

中國醫藥大學藥物化學研究所碩士論文

指導老師：陳勝智 教授

論文題目

巨峰葡萄籽之抑制細胞增殖活性成分研究

**A Study on Antiproliferative Constituents
from the Seeds of Kyohou Grape**

研究生：廖紋瑩

中華民國九十四年一月

目錄

中文摘要.....	3
英文摘要.....	4
第一章 緒論	
第一節 研究動機和目的.....	5
第二節 葡萄之藥用植物學考察.....	8
第三節 葡萄成分研究概況.....	15
第四節 藥理活性試驗原理簡介.....	24
第二章 巨峰葡萄籽之成分分離研究	
第一節 巨峰葡萄籽成分之抽取與分離.....	31
第二節 巨峰葡萄籽成分之結構鑑定.....	32
第三節 抽出物之抑制細胞增殖活性.....	53
第四節 抽出物之美白活性.....	65
第三章 實驗部分	
第一節 成分分離	
一、儀器與試藥.....	68
二、成分抽提與分離方法.....	73
三、化合物之性質與光譜數據.....	78
第二節 藥理活性試驗	
一、儀器與試藥.....	82
二、抽出物及分離所得化合物之加藥處理.....	86
三、細胞培養.....	86
四、抑制細胞增殖試驗.....	91
五、誘導細胞分化試驗.....	92
六、美白試驗.....	93
第四章 結論	95
參考文獻	97

巨峰葡萄籽之抑制細胞增殖活性成分研究

中國醫藥大學 藥物化學研究所

廖紋瑩

中文摘要

本研究自葡萄科 (*Vitaceae*) 植物巨峰葡萄籽甲醇抽出物，以藥理試驗追蹤活性成分的方式，單離得到三個化合物：gallic acid (I)、*epi*-catechin (II) 及 catechin (III)。其中 gallic acid 對 HL-60 細胞株的抑制增殖活性很好，其藥理活性為 $IC_{50} = 3.1 \mu\text{g/ml}$ 。另外在正己烷分劃中，單離得到 dilinoleyl stearyl glyceride (IV)。

對於其他四個細胞株 (B16-F₀、J5、NCI-H226、MDA KB-231 cell lines) 所做的抑制細胞增殖實驗中，gallic acid 對 B16-F₀、J5 cell 有抑制細胞增殖的活性，其藥理活性 IC_{50} 分別為 22.4 與 66.2 μM 。

而分離所得的化合物之美白試驗，gallic acid 在 1000 μM 下，五分鐘內抑制酪胺酸酶的活性，抑制率約為 50%，較 *epicatechin* 與 catechin 佳。

Summary

A Study on Antiproliferative Constituents from the Seeds of Kyohou Grape

by Wen-Ying Liao

Graduate Institute of Pharmaceutical Chemistry

China Medical University

The study traced the active constituents by screening the anti-proliferative activity of HL-60 cells. Three compounds ----- gallic acid (I), *epi*- catechin (II) , catechin (III), have been isolated from the ethyl acetate fraction of the methanolic extract of dried seeds of *Vitis vinifera* × *Vitis labrusca*. Compound I showed a potent antiproliferative activity and its IC₅₀ was 3.1 µg/ml. Another compound-----dilinoleyl stearyl glyceride (IV), has been isolated from the *n*-Hexane fraction of the methanolic extract.

Furthermore, compounds have been screened for their anti-proliferative activities of four cell lines, including B16-F₀, NCI-H226, J5, MDA KB-231 cell lines. Gallic acid showed antiproliferative activity for B16-F₀ and J5 cell. Their IC₅₀ were 22.4 and 66.2 µM, respectively.

Finally, gallic acid showed well tyrosinase inhibitory activity (50%) under 1000 µM and 5 mins.

第一章 緒論

第一節 研究動機與目的

在這知識爆炸的時代裡，科技日新月異，醫藥發達，人的生活品質越來越高，但對環境的破壞也相對提高，許多文明病也伴隨而生，如心血管疾病、糖尿病等，其中最值得我們去關切的是癌症，其發生的比例在近幾十年中逐漸提高，儼然已成為近一個世紀最難纏的疾病。

根據衛生署統計，去年一年，國內每天有超過 96 人死於癌症，每 4 名死亡者就有 1 人死於癌症，其中前 3 大癌症分別是肝癌、肺癌、結腸直腸癌，增加幅度最大的則是女性乳癌、男性口腔癌。衛生署一併公布 92 年國人 10 大癌症，10 大排名為肝癌、肺癌、結腸直腸癌、女性乳癌、胃癌、子宮頸癌、口腔癌、攝護腺癌、非何杰金淋巴瘤、胰臟癌；血癌排名 11 名。與上年度相較，僅 91 年排行第 11 名的非何杰金淋巴瘤與第 9 名的食道癌對調。92 年死於癌症的國人有 35201 人，占有所有死亡人數的 27.1%，死亡率雖較前年略減，但在女性乳癌（增 14.14%）、男性口腔癌（增 14.42%）死亡率上，均呈大幅增加，胰臟癌、卵巢癌也有增加趨勢。

目前對於癌症的治療，有傳統的化學療法（chemotherapy）、放射線治療（radiation therapy, 例如： γ -ray）及干擾素（interferon）的治療等。但這些方法沒有一個是「真正」能治癒癌症，甚至化學治療後的結果，誘發了另一種癌症的生成，然而二十世紀研究成果得到一項清晰的訊息，就像一九六〇年諾貝爾生理醫學獎得主梅達華（P. B. Medawar, 1915-1987，英國免疫學家），在四分之一世紀之前所說的：「癌症不是單單一種疾病，也不能只靠一種方法就治癒。」，因此許多的新型療法一一開發，如基因療法、雞尾酒療法。

由於藥物及放射線治療，常會帶來嚴重的副作用，故近年來開始有人提倡食物療法，從日常生活中唾手可得的天然食材，來治療與預防疾病的發生。根據文獻記載⁽¹⁾，食療的發源，早在春秋戰國時代，即創有食醫制度，戰國時代的黃帝內經更指出飲食與疾患之因果關係，目前也有許多含抗氧化物質的食物及植物，廣泛地用在防老化及美白產品上，美白與抗癌，為時下熱門話題，這兩者之間有著耐人尋味的關係，關鍵也許在於抗氧化的功能。

筆者有鑑於此，思考是否在日常食用水果中，具有抗癌的活性成分，那麼對於身體的負擔也相對降低。在篩選過當季水果，有西瓜、香蕉、香蕉心、百香果、柿子、巴西蘑菇粉、巨峰葡萄籽，發

現在巨峰葡萄籽的甲醇抽出物中，具有極佳的抑制細胞增殖活性，在查閱相關文獻中發現，一般葡萄的葡萄籽成分具有強抗氧化活性、抗菌活性、抗發炎等等活性⁽²⁾⁽³⁾，而台灣本土栽種的葡萄，屬巨峰葡萄最多，所以選擇巨峰葡萄籽，繼續研究探討其抑制細胞增殖活性的成分。

本研究以抑制癌細胞增殖為主要研究主題，使用human leukemia promyelocytic cells (HL-60 cells)來做粗抽物及化合物篩選指標，再將分離所得的化合物，進一步做其他株癌細胞的活性測試，最後進行體外黑色素含量試驗，希望能從巨峰葡萄籽中分離具有抑制細胞增殖與美白的活性成分，提供抗癌食品或藥物開發的另一個研究方向。

第二節 葡萄之藥用植物學考察

一、巨峰葡萄在植物學上的分類位置⁽⁴⁾

被子植物門 (Angiospermae)

雙子葉植物綱 (Dicotyledoneae)

原始花被亞綱 (Archichlamydeae)

葡萄科 (Vitaceae)

葡萄屬 (Vitis)

葡萄科植物，約 11 屬，480 種⁽⁵⁾。一般把葡萄屬的各個種依地理分布生態特點，劃分為三大種群，為歐亞種群、東亞種群和北美種群。將各種群表列如下：

表一、葡萄科葡萄屬各種群表

歐亞種群	
東方品種群	分布在中亞、中東和黑海沿岸。其共同特徵是幼葉沒有絨毛，新的樹梢多為赤褐色，植株生長性強，生長期長，結果實的能力低。
西歐品種群 <i>V. vinifera</i>	分布在西歐各國。其共同特徵是幼葉的絨毛密生，新的樹梢較細，呈現淡褐色。
黑海品種群	分布在黑海沿岸各國。其共同特徵是葉的背面密生絨毛，果穗中等大，果粒中等大而多汁，生長期短。
東亞種群	
山葡萄 <i>V. amurensis</i>	在中國大陸東北和華北各地均有野生的分布。
華北葡萄 <i>V. bryoniifolia</i>	野生於中國大陸華北及華南各地。果粒呈圓形，為紫黑色。
北美種群	
美洲種 <i>V. labrusca</i>	在栽培上所泛稱的美洲葡萄即指本種而言。其幼葉具有濃密的絨毛，成葉大而厚，接近全緣或者三裂，葉的表面呈暗綠色，卷鬚是連續着生。果穗小或中等大。
河岸葡萄 <i>V. riparia</i>	葉子光滑沒有毛。果穗小。果粒圓形，呈黑色，有青草味，不能食用。
沙地葡萄 <i>V. rupestris</i>	葉子為寬心臟形，葉片光滑沒有毛。果穗小。漿果呈圓形，黑色。
法國雜種	
原產於法國的一些歐洲種，與上述北美種群中的某些種雜交後，所獲得的雜種通稱為法國雜種	

而巨峰葡萄為歐美雜交種（*Vitis vinifera* × *Vitis labrusca*），

原產於日本，台灣自日本引進。

二、巨峰葡萄名稱考察

學名：*Vitis vinifera* × *Vitis labrusca*

英名：Kyohou Grape

中文名：巨峰葡萄

巨峰葡萄之所以命名主要是因為其果粒大，堅實而耐貯藏，呈長橢圓形的外觀而來。

三、巨峰葡萄產期與產地：

台灣葡萄栽培品種中，以巨峰種栽培最多，巨峰品種收穫期，第一次夏季6月中旬至8月上旬，第二次秋季9月中旬至10月中旬，第三次冬季12月下旬至2月下旬，其中以夏季和冬季產量最多。本省葡萄主要產區在中部平地，產區遍佈彰化縣大村、溪湖、南投縣集集、竹山、水里、信義、國姓、台中縣東勢、新社、新莊、后里、豐原，苗栗縣卓蘭、大湖，彰化大村等鄉鎮。

四、巨峰葡萄植物特徵⁽⁶⁾：

巨峰葡萄為多年生落葉木質藤本。葡萄枝蔓細長、褐色，老莖皮片狀剝落，幼枝無毛或被毛，捲鬚分歧。葉子互生，柄長4~8 cm，葉片長6~15 cm，寬4~12 cm，長3~5 cm裂，基部為心形，深凹入，有不整狀粗銳鋸齒緣。葉腋著生複合的芽。捲鬚或花序與葉對生。花有兩性花、雌性花和雄花。花多數，黃綠色。花萼細小，杯狀。花瓣5片，基部分離，前端粘合不展開。雄蕊5枚，花盤隆起，具5個腺體，基部與子房合生，子房2房，每室胚珠2個，花柱短，圓錐形。漿果卵圓形或卵狀橢圓形，熟時為紫黑色，多汁液質，外被臘粉質。種子2~3粒。

五、巨峰葡萄繁殖方式：

切接法，枝插或根插法。

六、葡萄成分：

(1) 果實之一般成分如表二：

表二、葡萄的營養成分（每 100 g 食部）⁽⁷⁾

成分	含量	成分	含量	成分	含量
水分 (g)	88.0	粗纖維 (g)	1.6	胡蘿蔔素	0.04
蛋白質 (g)	0.2	灰分 (g)	0.2	硫胺素 (mg)	0.01
脂肪 (g)	0.0	鈣 (mg)	4.0	核黃素 (mg)	0.01
糖類 (g)	10.0	磷 (mg)	15.0	尼克酸 (mg)	0.1
熱量 (kJ)	171.5	鐵 (mg)	0.6	抗壞血酸 (mg)	4.0

(2) 果實成分⁽⁸⁾：1934 年，加藤恭氏研究「硼酸」之含量。在果肉 1 公斤中含硼酸 7.68~8.99 mg，果皮含 26.10~26.81 mg，果實含 10~15 mg，葡萄酒中含 10~40 mg。1932 年，市川親文研究，果皮灰分中含氧化錳 0.031%、種子灰分中含氧化錳 0.054%；果皮灰分中含氧化鈦 (TiO₂) 0.09%、種子灰分中含氧化鈦 0.267%。

(3) 果實之色素：果實呈黑紫色，乃因含花青素之一種名黑葡萄色苷 (Oenin)，此物為深紅色短柱晶體。

(4) 種子：義大利產種子，含粗脂肪油 13.73~15.11%，灰分 2.51~3.72%，粗蛋白 9.83~11.26%，碳水化合物 9.37~11.66%，水分 8.99~11.95%。種子佔果實之 15~20%，灰分中含五氧化二磷 14.33%，氧化鉀 22.33%。

(5) 果臘：果皮含臘 1~2 % 。

(6) 葉：葉含蔗糖、轉化糖（兩者合計 2 % ）、澱粉、鞣質、槲皮素（Quercetin）、胡蘿蔔色素 0.2 % 、酸性酒石酸鉀約 2 % ，酒石酸及枸橼酸之鉀鹽，游離酒石酸及檸檬酸、琥珀酸、草酸鹽等，以及葉臘、紅色素等。

(7) 精油

七、葡萄效用：

中醫書籍中提及葡萄為本草綱目卷33收載。本經記載蒲萄⁽⁹⁾，實甘平無毒，曰：味甘酸，性溫，多食令人卒煩悶眼暗，主治筋骨濕痺，益氣倍力強志，令人肥健，飢忍風寒，久食輕身不老延年，可做酒、逐水、利小便、除腸間水、調中治淋、時氣痘瘡不出。果實可製葡萄酒，做營養強壯劑，並治消化器之慢性病。葡萄乾，虛弱人食之最宜，惟其皮不易消化，最好煮飲其汁。根及藤葉能止嘔，可治妊娠惡阻，並能安胎，及利尿消腫。

八、一般食用葡萄品種 (<http://www.cter.edu.tw/edu/materialcontent>)



圖一、巨峰葡萄



圖二、意大利葡萄



圖三、蜜紅葡萄



圖四、金香葡萄



圖五、巨峰葡萄園 (<http://tw.f4.page.bid.yahoo.com/tw/auction/d9289009>)

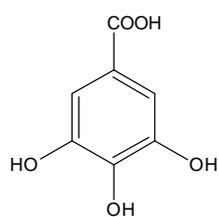
第三節 葡萄成分研究概況

一、葡萄中已知化學成分:

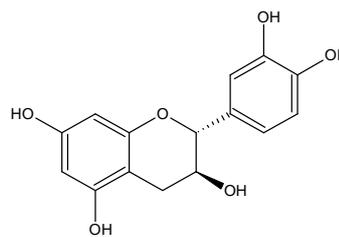
在葡萄科葡萄屬植物的各品種中，葡萄已知的成分如下。

(1) Catechins⁽¹⁰⁾

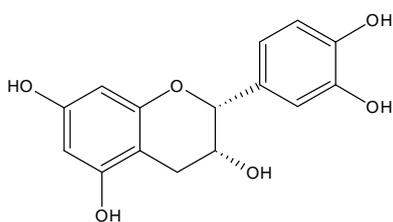
- a. gallic acid
- b. catechin
- c. (+)-gallocatechin
- d. *epi*-catechin
- e. epigallocatechin
- f. *epi*-catechin 3-*O*-gallate



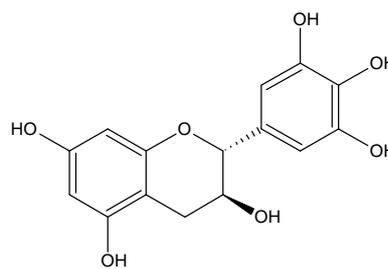
gallic acid



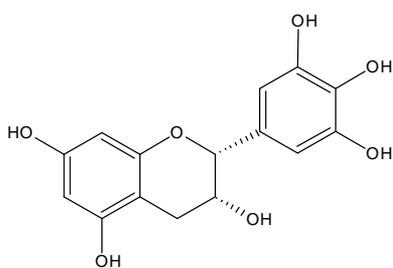
(+)-catechin



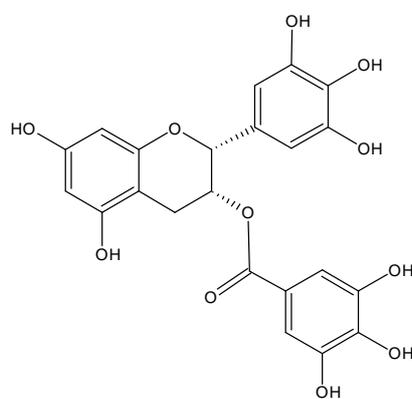
epicatechin



(+)-gallocatechin



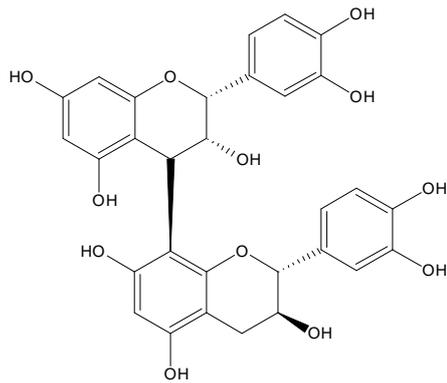
epigallocatechin



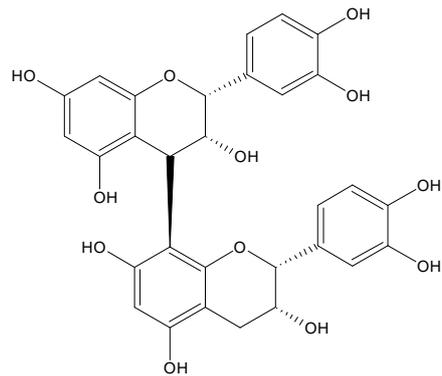
epicatechin 3-O-gallate

2. Procyanidins^{(11) (12) (13) (14)}

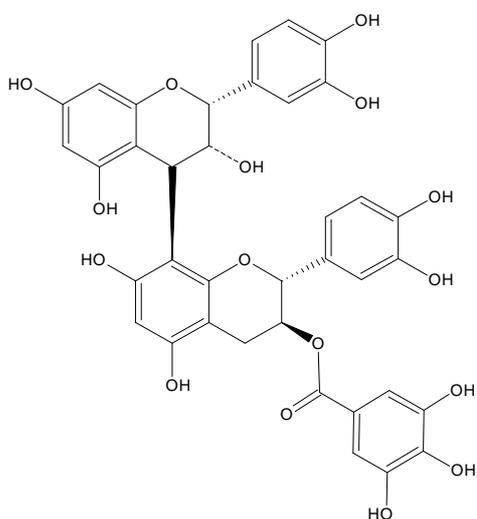
- a. procyanidin B1
- b. procyanidin B1 3'-*O*-gallate
- c. procyanidin B2
- d. procyanidin B2 3'-*O*-gallate
- e. procyanidin B3
- f. procyanidin B4
- g. procyanidin B5
- h. procyanidin B5 3'-*O*-gallate
- i. vitisinol
- j. amurensisin
- k. procyanidin C1
- l. procyanidin T2



