國立台東大學生命科學研究所

碩士論文

指導教授:郭曜豪 教授

椆櫟柿寄生化學成分及其生物 活性之研究

Studies on the Chemical Constituents and Biological Activities of Viscum articulatum

研究生:楊育清 撰

中華民國 九十七年七月

國立台東大學

學位論文考試委員審定書

系所别:生命科學研究所

本班 楊育清 君 所 提 之 論 文 椆櫟柿寄生化學成分與生物活性之研究 業經本委員會通過合於 ☑ 碩士學位論文 條件 4 論文學位考試委員會: 學位考試委員會主席) 厨 那嘴景 (指導教授) 論文學位考試日期: <u>77年 7月14日</u> 國立台東大學

附註:1. 本表一式二份經學位考試委員會簽後,送交系所辦公室及註冊組或進修部存查。 2. 本表為日夜學制通用,請依個人學制分送教務處或進修部辦理。

博碩士論文授權書

本授權書所授權之論文爲本人在 國立台東大學 生命科学系(所)

<u>______租 96 學年度第 三 學期取得 碩</u> 士學位之論文。 論文名稱:<u> 桐科樂 柳寄生化學成分及其生物</u>造性之研究

本人具有著作財產權之論文全文資料;授予下列單位:

	同意	不同意	單位
2	*	- 1 -	國家圖書館
	· 🗋 ·	N	本人畢業學校圖書館

得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或其他各種數位化方式重製後散 布發行或上載網站,藉由網路傳輸,提供讀者基於個人非營利性質之線 上檢索、閱覽、下載或列印。

本論文爲本人向經濟部智慧財產局申請專利(未申請者本條款請不予理會)的附件

之一,申請文號為: ________,請將全文資料延後半年再公開。

公開時程

立即公開	一年後公開	二年後公開	三年後公開	

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發 行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及 學術研發利用均為無償。上述同意與不同意之欄位若未鉤選,本 人同意視同授權。

		2	A A	h				
指導	教授姓名	: 31	· N/a	,35	(親筆	(簽名)		
研究生	生簽名:	福	戽 清		(親筆	正楷)		
學	號:	9500	810		(務必	填寫)		
H	期:	中華民國	97	年 _	7	月	29	日

 本授權書(得自 http://www.lib.nttu.edu.tw/theses/下載)請以黑筆撰寫並影印裝訂於書名頁之次頁。
2.依據 91 學年度第一學期一次教務會議決議:研究生畢業論交「至少需授權學校圖書館數位化,並至遲於 三年後上載網路供各界使用及校內瀏覽。」

謝誌

時光荏苒,於研究所的生涯經歷了兩個寒暑,想當初為了把握僅 有的時間敦促自己緩慢的實驗進度,從台東到台北來回通勤的辛苦日 子,在論文順利完成的此時此刻感到一切都是值得的。

本論文得以順遂的大功告成,首先由衷感謝恩師<u>郭曜豪</u>教授,對 學生的悉心指導與教誨,老師於天然物領域豐碩的專業知識,經常在 學生遭遇問題時給予適時的提點與幫助,更感謝老師提供優越的研究 環境,讓實驗的各種構想得以付諸實行,在此謹致上最誠摯的敬意與 感激。

同時感謝國立東華大學暨國立海洋生物博物館<u>宋秉鈞</u>教授與國立 台東大學<u>廖尉岑</u>教授對此論文的細心審核,並提供寶貴的意見,使本 論文得以更臻完善。

由大學畢業進入研究所,等同於將所學做出實質的體現,有新的 想法該如何表達,甚至是解決問題時的思考邏輯方式,皆是研究所生 涯當中最寶貴的磨練機會,在此我要特別感謝<u>張麗杰</u>博士,為人親切 謙和,在研究方面給予悉心的指導與幫助,並在論文起草過程中,不 厭其煩的提供指正與意見,再次表達感激之意。感謝食品工業發展研 究所<u>吴明德</u>博士,提供藥理活性測試的協助,以及在研究或生活上神 來一筆的建議,著實讓人獲益良多。感謝中國醫藥大學<u>黃慧琪</u>博士, 在我剛接觸天然物研究領域時,給予耐心的教導。感謝國立中國醫藥 的協助與指導。感謝國立中國醫藥研究所<u>董明兆</u>博士、<u>丁怡慧</u>小姐及 國立台灣大學孫姝雲小姐代測質譜。

感謝國立中國醫藥研究所提供良好的硬體設施與實驗儀器,使本 實驗得以順利完成。從大學到碩士班畢業,前後在中醫所待了四個年 頭,承蒙實驗室學長姐及夥伴們的提攜與照顧,才有苦盡甘來的這一 天,特別感謝師母<u>楊麗明</u>老師、經常一起討論並給予建議的<u>肇麟</u>學長、 熱心助人的<u>雅雯(小豆)</u>學姊、很厲害的<u>家慶(小黑)</u>學長、天天一起吃飯 聊天的<u>祐任</u>學長、平易近人的<u>羽</u>函、愛搞笑的<u>雅婷、實力</u>堅強的<u>萍君、</u> 碎碎唸的<u>逸辰、泡芙好好吃的昭榮、龍雲、力川</u>,各位無論在生活或 實驗上所給予的幫助與包容,小弟謹記在心,與你們共事是我的榮幸。 此外,感謝台東大學生科所同窗<u>揆廷、慶將、俊偉、淳信、于鈊、佩</u> 珊、<u>婉瑜</u>,有你們的陪伴,讓我在台東的那一年格外的充實。還要感 謝陪我一路走來的<u>嘉慧</u>,在遭遇困難及挫折時所給予的支持與鼓勵, 讓我有繼續奮戰的勇氣。

最後要感謝我摯愛的父親與母親,從小到大無微不至的關愛與照 顧,才有如今身心健康的我,你們無怨無悔的栽培與付出,才是這本 論文完成的最大動力,僅此獻上最深的感激之意。

椆櫟柿寄生化學成分及其生物活性之研究 楊育清

國立台東大學生命科學研究所

中文摘要

椆櫟柿寄生(Viscum articulatum)為桑寄生科,槲寄生屬植物,其在 傳統中藥應用方面,具有治療出血、胸膜炎、痛風、心臟病、關節炎 及高血壓等發炎疾病的功效。本研究以生物活性為導向進行椆櫟柿寄 生生物活性成分之分離,由乙酸乙酯層分離共得到十二個化合物,經 各種光譜及物理數據分析鑑定其結構,其中包括八個 flavanone 化合 物,分別為 visartiside A (1)、visartiside B (2)、naringenin-7-O-[5-O-transcinnamoyl- β -D-apiosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranoside (3) pinocembrin-7-O- $[\operatorname{cinnamoyl}(1 \rightarrow 5)-\beta-D-\operatorname{apiosyl}(1 \rightarrow 2)]-\beta-D-\operatorname{glucopyranoside}(4)$ pinocembrin-7-O- β -D-glucopyranoside (5) naringenin-7-O- β -D-glucopyranoside (6) \cdot eriodictyol-7-O- β -D-glucopyranoside (7) \cdot homoeriodictyol-7-O-glucopyranoside (8) 以及兩個 1,3-diphenylpropane 化合物 viscolin- $4^{"}$ -O-β-D-glucopyranoside (9) viscolin- $4^{'}$ -O-β-D-glucopyranoside (10) π 一個 benzenoid glycoside 化合物 5-O-trans-cinnamoyl-β-D-apiosyl(1→3)α-D-glucopyranoside (11), 還有一個 triterpenoid 化合物, oleanolic acid (12), 1~3 及 9~11 為新化合物。在清除 DPPH 能力的活性試驗結果 顯示化合物 1、2、7 皆有 90%以上的高清除率,其 ED50 分別為 21.76、 19.81、16.13 µg/mL。抑制 LPS 誘發 RAW 264.7 巨噬細胞產生一氧化 氮的抗發炎活性試驗,結果顯示化合物 1、2、8 在 20 μg/mL 的濃度下, 對一氧化氮產生的抑制率達 70%以上,且由 MTT 實驗結果顯示這些化 合物對 RAW 264.7 巨噬細胞均無明顯的細胞毒殺活性。抑制 HSV-1 病 毒複製之抗病毒活性結果顯示,1、2 在 100 μM 時分別具有 44.04 及 37.92%的抑制率。

關鍵字:椆櫟柿寄生、flavanone、抗發炎、抗氧化、抗病毒



Studies on the chemical constituents and biological activities of Viscum articulatum

Yu-Chin Yang

Viscum articulatum belonging to Loranthaceae family is traditionally used to treat lots of inflammatory disease such as hemorrhage, pleurisy, gout, heart disease, arthritis and hypertension. Using bioassay-directed fractionation from the ethyl acetate layer of EtOH extract of V. articulatum, twelve compounds including eight flavanones, visartiside A (1), visartiside naringenin-7-O-[5-O-trans-cinnamoyl- β -D-apiosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-В (2).(3), pinocembrin-7-*O*-[cinnamoyl($1\rightarrow 5$)- β -D-apiosyl glucopyranoside $(1\rightarrow 2)$]- β -D-glucopyranoside (4), pinocembrin-7-O- β -D-glucopyranoside (5), naringenin-7-O- β -D-glucopyranoside (6), eriodictyol-7-O- β -D-gluco pyranoside (7), homoeriodictyol-7-O-glucopyranoside (8), two 1,3-diphenylpropanes, viscolin-4["]-O- β -D-glucopyranoside (9), viscolin-4["]-O- β -D-glucopyranoside (10) and one benzenoid glycoside, 5-O-transcinnamoyl- β -D-apiosyl($1 \rightarrow 3$)- α -D-glucopyranoside (11), and one triterpenoid, oleanolic acid (12) were yielded, and 1-3, 9-11 were new compounds. Structural elucidation of these isolates were based on spectroscopic analysis, especially, 1D and 2D NMR techniques for the new compounds. Compounds 1, 2 and 7 showed strong antioxidant activity by DPPH radical scavenging with ED_{50} at 21.76, 19.81, 16.13 µg/mL, respectively. In the anti-inflammatory experiment, compounds 1, 2 and 8 exhibited the potent inhibitory (>70% inhibition in 20 μ g/mL) effects on nitric oxide (NO) production by RAW264.7 macrophages in response to lipopolysaccharide (LPS), and they have no cytotoxic activity by MTT assay in RAW264.7 macrophages. Compound **1** and **2** also showed anti-virus activity on HSV-1 replication with 44.04 \cdot 37.92 % inhibitory activity at 100 μ M, respectively.

Keywords : Viscum articulatum, flavonone, anti-inflammatory, antioxidant,

anti-virus.

	24	1
H	刧	K

頁次
中文摘要I
英文摘要III
目錄V
圖、表目錄VII
縮寫表XIII
第一章 緒論1
第一節 研究背景與目的1
第二節 椆櫟柿寄生之簡介3
第三節 抗發炎與抗氧化之簡介6
第四節 槲寄生屬植物之文獻回顧10
第二章 材料與方法
第一節 實驗儀器與藥品25
第二節 椆櫟柿寄生化學成分之萃取與分離
第三章 化合物之結構證明35
第一節 化合物 1 之結構解析
第二節 化合物 2 之結構解析47
第三節 化合物 3 之結構解析56

第四節 化合物 4 之結構解析66
第五節 化合物 5 之結構解析76
第六節 化合物 6 之結構解析81
第七節 化合物 7 之結構解析
第八節 化合物 8 之結構解析
第九節 化合物 9 之結構解析96
第十節 化合物 10 之結構解析105
第十一節 化合物 11 之結構解析113
第十二節 化合物 12 之結構解析121

第	四章 生	物活性試驗	.128
	第一節	清除 DPPH 自由基之抗氧化實驗	.128
	第二節	抗發炎活性實驗	.131
	第三節	抗病毒活性實驗	.137
	第四節	癌細胞毒殺分析實驗	.140

第五章	結論	144
-----	----	-----

第六章	參考文獻	147
-----	------	-----

圖目錄

圖	1-1、 椆櫟柿寄生之植物型態外觀	.4
圖	1-2、巨噬細胞受抗原刺激產生活性氧屬物質之過程	.9
圖	1-3、槲寄生(Viscum)屬植物化合物之化學結構	15
圖	2-1、 椆櫟柿寄生之化學成分萃取與分離流程(一)	31
圖	2-2、椆櫟柿寄生之化學成分萃取與分離流程(二)	32
圖	2-3、椆櫟柿寄生分離出之化合物	33
圖	3-1、Compound 1 之 HMBC、COSY 關聯圖	38
圖	3-2、Compound 1 之 ¹ H NMR 光譜	43
圖	3-3、Compound 1 之 ¹³ C NMR 光譜	43
圖	3-4、Compound 1之 HMQC 光譜	44
圖	3-5、Compound 1之 HMBC 光譜	44
圖	3-6、Compound 1 之 COSY 圖譜	45
圖	3-7、Compound 1 之 DEPT 圖 譜	45
圖	3-8、Compound 1之IR 圖譜	46
圖	3-9、Compound 1之 HRESIMS 圖譜	46
圖	3-10、Compound 2 之 HMBC、COSY 關聯圖	49
圖	3-11、Compound 2 之 ¹ H NMR 光譜	52
圖	3-12、Compound 2之 ¹³ C NMR 光譜	52
圖	3-13、Compound 2 之 HMQC 光譜	53
圖	3-14、Compound 2 之 HMBC 光譜	53

圖 3-15、Compound 2 之 COSY 光譜	54
圖 3-16、Compound 2 之 DEPT 光譜	54
圖 3-17、Compound 2 之 IR 圖 譜	55
圖 3-18、Compound 2 之 HRESIMS 圖 譜	55
圖 3-19、Compound 3 之 HMBC、COSY 關聯圖	58
圖 3-20、Compound $3 1$ H NMR 光譜	62
圖 3-21、Compound 3 之 ¹³ C NMR 光譜	62
圖 3-22、Compound 3 之 HMQC 光譜	63
圖 3-23、Compound 3 之 HMBC 光譜	63
圖 3-24、Compound 3 之 COSY 圖譜	64
圖 3-25、Compound 3 之 DEPT 圖譜	64
圖 3-26、Compound 3之 IR 圖譜	65
圖 3-27、Compound 3 之 HRESIMS 圖 譜	65
圖 3-28、Compound 4 之 HMBC、COSY 關聯圖	68
圖 3-29、Compound 4之 ¹ H NMR 光譜	72
圖 3-30、Compound 4 之 ¹³ C NMR 光譜	72
圖 3-31、Compound 4 之 HMQC 光譜	73
圖 3-32、Compound 4 之 HMBC 光譜	73
圖 3-33、Compound 4 之 COSY 圖 譜	74
圖 3-34、Compound 4 之 DEPT 圖 譜	74
圖 3-35、Compound 4 之 ESIMS 圖 譜	75
圖 3-36、Compound 5 之 1 H NMR 光譜	79

圖 3-37、Compound 5 之 ¹³ C NMR 光譜	
圖 3-38、Compound 5 之 ESIMS 圖譜80	
圖 3-39、Compound 6 之 ¹ H NMR 光譜	
圖 3-40、Compound 6 之 ¹³ C NMR 光譜	
圖 3-41、Compound 6 之 ESIMS 圖譜85	
圖 3-42、Compound 7 之 ¹ H NMR 光譜	
圖 3-43、Compound 7 之 ¹³ C NMR 光譜	
圖 3-44、Compound 7 之 ESIMS 圖譜90	
圖 3-45、Compound 8之 ¹ H NMR 光譜94	
圖 3-46、Compound 8之 ¹³ C NMR 光譜	
圖 3-47、Compound 8之 ESIMS 圖譜95	
圖 3-48、Compound 9之 HMBC、COSY 關聯圖	
圖 3-49、Compound 9之 H NMR 光譜	
圖 3-50、Compound 9之 ¹³ C NMR 光譜101	
圖 3-51、Compound 9之 HMQC 光譜102	
圖 3-52、Compound 9 之 HMBC 光譜102	
圖 3-53、Compound 9 之 COSY 圖譜103	
圖 3-54、Compound 9 之 DEPT 圖譜103	
圖 3-55、Compound 9之 IR 圖譜104	
圖 3-56、Compound 9 之 HRESIMS 圖譜104	
圖 3-57、Compound 10 之 HMBC、COSY 關聯圖106	
圖 3-58、Compound 10 之 ¹ H NMR 光譜109	

圖 3-59、Compound 10 之 ¹³ C NMR 光譜109	
圖 3-60、Compound 10 之 HMQC 光譜110	
圖 3-61、Compound 10 之 HMBC 光譜110	
圖 3-62、Compound 10 之 COSY 圖譜111	
圖 3-63、Compound 10 之 DEPT 圖譜111	
圖 3-64、Compound 10之IR 圖譜112	
圖 3-65、Compound 10 之 HRESIMS 圖譜112	
圖 3-66、Compound 11 之 HMBC、COSY 關聯圖114	
圖 3-67、Compound 11 之 ¹ H NMR 光譜117	
圖 3-68、Compound 11 之 ¹³ C NMR 光譜117	
圖 3-69、Compound 11 之 HMQC 光譜118	
圖 3-70、Compound 11 之 HMBC 光譜118	
圖 3-71、Compound 11 之 COSY 圖譜	
圖 3-72、Compound 11 之 DEPT 圖譜119	
圖 3-73、Compound 11 之 IR 圖 譜120	
圖 3-74、Compound 11 之 HRESIMS 圖譜120	
圖 3-75、Compound 12 之 ¹ H NMR 光譜124	
圖 3-76、Compound 12 之 ¹³ C NMR 光譜124	
圖 3-77、Compound 12 之 HMQC 圖譜125	
圖 3-78、Compound 12 之 HMBC 圖譜125	
圖 3-79、Compound 12 之 COSY 圖 譜126	
圖 3-80、Compound 12 之 DEPT 圖譜126	

圖	3-81、Compound 12 之 ESIMS 圖 譜	127
圖	4-1、1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl,DPPH 之化學結構式	128
圖	4-2、Quercetin之化學結構	134
圖	4-3、化合物1~8及12抗發炎及細胞存活率實驗結果	.135
圖	4-4、化合物 9、10 抗發炎及細胞存活率實驗結果	.136



表目錄

表1、槲寄生(Viscum)屬植物之化學成分文獻回	11
表 3-1、化合物 1 之 ¹ H、 ¹³ C 光譜數據整理4	41
表 3-2、化合物 2 之 ¹ H、 ¹³ C 光譜數據整理5	50
表 3-3、化合物 3 之 ¹ H、 ¹³ C 光譜數據整理	50
表 3-4、化合物 4 之 ¹ H、 ¹³ C 光譜數據整理7	70
表 3-5、化合物 5 之 ¹ H、 ¹³ C 光譜數據整理7	78
表 3-6、化合物 6 之 ¹ H、 ¹³ C 光譜數據整理	33
表 3-7、化合物 7 之 ¹ H、 ¹³ C 光譜數據整理	38
表 3-8、化合物 8 之 ¹ H、 ¹³ C 光譜數據整理) 3
表 3-9、化合物 9 之 ¹ H、 ¹³ C 光譜數據整理10	00
表 3-10、化合物 10 之 ¹ H、 ¹³ C 光譜數據整理10	08
表 3-11、化合物 11 之 ¹ H、 ¹³ C 光譜數據整理1	.16
表 3-12、化合物 12 之 ¹ H、 ¹³ C 光譜數據整理1	23
表 4-1:清除自由基之抗氧化實驗結果1	.30
表 4-2: 化合物 1、2、7、9、10 與 α-tocopherol 之 ED ₅₀ 比較表1	.30
表 4-3:抗發炎及細胞存活率實驗結果1	.34
表 4-4: 粗萃取物抑制 HSV-1 複製之抗病毒實驗結果1	.39
表 4-5:純化合物抑制 HSV-1 複製之抗病毒實驗結果1	.39
表 4-6: 細胞毒殺實驗結果1	.43
附錄:New Compounds 之UV光譜1	57

