

臺灣馬桑 (*Coriaria intermedia* MATSUM)
活性成分之研究

第一章 前言

台灣馬桑 (*Coriaria intermedia* MATSUM) 為馬桑科 (Coriariaceae) 馬桑屬 (*Coriaria* LINN.) 植物⁽¹⁾。馬桑屬植物大約有十種分佈於地中海地區、喜馬拉雅山區、日本、紐西蘭、智利至墨西哥、菲律賓及台灣。本屬植物大多有劇毒，在中國大陸地區民間草藥馬桑 (*Coriaria sinica* MAXIN) 的根部用來治淋巴結結核、牙痛、跌打損傷、風濕關節痛，外用來治療癰疽、腫毒、疥癩及燙傷^(2,3)。

台灣馬桑為叢生小灌木，產於台灣全境低海拔山地河岸、山腰至高海拔向陽矮林內或路旁。其根及種子有劇毒，山胞以種子內服自戕，也有誤食致死的報導。台灣民間用其葉來治療腹痛，根用來治療子宮癌⁽⁴⁾，在近年中國大陸的研究中，發現馬桑屬植物中所含倍半醜內酯類 (sesquiterpene-lactones)，具有治療精神分裂症的效果⁽⁵⁾，中國已有馬桑內酯注射液用來治療精神分裂症^(6,7)。

癌症近來是國人十大死原因的第一位，對癌症的治療仍然尚未有較適當的方法，本研究曾將臺灣馬桑粗抽物對人類喉癌細胞及鱗鼠血癌細胞篩檢中發現，臺灣馬桑粗抽物對鱗鼠血癌細胞具有抑制效果，接著希望能將具有活性成分的化合物找出。

近年來研究倍半醜類的結構與活性的關係發現，馬桑所含的倍半醜類化合物與印度防己毒素 (picrotoxin) 的結構類似也有相同的作用，這類化合物均對 GABA_A 接受器具拮抗作用，且與其中的氯離子通道 (chloride channel) 有關⁽⁸⁾。因此本研究對台灣馬桑的成分及生物活性加以探討。

第二章 總 論

第一節 台灣馬桑之藥用植物學考察

馬桑目 (Coriariales)

本目僅有馬桑科 (Coriariaceae) 一科，而馬桑科中亦僅有馬桑屬 (*Coriaria*) 而已，該屬中則有 13 種植物，主分佈於地中海地區，喜馬拉雅山區、日本、紐西蘭、菲律賓、台灣、智利及墨西哥。由於在形態上特異的特徵，在目前的分類系統上都無法很滿意地歸類於理想的地位。有關此目的特徵將詳述於科的特徵中⁽⁹⁾。

一．馬桑科 (Coriariaceae) 植物之特徵

灌木，小枝條四方型，有稜角；葉單生，對生或輪生，全緣，無柄，無托葉；芽多具有鱗片。花兩性或單性，小型，腋生，單生或為總狀花序；萼片五枚，覆瓦狀排列，擴展，殘存，花瓣較萼片為小，內側呈龍骨突起；雄蕊10枚，下位離生或與花瓣對生者與龍骨突起連生；花葯大，縱裂，無花盤；心皮5-10枚，離生，一室，輪生於肉質的花托上；花柱細長，鑿形，肉質，有柔毛，每室中有胚珠一枚從頂端向下垂。分果 5或10枚，小堅果狀，外面包被肉質的花瓣，種子扁平，有薄的胚乳，種皮膜質，胚小，僅有一屬，10種左右，而台灣自生一種⁽⁹⁾。

二．馬桑屬(*Coriaria* LINN.)植物之特徵

灌木，葉對生或輪生，無托葉；花兩性或單性，小，綠色，單生或排列成總狀花序；萼片和花瓣均5枚，心皮5-10枚，離生，有胚珠一顆，成熟時為肉質花瓣所包圍而成一假果核⁽¹⁰⁾。

【壹灣馬桑之檢索表】

- 1.花序在前年枝上側生．葉有三主脈，無毛
 - 2.葉先端短尖，葉橢圓或廣橢圓形.....馬桑 (*Coriaria sinica*)
 - 2.葉先端漸尖
 - 3.葉卵形或披針狀卵形，蒴果球形..... 毒空木(*C. japonica*)
 - 3.葉長卵形且長肋有紅暈，蒴果扁球形.....
..... 台灣馬桑 (*C. intermedia*)
- 1.花序頂生，葉有九脈.....草馬桑 (*C. terminalis*)

三．台灣馬桑之形態與產地分布

台灣馬桑為叢生小灌木，莖具粗髓心，根有菌根，葉具短柄，對生，長卵形，先端漸銳，基部近於圓形，全緣，長 4-6 公分，寬 15-25 公厘，主脈 3 條，略帶紅暈，雌雄同株，偶有為雜性者；總狀花序腋出，花黃綠色；萼片 5 枚，闊橢圓形，邊緣紫色花瓣較萼片短小，雄蕊 10 枚，雌花心皮 5 枚，退化雄蕊 10 枚，蒴果扁球形，圍於永存之紅色花瓣內，徑約 6 公厘，表面有縱溝 5 條，花期 2-4 月，果期 5-9 月。產於台灣全境低至中海拔山地河岸，山腰至高海拔向陽矮林內或路旁多見。分布於菲律賓，日本，琉球，台灣^(2, 3, 11, 12)。



Fig -1. 臺灣馬桑之植物寫生圖⁽¹¹⁾

1. 帶果實的分枝 2. 種子 3. 蒴果縱切面 4. 蒴果橫切面 5. 蒴果 6. 雄蕊 7. 具雄蕊的花 8. 具有雄蕊及雌蕊的總狀花序 9. 及 12. 帶有雌蕊的花 10. 完整的花 11. 雌蕊

第二節 馬桑屬植物已知化學成分考察

根據文獻調查,馬桑屬 (*Coriaria* LINN.) 植物已知成分整理如下:

1. Sesquiterpenes

Coriamyrtin, tutin, coriatin, corianin⁽¹³⁻¹⁴⁾, leonine⁽¹⁵⁾, seudotutin⁽¹⁶⁾,
-tutin⁽¹⁷⁾

2. Triterpenoids

Ursolic acid⁽¹⁸⁾

3. Flavonoids

Quercetin, quercetin-3-O- β -L-galactosides, quercitrin, avicularin⁽¹⁸⁾,
kaempferol⁽²⁾

4. Carbohydrates

Coriose, sedoheptulose, monoheptulose⁽¹⁹⁾

5. Tannins

Coriariin A, coriariin B, 1, 2, 3-tri-O-galloyl- β -D-glucose, geraniin,
tellimagrandins I and II, rugosi-A, D, E⁽²⁰⁾, coriariins C, D, E, F,
rugosin B, gemin D, strictinin⁽²¹⁾, coriariin G, H, I, J⁽²²⁾, ellagic acid,
ellagic acid 3, 3'-dimethyl ether, gallic acid⁽²³⁾

6. Lipids

Myristic acid, palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid,
coriolic acid⁽²⁴⁾

7. Steroids

- sitosterol⁽¹⁸⁾

8. Amino acid

Glutamic acid, glutamine, arginine⁽²⁵⁾

第三節 馬桑屬植物藥理作用之文獻考察

根據文獻報導⁽²⁶⁻³¹⁾有關馬桑屬植物的藥理作用，整理如下：

一 . *Coriaria japonica*

果實有殺蟲作用 (insecticidal activity)⁽²⁶⁾

二 . *Coriaria nepalensis*

1. 地上部分有細胞毒性作用 (cytotoxic activity)⁽²⁷⁾

2. 地上部分有殺精蟲作用 (spermicidal effect)⁽²⁸⁾

3. 新鮮葉子有毒魚作用 (fish poison)⁽²⁹⁾

4. 乾燥葉子及莖有抗細胞分裂作用 (antimitotic activity)⁽³⁰⁾

三 . *Coriaria ruscifolia*

1. 花、葉子及細莖有費洛蒙的作用⁽³¹⁾

2. 葉及莖有抗腫瘤作用 (antitumor activity) 和細胞毒性作用 (cytotoxic activity)⁽³²⁾

第三章 材料與方法

第一節 實驗試藥與儀器

一、溶媒

1. 正己烷、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇、甲醇：E. Merck, J. T. Bakers
2. 乙醇：台灣省菸酒公賣局
3. 核磁共振 (NMR) 光譜測定所用之溶媒
Acetone-d₆ (Acetone-d₆): E. Merck
deuterium chloroform (CDCl₃): Aldrich
dimethylsulfoxide-d₆ (DMSO-d₆): E. Merck
deuterium water (D₂O): E. Merck
deuterium methanol(CD₃OD): E. Merck

二、試藥

- (一). 一般化學試劑：醋酸，硫酸，鹽酸，無水硫酸鈉，石油醚，磷鉬酸，氯化鐵，vanillin 等，均為試藥級。
- (二). 抗腫瘤活性試驗試劑：
 1. Leupeptin, Tris-HCl, trichloroacetic acid, Triton-X100, ethylenediaminetera acetic acid, dimethyl sulfoxide (DMSO), propidium Iodide (PI), ethidium bromide. (購自 Sigma Chemical Co.)
 2. 2-aminofluorene (2-AF), 2-acetylaminofluorene (2-AAF) (購自 K and K Lab.)
 3. Acetyl CoA (購自 P-L Biochemicals Inc.)

4. Hank's balanced salts solution (購自 Gibco laboratories Grand Island , NY)
5. Acetonitrile, methanol, ethyl acetate, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , KCl , NaCl (購自 Merck Co.)
6. G-NOME DNA KIT (Bio 101, Inc.)
7. Phosphate-buffered saline (PBS) 【 NaCl , KCl , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 】
8. TE buffer 【Tris-HCl、EDTA、 H_2O 】

(二) 培養基

1. RPMI 1640 medium
2. Fetal bovine
3. Antibiotic
4. Glutamine
5. Glutamine
(購自 Gibco laboratories, Grand Island, NY)

三、顯色劑

硫酸 (1 %) , 磷鉬酸 (5 %) , vanillin sulfuric acid spray reagent , anisaldehyde sulfuric acid spray reagent , 乙醇溶液。

四、薄層色層分析法 (Thin Layer Chromatography ; TLC)

定性分析採用 Kieselgel 60 F254 silica gel precoated aluminium plate , 厚度 0.2 mm (E. Merck)。

五、管柱色層分析法 (Column Chromatography)

吸附劑用 Kieselgel 60 70-230 mesh (E. Merck) ; Kieselgel 60 230-400 mesh (E. Merck) ; Sephadex LH-20 (Pharmacia)。

六、紫外線燈

CAMAG universal (UV) lamp , 波長 254 nm 及 366 nm。

七、微量融點測定器

Yanaco MP-5000 型 , 測定範圍 0.00-500.0 之間 , 其溫度未經校正。

八、紅外線分光光譜儀 (IR)

傅立葉轉換紅外線分光光譜儀 (FT-IR) : Nicolet Impact 400 FT-IR spectrophotometer , 固體以乾燥的 KBr 粉末混和均勻 , 在真空下加壓成透明薄片測定之。

九、傅立葉轉換核磁共振儀 (FT-NMR)

Varian Gemini-200 FT-NMR (國立中國醫藥研究所) , Bruker ACP-300 FT-NMR (國立中國醫藥研究所) , Varian VXR-300 FT-NMR (中興大學)。Chemical shift 以 ppm 表示 , 以 TMS 為 internal standard, $s = \text{singlet}$, $d = \text{doublet}$, $t = \text{triplet}$, $m = \text{multiplet}$ 。

十、質譜儀 (MS)

JEOL JMS-SX 102A：新竹貴重分析儀器使用中心（清華大學），GC/MS/DS Mass (TSQ-46C)：北部貴重分析儀器使用中心（台灣大學），JOEL JMSD 300 型及 JOEL JMS-SX/SX 102A 質譜儀：中部貴重分析儀器使用中心（中興大學）；Fast atom bombardment mass spectrometry (FAB-MS)，所用之 suspending matrix：diethanolamine (DEA)，glycerol (G)，單位為 m/z。

十一、抗腫瘤活性試驗儀器

Flow cytometry (Becton Dickinson)

Hight performance liquid chromatography) (HPLC) 【Backman】

RP 18 column (250×4.0) (Bischoff)

Polytrone PT3000

Cytospin 離心機

高速離心機 (Hettich EBA 12R)

細胞培養箱 (Revco 3000 TVBA)

第二節 實驗藥材來源及其抽提與分離

一．植物採集及前處理

民國八十一年十二月二十五日於南投縣翠峰採得台灣馬桑之全株。經本所邱年永技正鑑定，確定為台灣馬桑 (*Coriaria intermedia* MATSUM) 後，始進行研究。植物切碎後陰乾，得葉 3.3 公斤，莖 20.3 公斤，根 3.2 公斤。後於民國八十二年八月十二日在同地點採得台灣馬桑果實，經陰乾後得果實 1.2 公斤。民國八十二年十月十一日再於同地點作第二次台灣馬桑葉之採集得 4.5 公斤。

二．提取

陰乾後之台灣馬桑根、莖、葉、果實分別以甲醇於室溫下浸泡一週，如此反覆抽取三次，經過濾後，減壓濃縮得到葉部甲醇粗抽物 855g，抽出率為 25.9%。莖部甲醇抽出物 2275g，抽出率為 11.2%。根部甲醇抽出物 340g，抽出率為 10.6%。果實甲醇抽出物 240 g，抽出率為 20 %。

三、分離

(一) 根部成分分離：

取根部甲醇粗抽物，加入蒸餾水使之成懸浮液，再以正己烷萃取三次，萃取液合併減壓濃縮至乾，得正己烷層 (Fr.RA 13g)，同上法再將水層依序以氯仿、乙酸乙酯、水飽合之正丁醇萃取之，得氯仿層 (Fr.RB 30g)，乙酸乙酯 (Fr.RC 70g)，正丁醇層 (Fr.RD 65g)，餘者為水層 (Fr.RE 162g)。抽提之流程如 Fig -2 所示。

其中根部正己烷層 (Fr. RA) 以矽膠管柱層析法分離，依序以氯仿、乙酸乙酯、甲醇沖提，得到沖提部分 Fr. 1-25，合併其中 Fr. 5-8

以氯仿沖提，在氯仿沖提得到化合物 *phytosterol* (RA-1, 25mg)，再將 Fr. 14 以正己烷與乙酸乙酯的溶媒系統沖提，在正己烷/乙酸乙酯 = 1 : 1 沖提，得到化合物 *ellagic acid 3,3'-dimethyl ether* (FA-2, 10mg)。

