

第二章 實驗部分

第一節 實驗材料

1、石斛 (Figure 1)

民國 86 年 7 月由台中何富順先生的幫忙，在南投杉林溪採集得到新鮮白花石斛 2 公斤，經由本所陳所長忠川教授，以植物形態與顯微切片鑑定確認為此植物。學名：*Dendrobium moniliforme* Swartz。

2、連珠石斛 (Figure 2)

民國 87 年 3 月由台中何富順先生的幫忙，在南投杉林溪採集得到新鮮連珠石斛 1.2 公斤，經由本所陳所長忠川教授，以植物形態與顯微切片鑑定確認為此植物。學名：*Dendrobium nakaharai* SCHLECHTER。

3、臺灣金線連 (Figure 3)

民國 87 年 12 月由台中何富順先生的幫忙下，在南投購得新鮮臺灣金線連 1.2 公斤，經由本所陳所長忠川教授，以植物形態與顯微切片鑑定確認為此植物。學名：*Anoectochilus formosanus* HAYATA。

第二節 試藥與材料

1、試藥

(1) 溶媒

正己烷、苯、二氯甲烷、氯仿、乙酸乙酯、丙酮、甲醇等工業級溶媒，經重蒸餾後，用於浸泡中藥材及矽膠管柱層析之沖提溶媒。再結晶等純化過程則使用試藥級，正己烷、氯仿、丙酮、甲醇等購自皓峰和默克公司，測紫外光譜時則使用光譜級溶媒，氯仿，NMR 光譜使用的溶媒，如 CDCl_3 、 $\text{acetone-}d_6$ 、 $\text{methanol-}d_4$ 、 $\text{DMSO-}d_6$ 等，均購自默克公司。

(2) 試劑

測紅外光譜的溴化鉀購自默克公司。試藥級的碳酸鈉、硫酸、鹽酸、醋酸酐、硝酸等，購自島久藥品株式會社。測紫外光譜的金屬鈉、三氯化鋁、醋酸鈉、硼酸等試藥，亦購自島久藥品株式會社。硫酸配成 10% 溶液及氯化鐵等作為 TLC 呈色劑。

2、材料

(1) 薄層層析(Thin Layer Chromatography, TLC)

TLC---Kieselgel 60 F₂₅₄, Art. No. 5554 (E. Merck)。

PLC--Kieselgel 60 F₂₅₄ , Art. No. 13793 (E. Merck)。

(2) 管柱層析 (Column Chromatography, CC)

Kieselgel 60 70-300 mesh 及 230-400 mesh (E. Merck)。

Sephadex LH-20 (Pharmacia)。

(3) 活性試驗之材料

1. Dextran T-500 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)。
2. Hank's balanced salt solution (Life Technologies Gibco BRL, Gaithersburg)。
3. Iscove's Modified Dulbecco's Medium and fetal bovine serum (Gibco BRL, Gaithersburg)
4. TNF- α enzyme immunoassay (EIA) kit (Genzyme Co., MA)。
5. Mouse interferon- α (IFN- α) (R&D Systems, MN)。
6. RAW 264.7 mouse macrophage-like cell line (American Type Culture Collection, MD.)。
7. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) and fetal calf serum (Gibco BRL, Gaithersburg)。
8. PGE₂ enzyme immunoassay (EIA) kit (American International, Buckinghamshire)。
9. Other chemicals were obtained from Sigma (St. Louis, MO.)。
10. 實驗動物，Sprague Dawley 雄性大鼠，體重 250 至 300 公克，飼養於台中榮總醫研大樓動物中心。

第三節 實驗儀器

1、質譜儀(Mass spectrometer, MS)

(1)氣相層析儀(GC)

Hitachi GC 3000 , FID , 毛細管柱 DBwax 30 m × 0.53 mm , 管柱溫度 50 -220 , 每分鐘升溫 5 , 載氣為氮氣 , 流速 4 kgf/cm² , 並用 Hitachi D-2100 積分儀記錄 GC 圖及積分各峰面積。

(2)氣相層析/質譜儀(GC/MS)

JEOL JMS-SX/SX 102A tandem mass spectrometer。 (中興大學)

Hewlett Packard 5995 GC-MS spectrometer , 毛細管柱 ultra 2 , 25 m × 0.32 mm I.D. , 載氣為氦氣 , 離子化電壓為 75 eV。 (中國醫藥學院)

2、核磁共振儀 (Nuclear magnetic resonance spectrometer, NMR)

Bruker DPX-200 FT-NMR (中國醫藥學院)

Bruker DMX-500 FT-NMR (台灣大學)

Varian VXR-300 FT-NMR (中興大學)

Varian VXR-600 FT-NMR (中興大學)

所使用之溶媒：chloroform-*d*, acetone-*d*₆, methanol-*d*₄, dimethyl sulfoxide-*d*₆ (DMSO)等，皆購自 E. Merck。表示化學位移(chemical shift), 單位為 ppm, *J* 表示耦合常數, 單位為 Hz, *s* 表示單峰(singlet), *d* 表示雙重峰(doublet), *t* 表示三重峰(triplet), *m* 表示多重峰(multiplet), *br* 表示寬峰(broad)。

3、紅外線光譜儀(Infrared spectrometer, IR)

Nicolet Impact 400 FT-IR spectrometer (中國醫藥學院)。

以溴化鉀粉末作為打片稀釋劑，利用聚苯乙烯(polystyrene)之 1600 cm⁻¹ 吸收峰當校正點。

4、紫外光譜儀(Ultraviolet spectrometer, UV)

Shimadzu UV-160A UV-visible recording spectrometer(中國醫藥學院)。

5、微量熔點測定計(Melting point apparatus)

Yanaco micro melting point apparatus MP-500D , 溫度未校正。

6、其它

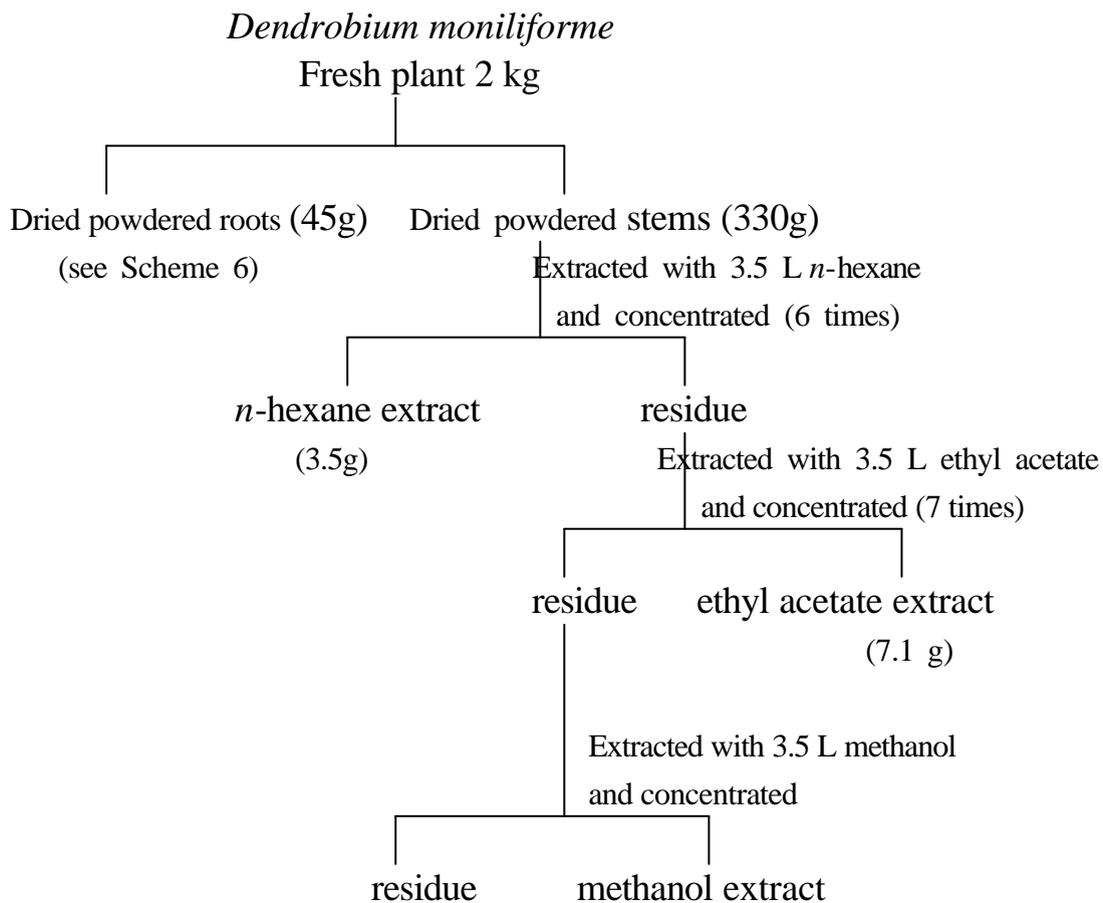
- (1)烘箱:Eyela WFO-450ND。
- (2)玻璃乾燥器。
- (3)電子乾燥箱(保存 TLC 片)。
- (4)電子天平:Mettler AJ100 及 Mettler Toledo PB 602。
- (5)電熱板:Frano-Geratetechnik M 21/1。
- (6)超音波振盪器:Branson 5200。
- (7)蒸餾水製造器:為 Millipore 公司 , Milli-Q 製造之超純水 , 再經 millipore 0.45 μm 過濾膜過濾。
- (8)紫外燈:Raytech ultraviolet equipment LS-88, 254nm 及 366nm 兩種波長。
- (9)玻璃展開槽:120mm x 150mm 及 220mm \times 70mm x 220mm。
- (10)粉碎機:原泰奇傾倒式粉碎機(D3V-B)。
- (11)均質機:不銹鋼果汁機(Waring blender)。
- (12)低溫冷凍庫:溫度可設定至零下 25 。
- (13)電腦: Pentium II、 Pentium III , 雷射印表機(HP, Laser Jet 1110)。

第四節 植物成分之抽取與分離

一、石斛之抽取與分離

(1) 石斛之抽取

將石斛植物鮮品 2 公斤，先將莖與根分開，去除雜質，然後陰乾粉碎，分別得到 330 公克的莖和 45 公克的根，再分別以 3.5 和 2 公升的正己烷溶媒冷浸萃取 6 和 7 次（每次約 5 天），萃取液合併減壓濃縮至乾，得正己烷粗抽物莖為 3.5 公克和根為 0.5 公克，其殘渣分別以 3.5 和 1 公升的乙酸乙酯溶媒冷浸萃取 7 和 8 次，萃取液合併減壓濃縮至乾，得乙酸乙酯粗抽物莖 7.1 公克和根 0.3 公克，其殘渣再分別以 3.5 和 1 公升的甲醇溶媒冷浸萃取，萃取液合併減壓濃縮至乾，得甲醇粗抽物。(Scheme 1&6)



Scheme 1. Extraction of the stems of *D. moniliforme*

(2) 石斛莖的正己烷粗抽物的分離

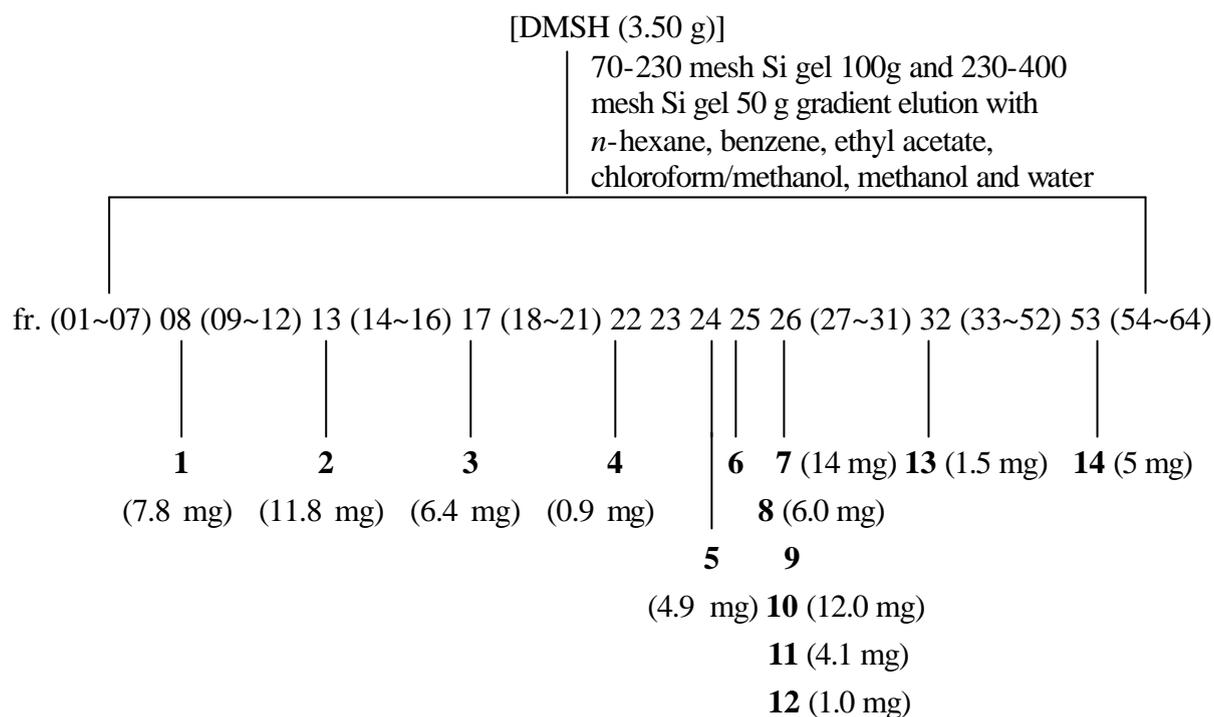
石斛莖正己烷粗抽物 3.5 公克，以矽膠管柱層析法分離；70-230 mesh 矽膠 100 公克加 230-400 mesh 矽膠 50 公克，依次用正己烷、苯、乙酸乙酯、氯仿/甲醇、甲醇、水等溶媒做梯度沖提，每 100 毫升收一瓶，共收 64 瓶(Table 3)。

Table 3. Isolation of the *n*-hexane extract of *D. moniliforme*

瓶	沖提溶媒	重量(mg)	瓶	沖提溶媒	重量 (mg)
1	H	321.6	33	4/1 B/E	
2	H	139.5	34	4/1 B/E	
3	H	6.0	35	4/1 B/E	
4	H	5.8	36	3/1 B/E	
5	H	0.6	37	3/1 B/E	
6	H	2.9	38	3/1 B/E	
7	H		39	3/1 B/E	
8	H	7.8	40	2/1 B/E	
9	H		41	2/1 B/E	
10	H		42	2/1 B/E	
11	H		43	2/1 B/E	
12	H	1.2	44	1/1 B/E	
13	4/1 H/B	17.0	45	1/1 B/E	
14	4/1 H/B	59.9	46	1/1 B/E	
15	4/1 H/B		47	1/2 B/E	
16	4/1 H/B	193.2	48	1/2 B/E	
17	1/1 H/B	51.9	49	E	27.4
18	1/1 H/B		50	E	
19	1/1 H/B	35.2	51	E	
20	1/1 H/B	48.2	52	E	
21	B	113.7	53	4/1 C/M	225.2
22	B		54	4/1 C/M	11.8
23	B		55	1/1 C/M	
24	B		56	1/1 C/M	61.6
25	B		57	M	30.9
26	9/1 B/E	520.0	58	M	
27	9/1 B/E	260.0	59	M	
28	9/1 B/E	237.7	60	M	
29	9/1 B/E	192.4	61	M	
30	9/1 B/E	151.8	62	1/2 C/M	
31	9/1 B/E	180.8	63	W	
32	4/1 B/E		64	W	

每瓶收 100 ml ; H: *n*-hexane ; B: benzene ; E: ethyl acetate ; C: chloroform ; M: methanol ; W: water.

n-hexane extract of the stems of *D. moniliforme*



Scheme 2. Isolation of the *n*-hexane extract of the stems of *D. moniliforme*

1. 在第 8 瓶得到一化合物 **1** (7.8 毫克), 經光譜確認為 heptacosane。
2. 在第 13 瓶 (17.0 毫克), 再純化得到化合物 **2** (11.8 毫克), 經光譜確認為 octacosanyl hexadecanoate。
3. 在第 17 瓶 (51.9 毫克), 再純化得到化合物 **3** (6.4 毫克), 經光譜確認為 methyl and ethyl linolenates 的混合。
4. 在第 22 瓶, 再以製備型薄層層析(PTLC)分離, 得到化合物 **4** (0.9 毫克), 經光譜和標準品比對, 確認為 4-methoxybenzaldehyde。
5. 在第 24 瓶, 再以矽膠管柱層析分離, 用正己烷-乙酸乙酯 (4:1)沖提, 在第 5-6 部分, 得到化合物 **5** (4.9 毫克), 經光譜確認為 alkyl *trans*-ferulates 類化合物 (alkyl : C₂₀₋₂₉)。
6. 在第 25 瓶, 再以矽膠管柱層析分離, 用正己烷-乙酸乙酯 (4:1)沖提, 在第 11 部分, 得到化合物 **6**, 經光譜確認為 pheophytin a。
7. 第 26 瓶之分離

在第 26 瓶 (0.52 公克), 再以矽膠管柱層析分離與純化 (Scheme 3)。以 230-400 mesh 矽膠 52 公克充填管柱, 正己烷-乙酸乙酯(4:1)溶

