

第一章 緒 言

黃杞屬 (*Engelhardtia*) 為一分布廣泛之胡桃科 (Juglandaceae) 植物，分布於福建、臺灣、湖南、廣東、海南、廣西、四川、貴州、雲南等地，印度、緬甸、越南、泰國亦有分布。而臺灣產之黃杞屬 (*Engelhardtia*) 植物依臺灣植物誌 (Flora of Taiwan) 所載僅有臺灣黃杞 (*Engelhardtia roxburghiana* Wallich) 一種^[1-2]。臺灣黃杞 (*E. roxburghiana*) 生長在臺灣全島低至中海拔之山區森林中，其樹皮具有行氣，化濕，健脾，導滯，消食之功效。民間剝取其粗幹皮部，整片曬乾或切片曬乾使用。主治脾胃濕滯，胸腹脹悶，濕熱泄瀉，疝氣腹痛；葉可清熱，止痛。主治感冒發熱，疝氣腹痛^[3-4]，樹皮及葉能毒魚^[4-5]。

根據美國伊利諾大學 Napralert 資料庫在 2002 年以前所做的統計，目前尚無臺灣黃杞英文學名之相關資料。而據文獻報導本科植物具有抑制醛糖還原酶、抗腫瘤、鎮痛消炎、抑菌及生物毒性等作用^[6]，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，發現臺灣黃杞樹皮部之甲醇抽出物及各種有機溶媒萃取層中，以正己烷層及氯仿層對 NUGC-3 及 HONE-1 兩種癌細胞具有明顯抑制作用；而在莖部之甲醇抽出物及各種有機溶媒萃取層中，以正己烷層及氯仿層對 NUGC-3 癌細胞具有明顯抑制作用；而在 DPPH 自由基清除能力之試驗中，結果發現臺灣黃杞樹皮部之甲醇萃取物、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，進行臺灣黃杞化學成分之分離，將臺灣黃杞之乾燥樹皮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，再將各萃取層成分分別以管柱層析法分離，經由再結晶法純化並利用紅外光譜、紫外光譜、質譜及核磁共振等光譜分析法，進行結構鑑定，最後得到七個化合物及一個混合物，分別為 β -sitosterol, tetracosanoic acid, betulinic acid, 5-hydroxy-2-methoxy-1,4-naphthoquinone, mixture of betulinic acid and ursolic acid, β -sitosterol 3-*O*-glucoside, astilbin, kaempferol 3-*O*-rhamnoside。

盼望藉由臺灣產藥用植物臺灣黃杞的化學成分研究，來確定其成分種類，進而瞭解臺灣黃杞在醫療上的功效及民間用途使用的正確性，以提高臺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 臺灣黃杞之藥用植物學考察

一、臺灣黃杞之植物學分類^[7]

被子植物門 Angiospermae

雙子葉綱 Dicotyledoneae

離瓣花亞綱 Choripetalae

單花被類 Monochlamydeae

胡桃目 Juglandales

胡桃科 Juglandaceae

黃杞屬 *Engelhardtia*

二、胡桃科(Juglandaceae) 黃杞屬(*Engelhardtia*)植物之特徵^[1]

芽裸露。偶數羽狀複葉；小葉 2 至 5 對。數支雄花序簇生或排成圓錐狀；雄花被片 4 裂或退化，雄蕊 3 至 15 枚。雌花序為一長莖萼花序；雌花被片 4 裂；柱頭 2 或 4。小堅果具翅 3 裂。臺灣有 1 種。

三、黃杞屬(*Engelhardtia*) 植物檢索表^[2]

1. 偶數羽狀複葉；小葉 2 至 5 對，明顯有柄.....1. *Engelhardtia* (黃杞屬)

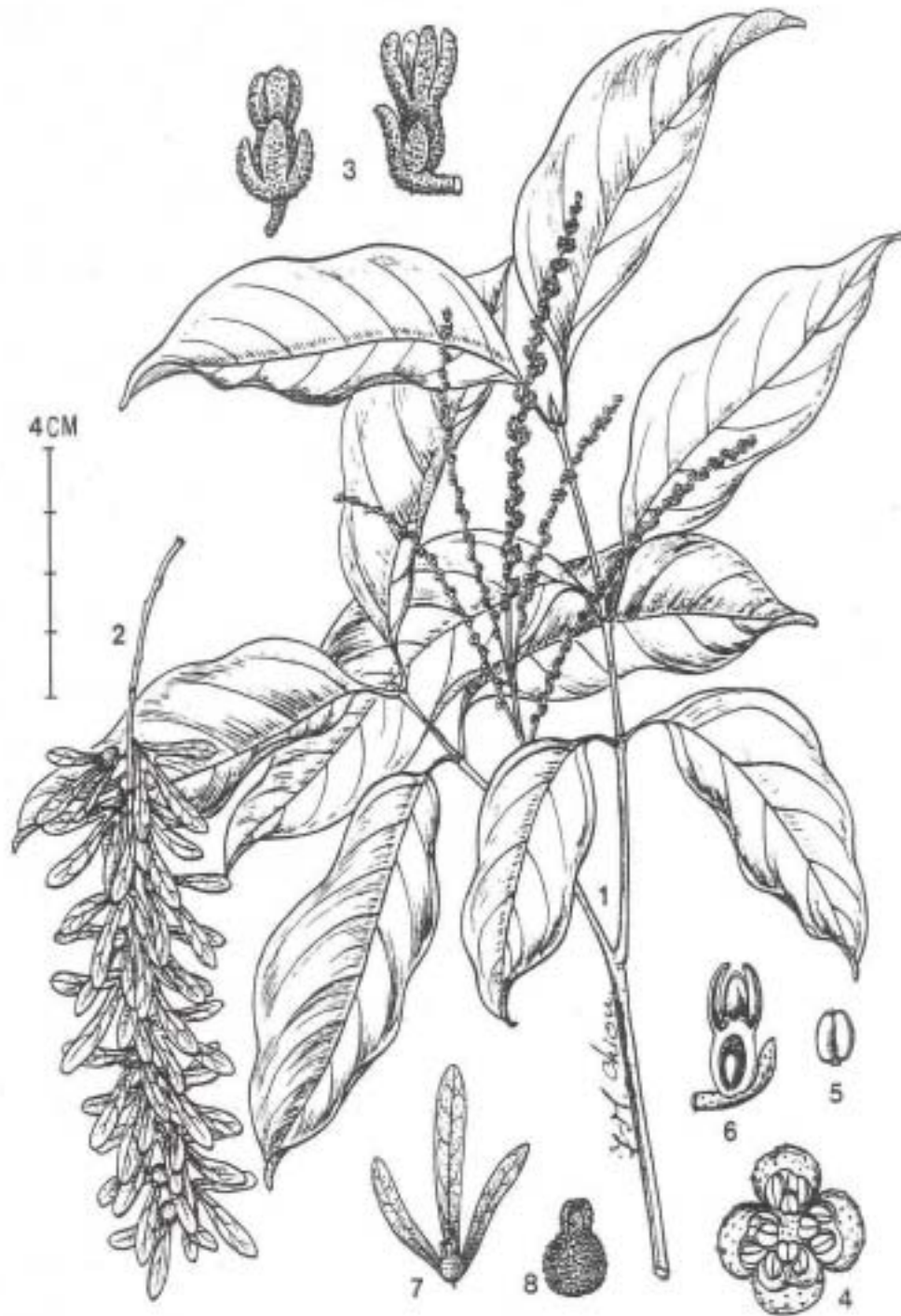
1. 奇數羽狀複葉；小葉 7 至 15 對，無或幾無柄。

2. 小葉長橢圓形，長橢圓狀卵形或橢圓形.....2. *Juglans* (核桃屬)

3. 小葉卵狀或長橢圓狀披針形.....3. *Platycarya* (化香屬)

四、臺灣黃杞(*Engelhardtia roxburghiana* Wallich) 之植物形態^[1-2]

喬木高達 10 m。小葉全緣，小葉柄長 0.5-1.0 cm。雌花序頂生，單生或與數個雄花序排成圓錐花序。小堅果球形，直徑約 3 mm。生長在全島低至中海拔之山區森林中。



1. branch with staminate catkins; 2. frutescence; 3. pistillate flower;
 4. staminate flower; 5. stamen; 6. section of pistillate flower;
 7. nut with 3-lobed bract; 8. nut.

Figure 2-1 臺灣黃杞(*Engelhardtia roxburghiana* Wallich)植物型態特徵圖^[2]

五、臺灣黃杞之基原、分布與功用^[3-8]：

1.學名：*Engelhardtia roxburghiana* Wallich

2.科名：胡桃科 Juglandaceae

3.別名：杞樹，黃久、黃果，黃櫟、黃古木、土厚朴。

4.分布：福建、臺灣、湖南、廣東、海南、廣西、四川、貴州、雲南等地。

5.藥性：味微苦、辛，性平。

6.效用：樹皮部可行氣，化濕，導滯。主治脾胃濕滯，皖腹脹悶，泄瀉。而葉部可清熱，止痛。主治感冒發熱，疝氣腹痛。

7.用法用量：

(1)治黃疸病：黃杞樹皮 2-3 錢。水煎服。

(2)治脾胃濕滯，濕熱泄瀉：黃杞樹皮 2-3 錢或葉 4-5 錢，水煎服。

(3)治感冒發熱：黃杞葉 4-5 錢，水煎服。

第二節 臺灣黃杞 Napralert 及相關文獻考察

有關黃杞屬(*Engelhardtia*)全屬之植物成分及藥理文獻，據 2002 年美國伊利諾大學 Narpralert Database Profiles on *Engelhardtia* 在 2002 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：

一、黃杞屬(*Engelhardtia*)植物之民俗用法報導方面：

黃杞屬之民俗用法報導方面，在臺灣民間用法為剝取其粗幹皮部，整片曬乾或切片曬乾使用。主治脾胃濕滯，胸腹脹悶，濕熱泄瀉，疝氣腹痛；葉可清熱，止痛。主治感冒發熱，疝氣腹痛；樹皮及葉能毒魚^[4-5]。黃杞之乾燥葉，在中國大陸民間常用來泡成甜茶(sweet tea)喝，可預防高血壓，並有降血脂作用^[9,10,13-14]；在印度民間則是取樹皮部來治療內傷(internal injury)^[15]。

二、黃杞屬(*Engelhardtia*)植物之生物活性研究方面：

在中國大陸方面的研究，黃杞葉部萃取物可以抑制組織胺游離，且黃杞葉部總黃酮對小鼠具有一定的活血化癥、降血脂、降血糖和增強免疫力的作用^[11-13]。而在 Napralert 資料庫則報導黃杞屬之生物活性，具有抗痙攣作用(spasmolytic activity)、刺激毛髮生長的作用(hair stimulant effect)、抗病毒(antiviral activity)、降血壓活性(hypotensive activity)、抗腫瘤活性(antitumor activity)、全身毒性反應(toxic effect, general)^[16-19]。

黃杞植物之成分研究方面，目前尚未有臺灣黃杞(*E. roxburghiana*)這一種植物之相關資料。

由上述整理發現，臺灣黃杞(*E. roxburghiana*)之民俗用法、生物活性及成分研究方面仍相當有限，而根據 Narpralert 文獻報導，本屬其他植物則具有抗腫瘤活性、抗痙攣、抗病毒、降血壓等之報導，因此具有值得進一步研究及開發的潛力。

三、黃杞屬(*Engelhardtia*)植物之成分研究方面：[11,14,20-27]

1. Steroids:

β-sitosterol

2. Benzenoids:

gallic acid

3. Flavonoids:

astibin (dihydroquercetin 3- α -L-rhamnopyranoside)

neoastilbin

isoastilbin

huangqioside E

phlorizin (phloretin 2'- β -D-glucoside)

gallocatechin

4. Flavonol :

quercitrin (quercetin 3-L-rhamnoside)

engelhardtia flavonoid triglycoside

engelhardtia quercetin glycoside

5. Chromone :

eucryphin

(詳見 Table 2-3)

Table 2-1 Ethnomedical information on *Engelhardtia*

Species	Used part	Area	Ethnomedical usage	Ref.
<i>E. chrysolepis</i>	dried leaf	China	Used as a sweet tea . Leaves are said to taste sweet.	[14]
<i>E. spicata</i>	bark	India	Used to cure internal injuries.	[15]