根部氯仿層 (Fr. RB) 以矽膠管柱層析法分離，依序以氯仿 (Fr.)、乙酸乙酯 (Fr.)、甲醇沖提 (Fr.)，得到沖提部 Fr. - , , 再將 Fr. 以正己烷與乙酸乙酯的溶媒系統沖提，得到沖提部 Fr. 1-20，在 Fr. -5 以正己烷/乙酸乙酯 = 1 : 1 沖提得到化合物 *20-epibryonolic acid* (RB-1, 10mg)，在 Fr. -10 以正己烷/乙酸乙酯 = 1 : 1 沖提得到化合物 *coriamyrtin* (RB-2, 25mg)，將 Fr. 以以氯仿與甲醇的溶媒系統沖提，得到沖提部 Fr. 1-10，再將 Fr. -5 以氯仿與甲醇的溶媒系統沖提，得到沖提部 Fr. 1-8，在 Fr. -5-2 以氯仿與甲醇的溶媒系統沖提，在氯仿/甲醇 = 98 : 2 沖提得到化合物 *ursolic acid* (RB-3, 80mg)。

根部乙酸乙酯層 (Fr. RC) 以矽膠管柱層析法分離，依序以氯仿 (Fr.)、乙酸乙酯 (Fr.)、甲醇沖提 (Fr.)，得到沖提部 Fr. - , 再將 Fr. 以正己烷與乙酸乙酯的溶媒系統沖提，得到沖提部 Fr. 1-13，在 Fr. -3 以正己烷/乙酸乙酯 = 1 : 1 沖提，得到沖提部 Fr. 1-10，將 Fr. -3-5 以正己烷/乙酸乙酯 = 1 : 1 沖提得到無色正方形結晶，以氯仿與甲醇 (1: 1) 再結晶為化合物 *corianin* (RC-1, 7mg)，再將 Fr. -3-8 以氯仿與甲醇的溶媒系統沖提，在氯仿/甲醇 = 95 : 5 沖提，得到黃色粉末為化合物 *naringenin* (RC-2, 20mg)，再將 Fr. 以氯仿與甲醇的溶媒系統沖提，得到沖提部 Fr. 1-6，將 Fr. -3 以氯仿與甲醇的溶媒系統沖提，在氯仿/甲醇 = 9 : 1 沖提得到黃色粉末，為化合物 *7-hydroxycoumarin* (RC-3, 5mg)。

(二) 果實成分分離：

取果實甲醇粗抽物，加入蒸餾水使之成懸浮液，再以正己烷萃取三次，萃取液合併減壓濃縮至乾，得正己烷層 (Fr. FA 50g)，同上法再將水層依序以氯仿、乙酸乙酯、水飽合之正丁醇萃取之，得氯仿層 (Fr. FB 40g)，乙酸乙酯 (Fr. FC 12g)，正丁醇層 (Fr. FD 40g)，餘者為水層 (Fr. FE 80g)。抽提之流程如 Fig -3 所示。

果實正己烷層 (Fr. FA) 以矽膠管柱層析法分離，依序以氯仿 (Fr.)、乙酸乙酯 (Fr.)、甲醇沖提 (Fr.)，得到沖提部 Fr. - ，再將 Fr. 以氯仿沖提，得到沖提部 Fr. 1-12，將 Fr. -7 以氯仿沖提 在氯仿沖提得到白色針狀結晶，經氯仿再結晶為化合物 -sitosterol (FA-1, 65mg)。

果實氯仿層 (Fr. FB) 以矽膠管柱層析法分離，依序以氯仿 (Fr.)、乙酸乙酯 (Fr.)、甲醇沖提 (Fr.)，得到沖提部 Fr. - ，再將 Fr. 以氯仿與甲醇的溶媒系統沖提，得到沖提部 Fr. 1-10，再將 Fr. -4 以氯仿與甲醇的溶媒系統沖提，得到沖提部 Fr. 1-8，再將 Fr. -4-4以氯仿與甲醇的溶媒系統沖提，在氯仿/甲醇 = 97 : 3 沖提得到無色長方柱狀結晶，為化合物 coriamyrtin (250mg)。將 Fr.

以氯仿與甲醇的溶媒系統沖提，得到沖提部 Fr. 1-10，再將 Fr. -6 以氯仿與甲醇的溶媒系統沖提，得到沖提部 Fr. 1-14，再將 Fr. -6-6 以氯仿與甲醇的溶媒系統沖提，在氯仿/甲醇 = 95 : 5 沖提得到化合物 ursolic acid (160mg)，將 Fr. 以氯仿與甲醇的溶媒系統沖提，得到沖提部 Fr. 1-10，再將 Fr. -9 以氯仿與甲醇的溶媒系統沖提，得到沖提部 Fr. 1-9，再將 Fr. -9-5 以以正己烷與乙酸乙酯的溶媒系統沖提，在正己烷/乙酸乙酯 = 3 : 2 沖提得到黃色針狀結晶，經氯仿再結晶，為化合物 angustifolin (RB-1, 50mg)，將 Fr. 以氯仿與甲醇的溶媒系統沖提，得到沖提部 Fr. 1-8，再將 Fr. -5 以氯仿與甲醇的溶媒系統沖提，得到沖提部 Fr. 1-8，再將 Fr. -5-7 以

以正己烷與乙酸乙酯的溶媒系統沖提，在正己烷/乙酸乙酯 = 1 : 1 沖提得到無色長方柱狀結晶，為化合物 tutin (RB-2, 86mg)。

果實乙酸乙酯層 (Fr. FC) 以矽膠管柱層析法分離，依序以正己烷/乙酸乙酯 = 1 : 1 (Fr.)、乙酸乙酯 (Fr.)、甲醇沖提 (Fr.)，得到沖提部 Fr. -，再將 Fr. 以正己烷與乙酸乙酯的溶媒系統沖提，得到沖提部 Fr. 1-8，再將 Fr. -4 以正己烷/乙酸乙酯 = 1 : 1 沖提，得到沖提部 Fr. 1-8，沖提部 Fr. -4-4，在正己烷/乙酸乙酯 = 1 : 1 沖提得到黃色針狀結晶，為化合物 quercetin (RC-1, 35mg)。沖提部 Fr. -4-3，以正己烷/乙酸乙酯 = 1 : 1 沖提，得到沖提部 Fr. 1-8，在沖提部 Fr. -4-3-5 以正己烷/乙酸乙酯 = 1 : 1 沖提得到黃色針狀結晶，經氯仿與甲醇 (3: 1) 再結晶，為化合物 kaempferol (RC-2, 32mg)。將 Fr. 以正己烷/乙酸乙酯 = 1 : 1 沖提，得到沖提部 Fr. 1-8，將 Fr. -4 以正己烷/乙酸乙酯 = 1 : 1 沖提，得到沖提部 Fr. 1-4，在 Fr. -4-3 以正己烷/乙酸乙酯 = 1 : 1 沖提，沖提得到化合物 ursolic acid (30mg)。在 Fr. -4-4 以正己烷/乙酸乙酯 = 1 : 1 沖提，沖提得到化合物 tutin (80mg)。

(三) 葉部成分分離：

將第二次採得之臺灣馬桑葉水煮粗抽物，加入二-三倍量的 95 % 酒精，攪拌過夜，濾去沉澱，濃縮並揮盡餘醇，加入少量水稀釋，用 NaCl 飽和，攪拌過夜，濾去沉澱⁽³³⁾，再以氯仿萃取五次，萃取液合併，減壓濃縮至乾得氯仿層 (Fr. HLC 15g)。抽提之流程如 Fig -4 所示。

將葉部氯仿層 (Fr. HLC) 以矽膠管柱層析法分離，以氯仿與甲醇的溶媒系統沖提，沖提得到沖提部 Fr. 1-5，再將 Fr. 3 以 Sephadex (LH-20) 管柱層析法分離，以乙酸乙酯/甲醇 = 1 : 1 沖提，得到化合

物 coriamyrtin (500mg)。再將 Fr. 5 以 Sephadex (LH-20) 管柱層析法分離，以乙酸乙酯/甲醇 = 1 : 1 沖提，得到無色正成形結晶，為化合物 -tutin (HLC-1, 5mg)。

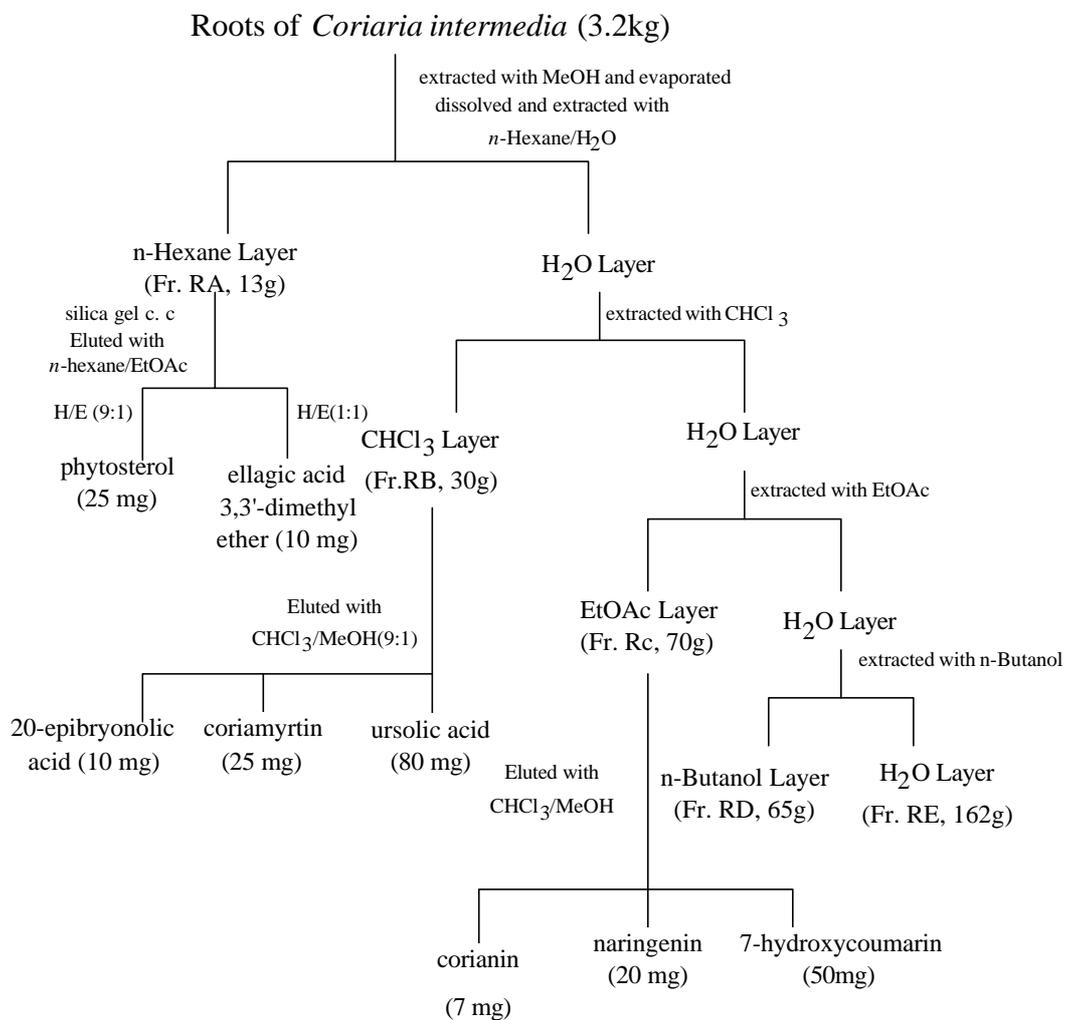
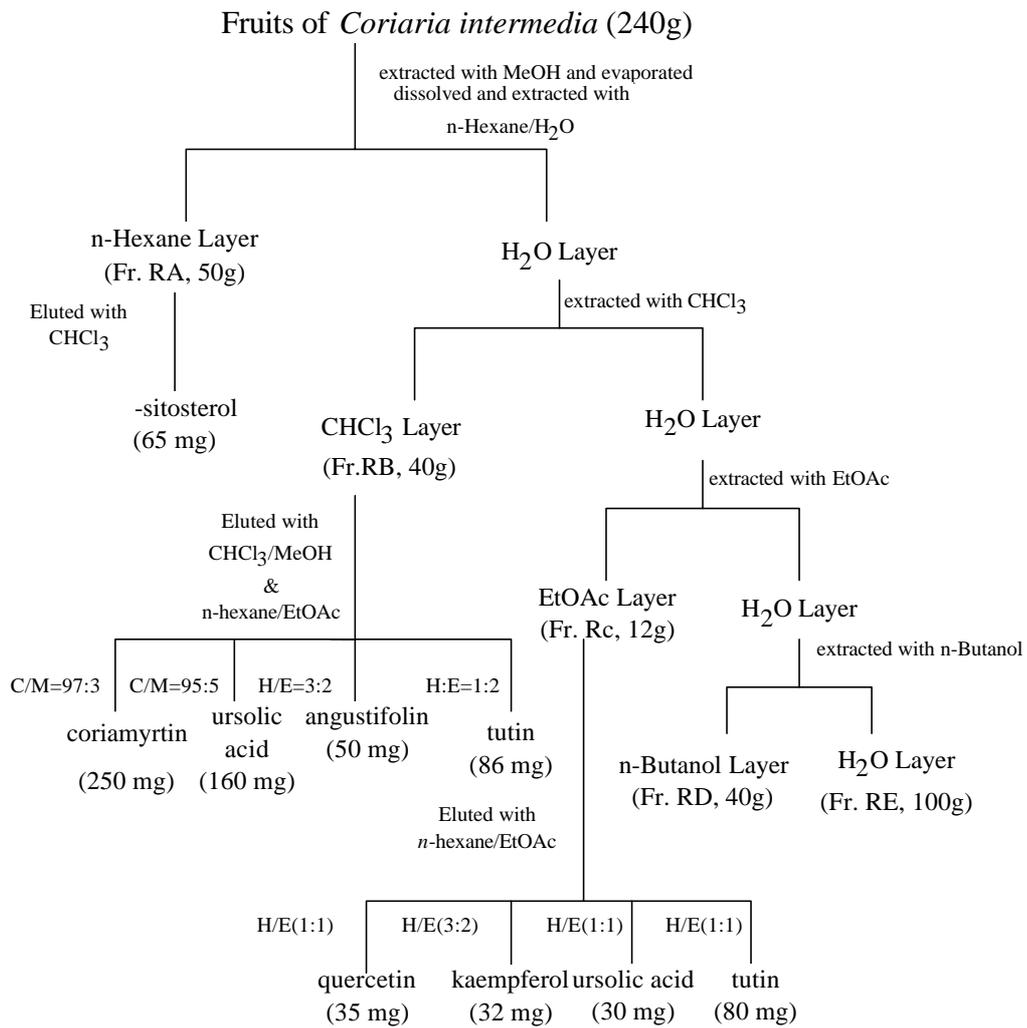


