

## 第二章 材料與方法

### 第一節 前言

一般而言，巨噬細胞在發炎反應過程中，會透過誘發型的COX-2 增加促發炎介質(pro-inflammatory mediator) PGE<sub>2</sub>的合成，已有實驗發現：利用LPS誘發巨噬細胞合成PGE<sub>2</sub>之細胞模式中，苦瓜萃取物具有抑制其PGE<sub>2</sub>生成的效應。表示苦瓜萃取物中可能含具有抑制發炎介質PGE<sub>2</sub>生合成的成分。趙氏 (2003)研究結果指出：苦瓜中含有活化PPAR之成份，此成份可被乙酸乙酯萃取。因此，本實驗室乃針對苦瓜進行化學分離，期望能找出該成份。本論文配合此化學分離之過程，以LPS誘發巨噬細胞生成PGE<sub>2</sub>之模式，篩選苦瓜中具有對LPS誘發巨噬細胞株生成PGE<sub>2</sub>之抑制作用的區分物，期能鑑定出具有抑制PGE<sub>2</sub>生成之活性成分，

### 第二節 山苦瓜之區分

#### 一 山苦瓜全果水溶性及非水溶性部分

吳氏(2000) 利用苦瓜萃取物處理RAW264.7 細胞，發現具有抑制PGE<sub>2</sub>生成的效應。其中苦瓜萃取物分為：水萃物及渣的乙酸乙酯萃取物(有機萃物)。在水萃物部分，其IC<sub>50</sub> 為 0.13mg/mL；有機萃物部分，其IC<sub>50</sub> 為 21 μg/mL。因此，本實驗流程亦先將山苦瓜進行粗萃，評估主要影響PGE<sub>2</sub>合成的成分存在於渣或水分中。

首先，將山苦瓜以組織均質機均質後，以棉布過濾。水層部分，於轉速 12000 rpm、4°C 離心 30mins，得上層水萃液，並進行冷凍乾燥，得水萃乾燥物(WE)。渣的部分，亦進行冷凍乾燥，得渣乾燥物。流程如圖 2-1

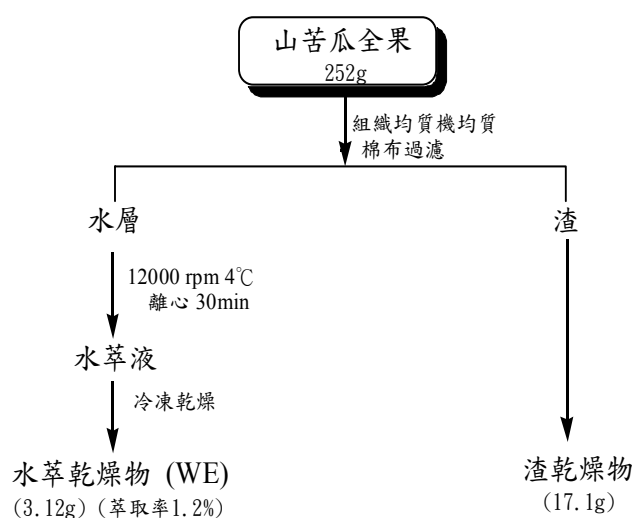


圖 2-1 山苦瓜全果之水萃乾燥物(WE)萃取流程

乙酸乙酯萃物(EAE)其製備過程為：

秤山苦瓜凍乾粉末於 1L 錐形瓶中，加適量的乙酸乙酯蓋過粉末浸泡兩天後，以濾紙抽氣過濾收集萃液，再加入適量乙酸乙酯溶劑浸泡兩天，抽氣過濾收集萃液。兩次萃液混合，經減壓濃縮去除溶劑得乙酸乙酯萃物(EAE)。流程如圖 2-2

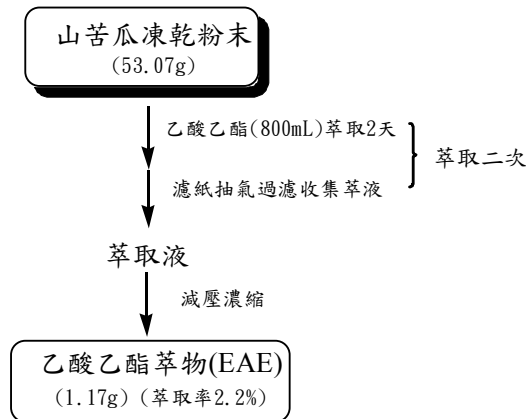


圖 2-2 山苦瓜凍乾粉末之乙酸乙酯萃物(EAE)萃取流程

## 二 山苦瓜乙酸乙酯萃物(EAE)對萃分離

將上述之乙酸乙酯萃物(EAE)以同體積之 90% MeOH/ H<sub>2</sub>O與 n-hexane 進行對萃，反覆對萃 3 次後，分離 n-hexane 層與 90% MeOH/ H<sub>2</sub>O 層。n-hexane 層經減壓濃縮後得 Hexane 萃物。90% MeOH/ H<sub>2</sub>O 層再經減壓濃縮去除 MeOH 後得水層萃物。水層萃物以同體積之乙酸乙酯進行對萃，反覆對萃 3 次後，分離乙酸乙酯層與水層。分別減壓濃縮後，得乙酸乙酯萃物(EAE-2)及水草物。極性由高至低為：水草物 > EAE-2 > Hexane 萃物。(回收率 74.3%) 流程如圖 2-3

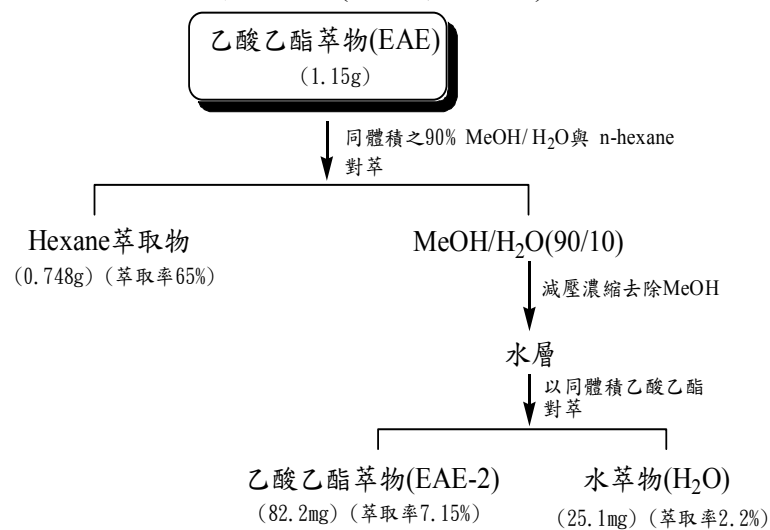


圖 2-3 山苦瓜乙酸乙酯萃物(EAE)對萃分離流程

### 三 山苦瓜 Hexane 區分物以矽膠管柱層析分離

#### (一) 管柱填充及樣品之前處理

細 silica gel (230-400mesh) (約樣品量之 10 倍)，加入適量之 n-hexane 將其懸浮，以玻璃棒攪拌均勻並趕掉氣泡，之後緩緩沿著玻璃棒填充倒入層析管柱，靜置數分鐘使其沉降(packing)。再加入些許 n-hexane 並打開管柱下方活塞，使管柱流洗數次，觀察其流速並檢查管柱是否與桌面垂直。

將 Hexane 萃取物以 EA 溶解，加入樣品重之 1.5-2 倍粗 silica gel (60-230mesh) 進行 coating，將 silica gel 與樣品混勻後置於超音波震盪機震盪數分鐘，使粒子均勻分散。而後減壓濃縮將溶劑抽乾成粉末顆粒狀。將其緩緩倒入管柱內使其平鋪沉降，並以少許之 n-hexane 沖洗管壁，此為樣品層。於樣品層上方再倒入少許之粗 silica gel (高度約樣品層一半)，此為保護層。最後加入 n-hexane 至管柱八分滿，溶劑不可低於保護層，開始進行流洗。

#### (二) 沖提液流洗之順序

流洗之沖提液以極性最低的 100% n-hexane 開始，逐漸提高沖提液之極性。依序為：100% n-hexane、2 %EA+98%Hex、5%EA+95%Hex、10 %EA+90%Hex、20 %EA+80 %Hex、60 %EA+40%Hex、100%EA。每 200 mL 收集一瓶，並將其減壓濃縮至乾。當收集的樣品重量減少後，即更換沖提液的極性。收集後的各區分物參考 TLC (thin layer chromatography) 的結果，將 pattern 相近的區分合併後得 7 個區分，進行細胞實驗。(回收率 93.41%)