Table 2-2 Biological activities for extracts of *Engelhardtia*

Species	Used part	Area	Biological activities	Ref.
<i>E. acerifolia</i>	aerial parts	India	spasmolytic activity (A)	[16]
<i>E. chrysolepis</i>	part not specified	Japan	hair stimulant effect (A)	[17]
<i>E. colebrookiana</i>	stem bark	India	antiviral activity (A)	[18]
			hypotensive activity (A)	
<i>E. spicata</i>	dried entire plant	Not stated	antitumor activity (W)	[19]
			toxic effect, general (A)	

(A: active, S: strong, W: weak, I: inactive)

Table 2-3: Presence of compounds in *Engelhardtia*

Species	Used part	Area	Isolated compounds	Type	Ref.
<i>E. chrysolepis</i>	leaf	China	astilbin, isoastilbin, neoastilbin huangqioside E,	Flavonoid	[14, 20-24]
		Japan	astilbin	Flavonoid	
		China	eucryphin	Chromone	
			quercitrin	Flavonol	
<i>E. colebrookiana</i>	leaf	India	engelhardtia flavonoid triglycoside	Flavonol	[25-26]
			engelhardtia quercetin glycoside	Flavonol	
<i>E. serrata</i>	stem bark	China	gallic acid	Benzenoid	[11, 27]
			(-):gallocatechin	Flavonoid	
			phlorizin	Flavonoid	
			β -sitosterol	Steroid	

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) 乙醇為臺灣省菸酒公賣局之 95% 酒精。
- (3) 測核磁共振 (NMR) 光譜所用之溶媒 CDCl_3 (Deuterated chloroform)、 $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$ (Deuterated methanol)、 $\text{DMSO}-d_6$ (Dimethyl sulfoxide)、 $\text{Pyridine}-d_5$ 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_{254} 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 溶媒及紅外線譜用之 KBr。
- 4.電子天平：Mettler AJ100 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) AquasonicTM 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 粉末混合均勻，加壓成透明薄片測定之，光譜單位為波數(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 Tetramethy Silane (TMS)，化學位移(Chemical shift)以 δ 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：

植物臺灣黃杞(*Engelhardtia roxburghiana* Wallich)於民國九十一年十月在南投縣魚池鄉五城村採得。經中國醫藥大學技正邱年永老師鑑定，確認為胡桃科(*Juglandaceae*)之臺灣黃杞(*Engelhardtia roxburghiana* Wallich)後，先將樹皮部與其他部位分開處理後，進行成分分離實驗之研究。



Figure 3-1 臺灣黃杞(*Engelhardtia roxburghiana* Wallich)植物圖^[5]

二、提取與分離：

陰乾後之臺灣黃杞樹皮部約 3.12 公斤。將粗幹皮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，得到樹皮部的甲醇粗抽物約 490.2 公克 (Fr. M)，抽出率約為 15.7 %。

將樹皮部的甲醇粗抽物，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 7.4 公克，以氯仿層和水層分配分離出氯仿層 (Fr. C) 共 16.6 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 50.8 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 256.2 公克，最後剩餘水層 (Fr. W) 為 159 公克。

而在臺灣黃杞莖部的提取方面，則是委託本實驗室盧冠宏學長代為進行。陰乾後之莖部約 0.5 公斤。將莖部切段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 48.1 公克 (Fr. M)，抽出率約為 9.6 %。

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 0.6 公克，以氯仿層和水層分配分離出氯仿層 (Fr. C) 共 3.3 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 10.3 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 16.5 公克，最後剩餘水層 (Fr. W) 為 17.4 公克。

成分分離：利用管柱色層層析法(column chromatography)，以 silica gel (70-230 mesh 及 230-400 mesh), Sephadex LH-20, Diaion HP-20 充填在玻璃管柱內為固定相，經不同溶媒梯度沖提管柱，並利用再結晶法純化化合物，結果分離得到七個化合物及一個混合物：

1. 正己烷層(Fr. H)：

β-sitosterol (H-1)

tetracosanoic acid (H-2))

2. 氯仿層(Fr. C)：

betulinic acid (C-1)

2-methoxyjuglone (5-hydroxy-2-methoxy-1,4-naphthoquinone) (C-2)

mixture of betulinic acid and ursolic acid (C-3)

β-sitosterol 3-*O*-glucoside (C-4)

3. 乙酸乙酯層(Fr. E)：

astilbin (dihydroquercetin 3-*O*-rhamnoside) (E-1)

kaempferol 3-*O*-rhamnoside (E-2)

三、實驗抽提流程圖：

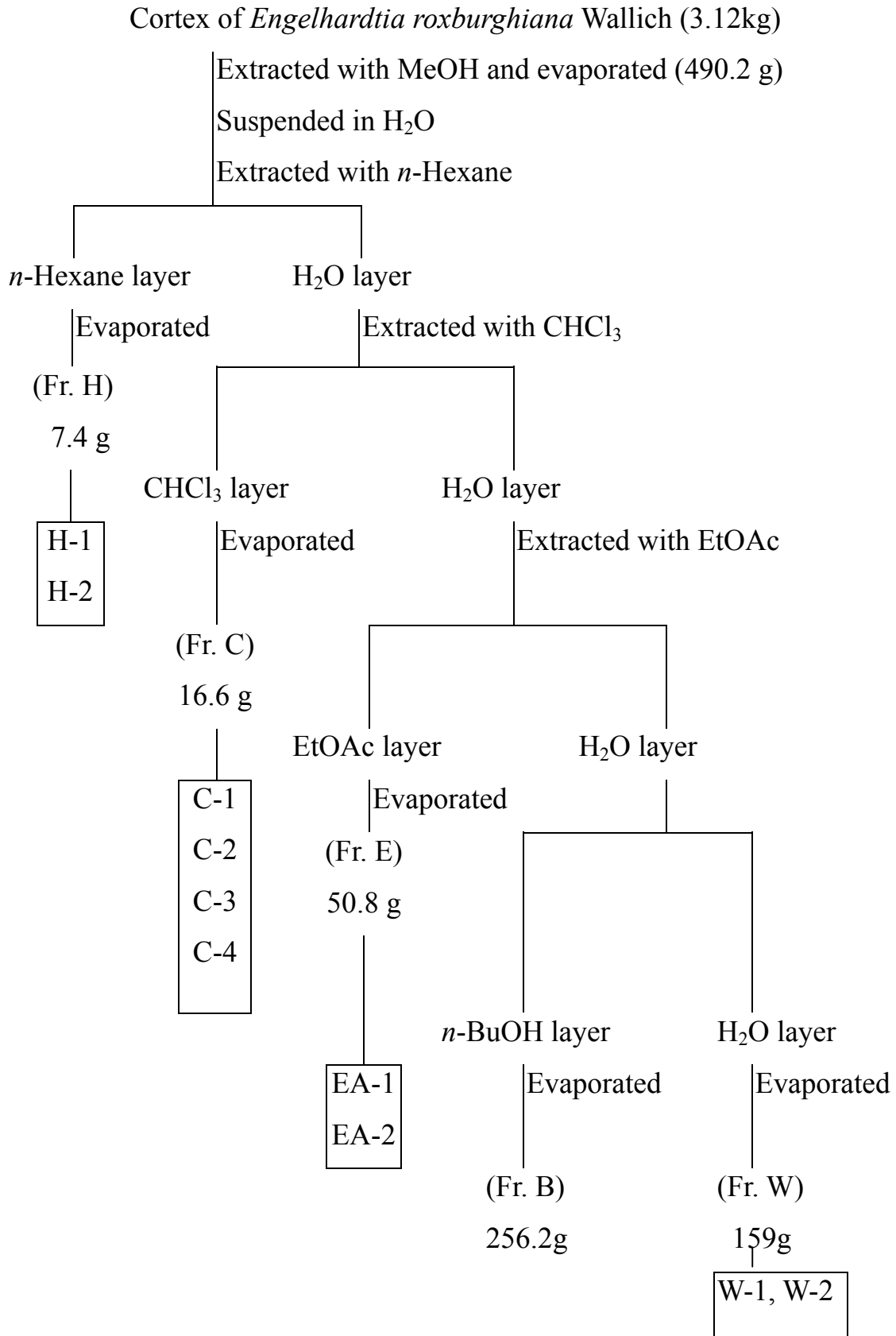


Figure 3-2 臺灣黃杞 *Engelhardtia roxburghiana* Wallich 樹皮部之抽提流程圖

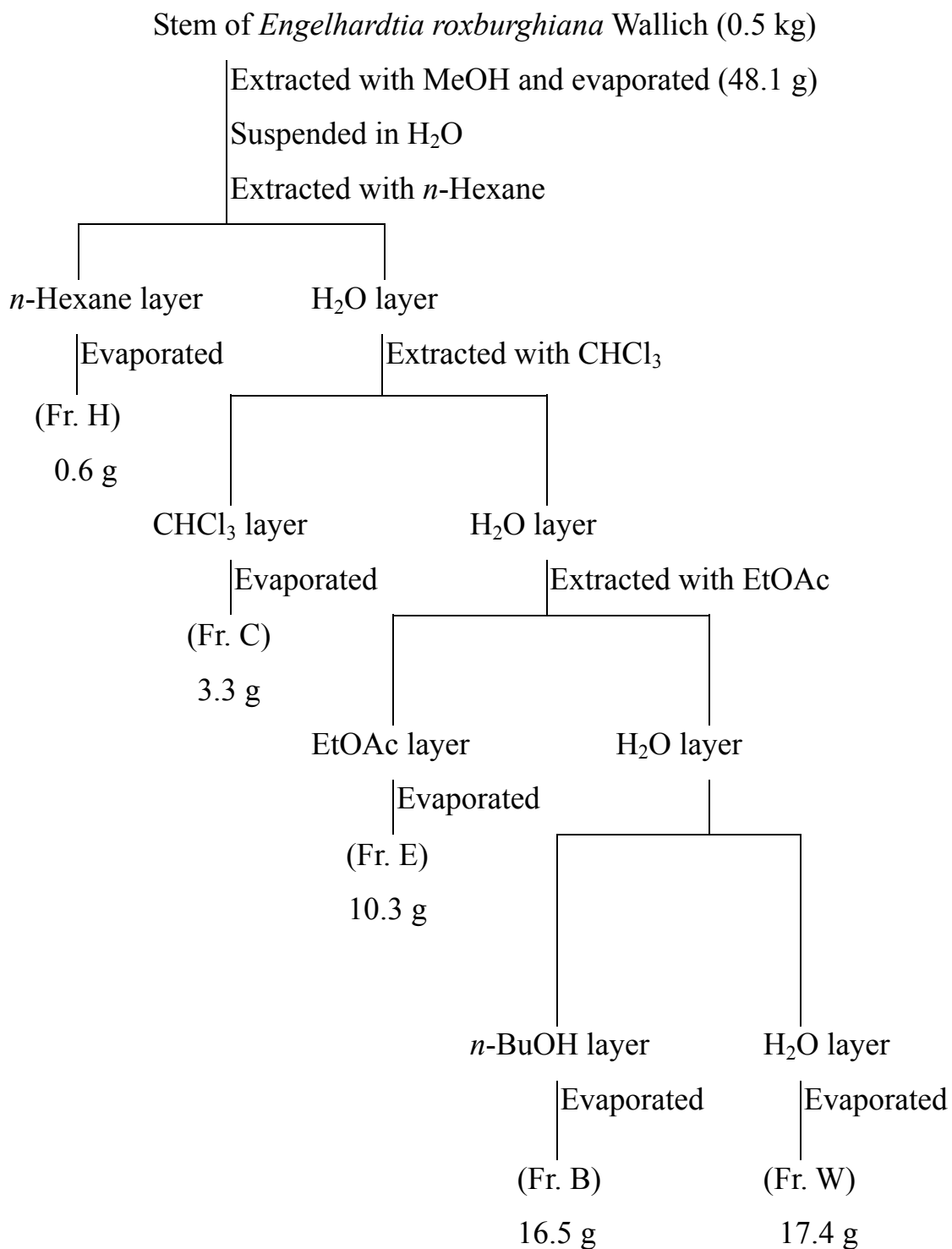


Figure 3-3 臺灣黃杞 *Engelhardtia roxburghiana* Wallich 莖部之抽提流程圖

第三節 臺灣黃杞之藥理活性評估

一、細胞毒殺活性試驗^[28-29]：

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 $\mu\text{g/ml}$ 之待測物。三天後，由 MTS 還原試劑決定細胞存活能力。Actinomycin D 10 μM 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