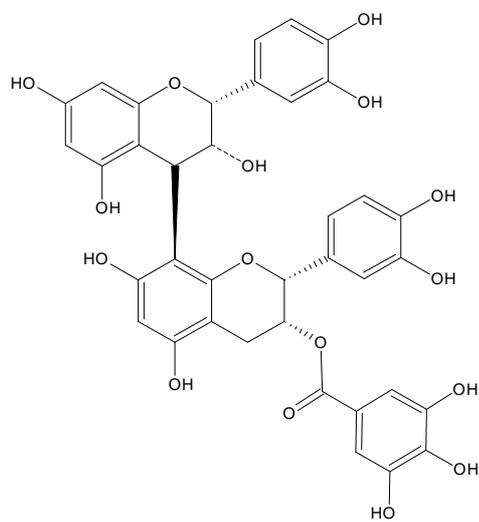
procyanidin B1



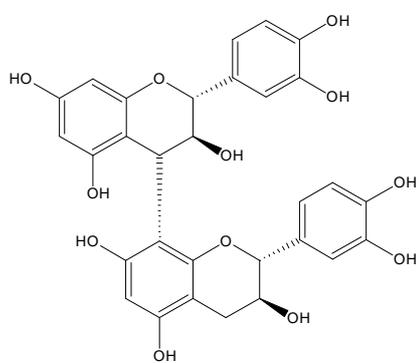
procyanidin B2



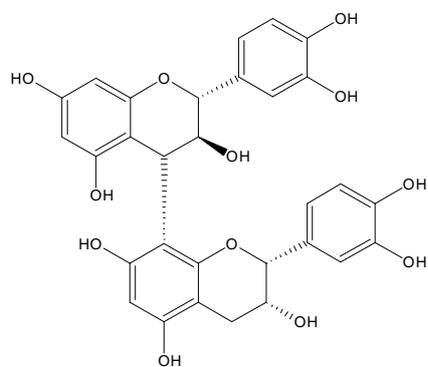
procyanidin B1 3'-O-gallate



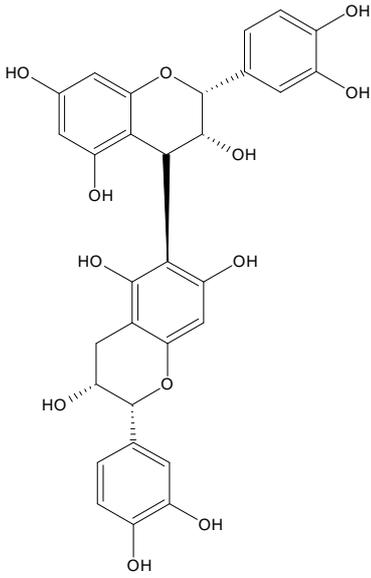
procyanidin B2 3'-O-gallate



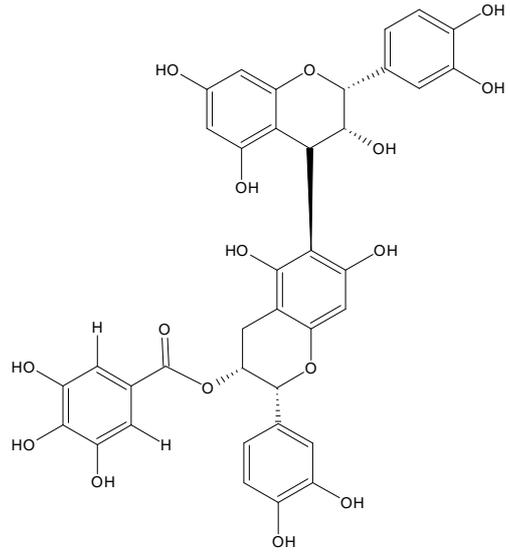
procyanidin B3



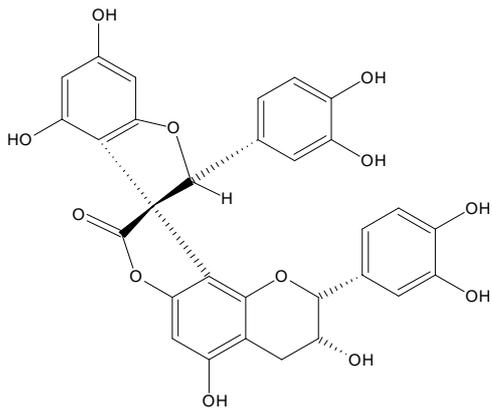
procyanidin B4



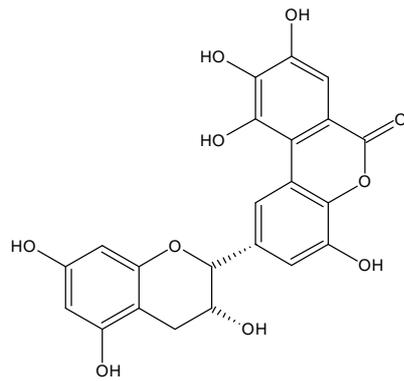
procyanidin B5



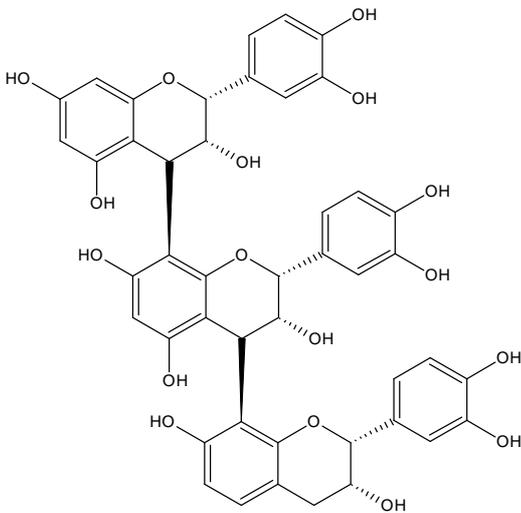
procyanidin B5 3'-O-gallate



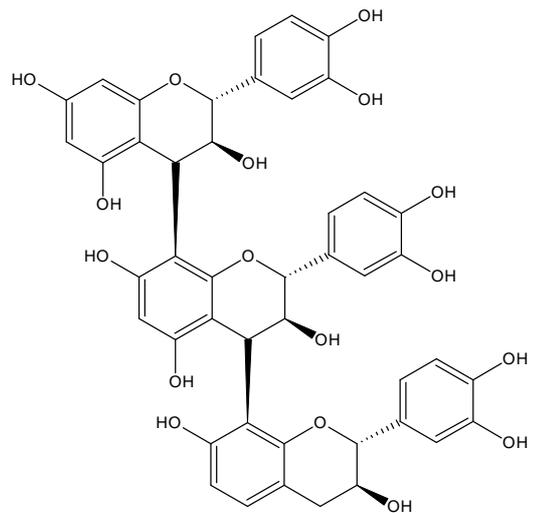
vitisinol



amurensisin

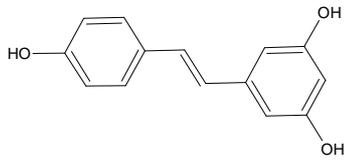


procyanidin C1

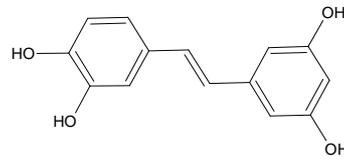


procyanidin T2

3. Resveratrol⁽¹⁵⁾



trans-resveratrol



piceatannol

4. Stilbenetetramers^{(16) (17) (18)}

a. (+)-viniferol A

(+)-viniferol B

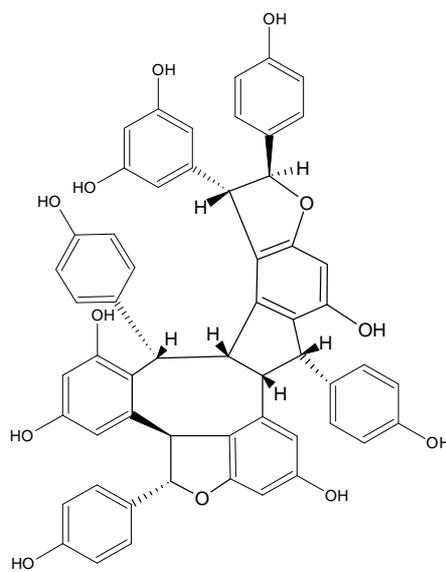
(+)-viniferol C

b. (-)-vaticaphenol A

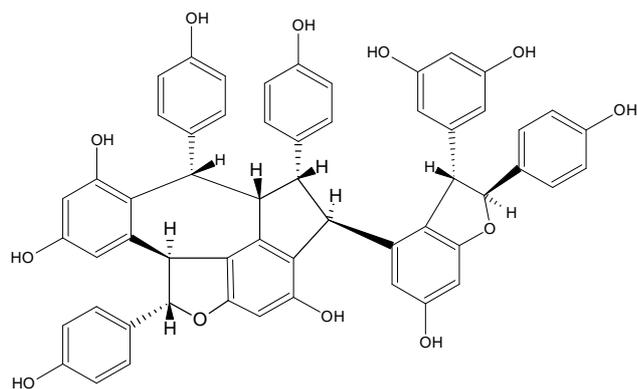
(-)-vaticanol B

c. (+)-hopeaphenol

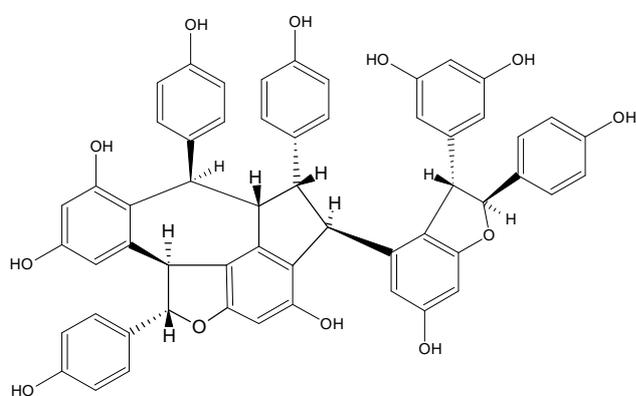
(-)-isohopeaphenol



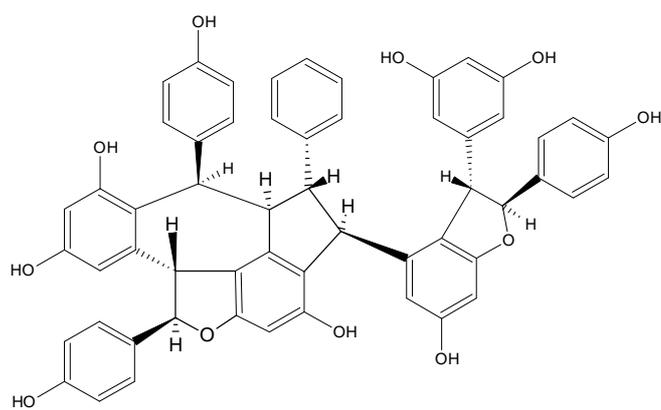
(+)-viniferol A



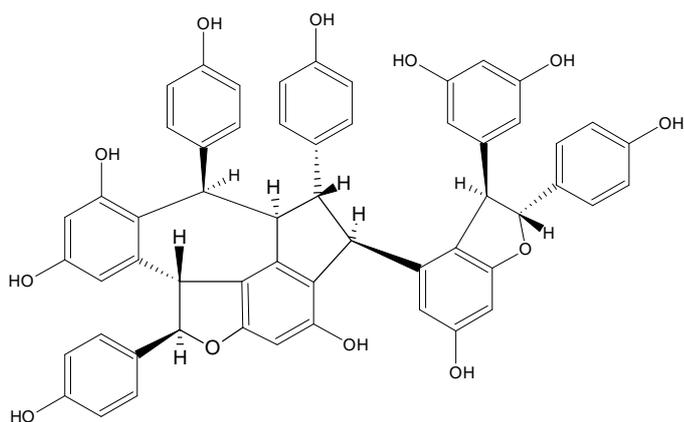
(+)-viniferol B



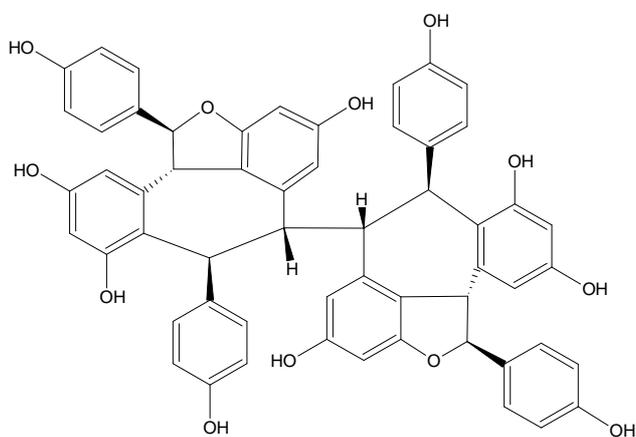
(+)-viniferol C



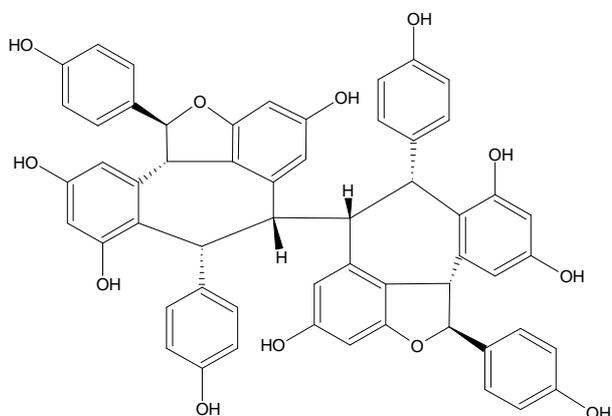
(-)-vaticaphenol A



(-)-vaticanol B



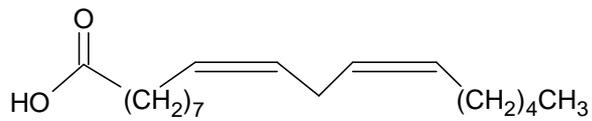
(+)-hopeaphenol



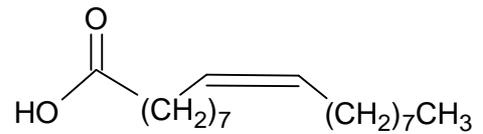
(-)-isohopeaphenol

5. Fatty acids⁽¹⁹⁾

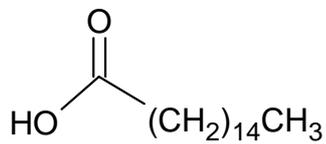
- linoleic acid
- oleic acid
- palmitic acid
- stearic acid



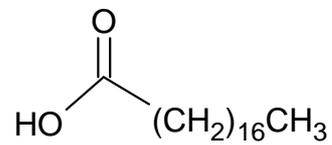
linoleic acid



oleic acid



palmitic acid



stearic acid

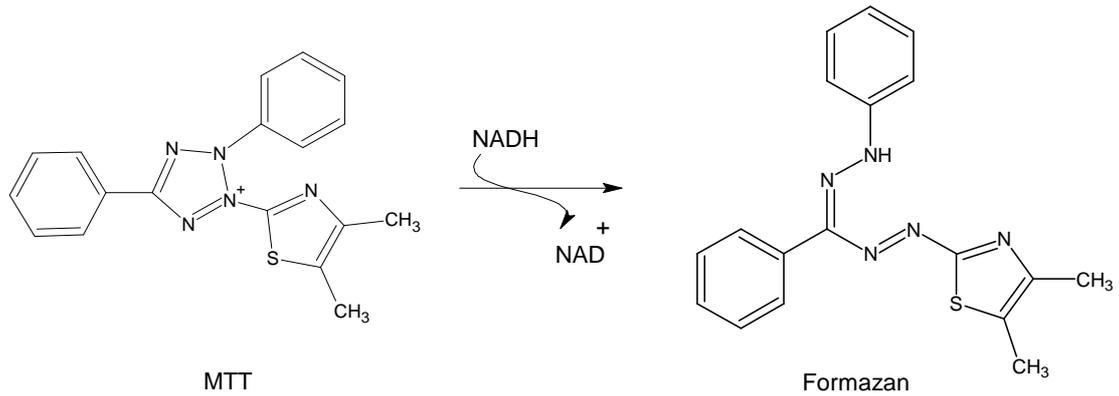
第四節 藥理活性試驗原理簡介

一、抗癌作用

癌症的發生，往往是由於細胞本身失去了正常調控細胞增殖的機制，而導致細胞不斷增生，不斷的複製。因此目前抗癌的研究方向之一，在於如何阻斷不正常的增殖作用，或將細胞導回正軌而成熟分化，恢復原有的生理功能。

本研究之藥理實驗的模式，首先以 HL-60 cell line 之抑制細胞增殖為主，進行抗癌活性追蹤，藉以確認活性成分為何。係利用 3-(4,5-dimethyl- thiazol-2-diphenyl)tetrazolium bromide (MTT)之氧化還原反應，測試葡萄籽抽出物及所分離之化合物對 HL-60 cell line 增殖的影響。另外，所得的粗抽物也進行了誘導細胞分化之實驗。

MTT assay 是一種應用於分析細胞增生(cell proliferation)和細胞毒性(cytotoxicity)之分析方法。分析方法是利用檢測活細胞之粒腺體內的酵素琥珀酸鹽去氫酶(succinate dehydrogenase)活性來測定細胞的存活狀態，進而得知相對的活細胞比例。活細胞內的琥珀酸鹽去氫酶可與MTT發生氧化還原作用，而使MTT由淡黃色還原成紫色之formazan，其反應式如下⁽²⁰⁾：



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

而進行誘導細胞分化活性測試是使用硝基藍四氮唑(nitroblue tetrazolium; NBT)溶液，原理在於白血病細胞分化成熟時可恢復其吞噬功能，而細胞內酵素活性因而大量增加並釋放出超氧化物(如：superoxide)以防禦外來物質的侵犯。於是利用其還原能力將NBT還原成藍黑色的 formazan 鹽類沉著於細胞內。並於顯微鏡鏡檢 200 個左右的細胞，計算其呈藍黑色細胞相對於總數所佔百分比即為誘導分化的比例。Differentiation (%) =

$$(\text{細胞質呈紫黑色的細胞總數} / \text{全部的細胞總數}) \times 100\%$$

進行一連串抗癌活性追蹤後，所分離出的化合物，再進行其他癌細胞株之篩檢，測試是否具有抑制細胞增殖的作用。

二、美白作用

皮膚的癌症是所有癌症中最普遍的一種，黑色素細胞瘤約佔皮膚癌的 4%，但它卻佔皮膚癌死亡率的 79%，黑色素細胞瘤會導致黑色素 (melanin) 不正常增生，若有藥物能抑制黑色素瘤細胞的增殖，也許亦具有抑制黑色素生成的功能，而美白的關鍵在於能抑制黑色素生成。

(1) 美白機轉

決定人類的皮膚、眼睛和頭髮顏色，重要因素是黑色素，黑色素的生合成是黑色素細胞的一種氧化反應，反應過強，可引起黑色素過多症，如：雀斑、褐斑、老年斑甚至黑色素細胞瘤等；反應過弱或缺乏反應，則可引發白髮症等病。要想達到美白的效果，就是抑制黑色素的生成。

a. 黑色素細胞之基本性質

黑色素是一種廣泛存在於動植物的生化聚合物 (biopolymers)⁽²¹⁾，能在人體及動物內生合成，主要分布於皮膚、毛髮、眼睛、羽毛、

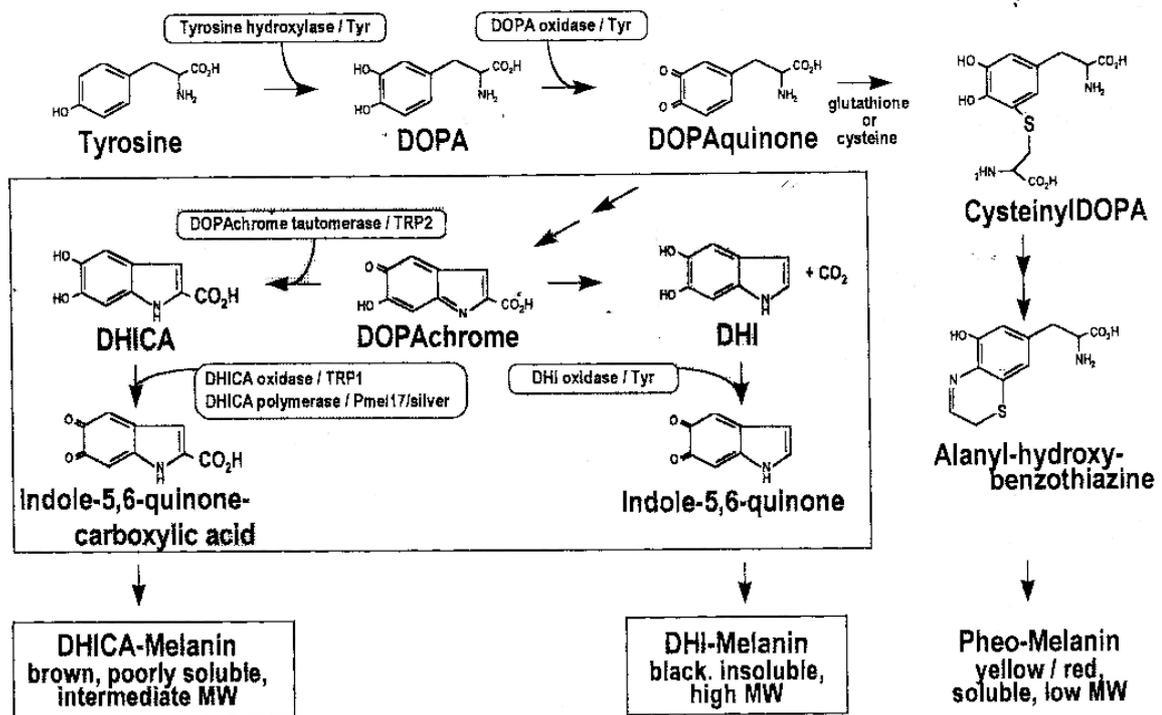
昆蟲外殼、黴菌、細菌等⁽²²⁾。依據分類，黑色素共分成三類：異黑色素 (allomelanins)、真黑色素 (eumelanin) 和嗜黑色素 (pheo-melanin)，真黑色素和嗜黑色素以不同的比例組合，存在於動物中。

⁽²³⁾真黑色素為棕黑色含氮色素，不溶於所有溶劑中。由酪胺酸產生 dopa，再形成 5,6-dihydroxyindole (DHI)，DHI 經氧化聚合形成真黑色素 (eumelanins) 真黑色素存在的範圍包含無脊椎動物之皮、膜與體液，到高等脊椎動物的特殊細胞與組織中。真黑色素的另外一個特性則會與許多二價或三價的金屬離子，或一些臨床常用的陰離子性藥物結合，如 chlorpromazine、chloroquine 和 haloperidol 等。真黑色素與 chlorpromazine 具有高度親合力。

嗜黑色素為可溶於鹼的色素，顏色由黃色到淡紅色，除了含有氮之外還有硫。由生合成中間產物 dopaquinone 與 cysteine 結合，形成 5-S-cysteinyl dopa。Cysteinyl dopa 經氧化環化反應產生 1,4-benothiazine，只存在於一些黃橙色或淡紅色毛髮或羽毛上。

b. 黑色素生成之機轉

圖六表示黑色素生成途徑⁽²⁴⁾，此色素形成的過程，有酶與氧分子的參與。首先，酪胺酸（tyrosine）在酪胺酸酶（tyrosinase）催化下，氧化成 dihydroxyphenylalanine，即 dopa。酪胺酸酶繼續產生催化作用，將 dopa 轉變為 dopachrome，再形成 indoles，最後形成黑色素。其中酪胺酸酶催化 dopa 轉為 dopachrome 為速率決定步驟，而 dopachrome 經由氧化反應轉變為黑色素。

