

# 第一章 緒 言

台灣常見藥用植物九節木(*Psychortia rubra* (Lour.) Poir.)，為茜草科(Rubiaceae)九節木屬(*Psychotria*)植物。生長在台灣全島低海拔山區為常綠灌木<sup>[1]</sup>。

九節木屬(*Psychotria*)為茜草科(Rubiaceae)植物，分布於台灣、浙江、福建、廣東、琉球及日本南部等地，而台灣產之九節木屬植物依台灣植物誌(Flora of Taiwan)所載有四種，分別為九節木(*P. rubra*)、琉球九節木(*P. manillensis*)、蘭嶼九節木(*P. cephalophora*)及拎壁龍(*P. serpen*)四種<sup>[2]</sup>。其民間用於治療扭傷、瘀傷<sup>[3]</sup>、祛風除濕、風濕痛、痔瘡、消腫解毒、治感冒發熱<sup>[4]</sup>、皮膚潰瘍<sup>[5]</sup>。

根據美國伊利諾大學 Narpralert 資料庫在 2001 年 1 月份所做統計，九節木目前已分離得到 helenalin<sup>[6]</sup>、psychorubrin、asperuloside<sup>[6]</sup>、 $\beta$ -sitosterol<sup>[3]</sup>等，且其中 psychorubrin 具有抗細胞毒性及抗腫瘤活性<sup>[6]</sup>，而植物其它部位則具有抗血小板凝集活性<sup>[7]</sup>等，值得進一步分離追蹤其活性成分。

經由國家衛生研究院細胞毒殺活性試驗，發現九節木乙酸乙酯層對胃腺癌細胞(SCM-1)及人類肝癌細胞(59T)具有明顯的抑制作用。而在以 DPPH 所測試之自由基清除活性試驗中，九節木之甲醇萃取物、氯仿、乙酸乙酯層及正丁醇層具有顯著的抗氧化活性。

因此本研究以細胞毒性及抗氧化能力作為活性指標，進行九節木化學成分之分離，將九節木的乾燥莖部，以甲醇浸泡抽取後，取甲醇抽出物以不同極性的溶媒萃取，經減壓濃縮至乾後，再將各萃取層分別以管柱層析法分離，並以再結晶法純化而得到八個化合物，並利用紅外光譜、紫外光譜、質譜以及核磁共振等光譜分析法，進行結構

鑑定，其分別為 phytosterol, hexacosanoic acid,  $\beta$ -sitosterol-3-*O*-glucoside, lupeol, oleanolic acid, triacontanoic acid, vanillic acid, EA-2。盼望藉由植物九節木的化學成分研究，進而瞭解九節木在醫療上的功效，及民間用途使用的正確性，以提高台灣本土藥用植物之利用價值。並期望本研究所分離的化合物，能對往後研究本藥用植物者，提供一些具有價值的參考。

## 第二章 總 論

### 第一節 九節木之藥用植物學考察

#### 一、九節木之植物學分類<sup>[8]</sup>

被子植物門 Angiospermae

雙子葉綱 Dicotyledoneae

合瓣花亞綱 Sympetalae

雙花被類 Dialypetalae

茜草目 Rubiales

茜草科 Rubiaceae

九節木屬 *Psychotria*

#### 二、茜草科(Rubiaceae)九節木屬(*Psychotria*)植物之特徵<sup>[1]</sup>

灌木或藤本，無毛。葉對生，羽狀脈；托葉葉柄間。花萼鐘形，通常5裂；花冠杯狀，喉部被長柔毛，裂片通常為5，苞時鑷合狀；兩性花異形花柱或單性雌雄異株，雌雄花各具不育之雄蕊或雌蕊；子房2室，每室一胚珠，柱頭2裂。核果。台灣有4種。

### 三、九節木屬(*Psychotria*)植物之種檢索表<sup>[2]</sup>

1. 藤本。.....4. *P. serpens* 拎壁龍
1. 灌木。
  2. 葉脈表面明顯凹入，果實球形.....3. *P. rubra* 九節木
  2. 葉脈表面近平直；果實橢圓形。
    3. 花頭狀叢生.....1. *P. cephalophora* 蘭嶼九節木
    3. 花聚繖花序排列.....2. *P. manillensis* 琉球九節木

### 四、九節木 *P. rubra* 之植物形態<sup>[1,2,9,10]</sup>

全島低海拔山區。常綠灌木。小枝近方形而光滑，後漸為圓筒形。葉對生，柄長 1-3 cm，葉片紙質，橢圓狀矩圓形或廣披針形，長 9-20 cm，基部漸狹，先端漸尖，全緣，背面脈生簇毛，其餘光滑。托葉闊形，膜質，早落性。聚繖狀圓錐花序，頂生或腋生，叉狀分歧。花淺綠色或白色，雌雄異株，萼長約 2 mm。花冠闊鐘形，長約 1.5 mm，5 裂，裂片披針形，長約 2 mm 反卷，喉密生白色毛。雄蕊約 5 枚，花絲短。子房下位，2 室，各室具 1 胚珠。核果球形，直徑約 6 cm，熟時呈紅色。種子外有縱溝。小堅果 4-5 稜。花期秋天。



- |  |                       |                                    |                       |
|--|-----------------------|------------------------------------|-----------------------|
| 1. Staminate flowering branch;                 | 2. Staminate cyme;    | 3. Longitudinal section of flower; | 4. Stamens;           |
| 5. Cross section of ovary;                     | 6. Style and stigma;  | 7. Pistillate branch;              | 8. Portion of leaf;   |
| 10. Longitudinal section of Pistillate flower; | 9. Pistillate flower; | 11. Stamens;                       | 11. Style and stigma; |
| 13. Cross section of ovary ;                   | 14. Fruiting branch.  |                                    |                       |

Figure 2-1 九節木(*Psychortia rubra* (Lour.) Poir.)植物型態特徵圖<sup>[2]</sup>

## 五、九節木之基原、分布與功用

1.學名：*Psychortia rubra* ( Lour. ) Poir.

2.科名：茜草科 Rubiaceae

3.別名：九節木、青龍吐霧、烏無常、厚肉仔<sup>[9]</sup>、山大刀、大丹葉、暗山公、暗山香、山大顏、吹筒管、刀斧傷、刀傷木、血紅羅傘、火筒樹、大羅傘、散血丹、九節仔頭、九節、牛屎烏<sup>[4]</sup>。

4.分佈：台灣、浙江、福建、廣東、海南、貴州、雲南、香港、琉球及日本南部等地<sup>[4]</sup>。

5.藥性：味苦，性寒、涼<sup>[4]</sup>。

6.效用：清熱解毒，祛風除濕，活血止痛。主治感冒發熱，咽喉腫痛，白喉，痢疾，腸傷寒，瘡瘍腫毒，風濕痺痛，跌打損傷，毒蛇咬傷<sup>[4,10]</sup>。

7.附方<sup>[4]</sup>：

(1)治腸傷寒：九節木根、葉曬乾研粉。成人每次服 2-3 g (兒童 0.5 g)，每日 3 次。

(2)治下肢潰瘍：九節木嫩葉，沸水燙過使葉較軟，如潰瘍面腐肉多，用葉背向潰瘍面貼；如潰瘍面乾淨，用葉面向潰瘍面貼。

(3)治刀傷出血：九節木葉搗爛或研末敷。

(4)治瘡療：九節木葉、土牛膝葉各適量。共搗爛，用酒調，冷敷患處。

(5)治骨折：九節木根、葉研粉，酒醋敷患處。

## 第二節 九節木之植物成分及藥理文獻考察

有關九節木(*Psychortia rubra* (Lour.) Poir.)植物成分及藥理之文獻，據美國伊利諾大學 Narpralert Database Profiles on *Psychortia* 在2001年以前所做的統計，依民俗用法(ethnomedical usage)、抽出物之生物活性(biological activities)及分離之成分(presence of compounds)等三項歸類整理如下：

九節木之民俗用法報導方面，九節木之水煎乾燥葉，在香港地區有作為藥物使用<sup>[3]</sup>，做為治療挫傷及瘀傷。(詳見 Table 2-1)

九節木植物之生物活性研究方面，九節木粗抽出物主要有抗血小板凝集<sup>[6, 11]</sup>、抗基因體突變及細胞毒性等活性。(詳見 Table 2-2)

九節木植物之成分研究方面，目前已分離得到 helenalin、psychorubrin、asperuloside、 $\beta$ -sitosterol<sup>[3]</sup>等。(詳見 Table 2-3)

Table 2-1 Ethnomedical information on *Psychotria rubra*

Species	Used part	Area	Ethnomedical usage	Ref.
<i>P. rubra</i>	Hot water extract dried leaf	Hong Kong	External : sprain	[3]
			External : bruises	[3]

Table 2-2 Biological activities of *Psychotria rubra* extracts

Species	Used part	Area	Biological activities	Ref.
<i>P. rubra</i>	Dried fruit	Japan	Antimutagenic activity: Agar plate ( <i>Bacillus</i> ), conc. used 50 mL/disc (I)	[12]
			Antimutagenic activity: Agar plate ( <i>E. coli</i> ), conc. used 50 mL/disc (I)	[12]
	Dried leaf	Japan	Antimutagenic activity: Agar plate ( <i>Bacillus</i> ), conc. used 50 mL/disc (I)	[12]
			Antimutagenic activity: Agar plate ( <i>E. coli</i> ), conc. used 50 mL/disc (I)	[12]
	Part not specified	Taiwan	Platelet aggregation inhibition :conc. used IC <sub>50</sub> 227.8 µg/mL (WA)	[7]
			Platelet aggregation inhibition :conc. used IC <sub>50</sub> 38.5 µg/mL (A)	[7]
			Platelet aggregation inhibition :conc. used IC <sub>50</sub> 80.9 µg/mL (A)	[7]
			Platelet aggregation inhibition :conc. used IC <sub>50</sub> 83.6 µg/mL (A)	[7]
			Platelet aggregation inhibition :conc. used IC <sub>50</sub> 88.6 µg/mL (A)	[7]
			Platelet aggregation inhibition :conc. used IC <sub>50</sub> 169.8 µg/mL (WA)	[7]
		Platelet aggregation inhibition :conc. used IC <sub>50</sub> 45.0 µg/mL (A)	[7]	



			Platelet aggregation inhibition :conc. used IC <sub>50</sub> 601.7 µg/mL (Equivocal)	[7]
			Platelet aggregation inhibition :conc. used IC <sub>50</sub> 78.8 µg/mL (WA)	[7]
			Platelet aggregation inhibition :conc. used IC <sub>50</sub> 91.3 µg/mL (WA)	[7]
			Platelet aggregation inhibition :conc. used IC <sub>50</sub> 98.2 µg/mL (WA)	[7]
			Platelet aggregation inhibition :conc. used IC <sub>50</sub> 226.7 µg/mL (WA)	[7]
			Platelet aggregation inhibition :conc. used IC <sub>50</sub> 290.2 µg/mL (WA)	[7]
			Platelet aggregation inhibition :conc. used IC <sub>50</sub> 343.0 µg/mL (WA)	[7]
			Platelet aggregation inhibition :conc. used IC <sub>50</sub> 70.6 µg/mL (WA)	[7]
	Dried stem	Taiwan	Cytotoxic activity: cell culture, ED <sub>50</sub> 11.0 µg/mL (A)	[6]

PS :

