

# 中國醫藥學院藥物化學研究所碩士論文

指導教授：陳勝智 教授

共同指導教授：郭盛助 教授

1. 釘地蜈蚣抗過敏、抗發炎及抗細胞增殖活性成分之  
研究

2. 引藻細胞分化誘導及抗細胞增殖之活性成分研究

1. Studies on Antiallergic, Antiinflammatory and  
Antiproliferation Constituents of *Helminthostachys*  
*zeylanica* (L) Hook.

2. Studies on Differentiation-induced and  
Antiproliferation Constituents of *Cryptomonadales*

研究生：黃元照

中華民國九十一年六月

## 謝辭

本論文承蒙業師陳所長勝智教授及郭教授盛助博士之殷切指導與黽勉，使之得以順利完成，於此謹呈最虔摯之謝忱。並於論文口試時，承蒙高雄醫學大學陳益昇博士對本論文之撥冗審查，惠與寶貴意見與指正，促使本論文得以更臻完善，僅此敬致最誠摯之謝意。

受業期間亦蒙黃麗嬌教授、吳俊雄教授、王繼平教授、李珮端教授、邱泰惠教授、劉正雄教授、林宗平副教授、吳金濱副教授、張永勳副教授、吳錦生副教授、黃順爵副教授、賴建銘副教授、侯曼貞副教授、蔡勝忠助理教授、連金城助理教授及系所內諸位師長之關懷指導，睿與新知，受益恩情永銘於心。

感謝台中榮總醫研部王繼平教授與所上美華學姊、俊仁學長在藥理實驗方面的協助；並感謝中醫系張賢哲教授、中藥所邱年永老師在植物基源之鑑定。同時於研究期間，本論文所刊載分離之化合物蒙黃太鴻助理教授、龔語慧小姐、賴萱薇小姐及中興大學貴重儀器中心代測各項圖譜，在此敬致由衷之謝語。

此外，雅韻學姊、嘉麟學長、安正學長、勝弘學長、家欣學長、雅姿學姊、建源學長、建平學長、玉琪學妹、書維學弟、亞齡學妹、瑞元學弟、怡倩學妹、正傑學弟、惠雅學妹、世偉學弟、純逸學妹、睿盈學妹、惠雯學妹、鈺如學妹、珮樺學妹、麒盛學弟、雯茹學妹等人於實驗和生活上的協助與關心，及同窗好友琮揚、佳惠、美玲、致群、宇鈞、孟葳、華鑫、治文、仙如、孟鎧、尚志於此兩年間的相互砥礪扶持與一同伴隨過的光陰歲月，使得人生旅途上增添許多繽紛色彩，然於此，心中縱有不捨之情，僅銘於心。

最後，則要感謝最摯愛的雙親與家人，由於他們的支持和鼓勵，使得學業得以順利完成，僅以這微小成果獻予諸位，並獻上感恩之意。

## 第一部份

# 釘地蜈蚣抗過敏、抗發炎及抗細胞增殖活性成分之 研究

目錄	
英文摘要	
中文摘要	
第一章 緒論	
第一節 研究動機和目的.....	1
第二節 釘地蜈蚣之藥用植物學考察.....	1
第三節 釘地蜈蚣成分研究概況.....	4
第四節 藥理實驗方法簡介.....	9
第二章 釘地蜈蚣成分之抽取與分離.....	12
第三章 釘地蜈蚣成分之化學結構鑑定.....	14
第四章 粗抽物與成分活性探討	
第一節 抗發炎、抗過敏之活性.....	29
第二節 抗細胞增殖活性.....	32
第五章 結論	35
第六章 實驗部分	
第一節 儀器與試藥.....	36
第二節 成分抽取與分離方法.....	39
第三節 藥理實驗方法.....	43
第四節 化合物之性質與光譜數據.....	45
參考文獻.....	50

# Summary

Studies on Antiallergic, Antiinflammatory and Antiproliferation  
Constituents of *Helminthostachys zeylanica* (L) Hook.

by

Yuan-Chia Huang

Graduate Institute of Pharmaceutical Chemistry  
China Medical College

Four compounds and one mixture  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol (I), hexadecanoic acid (II), tetracosanoic acid (III), ugonin H (IV) and ugonin I (V), have been isolated from the *n*-hexane and chloroform fractions of the methanolic extract of *Helminthostachys zeylanica* (L) Hook. Among the isolated compounds, ugonin H (IV) and ugonin I (V) are isolated for the first time.

The results of the biological activities showed ugonin H (IV) and ugonin I (V) exhibited antiproliferation activities on U937 cells.

However, other compounds are still under test.

# 釘地蜈蚣抗過敏、抗發炎及抗細胞增殖活性成分 之研究

中國醫藥學院 藥物化學研究所

黃元照

中文摘要

由七指蕨科 (*Helminthostachyaceae*) 植物釘地蜈蚣甲醇粗抽物之正己烷、氯仿分割中，單離出一個混合物及四個化合物： $\beta$ -sitosterol & stigmasterol 之混合物 (I)、hexadecanoic acid (II)、tetracosanoic acid (III)、ugonin H (IV) 及 ugonin I (V)。Ugonin H (IV) 及 ugonin I (V) 為首次從自然界分離得到的新化合物。

經抗細胞增殖試驗結果發現 ugonin H (IV) 及 ugonin I (V) 有明顯抑制 U937 血癌細胞增殖活性。

而各化合物之抗過敏與抗發炎試驗仍在進行中。

# 第一章 緒論

## 第一節 研究動機和目的

釘地蜈蚣，學名 *Helminthostachys zeylanica* (L) Hook. 屬於瓶爾小草目 (Ophioglossaceae)，七指蕨科 (Helminthostachyaceae)。又名倒地蜈蚣、地蜈蚣、過路蜈蚣、過路鵝江、蜈蚣草、倒麒麟<sup>(1)</sup>。但台灣民間稱地蜈蚣之植物，據文獻記載尚有禾本科之 *Chrysopogon aciculatus* (Retz.) Trin. 及玄參科 *Torenia concolor* Lindl. 兩種<sup>(2)</sup>。

釘地蜈蚣根莖乾燥，煎服具有消炎、解熱、良血行、治小兒食慾不振、結核病、毒蛇傷等等<sup>(3)</sup>。但其成分研究不多，且尚無有關抗發炎、抗細胞增殖活性的文獻記載。故取其甲醇粗抽物，送抗過敏、抗發炎及抗細胞增殖藥理試驗，發現具有活性，故希望能從該植物分離出具有活性之化合物。

## 第二節 釘地蜈蚣之藥用植物學考察

### 一、釘地蜈蚣在植物學上的分類位置<sup>(1)</sup>

蕨類植物門 (Pteridophyta)

厚囊蕨亞綱 (Eusporangiatidae)

瓶爾小草目 (Ophioglossales)

七指蕨科 (Helminthostachyaceae)

七指蕨屬 (*Helminthostachys*)

釘地蜈蚣 (*Helminthostachys zeylanica* (L) Hook.)

## 二、釘地蜈蚣—七指蕨科七指蕨屬植物

### 《學名》<sup>(1,3)</sup>

*Helminthostachys zeylanica* (L) Hook.

### 《別名》<sup>(1,3)</sup>

倒地蜈蚣、地蜈蚣、過路蜈蚣、過路鵝江、蜈蚣草、倒麒麟。

### 《形態》<sup>(3)</sup>

根莖肉質，強韌，成筒狀，具粗狀鬚根，形如百足蟲。裸葉為三出掌狀乃至掌狀羽狀葉，各羽片為 2~5 個，披針形，全緣，具鈍狀齒，葉綠色，長 10~15 公分，幅 1.6~4 公分，革質。孢子葉係從裸葉之基部抽出，孢子囊群排列成肉隱狀花序狀，圓柱形，頂生，與柄共長 13~23 公分，徑 1.3 公分，熟則縱裂，放出黃色孢子(圖 1)。

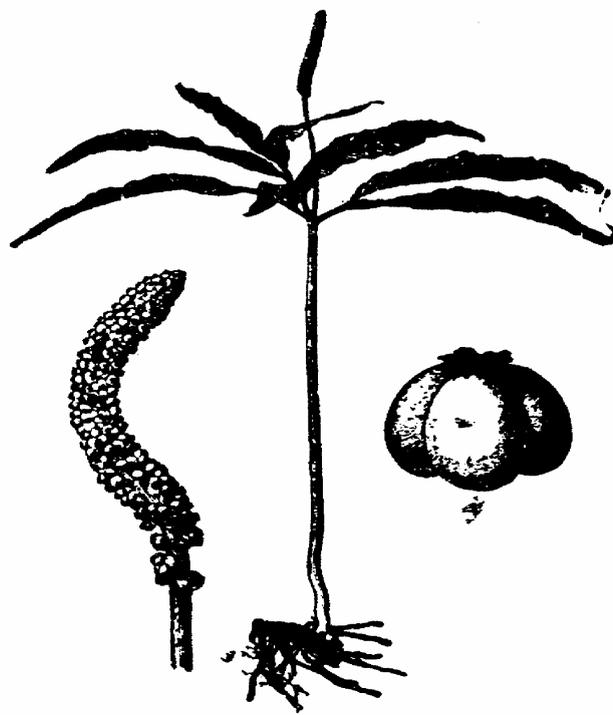


圖 1、倒地蜈蚣

《產地》<sup>(3)</sup>

自生全省，多生于南部山野陰地之多年生草本。

《分布》<sup>(3)</sup>

海南島，琉球，斯里蘭卡，馬來群島，菲律賓，澳洲，印度。

《成分》<sup>(3)</sup>

W. H. Brown 於 1935 年所做的礦物質含量研究，其中以含磷、鐵及鈣為主，其含量如下表：

表一、釘地蜈蚣之礦物質含量研究

成 分	鮮 品 %	烘 乾 品 %	灰 份 %
水 份	85.61		
灰 份	1.51	10.49	
P <sub>2</sub> O	0.34	2.33	22.25
CaO	0.03	0.24	2.25
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.015	0.10	0.99

《功效》<sup>(1,3)</sup>

(台灣)消炎，解熱，良血行，治小兒食慾不振，結核病。

(馬來)根莖為強壯劑，並治百日咳及發熱疾患。

(爪哇)根莖治痢疾，卡答兒及初期肺病。

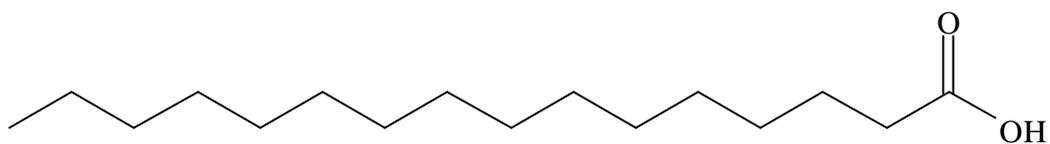
### 第三節 釘地蜈蚣成分研究概況

一、釘地蜈蚣已知化學成分如下：

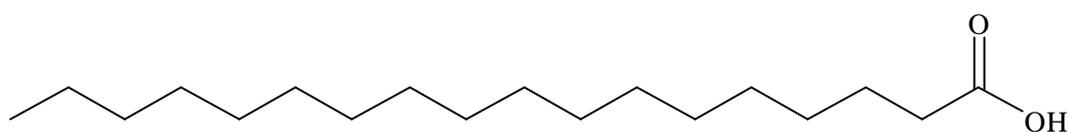
1.  $\beta$ -sitosterol<sup>(4)</sup>
2. stigmasterol<sup>(4)</sup>
3. hexadecanoic acid<sup>(4)</sup>
4. octadecanoic acid<sup>(4)</sup>
5. eicosanoic acid<sup>(4)</sup>
6. docosanoic acid<sup>(4)</sup>
7. campesterol-D-glucoside<sup>(6)</sup>
8. 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl- $\beta$ -sitosterol<sup>(6)</sup>
9. 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosylstigmasterol<sup>(6)</sup>
10. N-benzoyl-L-phenylalanyl-L-phenylalaninol acetate<sup>(6)</sup>
11. ugonin A<sup>(6)</sup>
12. ugonin B<sup>(6)</sup>
13. ugonin C<sup>(6)</sup>
14. ugonin D<sup>(6)</sup>
15. ugonin E<sup>(6)</sup>
16. ugonin F<sup>(6)</sup>
17. ugonin G<sup>(6)</sup>
18. spiraeoside<sup>(6)</sup>
19. dulcitol<sup>(5)</sup>

二、上述化合物依化學結構分類如下：

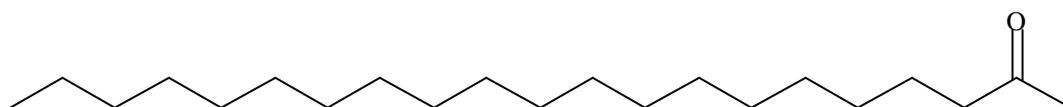
### 1. Fatty acids :



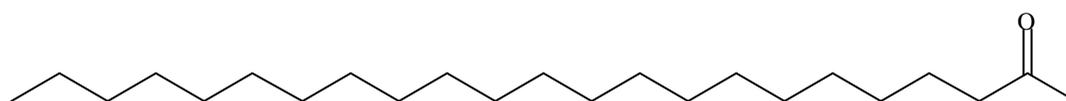
hexadecanoic acid



octadecanoic acid

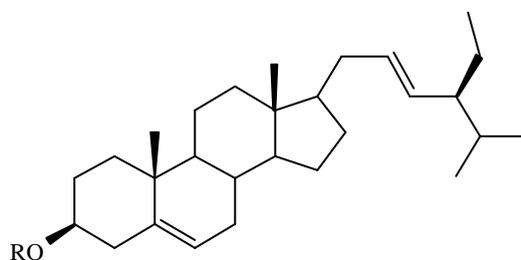


eicosanoic acid

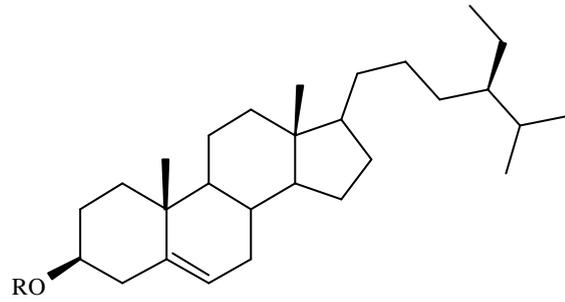


eicosanoic acid

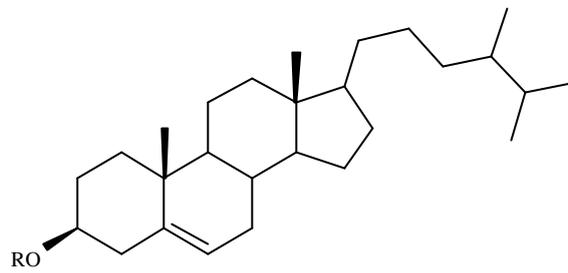
### 2. Steroids :



R = H : stigmasterol  
R = D-glucosyl : stigmasterol-D-glucopyranoside

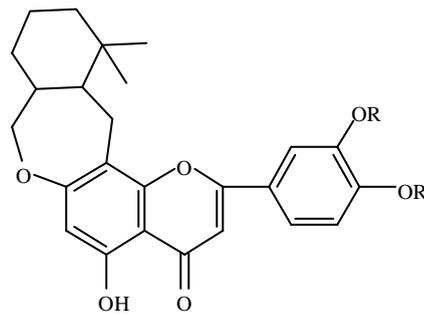


R = H :  $\beta$ -sitosterol  
 R = D-glucosyl :  $\beta$ -sitosterol-D-glucopyranoside

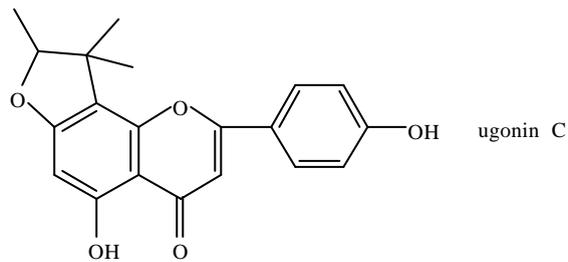


R = D-glucosyl : campesterol-D-glucoside

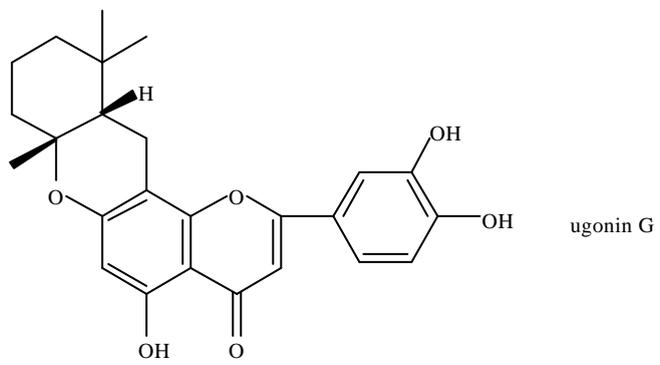
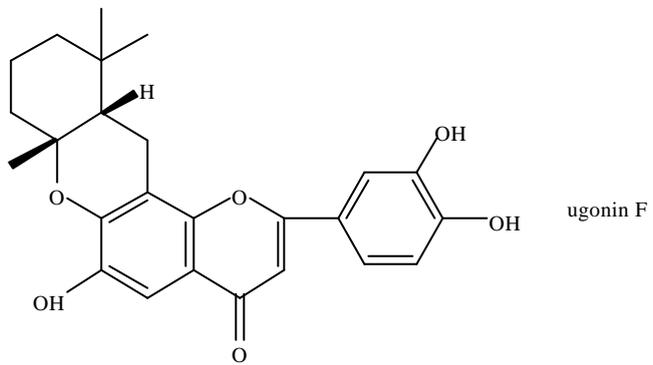
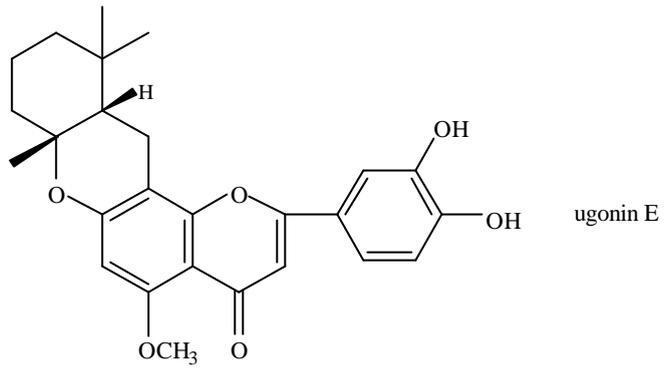
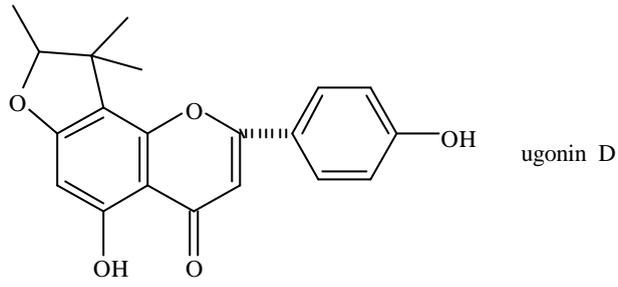
### 3. Flavonoids :