縮寫表

δ	Chemical shift (ppm)
COSY	Correlated spectroscopy
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ESI-MS	Electrospray ionization-mass spectrometry
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	Heteronuclear multiple quantum coherence
HPLC	High performance liquid chromatography
Hz	Hertz
IR	Infrared
UV	Ultraviolet
NMR	Nuclear magnetic resonance
MS	Mass spectrum
LPS	Lipopolysaccharide
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl
HSV-1 🧲	Herpes simplex virus type 1
MTT	3-4,5-Dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium
	bromide
PBS	Phosphate-buffered saline

第一章、緒論

第一節 研究背景與目的

隨著醫學科技高度發展,人類平均壽命大幅提高,伴隨年齡增長 而來的老化問題日益嚴重,如惡性腫瘤、心血管疾病、高血壓、糖尿 病等慢性疾病,逐漸為世人所重視;但慢性疾病發生時間較長且成因 複雜,目前醫學治療尚未足以達到「治癒」的能力,主要是針對各種 症狀予以舒緩,藉以延長生命及降低疾病所造成的傷害。因此,在探 討造成這些疾病成因的同時,積極尋找對各種慢性疾病更具療效的藥 物實為當務之急。

隨著社會發展,醫療及環保意識的抬頭,大眾越來越關注化學藥 物給自身健康及環境帶來的負面影響,因此近年來由動、植物及微生 物萃取二次代謝物進行疾病治療、抗蟲害、抗菌等天然藥物研究,受 到各界矚目。1960年代,科學界首度由太平洋紫杉(Taxus brevifolia)樹 皮中分離出paclitaxel (Taxol)¹,並發展為現今主要的卵巢癌、乳癌治療 藥物,並帶來龐大商機,即為天然藥物研究相當成功的先例。此外, 天然藥物在應用方面已有上千年的歷史,記載於各種醫藥古籍與現代 報導的藥用植物及其醫療用途,提供研究學者有力的參考價值及研究 方向,配合現代化的研究報告以及不斷進步的生物活性篩選機制與化 學成分分離技術,由天然物中尋找具有開發價值的藥物以治療疾病, 已逐漸成為目前新藥開發的趨勢之一。

1

桑寄生科槲寄生屬植物於傳統中國醫療的應用,主要治療關節 炎、高血壓、心臟病等發炎相關疾病²。近年來,以槲寄生屬植物進行 抗發炎及抗氧化之研究報告屢見不鮮;檞寄生(Viscum coloratum)分離 純化得到的diphenylpropanoid化合物viscolin,在fMLP誘導人類嗜中性 白血球釋放超氧陰離子的發炎模式中,展現優越的抑制活性²,進一步 的研究發現,其藥理作用機轉為透過PKA/cAMP-dependent pathway改 變細胞內鈣離子濃度,而抑制超氧陰離子的釋放,達到抗發炎的效果³。 檞寄生(Viscum coloratum)亦分離出darylheptanoid化合物mistletonone及 一些flavanone glycoside化合物,具有清除自由基的抗氧化能力^{4.5}。除了 抗發炎及抗氧化活性之外,槲寄生(Viscum album)所分離出的的槲寄生 凝集素(mistletoe lectin)可誘發HL-60和U937白血病細胞株的細胞凋亡 (apoptosis)^{6.7}。

本實驗室透過清除 DPPH 自由基的活性篩選後發現, 椆櫟柿寄生 (Viscum articulatum)具有良好的抗氧化能力,且於文獻中記載,其生物 活性成份具有抑制嗜中性白血球產生超氧陰離子的抗發炎活性⁸,因此 本實驗將以椆櫟柿寄生為題材,透過生物活性導向的分離萃取方式, 以核磁共振(NMR)及其他光譜解析鑑定其化合物之結構,並進行抗發 炎、抗氧化及其他生物活性之探討,期許能發現椆櫟柿寄生所含有的 生物活性成分,甚至新的化合物。

2

第二節 椆櫟柿寄生之簡介

· 桐櫟柿寄生(Viscum articulatum),別名有:風香寄生、蝦蚶草、百 子痰梗、楓寄生、赤柯寄生(台灣)、扁枝寄生(西藏)、柿寄生(雲 南)、螃蟹夾、栗寄生(四川)和扁枝槲寄生等,為半寄生性灌木,利 用特化的根深入寄主的組織中,藉以吸取養分,但仍具有退化的鱗片 葉可行光合作用⁸。

其分類地位屬於9

植物界 (Plantae)

木蘭植物門 (Magnoliophyta)

木蘭綱 (Magnoliopsida)

檀香目(Santalales)

桑寄生科 (Loranthaceae)

槲寄生屬 (Viscum)

椆櫟柿寄生 V. articulatum

【分佈】9

· 椆櫟柿寄生主要分布於東南亞的中國南部及西部、菲律賓、台灣、 澳洲等。本種廣泛分布於全島,從低海拔至高海拔均有。通常寄生於: 楓香、鳥心石、香楠、大葉楠、槲樹、栓皮櫟、青剛櫟、森式櫟、合 歡和紅皮等。 【型態】¹⁰

寄生性小灌木。高 30~60 cm。莖基部圓柱形, 灰褐色, 具 2 稜, 常 2~3 叉狀分枝, 小枝扁平, 綠色, 枝節呈矩圓狀倒披針形或扁條形, 上 寬下狹, 兩端稍縮小, 兩面均具多條縱紋。葉退化成鱗片狀。花單生, 雌雄同株, 著生每節頂端之節部, 每簇 3 朵, 中間為雌花, 兩側為雄 花, 基部具 2 枚合生小苞片。雄花小, 花被 4 片, 雄蕊 4 枚, 無花絲, 花葯多室, 著生花被上。雌花花被 4 片, 被片三角形。子房下位, 花 桂短, 圓錐形。漿果近卵形或橢圓形, 長 6~8 mm, 徑 4~5 mm, 熟時 黃色, 苞片宿存。花期 4~5 月。果期 6~8 月。



圖 1-1、 椆櫟柿寄生之植物型態外觀

【效用】¹¹

全草有祛風去濕,活血舒筋,祛痰鎮咳之效。治腰肢酸痛,關節 疼痛,風濕骨痛,赤白痢疾,產後血氣痛,崩漏帶下,胎動,乳少, 咳嗽多痰,小兒驚風,高血壓,癩風爛瘡,癱瘓和疥癬等。

【方例】¹¹

(1) 治產後血氣痛:螃蟹夾,醪槽炖服。(四川)

- (2)治婦人白帶:螃蟹夾、百節藕、天冬、蘭草根、白芨煎水。炖豬 心肺服。(四川)
- (3) 治小兒牙疳: 扁枝槲寄生全株研末吹入患處。(雲南)

(4)治牛皮癣:扁枝槲寄生研末,用雞蛋油調均擦患處。(雲南)

【化學成分與藥理活性】8,11,12

椆櫟柿寄生全草所含的主要成分包括: 齊墩果酸(oleanolic acid)、 齊墩果酸酯、白樺脂酸(betulinic acid)、白樺脂醇(betulin)等三萜類 (terpenoids)化合物,以及pinocembrin、naringenin、eriodictyol等類 黃酮(flavanoids)化合物,還有苯類(benzenoids)化合物及肌醇(inositol) 等。其中,齊墩果酸(Oleanolic acid)具有抗發炎活性,可抑制fMLP (formyl-L-methionyl-L- leucyl-L-phenyl-alanine)所誘導的人類嗜中性 白血球產生超氧陰離子。

第三節 抗發炎與抗氧化之簡介

一、巨噬細胞及其功能

當身體受到外來抗原的刺激會活化巨噬細胞(macrophage)進行 吞噬作用,並產生一氧化氮(nitric oxide, NO)、超氧陰離子(superoxide anion)、過氧化氫等自由基,又稱為活性氧屬物質(Reactive Oxygen Species, ROS)¹³(圖1-2),可直接對入侵之微生物進行毒殺作用¹⁴, 同時受刺激之巨噬細胞會產生前列腺素(prostaglandins)、白三烯素 (leukotriene)與血小板活性因子(platelet activating factor, PAF)等脂 質發炎性傳遞物質,皆是經由酵素路徑分解細胞膜磷脂質而由巨噬細 胞快速產生。其作用都是巨噬細胞對病原體發生反應後由巨噬細胞所 合成及分泌之細胞激素與趨化激素所引發¹⁵。但因為先天性免疫反應 不具專一性,在攻擊外來抗原的同時也會對自身細胞造成損害,攻擊 脂質、蛋白質、醣類以及 DNA 等分子³。

二、發炎反應之徵狀

發炎反應在感染部位會有疼痛、發紅、發熱及腫脹等特徵產生, 在局部血管會反映出三種變化。第一,增加血管的直徑,導致局部血 流增加,因此會發熱與發紅以及降低血流速度,血壓降低。第二種變 化是血管內皮細胞(endothelial cells)被活化而表現出黏附分子以促進 循環中白血球的附著。血流速度降低加上黏附分子的誘發可讓白血球 附著在內皮細胞並遷移到受傷組織,此種過程稱為溢血 (extravasation)。這些改變都是由活化的巨噬細胞所產生的細胞激素引發。發炎反應一但發生,最先到達感染部位的細胞通常都是嗜中性白血球。其次是單核球,它有別於組織中的的巨噬細胞。於發炎的後期, 其他白血球如嗜酸性白血球(eosinophil)與淋巴細胞也會進入感染部 位。第三種主要的變化是局部血管的通透性增加,這是因為血管壁的 內皮細胞分離,導致液體與蛋白質由血管流出,聚積在局部組織,造 成水腫(edema),以及疼痛¹⁵。

三、一氧化氮於發炎反應中所扮演的角色

於哺乳類動物中,L-arginine 可經由 nitric oxide synthase (NOS)催 化生成 L-citrulline 及 NO¹⁶。一氧化氮(NO)為自由基的一種,且半衰期 短¹⁷,分子量小 (30 Da),因此可作為生化訊息之傳遞物質,已知可調 控多種生理機能。

一氧化氮身為二級訊息傳遞者,可促進血管擴張導致血管壁間隙 擴大,提高免疫細胞進入受損傷組織的速度¹⁶。但遭受蜜蜂螫咬後患 部紅腫脹痛,即為蜜蜂蜂毒—毒蛋白所誘發的發炎反應;若被多隻蜜 蜂螫咬會導致嚴重發炎反應,血液內一氧化氮含量提高使血管過度擴 張,免疫反應失控甚而引發過敏性休克導致死亡,目前治療藥物僅有 腎上腺素效果較佳。近年研究發現白藜蘆醇(trans-3,4',5-trihydroxystibene, resveratrol)具有高度抗氧化及抗發炎能力¹⁸,而其保護 血管和抗發炎之活性,分別與抗氧化的能力有關¹⁹。

7

四、抗氧化藥物之發展

近年來,醫學界研究發現移除自由基之抗氧化能力可使細胞汰換 速率降低,延長細胞存活時間,有效的延緩老化現象,進而提升自體 免疫能力以預防或治療惡性腫瘤等慢性疾病的發生。因此人們對於所 謂的「抗氧化物質」產生極大的興趣和盼望,積極尋找類似維生素 C、 E、β-葫蘿蔔素、超氧歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)等抗氧化物 質。而已知的天然抗氧化劑,如:類黃酮(flavonoids)、類胡蘿蔔素 (carotenoids)、生物鹼(alkaloids)、抗壞血酸(ascorbic acid)、維 生素、酚類衍生物(phenolic derivatives)、單寧類化合物(tannin)等, 也都具有抗氧化的能力²⁰。目前,常被使用的天然抗氧化劑如生育醇 (α-tocopherol)、丁羥甲醚(butylated hydroxyanisole, BHA)與丁羥 甲苯(butylated hydroxytoluene, BHT)等,不過生育醇價格昂貴,且抗 氧化性較合成之抗氧化劑 BHA 與 BHT 差,但合成之抗氧化劑又具安 全上之問題,如肝臟損害與致癌性²¹,因此研發價格低廉且效果顯著 的天然抗氧化劑為科學界共同努力的目標。



圖 1-2、巨噬細胞受抗原刺激產生活性氧屬物質(ROS)之過程¹³。

第四節 槲寄生屬植物之化學成分文獻回顧

本實驗將探討椆櫟柿寄生之化學成分及其生物活性,為了瞭解槲 寄生屬(viscum)植物所分離出的化合物類型及結構,因此將其文獻 報導蒐集整理如表1所示,以作為往後結構解析及生物活性試驗之參 考。本屬植物已知的化合物,主要為:Aromatics、Amino acids、 Catechines、Chromones、Flavonoids、Steroids、Triterpenoids等不同類 型的骨架。

表	1	:	槲寄生	_(Viscum)屬	植物之	化學	成分	文獻回顧
---	---	---	-----	------------	-----	----	----	------

Compound 化合物名稱	Source 基源
Aromatics	
$(3,5-Dihydroxy-phenyl)-\beta-D-glucopyranoside (1)$	V. rotundifolium ²²
4-β-D-Glucopyranosyloxy-3-hydroxy-benzoic acid (2)	V. articulatum ⁸
4-Hydroxy-benzaldehyde (3)	V. articulatum ⁸
Vanillin (4)	V. articulatum ⁸
Methylparaben (5)	V. articulatum ⁸
Acetovanillone (6)	<i>V. coloratum</i> ²
Methyl cinnamate (7)	V. articulatum ⁸
Syringaldehyde (8)	<i>V. coloratum</i> ²
4-Hydroxy-benzoic acid (9)	V. articulatum ⁸
Ferulic acid (10)	<i>V. coloratum</i> ²
Protocatechuic acid (11)	V. articulatum ⁸
<i>p</i> -Coumaric acid (12)	V. coloratum ²
Phenaethylalkohol (13)	V. articulatum ⁸
3-[3-(3,4-Dihydroxy-phenyl)-acryloyloxy]-1,4,5-trihydroxy	V. album L. ²³
-cyclohexanecarboxylic acid (14)	
Gallic acid (15)	V. album L. ²³
Caffeic acid (16)	<i>V. coloratum</i> ²
O ⁴ -Cinnamoyl-chinasaeure (17)	V. articulatum ⁸
Coniferin 2'- <i>O</i> -β-D-apiofuranoside (18)	V. album L. ²⁴
Syringin (19)	V. album L . ²⁵
Methyl 3-O-feruloylquinate (20)	<i>V. coloratum</i> ²
Hirsutanone (21)	V. cruciatum ²⁶
Syringin (22)	V. ainiformosanae ²⁷
2',3',4',3"-Tetramethoxy-1,3-diphenylpropane 5',4"-di-O-	V. angulatum ²⁸
β -D-glucopyranoside (23)	
Viscolin (24)	<i>V. coloratum</i> ²
Mistletonone (25)	V. coloratum ⁴
Amino acids	
Thymine (26)	<i>V. coloratum</i> ²
Glycine (27)	V. album var. mali L^{29}
Alanine (28)	V. album var. mali L. ²⁹
Leucine (29)	V. album var. mali L. ²⁹

Compound 化合物名稱	Source 基源
Methionine (30)	V. album var. mali L. ²⁹
Aspartic acid (31)	V. album var. mali L. ²⁹
Threonine (32)	V. album var. mali L. ²⁹
Lysine (33)	V. album var. mali L. ²⁹
Serine (34)	V. album var. mali L. ²⁹
Isoleucin (35)	V. album var. mali L. ²⁹
Glutamic acid (36)	V. album var. mali L. ²⁹
Cysteic acid (37)	V. album var. mali L. ²⁹
L-Phenylalanine (38)	V. album ³⁰
Catechins	
(2 <i>R</i>)-2r-(3,4-Dihydroxy-phenyl)-chrome-3t,5,7-triol (39)	V. rotundifolium ²²
5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavan-5- <i>O</i> -β-D-Xyloside(40)	V. tuberculatum ³¹
5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavan-5-O-(2"-p-hydroxy	V. tuberculatum ³¹
benzoyl)-β-D-Xyloside (41)	
5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavan-5-O-(2"caffeoyl)-β-D-xylo-	V. tuberculatum ³¹
side (42)	
Chromones	
5,7-Dihydroxy-chromen-4-one (43)	V. coloratum ²
5-Hydroxychromone-7- <i>O</i> -glucoside (44)	V. coloratum ²
Flavonoids	
(2S)-Naringenin-7-O-glucoside (45)	V. coloratum ⁵
(2 <i>S</i>)-Pinocembrin (46)	V. coloratum ²
(2 <i>S</i>)-Naringenin (47)	V. coloratum ²
(2 <i>S</i>)-Eriodictyol (48)	V. coloratum ²
Homoeriodictyol (49)	V. articulatum ⁸
2'-Hydroxy-4',6'-dimethoxychalcone-4-O-	V. album L. ²⁵
glucosdie (50)	
Rhamnazin-3,4'-di-O-glucoside (51)	V. album L. ³²
(2R)-5,7-Dimethoxyflavanone-4'- <i>O</i> -glucoside (52)	V. album L. ²⁵
2'-Hydroxy-3,4',6'-trimethoxychalcone-4-O-	V. album L. ²⁵
glucoside(53)	
(2S)-Homoeriodictyol-7- <i>O</i> -glucoside (54)	V. coloratum ³³
(2S)-3',5,7-Trimethoxyflavanone-4'-O-glucoside(55)	V. album L. ²⁵

表 1-1: 槲寄生(Viscum)屬植物之化學成分文獻回顧(續)

表 1-1: 槲寄生(Viscum)屬植物之化學成分文獻回顧(續)

Compound 化合物名稱	Source 基源
2'-Hydroxy-4',6'-dimethoxychalcone-4- O -[apiosyl(1 \rightarrow 2)]	V. album L. ²⁵
glucoside (56)	
Isorhamnetin-3- O -[apiosyl(1 \rightarrow 6)] glucosyl-7- O - rhamno-	V. album L. ²⁴
side (57)	
Eriodictyol-7- <i>O</i> -β-D-glucopyranoside (58)	V. articulatum ⁸
(2S)-5-Hydroxy-7,3'-dimethoxyflavanone-4'- <i>O</i> -β-[apiosyl	V. ainiformosanae ²⁷
$(1\rightarrow 2)$] glucoside (59)	
Homoflavoyadorinin B (60)	V. ainiformosanae ²⁷
(2S)-Pinocembrin-7- <i>O</i> -glucoside (61)	V. articulatum ⁸
Pinocembrin-7- <i>O</i> -[apiosyl(1 \rightarrow 5) apiosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D	V. angulatum ²⁸
-glucopyranoside (62)	
Rhamnocitrin 3- <i>O</i> -apiosyl(1 \rightarrow 5)apiosyl(1 \rightarrow 2)-[α -L-	V. angulatum ²⁸
rhamnopyranosyl($1 \rightarrow 6$)]- β -D-glucopyranoside (63)	
(2S)-Pinocembrin-7- O -[apiosyl(1 \rightarrow 2)]-glucoside (64)	V. articulatum ⁸
(2S)-Pinocembrin 7- <i>O</i> -[cinnamoyl(1 \rightarrow 5)- β -D-apiosyl	V. articulatum ⁸
$(1\rightarrow 2)$]- β -D-glucoside (65)	
(2S)-Homoeriodictyol 7,4'-di- O - β -D-glucopyranoside (66)	V. coloratum ⁵
(2R)-Eriodictyol 7,4'-di- <i>O</i> -β-D-glucopyranoside (67)	V. coloratum ⁵
(2S)-7,4'-Dihydroxy-5,3'-dimethoxyflavanone (68)	V. coloratum ²
(2S)-Homoeriodictyol-7- O -[apiosyl(1 \rightarrow 2)]-glucoside (69)	V. coloratum ²
Steroid	
β -Sitostenone (70)	V. coloratum ²
Triterpenoids	
α-Amyrin (71)	V. articulatum ³⁴
3β-Acetoxy-urs-12-ene (72)	V. coloratum ²
Lupeol (73)	V. coloratum ²
Betulin (74)	V. articulatum ³⁴
3β -Acetoxy-olean-12-ene (75)	V. articulatum ⁸
3β-Acetoxy-lup-20(29)-ene (76)	V. articulatum ⁸
Oleanolic acid (77)	V. articulatum ⁸
Betulinic acid (78)	V. articulatum ³⁴
Betulonic acid (79)	V. coloratum ²
Ceryloleanolat (80)	V. articulatum ³⁵

