

第一章 緒論

第一節 研究背景及動機：

葛屬植物全世界約有 20 種，大陸約有 11 種⁽¹⁾，台灣地區約有 4 種⁽²⁾。葛根依中外藥用植物學及生藥學文獻，均指為 *Leguminosae*(豆科) *Pueraria* (葛屬)若干種植物之根⁽²⁾。中藥葛根為常見藥材，別名雞齊，傷風太陽病之要藥，常用方劑葛根湯之君藥，《中國藥典》⁽³⁾指豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (WILLDENOW.) OHWI.或甘葛藤 *Pueraria thomsonii* BENTH.的乾燥根。葛根始載于《神農本草經》，列為中品，主治消渴，身大熱，諸痺起陰氣，解諸毒⁽⁴⁾。《本草綱目》記載其性平，味甘辛，具有解肌退熱，升陽透疹，生津止渴的功效⁽⁵⁾。《傷寒論》中記述太陽病或太陽陽明合病，可用葛根治療項頸几几，目痛及口渴等症⁽⁶⁾。近年中醫常用於治療發熱無汗，頭痛項強及斑疹不透等表症⁽⁶⁾。葛根屬植物的大量異黃酮類成分中含有大量葛根素(puerarin)⁽⁸⁾，注射液可治冠心病、心絞痛、降血壓⁽⁹⁾。

近來，文獻報導泰國葛屬植物(*Pueraria mirifica* AIRY SHAW & SUVATABANDHU)生長於泰國北部⁽¹⁰⁾，有強的雌激素作用，常被研究用來治療骨質疏鬆症、更年期障礙的荷爾蒙替代療法及豐胸。文獻記載含有特殊結構式的類似女性荷爾蒙成分:葛雌素(+)- Miroestrol⁽¹¹⁻¹⁸⁾。葛雌素為本種特有的成分，也是目前所有從植物分離出來的植物性雌激素中最強的。在大鼠活體試驗中，藥理研究顯示具有比女性賀爾蒙 17 β -雌二醇還強的作用⁽¹³⁾⁽¹⁵⁾，近年來文獻報導研究此成分的化學全合成⁽¹⁸⁾，可見此成分最近有被重視的傾向。由於以本植物為原料的產製品常以保健食品型態出現於市面，甚至有使用同屬其他種植物的混淆情形。為了確立各種市售產品的真實性，提供有關產品的品質控制，擬進行葛雌素的分離，確定結構式，並以此為標準品開發高效液相層析分析方法，定量天然植物與市售產品有效成分含量。

由於葛根成分複雜，產地不同，成分含量也會不同，因此，本研究也以測定道地藥材的活性成分含量差異，做為另一研究目的。進行泰葛的特

有成分定量時，希望藉由分離所得各種成分去定量泰國、大陸和台灣產葛根成分，進而瞭解三地所產葛根成分含量有何不同，並且進一步確認是否除了泰葛以外，大陸產和台灣產葛根不含有葛雌素，為不同產地、不同種類的葛根藥材，是否可以用於不同病症，奠定研究基礎。另外，針對泰葛一年生的根、莖和葉進行指標成分定量，便於瞭解泰葛本身生長年數對二次代謝產物的影響，進而對泰葛的二次代謝產物建立生長曲線初步的概念。植物組織培養在二次代謝產物上及大量繁殖的應用，逐漸地嶄露頭角，中藥材以組織培養活性成分，已經有相當的成績了⁽¹⁹⁾。從培養泰葛細胞產生活性成分為目標，為日後研究培養泰葛活性成分為基礎。

此外，大陸近代藥理研究證明，葛根中所含有效成分葛根總黃酮(大多為異黃酮，這是豆科的特徵)能降低心肌耗氧量，增加冠狀動脈、腦血管血流量，明顯緩解心絞痛，抗心律失常等⁽⁷⁾⁽²⁰⁻²¹⁾，被醫藥界專家們認為具有開發治療心腦血管系統疾病之新藥的良好前景。大陸以使用野葛和粉葛為多，分析結果表明，除野葛的總黃酮成分明顯高於粉葛外，其水溶性、醇溶性成分的含量亦明顯高於粉葛⁽²²⁾。本文亦針對總黃酮成分研究，將泰葛與川葛、臺葛比較，就泰國、四川、臺灣三地進行了七種葛根的總黃酮含量測定，期望建立一套快速且方便的含量測定方法，以便應用於鑑別製藥產業上之產品質量優劣。同時為葛根的質量評價提供參考，篩選出品質佳、有效成分含量高之葛屬品種。

文獻中記載葛根粗抽物有分化凋亡⁽²³⁻²⁴⁾及抗癌活性作用⁽²⁵⁻²⁶⁾，內含有大豆元及染料木黃酮有細胞致毒及分化作用⁽⁷⁾⁽²⁷⁾，在大陸文獻亦提及葛根內含抗白血病成分⁽²⁸⁾，因此，本研究以治療急性白血病為研究主題，用 Human Leukemia promyelocytic cells(HL-60 cells)來做粗抽物及化合物篩選指標，冀望能夠為開發抗白血病藥做一個初步的活性檢測，提供抗白血病藥開發的另一個研究方向。

第二節 葛根相關研究：

壹、植物基原考察：⁽²⁹⁾

被子植物門(Angiospermae)

雙子葉植物綱(Dicotyledoneae)

離瓣花亞綱(Choripetalae)

薔薇目(Rosales)

豆科(Leguminosae)

蝶形花亞科(Papilionoideae)

葛根屬(*Pueraria*)

貳、語源：

後述的中國產葛屬植物之各種語源說明如下：⁽²⁾⁽²⁹⁾⁽³⁰⁾

“*Leguminosae*”，乃“*Legumen*” 莢果之意，指本科植物之果實均為莢果。屬名“*Pueraria*” 乃為紀念瑞士 日內瓦(Geneva)之植物學家 M. N. Puerari 而命名。而種名“*calycina*”：calycinus 花萼宿存之意；*edulis*：食用，指其塊根供食用；*elegans*：“優美的”，指其開花美麗；*lobata*：lobatus 淺裂，指其葉具淺裂；*montana*：montanus “野生的”；*omeiensis*：峨嵎，指其產於四川 峨嵎山；*peduncularis*：具花梗；*phaseoloides*：phaseolus 獨木舟，指果實之狀似於獨木舟；*thomsonii*：Thomas Thomson 氏 (1817~1878)英國植物學者，專研究印度植物。

參、 葛根之生藥學文獻考察

豆科(*Leguminosae*)植物，分布於全世界，尤以熱帶為多。計 690 屬，約 17600 種⁽³¹⁾。大陸及台灣共約 160 屬 1300 餘種，其中入藥者計 112 屬，約 531 種⁽³¹⁾。*Pueraria* 屬植物全世界有約 20 種⁽³²⁾，主要分布於亞熱帶和溫帶地區。分布於亞洲熱帶地區約 15 種，而我國所產者計 11 種。

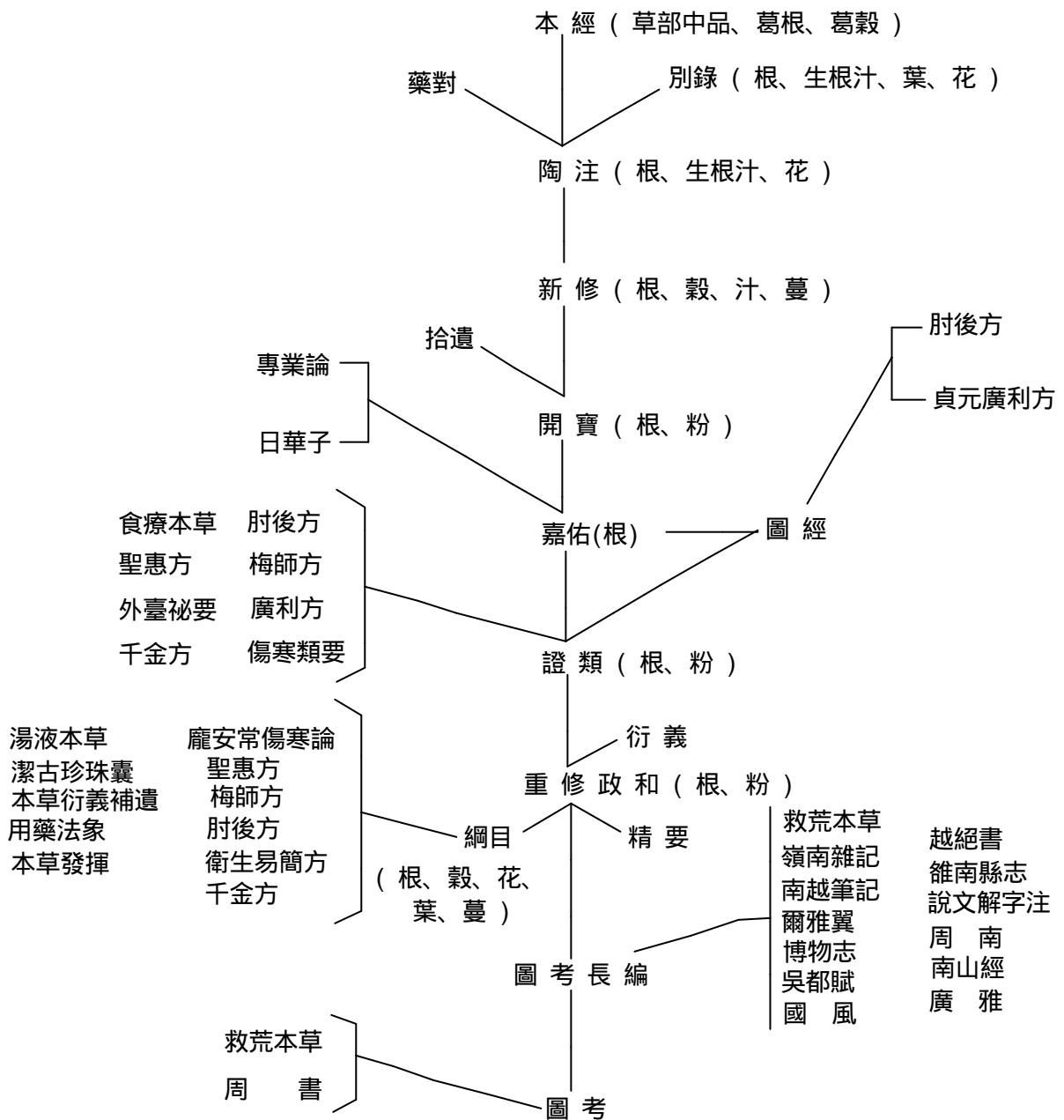
關於葛根之生藥學研究，最早見於日本東京大學藤田直市博士於 1924 年發表於藥學雜誌之生藥解剖圖，是為嚆矢。此植物據其他文獻考證，均指為 *Pueraria hirsuta* MATSUMURA。其後稻垣勳、野武亦曾就上述 *Pueraria hirsuta* MATSUMURA 繪製略圖於生藥學著作中。日本藥局方指出日本產葛根為 *P. lobata* OHWI，其異名為 *P. pseudo-hirsuta* TANG et WANG，而以中國產葛根為 *P. lobata* OHWI var *chinensis* (BENTHAM) OHWI。近年來大陸生藥學文獻分別指出 *P. lobata* (WILLDENOW) OHWI 及 *P. pseudo-hirsuta* TANG et WANG，據上述日本藥局方考訂，2 種當屬同種。⁽²⁾

肆、 葛屬植物之特徵：⁽²⁾⁽³²⁾

藤本或灌木，三出複葉，小葉有時淺裂。花藍紫或紫色，腋生，總狀花序，苞與小苞均小，心形；花萼鐘形，不等長，上面 2 片或多或少合生；旗瓣圓形或倒卵形，有耳，基部爪狀；翼瓣長方形，其中間部分常與龍骨瓣相連；雄蕊上部分離，中部合生，單獨分離者稀；子房幾無柄，胚珠多數；花柱彎曲，柱頭小。莢果線形，略平。

伍、 葛根之本草考察：⁽³³⁾

葛根為本經⁽³³⁾ 中品，別錄、陶注⁽³⁴⁾、新修⁽³⁵⁾、拾遺、開寶、藥性論、日華子、嘉祐、證類⁽³⁶⁾⁽³⁷⁾、救荒⁽³⁸⁾、綱目⁽⁵⁾以及圖考長編⁽³⁹⁾並圖考⁽⁴⁰⁾均有著錄。本經首論葛根及穀，別錄復論其生根汁、葉、花之藥能，新修增述其蔓，至開寶另立「葛根」一條件作為今附品，至綱目以葛為總名，分述葛根、葛穀、葛花、葉、蔓等五種藥用部位之藥能，長編及圖考亦有所論述。其本草系統如下：



陸、 葛根種類：⁽²⁾

(1)中國產葛屬植物計下列 11 種：

- P. calycina* FRABCHET (黃毛萼葛)
- P. edulis* PAMPANINI (食用葛)
- P. elegans* WANG et TANG (麗花葛)
- P. lobata* (WILLDENOW) OHWI (葛)
- P. Montana* (LOURRIRO) MERRILL (山葛)
- P. omeiensis* (TANG et WANG) (峨嵋葛)
- P. peduncularis* (GRAHAM) (雲南葛)
- P. phaseoloides* (ROXBURGH) BENTHAM(三裂葉野葛)
- P. thomsonii* (BENTHAM)(甘葛)
- P. wallichii* DE CANDOLLE (瓦氏葛)
- P. alopecuroides* CRAIB. (密花葛)

(2)台灣產葛屬植物目前三種：

- P. lobata* (WILLDENOW) OHWI (葛)
- P. Montana* (LOURRIRO) MERRILL (山葛)
- P. phaseoloides* (ROXBURGH) BENTHAM(三裂葉野葛)

(3)中國產葛屬植物之檢索⁽²⁾

1.托葉不脫落

2.托葉盾形或箭頭狀

3.托葉箭頭狀。萼齒較萼管長。

4.在最下方之萼齒具2個小齒，萼與其他各部密被黃色長硬毛

(1) *P. calycina* 黃毛萼葛

4.在最下方之萼齒不分開，苞片短於小苞片，頂端無一叢長毛

(2) *P. edulis* 食用葛

3.托葉盾形

4.苞片較小苞片短，幾無長硬毛；萼長7~8mm

(5) *P. montana* 山葛

4.苞片較小苞片長，頂端有一叢長硬毛，早落

5.長8~10mm；翼瓣的耳長大於寬

6.頂端小葉菱形

(4) *P. lobata* 葛

6.頂端小葉圓形

(6) *P. omeiensis* 峨眉葛

5.長12~15mm；翼瓣耳短，具較耳更呈截形之小翼

(9) *P. thomsonii* 甘葛

2.托葉舌狀。萼齒較萼管短；苞片稀長於花蕾。

3.子房具明顯子房柄；旗瓣矩形，無耳，漸狹或近於截形.....

(10) *P. wallichii* 瓦氏葛

3.子房幾無柄。旗瓣圓形，有明顯的耳。

4.龍骨瓣耳圓形。雄蕊上部部分離

(7) *P. peduncularis* 雲南葛

4.龍骨瓣無

(8) *P. phaseoloides* 三裂葉野葛

1.托葉脫落

(3) *P. elegans* 麗花葛

(4)台灣產四種葛根介紹：

1.野葛 *Pueraria lobata* (WILLDENOW)OHWI

產地：新竹楊梅鎮、苗栗縣銅鑼鄉、台中市、南投縣竹山鎮、嘉義縣
及屏東縣栽培。

形態：塊根肥大，重可達 30 公斤。多年生落葉大藤本，莖基部老化時呈木質狀，全株密被黃褐色粗毛，枝圓柱形，莖蔓長達 10m，常纏繞於其他植物攀援而上。葉大，互生，三出複葉，基部鈍形或近圓形；頂端小葉柄較長，葉片菱狀圓形，多呈 3 淺裂，長 6.5~19cm，寬 6.5~18cm，先端急尖，具小托葉 2 枚；側生小葉 1 對，偏橢圓形或偏菱狀橢圓形，具短柄，多呈 2 波淺裂，各具小托葉 1 枚；葉全緣或波狀緣，表面綠色，具稀疏淡黃褐色短伏毛，有時脫落或近於無毛，背面帶白色，密生灰白色短伏毛，葉脈兩面均突起，具稀疏淡黃褐色柔細毛；葉紙質而厚，小托葉線形，被黃褐色柔短毛，總葉柄具淺縱溝，被淡黃褐色至黃褐色毛葉柄基部特別膨大，長約 1~2cm，有時彎曲，托葉 2 枚，卵形，被淡黃褐色至黃褐色短葉毛，基部為盾狀。10~11 月開花，總狀花序，穗狀圓筒形，腋生，每節著生 2~3 朵，具短梗，總花梗被稀疏黃褐色絨毛，長 21~40 cm，總苞片 2 枚，狹披針形，具淡黃褐色短絨毛，小苞片長橢圓狀披針狀，具淡黃褐色短絨毛，早落性；花萼基部紫色，先端淡褐綠色，短鐘形，裂片 4 枚，大小不等長，最下 1 枚最長，卵形，上面 1 枚最大，廣卵形，另 2 枚幾相等，邊緣及外面均有淡黃褐色短絨毛，內面具稀疏灰白色短絨毛；花冠紫紅色或紫色，蝶形，長 2~3cm，旗瓣近圓形，長 1.9~2.4cm，寬 2~2.3cm，先端凹形，近基部中央處有淡黃色或黃色卵形斑紋，基部兩端耳垂狀，微翹；翼瓣狹橢圓形，呈 2 波淺裂，有明顯之稜狀突起，長 1.5~2.1cm，寬 0.7~1.1cm，基部爪狀，僅一邊之基部有耳；龍骨瓣較翼瓣長，長 1.9~2.1cm，寬 1~1.3cm，亦僅一邊之基部有耳，於近耳處呈狀突起；雄蕊 10 枚，成束，兩體雄蕊(9+1)，不等長，先端彎；子房線形，花柱先端彎曲，並急細尖，密被毛，柱頭圓形。

2. 山葛 *Pueraria montana* (LOURRIRO)MERRILL

產地：全省平野及至中海拔叢林及森林，並分佈於中國大陸、琉球。

形態：藤本。莖圓形或扁形，橢圓形，全株密被黃褐色粗毛，藤長達10m以上。葉互生，三出複葉，全緣或波狀緣，基部鈍形或近圓形；頂生小葉柄較長，小葉菱狀卵形或卵狀披形，長10~8cm，寬6.2~3.4cm，先端漸尖形，全緣，具小托葉2枚；線形；兩側小葉歪斜，偏卵形，具短柄，各具小托葉1枚，較中央小葉之小托葉為大；表面具稀疏淡黃褐色短伏毛，有時脫落或近於無毛，背面帶白色，密生灰白色短伏毛，葉脈兩面均隆起，具稀疏淡黃褐色~黃褐色柔細毛；葉紙質，小托葉線狀披針形，被黃褐色柔短毛，細葉柄具淺縱溝，被淡黃色至黃褐色毛，基部膨大，長約0.5~1.5cm，托葉2枚，披針形，長約1cm；被淡黃色至黃色褐色柔短毛，基部為盾狀。5~11月開花，總狀花序，腋生，每節著生2~3朵，具短梗，細花梗被稀疏黃褐色絨毛，長10.5~65cm，苞片2枚，長橢圓形針形，具淡黃褐色短絨毛，小苞片卵形，具淡黃褐色短絨毛，早落性；苞較小苞為短；花萼短鐘形，裂片5枚，大小不等長，最下一裂片最長，長橢圓披針形，上面裂片最大，廣卵形，另2裂片等長，邊緣及外面均有淡黃褐色短絨毛，內面具稀疏淡黃色短絨毛；蝶形花冠，粉紅色或淡紫色，長1.3~1.6cm，旗瓣近圓形，長1.1~1.2cm，寬1.0~1.2mm，先端凹形，基部中央具黃色卵形斑，基部兩端耳狀，微翹；翼瓣狹橢圓形，長約1.3cm，寬2~3.5cm，基部爪狀，上端兩側展開耳形；翼瓣較龍骨瓣長，龍骨瓣長約1.2cm，寬2.5~3.5cm，僅一邊之基部有耳，於近基部處另有一塊耳垂突起；兩體雄蕊10枚(9+1)，不等長，先端彎；子房線形，花柱先端彎曲，並急細尖，密被毛，柱頭圓形，7~3月結果，莢果線狀長橢圓形，扁平，長1.3~5cm，外密被褐色剛毛。

3. 三裂葉野葛 *Pueraria phaseoloides* (ROXBURGH) BENTHAM

產地：台中縣石岡鄉、彰化縣田中、台北、楊梅、南投、雲林、斗六、高雄、屏東、台東。

形態：小藤本。莖細長，匍匐地上，長 2~4m，藤長達 10m 以上，全株密被黃褐色長粗毛。葉互生，三出複葉，基部鈍形或近圓形，先端短尖形；頂生小葉，柄較長，葉片長 6~10cm，寬 4.5~9cm，菱狀圓形，2 深裂，小托葉 2 枚；側生小葉 1 對，具短柄，斜廣卵形，2 裂，外側較深，內側較淺，各具小托葉 1 枚；葉片全緣或波狀緣，上面綠色，具稀疏淡褐色長毛，葉背面灰白色，密被灰白色長毛，葉脈兩面隆起，均被淡黃褐色毛；表面脈上毛較稀疏，葉背脈上毛則密生；小托葉線形，被黃褐色柔長毛，總葉柄密被黃褐粗毛，托葉 2 枚，為長橢圓狀披針形被淡黃褐色毛，由夏至冬開花，總狀花序，花排列疏鬆，腋生，具分枝，每節著生 3~5 朵，僅 1~2 朵結果，具短梗，總花梗中部以上有花，密被淡黃褐色毛，長 5.5~15.5 cm，總苞片 2 枚，長橢圓形狀針形，具淡黃色長絨毛，小苞片為長橢圓狀披針形，具淡黃褐色短絨毛；花萼極小，鐘形，裂片 4 枚，大小不等長，最下 1 裂片最長，呈長橢圓形狀披針形，上面裂片最大，呈廣卵形，紫褐色，餘者 3 裂片為褐綠色，其間 2 裂片近相等，邊緣及外面均被淡黃褐色毛；花冠帶紫綠色，蝶形，長 0.8~1.7cm，旗瓣近圓形，倒心形，長約 1.4cm，寬約 1.3cm，先端凹形，近基部中央呈紫色，兩旁則為黃綠色，基部小片狀，直立的附屬體及 2 枚耳垂，微翹；翼瓣狹橢圓形，長約 1.5cm，寬約 0.5cm，基部爪狀，但僅一邊之基部具圓而闊的耳，且有一耳狀長爪；龍骨瓣和翼瓣幾等長，僅一邊基部有耳，有時呈獨木舟狀，基部截形，有爪，兩體雄蕊 10 枚(9+1)，不等長；子房線形，花柱先端彎曲，密被毛，柱頭圓形，由秋至冬結果，莢果圓柱狀線形，獨木舟狀，扁平，長 4.5~8.5cm，寬 0.2~0.4cm，密被黃褐色伏毛，果瓣薄革質，開裂後扭曲；種子長橢圓形，兩端截形，長約 4mm，寬及厚均約 2mm，種臍長約 2.5mm

(4)一般藥用葛根以 *P. lobata* (WILLDENOW) OHWI 及 *P. thomsonii* BENTHAM 為

主：

甘葛 *Pueraria thomsonii* BENTHAM

產地：我國西南及華南各省；分佈於越南、印度、東部喜馬拉雅山。

形態：大藤本。莖被稀生黃色展開之長硬毛和黃色近於平貼之短柔毛。

小葉 3 枚，3 裂，頂生小葉常卵菱形，先端漸尖形，基部闊楔形或近於圓形，長 14~21cm，寬 12~18.5cm，兩側 2 個小葉斜闊卵形，先端漸尖形，基部截形，長 14~21cm，寬 10~16.5cm；葉片表面綠色，背面蒼白色，兩面均被密而色黃長硬毛；葉芮柄和小葉柄亦被黃毛；托葉宿存，中部著生，針狀長橢圓形，具毛。9 月開花，總狀花序，腋生，著生十餘朵乃至多數花，長(不含總花梗)7~32cm，總花梗亦被黃毛，花具短梗，常 3 朵聚生，苞片早落，小苞片卵形或卵披針形。除偶被短硬毛外，尚有黃色長硬毛；萼外面被黃色長硬毛，內面被黃色短毛，萼齒矩形，向頂端漸狹，最下方一個萼齒較萼管稍長或長於萼管近 1 倍；花冠紫藍色，長約 1.3cm，旗瓣闊卵形，先端 2 裂，基部有 2 耳及胼胝體 2 枚，突起小圓球狀，長(爪除外)約 2cm，寬約 1.5cm，爪長約 5mm，翼瓣一邊有耳，另一邊僅具有之痕跡，龍骨瓣之耳近於截形。莢果長橢圓形，長達 10~12(13)cm，寬 1cm (9~12mm)，扁平，直，密被黃褐色長硬毛；種子 8~12 枚褐色，腎形或圓形。

(6) 一般當作食品用葛根：食用葛、三裂葉野葛、峨眉葛

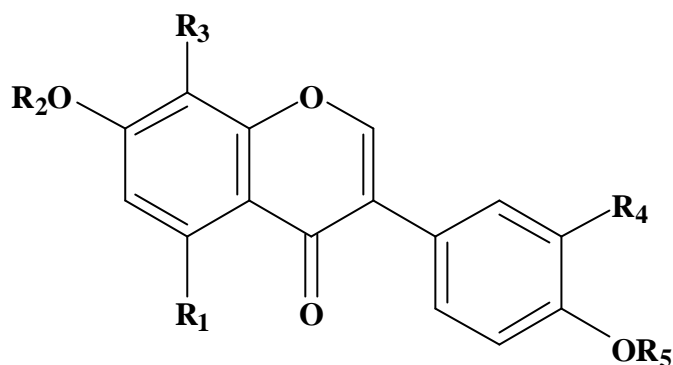
食用葛 *Pueraria edulis* P_{AMPANINI}

產地：廣西、雲南、四川。

形態：藤本。塊根肥厚，莖被稀少黃色長硬毛。小葉 3 枚，頂端 1 枚小葉卵形，先端短漸尖形，基部闊楔形或圓形，3 裂，長 9~15mm，寬 6~10mm，兩側 2 枚斜卵形，先端短漸尖形，基部截形或圓形，2 裂，長 8.5~13mm，寬 5~8.5mm，兩面稀被黃色長硬毛；小葉柄密被長硬毛；葉柄被很稀少的黃色長硬毛；托葉箭頭狀，長約 1cm；小托葉披針形。總狀花序腋生，不分枝，長 6~9cm，(不含總花梗)；在上部的苞片脫落，下部者不脫落，卵形，無毛；小苞片卵形無毛，有時頂端被稀長硬毛，長約 4cm；花梗瘦細，無毛。9 月上旬開花，紫色，長 15~17cm；萼鐘狀，外面無毛，裏面被短硬毛，邊緣被緣毛，萼齒矩形，急尖形，萼齒 5 裂，在最上面一片近於卵形，先端圓形，下面 3 枚披針形，萼與萼筒等長或稍長；旗瓣近於圓形，先端亦呈圓形，微缺，基部具兩耳，有爪，長不連爪約 15mm，寬約 13mm，爪長約 3.5mm，雄蕊一組；子房被短硬毛，殆無子房柄，基部具腺體。莢果帶形，稀被黃色長硬毛，有網脈，乾時黑色，長 5.5~6.5mm，寬約 1mm。

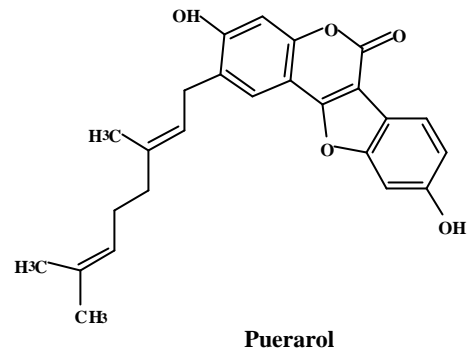
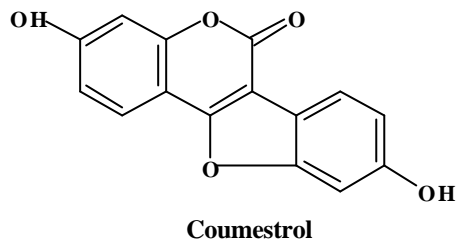
柒、葛根化學成分考察：⁽⁷⁾