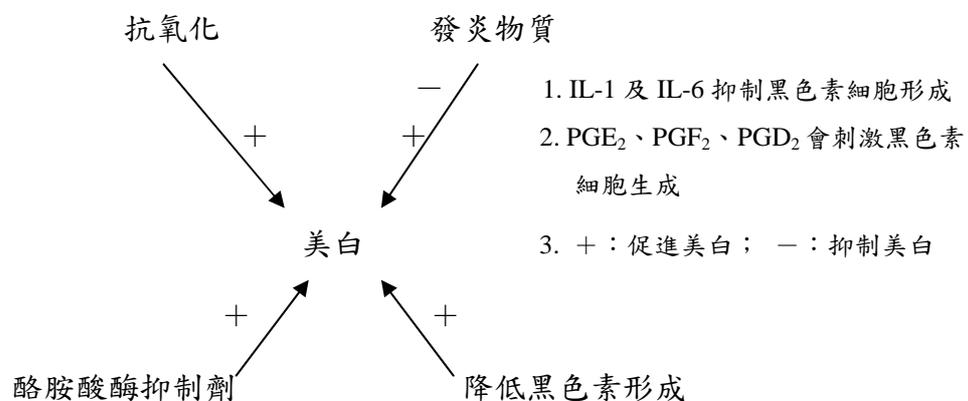


圖六、黑色素生成途徑

(2) 自由基、美白與抗氧化⁽¹⁾

生物體內存在內源性的自由基，為人體生化循環中的代謝產物，它們的蓄積對生物體的細胞膜、核酸、膠原蛋白和生物酶等會造成多種傷害。我們通常研究的自由基為氧自由基及其活性衍生物(Reactive oxygen species; ROS)，其中最常見的有 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 、NO 和 H_2O_2 ，具有未配對電子的物質，統稱自由基 (free radical)。過多的自由基會造成細胞內核 DNA、細胞膜的損傷，而產生各種疾病，甚至造成癌症的發生。抗氧化劑會與氧反應，而降低自由基的生成，能達到預防疾病產生的效果⁽²⁵⁾。

美白，就是抑制黑色素的生成，黑色素的生合成是黑色素細胞的一種氧化反應，抗氧化劑若能阻斷黑色素細胞氧化反應，便能達到美白的效果。含多酚類化合物的食物，也多具有抗氧化的功能⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾。



圖七、常見因子對美白的作用

(3) 目前美白評估的試驗方法

1. 抑制黑色素含量試驗—體外培養 B16-F₀ 黑色素瘤細胞⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾

老鼠 B16-F₀ cell 種入培養皿中（細胞數為 1×10^6 cells/dish），於 Dulbecco's modified Eagle's medium 培養 1 天後，將測試樣品溶於 DMSO 後，加入培養皿中繼續培養。兩天後，將細胞取出，使用強鹼溶出黑色素，於 405 nm 下偵測吸光值，與控制組對照。

2. 酪胺酸酶活性抑制試驗—Mason 和 Perterson 法⁽³⁰⁾⁽³¹⁾

將 L-dopa、酪胺酸酶混合，於 37 °C 下培養 10 分鐘，產生 dopachrome，dopachrome 為一有色物質，於 492 nm 下可偵測。加入測試樣品，偵測培養前後之吸光值，與控制組對照（不加測試樣品）對照，計算出 dopachrome 生成的抑制率，此即為酪胺酸酶活性之抑制率，以維他命 C 作為 positive control。

第二章 巨峰葡萄籽成分分離研究

第一節 巨峰葡萄籽成分之抽取與分離

將乾燥的巨峰葡萄籽 (2 kg) 經粉碎機粉碎後，以甲醇用冷浸法反覆抽提數次，最後一次甲醇抽提液減壓濃縮，所得的量 < 0.2 mg/ml，然後依照 Scheme 1~ Scheme 3 流程圖所述之方法分離。共得到四個化合物，經光譜解析及化學方法確認為：gallic acid、*epi*-catechin、catechin、dilinoleyl stearyl glyceride。

第二節 巨峰葡萄籽成分之結構鑑定

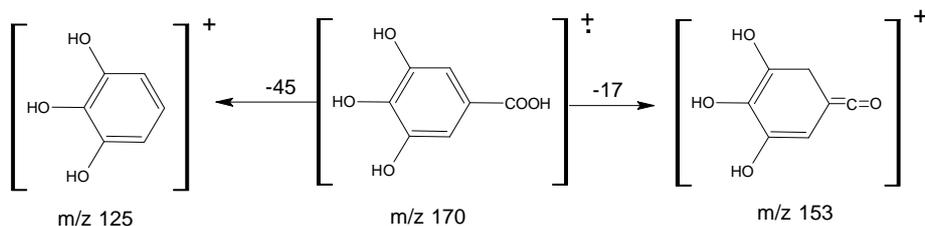
一、化合物 I—gallic acid

化合物 I 為白色針狀結晶，熔點 253 °C。其 TLC 片經溶媒(ethyl acetate) 展開後 Rf 值為 0.83，噴氯化鐵試液後，顏色呈紫黑色。噴 10% H₂SO₄ 加熱後，顏色呈紅褐色，初步推斷為多酚類的化合物。

紅外光光譜(圖八)顯示，在 3400~3200 cm⁻¹ 為 OH 基的吸收，1706 cm⁻¹ 為羧基(C=O)的吸收，1620、1543 及 1450 cm⁻¹ 為 benzene ring 的吸收。

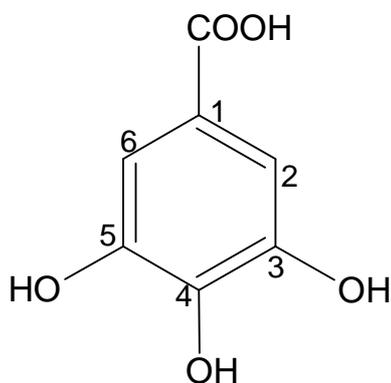
紫外光光譜(圖九)在 272 nm、245 nm 有最大吸收波長，272 nm 是 3,4,5-trihydroxybenzoic acid 的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 吸收。

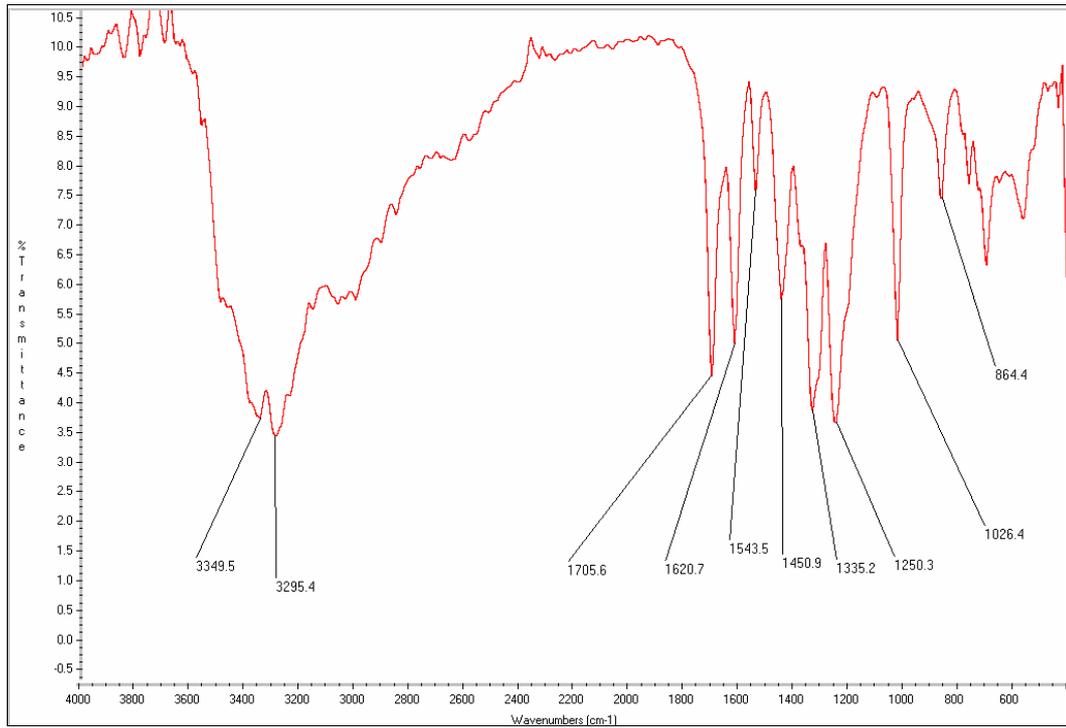
由 EIMS m/z (rel. int. %) 圖譜(圖十)顯示其 m/z 170 (100) [M]⁺ 為分子離子峰，此化合物分子量為 170。 m/z 153 (70) 為 M-17，125 (20) 為 M-45 的離子峰，是 benzoic acid 的特徵。



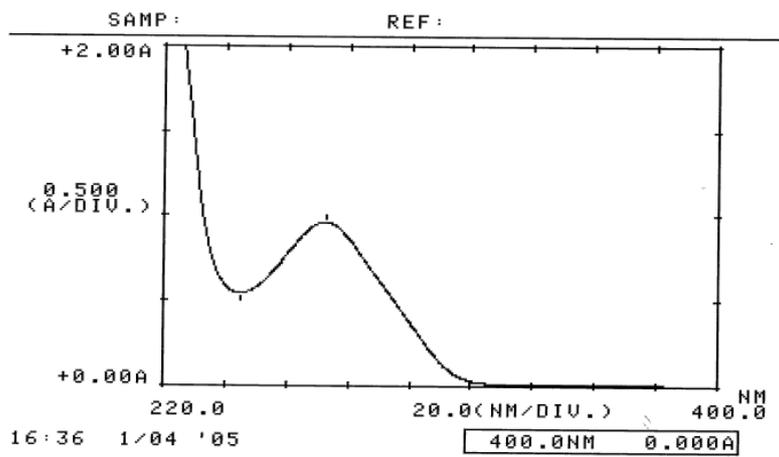
$^1\text{H-NMR}$ 光譜 (圖十一; acetone- d_6) 顯示 δ 8.20 (*br*) 為 benzene ring 上 OH 的氫訊號, δ 7.20 為 benzene ring 上氫的訊號。氫譜顯示化合物的對稱性很高。

$^{13}\text{C-NMR}$ 光譜 (圖十二; acetone- d_6) 也顯示在結構上有對稱性, 在 δ 166.6 為羧酸上的 C 訊號, δ 144.9 (C-3,5)、137.6 (C-1)、121.0 (C-4)、109.0 (C-2,6) 皆為 benzene ring 上 C 的訊號, 經與標準品的光譜比對, 得知此化合物為 3,4,5-trihydroxybenzoic acid (gallic acid)。

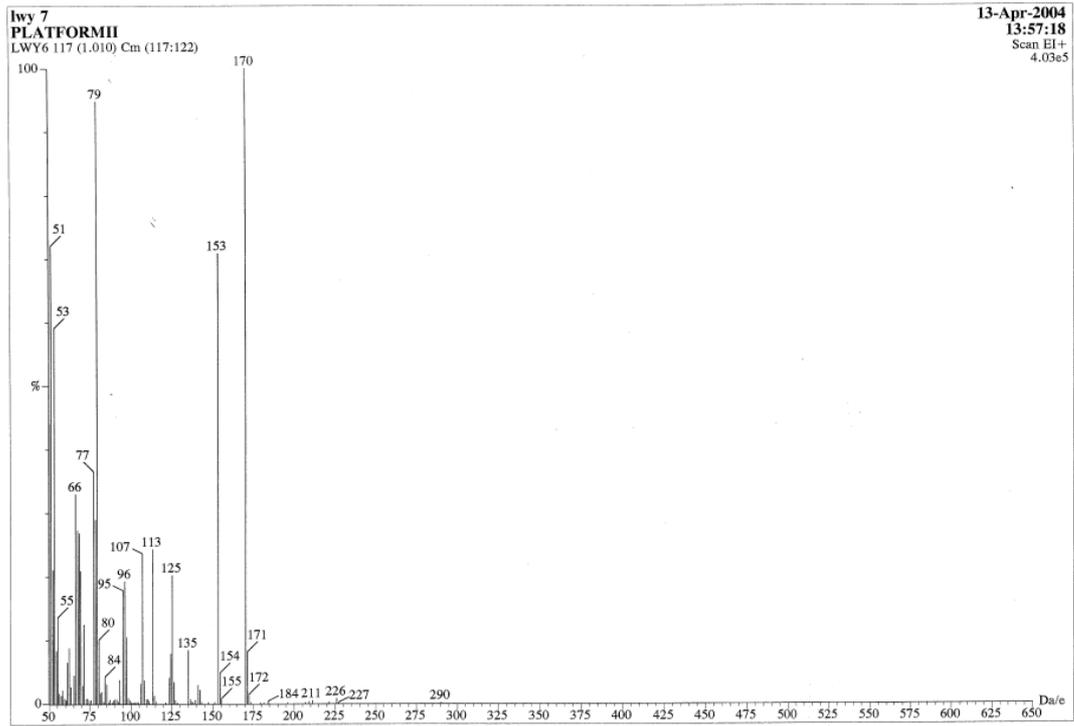




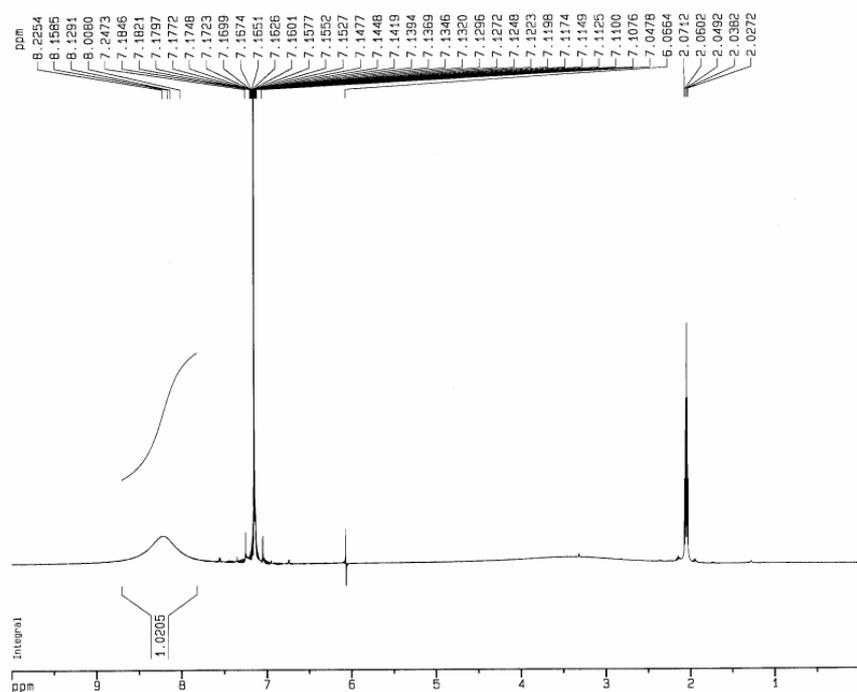
圖八、化合物 I 之 IR 光譜



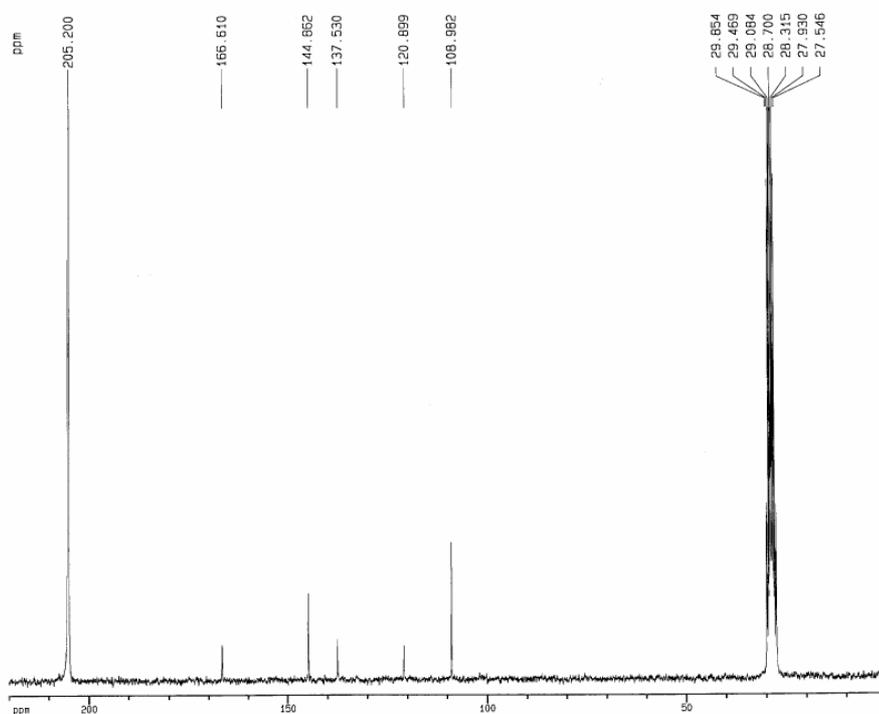
圖九、化合物 I 之 UV 光譜



圖十、化合物 I 之 EI 質譜



圖十一、化合物 I 之質子核磁共振光譜(200 MHz, acetone- d_6)



圖十二、化合物 I 之碳十三核磁共振光譜(200 MHz, acetone- d_6)

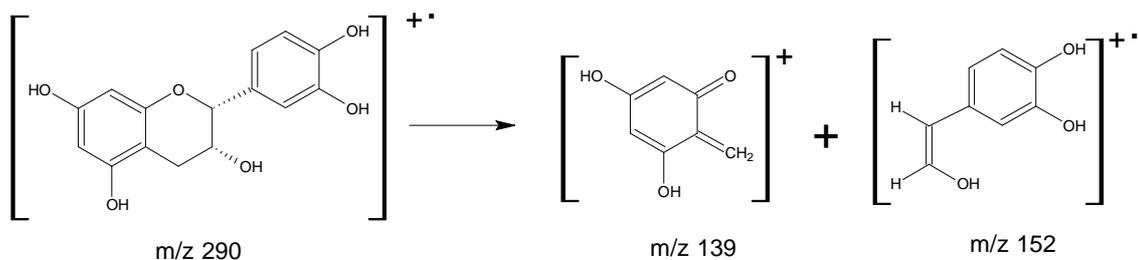
二、化合物 II—*epi*-catechin

化合物 II 為白色粉末，熔點 224-226 °C。其 TLC 片經溶媒(ethyl acetate) 展開後 Rf 值為 0.71，噴氯化鐵試液後，顏色呈紫黑色。噴 10% H₂SO₄ 加熱後，顏色呈紅褐色，初步推斷為多酚類的化合物。

紅外線光譜 (圖十三) 顯示，在 3500~3200 cm⁻¹ 為 OH 基的吸收， 1620、1520 及 1466 cm⁻¹ 為 benzene ring (C=C) 的吸收。

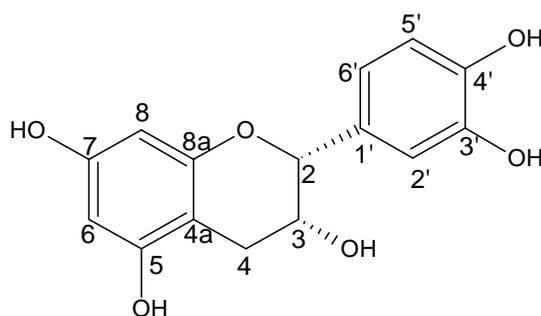
紫外光光譜 (圖十四) 在 280 nm、261 nm 有最大吸收波長，似有 benzene ring 的吸收。

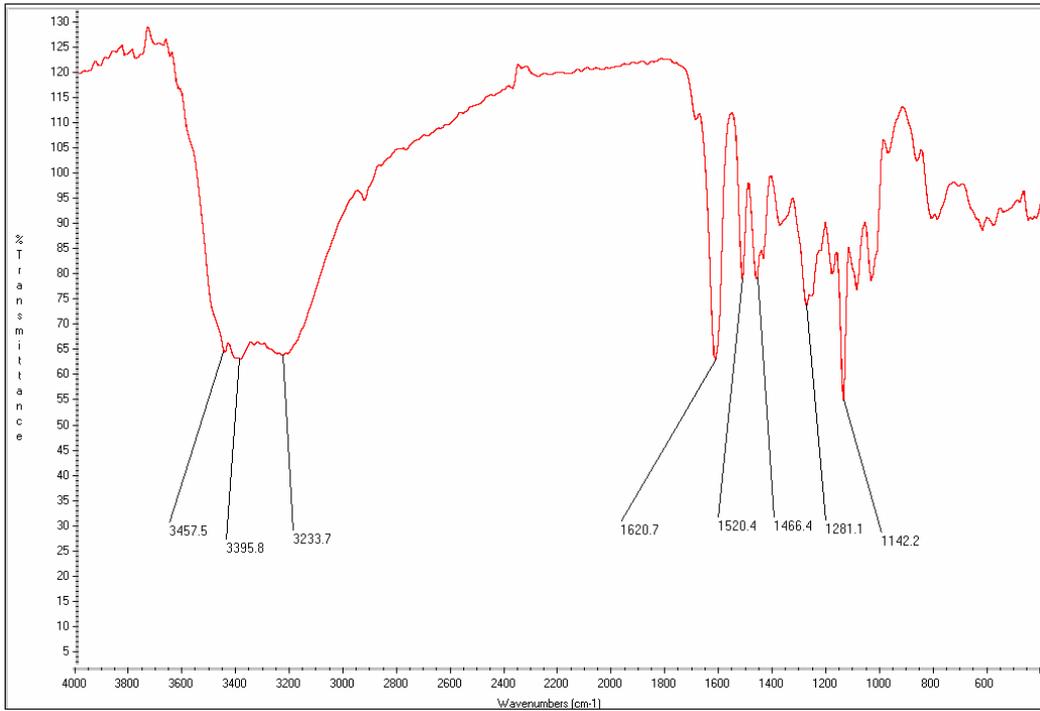
由 EIMS *m/z* (rel. int. %) 圖譜 (圖十五) 顯示其 *m/z* 290 (14) [M⁺] 為分子離子峰，此化合物分子量為 290，*m/z* 272 (2) 為 M-18 的離子峰，152 (20) 與 139 (31) 則是下列裂解而來：