I : inactive

WA : weak active

A : active

Table 2-3 Presence of compounds in *Psychotria. rubra*

Species	Used part	Area	Presense of compound	Type	Ref.
<i>P. rubra</i>	Stem	Taiwan	helenalin	Sesqui-terpene	[6]
			psychorubrin	Quinoid	[6]
	Leaf	Hong Kong	$\beta$ -sitosterol	Steroid	[3]
		Hong Kong	$\beta$ -sitosterol	Steroid	[3]
		Taiwan	$\beta$ -sitosterol	Steroid	[3]
		Japan	asperuloside	Mono-triterpene	[13]

由上述整理發現，九節木(*Psychotria rubra*)之民俗用法、生物活性及成分研究方面相當有限，具有值得進一步研究及開發的潛力。

## 第三章 實驗部分

### 第一節 實驗試劑與儀器

#### 一、溶媒、試藥與層析材料：

##### 1. 溶媒

- (1) 正己烷、氯仿、乙酸乙酯、甲醇、苯、乙醚、正丁醇等溶媒（以上購自 Merck）。
- (2) 乙醇為台灣省菸酒公賣局之 95% 酒精。
- (3) 測核磁共振 (NMR) 光譜所用之溶媒  $\text{CDCl}_3$  (Deuterated chloroform)、 $\text{MeOH-}d_4$  (Deuterated methanol)、 $\text{Pyridine-}d_5$ 、 $\text{DMSO-}d_6$  等均為光譜級（以上購自 Merck）。

##### 2. 顯色劑

- (1) 10 % Sulfuric acid spray reagent。
- (2) Anisaldehyde / sulfuric acid spray reagent。
- (3) Vanillin sulfuric / acid spray reagent。

##### 3. 薄層層析 (Thin Layer Chromatography)

TLC plate : Kieselgel 60 F<sub>254</sub> silica gel pre-coated aluminum plate ,  
厚度 0.2 mm (Merck)。

#### 4.管柱色層層析(Column Chromatography)

以 Pyrex 或 Merck 公司生產之不同型號管柱。

填充物質：Kieselgel 60 70~230 mesh (Merck), Kieselgel 60 230~400 mesh (Merck), Sephadex LH-20 (Pharmacia), Diaion HP-20。

#### 5.試藥

醋酸、硫酸、硝酸、氫氧化銨、無水硫酸鈉、茴香醛、香莢蘭醛及溴化鉀等均為試藥級（以上購自 Merck 公司）。

## 二、實驗儀器：

- 1.迴轉式濃縮機：Rotavapor R-114 (Büchi)。
- 2.烘箱：Chanel Drying Oven OV602。
- 3.電子乾燥箱：用於保存 TLC 片、NMR 溶媒及紅外線光譜用之 KBr。
- 4.電子天平：Mettler AJ 100 and Metter Toledo PB 602。
- 5.電熱板：Coroning Model PC-320。
- 6.超音波震盪器：
  - (1) Bandelin Sonorex Super PK1028BH
  - (2) Aquasonic<sup>TM</sup> Model 150D。
- 7.玻璃展開槽：

(Merck) 120 mm × 150 mm 及 220 mm × 70 mm。
- 8.紫外線燈：

CAMAG Universal UV lamp，波長 254 nm 及 366 nm。
- 9.微量熔點測定器：

Yanaco MP-500，其溫度計未經校正。

## 10.紅外線分光光譜儀 (Infared Spectrophotometer)

使用 Nicolet Impact 400 FT-IR Spectrophotometer 測定，固體以乾的 KBr 粉末磨勻，加壓成透明薄片測定之，光譜單位為波數( $\text{cm}^{-1}$ ) (中國醫藥大學)。

## 11.質譜儀(MS)

(1) VG Platform II Mass Spectrometer，離子化電壓為 70 eV (中國醫藥大學)

(2) JOEL JMS-SX/SX 102A Tandem Mass Spectrometer (中興大學)。

## 12.核磁共振光譜儀

(1) Bruker DPX-200 FT-NMR (中國醫藥大學)。

(2) Bruker AMX-400 FT-NMR (中國醫藥大學)。

(3) Varian VXR-600 FT-NMR (中興大學)。

Internal standard 為 Tetramethyl Silane (TMS)，化學位(Cheical shift)以  $\delta$  表示，單位 ppm，以 J 表示偶合常數(coupling constant)，單位 Hz 峰線訊號以“s”表示單峰(singlet)，“d”表示雙重峰(doublet)，“t”表示三重峰(triplet)，“q”表示四重峰(quartet)，“m”表示多重峰(multiplet)，“br”表示寬峰(broad)。

## 第二節 實驗藥材來源及其抽提與分離

### 一、植物採集及前處理：

植物九節木 *Psychortia rubra* ( Lour. ) Poir.於民國九十一年八月在台中縣后里毘廬寺採得。經中國醫藥大學技正邱年永老師鑑定，確認為茜草科(Rubiaceae)之九節木 *Psychortia rubra* ( Lour. ) Poir.無誤後，始進行研究，先將莖部與葉部分開處理後，針對九節木莖部之甲醇粗抽物及莖部之各有機溶媒萃取層，進行細胞毒殺活性試驗及 DPPH 清除自由基活性之探討。



Figure 3-1 九節木(*Psychortia rubra* ( Lour. ) Poir.)植物圖

## 二、提取與分離：

陰乾後之九節木約 14.51 公斤。將莖部切片並用甲醇於室溫下浸泡一週後，經過濾取濾液減壓濃縮，殘渣再經甲醇浸泡，如此反覆浸泡抽取 3 次，得到莖部的甲醇粗抽物約 1080.3 公克(Fr. M)，抽出率約為 7.44%。

將莖部的甲醇粗抽物，加入蒸餾水形成懸浮液。再以正己烷分配分離正己烷層合併減壓濃縮至乾後得正己烷層(Fr. H)共 70.0 公克，以氯仿層和水層分配分離出氯仿層(Fr. C)共 19.1 公克，以乙酸乙酯和水層分配分離出乙酸乙酯層(Fr. E)減壓濃縮後為 295.9 公克，以正丁醇和水層分配分離出正丁醇層(Fr. B)減壓濃縮後為 193.7 公克，最後剩餘水層(Fr. W)為 501.6 公克。



利用管柱色層層析法(column chromatography)，以 silica gel (70-230 mesh 及 230-400 mesh)、Sephadex LH-20 或 Diaion HP-20 充填在玻璃管柱內為固定相，經不同溶媒梯度沖提，並利用再結晶法純化化合物，結果分離得到下列化合物：

1. 正己烷層(Fr. H)：

phytosterol (mixture of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol) (H-1)

hexacosanoic acid (H-2)

$\beta$ -sitosterol-3-*O*-glucoside (H-3)

lupeol (H-4)

2. 氯仿層(Fr. C)：

oleanolic acid (C-1)

triacontanoic acid (C-2)

3. 乙酸乙酯層(Fr. E)：

4-hydroxy-3-methoxy benzoic acid (EA-1)

EA-2(鑑定中)

三、實驗抽提流程圖：

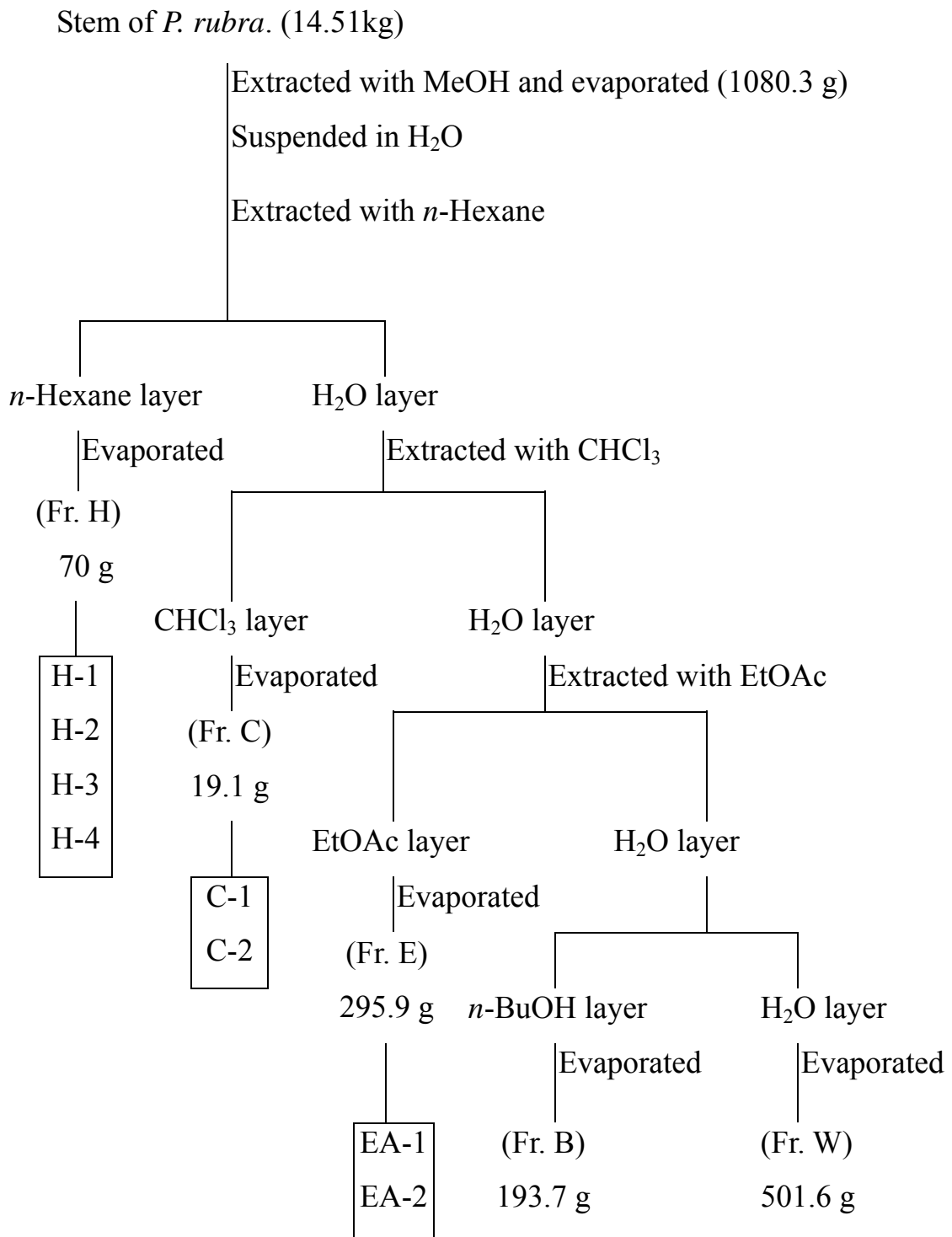


Figure 3-2 九節木(*Psychotria rubra* (Lour.) Poir.) 莖部之抽提流程圖

### 第三節 九節木之藥理活性評估

#### 一、細胞毒殺活性試驗<sup>[14,15]</sup>：

此部分實驗委託國家衛生研究院代為進行細胞毒殺活性測試，利用 MTS 分析法，將人類癌細胞植入 96 孔培養皿中。經過一夜的適應，在每孔中加入置於無胎牛血清、最終濃度為 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  之待測物。三天後，由 MTS 還原試劑決定細胞存活能力。Actinomycin D 10  $\mu\text{M}$  及 0.1 % DMSO 為正對照組及控制組，其結果與 DMSO 相比，換算成百分比。

MTS：

5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethyl-thiazolyl)-3-(4-sulfophenyl) tetrazolium