Compound 化合物名稱	Source 基源
Others	
Uracile (81)	V. coloratum ²
Lactic acid (82)	V. album L. ³⁶
Inositol (83)	V. articulatum ³⁵
2,6-Dimethoxy- <i>p</i> -benzoquinone (84)	V. coloratum ²
(+)-epi-Quercitol (85)	V. articulatum ⁸
1D-1-O-Methyl-muco-inostol (86)	V. album L. ³⁷
Choline hydroxide(87)	V. album L. ³⁸
1D-1- <i>O</i> -Methyl-muco-inositol (88)	V. album L. ³⁹
Viscumitol (89)	V. album L. ³⁹
2,6-Dimethylocta-2,7-diene-1,6-diol 6- <i>O</i> -[6'- <i>O</i> -β-D	$V. album^{40}$
-apiofuranosyl]-β-D-glucopyranoside (90)	

表 1-1: 槲寄生(Viscum)屬植物之化學成分文獻回顧(續)

Aromatics



圖 1-3、槲寄生(Viscum)屬植物化合物之化學結構









圖 1-3、槲寄生(Viscum)屬植物化合物之化學結構(續)



圖 1-3、槲寄生(Viscum)屬植物化合物之化學結構(續)



圖 1-3、槲寄生(Viscum)屬植物化合物之化學結構(續)
Chromones







圖 1-3、槲寄生(Viscum)屬植物化合物之化學結構(續)



圖 1-3、槲寄生(Viscum)屬植物化合物之化學結構(續)



圖 1-3、槲寄生(Viscum)屬植物化合物之化學結構(續)









Steroids



圖 1-3、槲寄生(Viscum)屬植物化合物之化學結構(續)

Triterpenoids









圖 1-3、槲寄生(Viscum)屬植物化合物之化學結構(續)

Others







圖 1-3、槲寄生(Viscum)屬植物化合物之化學結構(續)

第二章、材料與方法

第一節 實驗儀器與藥品

一、層析 (Chromatography)

(一) 管柱層析 (Column Chromatography)

1.管柱:不同口徑長度之玻璃管柱

2.填充物:E. Merck silica gel 60 F₂₅₄, 70-230 mesh

E. Merck silica gel 60 F₂₅₄ · 230-460 mesh

(二) 薄層層析 (Thin-layer Chromatography)

1.分析型 TLC 片: E. Merck Kieselgel 60 F254 silica gel,

pre-coated aluminum plate or glass plate ,

0.2 mm

2.製備型 TLC 片: E. Merck Kieselgel 60 F254 silica gel,

pre-coated glass plate , 1 mm

(三) 高效液相層析 (High Performance Liquid Chromatography)

1. 幫 浦(pump): Shimadzu LC-6AD Liquid Chromatograph

Dynamax model SD-200 solvent delivery system

2. 管柱(Column): E. Merck Li Chrosorb Si 60 (7 µm)

Waters RP-18 ($5 \mu m$) $\cdot 10 \times 250 nm$

3. 檢測器: Shimadzu SPD-6AV UV-VIS Spectrophotometric

detector, Dynamax model UV-1 adsorbance detector

二、光譜分析儀器

- (一) 紅外線光譜 (Infrared spectra IR): Nicolet Avatar 320 FT-IR
- (二) 核磁共振光譜 (Nuclear Magnetic Resonance Spectra, NMR)

1. Varian Gemini (200 MHz) FT-NMR

2.Bruker AC-400 (400 MHz) FT-NMR

3. Varian Gemini (500 MHz) FT-NMR

內部標準(internal standard): TMS (tetramethyl silane)

信號表示:分別以 s、d、t、m、dd 及 br,代表 singlet、doublt、

triplet、multiplet、double doublet 及 broad。

三、質譜儀器 (Mass Spectra)

Joel JMS-HX 110 Mass Spectrophotometer (國立中國醫藥研究所)
Shimadzu LCMS ITTOF Spectrophotometer (國立台灣大學貴儀中心)

四、熔點測定 (Melting Point)

Yanaco micro melting point apparatus

五、TLC spots 之檢出

- 1. UV (長波 365 nm, 短波 254 nm)
- 2.5%硫酸溶液

3. Libermann Burchard's reagent 檢測 triterpene

六、濃縮機

- 1.Buchi B-480 Waterbath
- 2. Buchi R-114 Rotavapor
- 3.Buchi B-720 vacuum controller

七、溶劑

、溶齊	IJ	.(11/
正己	烷	<i>n</i> -Hexane	GR or AR
二氯甲	烷	Dichloromethane	GR or AR
氯	仿	Chloroform	GR or AR
乙酸て	」酯	Ethyl acetate	GR or AR
甲	醇	Methanol	GR or AR
丙	酮	Acetone	GR or AR
乙	醇	Ethanol 95%	

第二節 椆櫟柿寄生化學成分之萃取與分離

一、植物來源

黄士元 博士於 95 年 02 月,於台中縣大坑鄉東山里大楓香樹上 採集並鑑定,乾重 22.5 kg。

二、椆櫟柿寄生萃取與分離流程

· 桐櫟柿寄生乾重 22.5 kg,以 95%酒精加熱萃取五次,經減壓濃 縮後得到 2.24 kg 的酒精粗萃物(crude extract)。將粗萃物以正已烷 (n-Hexane)及水進行液相分配(partition)後,得到正已烷層及水層, 正已烷層經減壓濃縮後得乾重 500.0 g。再將乙酸乙酯(EtOAc)與水 層進行液相分配,得到乙酸乙酯層與水層,乙酸乙酯層經減壓濃縮 後得乾重 463.6 g。最後,將正丁醇(Butanol)與水層進行液相分配, 得到正丁醇層與水層,正丁醇層經減壓濃縮後得乾重 354.0 g。

乙酸乙酯層進行矽膠管柱層析,利用正己烷/氯仿(CHCl₃)以 100:1 至 0:1 進行梯度沖提,再以氯仿/甲醇(MeOH)由 100:1 至 1:1 進行梯度沖提,共分得 14 個部份(Fr. 1~14)。

第 6 部分(Fr. 6)進行矽膠管柱層析,利用正已烷/二氯甲烷 (CH₂Cl₂)以 10:1 至 0:1 進行梯度沖提,再以二氯甲烷/乙酸乙酯/甲醇 由 40:1:0 至 1:1:1 進行梯度沖提,共分得 14 個部份(Fr. 6-1~6-14); 第 7 部份經由 Sephadex LH-20 管柱色層分析,以二氯甲烷/甲醇 1:3 進行沖提,共分得 6 個部份(6-7-1~6-7-6); 第 5 部份經由 Sephadex

28

LH-20 管柱色層分析,以氯仿/甲醇 1:1 進行沖提,得到化合物 12 (214.0 mg)。

第 10 部份(Fr. 10)進行矽膠管柱層析,利用二氯甲烷(CH₂Cl₂)/ 丙酮(Acetone)/甲醇以 40:1:0 至 2:2:1 進行梯度沖提, 共分得 19 個部 份(10-1~10-19); 第 14 部份(10-14)以再結晶的方式得到化合物 1 (255.0 mg),溶解的部分經由 Sephadex LH-20 管柱色層分析,以甲 醇/丙酮 10:1 進行沖提,得到化合物 2 (195.0 mg)。第 15 部份(10-15) 以再結晶的方式得到化合物 5 (432.0 mg)。第 16 部份(10-16)經由 Sephadex LH-20 管柱色層分析,以甲醇進行沖提,得到 3 個部份 (10-16-1~10-16-3), 第2部分經由 Sephadex LH-20 管柱色層分析, 以氯仿/甲醇1:3進行沖提,得到化合物4(60.3 mg)。第17部份(10-17) 經由 Sephadex LH-20 管柱色層分析,以甲醇進行沖提,得到 8 個部 份(10-17-1~10-17-8); 第4部份(10-17-4)進行矽膠管柱層析,利用 正己烷/氯仿以 10:1 至 0:1 進行梯度沖提,再以氯仿/甲醇由 50:1 至 1:1 進行梯度沖提,共分得 13 個部份(10-17-4-1~10-17-4-13);第7 部份(10-17-4-7)利用逆向的高效液相層析儀(HPLC),以 65%甲醇進 行沖提,得到化合物9(63.8 mg)、化合物10(27.2 mg);第10部份 (10-17-4-10)利用逆向的高效液相層析儀(HPLC),以 30%乙腈 (Acetonitrile)進行沖提,得到化合物 11 (2.8 mg)。第7部分(10-17-7) 利用製備型薄層色層分析板(P.TLC),以氯仿/甲醇 8:1 作為展開液展 開,得到化合物3(33.3 mg)、化合物8(13.2 mg)。

第 12 部分(Fr. 12)經由 Sephadex LH-20 管柱色層分析,以甲醇

進行沖提,得到 6 個部份(12-1~12-6),由第 4 部份得到化合物 6 (171.0 mg);而第 5 部份經由 Sephadex LH-20,以甲醇進行沖提,得 到化合物 7 (7.7 mg)。





圖 2-1、椆櫟柿寄生之化學成分萃取與分離流程(一)

Fr. 10 (37.5 g)



* new compounds

圖 2-2、椆櫟柿寄生之化學成分萃取與分離流程(二)

圖 2-3、椆櫟柿寄生分離出之化合物



* new compounds

圖 2-3、椆櫟柿寄生分離出之化合物(續)





Viscolin-4'-*O*-β-D-glucopyranoside (10*)



* new compounds

第三章、化合物之結構證明

利用核磁共振儀(NMR)測定化合物,透過其氫譜(¹H-NMR)、碳譜 (¹³C-NMR)、DEPT 及二維圖譜如:HMQC、HMBC、¹H-¹H COSY 及 NOESY 等,並使用低解析電灑式質譜(ESI-MS)與高解析電灑式質譜 (HRESI-MS)測量化合物的分子量或分子式,及其他物理資料和文獻比 對,以確定化合物之結構。

本實驗由椆櫟柿寄生(*Viscum articulatum*)中總共分離得到 12 個化 合物,包括 3 個 flavanone 類新化合物,分別為 visartiside A (1)、visartiside B (2)、 naringenin-7-*O*-[5-*O*-*trans*-cinnamoyl-β-D-apiosyl(1→2)]-β-Dglucopyranoside (3)和 2 個 1,3-diphenylpropane 類新化合物,分別為 viscolin- 4["]-*O*-β-D-glucopyranoside (9)、viscolin-4["]-*O*-β-D-glucopyranoside (10),以及 1 個 benzenoid 新化合物,5-*O*-*trans*-cinnamoyl-β-D-apiosyl (1→3)- α -D-glucopyranoside (11),還有 6 個已知化合物,包括 5 個 flavanone 類化合物分別為 pinocembrin-7-*O*-[cinnamoyl(1→5)- β -Dapiosyl(1→2)]- β -D-glucopyranoside (4)、pinocembrin-7-*O*- β -D-glucopyranoside (5)、 naringenin-7-*O*- β -D-glucopyranoside (6)、 eriodictyol-7-*O*- β -D-glucopyranoside (7)、 homoeriodictyol-7-*O*-glucopyranoside (8)及 1 個 triterpenoid 化合物, oleanolic acid (12)。

第一節、化合物 1 之結構解析



Compound 1 為黃色粉末, 比旋光值 $[\alpha]^{25}_{D}$ +30.8°(c 0.52, MeOH)。 由高解析電灑式質譜 (HRESIMS) 分析顯示,其分子離子峰為 m/z603.1544 $[M+Na]^+$, 推算其分子式為 $C_{30}H_{28}O_{12}$ 。由紅外線光譜 (IR) 在 3445 cm⁻¹ 有 OH 的訊號, 1635 cm⁻¹ 為 C=O 基之訊號, 1576、1524、1445 cm⁻¹ 為苯環訊號。由紫外光吸收光譜顯示 λ_{max} 281、332 (sh) nm,推測 為 flavanone 類的結構 ^{41,42,43}。

由核磁共振氫光譜 (acetone- d_6 , 圖 3-2、Table 3-1) 顯示此化合物 之芳香族質子區吸收訊號於 δ_H 7.66 (2H, brs)、7.42 (3H, brs)、7.01 (1H, s)、6.85 (2H, brs)、6.12 (1H, s)及 6.10 (1H, s); 一組反式乙烯基之質子 吸收訊號 δ_H 7.73 (1H, d, J = 16.0)、6.56 (1H, d, J = 16.0); 一個次甲基之 質子吸收訊號 δ_H 5.40 (1H, dd, J = 13.0, 3.0), 及一個亞甲基上兩個質子 吸收訊號 $\delta_{\rm H}$ 3.17 (1H, dd, J = 17.0, 13.0)、2.77 (1H, dd, J = 17.0, 3.0),為 flavanone 之特徵質子訊號;以及一個與 C=O 形成分子內氫鍵的 OH 吸 收訊號 $\delta_{\rm H}$ 12.05 (1H, s);還有一組醣基的質子吸收訊號 $\delta_{\rm H}$ 5.36 (1H, d, J = 8.0)、5.12 (1H, dd, J = 9.0, 8.0)、3.40~3.90 (5H); 由核磁共振碳光譜 (圖 3-3、Table 3-1)及 DEPT (圖 3-7)顯示,此化合物共有 2 個二級碳, 18 個三級碳,10 個四級碳;其中四級碳 $\delta_{\rm C}$ 197.4 依據其化學位移判斷 為 C=O 基,三級碳 $\delta_{\rm C}$ 79.4,以及二級碳 $\delta_{\rm C}$ 42.8,這些均為 flavanone 的特徵碳光譜吸收訊號;此外,碳光譜吸收訊號含有五個三級碳 $\delta_{\rm C}$ 98.3、77.4、75.0、73.7、70.6,及一個二級碳 $\delta_{\rm C}$ 61.6,顯示係一個 6 碳的醣基;因此初步推測此化合物為 flavanone glycoside⁴⁴,且含有一 個九個碳的殘基。

¹H NMR 在芳香族質子區有一組質子吸收訊號〔 $\delta_{\rm H}$ 7.01 (1H, s, H-2')、6.85 (2H, brs, H-5'、6')],經由 HMQC (圖 3-4)及 HMBC (圖 3-5) 確定為 flavanone B 環上之 H-2'、H-5'及 H-6'之質子,其碳值分別為 $\delta_{\rm C}$ 114.1 (C-2')、115.4 (C-5')、118.6 (C-6');經基則分別取代於 C-3'與 C-4' 的位置上,其碳值為 $\delta_{\rm C}$ 145.9 (C-3')及 $\delta_{\rm C}$ 145.4 (C-4');由 HMBC 得知 $\delta_{\rm H}$ 5.40 (1H, dd, J = 13.0, 3.0, H-2)分別與 $\delta_{\rm C}$ 130.6 (C-1')、118.6 (C-6')、 114.1 (C-2')、42.8 (C-3)有 ²J 或 ³J 的遠程關連,因此確定 B 環連接於 C-2 的位置上。又由 COSY (圖 3-6)顯示 $\delta_{\rm H}$ 3.17 (1H, dd, J = 17.0, 13.0) 及 2.77 (1H, dd J = 17.0, 3.0)分別與 $\delta_{\rm H}$ 5.40 (1H, dd, J = 13.0, 3.0, H-2)有 偶合,因此確定為 C-3 位置上的兩個質子,再透過其偶合常數判定 $\delta_{\rm H}$ 3.17 為 H-3 α , $\delta_{\rm H}$ 2.77 為 H-3 $\beta^{45,46}$; 由 HMBC 中得知, $\delta_{\rm H}$ 3.17 (H-3 α) 及 $\delta_{\rm H}$ 2.77 (H-3β)分別與 $\delta_{\rm C}$ 197.4 (C-4, C=O)、130.6 (C-1)、104.0 (C-10)、79.4 (C-2) 有 ²J 或 ³J 的遠程相連;因此推測上述的部份為 flavanone C 環之特徵訊號。此外,由核磁共振氫譜中發現 $\delta_{\rm H}$ 12.05 (1H, s)為 OH 基之吸收訊號,由 C=O 及 5-OH 的分子內氫鍵所造成,且由 HMBC 中得知 OH 的質子分別與 $\delta_{\rm C}$ 164.0 (C-5)、104.0 (C-10)、96.8 (C-6) $f^{2}J$ 或 ³J 的遠程關連,而近一步證實 OH 取代於 C-5 的位置上,碳值 為 $\delta_{\rm C}$ 164.0;而氫譜上 $\delta_{\rm H}$ 6.10 (1H, s)、6.12 (1H, s)訊號峯經 HMBC 及 HMQC 確定分別為 H-6 及 H-8 之質子吸收訊號,並確定其碳光譜吸收 訊號為 $\delta_{\rm C}$ 96.8 (C-6)、95.8 (C-8);除此之外,藉由 HMBC 的關連(如圖 3-1 所示)亦確定其他碳光譜吸收訊號,於此可推知 flavanone A 環為 5,7-dihydroxy 的結構;綜合以上推論,確認此化合物 flavanone 部分的



圖 3-1、Compound 1之 HMBC、COSY 關聯圖

結構為(2S)-2-(3,4-dihydroxy-phenyl)-5,7-dihydroxy-4-chromanone,其 ¹H、¹³C光譜數據經由文獻比對,與 eriodictyol 完全一致⁴⁷。

由核磁共振氫及碳光譜發現,芳香族質子區還有 $\delta_{\rm H}$ 7.66 (2H, brs, H-5["],9["])、7.42 (3H, brs, H-6["],7["],8["])以及 $\delta_{\rm C}$ 134.7 (C-4["])、130.5 (C-7["])、 129.2 (C-6["],C-8["])、128.4 (C-5["],C-9["])等訊號,其係為單取代之苯環吸收 訊號。此外,於氫譜上 $\delta_{\rm H}$ 7.73 (1H, d, J = 16.0)與 $\delta_{\rm H}$ 6.56 (1H, d, J = 16.0) 的偶合常數,推斷其為反式乙烯基之吸收訊號;加上由 HMBC 關聯圖 (圖 3-1)顯示這個乙烯基連接于羧基(carboxyl group)以及苯環的碳上, 而確定此苯環衍生物為 *trans*-cinnamoyl group 的結構⁴⁸。