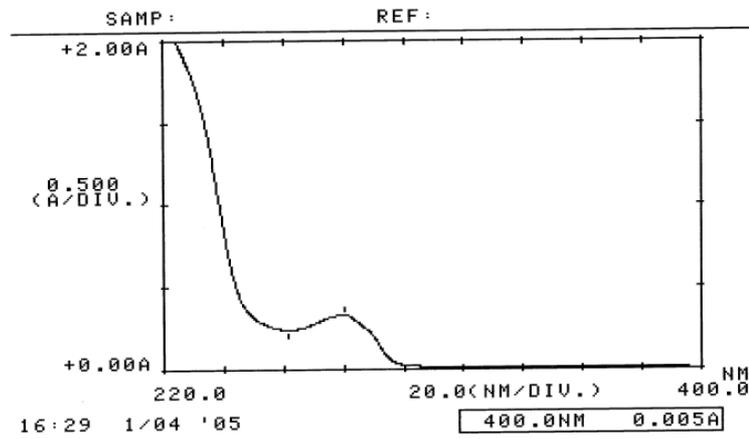
$^1\text{H-NMR}$ 光譜 (圖十六; acetone- d_6) 顯示 δ 7.8-8.5 為 5 個 OH 基上氫的訊號, 7.05 (1H, *d*, $J = 1.8$ Hz, H-2'), 6.82 (2H, *m*, H-5',6'), 6.02 (1H, *d*, $J = 2.2$ Hz, H-6), 5.91 (1H, *d*, $J = 2.2$ Hz, H-8), 4.87 (1H, *s*, H-2), 3.59 (1H, *d*, $J = 2.2$ Hz, H-3), 2.84 (1H, *dd*, $J = 16.6, 3.6$ Hz, H_{eq}-4), 2.77 (1H, *dd*, $J = 16.6, 3.4$ Hz, H_{ax}-4)。

$^{13}\text{C-NMR}$ 光譜 (圖十七; acetone- d_6) 顯示, δ 156.4-156.0 (C-5,7,8a), 144.2 (C-3', 4'), 131.1 (C-1'), 118.2 (C-6'), 114.4 (C-5'), 114.1 (C-2'), 98.7 (C-4a), 95.1 (C-6), 94.6 (C-8), 78.3 (C-2), 65.8 (C-3), 28.0 (C-4), 與標準品光譜比對, 得知此化合物為 *epi*-catechin。

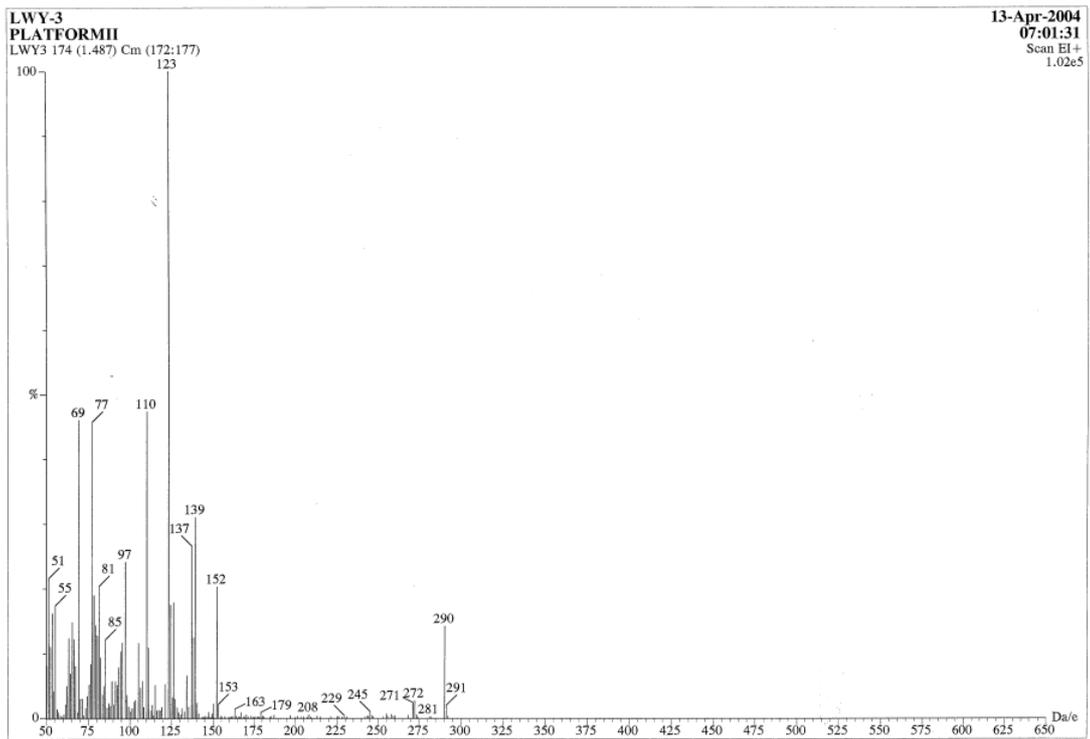




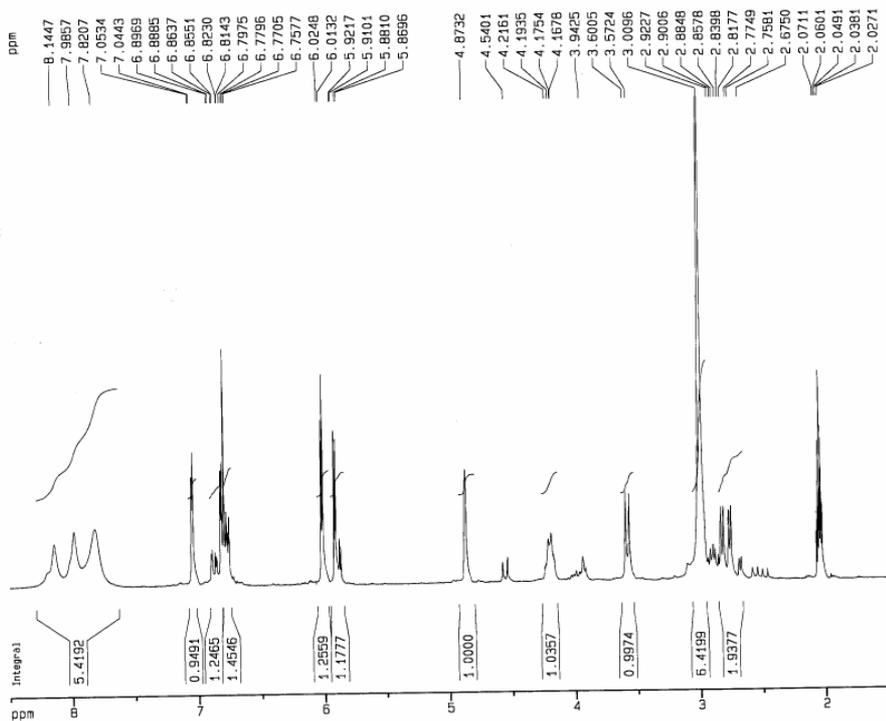
圖十三、化合物 II 之 IR 光譜



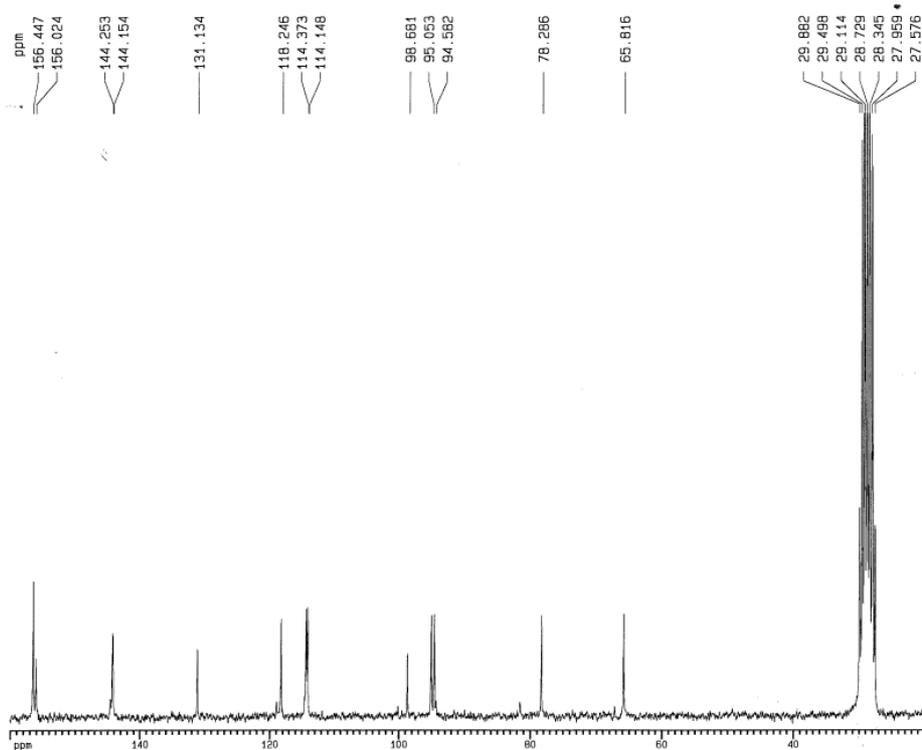
圖十四、化合物 II 之 UV 光譜



圖十五、化合物 II 之 EI 質譜



圖十六、化合物 II 之質子核磁共振光譜(200 MHz, acetone- d_6)



圖十七、化合物 II 之碳十三核磁共振光譜(200 MHz, acetone- d_6)

三、化合物 III—catechin

化合物 III 為白色粉末，熔點 212-214°C。其 TLC 片經溶媒(ethyl acetate) 展開後 Rf 值為 0.71，噴氯化鐵試液後，顏色呈紫黑色。噴 10% H₂SO₄ 加熱後，顏色呈紅褐色，初步推斷為多酚類的化合物。

紅外線光譜 (圖十八) 顯示，在 3500~3200 cm⁻¹ 為 OH 基的吸收訊號，1620、1520 及 1466 cm⁻¹ 為 benzene ring 的吸收，與 *epi*-catechin 相似。

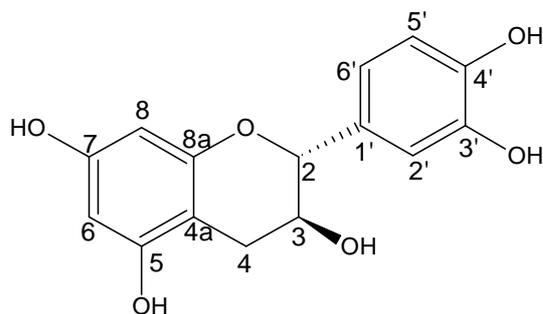
紫外光光譜 (圖十九) 在 280 nm、263 nm 有最大吸收波長，與 *epi*-catechin 相似。

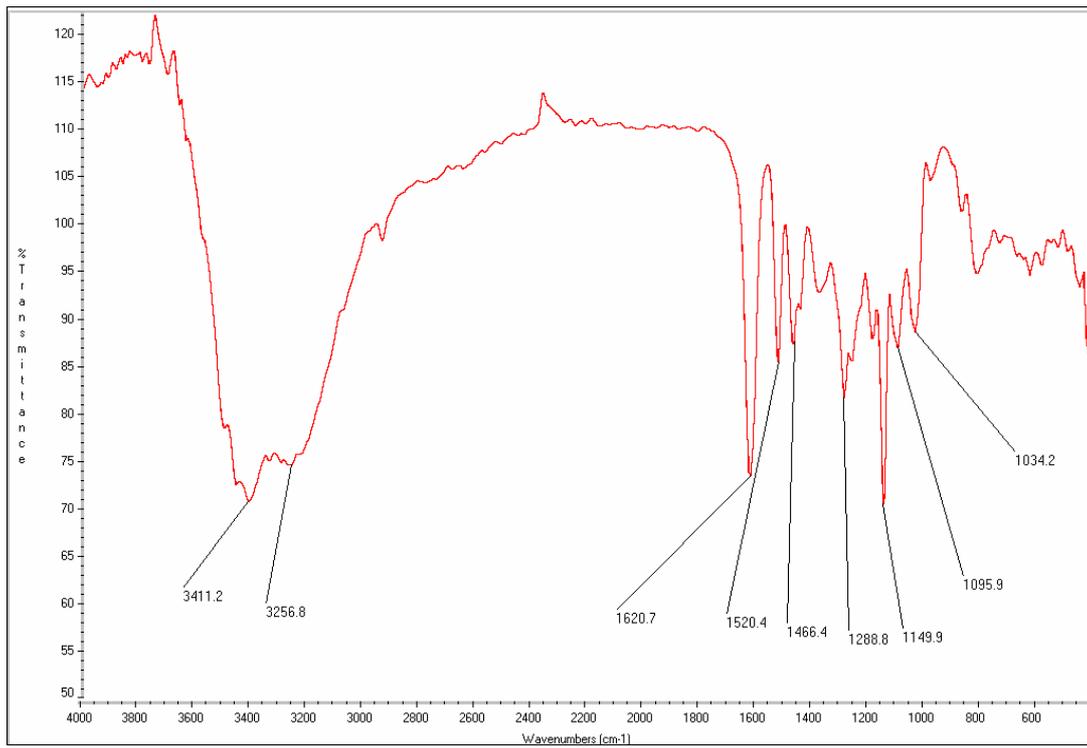
由 EIMS m/z (rel. int. %) 圖譜 (圖二十) 顯示其 m/z 290 (14) [M⁺] 為主要的分子離子峰，所以分子量為 290。裂解模式與 *epi*-catechin 相似， m/z 152 (17) 與 139 (0.2)。

¹H-NMR 光譜 (圖二十一; acetone-*d*₆)，顯示 δ 7.9-8.2 為 OH 基上氫的訊號，δ 7.05 (1H, *d*, *J* = 1.8 Hz, H-2')，6.79 (2H, *m*, H-5',6')，6.02 (1H, *d*, *J* = 2.2 Hz, H-6)，5.86 (1H, *d*, *J* = 2.2 Hz, H-8)，4.55 (1H, *d*,

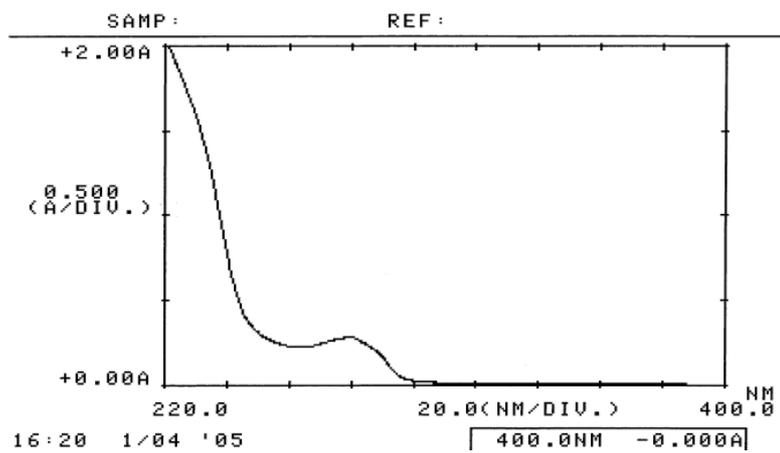
$J = 7.5$ Hz, H-2), 3.99 (1H, *m*, H-3), 2.90 (1H, *dd*, $J = 16.0, 5.1$ Hz, H_{eq}-4), 2.52 (1H, *dd*, $J = 14.5, 6.8$ Hz, H_{ax}-4)。

¹³C-NMR 光譜 (圖二十二; acetone-*d*₆) 顯示, δ 156.6、156.1、155.8 (C-5,7,8a), 144.6 (C-3', 4'), 131.0 (C-1'), 118.9 (C-6'), 114.5 (C-5'), 114.1 (C-2'), 99.5 (C-4a), 95.0 (C-6), 94.3 (C-8), 81.6 (C-2), 67.2 (C-3), 27.7 (C-4), 與標準品光譜比對, 得知此化合物為 catechin。

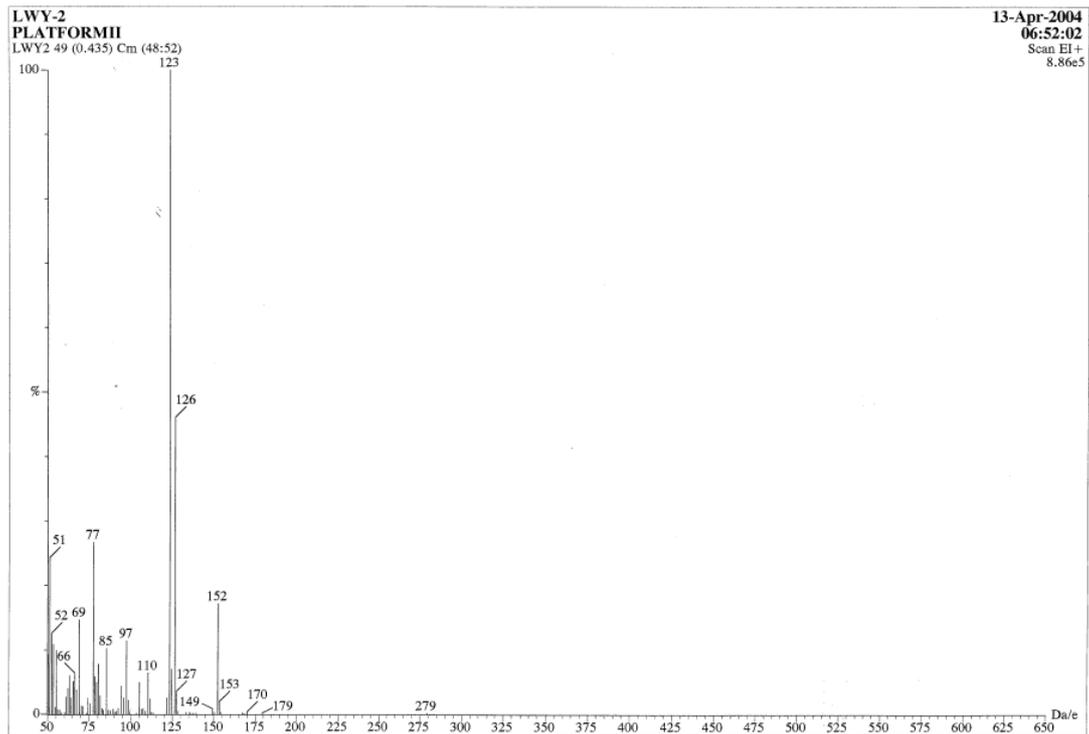




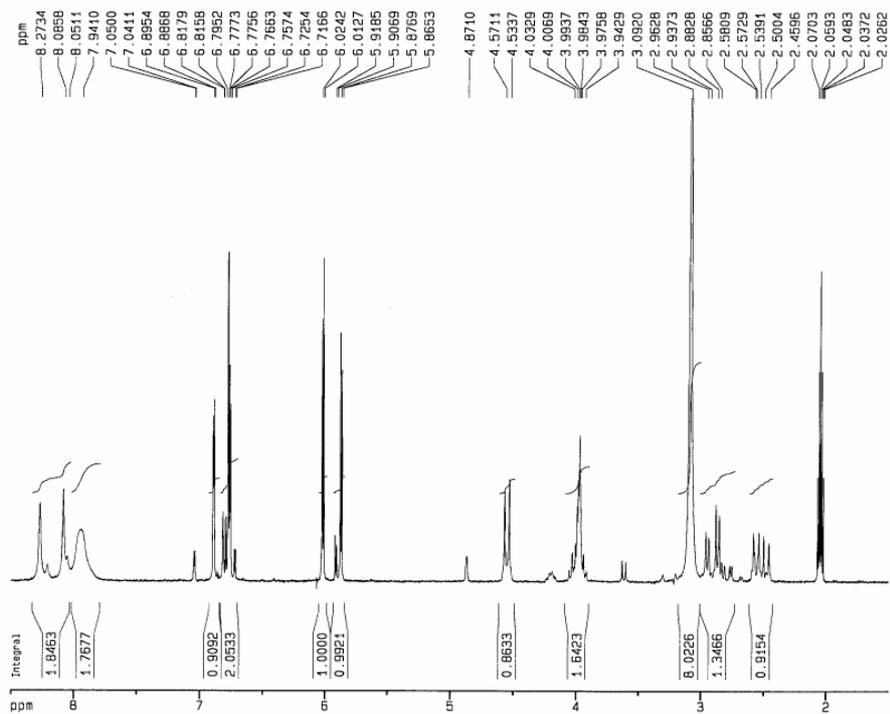
圖十八、化合物 III 之 IR 光譜



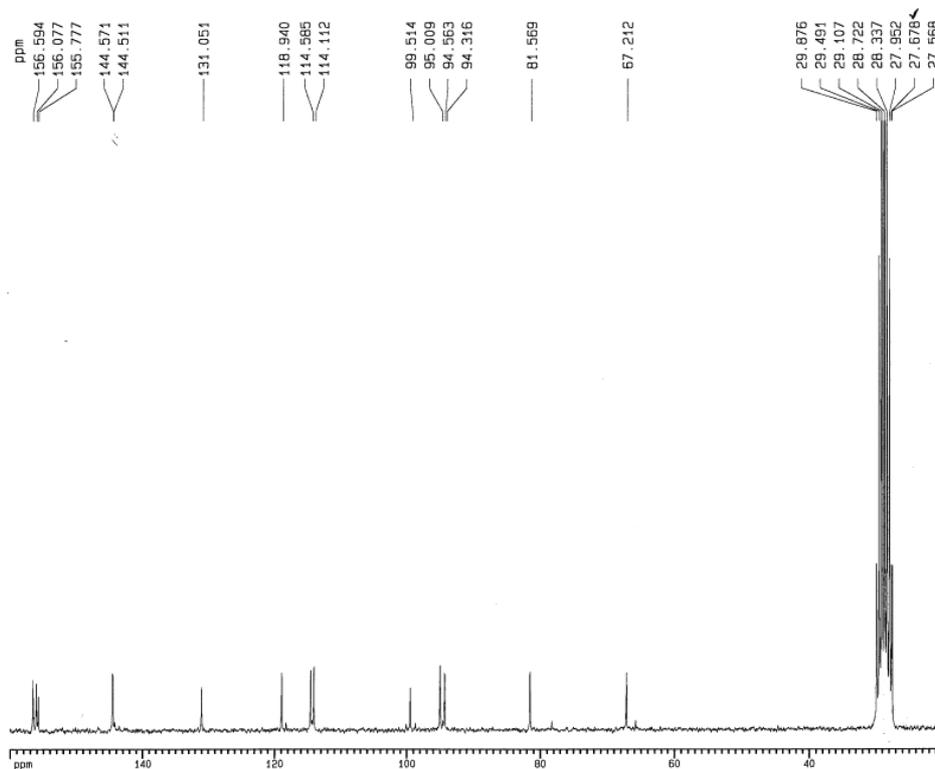
圖十九、化合物 III 之 UV 光譜



圖二十、化合物 III 之 EI 質譜



圖二十一、化合物 III 之質子核磁共振光譜(200 MHz, acetone- d_6)