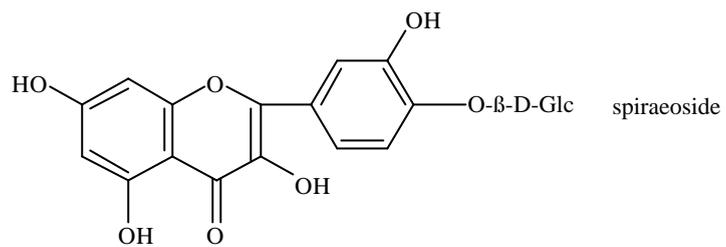


R = H    ugonin A  
 R = CH<sub>3</sub>    ugonin B

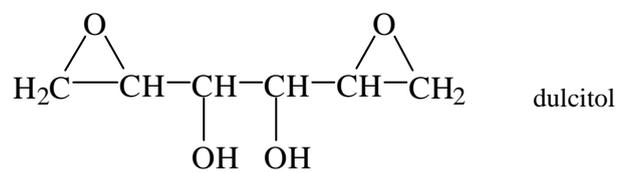
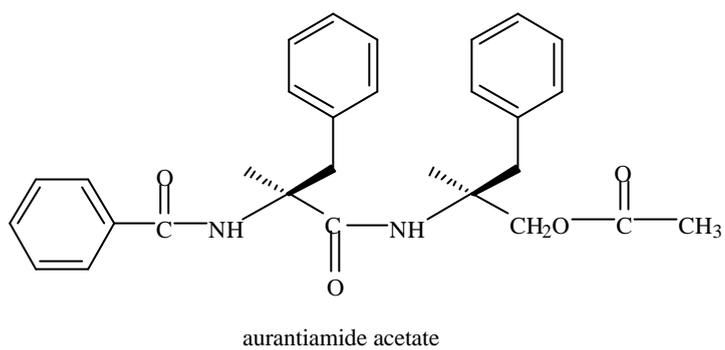


ugonin C





#### 4. Others :



## 第四節 藥理實驗法簡介

### 一、抗發炎、抗過敏作用：

肥大細胞(mast cell)及中性白血球(neutrophil)內的顆粒，含有多種過敏性及發炎媒介物，當此兩種細胞受到刺激後，如肥大細胞中所含的顆粒會釋 histamine、serotonin、PGs、neutral protease、 $\beta$ -hexosaminidase、PAF...等媒介物，而中性白血球會釋放 PGs、PAF、leukotrienes、lysozyme、neutral protease、 $\beta$ -glucuronidase...等媒介物。其中有些是發炎介質，導致血管擴張、通透性增加、支氣管平滑肌收縮及組織損傷，所以與急性發炎有密切關係(圖 2)。因此化合物若能抑制肥大細胞及中性白血球之活化，就能對過敏及發炎症狀之預防與治療有莫大幫助。

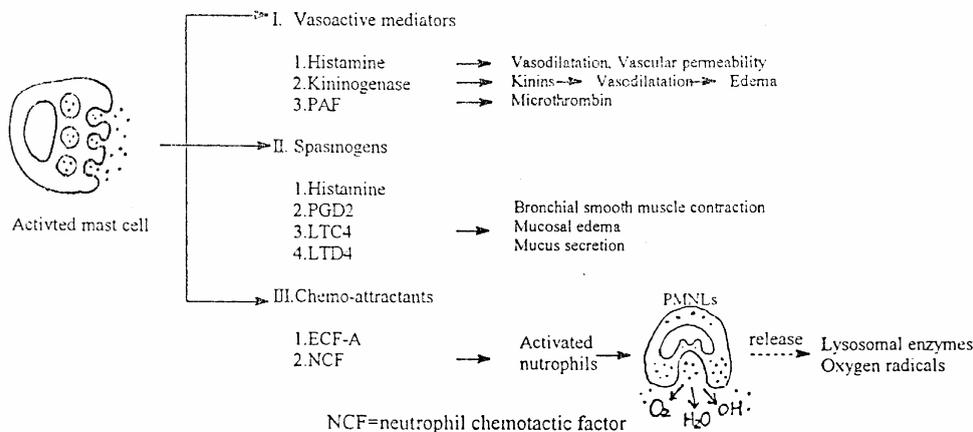


圖 2、肥大細胞釋出之媒介物質及所產生之生理反應

本研究之藥理實驗係由台中榮總醫學研究部王繼平教授實驗室代為測試。實驗模式係以 compound 48/80 引發肥大細胞釋放 histamine、 $\beta$ -glucuronidase 及 FMLP 引發中性白血球釋放 lysozyme  $\beta$ -glucuronidase，分別藉以測試各化合物以尋找抗過敏或抗發炎活性成分。各實驗內容簡介如下：

(一) 利用 compound 48/80 誘導肥大細胞去顆粒作用之抑制實驗，測定化合物之抗過敏活性：

試劑 compound 48/80 為 *N*-methyl-*p*-methoxyphenethylamine 與甲醛(formaldehyde)反應之產物且為一個聚合物之結構。

Compound 48/80 的藥理作用是促使肥大細胞釋放組織胺，故可作為化合物測定抗過敏的活性試驗時之誘導劑。實驗中以 mepacrine 為 positive control，觀察組織胺及  $\beta$ -glucuronidase 釋出量並求出抑制百分比。

(二) FMLP 誘導的嗜中性白血球去顆粒作用(neutrophil degranulation)之抑制實驗，測定化合物之抗發炎活性：

FMLP 為一種 chemotactic peptide (*N*-formyl-Met-Leu-Phe)之簡稱。

*N*-formyl peptide 類的化合物其藥理作用有促使嗜中性白血球去顆粒作用，故 FMLP 可作為化合物測定抗發炎的藥理活性試驗時之誘導劑。本實驗中以 trifluoperazine (TFP)為 positive control，觀察 lysozyme 及  $\beta$ -glucuronidase 釋出量並求出抑制百分比。

二、抗增殖作用：

細胞的增殖作用主要受到細胞週期的(cell cycle)調控，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了。

本研究之藥理實驗模式係利用 3-(4,5-dimethylthiazol-2-diphenyl)-tetrazolium bromide (MTT) 測試粗抽物及化合物之不同濃度對 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，再利用 DMSO 將細胞膜溶解後釋出藍色染料於 570 nm 下測量吸光值，即可得到粗抽物及化合物對細胞增殖比例的百分比<sup>(7~10)</sup>，本實驗是以 retinoic acid (RA) 為 positive control。

## 第二章 釘地蜈蚣成分之抽取與分離

將乾燥之釘地蜈蚣根莖部分(10 Kg)經粉碎機粉碎後，以甲醇用冷浸法反覆抽取 15 次，依照 Scheme 1~3 流程圖所述之方法分離。共得到 4 個化合物及 1 個混合物，經光譜解析及化學方法確認其結構為：

1.  $\beta$ -sitosterol & stigmasterol 之混合物

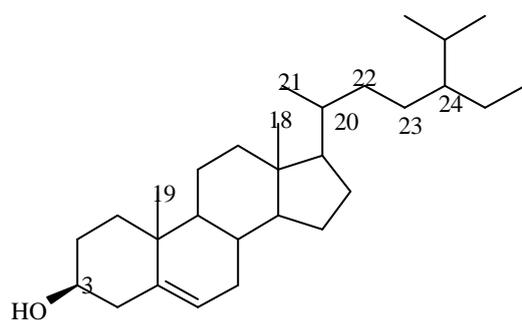
2. hexadecanoic acid

3. tetracosanoic acid

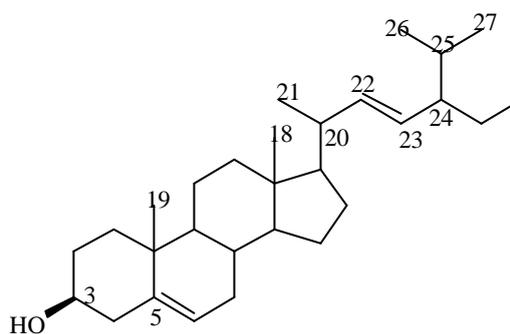
4. ugonin H

5. ugonin I

Mixture I

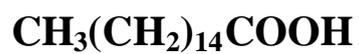


$\beta$ -sitosterol



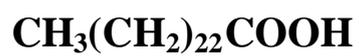
stigmasterol

Compound II



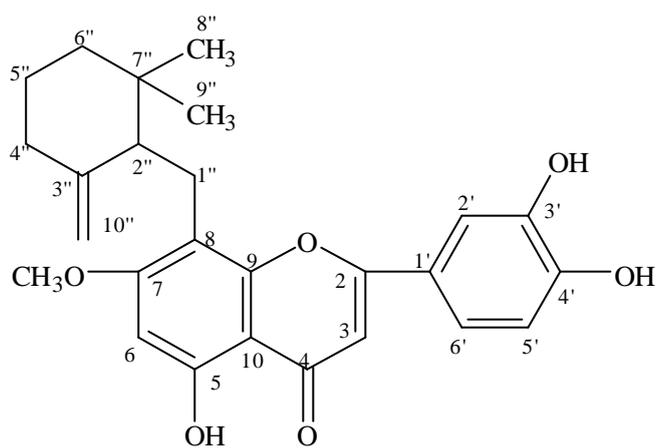
hexadecanoic acid

Compound III



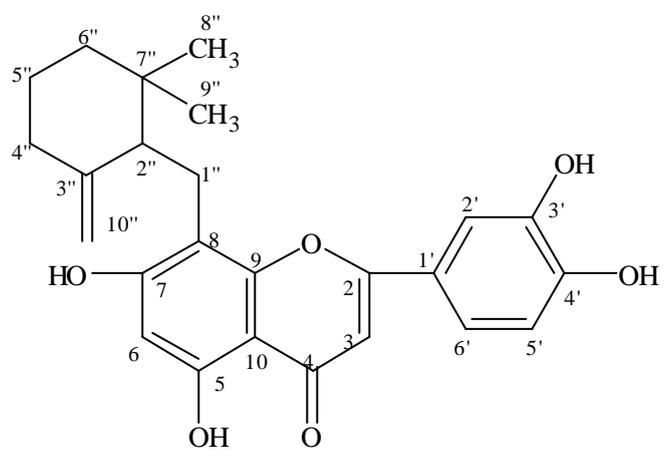
tetracosanoic acid

Compound IV



ugonin H

Compound V



ugonin I

### 第三章 釘地蜈蚣成分之化學結構鑑定

#### 【一】混合物 I ( $\beta$ -sitosterol & stigmasterol)

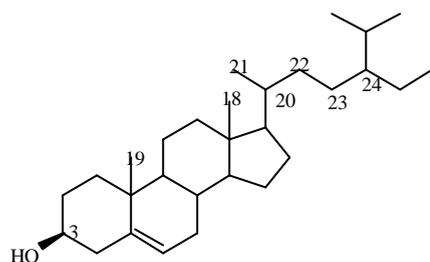
化合物 I 為白色針狀結晶，熔點 154-156 。其 TLC 片經溶媒 (chloroform) 展開後  $R_f$  值為 0.35，噴 10%  $H_2SO_4$  加熱後變色呈紫紅色。對 Liebermann-Burchard 試劑呈陽性反應 (由紫色變成藍色再變成綠色)，紫外光在 200~380 nm 內不吸光，故初步推斷化合物為植物固醇。

紅外線光譜 (圖 3) 顯示，在  $3400\sim 3300\text{ cm}^{-1}$  有 -OH 基的吸收帶， $1458$ 、 $1242\text{ cm}^{-1}$  是  $-CH_2$ 、 $-CH_3$  變角振動的吸收帶， $1659\text{ cm}^{-1}$  是雙鍵 (C=C) 的吸收帶， $1049\text{ cm}^{-1}$  有 -C-O-基伸縮振動的吸收帶。

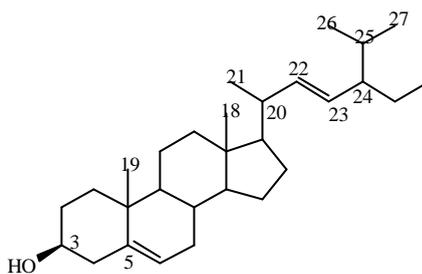
由 EIMS  $m/z$  (rel. int. %) 圖譜 (圖 4) 顯示其  $m/z$  412 (46)  $[M^+]$  為主要之分子離子峰，414 (15) 為次要化合物之分子離子峰，所以分子量為 414 及 412。故推測化合物主要為 stigmasterol 且尚含有  $\beta$ -sitosterol 之混合物。

$^1\text{H-NMR}$  光譜 (圖 5;  $\text{CDCl}_3$ ) 顯示 5.35 (1H,  $d$ ,  $J = 5.1\text{ Hz}$ , H-6) 是烯基氫的吸收訊號。5.14 (1H,  $dd$ ,  $J = 15.2, 8.1\text{ Hz}$ ), 5.10 (1H,  $dd$ ,  $J = 15.2, 8.0\text{ Hz}$ ) 為 stigmasterol 之 H-22、H-23 的訊號。3.52 (1H,  $m$ , H-3) 羥基根部質子訊號。

$^{13}\text{C-NMR}$  光譜 (圖 6;  $\text{CDCl}_3$ ) 顯示與 DEPT 圖譜 (圖 7) 顯示在 140.5、121.4 及 138.1、129.0 的訊號分別為雙鍵 C-5、C-6 及 C-22、C-23 之吸收，經與文獻比對<sup>(11~14)</sup>整理如表二所示，得知此化合物為  $\beta$ -sitosterol 及 stigmasterol 的混合物。



$\beta$ -sitosterol



stigmasterol

表二、 $\beta$ -sitosterol、stigmasterol與混合物 I 之碳譜化學位移比較

Carbon	stigmasterol	$\beta$ -sitosterol	Mixture I
1	37.3	37.2	37.0
2	31.7	31.6	32.2
3	71.8	71.8	71.6
4	42.3	42.2	42.2
5	140.8	140.8	140.5
6	121.7	121.7	121.4
7	31.9	31.8	31.4
8	31.9	31.8	31.6
9	50.2	50.1	49.9
10	36.5	36.4	36.4
11	21.1	21.0	21.0
12	39.7	39.7	39.5
13	42.2	42.3	42.1
14	56.9	56.7	56.1
15	24.3	24.2	24.1
16	28.9	28.2	28.6, 27.9
17	56.0	56.0	55.7
18	12.1	11.8	11.8, 11.6
19	19.4	19.3	19.2
20	40.5	36.1	40.3, 35.9
21	21.1	18.7	18.7, 18.0
22	138.8	33.9	138.1
23	129.3	26.0	129.1
24	51.2	45.8	51.0, 45.5
25	31.9	29.1	31.2, 30.0
26	21.2	19.0	20.8, 19.9
27	19.0	19.0	19.4
28	25.4	23.0	25.2, 22.8
29	12.3	11.9	12.0

## 【二】化合物 II ( hexadecanoic acid )

化合物 II 為白色片狀結晶，熔點 61~62 ，其 TLC 經溶媒 (n-hexane : chloroform = 10 : 1) 展開後  $R_f$  值為 0.4，紫外光在 200~380 nm 內不吸光。

紅外線光譜(圖 8)顯示  $2916\text{ cm}^{-1}$  及  $2851\text{ cm}^{-1}$  為飽和碳氫的吸收， $1701\text{ cm}^{-1}$  為 carbonyl group (C=O) 的吸收。

$^1\text{H-NMR}$  光譜(圖 9 ;  $\text{CDCl}_3$ )顯示 0.88 (3H, *t*) 為長鏈末端甲基之吸收訊號， 1.26 (24H, *s.br*) 為長鏈 methylene (- $\text{CH}_2$ -) 的吸收訊號， 2.35 (2H, *t*) 為 H-2 的吸收訊號。

$^{13}\text{C-NMR}$  光譜(圖 10 ;  $\text{CDCl}_3$ )顯示 13.8 為長鏈末端甲基碳的吸收訊號， 22.4~33.7 為長鏈 methylene 的吸收訊號， 179.6 為 carboxyl carbon (C=O) 的吸收訊號。

綜合上述資料與文獻值<sup>(15)</sup>比對，確認此化合物之結構為 hexadecanoic acid，分子式為  $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$ ，其結構如下所示：



### 【三】化合物 III ( tetracosanoic acid )

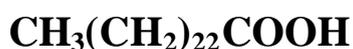
化合物 III 為白色片狀結晶，熔點 80~82 ，其 TLC 經溶媒 (n-hexane : chloroform = 10 : 1) 展開後  $R_f$  值為 0.35，紫外光在 200~380 nm 內不吸光。

紅外線光譜(圖 11)顯示  $3340\text{ cm}^{-1}$  為羥基的吸收訊號， $2916\text{ cm}^{-1}$  及  $2847\text{ cm}^{-1}$  為飽和碳氫的吸收， $1709\text{ cm}^{-1}$  為 carbonyl group (C=O) 的吸收。

$^1\text{H-NMR}$  光譜(圖 12;  $\text{CDCl}_3$ )顯示 0.88 (3H, *t*) 為長鏈末端甲基之吸收訊號，1.26 (40H, *s.br*) 為長鏈 methylene (- $\text{CH}_2$ -) 的吸收訊號，2.35 (2H, *t*) 為 H-2 的吸收訊號。

$^{13}\text{C-NMR}$  光譜(圖 13;  $\text{CDCl}_3$ )顯示 13.8 為長鏈末端甲基碳的吸收訊號，22.4~33.5 為長鏈 methylene (- $\text{CH}_2$ -) 的吸收訊號，178.2 為 carboxyl carbon (C=O) 的吸收訊號。

