

科技部補助專題研究計畫成果報告
期末報告

魚油和EGCG酯化物改善新陳代謝症候群與H. pylori引起之腸胃
潰瘍

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：MOST 104-2320-B-040-017-
執行期間：104年08月01日至105年07月31日
執行單位：中山醫學大學營養學系（所）

計畫主持人：王進崑

中華民國 105 年 10 月 27 日

中文摘要：魚油、植物固醇、EGCG (epigallocatechin gallate)已分別被發現具有消炎、降血脂、血糖等功效，魚油所含的DHA和EPA可以降低血脂肪、抑制凝血酶的合成，減少血小板凝集，有助於心血管疾病的預防與治療且臨床研究發現深海魚油中的omega-3多元不飽和脂肪酸可以有效的提升糖尿病患體內細胞對胰島素的敏感度。EGCg為綠茶中含量最高且最具保健功效之成分。流行病學研究指出，攝取高量EGCG有降低三酸甘油酯及總膽固醇的功效，可降低心血管疾病且有抗氧化、抗癌、降血糖及降血壓等功效。本研究發展並取魚油-EGCG酯化物加以運用於改善代謝症候群及三高症狀。結果顯示：在魚油-EGCG酯化物的合成方法方面，需先經過Saponification皂化、Urea complexation、魚油與EGCG Esterification等步驟後，透過TLC，HPLC (EGCG)，¹H NMR和¹³C NMR光譜以及LC-MS分析酯化的化合物。在魚油-EGCG酯化物人體試驗方面，每天給予魚油-EGCG酯化物(內含魚油500mg、EGCG100mg)，持續服用12星期後可以發現，魚油-EGCG酯化物可以調節血脂、血壓及血糖，有助於改善代謝症候群。

中文關鍵詞：魚油、EGCG、魚油-EGCG酯化物、代謝症候群、血脂

英文摘要：Fish oil, phytosterol and EGCG (epigallocatechin gallate) were found anti-inflammatory, lipid-lowering and blood glucose-lowering effects. Fish oil can reduce blood lipid, inhibit thrombin synthesis, decrease platelet aggregation, and helpful to cardiovascular disease prevention and treatment. EGCg was the the highest compound in green tea and had the most health effects. We made the mixture of fish oil and EGCG, ester of fish-EGCG, to evaluate the improvement of ester of fish oil-EGCG on the metabolic syndrome by human clinical trial. The ester of fish-EGCG was made by saponification, urea complexation and esterification. The esterified compound was then analyzed by TLC, HPLC (EGCG), ¹H NMR and ¹³C NMR spectroscopy as well as LC-MS. In clinical trial, there are significantly decrease in blood pressure, total cholesterol and blood sugar after 12 weeks intervention of ester of fish-EGCG. The ester of fish-EGCG was benefit for metabolic syndrome control.

英文關鍵詞：Fish oil, EGCG, ester of fish-EGCG, metabolic syndrome, blood lipid

研究成果報告

(一)魚油-EGCG 酯化物的合成方法

(1)步驟 1：Saponification 皂化 (KOH 溶於 95%乙醇和己烷)

⇒從魚油中分離 FFA。

利用針頭注射器刺穿膠囊，從魚油膠囊取得樣品，1g 魚油與 10 %KOH(溶於 95%乙醇) (1:5 / 1:6 比例) 混合後過濾，在 60°C 水浴中加熱 30 分鐘。將混合物冷卻 5 分鐘，加入 5mL 正己烷除去未皂化的樣品。在 60°C 水浴中加熱 15 分鐘，並使用減壓濃縮，得到富含 FFA 的提萃物。