圖二十二、化合物 III 之碳十三核磁共振光譜(200 MHz, acetone- d_6)

四、化合物 IV—dilinoleyl stearyl glyceride

化合物 IV 為透明液體。其 TLC 片經溶媒 (*n*-hexane) 展開後 Rf 值為 0.85，噴 10% H₂SO₄ 加熱後，顏色呈淡黃色，初步推斷為不飽和脂肪酸。

紅外線光譜 (圖二十三) 顯示，在 3009 cm⁻¹ 有不飽和 CH 的伸縮振動，3000~2800 cm⁻¹ 為飽和 CH₂ 的吸收，1744 cm⁻¹ 為 ester 的 C=O 吸收，1620、1659 cm⁻¹ 為 C=C 的吸收，1459、1374、1165 cm⁻¹ 為 -CH₂、-CH₃ 的變角振動吸收，結構上似乎沒有苯環。

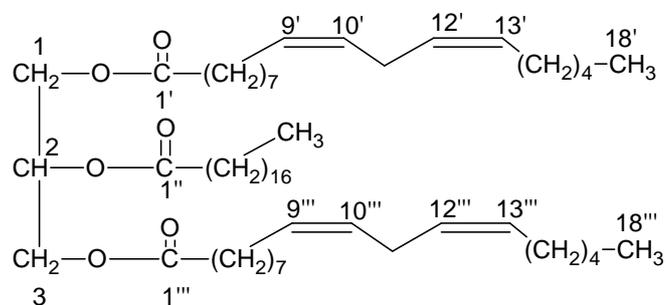
紫外光光譜 (圖二十四) 在 210 nm 有最大吸收波長，顯示沒有共軛系或苯環結構。

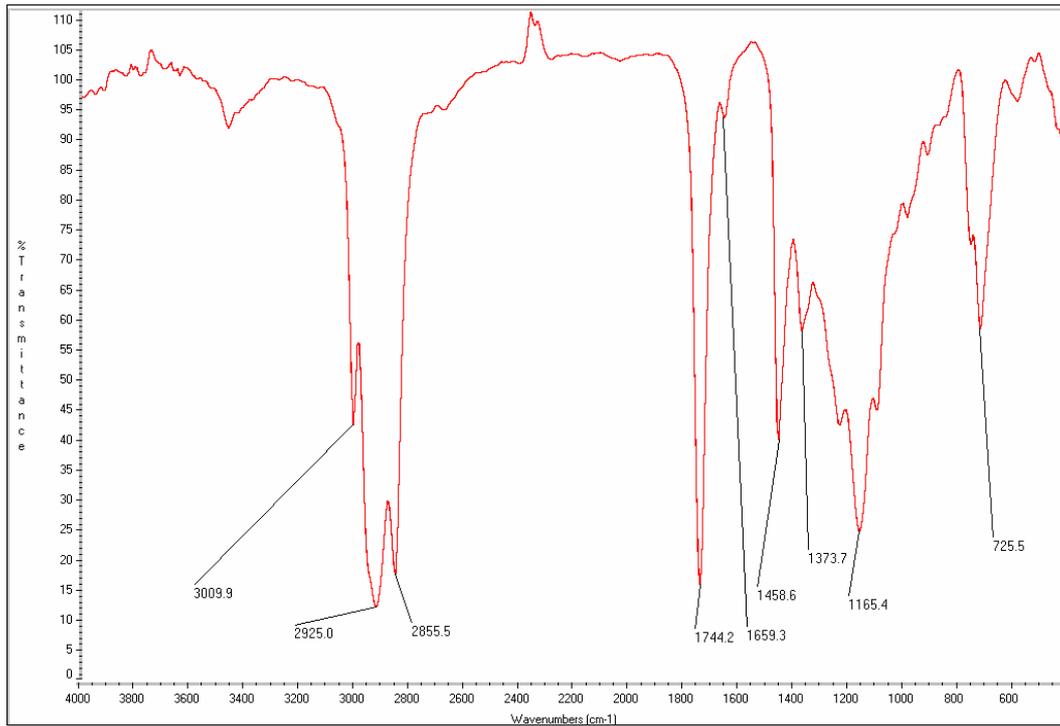
由 EIMS *m/z* (rel. int. %) 圖譜 (圖二十五) 顯示其 *m/z* 262 (0.4) 為 linoleic acid 從 ester 斷裂產生的 (RC⁺=O) 離子。

¹H-NMR 光譜 (圖二十六; CDCl₃)，顯示 δ 5.37 (9H, *m*) 為雙鍵上及 OCH₂- $\overset{|}{\text{HC}}$ -CH₂O 之氫的訊號，4.29 (2H, *dd*, *J* = 11.9, 4.3 Hz, H-1, 3)，4.13 (2H, *dd*, *J* = 11.9, 5.9 Hz, H-1,3)，2.76 (4H, *t*, *J* = 5.8 Hz, H-11',11'')，2.31 (6H, *t*, *J* = 7.2 Hz, H-2',2'',2''')，2.03 (8H, *m*, *J* = 6.4

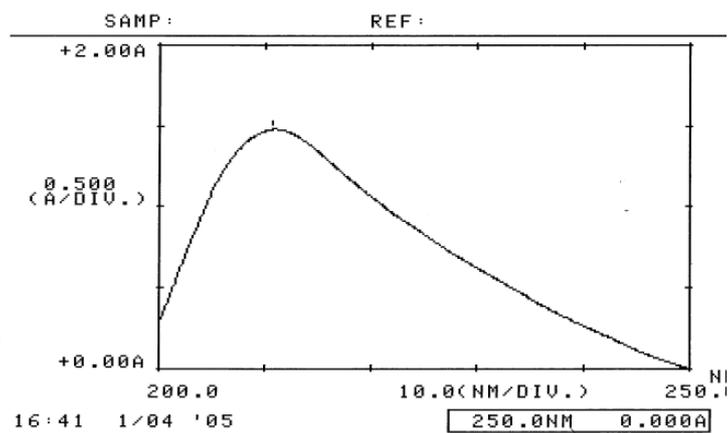
Hz, H-8',14',8'',14''), 1.23 (br, -(CH₂)_n-), 0.89 (9H, t, -CH₃)。

¹³C-NMR 光譜 (圖二十七; CDCl₃) 顯示在 δ 172.8 為 carboxylic ester 上 (C-1',1''), 172.6 (C-1''), 129.5~130.0 (C-9',13',9'', 13''), 127.8、127.6 (C-10',12',10'',12''), 68.6 (C-2), 61.9 (C-1,3), 22~33 為 -CH₂- 的訊號, 13.9 為 -CH₃ 的訊號, 經與文獻比對⁽³²⁾, 得知此化合物為 dilinoleyl stearyl glyceride。

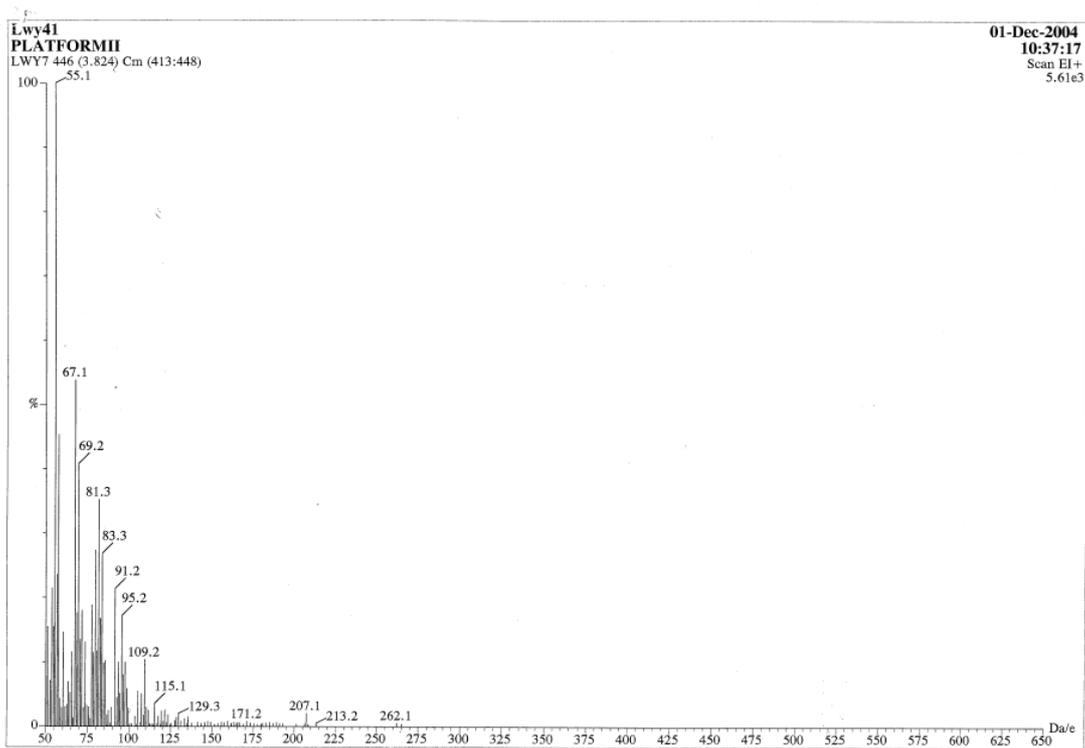




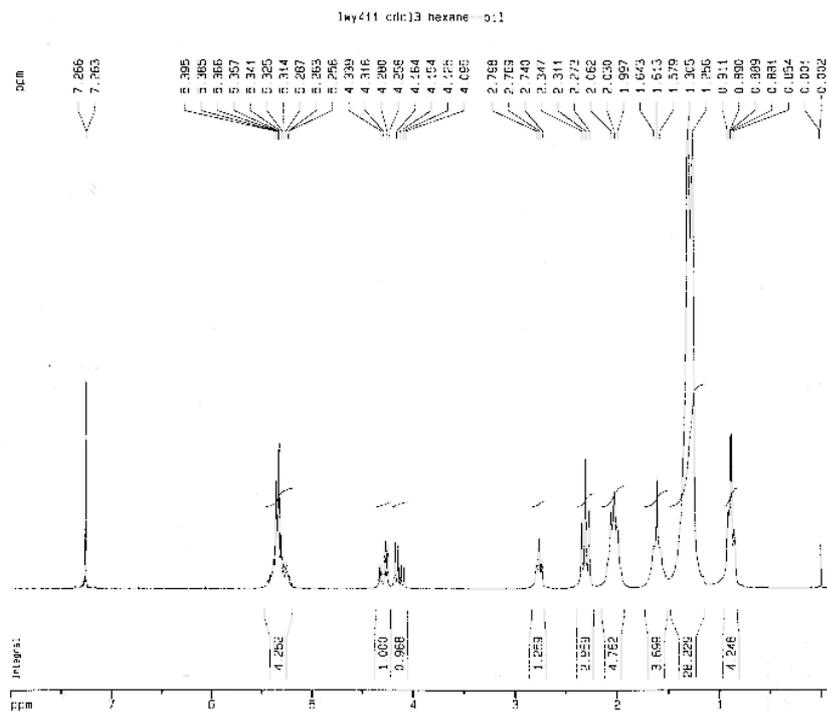
圖二十三、化合物 VI 之 IR 光譜



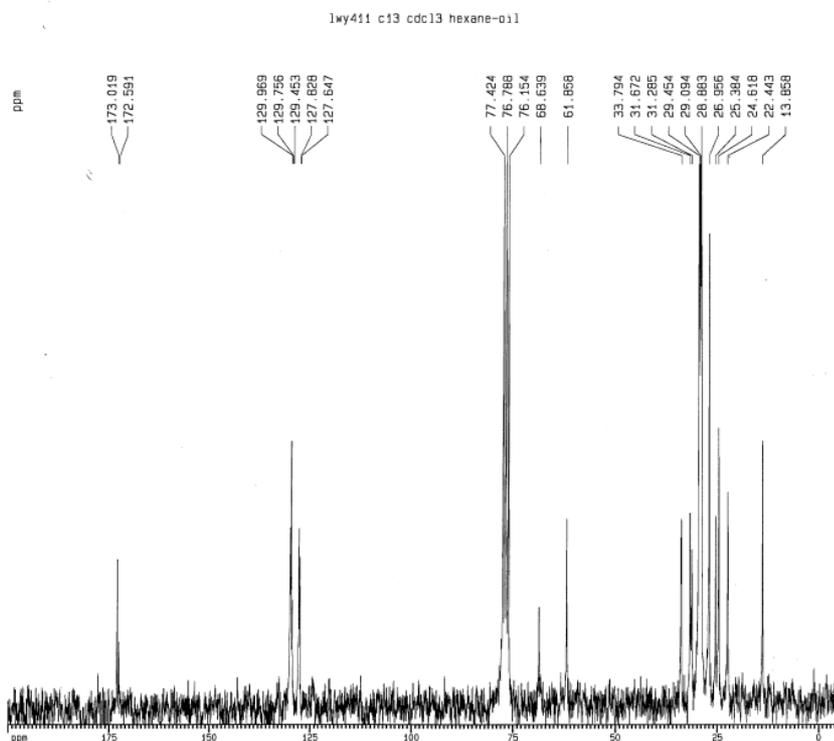
圖二十四、化合物 VI 之 UV 光譜



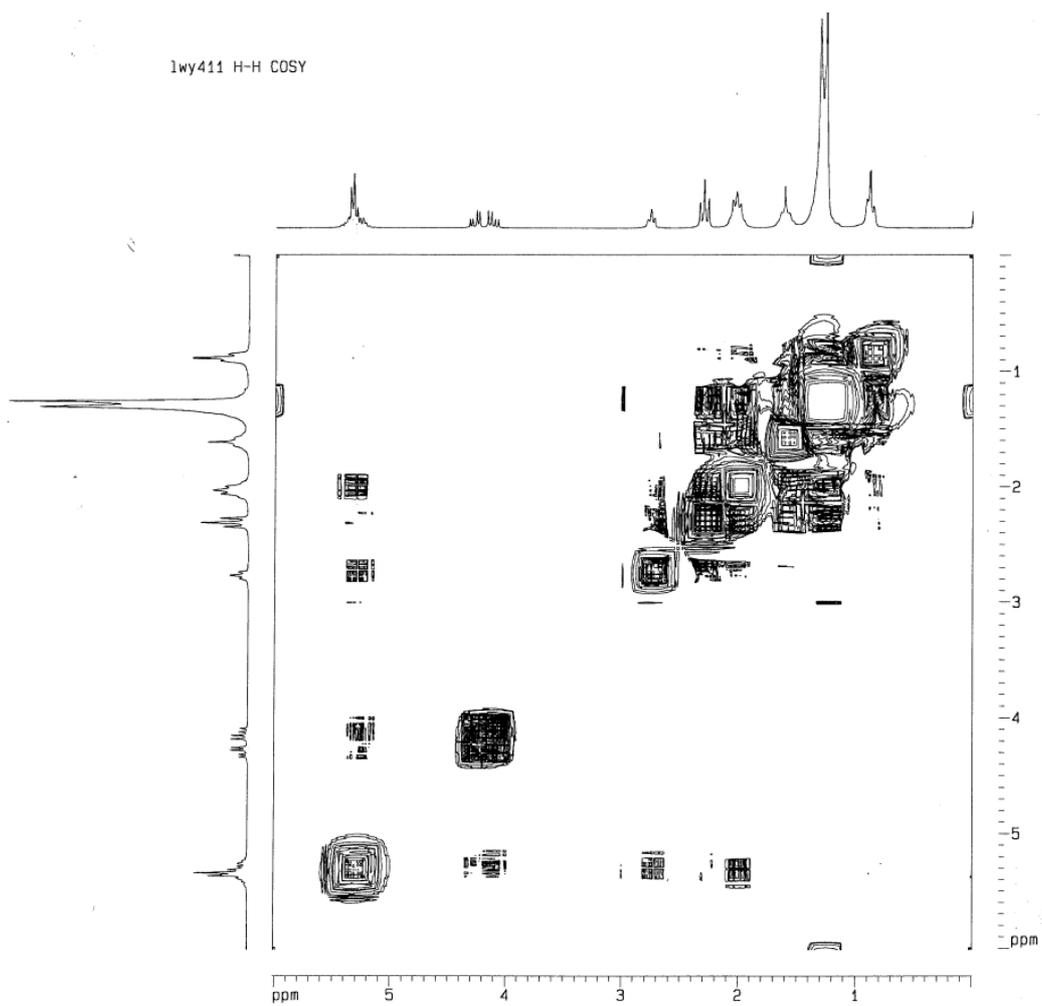
圖二十五、化合物 VI 之 EI 質譜



圖二十六、化合物 IV 之質子核磁共振光譜(200 MHz, CDCl₃)



圖二十七、化合物 IV 之碳十三核磁共振光譜(200 MHz, CDCl₃)



圖二十八、化合物 IV 之 ^1H - ^1H COSY 核磁共振光譜(200 MHz, CDCl_3)

第三節 抽出物之抑制細胞增殖活性

一、活性成分的追蹤

(1) 本實驗測試不同水果甲醇抽出物，對 HL-60 血癌細胞之抑制增殖活性及誘導分化活性

從日常生活中的蔬果，選擇了巨峰葡萄籽、西瓜、百香果、柿子、香蕉肉、香蕉心、巴西蘑菇，打碎後用甲醇浸漬抽提，減壓濃縮，分別稱取 2-3 毫克，用 DMSO 配置最高溶解濃度，供做藥理活性測試。其結果如表三：

表三、各水果甲醇抽出物對 HL-60 cell 之抑制增殖活性與誘導細胞分化活性

Samples	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	MTT assay (%)	NBT ($\mu\text{g/ml}$)
control		100.0 \pm 7.1	2.2 \pm 0.8
巨峰葡萄籽	0.1	71.5 \pm 7.4	5.6 \pm 2.2*
	0.5	20.0 \pm 2.1***	53.8 \pm 11.3***
	1	13.5 \pm 2.1***	Cell dead
	10	12.0 \pm 2.9***	Cell dead
巨峰葡萄肉	177	51.0 \pm 3.8*	2.3 \pm 0.4
巨峰葡萄皮	116	99.7 \pm 7.8	0.3 \pm 0.4
西瓜肉	28	79.7 \pm 4.4*	0.1 \pm 0.2
百香果肉	17	124.1 \pm 1.0	0.1 \pm 0.2
柿子肉	25	93.7 \pm 4.8	0.3 \pm 0.5
香蕉肉	7.6	63.4 \pm 8.3**	9.0 \pm 2.2***
香蕉心	2	72.7 \pm 4.3**	8.2 \pm 3.6**
巴西蘑菇	14	80.1 \pm 5.3**	4.3 \pm 1.6**

HL-60 cells (2.0×10^4 cells/well) were treated for 72 h. The data are presented as mean \pm SD from three independent experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ compared with control.

