., Calviño, J., Souto, G., & Donapetry, C. (2012). Insulin resistance and the metabolism of branched-chain amino acids in humans. *Amino Acids*, 43(1), 171-181.
- Ahsan, H., Ali, A., & Ali, R. (2003). Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clin Exp Immuno*, 131, 398-404.
- Ajibola, C. F., Eleyinmi, A. F., & Aluko, R. E. (2011). Kinetics of the inhibition of renin and angiotensin i converting enzyme by polar and non-polar polyphenolic extracts of *Vernonia amygdalina* and *Gongronema latifolium* leaves. *Plant Foods Hum Nutr*, 66(4),

320-327.

- Akah, P. A., & Ekekwe, R. K. (1995). Ethnopharmacology of some Asteraceae family used in Nigerian traditional medicine. *Fitoterapia*, 66, 351-355.
- Akinpelu, D.A. (1999). Antimicrobial activity of *Vernonia amygdalina* leaves. *Fitoterapia*, 70(4), 432-434.
- Aruoma, O. I. (1998). Free radical, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J Am Oil Chem Soc*, 75, 119-213.
- Atangwho, I. J., Ebong, P. E., Eyong, E. U., Asmawi, M. Z., & Ahmad, M. (2012). Synergistic antidiabetic activity of *Vernonia amygdalina* and *Azadirachta indica*: biochemical effects and possible mechanism. *J Ethnopharmacol*, 141(3), 878-887.
- Atangwho, I. J., Egbung, G. E., Ahmad, M., Yam, M. F., & Asmawi, M. Z. (2013). Antioxidant versus anti-diabetic properties of leaves from *Vernonia amygdalina* Del. growing in Malaysia. *Food Chem*, 141(4), 3428-3434.
- Atangwho, I. J., Yin, K. B., Umar, M. I, Ahmad, M., & Asmawi, M. Z. (2014). *Vernonia amygdalina* simultaneously suppresses gluconeogenesis and potentiates glucose oxidation via the pentose phosphate pathway in streptozotocin-induced diabetic rats. *BMC Complement Altern Med*, 14, 426.
- Bartosz, G. (2003). Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments Toxicol*, 9, 5-21.
- Bast, A., Haenen, G. R. M. M., & Doelman, C. J. A. (1991). Oxidants and antioxidants: Bullough, C. H. W., & Leary, W. P. 1982. Herbal

- medicines used by traditional birth attendants in Malawi. *Tropical Geographical Medicine*, 34, 81-85.
- Cacciuttolo, M. A., Trinh, L., Lumpkin, J. A., & Rao, G. (1993). Hyperoxia induces DNA damage in mammalian cells. *Free Rad Biol Med*, 14, 267-276.
- Diplock, A. (1991). Antioxidant nutrients and disease prevention: an overview. *Am J Clin Nutr*, 53, 189S-93S.
- Erasto, P., Grierson, D. S., & Afolayan, A. J. (2006). Bioactive sesquiterpene lactones from the leaves of *Vernonia amygdalina*. *Journal of Ethnopharmacology*, 106(1), 117-120.
- Erasto, P., Grierson, D. S., & Afolayan, A. J. (2007). Evaluation of antioxidant activity and the fatty acid profile of the leaves of *Vernonia amygdalina* growing in South Africa. *Food Chemistry*, 104(2), 636-642.
- Erdmann, K., Cheung, B. W., & Schröder, H. (2008). The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *J Nutr Biochem*, 19 (10) , 643-654.
- Fang, Y. Z., Yang, S., & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18, 872-879.
- Farombi, E. O., & Owoeye, O. (2011). Antioxidative and chemopreventive properties of *Vernonia amygdalina* and *Garcinia biflavonoid*. *Int J Environ Res Public Health*, 8(6), 2533-2555.
- Fasakin, C. F., Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2011). Antioxidant properties of chlorophyll-enriched and chlorophyll-depleted polyphenolic fractions from leaves of *Vernonia amygdalina* and

