

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫  成果報告  
 期中進度報告

紫草科植物化學成分及其生物活性研究

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 96-2321-B-039-007-

執行期間： 96 年 12 月 1 日至 97 年 7 月 31 日

計畫主持人：藍于璇

共同主持人：

計畫參與人員：張偉昱

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、  
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中國醫藥大學藥學系

中 華 民 國 97 年 10 月 16 日

## 中文摘要

現代醫學技術及知識的發展日新月異，相關醫療科技進展也非常快速，但由於現代生活環境惡質化與經濟富裕後生活習性改變，使得惡性腫瘤、心臟血管疾病、糖尿病與高血壓等文明病隨著接踵而來；相較於現代醫藥治療體系裡，中(草)藥所展現出另一番優異的治療功效已有目共睹，世人對於中(草)藥的仰賴與需求日益殷切，此趨勢可由每年逐步攀高的中(草)藥市場經濟產值窺之一二，顯示中國傳統醫藥潛藏的廣大醫藥市場之經濟效益與醫藥治療的研究價值，這引起我們找尋這些中(草)藥中所具有抗癌成份的興趣。

藥用植物所擁有的藥用與經濟價值，長久以來已為人類廣泛運用於日常生活中，但由於人類過度開發使得天然藥物的來源總是稀少且珍貴，若能結合有機合成與生合成之方式，發展量產之模式，可以將所開發新天然藥物及其衍生物進行大量之生物活性之篩選，達成新藥開發之目的；而量產的結果可降低成本並結合產業界發展新藥，以造福人群。本計畫預計完成厚殼屬植物破布烏(*Ehretia dicksonii* Hance)莖部活性成分的分離、純化及結構鑑定，配合活性篩選，建立結構與生物活性的相關性。

我們將以活性引導分離之方式，追蹤有抗癌或其他生物活性方面之(fraction)，進行植物活性成份之分離、純化、結構鑑定與衍生物之製備，同時進行生物活性之效能測試評估，確認其純化合物結構與活性上的關係(S.A.R.)。所獲成果進一步配合藥理機轉探討與合成方面的研究，進而發展為新藥應用於臨床。

關鍵詞：惡性腫瘤；中(草)藥；厚殼屬；破布烏

## 英文摘要

Medical knowledge and modern medical technology are out-dated tomorrow in decades; no good solutions are available to cure the widespread modern-age diseases, such as carcinoma, cardiovascular diseases, hypertension, and DM etc. Contrasting with the method of therapy in the modern medical system, using traditional Chinese herbs seems to appear another effective method, and then, more people worldwide rely on the alternate medicine curing their diseases. This trend has unveiled not only the value and advantage of Chinese medicine and therapy, but also its untapped market with significant economic benefits. It's also triggered our interest in the researches about antitumor constituent of traditional Chinese medicine.

Traditional medicine is a treasury for natural products research because they have been used clinically for thousands of years. During the period, we will target the stems of *Ehretia dicksonii* Hance.

We will institute bioactivity-guide fractionation to separate and purify the bioactive fractions against cancer and other bioactivities. Moreover, we will further elucidate their structure, make their derivatives, and estimate their bioactivity to insure the structure-activity relationship. Finally, we will also try to combine our research with the relative research on the field of pharmacy and synthesis to offer a solution against carcinoma and other diseases. We expect these bioactive constituents will be applied to clinical use.

Key words: carcinoma; traditional Chinese herbs; *Ehretia*; *Ehretia dicksonii* Hance

## 一、前言

中(草)藥在中國的使用已有數千年歷史，在中國傳統醫學上有著相當重要的價值。現今，藉由科學性及系統性地研究其主要藥理活性成分，並加以闡述與釐清，實是我們藥用植物相關研究人員迫切的工作。

近幾年來，由於生活環境的惡質化與經濟富裕後生活習性的改變，惡性腫瘤的發生率一直高居十大死亡病因之首，常由新聞報章得知某位名人又因罹患癌症而過逝，這引起我們尋找藥用植物中具有抗癌活性成分的興趣。目前我們擬計畫對具有抗癌活性潛力之藥用植物進行研究，經由數種藥材粗萃取物進行抗癌活性篩選，篩選結果顯示厚殼屬植物破布烏對數種癌細胞(Heo G2、MDA-MB-231 等)具有極佳的細胞毒殺活性(<20 µg/mL)，因此針對厚殼屬植物破布烏(*Ehretia resinosa* Hance)進行活性成份之分離、純化、結構鑑定與衍生物之製備，並評估其生物活性之效能，了解其純化合物結構與活性上的關係 (S.A.R.)。