從表三可以得知，在這七樣初篩蔬果中，以巨峰葡萄籽的抑制細胞增殖活性很好，對於巨峰葡萄籽誘導分化方面，從 NBT 的百分比例值來看，在濃度 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 下具有不錯的分化能力。但巨峰葡萄籽的抑制細胞增殖活性優於誘導分化，因此其抑制細胞增殖活性成分，值得進一步做分離研究。

(2) 本實驗為巨峰葡萄籽不同有機溶媒之抽出物對 HL-60 cell 之抑制增殖活性

將葡萄籽甲醇抽出物溶於蒸餾水中，再以正己烷抽取數次，經減壓濃縮後得到正己烷抽出物。剩餘水溶液再以氯仿抽取數次，經減壓濃縮後得氯仿抽出物。剩餘水溶液再以乙酸乙酯抽取數次，經減壓濃縮後得乙酸乙酯抽出物。最後剩餘水溶液經冷凍乾燥後得水抽出物，分別稱取 2-3 毫克，用 DMSO 配製各濃度，進行藥理試驗。其結果如表四：

表四、不同有機溶媒之抽出物對 HL-60cell 之抑制增殖活性比較

Fraction	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	MTT assay (%)	IC ₅₀
Control	0.0	95.4 \pm 6.5	
水抽出物	1	82.1 \pm 9.1	
	10	43.1 \pm 9.2***	14.28
	20	36.4 \pm 3.2***	
	40	18.2 \pm 5.0***	
乙酸乙酯抽出物	1	N.D	
	10	79.6 \pm 9.8	23.58
	20	55.2 \pm 8.6***	
	40	16.7 \pm 7.3***	
氯仿抽出物	78	91.2 \pm 11.1	>78
正己烷抽出物	140	123.3 \pm 19.2	>140

HL-60 cells (2.0×10^4 cells/well) were treated for 72 h.

The data are presented as mean \pm SD from three independent experiments.

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

ND : not determined

由表四中，從 MTT assay (%) 的數據看來，水抽出物與乙酸乙酯抽出物細胞增殖抑制的活性佳，水抽出物的 IC₅₀ 為 14.28 $\mu\text{g/ml}$ ，乙酸乙酯抽出物的 IC₅₀ 為 23.58 $\mu\text{g/ml}$ ，因此得知巨峰葡萄籽所含抑制細胞增殖活性成分，分布在高極性溶媒抽出物中。由於水層抽出物的極性較乙酸乙酯抽出物高，所以先選擇乙酸乙酯抽出物，繼續做分離的工作。

(3) 乙酸乙酯抽出物繼續分離所得 EA₂ 之抑制細胞增殖活性

將乙酸乙酯抽出物溶於乙酸乙酯中，再用 0.1N NaOH 水溶液進行分配，反覆抽提共 15 次，乙酸乙酯抽出物減壓濃縮後得 1.6 g，為 EA₁ (屬中性、鹼性物質)。分配後的水溶液以 1N HCl 中和，最後再以乙酸乙酯抽提，減壓濃縮後得 46.8 g，為 EA₂ (屬酸性物質)。再將 EA₁、EA₂ 做藥理活性測試，其結果如表五：

表五、EA₁、EA₂ 對 HL-60 cell 之抑制增殖活性比較

Fraction	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	MTT assay (%)	IC ₅₀
Control		100.0 \pm 7.3	
EA ₁	5	70.4 \pm 2.4	
EA ₂	10	59.3 \pm 6.6***	
	20	55.9 \pm 4.6***	20.83
	40	26.1 \pm 9.6***	

HL-60 cells (2.0×10^4 cells/well) were treated for 72 h.

The data are presented as mean \pm SD from three independent experiments

*** $P < 0.001$ compared with control.

由於 EA₁ 的溶解度極差，所能配製的最高濃度為 5 $\mu\text{g/ml}$ ，因此無法計算其 IC₅₀，而由表五得知，EA₂ 的 IC₅₀ 為 20.83 $\mu\text{g/ml}$ ，因此將 EA₂ 繼續做分離的工作。

(4)本實驗測試由 EA₂，經過 Sephadex LH-20 column 後的分割，將收集液分成 Fr. A ~Fr. H，分別對 HL-60 血癌細胞之抑制增殖活性，其結果如表六所示：

表六、EA₂ 之 sephadex 分割 Fr. A ~Fr. H，分別對 HL-60 cell 之抑制增殖活性

Fraction	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	MTT assay (%)	IC ₅₀
Control		100.0 \pm 0.0	
A	2.5	69.7 \pm 9.0**	7.57
	5	64.2 \pm 2.7***	
	7.5	48.2 \pm 3.8***	
	10	40.0 \pm 0.3***	
B	5	75.2 \pm 2.5**	> 10
	7.5	100.8 \pm 6.1	
	10	110.0 \pm 5.9	
C	5	105.0 \pm 7.2	> 10
	7.5	91.7 \pm 4.7	
	10	90.6 \pm 2.1*	
D	10	77.9 \pm 3.2	26.7
	20	71.6 \pm 5.6*	
	40	7.5 \pm 0.4***	
E	10	67.9 \pm 4.1**	14.76
	20	26.3 \pm 1.1***	
	40	13.0 \pm 3.1***	
F	10	80.0 \pm 4.9**	20.96
	20	44.3 \pm 0.0***	
	40	9.7 \pm 2.1***	
G	10	108.3 \pm 4.5*	34.3
	20	57.0 \pm 4.3***	
	40	46.0 \pm 0.8***	
H	10	96.7 \pm 1.1*	32.3
	20	70.3 \pm 0.5**	
	40	36.1 \pm 0.6 ***	

HL-60 cells (2.0×10^4 cells/well) were treated for 72 h.

The data are presented as mean \pm SD from three independent experiments.

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

由表六得知，Fraction A 的藥理活性 IC_{50} 低於 $7.6 \mu\text{g/ml}$ ；Fraction B 的最低濃度 $5 \mu\text{g/ml}$ ，數據上看來似乎有抑制細胞增殖的效果，但在鏡檢下發現是由於細胞在 well 中長的過滿，導致細胞死亡。Fraction E 及 F 藥理活性 IC_{50} 介於 $10\text{-}20 \mu\text{g/ml}$ ；Fraction D 及 H 藥理活性 IC_{50} 界於 $30\text{-}40 \mu\text{g/ml}$ 。因此實驗按照順序將 Fraction A-E 繼續做分離的工作。

(5) 由 Fr. A ~Fr. H 中所分離出來的化合物，分別對 HL-60 cell 之抑制增殖活性，其結果如表七所示：

表七、三個化合物分別對 HL-60 cell 之抑制增殖活性

Compound	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	MTT assay (%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
control		100.0 \pm 0.0	
I (gallic acid)	1	105.2 \pm 9.7	
	2.5	66.5 \pm 1.9***	3.1
	5	0.0 \pm 0.0***	
	7.5	0.0 \pm 0.0***	
	10	0.0 \pm 0.0***	
II (epi-catechin)	1	105.1 \pm 5.0	
10	98.8 \pm 10.1		
50	90.9 \pm 7.3		
100	69.2 \pm 5.8**		
III (catechin)	1	105.1 \pm 12.5	> 100
	10	102.7 \pm 11.2	
	50	92.6 \pm 6.2	
	100	79.6 \pm 3.2*	

HL-60 cell (2.0×10^4 cells/well) were treated for 72 h.

The data are presented as mean \pm SD from three independent experiments.

** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ compared with control.

由表七得知，化合物 I 經結構鑑定為 gallic acid，其 IC₅₀ 為 3.1 $\mu\text{g/ml}$ ；而化合物 II 及 III，其 IC₅₀ 皆大於 100 $\mu\text{g/ml}$ 。

(6) 3 個化合物對其他貼附性細胞株的篩選。

本實驗測試由所分離出三個化合物，分別對 B16-F₀ cell(黑色素瘤細胞)、H226 (肺癌細胞)、J5 (肝癌細胞)、MDA KB-231 (乳癌細胞)之抑制增殖活性進行篩選，其結果如表八、九、十、十一

表八、化合物與標準品分別對 B16-F₀ cell 之抑制增殖活性

Compound	Concentration (μM)	MTT assay (%)	IC ₅₀ (μM)
control		100.0 \pm 0.0	
I (gallic acid)	1	62.5 \pm 4.1***	
	10	60.6 \pm 5.2***	
	25	44.6 \pm 3.4***	22.4
	50	34.4 \pm 5.3***	
	100	12.5 \pm 2.8***	
II (epi-catechin)	1	66.4 \pm 7.1***	
	10	77.3 \pm 4.5***	> 100
	100	79.8 \pm 6.0***	
III (catechin)	1	81.2 \pm 7.8	
	10	74.6 \pm 4.9	> 100
	100	87.1 \pm 6.1	

B16-F₀ cell (1.0 \times 10⁴ cells/well) were treated for 72 h.

The data are presented as mean \pm SD from three independent experiments.

*** $P < 0.001$ compared with control.

表九、化合物與標準品分別對 NCI-H226 cell 之抑制增殖活性

Compound	Concentration (μM)	MTT assay (%)	IC₅₀ (μM)
control		100.0 \pm 0.0	
I (gallic acid)	10	69.5 \pm 5.4***	> 100
	25	80.7 \pm 5.4***	
	50	86.0 \pm 4.3***	
	100	76.6 \pm 4.0***	
II (epi-catechin)	10	91.6 \pm 2.8	> 100
	25	90.1 \pm 5.5*	
	50	83.5 \pm 3.2***	
	100	94.0 \pm 6.9*	
III (catechin)	10	91.1 \pm 5.5*	> 100
	25	95.2 \pm 6.4	
	50	96.6 \pm 6.0	
	100	100.5 \pm 4.2	

NCI-H226 cell (2.0×10^4 cells/well) were treated for 72 h.

The data are presented as mean \pm SD from three independent experiments.

* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ compared with control.

表十、化合物與標準品分別對 J5 cell 之抑制增殖活性

Compound	Concentration (μM)	MTT assay (%)	IC ₅₀ (μM)
control		100.0 \pm 0.0	
I (gallic acid)	10	98.9 \pm 5.1**	66.17
	25	97.9 \pm 3.5	
	50	66.3 \pm 6.2***	
	100	13.3 \pm 3.0***	
II (epi-catechin)	10	104.0 \pm 2.6	> 100
	25	101.6 \pm 3.5	
	50	102.1 \pm 6.8	
	100	100.6 \pm 2.6	
III (catechin)	10	97.3 \pm 5.0	> 100
	25	99.5 \pm 3.9	
	50	102.6 \pm 3.1**	
	100	103.8 \pm 5.0*	

J5 cell (1.0×10^4 cells/well) were treated for 72 h.

The data are presented as mean \pm SD from three independent experiments.

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

表十一、化合物與標準品分別對 MDA KB-231 cell 之抑制增殖活性

Compound	Concentration (μM)	MTT assay (%)	IC ₅₀ (μM)
control		100.0 \pm 0.0	
I (gallic acid)	10	95.7 \pm 5.1	> 100
	25	98.2 \pm 7.5	
	50	97.5 \pm 3.2	
	100	96.5 \pm 5.8	
II (epi-catechin)	10	102.3 \pm 0.1*	> 100
	25	103.0 \pm 3.7*	
	50	106.7 \pm 5.3**	
	100	106.5 \pm 4.9**	
III (catechin)	10	97.3 \pm 2.1	> 100
	25	104.3 \pm 5.0	
	50	111.2 \pm 6.0*	
	100	112.8 \pm 2.8**	

MDA KB-231 cell (4.0×10^4 cells/well) were treated for 72 h.

The data are presented as mean \pm SD from three independent experiments.

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ compared with control.

由表八、九、十、十一得知，化合物 I、II與III對所測試的四株細胞株，IC₅₀皆大於100 μM ；而化合物I對B16-F₀ cell、J5 cell有不錯的藥理活性。在此三個化合物中，化合物I的活性優於化合物 II 及 III。

在一連串針對 HL-60 血癌細胞，所做的藥理活性追蹤中顯示，從甲醇粗抽物，一路選擇由乙酸乙酯抽出物繼續做分離的工作。乙酸乙酯抽出物的藥理活性為 $IC_{50} = 23.58 \mu\text{g/ml}$ ； EA_2 的藥理活性 $IC_{50} = 20.83 \mu\text{g/ml}$ ；從 EA_2 劃分出的 Fr. A，其藥理活性為 $IC_{50} = 7.57 \mu\text{g/ml}$ ；最後所得的化合物 I，其藥理活性為 $IC_{50} = 3.1 \mu\text{g/ml}$ ，經結構鑑定為 gallic acid，而化合物 II 及 III 藥理活性 IC_{50} 皆大於 $100 \mu\text{g/ml}$ 。

由上得知本研究所追蹤的活性成分，應為 gallic acid。

第四節 抽出物之美白活性

在黑色素的生成過程，dopa 轉變為 dopachrome，dopachrome 經由氧化反應轉變為黑色素，天然的抗氧化物中，左旋 C 可還原黑色素，而熊果素、麴酸等具抑制黑色素的生成，目前已普遍使用在美白化妝品。

如前述，葡萄籽中含抗氧化成分，此等成分是否兼具美白效果，引人注意。因此將所分離出的 catechin、gallic acid、*epi*-catechin，進一步做體外黑色素細胞測試，看是否有抑制黑色素生成的現象，進而希望能運用在美白產品上。

在實驗設計上，針對抑制黑色素的生成做為測試的目標。

酪胺酸酶活性測試(Tyrosinase Activity Test)

本實驗使用分離所得化合物測試，是否會抑制細胞內酪胺酸酶的活性，進而抑制黑色素的生成，以 Vit.C 為 positive control，其結果如表十二。

由表十二得知，gallic acid 抑制酪胺酸酶的活性，抑制率約為 50%，較 epicatechin 與 catechin 佳。

表十二、Vit. C、gallic acid、*epi*-catechin 與 catechin 抑制酪胺酸酶的活性

化合物	濃度 (μM)	時間 (min)					
		0	1	5	10	20	30
Vit. C	10	24.3 \pm 1.6***	5.9 \pm 5.1	3.4 \pm 3.1	-9.4 \pm 4.9	-2.9 \pm 0.5	-8.8 \pm 1.9
	100	63.7 \pm 0.5***	15.3 \pm 6.0*	9.1 \pm 4.2*	3.5 \pm 5.1	12.9 \pm 2.4**	0.1 \pm 1.7
	1000	97.4 \pm 0.3***	98.1 \pm 0.3***	75.7 \pm 1.9***	51.9 \pm 1.6***	24.6 \pm 4.6**	7.7 \pm 1.5**
gallic acid	10	15.1 \pm 5.9*	17.6 \pm 6.0*	2.9 \pm 9.5	2.9 \pm 9.4	1.4 \pm 6.7	-2.7 \pm 8.2
	100	25.5 \pm 6.5**	27.8 \pm 6.2**	10.5 \pm 5.5*	10.5 \pm 1.3**	2.4 \pm 3.3	-0.5 \pm 0.6
	1000	39.0 \pm 2.9***	48.2 \pm 1.6***	41.0 \pm 4.0***	38.9 \pm 2.2***	23.4 \pm 1.4***	-0.5 \pm 2.6
<i>epi</i>-catechin	10	-6.1 \pm 4.9	-1.9 \pm 4.4	2.9 \pm 3.5	1.3 \pm 5.0	0.8 \pm 1.1	-3.6 \pm 5.3
	100	-31.5 \pm 6.6	-13.3 \pm 10.3	-1.1 \pm 0.3	-2.1 \pm 9.6	1.2 \pm 8.4	-2.5 \pm 6.6
	1000	-32.2 \pm 13.6	-11.0 \pm 7.4	4.5 \pm 7.7	6.5 \pm 5.1	2.3 \pm 6.0	-15.4 \pm 9.6
catechin	10	-15.8 \pm 0.8	-5.2 \pm 8.4	3.5 \pm 3.7	0.8 \pm 6.1	-6.4 \pm 3.3	-20.4 \pm 8.8
	100	-10.7 \pm 9.6	0.6 \pm 3.0	4.7 \pm 3.0	4.1 \pm 5.4	0.7 \pm 3.7	-2.0 \pm 5.0
	1000	-29.1 \pm 8.7	-17.5 \pm 5.5	-6.0 \pm 3.8	-4.1 \pm 6.2	-20.3 \pm 6.3	-46.6 \pm 7.7

The data are presented as mean \pm SD from three independent experiments.

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ compared with control

第三章 實驗部分

第一節 成分分離

一、儀器與試藥

(一) 儀器

(1) HPLC

- a. Series 2000 Autosampler (Perkin Elmer)
- b. UV Spectrophotometric Detector (Shimadzu SPD-6A)
- c. Liquid Chromatograph (Shimadzu LC-6A)
- d. Chromatopac (Shimadzu CR-6A)

(2) 冷凍乾燥器

- a. Microprocessor control corrosion resistant freeze dryer
(Flexi-DryTMμP)
- b. Microprocessor control bulk tray dryer (Dura-TopTMμP)

(3) 熔點測定裝置 (melting point apparatus)

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

(4) 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。

(5) 紅外光光譜儀 (infrared spectrometer ; IR)

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

(6) 質譜儀 (mass spectrometer ; MS)

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

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

採用 DPX-200 FT-NMR spectrometer。以 δ 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(doubolet)， t 表三重峰(triplet)， q 表四重峰(quartet)， m 表多重峰(multiplet)， br 表寬峰。

(8) 紫外光燈 (UV lamp)

CAMAG UV-Cabinet II , wavelength 254 nm and 366 nm

(9) 自動旋光光度計

JASCO P-1020 polarimeter

(二) 試藥

(1) 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、ethanol 等購自 TEDIA (ACS)。

(2) HPLC 移動相溶劑

HPLC 級的 methanol 購自 TEDIA (ACS)。

(3) 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)。

(4)核磁共振用溶劑

Methanol- d_4 (deuteration degree 99.5%)、chloroform- d_1
(deuteration degree 99.5%)、acetone- d_6 (deuteration degree
99.5%) 等購自默克公司(Merck Taiwan, LTD, 台北)。

(5)管柱色層分析 (column chromatography) 充填劑

1. Silica gel

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

2. SephadexTM LH-20 (Amersham Biosciences)。

3. RP-18

Lichroprep^R RP-18 (40-63 μ m, Merck)。

(6)薄層色層分析 (thin-layer chromatography)

1. TLC aluminium sheets (silica gel 60 F₂₅₄, 20×20 cm, 0.2 mm layer, Art. 5554, Merck)。

2. DC-Alufolien cellulose F (20×20 cm, 0.1 mm, Art.5574, Merck)。

3. 25DC plates (RP-8 F₂₅₄, 5×10 cm, Merck)。

(7) 製備薄層色層分析(preparative TLC)

採用 PLC plates silica gel 60 F₂₅₄ concentrating zone (20×20cm, 1 mm, Merck)

(8) 三氯化鐵 (FeCl₃)

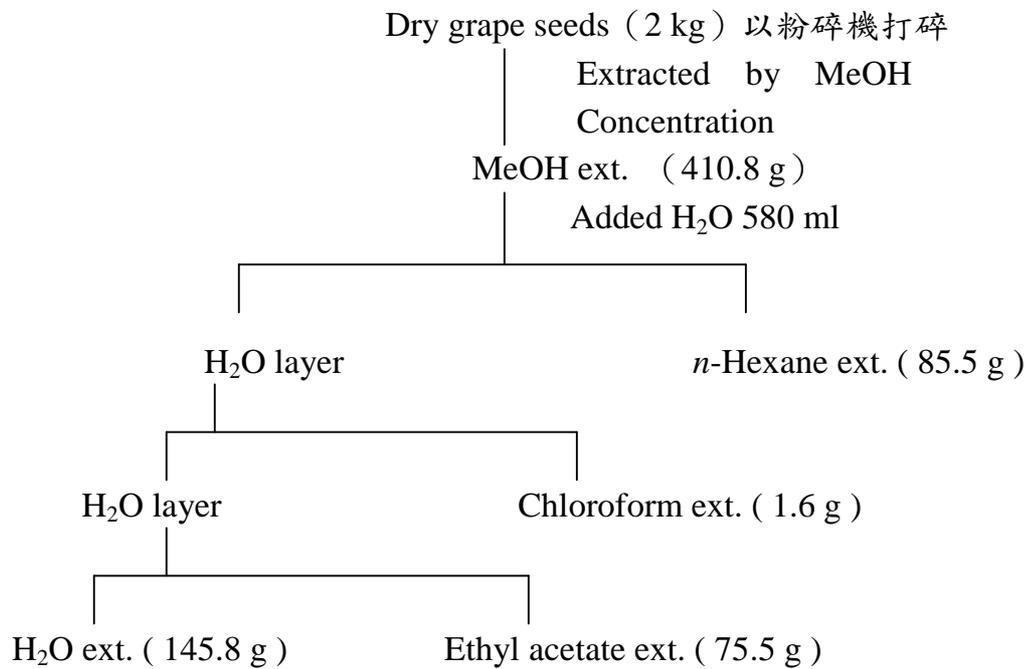
為噴霧劑使用。取氯化鐵 9 g，加入蒸餾水，配成 1000 ml 水溶液。

二、成分抽取與分離方法

(一) 粗抽物製備

取購自水果行之巨峰葡萄，經人工剝皮、取籽、37 °C 下烘乾，共得葡萄籽 2 公斤，經由文獻記載特徵，逐一比較查證為 *Vitis vinifera* × *Vitis labrusca* (Vitaceae)，始進行研究工作。先用粉碎機將葡萄籽打碎成粉末，再用甲醇浸漬反覆抽提數次，合併抽取液，經減壓濃縮後得甲醇抽出物 410.8 公克；將抽取物溶於蒸餾水中，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出物為 85.5 公克；剩餘水溶液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出物為 1.6 公克；剩餘水溶液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出物為 75.5 公克；最後剩餘水溶液經減壓濃縮及冷凍乾燥後，得水抽出物 145.8 公克。將此五個抽出物，進行抑制細胞增殖試驗。

