

中國醫藥大學藥物化學研究所碩士論文

指導教授：陳勝智教授

論文題目

巴戟天抗細胞增殖活性成分之研究

Studies on Antiproliferative Constituents of the
Roots of *Morinda officinalis* How



研究生：張栢龍

中華民國九十四年十二月

謝辭

本論文承蒙業師陳勝智教授於課業及實驗上之殷切指導與勉勵，使之得以順利完成，於此謹呈最誠摯之謝意。並感謝鍾婷婷教授對本論文之細心指導，惠與寶貴意見與指正，促使本論文得以更臻完善。

授業期間蒙黃麗嬌所長、吳俊雄教授、李珮端教授、郭盛助教授、劉正雄教授、張永勳教授、林宗平副教授、吳金濱副教授、吳錦生副教授、賴建銘副教授、侯曼貞副教授、連金城副教授及所內諸位師長之關懷指導，受益匪淺，一併致萬分謝意。

感謝所上俊仁學長、美華學姊、鈞達學長、紋瑩學姐在藥理實驗方面的協助。同時於研究期間，感謝黃太鴻助理教授、龔語慧小姐、賴萱薇小姐、玟君學姊代測各項圖譜，在此至上由衷之謝語。

此外，感謝勝弘學長、昱勳學長、華鑫學長、元照學長、立琛學長、怡倩學姊、睿盈學姊於生活及實驗上的協助與關心，還有同窗好友及學弟妹於兩年半的研究生生活裡給予相互扶持與一同伴過的光陰歲月。

最後，則要感謝最摯愛的家人給我的支援和鼓勵，使得學業得以順利完成，願將一切喜悅與成果與之分享。

巴戟天抗細胞增殖活性成分研究

張栢龍

中文摘要

由茜草科(Rubiaceae)中藥巴戟天甲醇粗抽物以正己烷、氯仿抽取的劃分成中行分離及純化，共單離得到 β -sitosterol (I)、methyl oleate 和 methyl stearate 混合物 (II)、friedelin (III)、ferulic acid (IV)、rubiadin 1-methyl ether (V)和 arctigenin (VI)，其中(III)、(IV)和(VI)是第一次於巴戟天中分離得到。

雖然正己烷和氯仿粗抽物經抑制細胞增殖試驗結果具活性，但單離出的化合物(V)並未發現活性。

Studies on Antiproliferative Constituents of the
Roots of *Morinda officinalis* How

Summary

by
Chang Po-Lung

Graduate Institute of Pharmaceutical Chemistry
China Medical University

Six compounds— β -sitosterol (I) 、 methyl oleate and methyl stearate mixtures (II) 、 friedelin (III) 、 ferulic acid (IV) 、 rubiadin 1-methyl ether (V) and arctigenin (VI), have been isolated from the *n*-hexane and chloroform fractions of the methanolic extract of the roots of *Morinda officinalis*. Among them, (III), (IV) and (VI) were isolated for the first time from this plant.

Although the *n*-hexane and chloroform crude extract showed antiproliferative activity, the isolated compound of (V) was inactive.

目錄

壹、緒論.....	1
第一章 研究背景和目的.....	1
第二章 巴戟天之藥用植物學基原考察.....	1
第一節 巴戟天在植物學的分類位置.....	1
第二節 茜草科植物.....	2
第三節 巴戟天簡介.....	2
第三章 巴戟天中藥之成分研究概況.....	5
第四章 巴戟天與常見偽品的鑒別.....	12
第五章 藥理試驗法簡介.....	18
貳、結果與討論.....	19
第一章 巴戟天成分之抽取與分離.....	19
第二章 巴戟天成分之化學結構鑑定.....	21
第三章 巴戟天粗抽物與成分活性.....	35
第四章 結論.....	37
第一節 實驗器材與試藥.....	37
第二節 儀器.....	40
第五章 成分抽取與分離方法.....	40
第一節 預試驗粗抽物之製備.....	40

第二節 成分單離.....	41
第六章 藥理試驗方法.....	42
第七章 巴戟天成分之性質與光譜數據.....	44
參、參考文獻.....	49
肆、圖譜.....	53

壹、緒論

第一章 研究背景與目的

巴戟天(*Morinda officinalis* How)是茜草科(Rubiaceae)巴戟天屬(*Morinda*)⁽¹⁾，南亞熱帶雨林下的多年生常綠藤本植物，為名貴中藥材。以根部入藥，具有補腎壯陽，補中益氣，強筋骨，祛風濕，抗衰老，安五臟之功效。雖已有其成分研究之相關報告，且有抗細胞增殖活性的文獻記載⁽²⁾，證實巴戟天所含部份之蒽醌類化合物對 L₁₂₁₀ 白血病的生長有抑制活性，但無針對 HL-60 細胞株，且無單離化合物抗細胞增殖活性的文獻記載。故取其甲醇粗抽物以正己烷、氯仿、乙酸乙酯做抗細胞增殖藥理預試驗，發現具有活性，故希望能從該中藥中單離出具有活性之化合物。

第二章 巴戟天之藥用植物學基原考察

第一節 巴戟天在植物學的分類位置⁽¹⁾

被子植物門(Angiospermae)

雙子葉綱(Dicotyledoneae)

合瓣花亞綱(Sympetalae)

茜草目(Rubiales)

茜草科(Rubiaceae)

巴戟天屬(*Morinda*)

巴戟天(*Morinda officinalis*)

第二節 茜草科植物⁽³⁾

茜草科 Rubiaceae 約 380 屬，5000 種以上，我國入藥者計 26 屬，多為喬木、灌木或草本。單葉，對生或輪生，常全緣；托葉 2，位於葉柄間或葉柄內，分離或合生。明顯而常宿存，稀脫落。花兩性，輻射對稱，常 4 或 5（偶 6）基數，單生或排成各種花序；花萼與子房合生，萼裂覆瓦狀排列，有時其中 1 片擴大成葉狀；花冠合瓣，筒狀、漏斗狀、高腳碟狀或輻狀，裂片常 4-5，鑷合狀或旋轉狀排列，偶覆瓦狀排列。雄蕊與花冠裂片同數而互生，著生於花冠筒上。子房下位，1 至數室，常 2 室，胚珠 1 至多數；花柱絲狀；柱頭頭狀或分歧。蒴果、核果或漿果；種子有胚乳。

第三節 巴戟天簡介

巴戟天為多年生常綠藤本植物，以根部入藥

學名⁽⁴⁾

Morinda officinalis How

別名⁽⁴⁾

巴戟、巴吉天、雞腸風、雞眼藤，兔子藤、三角藤、兔子腸、三蔓草

英文名⁽⁴⁾

Ba Ji Tian, Morinda Root

分布⁽⁴⁾

北面能抵擋北來寒潮、南面能截留東南濕潤季風的丘陵、山地，高溫、多濕、靜風，上有一層植被覆蓋，下有富含有機質、疏鬆濕潤

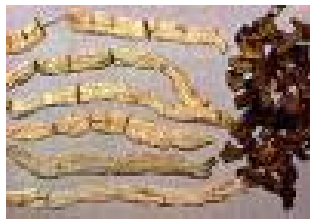
的森林地。

產地⁽⁴⁾

廣東、廣西、福建、海南、江西、湖北、雲南、四川等。

形態⁽⁵⁾

扁圓柱形，略彎曲，長短不等，直徑 0.5~2 釐米。表面灰黃或暗灰有縱紋及橫紋，質韌，肉容易剝落。斷面皮部濃，紫色或淡紫色，易與木質部剝離，木部堅硬，直徑 1~5 毫米，色黃棕或黃白。味甘微澀。



(6)



炮製⁽⁵⁾

- 1.巴戟天：揀去雜質，用熱水泡透後，趁熱抽去木心，切斷，曬乾。
- 2.炙巴戟：取甘草，搗碎，置鍋內加水煎湯，撈去甘草渣，加入揀淨的巴戟天，煮至鬆軟能抽出木心時（此時餘湯不宜多），取出，趁熱抽去木心，曬乾。（每巴戟天 100 斤，用甘草 6 斤 4 兩）。
- 3.鹽巴戟：取揀淨的巴戟天，用鹽水拌勻，入籠蒸透，抽去木心，曬乾。（每巴戟天 100 斤，用鹽 2 斤，加適量開水化開澄清）。
- 4.雷公炮炙論：凡使巴戟天，須用拘杞子湯浸一宿，持稍軟瀉出，卻用酒浸一伏時又瀉出，用菊花同熬令焦黃，去菊花，布拭令乾用。
- 5.綱目：以酒浸一宿，銼煉入藥，若急用，只以溫水浸，軟去心用。

採集⁽⁵⁾

冬、春季採挖，洗淨泥土，除去鬚根，曬至 6 至 7 成乾，用木輕輕捶扁，曬乾。

性味⁽⁵⁾

甘辛微溫無毒

功效⁽⁵⁾

補腎壯陽、補中益氣、強筋骨、祛風濕、抗衰老、安五臟、鎮靜、降壓、利尿功效，治療腎虛、陽痿、下腹隱痛、腰膝痠痛、下肢水腫等症狀。

方例⁽⁵⁾

真武東加味：熟附子、白茯苓、貢白術、杭白芍、切生薑、防黨蔘、巴戟天、北綿著、桂枝尖，治腎炎。

調肝湯：當歸身、杭白芍、山茱萸、巴戟天、阿膠珠、淮山藥、炙甘草，治經痛。

熟地、何首烏、黃精、菝葐各、巴戟天、杜仲、續斷、鹿角膠、枸杞子、鹿角膠、菟絲子、枸杞子、仙靈脾、肉桂、蛤蚧、狗鞭、麻雀(剝淨)，米酒7市斤。將藥浸泡入酒，治不孕。

茯苓、菖蒲、甘草、白朮、生棗、遠志、柴胡、當歸、人參、山藥、巴戟天，治陽痿。

禁忌⁽⁵⁾

陰虛火旺、津液不足、小便不利、有濕熱者忌服。

第三章 巴戟天及同屬植物之成分研究概況

一、巴戟天已知化學成分如下：

1. palmitic acid⁽⁷⁾
2. β -sitosterol⁽⁷⁾
3. oxositosterol⁽⁸⁾
4. rubiadin 1-methyl ether^(7,8)
5. lucidin^(7,8)
6. 1-hydroxy-2-methoxyanthraquinone^(7,8)
7. 1,6-dihydroxy-2,4-dimethylanthraquinone^(7,8)
8. 1,6-dihydroxy-2-dimethylanthraquinone^(7,8)
9. 1-hydroxy-2-methylanthraquinone^(7,8)
10. rubiadin^(7,8)
11. 1-hydroxyanthraquinone^(7,8)
12. alizalin 1-methyl ether^(7,8)
13. physcion⁽¹⁾
14. tectoquinone⁽⁹⁾
15. 2-hydroxy-3-methoxyanthraquinone⁽⁹⁾
16. rotungenic acid⁽¹⁰⁾
17. 1-borneol 6-O- β -D-apiosyl- β -D-glucoside⁽¹⁰⁾
18. morofficianloside⁽¹⁰⁾
19. 1,3-dihydroxy-2-methoxyanthraquinone⁽¹⁰⁾
20. 1-hydroxy-2,3-dimethylanthraquinone⁽¹⁰⁾
21. morindolide⁽¹⁰⁾
22. N-methyl-D-aspartic acid⁽¹⁰⁾
23. 2-hydroxy-1-methoxyanthraquinone⁽¹⁰⁾