(2) 步驟 2:Urea complexation

⇒尿素溶液 (20%在 95%乙醇中) 與 FFA 混合物

將 FFA 與 20%尿素 (1:5 / 1:6) (溶於 70%乙醇)混合，於-20°C 作用反應至隔天早上，形成 crystal [urea FA adduct or Urea-FFA complex]。隔天將 crystal [urea FA adduct or Urea-FFA complex]放置室溫，加入 3ml 的乙醇 (70 或 95%) 後利用 Whatman 濾紙過濾。將濾液 (富含 DHA 和 EPA) 用等體積的水 (10mL) 稀釋並用 H_2SO_4 或 HCl 酸化至 pH 2-3，隨後加入等體積的己烷，並將混合物充分攪拌。將含有脂肪酸的己烷層從含有尿素的水層中分離。用蒸餾水洗滌己烷層以除去

任何殘留的尿素，然後用無水硫酸鈉/氯化鈉（5mL）乾燥，並使用減壓濃縮除去溶劑，並在-20°C下儲存（3h）。將 FFA 的晶體/沉澱物溶解在 1mL 己烷中並離心，取上清液進行進一步的操作（富含 FFA 的濾液，特別是 DHA 和 EPA）。FFA 根據需求溶解在甲醇、乙醇或氯仿中。分別稱重水層和己烷層，計算回收率。利用 TLC 與 NMR 來確認純度。

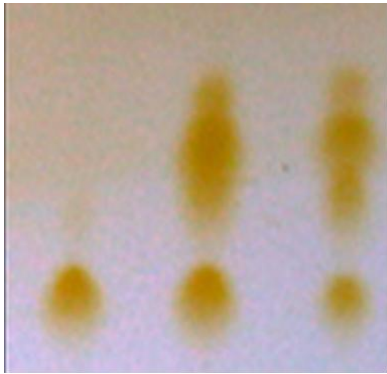
(3)步驟3:由 Hunan Sunfull Bio-tech Co., Ltd., China- Purity 購買 EGCG（純度 95-98%），並經 HPLC 分析證實其純度。

(4)步驟4: Esterification (Enzymic Method-Lipase)

將 Novozyme 脂肪酶（1g，來自 Sigma）加入到具有 3 μ m 分子篩（僅允許 FFA 如:DHA 和 EPA 通過）的火焰乾燥圓底燒瓶中，然後加入 EGCG（0.50 / 1g; 1.15mmols），乾燥的丙酮 - 溶劑（5mL-以輔助酯化）和 EPA（1.73 / 3mL，5.38mole）或 DHA（1.56 / 3.1mL，5.22moles）。將混合物攪拌並在 45°C 下加熱 12-24 小時，使用薄層層析來確認反應完成，透過 TLC，HPLC(EGCG)，¹H NMR 和 ¹³C NMR 光譜以及 LC-MS 分析酯化的化合物。

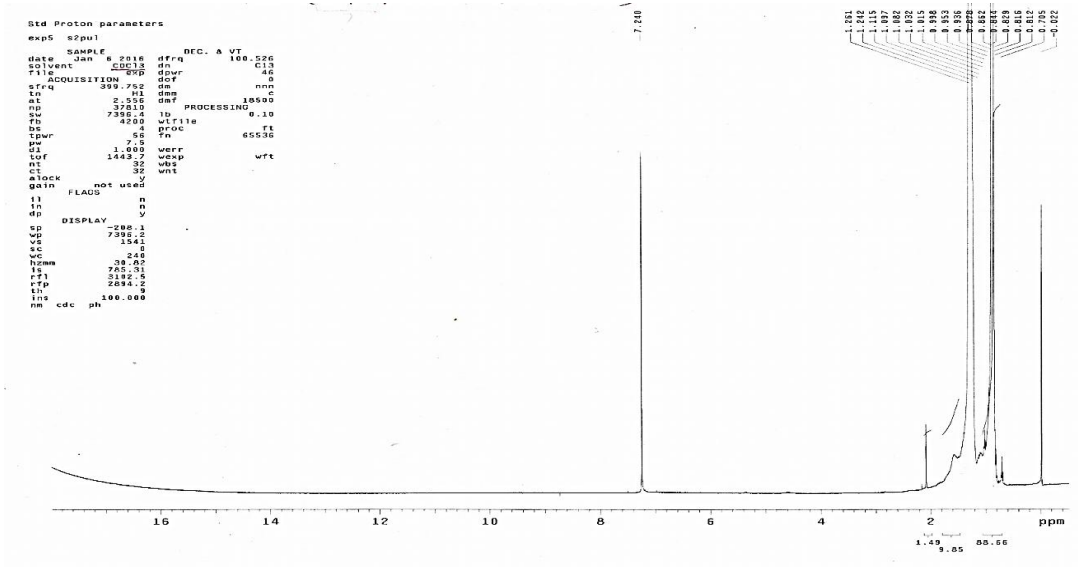
魚油-EGCG 酯化物合成相關結果呈現如下:

TLC

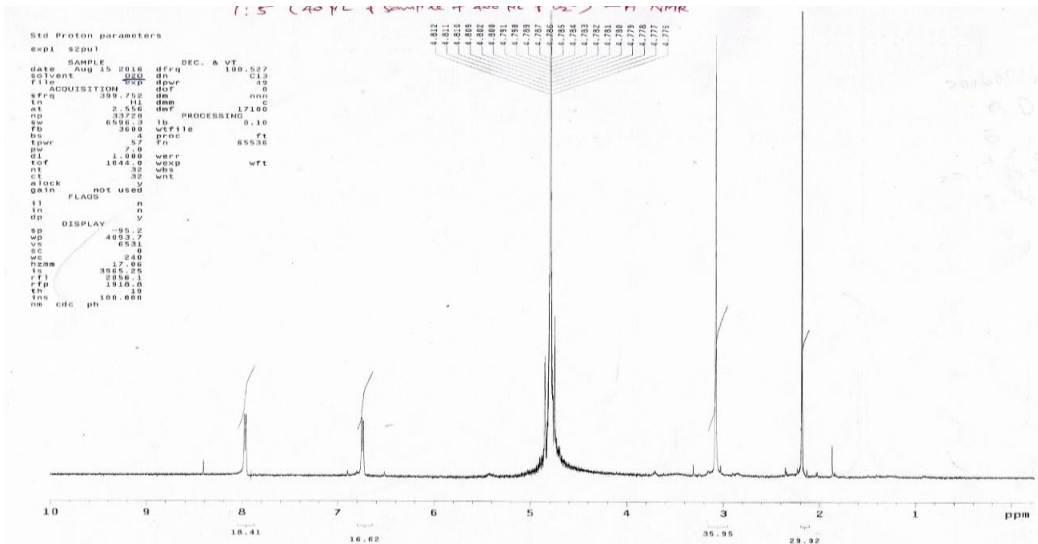


DHA/
EPA FFA Fish
 Oil

NMR ¹H (1:5 CDCl₃)



(1:5 D₂O)



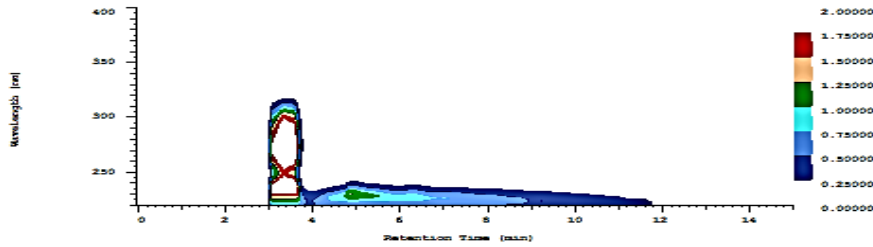
HPLC (95% pure EGCG)