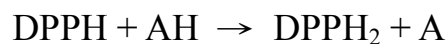
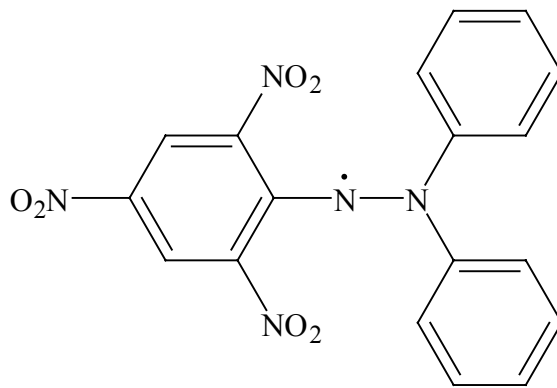
培養人類腫瘤細胞：

SCM-1 (胃腺癌細胞)、DLD1 (人類大腸癌細胞)、59T (人類肝癌細胞)、HONE-1 (鼻咽癌細胞) 在 Dulbecco's modified Eagle's 培養基培養。(5 %  $\text{CO}_2$  濕式培養基，維持在 37°C，外加 10 % 胎牛血清和非必需胺基酸)。

## 二、 DPPH 清除自由基活性實驗：

參考 Shyu YS (2002)<sup>[16]</sup>等之方法，以 DPPH 自由基清除能力之試驗，測試植物萃取物(crude extract)之抗氧化活性。DPPH 為一個安定的自由基，熔點為 137°C，其甲醇溶液為紫蘿蘭色(violet)在 517 nm 下有強吸光，當 DPPH 自由基與抗氧化劑反應時，將會降低吸光值。因而藉此判斷抗氧化劑清除 DPPH 自由基的能力，其吸光值愈低，表示試樣清除 DPPH 自由基的能力愈強。

DPPH: 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl



violet

decolorized (yellow)

DPPH 自由基的甲醇溶液會隨著 pH 值的不同及時間長短而有所變化，DPPH 自由基甲醇溶液在 pH 5.0-6.5 比較穩定而有適當的吸收，在鹼性時則不穩定。此外，DPPH 自由基的甲醇溶液會隨時間的增長而逐漸劣化，故實驗時需新鮮配製<sup>[17]</sup>。

依 Shyu YS (2002) 等之實驗方法及步驟：

1. 先檢測 DPPH (75  $\mu$ M) 甲醇溶液在可見光 517 nm 之吸收值( $A_0$ )。
2. 將九節木甲醇萃取物(Fr. M)、正己烷層(Fr. H)、氯仿層(Fr. C)、乙酸乙酯層(Fr. E)，正丁醇層(Fr. B)、水層(Fr. B)等萃取層，分別配製出 50, 100, 200, 250, 500  $\mu$ g/mL 等五種濃度之樣品(sample)兩組。接著在 10 mL 的試管中加入各樣品 0.3 mL 再加入 0.2 mL 之甲醇。
3. 此時將樣品分成兩組，一組為空白實驗，一組則加入 2.5 mL 的 DPPH (75  $\mu$ M) 甲醇溶液至總體積為 3 mL。將兩組溶液置於室溫反應 90 分鐘，之後分別將各組使用可見光 517 nm ( $A_{517}$ ) 吸收波長偵測並記錄。
4. 將各測得之吸光值代入下列公式換算成自由基清除能力 (Scavenging effect)<sup>[14]</sup>：

$$\text{Scavenging effect (\%)} = \frac{[A_0 - (A - A_b)]}{A_0} \times 100\%$$

$A_0$ :  $A_{517}$  of DPPH without sample

A:  $A_{517}$  of sample and DPPH

$A_b$ :  $A_{517}$  of sample without DPPH

## 第四章 結 果

### 第一節 九節木各成分之物理性質及光譜數據

#### 【一】 H-1 : Mixture of $\beta$ -sitosterol and stigmasterol

1. 白色粉末 (以氯仿再結晶)
2. 熔點 : 138-140°C
3. TLC :  $R_f = 0.45$  (*n*-Hexane :  $\text{CHCl}_3 = 5 : 1$ )
4. 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  spray : 由紅色變為紫色, 再變為墨綠色
5. IR  $\nu_{\text{max}}$ (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  : 3421, 2935, 2850, 1645, 1049。
6. MS ( $m/z$  % ; EI 70 eV) :

414	( $\text{M}^+$ , 30)	271	(11)	255	(17)	213	(16)
159	(23)	145	(29)	105	(37)	95	(40)
81	(44)	69	(46)	55	(100)		

#### 7. $^1\text{H-NMR}$ (in $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) ppm :

- |      |                     |
|------|---------------------|
| 5.36 | (1H, d, H-6)        |
| 5.16 | (1H, m, H-23)       |
| 5.05 | (1H, m, H-22)       |
| 3.51 | (1H, m, H-3)        |
| 0.93 | (3H, s, H-19)       |
| 0.84 | (6H, m, H-26, H-27) |
| 0.68 | (3H, s, H-18)       |

8.  $^{13}\text{C}$ -NMR (in  $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) ppm :

140.7 (C-5)	121.5 (C-6)	71.8 (C-3)	56.7 (C-14)
56.0 (C-17)	50.1 (C-9)	45.8 (C-24)	42.3 (C-4)
40.2 (C-13)	39.5 (C-12)	37.0 (C-1)	36.5 (C-10)
35.9 (C-20)	35.4 (C-7)	31.6 (C-8)	31.4 (C-2)
28.9 (C-25)	28.7 (C-16)	28.0 (C-23)	26.1 (C-22)
25.2 (C-15)	23.0 (C-28)	21.0 (C-11)	19.8 (C-26)
19.3 (C-19)	18.8 (C-27)	18.7 (C-21)	12.2 (C-29)
11.9 (C-18)			

9. DEPT ( $\pi/4$ ,  $2\pi/4$ ,  $3\pi/4$ , in  $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) ppm :

$\text{CH}_3$  : 19.7, 19.3, 19.0, 18.7, 11.9, 11.8

$\text{CH}_2$  : 42.2, 39.7, 37.2, 33.9, 31.6, 29.1, 28.2, 24.2, 23.0, 21.0

$\text{CH}$  : 121.7, 71.7, 56.7, 56.0, 50.0, 45.8, 36.1, 31.8, 28.2

## 【二】 H-2 : Hexacosanoic acid

1. 白色粉末狀
2. 熔點：89-91°C
3. TLC :  $R_f = 0.5$  ( $\text{CHCl}_3$ )
4. 溶解度：溶於氯仿、難溶甲醇及水
5. 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  spray : 灰黑色
6. IR  $\nu_{\text{max}}$ (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  : 2918, 2850, 1712, 1463。
7. MS ( $m/z$  % ; EI 70 eV) :

396	( $\text{M}^+$ , 0.26)	368	(1.4)	340	(0.8)	312	(0.13)
297	(0.45)	241	(0.52)	213	(0.23)	199	(0.26)
185	(1.49)	171	(1.18)	129	(13.91)	101	(3.3)
97	(13.9)	85	(15.9)	83	(27.9)	73	(62.4)
60	(72.6)	57	(100)				

### 7. $^1\text{H-NMR}$ (in $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) ppm :

- 2.35 (2H, t,  $J=7.2$  Hz, H-2)  
1.64 (2H, m, H-3)  
1.26 (*br*,  $(\text{CH}_2)_{4-25}$ )  
0.88 (3H, t,  $J=7.6$  Hz, H-26)



8.  $^{13}\text{C}$ -NMR (in  $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) ppm :

178.7 (C-1)	33.8 (C-2)	31.9 (C-24)	29.9 (C-25)
14.11 (C-26)			

### 【三】 H-3 : $\beta$ -sitosterol-3-O-glucoside

1. 白色粉末
2. 熔點：300°C 以上
3. TLC :  $R_f = 0.45$  ( $\text{CHCl}_3$  : MeOH = 7 : 1)
4. 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  spray : 藍紫色
5. IR  $\nu_{\text{max}}$ (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  : 3410, 1647, 1446, 1078, 1024 °
6. FAB-MS (m/z) :

599	( $\text{M}^+ + \text{Na}$ )	391	(33)	307	(1.2)	279	(5.5)
154.2	(32.7)	149.2	(100)	136	(30)	91	(23.9)
57	(80.5)						

7.  $^1\text{H-NMR}$  (in Pyridine- $d_5$ , 200 MHz) ppm :

5.32	(1H, H-6)
4.24-4.26	(m)
0.63~2.31	(m)

8.  $^{13}\text{C}$ -NMR (in Pyridine- $d_5$ , 50 MHz) ppm :

140.4 (C-5)	121.4 (C-6)	102.1 (C-1')	78.1 (C-3)
77.9 (C-3')	77.6 (C-5')	74.8 (C-4')	71.2 (C-2')
62.4 (C-6')	56.5 (C-14)	55.8 (C-17)	49.9 (C-13)
45.6 (C-12)	42.0 (C-10)	40.2 (C-7)	39.5 (C-8)
31.7 (C-23)	31.4 (C-22)	28.0 (C-28)	25.9 (C-11)
24.0 (C-26)	22.9 (C-19)	20.8 (C-27)	19.5 (C-21)
18.9 (C-18)	18.5 (C-29)		

9. DEPT ( $\pi/4$ ,  $2\pi/4$ ,  $3\pi/4$ , in Pyridine- $d_5$ , 50 MHz) ppm :

$\text{CH}_3$  : 23.1, 21.0, 19.7

$\text{CH}_2$  : 45.7, 37.2, 36.1, 31.9, 29.9, 28.2, 26.1, 24.2

$\text{CH}$  : 121.5, 102.3, 78.2, 77.8, 75.0, 62.5, 56.5, 55.9, 50.0, 39.6, 29.1

#### 【四】 H-4 : Lupeol

1. 白色針晶 (以氯仿-甲醇再結晶)
2. 熔點 : 227-229°C
3. TLC :  $R_f = 0.6$  ( $\text{CHCl}_3$ )
4. 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  spray : 由紅色變為紫色，再變為墨綠色
5. IR  $\nu_{\text{max}}$ (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  : 3334, 2945, 1494, 1379。
6. MS (m/z % ; EI 70 eV) :

426	( $\text{M}^+$ , 89.2)	411	(23.3)	315	(20.5)	234	(21.4)
219	(23.1)	218	(61.4)	207	(91.6)	189	(100)
125	(5.34)	121	(84.9)	109	(89.7)	55	(61.7)

7.  $^1\text{H-NMR}$  (in  $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) ppm :

4.67	(1H, d, $J=2.4\text{Hz}$ , H-29)
4.56	(1H, d, $J=2.4\text{Hz}$ , H-29)
3.17	(1H, dd, $J=11.0, 11.0, 5.5\text{ Hz}$ , H-3)
2.36	(1H, m, H-19)

8.  $^{13}\text{C}$ -NMR (in  $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) ppm :

150.7 (C-20)	109.0 (C-29)	78.7 (C-3)	55.0 (C-6)
50.5 (C-9)	47.7 (C-19)	48.0 (C-18)	42.7 (C-17)
42.5 (C-14)	39.8 (C-8)	39.1 (C-22)	38.6 (C-4)
34.0 (C-7)	29.6 (C-21)	29.4 (C-23)	27.7 (C-2)
55.0 (C-15)	25.5 (C-12)	22.4 (C-11)	19.5 (C-30)
18.0 (C-6)	17.7 (C-28)	15.8 (C-25)	15.7 (C-26)
15.1 (C-24)	14.3 (C-27)		