24. 1-hydroxy-3-methoxyanthraquinone⁽¹⁰⁾

25. monotropein⁽¹¹⁾

26. asperuloside tetraacetate⁽¹¹⁾

27. asperuloside acid⁽¹¹⁾

28. asperuloside⁽¹¹⁾

29. desacetyl asperuloside acid⁽¹¹⁾

30. succinic acid⁽¹²⁾

31. nystose⁽¹²⁾

32. 1F-fructofuranosylnystose⁽¹²⁾

33. hexasaccharide⁽¹²⁾

34. heptasaccharide⁽¹²⁾

35. officinalisin⁽¹³⁾

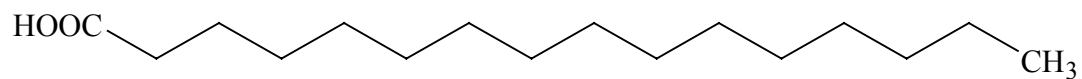
36. ethyl palmitate⁽¹⁴⁾

37. oleic acid⁽¹⁴⁾

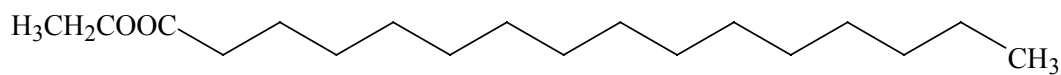
微量元素:Fe、Mn、Cu、Zn、Cr、Sn、Ni、Mo、Co、V、Sr⁽¹⁵⁾

二、上述化合物依化學結構分類如下：

1. fatty acid :

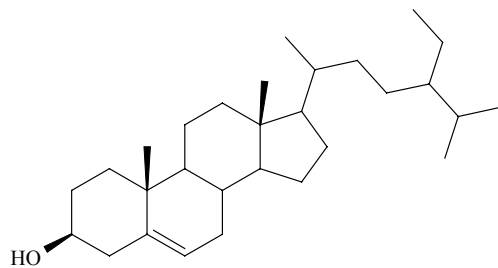


palmitic acid



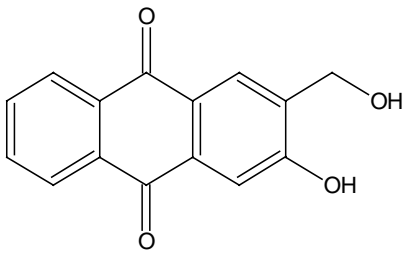
ethyl palmitate

2. Steroid :

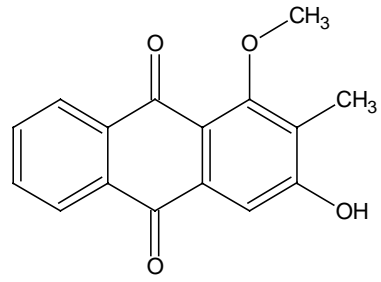


β -sitosterol

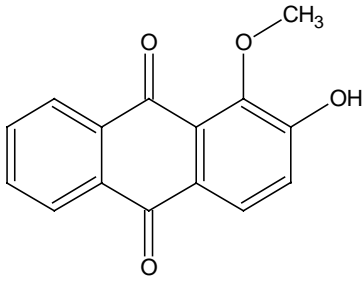
3. anthraquinone :



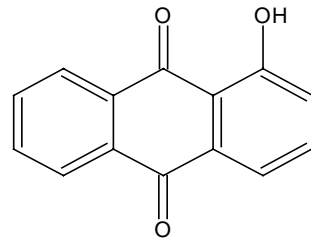
Lucidin



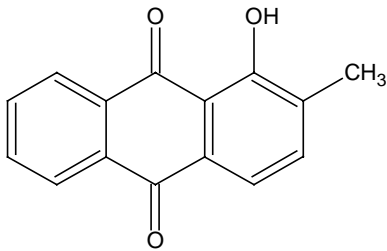
rubiadin 1-methyl ether



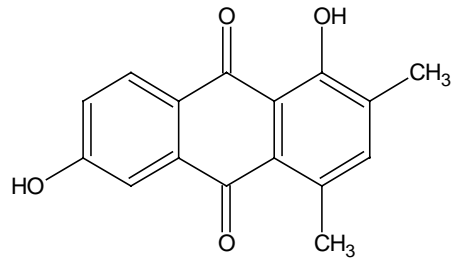
azialin 1-methyl ether



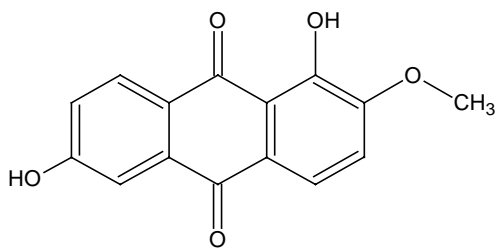
1-hydroxyanthraquinone



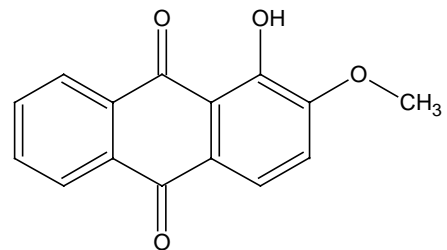
1-hydroxy-2-methylantraquinone



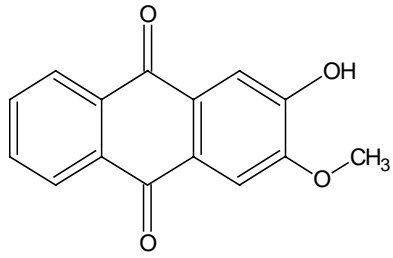
1,6-dihydroxy-2,4-dimethylantraquinone



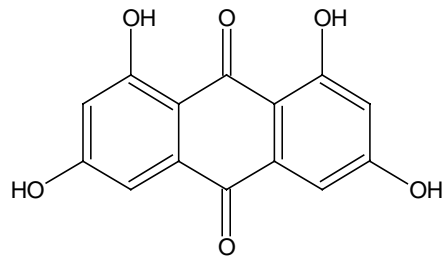
1,6-dihydroxy-2-methoxyantraquinone



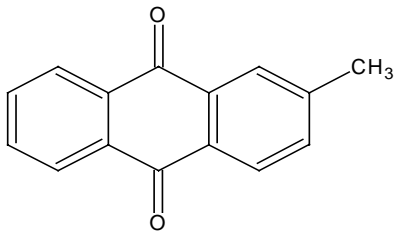
1-hydroxy-2-methoxyantraquinone



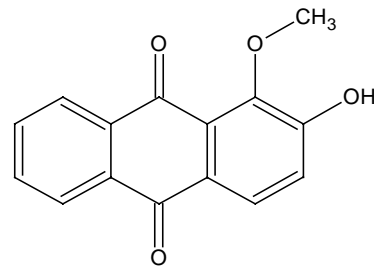
2-hydroxy-3-methoxyanthraquinone



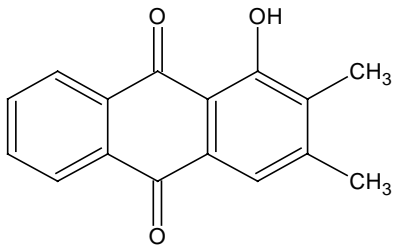
physcion



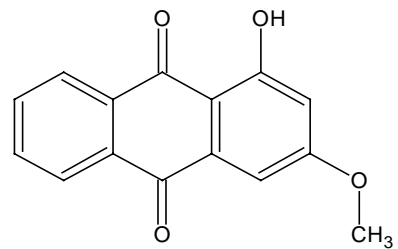
tectoquinone



2-hydroxy-1-methoxyanthraquinone

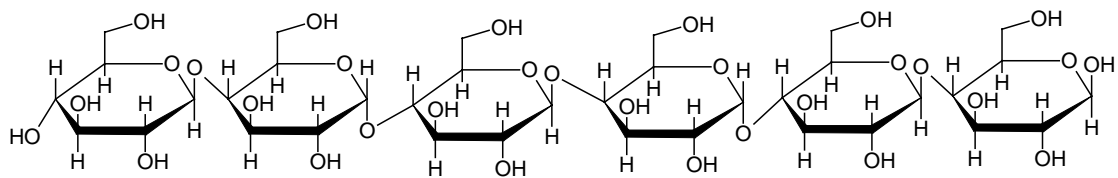


1-hydroxy-2,3-dimethylantraquinone

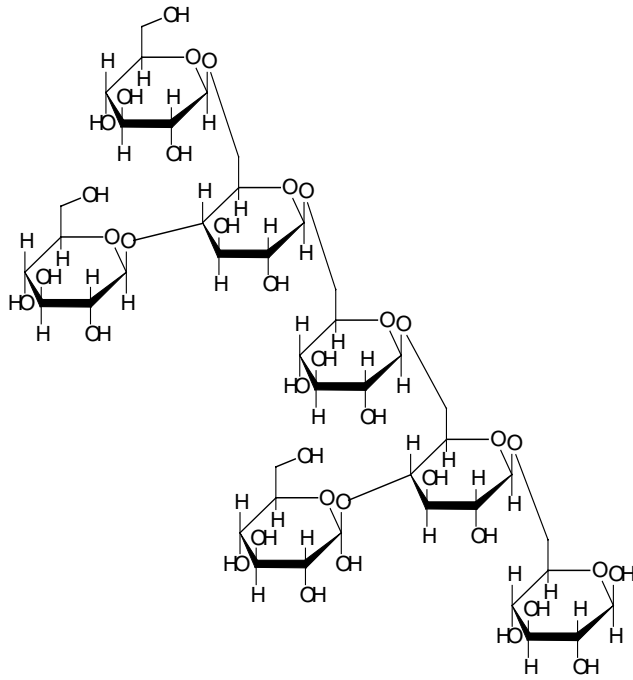


1-hydroxy-3-methoxyanthraquinone

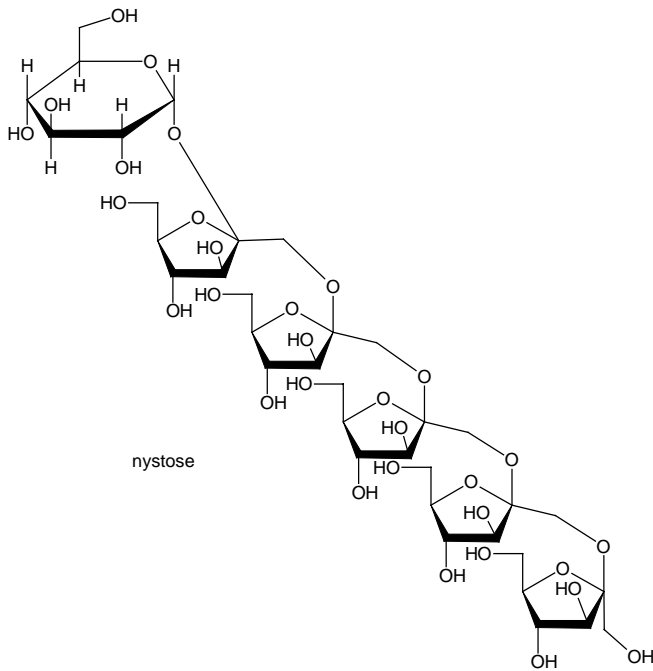
4. Sugar :



