

# 屏東縣第64屆國中小學科學展覽會 作品說明書

科 別：生活與應用科學科(二)

組 別：國中組

作品名稱：桑蠶便，降糖樂—探究桑葉和蠶沙之降血糖和抗氧化作用

關 鍵 詞：桑葉、蠶沙、抗氧化

編號：B7001

# 目錄

摘要.....	1
壹、前言.....	2
貳、研究設備及器材.....	5
參、研究過程或方法.....	9
肆、研究結果.....	13
伍、討論.....	22
陸、結論.....	24
柒、參考資料及其他.....	25

## 摘要

本研究係以不同溫度、萃取時間之熱水萃取法的桑葉萃取物和蠶沙萃取物對  $\alpha$ -葡萄糖甘酶抑制和清除1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(DPPH)之影響。從溫度及萃取時間之比較得知，100°C下萃取15分鐘為最佳條件，除此之外亦進行乾燥桑葉和蠶沙與熱水之間的固液比例(液料比)，發現在液料比為1:40時，蠶沙萃取物之抗氧化能力較佳；於液料比1:60時，蠶沙萃取物對  $\alpha$ -葡萄糖甘酶抑制較優。為雙重確認桑葉萃取物及蠶沙萃取物對  $\alpha$ -葡萄糖苷酶半抑制量進行IC<sub>50</sub>值之測定，得後者的IC<sub>50</sub>值為0.53 mg/mL，而前者之IC<sub>50</sub>值0.80 mg/mL，驗證假設成立桑葉經過蠶消化分解的排遺，於低濃度對  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制作用顯著優於桑葉。

# 壹、前言

## 一、研究動機與目的

糖尿病是一種醣類代謝異常的慢性病，根據我國衛生福利部統計，糖尿病在109年共奪走10,311國人的寶貴生命，18歲以上國人糖尿病盛行率為11.1%。許多文獻指出桑葉有降血糖、降血脂、抗炎、抗衰老、抗腫瘤、抗病毒、抗絲蟲、抗潰瘍等多方面藥理作用，屬於中藥材<sup>1,2,3</sup>。蠶沙是蠶的糞便，蠶的主食是桑葉，也是傳統中藥之一，具有抗腫瘤、降血糖、抗氧化等一系列作用。因此，桑葉和蠶沙同屬於中藥材，二者之間的降血糖和抗氧化的效用是否有關聯性，或是經過蠶體內消化後的排遺，有增強效用的可能。

為了比較桑葉和蠶沙之間的關聯性，本實驗會使用兩種萃取方法進行比較，熱水萃取法和乙醇萃取法，然而萃取條件的選擇也會有不同的影響，其影響變數包含萃取時間、溫度和料液比。因此，本實驗目標為：

1. 確認桑葉和蠶沙兩者功能活性有關聯性。
2. 不同萃取法及不同條件下，比較降血糖和清除自由基能力的效果。
3. 建立初步萃取的最適條件。
4. 桑葉和蠶沙萃取物具有顯著的降血糖和抗氧化潛力。
5. 混合物相較於單一藥物具安全性，能發揮協同作用，可有效控制血糖。
6. 桑葉和蠶沙萃取物可作為降血糖及抗氧化物質，具有開發潛力的植物化學成分。

## 二、研究背景介紹：

據統計：「台灣每年新發生的糖尿病患者數約為16萬人，並且大多數為第二型糖尿病」，上述為社團法人中華民國糖尿病衛教協會所提供的資訊，有此得知，糖尿病在台灣的發病率不容小覷，因為多為第二型糖尿病，因此若能從根本了解其病理作用以及了解國民的飲食習慣，或許可以從生活中就做到改善<sup>45</sup>。所謂的第二型糖尿病指的是通常發病於30歲之後，並且多為體態肥胖者所組成，但有趣的是，相較於第一型糖尿病病患，前者之胰島因為沒有產生明顯的病變，因此也從文獻中指出其胰島素並沒有匱乏之情形，那麼便能推測出，應為消化系統中其餘地方的醣類分解或相關作用機轉出現問題<sup>6,7,8</sup>。因此，若可以藉由飲食上的習慣進行改善，那麼或許可以不僅僅全由藥物治療來改善病情，還可以透過一般飲食得到控制，因此本篇文章將探討利用桑葉和蠶沙作為茶飲時，其內部組成的相關研究<sup>9,10,11</sup>。

糖尿病患者往往具有氧化逆境的增加，導致體內自由基水平升高，其中自由基為具有未成對電子的化學結構，在體內常以超氧自由基存在，亦為常見之活性氧化物種（Reactive Oxygen Species, 簡稱ROS），而自由基的過量產生可能損害細胞結構和功能。抗氧化物質通過中和自由基，可以減輕這種損傷，並有助於改善糖尿病患者的症狀和預防併發症的發生<sup>12,13</sup>。因此，飲食中富含抗氧化物質的食物，如新鮮水果、蔬菜和全穀類，對於糖尿病患者來說尤為重要。此外，一些研究還表明，補充抗氧化劑可能有助於控制血糖水平和減少糖尿病併發症的風險<sup>14,15,16</sup>。

桑樹是桑科多年生木本植物，為常綠樹種，並需要充足陽光、適宜的溫度、水分、空氣、營養的土壤成分；生長溫度範圍最適宜溫度為25-30°C，桑樹所需水分主要通過根毛於濕潤（約為土壤最大持水量之70%-80%）之土壤中吸收。雖需吸收相對多的水分，桑葉園內應有一定的空氣流通，以滿足桑樹呼吸作用的要求。最後桑樹在中性偏酸(pH值為6.5-7)的土壤中生長為最佳狀態<sup>17,18</sup>。

其中，桑葉作為本篇研究之主角，若將葉片進行層析技術分離可得其內部成分含多種營養素，例如維生素C、多酚類、植化素、礦物質鈣、鐵、磷、鋅、鎂……等數種微量元素。因具有多種礦物質與抗氧化劑，從歷史學上去看，李時珍所撰之《本草綱目》一文中所示：「桑葉乃手、足陽明之藥，治勞熱咳嗽，明目長髮，止消渴」，足見其功效非同小可。以現今科技能夠足以分辨出每種物質不同的作用與機轉，便可得知，諸如：桑葉生物鹼(Deoxyojirimycin，簡稱DNJ)具有幫助消化吸收之作用，並維持身體的醣類新陳代謝，作用似苦瓜甙；維生素C，含量超過檸檬的含量，與多酚類物質共同作用，其抗氧化性佳；而其他各種礦物質也能互相搭配維持生理機能<sup>19,20</sup>。

承上段，因具備多樣化對身體有益之成效，因此也變成了常見的藥用植物，並且多用於保

健食品上<sup>21</sup>，桑葉含有亞氨基糖生物鹼，已知對哺乳動物 $\alpha$ -葡萄糖苷酶有抑制作用，不同品種桑葉的乾葉中亞氨基糖生物鹼的濃度分別為 1.39 – 3.48mg/g和 0.13 – 1.47mg/g<sup>22</sup>。在化學分析中亦分離出許多抗氧化化合物，已被鑑定的酚酸包含咖啡酸、沒食子酸、原兒茶酸、對羥基苯甲酸、香草酸、綠原酸、丁香酸、對香豆酸、阿魏酸和間香豆酸，黃酮醇化合物則包含3-O-芸香苷槲皮素、槲皮素3- $\beta$ -d-葡萄糖苷和山奈酚3- $\beta$ -d-吡喃葡萄糖苷等<sup>23</sup>。藉此，本團隊將針對其抗氧化性及以及醣類抑制作用進行一連串的探究。