(1) Isoflavones：

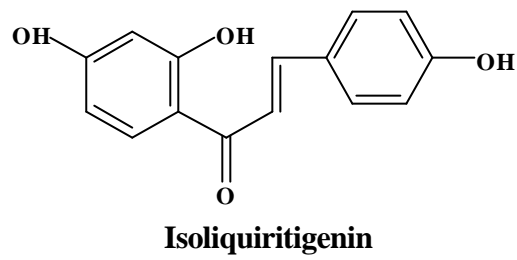


Seq. Compound	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
1 Puerarin	H	H	glc	H	H
2 Puerarin-O-xyloside	H	glc-xyl	H	H	H
3 Puerarin-xyloside	H	H	glc 6xyl	H	H
4 Puerarin 4-O-glucoside	H	H	glc	H	glc
5 3-O-hydroxy-puerarin	H	H	glc	OH	H
6 3-O-methoxy-puerarin	H	H	glc	OMe	H
7 Daidzin	H	glc	H	H	H
8 Daidzein	H	H	H	H	H
9 Daidzein 8-C-apiosyl-(1-6)glucoside	H	H	glc 6api	H	H
10 Daidzein 4,7-O-diglucoside	H	glc	H	H	glc
11 Genistin	OH	glc	H	H	H
12 Genistein	OH	H	H	H	H
13 Genistein 8-C glucoside	OH	H	glc	H	H
14 Genistein 8-C-apiosyl(1-6)glucoside	OH	H	glc 6api	H	H
15 Formononetin	H	H	H	H	Me
16 Formononetin-7-glucoside	H	glc	H	H	H

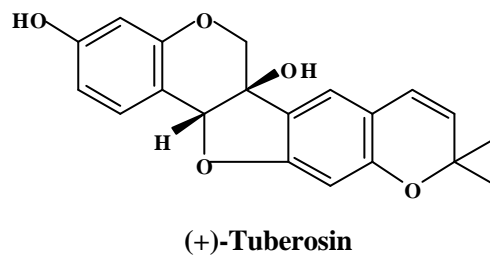
(2) Coumestrol:



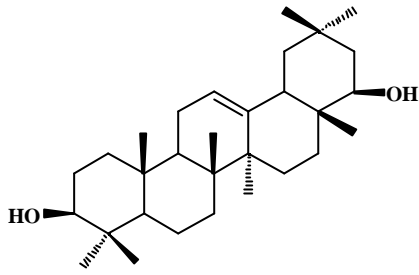
(3) Chalcone:



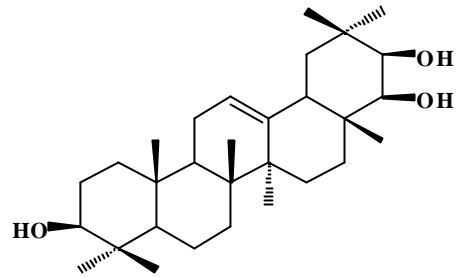
(4) Pterocarpan:



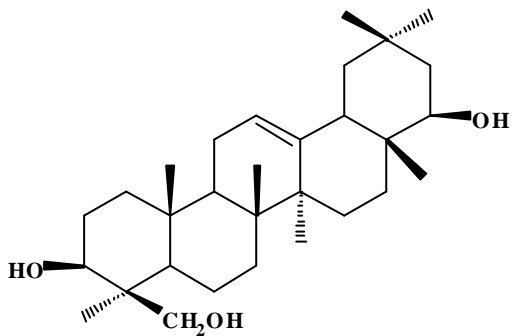
(5) Triterpenoids:



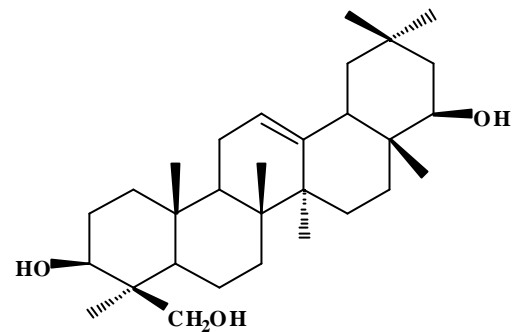
Sophoradiol



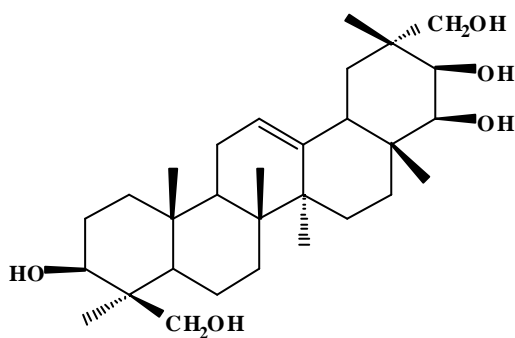
Cantoniensistriol



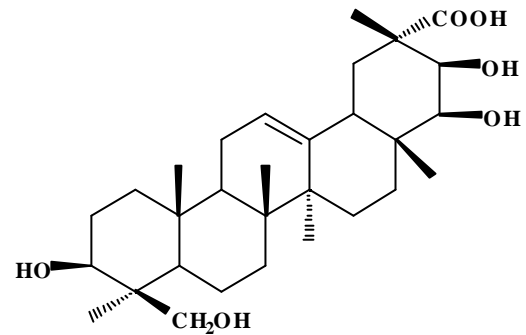
Soyasapogenol A



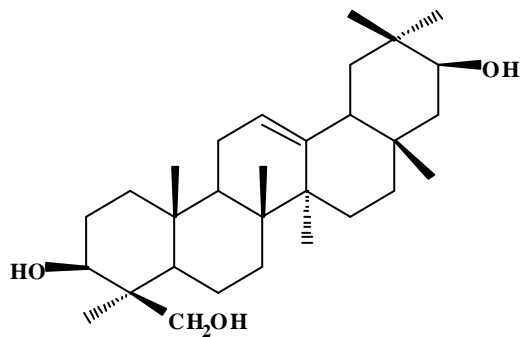
Soyasapogenol B



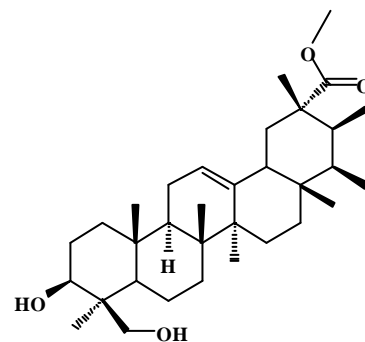
Kudzapogenol A



Kudzusapogenol B

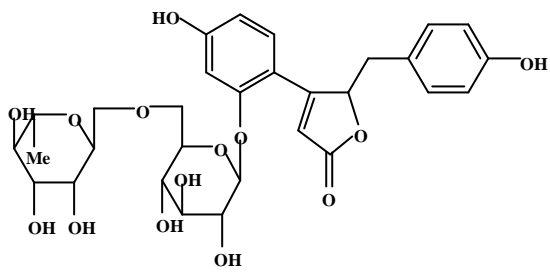


Kudzusapogenol C

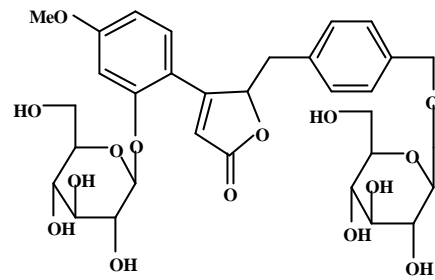


Kudzusapogenol B methyl ester

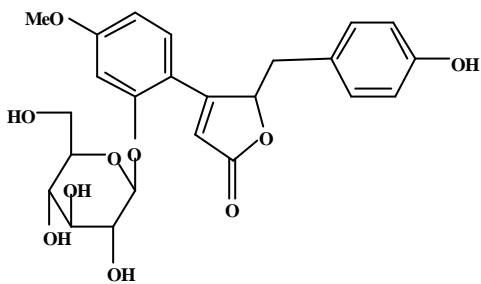
(6)Others:



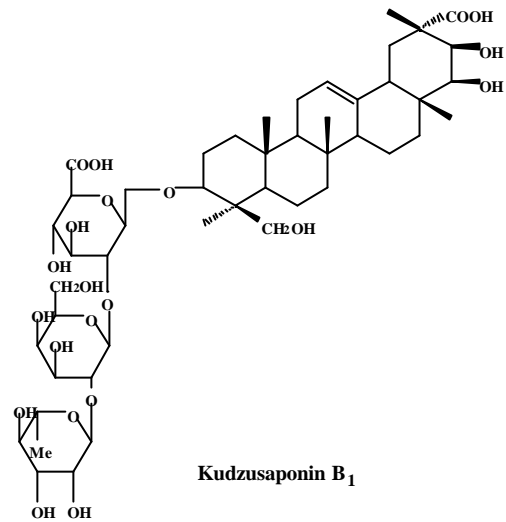
Pueroside A



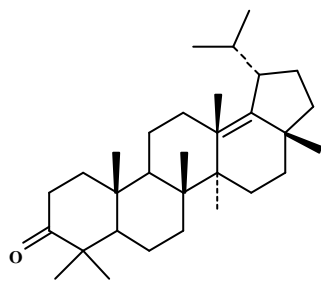
Pueroside B



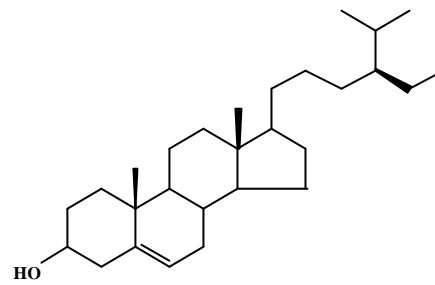
Pueroside C



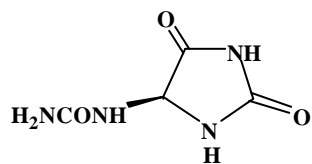
Kudzusaponin B₁



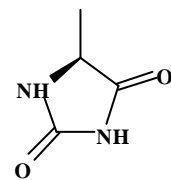
Lupenone



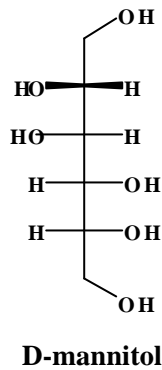
β - sitosterol



Allantoin



5-methylhydrantoin



捌、藥理考察：

綜合近代葛根的藥理研究結果，計有下列各種作用⁽⁴¹⁻⁴³⁾：

- (1) 解熱作用：葛根之水抽出液對人工發熱家兔有解熱作用。
- (2) 鎮痙作用：由小白鼠的腸管實驗，葛根成分 daidzein 有類似鎮痙作用，其效果為 papaverine 之 1/3，但其配醣體 daidzin 則無此作用。
- (3) 卵胞荷爾蒙作用：daidzein，genistein 和 formononetin 有卵胞荷爾蒙作用，但比標準品 diethylstilbesterol 弱。
- (4) 擴張冠狀動脈作用：葛根所含異黃酮素可擴張冠狀動脈血管，降低血管血流阻力。
- (5) 降血壓作用：Puerarin 有非常強的降血壓作用
- (6) 增加腦血流量作用：在麻醉狗之頸動脈注射葛根黃酮素，發現有增加腦血流量、減少血管阻力的現象，可應用於改善高血壓患者之血流量。
- (7) 其他：動物實驗顯示葛根能使血糖濃度先上升後下降。

玖、葛根指標成分的定量法考察：

年代	研究者	研究內容
1984	Hayakawa 等人 ⁽⁴⁴⁾	利用 TLC 與 HPLC 方法，定量葛根中的 puerarin, daidzin 和 daidzein 三個成分
1985	Zhao 等人 ⁽⁴⁴⁾	以 TLC 方法定量 puerarin 和 daidzein 二成分，並比較不同產地之含量
1985	Kinjo 等人 ⁽⁴⁵⁾	分離出七個野葛所含的 oleanene-sapogenols 成分
1987	Okamoto 等人 ⁽⁴⁶⁾	以 TLC 來定量 puerarin 及 daidzin
1987	Kinjo 等人 ⁽⁴⁷⁾	分析野葛中十五個成分
1988	Ohshima 等人 ⁽⁴⁸⁾	以 ODS 管柱分析七個 isoflavones 成分含量（但其解析度不佳）
1993	Zhong 等人 ⁽⁴⁹⁾	以 HPLC 測量隨著季節不同的 puerarin 含量變化狀況，發現在八月份有最高的含量，約為十月份的九倍
1993	Wen 等人 ⁽⁵⁰⁾	利用 HPLC 定量分析葛根和其相關方劑中 puerarin 的含量
1993	Yasuda 等人 ⁽⁵¹⁾	離子四級正庚基溴化銨(tetra- <i>n</i> -heptylammonium bromide) 來配對的離子對層析定量葛根中的 puerarin, daidzin 和 daidzein
1997	Hirakura 等人 ⁽⁵²⁾	分離出數個 isoflavones，並以 NMR 確定成分
1998	Wang 等人 ⁽⁵³⁾	以毛細管電泳之 CZE 模式，定量葛根中的 puerarin, daidzin, daidzein, genistein 和 biochanin A 等五個成分，並分析市售商品之含量
1998	Rong 等人 ⁽⁵⁴⁾	以 LC-MS 確認葛根中的十五個成分，其 LC 部分用兩個分析條件
2000	黃明星等人 ⁽⁵⁵⁾	開發 HPLC 及 CE 方法，來定量 puerarin, daidzin, 6,7-dimethoxycoumarin, daidzein, genistein, formononetin 和 biochanin A 等七個成分，並完成粉葛及野葛之基原鑑定

HPLC 為目前分析方法中最簡單便利且經濟的方法，不但操作簡便、分離效果佳、再現性良好且定量準確。因此本實驗採用 HPLC 來進行葛屬植物中成分 miroestrol、puerarin、daidzin、daidzein、genistin、genistein 之分析。

第三節 泰葛相關研究：

壹、*Pueraria mirifica* 基原歷史沿革：

大約在七十年前，泰國北部清邁(Chiengmei)當地盛傳一種著名球根植物，名字叫 Kwao Keur，別名有 Guao Krua、Kwao Khaao、Kwao Khua 和 Paukse，可以讓老人重新恢復青春，充滿活力。西元 1960 年，著名文獻 Nature 內有一段描述這神奇植物⁽¹⁰⁾，民間傳說有一個人長期服用此植物，活到 280 歲。在當地，謠傳有一老婦人服此藥後，原本停經的情況消失，月經又再產生；一性無能老人，竟然也老來得子。消息散播開來後，此種植物變成當地炙手可熱的天然產品，後來，一個未經證實的消息，敘述它會致命，導致它又迅速地沒落了。⁽⁹⁾

至 1932 年，Dr. Kerr 認為 *Pueraria mirifica* 是 *Butea superba*⁽⁵⁶⁾，1933 年 Wint 以相同題材再度提出相同觀點，這篇論文引起了全世界的熱烈迴響⁽⁵⁷⁾。事實上，早期 Kwao 這個名字在泰國北部是指 Tong Kwao (*Butea frondosa*)及 Kwao Keur (Keur 指 climber, *Butea superba*)。Dr. Kerr 因為看到 Kwao Keur 的塊根及葉片像 *Butea superba*，所以，一直認為是同一種植物。

後來，許多天然物學家提出疑問，在其他國家並沒有發現 *Butea superba* 的塊根。因此，開始著手進行調查，發現在泰國其他地方的 *Butea superba* 也沒有塊根。接著，更大規模的調查開始進行，經過研究所有叫做或用於醫藥的 Kwao 有關植物，排除了 *Butea superba* 的可能，也導致許多錯誤別名的產生。這種現象也許就可以解釋以前死亡案例的產生。

直到 1946 年，泰國葛被確認，發現葉片的確很像 *Butea superba*，但是又沒有發現花。因此，只有把根及塊莖送去曼谷做實驗研究，研究結果顯示內含物質與 1939 年 Mr. Vanijvatana 在 Thai. Science Bulletin 發表論文所提內容相符⁽⁵⁸⁾，相同情況也在 1941 年 Dr. Ketsusinh 及 Dr. Sukhavachana 在 Journal of the Medical Association⁽¹⁰⁾所發表的論文相呼應。由此可見，的確在以前是 *Butea superba* 的名字冠在泰葛上，而以前就已經以泰國葛在做研究了。

終於，1947 年二月採集到了泰國葛的花，在 Royal Botanic of Kew 的鑑定下，確定為葛根屬新種。從此，拋棄了 *Butea superba* 的包袱，擁有 "*Pueraria mirifica*" 的學名⁽⁹⁾。

貳、泰葛植物基原及混用植物(*Butea superba*)辨別

(1)植物基原：⁽²⁸⁾

被子植物門(Angiospermae)

雙子葉植物綱(Dicotyledoneae)

離瓣花亞綱(Choripetalae)

薔薇目(Rosales)

豆科(Leguminosae)

蝶形花亞科(Papilionoideae)

葛根屬(*Pueraria*)

泰葛(*Pueraria mirifica*)

(2)*Pueraria mirifica* 與 *Butea superba* 之比較： (59)

Pueraria mirifica:木本藤蔓植物，根的上頭為塊根

1. 別名：Guao Krua、Kwwao Khaao、Kwao Khua、Paukse、白高戈
2. 葉子:呈羽毛狀並有三片複葉，有托葉，端葉為長菱形、兩片側葉為橢圓形，葉端尖、膜狀組織及軟毛平覆於葉面。
3. 花:很小，長約為 0.8 公分、寬約為 0.2 公分，花色為紫藍色，呈長形綿密的花球狀，苞片及吹苞型小、易脫落，花尊為鐘形狀，並有不平均的裂片。
4. 塊根:近似圓形或橢圓形，生長成一個或是連續三至四個(呈念珠狀)，大小不同，從很小的到直徑約 20 公分的都有，果肉呈白色，含有澱粉質，同時其內腔含有白色汁液、微凹形。

Butea superba:木本攀緣植物，根的上頭為塊莖。

1. 別名：Guao Daeng、紅高戈
2. 葉子:呈羽毛狀並有三片複葉，質地大而厚，擁有軟硬實的中脈，葉端常為微凹形的，端葉較兩月側葉大。
3. 根:呈尖細管狀，表層皮間有黏稠的血紅色物質，內層纖維質部分為淺黃色，含有纖維質、澱粉質，若將其切開，則切面會立刻變成棕色。

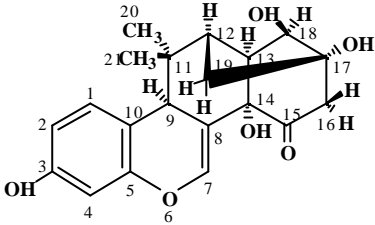
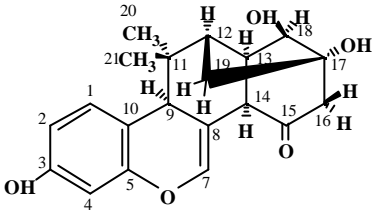
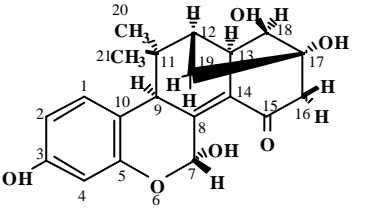
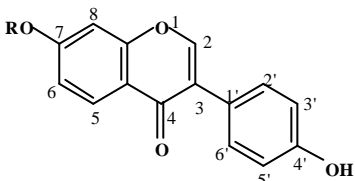
參、泰葛藥理藥效活性

Organ	Extract	Route	Dose		Effect	Ref.
Leaf	95% EtOH	S. C.	-	Mouse(Infant) Female	Estrogenic effect(weak)	15
	Hot H ₂ O	Oral	-	Human adult Female	Mammary gland expansion	59
Stem	95% EtOH	S. C.	-	Mouse(Infant) Female	Estrogenic effect(weak)	15
Root Tuber	Plant	Oral	-	Male	Aphrodisiac effect	60
	Plant	Oral	-	Man Female	1.Rejuvator 2.not be taken by young people 3.Folklore claim that a man using this plant lived to 280 years of age.	10
	Hot H ₂ O	Oral	-	Human adult Female	Mammary gland expansion	59
	Root ext.	Gastric Intubation	50mg/Ratl QD	Rat(Mid-pregna ncy,Day12-18)	Abortifiacient effect(Active) No effect on length of gestation and duration of fetal explusion	61
	Root ext.	Gastric Intubation	50mg/Rat QD	Rat(Late pregnancy)	Abortifiacient effect(Inactive)	
	Root ext.	Gastric Intubation	50mg/Rat QD	Rat(Late pregnancy)	Abortifiacient effect(Inactive)	62
	Hot H ₂ O	Gastric Intubation	100mg/g	Rat Male	Antiferlity effect(Active) Only male rats- high dose of ext. Female rats after mating: number,size of implantations gestation length duration of fetal explusion	63
	Root ext.	In Ration	5-7% of diet	Quail(Japanese) Male	Antiferlity effect(Active) weight of testis size of seminiferous tubules, immature sertoli cells,leydig cells	64
	Root ext.	Gastric Intubation	-	Rat(pregnant) Dosing on days 1-10	Antiimplantation effect(Active)	62

Root ext.	Gastric Intubation	-	Rat(pregnant)	Antiimplantation effect(Active)	
Root ext.	Gastric Intubation	-	Rat(pregnant)	Antiimplantation effect(Inactive)	
Root ext.	In rotation	5-7% of diet	Quail(Japanese) Male	Anspermatogenic effect(Active)	64
Root ext.	In rotation	5.10% of diet	Quail(Japanese) Male,Female	Cholesterol inhibition(Active)	65
Root ext.	Gastric Intubation	1.0 mg	Rat(immature ovariectomized rat) Female	Esgtrogenic effect(Inactive)	62
95% EtOH	S.C.	-	Dog Female	Estrogenic effect(Active)	60
95% EtOH	S.C.	-	Rat(Castrate) Female	Estrogenic effect(Active)	
95% EtOH	S.C.	-	Mouse(Infant) Female	Estrogenic effect(Active)	15
95% EtOH.	S.C.	-	Mouse(Infant) Female	Estrogenic effect(Active)	14
95% EtOH	S.C.	-	Dog Female	Estrogenic effect(Active)	60
Root ext.	In rotation	5.10% of diet	Quail(Japanese) Male,Female	Hypercalcemic effect(Active)	65
Root ext.	In rotation	5.10% of diet	Quail(Japanese) Male,Female	Plasma protein conc. (Active)	
Root ext.	Gastric Intubation	100mg/g TID,14 days	Rat Male	Spermicidal effect(Active)	63
95% EtOH	S.C.	11.32mg/Rat QD 22~37 days old -51~56 days old	Rat(Gonadectomized,Gonadoparathyroidectomized) Female,Male	Calcinogenic effect(Active)	60
				Calcium conc. of serum width of epiphyseal cartilage of the proximals end of the tibia	

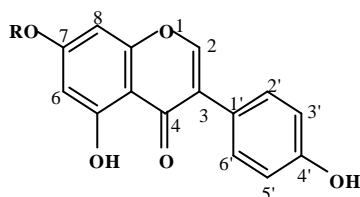
肆、泰葛化學成分考察：

1.Oxygen heterocycles

Compound	Structure	Effect	Ref.						
<p>(+)-Miroestrol</p> <p>$C_{20}H_{22}O_6$</p> <p>Mw = 358</p> <p>Yield = 2×10^{-3} %</p>		Potent Estrogenic effect	10~17 66 67						
<p>(+)-Deoxymiroestrol</p> <p>$C_{20}H_{22}O_5$</p> <p>Mw = 358.</p> <p>Yield = 2×10^{-3} %</p>		Potent Estrogenic effect	67						
<p>(+)-Isomiroestrol</p> <p>$C_{20}H_{22}O_6$</p> <p>Mw = 358.</p> <p>Yield = 1.9×10^{-3} %</p>		-							
2. Isoflavones									
<p>Daidzein</p> <p>$C_{15}H_{10}O_4$</p> <p>Mw = 254.242</p> <p>Yield = 4.616×10^{-2} %</p>		Antiinflammatory Antileukemic Estrogenic Lipase-Inhibitor Antiosteoporotic Antioxidant	61 62 65						
<p>Daidzin</p> <p>$C_{20}H_{21}O_9$</p> <p>Mw = 416</p> <p>Yield = 1.259×10^{-3} %</p>	<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th></th> <th>Daizein</th> <th>Daidzin</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>R</td> <td>H</td> <td>Glu</td> </tr> </tbody> </table>		Daizein	Daidzin	R	H	Glu	Antidipsomantic Antioxidant Antispasmodic Cancer-Preventive Estrogenic	
	Daizein	Daidzin							
R	H	Glu							

GenisteinC₁₅H₁₀O₅

Mw = 270.241

Yield= 6×10⁻⁵%

Genistein
R | H | Glu

Antioxidant
Antiaggregant
Antiinflammatory
Antileukemic
Anticancer
Cytotoxic
Lipase-Inhibitor
Uterotrophic

61

62

GenistinC₂₁H₂₀O₁₀

Mw = 432

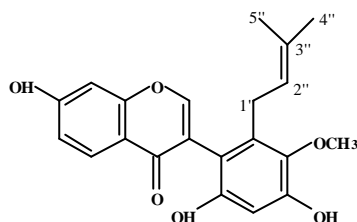
Antioxidant
Estrogenic
Fungicide

62

66

KwakhurinC₂₁H₂₀O₆

Mw = 368.385

2.3×10⁻³%Yield = 7.6×10⁻⁴%

-

65

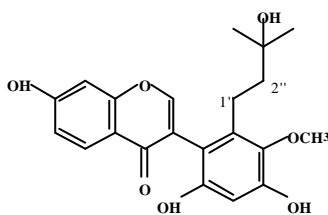
67

Kwakhurin hydrateC₂₁H₂₂O₇

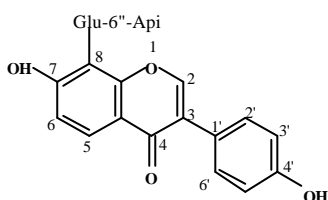
Mw = 386.401

-

67.

**Mirificin**C₂₆H₂₈O₁₃

Mw= 548.99

Yield = 1.61×10⁻³%6×10⁻³%2.96×10⁻³%

Estrogenic

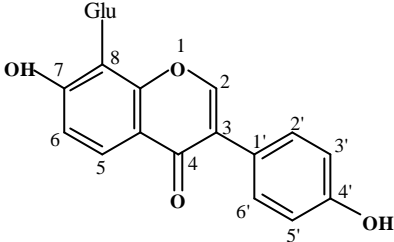
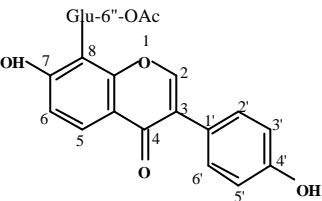
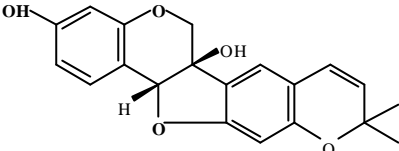
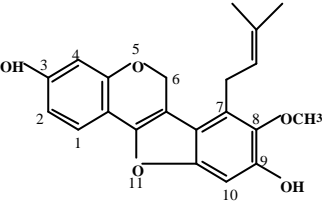
61

62

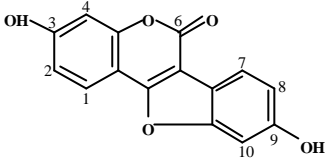
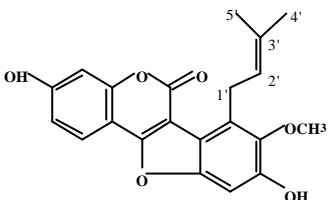
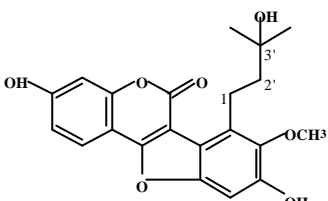
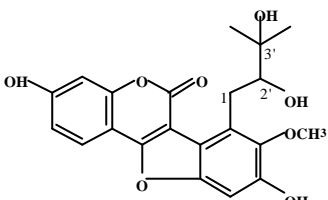
67

68

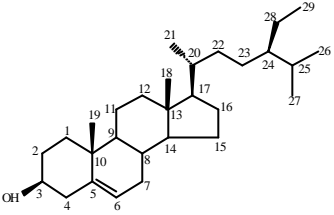
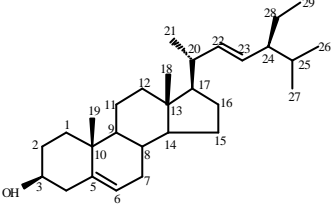
69

<p>Puerarin $C_{21}H_{20}O_9$ Mw = 416 Yield = $2 \times 10^{-2}\%$ $6.41 \times 10^{-3}\%$</p>		<p>Antiadrenergic Antiischemic Antimyocarditis Hypoglycemic Antihypertensive</p>	<p>61 62 67 68 69</p>
<p>Puerarin-6''-monoacetate $C_{21}H_{20}O_9$ Mw = 458.384</p>		<p>-</p>	<p>67.</p>
<p>(3)Petrocarpan</p>			
<p>(+)-Tuberosin $C_{20}H_{18}O_5$ Mw = 338.359 Yield = $1.58 \times 10^{-3}\%$</p>		<p>Antistaphylococic Antitubercular Fungicide Pesticide</p>	<p>63</p>
<p>Puemiricarpane (new) $C_{21}H_{20}O_5$ Mw = 352.1231 Yield = $1.79 \times 10^{-3}\%$</p>		<p>Estrogenic (MCF-7 cell line)</p>	<p>61</p>

(4) Coumestan

<p>Coumestrol $C_{15}H_8O_5$ Mw = 268.21 Yield = $6.8 \times 10^{-5}\%$</p>		<p>Antilipedemic Uterotrophic Antiosteoporotic;</p>	<p>62 66</p>
<p>Mirificoumestan $C_{21}H_{18}O_6$ Mw = 366.370</p>		<p>-</p>	<p>66.</p>
<p>Mirificoumestan hydrate $C_{21}H_{20}O_7$ Mw = 384.385</p>		<p>-</p>	<p>66.</p>
<p>Mirificoumestan glycerol $C_{21}H_{20}O_8$ Mw = 400.384</p>		<p>-</p>	<p>66.</p>

(4)Phytosterol

<p>-sitosterol</p> <p>$C_{29}H_{50}O$</p> <p>Mw = 414</p>		-	
<p>Stigmasterol</p> <p>$C_{29}H_{48}O$</p> <p>Mw=412</p>		-	
Sucrose		3%	52

特有成分 Miroestrol:

1. 強效的雌性激素作用: (15-19)

1-1 促進子宮生長的效價

* Miroestrol (i.p.) = miroestrol (s.c.) = stilboestrol (i.p.) = oestradiol-17 β (i.p.)