綜合上述資料與文獻值<sup>(16)</sup>比對，確認此化合物之結構為 tetracosanoic acid，分子式為  $\text{C}_{24}\text{H}_{48}\text{O}_2$ ，其結構如下所示：



#### 【四】化合物 IV

化合物 IV 為黃色粉末，熔點 285~287 ，微溶於甲醇不溶於水。TLC 經溶媒(chloroform : methanol = 10 : 1)展開後  $R_f$  值為 0.45，且在噴 10% 硫酸溶液加熱後顯色呈淡黃色， $FeCl_3$  試驗呈青綠色。

紅外光光譜(圖 14)在  $3442\text{ cm}^{-1}$  為寬幅吸收表示有羥基， $1651\text{ cm}^{-1}$  有共軛羰基吸收， $1605$ 、 $1559$ 、 $1443\text{ cm}^{-1}$  為苯環之吸收， $1165\text{ cm}^{-1}$  為 -C-O-基吸收。

紫外光光譜(圖 15)在 346 nm、275 nm 有最大吸收，前者為 Band I 吸收波長，後者為 Band II 吸收波長，符合黃酮類(flavones)化合物的吸收特性，故推定化合物 IV 為黃酮類化合物。進一步將化合物加入 shift reagent，其變化如下表所示：

UV 圖譜(nm)：

shift reagent	MeOH	NaOH	$AlCl_3$	$AlCl_3/HCl$	NaOAc	NaOAc/ $H_3BO_3$
Band I	346	401	412	362	397	369
Band II	275	269	283	291	272	263

- (1) 加入氫氧化鈉[1% (w/v) NaOH]：Band I 由 346 nm 向長波長移動 55 nm，且強度不變，表示化合物之 B 環在第 4' 位有羥基(4'-OH)。
- (2) 加入三氯化鋁[10% (w/v)  $AlCl_3$ ]：Band I 向長波長移動 66 nm，Band II 向長波長移動 8 nm；且再加入鹽酸(1N HCl)後，Band I 往短波長移動 50 nm，Band II 吸收幾乎不變，表示 B 環上有鄰位二羥基，A 環第 5 位上有羥基(5-OH)。
- (3) 加入醋酸鈉[10% (w/v) NaOAc]：Band I 往長波長移動 51 nm，Band

II 的移動很小,表示第 4 位有羥基且第 7 位不含羥基;再加入硼酸[10% (w/v) H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>]後, Band I 往短波長移動 28 nm, 亦證明含有鄰位二羥基。

綜合以上紫外光譜資料得知此化合物為 3', 4', 5 位有羥基之黃酮類化合物。

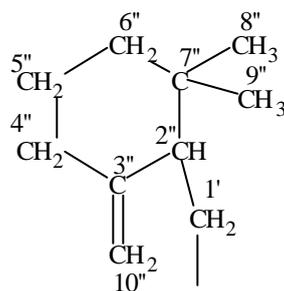
由 EI 質譜(圖 16)顯示其分子離子峰為 436 (7.6), 其它碎片離子峰尚有 369、313、283、179、134、123、109 等吸收, 且  $m/z$  313 應為黃酮類化合物之本體部分。

綜觀 NMR 光譜資料, <sup>1</sup>H-NMR 光譜 (圖 17; DMSO-*d*<sub>6</sub>) 顯示在 3.86 (3H, *s*)有芳香環上甲氧基的訊號, 也有 13.13 (1H, *s*)為 5-OH 質子訊號。<sup>13</sup>C-NMR 光譜 (圖 18; DMSO-*d*<sub>6</sub>)和 DEPT 實驗 (圖 19; DMSO-*d*<sub>6</sub>)顯示此化合物有 6 個次甲基 (CH)、5 個亞甲基 (CH<sub>2</sub>)、3 個甲基 (CH<sub>3</sub>)及 12 個四級碳總共 26 個碳, 其中 182.1 為 flavones 之 carbonyl (C-4)的吸收訊號。

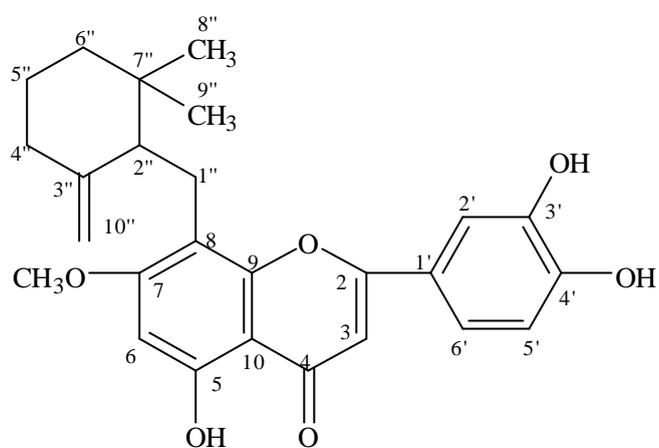
而 COSY 光譜(圖 20; DMSO-*d*<sub>6</sub>)顯示在 7.41 (*s*)、6.71 (*s*)、6.68 (*s*)、7.42 (*d*)、6.88 (*d*)有芳香族之質子訊號, 其中依 COSY 交叉峰, 可以確定 7.42 與 6.88 二訊號有偶合關係, 應可分別歸屬給 H-6'及 H-5'。從 HMQC 光譜 (圖 21; DMSO-*d*<sub>6</sub>)交叉峰, 發現 H-5' (6.88)與 146.1 (C-3')、121.6 (C-1')、150.2 (C-4') 有關, 而 H-6'與 113.6 (C-2') 之訊號相關, 故 flavone 結構上 C 環之訊號可正確歸屬。7.41 訊號與 121.6 (C-1')、146.1 (C-3')、119.2 (C-6') 的遠程相關支持此等歸屬。因 103.2 訊號歸屬給 C-3 (HMQC 顯示 6.68 之質子訊號為 H-3)與 C-1'有遠程相關, 推測 C 環接在 C-2,

正是 flavone 的結構。 103.2 (C-3)訊號也與 164.2 182.1 104.5 等訊號相關，故分別歸屬給 C-2、C-4、C-10。最後一個芳香族質子訊號 6.71 應是 H-6 (依 HMQC, 90.3 是 C-6)與 155.6 163.6 112.2、104.5 (C-10)的 HMBC(圖 22; DMSO- $d_6$ )相關，分別可順利歸屬為 C-5、C-7、C-8 的訊號。而 2.81 及 2.65 經 HMQC 確定是 C-1'' (21.0)碳十三訊號的質子訊號與 C-8 (112.2)有遠程偶合關係，也與碳譜上 158.0 (可歸屬給 C-9)芳香族碳十三訊號有相關，另外從上述紫外光光譜及化學位移資料，可以確定化合物 IV 是 8 位有取代之 7-methoxy-5,3',4'-trihydroxyflavone，而且 2.81 及 2.65 應歸屬於 H-1''，21.0 應歸屬於 C-1''，均能符合 HMBC 的要求。

至於分佈在較高磁場的脂肪族質子訊號，從 H-1'' 的 COSY 偶合關係，可確定 2.18 歸屬於 H-2''，依 HMQC，52.4 歸屬於 C-2''。其他 HMBC 偶合關係與上述 NMR 光譜資料整理如表三所示。且從 H-2'' 開始的 HMBC 各質子相關，依序可決定脂肪族環結構如下所示：



綜合上述資料推知化合物 IV 可能的結構如下：



化合物 IV 為一新的化合物，命名為 ugonin H；而其質譜斷裂模式如圖 23 所示。

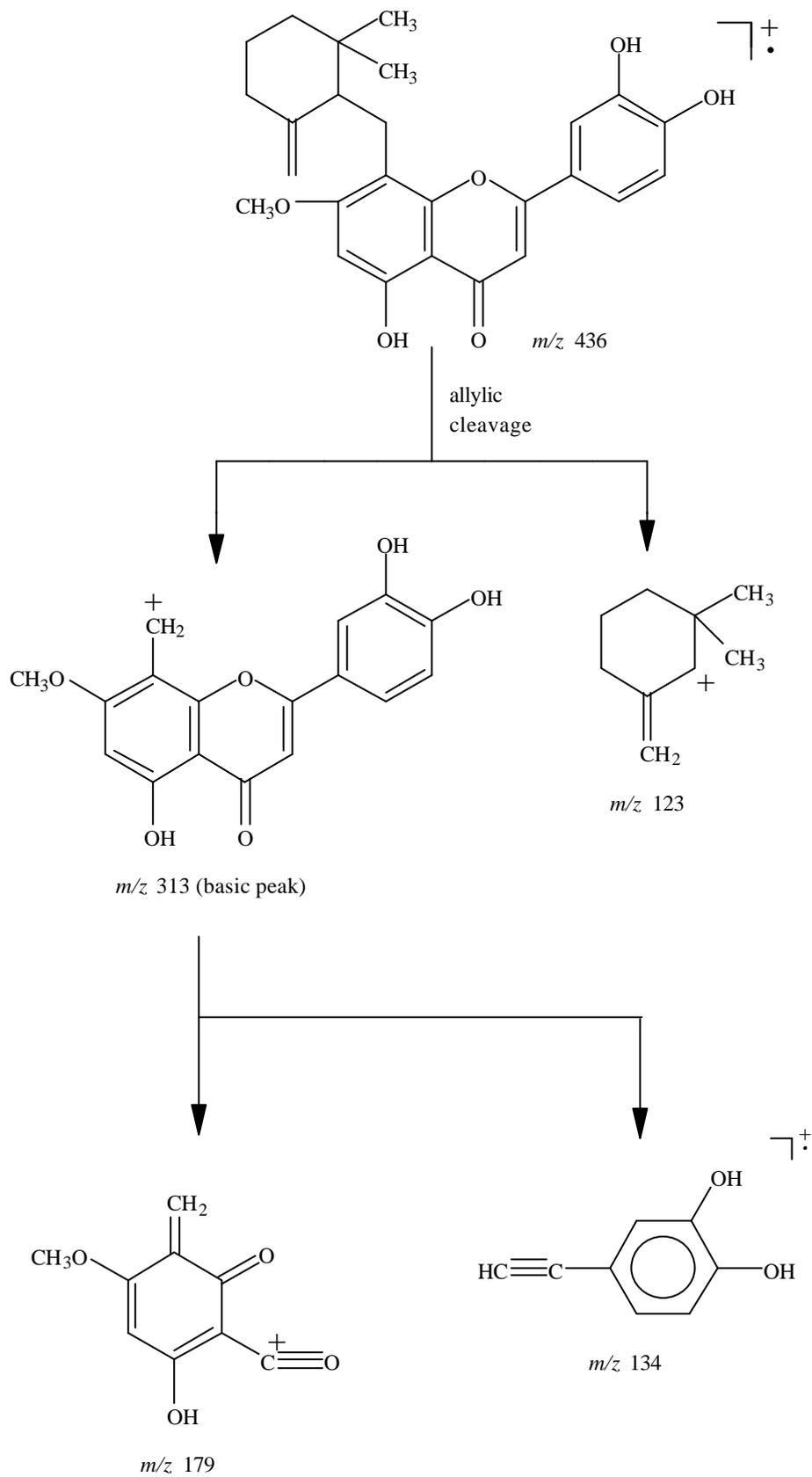


圖 23、Ugonin H 之裂解模式

表三、ugonin H之 NMR 光譜(DMSO-d<sub>6</sub>, 200 及 50 MHz)

Carbon	<sup>13</sup> C	DEPT	<sup>1</sup> H ( <i>J</i> in HZ)	COSY	HMBC
2	164.2	C			
3	103.2	CH	6.68 ( <i>s</i> )		C-2 ( <sup>2</sup> <i>J</i> ), C-4 ( <sup>2</sup> <i>J</i> ), C-10 ( <sup>3</sup> <i>J</i> ), C-1' ( <sup>3</sup> <i>J</i> )
4	182.1	C			
5	155.6	C			
6	90.3	CH	6.71 ( <i>d</i> )		C-5 ( <sup>2</sup> <i>J</i> ), C-7 ( <sup>2</sup> <i>J</i> ), C-8 ( <sup>3</sup> <i>J</i> ), C-10 ( <sup>3</sup> <i>J</i> )
7	163.6	C			
8	112.2	C			
9	158.0	C			
10	104.5	C			
1'	121.6	C		H-2'	
2'	113.6	CH	7.41 ( <i>d</i> )	H-1'	C-2 ( <sup>3</sup> <i>J</i> ), C-1' ( <sup>2</sup> <i>J</i> ), C-3' ( <sup>2</sup> <i>J</i> ), C-4 ( <sup>3</sup> <i>J</i> ), C-6' ( <sup>3</sup> <i>J</i> )
3'	146.1	C			
4'	150.2	C			
5'	116.2	CH	6.88 ( <i>d</i> , 8.6 Hz)	H-6'	C-1' ( <sup>3</sup> <i>J</i> ), C-3' ( <sup>3</sup> <i>J</i> ), C-4' ( <sup>2</sup> <i>J</i> )
6'	119.2	CH	7.42 ( <i>d</i> )	H-5'	C-2' ( <sup>3</sup> <i>J</i> )
1''	21.0	CH <sub>2</sub>	2.81, 2.65 ( <i>d</i> , 8.6 Hz)	H-2''	C-8 ( <sup>2</sup> <i>J</i> ), C-9 ( <sup>3</sup> <i>J</i> ), C-2'' ( <sup>2</sup> <i>J</i> ), C-3'' ( <sup>3</sup> <i>J</i> )
2''	52.4	CH	2.18 ( <i>d</i> , 8.6 Hz)	H-1''	C-8 ( <sup>3</sup> <i>J</i> ), C-3'' ( <sup>2</sup> <i>J</i> )
3''	149.4	C			
4''	30.9	CH <sub>2</sub>	2.35 ( <i>d</i> ) 1.92 ( <i>d</i> , 9 Hz)	H-5''	C-10'' ( <sup>3</sup> <i>J</i> )
5''	23.1	CH <sub>2</sub>	1.52, 1.42 ( <i>m</i> ; <i>m</i> )	H-6''	C-8'' ( <sup>3</sup> <i>J</i> ), C-9'' ( <sup>3</sup> <i>J</i> )
6''	34.6	CH <sub>2</sub>	1.57, 1.20 ( <i>m</i> ; <i>d.br</i> )		C-8'' ( <sup>2</sup> <i>J</i> ), C-9'' ( <sup>2</sup> <i>J</i> )
7''	34.6	C			
8''	28.2	CH <sub>3</sub>	0.88 ( <i>s</i> )		C-9'' ( <sup>3</sup> <i>J</i> )
9''	27.7	CH <sub>3</sub>	0.99 ( <i>s</i> )		C-8'' ( <sup>3</sup> <i>J</i> )
10''	109.1	CH <sub>2</sub>	4.40, 4.12 ( <i>s</i> , <i>s</i> )		C-2'' ( <sup>3</sup> <i>J</i> ), C-4'' ( <sup>3</sup> <i>J</i> )
7-OMe	56.3	OCH <sub>3</sub>	3.68 ( <i>s</i> )		
5-OH	—		13.13 ( <i>s</i> )		

## 【五】化合物 V

化合物 V 為黃色粉末，熔點 254~256 ，微溶於甲醇不溶於水。TLC 經溶媒(chloroform : methanol = 10 : 1)展開後  $R_f$  值為 0.35，且在噴 10% 硫酸溶液加熱後顯色呈淡黃色， $FeCl_3$  試驗呈青綠色。

紅外光光譜(圖 24)在  $3118\text{ cm}^{-1}$  附近為寬幅吸收表示有羥基， $1651\text{ cm}^{-1}$  有共軛羰基吸收， $1613\text{ } 1450\text{ cm}^{-1}$  為苯環之吸收， $1189\text{ cm}^{-1}$  為 -C-O 基吸收。

紫外光光譜(圖 25)在 346 nm、275 nm 有最大吸收，前者為 Band I 吸收波長，後者為 Band II 吸收波長，符合黃酮類(flavones)化合物的吸收特性，且與 ugonin H 之紫外光光譜相似，故推定化合物 V 亦為黃酮類化合物。進一步將化合物加入 shift reagent，其變化如下表所示：

UV 圖譜(nm)：

shift reagent	MeOH	NaOH	$AlCl_3$	$AlCl_3/HCl$	NaOAc	NaOAc/ $H_3BO_3$
Band I	346	404	412	361	394	370
Band II	275	278	280	290	272	263

(1) 加入氫氧化鈉[1% (w/v) NaOH]：Band I 由 346 nm 向長波長移動 58 nm，且強度不變，表示化合物之 B 環在第 4'位有羥基(4'-OH)，Band II 也有些微往常波長移動，可能第 7 位有羥基。

(2) 加入三氯化鋁[10% (w/v)  $AlCl_3$ ]：Band I 向長波長移動 66 nm，Band II 向長波長移動 5 nm；且再加入鹽酸(1N HCl)後，Band I 往短波長移動 51 nm，Band II 吸收幾乎不變，表示 B 環上有鄰位二羥基，A 環第 5 位上有羥基(5-OH)。

(3) 加入醋酸鈉[10% (w/v) NaOAc]：Band I 往長波長移動 48 nm，Band II 的移動很小，表示第 4'位有羥基；再加入硼酸[10% (w/v) H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>]後，Band I 往短波長移動 24 nm，亦證明含有鄰位二羥基。綜合以上紫外光譜資料得知此化合物亦為 3', 4', 5 位有 OH 基之黃酮類化合物，但 7 位亦可能含有 OH 基。

EI 質譜(圖 26)顯示其分子離子主要吸收峰為 422 (1.0)，其它碎片離子峰尚有 351、337、299、270、165、134、109 等吸收，與 ugonin H 裂解模式類似，故推定化合物 V 的基本骨架應與 ugonin H 相似。