由於家蠶僅食用桑葉作為主食，因此，若將此可作為功能性食品之原料經過家蠶之消化並排遺後，這類的消化後產物，被稱作蠶沙。蠶沙的外觀為灰黑色顆粒狀圓柱體，大小隨著家蠶的生長階段而有大小之差異，但組成分相似<sup>24</sup>。《本草綱目》：「蠶居火，其性燥，燥能勝風去濕，故蠶沙主療風濕之病。有人病風痺，用此熨法得效」，文中亦可得知蠶沙雖然已經是經過家蠶消化後之產物，但仍有很大的醫療用途<sup>25,26</sup>。不過經過時間的演變，蠶沙不單單只用在治療風濕，更在近代藥理研究中能夠指出所含之生物鹼能有效抑制 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的能力，而達到防止醣類分解的反應<sup>27</sup>。爾後，也透過動物性實驗的支持並於近代以蠶沙作為治療糖尿病的方劑不斷增多。但也因代謝過程中無法將每一種在桑葉中的化合物完全降解，也可以從物質的分析檢定當中可以得知仍有許多可抗氧化之物質，諸如：胡蘿蔔素、葉綠素.....等，存在於其內，因此也可以得知蠶沙亦具有抗氧化性<sup>28,29</sup>。因此本研究將針對桑葉以及蠶沙泡出來的茶，進行抗氧化性以及醣類降解率的雙重特性進行一系列的實證和探討。

## 貳、研究設備及器材

### 一、材料準備

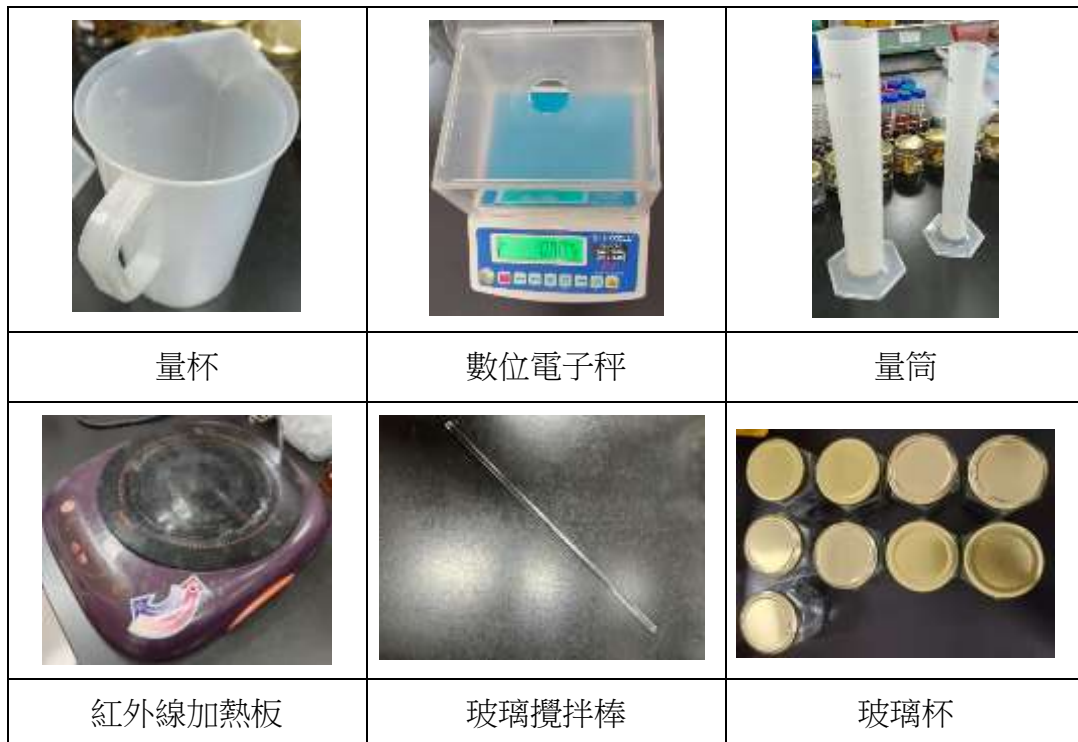
(一)桑葉：採自屏東縣內埔鄉內埔國小校園
















(二)蠶沙：蠶沙乃是蠶吃桑葉的排泄物，感謝內埔鄉水晶宮水族館提拱。



### 二、器具



		
塑膠量盤	微量天平	試管架
		
試管	濾紙	可調式微量吸管
		
溫度計	水浴鍋	分光光度計
		
比色管	鍋子	廣口血清瓶
		
離心機	烘箱	殺菌鍋



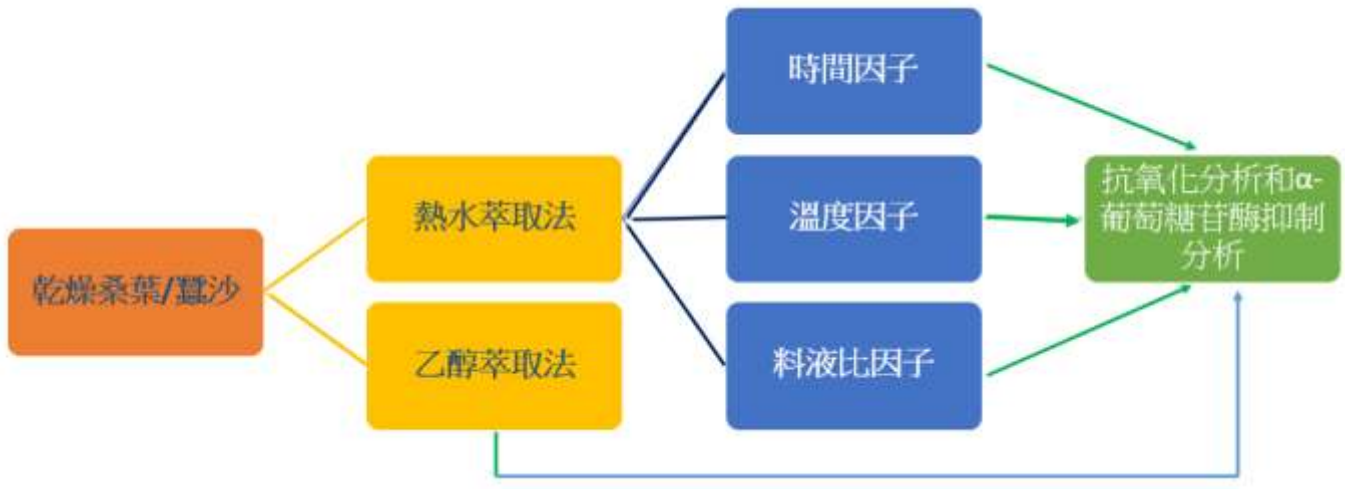
		
0.2mL 吸管尖	震盪器	1mL 吸管尖
		
1.5mL 離心管	計時器	洗滌瓶
		
-2 度冰箱	-20 度冷凍櫃	去離子水
		
漏斗	酸鹼度計	玻璃燒杯
		
96 孔盤		

### 三、藥品

63%乙醇水溶液
1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl，簡稱DPPH)
磷酸鹽緩衝生理鹽水(Phosphate buffered saline，簡稱為PBS)
阿卡波糖(Acarbose)
$\alpha$ -葡萄糖苷酶( $\alpha$ -glucosidase，AG)
4-硝基苯基 $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷(Synonyms: 4-Nitrophenyl $\beta$ -D-glucopyranoside，簡稱為pNPG)
碳酸鈉

## 參、研究過程或方法

### 一、研究架構與流程



### 二、實驗方法：

#### (一)熱水萃取法

桑葉和蠶沙分別乾燥後，桑葉和蠶沙各取2.00克分別加入40毫升去離子水，隔水加熱15分鐘，等待冷卻後，先去除渣物後，再使用濾紙過濾，得到濾液後，取3 mL放入燒杯，在70°C烘箱烘乾72小時，至完全乾燥後，秤其重量扣除空瓶重量計算萃取液的濃度和萃取率，以上過程重複三次。萃取率%=(萃取物乾重÷樣品乾重)×100%。

#### (二)乙醇萃取法

利用相似相溶原理，選擇乙醇當做極性質子性溶劑，為避免植物中的許多非極性非揮發性成份（蠟質、植物色素等）也一起被萃取出來，故選擇使用低乙醇濃度，本次選用63%乙醇水溶液(95%酒精: 去離子水=2:1)做為此次實驗的萃取溶劑<sup>30,31,32</sup>。實驗過程將桑葉和蠶沙各取2.00克分別加入40毫升63%乙醇溶液，靜置72小時，同樣先去除渣物後，再使用濾紙過濾，得到濾液後，取3 mL放入燒杯，在70°C烘箱烘乾72小時，至完全乾燥後，秤其重量扣除空瓶重量計算萃取液的濃度和萃取率，以上過程重複三次。計算方式：萃取率%=(萃取物乾重÷樣品乾重)×100%。

