

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫  成果報告  
 期中進度報告

台灣產民間藥用植物-黃杞、榿藤及血藤之活性成分研究

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC NSC92-2320-B-039-041

執行期間：92年8月1日至93年7月31日

計畫主持人：張永勳

共同主持人：何玉鈴

計畫參與人員：蔡宗翰

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中國醫藥大學 中國藥學研究所

中華民國九十三年十月二十八日

## 一、中文摘要

黃杞 *Engelhardtia roxburghiana* Wallich 為胡桃科之臺灣常見植物；其民間用於治療脾胃濕滯，胸腹脹悶，疝氣腹痛，黃疸病，感冒發熱，另且有報導黃杞葉部總黃酮對小鼠具有抗凝血、降血脂、降血糖和增強免疫力的作用。

本研究進行藥理活性篩選及 DPPH 自由基清除能力之試驗，發現臺灣黃杞樹皮部之甲醇抽出物及各種有機溶媒萃取層中，以正己烷層及氯仿層對 NUGC-3 及 HONE-1 兩種癌細胞具有明顯抑制作用；而在莖部之甲醇抽出物及各種有機溶媒萃取層中，以正己烷層及氯仿層對 NUGC-3 癌細胞具有明顯抑制作用；在 DPPH 自由基清除能力之試驗中，結果發現黃杞樹皮部之甲醇萃取物、氯仿、乙酸乙酯層及正丁醇層具有顯著的抗氧化活性，值得進一步分離追蹤其活性成分。

**關鍵詞：**黃杞、細胞毒殺活性、活性成分

## Abstract

*Engelhardtia roxburghiana* Wallich is a native plant of Taiwan belonging to Juglandaceae family. It is a folk medicine used for promoting qi circulation, to remove dampness, invigorate spleen and promote digestion. It is also used for jaundice, colds and fever. It was reported that the total flavonoids of the leaves of this plant had the actions of anti-coagulation, lipid-lowering, hypoglycemia and enhancing immunity in mice. In this study, we proceeded the preliminary tests and the assay for DPPH free radical scavenging effect. Firstly, our preliminary tests showed that the chloroform and *n*-hexane fractions of the cortex of *Engelhardtia roxburghiana* Wallich exhibited cytotoxic activity against NUGC-3 and HONE-1 cell lines, and the chloroform and *n*-hexane fractions of the stem of *Engelhardtia roxburghiana* Wallich exhibited cytotoxic activity against NUGC-3 cell lines. Secondly, in the assay for DPPH free radical scavenging effect, all fractions showed good DPPH free radical scavenging effect except the *n*-hexane and water fractions of the cortex of *Engelhardtia roxburghiana* Wallich .

**Keywords:** *Engelhardtia roxburghiana*, cytotoxic activity, active constituents

## 二、緣由與目的

黃杞屬(*Engelhardtia*)為一分布廣泛之胡桃科(Juglandaceae)植物，分布於亞洲南部(中國南部、印度)，緬甸、越南、泰國亦有分布，而臺灣產之黃杞屬(*Engelhardtia*)植物依臺灣植物誌(Flora of Taiwan)所載僅有臺灣黃杞(*Engelhardtia roxburghiana* Wallich)一種<sup>[1-2]</sup>。民間剝取其粗幹皮部，切片曬乾使用。主治脾胃濕滯，胸腹脹悶，濕熱泄瀉，疝氣腹痛；葉可清熱，止痛。主治感冒發熱，疝氣腹痛<sup>[3-4]</sup>，樹皮及葉能毒魚<sup>[4-5]</sup>。

根據美國伊利諾大學 Napralert 資料庫在 2002 年以前所做的統計，目前尚無臺灣黃杞英文學名之相關資料。而據文獻報導本科植物具有抑制醛糖還原酶、抗腫瘤、鎮痛消炎、抑菌及生物毒性等作用<sup>[6]</sup>，值得進一步分離追蹤其活性成分。

