

製藥與生物技術國家型計畫 全程結案成果報告

計畫編號：NSC 89~91-2323-B-039-001

執行期限：89年9月1日至91年7月30日

主持人：張永勳 中國醫藥學院中國藥學研究所

共同主持人：

計畫參與人員：詹旭川、Susan Matthew、何玉鈴、高國清

一、中文摘要

第一年從旋花科植物亨利氏伊立基藤 (*Erycibe huryi* Prain) 分離出 β -sitosterol (1)、sitosterol-3- β -D-glucose (2)、scopoletin (3)、methyl 3,4-dihydroxy-cinnamate (4) 及 *p*-hydroxyphenethyl *trans*-ferulate (5)。其中化合物 4 及 5 為本植物首次發現之化合物。抗癌活性方面，化合物 4 在 50mM 的濃度下對鼻咽癌細胞(HONE-1)有些微之抑制活性。

第二年以從紫金牛科台灣山桂花(*M. peralaria* (Lour.) var. *formosana* (Mez)) CHCl₃ 及 EA fractions 分離出 CYS-MPC-701 (Afzelin)、CYS-MPC-702 (接糖基之長鏈脂肪酸)、CYS-MPC-703 (lupeol)、CYS-MPE-1 (Stigmasterol)、CYS-MPE-2 (Sitosterol-3- β -D-glucose)、CYS-MPE-3 ((-)-epicatechin)、CYS-MPE-4 (Quercitrin) 及 CYS-MPE-6 (結構未定)。另外從嶺南野菊之乙酸乙酯層，分出四個化合物：Apigenin、Luteolin、Apigenin-7-O- β -glucopyranoid 及 Luteolin -7-O- β -glucopyranoid，其中 Apigenin 與 Luteolin 在 50 mg/ml 的濃度下對 NUGC 及 HONE-1 皆有抑制其生長之作用。

年從為三葉山香圓 (*Turpinia ternata* Nakai) 莖、葉部分離得 13 個化合物：3 β , 19 α dihydroxy urs 12-ene 28-oic acid (1)、2 α , 3 β dihydroxy urs 12-ene 28-oic acid (2)、ursolic acid (3)、sitosterol (4)、

Daucosterol (5)、3, 5 dihydroxy, 7,3',4' trimethoxy flavone (6)、5, 7, 4'-trihydroxy 3'-methoxy flavonol-3-O rhamnosyl glucoside (8)；而化合物 7-13 仍在結構解析中。在化合物 1、3、5、7、8、9、10 之篩選結果中，化合物 1、3、7 在 20 mg/ml 的濃度下對鼻咽癌細胞(HONE-1)分別有 -1%、42%、0% 之抑制活性；化合物 1、3 在 20 mg/ml 的濃度下亦對胃癌細胞(NUGC)分別有 -1%、-1% 之抑制活性。

關鍵詞：亨利氏伊立基藤、台灣山桂花、三葉山香圓

Abstract

In first year, five components, β -sitosterol (1), sitosterol-3- β -D-glucose (2), scopoletin (3), methyl 3,4-dihydroxy-cinnamate (4) and *p*-hydroxyphenethyl *trans*-ferulate (5) were isolated from *Erycibe huryi*. The compound 4 and 5 were first isolated from this plant. Compound 4 showed 42% inhibition on the growth of HONE-1 cancer cell line at 50 μ M.

In second year, CYS-MPC-701 (Afzelin), CYS-MPC-702 (fatty acid with sugar), CYS-MPC-703 (lupeol), CYS-MPE-1 (Stigmasterol), CYS-MPE-2 (Sitosterol-3- β -D-glucose), CYS-MPE-3 ((-)-epicatechin), CYS-MPE-4 (Quercitrin) and CYS-MPE-6 (unknown structure) have been isolated from chloroform and ethyl acetate layer of *M. peralaria* (Lour.) var. *formosana* (Mez). We also isolated three

flavonoides, Apigenin, Luteolin, Apigenin-7-O- β -glucopyranoid and Luteolin-7-O- β -glucopyranoid from *M. perlaria* (Lour.) var. *formosana* (Mez). Among them, Apigenin and Luteolin showed 50% inhibition on the growth of NUGC and HONE-1 cancer cell line at 50 μ M.