流程如圖 2-4：

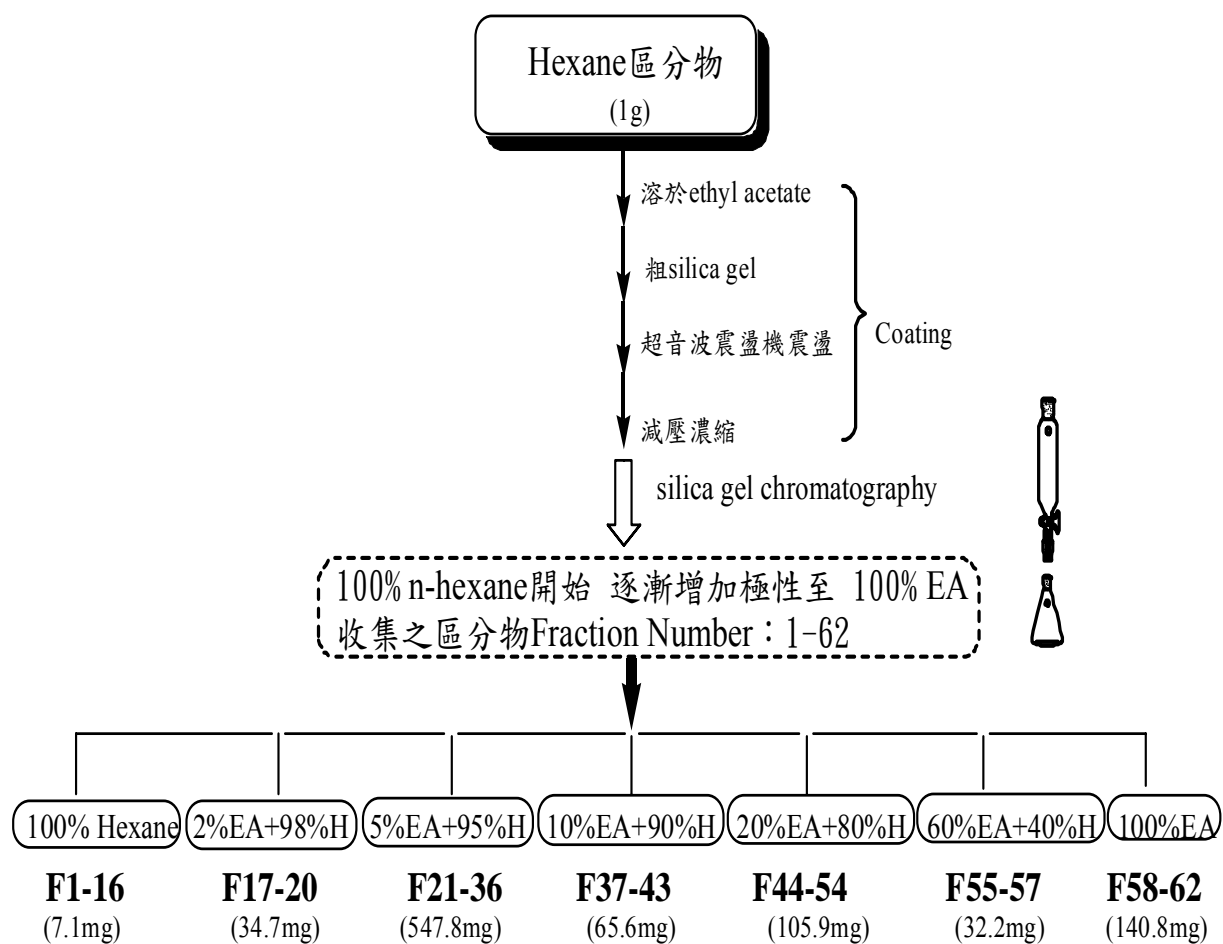


圖 2-4 山苦瓜之 Hexane 區分物以矽膠管柱層析分離流程圖

Fig.2-4 The protocol for fractionation of hexane extract of *Momordica charantia* L. by silica gel chromatography.

#### 四 山苦瓜大量萃取分離

鑒於山苦瓜經上述少量萃取分離後，其區分物對細胞PGE<sub>2</sub>的合成具有顯著抑制的效果。因此，進一步進行大量萃取及分離的工作，期能找出有效成分。

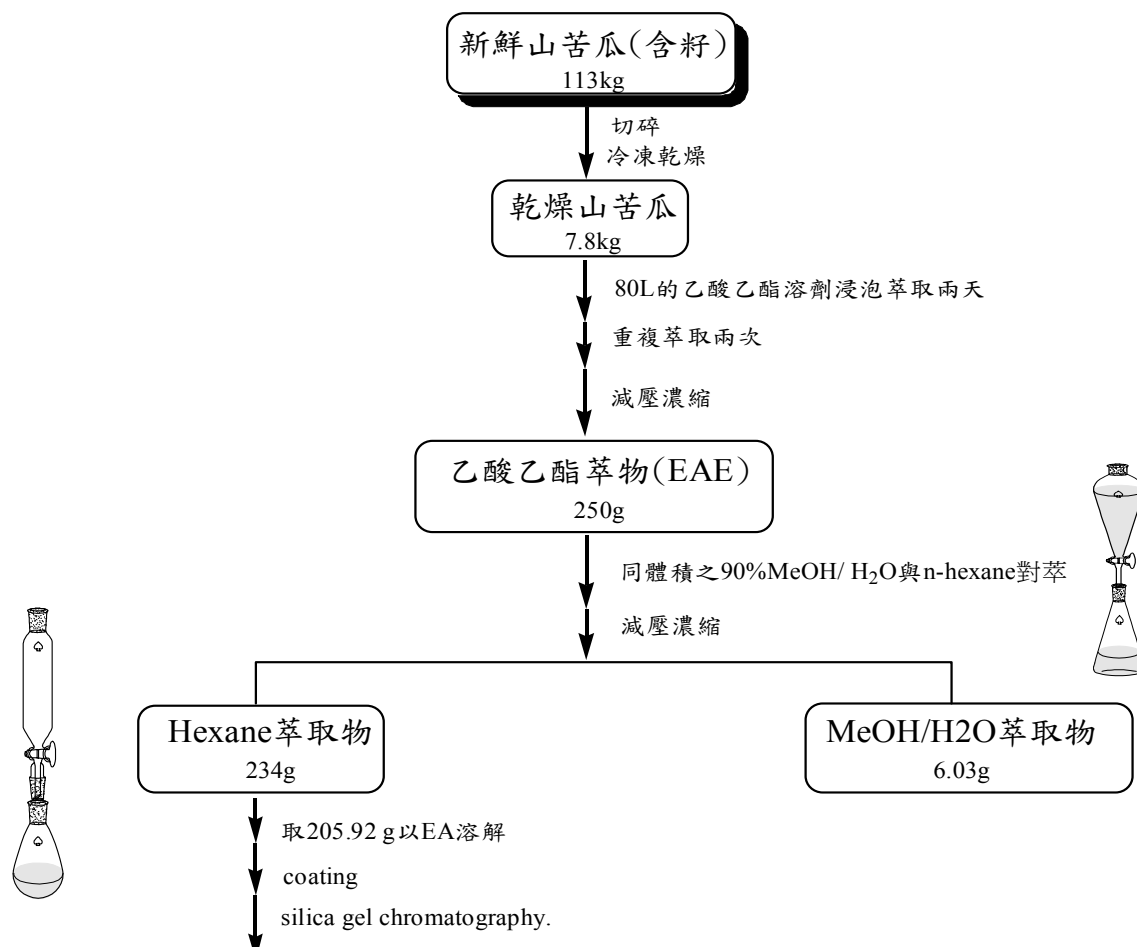
##### (一) 粗萃物之製備

萃取分離過程為：將總重 113kg 的新鮮山苦瓜全果(含籽)切碎後，進行冷凍乾燥。冷凍乾燥後的山苦瓜(7.8kg)，以 80L 的乙酸乙酯溶劑浸泡萃取兩天後，收集萃取液。再加入 80L 乙酸乙酯溶劑浸泡萃取兩天，收集萃取液。兩次萃取液混合，經減壓濃縮去除溶劑得乙酸乙酯萃物(EAE)，共 250g。

乙酸乙酯萃物(EAE)再以同體積之 90%MeOH/ H<sub>2</sub>O與n-hexane進行反覆對萃，分離n-hexane層與 90% MeOH/ H<sub>2</sub>O層。分別減壓濃縮得Hexane萃取物，重 234g；MeOH/H<sub>2</sub>O萃取物，重 6.03g。

##### (二) 矽膠管柱層析

Hexane萃取物的部分則進行矽膠管柱層析分離：以大層析管柱packing 2.3 kg 的粗silica gel。取Hexane萃取物 205.92 g以EA溶解後，加入 300 g的silica gel 進行coating。開始流洗之沖提液以極性最低的 100% n-hexane開始，逐漸提高沖提液極性。依序為：100%n-hexane、2%EA+98%Hex、5%EA+95%Hex、10%EA+90%Hex、20%EA+80%Hex、30%EA+70%Hex、40%EA+60%Hex、60%EA+40%Hex、80%EA+100%Hex、100%EA及 90%EA+10%MeOH。每 2L收集一瓶，平均流速為 4L/1hr。收集後，分別將其減壓濃縮至乾。當收集的樣品重量減少後，即更換沖提液的極性。收集後的各瓶以TLC進行追蹤。每一極性取具有最大收量的一瓶分別為：F28、F64、F92、F114、F141、F152、F162、F170 及F190，測<sup>1</sup>H-NMR及細胞實驗。流洗情形整理如圖 2-5：



n-hexane extract 205.92 g (回收率 99.9%)						
流洗順序	沖提液組成 (%)			瓶數	流洗液體積 (L)	區分物收量 (g)
	EA	n-hexane	MeOH			
1	0	100	0	1~10	20	0.1978
2	2	98	0	11~59	96	118.4664
3	5	95	0	60~89	60	17.3407
4	10	90	0	90~111	44	23.1256
5	20	80	0	112~138	54	14.8945
6	30	70	0	139~148	20	5.9508
7	40	60	0	149~159	22	7.9985
8	60	40	0	160~167	16	2.2905
9	80	20	0	168~179	24	2.5650
10	100	0	0	180~185	12	1.3871
11	90	0	10	186~195	20	11.6633

圖 2-5 大量山苦瓜萃取分離流程圖

Fig 2-5 The extraction procedure for separation and fractionation of *Momordica charantia* L.