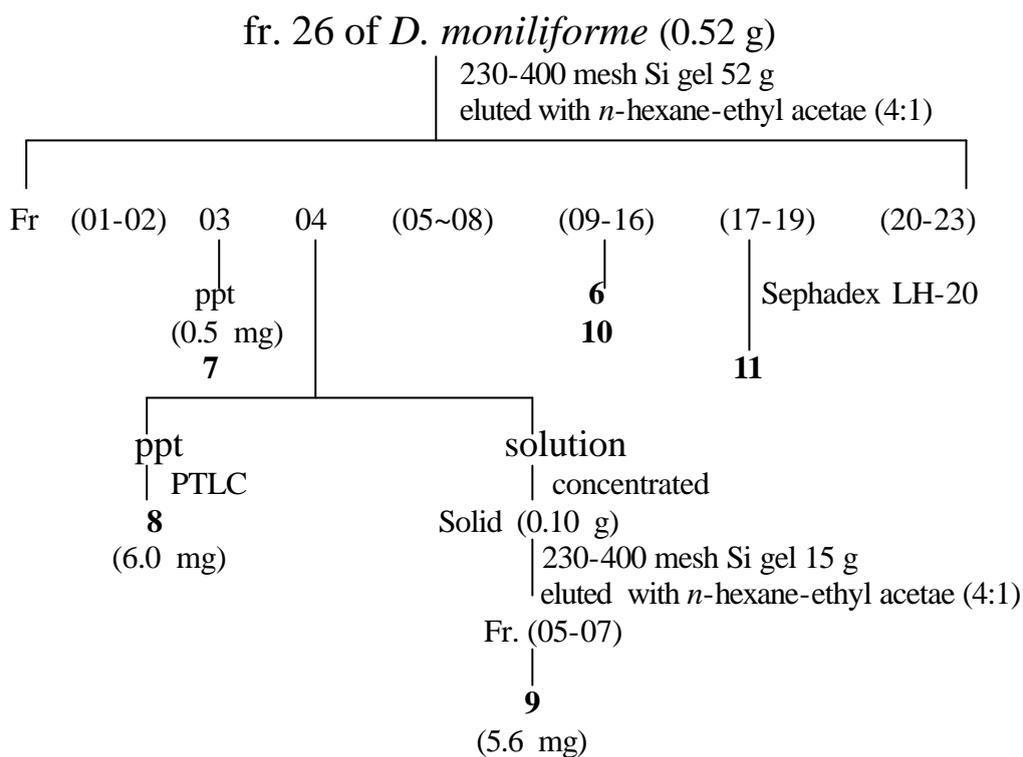
媒沖提，每部分收 30 毫升，共收 23 個部分。

- a. 第 3 部分，得沉澱物質 **7** (14.0 毫克)，經光譜確認為 alkyl 4'-hydroxy-cis-cinnamates 類化合物 (alkyl: C₂₂₋₃₀)。
- b. 第 4 部分，分為兩部分，一為沉澱部分，另一為溶液部分；在沉澱部分經製備型薄層層析(PTLC)分離，得到化合物 **8** (6.0 毫克)，經光譜確認為 alkyl 4'-hydroxy-trans-cinnamates 類化合物 (alkyl: C₂₀₋₂₈)；在溶液部分經 230-400 mesh 矽膠管柱層析，以正己烷-乙酸乙酯(4:1)溶媒沖提分離，得到化合物 **9**，經光譜確認為 stigmast-4-en-3-one。
- c. 第 9 至 16 部分，主要為化合物 **6** 和 **10**，經光譜確認或與標準品比對 **6** 為 pheophytin a, 而 **10** 為 campesterol, stigmasterol 和 β -sitosterol 之混合物。
- d. 第 17 至 19 部分，再經 sephadex LH-20 管柱，純化得到化合物 **11** (4.1 毫克)，經光譜確認為 denbinobin。

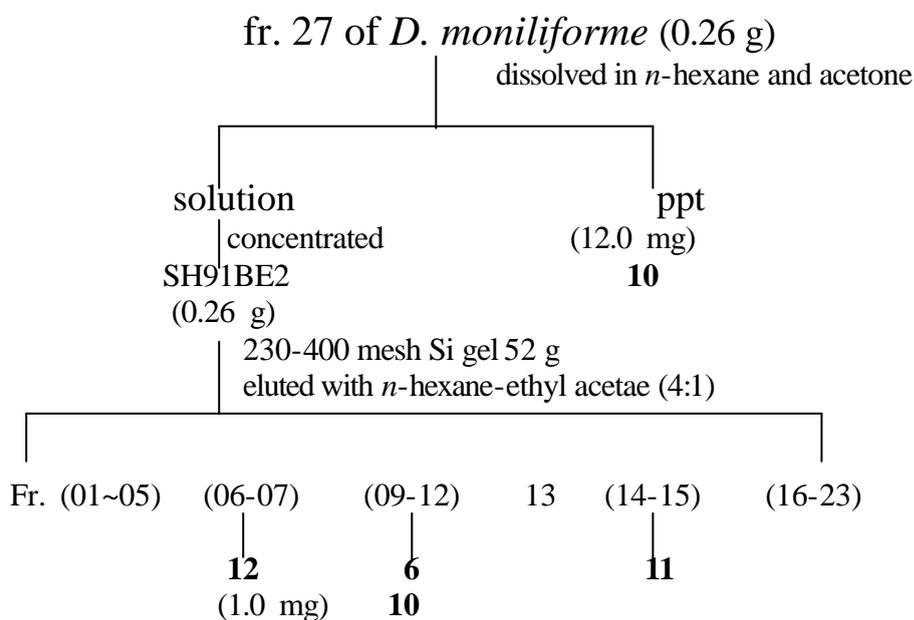
8. 第 27 瓶之分離與純化

在第 27 瓶 (0.26 公克)，先以正己烷溶媒洗，再以丙酮溶媒洗脫，得沉澱部分和溶液部分；在沉澱部分為化合物 **10** (12.0 毫克)，經光譜確認為 phytosterol；在溶液部分經 230-400 mesh (52 公克)矽膠管柱層析，以正己烷-乙酸乙酯(4:1)溶媒沖提分離，每部分收 30 毫升，共收 23 個部分。(Scheme 4)

- a. 第 6 和 7 部分，得化合物 **12** (1.0 毫克)，經光譜與標準品比對確認為 vanillin。
 - b. 第 9 至 12 部分，主要為化合物 **6** 和 **10**，經光譜確認或與標準品比對分別為 pheophytin a 和 phytosterol。
 - c. 第 14 和 15 部分，得到化合物 **11** (4.1 毫克)，經光譜確認為 denbinobin。
9. 在第 32 瓶，再經矽膠管柱層析法分離得到化合物 **13** (1.5 毫克)，經光譜確認為 linoleic acid。
10. 在第 53 瓶，以氯仿溶解，得不溶物 **14** (5 毫克)，經光譜確認為 heptatriaconsanoic acid。



Scheme 3. Isolation and purification of the fr. 26 of *D. moniliforme*



Scheme 4. Isolation and purification of the fr. 27 of *D. moniliforme*

(3) 石斛莖的乙酸乙酯粗抽物的分離

石斛莖乙酸乙酯粗抽物 7.05 公克，以矽膠管柱層析法分離；用 70-230 mesh 矽膠 150 公克充填管柱，管柱長與內徑為 4 公分× 28 公分，以正己烷、乙酸乙酯、氯仿/甲醇、甲醇、水等溶媒做梯度沖提，每 250 毫升收一瓶，共收 24 瓶 (Table 4)。

Table 4. Isolation of the ethyl acetate extract of *D. moniliforme*

瓶	沖提溶媒	重量(mg)	瓶	沖提溶媒	重量(mg)
1	20%E/H	112.1	13	90%E/H	194.4
2	20%E/H	205.7	14	E	153.6
3	20%E/H	20.6	15	E	168.3
4	30%E/H		16	20% M/C	2000.0
5	30%E/H		17	20% M/C	319.0
6	40%E/H	59.8	18	50% M/C	200.0
7	40%E/H		19	50% M/C	49.5
8	50%E/H	211.4	20	70% M/C	
9	50%E/H		21	70% M/C	
10	70%E/H	33.0	22	M	
11	70%E/H	267.7	23	M	
12	90%E/H	205.4	24	W	

每瓶收 100 ml ; H: *n*-hexane ; E:ethyl acetate ; C:chloroform ; M: methanol ; W: water.

將石斛莖的乙酸乙酯粗抽物經過幾次的層析分離和純化，得到 10 個化合物(scheme 4)，分別敘述如下：

1. 第 1 部分 (20%E/H-1)，再經 230-400 mesh 矽膠 20 公克充填管柱，管柱長與內徑為 10 公分× 2.5 公分，正己烷-苯 (6:1)沖提，以 20 毫升收 1 部分，共收 19 部分；其中 2 和 3 部分得到化合物 **15** (2.5 毫克)，後經光譜確認為 alkyl hexadecanoates (alkyl: C₂₂₋₂₈)；9 至 12 部分得到化合物 **16** (4 毫克)，經光譜確認為 alkyl acetates (alkyl: C₂₄₋₃₁)。
2. 第 2 和 3 部分合併 (20%E/H-2,3)，再經矽膠管柱層析分離，得到 3 個化合物，**7**、**8** 和 **14**，經光譜確認為 alkyl 4'-hydroxy-*cis*-cinnamates (alkyl: C₂₂₋₂₈)、alkyl 4'-hydroxy-*trans*-cinnamates (alkyl: C₂₂₋₂₈)和 aliphatic acids。
3. 第 4 和 5 部分合併 (30%E/H)，再經矽膠管柱層析分離，得到 3 個化合物，**5**、**11** 和 **17**，經光譜分別鑑定為 alkyl *trans*-ferulates (alkyl:

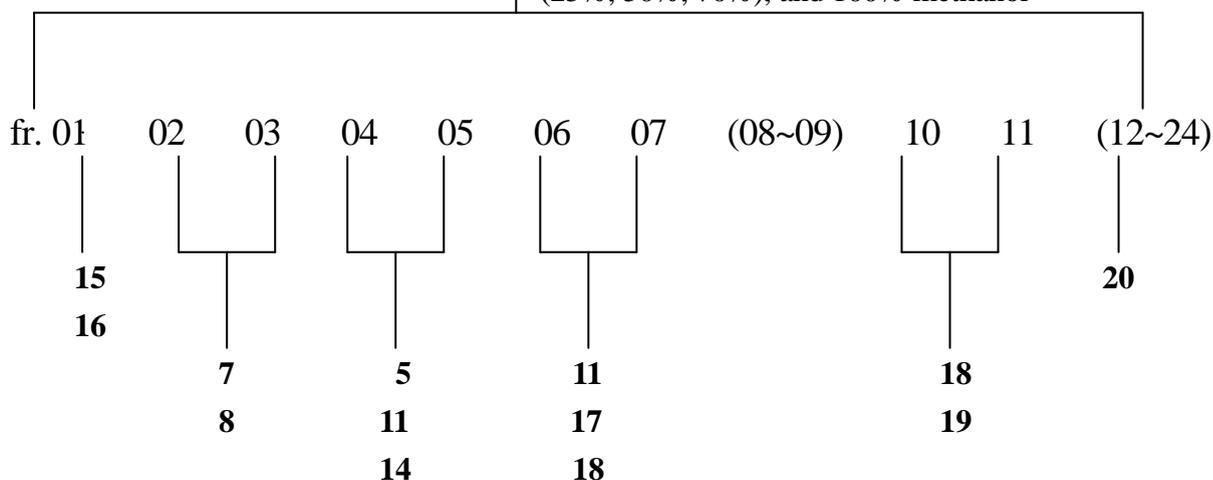
C₂₀₋₂₈)、denbinobin 和 dengibsin。

- 第 6 和 7 部分合併 (40%E/H), 再經 Sephadex LH-20 管柱層析以氯仿-甲醇 (1:1) 沖提, 和製備型薄層層析(PTLC)分離, 得到 2 個化合物, **11** 和 **18**, 經光譜確認為 denbinobin 和新化合物 moniliquinone。
- 第 10 和 11 部分合併 (70%E/H), 再經 Sephadex LH-20 管柱層析和製備型薄層層析(PTLC)分離, 得到 2 個化合物, **18** 和 **19**, 經光譜確認為 moniliquinone 和 moniliformol。
- 第 12 部分 (90%E/H-1), 再經矽膠管柱層析分離, 得到化合物 **20**, 經光譜確認為 diethylene glycol。

ethyl acetate extract of the stems of *D. moniliforme*

[DMSE (7.05 g)]

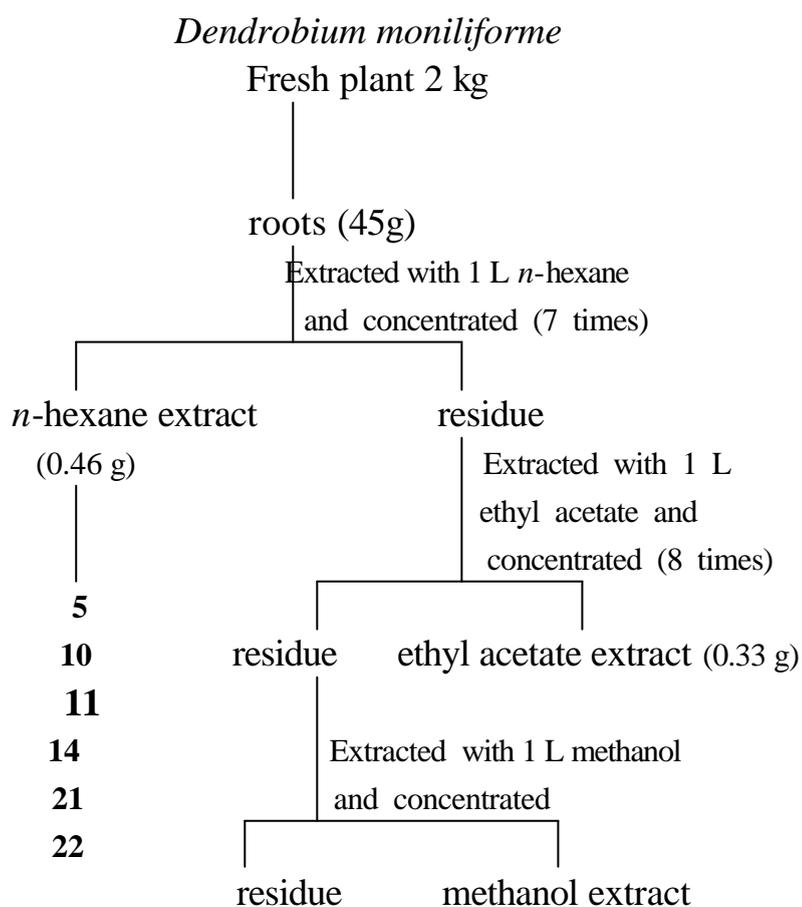
70-230 mesh Si gel 150g column (4 cm × 28 cm), gradiented elution with ethyl acetate-*n*-hexane (20%, 30%, 40%, 50%, 70%, 90%), 100% ethyl acetate, chloroform-methanol (25%, 50%, 70%), and 100% methanol



Scheme 5. Isolation of the ethyl acetate extract of the stems of *D. moniliforme*

(4) 石斛根的正己烷粗抽物的分離

石斛根的正己烷粗抽物經由管柱層析法分離，得到 6 個化合物 **5**、**10**、**11**、**14**、**21** 和 **22**，經光譜確認分別為 alkyl *trans*-ferulates、phytosterols、denbinobin、aliphatic acids、ergosterol 和 ergosterol peroxide。 (scheme 6)



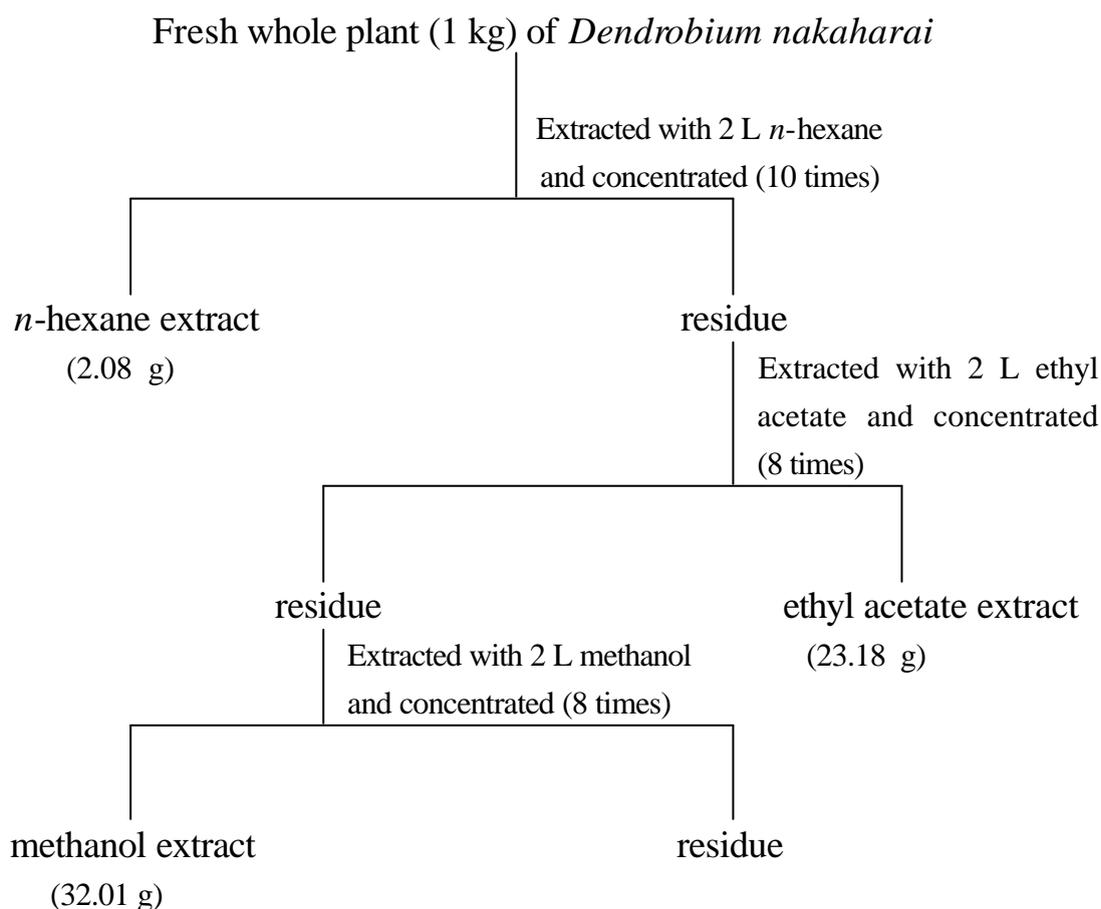
Scheme 6. Extraction of the roots of *D. moniliforme*