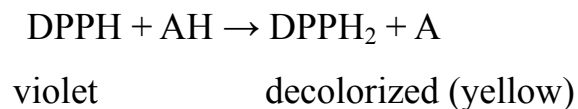
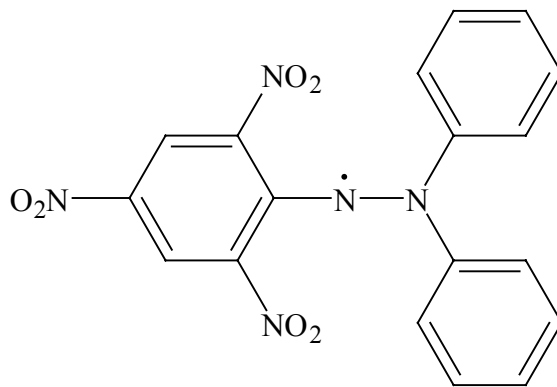
培養人類腫瘤細胞：

NUGC(胃癌細胞)、HONE-1(鼻咽癌細胞)在 Dulbecco's modified eagle's 培養基培養。(5 % CO_2 濕式培養基，維持在 37 $^{\circ}\text{C}$ ，外加 10 % 胎牛血清和非必需胺基酸)。

二、抗氧化活性實驗：

參考 Shyu YS (2002)^[30-34]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 為一相對安定的自由基，熔點為 137°C，其甲醇溶液為紫羅蘭色(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



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。

依 Shyu YS (2002)^[30-34]等之實驗方法及步驟：

1. 先檢測 DPPH (75 μM) 甲醇溶液在可見光 517 nm 之吸收值(A_0)。
2. 將臺灣黃杞甲醇萃取物(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. W)等萃取層，分別配製出 50, 100, 200, 250, 500 μg/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 μM) 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}) 吸收波長測定吸光度，並記錄之。
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)：

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

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 臺灣黃杞各成分之物理性質及光譜數據

【一】 H-1: β -sitosterol

1. 白色粉末 (以氯仿-甲醇再結晶)
2. 熔點：123-124
3. TLC：R_f = 0.6 (CHCl₃)
4. 10% H₂SO₄ spray：藍紫色(110)
5. IR ν_{\max} (KBr) cm⁻¹：3420, 2935, 2850, 1699, 1446, 1373, 1049。
6. MS (*m/z* % ; EI 70 eV)：

414 (M ⁺ , 51.66)	271 (1.69)	255 (18.46)	213 (25.56)
159 (26.03)	145 (41.66)	105 (59.98)	95 (38.63)
81 (69.60)	69 (64)	55 (91.69)	

7. ¹H-NMR (in CDCl₃, 200 MHz) ppm：

5.36	(1H, d, H-6)
3.52	(1H, m, H-3)
0.94	(3H, s, H-19)
0.84	(6H, m, H-26, H-27)
0.68	(3H, s, H-18)

8. ^{13}C -NMR (in CDCl_3 , 50MHz) ppm :

140.6 (C-5)	121.4 (C-6)	71.4 (C-3)	56.5 (C-14)
55.6 (C-17)	49.6 (C-9)	45.4 (C-24)	41.9 (C-4)
41.9 (C-13)	39.4 (C-12)	37.0 (C-1)	36.5 (C-10)
35.9 (C-20)	31.5 (C-7)	31.5 (C-8)	31.5 (C-2)
28.9 (C-25)	28.9 (C-16)	25.7 (C-23)	33.5 (C-22)
23.7 (C-15)	22.7 (C-28)	20.8 (C-11)	19.8 (C-26)
20.8 (C-19)	18.7 (C-27)	18.7 (C-21)	11.6 (C-29)
11.6 (C-18)			

9. DEPT ($\pi/4$, $2\pi/4$, $3\pi/4$, in CDCl_3 , 50 MHz) ppm :

CH_3 : 19.8, 19.4, 19.0, 18.7, 11.9, 11.8

CH_2 : 42.3, 39.7, 37.2, 33.9, 31.6, 29.1, 26.0, 24.3, 23.0, 21.0

CH : 121.7, 71.8, 56.7, 56.0, 50.1, 45.8, 36.1, 31.9, 29.1

【二】 H-2: tetracosanoic acid

1. 白色粉末狀 (以氯仿-甲醇再結晶)
2. 熔點：60-61
3. TLC：R_f = 0.5 (CHCl₃：EtOAc=9：1)
4. 10% H₂SO₄ spray：灰黑色(110)
5. IR ν_{max}(KBr) cm⁻¹：2916, 2849, 1724, 1468。
6. MS (*m/z* % ; EI 70 eV)：

368 (M ⁺ , 16)	354 (2)	340 (4)	326 (3)
199 (1)	185 (4)	171 (2)	129 (15)
101 (4)	97 (19)	85 (21)	83 (37)
73 (79)	60 (85)	57 (100)	

7. ¹H-NMR (in CDCl₃, 200 MHz) ppm：

2.36	(2H, t, <i>J</i> = 8 Hz, H-2)
1.63	(2H, m, H-3)
1.25	(40H, s, br)
0.89	(3H, t, <i>J</i> = 8 Hz, H-24)

8. ¹³C-NMR (in CDCl₃, 50 MHz) ppm：

177.6 (C-1)	33.6 (C-2)	31.8 (C-22)	29.4 (C-4-21)
24.5 (C-3)	22.4 (C-23)	13.9 (C-24)	

【三】 C-1: betulinic acid

1. 無色結晶 (以氯仿-甲醇再結晶)
2. 熔點 : 283-285
3. TLC : $R_f = 0.48$ ($\text{CHCl}_3 : \text{EtOAc} = 7 : 1$)
4. Vanillin/硫酸乙醇溶液 : 紅色→紫紅色→褐色(110)
5. IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3438, 3072, 2945, 1704, 1643, 1446, 1375, 883 °
6. MS (m/z % ; EI 70 eV) :

456 (M^+ , 13)	438 (45)	248 (13)	220 (10)
207 (32)	203 (20)	189 (100)	175 (30)
135 (37)	121 (32)	107 (29)	105 (22)
95 (30)	81 (33)		

7. $^1\text{H-NMR}$ (in CDCl_3 , 200 MHz) ppm :

4.73	(1H, br. s, H-29)
4.61	(1H, br. s, H-29)
3.39	(1H, m, H-3)
1.98	(3H, s, H-30)
0.82、0.99、1.08、1.15、1.21	(3H each, s, $5\times\text{CH}_3$)

8. ^{13}C -NMR (in CDCl_3 , 50 MHz) ppm :

181.3 (C-28)	150.2 (C-20)	109.4 (C-29)	76.2 (C-3)
56.1 (C-17)	50.0 (C-5)	49.0 (C-9)	48.8 (C-19)
46.7 (C-18)	42.3 (C-14)	40.6 (C-8)	38.1 (C-4)
37.2 (C-1)	37.0 (C-13)	36.8 (C-10)	33.9 (C-7)
33.0 (C-22)	31.9 (C-21)	30.3 (C-16)	29.4 (C-23)
29.4 (C-2)	28.0 (C-15)	25.2 (C-12)	21.8 (C-11)
20.4 (C-30)	19.1 (C-6)	17.9 (C-25)	15.8 (C-26)
15.6 (C-24)	14.5 (C-27)		

9. DEPT ($\pi/4$, $2\pi/4$, $3\pi/4$, in CDCl_3 , 50 MHz) ppm :

CH_3 : 28.2, 22.0, 19.3, 15.9, 15.8, 14.7

CH_2 : 109.6, 37.0, 34.1, 33.2, 32.1, 30.5, 29.6, 25.4, 20.6, 18.1

CH : 76.2, 50.2, 49.2, 49.0, 46.9, 38.3

【四】 C-2: 2-methoxyjuglone

(5-hydroxy-2-methoxy-1,4-naphthoquinone)

1. 橘黃色針晶 (以甲醇再結晶)
2. 熔點 : 149-151
3. TLC : $R_f = 0.4$ (*n*-Hexane : $\text{CHCl}_3 = 1 : 4$)
4. 10% H_2SO_4 spray : 黃色(110)
5. IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3075, 2918, 1678 , 1634, 1596, 1470, 1372 °
6. MS (m/z % ; EI 70 eV) :

204.2 (M^+ , 100)	189 (17)	175 (21)	174 (31)
149 (7)	118 (15)	105 (24)	63 (11)

7. $^1\text{H-NMR}$ (in CDCl_3 , 200 MHz) ppm :

12.23	(1H, s, OH)
7.69	(1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8)
7.61	(1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-7)
7.28	(1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6)
6.11	(1H, s, H-3)
3.93	(3H, s, OCH_3)

8. ^{13}C -NMR (in CDCl_3 , 50 MHz) ppm :

179.1 (C-1)	190.5 (C-4)	100.1 (C-2)	160.8 (C-5)
109.2 (C-3)	119.3 (C-6)	113.9 (C-10)	135.2 (C-7)
130.8 (C-9)	124.9 (C-8)	56.4 (C-11)	

9. DEPT ($\pi/4$, $2\pi/4$, $3\pi/4$, in CDCl_3 , 50 MHz) ppm :

CH_3 : 56.4

CH : 135.2, 124.9, 119.3, 109.2

【五】 C-3: mixture of betulinic acid and ursolic acid

1. 白色粉末狀 (以氯仿-甲醇再結晶)
2. 熔點：285-290
3. TLC：R_f = 0.4 (CHCl₃：EtOAc = 7：1)
4. Vanillin/硫酸乙醇溶液：紅色→紫紅色→褐色(110)
5. IR ν_{max}(KBr) cm⁻¹：3443, 2935, 2864, 1739, 1684, 1454, 1366, 1241。
6. MS (*m/z* % ; EI 70 eV)：

456 (M ⁺)	438 (36)	423 (16)	248 (100)
219 (11)	207 (2)	189 (59)	175 (20)
133 (40)	119 (22)	107 (20)	105 (22)
95 (19)	81 (22)		

7. ¹H-NMR (in CDCl₃, 200 MHz) ppm：

4.73	(1H, br. s, H-29)
4.61	(1H, br. s, H-29)
3.49	(1H, m, H-3)
1.89	(3H, s, H-30)
0.94、1.03、1.08、1.13、1.15	(3H each, s, 5×CH ₃)

8. ^{13}C -NMR (in CDCl_3 , 50 MHz) ppm :

170.6 (C-28)	150.2 (C-20)	109.4 (C-29)	80.7 (C-3)
78.1 (C-3)	125.4 (C-12)	138.3 (C-13)	56.2 (C-17)
55.0 (C-5)	50.0 (C-9)	49.0 (C-19)	47.2 (C-18)
42.3 (C-14)	40.6 (C-8)	39.3 (C-4)	38.7 (C-1)
38.1 (C-13)	37.4 (C-10)	33.8 (C-7)	31.9 (C-22)
30.3 (C-21)	29.4 (C-16)	27.8 (C-23)	27.8 (C-2)
27.5 (C-15)	25.2 (C-12)	20.9 (C-11)	19.1 (C-30)
17.8 (C-6)	15.9 (C-25)	15.6 (C-26)	15.2 (C-24)
14.6 (C-27)			

9. DEPT ($\pi/4$, $2\pi/4$, $3\pi/4$, in CDCl_3 , 50 MHz) ppm :

CH_3 : 28.0, 19.3, 18.0, 16.1, 15.9, 15.3, 15.2, 14.5

CH_2 : 109.3, 40.0, 38.7, 35.6, 34.3, 29.8, 27.4, 25.1, 20.9, 18.3

CH : 78.7, 80.9, 125.6, 55.3, 50.4, 48.3, 47.9, 38.0

【六】 C-4: β -sitosterol 3-*O*-glucoside

1. 白色粉末 (以甲醇再結晶)
2. 熔點：300°C 以上
3. TLC：R_f = 0.45 (CHCl₃ : MeOH = 9 : 1)
4. 10% H₂SO₄ spray：藍紫色(110)
5. IR ν_{\max} (KBr) cm⁻¹：3410, 2960, 2870, 1647, 1446, 1078, 1024。
6. MS (*m/z* % ; FAB) :

599 (M ⁺ + Na)	397 (13)	395 (5)	307 (21)
289 (11)	176 (7)	154 (100)	136 (74)
91 (34)	77 (24)		

7. ¹H-NMR (in Pyridine-*d*₅, 200 MHz) ppm :