## 五 活性區分物再層析分離

苦瓜中含有活化 PPARs 之成份，此成份可被乙酸乙酯萃取。因此，本實驗室乃針對苦瓜進行化學分離，期望能找出該成份。本論文配合該化學分離之過程，故上述之萃取物與分離之各區分物，由莊佳穎同學所提供。

由於大量萃取分離之區分物進行細胞實驗後，發現 Hexane 區分物中以高極性 90%EA+10%MeOH 所流洗出之 F190 抑制效果最佳，其次為 40%EA+60%Hex 之 F152，與活化 PPARs 之區分物極性不同，故以下之分離流程獨立進行。而將與活性最佳之 F190 極性相同的瓶數合併，再次進行純化區分。

### (一) Fraction189 ~ 191 純化分離

將相同極性的 Fraction189.190.191 加以合併得 8.3g。首先，利用 TLC 試驗欲分離之流洗系統。由於 Hexane/EA 系統下，此區分物有拖曳現象，無法分離出明顯的點，因此，改試以 Chloroform:EtOH(MeOH)系統分離。TLC 結果決定利用矽膠管柱，以 Chloroform:EtOH =6:1 開始分離流洗。

#### 1. 管柱填充及樣品之前處理 (乾填)

細 silica gel (230-400 mesh)(約樣品量之 10 倍 )，填充至層析管柱，以水幫浦抽氣，使 silica gel 緊密填充。將 Fraction189.190.191 以 acetone 溶解混合後，加入樣品重之 1.5-2 倍的粗 silica gel(60-230 mesh)進行 coating。將 silica gel 與樣品混勻後置於超音波震盪機震盪數分鐘，使粒子均勻分散。而後進行減壓濃縮將溶劑抽乾成粉末顆粒狀。將其緩緩倒入管柱內使其平鋪沉降，此為樣品層。於樣品層上方加入棉花，此為保護層。

#### 2. 沖提液流洗之順序

流洗之沖提液以 Chloroform:EtOH=6:1 開始，每 200 mL 收集一瓶，並將其減壓濃縮至乾，共收集 12 瓶。同時以 TLC 追蹤流洗之區分物，當所流洗出化合物減少，則增加極性改以 Chloroform:EtOH =5:1 流洗，共收集 9 瓶。收集後的各區分物參考 TLC 的結果，將 pattern 相近的區分合併後得 3 個區分，分別測<sup>1</sup>H-NMR 及細胞實驗。流程如圖 2-6：

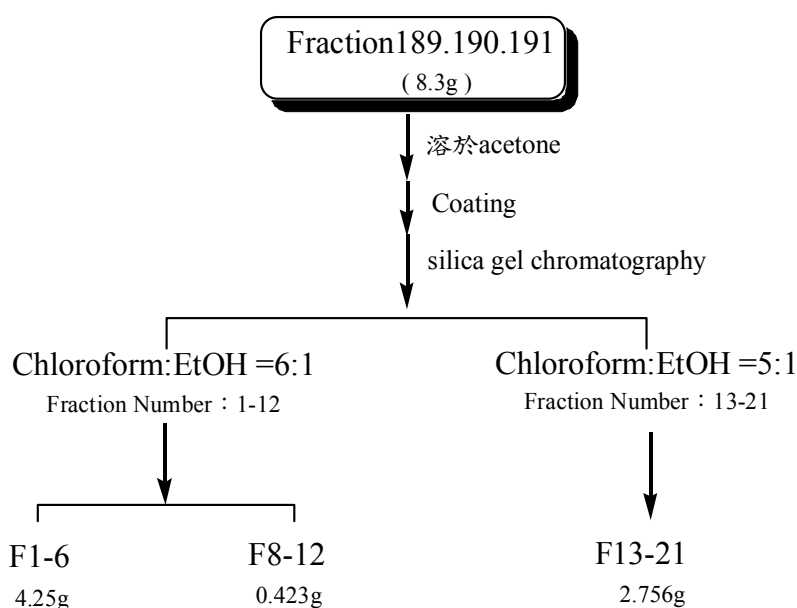


圖 2-6 Hexane 萃取層之活性區分物 F189-191 以矽膠管柱層析分離流程圖

Fig.2-6 The protocol for fractionation of F189-191 of hexane extract by silica gel chromatography

將Fraction189~191 合併經矽膠管柱區分成F1-6、F8-12 及F13-21，分別進行細胞實驗後發現：F1-6 及F8-12 具有顯著的抑制效果。從<sup>1</sup>H-NMR及IR中，可發現這兩個區分物的特徵相似，均包括：存在脂肪酸，有雙鍵，OH-group及酯化的特徵，由於F1-6 的量較多，因此決定由F1-6 再進一步純化分離。

### 【第一次實驗】 F1-6 甲基乙醯化

(圖 2-7)

因 F1-6 在 TLC 上會出現拖曳的現象，且此區分物極性偏高，可能因含有 COOH-及 OH-group 所致，故加以甲基化以避免酸所產生分離拖曳的現象，並加以乙醯化降低極性。

1. **甲基化**：取 F1-6 (約 300mg) 置於玻璃瓶中，酌量加入乙醚使其溶解，再慢慢滴入 Diazomethane，同時不斷攪拌，以 IR 來追蹤脂肪酸甲基化反應是否完成。
2. **乙醯化**：將甲基化反應完成的樣品(330mg) 加入pyridine及acetic anhydride =1 : 1(v/v)(5ml)，stir overnight。而後，將反應完成樣品以EA稀釋(因為濃度高易使 acetyl-group 斷裂)，再加入冰塊，stir (目的：利用水去除acetic acid，加冰塊以避免高溫使acetyl-group 斷裂)，待冰完全溶解後，以分液漏斗將下層水層漏掉，上層再加入冰塊stir，再以分液漏斗將下層水層漏掉。而後加入 3N HCl，以分液漏斗分層



後，保留上層有機層，將下層去除(目的：利用HCl去除多餘pyridine)。萃取兩次後，加入飽和NaHCO<sub>3</sub>混合，靜置，分層後保留上層有機層，將下層去除(目的：利用NaHCO<sub>3</sub>去除多餘HCl及酸)，得乙醯化之樣品(269mg)。

### 3. 矽膠管柱分離

經甲基乙醯化的 F1-6 以 TLC 追蹤其極性，並試驗欲分離之流洗系統，決定利用矽膠管柱，以 10%EA+90%Hexane 開始分離流洗。流洗順序為：10%EA/Hex、100%EA 及 70%EA/MeOH。每 100mL 收集一瓶，共收集 76 瓶。收集後的各區分物參考 TLC (thin layer chromatography)的結果，將 pattern 相近的區分合併後得 3 個區分，分別為：A8-22、A23-59 及 A60-76。

其中 A8-22 以 TLC 點片結果發現許多明顯的點，但因為極性相近，故決定以製備式 HPLC 再分離。而 A23-59 為明顯綠色點，可能是色素。A60-76 則出現連續拖曳的現象，無明顯的點。

### 4. 製備式 HPLC 分離

首先，A8-22 以 normal phase TLC 試驗最佳分離效果之溶劑比例，決定以 30%EA / Hex +5ml EtOH 為移動相。

#### (a)區分物之前處理

以 1mL 之移動相將區分物充分溶解後，以鐵氟龍製造之 filter 過濾。

#### (b)製備式 HPLC 之操作與參數設定

以移動相平衡 HPLC，當積分儀所劃之 baseline 平整不再漂移時，即達到平衡。此時可將區分物注入(300μL/針)，待 peak 出現時，用玻璃瓶分別加以收集，測 <sup>1</sup>H-NMR。製備式 HPLC 參數設定方面，流速：2mL/min，壓力：2000psi 以下，Detector：LDC refractomonitor III，Column：normal phase C18。

### 5. 結果

共分離 8 個區分(H1-H8)，分別測<sup>1</sup>H-NMR後，發現各區分仍為混合物。其中，H3 主要為Triacylglycerol (TG)的特徵。但因為分離後樣品的量過少，無法再次進行分離，且不足以將其甲基乙醯基切除進行細胞實驗。決定再由F1-6 重新分離。

## 【第一次實驗】

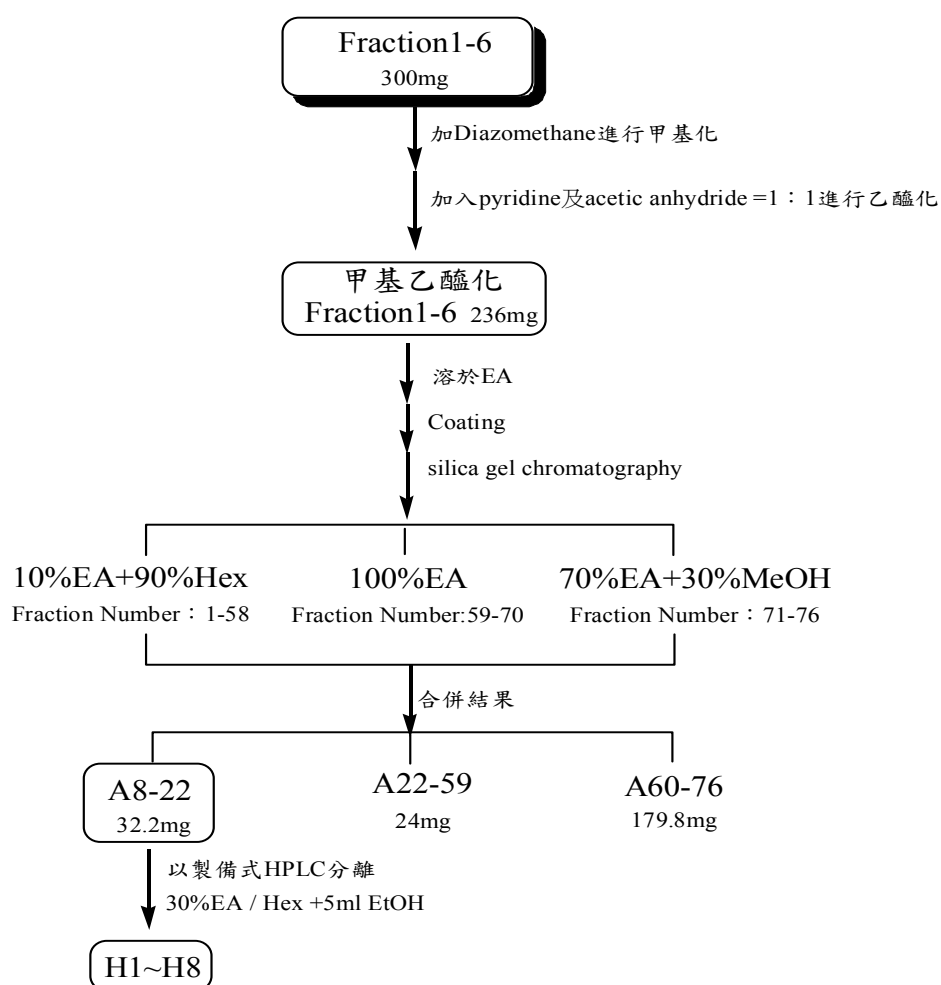


圖 2-7 Hexane 萃取層之活性區分物 F1-6 進行甲基乙醯化後分離流程

Fig.2-7 The protocol for fractionation of F1-6 of hexane extract after methylation and acetylation

**【第二次實驗】 F1-6 以 RP-18(Reverse-phase)進行分離**

(圖 2-8)