CSM: Samples Series: 0113 Report Name: original System: Sys 1

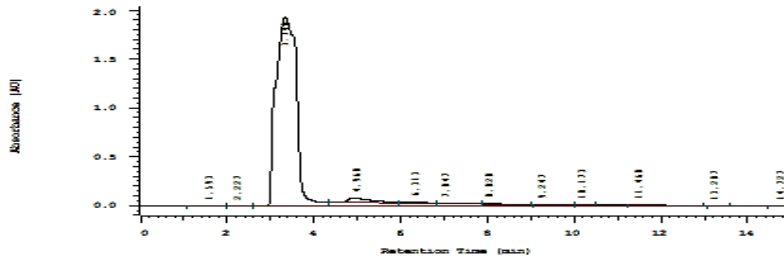
Chromaster System Manager Report

Analyzed Date and Time: 2016/05/23 03:22:51 上
 Reported Date and Time: 2016/05/23 04:01:16 上
 Processed Date and Time: 2016/05/23 03:38:57 上
 Data Path: C:\Win32app\Chromaster\Samples\DATA\0113\
 Processing Method: shirley gradient1
 System (acquisition): Sys 1 Series: 0113
 Application(data): Samples Vial Number: 1
 Sample Name: UNKNOWN001 Vial Type: UNK
 Injection from this vial: 1 of 1 Volume: 20.0 ul
 Sample Description:

Absorbance Mode: NORMAL(2.0 AU) Absorbance Scale: Auto
 Spectral Bandwidth: 4 nm Spectral Interval: 400 nm



Chrom Type: Integrated Chromatogram, 240 to 260 nm



Processing Method: shirley gradient1
 Method Developer: shirley gradient1
 Pump 1: 5110
 Pump 1 Solvent A: acetic acid Pump 1 Solvent B: acetonitrile
 Pump 1 Solvent C: methanol Pump 1 Solvent D: hexane
 Method Description: egcg

Page Indicator: 1 / 2

CSM: Samples Series: 0113 Report Name: original System: Sys 1

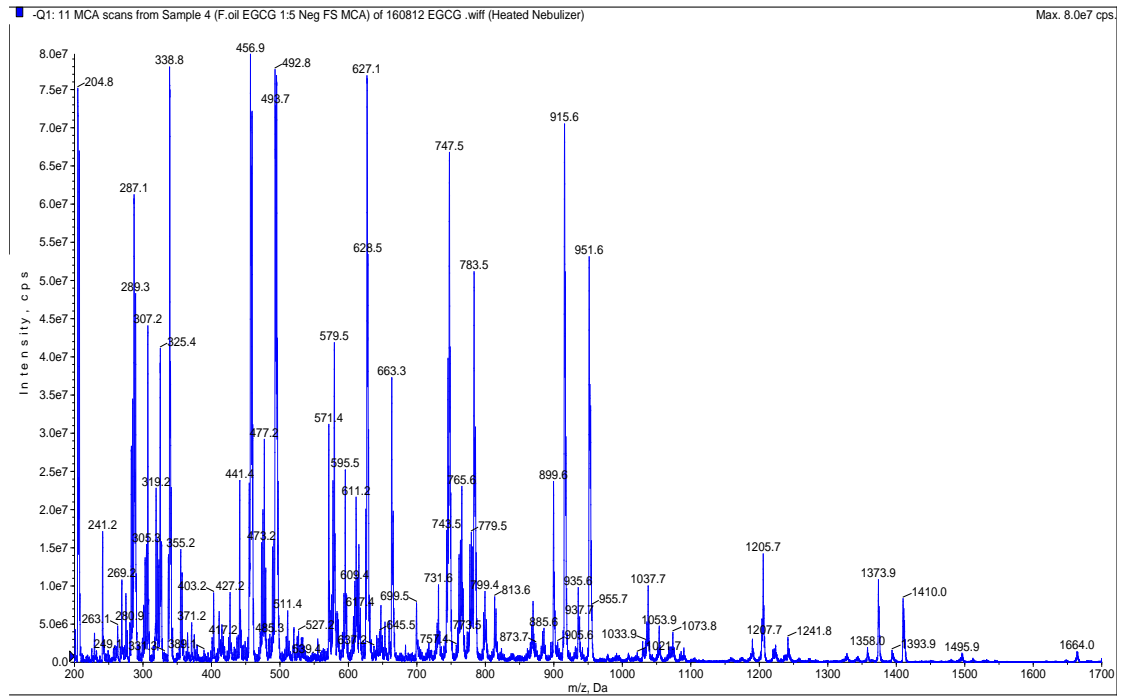
Chrom Type: Integrated Chromatogram, 240 to 260 nm