5.36	(br, s, H-6)
5.05	(2H, d, H-1')
4.56, 4.34, 4.31, 4.29, 4.28	(5H, m, glu-H)
4.08	(1H, m, H-3)
1.08	(3H, s, H-19)
1.02	(3H, d, H-21)
0.69	(3H, s, H-18)

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

140.4 (C-5)	121.5 (C-6)	102.0 (C-1')	79.2 (C-3)
77.8 (C-3')	74.7 (C-5')	71.1 (C-4')	62.2 (C-2')
60.0 (C-6')	56.4 (C-14)	55.8 (C-17)	53.4 (C-9)
49.9 (C-24)	49.1 (C-13)	45.6 (C-12)	45.6 (C-4)
43.4 (C-1)	42.0 (C-10)	39.5 (C-20)	39.5 (C-7)
38.8 (C-8)	37.0 (C-2)	35.9 (C-16)	35.9 (C-25)
33.2 (C-23)	32.7 (C-22)	31.7 (C-15)	28.1 (C-28)
25.8 (C-11)	24.1 (C-26)	22.9 (C-19)	22.9 (C-27)
20.8 (C-21)	18.9 (C-18)	13.8 (C-29)	

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

CH_3 : 23.4, 22.9, 22.6, 22.4, 15.5, 15.5

CH_2 : 65.5, 43.6, 42.4, 41.1, 37.7, 35.7, 35.7, 32.9, 32.0, 28.1, 26.8, 24.9, 23.5

CH : 125.8, 104.9, 82.9, 80.4, 79.8, 77.4, 74.0, 60.6, 59.9, 54.0, 49.7, 39.9,
33.4, 29.8

【七】 E-1: astilbin

1. 淡黄色針晶 (以甲醇再結晶)
2. 熔點：179-181
3. TLC：R_f = 0.45 (EtOAc：CHCl₃ = 9：1)
4. 10% H₂SO₄ spray：黄色(110)
5. IR ν_{max}(KBr) cm⁻¹：3446, 2927, 1646, 1608, 1558, 1361, 1087, 813 °
6. MS (*m/z* % ; FAB) :

451 (M+H) ⁺	305 (M+H) ⁺ -146	289 (14)	286 (5)
176 (4)	154 (100)	136 (69)	107 (22)
89 (18)	77 (17)	65 (6)	

7. ¹H-NMR (in DMSO-*d*₆, 200 MHz) ppm :

7.29	(1H, d, <i>J</i> = 2.1 Hz, H-2')
7.73	(1H, dd, <i>J</i> = 8.8, 2.1 Hz, H-6')
6.89	(1H, d, <i>J</i> = 8.8 Hz, H-5')
6.37	(1H, d, <i>J</i> = 2.0 Hz, H-8)
6.17	(1H, d, <i>J</i> = 2.0 Hz, H-6)
5.20	(1H, dd, <i>J</i> = 10 Hz, H-3)
4.64	(1H, dd, <i>J</i> = 10 Hz, H-2)
3.06-3.96	(m, sugar-H)
1.04	(1H, d, <i>J</i> = 6.0 Hz, H-6'')

8. ^{13}C -NMR (in $\text{DMSO-}d_6$, 50 MHz) ppm :

194.2 (C-4)	163.7 (C-5)	167.3 (C-7)	144.8 (C-3')
145.7 (C-4')	82.2 (C-2)	76.9 (C-3)	96.0 (C-6)
94.9 (C-8)	162.4 (C-9)	100.8 (C-10)	127.0 (C-1')
113.9 (C-2')	114.9 (C-5')	118.9 (C-6')	100.5 (C-1'')
70.5 (C-2'')	70.1 (C-3'')	71.6 (C-4'')	68.9 (C-5'')
16.3 (C-6'')			

9. DEPT ($\pi/4$, $2\pi/4$, $3\pi/4$, in $\text{DMSO-}d_6$, 50 MHz) ppm :

CH_3 : 18.0

CH : 81.9, 76.3, 95.8, 94.3, 114.5, 115.3, 119.3, 100.7, 70.7, 70.5, 71.5, 69.4

【八】 E-2: kaempferol 3-*O*-rhamnoside

1. 黃色粉末 (以甲醇再結晶)
2. 熔點 : 172-174
3. TLC : $R_f = 0.5$ (EtOAc : $\text{CHCl}_3 = 9 : 1$)
4. 10% H_2SO_4 spray : 黃色(110)
5. IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3307, 2927, 1660, 1614, 1496, 1456, 1363, 1060 °
6. MS (m/z % ; FAB) :

435 (M+H) ⁺	289 (M+H) ⁺ -146	286 (57)	176 (16)
167 (13)	154 (100)	149 (43)	136 (82)
133 (51)	126 (33)	112 (64)	105 (64)
77 (38)	69 (58)	57 (86)	51 (11)

7. ¹H-NMR (in DMSO-*d*₆, 200 MHz) ppm :

7.74	(2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2' and H-6')
6.90	(2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3' and H-5')
6.36	(1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8)
6.16	(1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6)
3.09-3.96	(m, sugar-H)
0.78	(1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-6'')

8. ^{13}C -NMR (in $\text{DMSO-}d_6$, 50 MHz) ppm :

177.8 (C-4)	161.4 (C-5)	164.9 (C-7)	134.3 (C-3)
160.1 (C-4')	156.7 (C-2)	94.0 (C-6)	99.0 (C-8)
157.4 (C-9)	104.1 (C-10)	120.7 (C-1')	130.8 (C-2')
130.8 (C-6')	115.6 (C-3')	115.6 (C-5')	101.9 (C-1'')
70.5 (C-2'')	70.8 (C-3'')	71.3 (C-4'')	70.3 (C-5'')
17.5 (C-6'')			

9. DEPT ($\pi/4$, $2\pi/4$, $3\pi/4$, in $\text{DMSO-}d_6$, 50 MHz) ppm :

CH_3 : 17.8

CH : 94.0, 99.0, 130.9, 115.8, 102.1, 71.5, 70.9, 70.7, 70.5

第二節 臺灣黃杞之藥理活性試驗結果

一、細胞毒殺活性試驗：

將臺灣黃杞甲醇萃取物(Fr. M)以不同溶媒分別萃取後，分成正己烷層(Fr. H)、氯仿層(Fr. C)、乙酸乙酯層(Fr. E)，正丁醇層(Fr. B)、水層(Fr. w)及沈澱物(Fr. P)等。以 MTS 分析法試驗臺灣黃杞各萃取層之細胞毒殺活性，結果發現臺灣黃杞樹皮部之甲醇抽出物及各種有機溶媒萃取層中，以正己烷層及氯仿層對 NUGC-3 及 HONE-1 兩種癌細胞具有明顯抑制作用；而在莖部之甲醇抽出物及各種有機溶媒萃取層中，以正己烷層及氯仿層對 NUGC-3 癌細胞具有明顯抑制作用。此部分結果委託國家衛生研究院代為測試。(詳見 Table 4-1, Table 4-2)

Table 4-1 臺灣黃杞樹皮部各層對細胞毒殺活性測試結果

Cell Line		NUGC-3 50 µg/mL	HONE-1 50 µg/mL
Plant			
<i>Engelhardtia roxburghiana</i>	Fr. M	88%	86%
	Fr. H	<1%	27%
	Fr. C	1%	6%
	Fr. E	85%	>100%
	Fr. B	>100%	96%
	Fr. W	>100%	>100%
	Fr. P	>100%	93%

(1) Sample conc.: 50 µg/mL ;

(2) 以%表 cell 之存活率，小於 50%表示有效。

Table 4-2 臺灣黃杞莖部各層對細胞毒殺活性測試結果

Plant		Cell Line	NUGC-3 50 $\mu\text{g/mL}$	HONE-1 50 $\mu\text{g/mL}$
<i>Engelhardtia roxburghiana</i>	Fr. M		88%	51%
	Fr. H		1%	87%
	Fr. C		<1%	75%
	Fr. E		99%	88%
	Fr. B		98%	89%
	Fr. W		101%	87%
	Fr. P		99%	90%

(1) Sample conc.: 50 $\mu\text{g/mL}$;

(2) 以%表 cell 之存活率，小於 50%表示有效。

二、抗氧化活性試驗：

依 Shyu YS (2002) 等之方法，以 DPPH 自由基清除能力之試驗，測試臺灣黃杞樹皮部甲醇萃取物(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. W)等萃取層，結果發現臺灣黃杞樹皮部之甲醇萃取物、乙酸乙酯層、正丁醇層、水層及沉澱物具有顯著的抗氧化活性。

本實驗以 Quercetin 及 Vit. E (α -tocopherol) 為正對照組。(詳見 Table 4-3, Figure 4-1)

Table 4-3 Scavenging effect (%) of the fractions of *Engelhardtia roxburghiana*

Sample conc. Fraction	50 μ g/mL	100 μ g/mL	200 μ g/mL	250 μ g/mL	500 μ g/mL
Fr. M	66.77	84.55	97.06	97.14	99.81
Fr. H	44.67	49.28	50.00	52.60	63.77
Fr. C	56.19	63.69	80.57	89.10	99.66
Fr. E	72.17	91.82	94.31	95.11	98.39
Fr. B	75.37	95.99	97.91	98.44	99.10
Fr. W	48.72	55.64	66.69	76.45	93.13
*Quercetin	93.65	94.30	94.42	94.69	97.16
*Vit. E	76.26	93.95	94.44	94.86	97.17

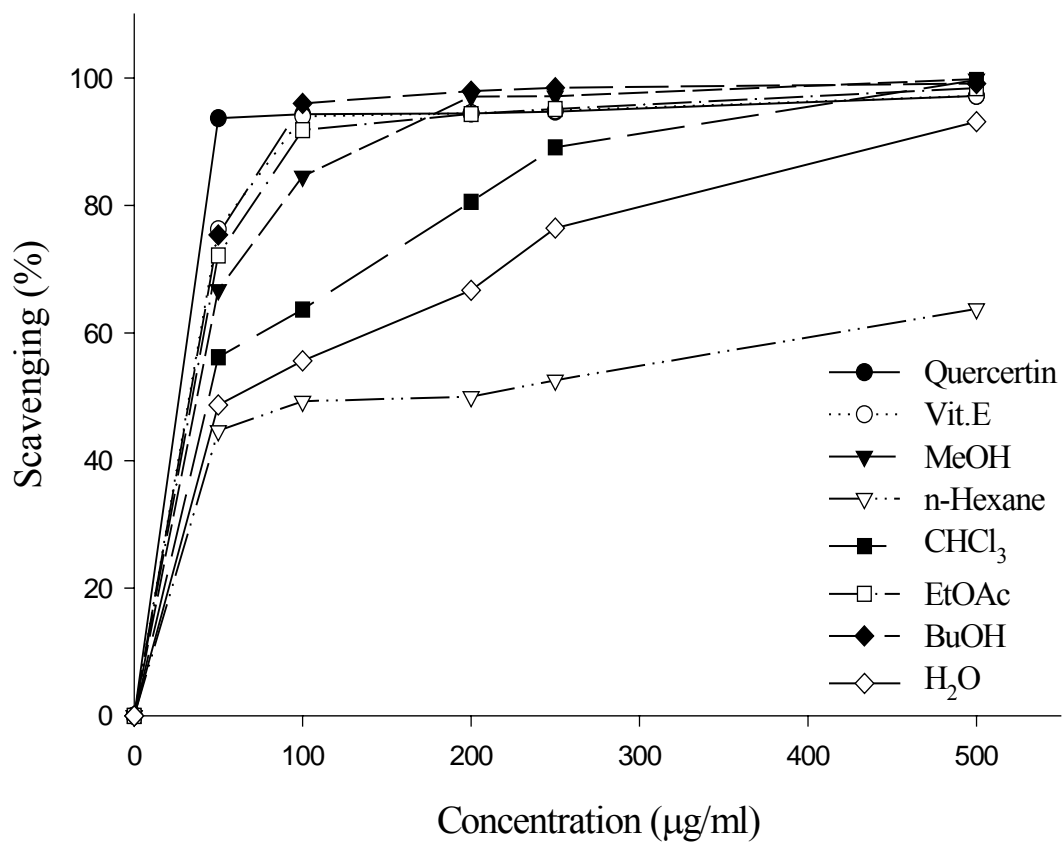
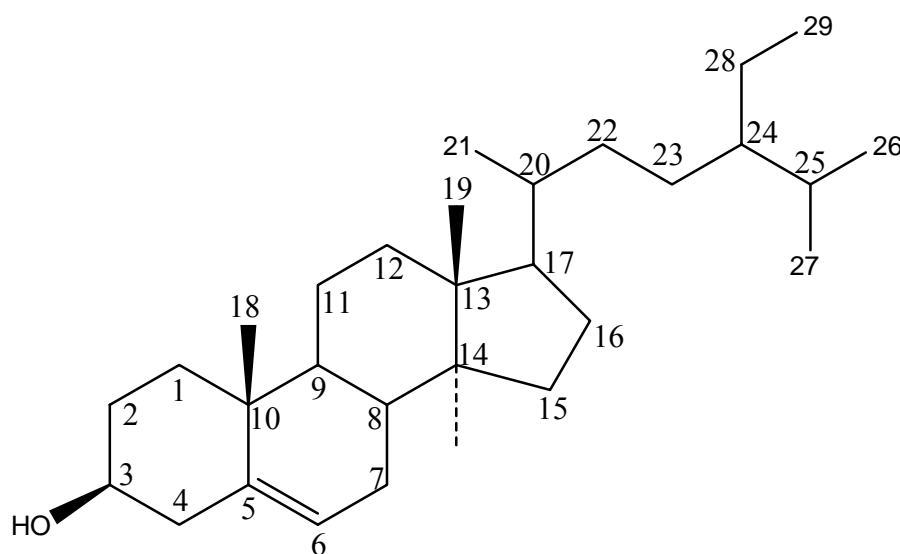