二、連珠石斛之抽取與分離

(1) 連珠石斛之抽取

將連珠石斛植物鮮品 1.2 公斤，先去除雜質，再讓風晾乾植物表面的水分，稱重得到 1 公斤，全株以攪拌機加正己烷溶媒攪拌粉碎，再以 2 公升的正己烷冷浸萃取 10 次（每次 2 至 3 天），萃取液合併減壓濃縮至乾，得正己烷粗抽物 2.08 公克，其殘渣以 2 公升的乙酸乙酯溶媒冷浸萃取 8 次，萃取液合併減壓濃縮至乾，得乙酸乙酯粗抽物 23.18 公克，其殘渣再以 2 公升的甲醇溶媒冷浸萃取 8 次，萃取液合併減壓濃縮至乾，得甲醇粗抽物 32.01 公克。(Scheme 7)

將正己烷粗抽物 33.8 毫克，乙酸乙酯粗抽物 23.18 毫克和甲醇粗抽物 8.1 毫克，做抗發炎及抗過敏活性試驗。



Scheme 7. Extraction of *D. nakaharai*

(2) 連珠石斛正己烷粗抽物的之分離與純化

連珠石斛正己烷粗抽物 2.05 公克，以矽膠管柱層析法分離；70-230 mesh 矽膠 50 公克，用正己烷、乙酸乙酯、二氯甲烷/ 甲醇、甲醇溶媒系統依次做梯度沖提，每 100 毫升收一瓶，共收 37 瓶 (Table 5)，再依 TLC 合併為 11 部分。(Scheme 8)

Table 5. Isolation of the *n*-hexane extract of *D. nakaharai*

瓶	沖提溶媒	依 TLC 合併	瓶	沖提溶媒	依 TLC 合併
1	H		20	20% E/H	DNH-VI (0.1598g)
2	H		21	30% E/H	
3	H		22	30% E/H	
4	H		23	30% E/H	DNH-VII (0.0598g)
5	2% E/H		24	30% E/H	
6	2% E/H	DNH-I (0.4796g)	25	40% E/H	DNH-VIII (0.0069g)
7	2% E/H		26	40% E/H	
8	2% E/H	DNH-II (0.7785g)	27	40% E/H	DNH-IX (0.0108g)
9	5% E/H		28	40% E/H	
10	5% E/H		29	50% E/H	DNH-X (0.0153g)
11	5% E/H	30	50% E/H		
12	5% E/H	DNH-III (0.4683g)	31	75% E/H	DNH-XI (0.0100g)
13	10% E/H		32	75% E/H	
14	10% E/H	DNH-IV (0.2205g)	33	E	
15	10% E/H		34	E	
16	10% E/H	DNH-V (0.1340g)	35	C ₂ /M	
17	20% E/H		36	C ₂ /M	
18	20% E/H		37	M	
19	20% E/H				

每瓶收 100 ml；H: *n*-hexane；E: ethyl acetate；C₂: dichloromethane；M: methanol。

Dendrobium nakaharai
n-hexane extract 2.05 g

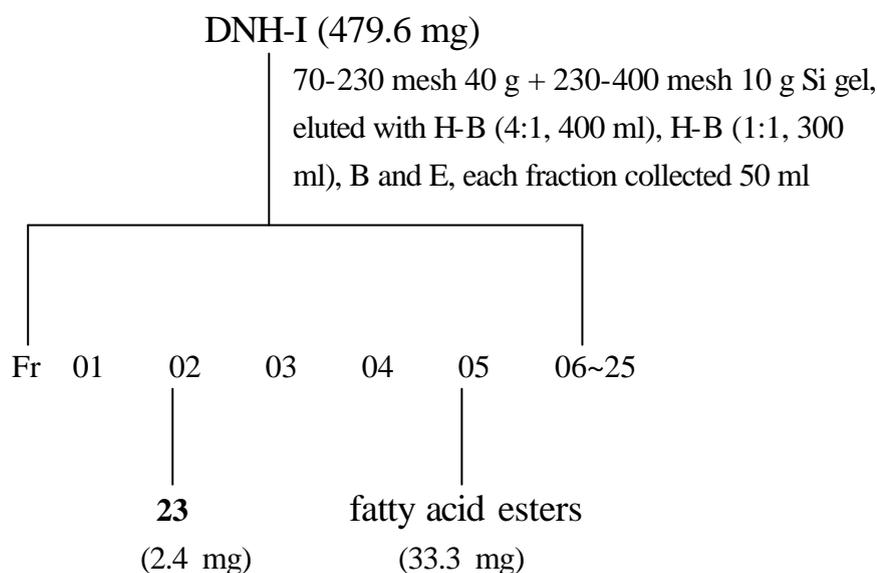
70-230 mesh Si gel 50g eluted with gradient solvent:
n-hexane-methanol, combined and concentrated by
 comparison of TLC

DNH-I	DNH-II	DNH-III	DNH-IV	DNH-V	DNH-VI	DNH-VII	DNH-VIII	DNH-IX	DNH-X	DNH-XI
(0.4796g)	(0.7785g)	(0.4683g)	(0.2205g)	(0.1340g)	(0.1598g)	(0.0598g)	(0.0598g)	(0.0069g)	(0.0108g)	(0.0100g)
23	5	5	6		13	32				
	9	10	10		14					
	24	21	27		29					
	25	25	28		30					
	26	27			31					

Scheme 8. Isolation of the *n*-hexane extract of *D. nakaharai*

1.DNH-I 之分離與純化

DNH-I (479.6 毫克)用矽膠管柱層析法分離與純化 (Scheme 9)。以 70-230 mesh 矽膠 40 公克和 230-400 mesh 矽膠 10 公克充填管柱，管柱長與內徑為 10 公分× 4 公分，以正己烷-苯 (4:1, 400 毫升)、正己烷-苯 (1:1, 300 毫升)、苯和乙酸乙酯等溶媒沖提，每 50 毫升收 1 瓶，共收 25 個部分。在第 2 部分得到化合物 **23** (2.4 毫克)，第 5 部分得到油脂類化合物 fatty acid esters (33.3 毫克)，經由光譜確認 **23** 為 *trans*- β -carotene。



Scheme 9. Isolation and purification of the DNH-I of *D. nakaharai*

2.DNH-II 之分離與純化

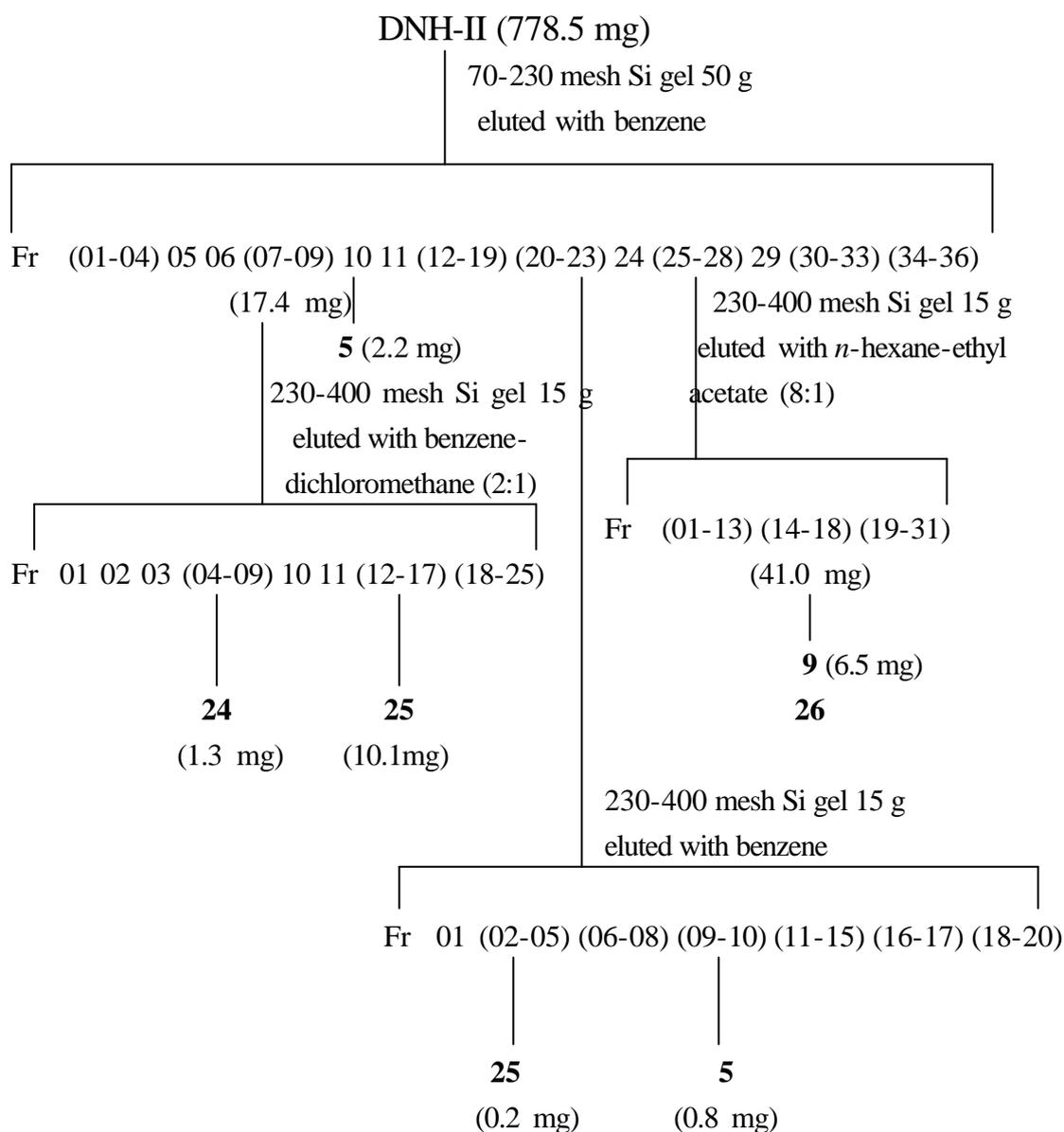
DNH-II (778.5 毫克)用矽膠管柱層析法分離與純化(Scheme 10)。以 70-230 mesh 矽膠 50 公克充填管柱，苯溶媒沖提，共收 36 個部分。經 TLC 檢查合併如下：

- a. 第 7 至 9 部分合併 (17.4 毫克)，再以 230-400 mesh 矽膠 15 公克充填管柱，苯-二氯甲烷 (2:1)溶媒沖提，共收 25 個分管。其中得 4 至 9 分管得到化合物 **24** (1.3 毫克)，12 至 17 分管合併為 **25** (10.1 毫克)。
- b. 第 10 部分得化合物 **25** (2.2 毫克)。
- c. 第 20 至 23 部分合併，再以 230-400 mesh 矽膠 15 公克充填管柱，苯溶媒沖提，共收 20 個分管。其中得 2 至 5 分管合併為化合物 **25** (0.2

毫克), 9 和 10 分管合併得到化合物 5 (0.8 毫克)。

d. 第 25 至 28 部分合併, 再經矽膠管柱層析純化, 得到化合物 9 (6.5 毫克)和 26。

化合物 5、9、24、25 和 26 經由光譜確認為 alkyl *trans*-ferulates (*n*-docosyl *trans*-ferulate 為主要組成)、stigmast-4-en-3-one、2,3,4,7-tetramethoxyphenanthrene、nakaharain 和 aliphatic alcohol。



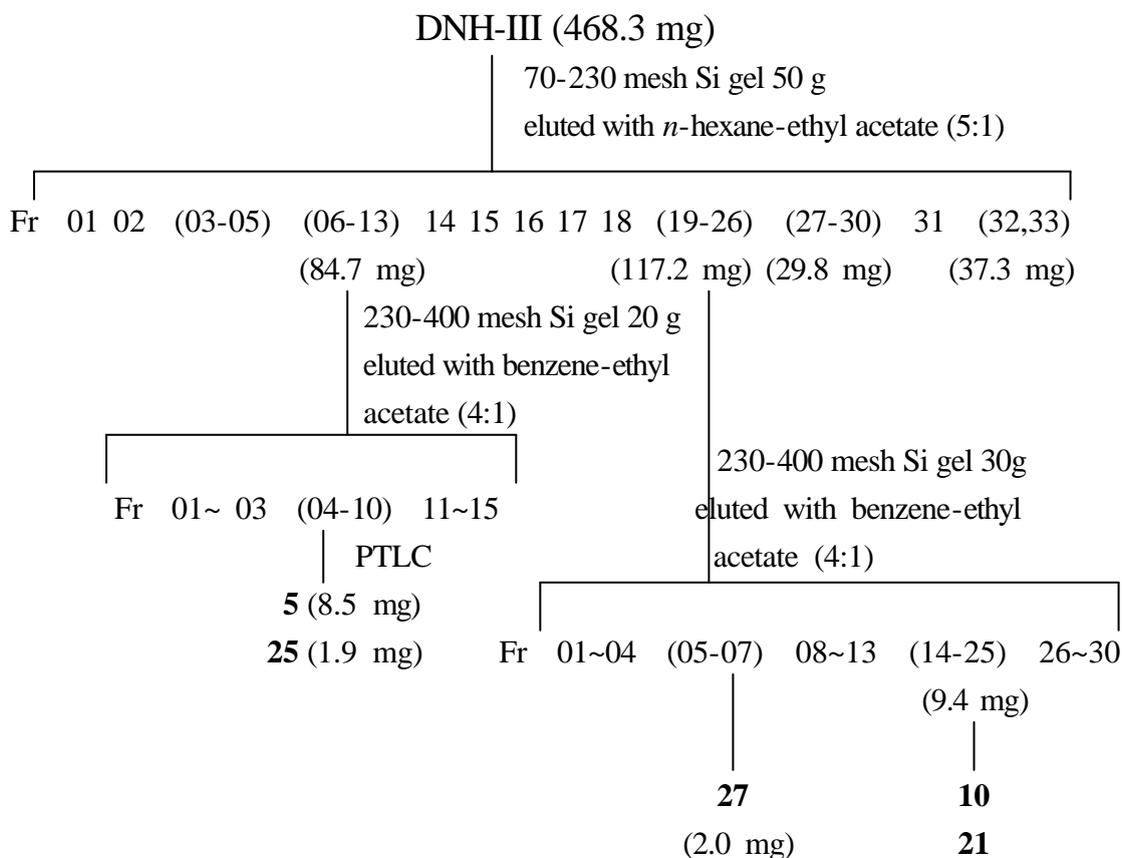
Scheme 10. Isolation and purification of the DNH-II of *D. nakaharai*

3.DNH-III 之分離與純化

DNH-III (468.3 毫克)用矽膠管柱層析法分離與純化 (Scheme 11)。以矽膠 70-230 mesh 50 公克充填管柱，用正己烷-乙酸乙酯(5:1) 溶媒沖提，共收 33 個部分。

- a. 第 6 至 13 部分合併 (84.7 毫克)，再以 230-400 mesh 矽膠 20 公克充填管柱，苯-乙酸乙酯(14:1)溶媒沖提，共收 15 個分管。其中 4 至 10 分管合併，再以製備型薄層層析(PTLC)分離，得到化合物 **25** (1.9 毫克)和 **5** (8.5 毫克)。
- b. 第 19 至 26 部分合併 (117.2 毫克)，再以 230-400 mesh 矽膠 30 公克充填管柱，苯-乙酸乙酯(10:1)溶媒沖提，共收 30 個部分。其中 5 至 10 分管合併，再以製備型薄層層析(PTLC)分離，得到化合物 **27** (2.0 毫克)，14 至 25 分管合併 (9.4 毫克)，得化合物 **10** 和 **21**。

化合物 **5**、**10**、**21**、**25** 和 **27** 經由光譜確認為 *n*-docosyl and *n*-tetracosyl *trans*-ferulates、phytosterol、ergosterol、nakaharain 和 nakaquinone。



Scheme 11. Isolation and purification of the DNH-III of *D. nakaharai*

4.DNH-IV 之分離與純化

DNH-IV (220.5 毫克)用矽膠管柱層析法分離與純化 (Scheme 12)。以矽膠 230-400 mesh 25 公克充填管柱，用正己烷-丙酮 (4:1)溶媒沖提，共收 35 個部分。