實驗流程圖如下:



### (三) $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制實驗

阿卡波糖(Acarbose)是治療糖尿病的藥物，作為本實驗的正相關標準品，用以確定  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制實驗無誤。隨後，即可測試來自不同條件狀況所得到的桑葉萃取物和蠶沙萃取物。為了進行萃取物的差異性的比較，必須先調整成等量濃度，因此高濃度的樣品必須稀釋調整成

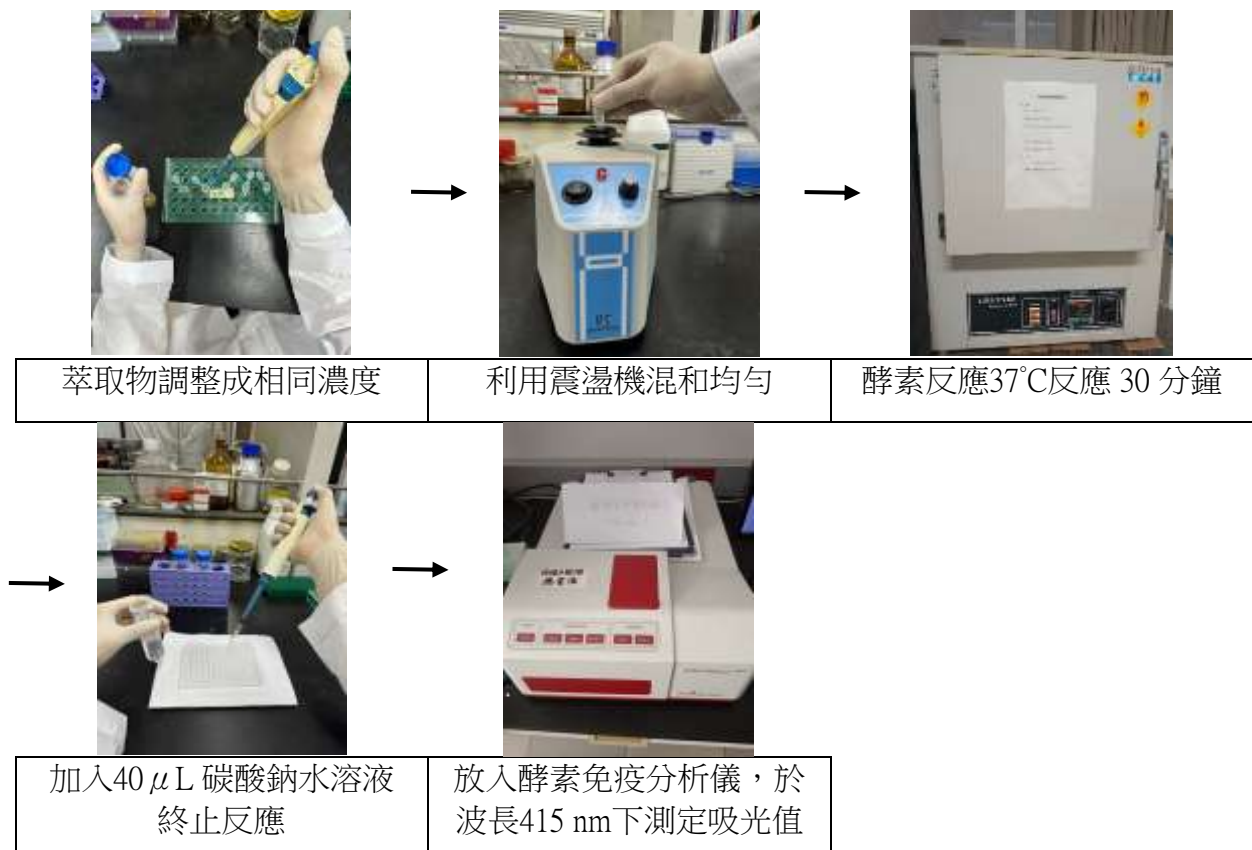
相同濃度。

$\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制實驗方法，取 100 $\mu$ L 樣品(阿卡波糖或萃取物)和10 $\mu$ L  $\alpha$ -葡萄糖苷酶 (1.25U/ml)均勻混合後，再加入反應基質50 $\mu$ L pNPG (3 mg/mL)， 37°C反應 30 分鐘，最後加入 40 $\mu$ L 碳酸鈉水溶液 (1M)終止反應，將96孔盤放入酵素免疫分析儀，於波長415 nm下測定吸光值。

B1對照組	樣品為去離子水
B0對照空白組	樣品為去離子水、不添加酵素和反應基質
S1樣品組	樣品為阿卡波糖或萃取物
S0樣品空白組	樣品為萃取物、不添加酵素和反應基質

抑制率計算：抑制率% = [1 - (B1 - B0) ÷ (S1 - S0)] × 100%

實驗過程圖示：



#### (四)抗氧化測定

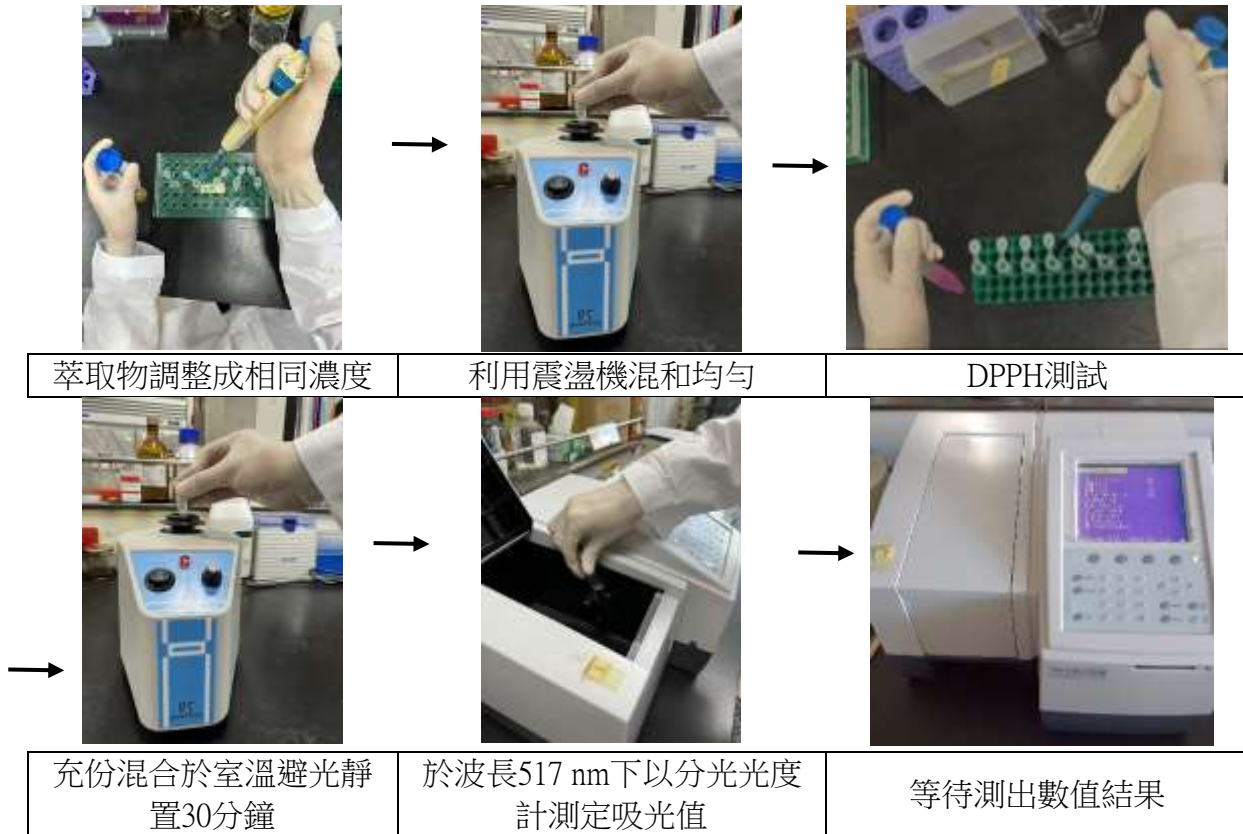
參考Tailor & Goyal (2015)之實驗方法並加以修飾<sup>35</sup>。DPPH為較安定的自由基，DPPH溶於乙醇之溶液為紫色，用分光光度計進行測定，在波長517 nm下具有較強的吸收力，但當抗氧化劑所提供之氫質子將DPPH自由基還原，顏色會變淡黃色，其吸光值降低，表示DPPH被清除的程度愈高，因此可藉由吸光度判斷樣品清除DPPH的能力，即表示抗氧化物的供氫能力。