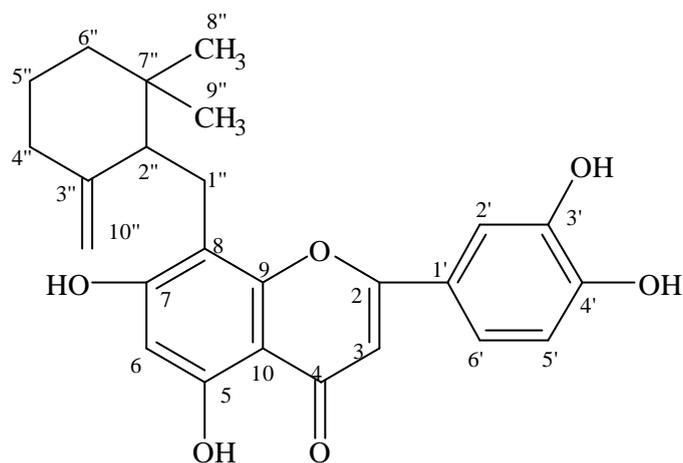
<sup>1</sup>H-NMR 光譜(圖 27；DMSO-*d*<sub>6</sub>)顯示在 7.35 (1H, *s*, H-2')、6.86 (1H, *d*, *J*=8.6 Hz, H-5')、7.39 (1H, *d*, H-6')為 1,3,4 取代芳香環上的質子訊號；6.43 (1H, *s*)及 6.61 (1H, *s*)為芳香環上的質子訊號，13.20 (1H, *s*)為第 5 位羥基的質子訊號，比較化合物 V 與 ugonin H 之氫譜化學位移 (如表四)，發現化合物 V 除了缺少芳香環甲氧基的訊號外，大致與 ugonin H 的氫譜相似。

<sup>13</sup>C-NMR 光譜(圖 28；DMSO-*d*<sub>6</sub>)和 DEPT 實驗(圖 29；DMSO-*d*<sub>6</sub>)顯示此化合物有 6 個次甲基(CH)、5 個亞甲基(CH<sub>2</sub>)、2 個甲基(CH<sub>3</sub>)及 12 個四級碳總共 25 個碳，其中 181.9 為 flavones 之 carbonyl (C-4) 的吸收訊號。與氫譜情況相同，除缺少芳香環甲氧基的訊號外，大致與 ugonin H 的碳譜相似 (如表四)。

比較化合物 V 在高磁場之化學位移訊號與 ugonin H 較為相近，可能脂肪環部分之結構類似；且如前述化合物 V 並無 56.3 之甲氧基訊號，從 DEPT 光譜得知化合物之 C-7 依然為一四級碳，故推論 C-7 位置上仍有一取代基存在。比較化合物 V 與 ugonin H 的 <sup>1</sup>H-NMR 光譜，發現兩者在 H-6 之化學位移有較大差異，且往高磁場移動，故

推論 C-7 位置上可能為 OH 基取代，亦符合化合物之分子量。其餘 NMR 光譜資料如表五所示。

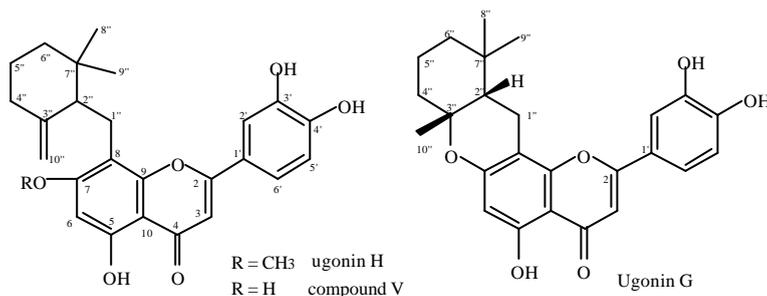
綜合上述資料推知化合物 V 可能的結構如下：



化合物 V 為一新的化合物，命名為 ugonin I。

表四、Ugonin H、Ugonin G、compound V 之  $^1\text{H}$  及  $^{13}\text{C}$ -NMR 之化學位移比較

carbon	$^{13}\text{C}$ (50 MHz, DMSO- $d_6$ )			$^1\text{H}$ (200 MHz, DMSO- $d_6$ )		
	Ugonin H	Compound V	Ugonin G	Ugonin H	Compound V	Ugonin G
2	164.2	163.7	164.0	—	—	—
3	103.2	102.9	102.7	6.68	6.61	6.65
4	182.1	181.9	181.5	—	—	—
5	155.6	155.0	154.7	—	—	—
6	90.3	93.1	94.6	6.71	6.43	6.45
7	163.6	162.5	160.4	—	—	—
8	112.2	111.3	105.6	—	—	—
9	158.0	159.1	157.9	—	—	—
10	104.5	103.4	103.7	—	—	—
1'	121.6	121.8	121.6	—	—	—
2'	113.6	113.4	113.4	7.41	7.35	7.38
3'	146.1	145.9	145.7	—	—	—
4'	150.2	149.8	149.7	—	—	—
5'	116.2	116.2	115.9	6.88	6.86	6.88
6'	119.2	119.1	119.0	7.42	7.39	7.38
1''	21.0	21.0	16.9	2.81, 2.65	2.82, 2.64	2.66
2''	52.4	51.9	42.0	2.18	2.30	1.55
3''	149.4	149.5	77.1	—	—	—
4''	30.9	31.2	38.3	2.35, 1.92	2.36, 1.92	1.93, 1.47
5''	23.1	23.1	17.6	1.52, 1.42	1.53, 1.43	1.63, 1.36
6''	34.6	34.6	40.6	1.57, 1.20	1.59, 1.20	1.25
7''	34.6	34.9	33.4	—	—	—
8''	28.2	28.2	31.8	0.88	0.89	0.9
9''	27.7	27.5	21.0	0.99	0.99	0.52
10''	109.1	109.1	26.5	4.40, 4.12	4.41, 4.21	1.15
7-OMe	56.3	—	—	3.86	—	—
5-OH	—	—	—	13.13	13.20	13.34



表五、ugonin I之 NMR 光譜(DMSO-d6, 200 及 50 MHz)

Carbon	<sup>13</sup> C	DEPT	<sup>1</sup> H (J in HZ)	COSY	HMBC
2	163.7	C			
3	103.0	CH	6.61 ( <i>s</i> )		C-2 ( <sup>2</sup> J), C-4 ( <sup>2</sup> J), C-10 ( <sup>3</sup> J)
4	181.9	C			
5	155.0	C			
6	93.1	CH	6.43 ( <i>d</i> )		C-5 ( <sup>2</sup> J), C-7 ( <sup>2</sup> J), C-8 ( <sup>3</sup> J), C-10 ( <sup>3</sup> J)
7	162.5	C			
8	111.3	C			
9	159.1	C			
10	103.4	C			
1'	121.8	C			
2'	113.4	CH	7.35 ( <i>d</i> )		C-2 ( <sup>3</sup> J), C-3' ( <sup>2</sup> J), C-6' ( <sup>3</sup> J)'
3'	145.9	C			
4'	149.8	C			
5'	116.2	CH	6.86 ( <i>d</i> , 8.6 Hz)	H-6'	C-1' ( <sup>3</sup> J), C-3' ( <sup>3</sup> J), C-4' ( <sup>2</sup> J)
6'	119.1	CH	7.39 ( <i>d</i> )	H-5'	C-2' ( <sup>3</sup> J)
1"	21.0	CH <sub>2</sub>	2.82, 2.64 ( <i>d</i> , 8.6 Hz)	H-2"	C-8 ( <sup>2</sup> J), C-9 ( <sup>3</sup> J), C-2" ( <sup>2</sup> J)
2"	51.9	CH	2.30 ( <i>d</i> , 8.6 Hz)	H-1"	C-6" ( <sup>2</sup> J)
3"	149.5	C			
4"	31.2	CH <sub>2</sub>	2.36 ( <i>d</i> ) 1.92 ( <i>d</i> , 9 Hz)		
5"	23.1	CH <sub>2</sub>	1.53( <i>m</i> ) 1.43 ( <i>m</i> )		C-8" ( <sup>3</sup> J), C-9" ( <sup>3</sup> J)
6"	34.6	CH <sub>2</sub>	1.59( <i>m</i> ) 1.20 ( <i>d.br</i> )		C-8" ( <sup>2</sup> J), C-9" ( <sup>2</sup> J)
7"	34.9	C			
8"	28.2	CH <sub>3</sub>	0.89 ( <i>s</i> )		C-9" ( <sup>3</sup> J)
9"	27.5	CH <sub>3</sub>	0.99 ( <i>s</i> )		C-8" ( <sup>3</sup> J)
10"	109.1	CH <sub>2</sub>	4.41( <i>s</i> ) 4.21 ( <i>s</i> )		C-2" ( <sup>3</sup> J), C-4" ( <sup>3</sup> J)
7-OMe	—	—	—	H-6	
5-OH	—		13.20 ( <i>s</i> )		

## 第四章 粗抽物與成分活性探討

### 第一節 抗發炎、抗過敏之活性

#### 一、釘地蜈蚣各抽取物之抗發炎、抗過敏活性

以 compound 48/80 為引發劑(inducing agent)，測試甲醇抽取物及各分劃層 (Fr. A~C) 對大白鼠的肥大細胞 (mast cell) 釋放  $\beta$ -glucuronidase、histamine 之抑制活性，其結果如表六所示。

以 FMLP 為引發劑，測試甲醇抽取物及各分化層(Fr. A~C)對中性白血球(neutrophil)釋放  $\beta$ -glucuronidase、lysozyme 之抑制活性，其結果如表七所示。

表六、釘地蜈蚣之甲醇抽取物及各分化層(Fr. A~C)對肥大細胞釋放  $\beta$ -glucuronidase、histamine 之抑制活性

Drugs ( $\mu$ g/ml)	Percent Release	
	$\beta$ -glucuronidase (% , inh)	histamine (% , inh)
Control	14.2 $\pm$ 1.6	83.1 $\pm$ 2.2
MeOH ext.(10)	14.8 $\pm$ 1.0 (3.8 $\pm$ 8.9)	85.8 $\pm$ 7.9 (-3.0 $\pm$ 9.4)
(30)	11.6 $\pm$ 0.9 (24.5 $\pm$ 6.3)*	76.3 $\pm$ 3.9 (8.3 $\pm$ 4.6)
Fr. A (10)	12.5 $\pm$ 1.3 (15.3 $\pm$ 4.4)**	92.3 $\pm$ 3.3 (-10.8 $\pm$ 4.1)
(30)	13.3 $\pm$ 0.7 (12.9 $\pm$ 8.8)	93.2 $\pm$ 3.6 (-11.9 $\pm$ 4.6)
Fr. B (10)	12.5 $\pm$ 0.5 (-6.1 $\pm$ 9.5)	81.6 $\pm$ 5.8 (-1.6 $\pm$ 6.6)
(30)	7.8 $\pm$ 0.3 (33.4 $\pm$ 6.4)*	53.4 $\pm$ 0.3 (33.2 $\pm$ 3.0)**
Fr. C (10)	13.0 $\pm$ 1.7 (16.7 $\pm$ 6.9)	89.1 $\pm$ 1.5 (-7.0 $\pm$ 1.9)
(30)	8.9 $\pm$ 1.5 (43.5 $\pm$ 6.6)**	79.3 $\pm$ 2.3 (4.8 $\pm$ 2.1)
Mepacrine (10 $\mu$ ?) )	12.1 $\pm$ 0.4 (18.1 $\pm$ 2.5)*	64.1 $\pm$ 2.3 (21.3 $\pm$ 2.5)*
(30 $\mu$ M)	7.2 $\pm$ 0.2 (46.3 $\pm$ 3.2)**	34.8 $\pm$ 1.1 (53.7 $\pm$ 1.3)**
(100 $\mu$ M)	3.1 $\pm$ 0.2 (81.9 $\pm$ 1.4)**	14.2 $\pm$ 1.3 (85.2 $\pm$ 1.7)**
IC <sub>50</sub>	27 $\pm$ 9.2	26.2 $\pm$ 1.6

1.N=3, \*P > 0.05,\*\*P < 0.01

2.Mepacrine : positive control

3.Fr. A : 正己烷抽取物。 Fr. B : 氯仿抽取物。 Fr. C 水層抽取物。

表六顯示氯仿抽取物 (Fr. B, 30  $\mu\text{g/ml}$ )對 compound 48/80 所引發肥大細胞釋放  $\beta$ -glucuronidase、histamine 有抑制活性，顯示具有抗過敏效果。

表七、釘地蜈蚣之甲醇抽取物及各分化層(Fr. A~C)對中性白血球釋放  $\beta$ -glucuronidase、lysozyme 之抑制活性

Drugs ( $\mu\text{g/ml}$ )	Percent	Release
Control	$\beta$ -glucuronides (% , inh)	lysozyme (% , inh)
	30.0 $\pm$ 0.7	29.3 $\pm$ 1.4
MeOH ext. (0.3)	26.8 $\pm$ 6.6 (1.5 $\pm$ 1.8)	
(1)	14.6 $\pm$ 1.3 (49.9 $\pm$ 3.7) **	30.6 $\pm$ 3.6 (-3.9 $\pm$ 7.0)
(3)	3.9 $\pm$ 1.6 (84.1 $\pm$ 5.7) **	16.0 $\pm$ 4.0 (46.1 $\pm$ 11.5) *
(10)	?	15.9 $\pm$ 1.3 (45.8 $\pm$ 2.8) *
(30)	?	34.8 $\pm$ 3.4 (-18.4 $\pm$ 6.0)
IC <sub>50</sub>	1.1 $\pm$ 0.1	
Fr. A (1)	21.2 $\pm$ 5.9 (24.9 $\pm$ 18.2)	25.2 $\pm$ 4.7 (14.6 $\pm$ 13.3)
(3)	11.2 $\pm$ 2.2 (60.2 $\pm$ 6.5) **	16.7 $\pm$ 4.3 (43.9 $\pm$ 11.9) *
(10)	3.9 $\pm$ 0.6 (87.1 $\pm$ 1.8) **	14.5 $\pm$ 5.0 (51.4 $\pm$ 15.3) *
(30)	?	10.9 $\pm$ 4.9 (63.6 $\pm$ 15.1) **
IC <sub>50</sub>	2.0 $\pm$ 0.7	9.0 $\pm$ 2.9
Fr. B (0.3)	23.5 $\pm$ 4.2 (21.6 $\pm$ 7.8)	?
(1)	15.7 $\pm$ 3.1 (42.8 $\pm$ 11.9) **	28.7 $\pm$ 0.7 (1.2 $\pm$ 6.5)
(3)	6.1 $\pm$ 0.7 (77.8 $\pm$ 2.7) **	20.7 $\pm$ 3.2 (29.8 $\pm$ 9.1)
(10)	?	27.2 $\pm$ 6.1 (7.7 $\pm$ 18.3)
(30)	?	38.9 $\pm$ 6.9 (-31.2 $\pm$ 17.0)
IC <sub>50</sub>	1.3 $\pm$ 0.1	?
Fr. C (10)	18.9 $\pm$ 3.8 (31.9 $\pm$ 13.6) **	31.9 $\pm$ 4.0 (-8.3 $\pm$ 10.8)
(30)	26.7 $\pm$ 0.9 (3.3 $\pm$ 9.5)	28.2 $\pm$ 3.8 (4.1 $\pm$ 9.7)
TFP (3 $\mu$ ? )	30.0 $\pm$ 0.9 (-0.5 $\pm$ 4.3)	24.5 $\pm$ 3.0 (16.5 $\pm$ 8.5)
(10 $\mu$ ? )	15.2 $\pm$ 2.4 (48.0 $\pm$ 9.2) **	15.2 $\pm$ 1.7 (48.3 $\pm$ 3.7) *
(30 $\mu$ ? )	6.1 $\pm$ 0.6 (79.5 $\pm$ 2.1) **	6.1 $\pm$ 1.0 (79.0 $\pm$ 2.9) **
IC <sub>50</sub>	9.8 $\pm$ 0.4	9.6 $\pm$ 0.4

1.N=3; \*P > 0.05, \*\*P < 0.01; ? , not determined

2.Trifluoperazine (TFP) : positive control

3.Fr. A : 正己烷抽取物。 Fr. B : 氯仿抽取物。 Fr. C 水層抽取物。

表七顯示甲醇提取物 (3  $\mu\text{g/ml}$ )、正己烷 (10  $\mu\text{g/ml}$ )、氯仿提取物 (3  $\mu\text{g/ml}$ )對 FMLP 所引發中性白血球釋放  $\beta$ -glucuronidase、lysozyme 之反應有顯著的抑制活性，顯示其具有抗發炎作用。甲醇提取物抑制 FMLP 所引發中性白血球釋放  $\beta$ -glucuronidase 之  $\text{IC}_{50}$  為  $1.1\pm 0.1$   $\mu\text{g/ml}$ ；Fr. A 抑制 FMLP 所引發中性白血球釋放  $\beta$ -glucuronidase、lysozyme 之  $\text{IC}_{50}$  分別為  $2.0\pm 0.7$   $\mu\text{g/ml}$  及  $9.0\pm 0.9$   $\mu\text{g/ml}$ ；Fr. B 抑制 FMLP 所引發中性白血球釋放  $\beta$ -glucuronidase 之  $\text{IC}_{50}$  為  $1.3\pm 0.1$   $\mu\text{g/ml}$ 。此結果顯示在正己烷、氯仿及水層提取物各有不同之有效成分。由 Scheme 1~3 之分離過程中所得 4 個化合物及 1 個混合物，其抗發炎之藥理目前正在測試中，結果探討將於爾後補上。

## 第二節 抗細胞增殖活性

本實驗以 retinoic acid 為 positive control, 測試甲醇提取物及各分劃層(Fr. A~C)對 HL-60 與 U937 血癌細胞之增殖抑制活性, 其結果如表八所示:

表八、釘地蜈蚣之甲醇提取物及各分化層(Fr. A~C)對 HL-60 與 U937 血癌細胞之增殖抑制活性

Compound	Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	MTT assay (%) (HL-60)	MTT assay(%) (U937)
Cont.	0.0	100.0 $\pm$ 1.0	100.0 $\pm$ 1.0
RA	<b>0.03 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	34.2 $\pm$ 3.3 ***	31.8 $\pm$ 1.3 ***
MeOH ext	5	107.3 $\pm$ 4.0	113.8 $\pm$ 9.7
	10	98.5 $\pm$ 4.7	99.1 $\pm$ 8.5
	25	27.1 $\pm$ 6.0 ***	32.5 $\pm$ 0.5 ***
		<b>IC<sub>50</sub>=19.9</b>	<b>IC<sub>50</sub>=21.0</b>
H <sub>2</sub> O layer	5	109.2 $\pm$ 8.7	120.6 $\pm$ 2.2
	10	102.9 $\pm$ 5.4	119.6 $\pm$ 4.1
	25	102.2 $\pm$ 9.3	113.2 $\pm$ 7.4
Fr. A	1	97.7 $\pm$ 9.7	90.7 $\pm$ 9.6
	5	43.9 $\pm$ 6.6 ***	56.4 $\pm$ 9.0 ***
	10	0.6 $\pm$ 0.5 ***	1.9 $\pm$ 0.5 ***
		<b>IC<sub>50</sub>=5.1</b>	<b>IC<sub>50</sub>=5.3</b>
Fr. B	5	100.8 $\pm$ 4.2	95.7 $\pm$ 9.4
	10	99.8 $\pm$ 5.7	69.1 $\pm$ 7.9 **
	15	93.6 $\pm$ 2.5	ND
	20	25.6 $\pm$ 8.5 ***	ND
	25	14.8 $\pm$ 5.7 ***	14.8 $\pm$ 5.7 ***
		<b>IC<sub>50</sub>=19.3</b>	<b>IC<sub>50</sub>=14.6</b>
Fr. C	1	100.6 $\pm$ 4.4	105.0 $\pm$ 8.9
	5	100.5 $\pm$ 11.7	64.2 $\pm$ 5.7 ***
	8	50.8 $\pm$ 8.3 ***	ND
	10	4.7 $\pm$ 2.8 ***	0.7 $\pm$ 0.6 ***
		<b>IC<sub>50</sub>=7.8</b>	<b>IC<sub>50</sub>=5.9</b>

1. HL-60 cells and U937 cells ( $2 \times 10^4$ ) were incubated with different concentration in 96 hrs. Data was presented as mean  $\pm$  SD from three separate experiments.