Figure 4-1 Scavenging effect (%) of the fractions of *E. roxburghiana*

第五章 討 論

第一節 臺灣黃杞化學成分之結構鑑定

【一】H-1: β -sitosterol



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 123-124°C，可溶於氯仿，其 TLC 片經溶媒(*n*-Hexane:CHCl₃ = 5:1)展開後，R_f 值為 0.45，噴 10% H₂SO₄ 溶液，加熱後呈由紅色變為紫色，再變為墨綠色。

IR 圖譜(Chart 1)顯示在 3420 cm⁻¹ 有 -OH 基特性吸收，2935 cm⁻¹ 及 2850 cm⁻¹ 為飽和碳氫鍵伸縮振動之特性吸收，1446 cm⁻¹ 為 CH₂ 之特性吸收。

MS 圖譜(Chart 2) M^+ (m/z %)顯示分子離子峰為 414，其裂片斷裂型式與 β -sitosterol 相同，推測分子式為 $C_{29}H_{50}O$ 。

1H -NMR 圖譜(Chart 3)顯示 δ 5.36 (1H, d, H-6)為雙鍵上 H-6 之質子訊號， δ 3.52 (1H, m, H-3)為 C-3 連接-OH 基之次甲基的質子訊號， δ 0.68-2.28 (m)為植物固醇特有訊號。

^{13}C -NMR 圖譜(Chart 4)顯示 δ 140.60 (C-5), 121.45 (C-6)分別為環上雙鍵 C-5 及 C-6 之碳原子訊號， δ 71.44 (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 CH_3 ，分別為 δ 19.5 (C-26), 19.1 (C-19), 18.7 (C-27), 18.5 (C-21), 11.7 (C-29), 11.6 (C-18)。有十一個碳原子訊號屬於 CH_2 ，分別為 δ 42.0 (C-4), 39.5 (C-12), 37.0 (C-1), 31.4 (C-2), 31.6 (C-7), 28.9 (C-16), 24.0 (C-15), 22.8 (C-28), 20.8 (C-11), 33.7 (C-22), 25.8 (C-23)。有九個碳原子屬於 CH ，分別為 δ 121.4 (C-6), 71.5 (C-3), 56.5 (C-14), 55.8 (C-17), 50.6 (C-9), 45.6 (C-24), 36.2 (C-20), 31.6 (C-8), 28.9 (C-25)。其餘的三個碳原子訊號屬於四級碳，分別為 δ 140.5 (C-5)、 δ 36.5 (C-10)及 δ 42.3 (C-13)。

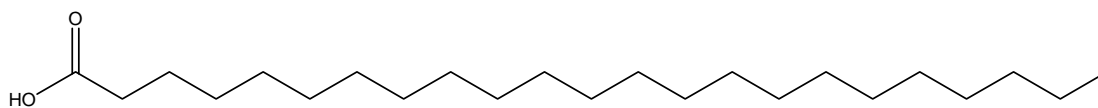
(詳見 Table 5-1)

Table 5-1 化合物H-1 碳譜數據與文獻^[35,36] β -sitosterol 碳譜數據比對表

No. of C	δ_c of H-1	δ_c of literature data
C-1	37.0	37.3
C-2	31.4	31.7
C-3	71.4	71.8
C-4	42.0	42.3
C-5	140.6	140.8
C-6	121.4	121.7
C-7	31.6	31.9
C-8	31.6	31.9
C-9	49.6	50.2
C-10	36.5	36.5
C-11	20.8	21.1
C-12	39.5	39.8
C-13	42.3	42.3
C-14	56.5	56.8
C-15	24.0	24.3
C-16	28.9	28.2
C-17	55.6	56.1
C-18	11.6	11.9
C-19	19.1	19.8
C-20	35.9	36.2
C-21	18.5	18.8
C-22	33.7	34.0
C-23	25.8	26.1
C-24	45.6	45.9
C-25	28.9	29.2
C-26	19.5	19.4
C-27	18.7	19.0
C-28	22.8	23.1
C-29	11.7	12.0

綜合以上光譜資料與文獻^[35-36]比對，推定此化合物為 β -sitosterol。

【二】 H-2: tetracosanoic acid



化合物 H-2 於正己烷層中得到，為白色固體粉末，以氯仿-甲醇再結晶，熔點 60-61°C，可溶於正己烷、氯仿，其 TLC 片經溶媒(CHCl₃: EtOAc=9:1) 展開後，R_f 值為 0.5，噴 10% H₂SO₄ 溶液，加熱後呈灰黑色。

IR 圖譜(Chart 6)顯示 2915 cm⁻¹ 及 2848 cm⁻¹ 為飽和碳氫的特性吸收，1724 cm⁻¹ 為 carbonyl group 的特性吸收，1467 cm⁻¹ 為 -CH₃ 基。

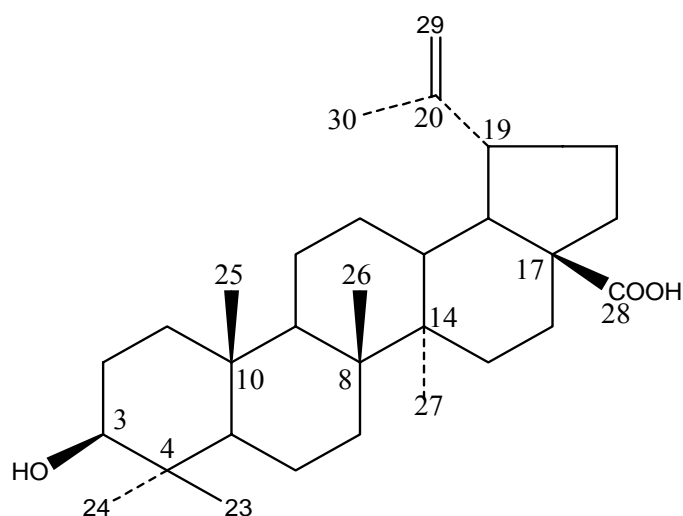
MS 圖譜(Chart 7) M⁺ (m/z %)顯示分子量為 368，推測分子式為 C₂₄H₄₈O₂。

¹H-NMR 圖譜(Chart 8)顯示 δ 2.36 (2H, t) 為 H-2 的吸收訊號，δ 1.25 (44H, s, br) 為長鏈 methylene (-CH₂-) 的吸收訊號，δ 0.87 (3H, t) 為長鏈末端甲基之吸收訊號。

¹³C-NMR 圖譜(Chart 9)顯示 δ 177.5 為 carboxyl carbon 的吸收訊號，δ 22.4~33.6 為長鏈 methylene (-CH₂-) 的吸收訊號，δ 13.8 為長鏈末端甲基之吸收訊號。

綜合上述資料與文獻值^[37-38] 比對，確認此化合物之結構為 tetracosanoic acid。

【三】 C-1 : betulinic acid



化合物 C-1 於氯仿層中得到，為無色結晶，以氯仿-甲醇再結晶，熔點 283-285°C，可溶於 pyridine，TLC 片以溶媒(CHCl₃ : EtOAc=7 : 1)展開後，R_f 值為 0.48，噴 vanillin/硫酸乙醇溶液，加熱後呈色變化為紅色→紫紅色→褐色，推測可能為三萜類化合物。

IR 圖譜(Chart 10)顯示在 3438 cm⁻¹ 為 OH 的特性吸收，1704 cm⁻¹ 為 carbonyl group 的特性吸收，1446 cm⁻¹ 為 CH₂ 的特性吸收，1375 cm⁻¹ 為 CH₃ 的特性吸收。

MS 圖譜(Chart 11) M⁺ (m/z %)顯示分子量為 456，推測分子式為 C₃₀H₄₈O₃。(詳見 Figure 5-1)

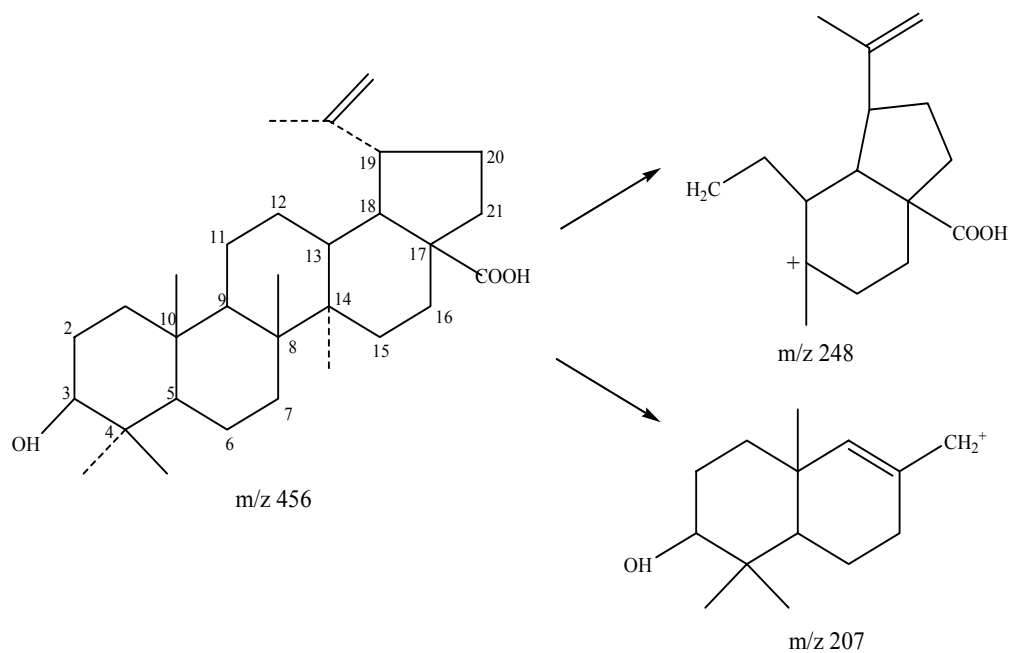


Figure 5-1 betulinic acid 之質譜(MS)斷裂方式

$^1\text{H-NMR}$ 圖譜(Chart 12)顯示 δ 0.82, 0.84, 0.93, 1.07, 1.20, 1.98 (s) 分別為六個四級碳上甲基之質子訊號, δ 4.61, 4.73 (2H, br. s) 為雙鍵上 H-29 之質子訊號; δ 3.39 (1H, s) 為 C-3 連接-OH 之次甲基的質子訊號。

$^{13}\text{C-NMR}$ 圖譜(Chart 13)及 DEPT 圖譜(Chart 14)中顯示 δ 150.2, 109.4 分別為環外雙鍵 C-20, C-29 之碳原子訊號; δ 76.24 為接-OH 基 C-3 之碳原子訊號。 δ 181.3 為 COOH 上 C-28 之碳原子訊號。

(詳見 Table 5-2)