- a.第 2 和 3 部分合併 (12.6 毫克)，再以 230-400 mesh 矽膠 25 公克充填管柱，苯-乙酸乙酯(5:1)溶媒沖提，共收 10 個分管。其中 2 部分為化合物 **6** (2.7 毫克)，5 至 10 分管合併，得到化合物 **10** (8.1 毫克)。
- b.第 4 至 5 部分合併(9.7 毫克)，再以 230-400 mesh 矽膠 25 公克充填管柱，苯-乙酸乙酯(5:1)溶媒沖提，共收 12 個分管。其中 2 和 3 分管合併，得到化合物 **6** (2.0 毫克)。
- c.第 6 和 14 部分合併(54.6 毫克)，再以 230-400 mesh 矽膠 15 公克充填管柱，氯仿溶媒沖提，共收 17 個分管。其中 2 分管為化合物 **27** (1.0 毫克)，3 至 8 部分合併(11.1 毫克)，再作分離，得到化合物 **27** (0.8 毫克)和 **28** (1.4 毫克)，而 9 至 11 分管得到 **28** (3.4 毫克)。
- d.第 15 至 22 部分合併(46.7 毫克)，再以 230-400 mesh 矽膠 25 公克充填管柱，氯仿溶媒沖提，共收 36 個分管。其中 13 和 16 分管合併(17.3 毫克)，為化合物 **28**，而 17 至 20 分管也是以 **28** 為主。
- e.第 26 至 34 部分合併(12.7 毫克)，再以 230-400 mesh 矽膠 25 克充填管柱，氯仿-甲醇(60:1)溶媒沖提，共收 20 個分管。其中 8 和 11 分管得到化合物 **28** (4.1 毫克)。

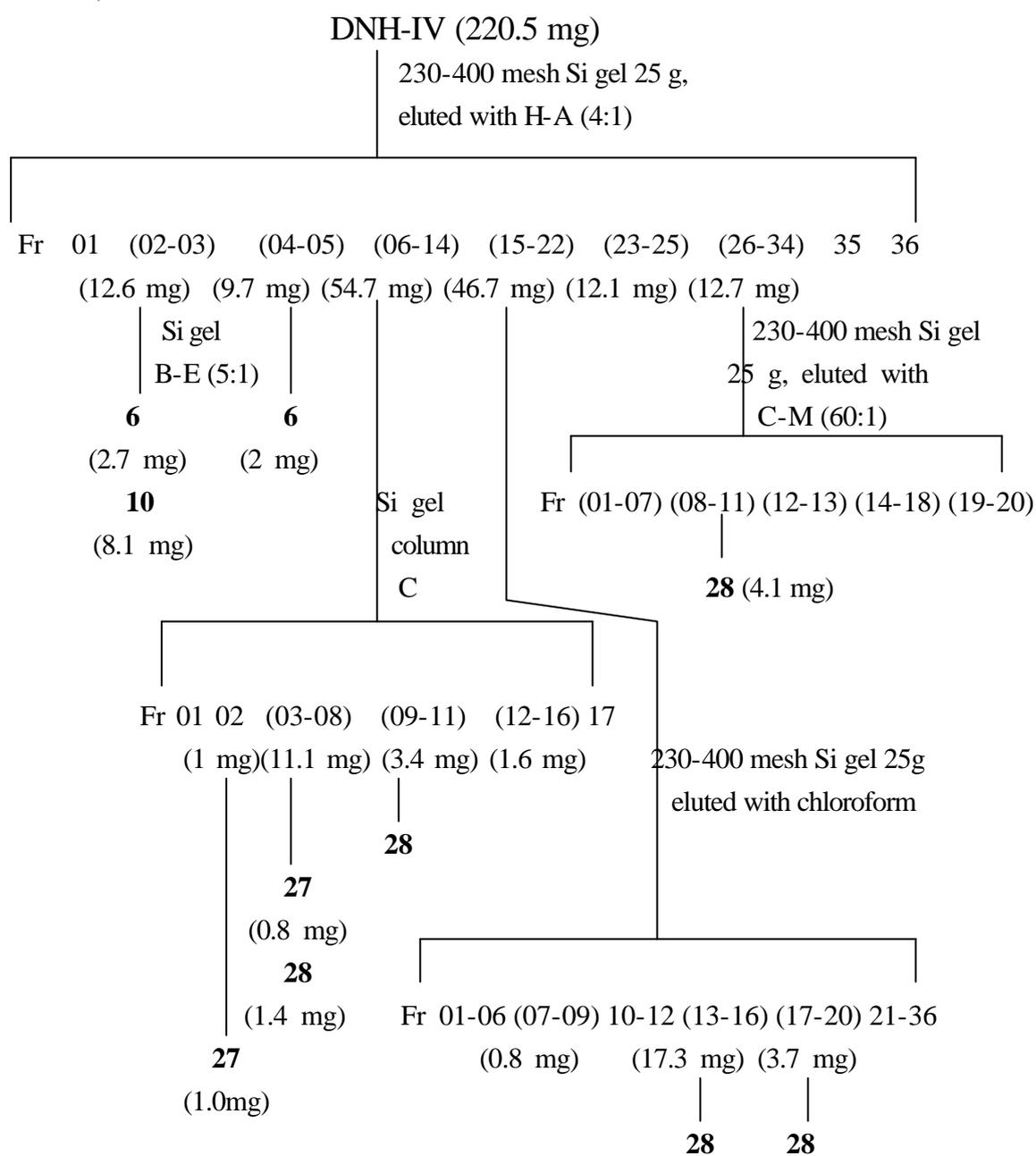
化合物 **6**、**10**、**27** 和 **28** 經由光譜確認為 pheophytin a、phytosterol、nakaquinone 和 2,5-dihydroxy-3,4-dimethoxyphenanthrene。

5.DNH-VI 之分離與純化

DNH-VI (159.8 毫克)用矽膠管柱層析法分離與純化 (Scheme 13)。以 230-400 mesh 矽膠 30 公克充填管柱，管柱長與內徑為 18.9 公分×3 公分，以苯-乙酸乙酯(4:1)，共收 33 個部分。

- a.第 11 和 12 部分合併(12.0 毫克)，再以矽膠管柱分離，正己烷-丙酮(2:1)溶媒沖提，共收 25 個分管。其中 15 至 22 分管合併，再經矽膠管柱和製備型薄層層析(PTLC)分離，得到化合物 **29** 和 **30**。
- b.第 13 至 18 部分合併(24.9 毫克)，再以矽膠管柱分離，正己烷-丙酮(2:1)溶媒沖提，共收 50 個分管。其中 21 至 47 分管合併，得到化合物 **31**

(1.0 毫克)。

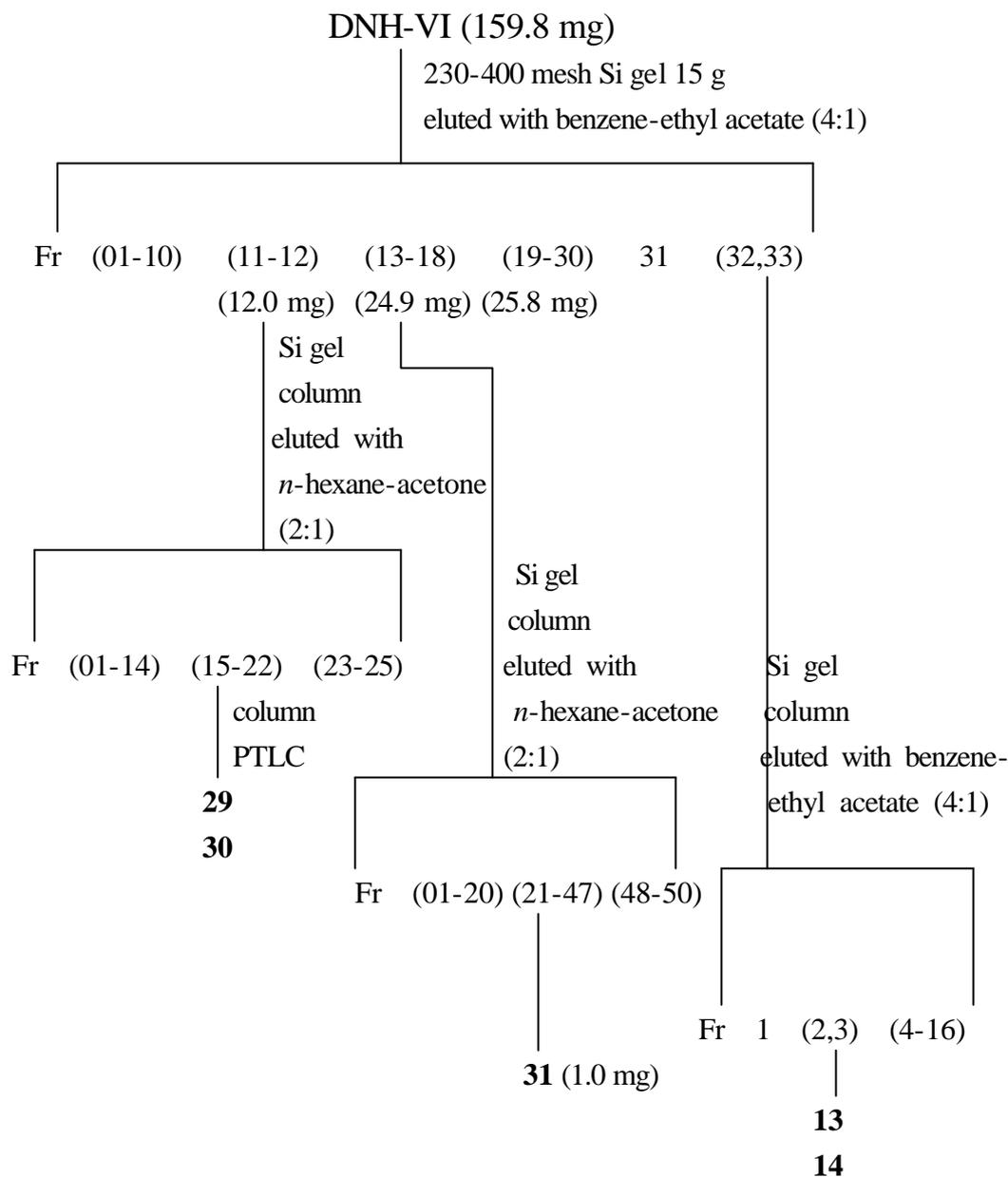


Scheme 12. Isolation and purification of the DNH-IV of *D. nakaharai*

c. 第 32 和 33 部分合併，再以矽膠管柱分離，苯-乙酸乙酯(4:1)溶媒沖提，共收 16 個分管。其中 2 和 3 分管以製備型薄層層析(PTLC)分離，得到化合物 13 和 14。

化合物 13、14、29、30 和 31 經由光譜確認分別為 linoleic acid、

aliphatic acid、2,7-dihydroxy-3,4,8-trimethoxyphenanthrene、3,7-dihydroxy-2,4-dimethoxyphenanthrene 和 bulbophyllanthrin。



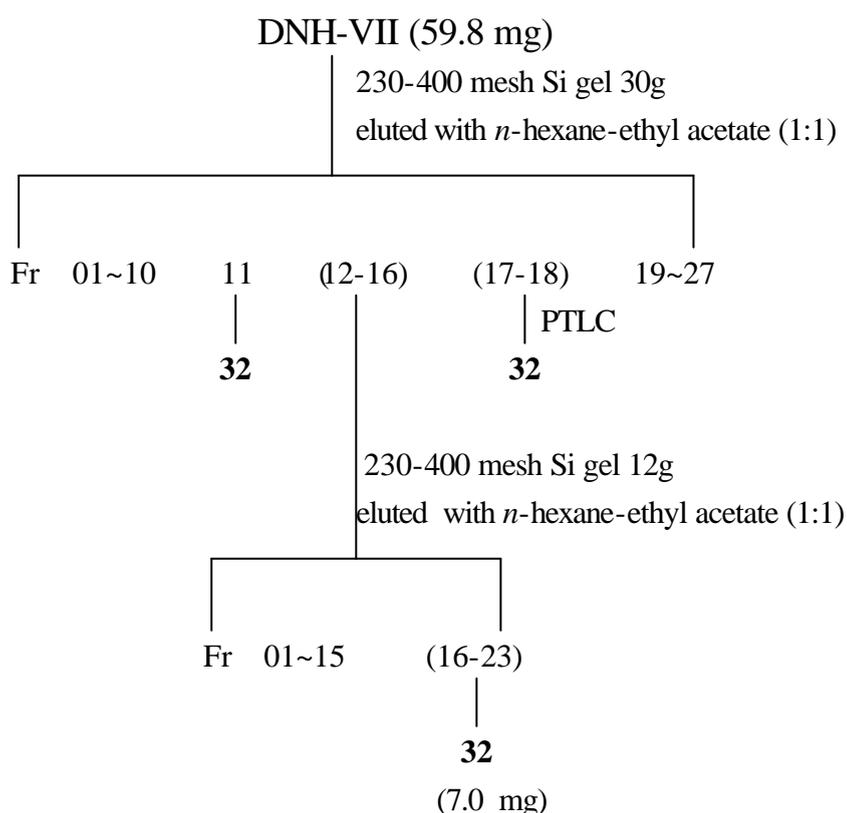
Scheme 13. Isolation and purification of the DNH-VI of *D. nakaharai*

6. DNH-VII 之分離與純化

DNH-VII (59.8 毫克)用矽膠管柱層析法分離與分離 (Scheme 14)。以 230-400 mesh 矽膠 30 公克充填管柱，管柱長與內徑為 18.5 公分× 3 公分，以正己烷-乙酸乙酯(1:1)溶媒沖提，共收 27 個部分，經 TLC 比較，發現在 11 至 18 部分有一主要成分。

- a. 第 11、17 和 18 部分，經製備型薄層層析(PTLC)分離，得到化合物 **32**。
- b. 第 12 至 16 部分合併，經矽膠管柱層析法分離一主要點，以 230-400 mesh 矽膠 12 公克充填管柱，管柱長與內徑為 18.5 公分× 3 公分，以正己烷-乙酸乙酯(1:1)溶媒沖提，共收 23 個分管，其中 16 至 23 分管合併，得到化合物 **32** (7.0 毫克)。

化合物 **32** 經由光譜確認為 nakaharaiquinone (7-hydroxy-2,5,6-trimethoxy-9,10-dihydrophenanthraquinone)。

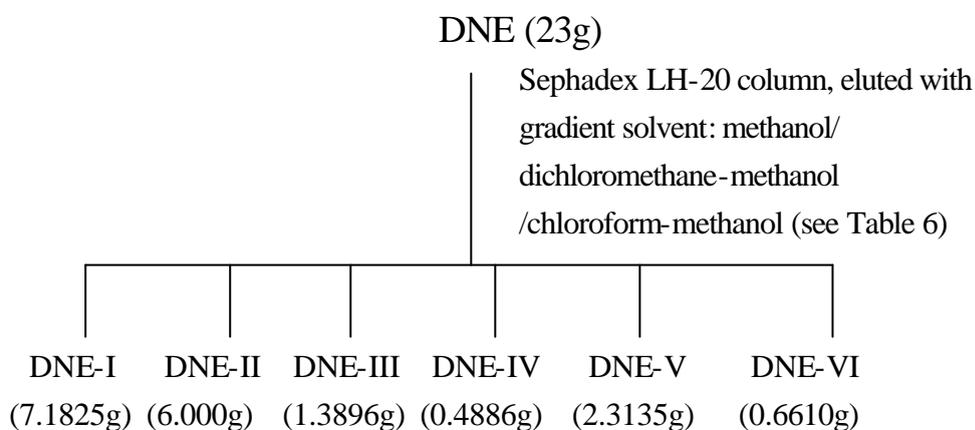


Scheme 14. Isolation and purification of the DNH-VII of *D. nakaharai*

(3) 連珠石斛的乙酸乙酯粗抽物的分離

連珠石斛乙酸乙酯粗抽物 23 公克，以 Sephadex LH-20 管柱層析法分離；用甲醇、二氯甲烷/甲醇、氯仿/甲醇，由高極性濃媒往低級性濃媒依次做梯度沖提，每 250 毫升收一瓶，共收 51 瓶 (Table 6)，再依 TLC 合併為 6 部分 (DNE-I~DNE-VI)。(Scheme 15)

取 DNE-I：37.1 毫克，DNE-II：24.7 毫克，DNE-III：21.2 毫克，DNE-IV：12.8 毫克，DNE-V：21.4 毫克和 DNE-VI：14.2 毫克，作抗發炎及抗過敏活性試驗。



Scheme 15. Isolation of the ethyl acetate extract of *D. nakaharai*

Table 6. Isolation of the ethyl acetate extract of *D. nakaharai*

瓶	沖提溶媒	依 TLC 合併	瓶	沖提溶媒	依 TLC 合併
1	M	DNE-I (7.1825g)	27	20% C ₂ /M	DNE-VI (0.6610g)
2	M		28	20% C ₂ /M	
3	M		29	20% C ₂ /M	
4	M		30	30% C ₂ /M	
5	M		31	30% C ₂ /M	
6	M	DNE-II (6.000g)	32	30% C ₂ /M	
7	M		33	30% C ₂ /M	
8	M		34	30% C ₂ /M	
9	M	DNE-III (1.3896g)	35	30% C ₂ /M	
10	M		36	30% C ₂ /M	
11	M		37	30% C ₂ /M	
12	M	DNE-IV (0.4886g)	38	40% C ₂ /M	
13	M		39	40% C ₂ /M	
14	10% C ₂ /M	DNE-V (2.3135g)	40	40% C ₂ /M	
15	10% C ₂ /M		41	40% C ₂ /M	
16	10% C ₂ /M		42	40% C ₂ /M	
17	10% C ₂ /M		43	40% C ₂ /M	
18	10% C ₂ /M		44	50% C ₂ /M	
19	10% C ₂ /M		45	50% C ₂ /M	
20	10% C ₂ /M		46	50% C ₂ /M	
21	10% C ₂ /M		47	50% C ₂ /M	
22	20% C ₂ /M		48	50% C ₂ /M	
23	20% C ₂ /M		49	50% C/M	
24	20% C ₂ /M	50	50% C/M		
25	20% C ₂ /M		51	50% C/M	
26	20% C ₂ /M				

每瓶收 250 ml ; M: methanol ; C₂: dichloromethane ; C: chloroform.