實驗方法：樣品組取975  $\mu$ L DPPH溶液加入20  $\mu$ L 80%乙醇溶液，然後加入5  $\mu$ L樣品(維生素

C或萃取物)混合均勻，置於室溫下避光反應30分鐘，然後利用分光光度計測定其波長517 nm吸光值，溶液退色之程度表示自由基清除能力，每一組實驗做三重複。控制組為975  $\mu\text{L}$  DPPH 溶液加入25  $\mu\text{L}$  80%乙醇，而樣品空白組為995 $\mu\text{L}$  80%乙醇加入5  $\mu\text{L}$ 樣品。利用DPPH自由基清除率公式，計算樣品清除DPPH自由基的百分率。

DPPH自由基清除率計算公式(%)：清除率%=[1-(樣品組-樣品空白組  $\div$  控制組) ] $\times$ 100%。

實驗過程圖示：



## 肆、研究結果

### 一、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶之抑制劑

阿卡波糖(Acarbose)屬於 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制劑，用於治療第二型糖尿病，它的作用是減緩食物分解為葡萄糖，有助於避免飯後血糖上升太高，因此做為本研究的標準品。對 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制實驗數據如表4-1所示，阿卡波糖濃度範圍從1.5625~12.5000  $\mu\text{g/mL}$ ，重複三次測量結果，其對酵素抑制率分別為23.10%、30.53%、43.80%和69.70%。實驗結果如圖4-1顯示，阿卡波糖對 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用，隨著劑量的增加，抑制程度隨之增加。以單因子獨立變異數分析(one-way ANOVA)之Dunnnett事後檢定，呈現顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

表4-1阿卡波糖對 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制率(%)

標準品 實驗	阿卡波糖(微克/毫升; $\mu\text{g/mL}$ )			
	1.5625	3.1250	6.2500	12.5000
抑制率(%)	23.10 $\pm$ 1.80	30.53 $\pm$ 1.40	43.80 $\pm$ 3.10	69.70 $\pm$ 4.20

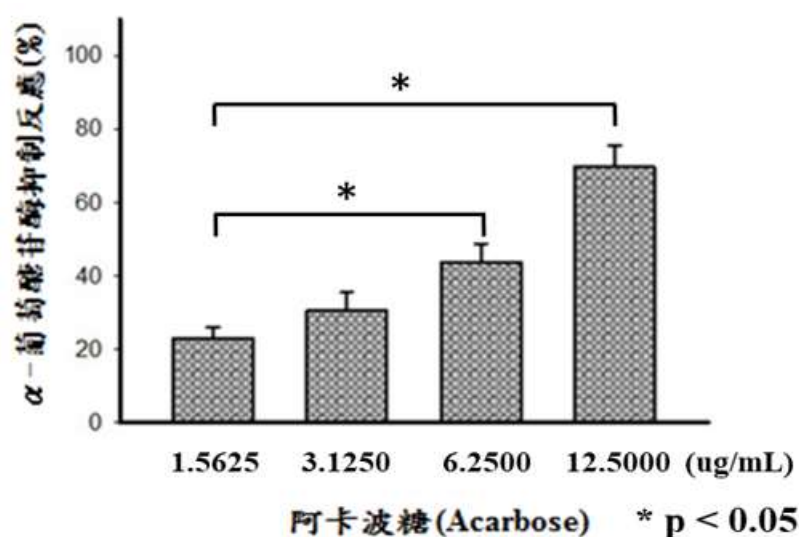


圖4-1. 阿卡波糖對 $\alpha$ -葡萄糖苷酶之抑制作用

### 二、桑葉和蠶沙的萃取

桑葉和蠶沙分別乾燥後，先以料液比1:20比例，分別施以63%乙醇和熱水進行萃取。在63%乙醇萃取，桑葉和蠶沙各取2.00克，加入40毫升63%乙醇，靜置72小時，經第一道過濾法先去除渣物，第二道濾法以濾紙濾除不溶物，得到清澈的濾液，取3 mL放入燒杯，在70 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱烘乾72小時，至完全乾燥後，秤其重量扣除空瓶重量計算萃取率。施以熱水萃取方面，桑葉和蠶沙各取2.00克，加入40毫升水，隔水加熱15分鐘，同樣經兩道過濾程序、乾燥和秤重，最後計算萃取

率，以上過程重複三次，實驗數據和萃取率如表4-2所示，桑葉萃取物的萃取率在63%乙醇和熱水分別為23.30%和16.70%；蠶沙萃取物的萃取率在63%乙醇和熱水分別為9.70和9.40。萃取率(%)表示可從每100公克的桑葉或蠶沙獲得多少克的萃取物，萃取率(%)計算方式： $[\text{萃取物重量}/\text{樣品重量}] \times 100\%$ 。

表4-2 萃取率之計算

實驗 \ 樣品	63%乙醇		熱水	
	桑葉萃取物	蠶沙萃取物	桑葉萃取物	蠶沙萃取物
萃取率(%)	23.30±0.45	9.70±0.26	16.70±0.33	9.40±0.12

### 三、桑葉萃取物和蠶沙萃取物在 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制和抗氧化能力之分析比較

桑葉和蠶沙分別經30%乙醇和熱水萃取所獲得萃取物的濃度，經3重複實驗如表4-3所示，桑葉萃取物在63%乙醇和熱水的濃度分別為7.47 mg/mL和13.30 mg/mL；蠶沙萃取物在63%乙醇和熱水的濃度分別為9.77 mg/mL和9.60 mg/mL，後續為了進行萃取物的差異性的比較，必須先調整相同濃度為7.47 mg/mL，因此其它高濃度的樣品必須稀釋調整成相同濃度。

首先在  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制實驗，經3重複實驗數據如表4-4所示，從63%乙醇和熱水得到的桑葉萃取物，其對  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制分別為76.68%和88.49%；而從30%乙醇和熱水得到的蠶沙萃取物，其對  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制分別為88.30%和93.01%。從酵素抑制的結果如圖4-2所示，桑葉和蠶沙在63%乙醇和熱水萃取法均有良好的酵素抑制作用，不過熱水萃取法顯著優於63%乙醇。以t test 檢定，呈現顯著差異( $p < 0.05$ )。

此外，觀察抗氧化能力，經3重複實驗數據如表4-5所示，從63%乙醇和熱水得到的桑葉萃取物，其抗氧化能力分別為6.58%和34.36%；而從63%乙醇和熱水得到的蠶沙萃取物，其抗氧化能力分別為11.35%和50.61%。如圖4-3所示，熱水萃取法顯著優於63%乙醇萃取法，且蠶沙萃取物的抗氧化能力高於桑葉萃取物5倍以上。以t test 檢定，呈現顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

表4-3桑葉萃取物和蠶沙萃取物濃度(mg/mL)

實驗 \ 樣品	63%乙醇		熱水	
	桑葉	蠶沙	桑葉	蠶沙
萃取物	7.47±0.18	9.77±0.10	13.30±0.50	9.60±0.70

表4-4 桑葉萃取物和蠶沙萃取物對  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制率(%)

實驗 \ 樣品	63%乙醇		熱水	
	桑葉萃取物	蠶沙萃取物	桑葉萃取物	蠶沙萃取物
抑制率(%)	76.68±7.19	88.49±2.83	88.30±2.31	93.01±1.75