- Gongron emalatifolium. *Food Research International*, 44(8) , 2435-2441.
- Foyer, C. H, & Fletcher, J. M. (2001). Plant antioxidants : colour me healthy. *Biologist*, 48, 115-120.
- Frei, B., England, L., & Ames, B. (1989). Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86, 6377-6381.
- Gresham, L. J., Ross, J., & Izevbigie, E. B. (2008). *Vernonia amygdalina* : anticancer activity authentication, and adulteration detection. *Int J Environ Res Public Health* ,5(5), 342-348.
- Gülçin, İ., Sat, İ. G., Beydemir, S., Elmastas, M., & Küfrevioğlu, Ö. İ. (2004). Comparison of antioxidant activity of clove(*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender(*Lavandula atoechas* L.). *Food Chem*, 87, 393-400.
- Halliwell, B. (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev*, 52(8), 253-265.
- Halliwell, B., Murcia, M. A., Chirico, S., & Aruoma, O. I. (1995). Free radicals and antioxidants in food and in vivo: What they do and how to work. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 35, 7-20.
- Hamill, F. A., Apio, S., Murbiru, N. K., Mosango, M., Bukenya-Ziraba, R., & Maganyi, O. W. (2000). Traditional herbal drugs of southern Uganda. *Journal of Ethnopharmacology*, 70, 281-300.
- Hatheill, J. R., Till, G. O., & Ward, P. A. (1991). Mechanisms of oxidant-induced changes in erythrocytes. *Agents And Actions*, 32,

351-358.

- Hertog, M. G., Feskens, E. J., Hollman, P. C., Katan, M. B., & Kromhout, D. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, *342*(8878), 1007-1011.
- Ho, W. Y., Yeap, S., Liang, W. S., Beh, B. K., Mohamad, N., & Alitheen, N. B. (2015). In vitro antioxidant and in vivo hepatoprotective effect on ethanol-mediated liver damage of spray dried *Vernonia amygdalina* water extract. *Pak J Pharm Sci*, *28*(1), 15-22.
- Horie, H., & Kohata, K. (2000). Analysis of tea components by high-performance liquid chromatography and high-performance capillary electrophoresis. *J Chromatography A*, *881*, 425-438.
- Howard, C. B., Stevens, J., & Izevbigie, E. B. (2003). Time and dose-dependent modulation of phase 1 and phase 2 gene expression in response to treatment of MCF-7 cells with a natural anti-cancer agent. *Cell Mol Biol (Noisyle-grand)*, *49*(7), 1057-1065.
- Huang, B., Wang, Z., Park, J. H., Ryu, O. H., Choi, M. K., Lee, J. Y., Kang, Y. H., & Lim, S. S. (2015). Anti-diabetic effect of purple corn extract on C57BL/KsJ db/db mice. *Nutr Res Pract*, *9*(1), 22-29.
- Igile, G. O., Oleszek, W., Jurzysta, M., Burda, S., Fanfunso, M., & Fasanmade, A. A. (1994). Flavonoids from *Vernonia amygdalina* and their antioxidant activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *42*, 2445-2448.
- Iwalewa, E. O., Adewunmi, C. O., Omisore, N. O., Adebajji, O. A., Azike, C. K., Adigun, A. O., Adesina, O. A., & Olowoyo, O. G. (2005). Pro- and antioxidant effects and cytoprotective potentials of

- nine edible vegetables in southwest Nigeria. *J Med Food*, 8(4), 539-544.
- Iwalokun, B. A., Efedede, B. U., Alabi-Sofunde, J. A., Oduala, T., Magbagbeola, O. A., & Akinwande, A. I. (2006). Hepatoprotective and antioxidant activities of *Vernonia amygdalina* on acetaminophen-induced hepatic damage in mice. *J Med Food*, 9(4), 524-530.
- Izevbogie, E. B, Bryant, J. L., & Walker, A. (2004). A novel natural inhibitor of extracellular signal-regulated kinases and human breast cancer cell growth. *Exp Biol Med(Maywood)* , 229(2), 163-169.
- Izevbogie, E. B. (2003). Discovery of water-soluble anticancer agents (edotides) from a vegetable found in Benin City, Nigeria. *Exp Biol Med*, 228(3), 293-298.
- Jia, Z., Tang, M., & Wu, J. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*, 64, 555-559.
- Jisaka, M., Ohigashi, H., & Takegawa, K. (1993). Antitumoral and antimicrobial activities of bitter sesquiterpene lactones of *Vernonia amygdalina*, a possible medicinal plant used by wild chimpanzees. *Biosci Biotechnol Biochem*, 57(5), 833-834.
- Johns, T., Faubert, G. M., Kokwaro, J. O., Mahunnah, R. L. A., & Kimanani, E. K. (1995). Anti-giardial activity of gastrointestinal remedies of the Luo of East Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 46, 17-23.
- Julkunen, T. R. (1985). Phenolic constituents in the leaves of northern

willows: methods for the analysis of certain phenolics. *J Agric Food chem*, 33, 213-217.

Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compound. *J Agric Food Chem*, 47, 3954-3962.

Kambizi, L., & Afolayan, A. J. (2001). An ethnobotanical study of plants used for the treatment of sexually transmitted diseases (njovhera) in Guruve District, Zimbabwe. *Journal of Ethnopharmacology*, 77, 5-9.

Kaur, C., & Kapoor, H. C. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables-the millennium's health. *Int J Food Sci Technol*, 36, 703-725.

Kupchan, S. M., Hemingway, R. J., Karim, A., & Werner, D. (1969). Tumor inhibitors. XLVII. Vernodalin and vernomygdin, two new cytotoxic sesquiterpene lactones from *Vernonia amygdalina* Del. *J Org Chem*, 34(12), 3908-3911.

Lin, L. Y., Peng, C. C., Liang, Y. J., Yeh, W. T., Wang, H. E., Yu, T. H., & Peng, R. Y. (2008). Alpiniazarumbet potentially elevates high-density lipoprotein cholesterol level in hamsters. *J Agric Food Chem*, 56(12), 4435-4443.

Lolodi, O., & Eriyamremu, G. E. (2013). Effect of methanolic extract of *Vernonia amygdalina* (common bitter leaf) on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rats exposed to cycasin. *Pak J Biol Sci*, 16(13), 642-646.

Luo, X., Jiang, Y., Fronczek, F. R., Lin, C., Izevbigie, E. B., & Lee, K. S.

- (2011). Isolation and structure determination of a sesquiterpene lactone (vernodalinol) from *Vernonia amygdalina* extracts. *Pharm Biol*, 49(5), 464-470.
- Masaba, S. C. (2000). The antimalarial activity of *Vernonia amygdalina* Del (Compositae). *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 94(6), 694-695.
- Michael, U. A., David, B. U., Theophine, C. O., Philip, F. U., Ogochukwu, A. M., & Benson, V. A. (2011). Antidiabetic effect of combined aqueous leaf extract of *Vernonia amygdalina* and metformin in rats. *J Basic Clin Pharm*, 1(3), 197-202.
- Miguel, M., Recio, I., Gomez-ruiz, J. A., Ramos, M., & Lopez-fandino, R. (2004). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from egg white protein by enzymatic hydrolysis. *Journal of food protection*, 67 (9), 1914-1920.
- Muraina, I. A., Adaudi, A. O., Mamman, M., Kazeem, H. M., Picard, J., McGaw, L. J., & Eloff, J. N. (2010). Antimycoplasmal activity of some plant species from northern Nigeria compared to the currently used therapeutic agent. *Pharm Biol*, 48(10), 1103-1107.
- Newsholme, P., Brennan, L., Rubi, B., & Maechler, P. (2005). New insights into amino acid metabolism, beta-cell function and diabetes. *Clin Sci (Lond)*, 108(3), 185-194.
- Nwanjo, H. U. (2005). Efficacy of aqueous leaf extract of *vernonia amygdalina* on plasma lipoprotein and oxidative status in diabetic rat models. *Niger J Physiol Sci*, 20(1-2), 39-42.
- Obaseiki-Ebor, E. E., Odukoya, K., & Telikepalli, H. (1993). Antimutagenic activity of extracts of leaves of four common edible

- vegetable plants in Nigeria(WeSt Africa) *Mutat Res*, 302(2), 109-117.
- Ojeda, D., Jiménez-Ferrer, E., Zamilpa, A., Herrera-Arellano, A., Tortoriello, J., & Alvarez, L. (2010). Inhibition of angiotensin convertin enzyme (ACE) activity by the anthocyanins delphinidin- and cyanidin-3-O-sambubiosides from *Hibiscus sabdariffa*. *J Ethnopharmacol*, 127(1), 7-10.
- Olanow, C. W. (1993). A radical hypothesis for neurodegeneration. *Trends Neurosci*, 16, 439-444.
- Ong, K. W., Hsu, A., Song, L., Huang, D., & Tan, B. K. (2011). Polyphenols-rich *Vernonia amygdalina* shows anti-diabetic effects in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, 133(2), 598-607.
- Onyesom, I., & Okoh, P. N. (2006). Quantitative analysis of nitrate and nitrite contents in vegetables commonly consumed in Delta State Nigeria. *Br J Nutr*, 96(5), 902-905.
- Opata, M. M., & Izevbigie, E. B. (2006). Aqueous *Vernonia amygdalina* extracts alter MCF-7 cell membrane permeability and efflux. *Int J Environ Res Public Health*, 3(2), 174-179.
- Otshudi, A. L., Vercruyse, A., & Foriers, A. (2000). Contribution of the ethnobotanical, phytochemical and pharmacological studies of traditionally used medicinal plants in the treatment of dysentery and diarrhea in Lomela area, Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 411-423.
- Owoeye, O., Farombi, E. O., & Onwuka, S. K. (2011). Gross morphometric reduction of rats' cerebellum by gamma irradiation was