至於醣基的訊號峯由 anomeric 質子 $\delta_{\rm H}$ 5.36 (1H, d, J = 8.0, Glc-H-1) 之偶合常數和 $\delta_{\rm C}$ 98.3 得知醣基的部份為一個 β-六碳醣;經由文獻比對 其 ¹H、¹³C 光譜數據,表現與 β-D-glucose 完全一致 ^{49,50,51};除此之外, HMBC 圖譜顯示 $\delta_{\rm H}$ 5.36 (Glc-H-1)與 flavanone 上 $\delta_{\rm C}$ 165.4 (C-7)有 ³J 的 關連,因此推測 β-D-glucose 以 C-1 位置與 flavanone 之 C-7 相連接; 並且由 COSY 得知, $\delta_{\rm H}$ 5.36 (1H, d, J = 8.0, Glc-H-1)與 $\delta_{\rm H}$ 5.13 (1H, dd, J = 9.0, 8.0)有偶合,因此確定 $\delta_{\rm H}$ 5.13 為 Glc-C-2 位置上之質子,其碳值 為 $\delta_{\rm C}$ 73.7;此外,藉由 ³J 的關連,發現 $\delta_{\rm H}$ 5.13 (Glc-H-2)與羧基上的碳 $\delta_{\rm C}$ 165.5 (C-1")有 ³J 的關連,推知 β-D-glucose 以 C-2 位置與 *trans*-cinnamoyl group 的 C-1"相連接;綜合以上推論,確認 β-D-glucose 與 flavanone 之連接方式為 Glc-1-*O*-7,而 β-D-glucose 與 *trans*-cinnamoyl group 之連接方式為 Glc-2-*O*-1"。 综合以上物理及光譜數據,確定 compound 1 為 (2S)-eriodictyol-7-O-(2-O-trans-cinnamoyl)-β-D-glucopyranoside,為新發 現之化合物,將其命名為 Visartiside A。



multiplicities and coupling constants for 1 $\delta^{13}C^a$ δ^{1} H^b, mult., Hz Position $5.40 \, dd \, (J = 13.0, \, 3.0)$ 2 79.4 3 42.8 3.17 *dd* (J = 17.0, 13.0)(α) 2.77 $dd (J = 17.0, 3.0)(\beta)$ 4 197.4 5 164.0 6 96.8 6.10 *s* 7 165.4 8 95.8 6.12 s 9 163.4 104.0 10 1 130.6 2 114.1 7.01 brs 3 145.9 4 145.4 Ś 6.85 brs 115.4 Ġ 118.6 6.85 brs Glc-1 98.3 5.36 d (J = 8.0) Glc-2 5.13 dd (J = 9.0, 8.0) 73.7 Glc-3 75.0 3.71 d (J = 9.0)Glc-4 70.6 3.62 m Glc-5 77.4 3.83 m Glc-6 61.6 3.93 m 3.76 m 1" 165.5 2" 118.1 6.56 d (J = 16.0)3" 7.73 d (J = 16.0) 145.2 4" 134.7 5 128.4 7.66 brs 6" 129.2 7.42 brs 7" 130.5 7.42 brs 8" 129.2 7.42 brs 9" 128.4 7.66 brs

Table 3-1 \cdot ¹³C and ¹H NMR chemical shifts in acetone- d_6 ; ¹H

^a Spectra recorded at 125 MHz in acetone- d_6 ^b Spectra recorded at 500 MHz in acetone- d_6





圖 3-3、Compound 1 之¹³C NMR 光譜



圖 3-5、Compound 1 之 HMBC 光譜



圖 3-7、Compound 1之 DEPT 圖譜



圖 3-8、Compound 1之 IR 圖譜



圖 3-9、Compound 1之 HRESIMS 圖譜

第二節、化合物 2 之結構解析



Compound 2 為黃色粉末, 比旋光值 [α]²⁵_D-38.0°(c 0.50, MeOH)。 由高解析電灑式質譜 (HRESIMS) 分析顯示,其分子離子峰為 m/z603.1535 [M+Na]⁺, 推算其分子式為 C₃₀H₂₈O₁₂。由紅外線光譜 (IR) 在 3374 cm⁻¹ 有 OH 的訊號, 1639 cm⁻¹ 為 C=O 基之訊號, 1572、1524、1449 cm⁻¹ 為苯環訊號。由紫外光吸收光譜顯示 λ_{max} 279、325 (sh) nm,推測 為 flavanone 類的結構 ^{41、42、43}。

由核磁共振氫光譜 (acetone- d_6 , 圖 3-11、Table 3-2) 顯示此化合物 之芳香族質子區吸收訊號於 δ_H 7.64 (2H, brs)、7.43 (3H, brs)、7.02 (1H, s)、6.84 (2H, brs)、6.22 (1H, s)及 6.16 (1H, s); 一組反式乙烯基之質子 吸收訊號 δ_H 7.68 (1H, d, J = 16.0)、6.57 (1H, d, J = 16.0); 一個次甲基之 質子吸收訊號 δ_H 5.39 (1H, dd, J = 12.5, 2.5), 及一個亞甲基上兩個質子 吸收訊號 δ_H 3.13 (1H, dd, J = 17.0, 12.5)、2.75 (1H, dd, J = 17.5, 3.0), 為 flavanone 之特徵質子訊號;以及一個與 C=O 形成分子內氫鍵的 OH 吸 收訊號 $\delta_{\rm H}$ 12.10 (1H, s);還有一組醣基的質子吸收訊號 $\delta_{\rm H}$ 5.15 (1H, d, J = 7.5)、4.60 (1H, d, J = 12.0)、4.33 (1H, dd, J = 12.0, 11.5)、3.93 (1H, ddd, J = 9.0, 6.5, 2.0)、3.40~3.60 (3H);由核磁共振碳光譜 (圖 3-12、Table 3-2) 及 DEPT (圖 3-16)顯示,此化合物共有 2 個二級碳,18 個三級碳,10 個四級碳;其中四級碳 $\delta_{\rm C}$ 197.2 依據其化學位移判斷為 C=O 基,三級 碳 $\delta_{\rm C}$ 79.4,以及二級碳 $\delta_{\rm C}$ 42.9,這些均為 flavanone 的特徵碳光譜吸 收訊號;此外,碳光譜吸收訊號含有五個三級碳 $\delta_{\rm C}$ 100.2、77.0、74.5、 73.8、70.5,及一個二級碳 $\delta_{\rm C}$ 63.7 顯示係一個 6 碳的醣基;因此初步 推測此化合物為 flavanone glycoside⁴⁴,且含有一個九個碳的殘基。

由核磁共振氫譜及碳譜比對後發現,化合物 2 的主體架構與 1 相 同,含有一個 5,7,3,4-tetrahydroxy-flavanone、一個 β -D-glucose 及一個 *trans*-cinnamoyl group,氫譜及碳譜顯示差異在於 β -D-glucose 的 C-6 位 置上的兩個質子明顯的往低磁場移動到 $\delta_{\rm H}$ 4.60 (1H, dd, J = 12.0, 11.5, Glc-H-6a)、4.33 (1H, d, J = 12.0, Glc-H-6b),由 HMBC 圖譜(圖 3-14)及 其關聯圖(圖 3-10)發現, $\delta_{\rm H}$ 4.60 (Glc-H-6a)與 4.33 (Glc-H-6b)分別與羧 基上的碳 $\delta_{\rm C}$ 166.4 (C-1[°])有 ³J 的關連,推知 β -D-glucose 以 C-6 位置與 *trans*-cinnamoyl group 的 C-1[°]相連接;且由 HMBC 得知 $\delta_{\rm H}$ 5.15 (1H, d, J = 7.5, Glc-H-1)與 flavanone 上 $\delta_{\rm C}$ 165.8 (C-7)有 ³J 的關連,確定 β -D-glucose 以 C-1 位置與 flavanone 之 C-7 相連接。綜合以上推論,證 實化合物 2 與 1 之差異僅在於 *trans*-cinnamoyl group 連接於醣基的不同 位置上。 综合以上物理及光譜數據,確定 compound 2 為 (2S)-eriodictyol-7-O-(6-O-trans-cinnamoyl)-β-D-glucopyranoside,為新發 現之化合物,將其命名為 Visartiside B。



圖 3-10、Compound 2 之 HMBC、COSY 關聯圖

multiplicities and coupling constants for 2 $\delta^{13}C^a$ δ^{1} H^b, mult., Hz Position $5.39 \, dd \, (J = 12.5, \, 3.5)$ 2 79.4 3 42.9 3.13 *dd* (J = 17.0, 12.5)(α) 2.75 $dd (J = 17.5, 3.0)(\beta)$ 4 197.2 5 164.1 6 96.8 6.22 s 7 165.8 8 6.16 s 96.0 9 163.2 103.9 10 1 130.7 2 114.0 7.02 s 3 145.8 4 145.4 5 115.4 6.84 brs Ġ 118.6 6.84 brs Glc-1 100.2 5.15 d (J = 7.5) Glc-2 3.53 m 73.8 Glc-3 77.0 3.60 m Glc-4 70.5 3.52 m Glc-5 74.5 $3.93 \, ddd \, (J = 9.0, \, 6.5, \, 2.0)$ Glc-6 63.7 4.60 d (J = 12.0)4.33 *dd* (*J* = 12.0, 11.5) 1" 166.4 2" 118.1 6.57 d (J = 16.0)3" 7.68 d (J = 16.0) 145.0 4" 134.7 5" 128.4 7.64 brs 6" 129.1 7.43 brs 7" 130.5 7.43 brs 8" 129.1 7.43 brs 9" 128.4 7.64 brs

Table 3-2 \cdot ¹³C and ¹H NMR chemical shifts in acetone- d_6 ; ¹H

^a Spectra recorded at 125 MHz in acetone- d_6 ^b Spectra recorded at 500 MHz in acetone- d_6





圖 3-12、Compound 2 之¹³C NMR 光譜



圖 3-14、Compound 2 之 HMBC 光譜



圖 3-16、Compound $2 \gtrsim DEPT$ 圖譜


圖 3-17、Compound 2之 IR 圖譜



圖 3-18、Compound 2 之 HRESIMS 圖譜

第三節、化合物 3 之結構解析



Compound 3 為白色粉末, 比旋光值 $[\alpha]_{D}^{25}$ +72.0°(c 0.25, MeOH)。 由高解析電灑式質譜 (HRESIMS) 分析顯示,其分子離子峰為 m/z 719.2030 $[M+Na]^+$, 推算其分子式為 $C_{35}H_{36}O_{15}$ 。由紅外線光譜 (IR) 在 3413 cm⁻¹ 有 OH 的訊號, 1639 cm⁻¹ 為 C=O 基之訊號, 1445 cm⁻¹ 為苯 環訊號。由紫外光吸收光譜顯示 λ_{max} 280、325 (sh) nm, 推測為 flavanone 類的結構 ^{41,42,43}。

由核磁共振氫光譜 (methanol- d_4 , 圖 3-20、Table 3-3) 顯示此化合物之芳香族質子區吸收訊號於 δ_H 7.34 (2H, brs)、7.27 (3H, brs)、7.09 (2H, d, J = 8.0)、6.68 (2H, d, J = 7.5)、6.00 (1H, s)及 5.97 (1H, s); 一個反式 乙烯基之質子吸收訊號 δ_H 7.44 (1H, d, J = 16.0)、6.23 (1H, d, J = 16.0);

56

-個次甲基之質子吸收訊號 $\delta_{\rm H}$ 5.02 (1H, dd, J = 13.0, 3.0), 及一個亞甲 基上兩個質子吸收訊號 $\delta_{\rm H}$ 2.83 (1H, dd, J = 16.5, 13.0)、2.40 (1H, dd, J = 17.0, 3.0), 為 flavanone 之特徵質子訊號;以及一個與 C=O 形成分子內 氫鍵的 OH 吸收訊號 $\delta_{\rm H}$ 11.81 (1H, s);還有二組醣基的質子吸收訊號 $\delta_{\rm H}$ 5.39 (1H, s)、4.96 (1H, d, J = 7.0)、4.10 (3H, brs)、3.85 (1H, s)、3.76 (2H, m)、3.54 (3H, ,m)、3.30 (2H, m); 由核磁共振碳光譜 (圖 3-21、Table 3-3) 及 DEPT (圖 3-25)顯示,此化合物共有 4 個二級碳,20 個三級碳,11 個四級碳;其中四級碳 $\delta_{\rm C}$ 197.1 依據其化學位移判斷為 C=O 基,三級 碳 $\delta_{\rm C}$ 79.3,以及二級碳 $\delta_{\rm C}$ 42.7,這些均為 flavanone 的特徵碳光譜吸 收訊號;而碳光譜吸收訊號還有一個四級碳 $\delta_{\rm C}$ 78.0,七個三級碳 $\delta_{\rm C}$ 109.0、98.3、77.5、77.0、77.0、76.5、70.0,及三個二級碳 $\delta_{\rm C}$ 74.0、 66.8、61.1 等,推測為六碳及五碳的醣基訊號;因此初步推測此化合物 為 flavanone glycoside⁸,且含有一個九個碳的殘基。

由核磁共振氫譜及碳譜中得知,化合物 3 的主體結構與 1、2 相似, 除了稍微不同的 flavanone 訊號之外,也含有一個 *trans*-cinnamoyl group 及一個 β-D-glucose,但在醣基的部分,還多出一組五個碳的醣基訊號。 由核磁共振氫譜顯示,化合物 3 在芳香族質子區有一組 A₂B₂型的質子 吸收訊號 [$\delta_{\rm H}$ 7.09 (2H, d, J = 8.0)、6.68 (2H, d, J = 7.5)],經 HMBC (圖 3-23)確定為 flavanone B 環上之 H-2[']、6[']及 H-3[']、5[']之質子,其碳值分 別為 $\delta_{\rm C}$ 127.9 (C-2[']、6['])、115.2 (C-3[']、5[']);再由 HMBC 得知(如圖 3-19 所示),羥基對位取代於 flavanone B 環 C-4[']的位置上,碳值為 $\delta_{\rm C}$ 157.9。 除此之外,藉由 HMBC 圖譜(圖 3-19、3-23)確定 flavanone 其他位置的

57

氫碳光譜吸收訊號。綜合以上推論,確認 3 的 flavanone 結構為 naringenin,其¹H、¹³C光譜數據經由文獻比對完全一致⁵²。

醣基的部分,由 HMBC 及 DEPT 得知 $\delta_H 5.39$ (1H, s, Api-H-1)與四 級碳 δ_C 78.0 (Api-C-3)及二級碳 δ_C 74.0 (Api-C-4)有 ³J 的遠程關連,由 此可推知五個碳的醣基為 β-D-apiose,其 ¹H、¹³C 光譜數據經文獻比對 完全一致⁸。再由 HMBC 得知, δ_H 4.96 (Glc-H-1)與 flavanone 上的 δ_C 165.4 (C-7)有 ³J 的關連,因此推測 β-D-glucose 以 C-1 位置與 flavanone 之 C-7 相連接;並且由 COSY 得知, δ_H 4.96 (1H, d, J=7.0, Glc-H-1)與 δ_H 3.58 (1H, m)有偶合,因此確定 δ_H 3.58 為 Glc-C-2 位置上之質子吸收 訊號,其碳值為 δ_C 76.5;此外,HMBC 顯示 δ_H 5.39 (1H, s, Api-H-1)與 δ_C 76.5 (Glc-C-2),有 ³J 的關連,推知 β-D-glucose 以 C-2 位置與



圖 3-19、Compound 3 之 HMBC、COSY 關聯圖

β-D-apiose 之 C-1 相連接;由 HMBC 得知 $\delta_H 4.10$ (2H, brs, Api-H₂-5)與 羧基上的碳 $\delta_C 166.9$ (C-1")有 ³J 的關連,推知 β-D-apiose 以 C-5 位置與 *trans*-cinnamoyl group 的 C-1"相連接;綜合以上推論,確認 β-D-glucose 與 flavanone 之連接方式為 Glc-1-O-7,而 β-D-glucose 與 β-D-apiose 之 連接方式為 Glc-2-O-Api-1,而 β-D-apiose 與 *trans*-cinnamoyl group 之 連接方式為 Api-5-O-1"。

综合以上物理及光譜數據,確定 compound **3** 為 (2S)-naringenin-7-O-[5-O-trans-cinnamoyl-β-D-apiosyl(1→2)]-β-D-glucopyranoside,為新發 現之化合物。

multiplicities and coupling constants for $\mathbf{3}$ $\delta^{13}C^a$ δ^{1} H^b, mult., Hz Position 5.02 *dd* (*J* = 13.0, 3.0) 2 79.3 3 2.83 *dd* (J = 16.5, 13.0)(α) 42.7 2.40 dd (J = 17.0, 3.0)(β) 4 197.1 5 163.8 6.00 s 6 96.5 7 165.4 8 5.97 s 95.5 9 163.1 10 103.7 1 130.4 2 7.09 d (J = 8.0) 127.9 3 $6.68 \ d \ (J = 7.5)$ 115.2 4 157.9 5 115.2 6.68 d (J = 7.5)6[°] 7.09 d (J = 8.0)127.9 Glc-1 98.3 4.96 d (J = 7.0)Glc-2 76.5 3.58 m Glc-3 77.0 3.30 m Glc-4 70.0 3.29 m Glc-5 77.5 3.85 m Glc-6 61.1 3.75 m 3.52 m Api-1 109.0 5.39 s Api-2 77.0 3.54 s Api-3 78.0 Api-4 74.0 4.10 brs 3.77 m Api-5 66.8 4.10 brs 2H 1 166.9 2" 117.2 6.23 d (J = 16.0)3" 145.4 7.44 d (J = 16.0)

Table 3-3 \cdot ¹³C and ¹H NMR chemical shifts in methanol- d_4 ; ¹H

4"	134.4	
5"	128.2	7.34 brs
6 ["]	128.9	7.27 brs
7"	129.6	7.27 brs
8"	128.9	7.27 brs
9"	128.2	7.34 brs
5-OH		11.81 s

^a Spectra recorded at 125 MHz in methanol-*d*₄
^b Spectra recorded at 500 MHz in methanol-*d*₄





圖 3-21、Compound 3 ² ¹³C NMR 光譜



圖 3-23、Compound 3 之 HMBC 光譜



圖 3-25、Compound 3 之 DEPT 圖譜



圖 3-26、Compound 3 之 IR 圖譜



圖 3-27、Compound 3 之 HRESIMS 圖譜

第四節、化合物 4 之結構解析



Compound 4 為黃色粉末,由電灑式質譜 (ESIMS) 分析顯示,其 分子離子峰為 m/z 703.2 [M+Na]⁺,推算其分子式為 $C_{35}H_{36}O_{14}$ 。由核磁 共振氫光譜 (acetone- d_6 ,圖 3-68、Table 3-11) 顯示此化合物之芳香族 質子區吸收訊號於 δ_H 7.58 (2H, brs)、7.50 (2H, brs)、7.44 (6H, brs)、6.18 (1H, s)及 6.16 (1H, s);一個反式乙烯基之質子吸收訊號 δ_H 7.67 (1H, d, J= 16.0)、6.40 (1H, d, J = 16.0);一個次甲基之質子吸收訊號 δ_H 5.44 (1H, brd, J = 13.0),及一個亞甲基上兩個質子吸收訊號 δ_H 3.10 (1H, dd, J = 17.0, 13.0)、2.72 (1H, dd, J = 17.0, 3.0),為 flavanone 之特徵質子訊號; 以及一個與 C=O 形成分子內氫鍵的 OH 吸收訊號 δ_H 12.01 (1H, s);還 有二組醣基的質子吸收訊號 δ_H 5.54 (1H, s)、5.17 (1H, d, J = 7.0)、4.21 (3H, s)、4.00 (1H, brs)、3.90 (1H, m)、3.85 (1H, m)、3.69 (3H, m)、3.58 (1H, brs)、3.48 (1H, brs); 由核磁共振碳光譜 (圖 3-69、Table 3-11)及 DEPT (圖 3-73)顯示,此化合物共有 4 個二級碳,21 個三級碳,10 個 四級碳;其中四級碳 δ_{C} 196.7 依據其化學位移判斷為 C=O 基,三級碳 δ_{C} 79.3,以及二級碳 δ_{C} 42.9,這些均為 flavanone 的特徵碳光譜吸收訊號; 而醣基碳光譜吸收訊號為一個四級碳 δ_{C} 78.0,七個三級碳 δ_{C} 109.1、98.5、77.8、77.6、77.1、76.2、70.7,及三個二級碳 δ_{C} 74.5、66.9、61.7 等,推測為六碳及五碳的醣基訊號;因此初步推測此化合物 為 flavanone glycoside⁸,且含有一個九個碳的殘基。