* stilboestrol (s.c.) = oestradiol-17 β (s.c.) > oestriol (i.p.) = oestriol (s.c.)

1-2 促進子宮內膜產生液體的效價

* Miroestrol (i.p.) = miroestrol (s.c.) = stilboestrol (i.p.)

= stilboestrol (s.c.) > oestradiol-17 β (i.p.) = oestradiol-17 β (s.c.) > oestriol (i.p.) = oestriol (s.c.)

1-3 促進陰道增生的效價

* Stilboestrol (i.p.) > miroestrol (i.p.) = miroestrol (s.c.)

> stilboestrol (s.c.) = oestradiol-17 β (i.p.) = oestradiol-17 β (s.c.) = oestriol (i.p.) > oestriol (s.c.)

2.作用與用途:⁽¹⁶⁻¹⁹⁾

1. 雌激素作用：具有很強的雌激素作用。小鼠試驗其活性為 17 β -雌二醇的 1.3 倍。小鼠皮下注射，強度與 17 β -雌二醇相等，為雌性酮的 2.2 倍。大鼠皮下注射，導管試驗活性為 17 β -雌二醇的 70%，陰道角化活性為 25%。小鼠口服，子宮生長活性為己烯雌酚的三倍。大鼠口服陰道角化活性強度為己烯雌酚的三分之二。
2. 臨床觀察：10 例閉經如人工絕經婦女每天給藥 5mg 和 1mg，均產生明顯的雌激素作用，撤藥後很少產生出血現象，毒副作用較小。

第四節 白血病及藥理活性試驗簡介

Leukemia (白血病，又稱作血癌)，是一種常見的血液癌病變，一般臨床上常見白血病的特徵為血球形成過程中一種或多種未成熟血球細胞無法正常分化並持續增生這些不正常的血球細胞，導致造血組織異常增生，浸潤身體各大組織，造成各器官功能失調，由於成熟白血球劇減而易受感染，並且產生發燒、畏寒及其他類似流行性感冒的症狀；紅血球減少而容易出現貧血，臉色蒼白、覺得疲倦、虛弱、沒有食慾而體重減輕；血小板量不足而造成出血、瘀青、牙齦腫脹等現象，除此之外，尚有脾臟腫大、骨頭或關節疼痛、個體活動力降低等病症出現。

而白血病屬於血液癌症的一種，癌細胞的形成，主要是外來致癌性因子刺激或內生性的基因突變，使生物體內細胞的生長、分化、增殖，自然凋亡的生命週期調控出現不平衡，導致細胞不正常的增生與細胞分化能力降低或喪失，進而細胞恣意成長且四處轉移，形成癌細胞。而其中細胞不正常增生的原因，可能與細胞週期運行異常及細胞凋亡途徑發生改變有關。

細胞週期 (Cell cycle)，其所指細胞從上一次細胞分裂結束開始到下一次細胞分裂為止的過程。而此過程由 G_1 、S、 G_2 、M 四個時期所構成，各時期各司其職。細胞的增殖作用主要受到細胞週期的調控，然而，細胞在通過 M 期後，一部份進入細胞週期繼續增殖，另一部份成為 G_0 細胞，而 G_0 通過程序性和非程序性途徑，最後死亡。也有部分細胞經分化，發展成更具完整性、功能性的細胞。

人體內的正常細胞多半停留在 G_0 - G_1 期 (G_0 - G_1 arrest) 進一步成熟分化，而癌細胞不同於正常細胞之處就是因為細胞週期的失控而導致細胞不斷的增殖與複製不成熟的幼稚細胞，如此惡性循環變造成癌症一發不可收拾，所以若能以藥物將不正常之增殖給停止，當然也促成了分化成熟的進行。

白血病臨床的化療藥物包括烷化基、抗代謝藥物，抗生素及激素等，這些藥物副作用較強，且對於重要防禦作用的淋巴細胞、骨髓造血細胞的破壞較大，使機體對癌細胞、感染失去抵抗力，臨床上白血病患者死於肺炎、敗血症、尿毒症等化療副作用的病例並不少見。大陸以中藥提取研製了較多的抗白血病製劑，並對中藥及天然藥物的抗白血病作用進行了實驗研究。⁽²³⁾⁽²⁴⁾發現中藥及天然藥物不但副作用小，還具有著重整體、攻擊兼施的優點，這是一些化療藥物所不能比擬的，以中藥及天然藥物中提取有效製劑，已經成功為抗白血病的重要途徑。

壹、一般抗白血病藥物的作用可分三大類：

1.細胞毒型藥物：

1. 1 損傷 DNA，抑制 DNA、RNA、蛋白質合成。(大豆皂)
1. 2 抑制白血病細胞分裂增殖
1. 3 干擾白血病細胞的能量代謝
1. 4 改變癌細胞環核 酸含量
1. 5 干擾膜信息傳遞
1. 6 影響膜內外電荷

2.提高機體免疫力的免疫型藥物：

不是表現在直接細胞毒作用，而是通過提高機體免疫力而達到殺死腫瘤細胞的作用。(靈芝多醣、香菇多醣、蟲草多醣通過促進機體免疫功能而實現的。大豆皂 可增加機體細胞免疫功能。)

3.誘導分化類藥物：

本研究基於開發 1,3 類型藥物，進行對泰葛粗抽物及分離化合物的活性測試，以期望能開發抗白血病症用藥。

貳、藥理檢測方法：

(1)抗增殖活性測定：(MTT assay)

本研究藥理實驗模式利用 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-diphenyl)-tetrazolium bromide (MTT)活性測試來檢測粗抽物及化合物測知不同濃度對 HL-60 cell line 增殖的影響。MTT 染劑可穿透活細胞的細胞膜經由粒線體上酵素的還原而成藍紫色反應，在利用 DMSO 將細胞膜溶解後釋出藍色染料於 570 nM 下測量吸光值得多寡，於是便可以得到粗抽物及化合物對細胞增殖比例的百分比^(7~10)。

(2)細胞分化活性測定：

本研究藥理實驗模式利用硝基藍四氮 (nitroblue tetrazolium: NBT)溶液來做分化活性測定，主要原理是利用白血病細胞分化成熟時，可恢復吞噬微生物或異物的功能，此時，細胞內酵素活性會增加許多，並且會釋放出超氧化物，像是 superoxide，去抵禦外來物質的侵犯，也由於它的還原性，將 NBT 還原成藍黑色的 formazan 化合物沈積在細胞內。測量誘導分化的能力，則用顯微鏡檢測 200 左右的細胞計算藍黑色細胞所佔比例，即為誘導分化的比例的百分比，也就是誘導分化能力。

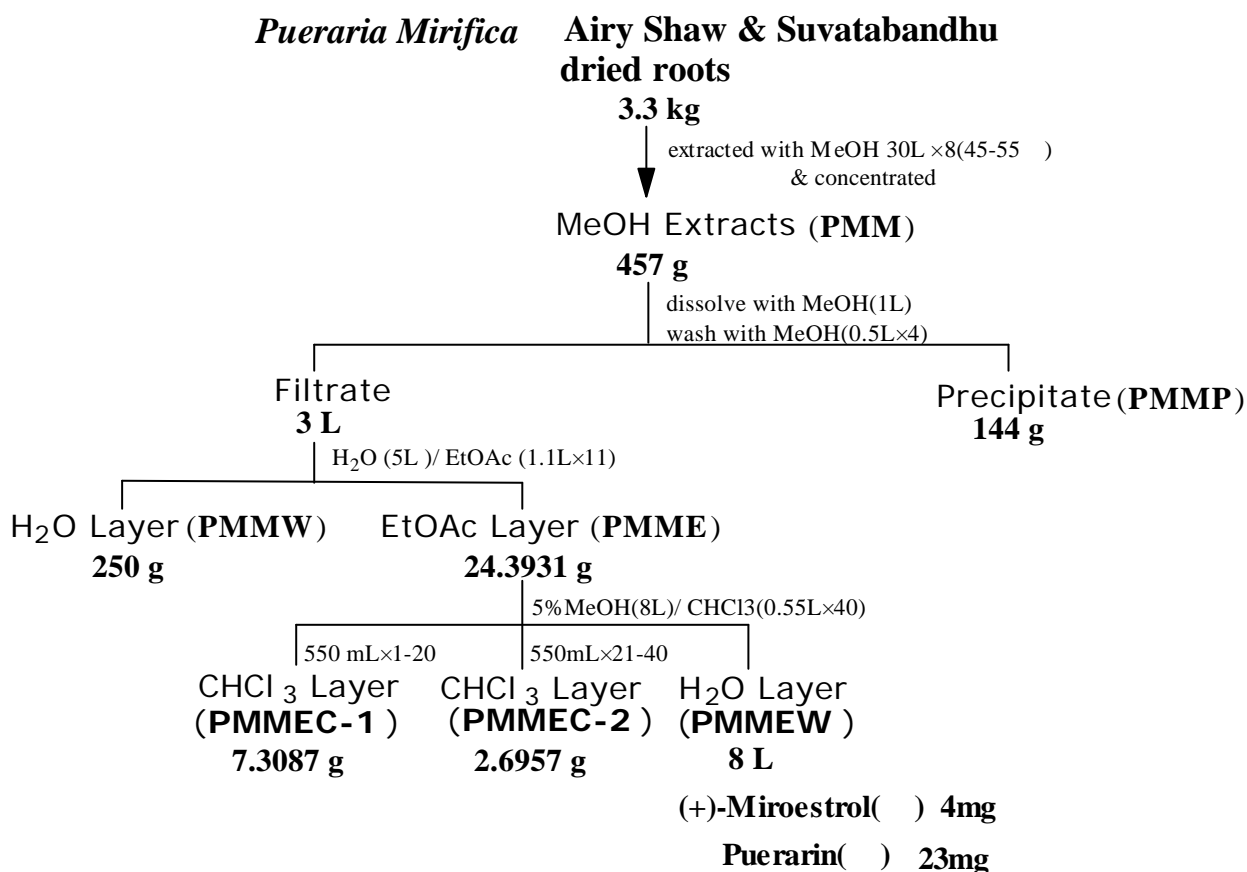
第二章 泰葛之萃取分離與純化

* 兩次的泰葛成分萃取分離共獲得四個化合物。

第一節 第一次抽取與分離純化(尋找葛雌素來做定量)

泰國北部取得泰葛(*Pueraria mirifica*)的根，陰乾後為 3.3Kg。泰國方面鑑定基原為豆科植物(*Leguminosae*)，葛根屬(*Puraria*)植物泰國葛根(*Pueraria mirifica*)。將陰乾後的根部切碎後，甲醇浸泡,甲醇粗抽出物(MeOH extracts)457 g，乾重為 390g，抽出率為 13.8%。

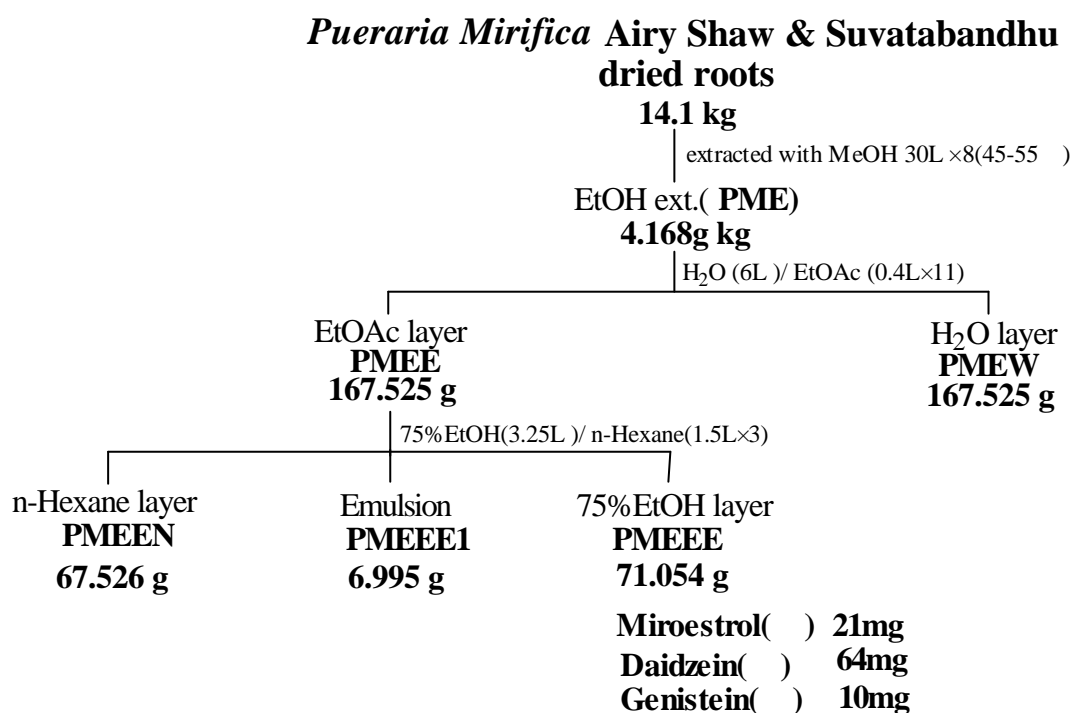
甲醇抽出物(MeOH extracts)457g，依 Scheme 1.的方法，依序純化分離而得兩個化合物：Miroestrol及 Puerarin。



Scheme 1. The first time extraction and partition of dried roots of *Pueraria Mirifica* Airy Shaw & Suvatabandhu

第二節 第二次抽取與分離純化

利用分離得葛雌素，再次分離純品及利用 HL-60 細胞測測粗篩物的活性藥理。利用 Scheme 2.的方法，在 PMEEE (75%EtOH layer)分離而得三個化合物：Miroestrol()、Daidzein()及 Genistein()。(Scheme 2.)



Scheme 2. The second time extraction and partition of dried roots of *Pueraria Mirifica*Airy Shaw & Suvatabandhu

第三章 結構解析

Compound() (Miroestrol)結構解析:

(1)物理性質和初鑑定：

1. 結晶：無色稜狀結晶（甲醇再結晶或氯仿 - 甲醇中再結晶）。
2. 熔點：270-273（文獻為 268~270）⁽¹⁰⁻¹¹⁾
3. TLC 片經 CHCl_3 : $\text{MeOH} = 10 : 1$ 溶媒展開後， $R_f = 0.3$ ；經 Ethyl acetate : cyclohexane : $\text{EtOH} = 45 : 45 : 10$ 溶媒展開後， $R_f = 0.37$ 。噴 10% H_2SO_4 呈褐色點； I_2 薰呈淡褐色反應。

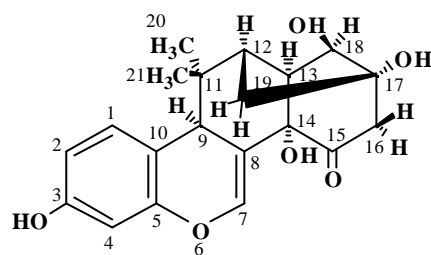
(2)EI-MS(Chart 1)：分子的離子峰應該為 m/z 358 $[\text{M}]^+$ ，分子量可能為 358，根據文獻⁽⁵⁹⁾，葛雌素(Miroestrol)的分子量為 358，故猜測可能為此化合物葛雌素。基峰分子離子峰為 m/z 55

(3)IR 光譜(Chart 1)：KBr 打片， 3480cm^{-1} 及 3403cm^{-1} 處有羥基(-OH)的特性吸收；在 2963cm^{-1} 處有不飽和氫(=C-H)的伸縮振動特性的吸收； 1713cm^{-1} 處有 -C=O 的特性吸收； 1659cm^{-1} 有 OCH=C 的吸收， 1659cm^{-1} 及 1504cm^{-1} 為芳香環(aromatic ring)的特性吸收，在 1281cm^{-1} 處有 -C-O-C 的特性吸收

(4)UV 光譜(Chart 2)：甲醇溶解，吸收光譜在 218nm 有最大吸收波長，在 255nm 有一肩部的矮峰，285nm 有一峰，文獻記述 Miroestrol 之 UV 的最大吸收波長為 217nm，285nm 為第二高的吸收峰，255nm 亦有吸收的矮峰，推測有可能是葛雌素(Miroestrol)。⁽¹⁰⁻¹¹⁾

(5) $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HMQC, DEPT, COSY and HMBC spectral data:
(參照所附光譜資料)(Chart. 3~9)

由 δ 6.99ppm (H-1)和 δ 6.50ppm (H-2)、 δ 6.50ppm (H-1)和 δ 6.30ppm (H-2)有相同的偶合常數，並經COSY證明後，可知相互有偶合，加上DEPT顯示為CH。 δ 2.74ppm (H-12)和 δ 2.43ppm (H-13)、 δ 2.74ppm (H-12)和 δ 1.99ppm (H-19)、 δ 2.89ppm (H-12)和 δ 2.57ppm (H-19)有相同的偶合常數，加上COSY及Dept的證明，可知 δ 2.74ppm (H-12)和 δ 2.43ppm (H-13)為CH， δ 1.99ppm (H-19)而為 $-\text{CH}_2$ 。其餘像是 δ 6.29ppm (H-7)、 δ 3.31ppm (H-9)、 δ 3.69ppm (H-18)、 δ 0.56ppm (H-20) δ 1.23ppm (H-21)，這些皆為單一峰，表示並無鄰近的H可偶合，經由與COSY的圖譜比對，確定並無任何偶合情況，與Miroestrol的結構相符合。特殊的ddd峰出現在 δ 1.23ppm，應該是和H-12及兩個H-19偶合的緣故，COSY圖譜也印正了此點。另外，HMBC顯示，偶合位置也是以 3J 最明顯。對過了所有圖譜，其訊號符合(+)- Miroestrol的訊號，起光譜資料，茲整理如Table 1.而 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 的資料與文獻⁽⁶⁷⁾比對(Table 2.)，亦相當符合。



(+)-Miroestrol

Table 1 . $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HMQC, DEPT, COSY and HMBC spectral data of (+)-Miroestrol

Position	(+)-Miroestrol(CD_3OD)					
	^1H (HMQC)	^{13}C	DEPT	COSY	NOESY	HMBC
1	6.99(<i>d</i> ,8.46)	131.2	CH	H-2	H-2	C-3(3J), C-5(3J),C-9(3J)
2	6.50(<i>dd</i> ,8.46,2.56,)	112.0	CH	H-1,H-4	H-1	C-4(3J),C-10(3J),C-3(2J), C-5(4J)
3	-	158.0	C	-	-	-
4	6.30(<i>d</i> ,2.56)	103.6	CH	H-2	-	C-2(3J),C-10(3J),C-3(2J), C-5(2J)
5	-	153.7	C	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	6.29(<i>s</i>)	139.7	CH	-	-	C-5(3J), C-14(3J),C-8(2J)
8	-	116.3	C	-	-	-
9	3.31(<i>s</i>)	40.7	CH	-	-	-
10	-	113.5	C	-	-	-
11	-	37.9	C	-	-	-
12	2.74(<i>ddd</i> ,9.6,5.56,2)	45.5	CH	H-13 H-19	-	C-14(3J), C-13(2J)
13	2.43(<i>d</i> ,5.56)	51.0	CH	H-12,H-18	-	C-15(3J),C-12(2J), C-14(2J)
14	-	79.7	C	-	-	-
15	-	210.7	C	-	-	-
16	2.57(<i>dd</i> ,18.5,1.4) 2.89(<i>d</i> ,18.5)	55.2	CH_2	H-19,H-16	H-16	C-14(3J),C-18(3J), C-15(2J),C-17(2J)
17	-	78.0	C	-	-	-
18	3.69(<i>s</i>)	79.3	CH	H-8,H-13	-	C-14(3J), C-12(3J),C-17(2J)
19	1.88(<i>dd</i> ,14,9.6) 1.99(<i>br. t</i> ,12.4)	40.7	CH_2	H-19,H-12 H-16	H-19	C-11(3J),C-14(3J),C-18($3J$) C-17(2J), C-12(2J)
20	0.56(<i>s</i>)	22.5	CH_3	H-21	-	C-12(3J),C-9(3J),C-11(2J),C-19(2J)
21	1.23(<i>s</i>)	32.4	CH_3	H-20	-	C-12(3J),C-9(3J),C-11(2J), C-19(2J)

δ in ppm, J in Hz.

s: singlet, *d*: doublet, *dd*: double doublet

ddd: double double doublet *br. t.*: broad triplet

Table2. Spectrum data of Compound () and (+)-Miroestrol⁽⁶⁷⁾

Position	Compound ()		文獻之(+)-Miroestrol	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
1	6.99	131.2	6.99	131.2
2	6.50	112.0	6.50	112.0
3	-	158.0	-	158.3
4	6.30	103.6	6.30	103.3
5	-	153.7	-	153.8
6	-	-	-	-
7	6.29	139.7	6.29	139.7
8	-	116.3	-	116.5
9	3.31	40.7	3.31	40.8
10	-	113.5	-	113.5
11	-	37.9	-	38.0
12	2.74	45.5	2.74	45.6
13	2.43	51.0	2.43	51.2
14	-	79.7	-	79.7
15	-	210.7	-	210.5
16	2.57 2.89	55.2	2.58 2.90	55.3
17	-	78.0	-	78.0
18	3.69	79.3	3.69	79.3
19	1.88 1.99	40.7	1.88 1.99	40.7
20	0.56	22.5	0.56	22.5
21	1.23	32.4	1.23	32.5

Compound () 結構解析

(1) 物理性質和初鑑定：

1. 結晶：無色針晶(甲醇再結晶)。
2. 熔點：187-190
3. TLC 片經溶媒 CHCl_3 : MeOH : H_2O = 20 : 10 : 1 溶媒展開後展開後， $R_f = 0.3$ 。噴 10% H_2SO_4 呈淡黃色點，初步可推定本化合物為異黃酮類化合物。

(2) EI-MS (Chart 10.): 分子的離子峰應該為 m/z 416 $[\text{M}]^+$ ，分子量可能為 416，基峰分子離子峰為 m/z 16 $[\text{M}-400]^+$

(3) IR 光譜 (Chart 11.): KBr 打片， 3457 cm^{-1} 處有羥基(-OH)的特性吸收； 1709 cm^{-1} 處有 -C=O 的特性吸收； $1600\sim 1450\text{ cm}^{-1}$ 有芳香環(aromatic ring) 的特性吸收，在 1255 cm^{-1} 處有 -C-O-C 的特性吸收

(4) UV 光譜 (Chart 12.): λ_{max} (MeOH) 在 249nm 及 301(sh) 有兩個吸收峰，因為位於異黃酮類之 Band I 300~340nm 及 Band II 245~270nm 之吸收範圍內⁽⁷⁶⁻⁷⁹⁾，故可以推測為異黃酮類化合物。

② 加入 Shift Reagents 後 UV 光譜變化的情形：(Table 3.)