根據黃杞預試之結果，此植物可針對細胞毒性及抗氧化能力作為活性指標，找出具有活性之成分，希望對開發台灣民間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。

由於黃杞在本屬植物文獻中的資料，在化學成分及藥理活性方面的相關報告均十分缺乏，值得進一步分離追蹤其活性成分。本研究進行藥理活性篩選及 DPPH 自由基清除能力之試驗，發現臺灣黃杞樹皮部之甲醇抽出物及各種有機溶媒萃取層中，以正己烷層及氯仿層對 NUGC-3 及 HONE-1 兩種癌細胞具有明顯抑制作用；而在莖部之甲醇抽出物及各種有機溶媒萃取層中，以正己烷層及氯仿層對 NUGC-3 癌細胞具有明顯抑制作用；在 DPPH 自由基清除能力之試驗中，結果發現黃杞樹皮部之甲醇萃取物、氯仿、乙酸乙酯層及正丁醇層具有顯著的抗氧化活性。故本計畫擬從事分離並追蹤其活性成分，以提高台灣本產藥用植物之利用價值。

因此，本研究擬以臺灣黃杞 *Engelhardtia roxburghiana* Wallich 為材料，以細胞毒性及抗氧化能力當活性指標而引導分離，將其甲醇粗抽物以不同溶媒分別萃取後，分成五層—正己烷層、氯仿層、乙酸乙酯層、正丁醇層、水層，再分別進行對人類胃癌細胞 (NUGC)、人類鼻咽癌細胞(HONE-1)等細胞毒殺活性試驗及 DPPH 自由基清除能力之試驗引導黃杞之成分分離，冀找出具有高度藥理活性之成分，提高台灣本產植物之利用價值，開發台灣藥用植物之資源。

## 三、結果與討論

### 一、MTS 細胞毒殺活性測試<sup>[7-9]</sup>

結果發現臺灣黃杞樹皮部之甲醇抽出物及各種有機溶媒萃取層中，以正己烷層及氯仿層對 NUGC-3 及 HONE-1 兩種癌細胞具有明顯抑制作用；而在莖部之甲醇抽出物及各種有機

溶媒萃取層中，以正己烷層及氯仿層對 NUGC-3 癌細胞具有明顯抑制作用。由此推測臺灣黃杞之細胞毒殺活性成分可能屬於中低極性之物質。而本研究由臺灣黃杞樹皮部之氯仿層分離所得之萘醌類化合物，2-methoxyjuglone，據文獻報導其對於人類肺癌(A549)及大腸癌細胞(HT-29)具有抑制作用<sup>[7-9]</sup>。此部分實驗為委託國家衛生研究院代為進行 MTS 細胞毒殺活性測試

## 二、抗氧化活性實驗<sup>[10-14]</sup>

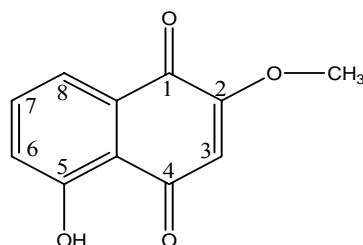
依 Shyu YS (2002)等之方法，以 DPPH 自由基清除能力之試驗，測試臺灣黃杞樹皮部各萃取層，發現臺灣黃杞樹皮部之甲醇粗抽物、正丁醇層、乙酸乙酯層及氯仿層、具有顯著的抗氧化活性。顯示黃杞之化學成分中含有具抗氧化能力之活性成分。因此以抗氧化能力為活性指標，由乙酸乙酯層中得到二個具有抗氧化活性之黃酮類化合物，astilbin, kaempferol 3-*O*-rhamnoside，顯示以活性引導分離之方式相當可行，而其他各萃取層之活性成分仍有待進一步追蹤。