Keywords: *Erycibe hnryi* Prain, *M. perlaria* (Lour.) var. *formosana* (Mez), *Turpinia ternata* Nakai

二、緣由與目的

世界衛生組織預測二十一世紀癌症將是人類第一殺手 也是每一個國家最嚴重的挑戰。在國內 癌症是十大死因之首 肝癌、肺癌、直腸癌、三種癌症更是佔一半左右。依據衛生署的調查統計 87 年度台灣地區癌症十大死因中肝癌佔第一位 其中死於肝癌者佔癌症死亡率 20%^[1]。癌症種類多 而國內研究人力有限 要在短時間內獲得成果 必須選擇幾項與本土性息息相關的疾病 且為國外藥廠不列為首要開發目標之治療藥作為開發的物。本計畫為「台灣產植物之抗癌與抗病毒活性成分研究」之子計畫之一 擬將經由國家衛生院進行篩選之有效台灣產植物 在經檢討評估選定後進行分離工作。本計畫選擇在抗癌及抗病毒活性篩選中具有活性之本產藥用植物 曲莖蘭嵌馬藍 (*Strobilanthes filixicaulis* (Hayata) Hsieh et Huang)、台灣山桂花 (*Mesa perlaria* (Lour.) Merr. var. *formosana* (Mez)) 及三葉山香圓 (*Turpinia ternata* Nakai) 進行活性成分之分離與構造鑑定 冀望分離出具有活性之化合

物 以提供合成化學家與藥物化學家作為新藥開發之先導藥物 並發展成具有臨床應用價值的抗癌與抗病毒新藥。

除進行活性成分分離外 並於研究期間選送 100 種樣品送至國家衛生研究院進行活性篩選 第一年擬送篩選神農本草經下品藥物。神農本草經是一部總結了漢代以前應用藥物知識的重要著作 書中收載藥物 365 種 其中植物藥 237 種 動物藥 65 種 礦物藥 43 種 其它 20 種 按性能和功效分為上、中、下三品 上品 120 種；能補養而無毒 可以長服、久服 中品 120 種 能治病補虛，無毒或有小毒 下品 125 種 專攻大病 多為有毒 不可多服和久服^[2]。第一年則以毒性較大之下品作為活性篩選之材料 第二、三年則以其他毒性較大中草藥作為篩選藥物 希望對開發本產藥用植物及中草藥有所助益 也對於新藥之研究更具有發展之空間。

三、結果與討論

本計畫第一年進行曲莖蘭嵌馬藍 (*S. filixicaulis*) 活性成分研究 但經採集及活性試驗後 因活性不如預期 經與本計畫之總主持人吳天賞教授討論後 從「製藥與生物技術國家型計劃」天然與化學合成藥物組研究分組第二次會議中之篩選名單中決定將研究主題更換為亨利氏伊立基藤 (*Erycibe hnryi* Prain)，並分離出 β -sitosterol (1)^[3]、sitosterol-3- β -D-glucose (2)^[4]、scopoletin (3)^[5]、methyl 3,4-dihydroxycinnamate (4)^[6] 及 *p*-hydroxyphenethyl *trans*-ferulate (5)^[7] 等化合物，其中除了 methyl 3,4-dihydroxycinnamate (4) 在 50mM 的濃

度下對 HONE-1 有些微之抑制活性外，其餘化合物並無抑制癌細胞生長的作用。

第二年材料為台灣山桂花，在大量分離活性成分時，只有 butanol fraction 有明顯之抗癌活性，其餘 fraction 並無活性。從 CHCl₃ 及 Ethylacetate fractions 分離的化合物：Afzelin^[8]、Stigmasterol、Sitosterol-3-β-D-glucose^[4]、(-)-epicatechin^[9]、Quercitrin^[10]，亦無抗癌活性。而嶺南野菊分離出之化合物 Apigenin^[11]、Luteolin^[12]、Apigenin-7-O-β-glucopyranoid^[12]及 Luteolin-7-O-β-glucopyranoid^[13]，其中 Apigenin 與 Luteolin 在 50 mg/ml 的濃度下對 NUGC 及 HONE-1 皆有抑制其生長之作用。