1. 以甲醇配置的標準液：Band II 為 260nm，Band I 為 302nm

2. 加入氫氧化鈉(NaOH)：

Band II 向紅位移 14nm，此化合物可能 A 環上有羥基化(-OH)

Band I 向紅位移 31nm，此化合物可能 B 環上有 4'-羥基化(4'-OH)

3. 加入三氯化鋁(AlCl_3):

☉ 4-酮基(-C=O) - 5-羥基(-OH)、3-羥基(-OH) - 4-酮基(C=O)或鄰二酚羥基等結構系統均可和三氯化鋁(AlCl_3) 形成螯合，而形成共軛系統延長，導致吸收帶向紅位移。

加入三氯化鋁後，此化合物 Band I 及 Band II 並沒有改變，表示 A 環上無鄰二酚羥基或骨架含有 4-酮基(-C=O) - 5-羥基(-OH)結構。

3.加入三氯化鋁(AlCl_3) /鹽酸(HCl) :

Band I 及 Band II 亦沒有改變，表示結構上並無相鄰的羥基(-OH)
ϰ、綜合 1、2 和 3，可推測此化合物結構尚無 4-酮基(-C=O) - 5-羥基(-OH)、3-羥基(-OH) - 4-酮基(C=O)或鄰二酚羥基。

4.加入醋酸鈉(NaOAc) :

Ϭ、醋酸鈉(NaOAc)的鹼性較弱，故只能把黃酮母核上酸性較強的羥基(-OH)解離，常用來判斷 7 位之羥基(-OH)。

加入醋酸鈉(NaOAc)後，Band II 向紅位移 10nm，表示第七位上有羥基(-OH)

5.加入醋酸鈉(NaOAc)/硼酸(H_3BO_3) :

Band I 及 Band II 無明顯改變，表示在 A 環及 B 環結構上無鄰二酚羥基(-OH)

ϭ、根據以上 UV 圖譜資料，推測此化合物為 7 及 4'為上有羥基(-OH)的異黃酮類化合物

Table 3. Change of UV absorption of Puerain by adding various shift reagents

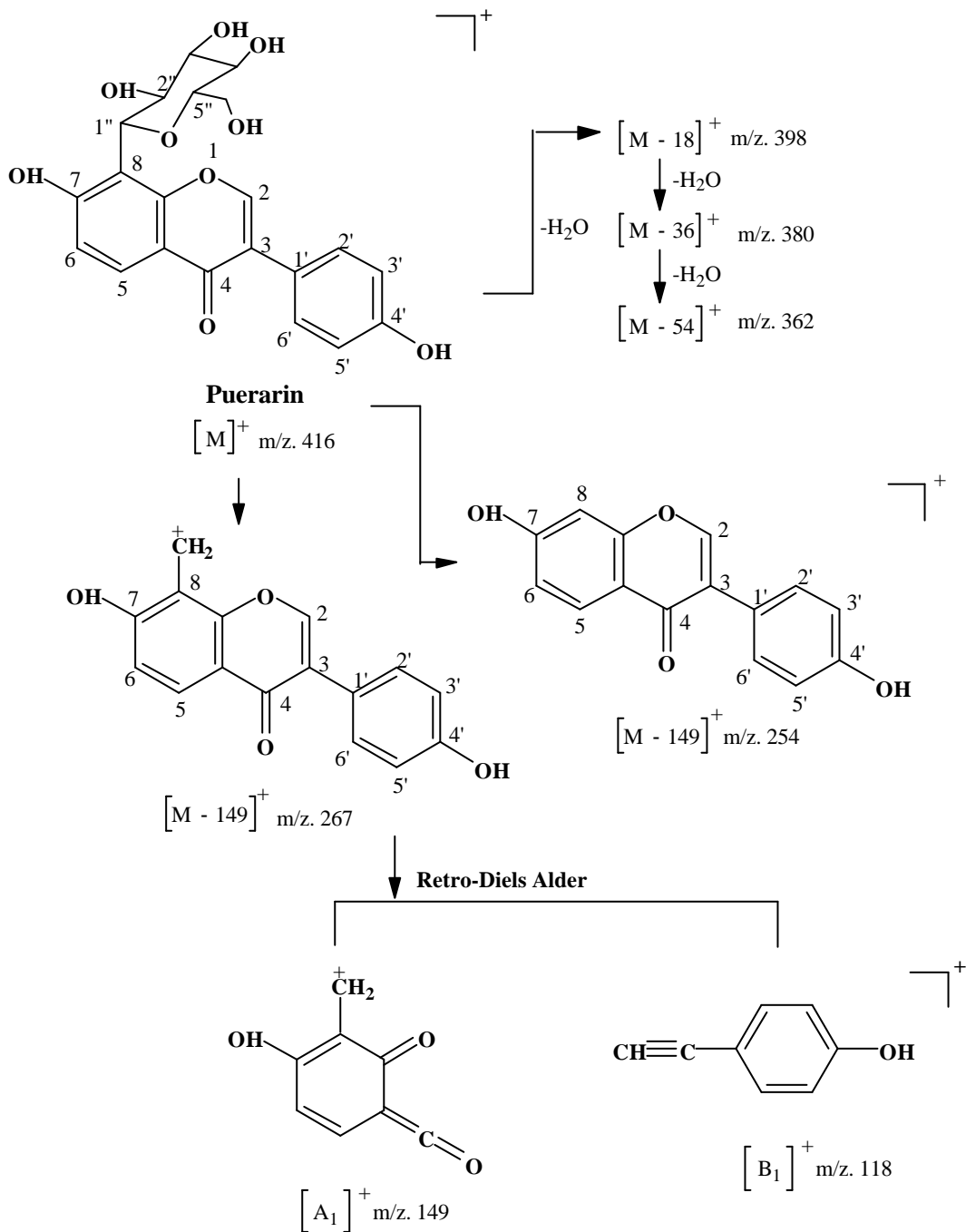
Shift reagent Band(nm)	MeOH	+NaOH	+ AlCl_3	+ AlCl_3/HCl	NaOAc	NaOAc/ H_3BO_3
I	301	332	301	301	301	301
II	249	263	250	249	259	250

(5) $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、HMQC、DEPT、COSY 光譜解析：

(參照 Table 4.)(Chart 10-17)

由 $^1\text{H-NMR}$ 光譜資料得知，芳香族質子區域發現 δ 7.36ppm (2H, *d*, $J=8.5$) 和 δ 6.84ppm (2H, *d*, $J=8.5$) 呈現相互偶合而且呈現鄰位偶合關係，積分比為 2 : 2； δ 6.95ppm (1H, *d*, $J=8.9$)、 δ 8.04ppm (1H, *d*, $J=8.9$) 有質子吸收訊號偶合關係，積分比為 1:1；而上述這些推測亦與 COSY 及 DEPT 的光譜相符合。在一般黃酮類的 A 環上的氫通常較 B 環上的氫位於較高磁場， δ 7.36ppm (2H, *d*, $J=8.5$) 和 δ 6.84ppm (2H, *d*, $J=8.5$) 同一位置也許各有兩個氫，是在 B 環上的四個氫，因為有 4' 位羥基 (-OH) 的取代，因此造成兩組四個氫雙雙偶，H；可知異黃酮類化合物可推測其在 7 位及 4' 位有羥基 (-OH)。但在 3-4ppm 處有 br. peak 產生為接糖基的特徵，而且在 DEPT 有 $-\text{CH}_2$ group 應該為葡萄糖的六號 C。在對照 C 譜，在 60-80ppm 左右有六個 C 推測應該為六碳糖的葡萄糖，因為 COSY 看出 H-5 及 H-6 有偶合，應該為在第八位接上葡萄糖，結構應該為 Puerarin。

(6)EI-MS 的分子離子峰 m/z 416 $[M]^+$ 符合 7,4'-dihydroxyisoflavone 的分子量，分子離子的碎片離子 m/z 416、 m/z 267 和以碳接糖基的異黃酮質譜斷裂方式相同. (Scheme 3)



Scheme 3. The mass spectrum of fragmentation patterns of Puerarin

(7)綜合以上推測，對照 DEPT、COSY、HMQC 和 HMBC，發現皆符合以上所述資料，再和文獻⁽⁷⁴⁾比對後，光譜資料無誤，確定此化合物應該為 Puerarin。

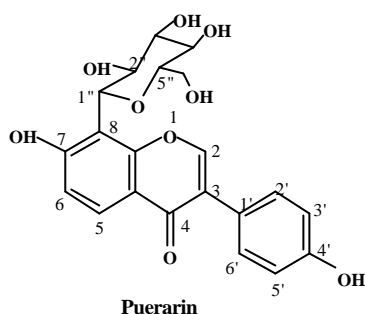


Table 4. ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HMQC, DEPT, COSY and HMBC spectral data of Puerarin.

Position	Puerarin(DMSO-d6)			
	¹ H (HMQC)	¹³ C	DEPT	COSY
2	8.16(s)	152.8	CH	-
3	-	123.9	C	-
4	-	176.6	C	-
5	8.04(d, 8.9)	126.5	CH	H-6
6	6.95(d, 8.9)	114.6	CH	H-5
7	-	162.9	C	-
8	-	111.5	C	-
9	-	157.0	C	-
10	-	116.9	C	-
1'	-	122.6	C	-
2'	7.36(d, 8.5)	129.7	CH	H-3'
3'	6.84(d, 8.5)	114.6	CH	H-2'
4'	-	156.4	C	-
5'	6.84(d, 8.5)	114.6	CH	H-6'
6'	7.36(d, 8.5)	129.7	CH	H-5'
1''	5.09(d, 9.9)	74.0	-	H-2''
2''	4.11(br. s)	71.4	-	H-1'',H-3''
3''	3.52~3.56(br. m)	78.4	-	H-1''
4''	3.52~3.56(br. m)	70.0	-	-
5''	3.52~3.56(br. m)	81.1	-	-
6''	3.78(dd),3.9(dd)	61.1	CH ₂	H-5''

δ in ppm, J in Hz.

br. m: broad multiple, s: singlet, d: doublet, dd: double doublet

Compound () 結構解析:

(1) 物理性質和初鑑定:

1. 結晶: 無色針晶(氯仿-甲醇再結晶)。
2. 熔點: 330-333
3. TLC 片經溶媒展開後為 $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 7 : 3$, $R_f = 0.55$ 。噴 10% H_2SO_4 呈淡黃色點; 對 FeCl_3 呈墨綠色陽性反應, 推測含有 Phenol 結構; Mg-HCl 呈黃色反應; 對 Na_2CO_3 呈黃色陽性, 故初步可推定本化合物為異黃酮類化合物。^(76,77)

(2) EI-MS (Chart 18.): 分子的離子峰應該為 m/z 254 $[\text{M}]^+$, 分子量可能為 254, 基峰分子離子峰為 m/z 137 $[\text{M}-117]^+$

(3) IR 光譜 (Chart 19.): KBr 打片, 3250 cm^{-1} 處有羥基(-OH)的特性吸收; 在 2933 cm^{-1} 處有不飽和氫(=C-H)的伸縮振動特性的吸收; 1657 cm^{-1} 處有 $\text{C}=\text{O}$ 的特性吸收; $1621, 1600\sim 1450 \text{ cm}^{-1}$ 有芳香環(aromatic ring)的特性吸收, 在 1262 cm^{-1} 處有 $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 的特性吸收

(4) UV 光譜 (Chart 20.): λ_{max} (MeOH) 在 260nm 及 302(sh) 有兩個吸收峰, 因為位於異黃酮類之 Band I 300~340nm 及 Band II 245~270nm 之吸收範圍內⁽⁷⁶⁻⁷⁹⁾, 故可以推測為異黃酮類化合物。

② 加入 Shift Reagents 後 UV 光譜變化的情形: (Table 5.)

1. 以甲醇配置的標準液: Band II 為 260nm, Band I 為 302nm

2. 加入氫氧化鈉(NaOH):

Band II 向紅位移 10nm, 此化合物可能 A 環上有羥基化(-OH)

Band I 向紅位移 28nm, 此化合物可能 B 環上有 4'-羥基化(4'-OH)

3.加入三氯化鋁(AlCl_3):

☪、4-酮基($-\text{C}=\text{O}$) - 5-羥基($-\text{OH}$)、3-羥基($-\text{OH}$) - 4-酮基($\text{C}=\text{O}$)或鄰二酚羥基等結構系統均可和三氯化鋁(AlCl_3) 形成螯合，而形成共軛系統延長，導致吸收帶向紅位移。

加入三氯化鋁後，此化合物 Band I 及 Band II 並沒有改變，表示 A 環上無鄰二酚羥基或骨架含有 4-酮基($-\text{C}=\text{O}$) - 5-羥基($-\text{OH}$)結構。

4.加入三氯化鋁(AlCl_3) /鹽酸(HCl) :

Band I 及 Band II 亦沒有改變，表示結構上並無相鄰的羥基($-\text{OH}$)

☪、綜合 1、2 和 3，可推測此化合物結構尚無 4-酮基($-\text{C}=\text{O}$) - 5-羥基($-\text{OH}$)、3-羥基($-\text{OH}$) - 4-酮基($\text{C}=\text{O}$)或鄰二酚羥基。

5.加入醋酸鈉(NaOAc) :

☪、醋酸鈉(NaOAc)的鹼性較弱，故只能把黃酮母核上酸性較強的羥基($-\text{OH}$)解離，常用來判斷 7 位之羥基($-\text{OH}$)。

加入醋酸鈉(NaOAc)後，Band II 向紅位移 7nm，表示第七位上有羥基($-\text{OH}$)

6.加入醋酸鈉(NaOAc)/硼酸(H_3BO_3) :

Band I 及 Band II 無明顯改變，表示在 A 環及 B 環結構上無鄰二酚羥基($-\text{OH}$)

☪、根據以上 UV 圖譜資料，推測此化合物為 7 及 4'為上有羥基($-\text{OH}$)的異黃酮類化合物

Table 5. Change of UV absorption of Daidzein by adding various shift reagents

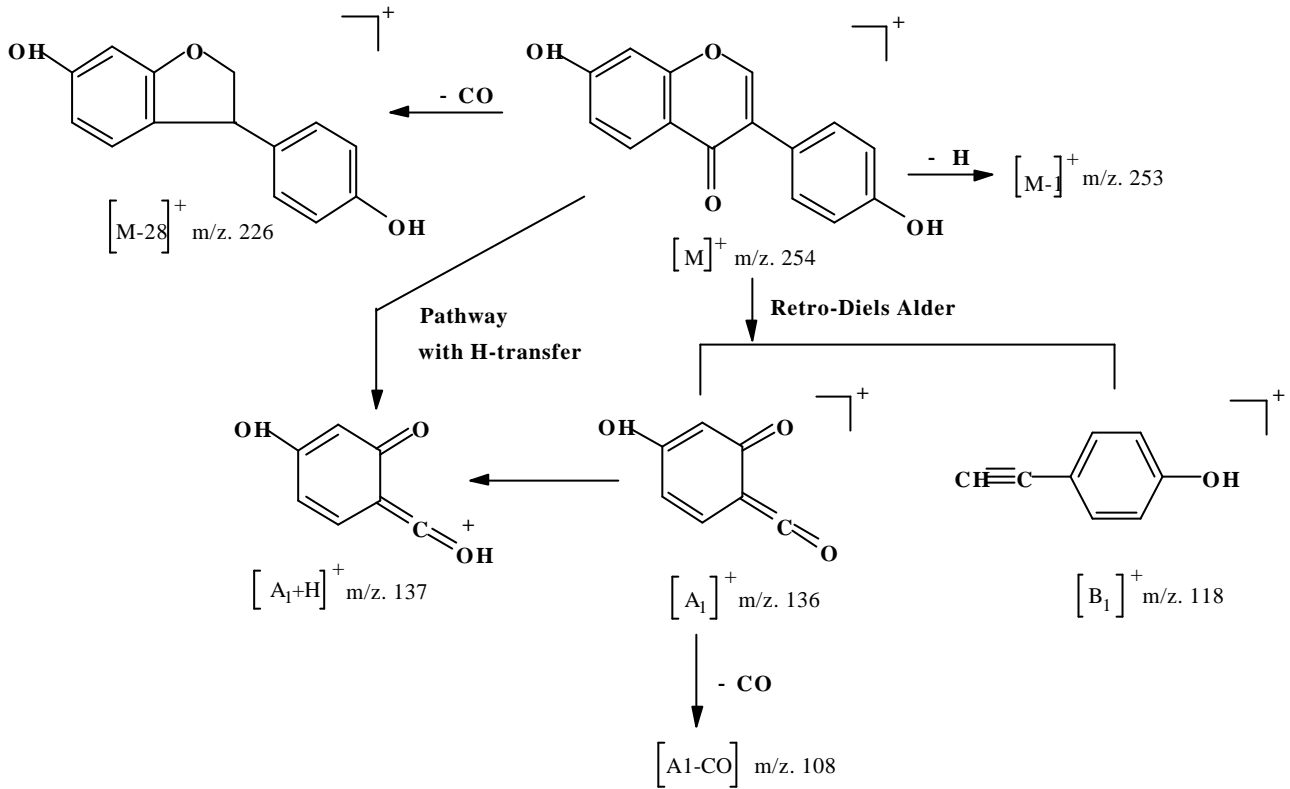
Shift reagent Band(nm)	MeOH	+NaOH	+ AlCl_3	+ AlCl_3/HCl	NaOAc	NaOAc/ H_3BO_3
I	301	329	301	301	301	301
II	248	258	249	250	258	249

(5) $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、HMQC、DEPT、COSY 光譜解析：

(參照 Table 6.) (Chart 18-25)

由 $^1\text{H-NMR}$ 光譜資料得知，芳香族質子區域發現 δ 7.36ppm(2H,*d*, $J=8.2$)和 δ 6.79ppm(2H,*d*, $J=8.2$)呈現相互偶合而且呈現鄰位偶合關係，積分比為 2 : 2； δ 6.85ppm (1H, *d*, $J=2.2$)、 δ 6.92ppm (1H, *dd*, $J=8.7, 2.2$)和 δ 7.94ppm(1H,*d*, $J=8.7$)呈現 ABX 型質子吸收訊號偶合關係，而上述此些推測亦與 COSY 及 DEPT 的光譜相符合。在一般黃酮類的 A 環上的氫通常較 B 環上的氫位於較高磁場， δ 7.36ppm(2H,*d*)和 δ 6.79ppm(2H,*d*)同一位置也許各有兩個氫，是在 B 環上的四個氫，因為有 4'位羥基(-OH)的取代，因此造成兩組四個氫雙雙偶，H； δ 6.85ppm (1H,*dd*) δ 6.92ppm (1H,*d*)和 δ 7.94ppm(1H,*d*)為 A 環上的氫。加上 UV 的資料佐證，可知異黃酮類化合物可推測其在 7 位及 4'位有羥基(-OH)。A 環的 H-8、H-6 和 H-5 而言，H-5 因為 C-4 的上酮基的去遮蔽效應，以及 H-6 的鄰偶，會出現一個約二重峰約在 δ 8ppm，所以， δ 7.94ppm(1H,*d*, $J=$)為 H-5 的訊號；H-6 因為 H-8 的間偶及 H-5 的鄰偶，出現一個四重峰(或二重峰)，因此， δ 6.92ppm(1H,*dd*, $J=$)是 H-6 的訊號；H-8 因為 H-6 的訊號，出現二重峰， δ 6.85ppm(1H, *d*, $J=$)為 H-8 的訊號。B 環上位置氫的確定而言，H-3'及 H-5' 因為取代基的遮蔽效應，及 C 環對 H'-2 及 H-6'的去遮蔽效應，可知較低磁場的 H-3'及 H-5 是 δ 6.79ppm(2H,*d*, $J=$)的訊號，H'-2 及 H-6'則是在 7.36ppm(2H,*d*, $J=$)。異黃酮的 H-2，因為附著氧原子上的碳原子上，一般為單一峰且比一般芳香環出現在較低磁場，在 DMSO- d_6 溶劑明顯可到 δ 8.2~8.7ppm⁽⁷⁸⁾，故可確定 H-2 是 δ 8.26ppm(1H,*s*)的訊號。應該為 7,4'-dihydroxyisoflavone。

(6)EI-MS 的分子離子峰 m/z 254 $[M]^+$ 符合 7,4'-dihydroxyisoflavone 的分子量，分子離子的碎片離子 m/z 254、 m/z 253、 m/z 226、 m/z 137、 m/z 136、118、 m/z 108 和異黃酮質譜斷裂方式相同. (Scheme 4.)



Scheme 4. The mass spectrum of fragmentation patterns of Daidzein

(7)綜合以上推測，對照 DEPT、COSY、HMQC 和 HMBC，發現皆符合以上所述資料，再和文獻⁽¹⁷⁾⁽⁷⁵⁻⁷⁶⁾比對後，光譜資料無誤，確定此化合物應該為 Daidzein。

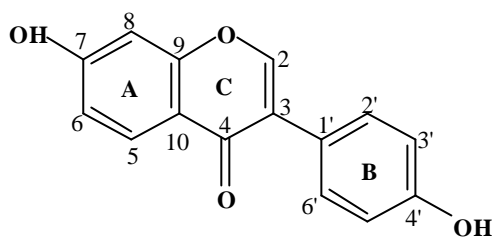


Table 6. ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HMQC, DEPT, COSY and HMBC spectral data of Daidzein.

Daidzein(DMSO-d6)				
Position	¹ H (HMQC)	¹³ C	DEPT	COSY
2	8.26(<i>s</i>)	153.0	CH	-
3	-	123.7	C	-
4	-	174.9	C	-
5	7.94(<i>d</i> , 8.7)	127.5	CH	H-6
6	6.92(<i>dd</i> , 8.7, 2.2)	115.4	CH	H-5 H-8
7	-	162.9	C	
8	6.85(<i>d</i> , 8.7)	102.3	CH	H-6
9	-	157.58	C	-
10	-	116.8	C	-
1'	-	122.8	C	
2'	7.36(<i>d</i> , 8.2)	130.3	CH	H-3'
3'	6.79(<i>d</i> , 8.2)	115.2	CH	H-2'
4'	-	157.7	C	-
5'	6.79(<i>d</i> , 8.2)	115.2	CH	H-6'
6'	7.36(<i>d</i> , 8.2)	130.3	CH	H-5'
7-OH	-	-	-	-
4'-OH	-	-	-	-

δ in ppm, *J* in Hz.

s: singlet, *d*: doublet, *dd*: double doublet

Compound () 結構解析:

(1)結晶：無色針晶(氯仿-甲醇再結晶)，淡黃色粉末。

1.熔點：295-300

2.物理性質和初鑑定：

3. TLC 片經溶媒展開後為 $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 5 : 1$ ， $R_f = 0.45$ 。噴 10% H_2SO_4 呈淡黃色點；對 FeCl_3 呈墨綠色陽性反應，推測含有 Phenol 結構； Mg-HCl 呈黃色反應；對 Na_2CO_3 呈黃色陽性，故初步可推定本化合物為異黃酮類化合物。^(76,77)

(2)EI-MS(Chart 26.): 分子的離子峰應該為 $m/z 270[\text{M}]^+$ ，分子量可能為 270，基峰分子離子峰為 $m/z 153[\text{M}-117]^+$

(3)IR 光譜(Chart 27.): KBr 打片，在 3459 cm^{-1} 處有 -OH 的特性吸收；在 2934 cm^{-1} 處有 =C-H 特性的吸收；在 1632 cm^{-1} 處有 -C=O 的特性吸收；在 1252 cm^{-1} 處有 -C-O-C 的特性吸收

(4)UV 光譜(Chart 28.): $\lambda_{\text{max}}(\text{MeOH})$ 在 260nm 及 333(sh) 有兩個吸收峰，因為位於異黃酮類之 Band I 300~340nm 及 Band II 245~270nm 之吸收範圍內⁽⁷⁶⁻⁷⁹⁾，故可以推測為異黃酮類化合物。

② 加入 Shift Reagents 後 UV 光譜變化的情形：(Table 7.)

1. 以甲醇配置的標準液：Band II 為 260nm，Band I 為 333nm

2. 加入氫氧化鈉(NaOH):

Band II 向紅位移 12nm，表示此化合物可能 A 環上有羥基化(-OH)

3. 加入三氯化鋁(AlCl_3):

∩、4-酮基(-C=O) - 5-羥基(-OH)、3-羥基(-OH) - 4-酮基(C=O)或鄰二酚羥基等結構系統均可和三氯化鋁(AlCl_3) 形成螯合，而形成共軛系統延長，導致吸收帶向紅位移。

加入三氯化鋁後，此化合物在 Band II 向紅位移 12nm，表示 A 環上有鄰二酚羥基或骨架含 4-酮基(-C=O) - 5-羥基(-OH)結構。

4.加入三氯化鋁(AlCl_3) /鹽酸(HCl) :

Band I 及 Band II 亦沒有改變，表示結構上並無相鄰的羥基(-OH)
Ω、綜合 1、2 和 3，可推測此化合物結構可能有 4-酮基(-C=O) - 5-羥基(-OH)。

5.加入醋酸鈉(NaOAc) :

Ω、醋酸鈉(NaOAc)的鹼性較弱，故只能把黃酮母核上酸性較強的羥基(-OH)解離，常用來判斷 7 位之羥基(-OH)。

加入醋酸鈉(NaOAc)後，Band II 向紅位移 9nm，表示第七位上有羥基(-OH)

6.加入醋酸鈉(NaOAc)/硼酸(H_3BO_3) :

Band I 及 Band II 無明顯改變，表示在 A 環及 B 環結構上無鄰二酚羥基(-OH)

ℓ、根據以上 UV 圖譜資料，推測此化合物為 7 及 4'為上有羥基(-OH)的異黃酮類化合物

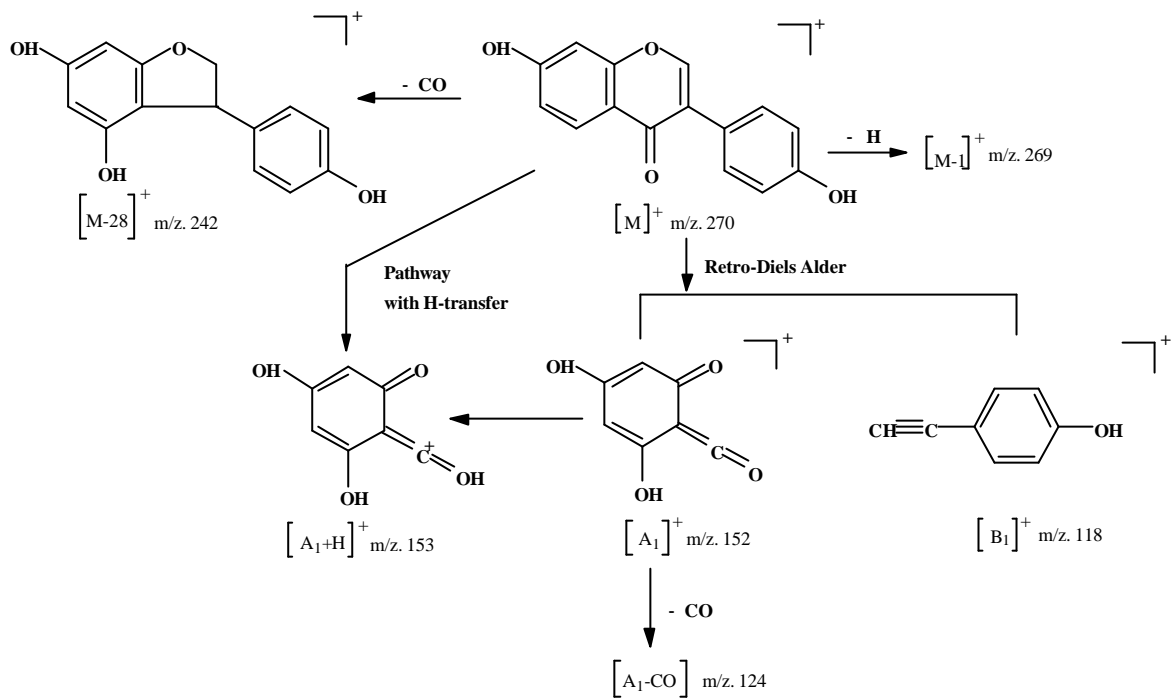
Table 7. Change of UV absorption of Genistein by adding various shift reagents

Shift eagent Band(nm)	MeOH	+NaOH	+ AlCl_3	+ AlCl_3/HCl	NaOAc	NaOAc/ H_3BO_3
I	330	330	368	371	331	331
II	261	273	273	273	270	271

(5) $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、HMQC、DEPT、COSY 光譜解析：
(參照 Table 8.)(Chart. 26-33)

由 $^1\text{H-NMR}$ 光譜資料得知，芳香族質子區域發現 δ 7.36ppm ($2\text{H}, d, J=8.6$) 和 δ 6.80ppm ($2\text{H}, d, J=8.6$) 呈現相互偶合而且呈現鄰位偶合關係，積分比為 2 : 2 ; δ 6.37ppm ($1\text{H}, d, J=2.2$)、 δ 6.21ppm ($1\text{H}, d, J=2.2$) 呈現間位質子吸收訊號偶合關係，而上述這些推測亦與 COSY 及 DEPT 的光譜相符合。在一般黃酮類的 A 環上的氫通常較 B 環上的氫位於較高磁場， δ 7.35ppm ($2\text{H}, d, J=8.6$) 和 δ 6.80ppm ($2\text{H}, d, J=8.6$) 同一位置也許各有兩個氫，是在 B 環上的四個氫，因為有 4' 位羥基 (-OH) 的取代，因此造成兩組四個氫雙雙偶合，A 環上的氫因為有供電子 OH 基的緣故，所以位於較高的磁場。所以， δ 6.21ppm ($1\text{H}, d$) 可能是 H-6 的訊號，因為兩邊有 OH 基，所以位於高磁場。 δ 6.37ppm ($1\text{H}, d$) 則為 H-8 的訊號。而 δ 8.30ppm 則是標準的 H-2 訊號 δ 12.94ppm 應該是 5'-OH，故可確定 H-2 是 δ 8.26ppm ($1\text{H}, s$) 的訊號。綜合上述資料，應該為 5,7,4'-dihydroxyisoflavone。

(6)EI-MS 的分子的離子峰 m/z 270[M], 亦符合 5,7,4'- dihydroxyisoflavone 的分子量, 分子離子的碎片離子 m/z 270、 m/z 153 和異黃酮的質譜斷裂方式相同(Scheme 5.)



Scheme 5.The mass spectrum of fragmentation patterns of Genistein

(7) 綜合以上推測，對照 DEPT、COSY、HMQC 和 HMBC，發現皆符合以上所述資料，再和文獻⁽⁷⁹⁾比對後，光譜資料無誤，確定此化合物應該為 Genistein。

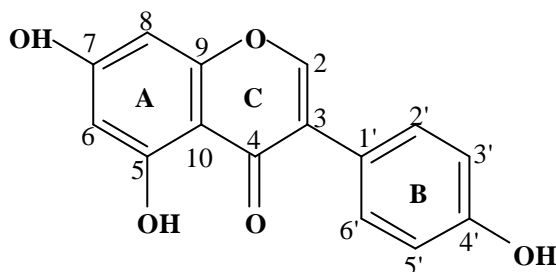


Table 8. ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HMQC, DEPT, COSY and HMBC spectral data of Genistein.