由核磁共振氫譜及碳譜比對後發現,化合物 4 與 3 非常相近,主 體結構皆為 flavanone、β-D-glucose、β-D-apiose 以及 *trans*-cinnamoyl group,不同的地方在於核磁共振氫譜的芳香族質子區,flavanone B 環 上的 H-2[']、6[']及 H-3[']、5[']質子吸收訊號往低磁場移動到 δ_H 7.50 (2H, brs)、 7.44 (6H, brs),且與 *trans*-cinnamoyl group 的單取代苯環質子訊號重 疊;而核磁共振碳光譜的差異在於,C-3[']、5[']往低磁場移動到 δ_C 128.9, C-4[']往高磁移動到 δ_C 128.8,由此推測化合物 4 的 flavanone B 環為單取 代之苯環。除此之外,透過 HMBC(圖 3-71)及其關聯圖(圖 3-67),確定 flavanone 其他位置的氫碳光譜吸收訊號。綜合以上推論,確認 4 的 flavanone 部分為 pinocembrin,其 ¹H、¹³C 光譜數據經由文獻比對完全 一致 ⁵⁵。

醣基的部份,藉由 HMBC 得知 δ_H 5.17 (1H, d, J = 7.0, Glc-H-1)與 flavanone 上 δ_C 165.7 (C-7)有 ³J 的關連,因此推測 β-D-glucose 以 C-1

67

位置與 flavanone 之 C-7 相連接;並且由 COSY 得知, $\delta_{\rm H}$ 5.17 (1H, d, J = 7.0, glc-H-1)與 $\delta_{\rm H}$ 3.69 (1H, m)有偶合,因此確定 $\delta_{\rm H}$ 3.69 為 Glc-C-2 位 置上之質子吸收訊號;此外,HMBC 顯示 $\delta_{\rm H}$ 3.69 (Glc-H-2)與 $\delta_{\rm C}$ 109.1 (Api-C-1),有 ³J 的關連,推知 β-D-glucose 以 C-2 位置與 β-D-apiose 之 C-1 相連接;再由 HMBC 得知 $\delta_{\rm H}$ 4.21 (2H, s, Api-H₂-5)與羧基上的碳 $\delta_{\rm C}$ 166.1 (C-1")有 ³J 的關連,得知 β-D-apiose 以 C-5 位置與 *trans*-cinnamoyl group 的 C-1"相連接;綜合以上推論,確認 β-D-glucose 與 flavanone 之 連接方式為 Glc-1-O-7,而 β-D-glucose 與 β-D-apiose 之連接方式為 Glc-2-O-Api-1,而 β-D-apiose 與 *trans*-cinnamoyl group 之連接方式為 Api-5-O-1"。



圖 3-28、Compound 4 之 HMBC、COSY 關聯圖

綜合以上物理及光譜數據,並透過文獻比對⁸,確定 compound 4 為 pinocembrin-7-*O*-[cinnamoyl(1→5)-β-D-apiosyl(1→2)]-β-D-glucopyranoside,為已知化合物。



multiplicities and coupling constants for 4		
Position	$\delta^{13}C^a$	δ^{1} H ^b , mult., Hz
2	79.3	5.44 <i>brd</i> ($J = 13.0$)
3	42.9	3.10 $dd (J = 17.0, 13.0)(\alpha)$
		2.72 dd (J = 17.0, 3.0)(β)
4	196.7	
5	164.1	
6	96.9	6.16 <i>s</i>
7	165.7	
8	95.7	6.18 <i>s</i>
9	163.1	
10	103.9	
1	139.2	
2	126.7	7.50 brs
3'	128.9	7.44 brs
4	128.8	7.44 brs
5	128.9	7.44 brs
6	126.7	7.50 brs
Glc-1	98.5	5.17 d (J = 7.0)
Glc-2	76.2	3.69 m
Glc-3	77.1	3.58 brs
Glc-4	70.7	3.48 brs
Glc-5	77.8	3.69 <i>m</i>
Glc-6	61.7	3.85 <i>m</i>
		3.69 <i>m</i>
Api-1	109.1	5.54 s
Api-2	77.6	4.00 brs
Api-3	78.0	
Api-4	74.5	4.21 s
		3.90 m
Api-5	66.9	4.21 s 2H
1"	166.1	
2"	118.0	6.40 d (J = 16.0)
3"	144.8	7.67 d ($J = 16.0$)
4"	134.6	

Table 3-4 \cdot ¹³C and ¹H NMR chemical shifts in acetone- d_6 ; ¹H

5"	128.4	7.58 brs
6 ["]	129.2	7.44 brs
7"	130.5	7.44 brs
8"	129.2	7.44 brs
9"	128.4	7.58 brs
5-OH		12.01 s

^a Spectra recorded at 125 MHz in acetone- d_6 ^b Spectra recorded at 500 MHz in acetone- d_6





圖 3-30、Compound **4** 之 ¹³C NMR 光譜



圖 3-32、Compound 4 之 HMBC 光譜



圖 3-34、Compound 4 之 DEPT 圖譜



圖 3-35、Compound 4 之 ESIMS 圖譜

第5節、化合物 5 之結構解析



Compound 5 為白色粉末,由電灑式質譜 (ESIMS) 分析顯示,其 分子離子峰為 m/z 416.9 [M-H]⁻,推算其分子式為 $C_{21}H_{22}O_9$ 。由核磁共 振氫及碳光譜 (pyridine- d_5 ,圖 3-55、3-56、Table 3-7),推測此化合物 含有 flavanone 及 β-D-glucose 的特徵吸收訊號;藉由 ¹H-NMR 得知, 芳香族質子區有一組質子吸收訊號 [δ_H 7.52 (2H, brs)、7.37 (3H, brs)], 分別為 flavanone B 環上之 H-2[']、6 與 H-3[']、4[']、5[']之質子,其碳值分別 為 δ_C 125.7 (C-2[']、6['])、128.0 (C-3[']、5['])、127.8 (C-4[']),推測為單取代之 苯環。除此之外,核磁共振氫譜中顯示 δ_H 6.61 (1H, s)、6.63 (1H, s), 分別為 H-6 及 H-8 之質子吸收訊號;而 δ_H 12.45 (1H, s)為 OH 基之吸收 訊號,由 C=O 及 5-OH 的分子內氫鍵所造成,而確定羥基取代於 C-5 的位置上;由此推知此 flavanone 之 A 環為本屬常見的 5,7-dihydroxy group;與化合物 4 之 flavanone 骨架同為 pinocembrin,其 ¹H、¹³C 光 譜數據經由文獻比對完全一致 ⁵⁵。並進一步推斷 β-D-glucose 連接於 flavanone 的 C-7 的位置上。 综合以上論述,並透過文獻比對⁵³,確定 compound 5 為 pinocembrin-7-O-β-D-glucopyranoside,為已知化合物。



multiplicities and coupling constants for 5		
Position	$\delta^{13}C^a$	δ^{1} H ^b , mult., Hz
2	78.4	5.45 <i>dd</i> (<i>J</i> = 13.0, 3.0)
3	42.2	3.17 $dd (J = 17.2, 13.0)(\alpha)$
		2.88 $dd (J = 17.2, 3.0)(\beta)$
4	195.5	
5	163.3	
6	96.7	6.61 <i>s</i>
7	165.5	
8	95.2	6.63 s
9	162.2	
10	103.1	
1	138.1	
2	125.7	7.52 brs
3'	128.0	7.37 brs
4'	127.8	7.37 brs
5	128.0	7. <mark>37 b</mark> rs
6	125.7	7.52 brs
Glc-1	100.4	5.77 d (J = 7.0)
Glc-2	73.5	4.15 m
Glc-3	77.2	4.36 <i>m</i>
Glc-4	69.8	4.15 m
Glc-5	77.9	4.36 m
Glc-6	61.0	4.50 <i>m</i> , 2H
5-OH		12.45 s

Table 3-5 \cdot ¹³C and ¹H NMR chemical shifts in pyridine- d_5 ; ¹H

^a Spectra recorded at 50 MHz in pyridine- d_5

^b Spectra recorded at 200 MHz in pyridine-*d*₅



圖 3-37、Compound 5 之¹³C NMR 光譜



圖 3-38、Compound 5 之 ESIMS 圖譜

第六節、化合物 6 之結構解析



Compound 6 為黃色粉末,由電灑式質譜 (ESIMS) 分析顯示,其 分子離子峰為 m/z 432.9 [M-H]⁻,推算其分子式為 C₂₁H₂₂O₁₀。由核磁共 振氫及碳光譜 (acetone-d₆,圖 3-58、3-59、Table 3-8)發現 flavanone 及 β-D-glucose 的特徵吸收訊號,推知為 flavanone glycoside 的結構。藉由 ¹H NMR 圖譜得知,芳香族質子區有一組 A₂B₂型質子吸收訊號[$\delta_{\rm H}$ 7.40 (2H, d, J = 8.0)、6.90 (2H, d, J = 8.0)],推測為 flavanone B 環上之 H-2[']、 6[']與 H-3[']、5[']之質子,其碳值分別為 $\delta_{\rm C}$ 127.9 (C-2[']、6['])、115.0 (C-3[']、5['])、 157.6 (C-4[']),由此推知 flavanone B 環為對位羥基取代之苯環。而 $\delta_{\rm H}$ 6.13 (1H, d, J = 2.2)、6.17 (1H, d, J = 2.2)為 H-6 及 H-8 之質子吸收訊號,其 碳光譜吸收訊號分別為 $\delta_{\rm C}$ 96.5 (C-6)、95.3 (C-8);除此之外,核磁共 振氫譜中顯示 $\delta_{\rm H}$ 12.08 (1H, s)為 C=O 與 5-OH 的分子內氫鍵所造成, 進一步確認羥基取代於 C-5 的位置上。由此推知,化合物 6 的 flavanone 屬於 naringenin 的骨架;其 ¹H、¹³C 光譜數據經由文獻比對完全一致 ⁵⁴。

醣基的部分,由於此化合物的 flavanone 部分與3同為 naringenin,

經由¹H、¹³C光譜數據比對,推知β-D-glucose 連接於C-7的位置上。
 綜合以上論述,並透過文獻比對⁵⁴,確定 compound 6 為 naringenin 7-O-β-D-glucopyranoside,為已知化合物。



Position	$\delta^{13}C^a$	δ^{1} H ^b , mult., Hz
2	78.9	5.49 <i>dd</i> (<i>J</i> = 13.0, 3.0)
3	42.4	$3.20 \ dd \ (J = 17.0, \ 13.0)(\alpha)$
		2.77 $dd (J = 17.0, 3.0)(\beta)$
4	196.8	
5	163.6	
6	96.5	6.13 d (J = 2.2)
7	165.5	
8	95.3	6.17 d (J = 2.2)
9	162.9	
10	103.8	
1	129.4	
2	127.9	7.40 d ($J = 8.4$)
3'	115.0	$6.90 \ d \ (J = 8.4)$
4	157.6	
5	115.0	6.90 d (J = 8.0)
6	127.9	7.40 d (J = 8.0)
Glc-1	99.9	5.07 d (J = 7.0)
Glc-2	73.3	3.50 m
Glc-3	76.6	3.70 m
Glc-4	69.9	3.50 m
Glc-5	76.7	3.70 m
Glc-6	61.3	3.86 m
		3.70 m
5-OH		12.08 s

Table 3-6 \cdot ¹³C and ¹H NMR chemical shifts in acetone- d_6 ; ¹H

multiplicities and coupling constants for **6**

^a Spectra recorded at 50 MHz in acetone- d_6

^b Spectra recorded at 200 MHz in acetone-*d*₆



圖 3-40、Compound 6 ² ¹³C NMR 光譜



圖 3-41、Compound 6 之 ESIMS 圖譜

第七節、化合物 7 之結構解析



Compound 7 為黃色粉末,由電灑式質譜 (ESIMS) 分析顯示,其 分子離子峰為 m/z 449.2 [M-H],推算其分子式為 $C_{21}H_{22}O_{11}$ 。由核磁共 振氫及碳光譜 (acetone-d₆,圖 3-61、3-62、Table 3-9) 發現 flavanone 及 β-D-glucose 的特徵吸收訊號,推知為 flavanone glycoside 的結構。 由 ¹H NMR 顯示芳香族質子區有一組質子吸收訊號 [δ_{H} 7.04 (1H, s)、 6.87 (2H, brs)],推測為 flavanone B 環上之 H-2 與 H-5 、 6 之質子,其 碳值分別為 δ_{C} 114.8 (C-2)、116.1 (C-5)、119.3 (C-6),由此推知 flavanone B 環為 3,4'-二羟基取代之苯環; δ_{H} 6.12 (1H, d, J = 2.2)、6.16 (1H, d, J =2.2)推測為 H-6 及 H-8 之質子吸收訊號,其碳光譜吸收訊號分別為 δ_{C} 96.5 (C-6)、97.6 (C-8);除此之外,由核磁共振氫譜中發現 δ_{H} 12.07 (1H, s)為 C=O 及 5-OH 形成的分子內氫鍵,確定羟基取代於 C-5 的位置上; 由以上概論,推知此化合物之 flavanone 骨架與 1、2 同為 eriodictyol; 其 ¹H、¹³C 光譜數據經由文獻比對完全一致 ⁴⁷。 而醣基的部份,由於此化合物與 $1 \cdot 2$ 同為 eriodictyol 之 flavanone 骨架,經由 ${}^{1}H \cdot {}^{13}C$ 光譜數據比對,推知 β -D-glucose 連接於 C-7 的位置上。

綜合以上論述,並透過文獻比對⁴⁷,確定 compound **7**為 eriodictyol-7-*O*-β-D-glucopyranoside,為已知化合物。



Position	$\delta^{13}C^a$	δ^{1} H ^b , mult., Hz
2	80.1	5.44 <i>dd</i> (<i>J</i> = 12.6, 3.0)
3	43.6	3.20 $dd (J = 17.0, 12.6)(\alpha)$
		2.77 $dd (J = 17.0, 3.0)(\beta)$
4	197.9	
5	164.7	
6	96.5	6.12 d (J = 2.2)
7	166.7	
8	97.6	6.16 <i>d</i> (<i>J</i> = 2.2)
9	164.0	
10	104.5	
1	131.3	
2	114.8	7.04 s
3	146.5	
4	146.1	
5	116.1	6.87 brs
Ġ	119.3	6.87 brs
glc-1	101.0	5.08 d (J = 7.0)
glc-2	74.5	3.46 m
glc-3	77.9	3.65 m
glc-4	71.1	3.46 m
glc-5	77.9	3.65 m
glc-6	62.5	3.88 m
		3.74 m
5-OH		12.07 s

Table 3-7 \sim ¹³C and ¹H NMR chemical shifts in acetone- d_6 ; ¹H

multiplicities and coupling constants for 7

^a Spectra recorded at 50 MHz in acetone- d_6

^b Spectra recorded at 200 MHz in acetone-*d*₆



圖 3-43、Compound 7 之 ¹³C NMR 光譜



圖 3-44、Compound 7 之 ESIMS 圖譜
第八節、化合物 8 之結構解析



Compound 8 為黃色粉末,由電灑式質譜 (ESIMS) 分析顯示,其 分子離子峰為 m/z 487.2 [M+Na]⁺,推算其分子式為 C₂₂H₂₄O₁₁。由核磁 共振 氫 及碳 光譜 (methanol-d₄,圖 3-64、3-65、Table 3-10)亦發現 flavanone 及 β-D-glucose 的特徵訊號;由¹H NMR 圖譜中顯示,芳香族 質子區有一組 ABX 型的質子吸收訊號[δ_{H} 7.07 (1H, brs)、6.92 (1H, brd, J = 8.2)、6.80 (1H, d, J = 8.2)],推測為 flavanone B 環上之 H-2[']、H-6[']、 5[']之質子,其碳值分別為 δ_{C} 111.4 (C-2['])、120.7 (C-6['])、116.1 (C-5[']),由 此推知 flavanone B 環之 C-3[']、4[']與氧原子連接,其碳值分別為 δ_{C} 149.1 (C-3['])、148.2 (C-4['])。而 δ_{H} 6.18 (1H, s)、6.21 (1H, s)推測為 H-6 及 H-8 之質子吸收訊號,碳值分別為 δ_{C} 98.0 (C-6)、96.9 (C-8)。所以此化合 物在結構上與 7 非常類似,其差異僅為多一個甲氧基的訊號, δ_{H} 3.86 (3H, s)、 δ_{C} 56.5;其¹H、¹³C 光譜數據經由文獻比對,與 homoeriodictyol 完全一致 ⁵⁵。 醣基的部份,經由文獻比對其 ${}^{1}H$ 、 ${}^{13}C$ 光譜數據,確定連接於 C-7 的 位 置 上 55 。 綜 合 以 上 論 述 , 確 定 compound **8** 為 homoeriodictyol-7-*O*-β-D-glucopyranoside,為已知化合物。



multiplicities and	ultiplicities and coupling constants for 8				
Position	$\delta^{13}C^a$	δ ¹ H ^b , mult., Hz			
2	80.8	$5.36 \ brd \ (J = 12.0)$			
3	44.0	$3.19 dd (J = 17.0, 14.0)(\alpha)$			
		2.73 <i>brd</i> ($J = 17.0$)(β)			
4	198.5				
5	164.9				
6	98.0	6.18 <i>s</i>			
7	167.0				
8	96.9	6.21 s			
9	164.6				
10	104.9				
1	131.4				
2	111.4	7.07 brs			
3'	149.1				
4'	148.2				
5	116.1	6.80 d (J = 8.2)			
6	120.7	$6.92 \ brd \ (J = 8.2)$			
glc-1	101.2	4.96 <i>o</i>			
glc-2	74.6				
glc-3	78.2				
glc-4	71.1				
glc-5	77.8				
glc-6	62.3	3.90 <i>o</i>			
		$3.67 \ dd \ (J = 12.0, \ 3.0)$			
OCH ₃ -3'	56.5	3.86 s			

Table 3-8 13 C and ¹H NMR chemical shifts in methanol- d_4 ; ¹H

^a Spectra recorded at 50 MHz in methanol- d_4

^b Spectra recorded at 200 MHz in methanol- d_4



圖 3-46、Compound 8 之 ¹³C NMR 光譜



圖 3-47、Compound 8之 ESIMS 圖譜

第九節、化合物 9 之結構解析



Compound 9 為黃色結晶, 比旋光值 $[\alpha]_{D}^{25}$ -29.7°(c 0.74, MeOH)。 由高解析電灑式質譜 (HRESIMS) 分析顯示,其分子離子峰為 m/z533.2053 $[M+Na]^+$,推算其分子式為 $C_{25}H_{34}O_{11}$ 。由紫外光吸收光譜顯 示 λ_{max} 206、229 (sh)、280nm。紅外線光譜 (IR) 在 3394 cm⁻¹ 有 OH 的訊號, 1592、1508、1465 cm⁻¹ 為苯環訊號。