第三年研究從三葉山香圓莖葉部分離得 13 個化合物，已鑑定出 3 β, 19α dihydroxy urs 12-ene 28-oic acid (1)^[14]、2α, 3 β dihydroxy urs 12-ene 28-oic acid (2)^[15]、ursolic acid (3)^[16]、sitosterol (4)^[17]、Daucosterol (5)^[12]、3, 5 dihydroxy, 7,3',4' trimethoxyflavone (6)^[18]、5, 7, 4'-trihydroxy 3'-methoxy flavonol-3-O rhamnosyl glucoside (8)^[19]等化合物，其中化合物 3 β, 19α dihydroxy urs 12-ene 28-oic acid (1)、ursolic acid (3)、(7) 在 20 mg/ml 的濃度下對鼻咽癌細胞(HONE-1)分別有-1%、42%、0%之抑制活性；化合物 1、3 在 20 mg/ml 的濃度下亦對胃癌細胞(NUGC)分別有-1%、-1%之抑制活性。

另外 針對神農本草經下品藥進行活性評估 神農本草經上所記載之藥品年代久遠 考證不易 其中多數為動物類或礦物類藥品 因此首先選定台灣市面上易購得且基原確定之五十一種藥材 表一 進行抗癌活性篩選。

神農本草經下品藥中蛤蟆皮、棟實、露蜂房、雄黃則有明顯抑制胃癌細胞生長

活性 表二。()

四、計畫成果自評

共完成五十一種農本草經下品藥之活性篩選 其中以蛤蟆皮、棟實、露蜂房與雄黃對胃癌細胞 NUGC 有明顯之抑制活性。

亨利氏伊立基藤之甲醇抽出物中化合物 methyl 3,4-dihydroxycinnamate (4) 在 50μM 的濃度下對鼻咽癌細胞(HONE-1)有 42%之抑制活性。

嶺南野菊分離出之 Apigenin 與 Luteolin 在 50 mg/ml 的濃度下對 NUGC 及 HONE-1 皆有抑制其生長之作用。

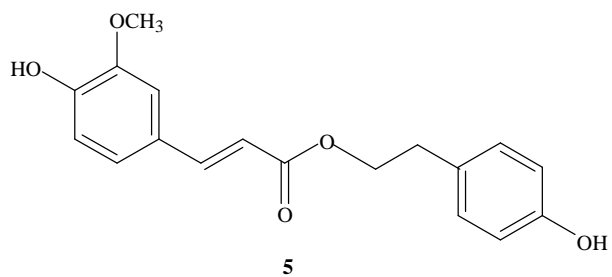
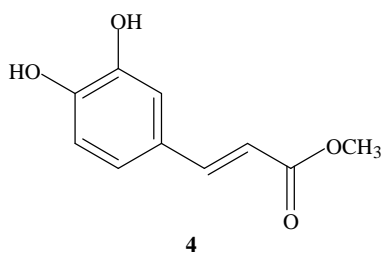
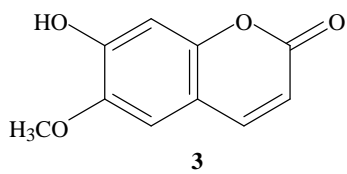
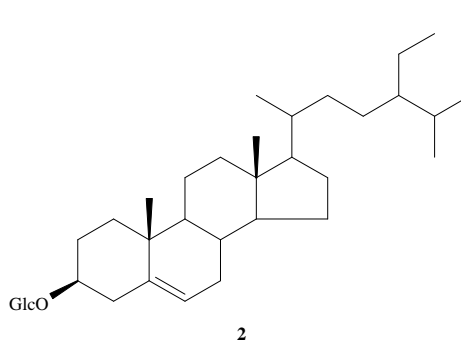
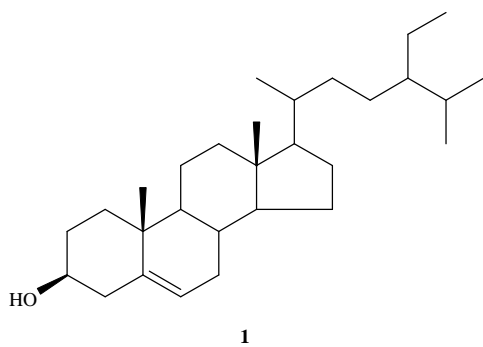
三葉山香圓(*Turpinia ternata* Nakai) 莖、葉部分離分離出之 3 β, 19α dihydroxy urs 12-ene 28-oic acid (1)、ursolic acid (3) 在 20 mg/ml 的濃度下對鼻咽癌細胞(HONE-1)、胃癌細胞(NUGC) 皆有抑制其生長之作用。