**1. RP-18 分離**

以reverse phase TLC試驗最佳分離效果之流洗條件，決定以 60% MeOH / H<sub>2</sub>O 開始分離流洗。首先，將RP-18 膠體懸浮於MeOH中，填充至玻璃管柱內，即以 60% MeOH/H<sub>2</sub>O加以平衡。取 1g F1-6 溶於少量acetone (因為sample對MeOH溶解度不佳，故溶於acetone)，注入已平衡之RP-18 管柱，待其融入RP-18 膠體後，加入 100mLH<sub>2</sub>O平衡極性。而後開始以 60% MeOH / H<sub>2</sub>O流洗，每 30mL收集一瓶，並將其減壓濃縮至乾，以TLC進行追蹤。當收集的樣品重量減少後，即降低流洗液的極性。流洗順序為：60% MeOH/H<sub>2</sub>O、80% MeOH/H<sub>2</sub>O、90% MeOH/H<sub>2</sub>O、100% MeOH、95% MeOH/acetone、90% MeOH/acetone及 50% MeOH/acetone。共收集 57 個區分。對照TLC的結果選擇R6、R13、R24、R41 及R55，分別測<sup>1</sup>H-NMR及細胞活性。結果發現：R13 及R24 均有活性。其中R13 在濃度大於 20μg/mL後，細胞會顯著死亡。因此，將TLC點片結果與R24 相似的區分物加以合併，為R21-29 共 117mg。為進一步純化，再以矽膠管柱進行分離。

**2. 矽膠管柱分離**

R21-29 合併後共 117mg，再以正相矽膠管柱進行流洗純化。以TLC試驗最佳分離效果之流洗條件，決定以chloroform:MeOH=6:1 進行分離流洗。共收集十瓶，名為RF1-10。以TLC點片結果，將RF3~RF6 及RF7~RF10 分別加以合併。其中，RF7~RF10 合併後重 11.6mg，而RF3~6 合併後重 82.5mg，由於其中含明顯色素，故再以中性Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>粉末，經 100%MeOH流洗以去除色素。

**3. 結果**

由於測<sup>13</sup>C-NMR時，樣品濃度越高越佳，故決定先將所有樣品溶解，待測完光譜後，再回收測細胞活性。而在測<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR時，需先將樣品以Chloroform-*d*、acetone-*d*或methanol-*d*溶解，而本樣品對Chloroform-*d*溶解度最佳，故先溶於Chloroform-*d*待測。

從<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR結果發現：R24 再經分離並去色素後所得之RF3-6 的光譜竟比原來R24 更為複雜，即成分更複雜，無純化之效果。因此推測可能原因為：樣品因於室溫光照下氧化破壞或樣品溶於Chloroform-*d*1 中存放，可能發生以下的反應：

$$\text{CHCl}_3 \rightleftharpoons \text{HCl} + \text{:CCl}_2$$

因而改變樣品的成分。此外，將RF3-6 測細胞活性後，發現其抑制PGE<sub>2</sub>的效果並不顯著。

而RF7~RF10 合併後所得的量很少，且從<sup>1</sup>H-NMR的結果可知仍為混合。因此，決定再由F1-6 重新分離。

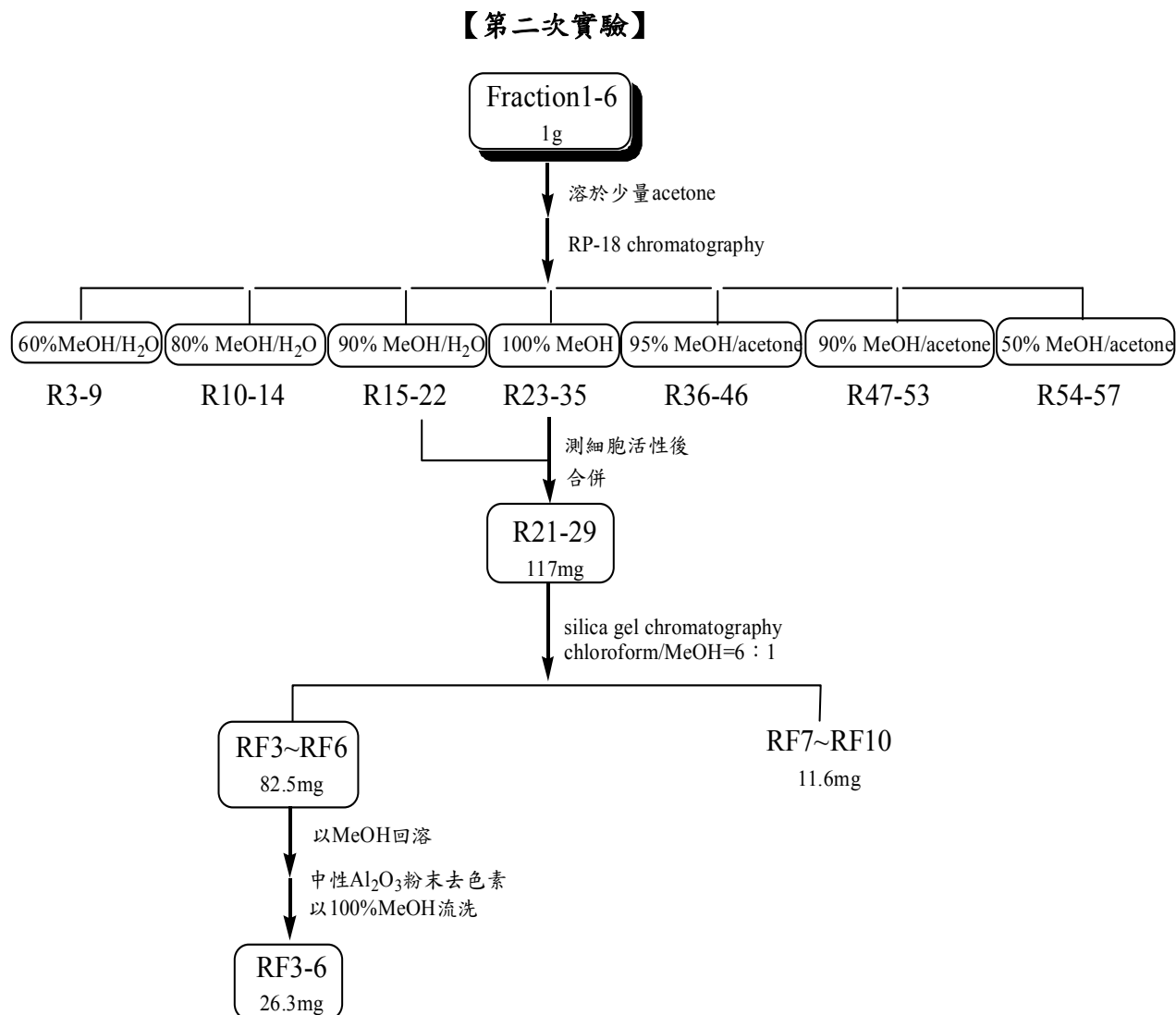


圖 2-8 Hexane 萃取層之活性區分物 F1-6 以 RP-18 層析區分之流程

Fig.2-8 The protocol for fractionation of F1-6 of hexane extract by RP-18 chromatography

**【第三次實驗】 F1-6 重新分離**

(圖 2-9)

**1. F1-6 以矽膠管柱粗分**

重新分離 F1-6，取樣品約 1.7g，依 TLC 點片結果，選擇以正相矽膠管柱先將其主要區分大致分離。以 TLC 試驗欲分離之流洗系統，選擇以 EA:Hexane =60:40 進行分離流洗。將 F1-6 以 EA 溶解混合後，加入 silica gel 進行 coating。流洗之沖提液為 60% EA/Hexane，每 150 mL 收集一瓶，共收集 36 瓶，並將其減壓濃縮至乾。同時以 TLC 追蹤流洗之區分物。收集後的各區分物參考 TLC 的結果，將 pattern 相近的區分合併後得 7 個區分，分別為 F1-6-1 ~ F1-6-7。其中，F1-6-2、F1-6-4、F1-6-6 在 TLC 上呈現 3 個極性不同的區分，因此分別進行細胞活性實驗。

細胞活性結果發現：F1-6-2 及 F1-6-4 具有抑制活性，因此將 F1-6-2、F1-6-3 及 F1-6-4 合併，得 742mg，再以矽膠管柱區分純化。

**2. 以矽膠管柱細分**

為能細分此區分物，避免樣品在某一極性大量流出，因此決定由低極性 10%EA/Hex 開始流洗。每 150mL 收集一瓶，每收 12 瓶再增加 5%EA 之極性進行流洗。共收集 180 瓶。以 TLC 追蹤並合併得 15 個區分：P1 ~ P15。

對照第二次實驗活性成分 R24 的 TLC 結果，將區分物 P11 ~ P13 加以合併，得 220mg。再以 RP-18 管柱層析純化。

**3. 以 RP-18 分離**

以 reverse phase TLC 試驗最佳分離效果之流洗條件，決定以 80%MeOH / H<sub>2</sub>O 開始分離流洗，流洗順序為：80%MeOH / H<sub>2</sub>O、90%MeOH / H<sub>2</sub>O 及 100% MeOH。每 50mL 收集一瓶，共收集 11 瓶：RP1 ~ RP11。以 TLC 追蹤流洗狀況，並分別測 <sup>1</sup>H-NMR。

結果發現：RP-10 的 <sup>1</sup>H-NMR 結果與第二次實驗所分離出具有活性的 R24 相近。因此，將 RP-10 進行細胞活性試驗，並送測 H-H COSY 以確認結構。

**4. 結果**

由 <sup>1</sup>H-NMR 及 H-H COSY 的結果(附錄圖一，圖二)，可確知該活性區分物主要為 TG，且其組成為中、短鏈飽和脂肪酸的型式為主。由於脂肪酸的型式多種，在 TG 中組成的比例不一，因此仍為混合的型式存在。也由此可知在分離純化的過程中，為何難以分離出純化的成分。而為確知當中脂肪酸組成的種類為何，故決定進一步的水解，以 GC-Mass 分析。