本研究已從臺灣黃杞之乾燥樹皮部位之甲醇粗抽物，經分離純化及結構鑑定後，一共分離出  $\beta$ -sitosterol (H-1), tetracosanoic acid (H-2), betulinic acid (C-1), 2-methoxyjuglone (5-hydroxy-2-methoxy- 1,4-naphthoquinone) (C-2), mixture of betulinic acid and ursolic acid (C-3),  $\beta$ -sitosterol 3-*O*-glucoside (C-4), astilbin (E-1), kaempferol 3-*O*-rhamnoside (E-2)等成分。

綜合上列所述，臺灣黃杞為臺灣之常見民間藥，樹皮有行氣，化濕，健脾，導滯，消食之效。而本研究分離所得之活性成分，若針對固有民間用法，再進一步進行藥理活性確認，將使臺灣黃杞的使用上更具意義，並有助於本土藥用植物的開發。

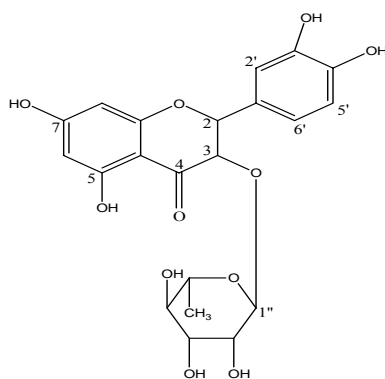
## 三、黃杞樹皮部活性成分之結構鑑定

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



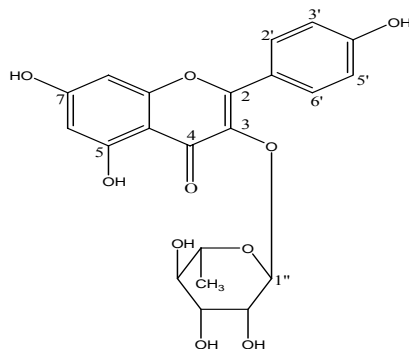
與文獻<sup>[15-17]</sup>比對，確認此化合物之結構為 5-hydroxy-2-methoxy-1,4-naphthoquinone

### 2. E-1: astilbin (dihydroquercetin 3-*O*-rhamnoside)



與文獻<sup>[18-19]</sup>比對，推測此化合物結構應為 dihydroquercetin 3-*O*-rhamnoside。

### 3. E-2: kaempferol 3-*O*-rhamnoside



與文獻<sup>[18-19]</sup>比對，推測此化合物結構應為 kaempferol 3-*O*-rhamnoside。

## 四、計畫成果自評

據文獻記載萘醌類化合物，2-methoxyjuglone 對於人類肺癌(A549)及大腸癌細胞(HT-29)具有抑制作用<sup>[20-21]</sup>。黃酮類化合物 astilbin，具有抗氧化、改善實驗性肝損傷及抑制醛糖還原酶的作用<sup>[22-30]</sup>；kaempferol 3-*O*-rhamnoside<sup>[29-31]</sup>則具有抗氧化的作用。以上皆為活性成分，顯示以活性引導成分分離的實驗方法相當可行，因此可再進行其它更深入的藥理活性篩選，以期發現其它活性成分。

## 五、參考文獻

1. 劉和義、楊遠波、呂勝由、施炳霖：臺灣維管束植物簡誌，第二卷，行政院農業委員會，臺北 2000；p. 19。
2. Editor-in-Chief: Huang TS. Tah Jinn: Flora of Taiwan, Second Edition. Volumn Two. Editorial Committee of Taiwan, 1993; pp. 23-25.