Peak Quantitation: AREA
 Calculation Method: AREA%

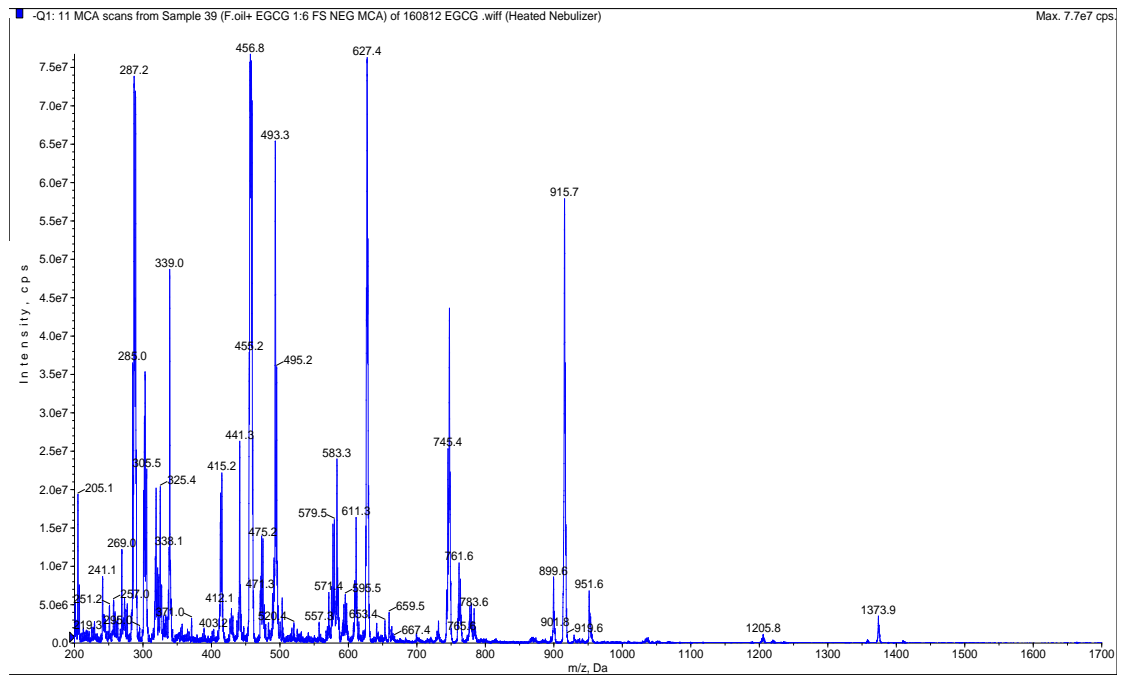
No.	RT	Area	Conc 1	EC
1	1.593	21258	0.055	EV
2	2.227	19217	0.050	VB
3	3.340	37104268	95.989	EV
4	4.960	979893	2.535	TEV
5	6.313	225685	0.584	TVV
6	7.047	150559	0.389	TVV
7	8.020	77331	0.200	TVB
8	9.247	26783	0.069	TEV
9	10.173	13405	0.035	TVB
10	11.460	19586	0.051	TBB
11	13.207	9496	0.025	TBB
12	14.727	7263	0.019	TBB
		38654744	100.000	

Peak rejection level: 0

LC-MS (1:5, POS)



(1:5, NOS)



(二)魚油-EGCG 酯化物之人體臨床試驗

■魚油-EGCG 酯化物對血脂肪、血壓的影響

(1)研究對象

本試驗共納入 15 位符合代謝症候群診斷或膽固醇偏高的成年人，符合以下三項者即診斷為代謝症候群，男性腰圍需 ≥ 90 公分/女性腰圍需 ≥ 80 公分、在未服用藥物下，收縮壓 $\geq 130\text{mmHg}$ /舒張壓 $\geq 85\text{mmHg}$ 、空腹血糖 $\geq 100\text{mg/dL}$ 、三酸甘油酯 $\geq 150\text{mg/dL}$ 、男性的高密度脂蛋白膽固醇 $< 40\text{mg/dL}$ ，女性 $< 50\text{mg/dL}$ ，膽固醇偏高的定義為未服用任何藥物下，空腹膽固醇濃度 $\geq 180\text{mg/dL}$ 。共納入男性 7 位、女性 8 位，其中 3 位受試者因無法配合研究而退出，完成研究者共 12 位(男性 6 位、女性 6 位)，平均年齡為 43.92 ± 11.67 歲(25~62 歲)，本次納入的受試者主要是符合代謝症候群診斷判定中的腰圍、血壓與血脂。