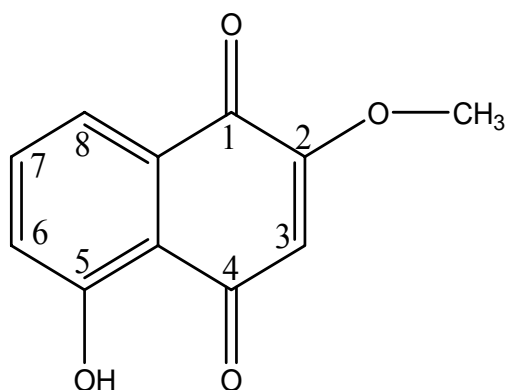
Table 5-2: 化合物 C-1 碳譜數據與文獻^[39-41] betulinic acid 碳譜數據比對表

No. of C	δ_c of C-1	δ_c of literature data
C-1	38.1	39.3
C-2	28.0	28.3
C-3	76.2	78.1
C-4	40.6	39.5
C-5	50.0	55.9
C-6	19.1	18.8
C-7	33.9	34.8
C-8	40.6	41.1
C-9	48.8	50.9
C-10	37.2	37.5
C-11	21.8	21.2
C-12	25.2	26.1
C-13	38.1	38.6
C-14	42.2	42.8
C-15	31.9	31.2
C-16	33.0	32.9
C-17	56.1	56.6
C-18	46.7	47.8
C-19	49.0	49.8
C-20	150.2	151.3
C-21	30.3	30.2
C-22	38.1	37.6
C-23	28.0	28.6
C-24	17.9	16.3
C-25	15.7	16.4
C-26	15.6	16.4
C-27	14.5	14.9
C-28	181.3	178.9
C-29	109.4	109.9
C-30	20.4	19.4

綜合以上光譜資料與文獻^[39-41]比對，推定此化合物為 betulinic acid。

【四】 C-2: 2-methoxyjuglone

(5-hydroxy-2-methoxy-1,4-naphthoquinone)



化合物 C-2 氣仿層中得到，為橘黃色針晶，以甲醇再結晶，熔點 149-151°C，可溶於氯仿、甲醇，其 TLC 片經溶媒(*n*-Hexane : CHCl₃ = 1 : 4)展開後，R_f 值為 0.4，噴 10% H₂SO₄ 溶液，加熱後呈黃色。

IR 圖譜(Chart 15)顯示 3420 cm⁻¹ 有 -OH 基的吸收訊號，1678 cm⁻¹ 有 carbonyl group 的特性吸收，1596, 1470, 1443cm⁻¹ 有芳香環之共軛雙鍵特性吸收。

MS 圖譜(Chart 16) M⁺ (*m/z* %)顯示分子量為 204.2，推測分子式為 C₁₁H₈O₄。

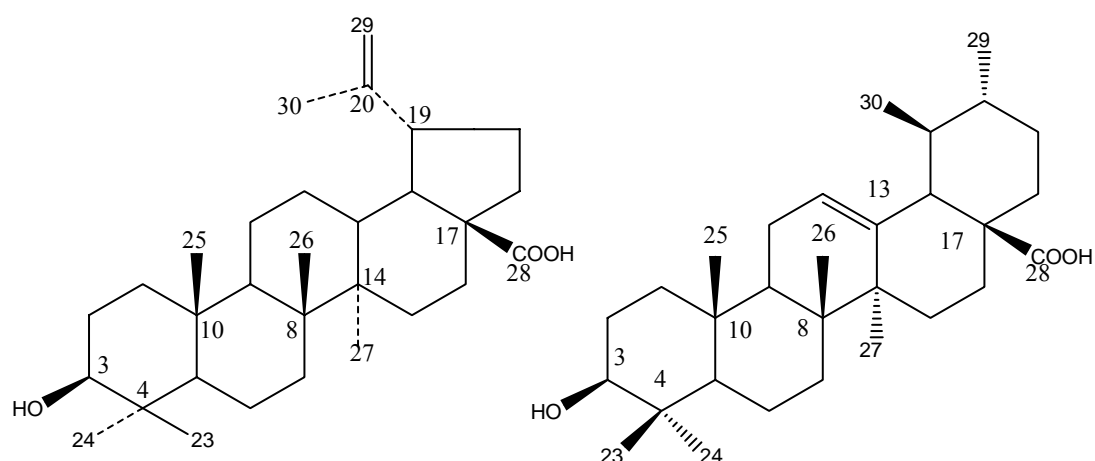
¹H-NMR 圖譜(Chart 17)顯示 δ 12.23 (1H, s, OH) 為 C-5 連接 -OH 的訊號。δ 7.69 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 7.61 (1H, dd, *J* = 8.0 and 2.0 Hz, H-7), 7.28 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6) 為 Vicinal Naphthalene Hs 的原子訊號。另外，δ 3.93 (3H, s, OCH₃) 為甲氧基之訊號。

^{13}C -NMR 圖譜(Chart 18)中顯示共有十一個碳原子吸收訊號，其中 δ 179.1, δ 190.5 為 1,4-naphthoquinone 上 carbonyl group 的碳原子吸收訊號， δ 160.8 為 C-5 上接 hydroxyl group 之碳原子吸收訊號， δ 56.4 為 C-2 上甲氧基之碳原子訊號。

由 ^{13}C -NMR 圖譜(Chart 18) DEPT 圖譜(Chart 19)中顯示共有十一個碳原子吸收訊號，其中有一個碳原子訊號是屬於 CH_3 ，為 δ 56.4 (2-O CH_3)。有四個碳原子訊號屬於 CH ，分別為 δ 135.4 (C-7), 125.1 (C-8), 119.5 (C-6), 109.4 (C-3)。其餘的六個碳原子訊號屬於四級碳，分別為 δ 160.8 (C-5), 190.5 (C-4), 179.1 (C-1), 100.1 (C-2), 130.8 (C-9), 113.9 (C-10)。另外， δ 56.4 為 C-2 上之-O CH_3 基之吸收訊號。

綜合上述資料與文獻^[43-45]比對，確認此化合物之結構為 2-methoxyjuglone (5-hydroxy-2-methoxy-1,4-naphthoquinone)。

【五】 C-3: mixture of betulinic acid and ursolic acid



混合物 C-3 於氯仿層中得到，為白色固體粉末，以氯仿-甲醇再結晶，熔點 285-290°C，可溶於 pyridine，TLC 片以溶媒(CHCl₃ : EtOAc=7 : 1)展開後，R_f 值為 0.4，噴 vanillin/硫酸乙醇溶液，加熱後呈色變化為紅色→紫紅色→褐色，推測可能為三萜類化合物。

IR 圖譜(Chart 20)顯示在 3442 cm⁻¹ 為 OH 的特性吸收，1738 cm⁻¹ 為 carbonyl group 的特性吸收，1454 cm⁻¹ 為 CH₂ 的特性吸收，1366 cm⁻¹ 為 CH₃ 的特性吸收。

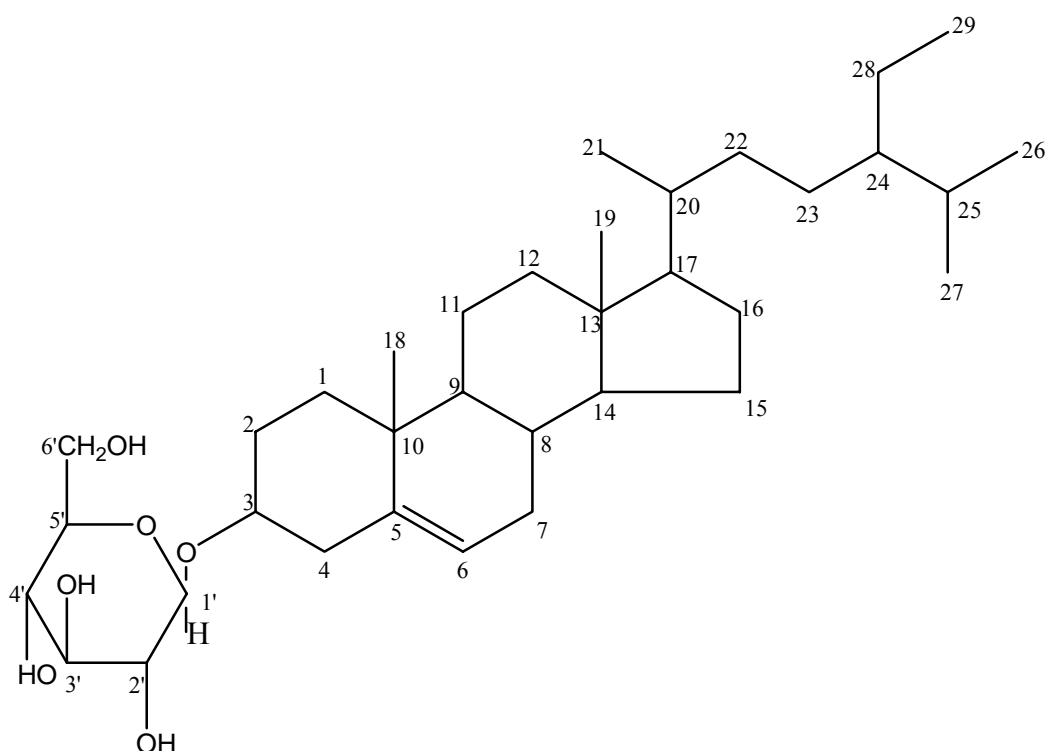
MS 圖譜(Chart 21) M⁺ (m/z %)顯示分子量為 456，推測分子式為 C₃₀H₄₈O₃。

$^1\text{H-NMR}$ 圖譜(Chart 22)顯示 δ 0.76, 0.79, 0.85, 0.94, 1.20, 1.88 (s) 分別為六個四級碳上甲基之質子訊號, δ 4.60, 4.73 (2H, br. S) 為雙鍵上 H-29 之質子訊號; δ 3.49 (1H, m) 為 C-3 連接-OH 之次甲基的質子訊號; 5.17 (1H, s) 為環上雙鍵 H-12 之質子訊號, 2.12 (dd) 則為 H-18 的質子訊號。

$^{13}\text{C-NMR}$ 圖譜(Chart 23)顯示 δ 150.1, 109.3 分別為環外雙鍵 C-20, C-29 之碳原子訊號; δ 78.14, 80.71 為帶有-OH 基 C-3 之碳原子訊號; δ 170.6 為 carbonyl group 之碳原子訊號; δ 138.3, 125.4 分別為環上雙鍵碳原子訊號。

綜合以上光譜資料並與文獻^[42,46-48]比對, 推測其結構應為 mixture of betulinic acid and ursolic acid。

【六】 C-4: β -sitosterol-3-O-glucoside



化合物 C-4 於氯仿層中得到，為白色粉末，以氯仿、甲醇再結晶，熔點 300°C 以上，可溶於 pyridine，其 TLC 片經溶媒(CHCl_3 : MeOH = 7 : 1)展開後， R_f 值為 0.5，噴 10% H_2SO_4 溶液，加熱後呈藍紫色。

IR 圖譜(Chart 25)顯示在 3410 cm^{-1} 有 $-\text{OH}$ 基特性吸收， 1647 cm^{-1} 及 1446 cm^{-1} 有 CH_2 及 CH_3 彎角振動之特性吸收， $1078, 1024\text{ cm}^{-1}$ 為醚基($\text{C}-\text{O}-\text{C}$)之特性吸收。

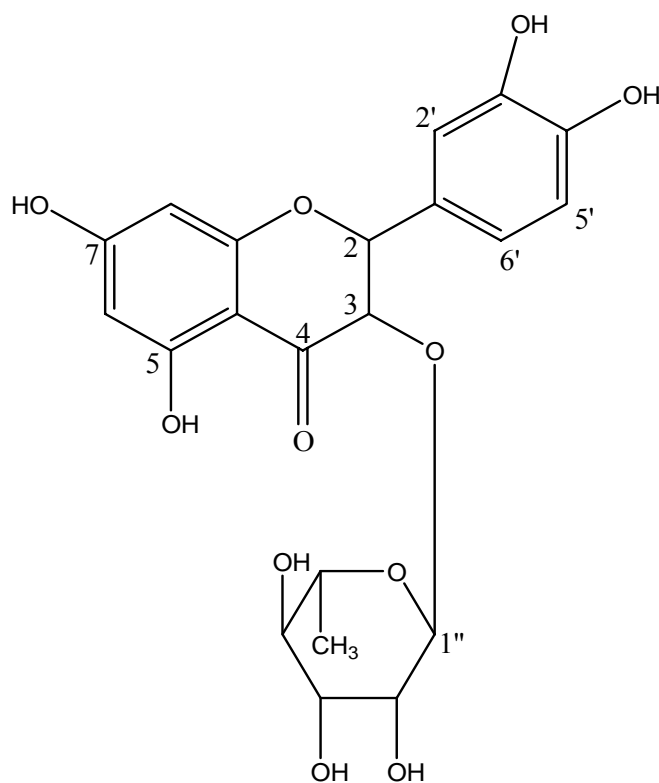
FAB-MS 圖譜(Chart 26) M^+ (m/z %)顯示 599 ($\text{M}^+ + \text{Na}$) 為分子離子峰，推測分子量為 576，分子式為 $\text{C}_{35}\text{H}_{60}\text{O}_6$ 。