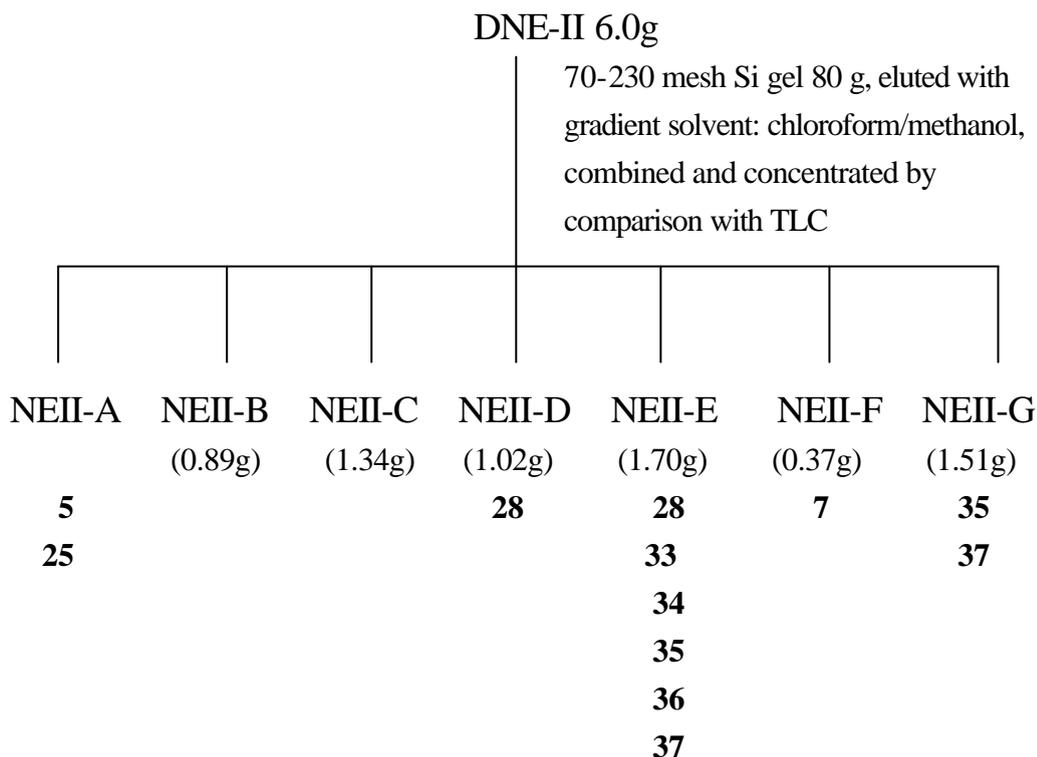
1. DNE-II 之分離

DNE-II 6.0 公克，以矽膠管柱層析法分離；70-230 mesh 矽膠 80 公克，用氯仿和甲醇溶媒做梯度沖提，每 50 或 100 毫升收一瓶，共收 28 瓶(Table 7), 再依 TLC 合併為 7 部分(NEII-A~NEFII-G) (Scheme 16)

Table 7. Isolation of the DNE-II of *D. nakaharai*

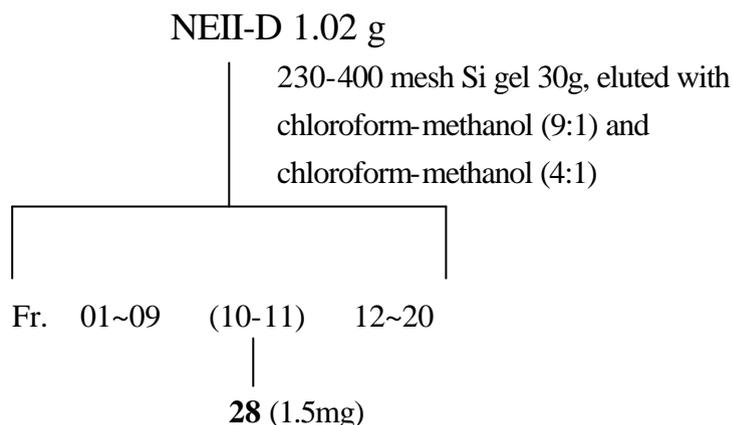
瓶	沖提溶媒	依 TLC 合併	瓶	沖提溶媒	依 TLC 合併
1	C	NEII-A	14	C/M 9/1	NEII-E (1.70g)
2	C		15	C/M 9/1	
3	C		16	C/M 4/1	
4	C		17	C/M 4/1	
5	C		18	C/M 4/1	NEII-F (0.37g)
6	C		19	C/M 4/1	
7	C		20	C/M 4/1	
8	C/M 9/1	NEII-B (0.89g)	21	C/M 4/1	NEII-G (1.51g)
9	C/M 9/1	NEII-C (1.34g)	22	C/M 4/1	
10	C/M 9/1		23	C/M 1/1	
11	C/M 9/1	NEII-D (1.02g)	24	C/M 1/1	
12	C/M 9/1		25	C/M 1/1	
13	C/M 9/1		26	C/M 1/1	
			27	M	
			28	M	

每瓶收 50 或 100 ml ; C: chloroform ; M: methanol.

**Scheme 16.** Isolation of the DNE-II of *D. nakaharai*

(A). NEII-D 之分離與純化

NEII-D (1.02 公克)用矽膠管柱層析法分離與純化(Scheme 17)。以 70-230 mesh 矽膠 30 公克充填管柱，管柱長與內徑為 12 公分× 2.5 公分，氯仿-甲醇(9:1)和氯仿-甲醇(4:1)溶媒沖提，共收 20 個部分。其中第 10 至 11 部分，分得化合物 **28** (1.5 毫克)。經由光譜確認 **28** 為 2,5-dihydroxy-3,4-dimethoxyphenanthrene。



Scheme 17. Isolation and purification of NEII-D of *D. nakaharai*

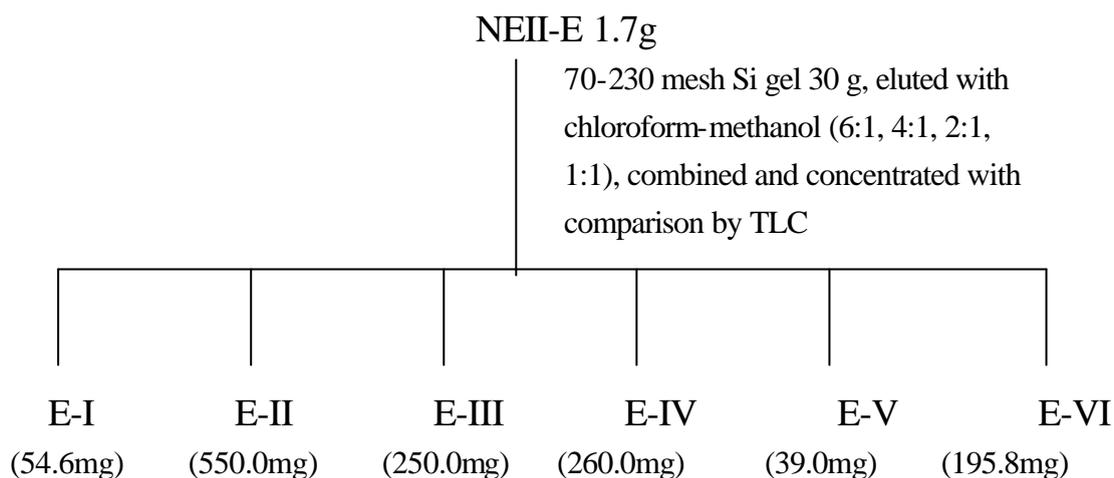
(B). NEII-E 之分離

NEII-E 1.70 公克，以矽膠管柱層析法分離；用 70-230 mesh 矽膠 30 公克，充填管柱，管柱長與內徑為 21 公分× 2.5 公分，氯仿-甲醇溶媒(6:1, 4:1, 2:1, 1:1)，沖提，共收 51 瓶(Table 8)，再依 TLC 合併為 6 部分(E-I~E-VI)。(Scheme 18)

Table 8. Isolation of the NEII-E of *D. nakaharai*

瓶	沖提溶媒(ml)	依 TLC 合併	瓶	沖提溶媒(ml)	依 TLC 合併
1	C/M 6/1 (20)		11	C/M 4/1 (50)	E-V (39.0mg)
2	C/M 6/1 (30)	E-I (54.6mg)	12	C/M 4/1 (50)	E-VI (0.196g)
3	C/M 6/1 (20)		13	C/M 4/1 (50)	
4	C/M 6/1 (30)	E-II (0.55g)	14	C/M 4/1 (50)	
5	C/M 6/1 (30)		15	C/M 2/1 (40)	
6	C/M 6/1 (30)	E-III (0.25g)	16	C/M 2/1 (50)	
7	C/M 6/1 (30)		17	C/M 1/1 (50)	
8	C/M 6/1 (30)		18	C/M 1/1 (50)	
9	C/M 6/1 (30)	E-IV (0.26g)			
10	C/M 6/1 (30)				

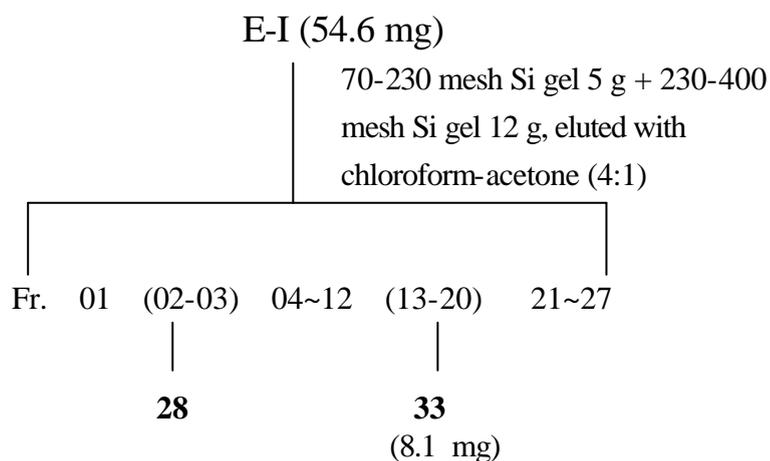
C: chloroform ; M: methanol.



Scheme 18. Isolation of the NEII-E of *D. nakaharai*

1) E-I 之分離與純化

E-I (54.6 毫克)用矽膠管柱層析法分離與純化 (Scheme 19)。以 70-230 mesh 矽膠 5 公克和 230-400 mesh 矽膠 12 公克充填管柱,管柱長寬為 20 公分× 1.5 公分,以氯仿-丙酮(4:1)溶媒沖提,每 2-5 毫升收 1 瓶,共收 27 個部分。在第 2 和 3 部分得到化合物 **28**,而第 13 至 20 部分合併(8.1 毫克),得到化合物 **33**,經由光譜確認 **28** 為 2,5-dihydroxy-3,4-dimethoxyphenanthrene, **33** 為 protocatechuic acid。



Scheme 19. Isolation and purification of E-I of *D. nakaharai*

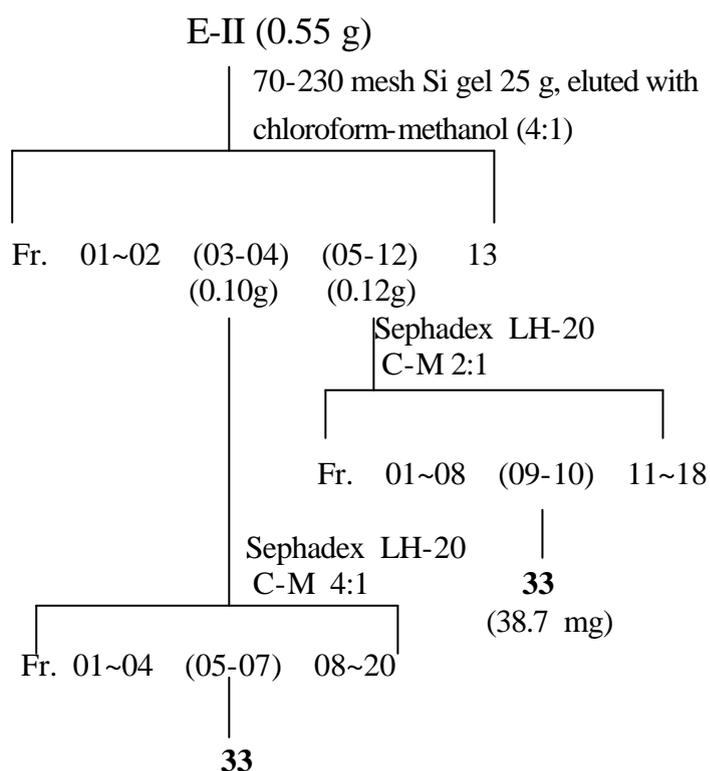
2) E-II 之分離與純化

E-II (0.55 公克)用矽膠管柱層析法分離與純化(Scheme 20)。以 70-230 mesh 矽膠 25 公克充填管柱，管柱長與內徑為 13 公分×2.5 公分，以氯仿-甲醇(4:1)溶媒沖提，共收 13 個部分。

在第 3 和 4 部分合併(0.10 公克)，再經 Sephadex LH-20 管柱，以氯仿-甲醇(4:1)溶媒沖提分離，共收 20 個分管，其中 5 至 7 分管，得到化合物 **33**。

在第 5 至 12 部分合併(0.12 公克)，再經 Sephadex LH-20 管柱，以氯仿-甲醇(2:1)溶媒沖提分離，共收 18 個分管，其中 9 和 10 分管(38.7 毫克)，得到化合物 **33**。

經由光譜確認 **33** 為 protocatechuic acid。



Scheme 20. Isolation and purification of E-II of *D. nakaharai*

3) E-III 之分離與純化

E-III (0.25 公克)用矽膠管柱層析法分離與純化(Scheme 21)。以 230-400 mesh 矽膠 20 公克充填管柱，管柱長與內徑為 10 公分× 2.5 公分，以氯仿-甲醇(4:1)溶媒沖提，每 5 毫升收一瓶，共收 41 個部分。

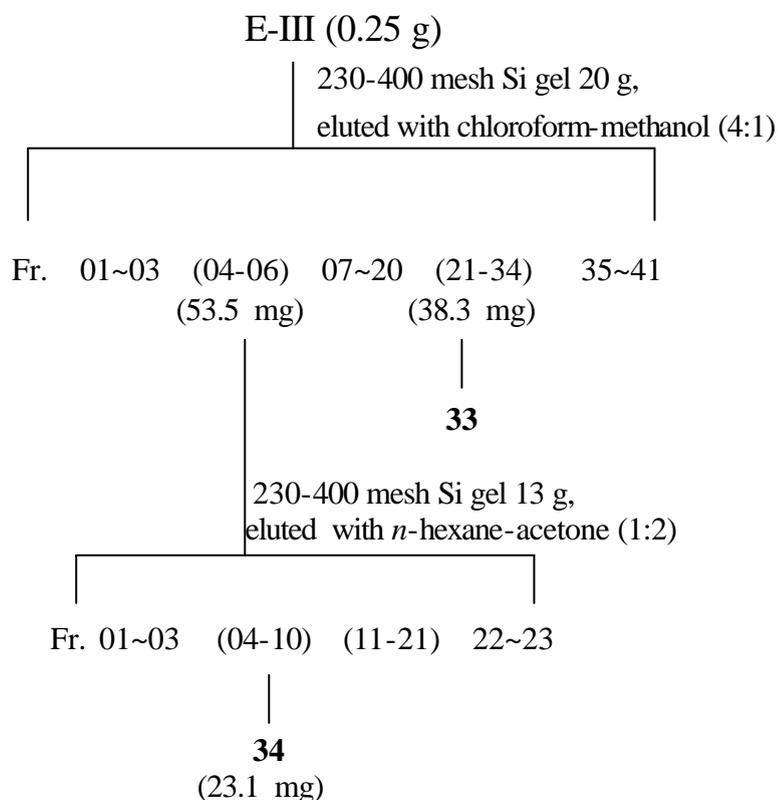
在第 4 和 6 部分合併(53.5 毫克)，再經 230-400 mesh 矽膠 13 公克充填管柱，管柱長與內徑為 12 公分× 1.5 公分，以正己烷-丙酮(1:2)溶媒沖提，共收 23 個分管。其中 4 至 10 分管合併(23.1 毫克)，為化合物 **34**。