2. ND : none do

3. \*\* p < 0.01 compared with control.

\*\*\* p < 0.001 compared with control.

4. 3.Fr. A : 正己烷提取物。 Fr. B : 氯仿提取物。 Fr. C 乙酸乙酯層提取物。

表八顯示甲醇抽出物 (25 µg/ml)、正己烷抽出物 (10 µg/ml)、氯仿抽出物 (25 µg/ml)、乙酸乙酯抽出物 (10 µg/ml)對 HL-60 與 U937 血癌細胞之細胞增殖有顯著的抑制活性，顯示其具有抗癌作用，其對 HL-60 血癌細胞之 IC<sub>50</sub> 分別為 19.9 µg/ml、5.1 µg/ml、19.3 µg/ml 及 7.8 µg/ml，此結果顯示其有效活性成分在正己烷、氯仿、乙酸乙酯、甲醇層抽取物皆存在。

由 Scheme 1~3 之分離過程共得到 4 個化合物及 1 個混合物，其中除了 β-sitosterol & stigmasterol 之混合物、化合物 II 及化合物 III 在有效濃度區間內無法溶解外，將化合物 IV 與化合物 V 分別進行 HL-60 與 U937 血癌細胞之增殖抑制試驗，其結果如下表所示：

表九、化合物 IV 與化合物 V 對 HL-60 與 U937 血癌細胞之增殖抑制活性

Compound	Conc. (µM)	MTT assay(% (HL60)	MTT assay (%) (U937)
Cont.	0.0	100.0 ± 1.0	100.0 ± 1.0
RA	0.1 µM	31.8 ± 1.3 ***	34.2 ± 3.3 ***
化合物 IV	1	126.7 ± 6.1	105.4 ± 8.8
	5	111.4 ± 3.2	49.2 ± 7.1 ***
	8	11.5 ± 6.1 ***	ND
	10	2.2 ± 1.0 ***	2.5 ± 2.1 ***
		<b>IC<sub>50</sub>=7.3 µM</b>	<b>IC<sub>50</sub>=5.5 µM</b>
化合物 V	1	116.3 ± 5.2	108.8 ± 9.9
	5	129.5 ± 7.9	48.8 ± 6.9 ***
	8	102.3 ± 9.1	ND
	10	75.9 ± 2.8 ***	4.6 ± 5.7 ***
			<b>IC<sub>50</sub>=5.7 µM</b>

1. U937 cells and HL60 cells ( $2 \times 10^4$ ) were incubated with different concentration in 96 hrs. Data was presented as mean ± SD from three separate experiments.

2. ND : none do

3. \*\*\* p < 0.001 compared with control.

表九結果顯示 ugonin H (IV, 10  $\mu\text{g/ml}$ )和 ugonin I (V, 10  $\mu\text{g/ml}$ )對 U937 血癌細胞有顯著的抑制細胞增殖作用，其  $\text{IC}_{50}$ 分別為 5.5  $\mu\text{M}$ 及 5.7  $\mu\text{M}$ ，表示化合物 IV 與化合物 V 有很強的抗癌活性。亦可發現到化合物 IV 在相同濃度下(10  $\mu\text{g/ml}$ )對 HL-60 血癌細胞的抑制增殖活性稍有下降，而化合物 V 則無明顯抑制增殖活性，此結果是否與 HL-60 與 U937 血癌細胞本身的敏感性有關則須再做進一步探討。

## 第五章 結論

本研究自釘地蜈蚣甲醇粗抽物所萃取之正己烷層、氯仿層、乙酸乙酯層中，單離得到 4 個化合物及 1 個混合物： $\beta$ -sitosterol & stigmasterol 之混合物 (I)、hexadecanoic acid (II)、tetracosanoic acid (III)、ugonin H (IV)、ugonin I (V)。

其中 ugonin H 及 ugonin I 為首次從自然界中分離得到的新化合物，而本植物已知的 ugonin A、ugonin B、ugonin C、ugonin D、ugonin E、ugonin F、ugonin G 等成分則未被分離得到，倒是首次分離得到的 ugonin H、ugonin I 含量較多，除了考慮藥材的產地不同之外，藥材保存時間的長短與貯藏時的環境亦可能影響其組成成分。

本次藥理實驗發現釘地蜈蚣抗細胞增殖之活性成分分布於各萃取層，而由氯仿層分離之 ugonin H (IV)、ugonin I (V)，經由本次藥理實驗發現皆具有很強之抑制細胞增殖活性， $IC_{50}$  分別為 5.5  $\mu$ M 及 5.7  $\mu$ M。

此外釘地蜈蚣分離得到化合物之抗發炎試驗尚在測試當中，其結果將於爾後補上。

本研究因時間限制未能完全分離活性成分致為可惜，故本研究尚待持續執行。

## 第六章 實驗部分

### 第一節 儀器與試藥

#### 一、儀器：

##### (一)熔點測定裝置 (melting point apparatus)

本實驗熔點測定裝置採用 Yanaco MP-500D 熔點測定裝置，測定範圍在 40-500 ，溫度未經校正。

##### (二)紫外光-可見光光譜儀 (UV-visible spectrometer)

紫外光-可見光光譜分析採用 Shimadzu UV-160A UV-visible recording spectrophotometer。

##### (三)紅外光光譜儀 (infrared spectrometer, IR)

紅外光光譜分析採用 Nicolet Impact 400 FT-IR spectrophotometer，以溴化鉀粉末作為打錠稀釋劑；單位為波數( $\text{cm}^{-1}$ )。

##### (四)質譜儀 (mass spectrometer, MS)

EIMS：

使用 VG PLATFORM II 測定，離子化電壓為 70 eV，單位為  $m/z$ 。

##### (五)核磁共振光譜儀 (nuclear magnetic resonance spectrometer)

採用 DPX-200 及 DPX-400 FT-NMR spectrometer。以  $\delta$  表示化學位移(chemical shift)，單位為 ppm。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(multiplet)， $br$  表寬峰。

##### (六)紫外光燈(UV lamp)

CAMAG UV-Cabinet II , wavelength 254 nm 及 366 nm。

## 二、試藥：

### (一)成分抽取、薄層層析及管柱層析用溶劑

*n*-Hexane, benzene, chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol, acetone, methanol 等購自 TEDIA (ACS)。

### (二)測紫外光光譜用溶劑

Methanol 購自默克公司(Merck Taiwan, LTD, 台北) 之高效液相層析級用溶媒(HPLC Grade)。

### (三)核磁共振光譜用溶劑

Chloroform-*d*<sub>1</sub> (deuteration degree 99.5%)、 dimethylsulfoxide-*d*<sub>6</sub> (deuteration degree 99.8%)、 methanol-*d*<sub>4</sub> (deuteration degree 99.5%)、 pyridine-*d*<sub>6</sub> (deuteration degree 99.5%) 等購自默克公司(Merck Taiwan, LTD, 台北)。

### (四)管柱色層分析 (column chromatography)填充劑

#### 1. Silica gel

Merck Kieselgel 60 (70-230 mesh, Art. 7734) ;  
Merck Kieselgel 60 (230-400 mesh, Art. 9385)。

### (五)薄層色層分析 (thin-layer chromatography)

1. TLC aluminium sheets (silica gel 60 F<sub>254</sub>, 20 ×20 cm, 0.2 mm layer, Art. 5554, E. Merck)。
2. DC-Alufolien cellulose F (20 ×20 cm, 0.1 mm, Art. 5574, Merck)。

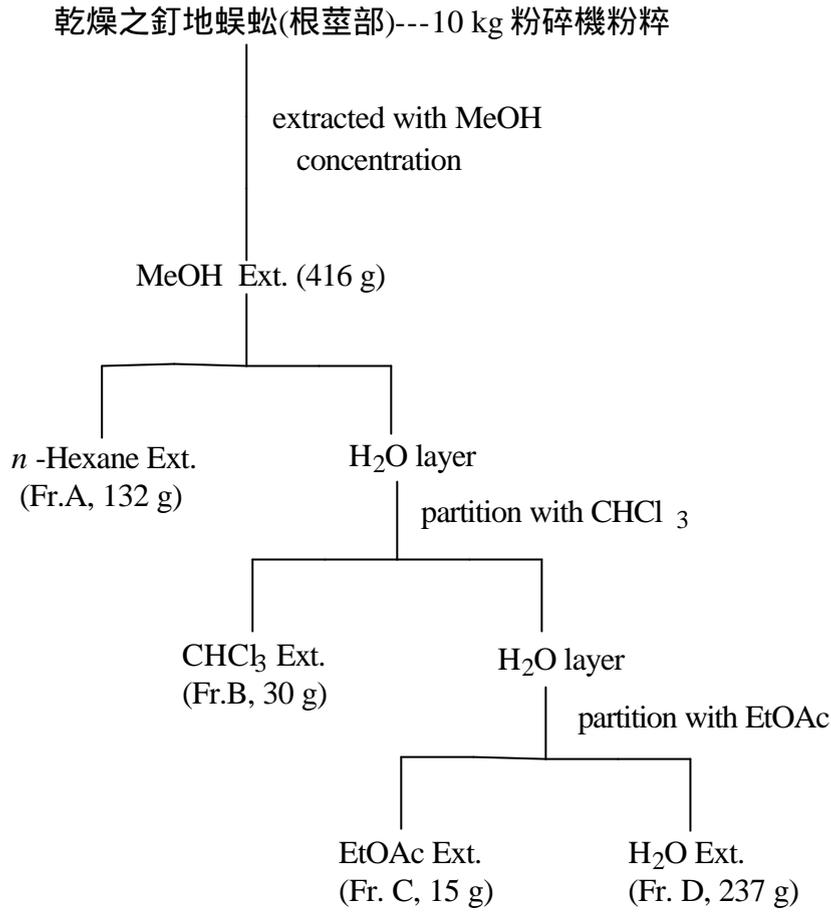
(六)製備薄層色層分析 (preparative TLC)

採用 PLC plates silica gel 60 F<sub>254</sub> concentrating zone (20 ×20 cm, 1 mm, E. Merck)。

## 第二節 成分抽取與分離方法

### 一、粗抽物之製備

取購自台中市成功路阿賢青草行之釘地蜈蚣乾燥根莖部約 10 公斤，經由文獻<sup>(1~3)</sup>記載特徵逐一比較查證並經由本校中醫系張賢哲教授、中國藥學研究所邱年永老師鑑定基源，確定為七指蕨科 (Helminthostachyaceae) 植物釘地蜈蚣 [*Helminthostachys zeylanica* (L) Hook.] 後，始進行研究。將購得植物用甲醇浸漬抽取 15 次。合併抽取液，經減壓濃縮得甲醇粗抽取物 416 公克，將抽取物懸浮於水中，再以正己烷抽取數次至正己烷抽取液近無色，合併抽取液，經減壓濃縮後得到正己烷抽取物約 132 克 (Fr. A)。剩餘水層再以氯仿抽取數次至氯仿抽取液近無色，合併抽取液，經減壓濃縮後得氯仿抽取物約 30 公克 (Fr. B)。剩餘水層再以乙酸乙酯抽取數次至乙酸乙酯抽取液近無色，合併抽取液，經減壓濃縮後得乙酸乙酯抽取物約 15 公克 (Fr. C)。最後剩餘的水層經減壓濃縮及冷凍乾燥後得水層抽取物約 237 公克 (Fr. D)。將此五個粗抽物層送往台中榮總醫院醫研部進行抗發炎試驗及本校藥物化學研究所進行抗細胞增殖試驗。上述四種劃分 (Fr. A~Fr. D) 再以矽膠管柱層析、薄層層析及再結晶法繼續進行分離。抽取及劃分流程如 Scheme 1。



Scheme 1 釘地蜈蚣之成分抽取與分離

## 二、 成分的單離

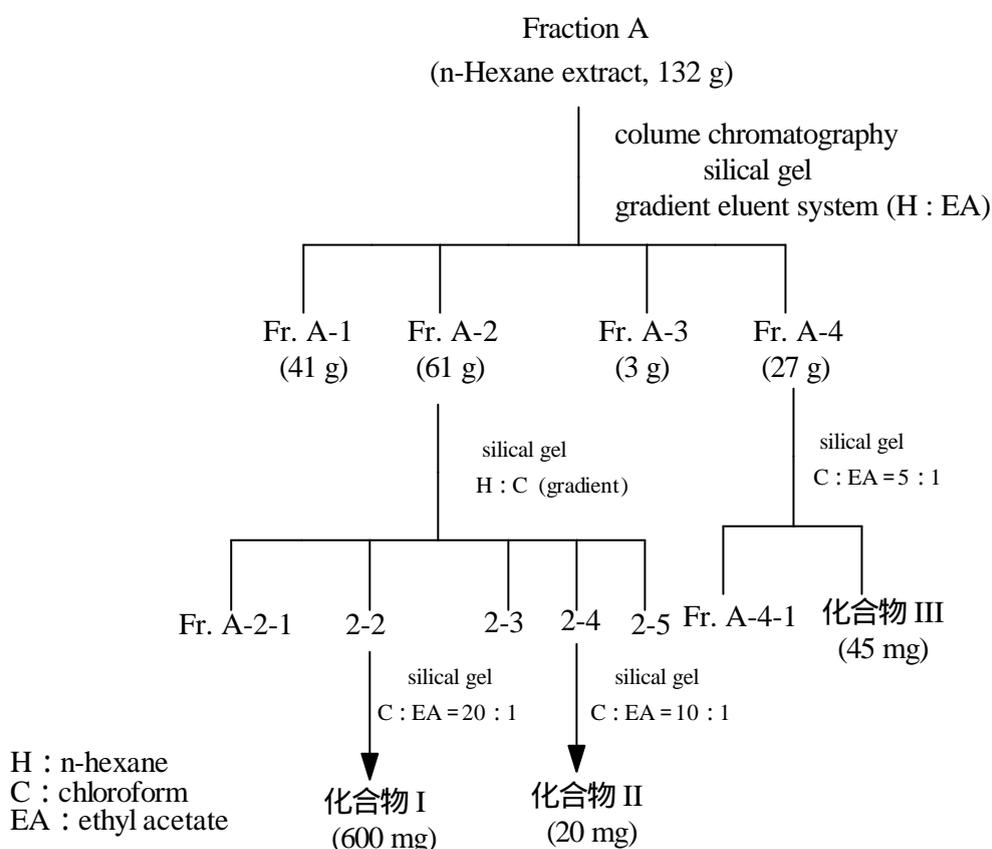
### (一) 正己烷抽出物之成分單離

取正己烷抽出物 132 g，經矽膠管柱色層分析法(70-230 mesh)，以正己烷、乙酸乙酯為梯度沖提，依極性大小不同將收集液分成 Fr. A-1~Fr. A-4。

取 Fr. A-2 經矽膠管柱色層分析法(70-230 mesh)，以正己烷、氯仿為梯度沖提，依極性大小不同將收集液分成 Fr. A-2-1~Fr. A-2-5。

Fr. A-2-2 經矽膠管柱色層分析法(230-400 mesh), 以氯仿、乙酸乙酯(20 : 1)為沖提液, 分離得到化合物 I (600 mg)。Fr. A-2-4 經矽膠管柱色層分析法(70-230 mesh), 以氯仿、乙酸乙酯(10 : 1)為沖提液, 分離得到化合物 II (20 mg)。

取 Fr. A-4 經矽膠管柱色層析法(70-230 mesh), 以氯仿、乙酸乙酯(5 : 1)為沖提液, 分離得到 Fr. A-4-1 及 Fr. A-4-2。將 Fr. A-4-2 的白色沉澱物, 以氯仿和甲醇做再結晶後得白色片狀結晶為化合物 III (45 mg)。其他分劃則與以保留, 流程圖如 Scheme 2 所示。



Scheme 2 正己烷抽取物之分劃流程圖

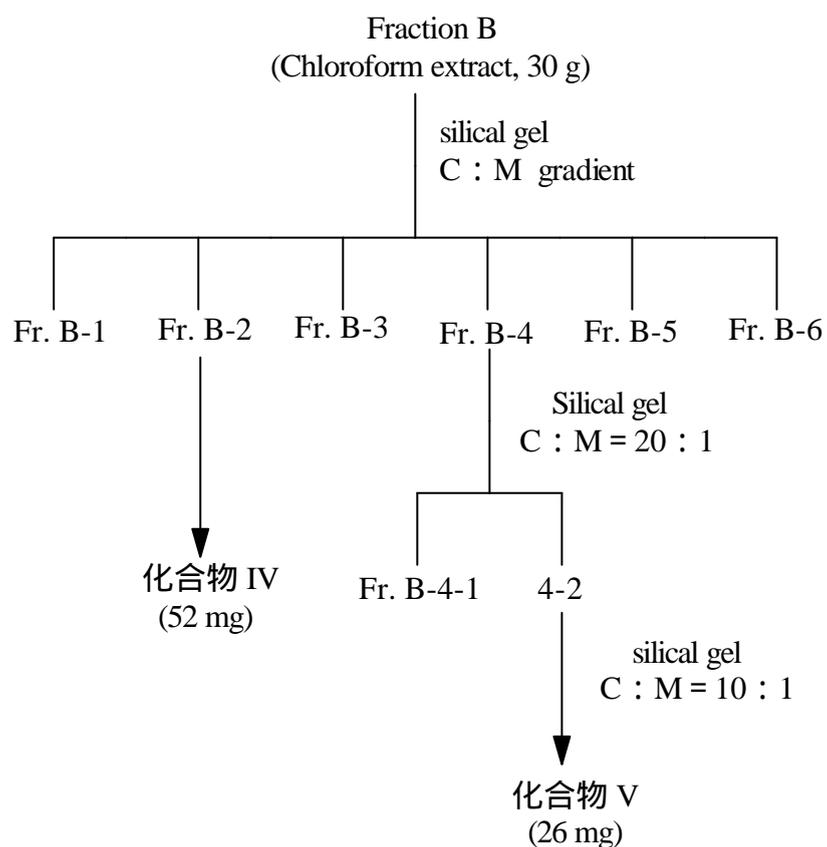
## (二) 氯仿抽出物之成分單離

取氯仿抽出物 30 g, 經矽膠管柱色層分析法(70-230 mesh), 以氯仿、甲醇為梯度沖提液, 依極性大小不同將收集液分成 Fr. B-1~Fr.