$^1\text{H-NMR}$ 圖譜(Chart 27)顯示 δ 5.36 (1H, br)為雙鍵上 H-6 之質子訊號； δ 5.05 (2H, d)為 glucose 上 H-1'之質子訊號； δ 0.61-2.31 (m)為植物固醇特有訊號， δ 3.95-4.53(m)為糖基上質子的吸收訊號。

$^{13}\text{C-NMR}$ 圖譜(Chart 28)顯示 δ 140.4 (C-5), 121.5 (C-6)分別為環上雙鍵 C-5 及 C-6 之碳原子訊號， δ 79.2 (C-3)為帶有-OH 基的 C-3 之碳原子訊號， δ 102.0, 77.8, 74.7, 71.1, 62.2, 59.9 為 glucose 上之碳原子訊號。

綜合以上光譜資料經與文獻^[40]比對推測其結構應為 β -sitosterol-3-O-glucoside。

【七】 E-1: astilbin (dihydroquercetin 3-*O*-rhamnoside)



化合物 E-1 乙酸乙酯層中得到，為淡黃色針晶，以甲醇再結晶，熔點 179-181°C，可溶於甲醇，其 TLC 片經溶媒(EtOAc : CHCl₃ = 9 : 1)展開後，R_f 值為 0.45，噴 10% H₂SO₄ 溶液，加熱後呈黃色。

IR 圖譜(Chart 30)顯示在 3446 cm⁻¹ 為 -OH 基之特性吸收，1646 cm⁻¹ 為 carbonyl group 之特性吸收，1608, 1558 cm⁻¹ 為芳香環共軛雙鍵的特性吸收。

由 FAB-MS 圖譜(Chart 31)分析測得分子量為 m/z 451 [M+H]⁺，其斷片碎片 305 [M+H-146]⁺ 顯示具有五碳糖基團，FAB-MS 分析其分子式為 C₂₁H₂₂O₁₁^[58]。

$^1\text{H-NMR}$ 圖譜(Chart 32)顯示在 δ 4.64 (dd, $J=10\text{Hz}$)、 δ 5.20 (d, $J=10\text{ Hz}$) 為 C-ring 上 H-2, H-3 之訊號； δ 6.17 (d, $J=2.0\text{ Hz}$), 6.37(d, $J=2.0\text{ Hz}$)分別為 A 環上 H-6, H-8 的質子訊號，且彼此間相互遠程偶合形成雙峰； δ 6.89 (d, $J = 8.8\text{ Hz}$), 7.73 (dd, $J = 8.8$ and 2.1 Hz), 7.29 (d, $J = 2.1\text{ Hz}$)為一組 ABX 型式之訊號，將其歸屬為 B-ring 上 H-5', H-6', H-2' 的質子訊號，其中 H-6' 分別與 H-5' 有產生鄰位偶合($J = 8.8\text{ Hz}$)，而與 H-2' 產生遠程偶合(d, $J = 2.1\text{ Hz}$)，符合 5, 7, 3', 4' 取代 flavonol 之結構特徵，推測具有 dihydroquercetin 之基本骨架。另外， δ 1.04 (d, $J=6.0\text{ Hz}$, H-6'')及 δ 3.06-3.96 (m)為糖基上質子的吸收訊號。

$^{13}\text{C-NMR}$ 圖譜(Chart 33)中顯示 δ 194.2 (C-4)為黃酮類之 carbonyl carbon 吸收訊號， δ 163.7 (C-5), 167.3 (C-7), 144.8 (C-3'), 145.6 (C-4')，分別為帶有-OH 基之 C-5, 7, 3', 4' 的吸收訊號。 δ 82.2 (C-2), 76.9 (C-3) 為 C-ring 上碳之吸收訊號。

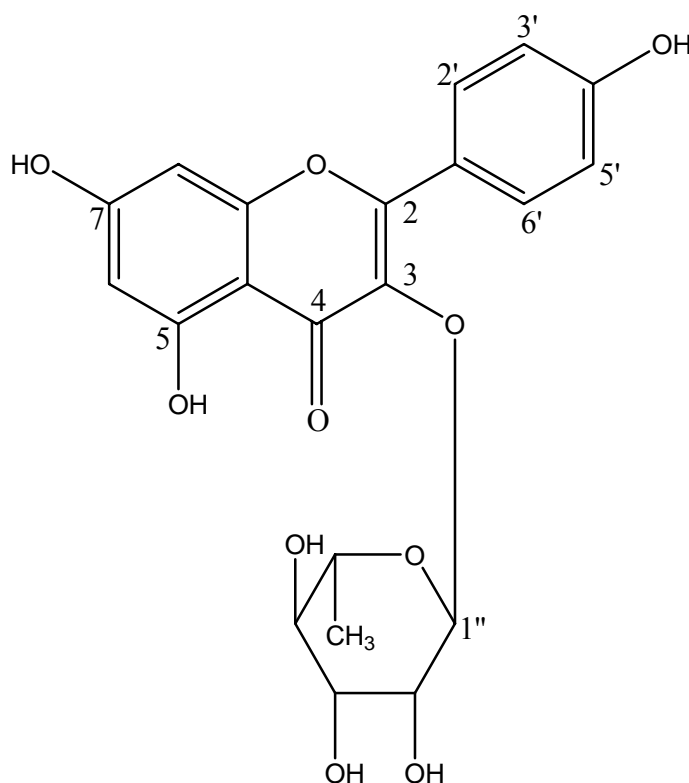
由 $^{13}\text{C-NMR}$ 及 DEPT 圖譜(Chart 33, Chart 34)中顯示 1 個甲基 (CH_3)，12 個三級碳(CH)及 8 個四級碳(C)等 21 個碳原子訊號。

Table 5-3: 化合物 E-1 碳譜數據與文獻^[49-50,54] astilbin 碳譜數據比對表

No. of C	δ_c of E-1	δ_c of literature data
C-2	82.2	81.48
C-3	76.9	75.6
C-4	194.2	194.3
C-5	163.7	163.4
C-6	95.97	96.06
C-7	167.3	167.23
C-8	94.85	95.11
C-9	162.38	162.14
C-10	100.75	100.68
B 環上的碳 C-1'~C-6'		
C-1'	127.0	126.97
C-2'	113.94	114.72
C-3'	144.83	145.10
C-4'	145.67	145.90
C-5'	114.93	115.31
C-6'	118.93	118.88
C 環接鼠李糖 C-1''~C-6''		
C-1'' (anomeric carbon)	100.48	100.02
C-2''	70.50	70.39
C-3''	70.13	70.10
C-4''	71.59	71.62
C-5''	68.90	68.95
C-6''	16.28	17.73

綜合上述資料並與文獻^[49-50,54]比對，推測此化合物結構應為 astilbin (dihydroquercetin 3-O-rhamnoside)。

【八】 E-2: kaempferol 3-*O*-rhamnoside



化合物 E-2 乙酸乙酯層中得到，為黃色粉末，以甲醇再結晶，熔點 172-174°C，可溶於甲醇，其 TLC 片經溶媒(EtOAc : CHCl₃ = 9 : 1)展開後，R_f 值為 0.5，噴 10% H₂SO₄ 溶液，加熱後呈黃色。

IR 圖譜(Chart 35)顯示在 3307 cm⁻¹ 為 -OH 基之特性吸收，1660 cm⁻¹ 為 carbonyl group 之特性吸收，1614, 1496 cm⁻¹ 為芳香環共軛雙鍵的特性吸收。

由 FAB-MS 圖譜(Chart 36)分析測得分子量為 m/z 435 [M+H]⁺，其斷片碎片 289 [M+H-146]⁺ 顯示具有五碳糖基團，FAB-MS 分析其分子式為 C₂₁H₂₁O₁₀^[58]。

$^1\text{H-NMR}$ 圖譜(Chart 37)顯示在 δ 6.16 (d, $J=2.0$ Hz)、6.36 (d, $J=2.0$ Hz)分別為 A 環上 H-6, H-8 的質子訊號，且彼此間相互遠程偶合形成雙峰； δ 7.74 (d, $J=8.8$ Hz, H-2' and H-6')及 δ 6.90 (d, $J=8.8$ Hz, H-3' and H-5')有偶合關係，分別為 B-ring 上 H-2', H-6'及 H-3', H-5'之吸收訊號，為一對 A_2X_2 型式之芳香族訊號，符合 5, 7, 4'取代 flavonol 類之結構特徵，推測具有 kaempferol 骨架。另外， δ 0.78 (d, $J=6.0$ Hz, H-6'')及 δ 3.09-3.96 (m)為糖基上質子的吸收訊號。

$^{13}\text{C-NMR}$ 圖譜(Chart 38)中顯示 δ 177.8 (C-4)為黃酮類(flavonoids)之 carbonyl carbon 吸收訊號， δ 161.4 (C-5)，164.9 (C-7)，160.1 (C-4')，分別為帶有-OH 基之 C-5, 7, 4'的吸收訊號。 δ 130.8 (C-2')，130.8 (C-6')及 115.6 (C-3')，115.6 (C-5')為 B-ring 上碳之吸收訊號。 δ 99.0 (C-6)，94.0 (C-8)為 A-ring 上碳之吸收訊號。另外， δ 156.7 (C-2)，134.3 (C-3)為 C-ring 上碳之吸收訊號。

由 $^{13}\text{C-NMR}$ 及 DEPT 圖譜(Chart 39, Chart 40)中顯示 1 個一級碳 (CH_3)，11 個三級碳(CH)及 9 個四級碳(C)等 21 個碳原子訊號。

Table 5-4: 化合物 E-2 碳譜數據與文獻^[49-50]kaempferol 3-*O*-rhamnoside

碳譜數據比對表

No. of C	δ_c of E-2	δ_c of literature data
C-2	156.7	156.16
C-3	134.3	133.17
C-4	177.79	177.38
C-5	161.42	161.19
C-6	99.04	98.77
C-7	164.94	164.52
C-8	94.00	93.68
C-9	157.73	156.41
C-10	104.10	103.84
B 環上的碳 C-1'~C-6'		
C-1'	120.70	120.89
C-2'	130.75	130.84
C-3'	115.57	115.07
C-4'	160.15	159.91
C-5'	115.57	115.07
C-6'	130.75	130.84
C 環接鼠李糖 C-1''~C-6''		
C-1''(anomeric carbon)	101.88	102.5
C-2''	70.5	71.6
C-3''	70.8	72.3
C-4''	71.3	73.2
C-5''	70.3	71.4
C-6''	17.5	17.8

綜合上述資料並與文獻^[49-50]比對，推測此化合物結構應為 kaempferol 3-*O*-rhamnoside。

第二節 臺灣黃杞之藥理活性試驗討論

一、細胞毒殺活性試驗

Table 4-1、Table 4-2 顯示，以 MTS 分析法試驗臺灣黃杞各萃取層之細胞毒殺活性，結果發現臺灣黃杞樹皮部之甲醇抽出物及各種有機溶媒萃取層中，以正己烷層及氯仿層對 NUGC-3 及 HONE-1 兩種癌細胞具有明顯抑制作用；而在莖部之甲醇抽出物及各種有機溶媒萃取層中，以正己烷層及氯仿層對 NUGC-3 癌細胞具有明顯抑制作用。由此推測臺灣黃杞之細胞毒殺活性成分可能屬於中低極性之物質。而本研究由臺灣黃杞樹皮部之氯仿層分離所得之萘醌類化合物，2-methoxyjuglone，據文獻報導其對於人類肺癌(A549)及大腸癌細胞(HT-29)具有抑制作用^[44-45]，顯示以活性引導成分分離之方式確實可行。