五、參考文獻

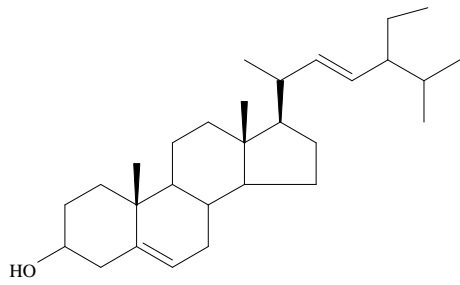
- [1] 行政院衛生署 中華民國台灣地區公共衛生概況 1999。
- [2] 邱年永、張光雄 原色台灣藥用植物圖鑑(5) 南天書局出版 台北 1998 , 208。
- [3] Lai, J. S.; Liou, H. S.; Huang, K. F., Constituents of the roots of *Melanolepis multiglandulosa*, *Chin. Pharm. J.*, 177-183, 48, 1996.
- [4] Huang, K. F.; Yen, Y. F., Constituents of *Erythrina variegata*. *Chin. Pharm. J.*, 21-29, 49, 1997.
- [5] 葉惠珍、范椰新、劉植蔚。金怡順等 丁公藤抗風濕有效成分的研究 中草藥 197-199, 12(5), 1981.
- [6] Tschesche, R.; Diederich, A.; Jha, H. C.; Caffeic acid 4-rutinoside from *Leonurus*

- cardiaca*, *Phytochemistry*, 2783, 19, 1980.
- [7] Nakata, H.; Sashida, Y.; Shimomura, H.; A new phenolic compound from *Heracleum lanatum* MICHX. Var. *nipponicum* HARA II *Chem.Pharm.Bull.*; 4554-4556, 30(12), 1982.
- [8] King, F.E. et al., *J Chem. Soc.*, 1950, 168.
- [9] Erickson, A. J.; Ramsewak, R. S.; Smucker, A. J.; Nair, M. G.; **Nitrification inhibitors from the roots of *Leucaena leucocephala***. *J. Agric. Food Chem.*; 6174-6177, 48 (12), 2000.
- [10] Kuroyanagi, M.; Fukushima, S.; *Chem. Pharm. Bull.*; 1163-1168, 30 (4), 1982.
- [11] Abegaz, B. M.; Ngadjui, B. T.; Dongo, E.; Tamboue, H.; *Phytochemistry*; 49; 4; 1998; 1147-1150.
- [12] Flamini, Guido; Antognoli, Elena; Morelli, Ivano; *Phytochemistry*; 57; 4; 2001; 559 - 564. Two flavonoids and other compounds from the aerial parts of *Centaurea bracteata* from Italy
- [13] Lu, Yinrong; Foo, L. Yeap; *Phytochemistry*; 55; 3; 2000; 263 - 268.
- [14] Cheng, Dong-Liang; Cao, Xiao-Ping; *Phytochemistry*; 31; 4; 1992; 1317-1320.
- [15] Yamagishi, Takashi; Zhang, De-Cheng; Chang, Jer-Jang; McPhail, Donald R.; McPhail, Andrew T.; Lee, Kuo-Hsiung; *Phytochemistry*; 27; 10; 1988; 3213-3216.
- [16] v. Carstenn-Lichterfelde et al.; *Phytochemistry*; 12; 1973; 3002.
- [17] Sheikh, Y.M.; Djerassi, C.; *Tetrahedron*; 30; 1974; 4095-4103.
- [18] Dong, Hui; Gou, Yu-Lin; Cao, Shu-Geng; Chen, Shao-Xing; Sim, Keng-Yeow; et al.; *Phytochemistry*; 50; 5; 1999; 899 - 902.
- [19] Slimestad, Rune; Andersen, Oeyvind M.; Francis, George W.; Marston, Andrew; Hostettmann, Kurt; *Phytochemistry*; 40; 5; 1995; 1537-1542.