由核磁共振氫光譜 (methanol- d_4 , 圖 3-29、Table 3-4)顯示,此化合物含有一組醣基的質子吸收訊號 $\delta_H 3.85$ (1H, m)、3.70 (1H, brs)、3.49 (1H, m)、3.46 (1H, m)、3.39 (2H, m) 以及 4.84 (1H, d, J = 7.0, anomeric H);還有芳香族質子吸收訊號 $\delta_H 7.05$ (1H, d, J = 8.0)、6.82 (1H, d, J = 2.0)、6.71 (1H, dd, J = 8.0, 2.0)、6.24 (1H, s);四個甲氧基吸收訊號 $\delta_H 3.83$ (3H, s)、3.77 (3H, s)、3.75 (3H, s)、3.69 (3H, s);以及三個亞甲基上六個質子吸收訊號, $\delta_H 2.56$ (2H, m)、2.53 (2H, m)、1.74 (2H, dd, J = 8.0, 7.0);由核磁共振碳光譜 (圖 3-30、Table 3-4)及 DEPT (圖 3-34)顯示,此化合物除了醣基訊號之外,還有 $\delta_C 154.3 \times 152.1 \times 148.7 \times 134.6 \times 115.2 \times 95.3$ 以及 $\delta_C 149.4 \times 144.7 \times 120.8 \times 117.0 \times 112.8 \times 138.1$ 等,推

測為兩個苯環訊號,分別將其定為A環及B環;還有 propane 的碳光 譜吸收訊號 $\delta_{\rm C}$ 35.4、31.9、22.9;以及甲氧基上的碳光譜吸收訊號 $\delta_{\rm C}$ 60.1、59.9、55.5、54.9;由以上數據,初步推測此化合物為 diphenylpropane glycoside 的結構 ⁵⁶。

由 COSY (圖 3-33) 顯示 $\delta_{\rm H}$ 1.74 (2H, dd, $J = 8.0, 7.0, H_2-2$) 分別與 2.56 (2H, m, H₂-3)、2.53 (2H, m, H₂-1)有偶合,進一步確定為 propane 的結構;再由 HMBC (圖 3-32)得知, δ_{H} 2.53 (2H, m, H₂-1)分別與 δ_{C} 154.3 (C-6')、152.1 (C-2')、115.1 (C-1')有²J 或³J 的關連,因此確定 A 環連接於 C-1 的位置上;且由 HMBC 得知, $\delta_{\rm H}$ 3.77 (3H, s, OCH₃-2) 與 δ_C 152.1 (C-2['])、 δ_H 3.69 (3H, s, OCH₃-6['])與 δ_C 154.2 (C-6['])各有 ³J 的 關連,確認甲氧基取代於 C-2 及 C-6 的位置上, 而 $\delta_{\rm H}$ 6.24 (1H, s)與 $\delta_{\rm C}$ 154.3 (C-6')、148.7、134.6、115.1 (C-1')有²J 或³J 的關連, 推知其為 C-5[']位置上的質子;由HMBC 顯示 δ_H 3.75 (3H, s, OCH₃-3['])與 δ_C 134.6 有³J的關連,再由其化學位移推斷甲氧基取代於 C-3 的位置上, 而 C-4 位置上則由 OH 基所取代,其碳值為 $\delta_{\rm C}$ 148.7;綜合以上推論,確定此 化合物之A環為4'-hydroxy-2',3',6'-trimethoxyphenyl group的結構;由 HMBC 顯示, δ_H 2.56 (2H, m, H₂-3)分別與 δ_C 138.1 (C-1["])、120.8 (C-6")、112.8 (C-2")有²J 或 ³J 的關連,因此確定此化合物之 B 環連接 於 C-3 的位置上;核磁共振氫譜在芳香族質子區還有一組 ABX 型的質 子吸收訊號 〔δ_H 7.05 (1H, d, J = 8.0)、6.82 (1H, d, J = 2.0)、6.71 (1H, dd, J=8.0, 2.0) 〕, 經由 HMBC 及 HMQC (圖 3-31)確認分別為 C-5["]、C-2["]、 C-6[°]位置上之質子;由HMBC 顯示, $\delta_{\rm H}$ 7.05 (1H, d, $J = 8.0, \text{H-5}^{\circ}$)、6.82 (1H, d, J = 2.0, H-2[°])分別與 δ_{C} 149.4 $f^{2}J$ 或³J的關連,因此判斷為C-6[°] 之對位, $I \delta_{H}$ 3.83 (3H, s, OCH₃-3[°])與 δ_{C} 149.4 (C-3[°]) $f^{3}J$ 的關連, 因 此確定甲氧基取代於C-3[°]的位置上; 再由 HMBC 得知 δ_{H} 6.82 (1H, d, J= 2.0, H-2[°])、6.71 (1H, dd, J = 8.0, 2.0, H-6[°])分別與 δ_{C} 144.7 (C-4[°]) $f^{3}J$ 的關連,證實C-4[°]與氧原子相連接;因此確認此化合物之B環為 4[°]-hydroxy-3[°]-methoxyphenyl group 的結構;綜合以上推論,確認此化 合物的部份結構為4[°],4[°]-dihydroxy-2[°],3[°],6[°],3[°]-tetramethoxy-1,3diphenylpropane, 其¹H、¹³C光譜數據經由文獻比對,與 viscolin 完全 一致²。

至於上述之醣基分子,除了氫光譜之外,由碳光譜吸收訊號 δ_{C} 101.9、76.9、76.6、73.7、70.1、61.3,推測為一個六碳醣,並由 anomeric 質子 δ_{H} 4.84 (1H, d, J = 7.0) 之偶合常數得知醣基的部份為一個 β -六碳 醣;經比對文獻的 ¹H、¹³C 光譜數據,證實其為 β -D-glucose ⁵⁶。再由



圖 3-48、Compound 9之 HMBC、COSY 關聯圖

HMBC 圖譜得知, δ_{H} 4.84 (1H, d, J = 7.0, Glc-H-1)與 δ_{C} 144.7 (C-4["])有 ³J 的關連, 確定 β-D-glucose 連接於 1,3-diphenylpropane 的 C-4["]位置上; 綜合以上推論,決定 β-D-glucose 與 1,3-diphenylpropane 之連接方式為 Glc-1-O-4["];並確定 compound **9** 為(4[']-hydroxy-2['],3['],6['],3["]-tetramethoxy-1,3-diphenylpropane)-4["]-O-β-D-glucopyranoside,為新發現之化合物,將 其命名為 viscolin-4["]-O-β-D-glucopyranoside。



 $\delta^{13}C^a$ δ^{1} H^b, mult., Hz Position 2.53 m 2H 1 22.9 2 $1.74 \, dd \, 2H \, (J = 8.0, \, 7.0)$ 31.9 3 35.4 2.56 *m* 2H 1 115.2 2 152.1 3 134.6 4 148.7 *5*['] 95.3 6.24 s *6* 154.3 138.1 1" 2" 112.8 6.82 d (J = 2.0)3" 149.4 4" 144.7 5 7.05 d (J = 8.0)117.0 6" $6.71 \, dd \, (J = 8.0, 2.0)$ 120.8 Glc-1 101.9 4.84 d (J = 7.0)Glc-2 3.49 m 73.7 Glc-3 76.9 3.39 m Glc-4 70.1 3.39 m Glc-5 76.6 3.46 m Glc-6 61.3 3.85 m 3.70 *brs* OCH₃-2' 60.1 3.77 s 3H OCH₃-3' 59.9 3.75 s 3H OCH₃-6' 54.9 3.69 s 3H OCH3-3" 3.83 s 3H 55.5

Table 3-9 \cdot ¹³C and ¹H NMR chemical shifts in methanol- d_4 ; ¹H

multiplicities and coupling constants for **9**

^a Spectra recorded at 125 MHz in methanol-*d*₄

^b Spectra recorded at 500 MHz in methanol-*d*₄



圖 3-50、Compound 9之 13 C NMR 光譜



圖 3-52、Compound 9 之 HMBC 光譜



圖 3-54、Compound 9之 DEPT 圖譜



圖 3-55、Compound 9 之 IR 圖譜



圖 3-56、Compound 9 之 HRESIMS 圖譜

第十節、化合物 10 之結構解析



Compound **10** 為黃色結晶,比旋光值〔 α 〕²⁵_D-38.6°(c 0.44, MeOH)。 由高解析電灑式質譜 (HRESIMS) 分析顯示,其分子離子峰為 *m*/z 533.2039 [M+Na]⁺,推算其分子式為 C₂₅H₃₄O₁₁。由紫外光吸收光譜顯 示 λ_{max} 205、230 (sh)、281 nm。紅外線光譜 (IR) 在 3390 cm⁻¹ 有 OH 的訊號,1592、1512、1457 cm⁻¹為苯環訊號⁵³,1073 cm⁻¹為醣基之訊 號⁵⁷。

由核磁共振氫光譜 (methanol- d_4 , 圖 3-38、Table 3-5)顯示,此化合 物含有一組醣基的質子吸收訊號 $\delta_H 3.90$ (1H, dd, J = 12.0, 2.0)、3.67 (1H, m)、3.50 (1H, m)、3.47 (1H, m)、3.43 (1H, m)、3.37 (1H, m)以及 4.88 (1H, d, J = 7.5, anomeric H);還有芳香族質子吸收訊號 $\delta_H 6.73$ (1H, d, J =2.0)、6.69 (1H, d, J = 7.5)、6.66 (1H, s)、6.60 (1H, dd, J = 8.0, 2.0);四 個甲氧基吸收訊號 $\delta_H 3.82$ (3H, s)、3.81 (3H, s)、3.78 (3H, s)、3.75 (3H, s);三個亞甲基上六個質子吸收訊號, $\delta_H 2.57$ (2H, m)、2.53 (2H, m)、 1.73 (2H, t, J = 7.5);由核磁共振碳光譜 (圖 3-39、Table 3-5)及 DEPT (圖 3-43)顯示,此化合物除了醣基訊號之外,還有 δ_{C} 154.2、152.2、149.4、136.9、118.7、96.9 以及 δ_{C} 147.6、144.2、134.4、120.6、114.8、112.0等,推測為兩個苯環訊號,分別將其定為A環及B環;還有 propane 的碳光譜吸收訊號 δ_{C} 35.5、31.9、23.0;以及甲氧基上的碳光譜吸收訊號 δ_{C} 60.7、60.5、55.2、55.1;由以上數據,初步推測此化合物為 diphenylpropane glycoside 的結構⁵⁶。

由核磁共振氫譜及碳譜比對後發現,化合物 **10** 的主體架構與**9** 相同,含有一個 1,3-diphenylpropane、一個 β-D-glucose 以及四個甲氧基等訊號;由氫譜及碳譜得知,其差異僅在於 viscolin 的 C-5[°]位置上的質子往低磁場移動到 $\delta_{\rm H}$ 6.66 (1H, s, H-5[°]),以及 C-6[°]位置上的甲氧基質子訊號往低磁場移動到 $\delta_{\rm H}$ 3.75 (3H, s, OCH₃-6[°]);由 HMBC 圖譜(圖 3-41)及其關聯圖(圖 3-37)發現, $\delta_{\rm H}$ 4.88 (1H, d, J = 7.5, Glc-H-1)與 $\delta_{\rm C}$ 149.4 (C-4[°])有 ³J 的關連,確定 β-D-glucose 以 C-1 連接於 1,3-diphenylpropane



COSY

圖 3-57、Compound 10 之 HMBC、COSY 關聯圖

的 C-4[']位置上。綜合以上推論,證實化合物 10 與 9 之差異僅在於 β-D-glucose 連接於 viscolin 的不同位置上。

綜合以上物理及光譜數據, 確定 compound **10** 為 (4"-hydroxy-2',3',6',3"-tetramethoxy-1,3-diphenylpropane)-4'-O- β -D-glucopyranoside,為新發現之化合物,將其命名為 viscolin-4'-O- β -D-glucopyranoside。



tiplicities and coupling constants for 10				
Position	$\delta^{13}C^a$	δ ¹ H ^b , mult., Hz		
1	23.0	2.57 <i>m</i> 2H		
2	31.9	1.73 <i>t</i> 2H (<i>J</i> = 7.5)		
3	35.5	2.53 <i>m</i> 2H		
1	118.7			
2	152.2			
3	136.9			
4	149.4			
5	96.9	6.66 s		
6 [°]	154.2			
1"	134.4			
2"	112.0	6.73 d (J = 2.0)		
3"	147.6			
4"	144.2			
5"	114.8	6.69 $d (J = 7.5)$		
6"	120.6	$6.60 \ dd \ (J = 8.0, 2.0)$		
Glc-1	102.2	4.88 d (J = 7.5)		
Glc-2	73.8	3.50 m		
Glc-3	77.3	3.47 m		
Glc-4	70.4	3.37 m		
Glc-5	76.9	3.43 m		
Glc-6	61.5	$3.90 \ dd \ (J = 12.0, \ 2.0)$		
		3.67 m		
OCH ₃ -2'	60.5	3.78 s 3H		
OCH ₃ -3'	60.7	3.81 s 3H		
OCH ₃ -6'	55.1	3.75 s 3H		
OCH ₃ -3"	55.2	3.82 s 3H		

Table 3-10 \cdot ¹³C and ¹H NMR chemical shifts in methanol- d_4 ; ¹H

^a Spectra recorded at 125 MHz in methanol- d_4

^b Spectra recorded at 500 MHz in methanol-*d*₄



圖 3-59、Compound 10 之 13 C NMR 光譜



圖 3-60、Compound 10 之 HMQC 光譜



圖 3-61、Compound 10 之 HMBC 光譜



圖 3-63、Compound 10 之 DEPT 圖譜



圖 3-64、Compound 10 之 IR 圖譜



圖 3-65、Compound 10 之 HRESIMS 圖譜

第十一節、化合物 11 之結構解析



Compound **11** 為白色粉末,比旋光值 $[\alpha]_{D}^{25}$ +52.6°(c 0.38, MeOH)。 由高解析電灑式質譜 (HRESIMS) 分析顯示,其分子離子峰為 *m*/z 465.1392 [M+Na]⁺,推算其分子式為 C₂₀H₂₆O₁₁。由紅外線光譜 (IR) 在 3382 cm⁻¹ 有 OH 的訊號,1627 cm⁻¹ 為 C=O 基之訊號,1587、1445 cm⁻¹ 為苯環訊號,1073 cm⁻¹ 為醣基的訊號。由紫外光吸收光譜顯示 λ_{max} 216、275 nm。

由核磁共振氫光譜 (methanol- d_4 , 圖 3-47、Table 3-6) 顯示此化合 物含有兩組醣基訊號 $\delta_{\rm H}$ 5.26 (1H, d, J = 3.0)、5.17 (1H, s)、4.32 (2H, brs)、4.10 (1H, dd, J = 9.5, 3.0)、4.07 (1H, s)、3.86 (1H, dd, J = 9.5, 2.5)、 3.83 (1H, m)、3.77 (2H, brs)、3.68 (1H, m)、3.34 (2H, brs); 還有芳香族 質子吸收訊號 $\delta_{\rm H}$ 7.61 (2H, brs)、7.41 (3H, brs); 以及一個反式乙烯基之 質子吸收訊號 $\delta_{\rm H}$ 7.77 (1H, d, J = 17.0)、6.58 (1H, d, J = 16.0); 由核磁共 振碳光譜 (圖 3-48、Table 3-6)及 DEPT (圖 3-52)顯示, 醣基碳光譜吸收 訊號為一個四級碳 $\delta_{\rm C}$ 77.8, 七個三級碳 $\delta_{\rm C}$ 111.0、92.5、80.3、77.4、 72.5、71.5、70.7, 及三個二級碳 $\delta_{\rm C}$ 74.0、66.5、61.5。此外, 四級碳 $\delta_{\rm C}$ 167.2 推測為 C=O 基,而三級碳 δ_c 130.4、128.9、128.1 為苯環訊號;
由以上數據,初步推測此化合物含有一個苯環衍生物及一個六碳醣和 一個五碳醣。

由核磁共振氫及碳光譜得知,此化合物含有一個 trans-cinnamoyl group、β-D-apiose 以及一個六個碳的醣基訊號;由 HMBC (圖 3-50)及 DEPT 得知 $\delta_{\rm H}$ 5.17 (1H, s, Api-H-1)與四級碳 $\delta_{\rm C}$ 77.8 (Api-C-3)及二級碳 $\delta_{\rm C}$ 74.0 (Api-C-4)有 ³J 的關連,進一步確定五碳醣的部份為β-D-apiose; 再由 anomeric 質子 $\delta_{\rm H}$ 5.26 (1H, d, J = 3.0, Glc-H-1)之偶合常數推知醣基 的部分還有一個 α -六碳醣,其氫碳光譜吸收訊號經由文獻比對確認為 α -D-glucose 的構形 ⁵⁸;除此之外,藉由 HMBC 得知 $\delta_{\rm H}$ 4.32 (2H, brs, Api-H₂-5)與 $\delta_{\rm C}$ 167.2 (C-1)有 ³J 的關連,推知 β-D-apiose 以 C-5 位置與 trans-cinnamoyl group 之 C-1 相連接。HMBC 顯示 $\delta_{\rm H}$ 5.17 (1H, s, Api-H-1) 與 $\delta_{\rm C}$ 80.3 有 ³J 的關連,經由文獻比對 α -D-glucose 的 ¹H、¹³C 光譜數



圖 3-66、Compound 11 之 HMBC、COSY 關聯圖

據,發現與醣基連接在 C-3 位置的 α-D-glucose 完全一致 58,59 ,確定 β-D-apiose 以 C-1 位置與 α-D-glucose 之 C-3 相連接;綜合以上推論, 確認 *trans*-cinnamoyl group 與 β-D-apiose 之連接方式為 1-O-Api-5, β-D-apiose 與 α-D-glucose 之連接方式為 Api-1-O-Glc-3。

綜合以上物理及光譜數據,確定 compound 11 為 5-O-trans-cinnamoyl-β-D-apiosyl(1→3)- α -D-glucopyranoside,為新發現 之化合物。



Position	$\delta^{13}C^a$	δ ¹ H ^b , mult., Hz
1	167.2	
2	117.4	6.58 d (J = 16.0)
3	145.5	7.77 $d (J = 17.0)$
4	134.6	
5	128.1	7.61 brs
6	128.9	7.41 brs
7	130.4	7.41 brs
8	128.9	7.41 brs
9	128.1	7.61 brs
Glc-1	92.5	5.26 d (J = 3.0)
Glc-2	71.5	3.77 brs
Glc-3	80.3	3.34 brs
Glc-4	70.7	3.34 brs
Glc-5	72.5	3.77 brs
Glc-6	61.5	3.83 m
~		3.68 m
Api-1	111.0	5.17 s
Api-2	77.4	4.07 s
Api-3	77.8	
Api-4	74.0	4.10 <i>dd</i> (<i>J</i> = 9.5, 3.0