Position	Genistein(DMSO-d6)			
	¹ H (HMQC)	¹³ C	DEPT	COSY
2	8.30(<i>s</i>)	154.2	CH	-
3	-	122.5	C	-
4	-	180.4	C	-
5	-	164.5	C	-
6	6.21(<i>d</i> ,2.2)	99.2	CH	H-6 - H-8
7	-	162.9	C	-
8	6.37(<i>d</i> ,2.2)	93.9	CH	H-8 - H-6
9	-	157.6	C	-
10	-	104.7	C	-
1'	-	121.4	C	-
2'	7.36(<i>d</i> ,8.6)	130.4	CH	H-2' - H-3'
3'	6.80(<i>d</i> ,8.6)	115.3	CH	H-3' - H-2'
4'	-	157.2	C	-
5'	6.80(<i>d</i> ,8.6)	115.3	CH	H-5' - H-6'
6'	7.36(<i>d</i>),8.6	130.4	CH	H-6' - H-5'
5-OH	12.94(<i>s</i>)	-	-	-
7-OH	-	-	-	-
4'-OH	-	-	-	-

δ in ppm, *J* in Hz.

s: singlet, *d*: doublet

第四章 藥理試驗與活性探討

本實驗經由 MTT 染色的結果，測定粗萃物及分離之化合物對 HL-60 細胞株的抗增殖活性，來做為分離活性成分之主要指標。並且經由 NBT 染色的方法來做第二指標，尋找有分化能力的粗萃物及化合物。

由於一般豆科植物含異黃酮居多，同樣地，葛根屬植物含量也是非常高。再者，本實驗以分離葛雌素為最主要目標，而且，一般對細胞株的研究，以 aglycone 的型態居多。所以，以第二次分離葛雌素及黃酮類居多的乙酸乙酯粗抽物為最初藥理篩選的起點，將 PMEE ($IC_{50}=39\mu\text{g/ml}$) 分成 PMEEE、PMEEE1 和 PMEEN，以 PMEEE 為有效之分層 ($IC_{50}=27.1\mu\text{g/ml}$)，其活性測試結果如下表(Table 9.)。

Table 9. MTT assay and NBT assay on HL-60 cells treated with PMEE, PMEEN, PMEEE1 and PMEEE for 96 hrs

	Conc.	MTT assays (%)	NBT assays (%)
Control	0	100.0±1.1	1.3 ± 0.3
PMEE	10	89.1 ± 3.3**	1.5 ± 0.5
	25	79.6 ± 0.8***	2.5 ± 0.0*
	40	44.3 ± 4.4***	7.3 ± 1.4***
$IC_{50}= 39 (\mu \text{g/ml})$			
PMEEN	5	96.5 ± 7.3	1.5 ± 0.6*
	10	117.7±0.9***	1.7 ± 1.0
	25	結晶	—————
PMEEE₁	2.5	97.1 ± 5.9*	3.4 ± 0.5**
	5	95.4 ± 2.4	5.7 ± 1.6**
	10	結晶	—————
PMEEE	10	85.0 ± 5.7**	4.8 ± 0.3***
	25	45.0 ± 6.7***	10.6±0.5***
	50	13.5 ± 0.5***	Death
$IC_{50}= 27.1 (\mu \text{g/ml})$			

HL-60 cells($2 \times 10^4/\text{ml}$) were treated with PMEE ,PMEEN, PMEEE₁ and PMEEE for 96 hrs.

Data was presented as mean ± SD from three separate experiments.

p < 0.05 ; ** p < 0.01 ; *** p < 0.001 ; compared with control

經由第一次測試得知，PMEEE 為有效之分層，故配合分離，將其通過矽膠管柱層析，再次分為六個收集層，結果證明在第一層(PMEEE-1)及第二層(PMEEE-2)有強烈的抗增殖活性產生，第三收集層則為葛雌素所在處，活性並沒有前兩者強。故先從前兩層開始分離，第三層繼續分離葛雌素標準品，活性測試結果如下：(Table 10)

Table 10. MTT assay and NBT assay on HL-60 cells treated with PMEEE-(1~6) for 96 hrs

	Conc.	MTT assays (%)	NBT assays (%)
Control	0	100.0±1.1	1.3 ± 0.3
PMEEE-1	15	83.1 ± 2.8***	5.9 ± 0.5***
	20	58.4 ± 3.8***	6.9 ± 1.8**
	25	15.3 ± 2.3***	5.3 ± 0.6***
IC₅₀= 19.5 (μ g/ml)			
PMEEE-2	5	93.9 ± 4.7*	1.9 ± 0.4*
	10	79.9 ± 1.1***	2.3 ± 0.3*
	25	11.0 ± 0.7***	25.2±0.5***
IC₅₀= 16.1 (μ g/ml)			
PMEEE-3	5	101.3±3.0	2.1 ± 0.6**
	10	93.2 ± 0.7***	3.8 ± 1.5**
	25	50.1 ± 2.8***	8.6 ± 0.5***
PMEEE-4	5	73.9 ± 1.7***	1.5 ± 0.5
	10	67.6 ± 6.8***	1.1 ± 0.5
	25	62.9 ± 1.7***	1.9 ± 0.4*
PMEEE-5	5	108.5±8.5	0.9 ± 0.5
	10	100.6±0.9	1.8 ± 0.6
	25	93.8 ± 5.1	4.4 ± 1.6
PMEEE-6	25	121.7±6.7**	4.5 ± 1.2*
	50	79.6 ± 9.8*	8.3 ± 1.4**
	100	結晶	_____

HL-60 cells (2×10^4 /ml) were treated with PMEEE 1~6 for 96 hrs. Data was presented as mean ± SD from three separate experiments. $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; compared with control

將 PMEEE-1 的分層再經矽膠管柱層析，分為四個收集層，PMEEE-1-1、PMEEE-1-3 及 PMEEE-1-4 為有效分層，PMEEE-1-(1~4)的活性測試結果如下表：(Table)，但由於量少其中化合物較複雜及 PMEEE-2 的作用較強，故本研究先將其針對 PMEEE-1-(1~4)的繼續活性分離訂於未來的目標，先致力於分離 PMEEE-2 的化合物。

Table 11. MTT assay and NBT assay on HL-60 cells treated with PMEEE-1-(1~4) for 96 hrs

	Conc (μ g/ml)	MTT assays (%)	NBT assays (%)
Control	0	100.0 \pm 1.1	4.5 \pm 0.5
PMEEE-1-1	5	72.9 \pm 3.8***	4.5 \pm 0.4
	10	70.5 \pm 1.3***	6.2 \pm 0.3**
	25	44.3 \pm 2.0***	10.8 \pm 1.0***
IC₅₀ = 21.7 (μ g/ml)			
PMEEE-1-2	2.5	82.4 \pm 2.9***	5.4 \pm 0.4*
	5	75.5 \pm 4.3***	7.0 \pm 0.3**
	8	72.8 \pm 1.4***	10.5 \pm 1.6**
PMEEE-1-3	5	89.7 \pm 6.3*	3.8 \pm 0.8
	10	70.9 \pm 8.0**	6.0 \pm 0.5*
	25	16.9 \pm 2.0***	9.5 \pm 1.7**
IC₅₀ = 15.9 (μ g/ml)			
PMEEE-1-4	5	119.4 \pm 0.7***	5.3 \pm 0.3*
	10	111.7 \pm 2.4**	6.6 \pm 0.7*
	25	58.5 \pm 5.9***	10.0 \pm 0.4***
IC₅₀ = 28.1 (μ g/ml)			

HL-60 cells (2×10^4 /ml) were treated with PMEEE-1-(1~4) for 96 hrs.

Data was presented as mean \pm SD from three separate experiments.

p < 0.05 ; ** p < 0.01 ; *** p < 0.001 ; compared with control.

PMEEE-2 通過矽膠管柱層析，分為四個分層 PMEEE-2-(1~4)，得知 PMEEE-2-1 及 PMEEE-2-2 有較強的抗增殖活性。故依循此指標，繼續向下分層，PMEEE-2-1 及 PMEEE-2-2 分別依照分離的方法，進行純化的步驟，以求細分至可獲得純化合物。PMEEE-3 在葛雌素分離過程則有沈澱產生，通過 LH-20 管柱層析後，分離出化合物為 PMEEE-3flaf，經光譜鑑定為 Daidzein，有不錯的抗增殖活性及些可能有許分化活性。

Table 12. MTT assay and NBT assay on HL-60 cells treated with PMEEE-2-(1~4), PMEEE-3flaf for 96 hrs

	Conc. (μ g/ml)	MTT assays (%)	NBT assays (%)
Control	0	100.0 \pm 1.1	1.3 \pm 0.3
PMEEE-2-1	5	97.4 \pm 5.4	3.4 \pm 0.8
	10	63.5 \pm 7.6***	3.6 \pm 1.3
	25	5.7 \pm 1.5***	Death
IC₅₀ = 14.6 (μ g/ml)			
PMEEE-2-2	5	99.2 \pm 4.7	2.1 \pm 0.8
	10	87.9 \pm 6.4*	1.9 \pm 0.2
	25	9.1 \pm 4.2***	12.7 \pm 6.4
IC₅₀ = 16.6 (μ g/ml)			
PMEEE-2-3	10	100.5 \pm 1.0	4.2 \pm 1.6
	25	95.6 \pm 3.9	5.1 \pm 1.7
	50	81.2 \pm 0.3***	15.1 \pm 1.3
PMEEE-2-4	10	104.8 \pm 4.5	2.7 \pm 1.6
	25	97.6 \pm 1.9*	4.6 \pm 0.8
	50	94.0 \pm 7.6	6.2 \pm 1.3
PMEEE-3flaf	10	70.9 \pm 1.4***	9.9 \pm 1.6***
	25	41.7 \pm 4.0***	13.7 \pm 2.2***
	40	24.8 \pm 1.3***	23.9\pm2.9***
IC₅₀ = 22.3 (μ g/ml)			

HL-60 cells (2×10^4 /ml) were treated with PMEEE-2-(1~4), PMEEE3flaf for 96 hrs.

Data was presented as mean \pm SD from three separate experiments.

p < 0.05 ; ** p < 0.01 ; *** p < 0.001 ; compared with control.

PMEEE-2-1 及 PMEEE-2-2 的分離層如下表 (Table.13.) , PMEEE-2-1-1、PMEEE-2-1-2、PMEEE-2-2-E 及 PMEEE-2-2-fh 都有不錯的活性，其中 PMEEE-2-1-2 及 PMEEE-2-1-3 有很強的抗增殖活性，經由 TLC 再次比對成分，可考慮合併，故合併後再次用管柱分離收集。而在 PMEEE-2-2-E 中經過再次純化後，得到 Daidzein 及光譜確定結構的 Genitein。

Table 13. MTT assay and NBT assay on HL-60 cells treated with PMEEE-2-(1~4), PMEEE-2-2-E, PMEEE-2-2fh for 96 hrs

	Conc. (μ g/ml)	MTT assays (%)	NBT assays (%)
Control	0	100.0 \pm 1.1	3.8 \pm 0.7
PMEEE-2-1-1	2.5	94.1 \pm 1.5***	4.0 \pm 1.1
	5	77.8 \pm 5.2***	6.1 \pm 0.7**
	10	54.3 \pm 4.9***	8.7 \pm 0.9**
PMEEE-2-1-2	2.5	84.9 \pm 3.7***	6.0 \pm 0.5*
	5	49.1 \pm 9.8***	13.8 \pm 2.6**
	10	19.1 \pm 4.1***	Death
IC₅₀ = 5 (μ g/ml)			
PMEEE-2-1-3	2.5	45.8 \pm 5.2***	11.6 \pm 1.6**
	5	43.5 \pm 0.6***	15.4 \pm 3.5**
	10	17.8 \pm 4.3***	Death
IC₅₀ = 2.5 (μ g/ml)			
PMEEE-2-1-4	2.5	121.4 \pm 7.5**	3.3 \pm 0.6
	5	120.5 \pm 7.8**	4.7 \pm 0.8
	10	85.2 \pm 3.1***	7.7 \pm 1.8*
PMEEE-2-2-E	5	83.1 \pm 2.8***	6.5 \pm 1.5**
	10	58.4 \pm 3.8***	9.9 \pm 1.4***
	25	13.6 \pm 3.1***	Death
IC₅₀ = 13.8 (μ g/ml)			
PMEEE-2-2-fh	5	101.1 \pm 5.9	3.7 \pm 0.3***
	10	88.4 \pm 3.2**	6.5 \pm 1.3**
	25	44.1 \pm 3.1***	11.2 \pm 1.8***
IC₅₀ = 23.0 (μ g/ml)			

HL-60 cells (2×10^4 /ml) were treated with PMEEE-2-1-(1~4) and PMEEE-2-2-E(fh) for 96 hrs. Data was presented as mean \pm SD from three separate experiments.

p < 0.05 ; ** p < 0.01 ; *** p < 0.001 ; compared with control.

PMEEE-2-1-2 及 PMEEE-2-2-3 通過管柱層析後，分為五個部分。前四個部分的皆在 $IC_{50} = 20$ (μ g/ml)，具有相當的研究價值，但是，很遺憾的是，本研究後續目前仍在進行中，目前無較多資料。另一部份，在分離葛雌素的過程中，亦把第二次分離而得的葛雌素前一段分離層，測得其抗增殖活性亦有不錯的效果。

Table 14. MTT assay and NBT assay on HL-60 cells treated with PMEEE-2-1-2,3-(1~5), PreMi for 96 hrs

	Conc (μ g/ml)	MTT assays (%)	NBT assays (%)
Control	0	100.0±1.1	3.8 ± 1.3
PMEEE-2-1-2.3-1	2.5	113.2±3.0***	1.6 ± 0.6**
	5	103.3±2.5*	2.5 ± 0.5***
	10	97.7 ± 4.6	4.0 ± 1.3**
$IC_{50} = 16.6$ (μ g/ml)			
PMEEE-2-1-2.3-2	2.5	89.5 ± 7.6*	4.0 ± 1.2**
	5	62.7 ± 3.1***	8.0 ± 1.4***
	10	21.6 ± 3.3***	21.0±1.3***
$IC_{50} = 6.7$ (μ g/ml)			
PMEEE-2-1-2.3-3	2.5	83.1 ± 5.4**	13.0±1.2***
	5	41.4 ± 6.4***	21.8±2.4***
	10	22.8 ± 2.4***	Death
$IC_{50} = 5$ (μ g/ml)			
PMEEE-2-1-2.3-4	2.5	185.5±6.2	4.4 ± 1.4
	5	108.1±1.4	6.6 ± 0.2*
	10	42.0 ± 2.9***	8.4 ± 1.2***
$IC_{50} = 9.2$ (μ g/ml)			
PMEEE-2-1-2.2-5	2.5	182.5±3.6	6.0 ± 0.3*
	5	167.1±5.1	6.6 ± 0.2*
	10	161.6±0.5	6.9 ± 0.8*
PreMi	5	173.1 ± 1.2	4.2 ± 1.3
	10	126.9 ± 6.1	8.2 ± 0.3**
	25	52.9 ± 2.5***	16.8±1.7***
$IC_{50} = 26.0$ (μ g/ml)			

HL-60 cells (2×10^4 /ml) were treated with PMEEE-2-1-2,3-(1-5), PreMi for 96 hrs.

Data was presented as mean ± SD from three separate experiments.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; compared with control.

基於對於化合物抗增殖及分化活性的探討，本研究將分離獲得四個化合物 Miroestrol、Daidzein、Genistein 和 Puerarin，加上本實驗室已有的 Genistin 及由 Wanko 購得的 Daidzin，本實驗利用 retinoic acid 做 positive control，其活性茲整理如下表(table 15.)。

Table 15. MTT assay and NBT assay on HL-60 cells treated with all compounds for 96 hrs

	Conc (μ g/ml)	MTT assays (%)	NBT assays (%)
Control	0	100.0 \pm 1.1	0.7 \pm 0.3
RA	0.1 μ M	31.5 \pm 2.2***	87.8 \pm 0.8***
Genistein	2.5	78.5 \pm 4.1***	3.8 \pm 0.8**
	5	51.8 \pm 2.8***	10.1 \pm 0.2***
	10	13.2 \pm 1.9***	20.0\pm3.9**
		IC₅₀= 20.7 μ M	
Genistin	10	48.8 \pm 3.7***	13.2 \pm 0.7***
	25	16.1 \pm 1.3***	14.4 \pm 6.1*
	50	12.3 \pm 3.1***	Death
		IC₅₀= 23.1 μ M	
Daidzein	10	70.9 \pm 1.4***	9.9 \pm 1.6***
	25	41.7 \pm 4.0***	13.7 \pm 2.2***
	40	24.8 \pm 1.3***	23.9\pm2.9***
		IC₅₀= 87.8 μ M	
Daidzin	10	58.8 \pm 2.3***	5.7 \pm 4.3
	25	54.2 \pm 2.5***	20.8\pm0.8***
	50	30.7 \pm 2.7***	43.2\pm4.4***
		IC₅₀= 61.1 μ M	
Miroestrol	10	90.1 \pm 2.7***	3.5 \pm 1.3**
	25	71.5 \pm 2.8***	4.1 \pm 1.7**
	50	37.3 \pm 4.3***	9.0 \pm 0.7***
		IC₅₀= 113.4 μ M	
Puerarin	10	110.8 \pm 4.2	2.8 \pm 0.8*
	25	107.1 \pm 1.3	2.5 \pm 0.5**
	50	87.6 \pm 1.3***	4.7 \pm 0.3***

HL-60 cells (2×10^4 /ml) were treated with Genistein, Genistin, Daidzein, Daidzin, Puerarin, Miroestrol for 96 hrs. Data was presented as mean \pm SD from three separate experiments. * p < 0.05 ; ** p < 0.01 ; *** p < 0.001 ; compared with control.

本次利用 HL-60 細胞株，經過 MTT assay 及 NBT assay，分離所得的

四個化合物，Puerarin 幾乎無活性，Genistein 及 Genistin 對 HL-60 細胞株研究呈現出有較強抗增殖活性，而且 Genistein 可能有分化的活性產生，Daidzein 及 Daidzin 則抗增殖活性效果較弱，但接可能有分化的效果產生，六個化合物的抗增殖活性強度依序如下：

Genistein ($IC_{50} = 20.7 \mu M$) > Genistin ($IC_{50} = 23.1 \mu M$) >

Daidzin ($IC_{50} = 61.1 \mu M$) > Daidzein ($IC_{50} = 87.8 \mu M$) >

Miroestrol ($IC_{50} = 113.4 \mu M$) > Puerarin

此外，Genistin 及 Daidzin 亦呈現頗強之活性，而這些活性成分同樣地也是本實驗所設定之定量指標成分，再次驗證了本研究尋找之定量指標成分的正确性。

至於，尋找 PMEEE-1-(1~4)、PMEEE-2-1 及 PMEEE-2-2fh 分離部分之活性成分，仍在分離階段，相信也必定有相當強的活性成分存在。此部分研究仍在進行中。

第五章 葛屬活性成分定量

第一部份 各種不同產地葛根之高效液相層析

第一節 分析條件的選擇及最佳化：

中藥材與天然物是極為繁雜的混合物，所含化學成分很多，欲以簡單、準確的方法分離並同時定量，實屬一件不易之事。

葛根屬於豆科植物，我們曾經就同屬於豆科植物的大葉千斤拔、大豆等乾燥品進行定量分析，經過考究黃明星等人⁽⁴⁴⁻⁵⁵⁾的溶媒系統，並且參考大豆的指標成分之定量系統⁽⁸⁰⁾。加上實際上的操作實驗結果發現，經過改良後的氰甲烷/水/冰醋酸這個系統適用於大葉千斤拔、大豆等(Fig.3)，故將葛根以此系統進行分析，以期建立一個良好的定量系統。

壹、最佳的分析系統：(UV = 254nm, Rate=1ml/min, 30, RP-18)

	ACN : H ₂ O : HAC	Time	A	B	Curve
A	15:85:0.15	0	100	0	linear
B	35:65:0.15	60	0	100	linear

貳、檢量線之繪製

五種指標成分(Puerarin、Daidzin、Genistin、Daidzein 及 Genistein)配置成各種濃度，其檢量液經 HPLC 分析後，所得之 area 數據（重複三次分析之平均值）進行直線迴歸，繪成檢量線並得迴歸直線方程式。(Table 16)

Table 16. Puerarin, Daidzin, Genistin, Daidzein, Genistein 的有效線性範

圖

y = ax + b				
Compound	【y = peak area, x = conc. (mg/ml)】			
	Linear range	Slope	Intercept	r
	(μg/ml)	a	b	
Puerarin	111.60-5.58	39882392.62	-62873.94	0.9997
Daidzin	210.00-2.10	53592029.55	-5930.90	0.9999
Genistin	20.00-1.25	87722003.04	52122.18	0.9997
Daidzein	20.00-1.00	134383856.43	-13913.73	0.9999
Genistein	39.00-1.95	17946190.20	5198.92	0.9999

Table 17. 滯留時間的再現性

	Intraday (n=3)		Interday (n=3)	
	Retention Time 【 mean ±S.D. (R.S.D)】			
Puerarin	5.84	±0.013 (0.23 %)	5.81	±0.029 (0.5 %)
Daidzin	9.78	±0.208 (2.13 %)	9.87	±0.253 (2.57 %)
Genistin	17.01	±0.017 (0.10 %)	16.95	±0.026 (0.15 %)
Daidzein	30.64	±0.029 (0.09 %)	30.70	±0.043 (0.14 %)
Genistein	45.45	±0.3195 (0.70 %)	45.36	±0.3510 (0.77 %)

參、精密度 (precision) 試驗

精密度的實驗部分，我們選擇以最佳分析條件對各成分進行定量，在同一天內連續重複注射三次（intraday）及不同天（一星期內）總計注射六次（interday）。分別以成分與內標之吸收峰面積比及滯留時間，來計算相對標準偏差（RSD，%），見表（a、b、c、d、e）

實驗的結果顯示，再現性良好，滯留時間之 RSD 值均在 3% 以內，同一天的滯留時間相對標準偏差可在 0.09% - 2.13% 之間，不同天的滯留時間相對標準偏差可在 0.14% - 2.57% 之間，而同一天的面積比相對標準偏差在 0.085% - 2.96% 之間，不同天的面積比相對標準偏差在 0.069% - 2.58% 之間。（Table 18-22.）

Table 18.在藥材中 Puerarin 同日間及異日間之分析精密度 (n= 3)

Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Intraday	Interday
	mean \pm S.D. (R.S.D)	mean \pm S.D. (R.S.D)
111.60	4368542 \pm 8259.76 (0.65 %)	4381018 \pm 3130.24 (0.53 %)
55.80	2210249 \pm 637.64 (0.39 %)	2219143 \pm 530.82 (0.069 %)
11.16	322770 \pm 286.00 (0.40 %)	322609 \pm 506.00 (0.78 %)
5.58	190887 \pm 10.73 (0.37 %)	192284 \pm 745.50 (0.91 %)

Table 19.在藥材中 Daidzin 同日間及異日間之分析精密度 (n= 3)

Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Intraday	Interday
	mean \pm S.D. (R.S.D)	mean \pm S.D. (R.S.D)
210.00	11078716 \pm 82604.08 (1.65 %)	11541308 \pm 85189.88 (1.60 %)
21.00	1172634 \pm 845.16 (0.84 %)	1145277 \pm 697.48 (0.85 %)
4.20	210378 \pm 983.15 (1.42 %)	210401 \pm 5419.91 (2.58 %)
2.10	102214 \pm 97.99 (0.98 %)	99243 \pm 729.14 (1.74 %)

Table 20.在藥材中 Genistin 同日間及異日間之分析精密度 (n= 3)

Conc. (µg/ml)	Intraday	Interday
	mean±S.D. (R.S.D)	mean±S.D. (R.S.D)
20.00	1805423 ±8497.11 (0.47 %)	1816702 ±7315.49 (0.40 %)
10.00	1046081 ±8014.85 (0.77 %)	1057078 ±930.67 (0.37 %)
2.50	275733 ±950.01 (1.07 %)	279081 ±306.98 (1.18 %)
1.25	176133 ±445.52 (1.96 %)	178078 ±801.38 (1.01 %)

Table 21.在藥材中 Daidzein 同日間及異日間之分析精密度 (n= 3)

Conc. (µg/ml)	Intraday	Interday
	mean±S.D. (R.S.D)	mean±S.D. (R.S.D)
20.00	2684754 ±9362.38 (2.96 %)	2806100 ±1356.22 (1.47 %)
10.00	1306555 ±4112.41 (2.61 %)	1342095 ±30622.21 (2.28 %)
2.00	256367 ±858.33 (1.90 %)	257480 ±5097.23 (1.98 %)
1.00	131336 ±455.35 (2.39 %)	132770 ±2209.34 (1.66 %)

Table 22.在藥材中 Genistein 同日間及異日間之分析精密度 (n= 3)

Conc. (µg/ml)	Intraday	Interday
	mean±S.D. (R.S.D)	mean±S.D. (R.S.D)
39.0	710343 ±6868.50 (0.97 %)	699427 ±4641.72 (2.09 %)
19.5	360661 ±1252.96 (0.35 %)	362741 ±1200.71 (0.33 %)
3.9	76777 ±65.07 (0.085 %)	76680 ±832.34 (1.09 %)
1.95	42242 ±41.74 (0.34 %)	42372 ±94.19 (0.22 %)

肆、 回收率(recovery)試驗

將五種指標成分含量的中藥材檢品（泰葛原生植物，泰葛市場品，市售川葛檢品 1、2、3，市售台灣葛根檢品 1、2），分別加入已知濃度的標準品溶液，混合振盪一分鐘，然後重新層析定量，所測得之五種指標成分增加量除以已知的標準品添加量即為回收率。

實驗結果可知 Puerarin、Daidzin、Genistin、Daidzein 和 Genistein 於藥材中之回收率（%），得到各個指標成分的回收率在 96.1% -104.8% 之間，顯示實驗之回收率良好。（Table 23.）

Table 23. Puerarin, Daidzin, Genistin, Daidzein, Genistein 的回收率（%）

Constituent	Puerarin	Daidzin	Genistin	Daidzein	Genistein
PM (mean \pm S.D)	100.93	99.30	101.20	103.13	99.17
PL1 (mean \pm S.D)	102.73	101.63	97.933	98.73	101.63
PL2 (mean \pm S.D)	99.57	101.37	101.67	101.53	101.17
PL3 (mean \pm S.D)	102.87	99.57	100.63	102.13	101.33
PT (mean \pm S.D)	102.97	103.87	99.97	98.57	100.80
PP (mean \pm S.D)	99.43	101.60	102.30	98.93	101.63

第二節 泰葛與川葛、臺葛活性成分之定量分析比較

我們將取得之藥材與植物進行前處理,計畫以同樣萃取方式進行葛屬植物七種葛根 (Table 24) 進行萃取, 得到各種葛屬植物之抽提率, 進而分析, 得到層析圖, 再換算得到五種活性成分(Puerarin、Daidzin、Genistin、Daidzein 及 Genistein)在原生藥材或植物中的實際含量, 達到一個良好的品質監測及不同葛屬植物之活性成分含量的比較。

Table 24. 七種葛根的縮寫

種 類	縮 寫
泰國葛根.....	PM
泰國葛根市場品.....	PM1
大陸四川葛根 (藥用)	PL1
大陸四川葛根 (一般民間食用)	PL2
大陸四川葛根 (藥用)	PL3
臺灣野葛.....	PT
臺灣葛根.....	PP

壹、各種葛屬之抽提率值:

在對各種檢品萃取方式的試驗, 以 PM 為萃取標準, 置於 60 , 先以 10 倍的甲醇萃取五次, 10 倍的 70% 甲醇萃取四次, 10 倍的 50% 甲醇萃取四次, 再以 30 倍甲醇萃取。之後再以 10 倍甲醇萃取, 過濾打入 HPLC, 檢測是否仍有五種指標成分, 接著以 10 倍 70% 甲醇、50% 甲醇萃取, 萃取完都用 HPLC 證明將成分萃取完全, 此時濃縮乾燥秤重為乾燥重, 乾燥重除以原植物重之比率, 為抽提率。抽提率由大至小依序 **PM1 > PM > PP > PL3 > PT > PL1 > PL2**。(Table. 25 & Fig. 4)

Table 25. 各種葛屬植物之抽提率百分比

	PM	PM1	PL1	PL2	PL3	PT	PP
抽提率	37.44 %	40.55 %	13.57 %	11.30 %	15.90 %	15.06 %	17.02 %

貳、葛屬植物檢品活性成分含量：

將 PM、PL1、PL2、PL3、PT、PP 配置適當濃度，經由高效液相層析之定量結果如 Table 27 (Fig. 5、 6、 7、 8、 9) 所示，各生藥之層析圖分別如圖 (Chrom. 1-6)。

葛屬植物檢品活性成分含量結果顯示如下：

Table 26. 各種葛屬植物每公克內所含活性成分之含量 (mg/g)

	Puerarin	Daidzin	Genistin	Daidzein	Genistein
PM	7.55	0.56	0.0634	0.28	0.36
PM1	0.53	0.22	0.0302	0.20	7.20
PL1	0.87	0.73	0.0692	0.20	0.19
PL2	3.78	0.39	0.0314	0.26	0.26
PL3	5.29	0.75	0.0665	0.29	0.22
PT	5.65	1.63	0.50	0.57	1.53
PP	6.23	1.76	0.59	0.90	3.18