B-6。

Fr. B-2 有黃色沉澱物，過濾後以氯仿做再結晶純化得化合物 IV (52 mg)。

Fr. B-4 經矽膠管柱色層分析法(70-230 mesh)，以氯仿、甲醇(20 : 1)為沖提液，分離得到 Fr. B-4-1 及 Fr. B-4-2 兩部份。將 Fr. B-4-2 經矽膠管柱色層分析法(230-400 mesh)，以氯仿、甲醇(10 : 1)為沖提液，每 25 cc 收集一次，總共收集 30 瓶，其中第 5 瓶到第 20 瓶合併，經減壓濃縮後得到黃色固體，以丙酮和水做再結晶得到黃色粉末為化合物 V (26 mg)。其他分劃則予以保留，流程圖如 Scheme 3 所示。



C : chloroform

M : methanol

Scheme 3 氯仿抽取物之分劃流程圖

### 第三節 藥理實驗方法

#### 一、抗發炎及抗過敏實驗：

##### 1.肥大細胞的去顆粒作用實驗<sup>(18)</sup>

大鼠經頸部放血後，將含肝素之 Tyrode's 溶液注入鼠腹腔內，按摩並取出腹腔溶液，經 38% 牛血清蛋白溶液離心，沉澱細胞經清洗後，懸浮成每毫升  $1\sim 1.5 \times 10^6$  細胞。

將此肥大細胞懸浮液與 compound 48/80 作用，離心後將上清液取出，測其中所含的組織胺。利用 *o*-phthalaldehyde 聚合後以螢光分光光度來測量。另一方面利用 phenolphthalein- $\beta$ -D-glucuronide 作為受質，經由分光光度計測量  $\beta$ -glucuronidase 之活性。

##### 2.嗜中性白血球去顆粒作用試驗<sup>(19)</sup>

大鼠麻醉後，由腹腔動脈抽血，經 dextran 混合靜置，Ficoll-Hypaque 離心，低張溶液使紅血球溶血，將細胞清洗並懸浮成每毫升  $1 \times 10^7$  細胞。將此細胞懸浮液與 FLMP 作用後，離心取上清液，並測量其中所含之  $\beta$ -glucuronidase 活性，利用分光光度計 550 nm 下測之。另一方面利用 *Micrococcus lysodeikticus* 細胞為受質，在分光光度計 450 nm 下測 lysozyme 之活性。

## 二、抗細胞增殖實驗：

### 1. 癌細胞的培養<sup>(7-8)</sup>

本實驗使用 HL-60 或 U937 血癌細胞，這些癌細胞平常均培養於含有 10 ~ 20 % 胎牛血清的 RPMI 1640 培養基，並加入 kanamycin (100  $\mu$ g/ml)，penicillin (50  $\mu$ g/ml)，及 streptomycin (50  $\mu$ g/ml) 以防細菌污染。培養於含 5 % 二氧化碳的細胞培養箱，當培養前及實驗時，會取出少量癌細胞，再加色素錐藍 (trypan blue)，並於顯微鏡下觀察，確定細胞之死亡或存活，計算癌細胞總數。取定數的 HL-60 或 U937 細胞，要先以 phosphate buffered saline (PBS) 清洗 2 ~ 3 次，才可完全取出，以做進一步的實驗。

### 2. MTT proliferation assay<sup>(9-10)</sup>

將 HL-60 cells 或 U937 ( $2 \times 10^4$ ) 培養於 24-wells 培養皿使最後體積為 1 ml/well；每 well 中加入各種檢體於溫度 37 °C、溼度 95 %、5% CO<sub>2</sub> 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  $\mu$ l 細胞液置入 96-well plate 中，加入 10  $\mu$ l MTT solution 於 37 °C 培養箱中放置 4 小時。接著用 DMSO (150  $\mu$ l /well) 溶解細胞中之紫黑色顆粒，最後以 ELISA Reader 於波長 570 nm 的條件下測得 OD<sub>570</sub> 值。

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

## 第四節 化合物之性質與光譜數據

化合物 I stigmasterol 及  $\beta$ -sitosterol 之混合物

白色針狀結晶(acetone) ; m.p. : 154~156 。

Molecular weight : 414、 412。

[  $\alpha$  ]<sub>D</sub> : -144.4 (c0.03, CHCl<sub>3</sub>)。

TLC : R<sub>f</sub> = 0.35 (chloroform)。

**EIMS (70 eV) m/z (%) :**

414 (M<sup>+</sup>) 15.9、 412 (M<sup>+</sup>) 46.8、 300 (22.3)、 270 (30.5)、 254 (38.6)、 212 (25.0)、 172 (19.2)、 162 (24.1)、 158 (51.5)、 107 (63.7)、 81 (97.7)、 68 (89.5)、 54 (100.0)。

**IR**  $\nu_{\max}$  (KBr) cm<sup>-1</sup> :

3457、 3148、 3117、 1659、 1458、 1242、 1049、 964。

**<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :**

0.68 (3H, s)、 0.76~2.28 (m)、 3.52 (1H, m, H-3)、 5.10 (1H, dd, J = 15.2, 8.0 Hz)、 5.14 (1H, dd, J = 15.2, 8.2 Hz)、 5.33 (1H, d, J = 5.0, 8.0 Hz, H-6)。

**<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, , CDCl<sub>3</sub>) :**

11.6、 11.8 (C-18)、 12.0 (C-29)、 18.0、 18.7 (C-21)、 19.2 (C-19)、 19.9、 20.8 (C-26)、 22.8 (C-28)、 24.1 (C-15)、 25.2 (C-28)、 27.9、 28.6 (C-16)、 30.0 (C-25)、 31.2 (C-25)、 31.4 (C-7)、 31.6 (C-8)、 32.2 (C-2)、 35.9 (C-20)、 36.4 (C-10)、 37.0 (C-1)、 39.5 (C-12)、 40.3 (C-20)、 42.1 (C-13)、 42.2 (C-4)、 45.5 (C-24)、 49.9 (C-9)、 51.0 (C-24)、 56.1 (C-14)、 71.6 (C-3)、 121.4 (C-6)、 129.1 (C-23)、 138.1 (C-22)、 140.5 (C-5)。

化合物 II

白色片狀結晶(ethanol) ; m.p. : 61~62 。

Molecular weight : 256

TLC :  $R_f = 0.4$  (*n*-hexane : chloroform = 10 : 1)

**IR**  $_{\max}$  (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  :

2916、2851、1909、1701、1473、1292、891、721。

**$^1\text{H-NMR}$**  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :

0.88 (3H, *t*)、1.26 (24H, *s.br*)、1.62 (2H, *m*)、2.35 (2H, *t*)。

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :

13.8 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_3$ )、22.4~33.7 ( $14 \times \text{CH}_2$ )、179.6 ( $-\underline{\text{C}}\text{OOH}$ )。

### 化合物 III

白色片狀結晶 ; m.p. : 80~82 。

Molecular weight : 368

TLC :  $R_f = 0.35$  (*n*-hexane : chloroform = 10 : 1)

**IR**  $_{\max}$  (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  :

3340、3132、2916、2847、1709、1473、1234、1211。

**$^1\text{H-NMR}$**  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :

0.88 (3H, *t*)、1.26 (40H, *s.br*)、1.64 (2H, *m*)、2.35 (2H, *t*)。

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :

13.8 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_3$ )、22.4~33.5 ( $20 \times \text{CH}_2$ )、178.2 ( $-\underline{\text{C}}\text{OOH}$ )。

### 化合物 IV

黃色粉末(chloroform) ; m.p. : 285~287 。

Molecular weight : 436

TLC :  $R_f = 0.45$  (chloroform : methanol = 10 : 1)

**EIMS (70 eV) m/z (%) :**

436 [ $M^+$ ] (7.6), 369 (3.8), 313 (100), 283 (5.2), 179 (11.6), 134 (5.6), 109 (3.8)。

**IR**  $\text{max (KBr) cm}^{-1}$  :

3442、3110、2932、1651、1605、1559、1443、1335、1220、1165、1119、960。

**UV  $\lambda_{\text{max}}$  :** 275、345 nm in MeOH ;

269、401 nm in MeOH + NaOH ;

283、412 nm in MeOH +  $\text{AlCl}_3$  ;

291、362 nm in MeOH +  $\text{AlCl}_3$  + HCl ;

272、397 nm in MeOH + NaOAc ;

263、369 nm in MeOH + NaOAc +  $\text{H}_3\text{BO}_3$ 。

**$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) :**

0.88 (3H, *s*, H-8"), 0.99 (3H, *s*, H-9"), 1.20 (1H, *d.br*, H-6"), 1.42 (1H, *m*, H-5") $\lambda$  1.52 (1H, *m*, H-5") $\lambda$  1.57 (1H, *m*, H-6") $\lambda$  1.92 (1H, *d*,  $J=9.0$  Hz, H-4"), 2.18 (1H, *d*,  $J=8.6$  Hz, H-2"), 2.35 (1H, *d*, H-4"), 2.65 (1H, *d*,  $J=12.0$  Hz, H-1"), 2.81 (1H, *dd*,  $J=12.0, 12.0$  Hz, H-1"), 3.86 (3H, *s*, 7-OMe), 4.12 (1H, *s*, H-10"), 4.40 (1H, *s*, H-10"), 6.68 (1H, *s*, H-3), 6.71 (1H, *s*, H-6), 6.88 (1H, *d*,  $J=8.6$  Hz, H-5"), 7.41 (1H, *s*, H-2") $\lambda$  7.42 (1H, *d*, H-6'), 13.13 (1H, *s*, 5-OH)。

**$^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) :**

21.0 (C-1") $\lambda$  23.1 (C-5") $\lambda$  27.7 (C-9) $\lambda$  28.2 (C-8") $\lambda$  30.9 (C-4") $\lambda$  34.6、34.6 (C-6", C-7") $\lambda$  52.4 (C-2") $\lambda$  56.3 (7-OMe) $\lambda$  90.3 (C-6) $\lambda$  103.2 (C-3), 104.5 (C-10) $\lambda$  109.1 (C-10") $\lambda$  112.2 (C-8) $\lambda$  113.6 (C-2') $\lambda$  116.2 (C-5')、119.2 (C-6')、121.6 (C-1')、146.1 (C-3') $\lambda$  149.4 (C-3') $\lambda$  150.2 (C-4')、155.6 (C-7)、158.0 (C-9)、163.6 (C-5)、164.2 (C-2)、182.1 (C-4)。

**HMQC :** 如表三所示。

**HMBC** : 如表三所示。

**COSY** : 如表三所示。

化合物 V

黄色粉末(acetone) ; m.p. : 254~256 °。

Molecular weight : 422

TLC :  $R_f = 0.35$  (chloroform : methanol = 10 : 1)

**EIMS (70 eV) m/z (%) :**

422 [ $M^+$ ] (1.03)、 351 (0.6)、 337 (0.9)、 299 (20.1)、 270 (2.5)、 165 (12.6)、  
134 (18.5)、 109 (13.2)。

**IR**  $\max$  (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  :

3117、 2932、 1651、 1613、 1450、 1273、 1111、 810。

**UV**  $\lambda_{\max}$  : 275、 346 nm in MeOH ;

278、 404 nm in MeOH + NaOH ;

283、 412 nm in MeOH +  $\text{AlCl}_3$  ;

280、 412 nm in MeOH +  $\text{AlCl}_3$  + HCl ;

272、 394 nm in MeOH + NaOAc ;

263、 370 nm in MeOH + NaOAc +  $\text{H}_3\text{BO}_3$ 。

**$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) :**

0.89 (3H, *s*, H-8"), 0.99 (3H, *s*, H-9"), 1.20 (1H, *d.br*, H-6"), 1.43 (1H, *m*, H-5")、 1.53 (1H, *m*, H-5")、 1.59 (1H, *m*, H-6")、 1.92 (1H, *d*,  $J = 9.0\text{ Hz}$ , H-4")、 2.30 (1H, *m*,  $J = 8.2\text{ Hz}$ , H-2")、 2.36 (1H, *m*, H-4")、 2.64 (1H, *d*,  $J = 12.0\text{ Hz}$ , H-1")、 2.82 (1H, *dd*,  $J = 12.0, 12.0\text{ Hz}$ , H-1")、 4.21 (1H, *s*, H-10")、 4.41 (1H, *s*, H-10")、 6.43 (1H, *s*, H-6)、 6.61 (1H, *s*, H-3)、 6.86 (1H, *d*,  $J = 8.8\text{ Hz}$ , H-5')、 7.35 (1H, *s*, H-2')、 7.39 (1H, *d*, H-6')、 13.20 (1H,

s, 5-OH)。

**$^{13}\text{C}$ -NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ) :**

21.0 (C-1''), 23.1 (C-5''), 27.5 (C-9''), 28.2 (C-8''), 31.2 (C-4''), 34.6 (C-6''), 34.9 (C-7''), 51.9 (C-2''), 93.1 (C-6), 102.9 (C-3), 103.4 (C-10), 109.1 (C-10''), 111.3 (C-8), 113.4 (C-2'), 116.2 (C-5'), 119.1 (C-6'), 121.8 (C-1'), 145.9 (C-3'), 149.5 (C-3''), 149.8 (C-4'), 155.0 (C-7), 159.1 (C-9), 162.5 (C-5), 163.7 (C-2), 1821.9 (C-4)。

**HMQC :** 如表五所示。

**HMBC :** 如表五所示。

**$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY :** 如表五所示。

## 參考文獻

1. 甘偉松編著, 藥用植物學, 112 頁, 國立中國醫藥研究所, 1996。
2. 許鴻源, 台灣地區出產中藥藥材圖鑑, 11 頁, 行政院衛生署中醫藥委員會出版, 1972。
3. 甘偉松編著, 台灣藥用植物誌(卷上), 11 頁, 國立中國醫藥研究所, 1979。
4. T. Murakami, M. Hagiwara, K. Tanaka, and C. M. Chen, *Chem. Pharm. Bull.* **21**, 1849, 1851. (1973)
5. 李立聰, 化學, 1, 4. (1978)
6. 謝增華, “錫蘭七指蕨之成分研究”, 國立清華大學化學所碩士論文。(1990)
7. Makishima, M.; Kanatani. Y.; Yamamoto-Yamaguchi, Y.; Honma, Y. Enhancement of activity of alpha, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> for growth inhibition and differentiation induction of human myelomonocytic leukemia cells by tretinoin tocoferil, an alpha-tocopherol ester of all-*trans* retinoic acid. *Blood*, **87**, 3384-3394. (1996)
8. He, Q.; Jiang, D. A novel aminosteroid is active for proliferation inhibition and differentiation induction of human acute myeloid leukemia HL-60 cells. *Leuk. Res.* **23**, 369-372. (1999)
9. Berridge, M. V.; Tan, A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Aech. Biochem. Biophys.* **303**, 474-482. (1993)

10. Ishiyama, M.; Tominaga, H.; Shiga, M.; Sasamoto, K.; Ohkura, Y.; Ueno, K.; Watanabe, M. Novel cell proliferation and cytotoxicity assays using a tetrazolium salt that produces a soluble formazam dye. *In Vitro Toxicol.* **8**,187-190. (1995)
11. Pradhan, B. P.; Chakraborty, D. K.; Subba, G. C., A triterpenoid lactone form *Leucas aspera*, *Phytochemistry*, **29**, 1693-1695. (1990)
12. Huang, K. F.; Yen, Y. F., Constituents of *Erythrina variegata*; *Chin. Pharm. J.*, **49**, 21-29. (1997)
13. Gan, K. H. Studies on the cytotoxic and antihepatotoxic agents from Formosan Natural Resources. Ph.D. Thesis; Graduate Institute of Pharmaceutical Sciences, Kaohsiung Medical College. (1995)
14. Huang, K. F.; Yen, Y. F., Constituents of Roots of *Elaeagnus glabra*; *Chin. Pharm. J.*, **47**, 493-500. (1995)
15. Sasaki, S. I., Handbook of Proton-NMR Spectra and Data, Academic Press, Vol. **5**, 190. (1985-1986)
16. Sasaki, S. I., Handbook of Proton-NMR Spectra and Data, Academic Press, Vol. **5**, 289. (1985-1986)
17. 姚新生編著，天然藥物化學第二版，206 頁，人民衛生出版社，1994。
18. McClain, D. E.; Donton, M. A., Chock, S. and Catravas, C. N, *Biochim. Acta*, **193** (1989)
19. Smith, R. J.; Iden, S. S., *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **91**, 263-271. (1979)

## 第二部分

# 引藻細胞分化誘導及抗細胞增殖之活性 成分研究

目錄	
英文摘要	
中文摘要	
第一章 緒論	
第一節 研究背景與目的.....	1
第二節 藥理試驗方法簡介.....	2
第二章 引藻成分之抽取與分離.....	3
第三章 引藻成分之化學結構鑑定.....	4
第四章 粗抽物與活性成分探討.....	6
第五章 結論.....	10
第六章 實驗部分	
第一節 儀器與試藥.....	11
第二節 成分抽取與分離方法.....	14
第三節 藥理實驗方法.....	16
第四節 化合物之性質與光譜數據.....	18
參考文獻.....	19

# Summary

## Studies on Differentiation-induced and Antiproliferation Constituents of *Cryptomonadales*

by

Yuan-Chia Huang

Graduate Institute of Pharmaceutical Chemistry  
China Medical College

One compound and one mixture bis-(2-ethylhexyl) phthalate (CPA-1), mixture of hexadecanoic acid and octadecanoic acid (CPA-2) have been isolated from the *n*-hexane, chloroform and ethyl acetate fractions of the ethyl acetic extract of *Cryptomonadales*. These compounds were isolated for the first time from *Cryptomonadales*.