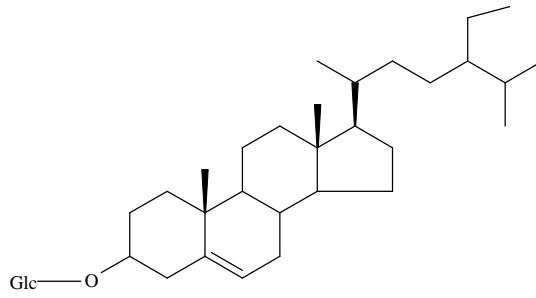
亨利氏伊立基藤(*Erycibe henryi* Prain)分離出之化合物



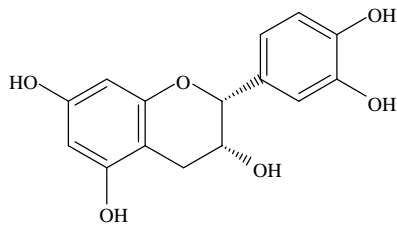
台灣山桂花(*M. perlaria* (Lour.) var. *formosana* (Mez))及嶺南野菊分離之化合物



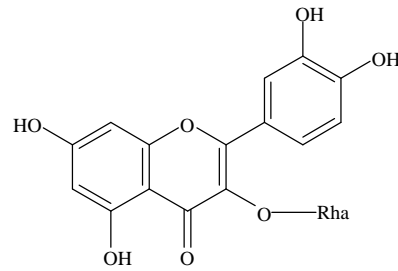
CYS-MPE-1 (Stigmasterol)



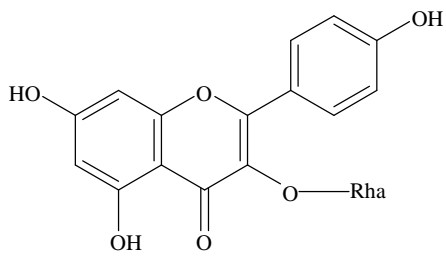
CYS-MPE-2 (Sitosterol-3-β-D-glucoside)



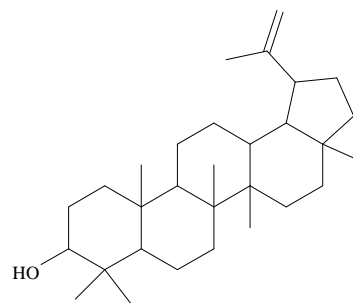
CYS-MPE-3 ((-)-epicatechin)



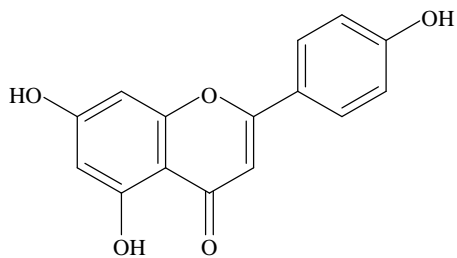
CYS-MPE-4 (Quercitrin)



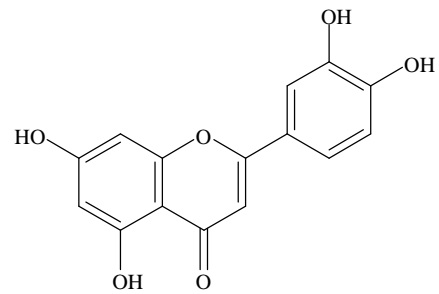
CYS-MPC-701 (Afzelin)



CYS-MPC-703 (Lupeol)