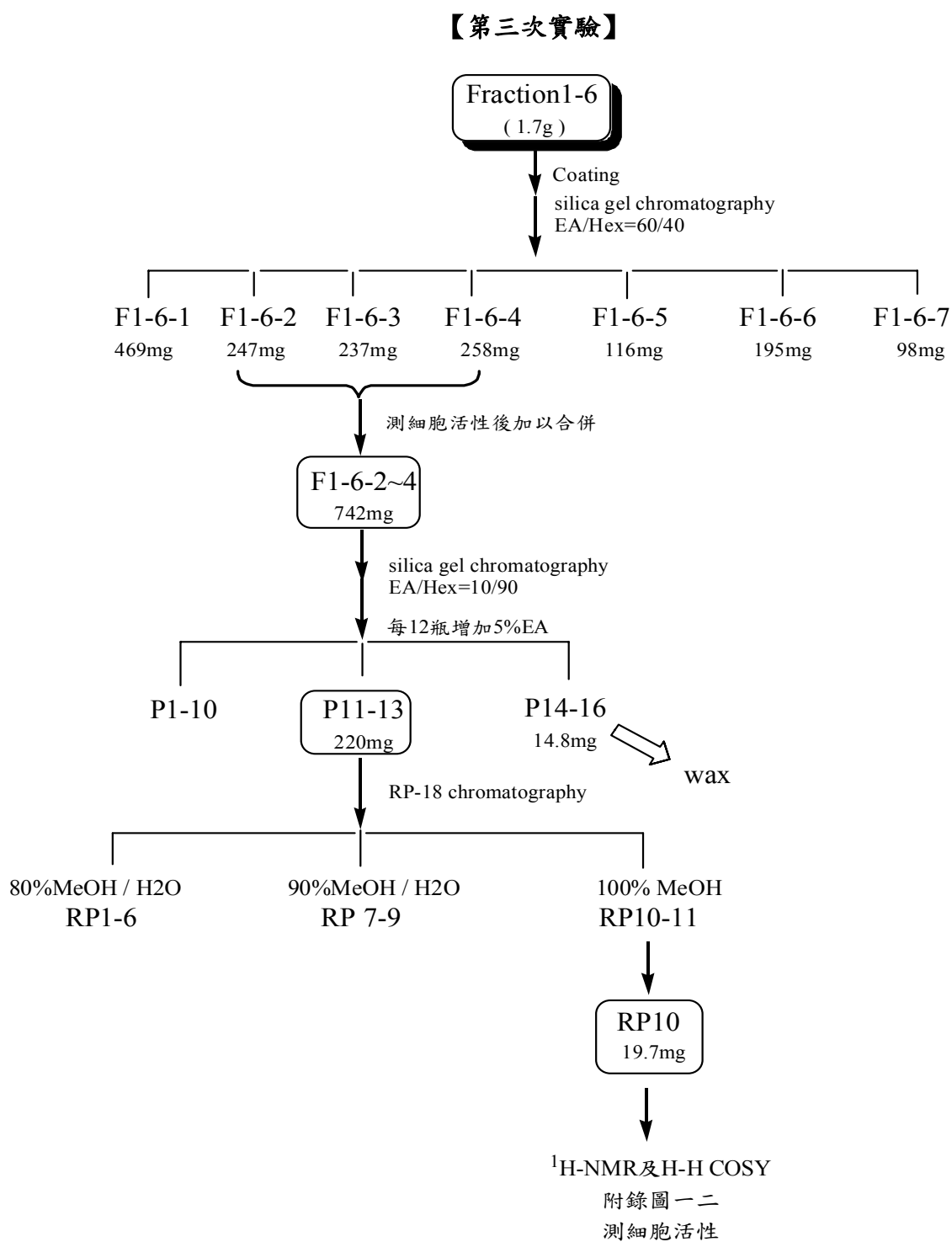


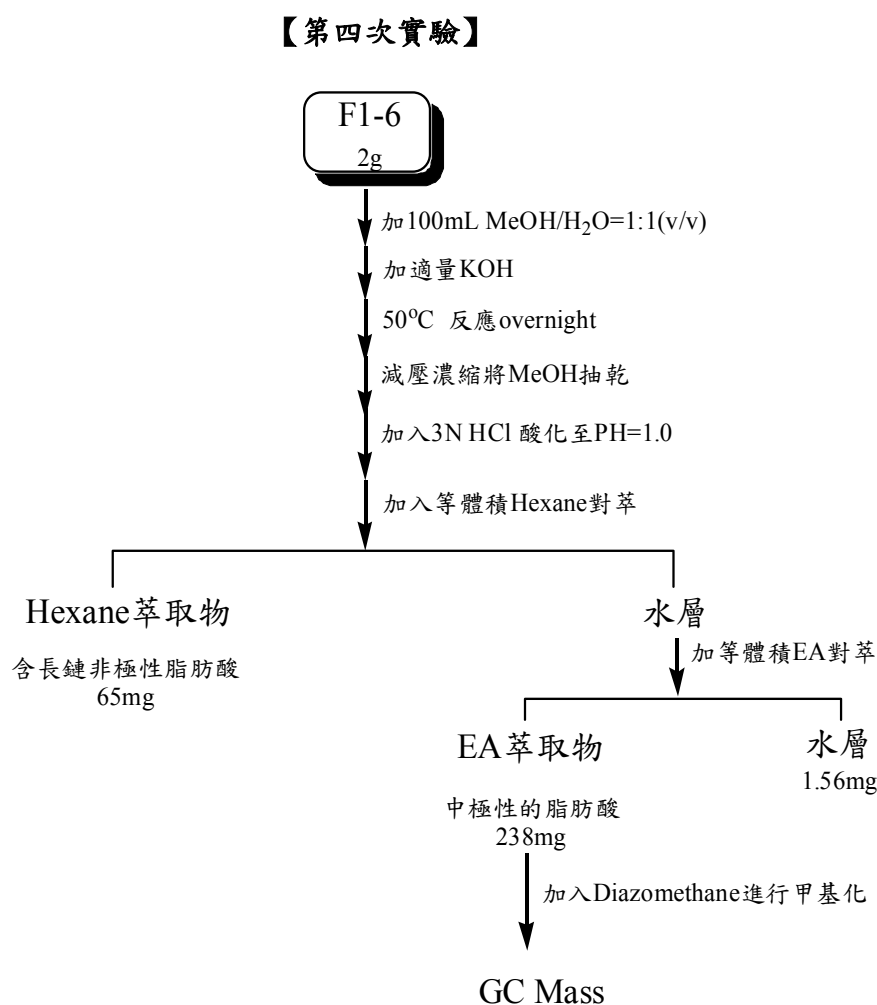
圖 2-9 Hexane 萃取層之活性區分物 F1-6 層析區分之流程

Fig.2-9 The protocol for fractionation of F1-6 of hexane extract by chromatography

## 【第四次實驗】 F1-6 鹼水解 EA 萃取物

(圖 2-10)

已知有效成分可能為TG接中短鏈飽和脂肪酸的型式，而為確知在F1-6 中短鏈脂肪酸所佔的比例及組成為何。因此，藉由將F1-6 鹼水解分離脂肪酸，再分別以Hexane及EA進行萃取，分別測<sup>1</sup>H-NMR及IR以評估其水解及萃取情形。而後，將水解後含中極性脂肪酸的EA萃取物，部份進行甲基化，送測GC-Mass，部分進行細胞活性的實驗，以評估此活性區分物經水解後是否仍具抑制PGE<sub>2</sub>的活性。流程如下：



(附錄圖三)

圖 2-10 Hexane 萃取層之活性區分物 F1-6 鹼水解萃取脂肪酸

Fig.2-10 The protocol for extraction of fatty acid of hydrolyzed F1-6 fraction.

**(二) Fraction151 ~ 158 純化分離**

大量萃取分離進行細胞實驗後，發現 Hexane 區分物 F190 抑制效果最佳，其次為 F152。F152 為 40%EA/Hex 所流洗出來，極性較低。因此，欲從該極性區分物再進行層析分離，故分別將極性相同的瓶數合併，以尋找其他可能的活性成分。

**矽膠管柱分離**

將相同極性的F151~ F158 加以合併，共得 6.487g。首先，利用TLC試驗欲分離之流洗系統。由於Hexane/EA的系統下，此區分物也有拖曳現象，無法分離出明顯的點，因此，改以Chloroform:EA系統分離。取樣品 4.5g，以Chloroform:EA=1:1 開始流洗，每 150 mL 收集一瓶，共收集 5 瓶，分別將其減壓濃縮至乾，當所流洗出化合物減少，再增加極性改以Chloroform:EA=3:7 流洗，共收集 8 瓶。收集後的各區分物參考TLC的結果，將pattern相近的區分合併後得 3 個區分，分別測<sup>1</sup>H-NMR、IR及細胞活性。流程如下：

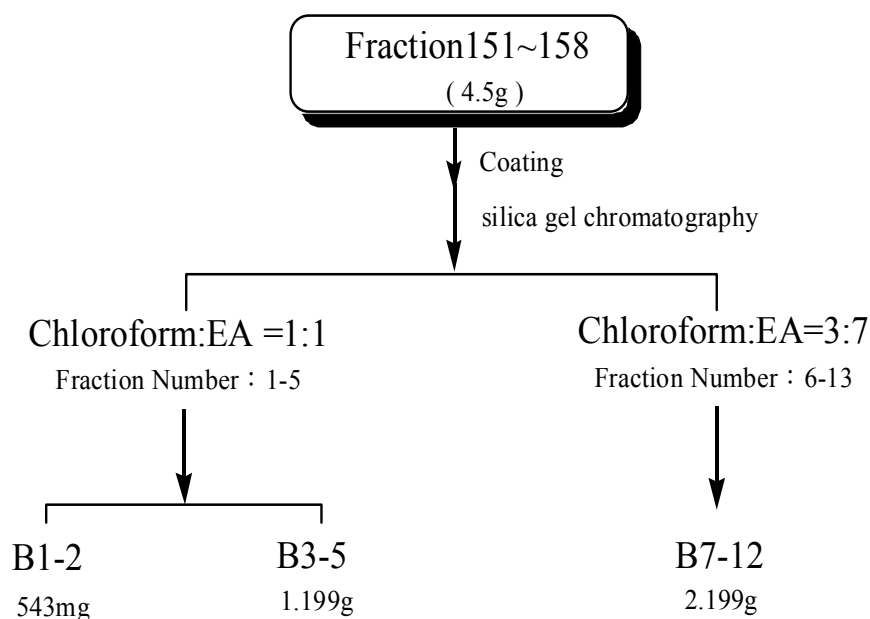


圖 2-11 Hexane 萃取層之活性區分物 F151-158 以矽膠管柱層析分離流程圖

Fig.2-11 The protocol for fractionation of F151-158 of hexane extract by silica gel chromatography