在第 21 至 34 部分合併(38.3 毫克)，主要為化合物 **33**。

經由光譜確認 **33** 為 protocatechuic acid，**34** 為 uracil。

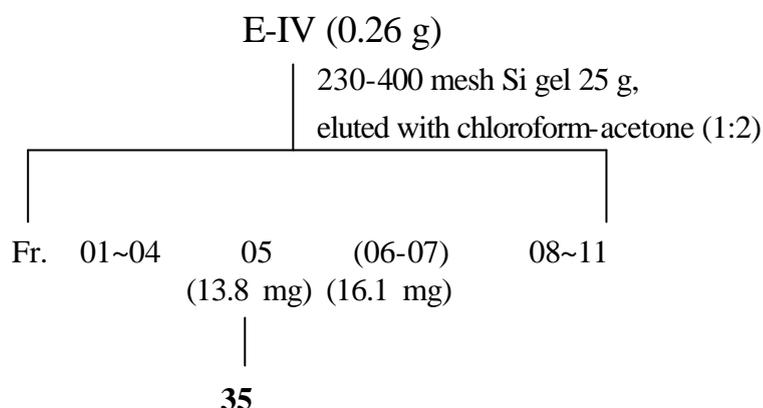
4) E-IV 之分離與純化

E-IV (0.26 公克)用矽膠管柱層析法分離與純化 (Scheme 22)。以 230-400 mesh 矽膠 25 公克充填管柱，管柱長與內徑為 13 公分× 2.5 公分，以氯仿-丙酮(1:2)溶媒沖提，每 20-30 毫升收一瓶，共收 11 個部分。



Scheme 21. Isolation and purification of E-III of *D. nakaharai*

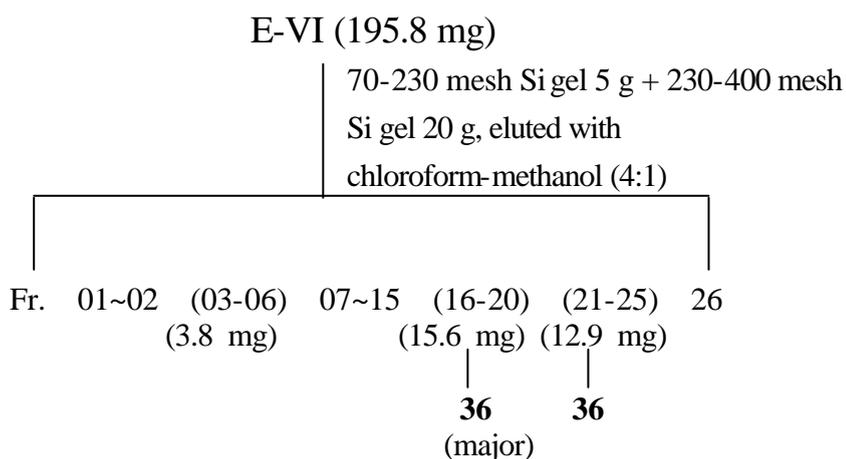
在第 5 部分(13.8 毫克), 得到化合物 35, 經由光譜確認 35 為 nakaharoside A。



Scheme 22. Isolation and purification of E-IV of *D. nakaharai*

5) E-VI 之分離與純化

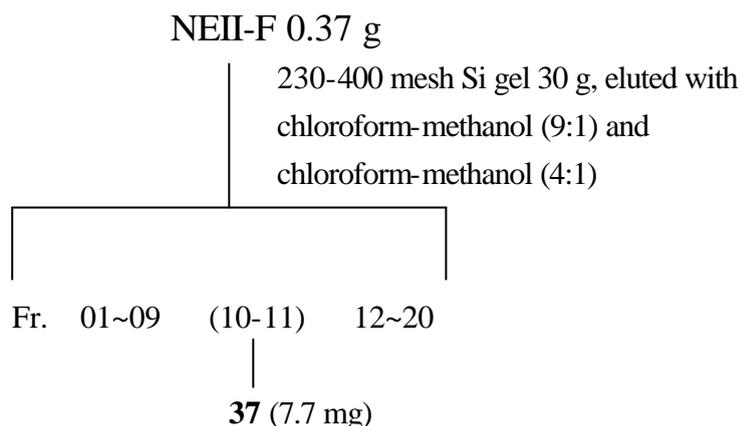
E-VI (195.8 毫克)用矽膠管柱層析法分離與純化 (Scheme 23)。以 70-230 mesh 矽膠 5 公克和 230-400 mesh 矽膠 20 公克充填管柱, 氯仿-甲醇(4:1)溶媒沖提, 共收 26 個部分。其中第 16 至 20 部分合併(15.6 毫克), 以化合物 36 為主要成分, 第 21 至 25 部分合併(12.9 毫克), 為化合物 36。經由光譜確認 36 為 vitexin。



Scheme 23. Isolation and purification of E-VI of *D. nakaharai*

(C). NEII-F 之分離與純化

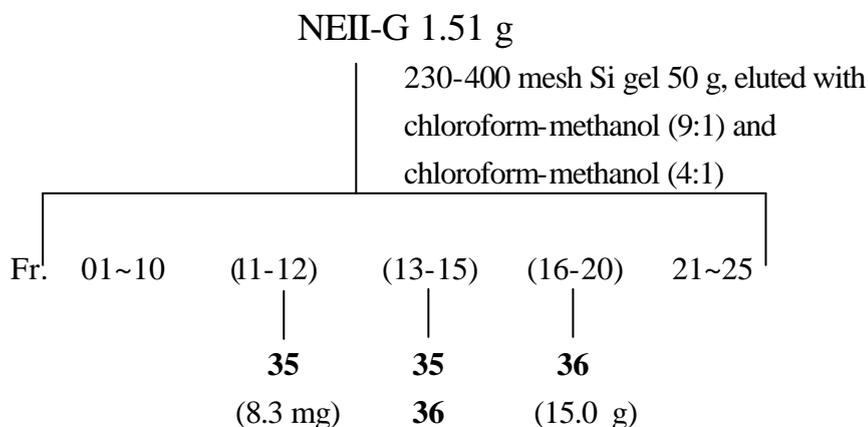
NEII-F (0.3 公克)用矽膠管柱層析法分離與純化 (Scheme 24)。以 70-230 mesh 矽膠 30 公克充填管柱，管柱長與內徑為 12 公分×2.5 公分，氯仿-甲醇(9:1)和氯仿-甲醇(4:1)溶媒沖提，共收 20 個部分。其中第 10 至 11 部分，分得化合物 **37** (7.7 毫克)。經由光譜確認 **37** 為 nakaharoside B。



Scheme 24. Isolation and purification of NEII-F of *D. nakaharai*

(D). NEII-G 之分離與純化

NEII-G (1.51 公克)用矽膠管柱層析法分離與純化(Scheme 25)。以 70-230 mesh 矽膠 50 公克充填管柱，管柱長與內徑為 10.5 公分×4 公分，氯仿-甲醇(9:1)和氯仿-甲醇(4:1)溶媒沖提，共收 20 個部分。其中第 11 至 12 部分，得到化合物 **35** (8.3 毫克)，第 13 至 15 部分為化合物 **35** 和 **36**，第 16 至 20 部分為 **36** (15.0 毫克)。經由光譜確認 **35** 為 nakaharoside A，**36** 為 vitexin。



Scheme 25. Isolation and purification of NEII-G of *D. nakaharai*

2. DNE-VI 之分離

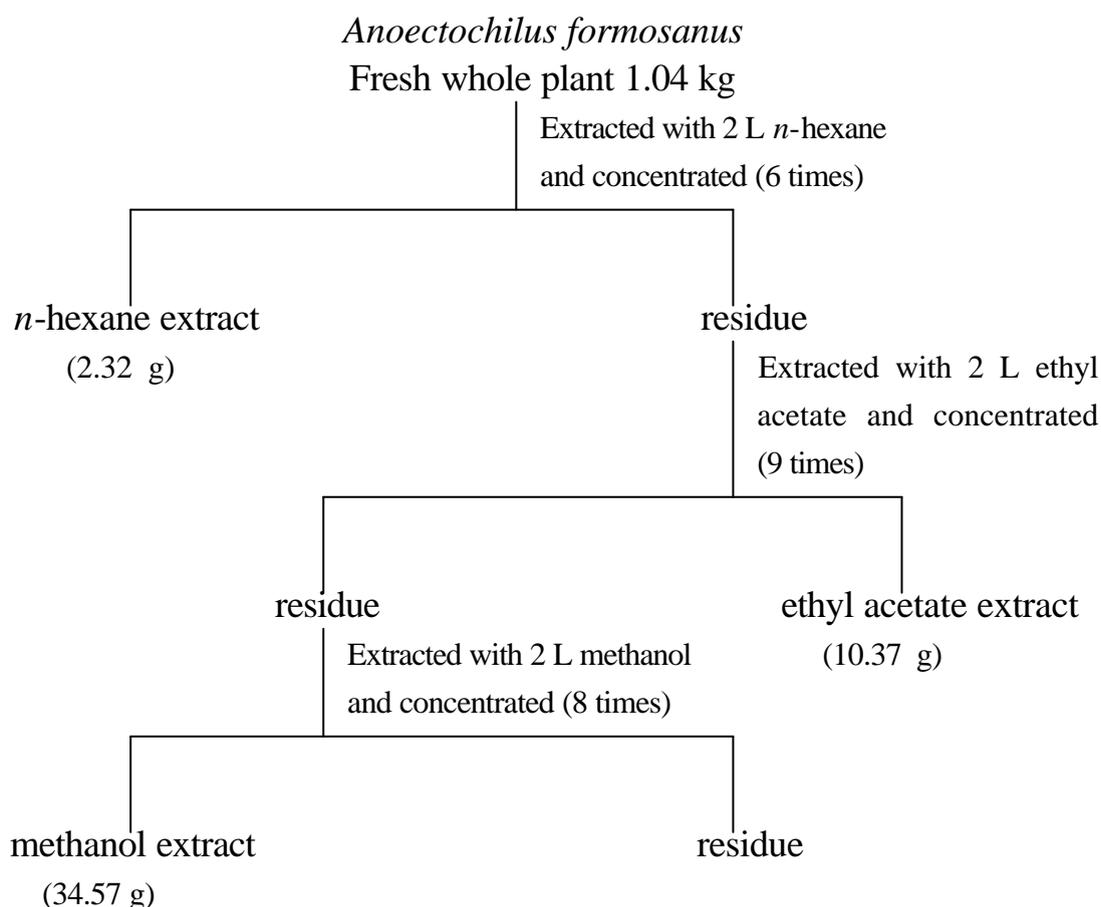
DNE-VI 0.66 公克，經 2 次矽膠管柱層析法分離，得到 2 個化合物 **7** 和 **8**，經光譜確認為 alkyl 4'-hydroxy-*cis*-cinnamates 和 alkyl 4'-hydroxy-*trans*-cinnamates。(分離條件資料遺失)

三、臺灣金線連之抽取與分離

(1) 臺灣金線連之抽取

將臺灣金線連植物鮮品 1.2 公斤，先去除雜質，再讓風晾乾植物表面的水分，稱重得到 1.04 公斤，全株以攪拌機加正己烷溶媒攪拌粉碎，再以 2 公升的正己烷冷浸萃取 6 次（每次 2 至 3 天），萃取液合併減壓濃縮至乾，得正己烷粗抽物 2.32 公克，其殘渣以 2 公升的乙酸乙酯溶媒冷浸萃取 9 次，萃取液合併減壓濃縮至乾，得乙酸乙酯粗抽物 10.37 公克，其殘渣再以 2 公升的甲醇溶媒冷浸萃取 8 次，萃取液合併減壓濃縮至乾，得甲醇粗抽物 23.18 公克。(Scheme 26)

將正己烷粗抽物 22.3 毫克，乙酸乙酯粗抽物 27.0 毫克和甲醇粗抽物 88.0 毫克，做抗發炎活性試驗。



Scheme 26. Extraction of *A. formosanus*

(2) 臺灣金線連正己烷粗抽物之分析

臺灣金線連正己烷粗抽物，以氣相層析儀(gas chromatography, GC)和氣相層析/質譜儀(GC/MS)分析成分。

氣相層析儀(GC): 使用 Hitachi GC 3000, FID, 毛細管柱 DBwax 30 m × 0.53 mm, 管柱溫度 50 -220, 每分鐘升溫 5, 載氣為氮氣, 流速 4 kgf/cm², 並用 Hitachi D-2100 積分儀記錄 GC 圖及積分各峰面積。

氣相層析/質譜儀 (GC/MS): Hewlett Packard 5995 GC-MS spectrometer, 毛細管柱 ultra 2, 25 m × 0.32 mm I.D., 載氣為氦氣, 流速 1 mL/min, splitter ratio 100 : 1, 離子化電壓為 75 eV。

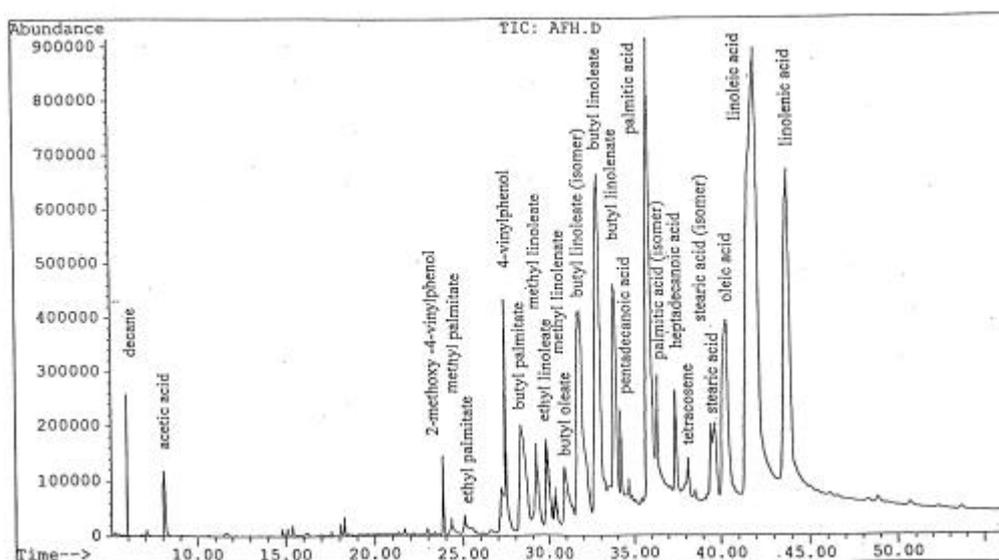


Figure 4. The gas chromatography of *n*-hexane extract of *A. formosanus*

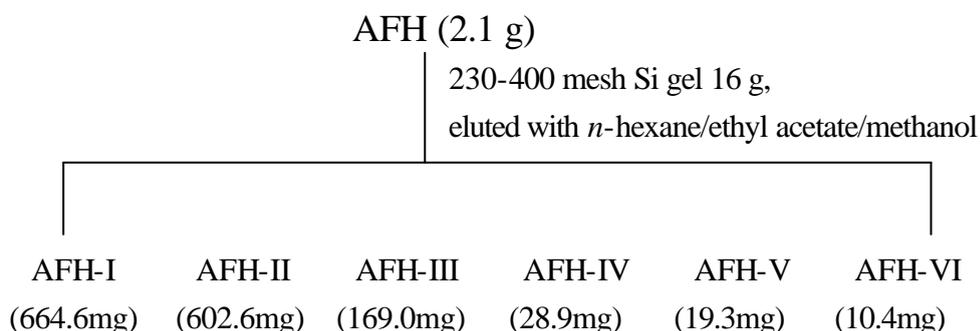
(3) 臺灣金線連正己烷粗抽物的分離

臺灣金線連正己烷粗抽物 2.1 公克，以矽膠管柱層析法分離；70-230 mesh 矽膠 40 公克，用正己烷、乙酸乙酯、甲醇依次做梯度沖提，共收 37 瓶(Table 9)，再依 TLC 色譜合併為 6 部分(AFH-I~AFH-VI)。(Scheme 27)

Table 9. Isolation of the *n*-hexane extract of *A. formosanus*

瓶	沖提溶媒	收集(ml)	依 TLC 合併	瓶	沖提溶媒	收集(ml)	依 TLC 合併
1	H	125		20	40% E/H	40	AFH-IV 28.9mg
2	H	40		21	40% E/H	40	
3	H	35		22	40% E/H	40	
4	5% E/H	40		23	40% E/H	40	
5	5% E/H	40	AFH-I 664.6mg	24	50% E/H	40	AFH-V 19.3mg
6	5% E/H	40		25	50% E/H	48	
7	5% E/H	40		26	50% E/H	50	
8	10% E/H	40	AFH-II 602.6mg	27	50% E/H	45	AFH-VI 10.4mg
9	10% E/H	40		28	75% E/H	40	
10	10% E/H	40		29	75% E/H	20	
11	10% E/H	40		30	75% E/H	40	
12	20% E/H	40	AFH-III 169.0mg	31	75% E/H	40	
13	20% E/H	40		32	E	40	
14	20% E/H	40		33	E	40	
15	20% E/H	40		34	E	40	
16	30% E/H	40		35	E	40	
17	30% E/H	40		36	M	40	
18	30% E/H	40		37	M	40	
19	30% E/H	40					

H: *n*-hexane ; E: ethyl acetate ; M: methanol.



