

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

樟芝的活性成分研究(2/3)

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC93-2321-B-002-007-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：國立臺灣大學化學系暨研究所

計畫主持人：郭悅雄

計畫參與人員：林睿達

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 5 月 24 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

樟芝的活性成分研究

Studies on the active principles from *Antrodia camphorata*

Chang-Chih

計畫編號：NSC 92 - 2321 - B - 002 - 006

執行期限：93 年 8 月 1 日至 94 年 7 月 31 日

主持人：郭悅雄 國立台灣大學化學系

計畫參與人員：林睿達（助理）

一、中文摘要

三種不同品系的樟芝分別以甲醇作萃取，萃取物用分配分離法，作成乙酸乙酯、正丁醇及水可溶部。每部分做不同的活性測試，如抗氧化、抗發炎、免疫調節等確認哪種品系確實有生理活性，再從事其有效成分的分離與確認，將來再推行有用品系為健康食品，而有效成分作為製藥的目的。

關鍵詞：樟芝、活性成分、抗氧化、免疫調節、抗發炎

Abstract

Three different varieties of *Antrodia camphorata* (Chang-Chih) are extracted with methanol, respectively. The extracts are portioned as EtOAc, n-BuOH and H₂O soluble fractions. Every fraction is tested for biological activities as antioxidation, anti-inflammatory, immune modulation, etc. The active fractions are separated and purified to give pure component and identify the structure. The active variety is introduced to serve as health food. And the active principle is developed as new drug.

Keywords: *Antrodia camphorata* (Chang-Chih); Active principle; Antioxidation; Immune modulation; Anti-inflammatory

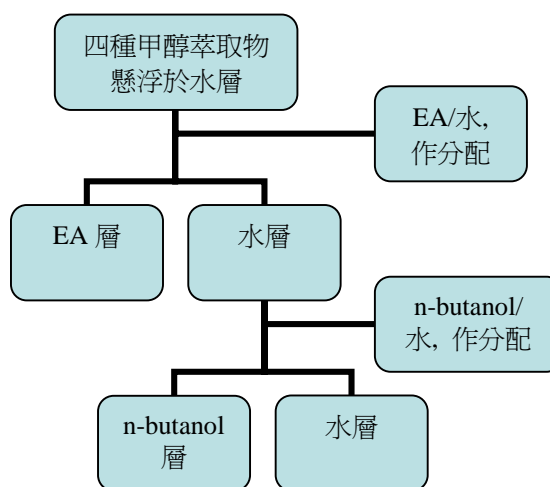
二、Purpose of Project

本研究計畫之總目標為開發台灣特有

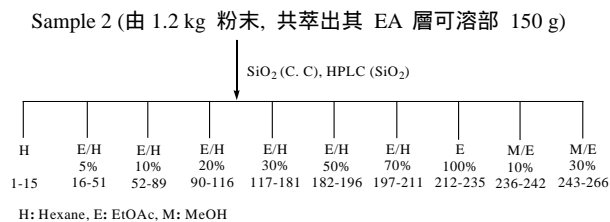
藥用菇類樟芝，完成樟芝優良品系之篩選及進行一系列的化學及生物活性研究，供做開發樟芝成為多元化保健產品的依據。樟芝自古以來為原住民著名的強身救命丹，在民間被認為具有祛風行氣、化瘀活血、解毒消腫、抗菌、抗病毒及抗腫瘤等功效。至今有關樟芝現代科學之藥理活性尚少，初步的研究報告證實了樟芝具有抗炎、保肝、抗癌、免疫調節、降血糖、降血脂及抗氧化等活性。

三、Content of Project

樟芝子實體共 3 種分別是 No. 1、No. 2 及 No. 5。另外有菌絲體的乾燥物。3 種子實體及菌絲體的分配分離如下執行。四種 sample 以甲醇萃取。



四種 sample 其分成 12 個 fraction , 每個 fraction 經三個 cell lines PLC/PRF/5, HepG2, Hep3B 的測試, 以 Sample 2 之 EtOAc 層表示最好的活性, 其 IC₅₀ 分別為 65.5 µg/mL, 68.6 µg/mL 及 95.7 µg/mL, 故用 sample 2 之 EtOAc 可溶層作為分析材料。