Fraction151~158 經矽膠管柱區分成B1-2、B3-5 及B7-12，分別進行細胞實驗後發現：B3-5 及B7-12 具有抑制效果。從<sup>1</sup>H-NMR及IR中，發現的特徵有：

B3-5：存在脂肪酸，有雙鍵、 $\omega$ -3 雙鍵、OH-group 及酯化的特徵

B7-12：存在 steroid 及脂肪酸，有雙鍵、多組 OH-group 及酯化的特徵

由於 B7-12 在 TLC 的結果為明確的點，且可能含有 steroid 的結構，因此決定先由 B7-12 著手分離。

## 1. B7-12 的純化分離

### 【實驗一】

(圖 2-12)

經上述分離所得之 B7-12 在 TLC 上為一點，難以利用其他分離系統加以區分。而從光譜結果已知該區分物含脂肪酸，因此，將樣品進行甲基化後分離。

**甲基化：**取樣品 (約 600mg) 置於玻璃瓶中，酌量加入乙醚使其溶解，再慢慢滴入 Diazomethane，同時不斷攪拌，以 IR 來追蹤脂肪酸甲基化反應是否完成。

### 矽膠管柱分離

經甲基化的B7-12 以TLC追蹤並試驗欲分離之流洗系統，決定利用矽膠管柱，以 20%EA/Hex開始分離流洗，每 15mL收集一瓶，共收集 57 瓶。再改以 40%EA/Hex流洗，共收集 14 瓶。收集後的各區分物參考TLC的結果，將pattern相近的區分合併後得 2 個區分，為M16-24 及M58-71，分別測<sup>1</sup>H-NMR。流程如下：

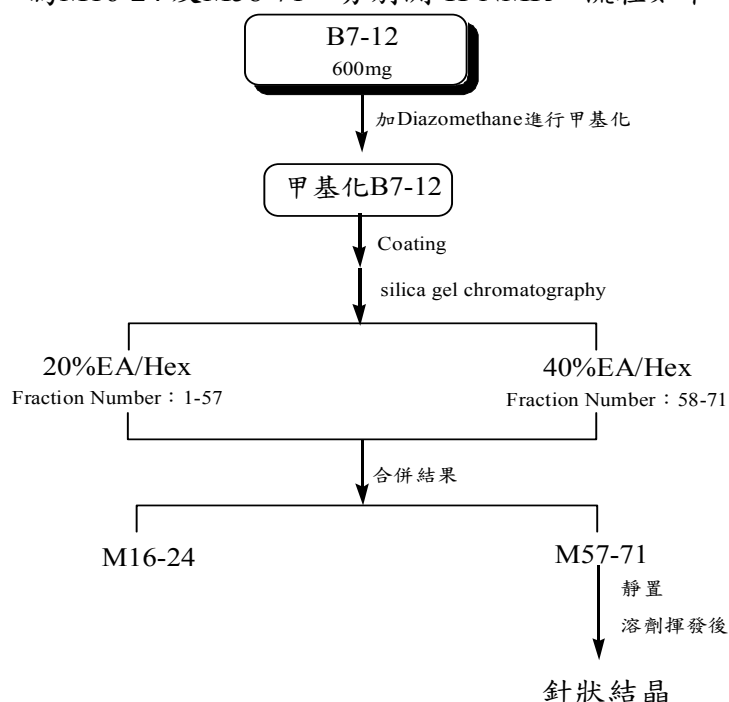


圖 2-12 Hexane 萃取層之活性區分物 B7-12 進行甲基化後分離流程

Fig.2-12 The protocol for fractionation of B7-12 of hexane extract after methylation.

結果發現：M16-24 為甲基化後的產物，而 M58-71 為起始物，於 40%EA/Hex 中靜置約一週後，出現透明針狀結晶。由於甲基化後仍為混合物。因此，決定改以其他方式分離(實驗二)。

### 【實驗二】

(圖 2-13)

從光譜結果已知 B7-12 區分物含多組 OH-group。因此，決定將其乙醯化後再分離。

**乙醯化：**取樣品(1.02g) 加入 pyridine 及 acetic anhydride =1 : 1(v/v)(15ml), stir overnight。方法如前述：p32 頁，得乙醯化之樣品(600mg)。

### 矽膠管柱分離

經乙醯化的B7-12 以TLC追蹤並試驗欲分離之流洗系統，決定利用矽膠管柱，以 5%EA/Hex開始分離流洗，流洗順序為：5%EA/Hex、10%EA/Hex、20%EA/Hex 及 40%EA/Hex。每 100mL收集一瓶，共收集 30 瓶。收集後的各區分物參考TLC的結果，將pattern相近的區分合併後得 3 個主要區分，為A12、A15 及A19-26，分別測<sup>1</sup>H-NMR。流程如下：

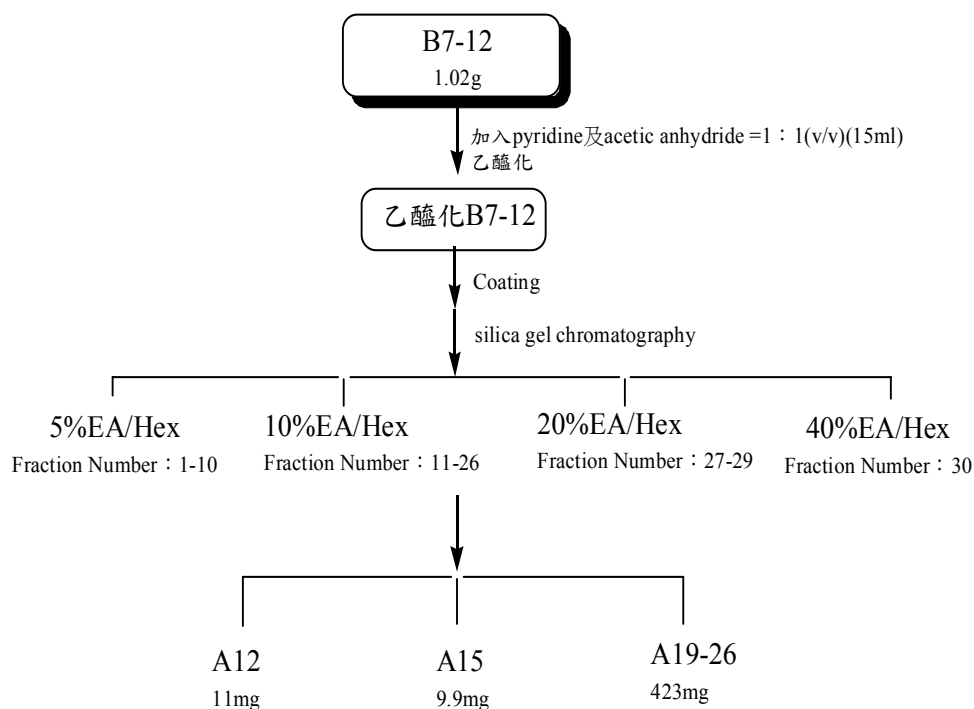


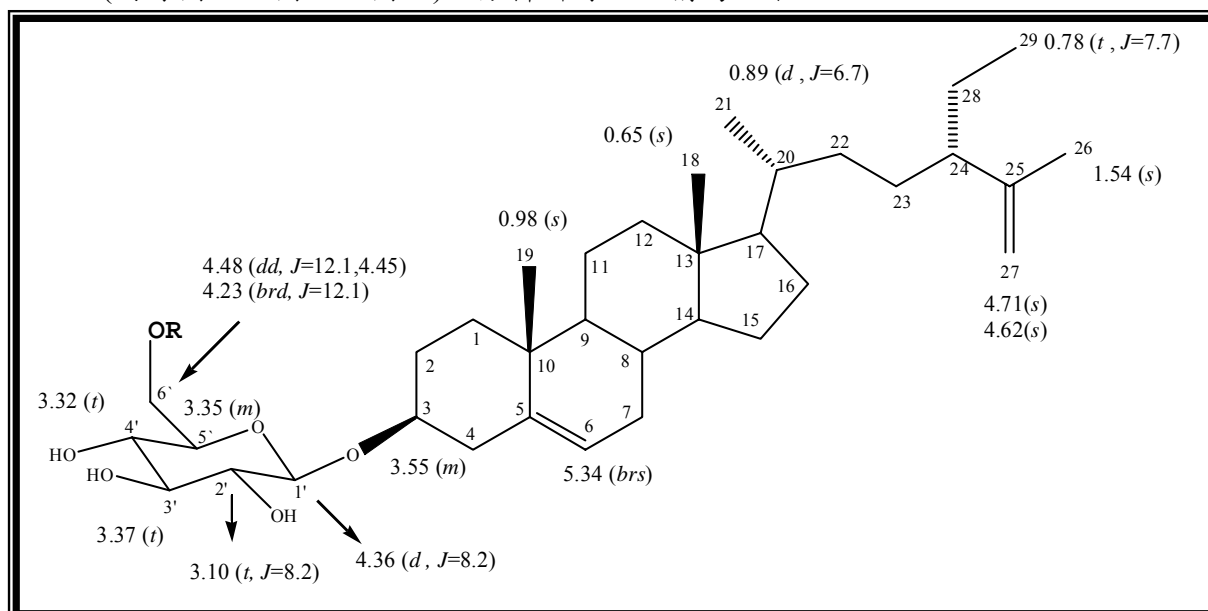
圖 2-13 Hexane 萃取層之活性區分物 B7-12 進行乙醯化後分離流程

Fig.2-13 The protocol for fractionation of B7-12 of hexane extract after acetylation.