Fig -2. 臺灣馬桑 *Coriaria intermedia* MATSUM 根部分離流程圖



Leaves of *Coriaria intermedia* (855 g)

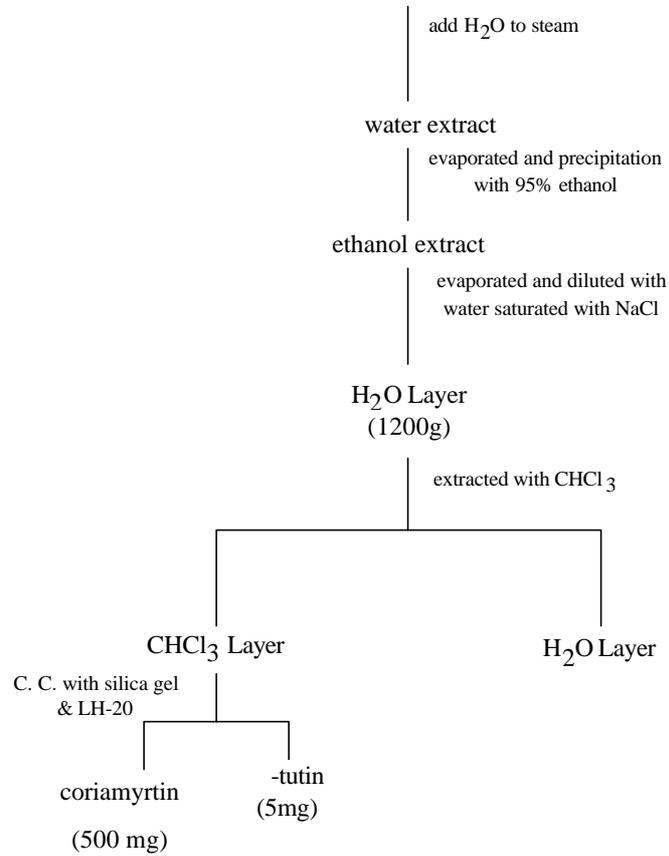


Fig -4. 臺灣馬桑 *Coriaria intermedia* MATSUM 葉部分離流程圖

第三節 台灣馬桑之成分鑑定

1. RA-2: ellagic acid 3,3'-dimethyl ether (C₁₈H₁₀O₅)

- (1) mp. 334-336 , 由甲醇-水再結晶, 為黃色顆粒狀結晶, 溶於水、乙醇。
- (2) TLC 以正己烷: 乙酸乙酯 = 1: 1 溶液展開, R_f 值為 0.74 , 以硫酸茴香醛呈色, 於 105 下呈黃色斑點。
- (3) IR (KBr, cm⁻¹)
3550 3200, 2950, 2840, 1730
- (4) MS (*m/z* %; EI 20eV)
330 (M⁺, 100), 315, 287
- (5) ¹H NMR (DMSO-d₆) (300Hz) ppm
7.51 (*s*, 2H, H-5, H-5'), 4.03 (*s*, 6H, 3-OCH₃, 3'-OCH₃)
- (6) ¹³C NMR (DMSO-d₆) (300Hz) ppm
158.7 (C-7, C-7'), 152.4 (C-4, C-4'), 141.4 (C-2, C-2'),
140.4 (C-3, C-3'), 112.3 (C-6, C-6'), 111.8 (C-1, C-1'),
111.6 (C-5, C-5'), 61.0 (-OCH₃)

2. RB-1: 20-epibryonolic acid (C₃₀H₄₈O₃)

- (1) mp. 276.5 277 , 由氯仿-甲醇再結晶, 為白色針狀結晶, 溶於甲醇、氯仿。
- (2) TLC 以正己烷: 乙酸乙酯 = 1: 1 溶液展開, R_f 值為 0.6, 以硫酸茴香醛呈色, 於 105 下呈黃色斑點。
- (3) IR (KBr, cm⁻¹)

3465, 2950, 1750, 1160

(4) MS (m/z %, EI 20eV)

456 (M^+ , 100), 441, 423, 368, 259, 247, 221, 229, 189, 121

(5) 1H NMR (DMSO- d_6) (300Hz) ppm

4.28 (*d*, 1H, $J = 4.8\text{Hz}$, -OH), 2.99 (*m*, 1H, H-3),

2.28 (*d*, 1H, $J = 15.0\text{Hz}$, H-18), 1.10, 0.99, 0.92, 0.89, 0.84 ,

0.68 (*s*, 7x- CH_3)

(6) ^{13}C NMR (DMSO- d_6) (300Hz) ppm

179.8 (C-28), 133.9 (C-8), 133.4 (C-9), 76.9 (C-3), 50.3 (C-5), 44.2

(C-18), 41.3 (C-17), 40.3 (C-14), 37.2 (C-13), 36.7 (C-19), 34.7

(C- 1), 34.0 (C-21), 32.6 (C-30), 31.1 (C-29), 30.6 (C- 4), 30.0 (C-

7), 30.0 (C-10), 29.9 (C-22), 29.4 (C-12), 28.2 (C-23), 27.7 (C-20),

27.7 (C-15), 27.2 (C- 2), 24.6 (C-16), 21.9 (C-26), 20.2 (C-11),

19.7 (C-25), 18.9 (C- 6), 17.3 (C-27), 16.1 (C-24)

3. RB-2: coriamyrtin ($C_{15}H_{18}O_5$)

(1) mp. 222 – 225 , 由氯仿再結晶為無色針晶 , 可溶於氯仿、乙醚。

(2) TLC 以正己烷 : 乙酸乙酯 = 1 : 1 溶液展開 , R_f 值為 0.54 , 以硫酸茴香醛呈色 , 於 105 下呈橘色。

(3) IR (KBr, cm^{-1})

3511, 2979, 1775, 1651, 1458, 1165, 1050, 910

(4) MS (m/z %; EI 20eV)

278(M^+), 260, 245, 233, 221, 201, 187, 173, 161, 149, 125, 109, 95, 67

- (5) ^1H NMR (DMSO- d_6) (200Hz) ppm
 5.63 (6-OH), 4.78, 4.57 (2H, H-9), 4.86 (br, 1H, H-3),
 3.65 (*d*, 1H, $J = 3.0\text{Hz}$, H-12), 3.24 (*d*, 1H, $J = 3.0\text{Hz}$, H-11),
 3.01 (3H, H-4, H-14), 2.81 (*d*, 1H, $J = 3.9\text{Hz}$, H-5),
 1.59 (*m*, 2H, H-2), 1.85, 0.93 (*s*, 6H, 10, 7- CH_3)
- (6) ^{13}C NMR (DMSO- d_6) (200Hz) ppm
 175.1 (C-15), 142.1 (C- 8), 110.1 (C- 9), 78.1 (C- 3),
 75.2 (C- 6), 66.1 (C-13), 60.6 (C-11), 58.0 (C-12),
 51.5 (C-14), 49.1 (C- 5), 47.4 (C- 4), 40.3 (C- 1),
 30.1 (C- 2), 23.0 (C-10), 22.8 (C- 7)
- (7) DEPT ($^{-}/4$, 2 $^{-}/4$, 3 $^{-}/4$) ppm
 22.8, 23.0 為 CH_3
 110.1, 51.5, 30.1 為 CH_2
 78.1, 60.6, 58.0, 49.1, 47.4 為 CH

4. RB-3: ursolic acid ($\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$)

- (1) mp. 287 – 289 , 由氯仿-甲醇再結晶為無色針晶 , 可溶於氯仿、乙醚。
- (2) TLC 以氯仿 : 丙酮 = 96 : 4 溶液展開 , R_f 值為 0.53 , 以 5% 硫酸呈色 , 於 105 下呈紫紅色。
- (3) IR (KBr, cm^{-1})
 3434, 2932, 2346, 1736, 1690, 1459, 1242, 1150, 965
- (4) MS (m/z %; EI 20eV)
 456(M^+), 248, 207
- (5) ^1H NMR (CDCl_3) (200Hz) ppm

5.17 (br, 1H, H-12), 3.13 (*dd*, 1H, $J = 7.0\text{Hz}$, H-3 α), 2.12 (*d*, 1H, $J = 11.0\text{Hz}$, H-18), 1.17, 1.02, 0.89, 0.85, 0.80, 0.77, 0.70 (*s*, 3H, 7x-CH₃)

(6) ¹³C NMR (CDCl₃) (200Hz) ppm

180.5 (C-28), 138.0 (C-13), 125.3 (C-12), 78.7 (C-3), 55.1 (C-5), 52.6 (C-17, 18), 47.6 (C-9), 47.4 (C-14), 41.9 (C-8), 39.3 (C-4), 38.9 (C-19), 38.7 (C-20), 38.5 (C-1, 22), 36.7 (C-7), 36.6 (C-10), 32.8 (C-21), 30.5 (C-15), 27.8 (C-23), 26.6 (C-2), 24.0 (C-16), 23.3 (C-27), 23.1 (C-6), 20.9 (C-29), 18.1 (C-11), 16.8 (C-30), 16.6 (C-26), 15.4 (C-25), 15.2 (C-24)

5. RC-1 : corianin (C₁₅H₁₈O₆)

(1) mp. 211 – 213 , 由氯仿再結晶為無色針晶 , 可溶於氯仿、熱乙醇。

(2) TLC 以正己烷 : 乙酸乙酯 = 1 : 1 溶液展開 , R_f 值為 0.21 , 以硫酸茴香醛呈色 , 於 105 °C 下呈橘色。

(3) IR (KBr, cm⁻¹)

3458, 3218, 2925, 2856, 2362, 1690, 1613, 1459, 1389, 1320, 1235, 1127

(4) MS(*m/z* %; EI 20eV)

294 (M⁺), 276, 250, 165, 125, 95 (100), 67

(5) ¹H NMR (DMSO-d₆) (200Hz) ppm

5.17 (*d*, 1H, $J = 7.7\text{Hz}$, 6-OH, H-3), 4.97 (*t*, 1H, $J = 4.3\text{Hz}$, H-2), 4.81, 4.76 (*d*, 2H, $J = 9.3\text{Hz}$, H-9), 4.11 (*d*, 1H, $J = 4.6\text{Hz}$, H-14), 3.70 (*s*, 2H, H-4, 5), 3.65 (*d*, 1H, $J = 2.5\text{Hz}$, H-12), 3.44 (*d*, 1H, J

= 2.5Hz, H-11), 3.02 (*d*, 1H, $J = 4.6\text{Hz}$, H-14), 1.82 (*s*, 3H, 10-CH₃), 0.87 (*s*, 3H, 7-CH₃)

(6) ¹³C NMR (DMSO-d₆) (200Hz) ppm

175.3 (C-15), 140.5 (C-8), 112.1 (C-9), 89.1 (C-13), 84.5 (C-3), 81.2 (C-2), 77.2 (C-14), 74.3 (C-6), 63.0 (C-11), 60.0 (C-12), 54.8 (C-1), 49.6 (C-5), 47.9 (C-4), 22.9 (C-10), 21.8 (C-7)

(7) DEPT (/4, 2 /4, 3 /4) ppm

22.9, 21.8 為 CH₃

112.1, 77.2 為 CH₂

89.1, 84.5, 63.0, 60.0, 49.6, 47.9 為 CH

6. RC-2 : naringenin (C₁₅H₁₂O₅)

(1) mp. 261 ~ 263 , 由氯仿與甲醇再結晶為無色針晶 , 可溶於苯、乙醚、乙醇。

(2) TLC 以正己烷 : 乙酸乙酯 = 1 : 1 溶液展開 , R_f 值為 0.55 , UV 254 及 366 nm 有吸收。以 5% 硫酸呈色 , 於 105 下呈黃色。

(3) UV λ_{Max}^{MeOH} nm : 297, 330

(4) IR (KBr, cm⁻¹)

3280~3033, 2917, 2361, 1636, 1605, 1497, 1466, 1250, 1158, 1080, 833

(5) MS(*m/z* %; EI 20eV)

272 (M⁺), 179, 166, 153, 120 (100), 91, 69

(6) ¹H NMR (DMSO-d₆) (200Hz) ppm

7.30 (*d*, 2H, $J = 8.6\text{Hz}$, H-2', 6'), 6.78 (*d*, 2H, $J = 8.6\text{Hz}$, H-3', 5'),
5.87 (*s*, 2H, H-6, 8), 5.42 (*dd*, 1H, $J = 12.8, 2.9\text{Hz}$, H-2), 2.66 (*dd*,
2H, $J = 17.1, 3.1\text{Hz}$, H-3)

- (7) ^{13}C NMR (DMSO- d_6) (200Hz) ppm
196.4 (C-4), 166.7 (C-7), 163.5 (C-5), 163.0 (C-9), 157.7 (C-4'),
128.9 (C-1'), 128.4 (C-2', 6'), 115.2 (C-3', 5'), 101.8 (C-10), 95.8
(C-6), 95.0 (C-8), 78.4 (C-2), 42.0 (C-3)

7. RC-3 : 7-hydroxycoumarin ($\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3$)

- (1) mp. 235 – 236 , 由氯仿再結晶為無色針晶 , 可溶於甲醇。
- (2) TLC 以正己烷 : 乙酸乙酯 = 1 : 1 溶液展開 , R_f 值為 0.50 ,
UV 254 及 366 呈強烈螢光。
- (3) UV λ_{Max}^{MeOH} nm : 298, 310
- (4) IR (KBr, cm^{-1})
3211, 2362, 1690, 1621, 1566, 1513, 1320, 1235, 1127, 988
- (5) MS(m/z %; EI 20eV)
162(M^+), 134 (100), 105, 78
- (6) ^1H NMR (CD_3OD) (200Hz) ppm
7.84 (*d*, 1H, $J = 9.5\text{Hz}$, H-4), 7.44 (*d*, 1H, $J = 8.6\text{Hz}$, H-5), 6.79
(*dd*, 1H, $J = 8.6, 2.4\text{Hz}$, H-6), 6.70 (*d*, 1H, $J = 2.4\text{Hz}$, H-8), 6.17
(*d*, 1H, $J = 9.5\text{Hz}$, H-3)
- (7) ^{13}C NMR (DMSO- d_6) (200Hz) ppm
154.2 (C-2), 153.9 (C-7), 147.8 (C-9), 136.6(C-4), 121.1 (C-3),
105.0(C-5), 103.5 (C-10), 102.7 (C-6), 93.9 (C-8)