共分離 266 瓶 (每瓶收 1000 mL)。取 17 瓶分別以 20 µg/mL 作 HepG2, Hep3B 及 PLC/PRF/5 做活性抑制, 發現第 108 瓶活性最強, 對 Hep3B 及 PLC/PRF/5 之抑制率為 53.13% 及 72.21%。但是亦發現有 proliferation 的結果, 尤其是 69, 178, 252 及 239 瓶增加細胞分裂, 可由 30% 到 45%。第 108 瓶位在 20% E/H 之 eluent, 因等不及活性的測試, 我們先以 30% fraction 進行分離純化, 利用 HPLC 而確認如下化合物 (34 個), 屬於新化合物共 13 個, 首次由天然分出新化合物有 6 個。下列 structure, 依不同骨架作標示。目前只有 compound S1 作 anticancer, 成果算不錯, 對 PLC/PRF/5 之 IC₅₀ 值為 20.5 µg/mL。

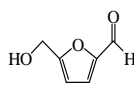
四、References

1. 江素瑛等人(2002) 樟芝之致基因毒性與抗基因毒性評估, 中華保健食品學會年會, 台北市。
2. 宋祖瑩等人(2002) 樟芝深層培養發酵濾液保護四氯化碳誘導大鼠急性肝損傷之能力, 中華保健食品學會年會, 台北市。
3. 沈立言等人(2002) 牛樟芝菌絲體發酵過濾液對肝臟生理機能之影響, 中華保健食品學會年會, 台北市。
4. 郭淑卿等人(2002) 樟芝菌株發酵液對大鼠紅血球及肝臟抗氧化系統之影響, 中華保健食品學會年會, 台北

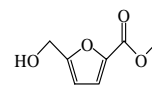
市。

5. 蔡敬民, 劉翠玲(2002) 樟芝對於血糖及血脂質之影響, 中華保健食品學會年會, 台北市。
6. 賴宏亮等人(2002) 樟芝免疫調節活性之研究, 中華保健食品學會年會, 台北市。
7. 鍾彩華等人(2002) 牛樟芝菌絲體發酵萃取液對大白鼠初代肝細胞生存力、抗氧化解毒代謝能力之影響, 中華民國食品科學技術學會年會, 彰化縣。

1. Furanoid



F1: 5-Hydroxymethylfurfural

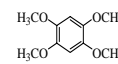


F2: 5-Hydroxymethylfurfuran-2-carboxylic acid methyl ester

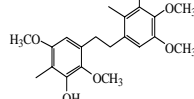
2. Benzoquinone and Benzene



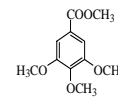
B1: 2,3-Dimethoxy-1,4-benzoquinone



**B2: 1,2,4,5-Tetramethoxybenzene

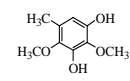


*B4: 1,2-Bis(3-hydroxy-2,4,5-trimethoxyphenyl)ethane

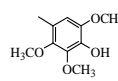


**B3: 3,4,5-Trimethoxybenzoic acid methyl ester

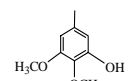
3. Phenylmethanoid and Benzoquinonemethanoid



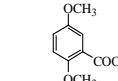
*PM1: 2,4-dimethoxy-5-methylbenzene-1,3-diol



PM2: 2,3,6-trimethoxy-4-methylphenol



**PM3: 2,3-dimethoxy-5-methylphenol

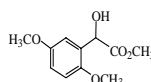


**PM4: 2,5-dimethoxybenzoic acid methyl ester



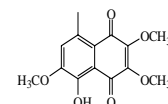
PM5: 2,3-dimethoxy-5-methyl[1,4]benzoquinone

4. Phenylethanoid



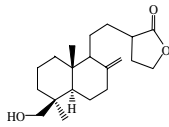
*PE1: Methyl 2-hydroxy-2-(2,5-dimethoxyphenyl)acetate

5. Naphthoquinone (C₁₁)

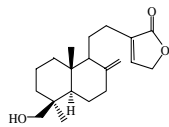


*N1: 5-Hydroxy-2,3,6-trimethoxy-8-methyl[1,4]naphthoquinone

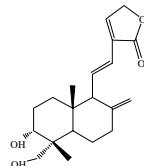
6. Diterpenoid (Labdane, C₂₀)