9. DEPT ( $\pi/4$ ,  $2\pi/4$ ,  $3\pi/4$ , in  $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) ppm :

$\text{CH}_3$  : 27.9, 19.2, 17.9, 16.0, 15.9, 15.3, 14.5

$\text{CH}_2$  : 109.2, 39.9, 38.6, 35.5, 34.2, 29.8, 27.9, 25.0, 20.9, 18.2

$\text{CH}$  : 78.9, 55.2, 50.3, 48.2, 47.9, 38.6

## 【五】 C-1 : Oleanolic acid

1. 白色針晶 ( 氯仿-甲醇再結晶 )
2. 熔點 : 267-269°C
3. TLC :  $R_f = 0.45$  ( $\text{CHCl}_3 : \text{EtOAc} = 4 : 1$ )
4. 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  spray : 由紅色變為紫色 , 再變為墨綠色
5. IR  $\nu_{\text{max}}$ (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  : 3475, 2939, 1689, 1463 .
6. MS (m/z % ; EI 70 eV) :

456	(M <sup>+</sup> , 0.8)	410	(0.81)	248	(100)	219	(4.7)
207	(17.1)	203	(63.2)	189	(12.7)	175	(12.0)
133	(28.7)	119	(24.6)	105	(24.2)	95	(22.2)
69	(46.9)	55	(37.7)				

7. <sup>1</sup>H-NMR (in  $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) ppm :

3.21	(1H, t, H-3)
2.80	(1H, dd, H-18)
0.76, 0.91, 0.93, 0.98, 1.05, 1.14, 1.17	(3H, each, s, 7×CH <sub>3</sub> )

8.  $^{13}\text{C}$ -NMR (in  $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) ppm :

182.7 (C-28)	143.3 (C-13)	122.3 (C-12)	78.7 (C-3)
54.9 (C-5)	47.3 (C-9)	46.2 (C-17)	45.6 (C-18)
41.3 (C-14)	40.7 (C-19)	39.0 (C-8)	38.5 (C-4)
38.1 (C-1)	38.4 (C-10)	36.8 (C-21)	33.5 (C-29)
32.8 (C-7)	32.2 (C-22)	30.4 (C-20)	27.8 (C-23)
27.4 (C-15)	26.9 (C-2)	25.6 (C-27)	25.6 (C-30)
23.3 (C-16)	22.7 (C-11)	18.0 (C-6)	16.8 (C-26)
15.2 (C-24)	15.0 (C-25)		

9. DEPT ( $\pi/4$ ,  $2\pi/4$ ,  $3\pi/4$ , in  $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) ppm :

$\text{CH}_3$  : 32.5, 25.8, 23.5, 17.0, 15.4

$\text{CH}_2$  : 38.3, 33.7, 33.0, 28.0, 27.6, 22.8, 18.2

$\text{CH}$  : 122.5, 78.9, 55.1, 47.6, 40.9

## 【六】 C-2 : Triacontanoic acid

1. 白色粉末 (氣仿)
2. 熔點 : 84-86°C
3. TLC :  $R_f = 0.45$  ( $\text{CHCl}_3$ )
4. 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  spray : 灰黑色
5. IR  $\nu_{\text{max}}$ (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  : 3396, 2933, 2850, 1645, 1464 °
6. MS ( $m/z$  % ; EI 70 eV) :

452	( $\text{M}^+$ , 1.27)	424	(19.5)	396	(22)	382	(6.2)
368	(12.5)	325	(4)	311	(2.4)	297	(3.9)
283	(3.2)	269	(3.2)	255	(2.5)	241	(5.1)
227	(4.3)	213	(3.0)	199	(3.2)	185	(13.6)
129	(47.0)	85	(38.2)	73	(85.8)	60	(80.4)

7.  $^1\text{H-NMR}$  (in  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) ppm :

2.35	(2H, t, $J=7.6$ Hz, H-2)
1.64	(2H, m, H-3)
1.26	(40H, s, <i>br</i> )
0.89	(3H, t, $J = 7.2$ Hz, H-24)



8.  $^{13}\text{C}$ -NMR (in  $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) ppm :

179.4 (C-1)      33.2 (C-2)      31.9 (C-22)      29.4 (C-4~21)

24.5 (C-3)      22.7 (C-23)      14.1 (C-24)

【七】EA-1 : Vanillic acid (4-hydroxy-3-methoxy benzoic acid)

1. 白色針晶 (以丙酮再結晶)

2. 熔點 : 172-174°C

3. TLC :  $R_f = 0.45$  ( $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 6 : 1$ )

4. IR  $\nu_{\text{max}}$ (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  : 3485, 2924, 1684, 1597, 1435, 1280 °

6. MS ( $m/z$  % ; EI 70 eV) :

168 (M<sup>+</sup>, 100) 153 (56) 125 (10) 97 (12)

51 (3.6)

7. <sup>1</sup>H-NMR (in DMSO, 200 MHz) ppm :

7.59 (1H, dd, H-6)

7.56 (1H, d, H-2)

6.90 (1H, d,  $J=8.4$  Hz, H-5)

3.90 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>)

8.  $^{13}\text{C}$ -NMR (in DMSO, 50 MHz) ppm :

167.4 (s, C=O)	151.2 (C-4)	147.4 (C-3)	123.6 (C-6)
121.9 (C-1)	115.2 (C-5)	113.0 (C-2)	55.8 (OMe-3)

9. DEPT ( $\pi/4$ ,  $2\pi/4$ ,  $3\pi/4$ , in DMSO, 50 MHz) ppm :

$\text{CH}_3$  : 55.9

$\text{CH}$  : 123.8, 115.4, 113.1

## 【八】 EA-2

1. 黃棕色針晶 (以甲醇再結晶)
2. 熔點：154-156°C
3. TLC：R<sub>f</sub> = 0.45 (CHCl<sub>3</sub>：MeOH = 9：1)
4. 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> spray：黃色
5. IR ν<sub>max</sub>(KBr) cm<sup>-1</sup>：3409, 2929, 2852, 1681, 1646, 1540, 1463。
6. MS (m/z % ; EI 70 eV)：

254	(M <sup>+</sup> , 16)	238	(57)	225	(14)	209	(100)
181	(26)	164	(10)	152	(42)	105	(15)
77	(24)	64	(3)	51	(4)		

7. <sup>1</sup>H-NMR (in CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) ppm：

8.40	(5H, m)
7.87	(3H, m)
4.91	(1H, s)
3.49	(2H, s)

8.  $^{13}\text{C}$ -NMR (in  $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) ppm :

190.6	182.9	147.4	134.9
133.9	133.2	132.8	132.4
131.7	129.2	127.4	124.6
64.1			

9. DEPT ( $\pi/4$ ,  $2\pi/4$ ,  $3\pi/4$ , in  $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) ppm :

$\text{CH}_2$  : 64.3

$\text{CH}$  : 134.6, 134.1, 131.9, 127.6, 127.4, 127.1, 124.8

## 第二節 九節木之藥理活性試驗結果

### 一、細胞毒殺活性試驗：

將九節木甲醇萃取物以不同溶媒分別萃取後，分成總粗抽層、正己烷層、乙酸乙酯層、甲醇層等，且分成三種濃度(12.5  $\mu\text{g/mL}$ 、25  $\mu\text{g/mL}$ 、50  $\mu\text{g/mL}$ )。以 MTS 分析法試驗九節木各萃取層之細胞毒殺活性，結果發現九節木乙酸乙酯層對胃腺癌細胞(SCM-1)及肝癌細胞(59T)具有明顯的抑制作用。此部分結果委託國家衛生研究院代為測試。(詳見 Table 4-1)

Table 4-1 九節木各層對細胞毒殺活性測試結果

Plant ( $\mu\text{g/mL}$ ) Cell Line	九節木 ( <i>P. rubra</i> )											
	Total			<i>n</i> -Hexane			EtOAc			MeOH		
	12.5	25	50	12.5	25	50	12.5	25	50	12.5	25	50
HONE-1	>100%	>100%	94%	>100%	99%	>100%	>100%	>100%	97%	>100%	>100%	>100%
SCM-1	97%	80%	61%	>100%	>100%	>100%	98%	70%	<b>44%</b>	>100%	84%	64%
59T	95%	79%	60%	>100%	>100%	>100%	98%	89%	<b>44%</b>	>100%	86%	66%
DLD1	>100%	>100%	94%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	99%	>100%	>100%	>100%

(1) 以%表 cell 之存活率，小於 50%表示有效。

HONE-1：人類鼻咽癌細胞

DLD1：人類大腸癌細胞

59T：人類肝癌細胞

SCM-1：胃腺癌細胞

## 二、DPPH 清除自由基活性試驗：

依 Shyu YS (2002)等之方法，以 DPPH 自由基清除能力之試驗，測試九節木甲醇萃取物(Fr. M)、正己烷層(Fr. H)、氯仿層(Fr. C)、乙酸乙酯層(Fr. E)、正丁醇層(Fr. B)、水層(Fr. B)等萃取層，結果發現九節木之甲醇萃取物、氯仿、乙酸乙酯層及正丁醇層具有顯著的抗氧化活性。

本實驗以 Quercetin 及 Vit. E ( $\alpha$ -tocopherol)為正對照組。(詳見

Table 4-2, Figure 4-1)

Table 4-2 Scavenging effect (%) of the fractions of *P. rubra*

Sample conc. Fraction	50 $\mu$ g/mL	100 $\mu$ g/mL	200 $\mu$ g/mL	250 $\mu$ g/mL	500 $\mu$ g/mL
Fr. M	<b>50.02</b>	<b>77.19</b>	<b>81.35</b>	<b>81.64</b>	<b>83.83</b>
Fr. H	<b>40.51</b>	<b>69.64</b>	<b>83.50</b>	<b>78.14</b>	<b>87.03</b>
Fr. C	<b>47.30</b>	<b>74.80</b>	<b>85.12</b>	<b>84.39</b>	<b>99.01</b>
Fr. E	<b>79.63</b>	<b>80.82</b>	<b>81.56</b>	<b>81.60</b>	<b>83.09</b>
Fr. B	<b>57.82</b>	<b>81.17</b>	<b>84.88</b>	<b>86.86</b>	<b>91.17</b>
Fr. W	<b>14.76</b>	<b>15.97</b>	<b>24.24</b>	<b>37.52</b>	<b>44.62</b>
*Quercetin	<b>81.49</b>	<b>81.62</b>	<b>81.92</b>	<b>82.07</b>	<b>82.30</b>
*Vit. E	<b>36.17</b>	<b>68.55</b>	<b>81.17</b>	<b>81.68</b>	<b>81.64</b>