- mitigated by pretreatment with *Vernonia amygdalina* leaf extract. *Rom J Morphol Embryol*, 52(1), 81-88.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction : Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr*, 44, 307-315.
- Padmavat, M., Sakthivel, N., Thara, K. V., & Roddy, A. R. (1997). Differential sensitivity of rice pathogens to growth inhibition by flavonoids. *Phytochemistry*, 46(3), 499-502.
- Ratty, A. K., & Das, N. P. (1988). Effects of flavonoids on nonenzymic lipid peroxidation: Structure activity relationship. *Biochem Med Metabol Biol*, 39, 69-79.
- Riley, H. P. (1963). Families of flowering plants of Southern Africa. University of Kentucky p. 170.
- Rosen, G. L. M., Pou, S., Ramos, C. L., Cohen, M. S., & Britigan, B. E. (1995). Free radicals and phagocytic cells. *FASEB J*, 9, 200-209.
- Tadesse, A., Gebre-Hiwot, A., & Asres, K. (1993). The in vitro activity of *Vernonia amygdalina* on *Leishmania aethiopica*. *Ethiop Med J*, 31(3), 183-189.
- Tona, L., Cimanga, R. K., Mesia, K., Musuamba, C. T., De Bruyne, T., Apers, S., Hernans, N., Van Miert, S., Pieters, L., Totté, J., & Vlietinck, A. J. (2004). In vitro antiplasmodial activity of extracts and fractions from seven medicinal plants used in the Democratic Republic of Congo. *J Ethnopharmacol*, 93(1), 27-32.
- Tsuda, T., Shiga, K., Ohshima, K., Kawakishi, S., & Osawa, T. (1996).

- Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Biochem Pharmacol*, 52(7), 1033-1039.
- Vercruyse, L., Van Camp, J., & Smagghe, G. (2005). ACE inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of animal muscle protein: a review. *J Agric Food Chem*, 53, 8106-8115.
- Wallace, T. C. (2011). Anthocyanins in cardiovascular disease. *Adv Nutr*, 2; 1-7.
- Wang, H., Cao, G., & Prior, R. L. (1997). Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J Agric Food Chem*, 45, 304-309.
- Wickens, A. P. (2001). Ageing and the free radical theory. *Respir Physiol*, 128, 379-391.
- Wittenbecher, C., Mühlenbruch, K., Kröger, J., Jacobs, S., Kuxhaus, O., Floegel, A., Fritsche, A., Pischon, T., Prehn, C., Adamski, J., Joost, H. G., Boeing, H., & Schulze M. B. (2015). Amino acids, lipid metabolites, and ferritin as potential mediators linking red meat consumption to type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr*, 1-10.
- Wu, J. P., & Ding, X. L. (2002). Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Res Int*, 35, 367-375.
- Yedjoa, C., Izevbie, E., & Tchounwou, P. (2008). Preclinical assessment of *vernonia amygdalina* leaf extracts as DNA damaging anti-cancer agent in the management of breast cancer. *Int J Environ Res Public Health*, 5(5), 337-341.
- Youdim, K. A., Dobbie, M. S., Kuhnle, G., Proteggente, A. R., Abbott, N.

- J., & Rice-Evans, C. (2003). Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: in vitro studies. *J Neurochem*, 85(1), 180-192.
- Yousuf, B., Gul, K., Wani, A. A., & Singh, P. (2015). Health Benefits of Anthocyanins and Their Encapsulation for Potential Use in Food Systems: A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr*.
- Yu, Z., Liu, B., Zhao, W., Yin, Y., Liu, J., & Chen, F. (2012). Primary and secondary structure of novel ACE-inhibitory peptides from egg white protein. *Food Chem*, 133(2), 315-22.