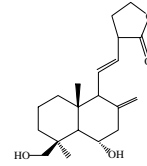
*D1: 19-Hydroxy-8(17)-labdaden-16,15-olide



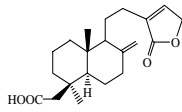
D2: 19-Hydroxy-8(17),13-labdaden-16,15-olide



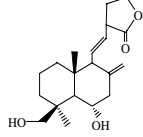
D5: 14-Deoxy-11,12-dihydroandrographolide



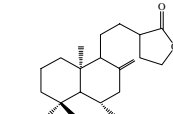
*D6: 6a, 19-dihydroxy-8(17), 11E-labdadien-16,15-olide (isomer of *D4)



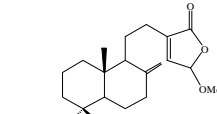
D3: Pinusolidic acid



*D4: 6α, 19-dihydroxy-8(17),11E-labdadien-16,15-olide

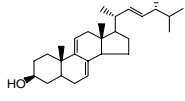


D7: 14-Deoxyandrographolide

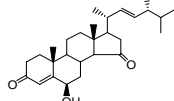


D8: 15-methoxypinusolidic acid

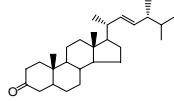
7. Ergostane (C₂₈)



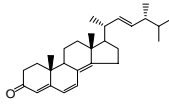
ST1: Ergosta-7, 9(11), 22E-trien-3β-ol



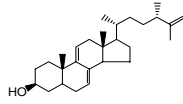
*ST2: 6β-hydroxy-4, 22E-ergostadiene-3, 15-dione



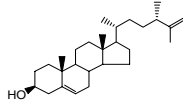
ST3: 3-Oxo-5β-22E-ergostene



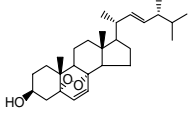
ST4: Ergosta-4, 6, 8(14), 22E-tetraen-3-one



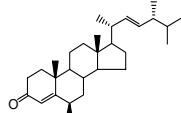
*ST5: Ergosta-7,9(11), 25-trien-3β-ol-3-one



**ST6: Ergosta-5, 25--dien-3β-ol-3-one

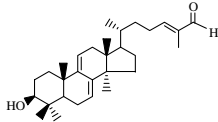


ST7: Ergosterol peroxide

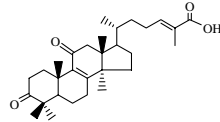


ST8: 6β-hydroxy-4, 22E-ergostadien-3-one

8. Lanostane

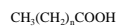


LA1: 6β-Hydroxy-7, 9(11), 24E-lanostatrien-26-al



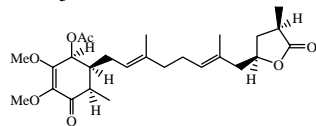
*LA2: 3,11-Dioxolanosta-8, 24E-dien-26-oic acid

9. Fatty acid



$$n=20-26 \\ (n=20, 100\%)$$

10. CoQ₃



*5-[8-(2-Acetoxy-3,4-dimethoxy-6-methyl-5-oxo-cyclohex-3-enyl)-2,6-dimethyl-octa-2,6-dienyl]-3-methyl-dihydrofuran-2-one

一、測定項目：

中樞神經系統作用 (Ab25-35)(阿茲海默氏症 Alzheimer's Disease 的預防)

二、實驗條件：

新生大白鼠 (Sprague-Dawley) 之大腦皮質之神經元細胞培養成初級單層細胞。神經元細胞培養至第五天加入 D1-D8 (0, 1, 5, 10, 20 μ g/ml) 處理 2 小時，再以 5 μ M fAb25-35 (7 days ageing) 處理 40 小時，其存活情形與毒性反應以 MTT 試驗方法測試。數據以 cell death (%) 表示。

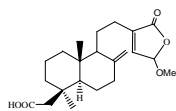
三、藥理活性報告：

1. D-1, -2, -4, -5, 和 -6 在濃度高於 20 μ g/ml 時對神經元具有毒性，所以濃度選擇低於 20 μ g/ml。D-8 在濃度高於 20 μ g/ml 時對神經元仍不具有毒性，所以濃度選擇低於 100 μ g/ml。