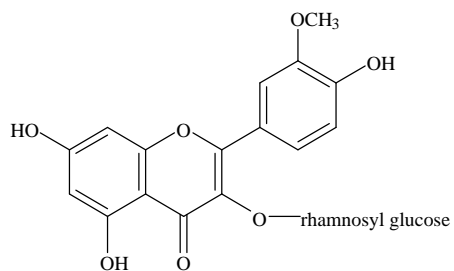
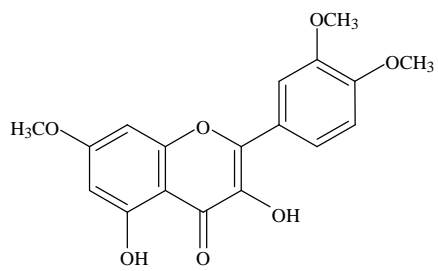
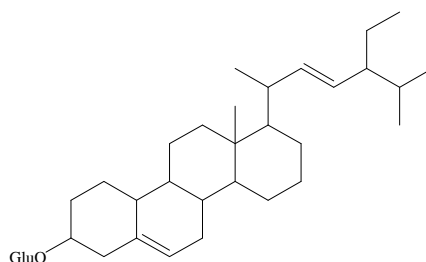
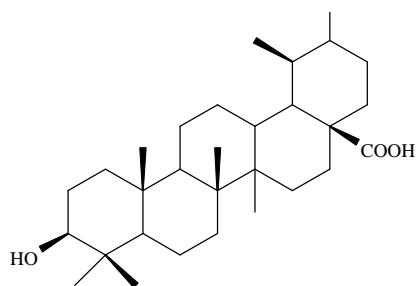
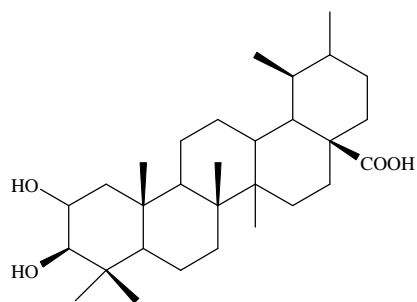
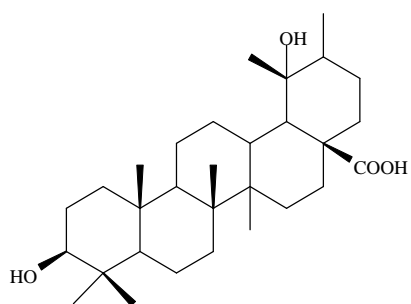


CYS-VP-1 (Apigenin)



CYS-VP-2 (Luteolin)

三葉山香圓 (*Turpinia ternata* Nakai) 分離之化合物



表一、神農本草經下品藥抗癌活性篩選之藥材

編號	藥 品	重量 mg	編號	藥 品	重量 mg
300	鱉 甲	20.70	334	葫 蘆 巴	19.80
301	蜈 蚣	22.00	335	白 頭 翁	21.00
302	朱 砂	15.20	336	女 青	24.60
303	淫 洋 霍	21.30	337	連 翹	22.02
311	刺 蝟 皮	20.40	338	澤 蘭	20.30
312	蛤 蟆 皮	19.50	339	佛 桃 仁	20.11
313	五 加 皮	20.30	340	巴 戟 天	20.00
314	八 角 蓮	20.90	341	杏 仁	23.20
315	地 榆	21.10	342	郁 李 仁	20.80
316	棟 實	19.80	343	蛤 蟆 骨	20.30
317	白 欽	20.93	344	芫 花	25.97
318	款 冬 花	20.00	345	甘 遂	22.20
319	紫 參	21.00	346	大 戟	22.50
320	旋 覆 花	19.90	347	敗 醬	28.94
321	巴 豆	20.00	348	青 箱 子	22.90
322	皂 夾	20.50	349	穿 山 甲	21.20
323	夏 枯 草	21.10	350	半 夏	26.60
324	貫 眾	21.50	351	天 雄	27.00
325	扁 蓄	20.30	352	烏 頭	21.80
326	射 干	21.30	353	防 己	23.10
327	露 蜂 房	21.40	363	水 蛭	20.50
328	芫 花	21.30	367	赤 小 豆	25.06
329	商 陸	21.30	370	雄 黃	20.15
330	蛇 退	21.30	376	鉛 丹	21.74
331	白 及	22.60	380	戎 鹽	20.30
332	牡 丹 皮	21.90	391	龜 甲	21.00
333	蜀 椒	19.10			