hexasaccharide

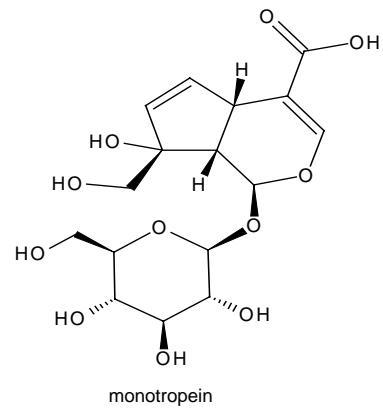
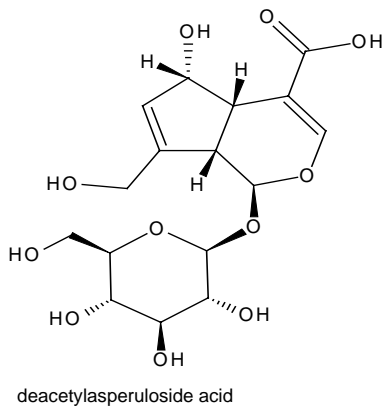
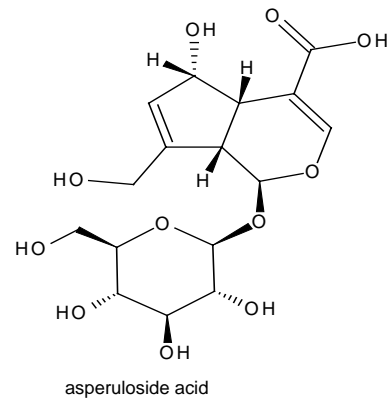
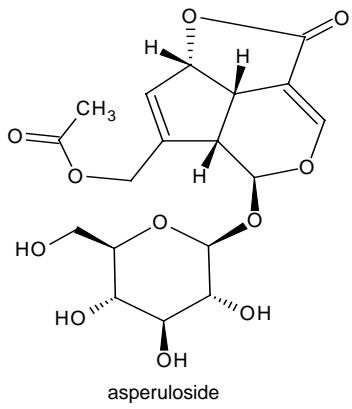


heptasaccharide

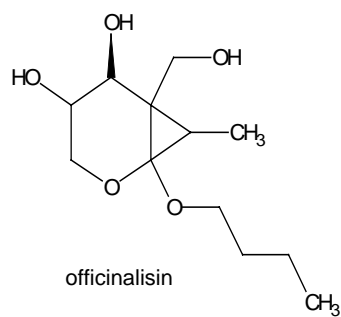
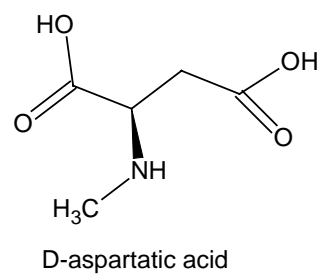
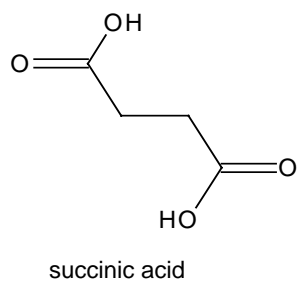


nystose

5. iridoid:



6. other:



第四章 巴戟天與常見偽品的鑒別

一、性狀比較

1 真品⁽¹⁶⁾

巴戟天：

為茜草科植物巴戟天*Morinda Offcinalis* How 的乾燥根。藥材性狀：多為扁圓柱形，略彎曲，長短不等，直徑在0.5~2 cm。表面灰黃色、黃棕色或暗灰色，具縱皺紋及橫裂紋，有的皮部橫向斷裂露出木部。皮部質韌，較濃，易剝落，斷面紫色或淡紫色，木部堅硬黃棕色或黃白色，直徑0.1~0.5 cm，無臭，味甘而微澀，此為正品巴戟天。

2 偽品⁽¹⁶⁾

羊角藤：

為茜草科植物羊角藤*Morrinda umbellata* L.的乾燥根，形狀圓柱形，略彎曲，長短不等，直徑在1~1.5 cm，木部約占直徑60% - 70%，味淡微甜。顯微鏡下石細胞形狀似巴戟天，但壁較濃，木質部薄壁細胞全部木化。表面黃色或黃棕色，有的微帶紫色。具不規則縱皺紋和深陷的橫紋，有的皮部斷裂而露出木部，形成長短不等的節。皮部薄，濃約0.1~0.4 cm，不易剝離，質堅硬韌，斷面淡紫色或黃白色，木部較大，直徑0.3~0.7 cm，呈齒輪狀，質堅硬。

恩施巴戟天(也稱川虎刺)：

來源於茜草科植物四川虎刺*Damnacanthus officinarum* Huang 的乾燥根，外形呈圓柱形，外表面具細的橫皺紋或縮成連珠狀，斷面皮部較濃。味微甜。顯微鏡下有石細胞、針晶、菊糖，無嵌晶纖維、澱粉粒、黏液質塊。長約0.4~2 cm，多呈折斷狀，表面土棕黃色至棕黑褐色，具不規則縱皺和細的橫皺紋，質硬、橫斷面肉質黃白色或淡紫色，木部有的露出，直徑細小約0.1~0.3 cm，有的抽去木心，形成一圓形小空洞。質堅脆易斷，無臭，味微甜。

虎刺：

茜草科植物虎刺*Damnacanthus indicus* Gaertn. F. 的根。藥材性狀：根多彎曲，呈連珠狀，壓扁或不壓扁。膨大部位直徑0.5~1.5 cm。表面灰白色，有細皺紋，質堅實，橫向裂紋較少。膨大部位之間為一段帶有表皮的木心，木心直徑0.1~0.3 cm，表面縱紋較細，質脆易斷，橫切面圓形。無臭，味甜。

假巴戟別名副巴戟、巴戟公：

來源於茜草科植物雙華巴戟*Morinda shunghuaensis* C. Y. Chen et M. S. Hwang 的乾燥根，外形呈圓柱形，具少數橫縊紋，皮部薄，易脫落，木部約占直徑80%以上。味淡微甜。顯微特徵與正品巴戟天基本相似，僅石細胞有的呈短分枝狀，壁較濃。

鐵箍散別名川巴戟、香巴戟：

來源於木蘭科植物鐵箍散*Schisandra propinqua* (Wall.) Baill. var. *sinensis* Oliv. 的乾燥根或藤莖，外形呈細圓柱形，彎曲，有分枝，外表面橫裂深部，露出木部，形成長短不等的節，斷面皮部薄，木部約占直徑80%以上。味微苦辛，嚼之發黏。顯微特徵與正品巴戟天區別較大，無石細胞、針晶、菊糖，有嵌晶纖維、澱粉粒、黏液質塊，較易區別。直徑在0.3~0.5 cm。表面褐色或棕紅色，具環類裂縫及縱皺紋，有斷痕和疣狀突起。質韌，不易折斷，斷面皮部薄，灰白色，有眾多棕紅色小點，皮部與木部交接處有紫棕色環，木部類白或淡灰棕色，氣香，習稱香巴戟。

小鑽：

五味子科植物*Kadsura Longipedunculata* Finet et Gagnep. 的根。藥材性狀：多彎曲圓柱形，珠狀，長短不等。

二、理化性質比較

1. 巴戟天含植物固醇醇、糖類、樹脂等成分，而偽品不全具備含這些成份，只含一種或某些微量相同成分，根據以上成分分別取正品與偽品的粗粉各10 g，加入10倍量95 %的乙醇回餾1 hr，加入適量的水使呈70 %的乙醇液，供試驗用。

醋酐濃硫酸試驗(Liebrmann-Burchard 反應)：取檢品的水溶液置蒸發皿中，於水浴上蒸乾，殘渣加入少量冰醋酸使溶解，再加入醋酐濃硫酸(19:1)試液，呈現紅紫色並變成藍色綠色(固醇類、三萜類成分或皂甙反應)，結果如表一。

氯仿濃硫酸試驗：取檢品加氯仿 10 ml，浸泡 10 h，取濾液 1 ml，置試管中，沿管壁滴加濃硫酸，氯仿層呈淡紅色，硫酸呈綠色螢光(固醇類反應)，結果如表一。

α 萘酚試驗(Molisch 紫環反應)：取檢品的水溶液 1 ml，加 5 % 萘酚試液數滴振搖後，沿管壁滴入 5-6 滴濃硫酸，使成兩液層，待 2-3 分鐘後，兩層液面出現紫紅色環(糖、多糖或甙類反應)，結果見表一。

鹼性硝酸銀試驗：取檢品加入 1 ml 2 %的 AgNO_3 溶液，邊振搖試管，逐滴加入 2 %的稀氨水，至最初產生的沈澱，剛好溶解，再滴入檢品，在熱水中溫熱，內壁上產生金屬銀沈澱(糖類反應)，結果如

表一。

表一 巴戟天與其品偽⁽¹⁷⁾理化性質的之比較

實驗類別	巴戟天	羊角藤	恩施巴戟天	虎刺	假巴戟(副巴戟)	鐵箍散(川巴戟)	小鑽
醋酐濃硫酸試驗	藍綠色	淺綠色	無反應	無反應	無反應	無反應	無反應
氯仿濃硫酸試驗	氯仿層紅色	氯仿層淡紅色	無反應	無反應	無反應	無反應	無反應
α 萘酚試驗	二液界面處產生紫紅色環	無反應	無反應	無反應	無反應	無反應	無反應
氨性硝酸銀試驗	呈褐色	無反應	無反應	無反應	無反應	無反應	無反應

2. 甲醇100 ml，浸漬過夜，濾過，取濾液按分光光度法進行比色測定，結果如表二。

螢光法:分別取巴戟天的偽品粗粉各10 g，加甲醇100 ml浸漬過夜濾過，濾液作為供試品溶液。另取巴戟天粗粉按同法製成10%甲醇作為對照藥材溶液，取供試品溶液與對照藥材溶液點於濾紙上，置紫外光燈(254 nm)下檢視，再噴以5% 醋酸鎂甲醇液後，再觀察螢光斑點，結果如表二。

薄層色譜法:分別取巴戟天的偽品粗粉0.2 g，加入20 ml氯仿浸漬24 hr濾過，濾液作為供試品溶液。另取巴戟天藥材按同法製備成巴戟天的氯仿提取液，作為對照藥材溶液，照薄層色譜法，吸取上述供試品溶液6 ml，對照藥材溶液，點於同一矽膠G25% 羧甲基纖維素薄層色譜板，以環己烷:醋酸乙酯:甲酸(15:3:0.5)為展開劑，展開、取出、晾乾，置紫外光燈(254 nm)下檢視，結果如表二。

紫外光譜法:分別取巴戟天及各種偽品粗粉各3 g，加甲醇100 ml，以紫外光-可見光光譜儀測定，結果如表二。

表二 巴戟天與其品偽⁽¹⁷⁾理化性質的之比較

實驗類別		巴戟天	羊角藤	恩施巴戟天	假巴戟(副巴戟)	鐵箍散(川巴戟)	小鑽
螢光法 (254 nm)	甲醇提取液 斑點	紫	天藍	藍紫	藍紫	暗黃	黃
	噴醋酸鎂後 斑點	藍紫	綠	紫黃	粉紅	暗黃	黃
薄層色譜法	以巴戟天為 對照藥材色 清斑點	6	4	5	6	2	3
紫外光譜法 (nm)	(30mg/ml) 溶媒甲醇	233 208 280(sh)	208 276 328 233(sh)	205 233 280(sh)	276 328 233(sh)	222 278	224 283