上述乙酸乙酯抽出物、正己烷抽出物，再以管柱層析、薄層層析、高效液相層析及再結晶法繼續進行分離，抽取與分離流程如 Scheme 1~ Scheme 3。



Scheme 1 巨峰葡萄籽之抽取與分離

(二) 成分的單離

(1) 乙酸乙酯抽出物之成分單離

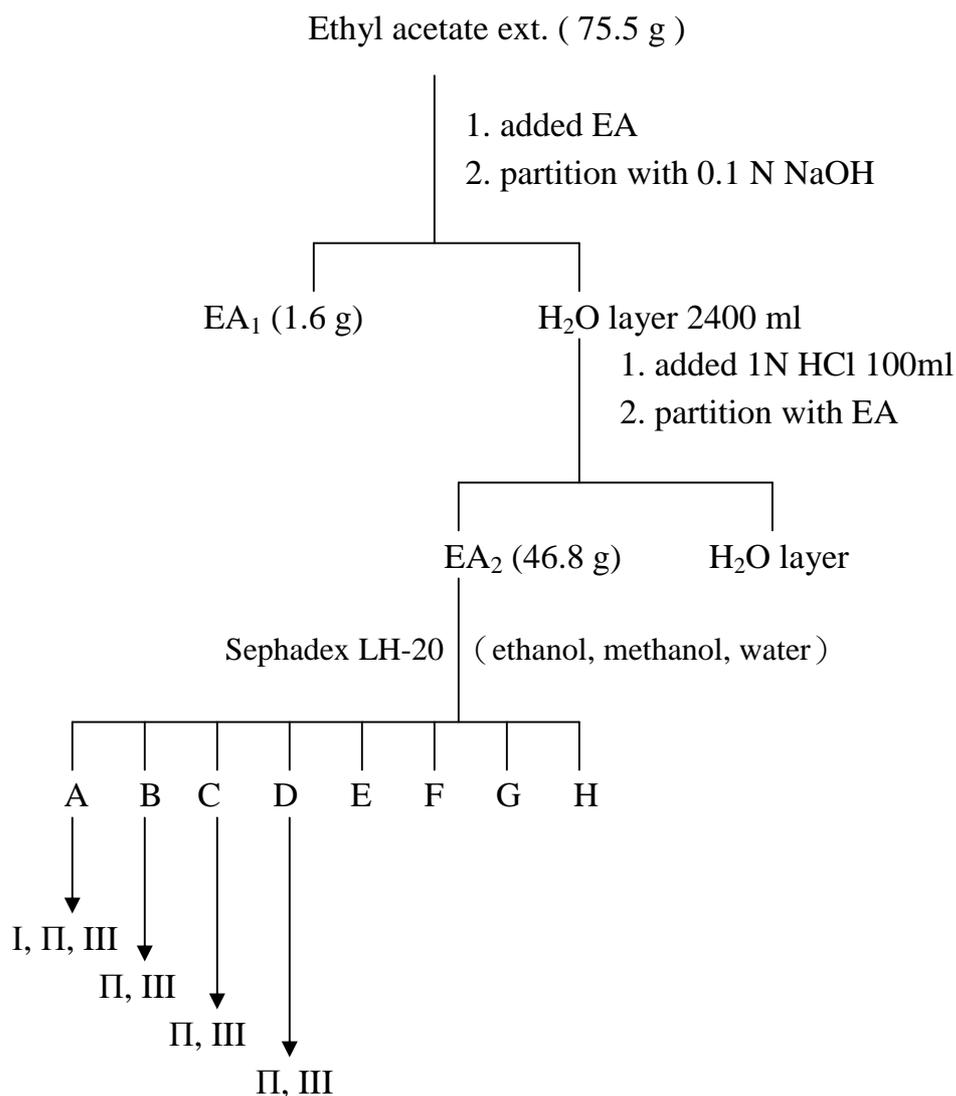
五個粗抽物，進行抑制細胞增殖試驗與誘導細胞分化試驗後，結果顯示水抽出物及乙酸乙酯抽出物有較佳的藥理活性，但由於水抽出物的極性較高，所以先取乙酸乙酯抽出物 75.5 公克，繼續進行分離。

根據所查文獻了解，葡萄籽中含多酚化合物，因此先將乙酸乙酯抽出物溶於乙酸乙酯中，由於酚基的存在使化合物易溶於鹼性水溶液，故用鹼性水溶液 0.1 N NaOH 水溶液進行提取，反覆抽提共 15 次，抽提後所剩的乙酸乙酯抽出物減壓濃縮後得 1.6 g，為 EA₁。然後在 0.1 N NaOH 水溶液中加入 1 N HCl 中和，化合物即可以析出，再以乙酸乙酯進行抽提，抽提液減壓濃縮後得 46.8 g，為 EA₂，再將 EA₁、EA₂ 做藥理活性測試。

EA₂ 抽出物，經 Sephadex LH-20 column，以乙醇、甲醇為梯度沖提溶劑，依極性大小不同，將收集液分成 Fr. A ~Fr. H。

最後得化合物 I (54.8 mg)、II (2.3 g)、III (4.7 g)，經結構鑑定分別為 gallic acid、*epi*-catechin、catechin。其中 *epi*-catechin 與 catechin 為光學異構物，在分離的過程中，先將兩者的混合物，使用 HPLC

(RP-8 ; MeOH : H₂O = 1 : 1 ; flow rate = 1 mg/min ; λ = 254 nm) 進行分離，最後以旋光度計辨別之。流程如 Scheme 2 所示。



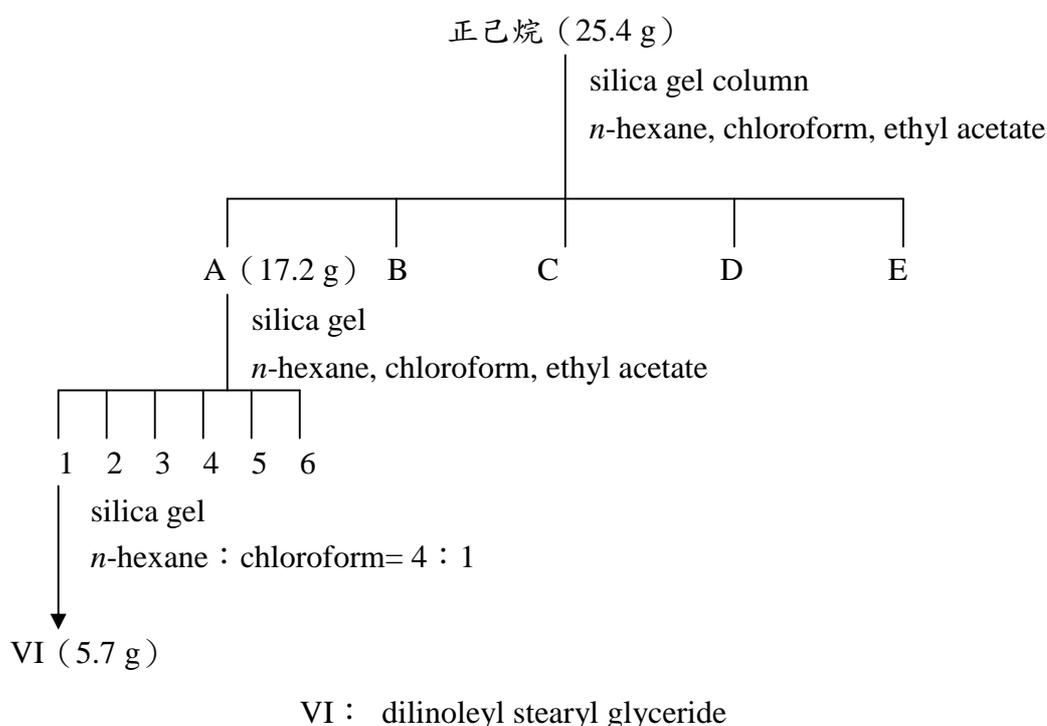
I : gallic acid (54.8 mg) II : epi-catechin (2.3 g) III : catechin (4.7 g)

Scheme 2 乙酸乙酯抽出物之分割流程圖

(2) 正己烷抽出物之成分單離

由於正己烷抽出物上層油性物質呈清澈透明的綠色，筆者欲想了解當中所含的成分，因此進行此抽出物的分離。取正己烷抽出物上層油性物質 25.4 公克，經矽膠管柱色層分析法，以正己烷、氯仿、乙酸乙酯為梯度沖提，依極性大小不同，收集液分成 Fr. A ~Fr. E。

取 fraction A (17.2 g) 繼續做分離，使用細粉的 silica gel (球狀、中性，63-210 μ m)，以正己烷、氯仿、乙酸乙酯為梯度沖提，收集液分成 Fr. A-1 ~Fr. A-6。將 Fr. A-1 (7.1 g) 經矽膠管柱色層分析法 (63-210 μ m)，以正己烷、氯仿為沖提液 (4 : 1)，最後從 fr.A-1 中分離出化合物 VI (5.7 g)。流程如 Scheme 3 所示。



Scheme 3 正己烷抽出物之分劃流程圖

三、化合物之性質與光譜數據

(1) 化合物 I—gallic acid

白色針狀結晶；m.p：253 °C

Molecular weight : 170

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

170[M⁺] (100), 153 (70), 125 (20), 113 (24), 107 (23), 79 (94), 78 (28)
77 (36), 66 (32), 53 (59), 51 (72)

IR_vmax (KBr) cm⁻¹ :

3349、3295、1705、1620、1543、1450、1336、1250、1026、864

UV λ_{max} (MeOH)(log ε) : 272 (6.4)

¹H-NMR (200 MHz, acetone-*d*₆, δ) :

8.20 (3H, *s*, 3,4,5-OH) , 7.20 (2H, *m*, H-2,5)

¹³C-NMR (50 MHz, acetone-*d*₆, δ) :

166.6 (1-COOH), 144.9 (C-3,5), 137.6 (C-1), 121.0(C-4), 109.0(C-2,6)

(2) 化合物 II—*epi*-catechin

白色粉末；m.p：224-226 °C

Molecular weight：290

EIMS (70 ev) *m/z* (%)：

290[M⁺] (14), 272 (2), 152 (20), 139 (31), 137 (26), 123 (100), 110 (47),
97 (24), 81 (20), 77 (45), 69 (46)

IR_vmax (KBr) cm⁻¹：

3457、3395、3233、1620、1520、1466、1281、1142

UV λ_{max} (MeOH)(log ε)：280 (6.7)

¹H-NMR (200 MHz, acetone-*d*₆, δ)：

7.05 (1H, *d*, *J* = 1.8 Hz, H-2'), 6.82 (2H, *m*, H-5',6'), 6.02 (1H, *d*, *J* = 2.2 Hz, H-6), 5.91 (1H, *d*, *J* = 2.2 Hz, H-8), 4.87 (1H, *s*, H-2), 3.59 (1H, *d*, *J* = 2.2 Hz, H-3), 2.84 (1H, *dd*, *J* = 16.6, 3.6 Hz, H_{eq}-4), 2.77 (1H, *dd*, *J* = 16.6, 3.4 Hz, H_{ax}-4)

¹³C-NMR (50 MHz, acetone-*d*₆, δ)：

156.4-156.0 (C-5,7,8a), 144.2 (C-3', 4'), 131.1 (C-1'), 118.2 (C-6'),
114.4 (C-5'), 114.1 (C-2'), 98.7 (C-4a), 95.1 (C-6), 94.6 (C-8), 78.3 (C-2),
65.8 (C-3), 28.0 (C-4)

(3) 化合物 III—catechin

白色針狀結晶；m.p：212-214 °C

Molecular weight : 290

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

290[M⁺], 152 (17), 139 (0.2), 137 (0.1), 123 (100), 110 (6), 97 (11), 81 (3), 77 (26), 69 (15), 51 (24)

IR_vmax (KBr) cm⁻¹ :

3411、3256、1620、1520、1466、1288、1149、1095、1034

UV λmax (MeOH) (log ε) : 279 (6.7)

¹H-NMR (200 MHz, acetone-*d*₆, δ) :

7.05 (1H, *d*, *J* = 1.8 Hz, H-2'), 6.79 (2H, *m*, H-5',6'), 6.02 (1H, *d*, *J* = 2.2 Hz, H-6), 5.86 (1H, *d*, *J* = 2.2 Hz, H-8), 4.55 (1H, *d*, *J* = 7.5 Hz, H-2), 3.99 (1H, *m*, H-3), 2.90 (1H, *dd*, *J* = 16.0, 5.1 Hz, H_{eq}-4), 2.52 (1H, *dd*, *J* = 14.5, 6.8 Hz, H_{ax}-4)

¹³C-NMR (50 MHz, acetone-*d*₆, δ) :

156.6-155.8 (C-5,7,8a), 144.6 (C-3', 4'), 131.0 (C-1'), 118.9 (C-6'), 114.5 (C-5'), 114.1 (C-2'), 99.5 (C-4a), 95.0 (C-6), 94.3 (C-8), 81.6 (C-2), 67.2 (C-3), 27.7 (C-4)

(4) 化合物 IV—dilinoleyl stearyl glyceride

無色透明液體

Molecular weight : 測定中

EIMS (70 ev) m/z (%) :

207 (2), 129 (2), 115 (3), 109 (10), 95 (17), 91 (21), 83 (27), 81 (35), 69 (40), 67 (54), 65 (12), 55 (100) (進行 FABMS 測定中)

IR v_{\max} (KBr) cm^{-1} :

3009、2925、2855、1744、1659、1458、1373、1165、725

UV λ_{\max} (MeOH)($\log \epsilon$) : 210 (7.0)

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3 , δ) :

5.37 (9H, *m*) 為雙鍵上及 $\text{OCH}_2\text{-}\overset{\text{|}}{\text{HC}}\text{-CH}_2\text{O}$ 之氫的訊號, 4.29 (2H, *dd*, $J = 11.9, 4.3 \text{ Hz}$, H-1,3), 4.13 (2H, *dd*, $J = 11.9, 5.9 \text{ Hz}$, H-1,3), 2.76 (4H, *t*, $J = 5.8 \text{ Hz}$, H-11',11''), 2.31 (6H, *t*, $J = 7.2 \text{ Hz}$, H-2',2'',2'''), 2.03 (8H, *m*, $J = 6.4 \text{ Hz}$, H-8',14',8''',14'''), 1.23 (br, $-(\text{CH}_2)_n$), 0.89 (9H, *t*, $-\text{CH}_3$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3 , δ) :

172.8 (C-1',1'''), 172.6 (C-1''), 129.5~130.0 (C-9',13',9''', 13'''), 127.8、127.6 (C-10',12',10''',12'''), 68.6 (C-2), 61.9 (C-1,3), 22~33 ($-\text{CH}_2-$), 22~33 ($-\text{CH}_3$)

第二節 藥理活性試驗

一、儀器與試藥

(1) 儀器

- a. 流式細胞儀(Becton Dickinson, Flow Cytometry)
 - b. 垂直式無菌操作台(Laminar Flow)
 - c. 直立式光學顯微鏡(Olympus CH-20)
 - d. 倒立式光學顯微鏡(Nikon Ellipse TE 300)
 - e. 高速離心機(Hettich zentrifugen)
 - f. 可控溫式二氧化碳培養箱(NUAIRE, Air-Jacketed DH
Autoflow Automatic CO₂ Incubator)
- a. 控溫培養箱(TKS, Incubator LT 1600)
 - b. 血球計算盤(Hemocytometer)
 - c. 酵素免疫分析儀 (Anthos Labtec Instruments, 2001)

(2) 試藥

- a. Catechin (Sigma Chemical Co.)
- b. *epi*-Catechin (Sigma Chemical Co.)
- c. Gallic acid (Sigma Chemical Co.)
- d. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma Chemical Co.)
- e. Trypan blue solution, 0.4 % (Sigma Chemical Co.)
- f. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma Chemical Co.)
- g. RPMI 1640 culture medium (BIOWEST)
- h. DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) culture medium
- i. Fetal bovine serum (FBS) (Gibco laboratories)
- j. Antibiotics (Penicillin, Streptomycin) (Gibco laboratories)
- k. L-glutamine (Gibco laboratories)
- l. 10×Dulbecco's Hanks balanced salt solution (HBSS) (Gibco laboratories)
- m. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Merck)
- n. Ascorbic acid

(3) 溶液的配製

a. NBT solution: 秤取 NBT 粉末 20 mg 溶於 20 ml 1×HBSS 中,

最後再加入 PMA 100 µg。

b. MTT solution: 秤取 MTT 粉末溶於去離子水中使最後濃度分

別為 5 mg/ml 與 1 mg/ml。

MTT 濃度	用途
5 mg/ml	HL-60 cell 用
1 mg/ml	貼附性細胞用

(4) 細胞株

a. HL-60 cell line

Human promyelocytic leukemia cells (人類前骨髓性血癌細胞)

屬於懸浮性細胞, 可用 RPMI-1640 culture medium 培養之; 本

細胞株來自美國 American Type Culture Collection (Manassas,

VA USA)。

b. B16-F₀ cell line

Mouse melanoma cell line (老鼠黑色素細胞瘤細胞), 屬於貼

附性細胞, 使用 DMEM culture medium 培養之; 本細胞株來

自台灣食品工業發展研究所菌種中心。

c. NCI-H226 cell line

Human lung tumor cell line (人類肺癌細胞)，屬於貼附性細胞，使用 DMEM culture medium 培養之；本細胞株來自美國 American Type Culture Collection (Manassas, VA USA)。

d. J5 cell line

Human liver tumor cell line (人類肝癌細胞)，屬於貼附性細胞，使用 DMEM culture medium 培養之；本細胞株由本校醫學研究所鍾景光教授提供。

e. MDA KB-231 cell line

Human mammary gland tumor cell line (人類乳癌細胞)，屬於貼附性細胞，使用 DMEM culture medium 培養之；本細胞株來自美國 American Type Culture Collection (Manassas, VA USA)。

二、抽出物及分離所得的化合物之加藥處理

將一系列欲測的天然物抽出物及分離得的化合物以 DMSO 溶解，檢品皆為新鮮配製。加藥時，DMSO 的濃度需控制在 0.1% 以下，以避免 DMSO 本身對於細胞的影響⁽³³⁾。

三、細胞培養

冷凍細胞之活化原則為快速解凍，以避免冰晶重新結晶而對細胞造成傷害，導致細胞之死亡。細胞活化後，約需數日，或繼代一至二代，其細胞生長或特性才會表現（如產生單株抗體或其他蛋白質）。

解凍細胞步驟：將新鮮培養基置於 37 °C 水槽中回溫，回溫後噴以 70% 酒精並擦拭容器，移入無菌操作台內。自液氮或乾冰容器中取出冷凍管，檢查蓋子是否旋緊，由於熱脹冷縮過程，此時蓋子易鬆掉。取出冷凍管，立即放入 37 °C 水槽中快速解凍，輕搖冷凍管使其在 3 分鐘內全部融化，以 70% 酒精擦拭保存管外部，移入無菌操作台內。取出解凍之細胞懸浮液，去除含有抗凍劑（10% DMSO）之上清液後，緩緩加入有培養基之培養容器內，混合均勻，放入 CO₂ 培養箱培養。在解凍培養後隔日更換培養基。

繼代細胞培養：先將培養瓶之培養液以無菌吸管吸出，以 PBS 清洗數次，再加入 0.25% Trypsin/EDTA，置入 37 °C 培養箱約兩分鐘，再左右輕拍培養瓶，讓細胞脫落，然後使用 pipet 均勻沖散細胞，移至無菌離心管，以 1200 r.p.m (Hettich zentrifugen) 離心五分鐘，去除上清液，加入生長培養液後打散細胞，計算細胞數目。依實驗需要分配細胞至其他培養瓶中。

(1) 血癌細胞(HL-60)之培養

HL-60 cell(血癌細胞)培養在溫度 37 °C、溼度 95%、5% CO₂ 之無菌培養箱中。含有 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum ; FBS)、1% L-glutamine、100 unit/ml penicillin 及 100 µl/ml streptomycin 的培養基 (RPMI-1640 medium) 培養之。

培養期間及實驗前，不定期以色素錐藍 (trypan blue) 染色，於顯微鏡下觀察並使用血球計數盤計數之，以確定細胞的存活率大約 95% 以上，並將細胞濃度維持在 $2-5 \times 10^5$ (cells/25T flask)。在進行每次實驗之前，細胞至少先培養 2~8 天，以維持細胞生長穩定度。⁽³⁴⁾