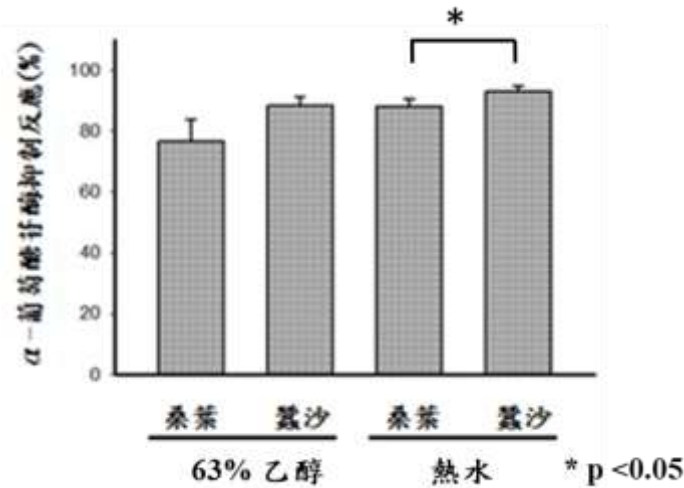


圖4-2. 不同萃取法的萃取物對  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制反應

表4-5 桑葉萃取物和蠶沙萃取物的抗氧化能力(%)

實驗	63%乙醇		熱水	
	桑葉	蠶沙	桑葉	蠶沙
抗氧化(%)	6.58±0.30	34.36±0.46	11.35±0.45	50.61±0.41

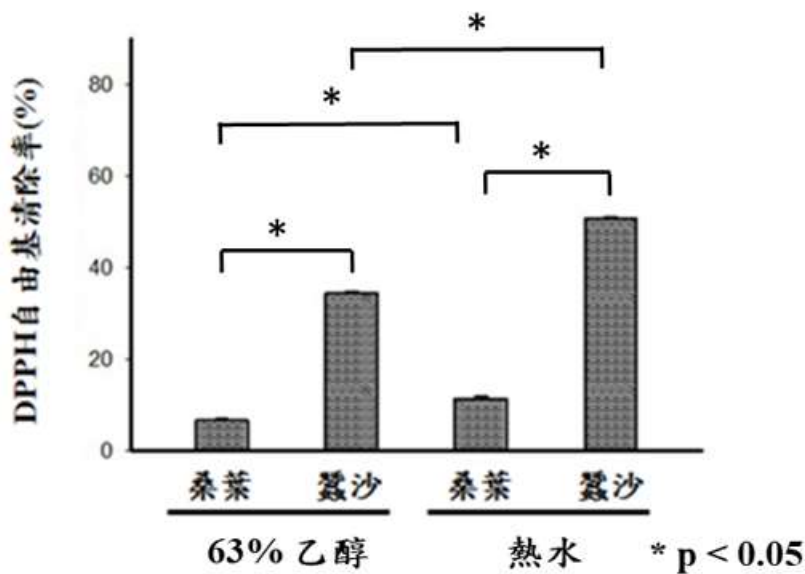


圖4-3. 不同萃取法的萃取物之抗氧化反應

#### (一) 萃取溫度的探討

採用料液比1:20進行熱水萃取法，萃取溫度設定70°C、80°C、90°C和100°C，分別隔水加熱15分鐘後，同樣經過兩道程序的過濾、乾燥、秤重和濃度計算。桑葉和蠶沙分別得到四組不同萃取溫度的萃取物，經3重複實驗得到濃度數據如表4-6所示，桑葉萃取物濃度在70~100°C分別是14.20、12.40、11.00和12.10 mg/mL；而蠶沙萃取物濃度在70~100°C分別是8.90、7.70、8.40和8.80 mg/mL，由於不同濃度無法比較差異，因此採用最低濃度(7.70 mg/mL)，而高濃度者均需稀

釋調整成7.70 mg/mL方可進行後續  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制和抗氧化能力之分析比較。

酵素抑制率數據如表4-7所示，不同溫度70~100°C所獲得桑葉萃取物和蠶沙萃取物在的酵素抑制反應分別是91.44、3.12、94.81、93.42、92.46、93.78、93.82和93.57；從圖4-4結果分析，在不同溫度70~100°C所獲得桑葉萃取物和蠶沙萃取物對  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制，均呈現良好抑制能力。在抗氧化反應數據如表4-8所示，在不同溫度70~100°C所獲得的桑葉萃取物和蠶沙萃取物，其抗氧化能力分別是15.10、17.01、15.40、20.10、55.00、55.20、57.50、和58.30。從圖4-5結果分析，在不同溫度70~100°C所獲得蠶沙萃取物的抗氧化能力顯著優於桑葉萃取物。以t test 檢定( $p < 0.05$ )。

表4-6 不同溫度桑葉和蠶沙萃取物濃度(mg/mL)

溫度°C \ 樣品	桑葉萃取物	蠶沙萃取物
70	14.20±0.36	8.90±0.26
80	12.40±0.26	7.70±0.45
90	11.00±0.20	8.40±0.17
100	12.10±0.26	8.80±0.70

表4-7 不同溫度的桑葉和蠶沙萃取物對  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制(%)

溫度°C \ 樣品	桑葉萃取物	蠶沙萃取物
70	91.44±0.51	92.46±0.26
80	93.12±0.07	93.78±0.41
90	94.81±0.11	93.82±0.90
100	93.42±0.18	93.57±0.22

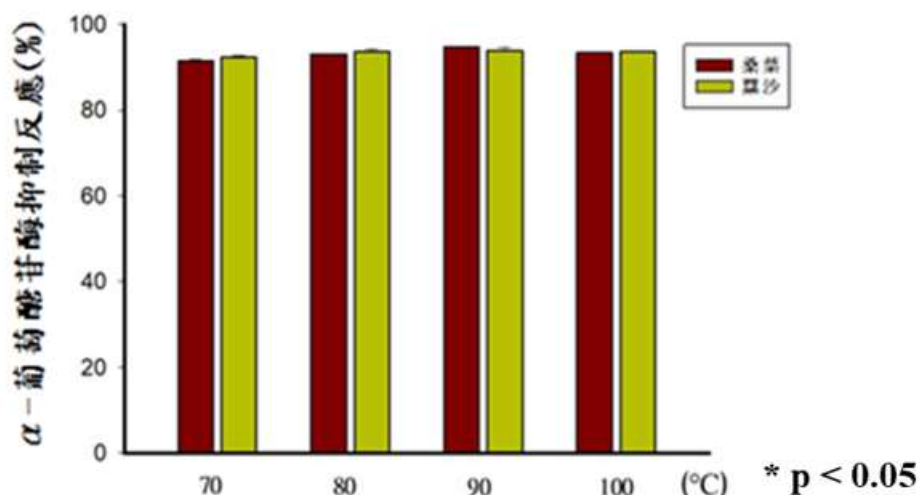


圖4-4. 不同溫度的萃取物對  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制反應

表4-8 不同溫度的桑葉和蠶沙萃取物的抗氧化反應(%)

溫度°C	桑葉萃取物	蠶沙萃取物
70	15.10±0.25	55.00±0.18.
80	17.01±0.20	55.20±0.15
90	15.40±0.26	57.50±0.30
100	20.10±0.24	58.30±0.17

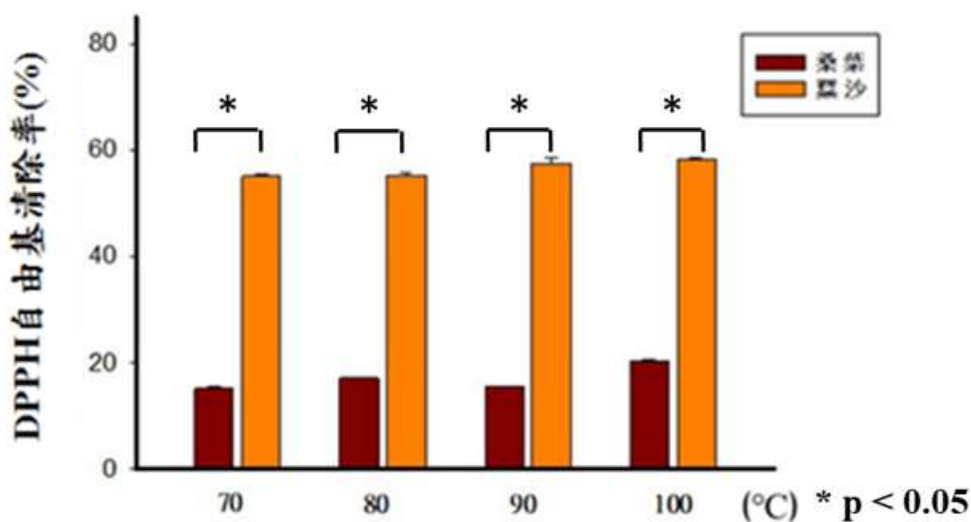


圖4-5. 不同溫度的萃取物的抗氧化反應

## (二)料液比的探討

採用100°C的熱水萃取法，料液比調整為1:20、1:40、1:60、1:80、1:100，一樣使用隔水加熱15分鐘後，過濾、乾燥、稱重和計算濃度。最後桑葉和蠶沙分別得到五組萃取物，經3重複實驗得到濃度數據如表4-9所示，不同料液比(1:20、1:40、1:60、1:80、1:100)的桑葉萃取物濃度分別是11.10、5.00、2.40、2.70和1.80；而蠶沙萃取物濃度分別6.80、3.20、2.90、2.20和1.80，後續實驗需採相同濃度(1.80 mg/mL)進行分析，而高濃度者均需稀釋調整成1.80 mg/mL方可進行後續 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制和抗氧化能力之分析比較。