第五章 藥理實驗法簡介

抑制增殖作用：

細胞的增殖作用主要受到細胞週期的(cell cycle)調控，而細胞週期是由 cyclin 和 cyclin-dependent kinase (CDKs) 形成複合體，藉著活化細胞週期中的相關蛋白質來控制細胞增殖。人體內的正常細胞多半停留在 G₀-G₁期(G₀-G₁arrest)進一步成熟分化，分化過程中的細胞一旦受損，會活化細胞週期相關基因終止細胞週期的前進，進行 DNA 的修復。而癌細胞不同於正常細胞之處就是因為細胞週期的失控而導致細胞不斷的增殖與複製不成熟的幼稚胞，所以若能以藥物將不正常之增殖給停止當然也促成了分化成熟的進行了。研究之藥理實驗模式係利用 3-(4,5-dimethylthiazol-2-diphenyl)-tetrazolium bromide (MTT) 活性測試來檢測粗抽物及化合物之不同濃度對 HL-60 cell line 增殖的影響。此實驗方法是一種快速呈色法，其主要依賴粒線體中琥珀酸去氫酶(succinate dehydrogenase)作用將 MTT 還原為藍色之產物 formazan。MTT 的轉變僅在存活細胞中進行，並堆積在細胞內，加入 DMSO 溶解後，可由波長約 570 nm 之吸光測量並定量。由於細胞還原 MTT 的能力，代表了細胞粒腺體的活性，因此可做為細胞存活率的一個指標，於是便可以得到粗抽物及化合物對細胞增殖比例的百分比⁽¹⁸⁻²¹⁾。

貳、結果與討論

第一章 巴戟天成分之抽取與分離

將乾燥之巴戟天根莖部分粉碎後，以甲醇用冷浸法反覆抽取 15 次，依照 Scheme 1~Scheme 3 流程圖所述之方法分離。共得到一混合物及 5 個化合物，經光譜解析及化學方法確認其結構為：

Compound I : β -sitosterol

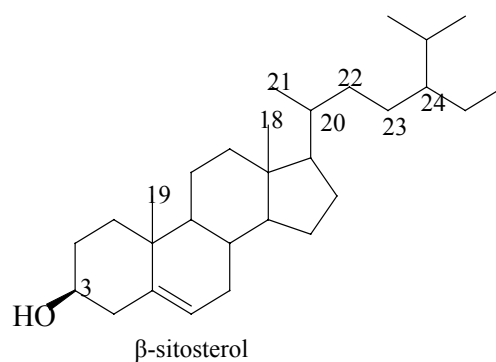
Compound II : a mixture of methyl oleate and methyl stearate

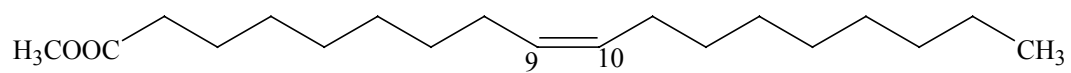
Compound III : friedelin

Compound IV : ferulic acid

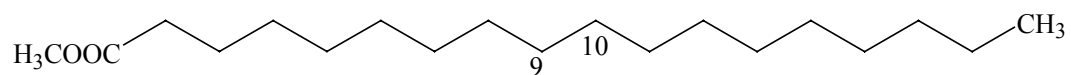
Compound V : rubiadin 1-methyl ether

Compound VI : arctigenin

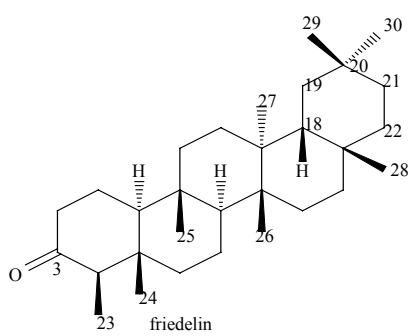




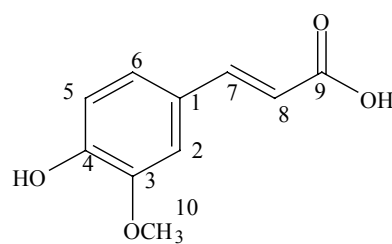
methyl oleate



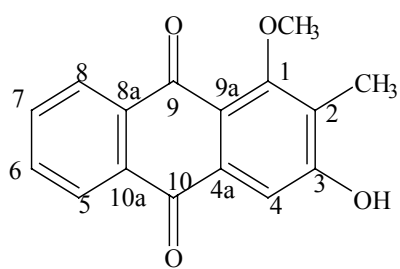
methyl stearate



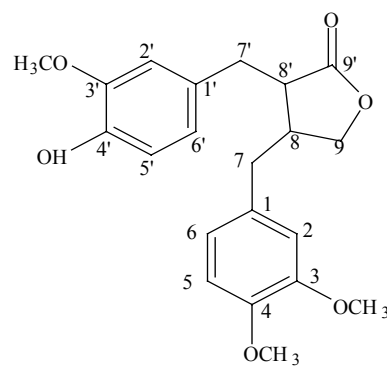
friedelin



ferulic acid



rubiadin 1-methyl ether



arctigenin

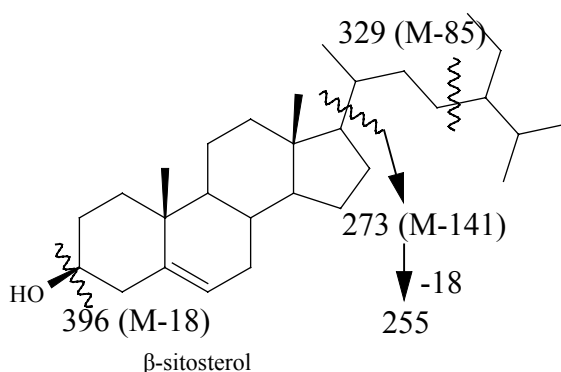
第二章 巴戟天成分之化學結構鑑定

【一】化合物 I (β -sitosterol)

化合物 I 為白色針狀結晶，熔點 154-156 $^{\circ}$ 。其 TLC 片經氯仿展開後 Rf 值為 0.35，噴 10% H_2SO_4 加熱後變色呈紫紅色。對 Liebermann-Burchard 試劑呈陽性反應(由紫色變成藍色再變成綠色)，紫外光下不吸光，故初步推斷化合物為植物固醇。

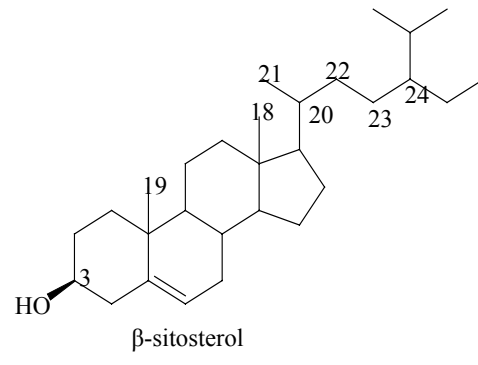
紅外線光譜(圖 1)顯示，在 3400~3300 cm^{-1} 有羥基-OH 的吸收帶，1463、1382 cm^{-1} 是 $-\text{CH}_2$ 、 $-\text{CH}_3$ 變角振動的吸收帶，1038 cm^{-1} 有 $-\text{C}-\text{O}$ 基伸縮振動的吸收帶。

由 EIMS m/z (rel. int. %) 圖譜(圖 2)顯示其 m/z 414 [M^+] (31) 為分子離子峰，所以分子量為 414，其他重要的斷裂碎片 m/z 396、381、328、272、255。故推測化合物可能主要為含有 β -sitosterol 之化合物。



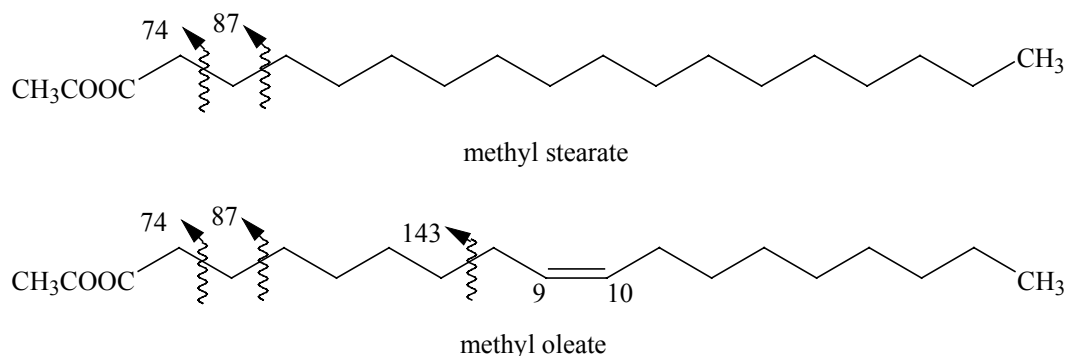
$^1\text{H-NMR}$ 光譜(CDCl_3 , ppm)(圖 3)顯示 δ 5.35 (1H, *m*, H-6) 是烯基氫的吸收訊號。 δ 3.52 (1H, *m*, H-3) 羥基根部質子訊號。

$^{13}\text{C-NMR}$ 光譜(CDCl_3 , ppm)(圖 4)顯示在 δ 140.5、121.4 的訊號為雙鍵 C-5、C-6 之吸收，經與文獻比對^(22,23)得知此化合物為 β -sitosterol 的化合物。



【二】化合物 II (a mixture of methyl oleate and methyl stearate)

化合物 II 為淡黃色油狀物，其 TLC 經 *n*-hexane-chloroform (5:1) 展開後 R_f 值為 0.4，紫外光下不吸光。由 EIMS *m/z* (rel. int. %) 圖譜(圖 5)顯示其 298 *m/z* [M⁺] 為主要之分子離子峰，296 *m/z* [M⁺] 為次要之分子離子峰，所以分子量為 298 及 296，其他重要的斷裂碎片 *m/z* 74、87 為長鏈脂肪酸甲酯類的特性離子峰。

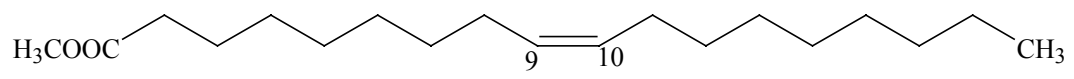


紅外線光譜(圖 6)顯示 2921 cm^{-1} 及 2851 cm^{-1} 為飽和碳氫伸縮振動的吸收，1745 cm^{-1} 為酯鏈 carbonyl group 羰基(C=O)的吸收，1459 cm^{-1} 為 CH 的角變動，1243 cm^{-1} 為酯鏈(C-O-C)的吸收。

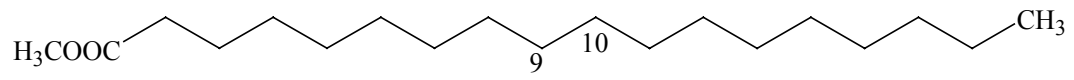
¹H-NMR 光譜(CDCl₃, ppm)(圖 7)顯示 δ 0.87 (*t*, *J* = 6.3 Hz) 為長鏈末端甲基之吸收訊號， δ 1.28~1.31(*s*) 為 11 長鏈 methylene (-CH₂-) 的吸收訊號， δ 1.57 (*m*)、 δ 2.01 (*m*)、 δ 2.26 (*t*, *J* = 7.6 Hz) 分別為 H-3、H-8、H-2 的吸收訊號， δ 3.66 (3H, *s*) 為甲酯基上氫的吸收訊號， δ 5.34 (2H, *t*, *J* = 5.3 Hz, H-9, 10) 為 olefinic 的吸收訊號，因 δ 5.34 及 δ 3.66 吸收面積不成應有比例，故判斷其為混合物。