8. FA-1 : β -sitosterol ($C_{29}H_{50}O$)

- (1) mp. 140–141 °C, 由正己烷-乙醚再結晶為無色針晶, 可溶於氯仿、正己烷。
- (2) TLC 以氯仿溶液展開, R_f 值為 0.33, 以 5% 硫酸呈色, 於 105 °C 下呈紫紅色。
- (3) IR (KBr, cm^{-1})
3434, 2904, 2361, 1736, 1466, 1381, 1050, 957
- (4) MS(m/z %; EI 20eV)
414 (M^+ , 100), 396, 329, 303, 255, 213, 159, 81
- (5) 1H NMR ($CDCl_3$) (200Hz) ppm
5.33 (*d*, 1H, $J = 5.4Hz$, H-6), 3.50 (*m*, 1H, H-3), 0.99 (*s*, 3H, H-19), 0.90 (*d*, 3H, $J = 6.4Hz$, H-21), 0.84 (*d*, 6H, $J = 7.0Hz$, H-26, 27), 0.66 (*s*, 3H, H-18)
- (6) ^{13}C NMR ($CDCl_3$) (200Hz) ppm
140.8 (C-5), 121.7 (C-6), 71.8 (C-3), 56.8 (C-14), 56.0 (C-17),
50.1 (C-9), 45.8 (C-24), 42.3 (C-4, 13), 39.8 (C-16), 37.2 (C-1),
36.5 (C-10), 36.1 (C-20), 33.9 (C-8), 31.9 (C-7), 31.7 (C-2), 29.1
(C-25), 28.2 (C-12), 26.1 (C-22), 24.3 (C-15), 23.1 (C-28), 21.1
(C-11), 19.8 (C-19), 19.0 (C-27), 18.8 (C-21), 12.0 (C-29), 11.8
(C-18)

9. FB-1: angustifolin ($C_{14}H_{14}O_3$)

- (1) mp. 62–63 °C, 由氯仿再結晶為無色針晶, 可溶於氯仿。
- (2) TLC 以正己烷 : 乙酸乙酯 = 3 : 2 溶液展開, R_f 值為 0.51, 在UV 波長 254 及 366nm 下呈強烈螢光。

- (3) UV λ_{Max}^{MeOH} nm : 298, 310
- (4) IR (KBr, cm^{-1})
3427~3303, 2925, 2856, 2361, 1737, 1613, 1512, 1458, 1366,
1165
- (5) MS(m/z %; EI 20eV)
230 (M^+), 215, 117, 97, 84, 71, 66, 57
- (6) 1H NMR ($CDCl_3$) (200Hz) ppm
7.54 (*s*, 1H, H-4), 7.31 (*d*, 1H, $J = 8.5Hz$, H-5), 6.95 (*d*, 1H, $J = 8.0$, H-8), 6.80 (*dd*, 1H, $J = 8.5, 2.0Hz$, H-6), 6.15 (*dd*, 1H, $J = 17.9, 10.2Hz$, H-10), 5.10 (*d*, 1H, $J = 0.7Hz$, H-11), 5.03 (*dd*, 1H, $J = 5.9, 1.1Hz$, H-11), 1.45 (*s*, 6H, $2 \times CH_3$)
- (7) ^{13}C NMR ($CDCl_3$) (200Hz) ppm
160.8 (C-2), 159.1 (C-7), 154.7 (C-8a), 145.4 (C-4), 138.4 (C-10),
131.2 (C-3), 129.0 (C-5), 113.2 (C-6), 112.8(C-4a), 112.3 (C-11),
102.5(C-8), 40.3 (C-9), 26.1 ($2 \times CH_3$)

10. FB-2: tutin ($C_{15}H_{16}O_6$)

- (1) mp. 208 ~ 209 , 由氯仿-甲醇再結晶為無色針晶 , 可溶於氯仿、熱乙醇。
- (2) TLC 以正己烷 : 乙酸乙酯 = 1 : 1 溶液展開 , R_f 值為 0.46 , 以硫酸茴香醛呈色 , 於 105 °C 下呈橘色。
- (3) IR (KBr, cm^{-1})
3542, 3480, 2971, 2361, 1767, 1381, 1296, 1173, 918
- (4) MS(m/z %; EI 20eV)
294 (M^+), 278

- (5) ^1H NMR (Acetone- d_6) (200Hz) ppm
 4.83 (2H, 6-OH, H-3), 4.74, 4.67 (*d*, 2H, $J = 12.0\text{Hz}$, H-9), 4.45 (1H, 7-OH), 4.23 (*d*, 1H, $J = 4.8\text{Hz}$, H-2), 3.96 (*d*, 1H, $J = 6.1\text{Hz}$, H-14), 3.66 (*d*, 1H, $J = 3.1\text{Hz}$, H-12), 3.24 (br, 1H, H-4), 3.11 (*d*, 1H, $J = 4.4$, H-5), 3.03 (*d*, 1H, $J = 3.1\text{Hz}$, H-11), 2.61 (*d*, 1H, $J = 6.1\text{Hz}$, H-14), 1.95 (*s*, 3H, 10- CH_3), 1.32 (*s*, 3H, 7- CH_3)
- (6) ^{13}C NMR (Acetone- d_6) (200Hz) ppm
 175.1 (C-15), 142.2 (C-8), 109.9 (C-9), 83.4 (C-3), 76.7 (C-6), 72.9 (C-2), 65.2 (C-13), 61.0 (C-11), 60.2 (C-12), 51.9 (C-14), 50.4 (C-5), 50.0 (C-4), 45.7 (C-1), 23.0 (C-10), 20.8 (C-7)

11. FC-1: Quercetin ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$)

- (1) mp. 319–321, 由甲醇再結晶為無色針晶, 可溶於乙酸乙酯、熱乙醇。
- (2) TLC 以正己烷 : 乙酸乙酯 = 1 : 1 溶液展開, R_f 值為 0.36, 以硫酸茴香醛呈色, 於 105 下呈橘色。
- (3) UV $\lambda_{\text{Max}}^{\text{MeOH}}$ nm : 296, 350, 361
- (4) IR (KBr, cm^{-1})
 3473, 2925, 2856, 2361, 1737, 1698, 1613, 1459, 1366, 1266, 1150
- (5) MS(m/z %; EI 20eV)
 302 (M^+), 285, 278, 257, 239, 211, 185, 149
- (6) ^1H NMR (CD_3OD) (200Hz) ppm

7.82 (*d*, 1H, $J = 2.0\text{Hz}$, H-2'), 7.69 (*dd*, 1H, $J = 8.4, 2.0\text{Hz}$, H-6'),
6.87 (*d*, 1H, $J = 8.4\text{Hz}$, H-5'), 6.38 (*d*, 1H, $J = 2.0\text{Hz}$, H-8), 6.17
(*d*, 1H, $J = 2.0\text{Hz}$, H-6), 4.59 (*br*, 5-OH)

(7) ^{13}C NMR (Acetone- d_6) (200Hz) ppm

176.5 (C-4), 165.1 (C-7), 162.2 (C-5), 157.8 (C-9), 148.4 (C-4'),
146.0 (C-2), 145.8 (C-3'), 136.7 (C-3), 123.7 (C-1'), 121.4 (C-6'),
116.2 (C-5'), 115.8 (C-2'), 99.2 (C-6), 94.5 (C-8)

12. FC-2: Kaempferol ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$)

(1) mp. 281–282, 由氯仿再結晶為無色針晶, 可溶於乙酸乙酯、熱乙醇。

(2) TLC 以正己烷 : 乙酸乙酯 = 3 : 2 溶液展開, R_f 值為 0.41, 以硫酸茴香醛呈色, 於 105 下呈橘色。

(3) UV $\lambda_{\text{Max}}^{\text{MeOH}}$ nm : 299, 343, 350

(4) IR (KBr, cm^{-1})

3319~3203, 2965, 1659, 1613, 1505, 1381, 1227, 1173, 1088, 818

(5) MS (m/z %; EI 20eV)

286 (M^+), 258, 239, 229, 213, 184, 153, 121

(6) ^1H NMR (Acetone- d_6) (200Hz) ppm

8.13 (*d*, 2H, $J = 8.8\text{Hz}$, H-2', 6'), 7.06 (*d*, 2H, $J = 8.8\text{Hz}$, H-3', 5'),
6.53 (*s*, 1H, H-8), 6.26 (*s*, 1H, H-6)

(7) ^{13}C NMR (Acetone- d_6) (200Hz) ppm

176.6 (C-4), 165.0 (C-7), 162.3 (C-5), 160.2 (C-9), 157.8 (C-4'),
147.0 (C-2), 136.6 (C-3), 130.4 (C-2', 6'), 123.3 (C-1'), 116.3
(C-3', 5'), 104.1 (C-10), 99.1 (C-6), 94.5 (C-8)

13. HLC-1: -tutin (C₁₅H₁₈O₆)

- (1) mp. 224 ~ 225 , 由氯仿-甲醇再結晶, 為白色顆粒結晶, 可溶於氯仿、甲醇。
- (2) TLC 以正己烷 : 乙酸乙酯 = 1 : 1 溶液展開, R_f 值為 0.14, 以硫酸茴香醛呈色, 於105 °C 下呈橘色斑點。
- (3) IR (KBr, cm⁻¹)
3453, 2976, 1797, 1160
- (4) MS (*m/z* %; EI 20eV)
294 (M⁺), 279, 237, 219, 161, 125, 95 (100)
- (5) ¹H NMR (CDCl₃-CD₃OD) (300Hz) ppm
4.60 (*m*, 1H, *J* = 2.7Hz, H-3), 3.88, 2.58 (2H, H-14),
3.88 (*t*, 1H, H-2), 3.62 (*d*, 1H, *J* = 3.0Hz, H-12),
3.10 (*m*, 3H, H-4, H-5, H-11), 1.42, 1.41, 1.31 (*s*, 3x-CH₃)
- (6) ¹³C NMR (CDCl₃-CD₃OD) (300Hz) ppm
174.3 (C-15), 89.5 (C-6), 83.6 (C-8), 83.5 (C-3),
74.2 (C-2), 64.0 (C-13), 57.0 (C-12), 56.8 (C-11),
55.4 (C-4), 53.3 (C-5), 52.1 (C-14), 44.3 (C-1),
32.6 (C-9), 23.7 (C-10), 22.3 (C-7)
- (7) DEPT (135°, 90°, 45°) ppm
32.6, 23.7, 22.3 為 CH₃
52.1 為 CH₂
83.5, 74.2, 57.0, 56.8, 55.4, 53.3 為 CH

第四節 臺灣馬桑之藥理活性試驗

一、實驗動物與腫瘤細胞

(一)、動物

ICR 雄性小鼠，SD 大白鼠購自國科會國家實驗動物繁殖及研究中心。

(二)、細胞株

SCM-1 (人類胃癌細胞)，L1210 (老鼠血癌細胞) 由食品工業發展研究所菌種中心/國家衛生研究院細胞庫提供。

二、藥理活性實驗方法

(一)、急性毒性試驗

實驗係採用 Litchfield 和 Wilcoxon 之方法⁽³⁴⁾，使用體重 18-23g ICR 雄性小白鼠，臺灣馬桑經甲醇抽取之根、莖、葉、果實及水抽取之葉粗抽物，經口服給藥後，連續觀察 72 小時，記錄其中毒及死亡之情形，求得小白鼠之半數致死劑量及其 95% 可信度。

(二)、中樞神經興奮劑引起痙攣作用

1. Coriamyrtin 及 tutin 誘發小鼠痙攣之作用

將小鼠隨機分組，每組六隻，分別腹腔注射給予不同劑

量的 coriamyrtin (0.5, 2, 3 mg/kg) 或 tutin (1, 3, 5 mg/kg), 觀察記錄誘發小鼠陣發性痙攣 (clonic seizure) 的時間、陣發性痙攣至強直性痙攣 (tonic seizure) 的時間及死亡時間。正對照組皮下注射給予 picrotoxin (10 mg/kg)⁽³⁵⁾。

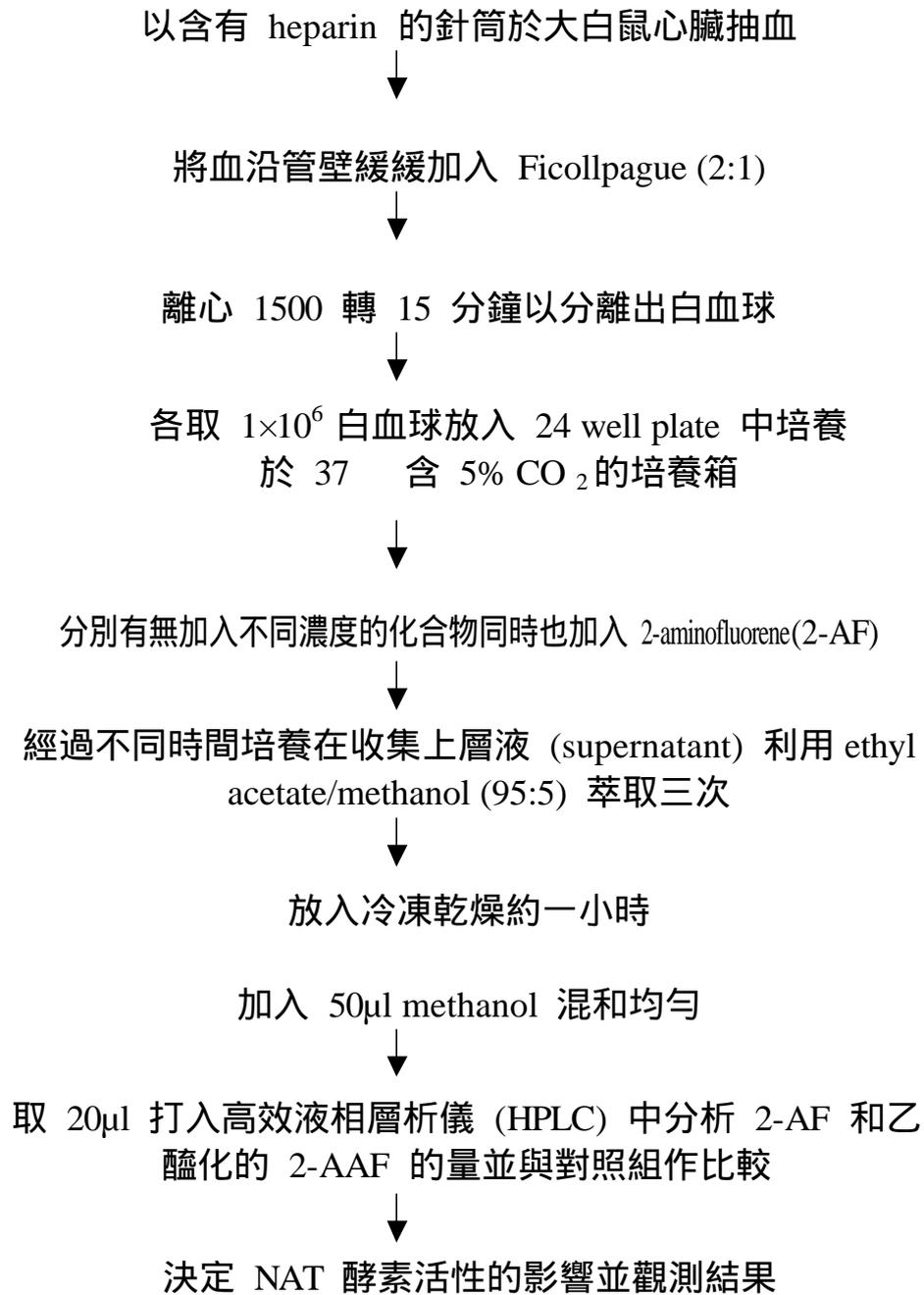
2. Pentobarbital diazepam 對 coriamyrtin 及 tutin 誘發小鼠痙攣作用之療效評估