由 Table 26. 可以發現,以泰國、四川、臺灣三地之葛根來比較，除了 Puerarin，臺灣葛根 (PT、PP) 的活性成分含量明顯比其他兩地葛根的活性成分含量來的多。成分高低含量如：Genistin，可高達 18.85 倍，少則如 Daidzein，可高達 4.58 倍，顯示臺灣葛根的活性成分可用率會比其他兩地來的好。

其中,三種川葛的市售品，又以 PL3 所含的 Puerarin 最高,由表可看出 PL3 比 PL1 高出 6 倍，顯示出市場品間品質的差異性。以同樣來源的藥

用川葛與一般民間食用川葛比較，發現兩者主要差別在 Puerarin、Daidzin 和 Genistin 的含量比。

Puerarin 方面，食用川葛比藥用川葛高出 4.32 倍。

Daidzin 和 Genistin 方面，藥用川葛反而比食用川葛高出約兩倍。

泰葛除了具其特有成分外，Puerarin 含量為三地七種葛屬植物中佔最高者。

不同產地葛屬植物之定量比較結果如表所示，各植物之高效液相層析圖分別如圖 (Chrom. 1-6)。結果顯示 PM、PM1、PL1、PL2、PL3、PT、PP 中，

以 PT 含 Puerarin 最多 (PT > PP > PL2 > PL3 > PM > PL1 > PM1)

以 PT 含 Daidzin 最多 (PT > PP > PL3 > PL1 > PL2 > PM > PM1)

以 PP 含 Genistin 最多 (PP > PT > PL1 > PL3 > PM > PL2 > PM1)

以 PP 含 Daidzein 最多 (PP > PT > PL3 > PM > PL2 > PM1 > PL1)

以 PM1 含 Genistein 最多 (PM1 > PT > PP > PL2 > PL3 > PL1 > PM)

第二部分 泰葛一年生不同部位器官之成分定量

與泰葛組織培養 - 癒傷組織之二次代謝產物的研究比較

第一節 分析條件的選擇及最佳化：(沿用第一部份的分析條件)

最佳的分析系統：(UV = 254nm , Rate =1 ml/min , 30 , RP-18)

	ACN : H ₂ O : HAC	Time	A	B	Curve
A	15:85:0.15	0	100	0	linear
B	35:65:0.15	60	0	100	linear

第二節 泰葛一年生不同部位器官與癒傷組織二次代謝產物之抽提率

我們將種植約一年的泰葛原植物取下，分根、莖、葉三部分，以前述之萃取方式萃取。再取由根、莖、種子誘發之癒傷組織，以同樣方式萃取，經高效液相層析定量，將原植物一年生與癒傷組織比較，尋求泰葛在癒傷組織產生二次代謝產物這一方面，是否能夠突破技術瓶頸，具有發展的潛力及商機，以期未來發展具有可行性。

Table 27. 一年生根、莖和葉及組織培養癒傷組織之根、莖和葉的縮寫

種 類	縮 寫
泰國葛根一年生根.....	Root
泰國葛根一年生莖.....	Stem
泰國葛根一年生葉.....	Leaf
泰葛組織培養癒傷組織之根.....	tRoot
泰葛組織培養癒傷組織之莖.....	tStem
泰葛組織培養癒傷組織之種子.....	tSeed

壹、各種樣品之抽提率值：

泰葛一年生原植物萃取液和癒傷組織萃取液經濃縮機濃縮回流至

乾，稱重，分別得到抽提率如表（Table 28., Fig.10.）

Table 28. 泰葛一年生植物與癒傷組織二次代謝產物之抽提率百分比

	Root	Stem	Leaf	tRoot	tStem	tSeed
抽提率	19.21 %	12.57 %	29.50 %	45.52 %	10.99 %	28.34 %

貳 泰葛一年生不同部位器官與癒傷組織二次代謝產物活性成分含量：

將 Root、Stem、Leaf、tRoot、tStem、tSeed 配置適當濃度，經由高效液相層析之定量結果如 Table 29. (Fig. 11、12、13、14、15) 所示，各生藥之層析圖分別如(Chrom. 7-12)。結果顯示如下：

Table.29.泰葛一年生植物所含活性成分的含量（mg/g）

	Puerarin	Daidzin	Genistin	Daidzein	Genistein
Root	0.35	0.27	0.040	0.019	0.02
Stem	0.037	0.33	----	0.0038	0.015
Leaf	----	1.35	----	0.0033	0.0034
tRoot	0.13	0.66	----	0.026	0.024
tStem	0.042	0.052	----	0.014	0.0045
tSeed	0.24	1.00	----	0.043	0.0036

第三部分：泰葛有效成分 miroestrol 之定量分析

第一節 分析條件的選擇

1.1 分離管柱的選擇

選擇兩種不同填充材料之管柱，以兩種系統之流動相分析條件進行分析，各組進行兩次重複注射，以探討不同填充材料之管柱對各成分的分離效果。

1.2 移動相的選擇 (以下 Miroestrol 及 Genistin 之 Retention time 簡稱 MiRT 及 GiRT, Miroestrol 簡稱 Miro)

以 Acetonitrile : H₂O : HAC = 15 : 85 : 0.15 → 35 : 65 : 0.15 (梯度程式) 試之，發現 miroestrol 之 retention time = 18.00min，與 genistin (17.01min) 分離度不好，故從四個點考慮改之

- (i) 管柱種類
- (ii) 移動相
- (iii) UV 值
- (iv) 流速

(i) 管柱種類

選擇兩種不同填充材料之管柱，以不同流動相分析條件進行分析，比較 miro 之滯留時間與其他活性成分之分離度，以期找出對 miro 具良好分離效果之管柱

a. RP-18

對 miro 及 genistin 分離度比 Cosmosil 好，較不易有拖尾現象

b. Cosmosil (AR)

對 miro 及 genistin 分離度較差，尤其對 genistin 非常容易有拖尾的現象

(ii) 移動相

a. 移動相中不同氫甲烷/水/冰醋酸的探討

延續各種不同產地葛根之高效液相層析的最佳分析條件，故我們考慮改變氰甲烷/水/冰醋酸的比例，尋求 miro 的最佳分析條件

b.流動相中不同水/甲醇比例的探討

楊玲玲等人⁽⁸¹⁾曾選擇甲醇/水系統來分析葛根之指標成分，故我們嘗試使用甲醇/水系統來分析 miro，期望得到一個理想的分析條件。

c.流動相中微量冰醋酸的影響

吳權益等人⁽⁸²⁾曾探討流動相中微量冰醋酸的影響，指出不論有無添加冰醋酸，雖然各成分的滯留時間變化不大，但增加醋酸的濃度至一定比例，可以增加理論板數，故我們加入不同體積的冰醋酸，希望改善其分離度。

(iii) 吸光度值 (UV)

我們選擇從 UV = 254nm，UV = 217nm，UV = 285nm 和 UV = 230nm 此四個因子進行分析，進一步尋找最佳分析方法。

許多學者⁽⁸¹⁾定量分析天然物，一般選擇吸光度在 UV = 254nm，且泰葛含多數的黃酮類，研究指出^(86,88)黃酮類定量分析吸光度多在 250-254nm，故我們選擇先從 UV = 254nm 尋找分析條件。

再者，文獻⁽¹⁰⁻¹¹⁾指出 miro 之最大吸光度在 UV = 217nm，第二大吸光度在 UV = 285nm，且 miro 在泰葛植物中相對於其他活性成分，所佔含量比例很低，我們希望能定量泰葛植物中 miroestrol 的含量，故選擇吸光度 UV = 285nm 及 UV = 217nm 進行分析。

(iv) 流速

有文獻指出⁽⁸³⁾流速在超過一定的範圍，其高低會影響檢測物出來的快慢。流速高時，檢測物之 retention time 較短，流速低時，檢測物之 retention time 較長。

故檢測時，先將檢品以 ACN: H₂O: HAC = 15: 85: 0.15 進行沖提，分析得到 MiRT = 27.4min

GiRT 之 RT = 26.6min

兩者之 retention time 接近，由於 miro 之含量值太小，曲線下面積易受 genistin 的影響，故考慮改變移動相、UV 值及流速。

1.2.1 單相溶媒系統

A. 氰甲烷/冰醋酸

(1) UV 值與移動相

先固定流速、管柱種類，改變 UV 值與移動相，找最佳分析條件

a. UV = 254nm (rate : 1ml/min , column : RP18)

ACN:H ₂ O:HAC = 8 : 92 : 0.15	MiRT 60min 內不出現	故將 ACN 量提高
ACN:H ₂ O:HAC = 12 : 88 : 0.15	MiRT = 54.12min	miro 與 genistin 完全分不開
ACN:H ₂ O:HAC = 13 : 87 : 0.15	MiRT = 42.69min GiRT = 41.86min	miro 與 genistin 沒有分開
ACN:H ₂ O:HAC = 15 : 85 : 0.15	MiRT = 27.7min GiRT = 26.8min	miro 與 genistin 分離度不佳，且 Miro 波峰太小
ACN:H ₂ O:HAC = 20 : 80 : 0.15	MiRT = 23.85min GiRT = 22.9min	miro 與 genistin 沒有分開

此系統分離度不好，且 Miro 在 UV = 254nm 時，吸光度不好，所顯示之曲線下面積太小，易受其他波峰之干擾，故考慮同樣的移動相條件，改變吸光值。

b. UV = 217nm (rate : 1ml/min , column : RP-18)

HAC 在 UV = 217nm 有干擾，故將 HAC 拿掉

ACN : H ₂ O = 8 : 92	Miro60min 內不出現	故將 ACN 量提高
ACN : H ₂ O = 12 : 88	MiRT = 53.31min	miro 與 genistin 分不開

ACN : H ₂ O = 13 : 87	MiRT = 42.78min GiRT = 40.95min	miro 與 genistin 有分開，但分離度不佳（拖尾效應）
ACN : H ₂ O = 15 : 85	MiRT = 27.5min GiRT = 26.5min	miro 與 genistin 分離度不佳
ACN : H ₂ O = 20 : 80	MiRT = 23.55min GiRT = 22.49min	miro 與 genistin 沒有分開

此系統分離度比 UV = 254nm 之系統佳，由於 Miro 在 UV = 217nm 時有最大吸光度，波峰較大，但與 genistin 之波峰相差值仍很大，且受雜訊之干擾也很大，分離度未達我們理想的程度，故考慮試其他條件。

c. UV = 285nm (rate : 1ml/min , column : RP-18)

ACN : H ₂ O : HAC = 8 : 92 : 0.15	Miro 60min 內不出現	故將 ACN 量提高
ACN : H ₂ O : HAC = 12 : 88 : 0.15	MiRT = 53.88min	miro 與 genistin 分不開
ACN : H ₂ O : HAC = 13 : 87 : 0.15	MiRT = 42.86min GiRT = 41.98min	miro 與 genistin 分不開（拖尾效應）
ACN : H ₂ O : HAC = 15 : 85 : 0.15	MiRT = 27.2min GiRT = 26.4min	miro 與 genistin 分離度不佳
ACN : H ₂ O : HAC = 20 : 80 : 0.15	MiRT = 23.67min GiRT = 22.32min	miro 與 genistin 沒有分開

在 UV = 285nm 時，miro 與 genistin 仍易產生拖尾效應，分離度不佳。所謂的「拖尾效應」主要是因為 genistin 在泰葛植物內所佔之含量與 miro 含量相差太大造成的。genistin 含量約為 miro 含量的 10² 倍，故易影響 miro 含量測定值。

基於以上這些因素，我們從 genistin 與 miro 的光譜圖找到在 UV = 230nm 左右，genistin 之吸光度最小。所以我們考慮是否在 UV = 230nm 時，genistin 與 miro 之分離度會較好。

(2) 流速

改變移動相與 UV 值無法得到較好的分離條件，故嘗試改變流速，

以期得到較好的分離系統

a.UV = 254nm

(i) rate = 0.5ml/min

ACN : H ₂ O : HAC = 15 : 85 : 0.15	MiRT = 48.593min	genistin 與 miro 分不開
--	------------------	---------------------

b.UV = 217nm

(ii) rate = 0.5ml/min

CAN : H ₂ O = 15 : 85	MiRT = 48.593min	genistin 與 miro 分不開
-------------------------------------	------------------	---------------------

c.UV = 285nm

(i) rate = 0.5ml/min

ACN : H ₂ O : HAC = 15 : 85 : 0.15	MiRT = 48.593min	genistin 與 miro 分不開
--	------------------	---------------------

楊玲玲等人⁽⁸¹⁾曾以甲醇/水系統來定量葛根的成分，故我們也嘗試以這個系統來定量泰葛中的活性成分 Miro，希望得到一個良好的分離系統。

B. 甲醇/水系統

(1) UV 值與移動相

先固定流速、管柱種類，改變 UV 值與移動相，尋找最佳分析條件

a.UV = 254nm (rate : 1ml/min , column : RP-18)

MeOH : H2O = 32 : 68	MiRT = 25.42min	miro 與 genistin 分離度不好(拖尾效應)
MeOH : H2O = 30 : 70	MiRT = 23.65min GiRT = 20.32min	波峰不夠尖銳，故加醋酸希望波峰更尖銳 但發現在 1~10min 分離度不好，且 Miro 不明顯
MeOH : H2O : HAC = 30 : 70 : 0.1	MiRT = 23.58min GiRT = 20.42min	波峰不夠尖銳，且分離度不好
MeOH : H2O = 25 : 75	MiRT = 35.12min GiRT = 33.62min	miro 與 genistin 分不開 (拖尾效應)
MeOH : H2O : HAC = 25 : 75 : 0.1	MiRT = 35.18min GiRT = 33.57min	miro 與 genistin 分不開 (拖尾效應)

b.UV = 217nm (rate : 1ml/min , column : RP-18)

MeOH : H2O = 32 : 68	MiRT = 25.93min	miro 與 genistin 分離度不好 (拖尾效應)
MeOH : H2O = 30 : 70	MiRT = 23.37min GiRT = 20.16min	波峰不夠尖銳，故加醋酸希望波峰更尖銳。但發現 1~10min 分離度不好，且 Miro 不明顯
MeOH : H2O : HAC = 30 : 70 : 0.1	MiRT = 23.71min GiRT = 20.38min	波峰不夠尖銳，且分離度不好
MeOH : H2O = 25 : 75	MiRT = 35.46min GiRT = 33.58min	miro 與 genistin 分不開 (拖尾效應)
MeOH : H2O : HAC = 25 : 75 : 0.1	MiRT = 34.97min GiRT = 33.11min	miro 與 genistin 分不開 (拖尾效應)

c.UV = 285nm (rate : 1 ml/min , column : RP18)

MeOH : H2O = 32 : 68	MiRT = 25.17min	miro 與 genistin 分離度不好 (拖尾效應)
MeOH : H2O = 30 : 70	MiRT = 23.86min GiRT = 20.74min	波峰不夠尖銳，故加醋酸希望波峰更尖銳。但發現 1~10min 分離度不好，且 Miro 不明顯
MeOH : H2O : HAC = 30 : 70 : 0.1	MiRT = 23.49min GiRT = 20.66min	波峰不夠尖銳，且分離度不好

MeOH : H ₂ O = 25 : 75	MiRT = 34.87min GiRT = 33.22min	miro 與 genistin 分不開 (拖尾效應)
MeOH : H ₂ O : HAC = 25 : 75 : 0.1	MiRT = 35.12min GiRT = 33.19min	miro 與 genistin 分不開 (拖尾效應)

(2) 流速 (rate = 0.6ml/min)

改變移動相與 UV 值無法得到較好的分離條件，故嘗試改變流速，以期得到較好的分離系統

a. UV = 254nm

MeOH : H ₂ O = 25 : 75	MiRT = 34.19min GiRT = 36.77min	分離度尚可
-----------------------------------	------------------------------------	-------

b. UV = 217nm

MeOH : H ₂ O = 25 : 75	MiRT = 34.19min GiRT = 36.77min	分離度尚可
-----------------------------------	------------------------------------	-------

c. UV = 285nm

MeOH : H ₂ O = 25 : 75	MiRT = 34.19min GiRT = 36.77min	分離度尚可
-----------------------------------	------------------------------------	-------

1.2.2 梯度程式系統 (兩相溶媒系統)

A. 氰甲烷/冰醋酸

(1) UV 值與移動相

先固定流速、管柱種類，改變 UV 值與移動相，尋找最佳分析條件

a. UV = 254nm (rate = 1ml/min, column : RP-18)

* 梯度沖提程式 :

A:	ACN : H ₂ O : HAC = 15 : 85 : 0.15	Time	A %	B %	Curve	MiRT (min)	GiRT (min)
B:	ACN : H ₂ O : HAC = 35 : 65 : 0.15	0	100	0	linear	25.2	26.7
		60	50	50	linear		

* 結果 : Miro 與 Genistin 分離度增加 , 但基線往上傾斜 , 不平穩 , 且 Miro 波峰小

b.UV = 217nm (rate : 1ml/min , column : RP-18)

* 梯度沖提程式 :

A:	ACN : H ₂ O : HAC = 15 : 85 : 0.15	Time	A %	B %	Curve	MiRT (min)	GiRT (min)
B:	ACN : H ₂ O : HAC = 35 : 65 : 0.15	0	100	0	linear	25.5	27.3
		60	50	50	linear		

* 結果 : Miro 與 Genistin 分離度增加 , 但基線往上傾斜 , 不平穩。

c.UV = 285nm (rate : 1ml/min , column : RP-18)

* 梯度沖提程式 :

A:	ACN : H ₂ O : HAC = 15 : 85 : 0.15	Time	A %	B %	Curve	MiRT (min)	GiRT (min)
B:	ACN : H ₂ O : HAC = 35 : 65 : 0.15	0	100	0	linear	25.9	27.8
		60	50	50	linear		

* 結果 : Miro 與 Genistin 分離度增加 , 但基線往上傾斜 , 不平穩。

(2) 流速

改變移動相與 UV 值無法得到較好的分離條件 , 故嘗試改變流速 , 以期得到較好的分離系統

a.UV = 254nm

(I) rate = 0.6 ml/min

* 梯度沖提程式：

A: ACN : H₂O : HAC
= 15 : 85 : 0.15

B: ACN : H₂O : HAC
= 35 : 65 : 0.15

Time	A %	B %	Curve	MiRT (min)	GiRT (min)
0	100	0	linear	31.23	29.98
60	50	50	linear		

* 結果：分離度可，但基線往上傾斜，不平穩，且 Miro 波峰 小

(II) rate = 0.6 ml/min

* 梯度沖提程式：

A: ACN : H₂O : HAC
= 15 : 85 : 0.15

B: ACN : H₂O : HAC
= 35 : 65 : 0.15

Time	A %	B %	Curve	MiRT (min)	GiRT (min)
0	100	0	linear	34.08	33.24
60	70	30	linear		

* 結果：分離度比較差。

(III) rate = 0.8ml/min

* 梯度沖提程式：

A: ACN : H₂O : HAC
= 15 : 85 : 0.15

B: ACN : H₂O : HAC
= 35 : 65 : 0.15

Time	A %	B %	Curve	MiRT (min)	GiRT (min)
0	100	0	linear	22.97	24.38
60	50	50	linear		

* 結果：分離度可。

b.UV = 217nm

(I) rate = 0.6 ml/min

* 梯度沖提程式：

A: ACN : H₂O : HAC
= 15 : 85 : 0.15

B: ACN : H₂O : HAC

Time	A %	B %	Curve	MiRT (min)	GiRT (min)
0	100	0	linear	30.99	29.31

= 35 : 65 : 0.15

60	50	50	linear		
----	----	----	--------	--	--

* 結果：分離度佳，但基線往上傾斜，不平穩，與 B 濃度沖提量減少有關

(II) rate = 0.6 ml/min

* 梯度沖提程式：

A: ACN : H₂O : HAC
= 15 : 85 : 0.15

B: ACN : H₂O : HAC
= 35 : 65 : 0.15

Time	A %	B %	Curve	MiRT (min)	GiRT (min)
0	100	0	linear	34.67	33.35
60	70	30	linear		

* 結果：分離度比較差。

(III) rate = 0.8ml/min

* 梯度沖提程式：

A: ACN : H₂O : HAC
= 15 : 85 : 0.15

B: ACN : H₂O : HAC
= 35 : 65 : 0.15

Time	A %	B %	Curve	MiRT (min)	GiRT (min)
0	100	0	linear	23.16	24.54
60	50	50	linear		

* 結果：分離度尚可。

c.UV = 285nm

(I) rate = 0.6 ml/min

* 梯度沖提程式：

A: ACN : H₂O : HAC
= 15 : 85 : 0.15

B: ACN : H₂O : HAC
= 35 : 65 : 0.15

Time	A %	B %	Curve	MiRT (min)	GiRT (min)
0	100	0	linear	30.54	28.79
60	50	50	linear		

* 結果：分離度變佳，但基線往上傾斜，不平穩。

(II) rate = 0.6 ml/min

* 梯度沖提程式：

A: ACN : H₂O : HAC
= 15 : 85 : 0.15

B: ACN : H₂O : HAC
= 35 : 65 : 0.15

Time	A %	B %	Curve	MiRT (min)	GiRT (min)
0	100	0	linear	34.98	32.76
60	70	30	linear		

* 結果：分離度變佳，

(III) rate = 0.8ml/min

* 梯度沖提程式：

A: ACN : H₂O : HAC
= 15 : 85 : 0.15

B: ACN : H₂O : HAC
= 35 : 65 : 0.15

Time	A %	B %	Curve	MiRT (min)	GiRT (min)
0	100	0	linear	23.16	24.54
60	50	50	linear		

* 結果：分離度尚可。

* 三種 UV 值在流速 = 0.6ml/min 時，以 UV = 217 分離度最佳，但易受雜訊干擾，且基線往上傾斜，不平穩，與 B 濃度沖提量減少有關，故降低 B 濃度沖提量。

B. 甲醇/水系統

(1) UV 值與移動相

先固定流速、管柱種類，改變 UV 值與移動相，尋找分析條件最佳化

a. UV = 254nm (rate : 1ml/min , column : RP18)

* 梯度沖提程式：

A: MeoH : H2O
= 20 : 80

B: MeoH : H2O
= 45 : 55

Time	A %	B %	Curve	MiRT (min)	GiRT (min)
0	100	0	linear	19.98	21.57
60	0	100	linear		

* 結果：分離效果很差

b.UV = 217nm (rate : 1ml/min , column : RP18)

* 梯度沖提程式：

A: MeoH : H2O
= 20 : 80

B: MeoH : H2O
= 45 : 55

Time	A %	B %	Curve	MiRT (min)	GiRT (min)
0	100	0	linear	19.47	21.24
60	0	100	linear		

* 結果：分離效果很差

c.UV = 285nm (rate : 1ml/min , column : RP18)

* 梯度沖提程式：

A: MeoH : H2O
= 20 : 80

B: MeoH : H2O
= 45 : 55

Time	A %	B %	Curve	MiRT (min)	GiRT (min)
0	100	0	linear	18.85	20.66
60	0	100	linear		

* 結果：分離效果不好

(2) 流速

改變移動相與 UV 值無法得到較好的分離條件，故嘗試改變流速，以期得到較好的分離系統

a.UV = 254nm (rate = 0.6 ml/min)

* 梯度沖提程式：

A: MeoH : H2O
= 20 : 80

Time	A %	B %	Curve	MiRT (min)	GiRT (min)
------	-----	-----	-------	------------	------------

B: MeoH : H2O
= 45 : 55

0	100	0	linear	30.27	32.15
60	0	100	linear		

* 結果：分離效果不好（有拖尾現象）

b.UV = 217nm (rate = 0.6 ml/min)

* 梯度沖提程式：

A: MeoH : H2O
= 20 : 80

B: MeoH : H2O
= 45 : 55

Time	A %	B %	Curve	MiRT (min)	GiRT (min)
0	100	0	linear	31.18	32.95
60	0	100	linear		

* 結果：分離效果很差（有拖尾現象）

c.UV = 285nm

* 梯度沖提程式：

A: MeoH : H2O
= 20 : 80

B: MeoH : H2O
= 45 : 55

Time	A %	B %	Curve	MiRT (min)	GiRT (min)
0	100	0	linear	30.86	33.57
60	0	100	linear		

* 結果：分離效果不好（有拖尾現象）

由以上尋找分析條件的方法中，我們得出一個總結：

對於 **miro** 與 **genistin** 這兩個活性成分，欲使它們的波峰分離度變佳，移動相與 UV 值無法產生較大的作用，但改變流速可使兩者分離度變佳。由於 **miro** 與 **genistin** 易產生拖尾效應，分離度不佳。所謂的「拖尾效應」主要是因為 **genistin** 在泰葛植物內所佔之含量與 **miro** 含量相差太大造成的。**genistin** 含量約為 **miro** 含量的倍，故易影響 **miro** 含量測定值。

基於以上這些因素，我們從 genistin 與 miro 的光譜圖找到在 UV = 230nm 左右，genistin 之吸光度最小。所以我們考慮在 UV = 230nm 時，改變其流速

1.3 分析條件的最佳化

(1) UV = 230nm , column : RP-18 , rate = 0.8ml/min

* 梯度沖提程式 :

A: ACN : H2O : HAC
= 15 : 85 : 0.15

B: ACN : H2O : HAC
= 35 : 65 : 0.15

Time	A %	B %	Curve	MiRT (min)	GiRT (min)
0	50	50	linear	23.00	24.38
60	50	50	linear		

* 結果：分離效果尚可

(2) UV = 230nm , column : RP-18 , rate = 0.6ml/min

(2)-1. 梯度沖提程式 :

A: ACN : H2O : HAC
= 15 : 85 : 0.15

B: ACN : H2O : HAC
= 35 : 65 : 0.15

Time	A %	B %	Curve	MiRT (min)	GiRT (min)
0	100	0	linear	30.55	28.75
60	50	50	linear		

* 結果：分離效果尚可

(2).1 梯度沖提程式 :

A: ACN : H2O : HAC
= 15 : 85 : 0.15

B: ACN : H2O : HAC
= 35 : 65 : 0.15

Time	A %	B %	Curve	MiRT (min)	GiRT (min)
0	100	0	linear	33,83	32.00
60	70	30	linear		

* 結果：分離效果尚可

(3) UV = 230nm , column : RP-18 , rate = 0.5ml/min

* 梯度沖提程式：

A: ACN : H₂O : HAC
= 15 : 85 : 0.15

B: ACN : H₂O : HAC
= 35 : 65 : 0.15

Time	A %	B %	Curve	MiRT (min)	GiRT (min)
0	100	0	linear	39.23	37.00
60	70	30	linear		

* 結果：分離效果不錯

(4) UV = 230nm , column : RP-18 , rate = 0.4ml/min

(4)-1. 梯度沖提程式：

A: ACN : H₂O : HAC
= 10 : 90 : 0.15

B: ACN : H₂O : HAC
= 35 : 65 : 0.15

Time	A %	B %	Curve	MiRT (min)
0	75	25	linear	44.26
60	70	30	linear	

* 結果：分離度差

(4)-2 梯度沖提程式：

A: ACN : H₂O : HAC
= 10 : 90 : 0.15

B: ACN : H₂O : HAC
= 35 : 65 : 0.15

Time	A %	B %	Curve	MiRT (min)	GiRT (min)
0	70	30	linear	41.31	38.51
60	65	35	linear		

* 結果：分離度不好 (波峰不夠尖銳)

(4)-3. 梯度沖提程式：

A: ACN : H₂O : HAC
= 10 : 90 : 0.15

B: ACN : H₂O : HAC
= 35 : 65 : 0.15

Time	A %	B %	Curve	MiRT (min)	GiRT (min)
0	45	55	linear	33.2	31.0
60	43	57	linear		

* 結果：分離度不好

(4)-4. 由於梯度沖提，基線易不平，起伏不定太大。

選擇單一溶媒系統 ACN : H₂O : HAC = 20 : 80 : 0.15 *

* MiRT = 31.54min

GiRT = 35.81min

* 結果：相隔約有四分鐘和 Genistin 分開了，無拖尾現象，但中間多分離了一個小峰交叉了 Miro 的峰

(5) UV = 230nm , column : RP-18 , rate = 0.3ml/min

(5)-1 梯度沖提程式：

	Time	A %	B %	Curve	MiRT (min)	GiRT (min)
A: ACN : H ₂ O : HAC = 10 : 90 : 0.15	10	20	80	linear	12.00	11.57
	15	60	40	linear		
	20	57	43	linear		
B: ACN : H ₂ O : HAC = 35 : 65 : 0.15	30	56	44	linear		
	60	55	45	linear		