Table 3-11 \cdot ¹³C and ¹H NMR chemical shifts in methanol- d_4 ; ¹H

^a Spectra recorded at 125 MHz in methanol- d_4

^b Spectra recorded at 500 MHz in methanol- d_4



圖 3-68、Compound 11 之¹³C NMR 光譜



圖 3-70、Compound 11 之 HMBC 光譜



圖 3-72、Compound 11 之 DEPT 圖譜



圖 3-73、Compound 11 之 IR 圖譜



圖 3-74、Compound 11 之 HRESIMS 圖譜

第十二節、化合物 12 之結構解析



Compound 12 為白色粉末,由電灑式質譜 (ESIMS) 分析顯示,其 分子離子峰為 m/z 455.4 [M-H],推算其分子式為 $C_{30}H_{48}O_3$ 。由核磁共 振氫光譜 (methanol- d_4 ,圖 3-75、Table 3-12) 顯示 7 個甲基之單峰質子 訊號於 δ_H 1.16 (3H, s)、0.97 (3H, s)、0.94 (6H, s)、0.91 (3H, s)、0.80 (3H, s)、0.78 (3H, s),因此判定此化合物屬於 oleanolic type 之 triterpene 類 型結構;由¹³C NMR (圖 3-76、Table 3-12)、HMQC (圖 3-77)與 DEPT (圖 3-80)確定 7 個單峰質子訊號分別為 CH₃-27、23、25、30、29、26、24 之甲基質子訊號;而在 δ_H 5.23 (1H, t, J = 3.5)之質子訊號為雙鍵上之 H-12;而 δ_H 3.14 (1H, dd, J = 11.0, 4.5)為 oxymethine 之質子吸收訊號, 推知為 H-3。¹³C NMR 顯示, δ_C 180.7 有 C=O 之吸收訊號,推測為 C-28 位上的 carboxyl group。

綜合以上論述,推測 compound 12 為 oleanolic acid,其¹H、¹³C 光

譜數據,經由文獻比對⁶⁰,完全一致,為已知化合物。



Table 3-12 \cdot ¹³C and ¹H NMR chemical shifts in methanol- d_4 ; ¹H

Position	$\delta^{13}C^a$	δ ¹ H ^b , mult., Hz
1	38.7	
2	26.7	
3	78.5	3.14 <i>dd</i> (<i>J</i> = 11.0, 4.5)
4	38.7	
5	55.6	
6	18.3	
7	32.8	
8	39.4	~
9	47.5	
10	37.0	
11	22.9	
12	122.5	$5.23 \ dd \ (J = 3.5, \ 3.5)$
13	144.0	
14	41.7	
15	27.7	
16	23.3	
17	46.5	
18	41.5	2.84 dd (J = 14.0, 4.0)
19	46.1	
20	30.4	
21	33.7	
22	32.6	
23	27.6	
24	15.1	
25	14.7	
26	16.6	
27	25.2	
28	180.7	
29	32.4	
30	22.8	

multiplicities and coupling constants for 12

^a Spectra recorded at 125 MHz in methanol- d_4

^b Spectra recorded at 500 MHz in methanol- d_4



圖 3-76、Compound 12 之¹³C NMR 光譜



圖 3-78、Compound 12 之 HMBC 圖 譜



圖 3-80、Compound **12** 之 DEPT 圖譜


圖 3-81、Compound 12 之 ESIMS 圖譜

第四章、生物活性試驗

第一節 清除 DPPH 自由基之抗氧化實驗

DPPH 全名為1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (圖4-1),是一個含奇數 電子之穩定型自由基,可溶於甲醇或乙醇,且於波長517 nm下有強吸 光值,當其被抗氧化劑還原時,吸光值會降低甚至消失,所以藉由517 nm之吸光值來判斷化合物是否具有提供氫原子以捕捉 DPPH 自由基 之能力。



圖 4-1、1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl,DPPH 之化學結構式

一、實驗方法

- (一) 以甲醇配製DPPH 溶液,濃度為0.75 mM
- (二) 將待測之化合物以甲醇分別稀釋成下列不同濃度:
 - 1. 200 µg/mL
 - $2.\ 100\ \mu\text{g/mL}$
 - 3. 50 µg/mL

4. 25 μg/mL

5. 12.5 µg/mL

- (三) 取120 μL 樣品,依次序加入96-well plate,注入30 μL DPPH。
- (四) 於避光的狀況下,於 shaker 上搖晃反應 30 分鐘。
- (五) 以ELISA reader 測量於波長517 nm之吸光值,吸光值越低表示清除DPPH能力越強
- (六) 計算自由基清除率(%):

清除率(%)=〔1-(樣品吸光值/未加樣品之對照組吸光值)〕×100

二、實驗結果

- (一)由表4-1的結果發現化合物 8 在200 μg/mL時有33.28%的中度清除活性,化合物 9、10在200 μg/mL分別有72.61及86.84%的清除率,而化合物 1、2、7在200 μg/mL皆有95%以上的DPPH清除活性。
- (二) 清除DPPH效果較顯著的化合物 1、2、7 進行ED₅₀值的檢測,化合物 1 之ED₅₀為21.76 μg/mL,化合物 2 之ED₅₀為19.81 μg/mL, 而化合物 7 之ED₅₀為16.13 μg/mL,其中以化合物 7 與 α-tocopherol的活性較為接近(ED₅₀=12.15 μg/mL)。

Compounds	nds Redical scavenging activity	
	(%, 200 µg/mL)	
1	99.61	
2	99.72	
3	8.71	
4	5.38	
5	2.16	
6	3.83	
7	95.51	
8	33.28	
9	72.61	
10	86.84	
11	NT NT	
12	1.28	

表 4-1:清除自由基之抗氧化實驗結果

sample 濃度 200 µg/mL

清除率(%)=〔1-(樣品吸光值/未加樣品之對照組吸光值)〕×100

- 1. methanol或ethanol+DPPH之吸光值為對照組
- 2. 對照組之吸光值須控制在1.00左右
- 3. DPPH 溶液需震盪或攪拌20~30分鐘使其完全溶解

4. 樣品吸光值須扣除以methanol或ethanol溶解DPPH時於517 nm時 之吸光值

NT : no test

表 4-2: 化合物 1、2、7、9、10 與 α-tocopherol 之 ED₅₀ 比較表

Compounds	ED ₅₀ (µg/mL)
a-tocopherol	12.15
1	21.76
2	19.81
7	16.13
9	90.20
10	52.56

Positive control : α -tocopherol

第二節 抗發炎活性實驗

本實驗利用 LPS (lipopolysaccharide)誘導小鼠巨噬細胞(murine macrophage-like cell line, RAW 264.7)產生一氧化氮(NO)的細胞模式,進行抗發炎實驗,檢測化合物抑制受刺激之巨噬細胞一氧化氮的產生量,為評量其抗發炎活性之基準。同時進行 MTT 細胞毒殺試驗,測試化合物對細胞之毒殺活性,以釐清一氧化氮含量降低是否出自於細胞死亡。

一、實驗步驟

(一) 細胞培養

小鼠巨噬細胞(murine macrophage-like cell line, RAW 264.7)培 養於含有 10 %胎牛血清(fetal calf serum, FCS)之培養基 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)中,並加入抗生素 penicillin (100 units/mL)及 streptomycin (100 µg/mL), 置入 5% CO₂、37℃恆溫培 養箱中培養。

(二) 測試樣品之濃度配置

秤取 1.0 mg sample 以 100 % DMSO 調配濃度為 20 mg/mL 再
以 1× PBS 作序列稀釋成 100、20、10、5、1 μg/mL 稀釋樣品。

(三) Nitrite 分析與細胞存活率實驗

24 小時後取出細胞並將新的 DMEM 及 FBS 置換到 96 孔培養

盤內,分別加入不同濃度之樣品及LPS(1 μg/mL Sigma, Cat No: L-2654)後,置入5% CO₂、37℃恆溫培養箱中反應24小時。反應 過後,取上清液進行 NO 含量的測試,而細胞則進行 MTT 細胞存 活率實驗。

於上清液中加入 Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% N-(1-naphthyl)ethyl-enediamine dihydrochloride in 2.5% phosphoric acid solution),於室溫下反應 10 分鐘,再以 ELISA reader 測量 540 nm 之吸光值,並換算為 nitrite 所含的濃度。

MTT colorimetric assay 參考並修改於 Mosmann⁶¹,活細胞中的 粒腺體(mitochondria)含有各種脫氫酵素(dehydrogen-ase),此酵素 與 MTT 反應,會將 MTT 之 tetrazolium 環切斷形成 formazan。此 時,顏色由淡黃色轉變為暗藍色。加入 MTT (5 µg/mL)於培養基中 (10 µLper 100 µLculture),培養於 37℃恆溫培養箱中4小時。加入 DMSO 溶解 formazan 結晶後利用酵素免疫分析儀(ELISA reader)讀 取波長 550 nm 之吸光度,未加藥之 control 組所測得的吸光值,視 為存活率 100 %。

二、實驗結果

本實驗將椆櫟柿寄生所分離出的化合物,對 LPS 誘導的 RAW 264.7 巨噬細胞進行抑制一氧化氮產生的實驗,評估各化合物的抗發炎 活性以及對細胞存活率的影響。

由表 4-3 及圖 4-3、4-4 實驗結果發現,由椆櫟柿寄生所分離出的 化合物,對 RAW 264.7 巨噬細胞產生一氧化氮均具有濃度相關性抑制 的活性,所有檢測的化合物在 20 μg/mL 濃度下都達到 50%以上的抑制 率,而化合物 1、3、10、12 的抑制率更達到 70%以上,其 IC₅₀分別 為 9.11、10.39、10.53、11.39 μg/mL。

綜合以上實驗結果, 椆櫟柿寄生所分離出的化合物在抗發炎的部份具有顯著的活性, 且對 RAW 264.7 巨噬細胞幾乎沒有毒殺的作用。



Compounds	IC ₅₀ (µg/mL)	Cell viability (%, in 10 µg/mL)
Quercetin	10.31	117.49
1	9.11	129.17
2	14.63	132.93
3	10.39	99.73
4	13.45	148.29
5	13.51	74.47
6	17.90	142.05
7	17.83	129.62
8	10.53	88.65
9	15.42	77.02
10	14.49	67.29
11	NT	NT
12	11.39	74.53

表 4-3:抗發炎及細胞存活率實驗結果

Quercetin : positive control

IC₅₀ : Half maximal inhibitory concentration

NT: no test

※ 感謝財團法人食品工業發展研究所 吴明德 博士合作進行抗發炎活

性實驗之檢測。



圖 4-2、Quercetin 之化學結構





圖4-4、化合物9、10抗發炎及細胞存活率實驗結果



第三節 抗病毒活性實驗

本實驗使用非洲綠猴腎臟細胞(Vero cells)作為單純疱疹病毒第一型 (herpes simplex virus type 1, HSV-1)的感染宿主,檢測椆櫟柿寄生的 粗萃取物(Fraction)及其純化物對單純疱疹病毒第一型的複製之抑制活 性。

QL,

一、實驗方法

(一) 宿主細胞培養

將 Vero cells 培養於 Eagle's minimum essential medium (MEM) 中,並加入 10% 胎牛血清 (Fetal calf serum; FCS) 及抗生素,將 細胞放入 37°C、5% CO2 的恆溫培養箱進行培養。

(二) 測試樣品之濃度配置

以 100 %的 DMSO 溶解椆櫟柿寄生的粗萃取物與純化合物。將 5 mg 的粗萃取物稀釋為 100 μg/mL 的稀 釋樣品; 秤取 2 mg 的純化合物調配為 100 μM 的濃度。

(三) 實驗步驟

 將各種不同濃度之分離產物與單純疱疹病毒第一型分別加入已形成單層之 Vero 細胞株中,置入 37 °C的恆溫培養箱 中反應一小時。 經過 1 小時吸收反應後,以 2% Methylcellulose覆蓋之,5 天 後經Crystal violet 染色,計算 Plaque 數目與對照組比較,算 出藥物抑制的百分比,其公式如下:

Plaque No.(Control) - Plaque No.(Experiment)

Inhibitory Activity (%) =------ x 100

Plaque No.(Control)

二、實驗結果

椆櫟柿寄生的酒精萃取物(ethanol extract)及其透過液相分配後獲 得的 n-Hexane、EtOAc 和 Butanol layer 等粗萃物,抑制單純疱疹病毒 第一型(HSV-1)複製之活性結果如表 4-4 所示,結果顯示 n-Hexane layer 會造成細胞死亡,具有細胞毒性;Butanol layer 粗萃物在 100 μg/mL 的 濃度下有 22.80 的輕度的抑制活性;Ethanol extract 在 100 μg/mL 的濃 度下有 46.25 %的中度的抑制活性;EtOAc layer 在 100 μg/mL 的濃度下 有 94.38 %的高度的抑制活性。

· 椆櫟柿寄生所分離出的純化合物 1~8 和 12,抑制單純疱疹病毒第 一型(HSV-1)複製之活性結果如表 4-5 所示,結果顯示 12 具有細胞毒 性,5則不具抑制活性; 3、6、7 在 100 μM 的濃度下,具有 10% 左右 的微弱抑制活性;4、8 在 100 μM 的濃度下,分別有 19.27%、14.68 的輕度抑制活性;1、2 在 100 μM 的濃度下,分別有 44.04、37.92%的 中度抑制活性。

Samples	Inhibitory Activity (%)
Ethanol extract	46.25±7.04
<i>n</i> -Hexane layer	(-)
EtOAc layer	94.38±2.65
Butanol layer	22.81±1.95
ドロ 曲 広 ・ 100 / 1	

表 4-4: 粗萃取物抑制 HSV-1 複製之抗病毒實驗結果

樣品濃度:100 μg/mL

(-) : Heavy cell lysis

NT : no test

Compounds	Inhibitory Activity (%, 100 µM)
	44.04±6.42
2	37.92±4.14
3	11.93±0.0
4	19.27±0.0
5	-10.09±6.49
6	7.80±1.95
7	9.63±7.14
8	14.68±2.59
9	NT
10	NT
11	NT
12	(-)

表 4-5:純化合物抑制 HSV-1 複製之抗病毒實驗結果

樣品濃度:100 μM

(-) : Heavy cell lysis

NT: no test

※ 感謝輔仁大學生命科學研究所 郭育綺 教授合作測試抗病毒活性。

第四節 癌細胞毒殺分析實驗

一、細胞毒殺實驗原理

本實驗利用 colorimetric MTT assay 之 3-(4,5-dimethylthiazo-2diphenyl)-tetrazolium bromide (MTT)來檢測化合物對癌症細胞的毒殺活 性。活細胞中的粒線體(mitochondria)含有各種脫氫酵素(dehydrogenase),此酵素與 MTT 反應,會將 MTT 之 tetrazolium 環切斷形成 formazan。此時,顏色由淡黃色轉變為暗藍色。可利用酵素免疫分析儀 (ELISA reader)讀取波長 550 nm 之吸光度,並計算 ED₅₀ (µg/mL)。

由於死亡之細胞內不含脫氫酵素,因此MTT並不會遭受破壞,而 吸光度也不會改變,本法即利用此原理,以ELISA reader 測定 550 nm 之吸光度,以判別化合物對細胞之毒性。

二、實驗材料

(一) 培養基及試液

- 1. Fetal bovine serum (10% FBS)
- 2. Dulbecco's MEM (DMEM)
- 3. Minimum essential medium-eagle (MEM)
- 4. 3-(4,5-dimethylthiazo-2- diphenyl)-tetrazolium bromide (MTT)
- 5. Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- 6. Phosphate-buffer saline (PBS)

(二) 癌細胞種類及來源

1. Human breast adenocarcinoma (MCF-7, 胸腺纖維母細胞瘤)

2. Human laryngeal carcinoma (Hep2, 喉鱗狀細胞瘤)

3. Human medulloblastoma (Doay, 神經管母細胞瘤)

使用之癌細胞有 MCF-7、Hep2、Doay 等,皆購自財團法人食品工業發展研究所。

三、實驗方法

(一) 癌細胞(Cell lines)之配置

將 MCF-7、Doay、Hep2 培養在 10%胎牛血清(fetal calf serum)及 含 100 units/mL penicillin 和 100 µg/mL streptomycin 的 MEM 培養 基,放置於 5% CO₂、37℃之恆溫培養箱中培養。

(二) 測試樣品之濃度配置

秤取 2.0 mg sample 以 100 % DMSO 調配濃度為 20 g/L,再以 1×
PBS 作序列稀釋成 400、200、100、10 mg/L 之稀釋樣品。

(三) 實驗步驟

當癌細胞生長至培養基單層長滿時,以 trypsin 處理並收集細胞,經染劑(Trypan blue solution 0.4%)染色並置於血球計數盤上,利用顯微鏡計算細胞數目。以每孔至 3 × 10³cells、180 µL 培養基之條件將細胞植至96孔培養基上,4小時後添加樣品,於5% CO₂、37℃ 之恆溫培養相中培養72小時。

72小時後,在每個孔洞中加入 MTT 20 μL (2 mg/mL),移入恆

温培養箱中培養4小時後,洗去上清液。於每個孔洞中加入 200 μL 的DMSO,溶解formazan結晶,再以酵素免疫分析儀(ELISA reader) 於波長540 nm下,測定其吸光度(Optical density: O.D.),並計算樣 品之ED₅₀。

四、實驗結果

本實驗將椆櫟柿寄生所分離出的化合物1~8和12,對MCF-7、 Hep2、Doay等癌細胞株進行一系列的細胞毒殺測試,評估各化合物對 癌細胞的毒性大小。

由表4-6的實驗結果發現,化合物 1 對三個癌細胞株僅具有微弱的 細胞毒殺活性。而化合物 12 對MCF-7具有輕度的毒殺活性,其ED₅₀ 為13.22 μ g/mL。而其他化合物對這三種癌細胞株皆不具有細胞毒殺之 活性 (ED₅₀ \geq 40 μ g/mL)。

Compounds	ED ₅₀ (µg/mL)		
	MCF-7	Hep2	Doay
1	35.70	31.57	22.24
2	(-)	(-)	(-)
3	(-)	(-)	(-)
4	(-)	(-)	(-)
5	(-)	(-)	(-)
6	(-)	(-)	(-)
7	(-)	(-)	(-)
8	(-)	(-)	(-)
9	NT	NT	NT
10	NT	NT	NT
11	NT	NT	NT
12	13.22	20.37	35.18

表 4-6	:	細胞毒殺實驗結果

1. MCF-7: Human breast adenocarcinoma (胸腺纖維母細胞瘤)

2. Hep2: Human laryngeal carcinoma (喉鱗狀細胞瘤)

3. Doay: Human medulloblastoma (神經管母細胞瘤)

(-) : $ED_{50} \ge 40 \ \mu g/mL$

NT : no test

Standard Mitomycin C :

Doay $ED_{50} = 0.04 \ \mu g/mL$ MCF-7 $ED_{50} = 0.16 \ \mu g/mL$ Hep2 $ED_{50} = 0.10 \ \mu g/mL$