將小鼠隨機分組，每組六隻，分別腹腔注射給予不同劑量的 pentobarbital (45-10 mg/kg) 或 diazepam (10-0.1 mg/kg) 10 分鐘後，再給予 coriamyrtin (3mg/kg, i.p.)、tutin (5 mg/kg, i.p.) 及 picrotoxin (10 mg/kg, s.c.)，觀察記錄誘發小鼠陣發性痙攣的時間、陣發性痙攣至強直性痙攣的時間及死亡時間。

(三)、抗腫瘤活性試驗

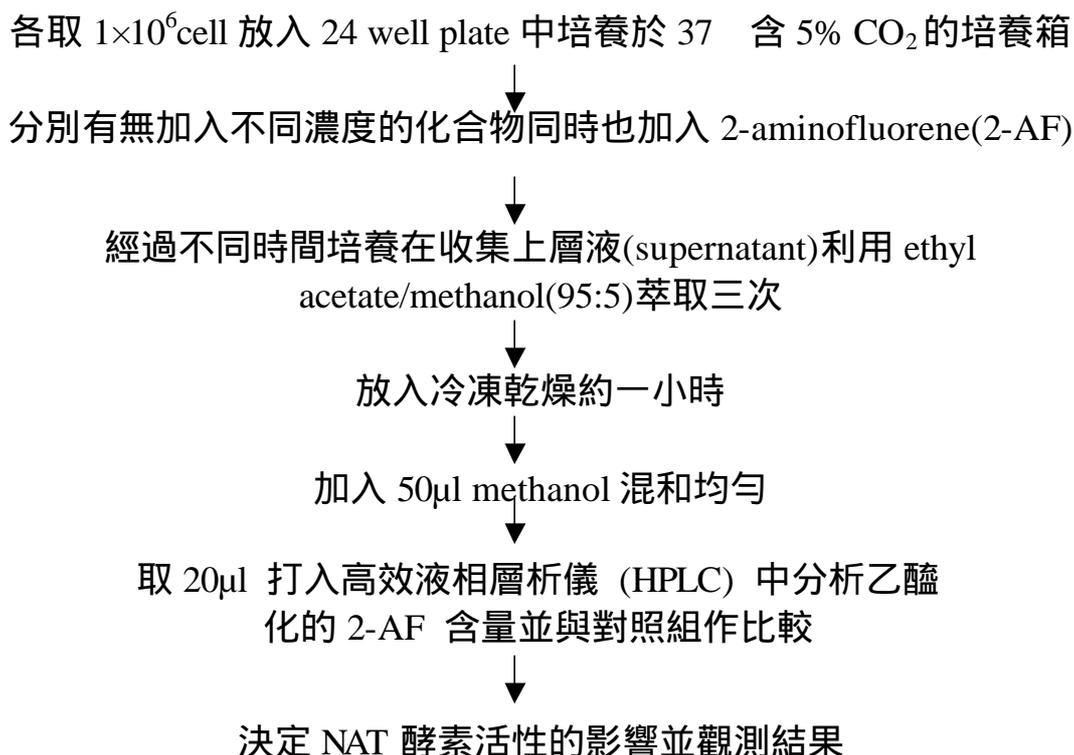
1. 分析大白鼠白血球之 NAT (N-acetyltransferase) 活性

將裝有 heparin 的針筒直接於大白鼠心臟抽血，將抽出的血液，沿管壁緩緩加入 Ficollpague reagent 中 (其比例為 2:1)，離心 1500 轉 15 分鐘以分離出白血球，取 1×10^6 的白血球細胞於含 10% FBS 之 RPMI 1640 的 24 well 中，並加入 2-aminofluorene (2-AF) 與不同的藥物濃度，經 6-24 小時後收取細胞，細胞取出後加入 ethyl acetate/methanol (95:5) 萃取，將上層液放入冷凍乾燥離心機中乾燥，加入 50 μ l methanol 混和均勻，並取出 20 μ l 打入 HPLC 分析，實驗步驟如下：



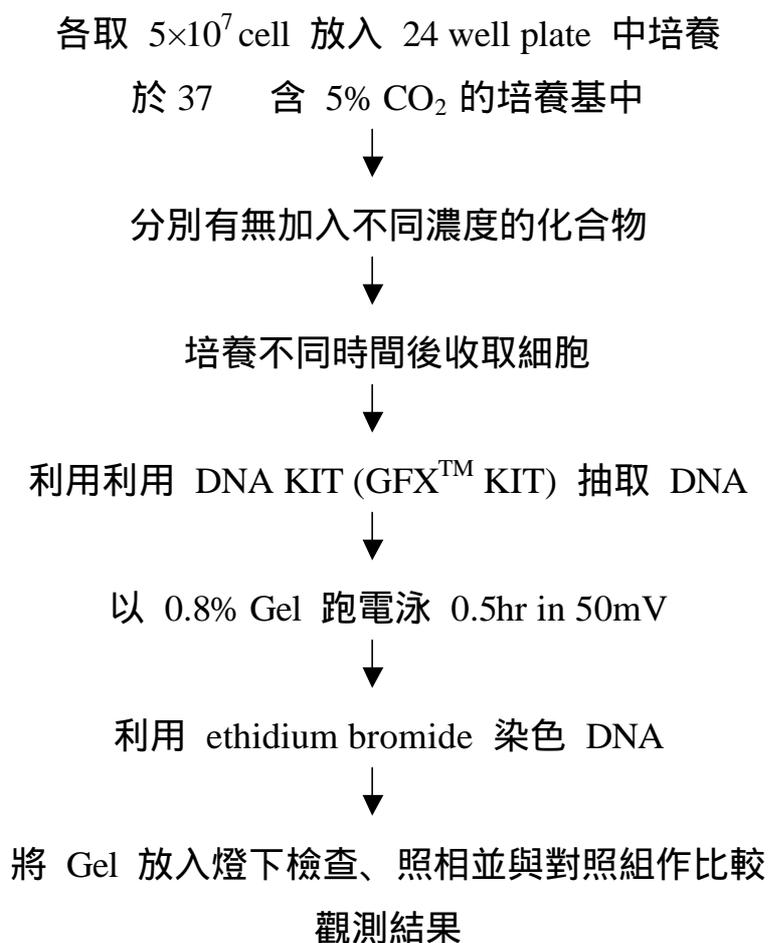
2. 檢測 tutin 及 coriamyrtin 對癌細胞 NAT 活性影響

將癌細胞株培養於含 10% FBS、antibiotics、glutamine 的 RPMI 1640 培養液中分別取 1×10^6 細胞放入於 24-well plate 內，加入受質 2-AF (6.75mM) 及不同濃度的化合物，在含有 95% air 及 5% CO₂ 培養箱培養，經過不同的培養時間 (6-24hrs)，培養完成後吸取 1cc 的上層液，經由萃取後放入冷凍乾燥機乾燥約 60 分鐘，冷凍乾燥完後其殘餘物以 50 μ l methanol 溶解，取 20 μ l 打入 HPLC 分析 2-AF 和 2-AAF 的含量，以下是實驗流程：



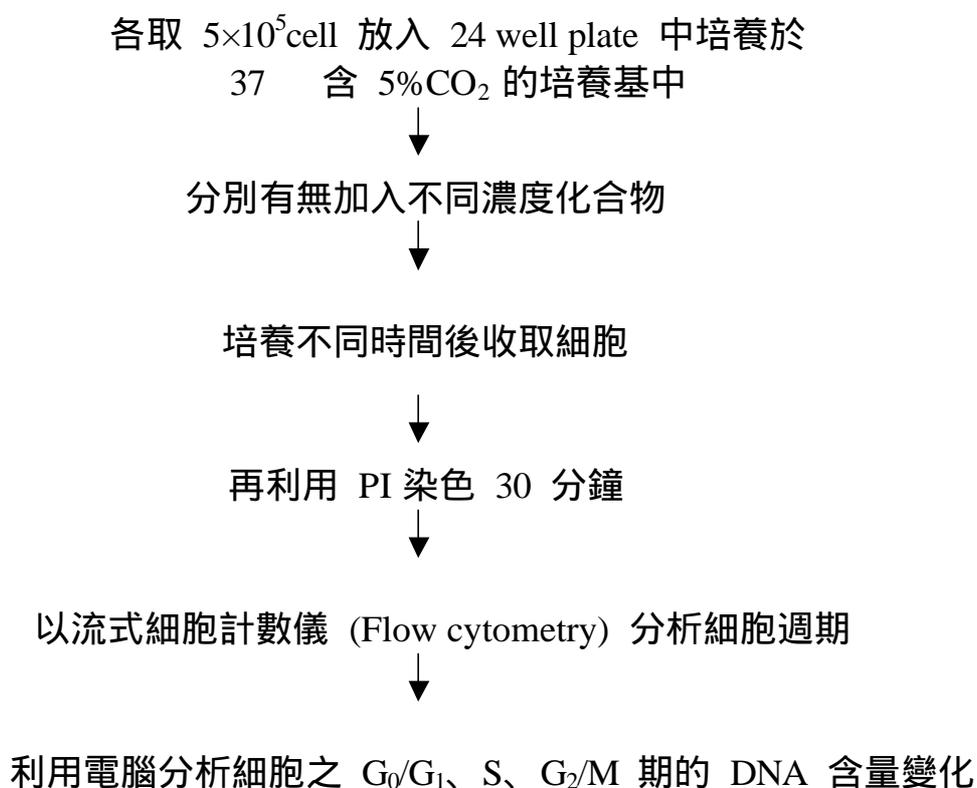
3. DNA 的抽取過程

DNA 的抽取是利用 GFXTM KIT 抽取，首先將培養好的細胞先用 trypsin 將細胞打下，收集、離心，取 1×10^7 細胞，加入 500 μ l Extraction Solution 於室溫培養 5 分鐘，以 8000 轉 1 分鐘離心過濾，重複此步驟 2 次，再加 500 μ l Wash Solution，以 15000 轉 3 分鐘離心、過濾，加入預熱 75 200 μ l 的 TE buffer，室溫培養 1 分鐘再離心 8000 轉 1 分鐘，使其 DNA 沉澱於濾液中之後，即可取其濾液，在 TBE buffer 中，再用 0.8% agarose 以 50mV 電泳分析，然後以 UV 燈做檢視，再利用拍利得照相及觀察 DNA fragment 及 apoptosis 的現象，以下是實驗流程。



4. 細胞週期分析

先將 PBS 和 70% 乙醇放置於冰上冷卻，以 PBS 清洗並收集細胞，再以 trypsin 處理具黏貼性質的癌細胞株，離心後棄置上層液，再用 PBS 來調整細胞濃度，並清洗細胞兩次，離心後收取細胞，接著一面震盪一面加入 3cc 70% 乙醇固定細胞，靜置於 -20 冰箱中隔夜，上機前，先低速離心 5 分鐘，1500 轉，吸除上清液再加入 PBS 清洗，儘量吸除上清液後將細胞團塊均勻打散，最後加入 1ml 的 Stain Solution (Final concentration of Triton 1% RNase A 0.1 mg/ml & propidium iodide 4 μ g/ml)，此溶液需避光反應 30 分鐘，反應完後在一小時內上流式細胞計數儀 (以 Cell Quest 程式收集) 檢測分析。實驗流程如下：

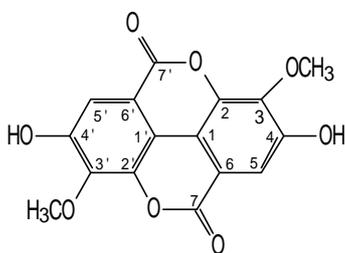


第四章 結果與討論

第一節 台灣馬桑的化學組成

本實驗中由台灣馬桑的根部氯仿層經矽膠柱層析法分離得到 corianin (7mg) 及 7-hydroxycoumarin (5mg)，由果實的正己烷層及氯仿層分到 β -sitosterol (65mg), ursolic acid, coriamyrtin (250mg), tutin (86mg) 及 angustifolin (50mg)，由乙酸乙酯層分離到 quercetin (35mg) 及 kaempferol (32mg)。Ursolic acid 及 coriamyrtin 經 NMR 及 MS 圖譜經比對後證明，與先前在實驗中由根部分離到的化合物相同⁽³⁶⁾。

1. RA-2: ellagic acid 3, 3'-dimethyl ether ($C_{18}H_{10}O_8$)



結晶 RA-2 由乙醇-水再結晶，為黃色顆粒狀結晶，mp. 334-336

(文獻值333-335)⁽³⁶⁾，TLC 以正己烷：乙酸乙酯 = 1：1 溶液為展開溶媒，以硫酸茴香醛呈色， R_f 值為0.74。

IR (chart 1-1) 圖譜：顯示在 3400cm^{-1} (br) 為 -OH 之特性吸收， 2950cm^{-1} 為 C-H 伸縮振動， 1730cm^{-1} 為 carbonyl group ($>\text{C}=\text{O}$) 的特性吸收。

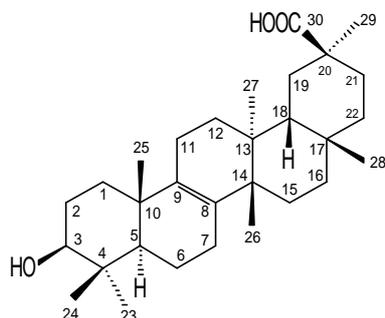
Mass (chart 1-2) 圖譜：其分子離子峰為 330 (M^+)。

$^1\text{H-NMR}$ (chart 1-3) 圖譜：7.51 (*s*) ppm 為芳香環上 C-5, C-5' 上的質子訊號，4.03 (*s*) 為 C-3, C-3' 上甲氧基的質子訊號。