酵素抑制率數據如表4-10所示，不同料液比所獲得桑葉萃取物和蠶沙萃取物的酵素抑制反應分別是 69.10、75.80、83.10、75.40、77.20、74.90、77.80、82.60、71.80和72.90；從圖4-6結果分析，以t test檢定，在料液比 1:60 所獲得的桑葉萃取物和蠶沙萃取物對 $\alpha$ -葡萄糖苷酶呈現較高的酵素抑制作用。在抗氧化反應數據如表4-11所示，在不同料液比所獲得桑葉萃取物和蠶沙萃取物的抗氧化能力分別是11.70、17.60、17.30、10.40、10.70、46.00、48.10、40.10、34.60和33.50；從圖4-7結果分析，料液比1:40所獲得的蠶沙萃取物，其抗氧化能力較為顯著。以t test 檢定 ( $p < 0.05$ )。

表4-9不同料液比的萃取物濃度(mg/mL)

料液比 \ 樣品	桑葉萃取物	蠶沙萃取物
1:20	11.10±0.50	6.80±0.50
1:40	5.00±0.30	3.20±0.30
1:60	2.40±0.30	2.90±0.30
1:80	2.70±0.40	2.20±0.50
1:100	1.80±0.30	1.80±0.30

表4-10不同料液比的萃取物對  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制(%)

料液比 \ 樣品	桑葉萃取物	蠶沙萃取物
1:20	69.10±0.20	74.90±0.40
1:40	75.80±1.50	77.80±2.10
1:60	83.10±2.00	82.60±0.70
1:80	75.40±1.50	71.80±0.30
1:100	77.20±0.40	72.90±1.80

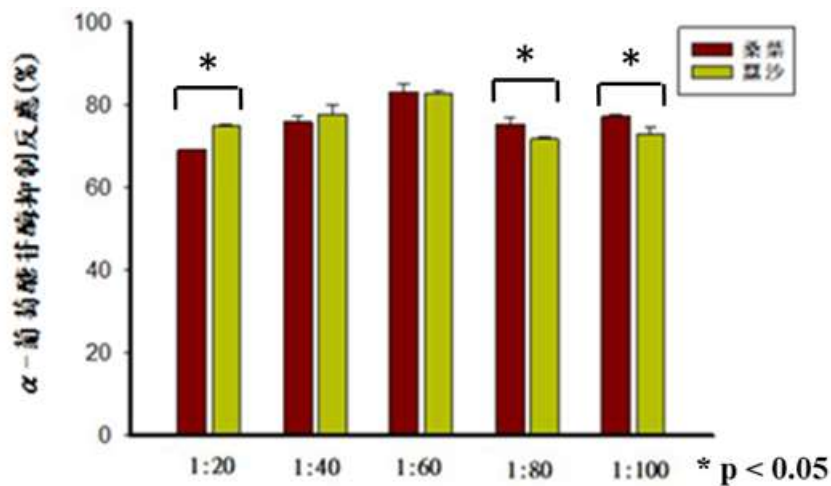


圖4-6. 不同料液比的萃取物對  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制反應

表4-11不同料液比的萃取物的抗氧化反應(%)

料液比 \ 樣品	桑葉萃取物	蠶沙萃取物
1:20	11.70±0.40	46.00±5.30
1:40	17.60±2.20	48.10±6.00
1:60	17.30±4.20	40.10±4.00
1:80	10.40±0.80	34.60±0.70
1:100	10.70±1.30	33.50±1.90

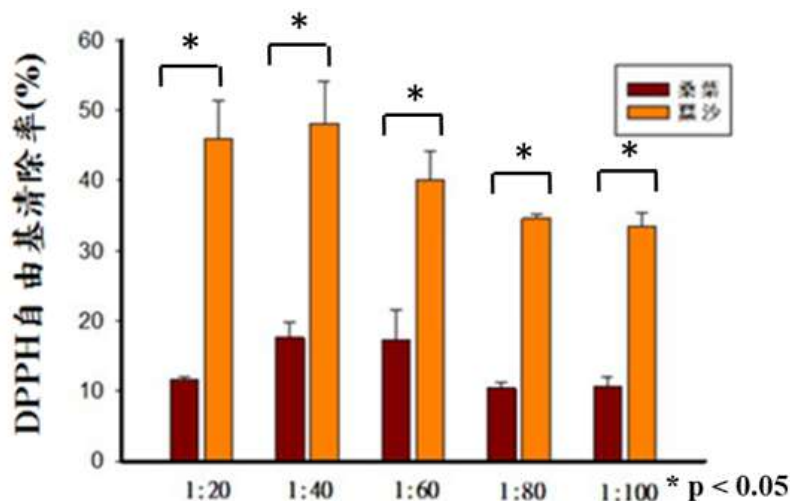


圖4-7. 不同料液比的萃取物的抗氧化反應

### (三) 萃取時間的探討

先前實驗得到最適溫度100°C和最適料液比1:60的萃取條件，接下來將探討不同萃取時間的影響，並確定最佳萃取時間；因此，隔水加熱時間分別為10、15、20、25和30分鐘，其後萃取物分別再經過濾、乾燥、秤重和計算濃度。最後桑葉和蠶沙分別得到五組萃取物，經3重複實驗得到濃度數據如表4-12所示，桑葉萃取物濃度分別是3.90、4.40、4.60、4.80和4.80；蠶沙萃取物濃度分別是2.60、2.20、2.80、3.10、3.30，後續實驗需採相同濃度(2.20 mg/mL)進行分析，而高濃度者均需稀釋調整成2.20 mg/mL方可進行後續 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制和抗氧化能力之分析比較。

酵素抑制率數據如表4-13所示，在不同萃取時間所獲得桑葉萃取物和蠶沙萃取物的酵素抑制反應分別是83.80、84.10、86.10、87.10、84.40、85.70、85.80、86.00、87.40和85.70；從圖4-8結果分析，在10~30分鐘的範圍，所獲得桑葉萃取物和蠶沙萃取物呈現一致程度以上的酵素抑制作用。在抗氧化反應數據如表4-14所示，在不同萃取時間所獲得桑葉萃取物和蠶沙萃取物的抗氧化能力分別是13.40、14.80、15.80、18.40、17.50、49.50、57.60、58.60、54.40和48.20；從圖4-9結果分析，在20分鐘的萃取時間，所獲得的蠶沙萃取物其抗氧化能力最佳，其次是15分鐘。以t test檢定( $p < 0.05$ )。

表4-12 不同萃取時間的萃取物濃度(mg/mL)

樣品 萃取時間min	桑葉萃取物	蠶沙萃取物
10	3.90±0.26	2.60±0.20
15	4.40±0.20	2.60±0.20
20	4.60±0.20	2.80±0.36
25	4.80±0.46	3.10±0.26
30	4.80±0.26	3.30±0.36

表4-13不同萃取時間的萃取物對 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制(%)

樣品 萃取時間min	桑葉萃取物	蠶沙萃取物
10	83.80±6.10	85.70±6.40
15	84.10±9.50	85.80±5.30
20	86.10±8.30	86.00±7.90
25	87.10±6.10	87.40±6.40
30	84.40±6.60	85.70±7.20