(2) 貼附性細胞的培養

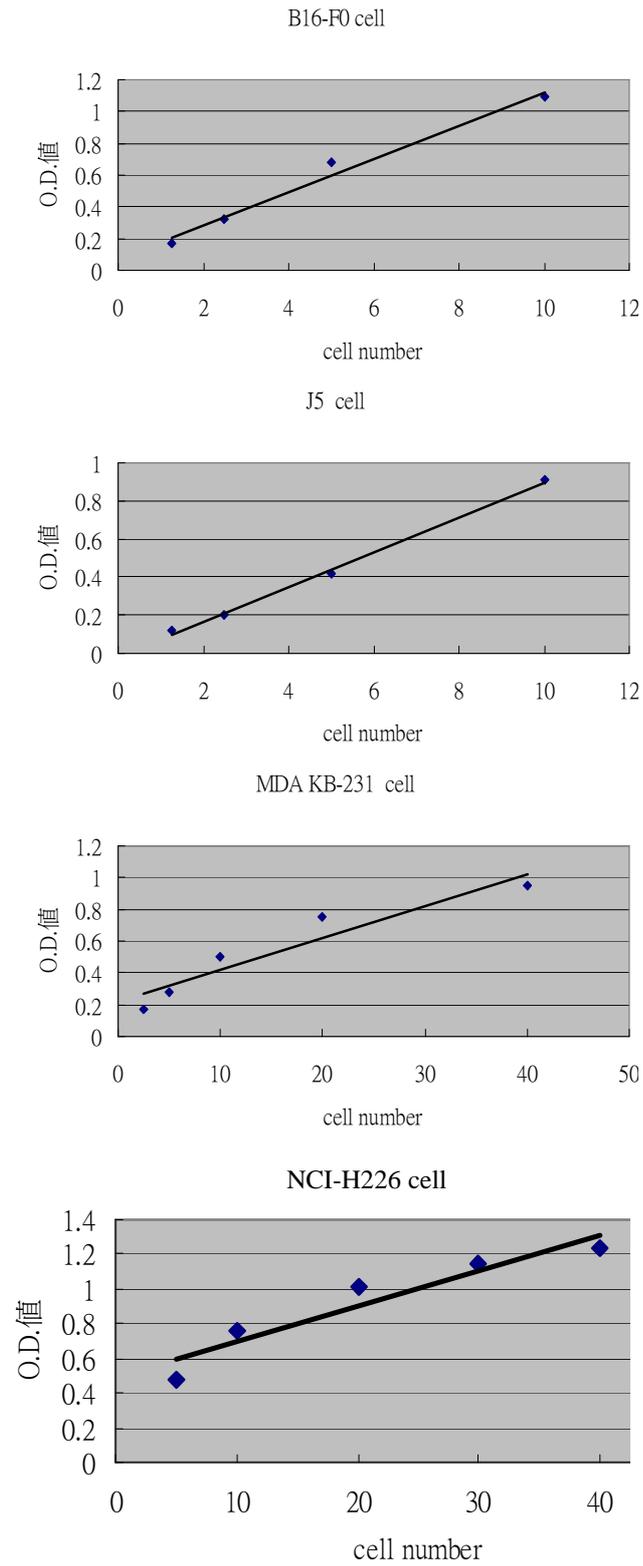
本實驗所使用之貼附性細胞株有 B16-F₀ cell、NCI-H226 cell、J5 cell、MDA KB-231 cell。這些貼附性細胞分別培養於含有 10% 胎牛血清、1% L-glutamine、100 unit/ml penicillin 及 100 µl/ml streptomycin 的培養基 (DMEM 或 RPMI medium) 中。

當細胞長滿培養皿之後，用胰蛋白酶 (0.25% Trypsin/EDTA) 使貼附的細胞脫離培養皿表層，呈現懸浮狀。離心之後，取定量細胞再繼代培養之，約 24 小時後細胞貼附完全，才具有生理活性。

(3) 貼附性細胞株之生長曲線圖

貼附性細胞打散之後，將細胞密度分別稀釋成 1.6×10^5 、 0.8×10^5 、 0.4×10^5 、 0.2×10^5 、 0.1×10^5 、 0.05×10^5 、 2.5×10^3 、 1.25×10^3 、 0.625×10^3 、 0.3125×10^3 cells/well，接著將 cells 分別種入 96 well 的培養盤中，培養 72 小時後，取出 96 well 用 PBS 清洗一次，再加入 50 μ l MTT solution(1 mg/ml)，於 37 $^{\circ}$ C 培養箱中反應 2 小時，最後用 DMSO (150 μ l/well) 溶解細胞中之紫黑色顆粒，以 ELISA reader 於波長 570 nm 的條件下測得 OD₅₇₀ 值，由於細胞在一定的數量中，MTT 的吸光值與細胞量呈正比，但超過一定的數量，細胞生長曲線趨於平緩，此時 MTT 的吸光值與細胞量不成正比，因此針對不同細胞株做其生長曲線測定，取線性範圍內之最大的細胞數。其目的在決定出最適合種入之細胞數，結果如圖二十四所示。

B16-F₀ cell 選擇種入的細胞數為 0.1×10^5 cells/well； J5 cell 選擇種入的細胞數為 0.1×10^5 cells/well； MDA KB-231 cell 選擇種入的細胞數為 0.4×10^5 cells/well； NCI-H226 cell 選擇種入的細胞數為 0.2×10^5 cells/well。



圖二十四、

B16-F₀ cell、H226 cell、J5 cell、MDA-KB 231 cell 之生長曲線圖

四、細胞增殖抑制實驗 (MTT Proliferation Assay)^{(35) (36)}

(1) 懸浮性細胞：將 HL-60 cells 培養於 24 wells 培養皿中，每 well 的細胞數為 2×10^4 cells/well，體積為 1 ml，培養液為 RPMI medium。每 well 中並加入各種檢品，置於溫度 37 °C、溼度 95%、5% CO₂ 的培養箱中培養 72 小時後，分別取出做 MTT proliferation assay 實驗。首先自每 well 取出已去除培養基之 50 μl 細胞液置入 96 well plate 中，加入 10 μl MTT solution 於 37 °C 培養箱中放置 4 小時，接著用 DMSO (150 μl/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 OD₅₇₀ 值。

(2) 貼附性細胞：將各細胞株培養於 96 wells 培養皿中，每 well 的細胞數按各細胞株的生長曲線而定，體積為 100 μl，培養液為 DMEM。培養 24 小時，待細胞貼附好以後，於每 well 中加入各種檢品，置於溫度 37 °C、溼度 95%、5% CO₂ 的培養箱中培養。48 小時後，分別取出做 MTT proliferation assay 實驗。首先自每 well 去除培養基，用 PBS 洗一次，加入 50 μl MTT solution (1 mg/ml)，於 37 °C 培養箱中放置 2 小時，接著用 DMSO (150 μl/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 OD₅₇₀ 值。Proliferation (%) = (Sample OD₅₇₀ / Control OD₅₇₀) × 100%

五、誘導細胞分化實驗 (NBT Reduction Assay)^{(37) (38) (39)}

HL-60 cells (2×10^4 cells/well) 培養於 24 well 之培養皿，使最後體積為 1 ml/well；並分別加入各種檢品於 37 °C、溼度 95%、5% CO₂ 之培養箱中，培養固定時間之後，分別取出做 NBT reduction assay 實驗。

首先將每well中取出 850 μ l 細胞液離心(1200 r.p.m., 5 mins; Hettich zentrifugen)後去除上清液；再用 400 μ l HBSS洗之，接著再次離心(1200 r.p.m., 5 mins; Hettich zentrifugen)去除上清液。然後加入 50 μ l NBT solution，於溫度 37 °C 的培養箱中培養 30 分鐘；取出後至於冰上，在顯微鏡下以細胞計數盤計數其分化細胞比率。

Differentiation (%) =

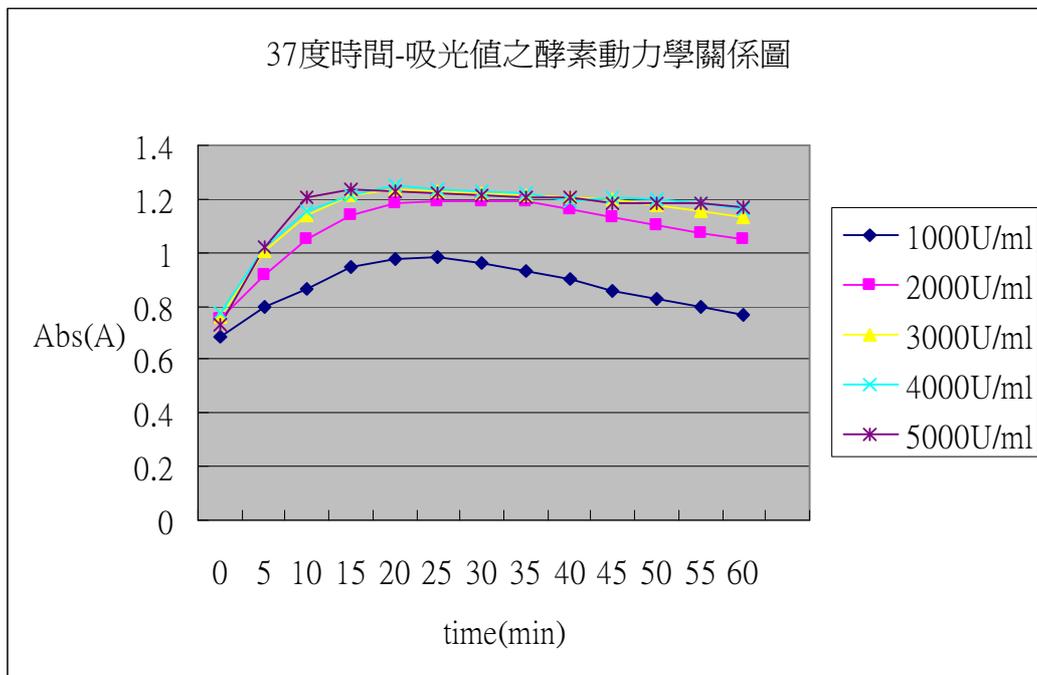
(細胞質呈紫黑色的細胞總數 / 全部的細胞總數) \times 100 %

六、美白試驗

酪胺酸酶活性測試(Tyrosinase Activity Test)

(1) 酪胺酸酶濃度選擇

酪胺酸與酪胺酸酶反應生成 dopachrome，在 492 nm 下有吸光。1000、2000、3000、4000、5000 U/ml 五種不同濃度之酪胺酸酶，於實驗條件下，37 °C 中反應，測得反應 60 分鐘之吸光值變化。如圖二十五所示，此五種濃度於反應 25 分鐘後皆可達飽和。由於 2000、3000、4000、5000 U/ml 之酪胺酸酶濃度曲線相近，因此選擇最小的酵素濃度（2000 U/ml），應用於酪胺酸酶活性抑制實驗。



圖二十五、酪胺酸酶反應 60 分鐘之活性標準曲線圖

(2) 化合物對酪胺酸酶活性抑制的測定

在 96 well 中，每 well 加入濃度 10 mM 的 L-dopa 10 μ l、70 μ l PBS、10 μ l 不同濃度化合物 (1000, 100, 10 μ M)，振搖混合，最後加入 10 μ l 之 20 U 的酪胺酸酶，放入 37 $^{\circ}$ C 下反應 10 分鐘，於波長 492 nm 的條件下測其吸光值得變化量，總測 30 分鐘，與控制組對照 (不加測試樣品) 對照，計算出 dopachrome 生成的抑制率，此即為酪胺酸酶活性之抑制率，以維他命 C 作為 positive control。

(3) 計算

利用下列公式計算酪胺酸酶活性的抑制率：

$$\text{Inh (\%)} = [1 - (A/B)] \times 100\%$$

A：加入測試樣品所偵測的吸光值

B：不加測試樣品所偵測的吸光值

第四章 結論

本研究自巨峰葡萄籽甲醇抽出物，以藥理試驗追蹤活性成分，所萃取之乙酸乙酯層，單離得到三個化合物 catechin、gallic acid、*epi*-catechin。另外在正己烷層中，單離得到一個化合物 dilinoleyl stearyl glyceride。

在一連串針對 HL-60 血癌細胞，所做的藥理活性追蹤中顯示，從甲醇粗抽物，一路選擇由乙酸乙酯抽出物繼續做分離的工作。乙酸乙酯抽出物的藥理活性為 $IC_{50} = 23.58 \mu\text{g/ml}$ ； EA_2 的藥理活性 $IC_{50} = 20.83 \mu\text{g/ml}$ ；從 EA_2 劃分出的 Fr. A，其藥理活性為 $IC_{50} = 7.57 \mu\text{g/ml}$ ；最後所得的化合物 I，其藥理活性為 $IC_{50} = 3.1 \mu\text{g/ml}$ ，經結構鑑定為 gallic acid，由此可知所追蹤的成分應為 gallic acid。

文獻考察⁽⁴⁰⁾⁽⁴¹⁾中得知，從細胞型態上觀察，當 gallic acid 加入 HL-60 cell，48 小時後產生了凋亡小體，接著進行細胞週期試驗，細胞停留在 G_0 - G_1 期，因此可了解 gallic acid 細胞增殖抑制的途徑，為誘導細胞走向細胞凋亡的路徑。

另外，在針對 B16-F₀、NCI-H226、J5、MDA KB-231cell 所做的細胞抑制增殖實驗中得知，gallic acid 對 B16-F₀、J5 cell 有抑制細胞增殖的效果，之後可繼續深入了解其抑制細胞增殖的機轉。而 *epi-catechin* 與 catechin 對所測試的四株細胞株沒有明顯的效果。

分離所得的化合物之美白試驗，gallic acid 在 1000 μM 下，五分鐘內抑制酪胺酸酶的活性，抑制率約為 50%，較 *epicatechin* 與 catechin 佳，未來在美白產品上仍有發展的空間。

研究中並未分離出花青素類的化合物，筆者推測應是由於此類化合物容易氧化分解成單體的 catechin、*epi-catechin*，而本研究之實驗進行過程，採藥理活性成分追蹤的方式，因此所需的時間較長，導致花青素類化合物的分解。

參考文獻

1. 林俊清，藥膳與食療之生藥應用，富山出版社，民國83年。
2. Jayaprakasha, G. K.; Selvi, T.; Sakariah, K. K. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Research International* 36 **2003**.
3. Negro, C.; Tommasi, L.; Miceli, A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresource Technology* 87, **2003**, 41–44.
4. 魏德文，中國高等植物科屬檢索表，**1991**。
5. 甘偉松編著，藥用植物學，375頁，國立中國醫藥研究所，**1996**。
6. 邱年永、張光雄編著，台灣藥用植物學圖鑑(5)，南天圖書有限公司，**1992**。
7. 苗明三主編，食療中藥藥物學，科學出版社，**2001**。
8. 甘偉松編著，台灣藥用植物誌，國立中國醫藥研究所，**1979**。
9. 張樹生、馬長武主編，神農本草經貫通，中國醫藥科技出版社，**1996**。
10. Yusuf, Y.; Romeo, T. T. Health aspects of functional grape seed constituents. *Trends in Food Science & Technology* 15, **2004**, 422–433.
11. Baoshan, S.; G. Pedro Belchior; Ricardo-da-Silva, J.M.; Isabel S. M. Isolation and purification of dimeric and trimeric procyanidins from grape seeds. *Journal of Chromatography A*, 841, **1999**, 115–121.
12. Peng Z. K.; Hayasaka, Y.; Iland, P. G.; Sefton, M.; Hoj, P.; Waters, E. J. Quantitative analysis of polymeric procyanidins (Tannins) from grape (*Vitis vinifera*) seeds by reverse phase high-performance liquid chromatography *Journal of Food Chemistry*, 49, **2001**, 26–31.
13. Wang, J. N.; Hano, Y.; Nomura, T.; Chen, Y. J. Procyanidins from the seeds of *Vitis amurensis*. *Phytochemistry* 53, **2000**, 1097–1102.

14. Delaunay J. C.; Castagnino, C.; Cheze, C.; Vercauteren, J.h. Preparative isolation of polyphenolic compounds from *Vitis vinifera* by centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, 964, **2002**, 123–128.
15. Sandra, S.; Helmut, S.; Ortwin, B. Efficiency and Mechanism of the Antioxidant Action of *trans*-Resveratrol and Its Analogues in the Radical Liposome Oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* Vol. 391, No. 1, July 1, **2001**, 79–89.
16. Yan, K. X.; Terashima, K.; Takaya, Y.; Niwa, M. T. A novel oligostilbene named (+)-viniferol A from the stem of *Vitis vinifera* ‘Kyohou’. *Tetrahedron* 57, **2001**, 2711–2715.
17. Yan, K. X.; Terashima, K.; Takaya, Y.; Niwa, M. T. Two new stilbenetetramers from the stem of *Vitis vinifera* ‘Kyohou’. *Tetrahedron* 58, **2002**, 6931–6935.
18. Fan, P. H.; Lou, H. X.; Yu, W. T.; Ren, D. M.; Ma, B.; and Ji, M. Novel flavanol derivatives from grape seeds. *Tetrahedron Letters* 45, **2004**.
19. Cao, X.; Ito, Y. Supercritical fluid extraction of grape seed oil and subsequent separation of free fatty acids by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1021, **2003**, 117–124.
20. Andrew, W.; Vicki, D.; Bertram, F.; David, H.; Joe, K.; Simone, M. Apoptosis and Cell Proliferation, 2nd edition. pp.2, **1998**.
21. Jimbow, K.; Quevedo, W.C.; Prota, G; Fitzpatrick, T.B. Biology of melanocytes. In: Freedberg, I.M.; Eisen, A. Z.; Wolff; K.; Austen, K.F.; Goldsmith, L.A.; Katz, S.I.; Fitzpatrick, T.B. (Eds). *Fitzpatrick’s dermatology in general medicine*. The McGraw- Hill Companies, Inc., USA, **1999**, pp 192-219.
22. Kollias, N.; Sayre, R.M.; Zeise, Li.; Chedekel, M.R. New trends in photobiology. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*. 9(1), **1991**, 135-160.
23. Cesarini, J. P. Melanin and their possible roles through biological evolution. *Advances in space research*. 18(12), **1996**, 35-40.

24. Nordlund J. J.; Boissy R. E.; Hearing V. J.; King R. A.; Ortonne J. P.(eds).The pigmentary system physiology and pathophysiology. Oxford University Press, New York. **1998**, pp.392.
25. Kim, D. S.; Park S. H.; Kwon, S. B.; Youn, S W.; Park, K. C. Effects of lysophosphatidic acid on melanogenesis. *Chemistry and Physics of Lipids* **127**, **2004**, 199–206.
26. Revilla, E.; Ryan, J. M. Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography–photodiode array detection without sample preparation *Journal of Chromatography A*, **881**, **2000**, 461–469.
27. Kumagai, J.; Kawaura, T.; Miyazak, T. ; Prost, M.; Prost, E.; Watanabe, M.i; Jo.elle, Q. L. Test for antioxidant ability by scavenging long-lived mutagenic radicals in mammalian cells and by blood test with intentional radicals: an application of gallic acid. *Radiation Physics and Chemistry* **66**, **2003**, 17–25.
28. Slominski, D.; Tobin, D. J.; Shibahara, S.; Wortsman, J. Melanin Pigmentation in Mammalian Skin and Its Hormonal Regulation. *Physiol Rev* **84**, **2004**, 1155–1228.
29. Kubo, I.; Niheia, K.I.; Tsujimoto, K. Methyl p-coumarate, a melanin formation inhibitor in B16 mouse melanoma cells.*Bioorganic & Medicinal Chemistry* **12**, **2004**, 5349–5354.
30. Hearing, V. J.; 1987..Mammalian monophenol monooxygenase (tyrosinase): purification, properties, and reactions catalyzed. *Methods in enzymology*. **142**, **1987**, 154-165.
31. Shirota, S.; Miyazaki, K.; Aiyama, R.; Ichioka, M.; Yokokura, T. Tyrosinase inhibitors from crude drugs. *Biological & pharmaceutical bulletin*. **17(2)**, **1994**, 266-269.

32. Kuo Y. H.; and Chu, P. H. Studies on the constituents from the bark of *Bauhinia purpurea*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 49, **2002**, 269-274
33. Lopez-Lluch, G.; Buron, M.I.; Alcain, F. J.; Quesada, J. M.; Navas, P. Redox regulation of cAMP levels by ascorbate in 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced differentiation of HL-60 cells. *Biochem. J.* 331, **1998**, 21-27.
34. Cuendet, M.; Gills, J. J.; Pezzuto, J. M. Brusatol-induced HL-60 cell differentiation involves NF- κ B activation. *Cancer lett.* 206, **2004**, 43-50.
35. 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. *Arch. Biochem. Biophys.* 303, **1993**, 474-482.
36. Ishiyama, K.; 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, **1995**, 187-190.
37. 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 (4), **1999**, 369-372.
38. Kawaii, S.; Tomono, Y.; Katase, E.; Ogawa, K.; Yano, M.; Takemura, Y.; Ju-ichi, M.; Ito, C.; Furukawa, H. Acridones as inducers of HL-60 cell differentiation. *Leuk. Res.* 23 (3), **1999**, 363-369.
39. Sham, R. L.; Phatak, P. D.; Belanger, K. A.; Braggins, C.; Packman, C. H. Functional characteristics of mature granulocytes in a patient with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid. *Leuk. Res.* 19 (8), **1995**, 505-511.

40. Inoue, M.; Suzuki, R.; Koide, T.; Sakaguchi, N.; Ogihara, Y.; Yabu, Y.
Antioxidant, gallic acid, induces apoptosis in HL-60RG cells. *Biochemical and biophysical research communications* Vol. 204, No. 2, **1994**, pp898–904.
41. Kobayashi, H.; Oikawa, S.; Hirakawa, K.; Kawanishi, S. Metal-mediated oxidative damage to cellular and isolated DNA by gallic acid, a metabolite of antioxidant propyl gallate. *Mutation Research* 558, **2004**, 111–120.