$^{13}\text{C-NMR}$ (chart 1-4) 圖譜：158.67 ppm 為 pyrone 上帶有 $>\text{C}=\text{O}$ 之 C-7, C-7' 的碳原子訊號，141.37 ppm 為 pyrone 上帶有醚鍵之 C-2, C-2' 的碳原子訊號，152.36 ppm 為芳香環上帶 -OH 之 C-4, C-4' 之碳原子訊號，140.25 為甲氧基上碳原子 C-3, C-3' 訊號，111.6 為碳原子 C-5, C-5' 訊號，其它訊號均與文獻相似。

由以上光譜資料與文獻⁽³⁶⁻³⁸⁾佐證，推論其結構為 ellagic acid 3,3'-dimethyl ether。

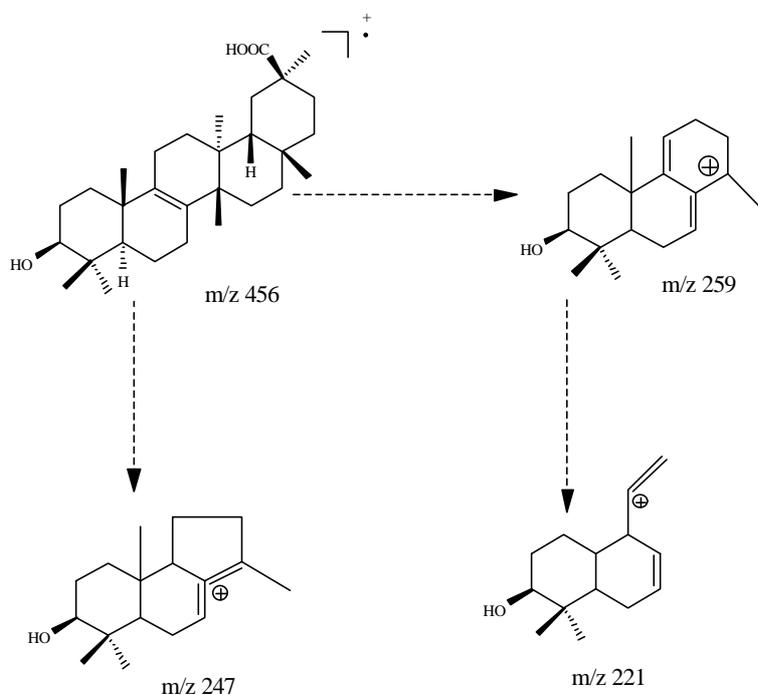
2. RB-1: 20-epibryonolic acid ($C_{30}H_{48}O_3$)



結晶 RB-1 是由氯仿-甲醇再結晶，為白色針晶，mp. 276.5-277，TLC 以正己烷：乙酸乙酯 = 1：1 溶液為展開溶媒，以硫酸茴香醛呈色， R_f 值為 0.6。

IR (chart 2-1) 圖譜顯示： 3465cm^{-1} 為 $-\text{OH}$ 之特性吸收， 2950cm^{-1} 為 $-\text{CH}$ stretch， 1750cm^{-1} 為 $>\text{C}=\text{O}$ 之特性吸收， 1160cm^{-1} 為 $\text{C}-\text{O}$ 的特性吸收。

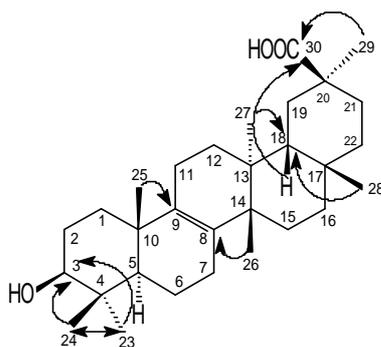
Mass (chart 2-2) 圖譜：其 Molecular ion peak 為 $456 (M^+)$ ，由 Mass 的斷裂形式 441, 259, 247, 229 及 203 顯示此結構為一個三環類帶有羧基，而其 259、247、221 等裂片之斷裂形式如下：



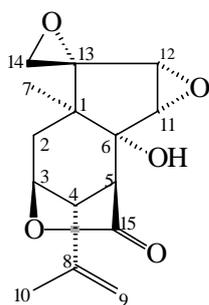
^1H NMR (chart 2-3) 圖譜：在 11.99 ppm 有一個羧基上氫原子的訊號，4.28 (*d*) ppm 偶合常數 4.8 Hz 為 C-3 上接羥基後之 -OH 質子訊號，2.99 (*m*) ppm 為 H-3 之質子訊號，2.28 (*d*) ppm 偶合常數 15 Hz 為 C-18 之質子訊號，因為受到 C-20 上 *cis* 位置羧基的影響而向低磁場位移，1.10、0.99、0.92、0.89、0.88、0.84、0.68 ppm 為七個四級碳上甲基的質子訊號。

^{13}C NMR (chart 2-4) 圖譜：179.8 ppm 為 carbonyl group 上 C-30 的訊號，133.89、133.41 ppm 為 C-8、C-9 雙鍵的碳原子訊號，76.84 ppm 為接上 -OH 位羥基後 C-3 的訊號，再由其他光譜 HMBC、DEPT 及 HETCOR 來鑑別其光譜與其他文獻^(36,37,39)比對推論其結構為 20-epibryonolic acid。此結構第一次由天然物中分離得到，並已由本研究室發表⁽³⁶⁾。

以下為 20-epibryonolic acid 的 HMBC 及 HETCOR 圖譜所顯示甲基及氫原子與結構上的關係：



3. RB-2: coriamyrtin (C₁₅H₁₈O₅)



結晶 C1FC-2 由氯仿- 甲醇再結晶，為無色結晶，熔點為 222-225 (文獻值 226-227)⁽³⁹⁾，TLC以正己烷：乙酸乙酯 = 1：1 溶液為展開溶媒，以硫酸茴香醛呈色，R_f 值為 0.54。

IR (chart 3-1) 圖譜顯示 3511cm⁻¹ 為 -OH 之特性吸收，2979 cm⁻¹ 為 -CH stretch，1775cm⁻¹ 為 -lactone 中 >C=O 之特性吸收，1658cm⁻¹ 為雙鍵 (C=C) 之特性吸收，1165cm⁻¹ 為 -lactone 中 C-O 的特性吸收。

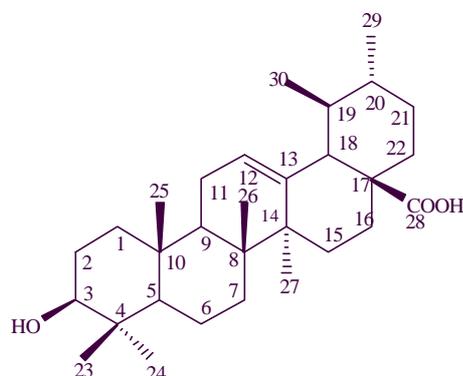
Mass (chart 3-2) 圖譜：其分子離子峰為 278 (M⁺)。

¹H NMR (chart 3-3) 圖譜：4.86 (*br*) ppm 為帶內酯鍵之 H-3 上的質子訊號。3.24 (*d*), 3.65 (*d*) ppm，其偶合常數同為 3Hz，而知其為 H-11, H-12 的質子訊號，3.01 ppm 與為 H-4, H-14 的質子訊號。5.63 ppm 為 C-6上 -OH 的訊號，1.59 (*m*, 2H) ppm 為 H-2 的質子訊號，1.85 (*s*)、0.93 (*s*) ppm 為甲基質子訊號。

¹³C NMR and DEPT (chart 3-4) 圖譜：175.1 ppm 為帶內酯鍵之 C-15 之碳原子訊號，142.1、110.1 ppm C-8、C-9 雙鍵上之碳原子訊號，78.1 ppm 為帶內酯鍵之 C-3 訊號，58.0 60.6 66.1、51.5 ppm 為帶醚鍵之 C-11、C-12、C-13、C-14 之碳原子訊號；其它訊號均與文獻^(14,22,36,37)相似。

由以上的光譜資料與文獻佐證，推論其結構為 coriamyrtin。

4. RB-3: ursolic acid (C₃₀H₄₈O₃)



混合物 RB-3 是由甲醇-氯仿再結晶，熔點為 287–289 (文獻值 287-289)⁽⁴¹⁾，TLC 以氯仿：丙酮 = 96：4 溶液為展開溶媒，R_f 值為 0.53，以硫酸呈色，於 105 °C 下呈紫紅色，Liebermann-Büchard 試驗呈陽性反應，由紅色變為紫色，再變為藍綠色，故推測此化合物為固醇類化合物。

IR (Chart 4-1) 圖譜：顯示在 3434cm⁻¹ (br) 為 -OH 之特性吸收，1690cm⁻¹ (br) 為 >C=O 之特性吸收，965cm⁻¹ 則顯示有雙鍵，1459cm⁻¹ 則為 -CH₂-bending。

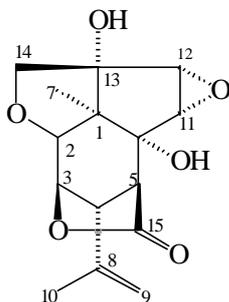
Mass (Chart 4-2) 圖譜顯示其分子離子峰為 456 (M⁺)。

¹H NMR 圖譜 (Chart 4-3) 5.17 (br) ppm 為環上雙鍵之質子訊號；3.13 (dd) ppm 則顯示為 C-3 連接 -OH 後之次甲基的質子訊號，2.12 (d) ppm 則為 H-18 的質子訊號。

¹³C NMR (Chart 4-4) 圖譜：180.5 ppm 為帶羧基之碳原子訊號；138.0、125.3 ppm 分別顯示為環雙鍵碳原子訊號；78.7 ppm 則為帶有 -OH 基的 C-3 訊號；其它訊號均與文獻^(36,42)相似。

由以上光譜資料與文獻比對，推論其結構為 ursolic acid。

5. RC-1 CIRET-1 : corianin (C₁₅H₁₈O₆)



結晶 CIRET-1 甲醇再結晶，為無色結晶，mp 為 211–213 (文獻值 215-216)⁽⁵⁾，TLC 以正己烷：乙酸乙酯 = 1：1 溶液為展開溶媒，以硫酸茴香醛呈色，R_f 值為 0.21。

IR (chart 5-1) 圖譜顯示在 3458cm⁻¹ 為 -OH 之特性吸收，2925 cm⁻¹ 為 -CH stretch，1690cm⁻¹ 為 -lactone 中 C=O 之特性吸收，1613cm⁻¹ 為雙鍵 (C=C) 之特性吸收，1127cm⁻¹ 為 -lactone 中 C-O 的特性吸收。

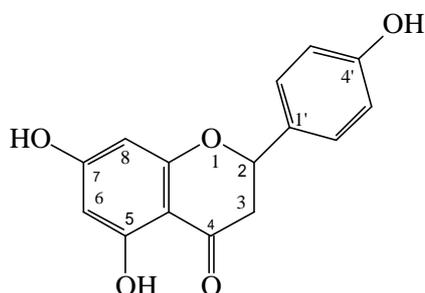
Mass (chart 5-2) 圖譜：其 Molecular ion peak 為 294 (M⁺)。

¹H NMR (chart 5-3) 圖譜：5.19 (*br*) ppm 為帶內酯鍵之 C-3 上的質子訊號。3.44 (*d*), 3.65 (*d*) ppm，其 偶合常數同為 2.5Hz，而知其為 H-11, H-12 的質子訊號，4.11、3.02 ppm 其 coupling constant 同為 4.3Hz，而知其與為 H-14 的質子訊號。1.82 (*s*)、0.87 (*s*) ppm 為甲基質子訊號。

¹³C NMR and DEPT (chart 5-4) 圖譜：175.3 ppm 為帶內酯鍵之 C-15 之碳原子訊號，140.5、112.1 ppm C-8、C-9 雙鍵上之碳原子訊號，89.1、84.5 ppm 為 C-13、C-3 訊號，77.2、63.0、60.0 ppm 為帶醚鍵之 C-14、C-11、C-12 之碳原子訊號；其它訊號均與文獻^(5,36) 相似。

由以上的光譜資料與文獻佐證，推論其結構為 corianin。

6. RC-2: naringenin ($C_{15}H_{12}O_5$)



結晶 RC-2 是由氯仿-甲醇再結晶，為黃色針晶，mp. 261-263 (文獻值 251)⁽⁴²⁾，TLC以正己烷：乙酸乙酯 = 1：1 溶液為展開溶媒，R_f 值為 0.55，紫外燈 254 及 366 nm 下具有吸收光譜。

IR (Chart 6-1) 圖譜：顯示在 3280~3033 cm^{-1} (br) 為 -OH 之特性吸收，1636 cm^{-1} 為 Carbonyl group ($>C=O$) 的吸收，1605 為環上雙鍵 (C=C) 之吸收，1158 cm^{-1} 則為 C-O 之吸收。

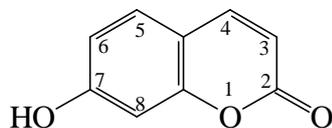
Mass (chart 6-2) 圖譜：其 Molecular ion peak 為 286 (M^+)。

1H NMR (chart 6-3) 圖譜：5.87 (s) ppm 為芳香環上 H-8 及 H-6 上質子訊號，7.30、6.78 (d) ppm 具有 AB 之偶合為 H-2',6'、H-3',5' 質子訊號，5.42 (dd) 為 H-2 上接苯環的質子訊號，2.66 (dd) ppm 為 H-3 的質子訊號。

^{13}C NMR (chart 6-4) 圖譜：196.4 ppm 為 carbonyl group 上 C-4 的訊號，166.7、1623.5、157.7 ppm 為芳香環上接甲基的 C-7、C-5、C-4' 的碳原子訊號，78.4 ppm 為接苯環的 C-2 的碳原子訊號，42.0 為 C-3 上 methylene 的碳原子訊號。

其光譜與其他文獻^(36,43)比對推論其結構為 naringenin。

7. RC-3: 7-hydroxycoumarin (C₉H₆O₃)



結晶 RC-3 由氯仿再結晶，為白色針狀結晶，mp. 235-236 (文獻值 230)⁽⁴⁴⁾，TLC 以正己烷：乙酸乙酯 = 1 : 1 溶液為展開溶媒，R_f 值為 0.5，紫外燈 254 及 366 nm 下呈強烈螢光。

IR (Chart 7-1) 圖譜：顯示在 3211cm⁻¹ (br) 為 -OH 之特性吸收，1690 cm⁻¹ 為 Carbonyl group (>C=O) 的吸收，1621 為環上雙鍵 (C=C) 之吸收，1127 cm⁻¹ 則為 C-O 之吸收。