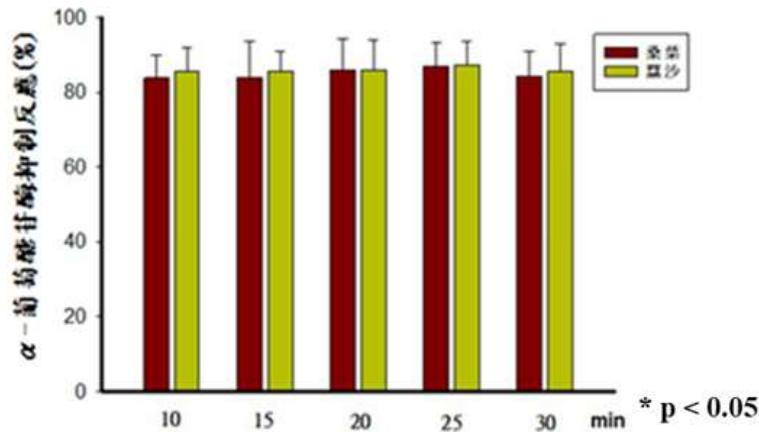


圖4-8. 不同萃取時間的萃取物對 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制反應

表4-14不同萃取時間的萃取物的抗氧化反應(%)

樣品 萃取時間min	桑葉萃取物	蠶沙萃取物
10	13.40±0.80	49.50±0.70
15	14.80±0.40	57.60±1.00
20	15.80±0.60	58.60±1.60
25	18.40±0.80	54.40±1.20
30	17.50±0.70	48.20±1.00

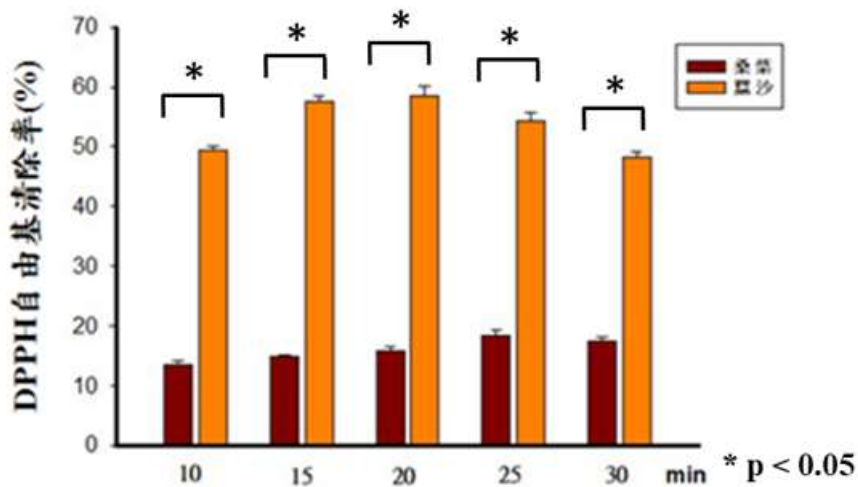


圖4-9. 不同萃取時間的萃取物之抗氧化反應

(四)桑葉萃取物和蠶沙萃取物對  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制的IC<sub>50</sub>

接續，將探討二者萃取物IC<sub>50</sub>對  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制濃度。桑葉萃取物濃度0.60 mg/mL、1.20mg/mL和2.40mg/mL，其對  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制率分別為42.27%、63.40%和81.17%，桑葉萃取物的IC<sub>50</sub>為0.80 mg/mL，如表4-15所示；蠶沙萃取物濃度0.19 mg/mL、0.39 mg/mL和0.78 mg/mL，其對  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制率分別為22.10%、45.27%和64.97%，蠶沙萃取物的IC<sub>50</sub>為0.53 mg/mL表4-16所示。從IC<sub>50</sub>的數據分析，蠶沙萃取物優於桑葉萃取物。

表4-15桑葉萃取物對  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制(%)的IC<sub>50</sub>

桑葉萃取物	$\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制(%)
0.60 mg/mL	42.27±0.95
1.20mg/mL	63.40±1.10
2.40mg/mL	81.17±1.00
IC <sub>50</sub> mg/mL	0.80±0.03

表4-16蠶沙萃取物對  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制(%)的IC<sub>50</sub>

蠶沙萃取物	$\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制(%)
0.19 mg/mL	22.10±0.53
0.39 mg/mL	45.27±0.65
0.78 mg/mL	64.97±0.42
IC <sub>50</sub> mg/mL	0.53±0.01

## 伍、討論

### 一、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶之抑制劑

阿卡波糖(Acarbose)屬於 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制劑，用於治療二型糖尿病，它的作用是減緩食物分解為葡萄糖，有助於避免飯後血糖上升太高，因此做為本研究的標準品。從實驗結果圖4-1所示，當劑量從 $1.56 \mu\text{g/mL}$ 提高到 $12.50 \mu\text{g/mL}$ 時，對酵素的抑制作用，從20%提高70%，此實驗結果證實本實驗方法是可行的。

### 二、桑葉和蠶沙的萃取方式

桑葉和蠶沙的萃取方式，選用熱水萃取和63%乙醇萃取，理由是熱水萃取是最普遍的方法，也是居家可行的方法，如泡茶、沖咖啡或是傳統煎藥等，可容易溶出存在於桑葉和蠶沙的極性物質，因此適用在本研究。另一種方式是乙醇萃取法，可以溶出非極性物質，倘若乙醇濃度過高，不利於極性物的溶出，因此選擇63%乙醇水溶液<sup>31</sup>，皆可溶出極性和非極性物質，且正好做為對比實驗，熱處理和室溫萃取方式的比較。

### 三、桑葉萃取物和蠶沙萃取物在 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制和抗氧化能力之分析比較

首先在 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制實驗，從酵素抑制的結果如圖4-2所示，桑葉和蠶沙在63%乙醇和熱水萃取法均有良好的酵素抑制作用，不過熱水萃取法較優於63%乙醇。其抗氧化能力分別為11.40%和50.60%。如圖4-3所示，熱水萃取法顯著優於63%乙醇萃取法，且蠶沙萃取物的抗氧化能力高於桑葉萃取物5倍以上。綜合研究結果，熱水萃取優於63%乙醇萃取，後續工作採用熱水萃取法，並檢討三個變因，如萃取溫度、萃取時間和料液比。

### 四、萃取溫度的探討

萃取溫度設定 $70^{\circ}\text{C}$ 、 $80^{\circ}\text{C}$ 、 $90^{\circ}\text{C}$ 和 $100^{\circ}\text{C}$ ，分別隔水加熱15分鐘後，同樣經過兩道程序的過濾、乾燥、秤重和濃度計算。從圖4-4結果分析，在不同溫度 $70\sim 100^{\circ}\text{C}$ 所獲得桑葉萃取物和蠶沙萃取物對 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制均呈現良好抑制能力。從圖4-5結果分析，在不同溫度 $70\sim 100^{\circ}\text{C}$ 所獲得桑葉萃取物和蠶沙萃取物的抗氧化能力顯著優於桑葉萃取物。綜合結果，雖然溫度範圍( $70\sim 100^{\circ}\text{C}$ )均有顯著的反應，因食品安全性的考量，採取溫度 $100^{\circ}\text{C}$ 較為適當。

### 五、料液比的探討

料液比調整為1:20、1:40、1:60、1:80、1:100，一樣使用隔水加熱15分鐘後，過濾、乾燥、秤重和計算濃度。從圖4-6結果分析，在料液比1:60所獲得的桑葉萃取物和蠶沙萃取物對 $\alpha$ -葡萄糖苷酶呈現較高的酵素抑制作用。從圖4-7結果分析，料液比1:40所獲得的蠶沙萃取物，其抗氧化能力較為顯著。綜合結果，1:60為較高的酵素抑制，1:40為較優的抗氧化反應，因此，在1:40和1:60區