¹³C-NMR 光譜(CDCl₃, ppm)(圖 8)顯示 δ 13.87 為長鏈末端甲基 (C-18) 碳的吸收訊號， δ 22.45~33.78 為 14 長鏈 methylene 的吸收訊號， δ 51.2 為 methoxy(-OCH₃) 的吸收訊號， δ 129.7 及 δ 129.5 為 olefinic carbon 的吸收訊號， δ 174.1 為 carboxyl carbon 羰基(C=O)的吸收訊號。

綜合上述資料與文獻值⁽²⁴⁻²⁶⁾比對，確認此化合物為 methyl oleate 和 methyl stearate 之混合物，其結構如下所示：



methyl oleate



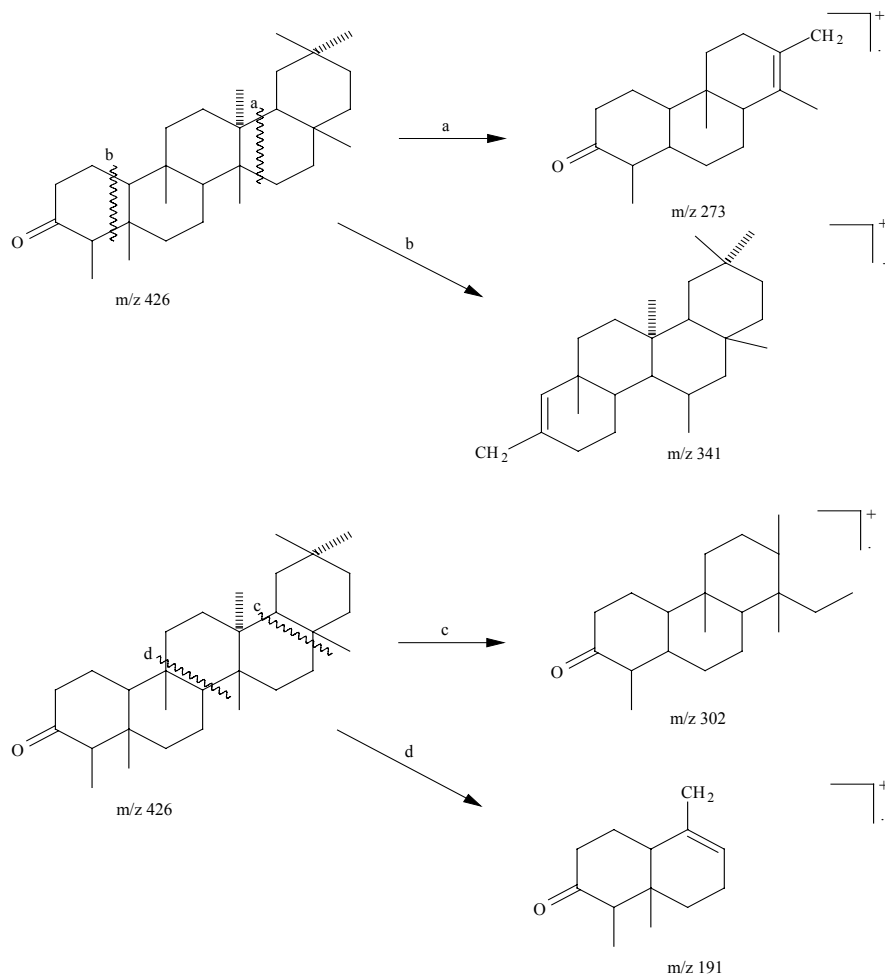
methyl stearate

【三】化合物 III (friedelin)

化合物 III 為白色針狀結晶，熔點 260-264 。其 TLC 片經 benzene 展開後 Rf 值為 0.38，噴 10% H₂SO₄ 加熱後變色呈紫色。對 Liebermann-Burchard 試劑呈陽性反應(由紅色變成紫色再變成黃褐色)，紫外光下不吸光，故初步推斷為植物固醇或三萜類化合物。

紅外線光譜(圖 9)顯示，在 1714 cm⁻¹ 有羰基-C=O 基的吸收帶，也有一般三萜類所含有的吸收(1459、1397、1111、1074、670 cm⁻¹)3000 cm⁻¹ 以上無不飽和碳氫伸縮振動的吸收帶。

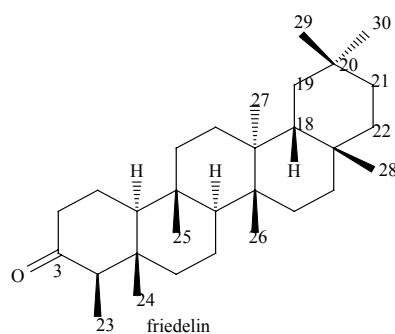
由 EIMS *m/z* (rel. int. %) 圖譜(圖 10)顯示其 *m/z* 426 [M⁺] (15) 為分子離子峰，所以分子量為 426，其他重要的斷裂碎片 *m/z* 341、302、273、246、205、191。故推測化合物可能是 friedelin 之化合物。



$^1\text{H-NMR}$ 光譜(CDCl_3 , ppm)(圖 11)顯示 δ 0.73 (3H, *s*)、 δ 0.87 (3H, *s*)、 δ 0.89 (3H, *d*, $J = 5.2$ Hz)、 δ 0.95 (3H, *s*)、 δ 1.00 (6H, *s*)、 δ 1.05 (3H, *s*)、 δ 1.18 (3H, *s*)應是結構中八個甲基的吸收訊號。配合 MS 的斷裂情形，推測化合物為 friedelin 類化合物，且八個甲基分別為 H-24、H-25、H-23、H-29、H-30、H-26、H-27、H-28 的訊號。

$^{13}\text{C-NMR}$ 光譜(CDCl_3 , ppm)(圖 12)顯示與 DEPT 135 圖譜(圖 13)顯示共有三十個碳原子吸收訊號。其中包含八個 CH_3 的碳原子訊號(δ 6.6、14.4、17.7、18.4、20.0、31.5、31.8、34.8)，十一個 CH_2 的碳原子訊號(δ 18.0、22.0、30.2、32.1、32.5、35.1、35.4、35.7、39.0、41.0、41.3)，四個 CH 的碳原子訊號(δ 42.5、52.8、57.9、59.2)，其餘六個碳原子訊號屬於四級碳(δ 27.9、29.7、37.2、38.0、39.4、41.9、213.0)，在最低磁場的碳原子訊號 δ 213.0 為 C-3 的羰基 $\text{C}=\text{O}$ 的吸收訊號。

綜合上述資料與文獻值⁽²⁶⁻³²⁾比對(表一)，確認此化合物之結構為 friedelin，其結構如下所示：



表三 化合物 III 與參考文獻⁽²⁶⁾的碳譜數據之比較

C	DEPT	化合物 III (CDCl ₃)	Friedelin (CDCl ₃)
1	CH ₂	22.0	22.0
2	CH ₂	41.3	41.3
3	C	213.0	212.9
4	CH	57.9	58.0
5	C	41.9	41.9
6	CH ₂	41.0	41.0
7	CH ₂	18.0	18.0
8	CH	52.8	52.9
9	C	37.1	37.2
10	CH	59.2	59.2
11	CH ₂	35.1	35.1
12	CH ₂	30.2	30.3
13	C	38.0	38.0
14	C	39.4	39.4
15	CH ₂	32.1	32.2
16	CH ₂	35.7	35.8
17	C	29.7	29.7
18	CH	42.5	42.6
19	CH ₂	35.4	35.4
20	C	27.9	27.9
21	CH ₂	32.5	32.5
22	CH ₂	39.0	39.0
23	CH ₃	6.5	6.6
24	CH ₃	14.4	14.4
25	CH ₃	17.7	17.7
26	CH ₃	18.4	18.7
27	CH ₃	20.0	20.0
28	CH ₃	31.8	31.9
29	CH ₃	31.5	31.6
30	CH ₃	34.7	34.8

【四】化合物 IV (ferulic acid)

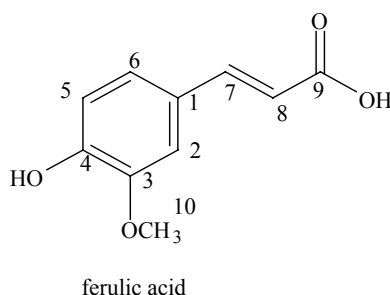
化合物為 IV 淡黃色針狀物，熔點 171-174 °C，其 TLC 經 *n*-hexane-chloroform (1:9) 展開後 R_f 值為 0.4，紫外光下不吸光。由 EIMS *m/z* (rel. int. %) 圖譜(圖 14)顯示其 194 *m/z* [M⁺] 為分子離子峰，所以分子量為 194，其他重要的斷裂碎片 *m/z* 179、150 為脫去(-CH₃)和(-CO₂)的特性離子峰

紅外線光譜(圖 15)顯示在 3439 cm⁻¹ 有羥基-OH 的吸收帶，2928 cm⁻¹ 及 2847 cm⁻¹ 為飽和碳氫伸縮振動的吸收，1699 cm⁻¹ 為羧基 carbonyl group (C=O) 的吸收，1436 cm⁻¹ 為 CH 的角變動，1208 cm⁻¹ 為醚基(C-O-C)的吸收。

¹H-NMR 光譜(acetone-*d*₆, ppm)(圖 16)顯示 δ 3.92 (3H, *s*) 為甲氧基上氫的吸收訊號，δ 7.60 (1H, *d*, *J* = 16.0 Hz)，δ 6.37 (1H, *d*, *J* = 16.0 Hz) 為 ferulic acid 之 H-7、H-8 的訊號，δ 7.33 (1H, *d*, *J* = 1.9 Hz)、δ 7.14 (1H, *dd*, *J* = 1.9, 8.1 Hz)、δ 6.87 (1H, *d*, *J* = 8.1 Hz)，分別為 H-2、H-6、H-5 苯環上氫的吸收訊號。

¹³C-NMR 光譜(acetone-*d*₆, ppm)(圖 17)顯示 δ 126.4、110.2、147.6、148.9、114.9、122.7 為苯環 C1~C6 的吸收訊號，δ 55.19 為 methoxy (-OCH₃) 的吸收訊號，δ 114.9、144.8 的訊號為雙鍵 C-8、C-7 之吸收，δ 167.1 為 carboxyl carbon 羧基(C=O)的吸收訊號。