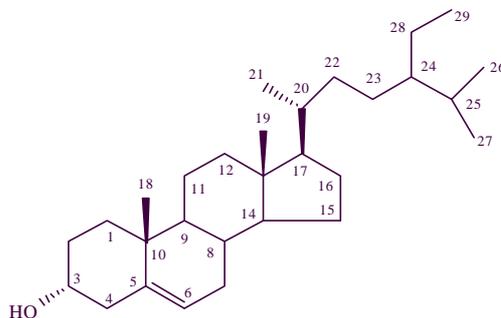
Mass (chart 7-2) 圖譜：其 molecular ion peak 為 162 (M⁺)。

¹H-NMR (chart 7-3) 圖譜：7.84 及 6.17 (*d*) ppm 具有 AB coupling constant 為 pyrone 上的 H-4 H-3 的兩個質子訊號，6.79 (*dd*) ppm 具有 ABX 的 coupling constant 為 H-6 上的質子訊號。

¹³C-NMR (chart 7-4) 圖譜：154.2 ppm 為 pyrone 上帶有 C=O 之 C-2 的碳原子訊號，153.9 ppm 為芳香環上帶 -OH 之 C-7 之碳原子訊號，其它訊號均與文獻⁽⁴⁵⁾相似。

由以上光譜資料與文獻佐證，推論其結構為 7-hydroxycoumarin。

8. FA-1: -sitosterol (C₂₉H₅₀O)



化合物 FA-1 是由正己烷-乙醚中結晶，為白色針狀結晶，mp. 為140-141 (文獻值為140)⁽⁴⁶⁾，TLC以氯仿為展開溶媒，5% 的硫酸為呈色劑，R_f 值為 0.33，可溶於乙醚、正己烷、氯仿。Liebermann-Büchard 反應呈陽性，由紅色變為紫色，再變為藍綠色，故推測此化合物為固醇類化合物。

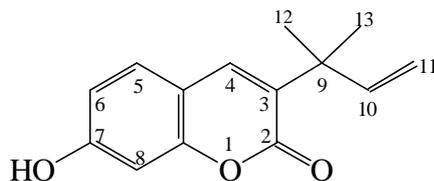
IR (Chart 8-1) 圖譜：顯示在 3434cm⁻¹ (br) 為 -OH 之特性吸收，1050cm⁻¹ 為 C-O 之特性吸收，957cm⁻¹ 則顯示有雙鍵，1466cm⁻¹ 則為 -CH₂-bending，1381cm⁻¹ 則為 -CH₃-bending。

Mass (Chart 8-2) 圖譜 (m/z)：其 molecular ion peak 為 414 (M⁺) 可能是 -sitosterol。

¹H NMR (Chart 8-3) 圖譜：5.33 (d) ppm 為雙鍵上 H-6 的質子訊號，並與 H-7 有一個 5.4Hz 的偶合常數；3.50 (m) ppm 則顯示為 C-3 連接 -OH 後之次甲基的質子訊號；0.99 (s) ppm 則為 H-19 的質子訊號；0.90 (d) ppm 為 H-21 的質子訊號，並與 H-20 有一個 6.4Hz 的偶合常數；0.66 (s) ppm 則為 H-18 的質子訊號。

¹³C NMR (Chart 8-4) 圖譜：140.8、121.7 ppm 分別顯示為 C-5、C-6 雙鍵訊號；71.8 ppm 則為帶有 -OH 基的 C-3 訊號；其它訊號均與文獻完全相似。由以上的光譜資料與文獻⁽⁴⁷⁾比對，推論其結構為 -sitosterol。

9. FB-1: angustifolin (C₁₄H₁₄O₃)



結晶 FB-1 由氯仿再結晶，為白色針狀結晶，熔點為 62-63 ，
TLC 以正己烷：乙酸乙酯 = 3：2 溶液為展開溶媒，R_f 值為 0.51 ，
紫外燈 254 及 366 nm 下呈強烈螢光。

IR (Chart 9-1) 圖譜：顯示在 3427~3303cm⁻¹ (br) 為 -OH 之特
性吸收，1737 cm⁻¹ 為 Carbonyl group (>C=O) 的吸收，1613 為環上
雙鍵 (C=C) 之吸收，1165 cm⁻¹ 則為 C-O 之吸收。

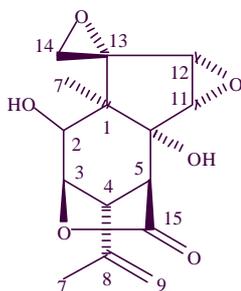
Mass (chart 9-2) 圖譜：其 molecular ion peak 為 230 (M⁺)。

¹H-NMR (chart 9-3) 圖譜：7.54 為 H-4 位的氫原子訊號，7.31(*d*)
及 6.80 (*dd*) 分別為 H-5 H-6 的質子訊號，6.80 (*dd*) ppm 具有 ABX
的偶合為 H-6 上的質子與H-5、 H-8 質子的偶合訊號，其偶合常數
分別為 8.5、 2.0Hz， 5.10 及 5.03 (*dd*) ppm 為支鏈上的 H-11 的兩
個質子訊號，1.45 ppm 有兩個甲基的質子訊號。

¹³C-NMR (chart 9-4) 圖譜：160.8 ppm 為 pyrone 上帶有 C=O
之C-2 的碳原子訊號，138.4 112.3 ppm 為 支鏈上之雙鍵 C-10 C-11
的碳原子訊號，159.1 ppm 為芳香環上帶 -OH 之 C-7 之碳原子訊
號，26.1 ppm 為甲基上碳原子訊號，其它訊號均與文獻⁽⁴⁸⁾相似。

由以上光譜資料與文獻佐證，推論其結構為 angustifolin。

10. FB-2: tutin ($C_{15}H_{18}O_6$)



結晶 FB-2 以氯仿- 甲醇再結晶得無色柱狀結晶，熔點為 208
209 (文獻值為 209~212)⁽¹⁷⁾，TLC 以正己烷：乙酸乙酯 = 1：
1 溶液為展開溶媒，硫酸茴香醛呈色， R_f 值為 0.46。

IR(chart 10-1)圖譜顯示右 3542cm^{-1} 為 $-\text{OH}$ 之特性吸收， 2971cm^{-1} 為 $-\text{CH}$ stretch， 1787cm^{-1} 為 $-\text{lactone}$ 中 $>\text{C}=\text{O}$ 之特性吸收， 1643cm^{-1} 為雙鍵 ($\text{C}=\text{C}$) 之特性吸收， 1173cm^{-1} 為 $-\text{lactone}$ 中 $\text{C}-\text{O}$ 的特性吸收。

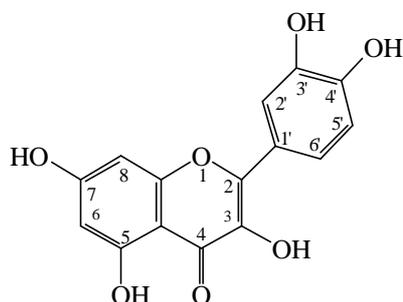
檢視其 $^1\text{H-NMR}$ (chart 10-3) 與 coriamyrtin 比較，4.45ppm 有 2-OH 的質子吸收，4.23ppm 為 H-2 的質子吸收，而原先 coriamyrtin H-2 在 1.59 (*m*) 質子訊號消失。4.83 (*br*) ppm 為帶內酯鍵之 H-3 上的質子訊號。3.03 (*d*), 3.66 (*d*) ppm，其偶合常數同為 3Hz，而知其為 H-11，H-12 的質子訊號，1.95 (*s*)、1.32 (*s*) ppm 為甲基質子訊號。

檢視其 $^{13}\text{C-NMR}$ (chart 10-4) 與 coriamyrtin 比較，可知原先在 30.1 的 C-2 訊號消失，而出現 72.9 ppm 的訊號，應為 coriamyrtin C-2 接上-OH 後產生，而 C-3 也由 78.1 移至 84.2 ppm。

Mass (chart 10-2) 圖譜：其 molecular ion 為 294 與 coriamyrtin 相差 16，可知此結構比 coriamyrtin 多一個氧原子。

由以上光譜資料與文獻⁽¹⁷⁾比對，推論其結構為 tutin。

11. FC-1: quercetin ($C_{15}H_{10}O_7$)



結晶 FC-1 是由氯仿- 甲醇再結晶，為黃色針晶，熔點 319-321 (文獻值 314)⁽⁴⁷⁾，TLC以正己烷：乙酸乙酯 = 1：1 溶液為展開溶媒， R_f 值為 0.36，紫外燈 254 及 366 nm 下具有吸收光譜。

IR (Chart 11-1) 圖譜：顯示在 3473cm^{-1} (br) 為 -OH 之特性吸收， 1698cm^{-1} 為 Carbonyl group ($>\text{C}=\text{O}$) 的吸收，1613 為環上雙鍵 (C=C) 之吸收， 1150cm^{-1} 則為 C-O 之吸收。

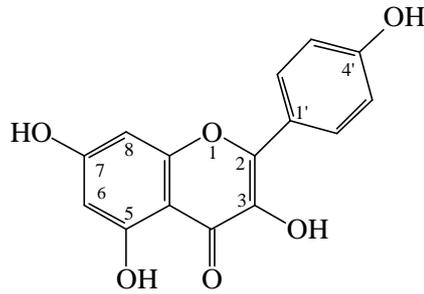
Mass (chart 11-2) 圖譜：其分子離子峰為 302 (M^+)。

^1H NMR (chart 11-3) 圖譜：6.38 & 6.17 (d) ppm 為芳香環上 H-8、H-6 上質子訊號，7.69、6.87 (dd) ppm 具有 ABX 之偶合為 H-5'、H-6' 質子訊號，其偶合常數為 8.4 Hz，而 H-2' 及 H-6' 之間另有一個 2.0Hz 的偶合常數。

^{13}C NMR (chart 11-4) 圖譜：176.5 ppm 為 carbonyl group 上 C-4 的訊號，165.1、162.2、148.4、146.0、145.8 ppm 為芳香環上接甲基的 C-7、C-5、C-4'、C-2、C-3' 的碳原子訊號。

其光譜與其他文獻⁽⁴⁸⁾比對推論其結構為 quercetin。

12. FC-2 : kaempferol ($C_{15}H_{10}O_6$)



結晶 FC-2 是由氯仿- 甲醇再結晶，為黃色針晶，mp. 280-282 (文獻值 276-278)⁽⁴⁹⁾，TLC 以正己烷：乙酸乙酯 = 1：1 溶液為展開溶媒， R_f 值為 0.41，紫外燈 254 及 366 nm 下具有吸收光譜

IR (Chart 12-1) 圖譜：顯示在 $3319\sim 3203\text{ cm}^{-1}$ (br) 為 -OH 之特性吸收， 1659 cm^{-1} 為 Carbonyl group ($>C=O$) 的吸收， 1613 為環上雙鍵 (C=C) 之吸收， 1173 cm^{-1} 則為 C-O 之吸收。

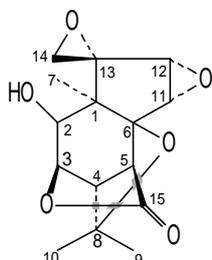
Mass (chart 12-2)圖譜：其 Molecular ion peak 為 $286 (M^+)$ 。

$^1\text{H NMR}$ (chart 12-3) 圖譜：6.53、6.26 (*d*) ppm 為芳香環上 H-8、H-6 上質子訊號，8.13、7.06 (*d*) ppm 具有 AB 之偶合為 H-2'，6'、H-3'，5' 質子訊號，其中 H-2' 與 H-3' 偶合常數為 8.8Hz。

$^{13}\text{C NMR}$ (chart 12-4)圖譜：176.6 ppm 為 carbonyl group 上 C-4 的訊號，165.0、162.3、157.8、147.0 ppm 為芳香環上接甲基的 C-7、C-5、C-4'、C-2 的碳原子訊號。

其光譜與其他文獻⁽⁵⁰⁾比對推論其結構為 kaempferol。

13. HLC-1 : -tutin ($C_{15}H_{18}O_6$)



結晶 HLC-1由氯仿-甲醇再結晶，為無色結晶，mp. 為224–225，TLC 以正己烷：乙酸乙酯 = 1：1 溶液為展開溶媒，以硫酸茴香醛呈色， R_f 值為 0.14。

IR(chart 13-1) 圖譜顯示在 3453cm^{-1} 為 -OH 之特性吸收， 2976cm^{-1} 為 -CH stretch， 1797cm^{-1} 為 -lactone中 $>\text{C}=\text{O}$ 之特性吸收， 1160cm^{-1} 為 -lactone中 C-O 的特性吸收。

Mass (chart 13-2) 圖譜：其分子離子峰為294 (M^+)

^1H NMR and COSY (chart 13-3) 圖譜：4.60 (m) ppm 為帶內酯鍵之 C-3 上的質子訊號。3.88 ppm 為帶 -OH 之 C-2 上的質子訊號，3.62 (d), 3.10 (d) ppm 為 H-12, H-11 的質子訊號，1.42(s)、1.41 (s)、1.31 (s) ppm 為甲基質子訊號。

^1H NMR 與 tutin 比較，tutin C-9 上 4.74、4.67 ppm 之雙鍵訊號消失，本結構 1.41 ppm 之甲基訊號為 C-9 上之 methylene 變成 methyl 之訊號。

^{13}C NMR (chart 13-4) 圖譜：174.3 ppm 為帶內酯鍵之 C-15 之碳原子訊號，89.5、83.6 ppm 分別為帶醚鍵之五員環上 C-6、C-8 之

碳原子訊號，83.5 ppm 為帶內酯鍵之 C-3訊號，74.2 ppm 為帶 -OH 之 C-2 碳原子訊號，32.6、23.7、22.2 ppm 為三個甲基之訊號。

檢視其 ^{13}C NMR 與 tutin 的光譜比較可知 tutin 上 C-8、C-9 之 142.2、109.9 ppm 雙鍵訊號消失，而出現 89.5、83.6 ppm 的訊號，推測應為 tutin C-6 上-OH 環化後其帶醚鍵之五員環上 C-6、C-8 之訊號，而 32.6 ppm 為 C-9 上甲基訊號。

由以上的光譜資料與文獻⁽⁵¹⁾佐證，推論其結構為 -tutin。

第五章 結 論

台灣馬桑為台灣山坡地常見的灌木，全株有劇毒，原住民曾經用來自裁，也有一般民眾誤食而中毒。馬桑科植物普遍存在的有毒成分為酮基倍半萜類，主要毒性會引起中樞神經興奮，造成動物痙攣，甚至造成死亡。