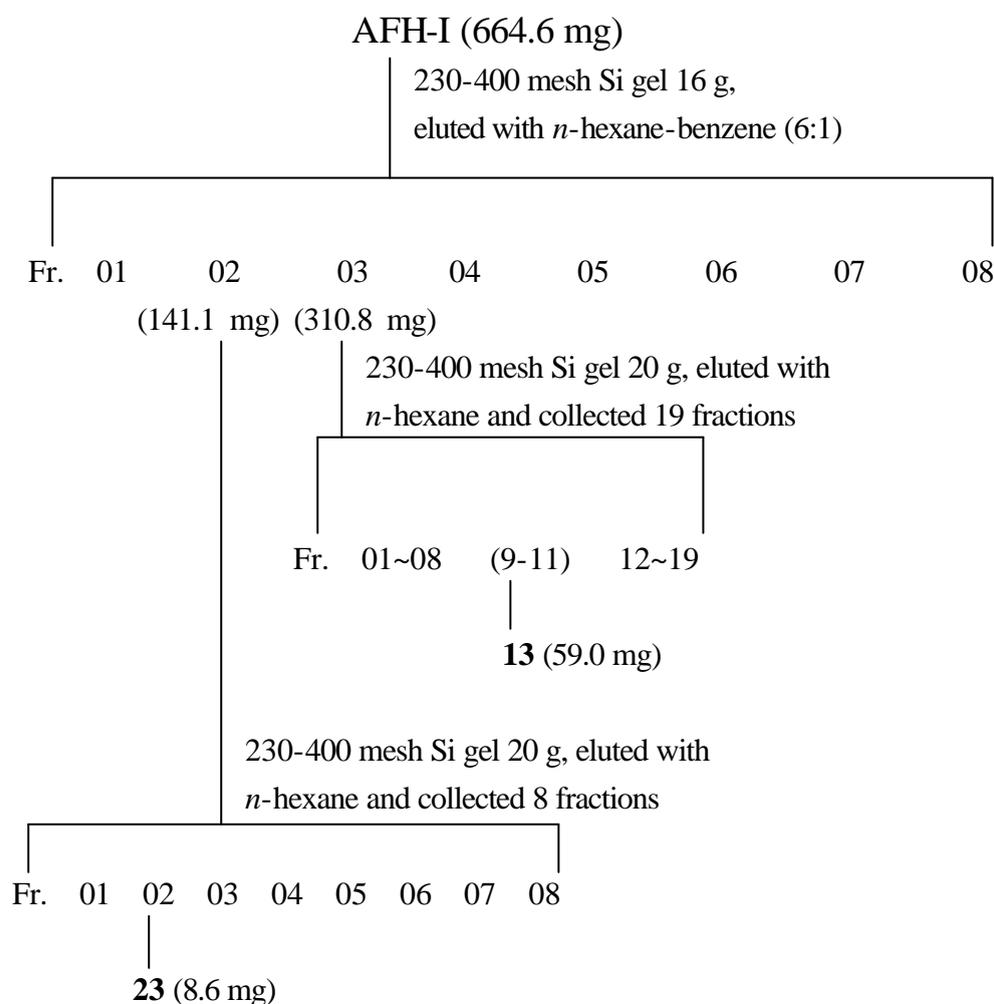
Scheme 27. Isolation of the *n*-hexane extract of *A. formosanus*

1. AFH-I 之分離與純化

AFH-I (664.6 毫克)用矽膠管柱層析法分離與純化(Scheme 28) 以 230-400 mesh 矽膠 16 公克充填管柱，正己烷-苯(6:1)溶媒沖提，共收 8 個部分。

- a. 第 2 部分(141.1 毫克)。再以 230-400 mesh 矽膠 20 公克充填管柱，正己烷溶媒沖提，共收 8 個分管。其中在 2 分管得到化合物 **23** (8.6 毫克)。
- b. 第 3 部分(310.8 毫克)。再以 230-400 mesh 矽膠 20 公克充填管柱，正己烷溶媒沖提，共收 19 個分管。其中在 9 至 11 分管合併，得到化合物 **13** (59.0 毫克)。

化合物 **13** 和 **23** 經由光譜確認為 linoleic acid 和 *trans*- β -carotene

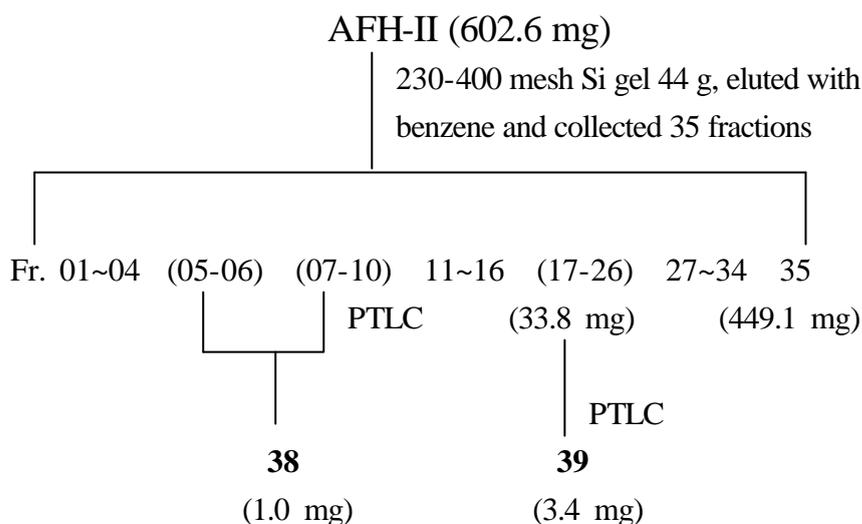


Scheme 28. Isolation and purification of the AFH-I of *A. formosanus*

2. AFH-II 之分離與純化

AFH-II (602.6 公克)用矽膠管柱層析法分離與純化(Scheme 29)。以 230-400 mesh 矽膠 44 公克充填管柱，苯溶媒沖提，共收 35 個部分，其中第 5 至 10 部分再經製備型薄層層析(PTLC)分離，得到化合物 **38** (1.0 毫克)，第 17 至 26 部分合併(33.8 毫克)，再經製備型薄層層析(PTLC)分離，得到化合物 **39** (3.4 毫克)。

化合物 **38** 和 **39** 經由光譜確認為 2-methoxy-4-vinylphenol 和 4-vinylphenol。



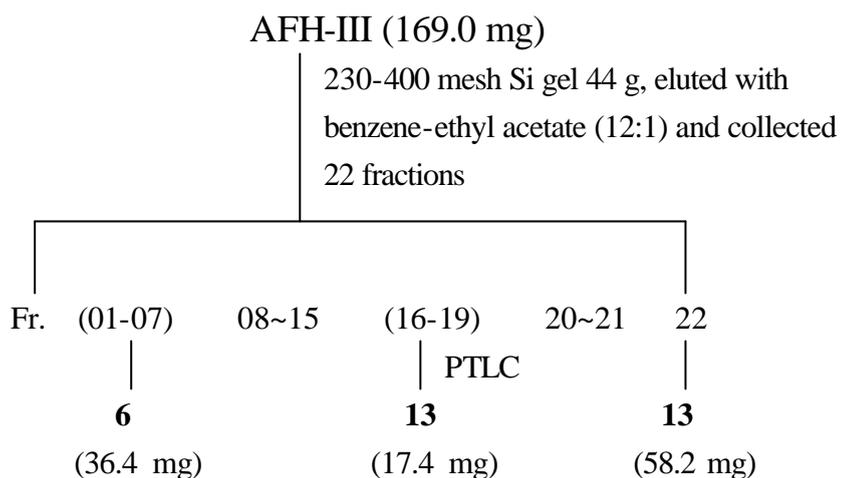
Scheme 29. Isolation and purification of the AFH-II of *A. formosanus*

3. AFH-III 之分離與純化

AFH-III (169.0 毫克)用矽膠管柱層析法分離與純化(Scheme 30)。以 230-400 mesh 矽膠 44 公克充填管柱，苯-乙酸乙酯(12:1)溶媒沖提，共收 22 個部分。

- 第 1 至 7 部分得到化合物 **6** (36.4 毫克)。
- 第 16 至 19 部分合併。再以製備型薄層層析(PTLC)分離，得到化合物 **13** (17.4 毫克)。
- 第 22 部分得到化合物 **13** (58.2 毫克)。

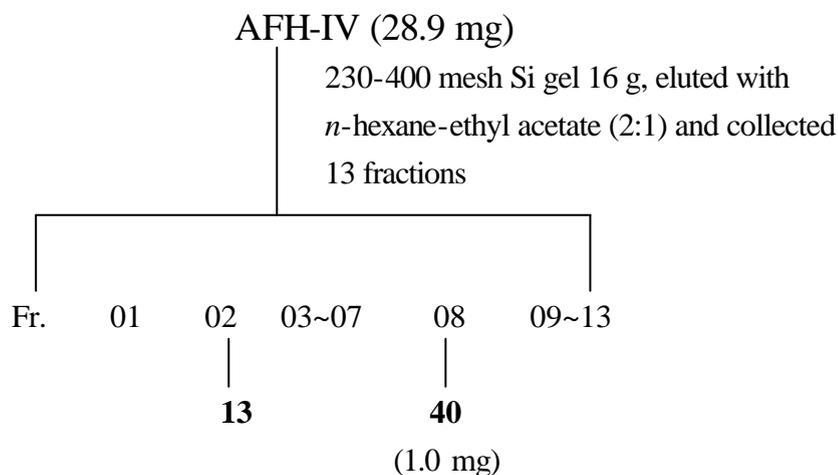
經由光譜確認，**6** 為 pheophytin a，化合物 **13** 為 linoleic acid。



Scheme 30. Isolation and purification of the AFH-III of *A. formosanus*

4. AFH-IV 之分離與純化

AFH-IV (28.9 毫克)用矽膠管柱層析法分離與純化(Scheme 31)。以 230-400 mesh 矽膠 16 公克充填管柱，正己烷-乙酸乙酯(2:1)溶媒沖提，共收 13 個部分。其中在第 2 部分得到化合物 **13**，第 8 部分為化合物 **40** (1.0 毫克)，經由光譜確認 **13** 為 linoleic acid，**40** 為 lutein。



Scheme 31. Isolation and purification of the AFH-IV of *A. formosanus*

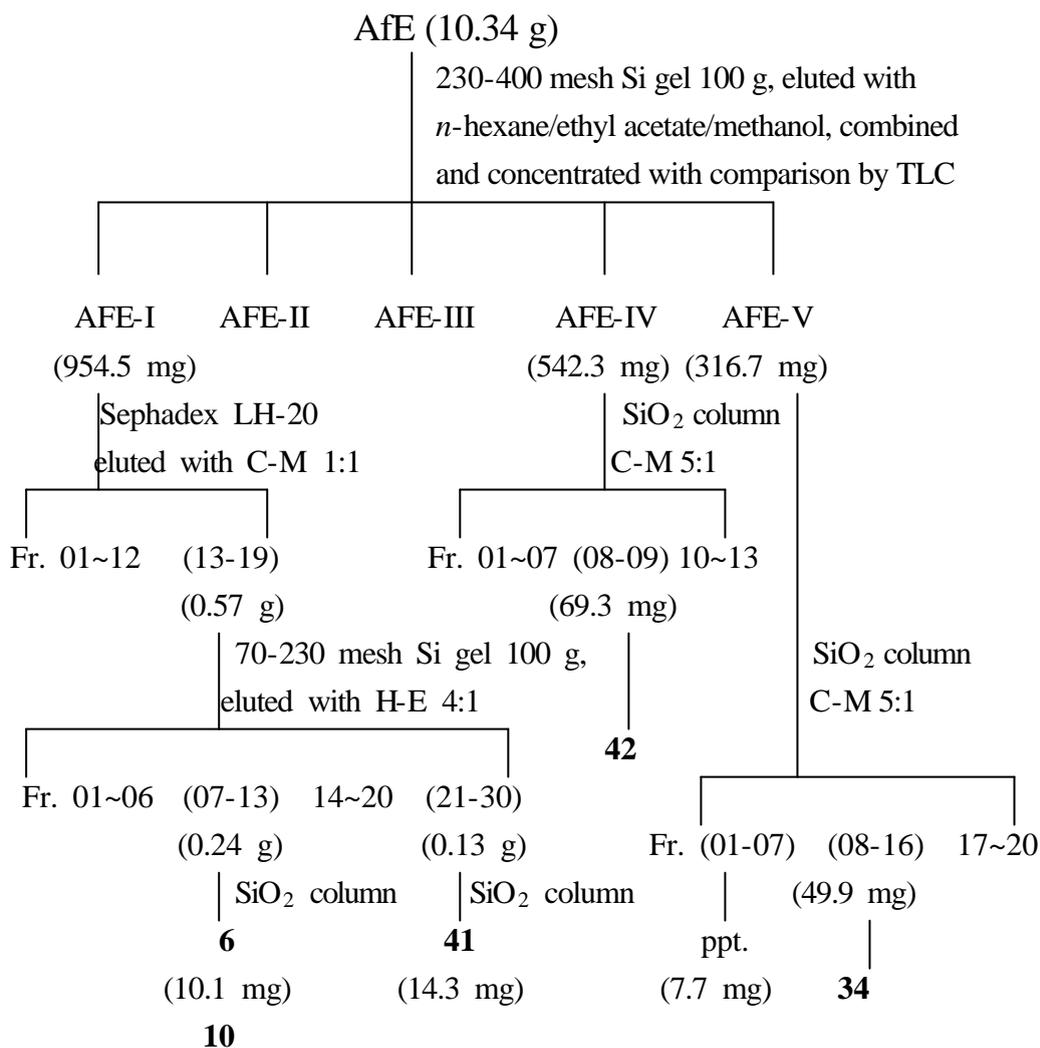
(4) 臺灣金線連乙酸乙酯粗抽物的分離

臺灣金線連乙酸乙酯粗抽物 10.34 公克(AFE)，以矽膠管柱層析法分離；70-230 mesh 矽膠 100 公克充填管柱，用正己烷、乙酸乙酯、甲醇等溶媒依次做梯度沖提，共收 36 瓶(Table 10)，再依 TLC 合併為 5 部分(AFE-I~AFE-V)。(Scheme 32)

Table 10. Isolation of the ethyl acetate extract of *A. formosanus*

瓶	沖提溶媒	收集(ml)	依 TLC 合併	瓶	沖提溶媒	收集(ml)	依 TLC 合併
1	10% E/H	200		20	80% E/H	200	AFE-IV (542.3 mg)
2	10% E/H	200		21	80% E/H	200	
3	10% E/H	200		22	90% E/H	200	AFE-V (316.7 mg)
4	20% E/H	200		23	90% E/H	200	
5	20% E/H	200		24	E	200	
6	20% E/H	200	AFE-I (954.5 mg)	25	E	200	
7	30% E/H	200		26	20% M/E	200	
8	30% E/H	200		27	20% M/E	200	
9	30% E/H	200	28	40% M/E	200		
10	40% E/H	200	AFE-II	29	40% M/E	200	
11	40% E/H	200		30	60% M/E	200	
12	40% E/H	200		31	60% M/E	200	
13	50% E/H	200	AFE-III (534.5 mg)	32	80% M/E	200	
14	50% E/H	200		33	80% M/E	200	
15	50% E/H	200		34	M	200	
16	60% E/H	200		35	M	200	
17	60% E/H	200		36	M	200	
18	70% E/H	200					
19	70% E/H	200					

H: *n*-hexane ; E: ethyl acetate ; M: methanol.



Scheme 32. Isolation of the ethyl acetate extract of *A. formosanus*

1. AFE-I 之分離與純化

AFE-I (954.5 毫克)經 Sepadex LH-20 管柱層析法分離，以氯仿-甲醇(1:1)沖提，共得 19 個部分，其中第 13 至 19 部分合併(570 毫克)，再以 70-230 mesh 矽膠 100 公克充填管柱，正己烷-乙酸乙酯(4:1)沖提，共收 30 個分管。

- a. 第 7 至 13 分管(240 毫克)，再經過管柱層析分離，得到 2 個化合物 **6** (10.1 毫克)和 **10**，經由光譜確認為 pheophytin a 和 phytosterol。
- b. 第 21 至 30 分管(130 毫克)，在經過管柱層析分離，得到化合物**41** (14.3 毫克)，經由光譜確認為 pheophytin b。

2. AFE-IV 之分離與純化

AFE-IV (542.3 毫克)再經過管柱層析分離法分離，以氯仿-甲醇(5:1)沖提，共得 13 個部分，其中第 8 和 9 部分合併(69.3 毫克)，得一化合物 **42**，經由光譜確認結構定為 anoectolide A。

3. AFE-V 之分離與純化

AFE-V (316.7 毫克)再經過管柱層析分離法分離，以氯仿-甲醇(5:1)沖提，共得 20 個部分，其中第 1 至 7 部分得一沉澱物(7.7 毫克)，第 8 至 16 部分得一化合物 **34**，經由光譜確認為 uracil。

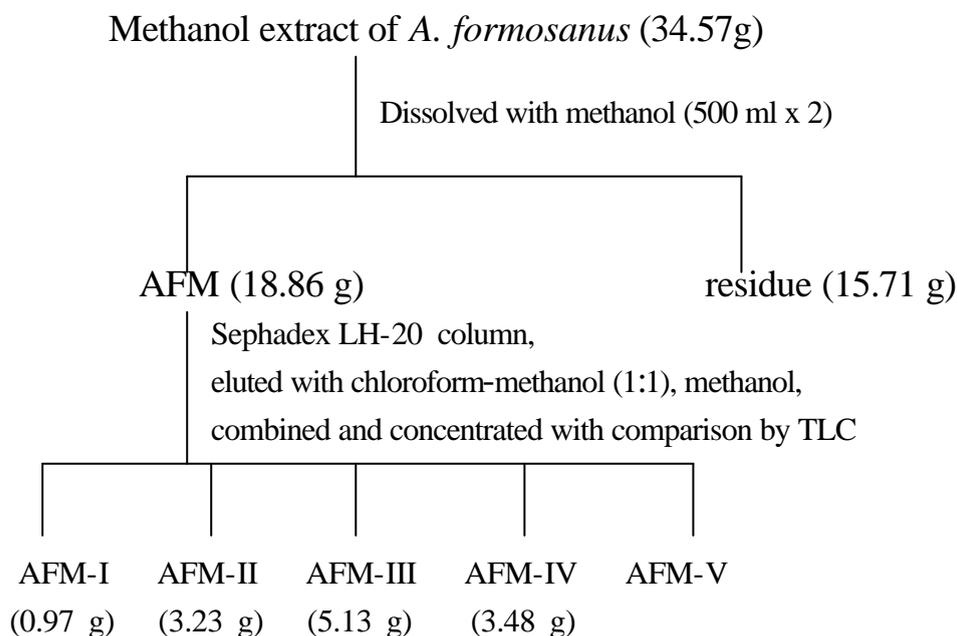
(5) 臺灣金線連甲醇粗抽物的分離

臺灣金線連甲醇粗抽物 34.57 公克，以甲醇溶媒溶解(500 ml × 2 次)，得甲醇溶液和甲醇不溶物 15.71 公克。將甲醇溶液濃縮乾燥秤重 18.86 公克(AF_M)，以 Sephadex LH-20 管柱層析法分離，氯仿-甲醇(1:1)和甲醇溶媒沖提，共收 15 瓶(Table 11)，再依 TLC 合併為 5 部分(AF_M-I~AF_M-V)。(Scheme 33)

Table 11. Isolation of the methanol extract of *A. formosanus*

瓶	沖提溶媒	收集(ml)	依 TLC 合併	瓶	沖提溶媒	收集(ml)	依 TLC 合併
1	C/M 1/1	50	AF _M -I (0.97 g)	8	M	200	AF _M -IV (3.48 g)
2	C/M 1/1	50		9	M	200	
3	C/M 1/1	50		10	M	200	
4	C/M 1/1	50		11	M	200	AF _M -V
5	C/M 1/1	100	12	M	200		
			AF _M -II (3.23 g)	13	M	200	
6	C/M 1/1	100	AF _M -III (5.13 g)	14	M	200	
7	C/M 1/1	200		15	M	200	

C: chloroform ; M: methanol.