\*為 Postive control

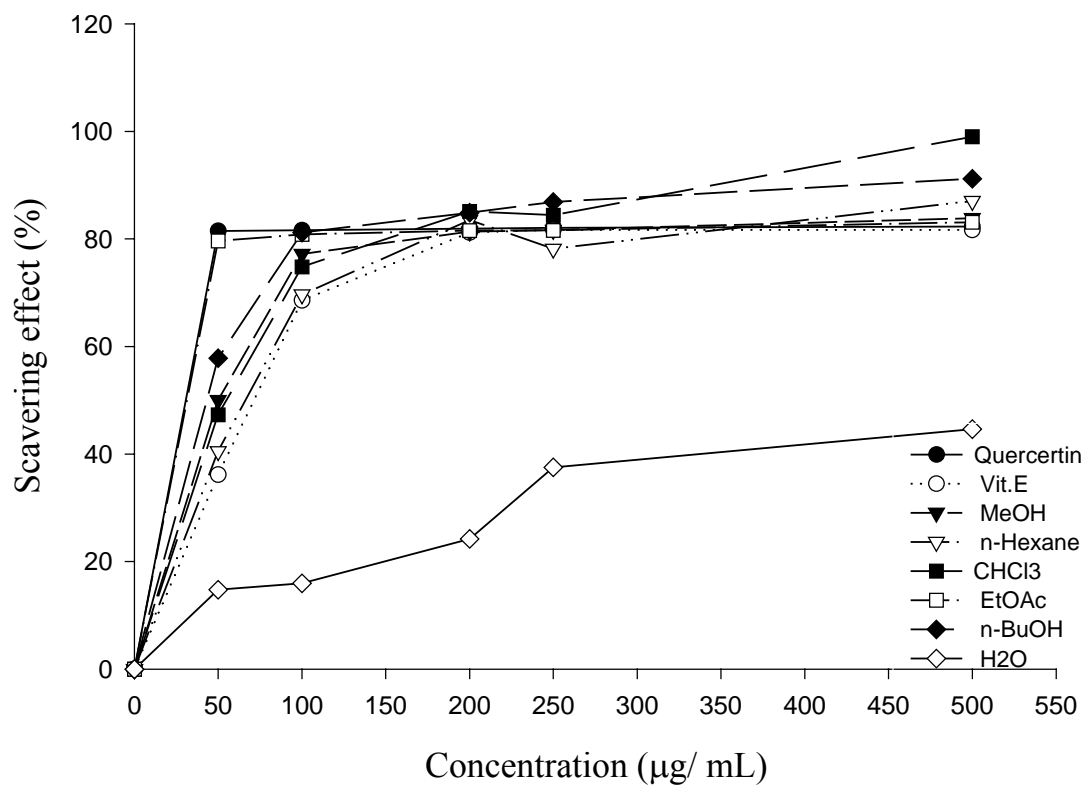


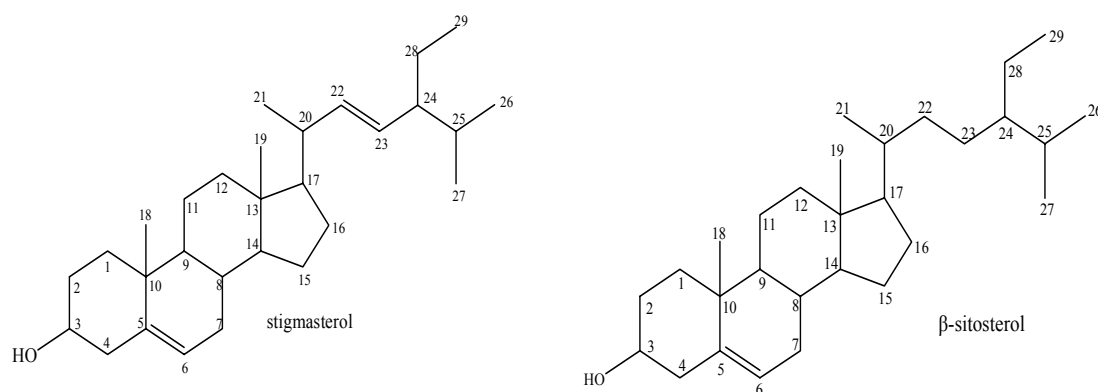
Figure 4-1 Scavenging effect (%) of the fractions of *P. rubra*



# 第五章 討 論

## 第一節 九節木化學成分之結構鑑定

### 【一】 H-1 : mixture of $\beta$ -sitosterol and stigmasterol



化合物 H-1 於正己烷層中得到，為白色粉末，以氯仿-甲醇再結晶，熔點 138-140 $^{\circ}$ C，可溶於氯仿，其 TLC 片經溶媒(*n*-Hexane : CHCl<sub>3</sub> = 5 : 1)展開後，R<sub>f</sub> 值為 0.45，噴 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液，加熱後呈由紅色變為紫色，再變為墨綠色(105 $^{\circ}$ C)。

IR 圖譜(Chart 1)顯示在 3421 cm<sup>-1</sup> 有 -OH 基特性吸收，2935 cm<sup>-1</sup> 及 2850 cm<sup>-1</sup> 為飽和碳氫鍵伸縮振動之特性吸收，1456 cm<sup>-1</sup> 為 CH<sub>2</sub> 之特性吸收。

MS 圖譜(Chart 2) M<sup>+</sup> (m/z %) 顯示分子離子峰為 414, 412，推測分子式為 C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O, C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>O。

<sup>1</sup>H-NMR 圖譜(Chart 3)顯示  $\delta$  5.36 (1H, d, H-6) 為雙鍵上 H-6 之質

子訊號， $\delta$  5.16 (1H, m, H-23), 5.05 (1H, m, H-22)分別為支鏈雙鍵 H-23, H-22 之質子訊號， $\delta$  3.51 (1H, m, H-3)為 C-3 連接-OH 基之次甲基的質子訊號， $\delta$  0.68-2.27 (m)為植物固醇特有訊號。

$^{13}\text{C}$ -NMR 圖譜(Chart 4)顯示 $\delta$  140.7 (C-5), 121.5 (C-6)分別為環上雙鍵 C-5 及 C-6 之碳原子訊號， $\delta$  71.8 (C-3)為帶有-OH 基的 C-3 之碳原子訊號。

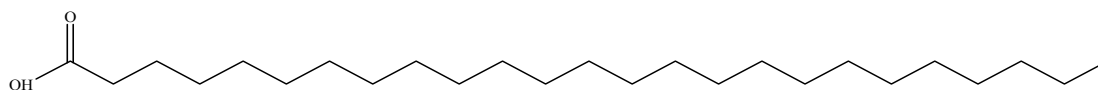
DEPT 圖譜(Chart 5)中顯示有六個碳原子訊號是屬於  $\text{CH}_3$ ，分別為 $\delta$  19.7 (C-26), 19.3 (C-19), 19.0 (C-27), 18.7 (C-21), 11.9 (C-29), 11.8 (C-18)。有十個碳原子訊號屬於  $\text{CH}_2$ ，分別為 $\delta$  42.2 (C-4), 39.7 (C-12), 37.2 (C-1), 33.9 (C-2), 31.6 (C-7), 29.1 (C-16), 28.2 (C-16), 24.2 (C-15), 23.0 (C-28), 21.0 (C-11)。有九個碳原子訊號屬於 CH，分別為 $\delta$  121.7 (C-6), 71.7 (C-3), 56.7 (C-14), 56.0 (C-17), 45.8 (C-24), 36.1 (C-20), 31.8 (C-8), 28.2 (C-25)。其餘的二個碳原子訊號屬於四級碳，分別為 $\delta$  140.7 (C-5)及 $\delta$  36.5 (C-10)。

Table 5-1: 化合物 H-1 碳譜數據與文獻 phytoosterol<sup>[18]</sup> 碳譜數據比對表

No. of C	$\delta_c$ of H-1	$\delta_c$ of literature data
C-1	37.2	37.2
C-2	31.8	31.6
C-3	71.8	71.8
C-4	42.3	42.3
C-5	140.7	140.8
C-6	121.5	121.7
C-7	33.9	33.9
C-8	31.6	31.8
C-9	50.1	50.1
C-10	36.5	36.5
C-11	21.0	21.0
C-12	39.7	39.7
C-13	40.2	40.5
C-14	56.7	56.7
C-15	24.2	24.2
C-16	28.7	28.3
C-17	56.0	56.0
C-18	11.9	11.8
C-19	19.3	19.3
C-20	36.1	36.1
C-21	18.7	18.7
C-22	26.1	26.0, 138.4
C-23	28.2	28.2, 129.3
C-24	45.8	45.8
C-25	29.1	29.1
C-26	19.8	19.8
C-27	18.7	19.0
C-28	23.0	23.0
C-29	12.2	11.9

綜合以上光譜資料與文獻<sup>[18-23]</sup>比對，推定此化合物為 $\beta$ -sitosterol 及 stigmasterol 混合物。

## 【二】 H-2 : Hexacosanoic acid



化合物 H-2 於正己烷層中得到，為白色粉末，溶於氯仿，熔點 89-91°C，其 TLC 片經溶媒(CHCl<sub>3</sub>)展開後，R<sub>f</sub> 值為 0.5，噴 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液，加熱後呈灰黑色。

IR 圖譜(Chart 6)顯示 2918 cm<sup>-1</sup> 及 2850 cm<sup>-1</sup> 為飽和碳氫的特性吸收，1712 cm<sup>-1</sup> 為 carbonyl group 的特性吸收，1464 cm<sup>-1</sup> 為 -CH<sub>3</sub> 基。

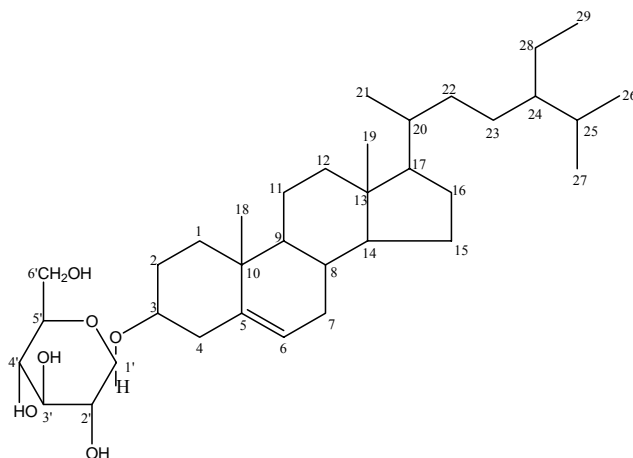
MS 圖譜(Chart 7) M<sup>+</sup> (m/z %)顯示分子量為 396，推測分子式為 C<sub>26</sub>H<sub>52</sub>O<sub>2</sub>。

<sup>1</sup>H-NMR 圖譜(Chart 8)顯示 δ 2.35 (2H, t) 為 H-2 的吸收訊號，δ 1.26 (40H, s, br) 為長鏈 methylene (-CH<sub>2</sub>-) 的吸收訊號，δ 0.88 (3H, t) 為長鏈末端甲基之吸收訊號。

<sup>13</sup>C-NMR 圖譜(Chart 9)顯示 δ 178.7 為 carboxyl carbon 的吸收訊號，δ 22.7~33.8 為長鏈 methylene (-CH<sub>2</sub>-) 的吸收訊號，δ 14.1 為長鏈末端甲基之吸收訊號。

綜合上述資料與文獻值<sup>[24,25]</sup>比對，確認此化合物之結構為 hexacosanoic acid。

### 【三】 H-3 : $\beta$ -sitosterol-3-*O*-glucoside



化合物 H-3 於正己烷層中得到，為白色粉末，熔點 300°C 以上，可溶於氯仿，其 TLC 片經溶媒(CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 7 : 1)展開後，R<sub>f</sub> 值為 0.45，噴 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液，加熱後呈藍紫色。

IR 圖譜(Char 10)顯示在 3410 cm<sup>-1</sup> 有 -OH 基特性吸收，1647 cm<sup>-1</sup> 及 1446 cm<sup>-1</sup> 有 CH<sub>2</sub> 及 CH<sub>3</sub> 彎角振動之特性吸收，1078、1024 cm<sup>-1</sup> 為醚基(C-O-C)之特性吸收。

FAB-MS 圖譜(Char 11) M<sup>+</sup> (m/z %) 顯示 599 (M<sup>+</sup> + Na) 為分子離子峰，推測分子量為 576，分子式為 C<sub>35</sub>H<sub>60</sub>O<sub>6</sub>。