(iii) 結果：Miro 與 Genistin 分不開

(5)-2. (i) ACN : H₂O : HAC = 22 : 78 : 0.15 *

(ii) MiRT = 27.35min

GiRT = 31.43min

(iii) 結果：相隔約有四分鐘和 Genistin 分開了，無拖尾現象，但中間多分離了一個小峰交叉了 Miro 的峰

(5)-3.. (i) ACN : H₂O : HAC = 20 : 80 : 0.15 *

(ii) MiRT = 35.34min

GiRT = 40.23min

(iii) 結果：分隔有五分鐘和 Genistin 分開了，無拖尾現象，但中間多分離了一個小峰交叉了 Miro 的峰

結論：以上三個 * 部分為分離度較佳之部份，由於

- () ACN : H₂O : HAC = 20 : 80 : 0.15, rate = 0.3ml/min : RT 太長，Miro 太晚出來，導致波峰不夠尖銳
- () ACN : H₂O : HAC = 22 : 78 : 0.15, rate = 0.3ml/min : RT 合適，但波峰對稱度不佳
- () ACN : H₂O : HAC = 20 : 80 : 0.15, rate = 0.4ml/min : RT 合適，且波峰對稱度佳,分離度好，故選擇此作為較佳條件，來加以修飾。

上述三個較好的系統，MiRT 都和 GiRT 都有不錯的分離度，但是，共同一個最大面臨的問題是分離度變好，反而把夾在兩者中間的小波峰給分離出來，而且把 Miro 的波峰給覆蓋了一部份。所以，選擇() 系統再加以改變，應該就能夠達到分離 Miro 單一波峰不和其他波峰有交叉的情形。故嘗試在 MiRT 出現的時間點前面，考慮降低流速，在 22.1min 時，分別嘗試以 0.2 ml/min 及 0.3 ml/min 去嘗試，結果顯示在降低成 0.2 ml/min 時，Miro 有分離出來較鈍。而且基線會飄，不易穩定。

在 22.1min 時，降低流速到 0.3 ml/min，Miro 樣有分離出來，但基線較平穩，而且波峰會更尖銳，而經過 Shimadzu SPD-10A system 在 MiRT 200~300nm 的檢測，與標準品的 UV 圖比對確定為 Miroestrol，所以，最佳分析條件如下。

qq Miroestrol 之 HPLC 最佳定量方法qq

層析管：Lichrospher RP-18

檢測波長：230nm

內部標準品：methylparaben

溫度：30

移動相：ACN : H₂O : HAc = 20 : 80 : 0.15

滯留時間：34.6min

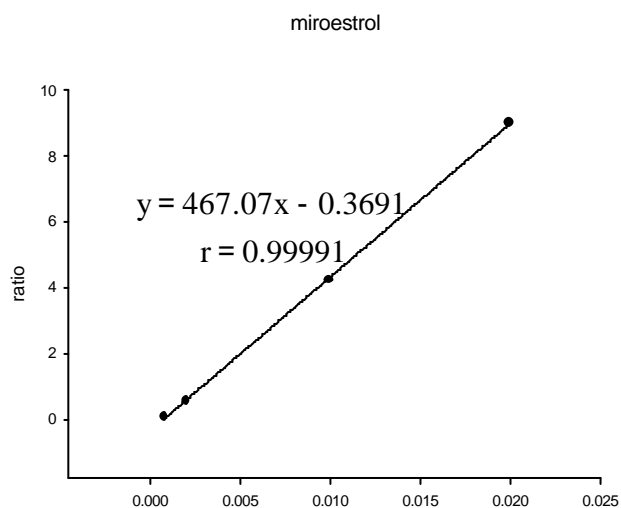
時間梯度方程式

時間	流速
22	0.4 ml/min
22.1min	0.3 ml/min
37min	0.3 ml/min
45min	0.4 ml/min
60min	0.4 ml/min

第二節 分析條件的建立

壹、檢量線之繪製

指標成分 Miroestrol 配置各種濃度，其檢量液經 HPLC 析後，所得之 area 數據（重三次分析之平均值）進行直



迴歸，繪成檢量線並得迴歸直線之方程式，見右圖。

貳、精密度試驗

精密度的實驗部分，我們選擇以最佳分析條件對各成分進行定量，在同一天內連續重複注射三次（intraday）及不同天（一星期內）重複注射三次（interday）總計注射六次。分別以吸收峰面積及滯留時間，來計算相對標準偏差（RSD，%），見表 Table.30.

實驗的結果顯示，再現性良好，而同一天的面積比相對標準偏差在 0 % - 1.15 % 之間，不同天的面積比相對標準偏差在 0.06 % - 1.14 % 之間

Table. 30 .在藥材中 Miroestrol 同日間及異日間之分析精密度 (n = 3)

Conc. (ug/ml)	Intraday	Interday
	mean \pm S.D. (R.S.D)	mean \pm S.D. (R.S.D)
20	9.01 \pm 0.00 (0.00 %)	9.02 \pm 0.0058 (0.06 %)
10	4.22 \pm 0.0058 (0.14 %)	4.23 \pm 0.0058 (0.14 %)
2	0.56 \pm 0.0003 (0.05 %)	0.57 \pm 0.0058 (1.02 %)
0.8	0.05 \pm 0.0005 (1.15 %)	0.05 \pm 0.0006 (1.14 %)

參、回收率試驗

Constituent	PM	PM1	PM2	PO1	PO2	TPO	BS
miro (mean \pm S.D)	102.6	101.8	100.5	103.1	98.3	102.2	98.7

實驗結果顯示，miro 的回收率在 98.3 % -103.1 % 之間，證明實驗準確可靠。

第三節 泰葛有效成分 miroestrol 之定量分析結果

在各種不同產地葛根之高效液相層析中，我們發現除了泰國葛根原植

物與各種市場品有 miro 此活性成分外，尚還有 PP、PL3、tRoot、tStem 疑似有 miro 此特有成分，故在此 miro 之分析系統再加以重新定量分析，以判斷出 miro 此成分存在與否。

我們將取得之藥材與植物進行前處理，以實驗步驟之萃取方式進行泰國葛根原植物與各種市場品(縮寫如 Table 31)的萃取，得到各種泰葛植物與市場品之抽提率，進而分析得到層析圖 (Chrom. 13-19)，再換算得到泰葛活性成分 miro 在原生藥材或植物中的實際含量。由於 miro 在原生藥材或植物中的實際含量很少，於高效液相層析定量時並不容易，故我們希望建立一個良好的分析系統來定量 miro 此活性成分。

1. 各種泰葛植物與市場品之抽提率

將各種葛屬植物以實驗步驟之萃取方式進行萃取，經迴旋濃縮至乾，稱重，分別得到抽提率 (Table.32、 Fig.16) 如表

Table 31. 各種泰葛植物與市場品之縮寫

種 類	縮 寫
泰國葛根原植物.....	PM
泰國葛根市場品.....	PM1
泰國葛根美國市場品(寶齡富錦提供).....	PM2
泰國葛根一年生根.....	Root
泰國葛根一年生莖.....	Stem
泰葛組織培養癒傷組織之根.....	tRoot
泰葛組織培養癒傷組織之莖.....	tStem
泰國葛根混用品.....	BS
臺灣葛根市場品.....	PP
大陸四川葛根市場品.....	PL3

Table 32.各種泰葛植物與市場品之抽提率百分比

抽提率	PM	PM1	PM2	PP	PL3

	37.44 %	40.55 %	0.68 %	17.02 %	15.90 %
	Root	Stem	tRoot	tStem	BS
	19.21 %	12.57 %	45.52 %	10.99 %	21.06 %

各種泰葛植物與葛屬植物市場品之抽提率比：

tRoot > PM1 > PM > BS > Root > PP > PL3 > Stem > tStem > PM2

Table 33. 泰葛與葛屬植物市場品每公克內含活性成分之含量 (mg/g)

	PM	PM1	PM2	PP	PL3
miroestrol	2.51×10^{-1}	4.48×10^{-2}	4.03×10^{-2}	0	0
	Root	Stem	tRoot	tStem	BS
	1.28×10^{-2}	4.96×10^{-3}	5.29×10^{-2}	0	0

PM > tRoot > PM1 > PM2 > Root > Stem > BS = PP = PL3 = tStem

第三部分 葛根屬總黃酮的測定

第一節 前言

葛根在各地分布廣泛，資源豐富，品種繁多，一般指豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (WILLDENOW.) O_{HWI} 或甘葛藤 *Pueraria thomsonii* B_{ENTH} 的乾燥根。全世界有近 20 種⁽³¹⁾，主要分布於亞熱帶和溫帶地區。近代藥理研究證明，葛根中有效成分葛根總黃酮能降低心肌耗氧量，增加冠狀動脈、腦血管血流量，明顯緩解心絞痛，抗心律失常等，被醫藥界專家們認為具有開發治療心腦血管系統疾病之新藥的良好前景。

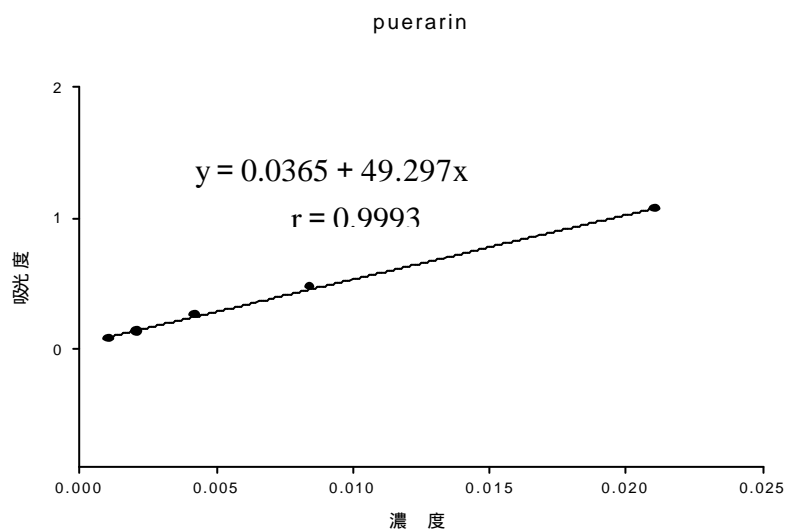
葛根品種非常繁雜，加上「地道藥材」的因素，所以，品質參差不齊。孫恩玲⁽⁸⁴⁾等人分析結果表明，除野葛的總黃酮成分明顯高於粉葛外，其水溶性、醇溶性成分的含量亦明顯高於粉葛。張愛岑⁽⁸⁵⁾等人以葛根素為對照品，採用紫外分光光度法測定了不同煎煮時間所得提取物中葛根總黃

酮的含量，許多文獻⁽⁸⁶⁻⁸⁸⁾利用紫外光測定法去定量不同葛屬植物之總黃酮，以作為對品質鑑定的指紋圖譜之一。這都是利用葛屬植物中含多量的黃酮類及異黃酮類活性成分，故我們採用紫外分光光度法進行總黃酮含量測定。葛屬植物之總黃酮的測定大多是以葛根素及大豆素為一個指標⁽⁸⁶⁻⁸⁸⁾，且因為我們的葛屬植物中含多量的葛根素，而葛根素的最高吸光度在 250nm，故我們以葛根素為指標，作其檢量線，在 250nm 進行檢品總黃酮含量的測定。

本文作了泰葛之成分研究，就泰國、四川、臺灣三地進行了七種不同來源的葛根做總黃酮含量測定，期望建立一套快速且方便的含量測定方法，以便應用於鑑別製藥產業上之產品質量優劣且完成泰葛之含量測定。同時為葛根質量評價提供參考，篩選出品質佳、有效成分含量高之葛屬品種。

第二節 分析條件的建立與評估：

壹、檢量線之製作



貳、精密度試驗

Table 34. 在藥材中 Puerarin 同日間及異日間之分析精密度 (n = 3)

Conc. (μg/ml)	Intraday	Interday
	mean ± S.D. (R.S.D)	mean ± S.D. (R.S.D)
20	1.593 ± 0.00058 (0.036 %)	1.594 ± 0 (0 %)
4	0.472 ± 0.00058 (0.12 %)	0.473 ± 0.00058 (0.12 %)
2	0.257 ± 0.00058 (0.22 %)	0.257 ± 0.001 (0.39 %)
1	0.133 ± 0.00058 (0.43 %)	0.134 ± 0.001 (0.75 %)
0.5	0.073 ± 0 (0 %)	0.0733 ± 0.0006 (0.79 %)

參、回收率試驗

Table 35 . 各種葛根的總黃酮回收率試驗

總黃酮回收率試驗			
PM	98.7 %	PM (Root)	102.4 %
PM1	97.2 %	PM (Stem)	100.9 %
PL1	103.5 %	PM (Leaf)	101.9 %
PL2	101.4 %	PM (tRoot)	104.8 %
PL3	103.8 %	PM (tSeed)	102.6 %
PP	99.6 %	PM (t Stem)	97.2 %
PT	104.6 %		

第三節 各種不同產地葛屬植物中總黃酮含量比較

我們將取得之藥材與植物進行前處理，以實驗步驟之萃取方式進行各種不同產地葛屬植物的萃取，進而以紫外分光法進行分析，得到各個不同的吸光度值，再換算得到原生藥材或植物中總黃酮的含量，達到一個良好的品質監測及總黃酮成分多寡的比較。測定總黃酮含量結果如下：
(Table 36.& Fig.18)

Table 36.不同產地葛屬植物中總黃酮含量比較 (%)

泰葛 (PM)					川葛 (PL)		臺葛 (PT、 PP)		
PM	總黃酮含量	一年	總黃酮含量	Calli	總黃酮含量	No	總黃酮含量	No	總黃酮含量
PM	1.38	Root	0.18	tRoot	0.50	PL1	0.62	PT	1.6
PM1	0.99	Stem	0.39	tStem	0.63	PL2	0.57	PP	0.93
		Leaf	0.12	tSeed	0.73	PL3	0.82		

總黃酮含量比：PT > PM > PM1 > PP > PL3 > tSeed > tStem > PL1 > PL2 > tRoot > Stem > Root > Leaf

在前言我們曾提到，近代藥理研究證明，葛根中有效成分葛根總黃酮能降低心肌耗氧量，增加冠狀動脈、腦血管血流量，明顯緩解心絞痛，抗心律失常等，被醫藥界專家們認為具有開發治療心腦血管系統疾病之新藥的良好前景。

因此，在不同產地葛屬植物中，我們以紫外分光法進行分析，比較原生藥材或植物中總黃酮的含量。

由 Table . 36.中得知：

(1) 以泰葛原植物與市場品而言，泰葛原植物的總黃酮含量比泰葛市場品高出 1.4 倍，顯示在醫療應用上，泰葛原植物會比泰葛市場品之應用價值來的高。

(2) 以川葛之市場品而言，PL3 比 PL1、 PL2 來的高，而藥用川葛(PL1、

PL3) 又比一般民間食用川葛之總黃酮含量來的高，可以顯示彼此之間的不同處。

(3) 以臺葛而言，PT 之總黃酮含量又比 PP 高出約 1.7 倍，明顯看出兩者品質之差異。

(4) 就泰葛、川葛、臺葛三種不同產地之葛根而言，泰葛與臺葛之總黃酮含量比川葛明顯來的高，三者總黃酮含量高低之差可高達 2.7 倍，其中以 PT 含量最高，PL2 含量最低。

(5) 就泰葛一年生原植物與癒傷組織 (callus) 而言，我們實驗所培養出來的癒傷組織其所含總黃酮的含量平均都比一年生原植物來的高，高低差可達 6 倍以上，而與四年生原植物比較，癒傷組織之含量一般都比較低，故我們希望未來繼續往癒傷組織之二次代謝產物這方面探討，以期在產業應用上，此可以成為一個開發的重點。

綜合以上所述，由於葛屬植物內總黃酮含量很多，故我們測定葛屬植物之總黃酮含量，期望以此當作一個辨別葛屬植物有效成分含量及其品質優劣的方法，完成快速、準確且簡便的測定

第六章 結果與討論

第一節 化學成分部分及藥理活性

此研究針對泰葛 *Pueraria Mirifica* 的成分單離，共獲得了四個化合物，為一個泰葛特有成分，目前在植物界中發現最強的植物雌激素：葛雌素(Miroestrol)；三個異黃酮類化合物，葛根素(Puerarin)、大豆元(Daidzein)及金雀異黃酮素(Genistein)。

藉著 HL-60 細胞株，利用 MTT assay 抗增殖活性和 NBT assay 分化活性篩選步驟，測出泰葛所含有之成分活性大小為：

Genistein ($IC_{50}=0.02 \mu M$) > Genistin ($IC_{50}=0.023 \mu M$) >

Daidzin ($IC_{50} = 0.06 \mu M$) > Daidzein ($IC_{50} = 0.08 \mu M$) >

Miroestrol($IC_{50} = 0.11 \mu M$) > Puerarin

配合分離出大豆元、金雀異黃酮素，都有頗強的抗增殖效果及些許

的分化效果，這和某些文獻指出的這兩者有抗增殖及分化效果相符合⁽²²⁻²³⁾⁽²⁷⁾，證明了我們要藥理數據的準確性；同樣地，葛雌素對 HL-60 細胞株也呈現有不低的抗增殖活性， $IC_{50} = 0.11\mu M$ ，這也是 1940 年以來⁽⁵³⁾，葛雌素首次針對白血病的細胞株做研究。加上本實驗室原本之前分離的染料木素(Genistin)及標準品的大豆素(Daidzin)對 HL-60 細胞株的測試結果，發現其實和不接糖基的大豆元(Daidzein)和金雀異黃酮素(Genistein)，抗增殖活性和分化的活性相似。

基本上，植物雌激素一般指雜環多酚類化合物，是一種具有弱雌激素作用的植物成分，它與 17 β -雌二醇結構相似，可以與雌二醇競爭性結合雌激素受體，表現出雌激素拮抗作用，對激素相關性疾病具有保護作用。就考察所得資料，泰葛的成分一樣也是以異黃酮居多，而且對於成分的瞭解並不十分完全，仍有很大的研究空間，故本實驗以白血病藥物研發為前提，目前完成了初步的研究工作，還需要進行持續地研究。

第二節 各種不同產地葛屬植物及泰葛愈創組織的定量：

泰葛、川葛及台葛三地不同產地七種不同來源的葛屬植物的乾燥根，含指標成分葛根素、大豆素、染料木、大豆元及金雀異黃酮素等五種成分的量經由同一分析系統中被定量出來。

葛根素(Puerarin)含量：

泰葛原植物(PM)含量最高，台灣葛根(PP)、(PT)次之。

大豆素(Daidzin)、染料木(Genistin)及大豆元(Daidzein)含量：以台灣葛根(PP)最高，台灣野葛(PT)次之。

金雀異黃酮(Genistein)含量：

泰葛市場品切片(PM1)最高，台灣葛根(PP)及(PT)次之。

基於以上這些資料，可知泰葛原植物(PM)由於葛根素的作用，降壓效果可能會比其他的強，擴張冠狀動脈及有關葛根素藥理的作用也較強；至

於台灣葛根(PP)及台灣野葛(PT)的葛根素、大豆素、染料木 及大豆 元等含量都非常高，所以，可能鎮痛消炎的效果應該不錯。這些指標成分的量，可以提供中藥製藥產業、天然物研究學者，乃至中醫師臨床用藥(現在已有不少中醫師葛根用藥取用台灣品種)，一個藥材原料選用的新思考。

泰葛植物一年生的根和多年生的樣品，比較五種標準指標成分，成分皆低於多年生樣品原植物，所以，多年生的泰葛乾燥根的二次代謝物可能才比較多。一年生的根、莖和葉的指標成分含量比，在葛根素、大豆素、染料木 、大豆 元及金雀異黃酮皆為根>莖>葉，證明根的活性成份量的確較高。

在愈傷組織生產二次代謝產物方面，在生產在大豆 元 ()含量上，以種子之愈傷組織含量最高。在染料木黃酮 () 含量上，以根之愈傷組織含量最高。即染料木黃酮和大豆 元的含量上，愈傷組織含量是大於同為一年生的原植物。所以，在植物細胞培養二次代謝產物的角度上，許多成功培養二次代謝產物的成功例子⁽¹⁻³⁾，意謂著泰葛的活性成分物質，理論上也可以藉著植物細胞工廠，來生產大量的有用物質，其經濟效益及效果也許會比想像中大。

葛根是一種多年生的木本植物，內含成分複雜⁽⁶⁾，而葛雌素是泰葛特有之成分，一直以來，無人發表任何有關定量的方法去定量它，也由於它的含量稀少，在定量它時，有極大的困難存在。本研究從單相溶媒系統到三相溶媒系統，改變 UV，改變流速，換管柱，終於將其從泰葛植物中定量出來，並經由光二極陣列偵測器，確定其他的葛根屬植物並無此化合物。在泰葛三種樣品中，都有發現葛雌素的存在。在一年生的莖、根也存在微量的葛雌素，令人驚喜的是在根愈傷組織中也有發現葛雌素，奠定了日後可以大量培養愈傷組織已生產葛雌素的基礎；葛雌素由於少量，一直以來，藥理的相關文獻一直停留在 1960 年代時期，它的強效雌激素樣作用，也許嘗試用來代替動物性來源的荷爾蒙，成為荷爾蒙替代療法之用藥，治療女性的更年期；亦或者在天然保健食品意識抬頭同時，可以嘗試

用泰葛內植物雌激素(異黃酮及葛雌素)的特性，取代目前當紅的大豆異黃酮，成為高齡婦女的一種保健食品，故葛雌素可作為雌激素天然藥物開發的前驅物。

總黃酮以台灣野葛(PT)的含量最多，泰葛原植物(PM)及市場品(PM1)的含量次之。泰葛一年生原植物與癒傷組織 (callus) 而言，我們實驗所培養出來的癒傷組織其所含總黃酮的含量平均都比一年生原植物來的高，高低差可達 6 倍以上，而與四年生原植物比較，愈傷組織之含量一般都比較低，故我們希望未來繼續往癒傷組織之二次代謝產物這方面探討，以期在產業應用上，此可以成為一個開發的重點。

第七章 實驗部分

第一節 實驗材料

壹、泰葛乾燥根來源：泰國曼谷生物科技公司

貳、台灣野葛及葛、大陸四川葛及食用葛：臻里生物科技公司

參、泰葛市場品來源及混用品 BS：世華生物科技公司、寶齡富錦生技提供

肆、一年生泰國葛 (根、莖、葉)：世華生物科技公司提供種子，一年室外栽培獲得，並由本校技正邱年永老師鑑定後，確定為泰葛。

伍、泰葛愈傷組織：在無菌培養環境下，由種子新生的幼芽發出後，經七天成長後，誘發產生愈創組織，經一年繼代培養而得。

陸、標準藥品：

1.大豆干元 (daidzin) 為本實驗之前分離所得

2.染料木素(genistin)購自 Wako

3.葛雌素(miroestrol)，大豆素 (daidzein)，金雀異黃酮(genistein)，葛

根素 (puerarin) , 利用分離獲得
柒、細胞株 (HL-60 cell line)

Human promyelocytic leukemia cells(人類前骨髓性血癌細胞) , 屬於懸浮性細胞可用 RPMI 1640 culture medium 培養之 ; 來自於美國 American Type Culture Collection (Maryland , USA) 。

第一節 試藥、材料與儀器

壹、試藥

1.購自德國 Merck 公司者 :

CD3OD(Methanol-d₄,Deuteration Degree 99.5%)

DMSO(Dimethyl sulfoxide-d₆, Deuteration Degree 99.5%)

KH₂PO₄、 Na₂HPO₄、 KCl、 NaCl

Dimethyl sulfoxide (DMSO)

Phenylacetate (PA)

2.購自美國 Tedia 公司者 :

n-Hexane、 Chloroform、 Ethyl acetate、 Methanol(ACS)

Acetonitrile、 Methanol、 Glacial acetic acid (LC grade)

3.配置樣品及移動相的去離子水 (deionized water) 取自 Milli-Q system

貳、材料

(1)萃取分離純化、薄層層析與管柱層析用 :

1.TLC Aluminum sheets silica gel 60 F₂₅₄ pre-coated 25 sheets

2.Silica gel 60 (70 – 230 mesh) (Merck)

3.TLC plates RP-18 F254s pre-coated 25 plates

4.HP-20(Diaion)(NIPPON RESSUI CO.,Japan)

5.LH-20(Sephadex)(25-100 μ m)(Pharmacia Fine Chemicals,Sweden)

6.RP-8(LiChroprep, Art. 11804)(Merck)

(2)組織培養用 :

B5 medium(Sigma CO.)

Benzylamimopurine(BA)(Sigma CO.)

Picrolam(Sigma Co.)

(3)液相層析用：

分離管：RP-18 (4.6×250mm , Merck , NO : 510705) , Cosmosil column

注射裝置：20ul injector

0.45 μm 過濾膜(Kimble. Co.)