台灣馬桑各部分的成分分離中共分離得到 14 個化合物，依植物各部份分別為，根部：phytosterol，ellagic acid 3,3'-dimethyl ether, 20-epibryonolic acid, naringenin, ursolic acid, corianin, 7-hydroxycoumarin，葉部：coriamyrtin, -tutin，種子：-sitosterol, ursolic acid, coriamyrtin, tutin, angustifolin, quercetin, kaempferol。

依結構區分為，固醇類: phytosterol, -sitosterol, 三萜類: ursolic acid, 20-epibryonolic acid，倍半萜類：coriamyrtin, tutin, corianin, -tutin，香豆素類: 7-hydroxycoumarin, angustifolin，黃酮類: naringenin, quercetin, kaempferol，鞣質類：ellagic acid 3,3'-dimethyl ether。其中 7-hydroxycoumarin 與 angustifolin 為馬桑屬植物中首次分離得到的化合物，20-epibryonolic acid 為天然物首次所分離得到⁽³⁶⁾。

本研究對臺灣馬桑各部位的抽取物急性毒性實驗發現，臺灣馬桑抽取物會引起動物痙攣而死亡，在成分單離中發現臺灣馬桑主要的有毒成分為 coriamyrtin 及 tutin，並證實為馬桑中毒症狀及原因⁽⁵²⁾。由 coriamyrtin 及 tutin 所誘發的陣發性痙攣及強直性痙攣，在時間及劑量來觀察，發現 coriamyrtin 在 2mg/kg 引起小鼠陣發性痙攣，3mg/kg 引起強直性痙攣並造成死亡；tutin 在 3mg/kg 引起小鼠陣發性痙攣，5mg/kg 引起強直性痙攣並造成死亡。

因此以治療大發作的藥物 pentobarbital 及 diazepam 來拮抗其中興奮作用，發現兩者的致痙攣作用均會被有效的抑制，在

pentobarbital 15mg/kg 及 diazepam 2.5mg/kg 時可有效的抑制 coriamyryin (3mg/kg) 所引起的痙攣；在 pentobarbital 30mg/kg 及 diazepam 0.5mg/kg 時可有效的抑制 tutin (5mg/kg) 所引起的痙攣。可以提供在臺灣馬桑中毒的治療方法。

環境中化學致癌物芳香胺類化合物 (arylamine) 有些已證實是致癌物^(53,54)。當此芳香胺類化合物進入人體後必先經過 N-乙醯轉移酵素 (N-acetyltransferase ; NAT) 的乙醯化，進一步再由其他酵素的代謝後才能形成活性更強的致癌物，接著此致癌物會與細胞 DNA 結合，形成 DNA 添加物而導致 DNA 突變，最後成了所謂的癌症；而由此乙醯轉移酵素 (NAT) 乙醯化能力的快慢，又可將個體分為快和慢乙醯轉移者，當個體曝露到芳香致癌物時，快乙醯轉移者較易得到大腸癌及直腸癌^(55,56)，相對的慢乙轉移者則易患膀胱癌^(57,58)。先前的研究證實小鼠白血球細胞含有此乙醯轉移酵素，也能乙醯化致癌物，此乙醯化致癌物的產生物會黏在白血球的 DNA 上形成 DNA 的添加物⁽⁵⁹⁾，另外學者的報告也指出改變肝臟中 NAT 的活性，與其他的病變有直接相關，例如乳癌與膀胱癌⁽⁵⁵⁾，若提升 NAT 的活性，會促使該個體於曝露到芳香胺類致癌物時，更容易引發癌症⁽⁶⁰⁾，因此化合物若能影響 NAT 酵素的活性，使致癌物不易被乙醯化時，則可降低致癌性之效果。

雖然癌症起源於各種不同的組織和器官，但形成癌細胞卻有它們共同的特性，第一就是各種癌細胞未能有正常細胞的功能，第二此癌細胞會以不正常的速度增生，但往往失去細胞分化的能力，第三癌細胞會侵犯周圍正常組織，且具有轉移性，第四就是前述提升細胞 NAT 酵素活性，當曝露到芳香胺類致癌物時，芳香胺類致癌物更容易與細胞 DNA 結合，形成 DNA 添加物，容易形成癌症。因此若能針對癌細胞的共通性，找出一種抗癌的方法，或許能成為一種新的癌症治療途徑。

在抗腫瘤的活性上 tutin 可以有效的抑制人類胃癌細胞中的 N-乙醯轉胺酵素的活性及對胃癌細胞的 DNA 具有破壞的作用,而且可以抑制胃癌細胞 DNA 合成周期之 S phase 有抑制的作用,此初步的結果可以做為日後研究抗癌藥物的參考。

參考文獻

1. 甘偉松，臺灣藥用植物誌，國立中國醫藥研究所，台北，1985，451。
2. 全國中草藥匯編編寫組，全國中草藥匯編（下冊），人民衛生出版社，北京，1986，54-55。
3. 江蘇新醫學院，中藥大辭典，上海科學技術出版社（上卷），上海，1986，293。
4. 邱年永、張光雄，原色臺灣藥用植物圖鑑（3），南天書局，台北，1992，123。
5. Okuda T, Yoshida T, Chen XM, Xie JX, Fukushima M. Corianin from *Coriaria japonica* A. Gray, and Sesquiterpene Lactones from *Loranthus parasiticus* Merr. Used for treatment of schizophrenia. Chem. Pharm. Bull. 1987; 35 (1): 182-187.
6. 四川省馬桑寄生和馬桑研協作組，馬桑寄生混合結晶治療精神分裂症 775 例臨檢觀察，中草藥通訊，1977; 8 (11): 34-37。
7. 四川醫學院藥學系中草藥化學教研組馬桑寄生科研小組，羥基馬桑毒素生產工業的研究，中草藥通訊，1978; 9 (8): 14-16。
8. Ozoe Y, Hasegawa H, Mochida K, Koike K, Suzuki Y, Nagahisa M, Ohmoto T. Picrodendrins, a new group of picrotoxane terpenoids: structure-activity profile of action at the GABA_A receptor-coupled picrotoxinin binding site in rat brain. Biosci. Biotech. Biochem. 1994; 58(8): 1506-1507.
9. 應紹舜，臺灣高等植物彩色圖誌（第一卷），南天出版社，台北，1985，336。
10. 侯寬昭，中國種子植物科屬辭典修訂版，南天出版社，台北，1991，127-128。

11. 台灣植物誌第二版編輯委員會，台灣植物誌 (第三卷)，中華民國國家科學委員會，台北，1993，579-580。
12. 劉業經、呂福原、歐辰雄，臺灣樹木誌，國立中興大學農學院出版委員會，台中，1988，169-170。
13. Yokoyama J, Suzuki M, Iwatsuki K, Hasebe M. Molecular phylogeny of *Coriaria* special emphasis on the disjunct distribution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2000; 14 (1): 11-19.
14. Aguirre-Galviz LE, Templeton W. Toxic sesquiterpenoid lactones from the leaves of *Coriaria microphylla*. *Planta Medica* 1990; 56 (2): 244.
15. Aguirre-Galviz LE. Leonine from *Coriaria microphylla*. *Fitoterapia* 1987; 58 (4): 279-280.
16. Kariyone T, Okuda T. Studies on the toxic components of *Coriaria japonica* A. Gray. *Acta. Sch. Med. Uni. Kioto.* 1955; 33 (1): 45-55.
17. John W. Blunt, Murray H, Munro G, and William H. Swallow. Carbon-13 N.M.R. analysis of tutin and related substance: application to the identification of minor components of toxic honey. *Aust. J. Chem.* 1979; 32: 1339-1343.
18. Reyes AQ, Martinez RJ, Bartulin J. Coriamyrtin and other meta-bolites of *Coriaria ruscifolia*. *J. Nat. Prod.* 1980; 43: 532-533.
19. Okuda T, Hayashi M. Mass fragmentography of Coriose in *Coriaria* species. *Phytochemistry* 1977; 16: 600-601.
20. Hatano T, Hattori S, Okuda T. Tannins of *Coriaria japonica* A. Gray. I coriariin A and B, new dimeric and monomeric hydrolyzable tannins. *Chem.Pharm.Bull.* 1986; 34 (10): 4092-4097.

21. Hatano T, Hattori S, Okuda T. Tannins of *Coriaria japonica* A. Gray. . coriariins C, D, E and F, new dimeric and monomeric hydrolyzable tannins. Chem. Pharm. Bull. 1986; 34 (11): 4533-4539.
22. Hatano T, Yoshihara R, Hattori S, Yoshizaki M, Okuda T. Tannins of *Coriaria japonica* A. Gray. structures of coriariin G, H, I and J. Chem.Pharm.Bull. 1992; 40 (7): 1703-1710.
23. 四川醫學院藥學系藥物研究室，馬桑寄生的化學研究，中草藥通訊 1977; 6: 6-11。
24. 金歧端、喻長惠，馬桑種子油脂肪酸成分，雲南植物研究 1980 ; 2: 228-229。
25. Wheller CT, Bond G. The amino acids of non-legume root nodules. Phytochemistry 1970; 9: 705-708.
26. Yamaguchi K, Suzuki T, Katayama A, Sasa M, Iida S. Insecticidal action of Japanese plants. A general method of detecting effective fractions and its application to 24 species of insecticidal plants. Botyu. Kagaku. 1950; 15: 62-70.
27. Dhar ML, Dhar MN, Dhawan BN, Mehrotra BN, Srimal RC, Tandon JS. Screening of Indian plants for biological activity. Part . Indian J. Exp. Biol. 1973; 11: 43-45.
28. Kamboj VP, Setty BS, Khanna VM. Semen coagulation-A potential approach to contraception, Contraception. 1977; 15: 601-610.
29. Kulakkattolickal A. Piscicidal plants of Nepal: Preliminary toxicity screening using grass carp (ctenopharyngodon idella) fingerlings. J. Ethnopharmacol. 1987; 211: 1-9.
30. Ikram M. Screening of medicinal plants of Pakistan for anticancer acitivity. Fitoterapia 1984; 543: 123-126.

31. Keiser I, Harris EJ, Miyashita DH, Jacobson M, Perdue RE. Attraction of ethyl ether extracts of 232 botanicals to oriental fruit flies. *Lloydia* 1975; 382: 141-152.
32. Bhakuni DS, Bittner M, Marticorena C, Silva M, Weldt E, Hoeneisen M, Hartwell JL. Screening of Chilean plants for anticancer activity I. *Lloydia* 1976; 39: 225.
33. 四川醫學院藥學系中草藥教研組，馬桑內酯注射液生產工藝，中草藥通訊，1977; 8: 25-27。
34. Litchfield JT and Wilcoxon F. A simplified method of evaluating dose effect experiment. *J. Pharmacod. Exp. Ther.* 1949; 96: 99-113.
35. Hsieh MT, Peng WH, Yeh FT, Tsai HY, Chang YS. Studies on the anticonvulsive, sedative and hypothermic effect of *Periostracum cicadae*. *J. Ethnopharmacol.* 1991; 35: 83-90.
36. Chang YS, Lin MS, Jiang RL, Huang SC, Ho LK. 20-epibryonolic acid, phytosterols and ellagic acid from *Coriaria intermedia*. *Phytochemistry* 1996; 42: 559-560.
37. 林明薰：壹灣馬桑 (*Coriaria intermedia* Matsum) 活性成分之研究，中國醫藥學院中國藥學研究所藥藥學碩士論文 1994。
38. Nawwar MAM, Buddrus J, Buer H. Dimeric phenolic constituents from the roots of *Tamarix nilotica*. *Phytochemistry* 1982; 21: 1755-1758.
39. Kamisako W., Suwa K., Honda C., Isoi K., Conformations of bryonolic acid and its derivatives in deuteriochloroform solution by proton and carbon-13 NMR spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.* 1987; 25: 848-855.
40. Huang KF, Liou LE, Constituents of *Erythrina crista-galli*, *Chin. Pharm. J.* 1997; 49: 305-314.

41. Windholz M. Merck Index 10th ed., Merck& Co., USA, 1983; 922,
42. P.K. Agrawal : Carbon-13 NMR of flavonoids, Elsevier Science Publishers B.V., New York, 1989; 102-103,.
43. Charles J. Pouchert and Jacquelyn Behnke. The Aldrich Library of ¹³C and ¹H FTNMR, Wisconsin USA, 1993; 1315,.
44. 同 41, 1127.
45. 余東防、胡邦豪、沙懷、鄭國華、周立潮，扶桑花中扶桑固醇的分離和結構鑑定，中草藥，1991; 22 (1): 3-5。
46. Juan B, Del C, Francisco RL, Miguel S. Angustifolin a coumarin from *Ruta angustifolia*. Phytochemistry 1984; 23 (9): 2095-2096.
47. 同 41, 1160.
48. 同 42, 154.
49. 同 41, 758.
50. 同 42, 152.
51. 四川醫學院藥學系藥物研究室：馬桑寄生的化學研究，中草藥通訊 1977; 6: 6-11。
52. 江睿玲、張永勳、何禮剛，臺灣馬桑 (*Coriaria intermedia* Matsum) 根及種子成分之研究，J. Chin. Med. 2000 11(2): 95-101.
53. Parker HG, Evans AEZ. Epidemiology of aromatic amine cancers. In Searle, C. E. (ed), Chemical carcinogens 2nd. American Chemical Society, Washington DC. ACS monograph.1984; 182: 277-302.
54. Miller EC, Miller JA. Search for the ultimate chemical carcinogens and their reaction with cellular macromolecules. Cancer 1981; 47: 2327-2345.
55. Lower GM. Concepts in causality: chemically induced human urinary bladder cancer. Cancer 1982; 49: 1056-1066.

56. Hein DW, Doll MA, Rustan TD, Gray K, Feng y, Ferguson RJ, Grant DM. Metabolism activation and deactivation of arylamine carcinogens by recombinant NAT₁ and polymorphic NAT₂ acetyltransferase. *Carcinogenesis*. 1993; 14: 1633-1638.
57. Hein DW. Acetylator genotype and arylamine-induced carcinogenesis. *Biochem. Biophys. Acta*. 1988; 948: 37-66.
58. Hein DW, Smolen TN, Fox RR, Weber WW. Identification of genetically homozygous rapid and slow acetylators of drugs and environmental carcinogens among established inbred rabbit strains. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1982; 223: 40-44.
59. Hein DW, Omichinski JG, Bucher KD, Furman EJ, Martin WJ. A unique pharmacogenetic expression of the N-acetylation polymorphism in the inbred hamster. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1982; 220: 8-15.
60. Hein DW, Rustan JD, Bucher KD, Furman EJ, Martin WJ. Extrahepatic expression of the N-acetylation polymorphism toward arylamine carcinogens in tumor target organ of an inbred rat model. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1991; 258: 232-236.