表二、神農本草經下品藥活性篩選結果

藥品	濃度	Total	n-Hexane	EtOAc	MeOH
蛤蟆皮	12.5µg/ml	2%	40%	4%	6%
	25µg/ml	2%	23%	3%	4%
	50 µg/ml	2%	16%	3%	3%
五加皮	12.5µg/ml	90%	104%	88%	67%
	25µg/ml	78%	113%	61%	42%
	50 µg/ml	63%	108%	32%	28%
八角蓮	12.5µg/ml	91%	104%	105%	98%
	25µg/ml	57%	117%	97%	14%
	50 µg/ml	0%	109%	56%	0%
棟實	12.5µg/ml	4%	103%	11%	11%
	25µg/ml	4%	116%	5%	6%
	50 µg/ml	3%	107%	3%	3%
款冬花	12.5µg/ml	103%	110%	109%	108%
	25µg/ml	106%	0%	107%	106%
	50 µg/ml	81%	0%	103%	80%
旋覆花	12.5µg/ml	106%	113%	112%	111%
	25µg/ml	89%	115%	97%	98%
	50 µg/ml	38%	31%	37%	63%
露蜂房	12.5µg/ml	100%	101%	40%	103%
	25µg/ml	92%	106%	7%	100%
	50 µg/ml	11%	20%	13%	91%
蛇退	12.5µg/ml	102%	99%	103%	101%
	25µg/ml	109%	77%	104%	110%
	50 µg/ml	96%	23%	70%	119%
葫蘆巴	12.5µg/ml	100%	101%	103%	105%
	25µg/ml	92%	104%	106%	12%
	50 µg/ml	2%	102%	109%	1%
雄黃	12.5µg/ml	4%	103%	98%	27%
	25µg/ml	1%	87%	38%	5%
	50 µg/ml	0%	63%	11%	1%

- 10 out of 91 extracts picked for 2° assay, NUGC most active :
蛤蟆皮、棟實、露風房、雄黃。
- All extract from 馬藍 negative. :

表三、馬藍屬植物抗癌活性篩選結果

編號	植物	T	N	E	M
400	曲莖藍嵌馬藍葉部	33%	*1%	2%	58%
304	長穗馬藍莖部	96%	99%	102%	99%
305	長穗馬藍葉部	97%	98%	102%	98%
306	曲莖藍嵌馬藍根部	96%	96%	100%	97%
307	曲莖藍嵌馬藍莖部	98%	95%	99%	99%
308	曲莖藍嵌馬藍葉部	96%	96%	101%	99%
309	台灣馬藍葉部	97%	97%	100%	98%
310	台灣馬藍根部	96%	94%	96%	96%
354	台灣馬藍莖部	95%	88%	89%	96%

吳天賞教授第一次送樣之 sample

T: total extract; N: n-hexane; E: ethyl acetate, M: Meyhanol

Cell line: NUGC

Sample conc.: 50 µg/mL

表四、曲莖藍嵌馬藍葉部分劃之抗癌活性篩選結果

	Fr.M ¹	Fr.H ²	Fr.B ³	Fr.W ⁴
曲莖藍嵌馬藍葉部	96%	97%	100%	95%

¹ methanol fraction, ² n-hexane fraction, ³ n-butanol fraction, ⁴ water fraction

Cell line: NUGC

Sample conc.: 50 µg/mL

表五、台灣山桂花、山香圓、亨利氏伊立基藤及三葉山香圓之抗癌活性篩選結果

Plant	Cell line	T	N	E	M
台灣山桂花(stem & leaf)	HONE-1	6%	41%	85%	18%
	NUGC	6%	18%	68%	19%
山香圓(stem & leaf)	HONE-1	91%	97%	96%	91%
	NUGC	87%	83%	86%	88%
亨利氏伊立基藤(stem)	HONE-1	87%	100%	98%	99%
	NUGC	97%	104%	103%	102%
三葉山香圓(stem & leaf)	HONE-1	90%	99%	52%	96%
	NUGC	98%	103%	56%	101%

T: total extract; N: n-hexane; E: ethyl acetate, M: Methanol

Sample conc.: 50 µg/mL

表八、亨利氏伊立基藤分離出之化合物 3、4 及 5 抗癌活性測試結果

Compound	NUGC		HONE-1	
	10µM	50µM	10µM	50µM
3	115%	113%	110%	113%

4	109%	99%	98%	42%
5	109%	107%	99%	87%