(2)受試配方

受試者每天服用一次魚油-EGCG 酯化物(內含魚油 500mg、EGCG100mg)，持續服用 12 星期。

(3)研究流程

本試驗共為期 12 週，分別在第 0 及 12 週檢測受試者體重及血壓，並採集血液樣本進行生化分析並記錄相關變化。血液測定

項目包括:三酸甘油酯、總膽固醇、低密度脂蛋白膽固醇、高密度脂蛋白膽固醇、血糖、肝功能、腎功能等。結果顯示:在食用魚油-EGCG 酯化物 12 週後有顯著調降血脂的效果,總膽固醇濃度由 148.83 ± 35.58 mg/dL 顯著下降至 137.25 ± 32.58 mg/dL, 平均下降 11.58 mg/dL (7.2%), 其他血脂指標, 雖沒達到統計上的顯著差異, 但也有改善的趨勢, 三酸甘油酯下降 6.25 mg/dL (4.7%) 和高密度脂蛋白膽固醇上升 3.93 mg/dL(13.99%), 低密度脂蛋白膽固醇下降 13.67 mg/dL(11.89%)。試驗證實: 魚油-EGCG 酯化物能有效改善血壓及血脂狀況。

■魚油-EGCG 酯化物對血糖的影響

(1)研究對象

本試驗共納入 10 位符合前期糖尿病(葡萄糖不耐)的成年人, 符合條件為在未服用任何藥物下, 空腹血糖介於 $100 \sim 125$ mg/dL 之間。共納入男性 4 位、女性 6 位, 平均年齡為 40.50 ± 10.36 歲(28~60 歲)。

(2)受試配方

受試者每天服用一次魚油-EGCG 酯化物(內含魚油 500mg、EGCG100mg), 持續服用 12 星期。

(3) 研究流程

本試驗共為期 12 週，分別在第 0 及 12 週檢測受試者體重及血壓，並採集血液樣本進行生化分析並記錄相關變化。血液測定項目包括：三酸甘油酯、總膽固醇、低密度脂蛋白膽固醇、高密度脂蛋白膽固醇、血糖、肝功能、腎功能等。結果顯示：在食用魚油-EGCG 酯化物 12 週後有顯著調降血糖的效果，空腹血糖濃度由 111.50 ± 6.50 mg/dL 顯著下降至 100.60 ± 10.27 mg/dL，其他血脂指標，雖沒達到統計上的顯著差異，但也有改善的趨勢。試驗證實：魚油-EGCG 酯化物能有效改善血糖狀況。

綜合以上的結果可以得知：魚油-EGCG 酯化物可以調節血脂、血壓及血糖，有助於改善代謝症候群。

■ 臨床試驗結果

表一、魚油-EGCG 酯化物對血脂肪、血壓的影響

	Baseline (n=12)	Week 12 (n=12)
Body height(cm)	163.67±7.16	163.67±7.16
Body weight(kg)	66.33±11.00	66.63±11.75
BMI	24.62±2.53	24.72±2.90
SBP(mmHg)	135.42±4.85	131.33±4.72*
DBP(mmHg)	81.75±6.34	80.08±4.98
Cholesterol(mg/dL)	148.83±35.58	137.25±32.58*
HDL-C(mg/dL)	39.66±12.70	43.58±13.17
LDL-C(mg/dL)	85.25±34.52	71.58±25.27
TG(mg/dL)	155.75±28.88	149.50±40.04
BS(mg/dL)	95.75±12.89	95.00±11.05
GOT(IU/L)	23.30±11.75	24.75±13.40
GPT(IU/L)	21.56±10.51	21.11±9.12
BUN(mg/dL)	13.00±2.93	11.25±3.68
Creatinine(mg/dL)	0.78±0.19	0.76±0.20

Values are means ± SD, * Significant difference as compared with baseline ($p<0.05$).