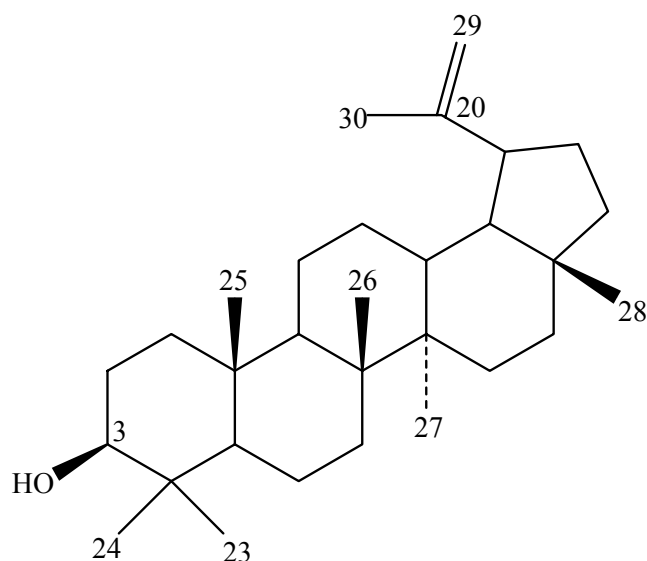
<sup>1</sup>H-NMR 圖譜(Char 12)顯示  $\delta$  5.32 (1H, d, H-6) 為雙鍵上 H-6 之質子訊號， $\delta$  0.63~2.31 (m) 為植物固醇特有訊號， $\delta$  4.24-4.26 (m) 為糖基上質子的吸收訊號。

<sup>13</sup>C-NMR 圖譜(Char 13)顯示  $\delta$  140.4 (C-5), 121.4 (C-6) 分別為環上雙鍵 C-5 及 C-6 之碳原子訊號， $\delta$  71.2 (C-3) 為帶有 -OH 基的 C-3 之

碳原子訊號。

綜合上述資料與文獻值<sup>[26]</sup>比對，確認此化合物之結構為  
 *$\beta$ -sitosterol-3-O- $\beta$ -glucoside*。

#### 【四】H-4 : Lupeol



化合物 H-4 正己烷層中得到，為白色針晶，以氯仿再結晶，熔點 227-229°C，可溶於正己烷、氯仿，其 TLC 片經溶媒(CHCl<sub>3</sub>)展開後，R<sub>f</sub> 值為 0.6，噴 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液，加熱後呈藍紫色。

IR 圖譜(Chart 15)顯示 3334 cm<sup>-1</sup> 有 -OH 基的吸收訊號，2945 cm<sup>-1</sup> 為 CH 的特性吸收帶，1496 cm<sup>-1</sup> 為 CH<sub>2</sub> 的特性吸收帶，1379 cm<sup>-1</sup> 為 CH<sub>3</sub> 的特性吸收帶。

MS 圖譜(Chart 16) M<sup>+</sup> (m/z %)顯示分子量為 426，推測分子式為 C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O。其他斷裂碎片如下：

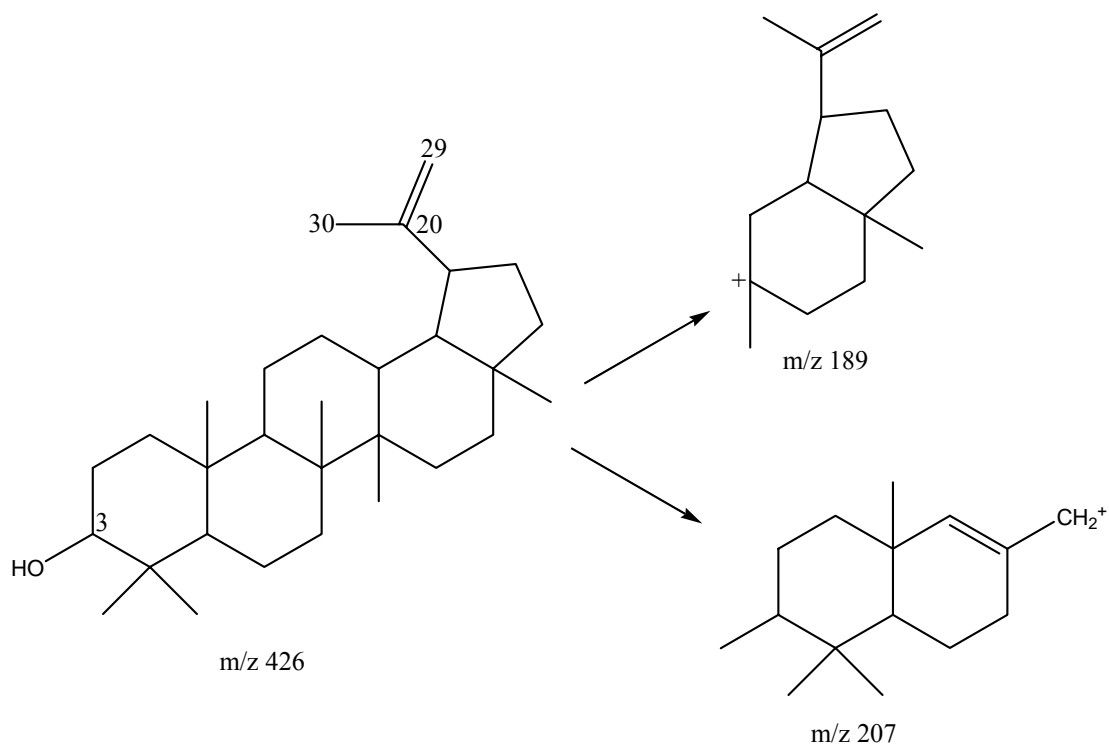


Figure 5-1 Lupeol 之質譜(MS)斷裂方式

$^1\text{H-NMR}$  圖譜(Chart 17)顯示  $\delta$  0.75、0.78、0.84、0.94、0.96、1.02、1.67(s)分別為七個甲基之質子訊號， $\delta$  4.56 (1H, d,  $J=2.4$  Hz), 4.67 (1H, d,  $J=2.4$  Hz)為雙鍵上 H-29 之質子訊號； $\delta$  3.17 (1H, ddd,  $J=11.0, 11.0, 5.5$  Hz)為 C-3 連接-OH 之次甲基的質子訊號； $\delta$  2.36 (m, 1H)為連接異丙基上 H-19 之質子訊號。

$^{13}\text{C-NMR}$  圖譜(Chart 18)顯示  $\delta$  150.7、109.0 分別為外環雙鍵 C-20、C-29 之碳原子訊號； $\delta$  78.7 為接 $\beta$ -OH 基 C-3 之碳原子訊號。

DEPT 圖譜(Chart 19)顯示  $\delta$  27.9, 19.2, 17.9, 16.0, 15.9, 15.3, 14.5 為  $\text{CH}_3$  的訊號， $\delta$  109.2, 39.9, 38.6, 35.5, 34.2, 29.8, 27.9, 25.0, 20.9, 18.2 為  $\text{CH}_2$  的訊號， $\delta$  78.9, 55.2, 50.3, 48.2, 47.9, 38.6 為 CH 的訊號。

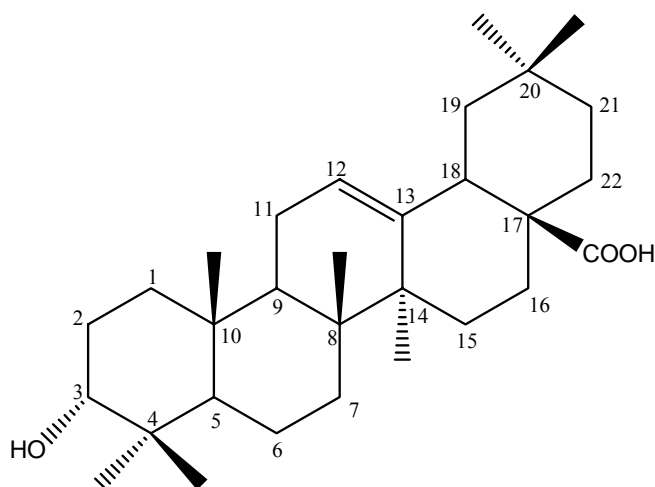


Table 5-2 化合物 H-4 碳譜數據與文獻 lupeol<sup>[27]</sup> 碳譜數據比對表

No. of C	$\delta_c$ of H-4	$\delta_c$ of literature data
C-1	37.8	38.1
C-2	27.7	27.5
C-3	78.7	79.0
C-4	38.6	38.9
C-5	55.0	55.3
C-6	18.0	18.4
C-7	34.0	34.3
C-8	39.7	40.9
C-9	50.5	50.5
C-10	36.9	37.2
C-11	22.4	21.0
C-12	25.5	25.2
C-13	38.4	38.1
C-14	42.5	42.9
C-15	27.1	27.5
C-16	35.3	35.6
C-17	42.7	43.0
C-18	48.0	48.4
C-19	47.7	48.0
C-20	150.7	151.0
C-21	29.6	29.9
C-22	39.1	40.0
C-23	29.4	28.0
C-24	15.1	15.4
C-25	15.8	16.1
C-26	15.7	16.0
C-27	14.3	14.6
C-28	17.7	18.0
C-29	109.0	109.3
C-30	19.5	19.3

綜合以上光譜資料與文獻<sup>[27-36]</sup>比對，推定此化合物為 lupeol。

### 【五】 C-1 : Oleanolic acid



化合物 C-1 氯仿層中得到，為白色針晶，以氯仿-甲醇再結晶，熔點 267-269°C，可溶於甲醇與氯仿溶液，其 TLC 片經溶媒(CHCl<sub>3</sub> : EtOAc = 4 : 1)展開後，R<sub>f</sub> 值為 0.45，噴 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液，加熱後呈藍紫色。

IR 圖譜(Chart 20)顯示在 3475 cm<sup>-1</sup> 有 -OH 基之特性吸收，2939 cm<sup>-1</sup> 為不飽和碳氫鍵之伸縮振動特性吸收，1689 cm<sup>-1</sup> 為 C=O 的特性吸收帶，1463 cm<sup>-1</sup> 為 CH<sub>2</sub> 的特性吸收帶。

MS 圖譜(Chart 21) M<sup>+</sup>(m/z %)顯示分子量為 456，推測分子式為 C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>。其它斷裂碎片如下：

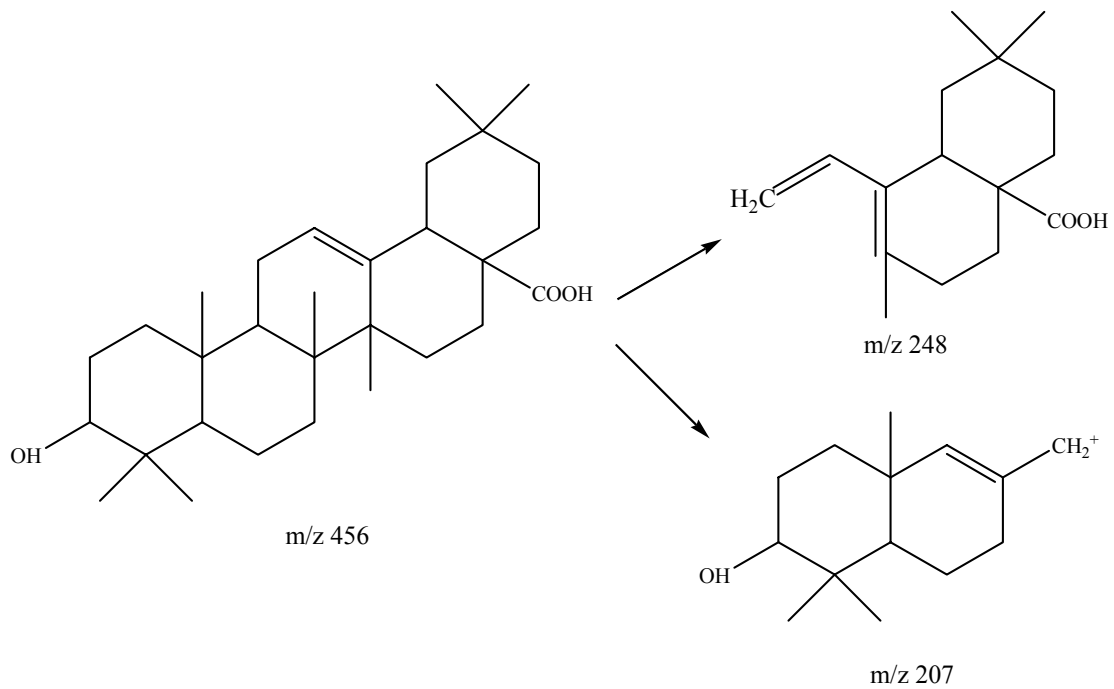


Figure 5-2 oleanolic acid 之質譜(MS)斷裂方式

$^1H$ -NMR 圖譜(Chart 22)顯示  $\delta$  0.76, 0.91, 0.93, 0.98, 1.05, 1.14, 1.17 (s)分別為七個甲基之質子訊號； $\delta$  3.21(1H, m)為 C-3 連接-OH 之次甲基的質子訊號。