間可視為良好範圍，所以採取1:60比例作為後續不同萃取時間的探討。

#### 六、萃取時間的探討

隔水加熱時間分別為10、15、20、25和30分鐘，其後萃取物分別再經過濾、乾燥、秤重和計算濃度。從圖4-8結果分析，在10~30分鐘的範圍，所獲得桑葉萃取物和蠶沙萃取物呈現一致程度以上的酵素抑制作用。從圖4-9結果分析，在20分鐘的萃取時間，所獲得的蠶沙萃取物其抗氧化能力最佳，其次是15分鐘，其中桑葉萃取物的抗氧化能力均低於蠶沙萃取物。

根據以上實驗數據和結果顯示，熱水萃取對桑葉和蠶沙是最適方法，且獲得萃取參數的條件，溫度100°C、料液比1:60和萃取時間20分鐘。

## 陸、結論

- 一、桑葉萃取物和蠶沙萃取物取得來源有熱水萃取法和63%乙醇萃取法，熱水萃取法所得到的萃取物，無論在對  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制作用和抗氧化反應均顯著優於63%乙醇萃取法，且蠶沙萃取物的抗氧化能力高於桑葉萃取物5倍以上。
- 二、在不同溫度70~100°C所獲得的蠶沙萃取物的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制反應和抗氧化能力均顯著優於桑葉萃取物。因應食品安全性的考量，採取溫度100°C較為適當。
- 三、在1:40和1:60區間的料液比均為良好區間，所以採取1:60比例做為最適比例。
- 四、萃取時間在15分鐘和20分鐘的區間，所獲得的蠶沙萃取物，其抗氧化能力最佳。若是配合政府或企業節能省碳，15分鐘可視為最佳時間。
- 五、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制的 $IC_{50}$ 值，桑葉萃取物的 $IC_{50}$ 為0.80 mg/mL，蠶沙萃取物的 $IC_{50}$ 為0.53 mg/mL，蠶沙萃取物優於桑葉萃取物。

## 柒、參考資料及其他

### 一、參考資料

1. Asano N, Tomioka E, Kizu H, et al. Sugars with nitrogen in the ring isolated from the leaves of *Morus bombycis*. *Carbohydrate Research*, 1994, 253: 235-245.
2. Kimura T, Nakagawa K, Saito Y, et al. Determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves using hydrophilic interaction chromatography with evaporative light scattering detection. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(6):1415-1418.
3. Asai A, Nakagawa K, Higuchi O, et al. Effect of mulberry leaf extract with enriched 1-deoxynojirimycin content on postprandial glycemic control in subjects with impaired glucose metabolism. Mulberry DNJ and postprandial glycemia. *J Diabetes Investig*, 2011, 2(4):318-320.
4. 全民糖尿病觀測站-什麼是糖尿病:  
([http://www.diabetes.org.tw/wddt\\_heduc01.jsp?P\\_TNO=EDUC990010001&P\\_HCTG=A](http://www.diabetes.org.tw/wddt_heduc01.jsp?P_TNO=EDUC990010001&P_HCTG=A))
5. 臺北市立聯合醫院-糖尿病類型:  
([https://tpech.gov.taipei/mp109211/Content\\_List.aspx?n=3384A118C39E538D](https://tpech.gov.taipei/mp109211/Content_List.aspx?n=3384A118C39E538D))
6. 康健雜誌-糖尿病前兆可逆轉！4大初期症狀，從皮膚到腳自我檢測，2021-06-01，文/游奕凱，責任編輯/陳祖晴，出處/康健編輯部:(<https://www.commonhealth.com.tw/article/84355>)
7. 健康2.0-糖尿病／除了「三多一少」還有哪些症狀？4種併發症很致命！當心中風、心肌梗塞，2022/08/02:(<https://health.tvbs.com.tw/encyclopedia/334244>)
8. Heho-多吃、多喝又多尿！我得了糖尿病嗎？為什麼會得糖尿病？初期症狀、第一型和第二型成因一次整理，日期:2023/4/21，作者:賴以玲(<https://heho.com.tw/archives/263096>)
9. Bowtie-【糖尿病】一型和二型糖尿病有什麼分別？飲食上要注意什麼:  
(<https://www.bowtie.com.hk/blog/zh/%E7%B3%96%E5%B0%BF%E7%97%85/>)
10. 康健雜誌-第一型、第二型糖尿病的差別？醫師解答成因、治療及診斷標準:  
(<https://www.commonhealth.com.tw/article/84349>)
11. 認識糖尿病慢性併發症-衛生福利部  
(<https://netreg.pntn.mohw.gov.tw/he/231%E8%AA%8D%E8%AD%98%E7%B3%96%E5%B0%BF%E7%97%85%E6%85%A2%E6%80%A7%E4%BD%B5%E7%99%BC%E7%97%87.pdf>)
12. Halliwell B, Gutteridge JM. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press; 2015.
13. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old

- paradigm. *Diabetes*, 1999, 48(1):1-9.
14. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*, 2003, 17(1):24-38.
  15. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, et al. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes*. 2003, 52(1):1-8.
  16. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*, 2010, 107(9):1058-1070.
  17. 每日頭條-桑樹生長發育的環境條件，2017-09-19，由雲南省農業廳發表于農業:  
(<https://knews.cc/zh-tw/agriculture/jrbpagy.html>)
  18. 蠶桑館-桑樹適當修剪促進生長，刊登日:110/04/12，更新日:112/10/26  
(<https://kmweb.moa.gov.tw/subject/subject.php?id=43396>)
  19. 農業知識入口網-桑葉低溫霜害症狀與管理措施，作者:劉東憲;施佳宏，公佈日期:111/11/18  
(<https://kmweb.moa.gov.tw/knowledgebase.php?func=1&type=12895&keyword=&id=417645>)
  20. 悠活原力-桑葉功效有哪些？營養組成、禁忌一次看懂，營養師:王思晴，2023-05-14  
(<https://www.yohopower.tw/blogs/health-note/97231/>)
  21. Srivastava S, Kapoor R, Thathola A, et al. Nutritional quality of leaves of some genotypes of mulberry (*Morus alba*). *Int J Food Sci Nutr*, 2006, 57:305–313.
  22. Hu XQ, Jiang L, Zhang JG, et al. Quantitative determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves from 132 varieties. *Ind Crops Prod*, 2013, 49:782–784.
  23. Thabti I, Elfalleh W, Hannachi H, et al. Identification and quantification of phenolic acids and flavonol glycosides in Tunisian *Morus* species by HPLC-DAD and HPLC-MS. *J Funct Foods*, 2012, 4:367–374.
  24. 農業主題館蠶沙館-蠶的一生，刊登日：96/11/26，更新日：112/12/05:  
(<https://kmweb.moa.gov.tw/subject/subject.php?id=14108>)
  25. 蠶桑館-蠶沙之健康飲品加工應(本文取自苗栗區農業專訊第103期 作者:廖久薰):  
(<https://kmweb.moa.gov.tw/subject/subject.php?id=52989&print=Y>)
  26. A+醫學百科-蠶沙: (<http://cht.a-hospital.com/w/%E8%9A%95%E6%B2%99>)
  27. 每日頭條-蠶沙是什麼，蠶沙的功效與作用，2016-10-31，由問病網發表于健康:  
(<https://knews.cc/zh-tw/health/p45vy48.html>)
  28. 蠶砂[蠶沙]-百科知識中文網 (<https://www.jendow.com.tw/wiki/%E8%A0%B6%E7%A0%82>)
  29. 每日頭條-蠶沙有四大功效，祛風除濕最佳，但它的來源可能讓你左右為難，2020-01-15，由

小叻健康匯發表于健康:(<https://kknews.cc/zh-tw/health/q98v26y.html>)

30. Tailor C. S. and Goyal A. Antioxidant Activity by DPPH Radical Scavenging Method of *Ageratum conyzoides* Linn. leaves. *American Journal of Ethnomedicine*, 2014, 1(4): 244-249.
31. 張紅俊, 常振國, 楊建, & 周樂. 超聲輔助提取蠶沙中總黃酮的工藝研究. *西北林學院學報*, 2010, 25(6):155-157.
32. Aoki F., Honda S., Kishida H., et al. Suppression by licorice flavonoids of abdominal fat accumulation and body weight gain in high-fat diet-induced obese C57BL/6J mice. *Bioscience Bio-technology and Biochemistry*, 2007, 71 (1): 206-214.