The results of the biological activity investigation showed bis-(2-ethylhexyl) phthalate (CPA-1) exhibited antiproliferation activities on U937 cells ( $IC_{50} = 58.4 \mu\text{g/ml}$ ).

# 引藻細胞分化誘導及抗細胞增殖之活性 成分研究

中國醫藥學院 藥物化學研究所

黃元照

## 中文摘要

由引藻 (Cryptomonadales) 乙酸乙酯粗抽物之正己烷、氯仿、乙酸乙酯分劃中，單離出一個化合物及一個混合物：bis-(2-ethylhexyl) phthalate (CPA-1) 及 hexadecanoic acid 和 octadecanoic acid 之混合物 (CPA-2)。以上化合物均為已知，但都是第一次由引藻中分離得到。

經細胞分化和抗細胞增殖試驗發現 bis-(2-ethylhexyl) phthalate (CPA-1) 具有抑制 U937 血癌細胞增殖之活性 ( $IC_{50} = 58.4 \mu\text{g/ml}$ )。

# 第一章 緒論

## 第一節 研究背景及目的

引藻(Cryptomonadales, 圖 1)是國際綠藻股份有限公司, 王順德博士所開發的一種含有葉綠素、維他命、高蛋白質的特殊品種藻類, 已在台灣、日本及東南亞各國當食品食用多年。引藻在民間有用於癌症、貧血、紅斑性狼瘡、不孕症等疾病。在已研究的結果顯示引藻之水性濃縮液中含有一些活性成分可以對癌細胞的生長誘導分化及抑制生長的作用; 亦顯示引藻對老鼠皮膚腫瘤的生成有顯著的抑制作用。故著手進行引藻之分離純化, 本研究以乙酸乙酯粗抽物、各溶媒抽出物以及從各溶媒層分劃分離所得之成分為檢體, 測試對 HL-60 或 U-937 cells 細胞增殖抑制及促進細胞分化的活性, 也將進一步分離引藻中所含促進細胞分化及增殖抑制之有效成分。



圖 1、引藻

## 第二節 藥理實驗方法簡介

### 一、抗增殖作用：

細胞的增殖作用主要受到細胞週期的(cell cycle)調控，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了。

本研究之藥理實驗模式係利用 3-(4,5-dimethylthiazol-2-diphenyl)-tetrazolium bromide (MTT)來檢測粗抽物及化合物知不同濃度對 HL-60 或 U937 血癌細胞增殖的影響。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，再利用 DMSO 將細胞膜溶解後釋出藍色染料於 570 nm 下測量吸光度，即可以得到粗抽物及化合物對細胞增殖比例的百分比<sup>(1-4)</sup>。

### 二、細胞分化作用：

所謂分化療法便是希望藉由分化誘導劑的幫助來導正不成熟的癌症細胞朝向分化成熟的途徑，進而伴隨正常的機制而死去，如此一來癌症也將得到緩解根除的效果。

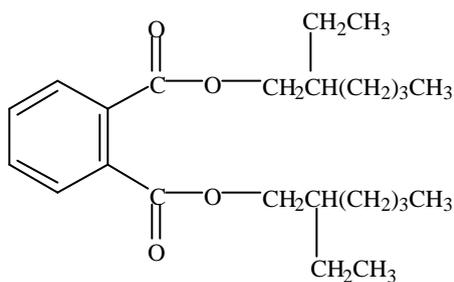
本研究之藥理實驗模式係利用硝基藍四氮唑 (nitroblue tetrazolium : NBT )溶液來做分化活性測試，其原理係利用癌症細胞分化成熟時可恢復吞噬微生物或異物的功能，而細胞內酵素活性也大量增加並釋放出超氧化物( ex: superoxide )去防禦外來物質的侵犯，於是利用其還原性將硝基藍四氮唑( NBT )還原成藍黑色的 formazan 化合物沈著於細胞內。藉由顯微鏡檢 200 個左右的細胞計算其中呈現藍黑色細胞所佔百分比即為誘導分化的比例<sup>(5)</sup>。

## 第二章 引藻成分之抽取與分離

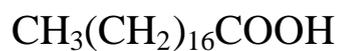
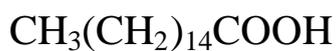
取由國際綠藻公司所提供之引藻精約 1000 ml，以乙酸乙酯反覆抽取 30 次，依照 Scheme 1 流程圖所述之方法分離，目前暫時得到 2 個化合物，經光譜解析及化學方法確認其結構為：

1. bis-(2-ethylhexyl) phthalate
2. hexadecanoic acid 和 octadecanoic acid 之混合物

### Compound I



### Mixture II



### 第三章 引藻成分之化學結構鑑定

#### 【一】化合物 I ( bis-(2-ethylhexyl) phthalate )

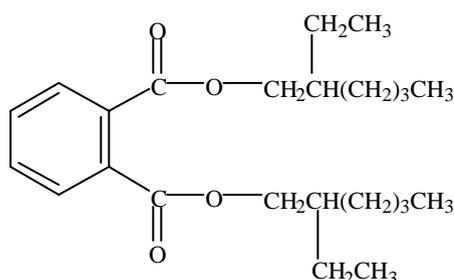
化合物 I 為白色顆粒，熔點 222~225 ，其 TLC 經溶媒 (chloroform) 展開後 Rf 值為 0.65。

EI 質譜(圖 2)顯示準分子離子 峰為 391 [m+1] (6)，其他碎片尚有 279 (31)、167 (87)、149 (100)等吸收；分析其裂解模式，發現化合物 I 有 phthalate 類化合物裂解特徵，如圖 3 所示。故初步推論化合物 I 可能為 phthalate 類化合物。

$^1\text{H-NMR}$  光譜 (圖 4;  $\text{CDCl}_3$ ) 顯示 0.86~0.89 (*m*) 為長鏈末端甲基之吸收訊號，1.25~1.46 (*m, br*) 為長鏈 methylene ( $-\text{CH}_2-$ ) 的吸收訊號，4.14~4.20 (*m*) 為長鏈中次甲基之吸收訊號，7.51~7.58 (2H, *ddd*) 與 7.67~7.74 (2H, *ddd*) 為芳香環的吸收訊號。

$^{13}\text{C-NMR}$  光譜 (圖 5;  $\text{CDCl}_3$ ) 顯示 10.7~13.8 為長鏈末端甲基碳的吸收訊號，22.75~30.12 為長鏈 methylene ( $-\text{CH}_2-$ ) 的吸收訊號，38.4 為長鏈中  $-\text{OCH}_2-$  的吸收訊號，128.5~132.2 為芳香環上不飽和碳的吸收訊號，178.2 為 carboxyl carbon ( $\text{C}=\text{O}$ ) 的吸收訊號。

綜合上述資料與文獻值<sup>(6~7)</sup>比對，確認此化合物之結構為 bis-(2-ethylhexyl) phthalate，分子式為  $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_4$ ，其結構如下所示：



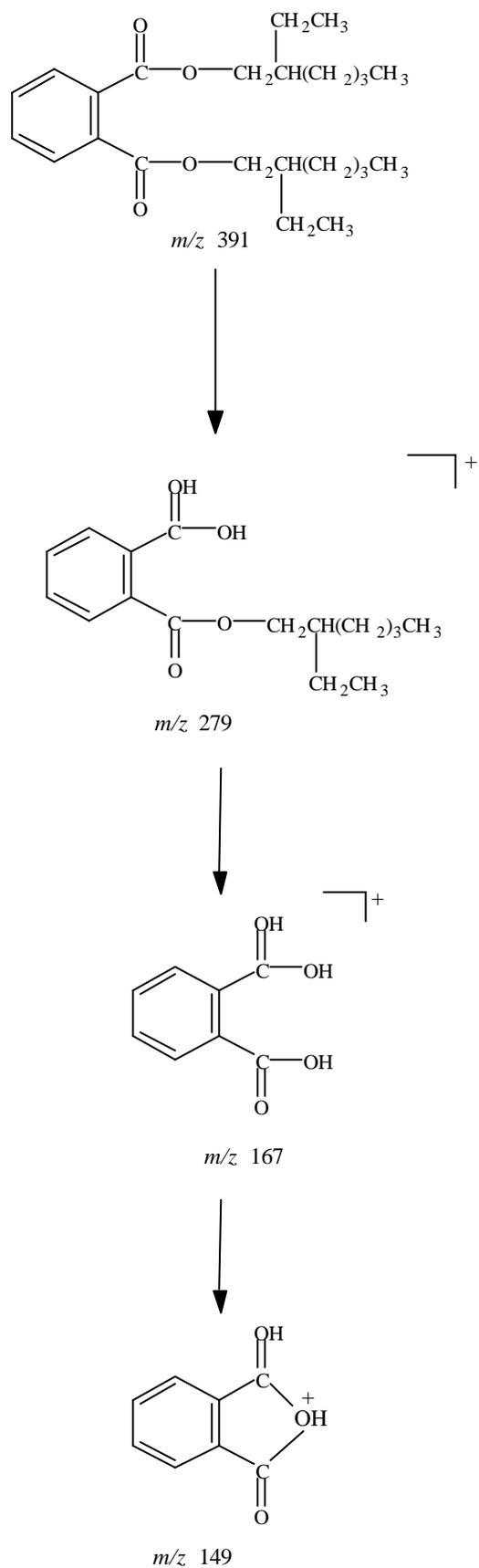


圖 3、化合物 I 之斷裂模式

## 【二】混合物 II (hexadecanoic acid & octadecanoic acid)

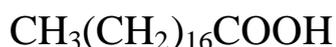
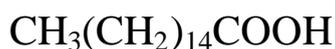
化合物 II 為白色片狀結晶，熔點 80~82 ，其 TLC 經溶媒 (n-hexane : chloroform = 10 : 1) 展開後 Rf 值為 0.35，200 nm 以上不吸光。

EI 質譜(圖 6)顯示 256 (22)為主要之化合物離子吸收峰，284 (3)為次要化合物之分子離子峰，所以分子量為 256 及 284。且其裂解模式符合長鏈脂肪酸之裂解模式，故推測混合物 II 可能主要為 hexadecanoic acid 且尚含有 octadecanoic acid 之混合物。

<sup>1</sup>H-NMR 光譜 (圖 7; CDCl<sub>3</sub>)顯示 0.88 (3H, *t*)為長鏈末端甲基之吸收訊號，1.26 (40H, *s.br*)為長鏈 methylene (-CH<sub>2</sub>-)的吸收訊號，2.35 (2H, *t*)為 H-2 的吸收訊號。

<sup>13</sup>C-NMR 光譜 (圖 8; CDCl<sub>3</sub>)顯示 13.8 為長鏈末端甲基碳的吸收訊號，22.4~33.7 為長鏈 methylene (-CH<sub>2</sub>-)的吸收訊號，179.0 為 carboxyl carbon (C=O)的吸收訊號。

綜合上述資料與文獻值<sup>(8~9)</sup>比對，確認此混合物為 hexadecanoic acid 及 octadecanoic acid 的混合物。



## 第四章 粗抽物與成分活性探討

根據研究正式開始前的預試驗，其結果顯示引藻精對 HL-60 血癌細胞呈現抑制增殖的作用；又引藻精經乙酸乙酯抽取所得的乙酸乙酯層與水層，分別測試其對 HL-60 血癌細胞抑制增殖的作用，結果如表一，顯示乙酸乙酯層之抑制增殖作用提高，而水層則無此現象，表示引藻精對 HL-60 血癌細胞抑制增殖的作用的活性成分可溶於乙酸乙酯。本實驗顯示引藻精確含有抑制 HL-60 血癌細胞增殖的活性成分，且這些成分可溶於乙酸乙酯。

表一、引藻精、乙酸乙酯層與水層對 HL-60 血癌細胞之抑制增殖活性

檢 體	濃度 ( $\mu$ g/ml )	MTT assay
control	0.0	100
引藻精	50	101.2 $\pm$ 8.7
	100	103.1 $\pm$ 8.4
	500	18.7 $\pm$ 4.9***
	1000	15.0 $\pm$ 3.9***
乙酸乙酯層	50	83.8 $\pm$ 11.2*
	100	46.8 $\pm$ 7.4***
水層	50	103.0 $\pm$ 11.6
	100	98.6 $\pm$ 4.6

1. HL-60 cells ( $4 \times 10^4$  /ml) were incubated with different concentration of sample for 48 hrs.

2. Data were presented as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

3. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$

進一步，將引藻精以乙酸乙酯抽取後，合併抽取液，經減壓濃縮完全去除溶媒並隨時濾取析出物得到析出物 (Fr. 1)、乳化層 (Fr. 2)、

乙酸乙酯抽出物 (Fr. 3)及水層 (Fr. 4)四個分劃，分離流程圖如 Scheme 1 所示。也進行 Scheme 1 中各分劃對 U937 血癌細胞增殖抑制或誘導 U937 血癌細胞分化活性的測試，其結果如表二。

表二、引藻精與 1, 2, 3-1, 3-2, 3-3 等分劃對 U937 血癌細胞之活性

Compound	Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	MTT-assay	NBT-assay
Cont.	0.0	100.0 $\pm$ 1.0	8.1 $\pm$ 1.6
引藻原液	25	90.0 $\pm$ 12.5	8.4 $\pm$ 1.7 **
	50	75.7 $\pm$ 5.6 ***	29.8 $\pm$ 3.2 ***
	100	51.5 $\pm$ 3.0 ***	52.9 $\pm$ 6.4 ***
		<b>IC<sub>50</sub> &gt; 100 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	<b>ED<sub>50</sub> = 92.5 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>
EtOAc extracts	25	96.5 $\pm$ 9.3	15.5 $\pm$ 5.5 **
	50	64.2 $\pm$ 7.2 *	26.8 $\pm$ 5.3 **
	100	21.1 $\pm$ 8.5 ***	49.2 $\pm$ 6.8 ***
		<b>IC<sub>50</sub>=77.6 <math>\mu\text{g}</math></b>	<b>ED<sub>50</sub> &gt; 101.8 <math>\mu\text{g}</math></b>
1	25	82.9 $\pm$ 3.9 ***	19.2 $\pm$ 3.7 ***
	50	75.7 $\pm$ 7.7 ***	32.4 $\pm$ 7.4 ***
	100	61.7 $\pm$ 7.9 ***	51.0 $\pm$ 0.7 ***
		<b>IC<sub>50</sub> &gt; 100 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	<b>ED<sub>50</sub> = 96.3 <math>\mu\text{g}</math></b>
2	25	76.6 $\pm$ 8.1 ***	11.1 $\pm$ 2.3 ***
	50	56.2 $\pm$ 5.3 ***	16.0 $\pm$ 1.2 ***
	100	9.6 $\pm$ 2.0 ***	<b>Death</b>
		<b>IC<sub>50</sub> = 55.5 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	
3-1	25	93.5 $\pm$ 1.7 ***	8.7 $\pm$ 1.7 **
	50	86.8 $\pm$ 0.8 ***	12.7 $\pm$ 1.6 ***
	100	36.4 $\pm$ 1.1 ***	22.6 $\pm$ 1.1 ***
		<b>IC<sub>50</sub> = 86.2 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	
3-2	25	105.5 $\pm$ 9.1	11.9 $\pm$ 1.7 ***
	50	97.2 $\pm$ 6.7	17.1 $\pm$ 3.3 ***
	100	64.3 $\pm$ 7.3 ***	34.7 $\pm$ 2.6 ***
		<b>IC<sub>50</sub> &gt; 100 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	
3-3	25	91.9 $\pm$ 6.5 *	23.8 $\pm$ 2.4 ***
	50	86.2 $\pm$ 5.1 **	28.7 $\pm$ 3.9 ***
	100	62.0 $\pm$ 13.1 **	32.2 $\pm$ 7.3 ***
		<b>IC<sub>50</sub> &gt; 100 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	

4	25	94.4 ± 5.8	11.5 ± 1.7 ***
	50	70.4 ± 6.0 ***	17.8 ± 3.2 ***
	70	53.0 ± 11.2 ***	23.8 ± 2.9 ***
<b>IC<sub>50</sub> &gt; 100 μg/ml</b>			

1. U937 cells ( $4 \times 10^4$ ) were incubated with different concentration in 72 hrs. Data was presented as mean ± SD from three separate experiments.

2. \* p < 0.05 compared with control.

\*\* p < 0.01 compared with control.

\*\*\* p < 0.001 compared with control.

結果顯示乙酸乙酯抽出物及所分出各分劃的誘導分化活性與引藻精相比，發現誘導分化之活性成分並未完全轉溶於乙酸乙酯；而乙酸乙酯溶液濃縮過程析出物 (Fr. 1) 的 ED<sub>50</sub> 為 96.3 μg/ml，可發現誘導分化之活性成分是難溶於乙酸乙酯的高極性化學成分。反觀細胞增殖的抑制活性，乙酸乙酯抽出物的活性要比引藻精強，其 IC<sub>50</sub> 為 77.6 μg/ml 表示乙酸乙酯抽取有濃縮效果，活性成分轉溶於乙酸乙酯之故。

從抗細胞增殖 IC<sub>50</sub> 的比較中發現對細胞增殖有抑制活性的成分主要集中在 Fr. 2 及 Fr. 3-1，IC<sub>50</sub> 分別為 55.5 μg/ml 及 86.2 μg/ml，顯示其抗細胞增殖活性成分轉溶於乳化層之乙酸乙酯抽出物及正己烷抽出物。

將 Fr. 3 經矽膠圓柱層析，所分的收集液濃縮後得到 Fr. 3-1-1~ Fr. 3-1-3 三個分劃與 2 個化合物(CPA-1 及 CPA-2)，對 U937 血癌細胞增殖抑制或誘導 U937 血癌細胞分化活性的測試，其結果如表三。

表三、3-1-1、3-1-2、3-1-3、CPA-1、CPA-2 等分劃及化合物對 U-937 血癌細胞之活性

Compound	Conc. (µg/ml)	MTT-assay	NBT-assay
Cont.	0.0	100.2 ± 0.8	5.0 ± 0.9
<b>3-1-1</b>	10	99.7 ± 6.9	19.8 ± 4.8 **
	25	89.2 ± 9.7	32.4 ± 4.8 ***
	50	48.5 ± 5.0 ***	42.0 ± 5.4 ***
		<b>IC<sub>50</sub> = 50.5 µg/ml</b>	<b>ED<sub>50</sub> = 62.9 µg/ml</b>
<b>3-1-2</b>	10	104.8 ± 10.5	3.3 ± 1.0
	25	92.1 ± 12.1	6.2 ± 2.6
	50	92.7 ± 5.5 *	10.6 ± 0.8 ***
		<b>IC<sub>50</sub> &gt; 50 µg/ml</b>	
<b>3-1-3</b>	10	101.1 ± 7.6	15.8 ± 3.2 **
	25	96.8 ± 11.9	23.4 ± 3.2 ***
	50	65.6 ± 9.2 ***	33.8 ± 3.8 ***
		<b>IC<sub>50</sub> = 69.3 µg/ml</b>	<b>ED<sub>50</sub> = 85.8 µg/ml</b>
<b>CPA-1</b>	10	100.9 ± 0.5 *	6.5 ± 1.6 *
	25	80.8 ± 7.7 **	13.0 ± 2.6 ***
	50	59.6 ± 8.3 ***	14.3 ± 2.9 ***
		<b>IC<sub>50</sub> = 58.4 µg/ml</b>	
<b>CPA-2</b>	1	106.0 ± 10.5	2.4 ± 0.6
	5	117.2 ± 7.9	2.9 ± 1.7
	10	107.2 ± 7.5	4.7 ± 1.7

1. U937 cells ( $4 \times 10^4$ ) were incubated with different concentration in 72 hrs. Data was presented as mean ± SD from three separate experiments.