2. 篩選數據如以下圖表所示。簡述其活性如下：

- D-1 在 5, 10, 20 μ g/ml 濃度下分別降低 Ab25-35 所造成的神經元死亡達 37.6%, 30.6%, 和 24.0%。
- D-2 在 10, 20 μ g/ml 濃度下分別降低 Ab25-35 所造成的神經元死亡達 28.1%, 和 18.8%。
- D-8 在 50, 100 μ g/ml 濃度下分別降低 Ab25-35 所造成的神經元死亡達 19.6%, 和 40.4%。
- D-4 在 10, 20 μ g/ml 濃度下分別降低 Ab25-35 所造成的神經元死亡達 24.7%, 和 32.8%。
- D-5 在 10, 20 μ g/ml 濃度下分別降低 Ab25-35 所造成的神經元死亡達 22.5%, 和 25.8%。
- D-6 在 20 μ g/ml 濃度下降低 Ab25-35 所造成的神經元死亡達 26.9%。

3. 綜述之，D-1 在濃度 5 μ g/ml 和 D-8 在濃度 100 μ g/ml 下具有最好的神經元保護效果。



※D-8 (15-methoxy)pinusolidic acid 為肖楠分離出的雙萜類，具有神經元保護效果，其結構與此次牛樟芝分離出的 Diterpenoid (Labdane type) 相似，但牛樟芝尚未有生成出 Diterpenoid 之報告，此為首次新發現，具有價值的成果。

NO.7, NO.8, 35396, 35398 四種不同種類的牛樟芝經初步萃取再 Partition 後，分為 EA, BuOH, H₂O 三層進行抗肝癌活性測試，以下為結果。

抗肝癌活性結果

Hep G2

Cell growth inhibition (%)

		50 μ g/ml	125 μ g/ml	50 μ g/ml	IC50 value (μ g/ml)
NO7	EA	30.38	71.98	88.61	92.01
	BuOH	-4.92	21.09	49.16	N.D.
	H ₂ O	-2.78	26.18	48.40	N.D.
NO8	EA	25.57	66.47	81.12	112.46
	BuOH	0.62	26.06	56.53	222.36
	H ₂ O	-9.82	20.65	44.95	N.D.
35396	EA	9.14	55.83	82.03	115.63
	BuOH	-4.78	11.36	46.03	N.D.
	H ₂ O	0.81	18.63	35.81	N.D.
35398	EA	3.78	52.27	83.33	115.8
	BuOH	-4.15	19.26	45.63	N.D.
	H ₂ O	-3.76	11.22	38.00	N.D.

Hep 3B
Cell growth inhibition (%)

		50 μ g/ml	125 μ g/ml	250 μ g/ml	IC50 value (μ g/ml)
NO7	EA	28.31	58.81	77.60	120.9
	BuOH	5.46	20.64	43.89	N.D
	H ₂ O	12.9	31.19	62.87	185.5
NO8	EA	11.82	49.78	74.57	156.9
	BuOH	4.47	24.93	52.16	N.D
	H ₂ O	4.64	30.97	61.94	203.5
35396	EA	5.96	40.95	68.16	180.2
	BuOH	9.04	25.26	42.63	N.D
	H ₂ O	3.26	12.59	40.75	N.D.
35398	EA	8.30	42.42	69.20	175.62
	BuOH	1.18	25.28	42.02	N.D
	H ₂ O	4.67	35.22	51.52	228.9

PLC/PRF/5
Cell growth inhibition (%)

		50 μ g/ml	125 μ g/ml	250 μ g/ml	C50 value (μ g/ml)
NO7	EA	49.86	70.56	91.58	40.59
	BuOH	-2.54	8.06	30.59	N.D
	H ₂ O	-2.49	13.89	30.15	N.D
NO8	EA	47.09	72.39	91.42	47.3
	BuOH	1.90	14.40	36.26	N.D
	H ₂ O	1.04	13.32	39.54	N.D
35396	EA	16.826	66.77	91.35	118.2
	BuOH	-3.73	7.09	36.72	N.D
	H ₂ O	-2.44	12.42	46.58	N.D
35398	EA	15.48	55.50	80.73	139.8
	BuOH	5.51	15.65	47.45	N.D
	H ₂ O	3.46	10.72	41.45	N.D