$^{13}C$ -NMR 圖譜(Chart 23)顯示  $\delta$  143.3, 122.3 分別 C-13, C-12 之碳原子訊號； $\delta$  77.3 為接-OH 基 C-3 之碳原子訊號； $\delta$  182.7 為 COOH 上 C-28 之碳原子訊號。

DEPT 圖譜(Chart 24)顯示  $\delta$  32.5, 25.8, 23.5, 17.0, 15.4 為  $CH_3$  的訊號， $\delta$  38.3, 33.7, 33.0, 28.0, 27.6, 22.8, 18.2 為  $CH_2$  的訊號， $\delta$  122.5, 78.9, 55.1, 47.6, 40.9 為 CH 的訊號。

Table 5-3 化合物 C-1 碳譜數據與文獻 oleanolic acid<sup>[37]</sup>碳譜數據比對表

No. of C	$\delta_c$ of C-1	$\delta_c$ of literature data (Pyridine- <i>d</i> <sub>5</sub> )
1	38.1	38.9
2	26.9	28.1
3	78.7	78.1
4	38.5	39.4
5	54.9	55.8
6	18.0	18.8
7	32.8	33.2
8	39.0	39.8
9	47.3	48.1
10	38.4	37.4
11	22.7	23.1
12	122.3	122.6
13	143.3	144.8
14	41.3	42.2
15	27.4	28.3
16	23.3	23.7
17	46.2	46.7
18	45.6	46.5
19	40.7	42.0
20	30.4	31.0
21	36.8	34.2
22	32.2	33.3
23	27.8	28.3
24	15.2	16.5
25	15.0	15.6
26	16.8	17.4
27	25.6	26.2
28	182.7	180.2
29	33.5	33.3
30	25.6	23.8

綜合上述資料與文獻<sup>[37]</sup>比對，確認此化合物之結構為 oleanolic acid。

## 【六】 C-2 : Triacotanoic acid



化合物 C-2 於氯仿層中得到，為白色固體粉末，以氯仿-甲醇再結晶，熔點 84-86°C，可溶於正己烷、氯仿，其 TLC 片經溶媒(CHCl<sub>3</sub>)展開後，R<sub>f</sub> 值為 0.45，噴 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液，加熱後呈灰黑色。

IR 圖譜(Chart 25)顯示 2933 cm<sup>-1</sup> 及 2850 cm<sup>-1</sup> 為飽和碳氫的特性吸收，1645 cm<sup>-1</sup> 為 carbonyl group 的特性吸收，1464 cm<sup>-1</sup> 為 -CH<sub>3</sub> 基。

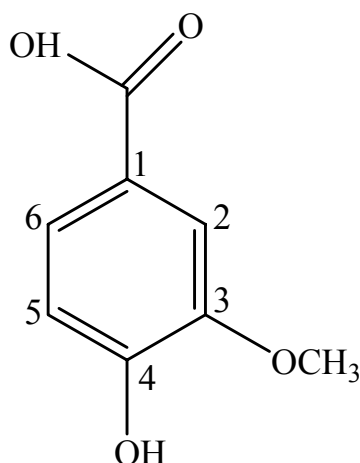
MS 圖譜(Chart 26) M<sup>+</sup> (m/z %)顯示分子量為 452，推測分子式為 C<sub>30</sub>H<sub>60</sub>O<sub>2</sub>。

<sup>1</sup>H-NMR 圖譜(Chart 27)顯示 δ 2.35 (2H, t) 為 H-2 的吸收訊號，δ 1.26 (40H, s, br) 為長鏈 methylene (-CH<sub>2</sub>-) 的吸收訊號，δ 0.89 (3H, t) 為長鏈末端甲基之吸收訊號。

<sup>13</sup>C-NMR 圖譜(Chart 28)顯示 δ 179.5 為 carboxyl carbon 的吸收訊號，δ 22.7~33.7 為長鏈 methylene (-CH<sub>2</sub>-) 的吸收訊號，δ 14.1 為長鏈末端甲基之吸收訊號。

綜合上述資料與文獻值<sup>[38,39]</sup>比對，確認此化合物之結構為 triacotanoic acid。

【七】EA-1：Vanillic acid (4-hydroxy-3-methoxy benzoic acid)



化合物 EA-1 乙酸乙酯層中得到，為白色針晶，以丙酮再結晶，熔點 172-174°C，可溶於甲醇與丙酮溶液，其 TLC 片經溶媒(CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 6 : 1)展開後，R<sub>f</sub> 值為 0.45。

IR 圖譜(Chart 29)：顯示在 3484 cm<sup>-1</sup> 有 -OH 基之特性吸收，2924 cm<sup>-1</sup> 為不飽和碳氫鍵之伸縮振動特性吸收，1683 cm<sup>-1</sup> 為 C = O 之特性吸收，1596, 1523, 1434 cm<sup>-1</sup> 為芳香環共軛雙鍵之特性吸收，1281 cm<sup>-1</sup> 為醚基(C-O-C)之特性吸收。

MS 圖譜(Chart 30) M<sup>+</sup> (m/z %)顯示分子量為 168，推測分子式為 C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>。

<sup>1</sup>H-NMR 圖譜(Chart 31)顯示 δ 7.44 (dd) 為 H-6 之質子訊號；δ 7.39 (d) 為 H-2 之質子訊號；δ 6.84 (d) 為 H-5 之質子訊號；δ 3.79 (s) 3 號碳上 OCH<sub>3</sub> 之質子訊號。

<sup>13</sup>C-NMR (Chart 32) 及 DEPT 圖譜(Chart 33)顯示共有 8 個碳原

子，包括 4 個四級碳，3 個三級碳及 1 個一級碳甲氧基的訊號，其中  $\delta$  167.4 為 carboxyl group (COOH) 之碳原子訊號； $\delta$  151.2 為 C-4 之碳原子訊號； $\delta$  123.6 為 C-6 之碳原子訊號； $\delta$  121.9 為 C-1 之碳原子訊號； $\delta$  115.2 為 C-5 之碳原子訊號； $\delta$  113.0 為 C-2 之碳原子訊號； $\delta$  55.8 則為 methoxy group 之碳原子訊號。

綜合上述資料與文獻<sup>[40]</sup>比對，確認此化合物之結構為 4-hydroxy-3-methoxy benzoic acid (vanillic acid)。

## 【八】EA-2

化合物 EA-2 乙酸乙酯層中得到，為黃棕色針晶，以甲醇再結晶，熔點 154-156°C，可溶於甲醇，其 TLC 片經溶媒(CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 9:1)展開後，R<sub>f</sub> 值為 0.45，噴 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液，加熱後呈黃色。

IR 圖譜(Chart 34)顯示在 3409 cm<sup>-1</sup> 為-OH 基之特性吸收，1646 cm<sup>-1</sup> 為 carbonyl group 之特性吸收，1540, 1508, 1463 cm<sup>-1</sup> 為芳香環共軛雙鍵的特性吸收。

MS 圖譜(Chart 35) M<sup>+</sup> (m/z %)顯示分子量為 254，推測分子式為 C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>。

<sup>1</sup>H-NMR 圖譜(Chart 36)顯示 δ 8.35 (m), δ 7.87 (m) 為 vicinal naphthalene Hs 的原子訊號。

<sup>13</sup>C-NMR 圖譜(Chart 37)中顯示共有十三個碳原子吸收訊號，其中 δ 190.5, δ 182.5 為 naphthoquinone 上 carbonyl group 之碳原子吸收訊號。

DEPT 圖譜(Chart 38)顯示 δ 64.3 為 CH<sub>2</sub> 的訊號，δ 134.6, 134.1, 131.9, 127.6, 127.4, 127.1, 124.8 為 CH 的訊號。

綜合上述資料與文獻<sup>[41-47]</sup>比對，推測此化合物之母結構為 1,4-naphthoquinone 的化合物，EA-2 的結構還在鑑定中。



## 第二節 九節木之藥理活性試驗討論

### 一、細胞毒殺活性試驗

Table 4-1 顯示，以 MTS 分析法試驗九節木各萃取層之細胞毒殺活性，結果發現九節木的乙酸乙酯層對胃腺癌細胞(SCM-1)及肝癌細胞(59T)具有明顯的抑制作用，由此推測九節木之細胞毒殺活性成分可能屬於中高極性之物質。而本研究由九節木莖部之乙酸乙酯層分離所得之 EA-2 化合物應為萘醌類化合物，而萘醌類化合物在文獻記載具有抗腫瘤與抗細胞毒性之活性成分，對於 EA-2 細胞毒殺活性方面則值得進一步探討。

### 二、DPPH 清除自由基活性實驗

依 Shyu YS (2002)等之方法<sup>[14,48]</sup>，以 DPPH 自由基清除能力之試驗，測試九節木莖部各萃取層，結果發現九節木之甲醇萃取物、氯仿、乙酸乙酯層及正丁醇層具有顯著的抗氧化活性。顯示九節木之化學成分中含有具抗氧化能力之活性成分。因此以抗氧化能力為活性指標，由氯仿、乙酸乙酯層中得到具有抗氧化活性之三萜類化合物 oleanolic acid (C-1)、vanillic acid (EA-1)，顯示以活性引導分離之方式相當可行，而其他各萃取層之活性成分仍有待進一步追蹤。

## 第六章 結 論

九節木之莖部經乾燥、萃取後，以細胞毒殺活性及清除自由基能力為活性指標，使用管柱層析分離並再結晶純化，結果由正己烷層、氯仿層、乙酸乙酯層中得到八個化合物：

1. Fatty acid :

hexacosanoic acid (H-2)

triacotanoic acid (C-1)

2. Triterpene :

lupeol (H-4)

oleanolic acid (C-1)

3. Steroid :

mixture of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol (H-1)

$\beta$ -sitosterol-3-*O*-glucoside (H-3)

4. Phenolic :

Vanillic acid (4-hydroxy-3-methoxy benzoic acid) (EA-1)

5. Naphthoquinone :

EA-2

其中，hexacosanoic acid, triacotanoic acid, lupeol, oleanolic acid,  $\beta$ -sitosterol-3-*O*-glucoside, 4-Hydroxy-3-methoxy benzoic acid, EA-2 等化合物皆為九節木首次發現。