綜合上述資料與文獻值⁽³³⁻³⁵⁾比對(表三)，確認此化合物之結構為，ferulic acid 分子式為 C₁₀H₁₀O₄，其結構如下所示：



表四 化合物 IV 與參考文獻⁽³⁵⁾的碳譜數據之比較

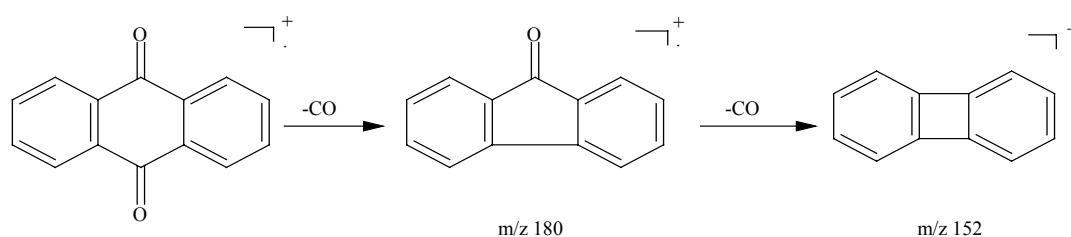
C	DEPT	化合物 IV (50 MHz)	ferulic acid (60 MHz)
1	C	126.4	125.4
2	CH	110.2	109.2
3	C	147.6	146.4
4	CH	148.9	147.8
5	CH	114.9	113.9
6	CH	122.7	121.1
7	CH	144.8	144.2
8	CH	114.9	113.7
9	C	167.1	166.7
10	OCH ₃	55.1	54.2

【五】化合物 (rubiadin 1-methyl ether)

化合物 為橙黃色針狀結晶，熔點 272-276 。其 TLC 片經 *n*-hexane-ethyl ether (2:1) 展開後 R_f 值為 0.5，溶於苯及甲苯，不溶於甲醇、乙醇、乙醚及丙酮，在可見光和紫外光下呈黃色，氬薰後在可見光呈紅色，可能是 anthraquinone 類化合物⁽³⁶⁾。

紅外線光譜(圖 18)顯示，在 3400~3300 cm⁻¹ 有羥基-OH 的吸收帶，1672 cm⁻¹ 為未和氫鍵結合之 carbonyl group 羰基(C=O)的吸收，1652 cm⁻¹ 為氫鍵結合之 carbonyl group 羰基(C=O)的吸收，1560 cm⁻¹ 及 1463 cm⁻¹ 雙峰為芳香環之 C=C 伸縮振動的吸收，1119 cm⁻¹ 為 C-O 之伸縮振動^(37,38)。

由 EIMS *m/z* (rel. int. %) 圖譜(圖 19)顯示其 *m/z* 268 [M⁺] (100) 為分子離子峰，所以分子量為 268，其他重要的斷裂碎 *m/z* 253 (M-CH₃)、239 (M-CO)、211 (M-2CO)。以上符合 9,10-anthraquinone 的裂解模式，故推測化合物可能主要為含有 anthraquinone 之化合物。

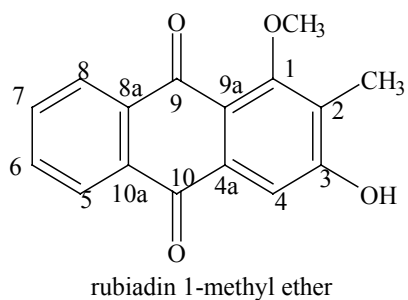


¹H-NMR 光譜(DMSO-*d*₆, ppm)(圖 20)顯示 δ 2.14 (3H, *s*) 為苯環上甲基之吸收訊號，δ 3.77 (3H, *s*) 為苯環上 methoxy (-OCH₃) 的吸收訊號，δ 7.50 (1H, *s*)、δ 7.8 - δ 8.0 (2H, *m*) H-6,7、δ 8.0 - δ 8.2 (2H, *m*) H-5,8 為苯環上 C-H 的吸收訊號，δ 11.11 (1H, *s*) 為苯環上-OH 的吸收訊號。

¹³C-NMR 光譜(DMSO-*d*₆, ppm)(圖 21)顯示碳原子吸收訊號包含 δ 9.2、60.8、109.2、118.1、126.2、126.6、132.2、133.6、133.9、134.7、160.8、161.1、175.5、180.4，其中 CH₃ 的碳原子訊號為 δ 9.2，OCH₃ 的碳原子訊號 δ 60.8，δ 180.4、175.5 在最低磁場的碳原子訊號為

C-9,10 的羰基 C=O 的吸收訊號，其餘為苯環上碳的訊號。

綜合上述資料與文獻值比對⁽²⁾，確認此化合物之結構為 rubiadin 1-methyl ether，其結構如下所示：

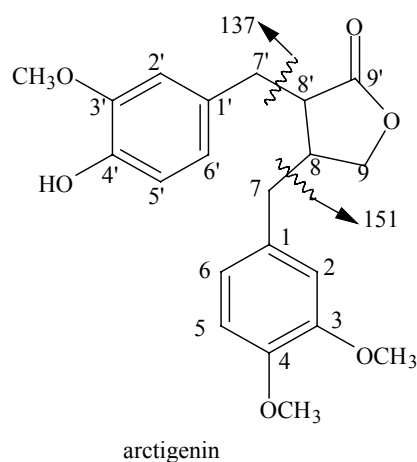


表五、化合物 V 與參考文獻⁽²⁾之氫譜比較

C	化合物 IV (200 MHz)	rubiadin 1-methyl ether (200 MHz)
C1-OCH ₃	3.77 (3H, <i>s</i>)	3.80 (3H, <i>s</i>)
C2-CH ₃	2.14 (3H, <i>s</i>)	2.18(3H, <i>s</i>)
C3-OH	11.11 (1H, <i>s</i>)	11.15 (1H, <i>s</i>)
C4-H	7.50 (1H, <i>s</i>)	7.52 (1H, <i>s</i>)
C5.6.7.8	7.81 -8.16 (4H, <i>m</i>)	7.84 -8.18 (4H, <i>m</i>)

【六】化合物 I (*l*-arctigenin)

化合物 I 為淡透明針狀物，熔點 107-110 °C， $[\alpha]_D^{25} : -24.4^\circ$ (c 0.41, CHCl₃)，其 TLC 經 *n*-hexane-chloroform (1:5) 展開後 R_f 值為 0.4，紫外光下不吸光。由 EIMS m/z (rel. int. %) 圖譜(圖 22) 顯示其 372 m/z [M⁺] 為分子離子峰，所以分子量為 372，其他重要的斷裂碎片 m/z 152, 151, 137, 122, 107, 91, 77 (為苯環的特性離子峰)。

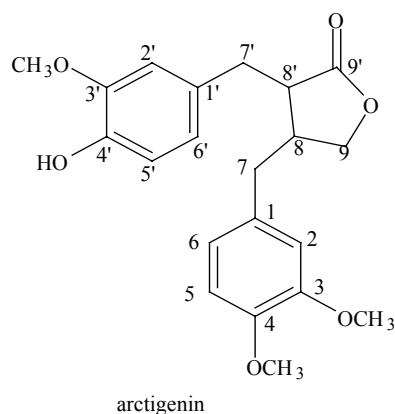


紅外線光譜(圖 23)顯示在 3431 cm⁻¹ 有 -OH 基的吸收帶，2936 cm⁻¹ 及 2840 cm⁻¹ 為飽和碳氫伸縮振動的吸收，1768 cm⁻¹ 為 carbonyl group 羰基(C=O)的吸收，可能為五圓環 lactone (*r*-lactone)，1520 cm⁻¹ 及 1462 cm⁻¹ 雙峰為芳香環之 C=C 伸縮振動的吸收，1238 cm⁻¹ 為酯基(C-O-C)的吸收。

¹H-NMR 光譜(CDCl₃, ppm)(圖 24)顯示 δ 2.56 (4H, *m*, H-7, 8, 8')， δ 2.92 (2H, *m*) 為 H-7' 收訊號， δ 3.85 (3H, *s*)、 δ 3.81 (6H, *s*) 為甲氧基上氫的吸收訊號， δ 5.58 (1H, *s*) 為苯環上 hydroxy 的吸收訊號， δ 3.88 (1H, *m*, H-9)， δ 4.12 (1H, *dd*, *J* = 6, 10 Hz, H-9)， δ 6.82 (1H, *d*, *J* = 7.6 Hz)， δ 6.74 (1H, *d*, *J* = 8 Hz)， δ 6.63 (1H, *s*)， δ 6.58 (1H, *dd*, *J* = 1.8, 8.2 Hz)， δ 6.54 (1H, *dd*, *J* = 1.8, 8.2 Hz)， δ 6.46 (1H, *d*, *J* = 1.7 Hz) 為苯環上 H 的吸收訊號。

^{13}C -NMR 光譜(CDCl_3 , ppm)(圖 25)與 Dept 135(圖 26)顯示 δ 55.6 為 3 之 methoxy ($-\text{OCH}_3$) 的吸收訊號, δ 71.1 為五元環 lactone ($-\text{OCH}_2-$) 的吸收訊號, δ 178.1 為五元環內酯環 lactone 羰基($\text{C}=\text{O}$)的吸收訊號, 其他訊號參考表三。

綜合上述資料與文獻值⁽³⁹⁾比對表三, 確認此化合物之結構為 arctigenin, 分子式為 $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_6$, 其結構如下所示



表六 化合物 VI 與參考文獻⁽³⁹⁾的碳譜數據之比較

C	DEPT	化合物 VI (50 MHz)	arctigenin (67.5 MHz)
1	C	129.26	129.51
2	CH	111.49	111.80
3	C	147.57	147.85
4	C	146.47	146.73
5	CH	111.00	111.31
6	CH	120.34	120.61
7	CH ₂	37.95	38.19
8	CH	40.69	40.94
9	CH ₂	71.10	71.32
1'	C	130.21	130.48
2'	CH	111.27	111.56
3'	C	148.77	149.05
4'	C	144.30	144.56
5'	CH	113.87	114.14
6'	CH	121.86	122.11
7'	CH ₂	34.28	34.54
8'	CH	46.35	46.60
9'	C	178.56	178.78
	OCH ₃	55.61	55.91
	OCH ₃	55.61	55.87
	OCH ₃	55.61	55.82

第三章 巴戟天粗抽物與成分活性

抗細胞增殖活性

本實驗以甲醇提取物及各分劃層(Fr. A~C)對 HL-60 血癌細胞之增殖抑制活性，其結果如表七所示：

表七 巴戟天之甲醇提取物及各分化層(Fr. A~C)
對 HL-60 血癌細胞之增殖抑制活性

Compound	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	MTT assay (%) (HL-60)
Cont.	0.0	100.0 \pm 1.0
MeOH ext	10	116.7 \pm 6.0
	50	93.3 \pm 2.0
	110	106.2 \pm 4.1
IC₅₀ > 100 $\mu\text{g/ml}$		
Fr. A	10	101.9 \pm 0.2
	25	74.9 \pm 4.7 ***
	40	59.6 \pm 1.7 ***
	55	13.7 \pm 2.0 ***
IC₅₀ = 39.2 $\mu\text{g/ml}$		
Fr. B	10	88.6 \pm 5.4
	25	95.2 \pm 2.2
	35	78.3 \pm 5.5 *
	50	13.9 \pm 5.7 ***
IC₅₀ = 39.6 $\mu\text{g/ml}$		
Fr. C	35	81.8 \pm 10.8 *
	70	78.1 \pm 7.6 **
	100	42.9 \pm 2.0 ***
	140	3.5 \pm 1.6 ***
IC₅₀ > 100 $\mu\text{g/ml}$		

1. HL-60 cells (2×10^4 cells/ml) were incubated with different concentration in 96 hrs. Data was presented as mean \pm SD from three separated experiments.

2. * $p < 0.055$ compared with control.