Scheme 33. Isolation of the methanol extract of *A. formosanus*

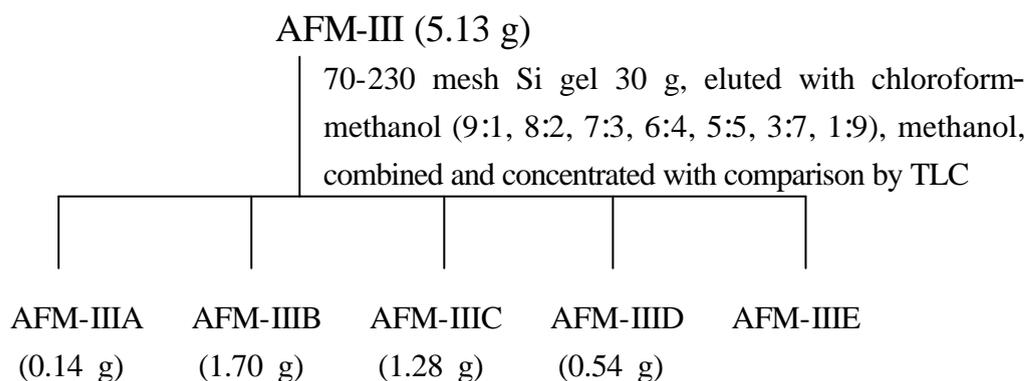
1. AFM-III 之分離

AFM-III (5.13 公克)用矽膠管柱層析法分離與純化 (Scheme 34) 以 70-230 mesh 矽膠 30 公克充填管柱, 氯仿-甲醇(9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 3:7, 1:9)和甲醇等溶媒沖提, 共收 12 瓶(Table 12), 再依 TLC 合併為 5 部分(AF-M-III A~AF-M-III E)。

Table 12. Isolation of the AFM-III of *A. formosanus*

瓶	沖提溶媒	收集(ml)	依 TLC 合併	瓶	沖提溶媒	收集(ml)	依 TLC 合併
1	C/M 9/1	20		7	C/M 7/3	100	AFM-III D (0.54 g)
2	C/M 9/1	30	AFM-III A (0.14 g)	8	C/M 6/4	100	AFM-III E
3	C/M 9/1	50	AFM-III B (1.70 g)	9	C/M 1/1	100	
4	C/M 9/1	50		10	C/M 3/7	100	
5	C/M 9/1	50	AFM-III C (1.28 g)	11	C/M 1/9	100	
6	C/M 8/2	100		12	M	200	

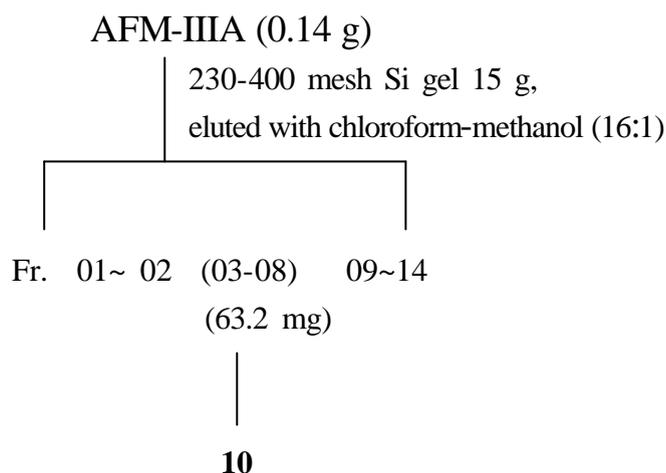
C: chloroform ; M: methanol



Scheme 34. Isolation of the AFM-III of *A. formosanus*

a) AFM-III A 之分離與純化

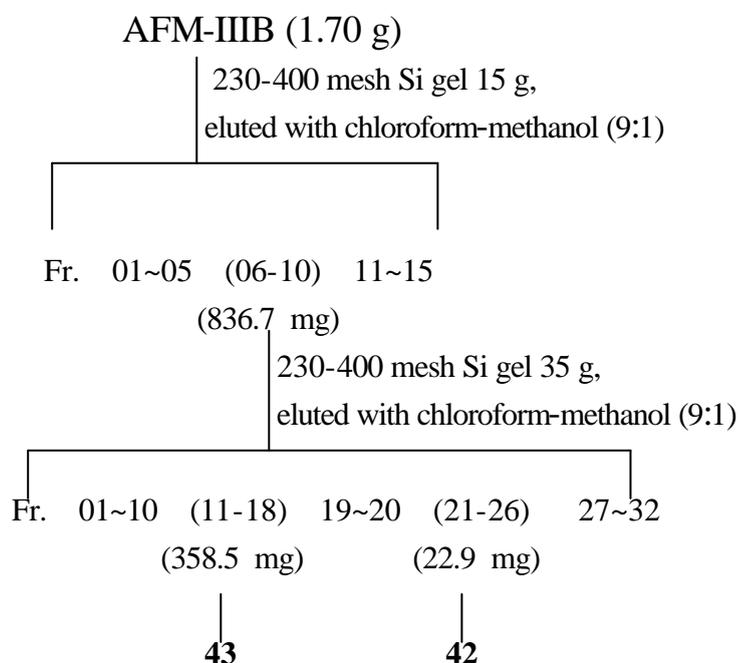
AFM-III A (0.14 公克)用矽膠管柱層析法分離與純化(Scheme 35)。以 230-400 mesh 矽膠 15 公克充填管柱, 氯仿-甲醇(16:1)溶媒沖提, 共收 14 個部分。其中在第 3 至 8 部分合併得到化合物 **10** (63.2 毫克), 經由光譜確認為 phytosterol。



Scheme 35. Isolation and purification of the AFM-III A of *A. formosanus*

b) AFM-III B 之分離與純化

AFM-III B (1.70 公克)用矽膠管柱層析法分離與純化(Scheme 36)。以 230-400 mesh 矽膠 15 公克充填管柱，氯仿-甲醇(9:1)溶媒沖提，共收 15 個部分。其中在第 6 至 10 部分合併(836.7 毫克)，再以 230-400 mesh 矽膠 35 克充填管柱，氯仿-甲醇(9:1)溶媒沖提，共收 32 個分管。其中在 11 至 18 分管合併(358.5 毫克)為化合物 **43**，21 至 26 分管合併(22.9 毫克)為化合物 **42**。經由光譜確認化合物 **42** 為 anoectolide A，化合物 **43** 為 anoectolide B。



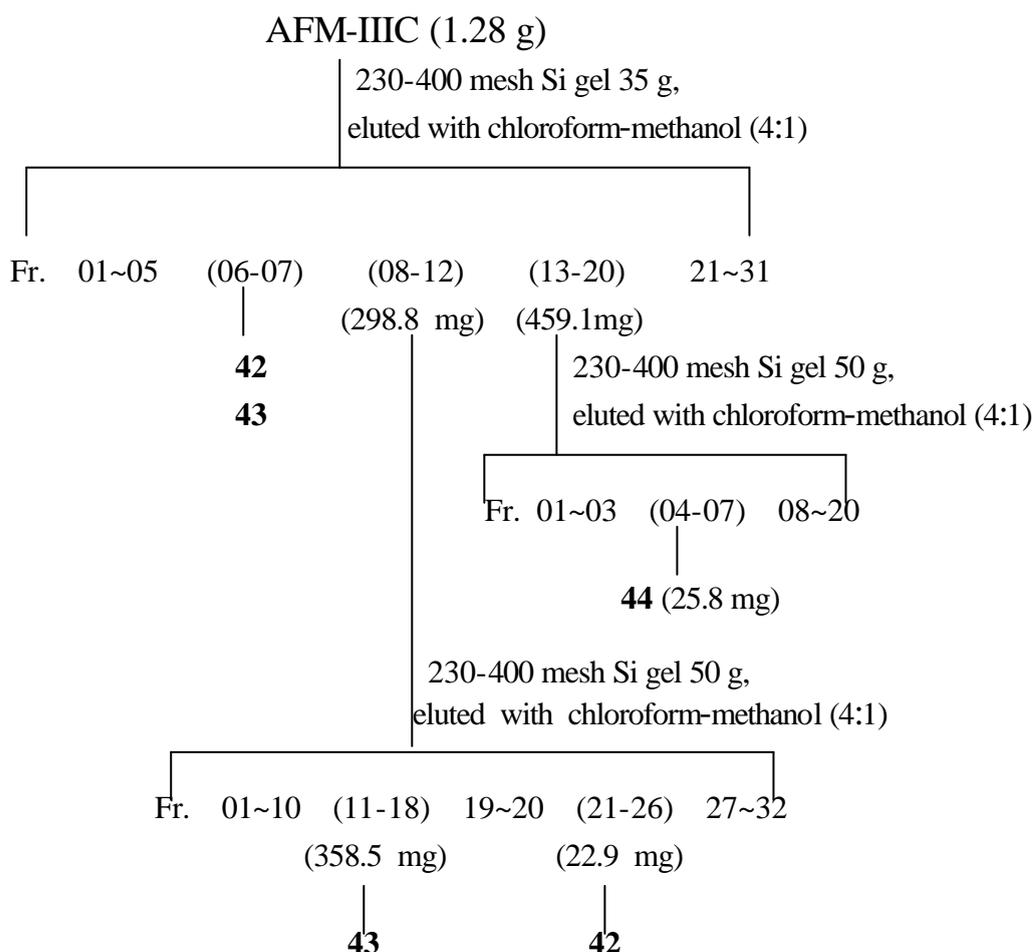
Scheme 36. Isolation and purification of the AFM-III B of *A. formosanus*

c) AFM-IIIIC 之分離與純化

AFM-IIIIC (1.28 公克)用矽膠管柱層析法分離與純化(Scheme 37)。以 230-400 mesh 矽膠 35 公克充填管柱，氯仿-甲醇(4:1)溶媒沖提，共收 31 個分管。

- a. 在第 6 和 7 部分為化合物 **42** 和 **43** (主要成分)的混合。
- b. 第 8 至 12 部分合併(298.8 毫克)，再以 230-400 mesh 矽膠 50 公克充填管柱，氯仿-甲醇(4:1)溶媒沖提，共收 20 個分管。其中在 3 分管得到化合物 **43** (8.1 毫克)。
- c. 第 13 至 20 部分合併(459.1 毫克)，再以 230-400 mesh 矽膠 50 公克充填管柱，氯仿-甲醇(4:1)溶媒沖提，共收 20 個分管。其中在 4 至 7 分管合併得到化合物 **44** (25.8 毫克)。

經由光譜確認化合物 **42**、**43** 和 **44** 分別為 anoectolide A、anoectolide B 和 ethyl β -D-glucopyranoside。



Scheme 37. Isolation and purification of the AFM-IIIIC of *A. formosanus*

第五節 抗發炎及抗過敏實驗方法

一、嗜中性白血球(Neutrophils)的去顆粒作用

嗜中性白血球之製備：大鼠(Sprague Dawley, 250-300 g)經 pentobarbital (60 mg/kg, i.p.)麻醉後，由腹腔動脈抽血，與 dextran 混合靜置，經 Ficoll-hypaque 離心後，使 neutrophil 與其它血液細胞分離，並在低張溶液(0.05%)除去紅血球，將細胞以包含 0.25% bovine serum albumin 之 saline (1.75%)清洗，並懸浮於 Hanks' balanced salt solution (HBSS)成 2×10^6 cells/mL 其中包含 90-95% 之 neutrophils⁽¹⁵⁶⁾。

實驗方法：

(1) β -glucuronidase 釋放反應之測定

將中性白血球懸浮液分別與 DMSO 或檢品溶液於 37 $^{\circ}$ C 培養三分鐘後，個別加入 fMLP (1 μ M)與之作用，經四十五分鐘後，加入冰浴過之 Tyrode's solution 終止反應，混合液經離心(1000 xg)十分鐘後，將上清液取出，利用上清液中之 β -glucuronidase 與 phenolphthalein- β -glucuronide 反應後以分光光度計在 550 nm 測量所含之 β -glucuronidase⁽¹⁵⁷⁾。

(2) lysozyme 釋放反應之測定

同 β -glucuronidase 釋放反應之處理後，將所得含 lysozyme 之上清液，利用 *Micrococcus lysodeikticus* 作為受質，經由分光光度計在 450 nm 測量⁽¹⁵⁸⁾。 β -glucuronidase 及 lysozyme 之釋放表示如下：

$$\text{release\%} = \frac{(\text{release elicited by secretagogue} - \text{spontaneous release})}{\text{total content}} \times 100$$

(total content 是將細胞懸浮於 Triton X-100 後所測量之值)

(3) superoxide anion 釋放反應之測定

將檢品及參考溶液(0.4 mL)其中含有 0.2 mL 細胞懸浮液(5×10^6 cells/mL)及 0.5 mg/mL 的 ferricytochrome c，參考溶液中在加入 6.6 μ g/mL 的 superoxide dismutase (SOD)，於 37 $^{\circ}$ C 培養三分鐘後，分別加入 fMLP (1 μ M)或 PMA (3 nM)，三十分鐘後經離心取上清液，利用分光光度計在 550 nm 測量 SOD 可抑制的吸光部分，即可知中性白血球釋放過氧化物自由基的程度⁽¹⁵⁹⁾。

superoxide anion (O_2^-)之量是以下列式子計算：

$$O_2^- \text{ (n mol)} = 19.08 \times \text{absorbance}$$

二、肥滿細胞(Mast cells)的去顆粒作用

肥滿細胞之製備：大鼠(Sprague-Dawley, 250-300 g)頸部放血後，將 10 mL 含肝素之 Tyrode's 溶液注入鼠腹腔內，按摩 1-2 分鐘並取出腹腔液，經 38% 牛血清蛋白之 glucose-free Tyrode's solution 離心，沉澱細胞經清洗後，懸浮成 $1-1.5 \times 10^6$ cells/mL，並測定細胞存活率⁽¹⁶⁰⁾。

實驗方法：

(1) 組織胺(histamine)釋放反應之測定

將肥滿細胞懸浮液分別與 DMSO 或檢品溶液於 37°C 培養三分鐘後，個別加入 compound 48/80 ($10 \mu\text{g/mL}$) 與之作用，經十五分鐘後，加入冰浴過之 Tyrode's solution 終止反應，混合液經離心($1000 \times g$) 十分鐘後，將上清液取出，測其所含之組織胺。利用 *o*-phthaldehyde 聚合後，以螢光分光光度計在 350/450 nm 處來測量所含之組織胺的量⁽¹⁶¹⁾。

(2) β -glucuronidase 釋放反應之測定

同 histamine 釋放反應之處理後，將所得含 β -glucuronidase 之上清液，利用 phenolphthalein- β -D-glucuronide 作為受質，以分光光度計在 550 nm 測量所含之 β -glucuronidase⁽¹⁶¹⁾。

histamine 及 β -glucuronidase 之釋放表示如下：

$$\text{release\%} = [(\text{release elicited by secretagogue} - \text{spontaneous release}) / \text{total content}] \times 100$$

(total content 是將細胞懸浮於 Triton X-100 後所測量之值)

三、NO 的測定

在細胞培養液中 NO 的生成，可以利用 Griess reaction 所得到的 nitrite 含量來測定出來。簡單地說將 40 μl 的 5 mM sulfanilamide, 10 μl 的 2 M HCl 和 20 μl 的 40 mM naphthylethylenediamine 依序分別加入 150 μl 培養液中。培養液在室溫下放置十分鐘，利用 microplate reader 在 550 nm 下測量吸光部分，並以 NaNO_2 作標準曲線⁽¹⁶²⁾。

四、TNF- α 和 PGE₂ 的測定

測量 PGE₂ 使用 EIA (enzyme immunoassay) kit , 測量 TNF- α 使用 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) 可將培養液中的 TNF- α 和 PGE₂ 測定出來。

五、統計方法

實驗依 Least Significant Difference Test 方法做統計分析, 每個數據為三到四個實驗的平均值 \pm 標準誤差(mean \pm S. E.)。 *P* 值小於 0.05 為具有顯著差異。