二、抗氧化活性實驗

依 Shyu YS (2002)等之方法，以 DPPH 自由基清除能力之試驗，測試臺灣黃杞樹皮部各萃取層，發現臺灣黃杞樹皮部之甲醇粗抽物、正丁醇層、乙酸乙酯層及氯仿層、具有顯著的抗氧化活性。顯示黃杞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，由乙酸乙酯層中得到二個具有抗氧化活性之黃酮類化合物，astilbin, kaempferol 3-*O*-rhamnoside，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

臺灣黃杞 (*Engelhardtia roxburghiana* Wallich)之樹皮部經乾燥、萃取後，以細胞毒殺活性及抗氧化能力為活性指標，使用管柱層析分離並再結晶純化，結果由正己烷層、氯仿層、乙酸乙酯層中共得到七個化合物及一個混合物：

1. Steroid :

β -sitosterol (H-1), β -sitosterol 3-*O*-glucoside (C-4)

2. Fatty acid :

tetracosanoic acid (H-2)

3. Triterpene :

betulinic acid (C-1)

mixture of betulinic acid and ursolic acid (C-3)

4. 1,4-naphthaquinone :

5-hydroxy-2-methoxy-1,4-naphthaquinone (C-2)

5. Flavonoids :

astilbin (dihydroquercetin 3-*O*-rhamnoside) (E-1)

kaempferol 3-*O*-rhamnoside (E-2)

其中， β -sitosterol 3-*O*-glucoside (固醇類)，tetracosanoic acid (脂肪酸)，betulinic acid，mixture of betulinic acid and ursolic acid (三萜類)，2-methoxyjuglone (萘醌類)，kaempferol 3-*O*-rhamnoside (黃酮類) 化合物皆為黃杞屬首次發現之成分。

據文獻記載萘醌類化合物，2-methoxyjuglone 對於人類肺癌(A549)及大腸癌細胞(HT-29)具有抑制作用^[44-45]。黃酮類化合物 astilbin，具

有抗氧化、改善實驗性肝損傷及抑制醛糖還原酶的作用^[51-57,59-60]；
kaempferol 3-*O*-rhamnoside^[56,59-60]則具有抗氧化的作用。以上皆為活
性成分，顯示以活性引導成分分離的實驗方法相當可行。

臺灣黃杞為臺灣之常見民間藥，樹皮有行氣，化濕，健脾，導滯，
消食之效。治黃疸病，小兒疳積，妊娠嘔吐。葉有清熱，解毒，止痛
之效。治脾胃濕滯，胸腹脹悶，濕熱瀉泄，疝氣腹痛，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，將使臺灣黃杞的使用上更具意義，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：臺灣維管束植物簡誌，第二卷，行政院農業委員會，臺北 2000；p. 19。
2. Editor-in-Chief: Huang TS. Tah Jinn: Flora of Taiwan, Second Edition. Volumn Two. Editorial Committee of Taiwan, 1993; pp. 23-25.
3. 國家中醫藥管理局（中華本草）編委會：中華本草(2)，上海科學技術出版社，上海，1999; pp. 371-373。
4. 邱年永、張光雄：原色臺灣藥用植物圖鑑(3)，南天書局，臺北 1992; p. 35。
5. 謝文全：臺灣常用藥用植物圖鑑第一冊，行政院衛生署中醫藥委員會，Vol. I，臺北，2002; p. 114。
6. 易醒、謝明勇、蕭小年：胡桃科植物化學及生物活性研究概況，中草藥 2001; 32(6): 559-561。
7. 甘偉松：藥用植物學，國立中國醫藥研究所，臺北，1993; p. 167。
8. 曹陽、蔣天勝、廖蘭、林彬：厚朴與其混淆品黃杞皮的比較鑑別，中草藥，2002; 33(5): 468-470。
9. 姜建萍：廣西桂平甜茶-黃杞葉粉末鑑定特徵，廣西中醫藥，2000; (2): 53。
10. 辛寧、朱華、廖月葵：廣西產 4 種甜茶的生藥鑑定，中藥材，2003; 26(8): 549-552。
11. 田芳：中藥治療過敏性疾病的作用研究進展，雲南中醫學院學報，2001; 24(3): 15-18。
12. 周文華：黃杞葉的抗過敏作用，國外醫學中醫中藥分冊，1996; 8(2): 35。

13. 鐘正賢、周桂芬、陳學芬、袁阿興：黃杞總黃酮的實驗研究，時珍國醫國藥，2000; 11(6): 495-496。
14. Kasai R, Hirono S, Chou WH, Tanaka O: Sweet dihydroflavonol rhamnoside from leaves of *Engelhardtia chrysolepis*, a Chinese folk medicine, Hung-qi. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 1988; 36(10): 4167-4170 .
15. Saklani A, Jain SK: Ethnobotanical observation on plants used in northeastern India. *International Journal of Crude Drug Reserch* 1989; 27(2): 65-73.
16. Dhar ML, Dhar MN, Dhawan BN, Mehrotra BN, Srimal RC: Screening of Indian plants for biological activity. Part IV. *Indian Journal of Experimental Biology* 1973; (11): 43-54.
17. Nishiza Y, Kanazawa S, Hotsuta M, Oochi A: Hair tonics and growth stimulants containing *Engelhardtia chrysolepis* extracts. *Patent-Japan Kokai Tokyo Koho-08* 1996; (73): 325.
18. Bhakuni DS, Dhar ML, Dhar MM, Dhawan BN, Gupta B, Srimali RC: Screening of Indian plants for biological activity. Part . *Indian Journal of Experimental Biology* 1971; 9(1): 91-102.
19. Suffness M, Abbott B, Statz DW, Wonilowicz E, Spjut R: The utility of P388 leukemia compared to B16 melanoma and colon carcinoma 38 for *in vivo* screening of plant extracts. *Phytotherapy Research* 1988; 2(2): 89-97.
20. Igarashi K, Uchida Y, Murakami N, Mizutani K, Masuda H: Effect of astilbin in tea processed from leaves of *Engelhardtia chrysolepis* on the serum and liver lipid concentrations and on the erythrocyte and liver antioxidative enzyme activities of rats. *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry* 1996; 60(3): 513-515.
21. Kanbara T, Mizutani K, Tamura K, Kataoka S: Extration of

- astilbins from *Engelhardtia chrysolepis* leaves and their antiinflammatory activities. *Patent-Japan Kokai Tokyo Koho-06* 1994; (256): 194.
22. Motoyashiki T, Miyake M, Morita T, Mizutani K, Masuda H: Enhancement of the vanadate-stimulated release of lipoprotein lipase activity by astilbin from the leaves of *Engelhardtia chrysolepis*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 1998; 21(5): 517-519.
 23. Kozuka M, Tokuda H, Mizutani K, Masuda K, Tamura K, Kataoka S: Astilbins as inhibitors for promotion of cancer. *Patent-Japan Kokai Tokkyo Koho-06* 1994; 247: 851.
 24. Kasai R, Horono S, Chou WH, Tanaka O: An additional sweet dihydroflavonol glycoside from leaves of *Engelhardtia chrysolepis*, a Chinese folk medicine, Huang-qi. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 1991; 39(7): 1871-1872.
 25. Uniyal SK, Badoni V, Sati OP: A new piscicidal flavonoid glycoside from *Engelhardtia colebrookiana*. *International Journal of Pharmacognosy* 1992; 30(3): 209-212.
 26. Bhatt JP: Neurolytic manifestation of piscicidal flavonoid of plant, *Engelhardtia colebrookiana* (Lindley) in Fish. *Indian Journal of Experimental Biology* 1991; 29(6): 588-590.
 27. Liu HW, Yao XS: Study on chemical constituents of stem bark of *Engelhardtia serrata*. *Chinese Journal of Medicinal Chemistry* 2001; 11(1): 51-52.
 28. Dhawan BN, Patnaik GK, Rastogi RP, Singh KK, Tandon JS: Screening of Indian plants for biological activity. Part VI. *Indian Journal of Experimental Biology* 1977; 15: 208.
 29. Dhar ML, Dhar MM, Dhawan BN, Mehrotra BN, Srimali RC:

- Screening of Indian plants for biological activity. Part IV. *Indian Journal of Experimental Biology* 1973; 11: 43.
30. 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.
 31. Blois MS: Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 1958; 26: 1199-1200.
 32. Williams WB, Cuvelier ME, Berset C: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebens-Wiss Technol* 1995; 28 (1): 25-30.
 33. Oshiyuki F: Antioxidative polyphenols from walnuts (*Juglans regia* L.) *Phytochemistry* 2003; 63: 795-801.
 34. Alessandra B: Antioxidant and free radical scavenging activity of flavonol glycosides from different *Aconitum* species. *Journal of Ethnopharmacology* 2003; 86: 63-67.
 35. 劉宏偉、姚新生：齒葉黃杞化學成分研究(I)，中國藥物化學雜誌，2001; 11(1): 51-52。
 36. Wanchai DE, Buppachart P: Biosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. *Phytochemistry* 2003; 62: 389-398.
 37. Sasaki SI: Handbook of proton-NMR spectra and data Vol. 5, academic press 1985-1986; 190.
 38. 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.
 39. 高國清：爵床科植物臺灣馬藍及六角英之化學成分研究與藥理活性評估，中國醫藥學院中國藥學研究所博士論文，臺中 2003。
 40. 丁治文：臺灣產地蜈蚣之化學成分研究，中國醫藥學院藥物化

- 學研究所碩士論文，臺中 2002。
41. 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，臺中 1997。
 42. 江睿玲：I、臺灣馬桑活性成分之研究 II、五味子中 Schizandrin 及 Gomisin A 定量及抗肝損傷之研究，中國醫藥學院中國藥學研究所博士論文，臺中 2000。
 43. 蕭崇厚：中藥化學-上海科學技術出版社，上海，1999；p. 192-194.
 44. Kim SH: Cytotoxic compounds from the root of *Juglans mandshurica*. *Journal of Natural products* 1998; 61(5): 643-645.
 45. Shigeyuki S: Inhibitory effects of plumbagin and juglone on azoxymethane -induced intestinal carcinogenesis in rats. *Cancer Letters* 1998; 127: 177-183.
 46. Zhongze M: Determination of the absolute stereochemistry of lupane triterpenoids by fucofuranoside method and ORD spectrum, *Tetrahedron Letters* 2004; 45: 3261-3263.
 47. Vincent C, Ange B, Serge R: Composition and chemical variability of the triterpene fraction of dichloromethane extracts of cork. *Industrial Crops and Products* 2002; 12: 15-22.
 48. Kao KC, Ho YL, Ho LK, Chang YS: 2-Benzoxazolinone, 2-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-one from the root of *Strobilanthes cusia*. *Journal of Chinese Medicine* 2001; 12: 41-49.
 49. Lu Y: The polyphenol constituents of grape pomace. *Food Chemistry* 1999; 65: 1-8.
 50. Agrawal PK: Carbon-13 NMR of flavonoids. *Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants* 1989; p334-335.
 51. Yan R, Qiang X: Astilbin selectively facilitates the apoptosis of interleukin-2-dependent phytohemagglutinin-activated jurkat cells. *Pharmacological Research* 2001; 44 (2): 135-139.

52. Qiang X: Astilbin selectively induces dysfunction of liver-infiltrating cells. *European Journal of Pharmacology* 1999; 377(1): 93-100.
53. Chan P, Hsu F: The *in vitro*-inhibitory effect of flavonoid astilbin on 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase on vero cells. *Heart, Lung and Circulation* 2000; 9(3): 114.
54. Ken O: First synthesis of astilbin, biologically active glycosyl flavonoid isolated from Chinese folk medicine. *Tetrahedron Letters* 2000; 41: 5537-5541.
55. 徐強：選擇性抑制活化 T 淋巴細胞的功能-從中藥及其成分中發現的嶄新作用模式，哈爾濱商業大學學報，2001; 17(2): 7-9。
56. 陳琪：黃酮類化合物抗氧化性與其結構的關係，重慶大學學報，2003; 26(11): 48-51。
57. 黃華藝、查錫良：黃酮類化合物抗腫瘤作用研究進展，中國新藥與臨床雜誌，2002; 21(7): 428-432。
58. Maciej S: Review: Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoids glycosides. *Phytochemistry* 2000; 54: 237-256.
59. Hollman PCH: Dietary Flavonoids: Intake, health effects and Bioavailability. *Food and chemical Toxicology* 1999; 37: 937-942.
60. Kelly E, Anthony R: Reviews: current topics: Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2002; 13: 572-584.