註: ED₅₀ (Half maximal effective dose): 代表藥物影響 50% 癌細

胞生長之毒殺濃度。

第五章、結論

- -、 棚櫟柿寄生(Viscum articulatum)全株植物的酒精萃取物,經液相分配後,由乙酸乙酯層中分離得到十二個化合物,包括八個flavanone 化合物,分別為 visartiside A (1)、visartiside B (2)、 naringenin-7-O-[5-O-trans-cinnamoyl-β-D-apiosyl(1→2)]-β-D-glucopyranoside (3)、pinocembrin-7-O-[cinnamoyl(1→5)-β-D-apiosyl (1→2)]-β-D-gluco-pyranoside (4) pinocembrin-7-O-β-D-glucopyranoside (5)、naringenin-7-O-β-D-glucopyranoside (6)、eriodictyol-7-O-β-D-glucopyranoside (5)、 naringenin-7-O-β-D-glucopyranoside (6)、eriodictyol-7-O-β-D-glucopyranoside (7)、 homoeriodictyol-7-O-β-D-glucopyranoside (8); 二個 1,3-diphenylpropane 化合物,分別為viscolin-4^{*}-O-β-D-glucopyranoside (9)、viscolin-4^{*}-O-β-D-glucopyranoside (10); 一個 benzenoids 化合物,5-O-trans-cinnamoyl-β-D-apiosyl(1→3)-α-D-glucopyranoside (11); 以及一個 triterpene 化合物, oleanolic acid (12),其中1、2、3、9、10、11 為新化合物。
- 二、將椆櫟柿寄生所分離出的化合物 1~10 和 12,分別進行抗氧化實驗,結果顯示化合物 1、2、7 在 200 μg/mL 皆具有 95%以上的清除率,其 ED₅₀分別為 21.76、19.81、16.13 μg/mL,其中化合物 7的清除能力與α-tocopherol (ED₅₀=12.15 μg/mL)相當接近。由清除DPPH 自由基能力的實驗結果發現,椆櫟柿寄生所分離出的

flavanones 化合物,在抗氧化活性的表現上與其結構具有密切的 關連性,當 flavanone B 環上的羥基取代增加時,化合物對 DPPH 自由基的移除率有明顯增加的趨勢,如化合物 1、2、7 皆屬於 flavanone B 環為 3['],4[']-dihydroxy-phenyl group 的 eriodictyol 骨 架,較其他類型的 flavanones 具有更顯著的清除能力(P<0.05), 因此推測 flavanone B 環上的羥基取代,為抗氧化作用當中提供 電子的主要官能基。然而,含有 cinnamoyl group 的化合物 1、2、 3、4 其 DPPH 移除率也較相同骨架的 flavanone glycosides 有稍微 增加的趨勢。

三、抗發炎實驗結果顯示, 椆櫟柿寄生所分離出的化合物 1~10 和 12,對LPS 誘導的 RAW 264.7 巨噬細胞產生一氧化氮均具有濃 度相關性的抑制活性,所有檢測的化合物在 20 μg/mL 的濃度下 都達到 50%以上的抑制率,而1、3、8、12 的抑制率更達到 70 %以上。但12 對 RAW 264.7 巨噬細胞具有微弱的毒殺作用,可 能也是降低一氧化氮產生的原因之一。若考慮細胞存活率及抗發 炎活性的表現,1、3、8 與 Quercetin 所表現出的結果相當接近, 尤其是化合物 1 的 IC₅₀為 9.11 μg/mL,優於 Quercetin 的 10.31 μg/mL。在結構上化合物 1 與 Quercetin 的 flavanoid 骨架相似,B 環上皆有兩個輕基取代,且化合物 1 對 RAW264.7 巨噬細胞不具 有毒殺的活性。

- 四、抑制單純疱疹病毒第一型(HSV-1)的抗病毒實驗結果顯示, 椆櫟 柿寄生酒精萃取物的乙酸乙酯層, 在 100 μg/mL 時具有 94.38 % 的高度的抑制活性。純化物的部份,以 1、2 所表現出的活性較 為顯著,在 100 μM 的濃度下,分別有 44.04、37.92 %的中度抑 制活性。曾有相關的研究報導, cinnamoyl group 具有加強化合物 抗病毒活性的能力⁶²,由化合物 1、2 所表現出的結果,得到進 一步的證實。
- 五、細胞毒殺實驗結果顯示, 椆櫟柿寄生所分離出的 flavanone glycosides 化合物 1~8, 在癌細胞毒殺的部份不具有明顯的效果;而 triterpenoid 骨架 oleanolic acid (12),則對 MCF-7 具有輕度的細胞毒殺活性。
- 六、 Visartiside A (1) 在抗發炎及抗氧化實驗中,皆展現出優異的活 性。一般而言,優越的抗氧化劑可能具有微弱的抗發炎活性⁶³, 本實驗結果更加強此論點,且 visartiside A (1)在抗病毒活性上的 表現,也進一步的證實 cinnamoyl group 具有加強化合物抗病毒 及抗氧化活性的能力⁶⁴。由本實驗結果顯示, visartiside A (1)具有 繼續研究開發的價值,可針對其藥理作用機轉進行深入的探討, 期許能發展成為新穎的抗發炎、抗氧化或抗病毒藥物。

第六章、参考文獻

- 1. Bandyopadhyay, S.; Sengupta, TK.; Fernandes, DJ.; Spicer, EK. Taxoland okadaic acid-induced destabilization of bcl-2 mRNA is associated with decreased binding of proteins to a bcl-2 instability element. *Biochem. Pharmacol.*, **2003**, 66, 1151-1162.
- Leu, Y. L.; Hwang, T. L.; Chung, Y. M.; Hong, P. Y., The Inhibition of Superoxide Anion Generation in Human Neutrophils by *Viscum coloratum. Chem. Pharm. Bull.*, 2006, 54, 1063-1066.
- 3. Hwang, T. L.; Leu, Y. L.; Kao, S. H.; Tang, M. C.; Chang, H. L. Viscolin, a new chalcone from Viscum coloratum, inhibits human neutrophil superoxide anion and elastase release via a cAMP-dependent pathway. *Free Radic. Biol. Med.*, 2006, 41, 1433–1441.
- 4. Yao, H.; Zhou, G. X.; Wu, Q.; Lei, G. Q.; Chen, D. F.; Chen, J. K.; Zhou, T. S. Mistletonone, a Novel Antioxidative Diarylheptanoid from the Branches and Leaves of *Viscum coloratum*. *Molecules*, 2007, 12, 312-317.
- Yao, H.; Liao, Z. X.; Wu, Q.; Lei, G. Q.; Liu, Z. J.; Chen, D. F.; Chen, J. K.; Zhou, T. S. Antioxidative Flavanone Glycosides from the Branches and Leaves of *Viscum coloratum*. *Chem. Pharm. Bull.*, 2006, 54, 133-135.

- Kim MS.; Lee, J.; Lee, KM.; Yang, SH.; Choi, S.; Chung, SY.; Kim, TY.; Jeong, WH.; Park, R. Involvement of hydrogen peroxide in mistletoe lectin-II-induced apoptosis of myeloleukemic U937 cells. *Life Sciences*, 2003, 73, 1231-1243.
- Lyu, SY.; Park, WB.; Choi, KH.; Kim, WH. Involvement of Caspase-3 in Apoptosis Induced by *Viscum album* var. *coloratum* Agglutinin in HL-60 Cells. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 2001, 65, 534-541.
- Leu, Y. L.; Kuo, S. M.; Hwang, T. L.; Chiu, S. T. The Inhibition of Superoxide Anion Generation by Neutrophils from *Viscum* articulactum. Chem. Pharm. Bull., 2004, 52, 858-860.
- 9. Huang, T. C. et al. Flora of Taiwan, volume 2, second edition, **1994**, pp 283-285.
- 陳堃霖,國立中興大學森林學研究所碩士論文,台灣產桑寄生科分類之研究,1987,pp 69-76.
- 印年永、張光雄,原色台灣藥用植物圖鑑(2),第一版,台北,南 天書局發行,1986,pp 24.
- Jincai, L.; Qishi, S.; Kazunori, S.; Yasuhiro, S.; Hiroyuki, K. Effect of Six Compounds Isolated from Rhizome of *Anemone raddeana* on the Superoxide Generation in Human Neutrophil. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, 280, 918-922.
- 13. Shen, Y. C.; Chen, C. F.; Chiou, W. F. Andrographolide prevents oxygen radical production by human neutrophils: possible

mechanism(s) involved in its anti-inflammatory effect. *Br. J. Pharmacol.*, **2002**, 135, 399-406.

- Otto, H.; Artur, J. U.; Helmut, B.; Hans, D. F.; Ernst, T.R. Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **1996**, 16, 83-104.
- 15. 楊志元 等編譯,免疫生物學,第一版,藝軒圖書出版社,2002, pp 42-48。
- Palmer, R.; Ress, D.; Ashton, D.; Moncada, S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988, 153, 1251-1256.
- Chi, D.; Qui, M.; Krishnawamy, G.; Li, G.; Stone, W. Regulation of nitric oxide production from macrophages by lipopolysaccharide and catecholamines. *Nitric oxide*, **2003**, 8, 127-132.
- Manna, S. K.; Mukhopadhyay, A.; Aggarwal, B. B. Resveratrol Suppresses TNF-Induced Activation of Nuclear Transcription Factors NF-KB, Activator Protein-1, and Apoptosis: Potential Role of Reactive Oxygen Intermediates and Lipid Peroxidation. *J. Immunol.*, 2000, 164, 6509-6519.
- Liu, J. C.; Chen, J.; Chan, P.; Cheng, C. F.; Cheng, T. H. Inhibition of Cyclic Strain–Induced Endothelin-1 Gene Expression by Resveratrol. *Hypertension*, 2003, 42, 1198-1205.

- 20. Larson, R. A. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, **1988**, 27, 969-978.
- Branen, A. L. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyl 136 anisole and butylated hydroxytoluene. J. American Oil Chemists' Soc., 1975, 52, 59-63.
- 22. Micheal, J. P.; Meikleham, N. E.; Perold, G. W. Crystalline Phlorin from *Viscum rotundifolium*: A Novel Extraction Procedure. *Planta Med.*, 1995, 61, 296.
- 23. Popova, O. I. Phenolic compounds of Viscum album. Chem. Nat. Compd., 1991, 27, 123.
- 24. Fukunaga, T.; Kajikawa, I.; Nishiya, K.; Watanabe, Y.; Suzuki, N. Studies on the Constituents of the European Mistletoe, *Viscum album* L. II. *Chem. Pharm. Bull.*, **1988**, 36, 1185-1189.
- 25. Fukunaga, T.; Nishiya, K.; Kajkawa, I.; Takeya, K.; Itokawa, H. Studies on the Constituents of Japanese Mistletoes from Different Host Trees, and Their Antimicrobial and Hypotensive Properties. *Chem. Pharm. Bull.*, **1989**, 37, 1543-1546.
- Carmen, M. C.; Miguel, L. L.; Agudo, M. A.; Navarro, E.; Trujillo, J.; Ayuso, M. J. A cytotoxic diarylheptanoid from *Viscum cruciatum*. *Phytochemistry*, **2001**, 58, 567-569.
- 27. Chou, C. J.; Ko, H. C.; Lin, L. C. Flavonoid Glycosides from Viscum alniformosanae. J. Nat. Prod., **1999**, 62, 1421-1422.

- 28. Lin, J. H.; Chiou, Y. N.; Lin, Y. L. Phenolic Glycosides from Viscum angulatum. J. Nat. Prod., 2002, 65, 638-640.
- Vester, F.; Mai, M. On the identification of the constituents of Viscum album. I. Free amino acids. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1960, 322, 273-277.
- Virtanen, A. I.; Matikkala, E. J. New gamma-glutamyl peptides in the onion. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **1960**, 322, 8-20.
- Kubo, I.; Kim M.; Naoki, H. New insect growth inhibitory flavan glycosides from *Viscum tuberculatum*. *Tetrahed. Lett.*, **1987**, 28, 921-924.
- Fukunaga, T.; Kajikawa, I.; Nishiya, K.; Takeya, K.; Itokawa, H. Studies on the Constituents of the Japanese Mistletoe, *Viscum album* L. var. *coloratum* OHWI Grown on Different Host Trees. *Chem. Pharm. Bull.*, 1989, 37, 1300-1303.
- 33. Zhao, Y.; Wang, X.; Zhao, Y. C.; Gao, X.; Bi, K.; Yu, Z. HPLC Determination and Pharmacokinetic Study of Homoeriodictyol-7-*O*-β-D-glucopyranoside in Rat Plasma and Tissues. *Biol. Pharm. Bull.*, 2007, 30, 617-620.
- Ray, S.; Thakur, T. N.; Ghosh, A.; Barua, A. K. Structures of two isomers of dichlorobis (2-phenylazopyridine) ruthenium. *J. Indian. Chem. Soc.*, **1984**, 61, 727-728.
- 35. Nishiya, K.; Watanabe, Y.; Takeya, K. Chemical Examination of

Viscum articulatum. Current Science, 1965, 34, 406.

- Cebovic, T.; Popovic, M. Effects of different extracts of mistletoe leaves (*Viscum album* L.) on CCl₄-induced hepatotoxicity in rats *Toxicol. Lett.*, **2006**, 174.
- 37. Richter, A.; Thonke, B.; Popp, M. 1_D-1-O-methyl-muco-inositol in *Viscum album* and members of the rhizophoraceae. *Phytochemistry*, 1990, 29, 1785-1786.
- Bicchi, C.; Amato, A.; Frattini, C.; Cappelletti, E. M.; Caniato, R.; Filippini, R. Chemical diversity of the contents from the secretory structures of *Heracleum sphondylium* subsp. *Sphondylium*. *Phytochemistry*, **1990**, 29, 1883-1887.
- 39. Richter, A. Viscumitol, a dimethyl-ether of *muco*-inositol from *Viscum album. Phytochemistry*, **1992**, 31, 3925-3927.
- 40. Delioram, D.; Calis, I.; Ergun, F. A new acyclic monoterpene glucoside from *Viscum album* ssp. *album*. *Fitoterapia*, **2001**, 72, 101-105.
- 41. Wang, M.; Li. J.; Liu, W. Two flavanones from the root bark of Lespedeza Davidii. Phytochemistry, **1987**, 26, 1218-1219.
- 42. Hisashi, M.; Toshio, M.; Iwao, T.; Shoichi H.; Masayuki, Y. Medicinal Flowers. VI.¹⁾ Absolute Stereostructures of Two New Flavanone Glycosides and a Phenylbutanoid Glycoside from the Flowers of *Chrysanthemum indicum* L.: Their Inhibitory Activities for Rat Lens Aldose Reductase. *Chem. Pharm. Bull.*, **2002**, 50, 972-975.

- 43. Dudley, H. W.; Ian, F. Spectroscopic methods in organic chemistry, Fifth Edition, **1995**, p13-17.
- 44. Zhang, Y. J.; Abe, T.; Tanaka, T.; Yang, C. R.; Kouno, I. Two New Acylated Flavanone Glycosides from the Leaves and Branches of *Phyllanthus emblica. Chem. Pharm. Bull.*, 2002, 50, 841-843.
- 45. 葉陽、趙維民,天然產物化學,第一版,科學出版社, 2003,
 pp 410-445.
- 46. Dirceu, DE B. C.; Lourdes, F. B.; Otto G.; Guilherme S. M. C-methyl phenolics from *Qualea* species. *Phytochemistry*, **1981**, 20, 305-307.
- 47. Moretti, C.; Sauvain, M.; Lavaud, C.; Massiot, G.; Bravo, J. A.; Munoz,
 V. A Novel Antiprotozoal Aminosteroid from *Saracha punctata*. J. Nat. Prod., 1998, 61, 1390-1393.
- Lokvam, J.; Coley, P. D.; Kursar, T. A. Cinnamoyl glucosides of catechin and dimeric procyanidins from young leaves of *Inga umbellifera* (Fabaceae). *Phytochemistry*, 2004, 65, 351-358.
- Fujimoto, H.; Suzuki, K.; Hagiwara, H.; Yamazaki, M. New Toxic Metabolites from a Mushroom, *Hebeloma vinosophyllum*. I. Structure of Hebevinoside I, II, III, IV and V. *Chem. Pharm. Bull.*, **1986**, 34, 88-99.
- Saxena, V. K.; Jain, A. K. Properties of 5'-nucleotidase from nodules of pigeonpea (*Cajanus cajan*). *Phytochemistry*, **1986**, 25, 2267-2270.
- 51. Ram, S. N.; Roy, R.; Singh, B.; Singh, R. P.; Pandey, V. B. An

Acylflavone Glucoside of *Echinops echinatus* Flowers. *Planta Med.*, **1996**, 62, 187.

- 52. Sang, S.; Lapsley, K.; Jeong, W. S.; Lachance, P. A.; Ho, C. T.; Rosen,
 R. Antioxidative Phenolic Compounds Isolated from Almond Skins (*Prunus amygdalus* Batsch). J. Agric. Food Chem., 2002, 50, 2459-2463.
- 53. Hammami, S.; Ben, J. H.; Bergaoui, A.; Ciavatta, L.; Cimino, G.; Mighri, Z. Isolation and Structure Elucidation of a Flavanone, a Flavanone Glycoside and Vomifoliol from *Echiochilon fruticosum* Growing in Tunisia. *Molecules*, 2004, 9, 602-608.
- 54. Turner, A.; Chen, S. N.; Joike, M. K.; Pendland, S. L.; Pauli, G. F.; Farnsworth, N. R. Inhibition of Uropathogenic Escherichia coli by Cranberry Juice: A New Antiadherence Assay. J. Agric. Food Chem., 2005, 53, 8940-8947.
- 55. Zhao, Y.; Wang, X.; Zhao, Y.; Gao, X.; Bi, K.; Yu, Z. HPLC Determination and Pharmacokinetic Study of Homoeriodictyol-7-*O*-β-D-glucopyranoside in Rat Plasma and Tissues. *Biol. Pharm. Bull.*, 2007, 30, 617-620.
- Lin, J. H.; Chiou, Y. N.; Lin, Y. L. Phenolic Glycosides from Viscum angulatum. J. Nat. Prod., 2002, 65, 638-640.
- 57. Yoshikawa, M.; Murakami, T.; Ishiwada, T.; Morikawa, T.; Kagawa, M.; Higashi, Y.; Matsuda, H. New Flavonol Oligoglycosides and

Polyacylated Sucroses with Inhibitory Effects on Aldose Reductase and Platelet Aggregation from the Flowers of *Prunus mume*. *J. Nat. Prod.*, **2002**, 65, 1151-1155.

- 58. 周同惠,分析化學手冊 第七分冊 核磁共振波譜分析,第二版,化 學工業出版社,1999, pp 901-905.
- 59. Gorin, P. A. J.; Mazurek, M. Further Studies on the Assignment of Signals in ¹³C Magnetic Resonance Spectra of Aldoses and Derived Methyl Glycosides. *Can. J. Chem.*, **1975**, 53, 1212-1223.
- Saimaru, H.; Orihara, Y.; Tansakul, P.; Kang, Y. H.; Shibuya, M.; Ebizuka, Y. Production of Triterpene Acids by Cell Suspension Cultures of *Olea europaea*. *Chem. Pharm. Bull.*, 2007, 55, 784-788.
- 61. Mosman, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods., **1983**, 65, 55–63.
- Amoros, M.; Lurton, E.; Boustie J.; Girre, L. Comparison of the Anit-Herpes Simplex Virus Activities of Propolis and 3-Methyl-But-2-Enyl Caffeate. J. Nat. Prod. 1994, 57, 644-647.
- 63. Jung, H. J.; Kang, H. J.; Song, Y. S.; Park, E. H.; Kim, Y. M.; Lim, C. J. Anti-inflammatory, anti-angiogenic and anti-nociceptive activities of *Sedum sarmentosum* extract. *J. Ethnopharmacol.*, **2008**, 116, 138-143.
- 64. Spasova, M.; Philipov, S.; Nikolaeva, GL.; Galabov, AS.; Milkova, TS. Cinnamoyl- and hydroxycinnamoyl amides of glaucine and their

antioxidative and antiviral activities. Bioorg. Med. Chem., 2008, online.



附錄一

Compound 1 之UV圖譜



附錄二

Compound 2 之UV圖譜



附錄三

Compound 3 之UV圖譜



附錄四

Compound 9 之UV圖譜



附錄五

Compound 10 之UV圖譜



附錄六

Compound 11 之UV圖譜