3. 國家中醫藥管理局(中華本草)編委會:中華本草(2),上海科學技術出版社,上海,1999; pp. 371-373。
4. 邱年永、張光雄:原色臺灣藥用植物圖鑑(3),南天書局,臺北 1992; p. 35。
5. 謝文全:臺灣常用藥用植物圖鑑第一冊,行政院衛生署中醫藥委員會,Vol. I,臺北,2002; p. 114。
6. 易醒、謝明勇、蕭小年:胡桃科植物化學及生物活性研究概況,中草藥 2001; 32(6): 559-561。
7. Gieni RS, Li Y, HayGlass KT: Comparison of [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation with MTT-and MTS-based bioassays for human and murine IL-2 and IL-4 analysis. Tetrazolium assays provide markedly enhanced sensitivity. *J Immunological Methods* 187(1): 85-93, 1995.
8. Malich G, Markovic B, Winder C. The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the *in vitro* cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. *Toxicology* 124(3): 179-192, 1997.
9. Barltrop JA et al: 5-(3-carboxymethoxy- phenyl)-2-(4,5-dimethyl-thiazolyl)-3-(4-sulfophenyl) tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of-3-(4,5-dimethyl-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 1: 611, 1991.
10. Shyu YS, Hwang LS: Antioxidant activity of the crude extract of lignan glycosides from unroasted Burma black sesame meal. *Food Research International* 2002; 35: 357-365.
11. Blois MS: Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 1958; 26: 1199-1200.
12. Williams WB, Cuvelier ME, Berset C: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebens-Wiss Technol* 1995; 28 (1): 25-30.
13. Oshiyuki F: Antioxidative polyphenols from walnuts (*Juglans regia* L.) *Phytochemistry* 2003; 63: 795-801.
14. Alessandra B: Antioxidant and free radical scavenging activity of flavonol glycosides from different *Aconitum* species. *Journal of Ethnopharmacology* 2003; 86: 63-67.
15. 蕭崇厚:中藥化學-上海科學技術出版社,上海,1999; p. 192-194.
16. Kim SH: Cytotoxic compounds from the root of *Juglans mandshurica*. *Journal of Natural products* 1998; 61(5): 643-645.

17. Shigeyuki S: Inhibitory effects of plumbagin and juglone on azoxymethane -induced intestinal carcinogenesis in rats. *Cancer Letters* 1998; 127: 177-183.
18. Lu Y: The polyphenol constituents of grape pomace. *Food Chemistry* 1999; 65: 1-8.
19. Agrawal PK: Carbon-13 NMR of flavonoids. *Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants* 1989; p334-335.
20. Kim SH: Cytotoxic compounds from the root of *Juglans mandshurica*. *Journal of Natural products* 1998; 61(5): 643-645.
21. Shigeyuki S: Inhibitory effects of plumbagin and juglone on azoxymethane -induced intestinal carcinogenesis in rats. *Cancer Letters* 1998; 127: 177-183.
22. Yan R, Qiang X: Astilbin selectively facilitates the apoptosis of interleukin-2-dependent phytohemagglutinin-activated jurkat cells. *Pharmacological Research* 2001; 44 (2): 135-139.
23. Qiang X: Astilbin selectively induces dysfunction of liver-infiltrating cells. *European Journal of Pharmacology* 1999; 377(1): 93-100.
24. Chan P, Hsu F: The *in vitro*-inhibitory effect of flavonoid astilbin on 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase on vero cells. *Heart, Lung and Circulation* 2000; 9(3): 114.
25. Ken O: First synthesis of astilbin, biologically active glycosyl flavonoid isolated from Chinese folk medicine. *Tetrahedron Letters* 2000; 41: 5537-5541.
26. 徐強：選擇性抑制活化 T 淋巴細胞的功能-從中藥及其成分中發現的嶄新作用模式，哈爾濱商業大學學報，2001; 17(2): 7-9。
27. 陳琪：黃酮類化合物抗氧化性與其結構的關係，重慶大學學報，2003; 26(11): 48-51。
28. 黃華藝、查錫良：黃酮類化合物抗腫瘤作用研究進展，中國新藥與臨床雜誌，2002; 21(7): 428-432。
29. Hollman PCH: Dietary Flavonoids: Intake, health effects and Bioavailability. *Food and chemical Toxicology* 1999; 37: 937-942.
30. Kelly E, Anthony R: Reviews: current topics: Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2002; 13: 572-584.
31. 陳琪：黃酮類化合物抗氧化性與其結構的關係，重慶大學學報，2003; 26(11): 48-51。