據文獻記載萘醌化合物具有抗腫瘤、抗基因體突變及<sup>[49]</sup>抗細胞毒性活性；EA-2 應為萘醌類化合物所以可能有相似活性，且據文獻記載顯示三萜化合物 oleanolic acid 具有抗發炎活性、抗氧化的活性以及改善實驗性肝損傷的作用<sup>[50-57]</sup>，而 vanillic acid 在文獻記載也有抗氧化的活性<sup>[58]</sup>，所以活性引導分離的實驗方法相當可行。

九節木為台灣之常見民間藥，其民間用於治療扭傷、瘀傷、祛風除濕、風濕痛、痔瘡、消腫解毒、治感冒發熱。而本研究分離所得之活性成分，若針對固有民間用法，再進一步進行藥理活性確認，將使九節木的應用上更具意義，並有助於本土藥用植物的開發。

## 參考文獻

1. 劉和義、楊遠波、呂勝由、施炳霖：台灣維管束植物簡誌（第肆卷），行政院農業委員會，台北，2000；pp. 91-92。
2. Editor-in-Chief: Huang TS. Tah Jinn: Flora of Taiwan, Second Edition. Volumn Four. Editorial Committee of Taiwan 1993; pp. 315-318.
3. Hui WH, Yee CW: An examination of the Rubiaceae of Hong Kong-III. *Phytochemistry*. 1967; 6: 441-442.
4. 國家中醫藥管理局（中華本草）編委會：中華本草 6，上海科學技術出版社，上海，1999; pp. 466-467。
5. 陳彬：九節木粉外敷治療慢性皮膚潰瘍，安徽中醫學院學報，1994；13(3)：122-123。
6. Hayashi T, Smith FT, and Lee KH: Antitumor Agent. 89.<sup>1</sup> psychorubrin, a new cytotoxic naphthoquinone from *Psychotria rubra* and its structure-activity relationships. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1987; 30: 2005-2008.
7. Lin AP, Fan CY, Lee MJ, Lee YH, Wu LY, Tsai WJ : Analysis on the vasoactive-antithrombotic effect of *Psychotria rubra*. *Journal of Chinese Medicine*. 1998; 9 (4): 239-245.
8. 甘偉松：藥用植物學，國立中國醫藥研究所，台北 1993；p. 524。
9. 邱年永、張光雄：原色台灣藥用植物圖鑑 2，南天書局，台北 1992；p. 207。
10. 江蘇新醫學院：中藥大辭典（上冊），上海科學技術出版社，上海 1992；p. 173。
11. Edenharder R, Tang X: Inhibition of the mutagenicity of 2-nitrofluorene, 3-nitrofluoranthene and 1-nitropyrene by flavonoids,

- coumarins, quinone and other phenolic acid compounds. *Food and Chemical Toxicology*. 1997; 35: 357-372.
12. Ryuichiro I, Yoshikawa K, Mura H, Kada T, Kura H, Kada T: Specificities of bio-antimutagens in plant kingdom. *Agriculture of Biological Chemistry*. 1984; 48 (10): 2587-2591.
  13. Inouye H, Takeda Y, Nishimura H, Kanomi A, Okuda T, Ruff C: Chemotaxonomic studies of Rubiaceae plants containing iridoid glycosides. *Phytochemistry*. 1988; 27 (8): 2591-2598.
  14. Dhawan BN, Patnaik GK, Rastogi RP, Singh KK, Tandon JS: Screening of India plants for biological activity part VI. *Indian Journal of Experimental Biology*. 1977; 15: 208-.
  15. Dhar ML, Dhar MN, Dhawan BN, Mehrotra BN, Srimal RC: Screening of India plants for biological activity part IV. *Indian Journal of Experimental Biology*. 1973; 11: 43.
  16. Shyu YS, Hwang LS: Antioxidant activity of the crude extract of lignan glycosides from unroasted Burma black sesame meal. *Food Research International*. 2002; 35: 357-365.
  17. Williams WB, Cuvelier ME, Berset C: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie-Food Science and Technology*. 1995; 28(1): 25-30.
  18. Dey PM, Harborne JB: Method in plant biochemistry Volume 7 terpenoids. *Harcourt Brace Jovanovich*. 1991; 7: 419-423.
  19. Eric L, Pierre A: Synthesis of triaromatic steroid hydrocarbons methylated at position 2, 3 or 6: molecular fossils of unknown biological origin. *Tetrahedron Letters*. 1994; 56 (5): 1731-1744.
  20. Kuo YH, Yen YF: Constituents of *Erythrina variegata*. *China Pharmaceutical Journal*. 1997 ; 49: 21-29.
  21. 于德泉、楊峻山：分析化學手冊(第七分冊)：核磁共振波譜分析，化學工業出版社，北京 1995；pp. 898-899。

22. Kuo YH, Li YC: Constituents of the bark of *Ficus microcarpa* L.F. *Journal of the Chinese Chemical Society*. 1997; 44: 321-325.
23. Lai JS, Lious HS, Huang KF: Constituents of the roots of *Melanolepis multiglandulosa*. *Chininese Pharmaceutical Journal*. 1996; 48: 177-183.
24. Kuo YH, Yeh MH: Chemical constituents of heartwood of *Bauhinia purpurea*. *Journal of the Chinese Chemical Society*. 1997; 44: 379-383.
25. Miwa A, Adachi J, Mizuno K, Tatsuno Y: Very long-chain fatty acid in crush syndrome patients in the Kobe earthquake. *Clinica Chimica Acta*. 1997; 258, 125-135.
26. Huang KF, Yen YF: Constituents of *Erythrina variegata*. *China Parmaceutical Journal*. 1997; 49: 21-29.
27. Fuchino H, Satoh T, Tanaka N: Chemical Evalution of *Betula* species in Japan I. Constituents of *Betula ermanii*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*. 1995; 43(11): 1937-1942.
28. Viqur Vddin Ahmad, Shaheed Bane, Faryal Vali Mohammad: Nepehinol a new triterpene from *Nepeta hindostana*. *Planta Medica*. 1985; 55: 521-523.
29. Mochammad S, Yamasaki K, Kasai R, Tanaka O: <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance of lupine-type triterpenes, lupeol, betulin, betulinic acid. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*. 1980; 28 (3): 1006-1008.
30. Ho LD, Chang CR, Chang YS: Chemical components from *Triumfetta bartramia*. *Journal of the Chinese Chemical Society*. 1995; 42: 93-95.
31. Andre N, Anthony DW, Topul R, Otto S: Antibacterial triterpenoids from *Dillenia papuana* and their structure-activity relationships. *Phytochemistry*. 1995; 40 (6): pp 1691-1695.
32. 林美昭、林宗旦編著：最新植物化學，明哲出版社，台中 1985；

573-583。

33. 楊蕙菁：腺毛馬藍之化學成分研究，中國醫藥學院中國藥學研究所碩士論文，台中 1997。
34. 高國清：爵床科植物台灣馬藍(*Strobilanthes formosanus* Moore)及六角英(*Hypoestes purpurea* R. Brown)化學成分與藥理活性評估，中國醫藥學院中國藥學研究所博士論文，台中 2003。
35. Kohei K, Kazuuko Y, Yasuhisa S, Akira I, Toshiko S : Triterpenoids and flavonoids from *Paeonia lactiflora*. *Phytochemistry*. 1997 ; 44: 141-144.
36. Zhongze M, Hano Y, Feng Q, Chen Y, Taro Nomura: Determination of the absolute stereochemistry of lupane triterpenoids by fucofuranoside method and ORD spectrum. *Tetrahedron Letters*. 2004; 45: 3261-3263.
37. Pouchert CJ, Behnke J: The Aldyich Library of <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H FT-NMR spectra III, Aldrich Chemical Company. 1993; p. 595.
38. Sasaki SI: Hanbook of proton-NMR spectra and data Vol. 5, Academic Press 1985-1986;p 190.
39. Lin YT, Kuo YH, Chang BH: Studies on the extractive constituents of the bark of *Libocedrus formosana* Florin. II. *Journal of Chinese Chemical Society*. 1975; 22: 331-334.
40. Harrison LJ, Sia GL, Sim KY, Tan HTW, Connolly JD: A ferulic acid ester of sucrose and other constituents of *Bhesa paniculata*. *Phytochemistry*. 1995; 38 (6): 1497-1500.
41. Tuyen NV, Norbert DK: Synthesis of pyranonaphthoquinone antibiotics involving the ring closing metathesis of a vinyl ether. *Tetrahedron Letters*. 2004; 45: 3443-3446.
42. David B, Williams VE: An efficient synthesis of substituted anthraquinones and naphthoquinone. *Tetrahedron Letters*. 2004; 4:

- 2511-2513.
43. Bernardina O, Carola K, Inga KMF: Antiplasmodial activity of naphthoquinones and one anthraquinone from *Stereopermum kunthianum*. *Phytochemistry*. 2003; 60: 39-44.
  44. 蕭崇厚：中藥化學，上海科學技術出版社，上海 1994；pp. 486-487。
  45. Naito T, Makita Y, Yazaki S, Kaneko C: Cycloadditions in syntheses. XXVI. 1,2-Dihydrocyclobuta[*b*]-naphthalene-3,8-diones: synthesis by phytochemical means and their reactions *via* 2,3-dimethylene-1,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydronaphthalenes. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*. 1986; 34 (4): 1505-1517.
  46. Bart K, Tuyen NV, Norbert DK: Synthesis of 3-alkyl-and 3-aryl-2-aza-anthraquinones. *Tetrahedron Letters*. 1999; 55: 2091-2102.
  47. Hari L, Buyck De LF, Pooter De HL: Naphthoquinone pigments from *Pents longiflora*. *Phytochemistry*. 1991; 30: 1726-1727.
  48. Blois MS: Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958; 26: 1199-1200.
  49. Zhang R, Hirsch O, Mohsen M, Samuni A: Effect of nitroxide stable radicals on juglone cytotoxicity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1994; 312 (2): 385-391.
  50. Liu J: Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*. 1995; 49: 57-68.
  51. Ismaili H, Milella L, Fkih-Tetouani S, Ilidrissi A, Camporese A, Sosa S, Altinier G, Della Loggia R, Aquino R: *In vivo* topical anti-inflammatory and *vitro* antioxidant activities of two extracts of *Thymus stureioides* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004; 91: 31-36.
  52. Chien-Ya, Yen GC: Extraction and identification of antioxidative Components of Hsian-tiao (*Mesona procumbens* Hemsl.).



*Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie-Food Science and Technology*. 2001; 34: 306-311.

53. Ohsugi M, Fan W, Hase K, Xiong Q, Tezuka Y, Komatsu K, Namba T, Saitoh T, Tazawa K, Kadota S: Active-oxygen scavenging activity of traditional nourishing-tonic herbal medicines and active constituents of *Rhodiola sacra*. *Journal of Ethnopharmacology*. 1999; 67: 111-119.
54. 張瓊文：一、植物活性成分研究 1.羅勒 2.台灣赤楠。二、Naringin 與 Hesperidin 之高效液相層析定量，中國醫藥學院藥物化學研究所博士論文，台中 1996。
55. 田麗婷、馬龍、褚年生：齊墩果酸的藥理作用研究概況，中國中藥雜誌，2002； 27(12): 884-901。
56. 張東方、黃煒、黃濟群、張瑞玲、廖兆全：齊墩果酸抗人肺癌細胞增殖、侵襲和誘導細胞凋亡的研究，腫瘤防治研究，2003； 3(30): 180-183。
57. 譚仁祥：植物成分功能，科學出版社，北京 2003； pp. 242-243。
58. Jaroslaw K, Marina A, Antonia S, Butterfield DA: Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture system *in vitro*: structure-activity studies. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2002; 13: 273-281.