結果發現：乙醯化的結果(附錄圖七：<sup>1</sup>H-NMR)可知共有 3 個OH-group存在。三個主要區分在光譜上的特徵相似，主要的差異在支鏈之飽和度。

## 【結晶】

結晶的部分測<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR、FAB-MS及熔點測試，以鑑定其結構(附錄圖四、圖五及圖六)。分析所得之結構為如下：



☞ R= fatty acid (palmitate or C17 or C19)

Molecular Formula : C<sub>51</sub>H<sub>88</sub>O<sub>7</sub> M<sup>+</sup> m/z : 813.7

Molecular Formula : C<sub>52</sub>H<sub>92</sub>O<sub>7</sub> M<sup>+</sup> m/z : 827.6

Molecular Formula : C<sub>54</sub>H<sub>96</sub>O<sub>7</sub> M<sup>+</sup> m/z : 855.6

☞ 熔點測試結果為：181°C

☞ Chemical Name :

3-O-[6'-O-palmitoyl-β-D-glucosyl]-stigmasta-5,25(27)-diene hexadecanoic acid

6-[17-(4-ethyl-1,5-dimethyl-hex-5-enyl)-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-yloxy]-3,4,5-trihydroxy-tetrahydro-pyran-2-ylmethyl ester.

此結晶所鑑定的結構為具有飽和脂肪酸之支鏈，是目前已知成分(Leitao *et al.*,1994 ; Guevara *et al.*,1989)。然而，在乙醯化分離的過程，可知其支鏈的脂肪酸，包含飽和及不飽和脂肪酸。因此，當中可能含有其他接著不同碳數或不飽和脂肪酸的成分，需進一步的分離。此外，由乙醯化的結果確知當中含有 3 個 OH-group 存在，也符合結晶結構的結果，為六碳糖上的 3 個 OH-group。

此成分經細胞活性測試後，發現並無抑制PGE<sub>2</sub>合成的作用。

## 2. B3-5 的純化分離

從 B7-12 所分離的結晶並非為具有活性的成分，因此推測當中可能有活性的成分與 B3-5 是重疊的。因此，欲從 B3-5 再進行分離。

先以 TLC 試驗欲分離的條件，由於在 EA/Hex 系統仍有拖曳的情形，因此試以 Chloroform/MeOH 系統，結果決定以 Chloroform:MeOH = 12:1 達水飽和狀態，以製備式 TLC 片進行分離。

### 製備式 TLC

在製備式 TLC 上事先以鉛筆劃上欲 loading 的線，取 B3-5 約 500mg 以 EA 溶解後，均勻地 loading 在線上，待乾燥後以大展開槽內盛裝展開液：

Chloroform:MeOH = 12:1(水飽和)進行展開，達 TLC plate 前緣位置即取出吹乾，再進行第二次展開，完成後吹乾。

展開完成的 TLC 片置於 UV 燈下觀察展開情形，並以鉛筆劃上欲分割的區塊，共為五區。利用鐵刮勺分別將各區刮下，並分別溶於 EA 萃取，經超音波震盪機震盪數分鐘後，再以濾紙過濾。分別得到 T1 ~ T5 的區分物。流程如下：

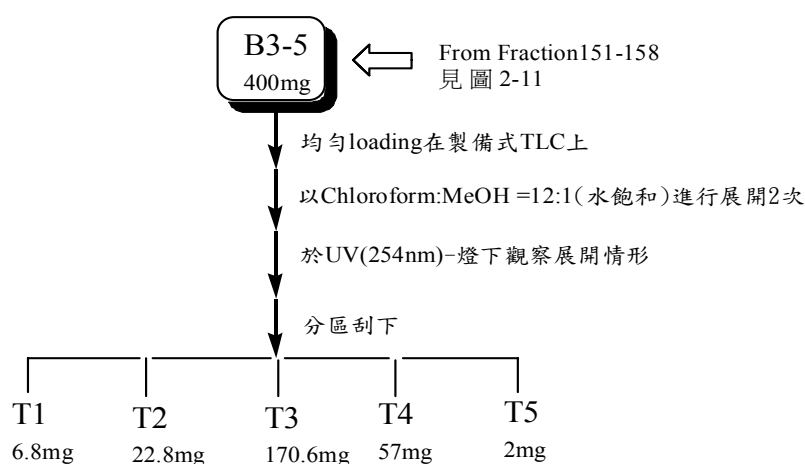


圖 2-14 Hexane 萃取層之活性區分物 B3-5 以製備式 TLC 分離

Fig.2-14 The protocol for fractionation of B3-5 of hexane extract by preparative TLC

其中，T3 較為大量，測<sup>1</sup>H-NMR的結果發現：仍為脂肪酸混合物。特徵包括：含有雙鍵， $\omega$ -3 雙鍵、OH-group及酯類。

## 六 脂肪酸甲基酯化法(Diazomethane 法)

於雙頸圓底瓶中秤取 5g Diazald(N-methyl-N-nitroso-p-toluenesulfonamide)，溶於 50mL 酒精及 50mL 乙醚中，置於冰浴中；正上方之一端準備添加 10%NaOH，另一端接上冷凝管，冷凝管末端接上至於冰浴中的收集瓶。所有玻璃器材均不可有磨砂口，故各銜接口皆以 O-ring 及鐵夾加以密合固定。將 100mL NaOH 加至圓底瓶上方的添加管中，使其慢慢滴入圓底瓶中，則 Diazomethane 之製備反應開始。

待圓底瓶中之上層乙醚層呈現黃色，下層呈無色後，即移除冰浴，改以油浴加熱，提高反應溫度(由於乙醚的沸點約為 35-37°C，因此，加熱溫度控制於 37°C 左右)，將含有 Diazomethane 之乙醚蒸餾出，並冷凝至收集管中，待圓底瓶中之黃色乙醚層完全蒸出，即完成 Diazomethane 之製備。

將欲甲基化的脂肪酸樣品，置於玻璃瓶中，酌量加入乙醚使之溶解，再慢慢加入製備好的 Diazomethane，並不斷攪拌，以 IR 及 NMR 追蹤脂肪酸甲基酯化是否完成。

## 七 光譜鑑定及儀器設備

### (一) 核磁共振光譜儀(Nuclear Magnetic Resonance ; NMR)

Bruker AC-200 (200MHz)、Bruker AC-300 (300MHz)

樣品以 Chloroform-*d*1(CDCl<sub>3</sub>)、acetone-*d*6 或 methanol-*d*1 溶解，chemical shift 以 ppm 為單位。

### (二) 紅外線光譜(Infrared Spectrometer ; IR)

Bio-Rad FTS-40 型 FT-IR

液化樣品以純液(溶於乙醚中)型式塗抹於溴化鉀(KBr)之鹽片上，固體樣品則壓製成溴化鉀薄片來測試，單位為 cm<sup>-1</sup>。

### (三) FAB-MS

Jeol JMS-HX110 Mass-Spectrometer

### (四) 製備式高效能液相色層分析儀( Preparative HPLC)

GBCLC-1440

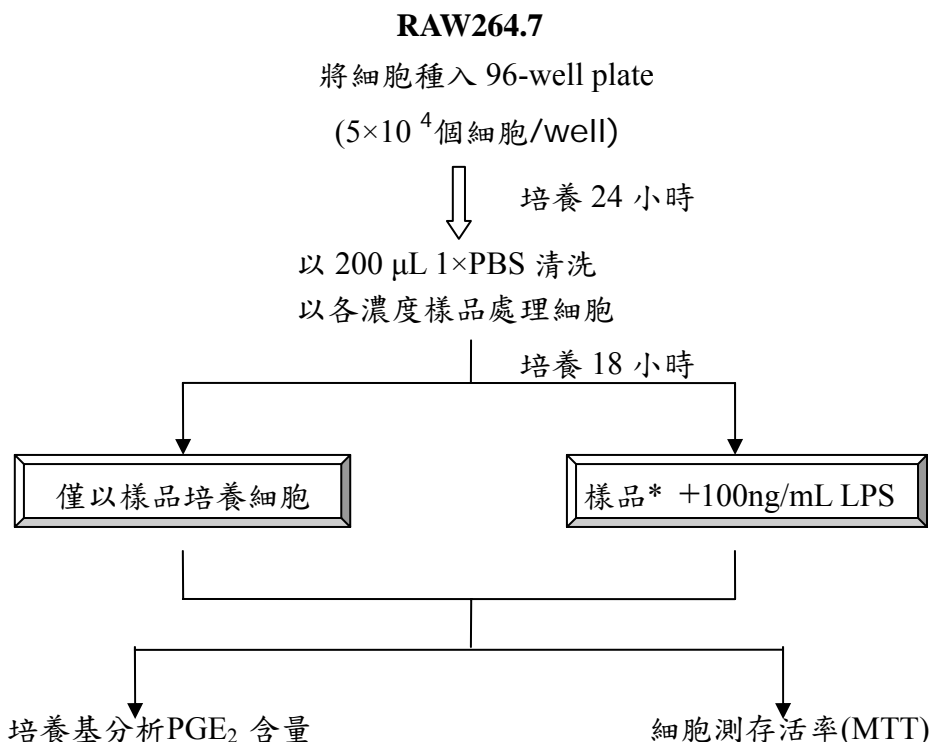
Column : Lichrocart Si60(5μm)10mm x 250mm

Detector : LDL refractomonitor III

### (五) 氣相層析質譜(GC-Mass)

GC 配備 HP-5MS Column : 30m x 0.25mm x 0.25μm，操作條件：氦氣流速 1.0mL/min，注入口溫度：250°C，烘箱升溫程式起始為 50°C 維持 3mins，而後每分鐘升溫 10°C，至 280°C 維持 40 mins。

### 第三節 生物活性分析



\*樣品為苦瓜粗萃物、區分物、分離物或脂肪酸

#### 一 細胞培養系統的建立

##### (一) 細胞來源

RAW264.7：ATCC number：TIB-71。由小鼠(BALB/c)的 monocyte 經 virus-induced 而成的巨噬細胞株。基本培養液：Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, USA)。添加 4 mM L-glutamine, 1.5 g/L sodium bicarbonate, 4.5 g/L glucose。細胞培養於含 10% FBS 之 DMEM 中。培養條件：37°C, 5%CO<sub>2</sub>, 每三天繼代培養一次，繼代培養時使用 scraper 進行去附作用，取 1/10 的細胞數 (subcultivation ratio=1:10)加入新的培養瓶中。