(4)藥理試驗用：

1. 購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis , MO)

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)

Trypan blue solution , 0.4%

Ribonuclease A (RNase)

Propidium Iodide (PI)

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

2. 購自東京化成工業株式會社 TCI (Tokyokase , Tokyo , Japan)

Nitroblue tetrazolium (NBT)

3. 購自 BIOWEST

RPMI 1640 culture medium

Fetal bovine serum (FBS)

4. 購自 Gibco laboratories (Grand Island, NY)

Antibiotics (Penicillin, Streptomycin)

L-Glutamine

10× Dulbecco's Hanks balanced salt solution

10× Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline

5. 購自 BASO diagnostic, Inc.Taiwan

Liu A solution

Liu B solution

參、儀器

(一)融點測定器 (Melting Point Apparatus)

本實驗產物之熔點係採用 Yanaco MP-500D 熔點測定器測定，

而其測定範圍在 40–500 ，且溫度未經校正。

(二)質譜儀(Mass Spectrophotometer)

EI Mass 以 VG Platform II GC-MS instrument 測定和用 Shimadzu QP-1100EX，電子化電壓為 70 eV，單位為 m/z 。(中國醫藥學院精密儀器中心)

(三)核磁共振光譜儀(Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer)

氫及碳的核磁共振光譜分析係採用 Bruker ADVANCE DPX-200 FT-NMR Spectrometer 測定。(中國醫藥學院精密儀器中心)

以 (ppm)表示化學位移，而以 TMS (tetramethylsilane) 0 ppm 為內部標準。偶合常數(J)以 Hz 為單位，並以 s 表單峰(singlet)， d 表二重峰(doublet)， t 表三重峰(triplet)， q 表四重峰(quartet)， m 表多重峰(multiplet)。

(四)紅外線光譜儀(Infrared Spectrophotometer)

紅外線光譜分析用 Nicolet Impact 400 FT-IR Spectrophotometer 測定，以溴化鉀(KBr)粉末為打片稀釋劑，光譜單位為 cm^{-1} 。

(五)紫外光-可見光光譜儀(UV-Visible Spectrophotometer)

紫外光-可見光光譜分析係採用 Shimadzu UV-160A UV-Visible Recording Spectrophotometer 測定，使用甲醇為溶劑，最大吸收波長(λ_{max})單位為 nm，以 \log 表示 molar absorptivity。

(六)元素分析儀(Element Analyzer)

元素分析係採用 Perkin Elmer PE 2400 Series II CHNS/O Analyzer 測定，元素分析值與理論值相差皆在 $\pm 0.4\%$ 以內。(中國醫藥學院精密儀器中心及國科會中部貴重儀器使用中心)

(七)紫外光燈(UV Equipment)

使用 CAMAG UV-Cabinet II 紫外燈觀察箱，備有 254 nm 與 366 nm 之光源。

(八)高壓蒸汽滅菌鍋

(九)無菌操作台

(十)微量電子天平：最小感度為 0.1mg 以下

(十一)高效液相層析儀 (HPLC)：Shimadzu 6A system

液壓推進器：Shimadzu LC-6A pump 兩個

偵測器：Shimadzu SPD-6AV Uvdetector

資料處理器：Shimadzu C-R3A recorder

系統控制儀：SCL-6A system controller

(十二)超音波振盪器

(十三)抽氣過濾器

(十四)微量玻璃過濾器 (microfiltration assemblies)

(十五)藥理試驗用：

Becton Dickinson Flow Cytometry

垂直式無菌操作檯(Laminar Flow)

直立式光學顯微鏡 (Olympus CH-20)

倒立式光學顯微鏡 (Nikon Ellipse TE300)

高速離心機(Hettich zentrifugen)

細胞培養箱(37 、 5 % CO₂ Incubator)

細胞培養箱(37 Incubator)

血球計算盤(Hemocytometer)

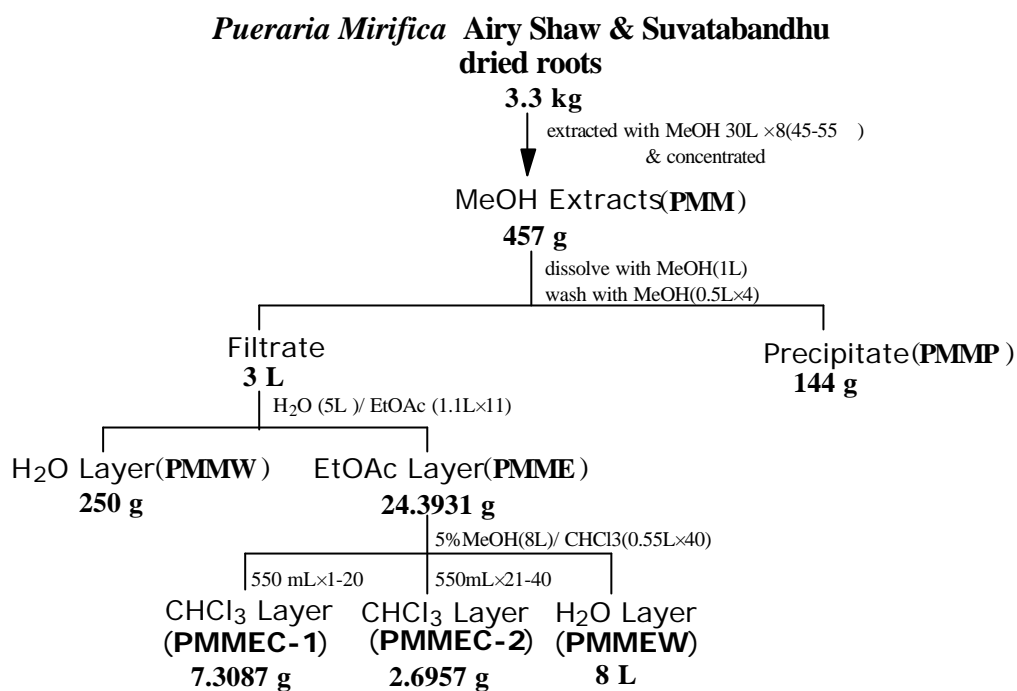
ELISA reader (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

第二節 泰葛萃取分離與純化

壹、第一次抽取與分離:

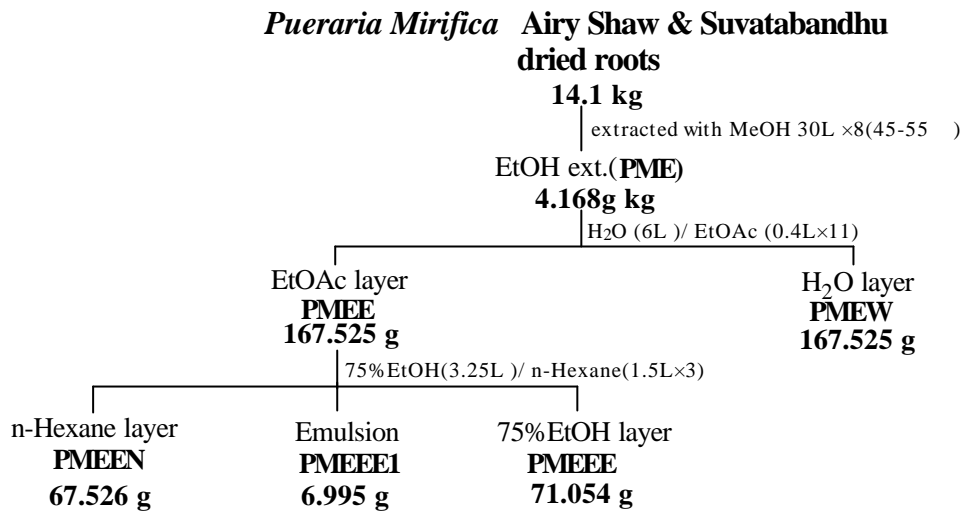
泰國北部取得泰葛(*Pueraria mirifica*)的根，陰乾後為 3.3Kg。泰國方面鑑定基原為豆科植物(*Leguminosae*)，葛根屬(*Puraria*)植物泰國葛根(*Pueraria mirifica*)。將陰乾後的根部切碎後，甲醇浸泡，維持 45~50 水浴中，每兩天取出濃縮一次，抽取 8 次後，合併得甲醇粗抽出物(MeOH extracts)457 g，乾重為 390g，含水率為 14.6%，抽出率為 13.8%。

取出甲醇抽出物(MeOH extracts)457g，溶於 1L 的甲醇中，超音波震盪後，用布氏漏斗過濾不溶物，再用甲醇 500ml 沖洗四次，得不溶沉澱物 144g(MP)，將收集濾液(Filtrate)(M)3L 加入適量水濃縮成 emulsion 狀約 5L，再以乙酸乙酯(EtoAc)1.1L 分配萃取 11 次，得乙酸乙酯層(ME)24.393g，及剩餘之水層(MW)249g。將以乙酸乙酯層(ME)24.3931g 用 400mL MeOH 溶解，加入至 8L(5% MeOH)，以 CHCl_3 每次 550mL，共分配萃取 40 次，得第一次 CHCl_3 層(MEC-1)7.3087g，再以 CHCl_3 分配萃取 21-40 次，得第二次 CHCl_3 層 2.6957g，剩餘之水層為 MEW(8L)。(Scheme 6)。

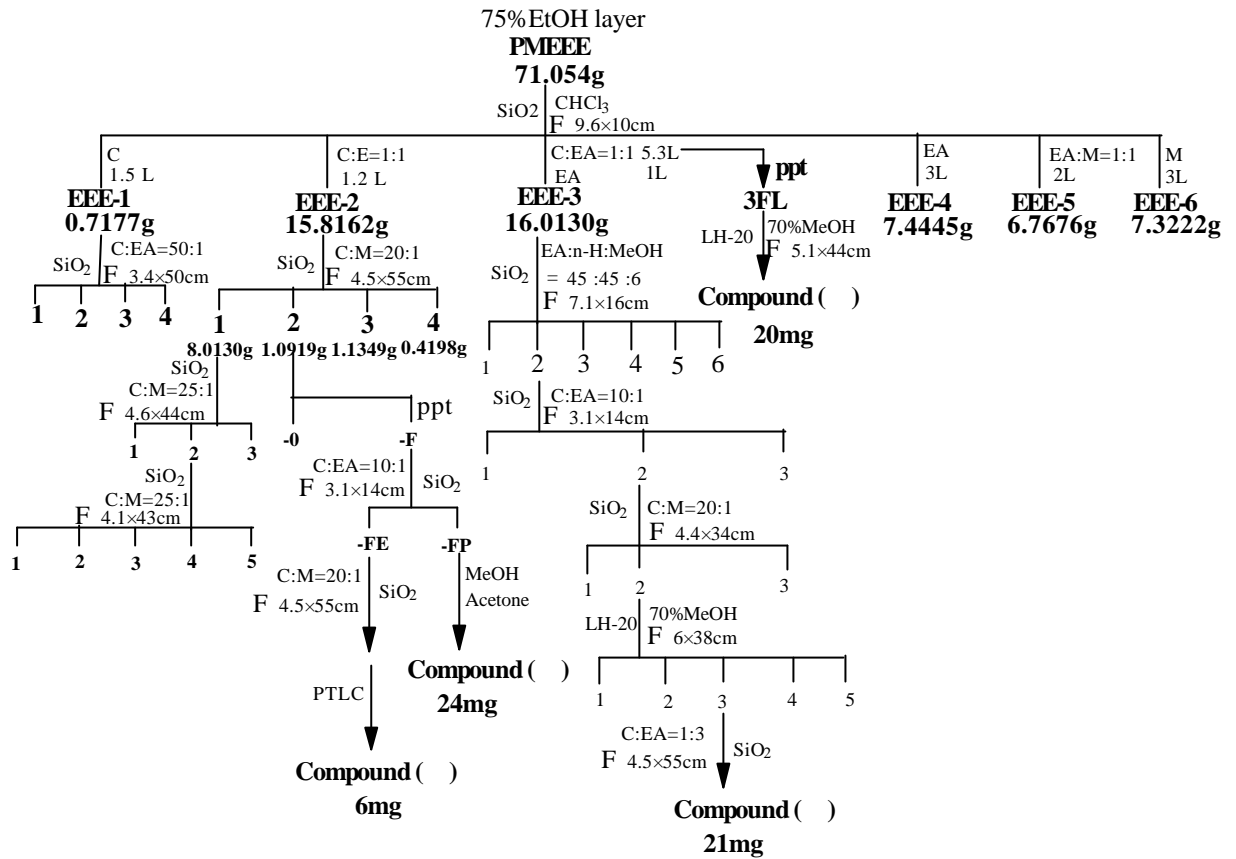


Scheme 7. The first time isolation and fractions of dried roots of *Pueraria Mirifica* Airy Shaw & Suvatabandhu

貳、第二次抽取與分離:



Scheme 8. The second time extraction and partition of dried roots of *Pueraria Mirifica* Airy Shaw & Suvatabandhu



Scheme 9. The second time isolation and purification of dried roots of *Pueraria Mirifica* Airy Shaw & Suvatbandhu

第三節 藥理試驗方法

壹、溶液的配製

· PBS 1X (Phosphate Buffered Saline)

秤取 NaCl 8.0 g , KCl 0.2 g , Na₂HPO₄ 1.15 g , KH₂PO₄ 0.2 g 溶於

去離子水中至 1000 ml，過濾，並調整 pH = 7.0 ~ 7.4。

· NBT solution (Nitroblue tetrazolium)

秤取 NBT 粉末 20 mg 溶於 20 ml 1 × Hanks balanced salt solution 中，最後再加入 PMA 100 μ g。

· MTT solution

秤取 MTT 粉末溶於去離子水中使最後濃度為 5 mg / ml。

貳、人類前骨髓性血癌細胞 (HL-60 cells) 的培養¹⁰²

HL-60 cells 培養在溫度 37 °C、溼度 95 %、5 % CO₂ 的培養箱中。並用含有 10 % 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS)、1 % L-glutamine、100 unit / ml Penicillin 和 100 ul / ml Streptomycin 的培養基 (RPMI-1640 medium) 培養之。期間不定期用 Trypan blue 染色，在顯微鏡下以細胞計數盤數之，以控制細胞數落在 1~2 × 10⁵ / ml 之間；並確定其存活率約 95 % 左右。而且在每次不同實驗進行之前，細胞至少都要先培養 2~8 天，以維持細胞生長之穩定度。

參、泰葛粗萃物及化合物的加藥處理 (treatment)

泰葛分離化合物用 Dimethyl sulfoxide (DMSO) 溶解之；將一系列不同濃度的藥物儲放在 -20 °C 冰箱內，待加藥時再解凍之。加藥時，DMSO 的濃度需控制在千分之一以下，以避免溶媒 DMSO 本身對 HL-60 cells 的影響⁷⁵。

肆、泰葛粗萃物及化合物對人類前骨髓性血癌細胞 (HL-60 cells) 增殖作用之影響¹⁰³⁻¹⁰⁴

將 HL-60 cells 以 1.5 × 10⁴ / ml 密度培養在含有 10 % 胎牛血清 (FBS)、1 % L-glutamine、100 unit / ml Penicillin 和 100 ul / ml Streptomycin 的培養基 (RPMI-1640 medium) 中；並分別置入 24-wells 培養皿使最後體積為 1 ml。每 well 中加入 1 μ l 的各種不同濃度細胞分化誘導劑。於溫度 37 °C、溼度 95 %、5 % CO₂ 的培養箱中培養固定時間之後，分別取出作 MTT-proliferation assay 實驗。

首先自每 well 取出已去除培養基之 50 μ l 細胞液置入 96-wells plates 中，加入 10 μ l MTT solution (5 mg / ml)於 37 $^{\circ}$ C 培養箱中放置 4 小時。接著用 DMSO(150 μ l / well)溶解細胞膜，最後以 ELASA Reader 於波長 570 nm 的條件下測得 OD₅₇₀ 值。

$$\text{Proliferation (\%)} = \text{Sample OD}_{570} / \text{Cont. OD}_{570} \times 100 \%$$

伍、泰葛粗萃物及化合物對人類前骨髓性血癌細胞 (HL-60 cells) 分化作用之影響

Morphology assay ¹⁰⁵

將 HL-60 cells 以 1.5 $\times 10^4$ / ml 密度培養在含有 10 % 胎牛血清 (FBS)、1 % L-glutamine、100 unit / ml Penicillin 和 100 μ l / ml Streptomycin 的培養基 (RPMI-1640 medium) 中；並分別置入 24-wells 培養皿使最後體積為 1ml。每 well 中加入 1 μ l 的各種不同濃度細胞分化誘導劑。於溫度 37 $^{\circ}$ C、溼度 95 %、5 % CO₂ 的培養箱中培養固定時間之後，分別取出作 Morphology assay 實驗。

首先自每 well 中取出 800 μ l 細胞液置入 1.5 ml 離心管，以轉速 1200 r.p.m 離心 5 分鐘去除上清液；再用 200 μ l HBSS (Hanks balanced salt solution) 洗之，接著再用轉速 1200 r.p.m 離心 5 分鐘去除上清液。然後取 5 μ l 細胞液滴至蓋玻片中心待製作細胞抹片，並於室溫下等細胞抹片完全乾燥後準備染色。在已乾燥的細胞抹片上先滴 0.8 ml Liu A solution 反應 10 秒鐘，接著再加入 1.5 ml Liu B solution 與 Liu A solution 充分混合反應 30 秒鐘；直到液面呈現金屬光澤，即可用大量的蒸餾水將染劑沖去。將細胞抹片於室溫下陰乾再用封片油將染完色的細胞抹片固定；最後於顯微鏡下觀察其分類並攝影之。

NBT Reduction Assay ¹⁰⁶

將 HL-60 cells 以 1.5 $\times 10^4$ / ml 密度培養在含有 10 % 胎牛血清 (FBS)、100 unit / ml Penicillin 和 100 μ l / ml Streptomycin 的培養基 (RPMI-1640 medium) 中；並分別置入 24-wells 培養皿中使最後體積為 1ml。每 well 中加入 1 μ l 的各種不同濃度細胞分化劑。於溫度 37 $^{\circ}$ C、溼度 95 %、5 % CO₂ 的培養箱中培養固定時間之後，分別取出作 NBT reduction assay 實驗。

首先自每 well 中取出 750 μ l 細胞液置入 1.5 ml 離心管，以轉速 1500 r.p.m 離心 5 分鐘去除上清液；再用 200 μ l HBSS (Hanks balanced salt solution)洗之，接著再用轉速 1500 r.p.m 離心 5 分鐘去除上清液。加入 70 μ l NBT solution (1 mg / ml nitroblue tetrazolium (NBT) & 200 μ l / ml phorbol 12- myristate 13- acetate (PMA)混和液)，於溫度 37 的培養箱中培養 30 分鐘；取出後以轉速 1500 r.p.m 離心 5 分鐘去除上清液；再用 100 μ l HBSS 洗之，接著加入 70 % Ethanol 固定細胞，最後於顯微鏡下以細胞計數盤數之(細胞數至少要 200 顆)。

Differentiation (%) = 細胞質呈紫黑色細胞總數 / 全部的細胞總數 \times 100 %

第四節 泰葛組織培養方法

壹、植物組織切片：

泰葛種子置於 1/2MS 培養基，待長成幼苗後(約七天)，將子葉(種子) 幼莖葉和葉三部分，分別切成約長約置入含有 kinetin 2 ppm 及 Picrolam 1 ppm 的 B5 培養基中，使其誘發產生愈傷組織。

貳、愈傷組織的產生：

子葉(種子) 幼莖葉和葉三部分，在含有 BA 2 ppm 及 Picrolam 1 ppm 的 B5 培養基中，長出愈傷組織之後，一個月繼代至含有 kinetin 1 ppm 及 Picrolam 1 ppm 的 B5 培養基中，不斷地繼代培養，一年後取出愈傷組織作含量測定。

第五節 活性成分定量方法

壹、配製標準品

(1) Miroestrol

精稱 10mg 的 Miroestrol 標準品，溶於甲醇，配成 10ml 標準品母液，再稀釋成十倍，分別取 0.1ml、 0.05ml、 0.025ml、 0.0125ml 放

至定量瓶。

(2) Puerarin

精稱 11.16mg 的 Puerarin 標準品，溶於適量甲醇與水，配成 10ml 標準品母液，再稀釋成十倍，分別取 1ml、0.2ml、0.1ml、0.05ml 放至定量瓶。

(3) Daidzin

精稱 10.5mg 的 Daidzin 標準品，溶於甲醇，配成 10ml 標準品母液，再稀釋成五倍，分別取 1ml、0.1ml、0.02ml、0.01ml 放至定量瓶。

(4) Genistin

精稱 10mg 的 Genistin 標準品，溶於 70% 甲醇，配成 10ml 標準品母液，再稀釋成十倍，分別取 0.2ml、0.1ml、0.025ml、0.0125ml 放至定量瓶。

(5) Daidzein

精稱 10mg 的 Daidzein 標準品，溶於甲醇，配成 10ml 標準品母液，再稀釋成五十倍，分別取 1ml、0.5ml、0.1ml、0.05ml 放至定量瓶。

(6) Genistein

精稱 9.75mg 的 Genistein 標準品，溶於甲醇，配成 25ml 標準品母液，再稀釋成十倍，分別取 1ml、0.5ml、0.1ml、0.05ml 放至定量瓶。

貳、檢量線之繪製

六種指標成分之各種濃度其檢量液經 HPLC 分析後，所得之 area 數據（重複三次分析之平均值）進行直線迴歸，繪成檢量線並得迴歸直線之方程式。

參.中藥材檢品之製備

1. 泰葛

a. 原生植物 (PM)

精稱泰葛乾燥品 10g，以五次甲醇萃取，四次 70% 甲醇萃取，四次 50% 甲醇萃取的方式，每次加熱 60 一小時，乾燥濃縮秤重，取 46.2mg 溶於適量甲醇，放至 10ml 定量瓶，超音波加熱振盪，放冷至室溫，加甲醇至刻度

b. 市場品 (PM1)

精稱泰葛市場品 10g，以五次甲醇萃取，四次 70% 甲醇萃取，四次 50% 甲醇萃取的方式，每次加熱 60 一小時，乾燥濃縮秤重，取 31mg 溶於適量甲醇，放至 10ml 定量瓶，超音波加熱振盪，放冷至室溫，加甲醇至刻度

2. 川葛 (PL)

a. 市場品 1 (PL1)

精稱川葛市場品 1 10g，以五次甲醇萃取，四次 70% 甲醇萃取，四次 50% 甲醇萃取的方式，每次加熱 60 一小時，乾燥濃縮秤重，取 28.1mg 溶於適量甲醇，放至 5ml 定量瓶，超音波加熱振盪，放冷至室溫，加甲醇至刻度

b. 市場品 2 (PL2)

精稱川葛市場品 2 10g，以五次甲醇萃取，四次 70% 甲醇萃取，四次 50% 甲醇萃取的方式，每次加熱 60 一小時，乾燥濃縮秤重，取 62.7mg 溶於適量甲醇，放至 10ml 定量瓶，超音波加熱振盪，放冷至室溫，加甲醇至刻度

c. 市場品 3 (PL3)

精稱川葛市場品 3 10g，以五次甲醇萃取，四次 70% 甲醇萃取，四次 50% 甲醇萃取的方式，每次加熱 60 一小時，乾燥濃縮秤重，取 33.3mg 溶於適量甲醇，放至 5ml 定量瓶，超音波加熱振盪，放冷至室溫，加甲醇至刻度

3. 台葛

a. 台灣葛根市售品 1 (PT)

精稱市售台灣葛根市售品 10g，以五次甲醇萃取，四次 70% 甲醇萃取，四次 50% 甲醇萃取的方式，每次加熱 60 一小時，乾燥濃縮秤重，取 32.3mg 溶於適量甲醇，放至 10ml 定量瓶，超音波加熱振盪，放冷至室溫，加甲醇至刻度

b. 台灣葛根市售品 2 (PP)

精稱市售台灣葛根 10g，以五次甲醇萃取，四次 70% 甲醇萃取，四次 50% 甲醇萃取的方式，每次加熱 60 一小時，乾燥濃縮秤重，取 69.2mg 溶於適量甲醇，放至 10ml 定量瓶，超音波加熱振盪，放冷至室溫，加甲醇至刻度

* 其餘檢品配製步驟以此類推

肆. 分析條件之評估

(1) 精密度 (precision)

精確稱取標準品，以適量甲醇稀釋成四種不同濃度，先進行此四個樣品之層析並完成直線迴歸，於同日內晨、午、晚及連續六日內之異日間各進行一次層析，然後以先前獲得的迴歸直線方程式求得每次的實驗濃度值。以三次同日內和三次異日間分析值分別求取平均值 (mean)、標準差 (standard deviation, S.D.) 及相對標準差 (relative standard deviation, R.S.D.)。

(2) 偵測極限 (Detection limit)

逐步稀釋標準品溶液，注入偵測，直到 $\text{signal/noise} = 3/1$ 以上，計算注入量及其濃度。

(3) 回收率試驗 (recovery)

取定過六種指標成分含量的中藥材檢品（泰葛原生植物，泰葛市場品，市售川葛檢品 1 2 3，台灣葛根市售品，台灣葛根市售品），分別加入已知濃度的標準品溶液，混合振盪一分鐘，然後重新層析定量，所測得之六種指標成分增加量除以已知的標準品添加量即為回收率。

貳、總黃酮分析方法

1. 紫外分光光度法測定波長確定

分別測定葛根素和樣品在甲醇中的紫外吸收光譜圖，結果在 250nm 波長處有最大吸收，且光譜圖基本相同（圖）確定以 250nm 為測定波長

2. 配製標準品溶液及製作檢量線

對照標準品溶液配製（濃度為 1mg/50ml 1mg/250ml 1mg/500ml 1mg/1000ml 1mg/2000ml）

精稱 10mg 的 Puerarin 標準品，溶於甲醇，配成 10ml 標準品母液，超音波振盪，放冷至室溫，再稀釋成 50 倍、250 倍、500 倍、1000 倍、2000 倍，分別取放至定量瓶

3. 檢量線製作

將各種濃度的對照品其檢量液經紫外分光光度法分析後，所得之吸光度數值（重複三次分析之平均值）進行直線迴歸，繪成檢量線並得迴歸直線之方程式。

4. 樣品溶液配製

精稱樣品，以五次甲醇萃取，四次 70% 甲醇萃取，四次 50% 甲醇萃取的方式，每次加熱 60 一小時，乾燥濃縮秤重，取樣品溶於甲醇，放至定量瓶，超音波加熱振盪，放冷至室溫，加甲醇至刻度

葛根總黃酮含量測定

稱取生藥適當量取量加入甲醇溶解之移至容量瓶中超音波震盪加甲醇至刻度用甲醇作空白對照在波長測定吸收度，通過紫外光譜可將不同品種的葛根，根據其峰形、峰位、導數光譜的振幅高度比的不同

5.回收率試驗

將定過含量的中藥材檢品分別加入已知濃度的標準品溶液，混合振盪一分鐘，然後重新層析定量，所測得之總黃酮增加量除以已知的對照品添加量即為回收率。

6.精密度試驗

精確稱取標準品，以甲醇稀釋成五種不同濃度，先進行分析並完成直線迴歸，於同日內每個小時各進行一次層析，然後以先前獲得的迴歸直線方程式求得每次的實驗濃度值。以三次同日內和三次異日間分析值分別求取平均值（mean）、標準差（standard deviation, S.D.）及相對標準差（relativestandard deviation, R.S.D.）

第六節 化合物之光譜數據

化合物（ ） Miroestrol $C_{20}H_{22}O_6$

1.Colorless prisms(MeOH)

2.m.p.: 270-273

3. UV(MeOH): max=218,255,285nm
4. MS(EI-MS)(70eV)(m/z):358
5. $[\alpha]_D^{25} = 160$ (MeOH)
6. IR(KBr): max = 3480,3403(OH),2950(CH),1706(非共轭六元环酮),
1661(OCH=C),1623,1597,1511(aromatic) cm^{-1}
7. $^1\text{H-NMR}$: 0.56(s,20-H) , 1.23(s,21-H) , 1.88(dd,19-H) , 1.99(br.t,19-H) ,
2.57(dd,16-H) , 2.43(d,13-H) , 2.74(ddd,12-H) , 2.89(d,16-H) , 3.31(s,9-H) ,
3.69(s,18-H) , 6.30(d,4-H) , 6.50(dd,2-H) , 6.29(s,7-H) , 6.99(d,1-H)
8. $^{13}\text{C-NMR}$: 22.5(20-C) , 32.4(21-C) , 37.9(11-C) , 40.7(19-C) , 51.0(13-C) ,
40.7(9-C) , 45.5(12-C) , 79.7(14-C) , 55.2(16-C) , 78.0(17-C) , 79.3(18-C) ,
103.6(4-C) , 116.3(8-C) , 112.0(2-C) , 113.5(10-C) , 131.2(1-C) ,
139.7(7-C) , 153.7(5-C) , 158.0(3-C) ,210.7(15-C)

化合物 () **Puerarin** $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_9$

1. White needles
2. m.p.: 187
3. UV(MeOH): max=206,243,251,263,309nm
4. MS(EI-MS)(70eV)(m/z):416.37
5. IR(nujol): max = 3372,1642,1615,1584 cm^{-1}
6. $^1\text{H-NMR}$: 3.52~3.56(br.3'', 4'',5''-H) , 3.78(dd,6''-H) , 3.88(dd,6''-H) ,
4.11(br.s.,2''-H) , 5.09(d,1''-H) ,

6.84(*d*,3',5'-H) , 6.95(*d*,6-H) , 7.36(*d*,2',6'-H) ,

8.04(*d*,5-H) , 8.16(*s*,2-H)

¹³C-NMR: 61.1(6''-C) , 70.0(4''-C) , 71.4(2''-C) , 74.0(1''-C) , 78.4(3''-C),

81.1(5''-C) , 111.5(8-C) , 114.6(6,3',5'-C) , 116.9(10-C) , 123.9(3-C) ,

126.5(5-C) , 122.6(1'-C) , 129.7(2',6'-C) , 152.8(2-C) , 156.4(4'-C) ,

157.0(9-C) , 162.9(7-C) , 176.6(4-C)

化合物 () **Daidzein** $C_{15}H_{10}O_4$

1. White needles(CHCl₃-MeOH recrystalized)

2.m.p.: 187

3.UV(MeOH): max=206,243,251,263,309nm

4.MS(EI-MS)(70eV)(m/z):416.37

5.IR(nujol): max = 3372,1642,1615,1584 cm⁻¹

6.H¹-NMR: 6.79(*d*,3',5'-H) , 6.85(*d*,8-H) , 6.92(*dd*,6-H) , 7.36(*d*,2',6'-H) ,

7.94(*d*,5-H) , 8.26(*s*,2-H)

7. C^{13} -NMR: 102.3(8-C) , 115.2(3' ,5' -C) , 115.4(6-C) , 116.8(10-C) ,
122.8(1' -C) , 123.7(3-C) , 127.5(5-C) , 130.3(2' -C) , 130.3(6' -C) ,
153.0(2-C) , 157.58(9-C) , 157.7(4' -C) , 162.9(7-C) , 174.9(4-C)

化合物 () Genistein $C_{15}H_{10}O_4$

1. White needles($CHCl_3$ -MeOH recrystallized)

2. m.p.: 187

3. UV(MeOH): max=206,243,251,263,309nm

4. MS(EI-MS)(70eV)(m/z):416.37

5. $[\alpha]_D^{25} = +286$ (c=0.1, EtOH)

6. IR(nujol): max = 3372,1642,1615,1584 cm^{-1}

7. H^1 -NMR: 6.21(*d*,6-H) , 6.37(*d*,8-H) , 6.80(*d*,3' ,5' -H) , 7.36(*d*,2' ,6' -H) ,
8.30(*s*, 2-H) , 12.94(*s*,5-OH)

8. C^{13} -NMR: 93.9(8-C) , 99.2(6-C) , 104.7(10-C) , 115.3(3' ,5' -C) ,
121.4(1' -C) , 122.5(3-C) , 130.4(2' ,4' -C) , 154.2(2-C) , 157.2(4' -C) ,
157.6(9-C) , 162.9(7-C) , 164.5(5-C) , 180.4(4-C)