** $p < 0.01$ compared with control.

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

3. Fr. A：正己烷提取物。Fr. B：氯仿提取物。

Fr. C 乙酸乙酯層提取物。

表四顯示正己烷抽出物 (55 $\mu\text{g/ml}$)、氯仿抽出物 (50 $\mu\text{g/ml}$)對 HL-60 血癌細胞之細胞增殖有明顯抑制活性，顯示其具有抗癌作用，其對 HL-60 血癌細胞之 IC_{50} 分別為 39.2 $\mu\text{g/ml}$ 及 39.6 $\mu\text{g/ml}$ ，此結果顯示其有效活性成分在正己烷、氯仿層提取物。

由 Scheme 1~Scheme 3 之分離過程共得到 5 個化合物及 1 個混合物，將化合物 V 分別進行 HL-60 血癌細胞之增殖抑制試驗，其結果如表八所示：

表八 化合物 V 對 HL-60 血癌細胞之增殖抑制活性

Compound	Conc. (μgM)	MTT assay(% (HL-60)
Cont.	0.0	100.0 \pm 1.0
化合物 V	1	93.8 \pm 3.9
	5	108.6 \pm 4.4
	10	103.8 \pm 4.5
	50	97.2 \pm 3.2
	100	68.9 \pm 4.2
		$\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{gM}$

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

表五結果顯示 rubiadin 1-methyl ether 對血癌細胞無抑制細胞增殖作用，其 $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$ ，表示化合物 V 無明顯抑制增殖活性，此結果是否與 HL-60 血癌細胞本身的敏感性有關則須再做進一步探討。

參、實驗材料與方法

第一章 試藥與儀器

第一節 試藥

(一)成分抽取、薄層層析及管柱層析用

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

(二)測紫外光光譜用

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

(三)核磁共振光譜用

Chloroform-*d*₁ (deuteration degree 99.5%)、dimethyl sulfoxide-*d*₆ (deuteration degree 99.8%)、acetone-*d*₄ (deuteration degree 99.5%)、pyridine-*d*₅ (deuteration degree 99.5%) 等購自默克公司(Merck Taiwan, LTD, 臺北)。

(四)管柱色層分析 (column chromatography)填充劑

1. silica gel

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

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

(五)薄層色層分析 (thin-layer chromatography)

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

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

(六)厚層色層分析 (preparative thin-layer chromatography)

採用 PLC plates Silica gel 60 F₂₅₄ concentrating zone (20×20 cm, 1 mm, E. Merck)。

第二節 儀器

(一)熔點測定機 (melting point apparatus)

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

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

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

(三)紅外光光譜儀 (Infrared spectrometer, IR)

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

(四)質譜儀 (mass spectrometer, MS)

EIMS：使用 VG PLATFORM II 測定，離子化電壓 ionization voltage 為 70 ev，單位為 m/z 。

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

採用 DPX-200 FT-NMR Spectrometer 及 DPX-400 FT-NMR。以 δ 值表示化學位移(chemical shift)，單位為 ppm，以

TMS (tetramethylsilane ; $\delta=0$)為內部標準品。偶合常數(J)以 Hz 為單位，並以 s 表單峰(singlet)， d 表二重峰(doublet)， t 表三重峰(triple)， q 表四重峰(quartet)， m 表多重峰(multiplet)， br 表寬峰 broad。

(六)紫外光燈(UV Lamp)

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

第二章 預試驗粗抽物之製備

第一節 粗抽物之製備

取巴戟天乾燥根莖部約 10 公斤，經由文獻^(1~3)記載特徵逐一比較查證並經由本校中醫系張賢哲教授、中國藥學研究所陳忠川鑑定基源，確定為茜草科(Rubiaceae)植物巴戟天[*Morinda officinalis* How]後，除去根心(約剩 8 公斤)，始進行研究。所購得植物用甲醇靜置抽取 15 次。合併抽取液，經減壓濃縮得甲醇粗提取物 1247 公克，將提取物懸浮於水中，再以正己烷抽取 6 次至近無色，合併抽取液，經減壓濃縮後得到正己烷提取物約 42 克(Fr. A)。剩餘水層再以氯仿抽取 6 次至近無色，合併抽取液，經減壓濃縮後得氯仿提取物約 30 公克(Fr. B)。剩餘水層再以乙酸乙酯抽取 6 次至近無色，合併抽取液，經減壓濃縮後得乙酸乙酯提取物約 48 公克(Fr. C)。最後剩餘的水層經減壓濃縮及冷凍乾燥後得水層提取物約 1100 公克(Fr. D)。將此上述四種劃分(Fr. A~Fr. D)再以矽膠管柱層析、薄層層析及再結晶法繼續進行分離。抽取及劃分流程如 Scheme 1

第二節 成分的單離

(一) 正己烷抽出物之成分單離

取 Fr. A 42 g，經矽膠管柱色層分析法(70-230 mesh)，以正己烷、氯仿為梯度沖提，依極性大小不同將收集液分成 Fr. A-1~Fr. A-4。

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

Fr. A-2-2 經矽膠管柱色層分析法(230-400 mesh)，以氯仿、乙酸乙酯

(20 : 1)為沖提液，分離得到化合物 I (7.2 mg)。Fr. A-2-4 經矽膠管柱色層分析法(70-230 mesh)，以氯仿、正己烷(1 : 5)為沖提液，分離得到化合物 II (20 mg)。

取 Fr. A-4 經矽膠管柱色層析法(70-230 mesh)，以氯仿、乙酸乙酯(5 : 1)為沖提液，分離得到 Fr. A-4-1 及 Fr. A-4-2。將 Fr. A-4-2 的白色沉澱物，以丙酮做再結晶後得白色片狀結晶為化合物 III (5.2 mg)。其他分劃則予以保留，流程圖如 Scheme 2 所示。

(二) 氯仿抽出物之成分單離

取 Fr. B 30 g，經矽膠管柱色層分析法(70-230 mesh)，以氯仿、乙酸乙酯為梯度沖提液，依極性大小不同將收集液分成 Fr. B-1~Fr. B-6。

Fr. B-2 有黃色沉澱物，過濾後以丙酮做再結晶純化得化合物 V(2.0 mg)。

Fr. B-4 經矽膠管柱色層分析法(70-230 mesh)，以氯仿、正己烷(1 : 1)為沖提液，分離得到 Fr. B-4-1 及 Fr. B-4-4 兩部份。將 Fr. B-4-1 經矽膠管柱色層分析法(230-400 mesh)，以氯仿、正己烷(5 : 1)為沖提液，每 20 ml 收集一次，共收集 30 瓶，其中第 5 瓶到第 21 瓶合併，經減壓濃縮後得到白色固體，以丙酮和水做再結晶得到為化合物 VI (6 mg)，Fr. B-4-4 以氯仿、正己烷(9 : 1)為沖提液，經減壓濃縮後得到白色針狀固體，得到為化合物 IV (3 mg)。其他分劃則予以保留，流程圖如 Scheme 3 所示。

第三章 藥理試驗方法

抗細胞增殖實驗：

1. 癌細胞的培養^(18,19)

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

2. MTT proliferation assay^(20,21)

將 HL-60 cells (2×10^4 cell/ml) 培養於 24-wells 培養皿使最後體積為 1 ml/well；每 well 中加入各種檢體於溫度 37 °C、溼度 95%、5% CO₂ 的培養箱中培養固定時間之後，分別取出作 MTT-proliferation assay 實驗。

首先自每 well 取出已去除培養基之 50 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 IC₅₀ 值。

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

第四節 化合物之性質與光譜數據

化合物 I β -sitosterol

白色針狀結晶；m.p. 154-156 °。

Molecular weight：414。

TLC：Rf = 0.35 (chloroform)。

EIMS (70 eV) m/z (rel. int. %)：

414 [M^+] (31.2)、396 (7.1)、381 (15.4)、328 (7.6)、272 (10.0)、255 (13.6)、
213 (17.3)、159 (12.8)、119 (20.5)、107 (41.8)、91 (43.0)、81 (37.3)、
69 (40.6)、55 (100.0)。

IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1} ：

3381、2981、2867、1714、1463、1382、1038。

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

0.68 (3H, *s*)、0.79~2.28 (*m*)、3.52 (1H, *m*, H-3)、5.35 (1H, *d*, $J = 5.0$ Hz, H-6)。

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

11.7 (C-18)、18.5 (C-29)、18.7 (C-21)、19.1、19.8、20.8、(C-11, 16, 21)、
22.8 (C-15)、25.8 (C-28)、28.0 (C-16, C-27)、30.0 (C-19)、31.2 (C-25)、
31.4 (C-7)、31.6 (C-8)、32.2 (C-2)、33.7、35.9、36.2 (C-10)、37.0 (C-1)、
39.5 (C-12)、40.3 (C-20)、42.0 (C-13)、45.5、49.9 (C-9)、51.0 (C-24)、
55.8 (C-17)、56.5 (C-14)、71.5 (C-3)、121.4 (C-6)、24.0 (C-23)、28.9
(C-22)、140.5 (C-5)。

化合物 II methyl oleate and methyl stearate 之混合物

黃色油狀物。

Molecular weight : 298 、 296

TLC : Rf = 0.4 (*n*-hexane : chloroform = 5 : 1)

IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1} :

2921 、 2851 、 1745 、 1459 、 1243 、 1173 。

EIMS (70 eV) m/z (rel. int. %) :

298 [M^+] (2.0) 、 296 (0.5) 、 270 (5.0) 、 227 (4.2) 、 111 (5.3) 、 97 (17.9) 、
87 (21.9) 、 74 (100) 、 69 (30.8) 、 55 (60.5) 。

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

0.87 (3H, *t*, $J = 4.8$ Hz, H-8) 、 1.28~1.31 (11 \times CH₂) 、 1.5 (2H, *m*, H-3) 、
2.01 (4H, *m*) 、 2.27 (2H, *t*, $J = 7.6$ Hz) 、 3.65 (2H, *t*, $J = 7.6$ Hz, H-2) 、 5.33
(2H, *t*, $J = 5.3$ Hz, H-9) 。

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

13.8 ($-\underline{\text{C}}\text{H}_3$) 、 21.8~31.7 (13 \times CH₂) 、 51.2 ($-\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_3$) 、 129.4, 129.9 (C-9 、
C-10) 、 174.1 ($\underline{\text{C}}=\text{O}$) 。

化合物 III friedelin

白色柱狀結晶 ; m.p. 261-263 。

Molecular weight : 426

TLC : Rf = 0.38 (benzene)

IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1} :

2925 、 2867 、 1714 、 1459 、 1111 、 1074 、 670 。

EIMS (70 eV) m/z (rel. int. %) :

426 [M^+] (5.0) 、 411 (1.9) 、 341 (1.2) 、 273 (8.5) 、 246 (6.8) 、 205 (11.7) 、
163 (12.8) 、 123 (37.1) 、 109 (41.3) 、 95 (64.1) 、 69 (100) 。

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

0.72 (3H, *s*, H-24) 、 0.86 (3H, *s*, H-25) 、 0.89 (3H, *d*, $J = 5.2$ Hz, H-23) 、

0.95 (3H, *s*, H-29)、1.00 (6H, *s*, H-30, 26)、1.04 (3H, *s*, H-27)、1.18 (3H, *s*, H-28)、1.21~1.73 (*m*)、2.23~2.36 (*m*)。

¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃, ppm) :