表二、魚油-EGCG 酯化物對血糖的影響

	Baseline (n=10)	Week 12 (n=10)
Body height(cm)	161.80±5.92	161.80±5.92
Body weight(kg)	64.50±8.91	64.9±9.18
BMI	24.55±2.19	24.71±2.43
SBP(mmHg)	128.00±10.78	124.80±9.80
DBP(mmHg)	83.10±5.07	81.30±4.42
Cholesterol(mg/dL)	136.70±23.34	128.80±20.58
HDL-C(mg/dL)	43.67±13.64	45.37±14.32
LDL-C(mg/dL)	92.50±32.79	79.60±25.65
TG(mg/dL)	115.00±41.38	110.50±40.79
BS(mg/dL)	111.50±6.50	100.60±10.27*
GOT(IU/L)	21.10±4.15	22.60±3.06
GPT(IU/L)	17.00±5.29	20.50±5.99
BUN(mg/dL)	12.56±4.82	12.98±3.13
Creatinine(mg/dL)	0.58±0.09	0.62±0.14

Values are means ± SD, * Significant difference as compared with baseline ($p<0.05$).

科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2016/10/27

科技部補助計畫	計畫名稱: 魚油和EGCG酯化物改善新陳代謝症候群與H. pylori引起之腸胃潰瘍
	計畫主持人: 王進崑
	計畫編號: 104-2320-B-040-017- 學門領域: 食品科學
無研發成果推廣資料	

104年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：王進崑			計畫編號：104-2320-B-040-017-			
計畫名稱：魚油和EGCG酯化物改善新陳代謝症候群與H. pylori引起之腸胃潰瘍						
成果項目			量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)	
國內	學術性論文	期刊論文		0	篇	
		研討會論文		0		
		專書		0	本	
		專書論文		0	章	
		技術報告		0	篇	
		其他		0	篇	
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件
				已獲得	0	
			新型/設計專利		0	
		商標權		0		
		營業秘密		0		
		積體電路電路布局權		0		
		著作權		0		
		品種權		0		
		其他		0		
	技術移轉	件數		0	件	
		收入		0	千元	
	國外	學術性論文	期刊論文		0	篇
			研討會論文		0	
專書			0	本		
專書論文			0	章		
技術報告			0	篇		
其他			0	篇		
智慧財產權及成果		專利權	發明專利	申請中	0	件
				已獲得	0	
			新型/設計專利		0	
		商標權		0		
		營業秘密		0		
		積體電路電路布局權		0		
		著作權		0		
		品種權		0		
其他		0				

	技術移轉	件數	0	件	
		收入	0	千元	
參與計畫人力	本國籍	大專生	0	人次	
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士後研究員	0		
		專任助理	0		
	非本國籍	大專生	0		
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士後研究員	0		
		專任助理	0		
其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)					

科技部補助專題研究計畫成果自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現（簡要敘述成果是否具有政策應用參考價值及具影響公共利益之重大發現）或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以100字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形（請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊）

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以200字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，以500字為限）

在魚油-EGCG酯化物的合成方法方面，需先經過Saponification皂化、Urea complexation、魚油與EGCG Esterification等步驟後，透過

TLC，HPLC（EGCG），¹H NMR和¹³C NMR光譜以及LC-MS分析酯化的化合物。

在魚油-EGCG酯化物人體試驗方面，每天給予魚油-EGCG酯化物（內含魚油500mg、EGCG100mg），持續服用12星期後可以發現，魚油-EGCG酯化物可以調節血脂、血壓及血糖，有助於改善代謝症候群。

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值： 否 是，建議提供機關

（勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關）

本研究具影響公共利益之重大發現： 否 是

說明：（以150字為限）