2. \* p < 0.05 compared with control.  
 \*\* p < 0.01 compared with control.  
 \*\*\* p < 0.001 compared with control.

由表三發現誘導分化之活性以 Fr. 3-1-1 及 Fr. 3-1-3 最為明顯，其 ED<sub>50</sub> 分別為 62.9 µg/ml 及 85.8 µg/ml，表示誘導分化之活性成分存於 Fr. 3-1-1 及 Fr. 3-1-3 中。而在抗細胞增殖活性方面則以 Fr. 3-1-1、Fr. 3-1-3 及 CPA-2 之抗細胞增殖活性較明顯，其 IC<sub>50</sub> 分別為 50.5 µg/ml、69.3 µg/ml 及 58.4 µg/ml。

## 第五章 結論

本研究自引藻乙酸乙酯提取物中，單離出 1 個化合物及 1 個混合物：bis-(2-ethylhexyl) phthalate (CPA-1)、hexadecanoic acid 與 octadecanoic acid 之混合物(CPA-2)。

本次藥理實驗發現，引藻細胞分化誘導之活性成分為難溶於乙酸乙酯的高極性之脂溶性化學成分，而抗細胞增殖活性成分則從引藻原液轉溶於乙酸乙酯抽出物及乙酸乙酯乳化層這 2 個 fraction 中，其  $IC_{50}$  分別為 77.6  $\mu\text{g/ml}$  及 55.5  $\mu\text{g/ml}$ 。而在進一步分離的 fraction 中，則以 Fr. 3-1-1 及 Fr. 3-1-3 的細胞分化誘導與抗細胞增殖的活性較為明顯，其  $IC_{50}$  與  $ED_{50}$  分別為 50.5  $\mu\text{g/ml}$  62.9  $\mu\text{g/m}$  與 69.3  $\mu\text{g/ml}$  85.8  $\mu\text{g/ml}$ 。

本研究只有小部份之初步成果，有必要持續進行更進一步的探討。

## 第六章 實驗部分

### 第一節 儀器與試藥

#### 一、儀器

##### (一)熔點測定裝置 (melting point apparatus)

本實驗熔點測定裝置採用 Yanaco MP-500D 熔點測定裝置，測定範圍在 40-500 ，溫度未經校正。

##### (二)紫外光-可見光光譜儀 (UV-visible spectrometer)

紫外光-可見光光譜分析採用 Shimadzu UV-160A UV-Visible recording spectrophotometer。

##### (三)紅外光光譜儀 (infrared spectrometer, IR)

紅外光光譜分析採用 Nicolet Impact 400 FT-IR spectrophotometer，以溴化鉀粉末作為打錠稀釋劑；單位為波數( $\text{cm}^{-1}$ )。

##### (四)質譜儀 (mass spectrometer, MS)

EIMS：

使用 VG PLATFORM II 測定，離子化電壓為 70 eV，單位為  $m/z$ 。

##### (五)核磁共振光譜儀 (nuclear magnetic resonance spectrometer)

採用 DPX-200 及 DPX-400 FT-NMR spectrometer。以  $\delta$  表示化學位移(chemical shift)，單位為 ppm。偶合常數( $J$ )以 Hz 為單位，並以  $s$  表單峰(single)， $d$  表二重峰(doublet)， $t$  表三重峰(triplet)， $q$  表四重峰(quartet)， $m$  表多重峰(multiplet)， $br$  表寬峰。

(六)紫外光燈(UV lamp)

CAMAG UV-Cabinet II , wavelength 254 及 366 nm。

二、試藥

(一)本項研究所用之引藻精是由國際綠藻股份有限公司提供。

(二)成分抽取、薄層層析及管柱層析用溶媒

*n*-Hexane, benzene, chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol, acetone, methanol, 等購自 TEDIA(ACS, 20L)。

(三)核磁共振光譜用溶媒

Chloroform-*d*<sub>1</sub> (deuteration degree 99.5%)、 dimethylsulfoxide-*d*<sub>6</sub> (deuteration degree 99.8%)、 methanol-*d*<sub>4</sub> (deuteration degree 99.5%)、 pyridine-*d*<sub>6</sub> (deuteration degree 99.5%) 等購自默克公司(Merck Taiwan, LTD, 台北)。

(四)管柱色層分析 (column chromatography)填充劑

1. Silica gel : Merck Kieselgel 60 (70-230 mesh, Art. 7734) ; Merck Kieselgel 60 (230-400 mesh, Art. 9385)。
2. Cellulose microcrystalline (Merck , Art. 2331)。

(五)薄層色層分析 (thin-layer chromatography)

1. TLC aluminium sheets (silica gel 60 F<sub>254</sub>, 20 ×20 cm, 0.2 mm layer, Art. 5554, E. Merck)。
2. DC-Alufolien cellulose F (20 ×20 cm, 0.1 mm, Art. 5574, E.

Merck)。

(六) 製備薄層色層分析 (preparative TLC)

採用 PLC plates silica gel 60 F<sub>254</sub> concentrating zone (20 × 20 cm, 1 mm, E. Merck)。

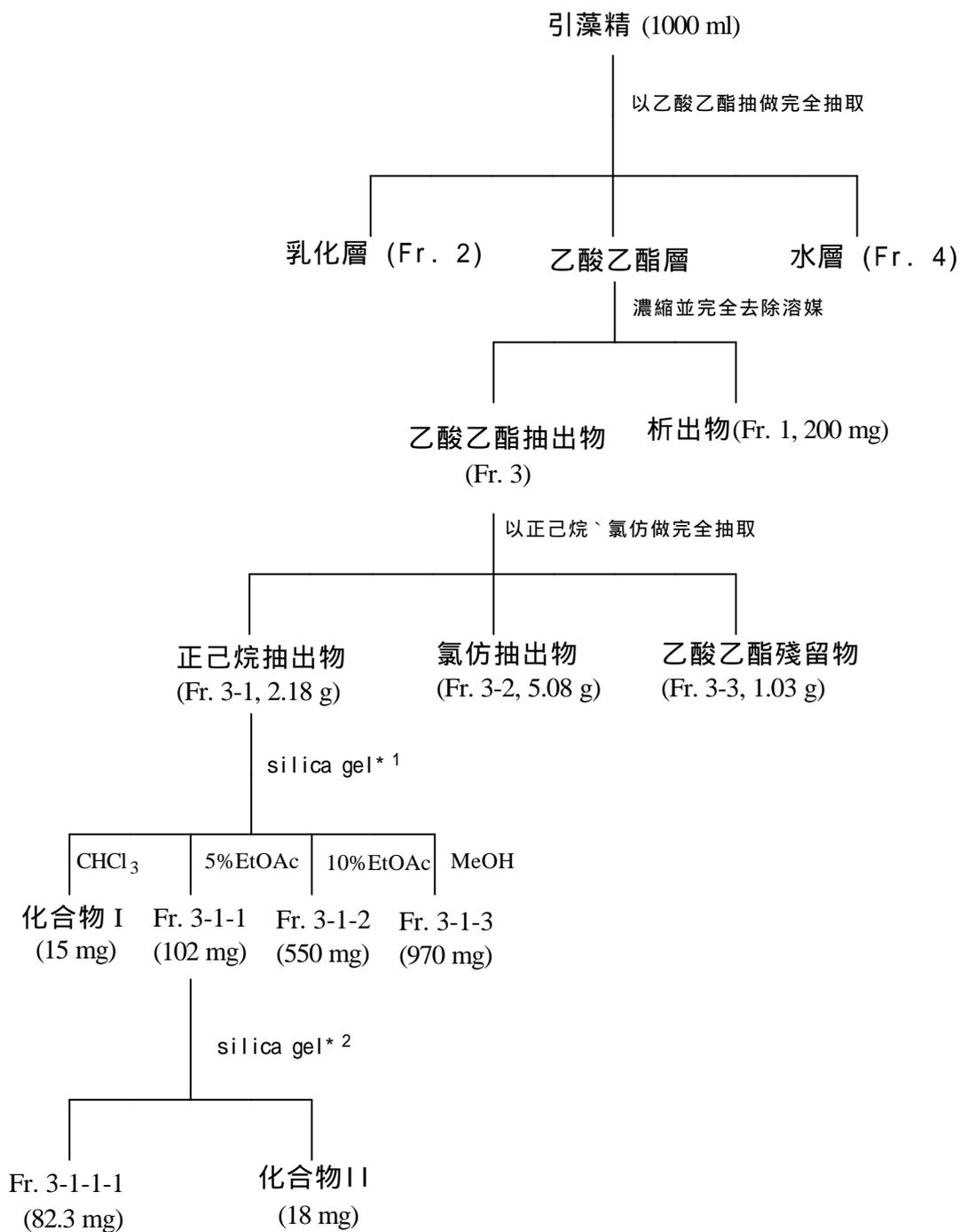
## 第二節 成分抽取與分離方法

取由國際綠藻公司所提供之引藻精約 1000 ml，以乙酸乙酯抽取至抽取物低於 10 mg/ml (約 30 次抽取)，合併抽取液，經減壓濃縮完全去除溶媒並隨時濾取析出物得到析出物 (Fr. 1)、乳化層 (Fr. 2)、乙酸乙酯抽出物 (Fr. 3) 及水層 (Fr. 4) 四個分劃，分離流程如 Scheme 1 所示。

將此四個粗抽物進行細胞分化及抗細胞增殖試驗，結果發現 Fr. 3 較具有活性，故先進行 Fr. 3 之單離，其餘分劃層則暫予以保留。

乙酸乙酯抽出物以正己烷、氯仿抽取至抽取液近無色，合併抽取液，經減壓濃縮得到正己烷抽出物約 2.18 g (Fr. 3-1)、氯仿抽出物約 5.08 g (Fr. 3-2)、乙酸乙酯殘留物約 1.03 g (Fr. 3-3)。其中正己烷抽出物利用矽膠管柱色層分離，以氯仿及乙酸乙酯混合溶媒洗離，收集氯仿、5% (Fr. 3-1-1, 102 mg)、10% (Fr. 3-1-2, 550 mg) 乙酸乙酯之氯仿溶液及甲醇 (Fr. 3-1-3, 970 mg) 溶液四個分劃，而氯仿溶液經減壓濃縮後得到化合物 I (15 mg)。

取 Fr. 3-1-1 經矽膠管柱色層分析，以氯仿及乙酸乙酯混合溶媒洗離，收集 5%、10% (Fr. 3-1-1-1, 82.3 mg) 乙酸乙酯之氯仿溶液二個分劃，其中 5% 乙酸乙酯之氯仿溶液以甲醇做再結晶得到化合物 II (18 mg)。



\*1. 以氯仿及乙酸乙酯混合溶媒洗離，收集氯仿（化合物 I）、5%、10%乙酸乙酯之氯仿溶液及甲醇溶液四個分劃。

\*2. 以氯仿及乙酸乙酯混合溶媒洗離，收集 5%（化合物 II）及 10%乙酸乙酯之氯仿溶液 2 個分劃。

Scheme 1 引藻精提取物分劃流程圖

### 第三節 藥理實驗方法

#### 1. 癌細胞的培養<sup>(1)</sup>

本實驗使用 HL-60 血癌細胞 (human promyelocytic leukemia cells) 或 U-937 血癌細胞，這些癌細胞平常均培養於含有 10 ~ 20 % 胎牛血清的 RPMI 1640 培養基，並加入 kanamycin (100  $\mu$ g/ml)，penicillin (50  $\mu$ g/ml)，及 streptomycin (50  $\mu$ g/ml) 以防細菌污染。培養於於含 5 % 二氧化碳的細胞培養箱，當培養前及實驗時，會取出少量癌細胞，再加色素錐藍 (trypan blue)，並於顯微鏡下觀察，確定細胞之死亡或存活，計算癌細胞總數。取定數的 HL-60 細胞或 U-937 細胞，要先以 Phosphate buffered saline (PBS) 清洗 2 ~ 3 次，才可完全取出，以做進一步的實驗。

#### 2. MTT proliferation assay<sup>(2~4)</sup>

HL-60 cells (  $1.5 \times 10^4$  / ml )或 U-937 cells 培養於 24-wells 培養皿使最後體積為 1ml/ well；每 well 中加入各種檢體於溫度 37  $^{\circ}$ C、溼度 95 %、5 % CO<sub>2</sub> 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  $\mu$ l 細胞液置入 96-well plate 中，加入 10  $\mu$ l MTT solution 於 37  $^{\circ}$ C 培養箱中放置 4 小時。接著用 DMSO (150  $\mu$ l/ well )溶解細胞中之紫黑色顆粒，最後以 ELISA Reader 於波長 570 nm 的條件下測得 OD<sub>570</sub> 值。

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

### 3. NBT Reduction Assay<sup>(5)</sup>

HL-60 cells ( $1.5 \times 10^4$  / ml) 或 U-937 cells 培養在 24-wells 之培養皿中使最後體積為 1ml/ml；每 well 中加入各種檢體於溫度 37 °C、溼度 95 %、5 % CO<sub>2</sub> 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 800  $\mu$ l 細胞液離心( 1500 r.p.m., 5 min.) 去除上清液；再用 200  $\mu$ l HBSS 洗之，接著再次離心( 1500 r.p.m., 5 min) 去除上清液。之後加入 70  $\mu$ l NBT solution，於溫度 37 °C 的培養箱中培養 30 分鐘；取出後離心( 1500 r.p.m., 5min. ) 以去除上清液，再用 100  $\mu$ l HBSS 洗之，最後加入 70 % Ethanol 固定細胞，於顯微鏡下以細胞計數盤數之( 細胞數至少要 200 顆 )。

Differentiation ( % ) =

細胞質呈紫黑色的細胞總數 / 全部的細胞總數  $\times 100$  %

## 第四節 化合物之性質與光譜數據

### 化合物 I

白色顆粒(ethanol) ; m.p. : 222~225 。

Molecular weight : 390

TLC :  $R_f = 0.65$  (chloroform)

**EIMS (70 eV) m/z (%) :**

390 [ $M^+$ ] (6)、 379 (31)、 197 (87)、 149 (100)。

**$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :**

0.86~0.89 (*m*)、 1.25~1.46 (*m*)、 1.58~1.69 (*m*)、 4.20~4.24 (4H, *m*)、  
7.51~7.58 (2H, *ddd*)、 7.67~7.74 (2H, *ddd*)。

**$^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :**

10.7~13.8 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_3$ )、 22.7~30.1 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ )、 38.4 ( $-\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ )、 178.2 ( $-\underline{\text{C}}\text{OOH}$ )。

### 化合物 II

白色顆粒(ethanol) ; m.p. : 80~82 。

Molecular weight : 284、 256

TLC :  $R_f = 0.35$  (n-hexane : chloroform = 10 : 1)

**EIMS (70 eV) m/z (%) :**

284 [ $M^+$ ] (3)、 256 [ $M^+$ ] (22)、 213 (13)、 129 (32)。

**$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :**

0.88 (*m*)、 1.26 (40H, *s.br*)、 2.35 (2H, *t*)。

**$^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :**

13.8 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_3$ )、 22.4~33.7 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ )、 179.0 ( $-\underline{\text{C}}\text{OOH}$ )。

## 参考文献

1. Makishima, M.; Kanatani, Y.; Yamamoto-Yamaguchi, Y.; Honma, Y. Enhancement of activity of alpha, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> for growth inhibition and differentiation induction of human myelomonocytic leukemia cells by tretinoin tocoferil, an alpha-tocopherol ester of all-*trans* retinoic acid. *Blood*, **87**, 3384-3394. (1996)
2. He, Q.; Jiang, D. A novel aminosteroid is active for proliferation inhibition and differentiation induction of human acute myeloid leukemia HL-60 cells. *Leuk. Res.* **23**, 369-372. (1999)
3. Berridge, M. V.; Tan, A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Aech. Biochem. Biophys.* **303**, 474-482. (1993)
4. Ishiyama, M.; Tominaga, H.; Shiga, M.; Sasamoto, K.; Ohkura, Y.; Ueno, K.; Watanabe, M. Novel cell proliferation and cytotoxicity assays using a tetrazolium salt that produces a soluble formazan dye. *In Vitro Toxicol.* **8**, 187-190. (1995)
5. Kawaii, S.; Tomono, Y.; Katase, E.; Ogawa, K.; Yano, M.; Takemura, Y.; Juichi, M.; Ito, C.; Furukawa, H. Acridones as inducers of HL-60 cell differentiation. *Leuk. Res.* **23**, 263-269. (1999)

6. Weast, R. C.; Grassell, J. G. Handbook of Data on Organic Compounds Vol 2; CRC Press : Florida, USA., 785. (1989)
  
7. Hayashi, S.; Asakawa, Y.; Ishida, T. Phthalate Esters of *Cryptotaenia canadensis* DC. var. *japonica* Makino (Umbelliferae). *Tetrahedron Letters*, 5061. (1967)
  
8. Sasaki, S. I., Handbook of Proton-NMR Spectra and Data, Academic Press, Vol. 5, 190. (1985-1986)
  
9. S. I. Sasaki, Handbook of Proton-NMR Spectra and Data, Academic Press, Vol. 5, 269. (1985-1986)