破布烏(*Ehretia resinosa* Hance)屬於紫草科厚殼樹亞科(Ehretioideae)植物<sup>1</sup>。紫草科植物全世界約有 100 多屬 2000 多種左右，主分佈於溫帶及熱帶地區，其中台灣有 12 屬厚殼屬為其中一屬，台灣產厚殼屬植物有 5 種；本屬植物曾被發表發現過 Alkaloid、Flavone、Lignan、Microphyllone 與 Triterpenoid 等成分<sup>2-13</sup>，而藥理方面的報導則較少顯示具有極大的研究空間。破布烏(*Ehretia resinosa* Hance)植物，中國大陸、台灣、日本及琉球等地皆有其蹤跡，台灣原生種破布烏(*Ehretia resinosa* Hance)植物則分部在台北、苗栗、台中、屏東、花蓮、台東以及全島海拔約 1100 公尺以下平地，在台灣原住民藥用植物彙編中提及本植物多作為治療齒痛之用。此外破布烏的根及樹皮有散瘀、消腫、解毒的效用，外用可治跌打損傷。

## 二、研究目的

中(草)藥在中國的使用已有數千年歷史，在中國傳統醫學上有著相當重要的價值。現今，藉由科學性及系統性地研究其主要藥理活性成分，並加以闡述與釐清，實是我們藥用植物相關研究人員迫切的工作。

近幾年來，由於生活環境的惡質化與經濟富裕後生活習性的改變，惡性腫瘤的發生率一直高居十大死亡病因之首，常由新聞報章得知某位名人又因罹患癌症而過逝，這引起我們尋找藥用植物中具有抗癌活性成分的興趣。目前我們擬計畫對具有抗癌活性潛力之藥用植物進行研究，經由數種藥材粗萃取物進行抗癌活性篩選，篩選結果顯示厚殼屬植物破布烏對數種癌細胞(Heo G2、MDA-MB-231 等)具有極佳的細胞毒殺活性(<20 µg/mL)，因此針對厚殼屬植物破布烏(*Ehretia resinosa* Hance)進行活性成份之分離、純化、結構鑑定與衍生物之製備，並評估其生物活性之效能，了解其純化合物結構與活性上的關係 (S.A.R.)。

## 三、研究方法

採集新鮮破布烏 (*Ehretia dicksonii* Hance) 經過曝曬之後，莖部重量 370.79 克，在室溫以下以 4 公升甲醇連續抽取五次，將抽取液經過減壓濃縮後；用水：甲醇：乙酸乙酯(8：1：9)進行分配萃取，分別收集水層與乙酸乙酯層，再經水層減壓濃縮後，用水-甲醇-丁醇(9-1-10)分配萃取，得到水層與丁醇層。

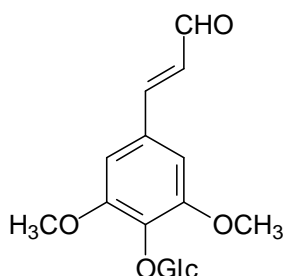
首先將分配萃取到的乙酸乙酯層(4.7848 g)利用管柱色層層析法 (celite 545, 6×11cm)，以 *n*-hexane→CHCl<sub>3</sub>→EtOAc→MeOH→H<sub>2</sub>O 為沖提溶媒系統，分成了五個部份(EDSEA-H、C、EA、M、H<sub>2</sub>O)。其中 EDSEA-C (1.3256 g) 利用管柱色層層析法 (sephadex-LH20, 3.7×16.5cm)，以 MeOH 為沖提溶媒系統，再利用矽膠薄層色層分析法(TLC)判斷，分成了 5 個 fractions, 每個 fraction 重量分別為 fr.1(194.5mg)、fr.2(513.1mg)、fr.3(222.2mg)、

fr.4(270.3mg)、fr.5(24.9mg)。fr.4(270.3mg)利用管柱色層層析法 (silica gel, 230~400mesh, 2.5×23cm), 以 CHCl<sub>3</sub>/MeOH 為沖提溶媒系統, 再使用矽膠薄層色層分析法(TLC)判斷後分成 12 個 fractions, 每個 fraction 重量為 fr.4-1(1.8mg)、fr.4-2(1.8mg)、fr.4-3(10.4mg)、fr.4-4(5.4mg)、fr.4-5(11.5mg)、fr.4-6(5.1mg)、fr.4-7(50.4mg)、fr.4-8(35.5mg)、fr.4-9(17.5mg)、fr.4-10(145mg)、fr.4-11(68mg)、fr.4-12(44.3mg)。將 fr.4-3(10.4mg)利用管柱色層層析法 (silica gel, 230~400mesh, 1.5×16cm), 以 CHCl<sub>3</sub> 為沖提溶媒系統, 接著使用矽膠薄層色層分析法 (TLC)判斷後細分成 5 個 fractions, 其中 fr.4-3-2(5.2mg)利用玻璃薄層層析片純化, 以 Hexane:EtOAc=2:1 的溶媒系統分離出化合物 1 (2.5mg)。而 fr.4-7(50.4mg)有白色粉末析出, 利用甲醇洗結晶得到化合物 2。