6.5 (C-23)、14.4 (C-24)、17.7 (C-25)、17.9 (C-7)、18.4 (C-26)、20.0 (C-27)、22.0 (C-1)、27.9 (C-20)、29.7 (C-17)、30.2 (C-12)、31.5 (C-29)、31.8 (C-28)、32.1 (C-15)、32.5 (C-21)、34.7 (C-30)、35.1 (C-11)、35.3 (C-19)、35.7 (C-16)、37.1 (C-9)、38.0 (C-13)、39.0 (C-22)、39.4 (C-14)、41.0 (C-6)、41.2 (C-2)、41.9 (C-5)、42.5 (C-18)、52.8 (C-8)、57.9 (C-4)、59.2 (C-10)、213.0 (C-3)。

化合物 IV ferulic acid

淡黄色针状(chloroform) ; m.p. 171-174 。

Molecular weight : 194

TLC : R_f = 0.4 (chloroform : *n*-hexane = 9 : 1)

IR ν_{max} (KBr) cm⁻¹ :

3439、2928、2847、1699、1517、1436、1208、1038、809。

EIMS (70 eV) *m/z* (rel. int. %) :

194 [M⁺] (13.8)、179 (15.0)、150 (10.3)、135 (22.7)、133 (33.7)、107 (19.4)、77 (40.1)、51 (100)。

¹H-NMR (200 MHz, acetone-*d*₆, ppm) :

3.92 (3H, *s*)、6.37 (1H, *d*, *J* = 16.0 Hz, H-7、H-8)、6.87 (1H, *d*, *J* = 1.7, 8 Hz)、7.14 (1H, *dd*, *J* = 1.8, 7.8 Hz)、7.13 (1H, *dd*, *J* = 1.8, 7.8 Hz)、7.33 (1H, *d*, *J* = 1.8 Hz)、7.60 (1H, *d*, *J* = 16.0 Hz)。

¹³C-NMR (50 MHz, acetone-*d*₆, ppm) :

55.1 (-OCH₃)、110.1 (C-2)、114.9 (C-5, C-8)、122.7 (C-6)、126.3 (C-1)、144.8 (C-7)、147.6 (C-3)、148.8 (C-4)、167.1 (C-9)。

化合物 V rubiadin 1-methyl ether

黄色結晶(acetone) ; m.p. 272-276 °

Molecular weight : 268

TLC : Rf = 0.5 (*n*-hexane : ethylether = 2 : 1)

EIMS (70 ev) *m/z* (rel. int. %) :

268 [M⁺] (100) 、 253 (42.4) 、 239 (27.6) 、 222 (14.1) 、 194 (8.6) 、 152 (42.2) 、 91 (73.1) 、 77 (30.0) °

IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1} :

3396 、 2925 、 2855 、 1672 、 1652 、 1463 、 1119 、 670 °

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) :

2.14 (3H, *s*) 、 3.77 (3H, *s*, OCH₃) 、 7.50 (1H, *s*) 、 7.84-8.18 (4H, *m*) 、 11.11 (1H, *s*)

¹³C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) :

34.2 (C-7'') 、 37.9 (C-7) 、 40.6 (C-8) 、 46.3 (C-8'') 、 55.6 (OCH₃) 、 71.0 (C-9) 、 110.9 (C-5) 、 111.2 (C-2'') 、 111.4 (C-2) 、 113.8 (C-5'') 、 120.3 (C-6) 、 121.5 (C-6'') 、 129.2 (C-1) 、 130.2 (C-1'') 、 144.2 (C-4'') 、 146.4 (C-4) 、 147.5 (C-3) 、 148.7 (C-3'') 、 178.5 (C-9'') °

化合物 VI *l*-arctigenin

透明針狀(acetone) ; m.p. 107-110 °

Molecular weight : 372

[α]_D : -24.39° (c 0.41, CHCl₃) °

TLC : Rf = 0.4 (*n*-hexane : chloroform = 1 : 5)

EIMS (70 ev) *m/z* (rel. int. %) :

372 [M^+] (0.8)、152 (12.9)、151 (45.2)、137 (100)、122 (10.7)、107 (6.9)、
91 (4.1)、77 (14.3)。

IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1} :

3431、2936、2840、1768、1520、1462、1238、1025、813。

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

2.56 (4H, *m*, H-7, 8, 8'), 2.92 (2H, *m*, H-7'), 3.81 (3H, *s*), 3.85 (3H, *s*),
3.88 (1H, *m*, H-9), 4.12 (1H, *dd*, $J = 6, 10$ Hz, H-9), 5.58 (1H, *s*, OH),
6.84 (1H, *d*, $J = 7.6$ Hz), 6.74 (1H, *d*, $J = 8$ Hz), 6.63 (1H, *s*), 6.58 (1H,
dd, $J = 1.8, 8.2$ Hz)、6.54 (1H, *dd*, $J = 1.8, 8.2$ Hz)、6.46 (1H, *d*, $J = 1.7$
Hz)

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

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

肆、參考文獻

1. 甘偉松編著，藥用植物學，國立中國醫藥研究所，1986, 523 頁。
2. 王燕芳，吳照華，周新月，巴戟天植物化學成分，植物學報，1986, 28(5), 566 頁。
3. 周榮漢，藥用植物學分類，上海科學技術出版社，1986, 343 頁。
4. 宋立人，現代中藥學大辭典，人民衛生出版社，2001, 483 頁。
5. 徐國鈞，中國藥材學，中國醫藥科技出版社，1996, 414 頁。
6. 李錫敏，中國藥典中藥彩色圖集，中國藥典委員會出版，1991, 81 頁。
7. 周友與，巴戟天的化學成分研究，中藥通報，1986, 11(9), 554 頁。
8. 楊燕軍，舒惠一，閔之大，巴戟天與施巴戟的蔥葑化合物，藥學學報，1992, 16(11), 358 頁。
9. 李騫，歐強，淡宜中，巴戟天化學成分研究，中國中藥染誌，1911, 16, 675 頁。
10. Youshikawa, M.; Yamaguchi, S.; Nishisaka, H. et al. *Chem. Pharm. Bull.* 1995, 439(9), 1462-1463.
11. 徐玉武，薛智，巴戟天化學成分研究，中藥通報，1987, 12(10), 613 頁。
12. 崔承彬，楊明，姚志仕，中藥巴戟天抗抑鬱活性成分的研究，中國中藥染誌，1995, 20, 36 頁。
13. 姚仲青，郭青，黃彥和，巴戟天-新的環炳酮類衍生物的分離與結構鑑定，1998, 29(4), 217 頁。
14. 林勵，徐鴻華，王淑英，巴戟天揮發成分的 GC-MS 分析，1992, 9(4), 208 頁。
15. 李騫，巴戟天無機元素的光譜測定和臨床藥效分析，中國中學報，1987, 2(4), 221 頁。

16. 戴善光, 巴戟天及其偽品的鑑別, 廣西中醫藥, 北京 **2003**, 4(8), 323 頁。
17. 鍾小榮, 巴戟天真偽品的鑑別, 福建中醫藥, **2001**, 32(5), 216 頁。
18. Makishima, M.; Kanatani, Y.; Yamamoto-Yamaguchi, Y.; Honma, Y. Enhancement of activity of alpha, 25-dihydroxyvitamin D₃ for growth inhibition and differentiation induction of human myelomonocytic leukemia cells by tretinoin tocoferil, an alpha-tocopherol ester of all-*trans* retinoic acid. *Blood*, **1996**, 87, 3384-3394.
19. 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.* **1999**, 23, 369-372.
20. Berridge, M. V.; Tan, A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl -tetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Aech. Biochem. Biophys.* **1993**, 303, 474-482.
21. Ishiyama, M.; Tominaga, H.; Shiga, M.; Sasamoto, K.; Ohkura, Y.; Ueno, K.; Watanabe, M. Novel cell proliferation and cytotoxicity assays using a tetrazolium salt that produces a soluble formazam dye. *In Vitro Toxicol.* **1995**, 8, 187-190.
22. Lai, J. S.; Liou, H. S.; Huang, K. F. Constituents of the root of *Melanolepis multiglandulosa*, *Chin. Pharm. J.* **1966**, 48, 177-183.
23. Huang, K. F.; Yen, Y. F. Constituents of *Erythrina variegata*. *Chin. Pharm. J.* **1997**, 49, 21-29.
24. Sasaki, S. I. Handbook of Proton-NMR Spectra and Data. Academic Press **1985**, 5, 289-299.

25. Yang, S. C.; Fang, J. M.; Cheng, Y. H. Chemical constituents from the root and aerial parts of *Posa taiwanensis*. *J. Chin. Chem. Soc.* **2000**, *42*, 573-577.
26. Chen, S. C.; Hong, L. L.; Chang, C. Y.; Chen, C. J.; Hsu, M. H.; Huang, Y. C.; Huang, T. H.; Kuo, S. C. Antiproliferative Constituents from *Gynura divaricata* subsp. *Chin. Pharm. J.* **2003**, *55*, 109-119.
27. Hirota, H.; Moriyama, Y.; Takyuki, T. The high resolution mass spectra of shionane and friedelane derivatives. *Bull. Chem. Soc. Japan* **1975**, *48*, 1884-1888.
28. Klass, J.; Tinto, W. F. Friedelane triterpenoids from *Peritassa compta*: complete ^1H and ^{13}C assignments by 2D NMR spectroscopy. *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 1626-1630.
29. Shannon, J. S.; Macdonald, C. G. Studies in mass spectrometry triterpenoids. *Tetrahedron Lett.* **1963**, *4*, 173-179.
30. Betancor, C.; Freire, R. Three triterpenes and other terpenoids from *Catha cassinoides*. *Phytochemistry* **1963**, *19*, 1989-1993.
31. Lai, J. S.; Liou, H. S.; Huang, K. F. Constituents of the roots of *Melanolepis multiglandulosa*. *Chin. Pharm. J.* **1996**, *48*, 177-183.
32. Akihisa, T.; Yamamoto, K.; Tamura, T.; Kimura, Y.; Iida, T.; Nambara, T. Triterpenoid ketones from *Lignania chungii* McClure: arborinone, friedelin and glutinone. *Chin. Pharm. J.* **1992**, *40*, 789-791.
33. Donga, Z. B.; Li, S. P.; Hong, M.; Zhu, Q. Hypothesis of potential active components in *Angelica sinensis* by using biomembrane extraction and high performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biom. Anal.* **2005**, *38*, 664-669.

34. Shikha, S.; Roger, M. S.; Eva, L.; Ian D. W. Analysis of a ginger extract by high-performance liquid chromatography coupled to nuclear magnetic resonance spectroscopy using superheated deuterium oxide as the mobile phase. *J. Chromatogr. A* **2003**, *991*, 143-150.
35. Rong, J.; Zaixin, C.; Philippe, F. C.; Andreas, K. C.; Andreas, B. D.; Konrad, H. E.; Andreas, S F. Synthesis of [¹³C]- and [¹⁴C]-labeled phenolic humus and lignin monomers. *Chemosphere* **2005**, *60*, 1169-1181.
36. 中國醫學科學院藥物研究所, 薄層層離及其在中草藥分析中的應用, 科學出版社, **1979**, 302 頁。
37. 王憲楷, 天然藥物化學, 人民衛生出版社, **1986**, 268 頁。
38. Silverstein, R. M.; bassler, G. C.; Morrill, T. C. Spectrometric identification of Organic Compounds, 15ed. John Wiley and Sons, Inc. **1991**.
39. Koubaa, I.; Damak, M.; McKillop, A.; Simmonds M. Constituents of *Cynara cardunculus*. *Fitoterapia* **1999**, *70*, 212-213.