採集新鮮破布烏 (*Ehretia dicksonii* Hance) 經過曝曬之後, 葉部重量 96.54 克, 在室溫以下以甲醇(4L)連續抽取五次, 將抽取液經過減壓濃縮後; 用 90% 水: 乙酸乙酯(1:1)進行分配萃取, 分別收集水層與乙酸乙酯層。

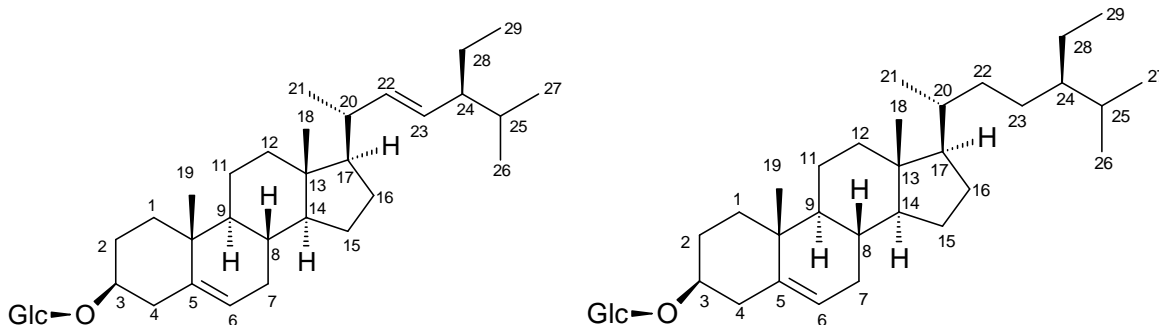
乙酸乙酯層(2.36g)以管柱色層層析法 (silica gel, 230~400mesh, 6×15cm), 沖提溶媒系統為 CHCl<sub>3</sub>, 利用矽膠薄層色層分析法(TLC)判斷分成 12 個 fractions。其中 fr.4(140mg)以 CHCl<sub>3</sub> 為沖提溶媒系統分成 7 個 fractions 後, 再將 fr.4-6 利用管柱色層層析法 (sephadex-LH20, 3.7×16.5cm), 以 CHCl<sub>3</sub>:MeOH=1:5 為沖提溶媒系統分成 8 個 fractions, fr.4(140mg) 以管柱色層層析法 (silica gel, 230~400mesh, 2×22cm), 沖提溶媒系統為 CHCl<sub>3</sub>, 利用矽膠薄層色層分析法(TLC)判斷分成 7 個 fractions, 其中 fr.4-6 經過管柱色層層析法 (sephadex-LH20, 1.5×25cm), 以 MeOH 為沖提溶媒系統, 再利用矽膠薄層色層分析法(TLC)判斷, 分成 8 個 fractions, 將 fr.4-6-4(13.6mg)利用玻璃薄層層析片純化, 以 CHCl<sub>3</sub> 溶媒系統分離得到化合物 3(7.9mg)。

#### 四、結果與討論



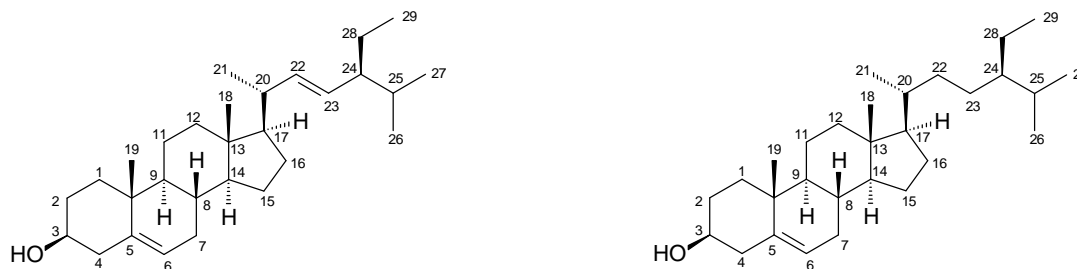
化合物 1:

氫光譜(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_H$  7.05 (1H, s, H-2), 7.05 (1H, s, H-6), 7.65 (1H, d,  $J=14.6$  Hz, H-7), 6.80 (1H, dd,  $J=14.6, 7.0$  Hz, H-8), 9.60 (1H, d,  $J=7.0$  Hz, H-9), OCH<sub>3</sub> (3.87, 6H, s)



化合物 2:

氫光譜(400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N):  $\delta_{\text{H}}$  5.07(1H, d,  $J=5.2$  Hz, H-1'), 4.052 (1H, t,  $J=8.4$ , 7.6Hz, H-2'), 4.28 (1H, m, H-3'), 3.94 (1H, m, H-4'), 4.41 (1H, dd,  $J=6.4$ , 3.2 Hz, H-5'), 4.56 (1H, dd,  $J=9.6$ , 4.8 Hz, H-6'), 5.34 (1H, d,  $J=4.4$  Hz, H-6), 5.19 (1H, dd,  $J=8.4$ , 4.2 Hz, H-22), 5.23 (1H, dd,  $J=8.4$ , 4.2 Hz, H-23)



化合物 3:

氫光譜(200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_{\text{H}}$  3.49 (1H, m, H-3), 5.35 (1H, br s, H-6), 0.68 (3H, s, H-18), 1.01 (3H, s, H-19), 0.93 (3H, d,  $J=6.6$  Hz, H-21), 5.04 (1H, dd,  $J=8.0$ , 4.0 Hz, H-22), 5.12 (1H, dd,  $J=8.0$ , 4.0 Hz, H-23), 0.80 (3H, d,  $J=2.8$  Hz, H-26), 0.84 (3H, d,  $J=3.0$  Hz, H-27), 0.88 (3H, t,  $J=6.0$  Hz, H-29)

碳光譜(50 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_{\text{C}}$  37.23 (C-1), 31.64(C-2), 71.80 (C-3), 42.28 (C-4), 104.75 (C-5), 121.70 (C-6), 31.89 (C-7), 31.89 (C-8), 50.13 (C-9), 36.49 (C-10), 21.05 (C-11), 39.76 (C-12), 42.28 (C-13), 56.76 (C-14), 24.29 (C-15), 28.22 (C-16), 56.04 (C-17), 11.83 (C-18), 19.37 (C-19), 36.12 (C-20), 18.76 (C-21), 33.94 (C-22), 26.06 (C-23), 45.82 (C-24), 29.14 (C-25), 19.79 (C-26), 19.00 (C-27), 23.04 (C-28), 11.95 (C-29)

### 參考文獻

1. Iqbal, K.; Nawaz, S. A.; Malik, A.; Riaz, N.; Mukhtar, N.; Mohammad, P.; Choudhary, M. I., Isolation and lipoxygenase-inhibition studies of phenolic constituents from *Ehretia obtusifolia*. *Chemistry & Biodiversity* 2005, 2(1), 104-111.
2. Dong, M.; Oda, Y.; Hirota, M., (10E,12Z,15Z)-9-hydroxy-10,12,15-octadecatrienoic acid methyl ester as an anti-inflammatory compound from *Ehretia dicksonii*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2000, 64(4), 882-886.
3. Selvanayagam, Z. E.; Gnanavendhan, S. G.; Balakrishna, K.; Rao, R. B.; Sivaraman, J.; Subramanian, K.; Puri, R.; Puri, R. K. Ehretianone, A Novel Quinonoid Xanthene from *Ehretia buxifolia* with Antisnake Venom Activity. *Journal of Natural Products* 1996, 59(7), 664-667.
4. Yoshikawa, K.; Kageyama, H.; Arihara, S., Phenolic glucosides and lignans from *Ehretia ovalifolia*. *Phytochemistry* 1995, 39(3), 659-64.
5. Yamamura, S.; Simpol, L. R.; Ozawa, K.; Ohtani, K.; Otsuka, H.; Kasai, R.; Yamasaki, K.;

Padolina, W. G., Antiallergic dimeric prenylbenzoquinones from *Ehretia microphylla*. *Phytochemistry* 1995, 39(1), 105-10.

6. Simpol, L. R.; Otsuka, H.; Ohtani, K.; Kasai, R.; Yamasaki, K., Nitrile glucosides and rosmarinic acid, the histamine inhibitor from *Ehretia philippinensis*. *Phytochemistry* 1994, 36(1), 91-95.
7. Suri, O. P.; Jamwal, R. S.; Suri, K. A.; Atal, C. K., Ehretinine, a novel pyrrolizidine alkaloid from *Ehretia aspera*. *Phytochemistry* 1980, 19(6), 1273-4.
8. Agarwal, S. K.; Rastogi, R. P.; Van Koningsveld, H.; Goubitz, K.; Olthof, G. J., The molecular structure of 4a,5,8,8a-tetrahydro-11,14-dimethoxy-7-methyl-4a-(3-methyl-2-butenyl)-5,8a-o- benzeno-1,4-naphthoquinone. *Tetrahedron* 1980, 36(10), 1435-8.

計畫成果自評:

由於本計畫執行期限較短因此本研究雖已過了執行期限仍在持續進行中，且成果持續測試，希望可有較為完備之成果可發表於國際期刊。