##### (二) 樣品處理對PGE<sub>2</sub>生成量的影響

將長滿 80%的RAW264.7 細胞以scraper去附後，用含 10% FBS之DMEM調整細胞濃度為每毫升  $5 \times 10^5$  個細胞，分別於 96 well培養盤中接種 100  $\mu$ L ( $5 \times 10^4$  個細胞/well)。培養 24 小時後，以 200  $\mu$ L 1 $\times$ PBS清洗，而後處理樣品：以DMEM將樣品稀釋成不同濃度，分為兩部分：一為單獨添加各濃度樣品，一為同時添加各濃度樣品及 100ng/mL LPS。均培養 18 小時後，收集培養液，進行PGE<sub>2</sub>的測定，於培養盤中的細胞則進行MTT染色，測細胞存活率。

## 二 山苦瓜區分物之活性分析

依據上節山苦瓜之分離流程，進行各區分物活性之分析，整理如下表所示：

表 2-1 山苦瓜區分物之活性分析一覽表

山苦瓜萃取分離方式		流程圖
山苦瓜凍乾粉末的乙酸乙酯萃物 (EAE) 經對萃分離	Hexane 區分物	圖 2-3
	EAE-2 區分物	
	H <sub>2</sub> O區分物	
山苦瓜 Hexane 區分物以矽膠管柱層析 分離(少量)	共七個區分物	圖 2-4
山苦瓜大量萃取分離 Hexane 萃取層以矽膠管柱層析分離	共九個區分物	圖 2-5
Hexane 萃取層之活性區分物 F189-191 以矽膠管柱層析分離	F1-6、F8-12 及 F13-21 共三個區分物	圖 2-6
Hexane 萃取層之活性區分物 F1-6 以 RP-18 管柱層析分離(第二次實驗)	R6、R13、R24、R41 及 R55 共五個區分物	圖 2-8
Hexane 萃取層之活性區分物 F1-6 以矽膠管柱粗分離(第三次實驗)	F1-6-2、F1-6-4、F1-6-6 共三個區分物	圖 2-9
Hexane 萃取層之活性區分物 F1-6 以 RP-18 管柱分離(第三次實驗)	RP-10	圖 2-9
Hexane 萃取層之活性區分物 F1-6 經鹼水解，EA 萃取(第四次實驗)	F1-6 水解(EA 萃取)	圖 2-10
Hexane 萃取層之活性區分物 F151-158 以矽膠管柱層析分離	B1-2、B3-5 及 B7-12 共三個區分物	圖 2-11
Hexane 萃取層之活性區分物 B7-12 進行甲基化後分離所得之結晶	結晶物	圖 2-12

### 三 測試脂肪酸標準品之活性

在山苦瓜的區分過程中，發現具有活性的區分物當中，存在脂肪酸或脂肪酸酯化(TG)型的特徵。因此，為進一步確知何種脂肪酸具有抑制PGE<sub>2</sub>的活性，決定以標準品進行細胞實驗。

起初將F1-6以GC-mass分析的結果得知，山苦瓜中主要的脂肪酸為一般長鏈的型式，Nasim S (1998)分析苦瓜全果中脂肪酸的組成，指出：苦瓜中主要的脂肪酸為palmitic acid及oleic acid，其次還包含stearic、lauric、linoleic、arachidic、myristic及capric acids。因此，初步以一般脂肪酸進行篩選。此外，在山苦瓜的分離過程中，發現具有活化PPARs作用的CLN，及文獻中所提及具有抑制PGE<sub>2</sub>合成的CLA(Iwakiri *et al.*,2002)也同時進行試驗。

而後，在第三次實驗，鑑定F1-6的活性區分物RP10可能主要為接中、短鏈飽和脂肪酸的TG，故選擇以中、短鏈脂肪酸及MCT oil進行細胞實驗。而在第四次實驗中，將F1-6鹼水解，以EA萃取中極性脂肪酸後甲基化，送測GC-Mass的結果得知：當中含有短鏈雙酸的型式包括：octanedioic acid(八碳雙酸)、nonanedioic acid(九碳雙酸)及decanedioic acid(十碳雙酸)。因此，也以其標準品進行細胞實驗。

實驗樣品整理如表 2-2 所示：



## 種類來源及配製

表 2-2 脂肪酸標準品之活性分析一覽表

種類	分子式		分子量	來源
Propionic acid	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>		74	Arose
Butyric acid	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>		88	Arose
Caproic acid	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>		116	Acrose
Caprylic acid	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>		144	Acrose
Capric acid	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>		172	Acrose
Lauric acid	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>		200	Sigma
Myristic acid	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>		228	Acrose
Palmitic acid	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>		256	Sigma
Stearic acid	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>		284	Acrose
Oleic acid	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	C18:1 ; 9	282.5	Cayman
Linoleic acid	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	C18:2 ; 9,12	280.5	Cayman
Linolenic acid	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	C18:3 ; 9,12,15	278.4	Cayman
Arachidonic acid	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	C20:4 ; 5,8,11,14	304.5	Cayman
Conjugated linoleic acid(CLA)	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	C18:2 ; 9- <i>c</i> ,11- <i>t</i> 或	280.5	Cayman
Conjugated linolenic acid (CLN)	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	C18:3 ; 9- <i>c</i> ,11- <i>t</i> ,13- <i>t</i>	278.4	苦瓜分離
Octanedioic acid	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	Suberic acid	174.2	Acrose
Nonanedioic acid	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	Azelainic acid (85%)	188.22	Acrose
Decanedioic acid	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	Sebacic acid	202.2	Acrose
MCT oil (中鏈三酸甘油酯) :	Fatty acid	<C8    C8    C10    >C10		Mead
Lipid Fraction of Coconut Oil	組成(%)	<6%    67%    23%    <4%		Johnson
	Consisting Primarily of the Triglycerides of the C8 and C10			

\*MCT oil經<sup>1</sup>H-NMR的鑑定結果為TG的型式存在，並無游離的脂肪酸(附錄圖八)。

配製：將脂肪酸或化合物精秤，溶於適當量之溶劑(無水酒精或 DMSO)，配製成 stock solution 凍於-20°C 儲存備用。實驗時，再以培養液(DMEM)系列稀釋成適當濃度處理 RAW264.7 細胞。

#### 四 細胞存活率(MTT)之測定：

##### (一) 原理

MTT 為一種活細胞染色法，活細胞粒腺體中之 dehydrogenase，可將 MTT 之 tetrazolium ring 打斷，形成 formazan。此時，由黃色轉變成深藍色，再用 acidic isopropanol 將 formazan (水不溶性) 溶出，以 ELISA reader 測定 540nm 吸光值並對照標準曲線，計算活細胞數目。

##### (二) 試劑

1. MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenylterazolium bromide ,Thiazolyl blue, Sigma) stock solution：以 PBS 配製成 5mg/ml 的 MTT stock solution，再以 0.2 $\mu$ m 過濾膜過濾並避光儲存。
2. 溶劑：0.04N HCl isopropanol (Hayashi)

##### (三) 實驗步驟

以 MEM 將 MTT stock 溶液稀釋 10 倍，吸除微孔中殘餘培養液，於每一 well 中加入 55 $\mu$ L 稀釋之 MTT 溶液，隨後將之置入 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 3 小時，再加入 100 $\mu$ L 的 0.04N HCl isopropanol 將色劑溶出，並以酵素免疫分析儀 (ELISA reader) 讀取 540nm 吸光值。

#### 五 前列腺素(PGE<sub>2</sub>)之測定：

##### (一) 原理

採用市售試劑套組以競爭性免疫分析方法進行 PGE<sub>2</sub> 分析。樣品(上清培養液)中 PGE<sub>2</sub> 與以酵素 (acetylcholinesterase) 標示之 PGE<sub>2</sub> (tracer) 競爭 PGE<sub>2</sub> 單株抗體 (monoclonal Antibody)，然後 PGE<sub>2</sub>-antibody complex 結合到事先被覆於微孔內的二級抗體 (goat anti-mouse polyclonal antibody)，培養一段時間後移除未結合的物質，再加入含有 acetylcholinesterase substrate 的 Ellman's reagent。PGE<sub>2</sub> tracer 上之 acetylcholinesterase 與 reagent 中的 substrate 作用產生黃色產物於 415nm 具有吸光。吸光值越高代表樣品中的 PGE<sub>2</sub> 的含量越少。再利用標準品做系列稀釋進行相同反應得標準曲線，供換算樣品中 PGE<sub>2</sub> 的含量。此分析方法中，吸光值與結合於微孔中之標示 PGE<sub>2</sub> 量成正比，而與樣品中所含之 PGE<sub>2</sub> 量成反比。

## (二) 試劑

市售試劑 prostaglandin E<sub>2</sub>-monoclonal enzyme immunoassay kit  
(Cayman514010, MI, USA)

### 1. 主要含有以下試劑：

EIA buffer

PGE<sub>2</sub> Ache Tracer (為連接一個 acetylcholinesterase 之 PGE<sub>2</sub>)

PGE<sub>2</sub> EIA Antibody、PGE<sub>2</sub> EIA Standard

Ellman's reagent

### 2. 標準曲線範圍於 7.8 pg/ml 到 1000 pg/ml 之間

### 3. PGE<sub>2</sub>之抗體專一性為 100%

## (三) 實驗步驟

將已被覆二級抗體的 96 孔微盤，於每微孔注入 200 $\mu$ L 洗液(wash buffer)潤濕後倒出，注入 50 $\mu$ L EIA buffer (B<sub>0</sub>·見下文)或標準品 (standard)或稀釋的樣品 (sample)或 quality control (QC)，於被覆二級抗體的微盤中再依序加入 50 $\mu$ L PGE<sub>2</sub>Ache Tracer 及 50 $\mu$ L PGE<sub>2</sub>EIA Antibody，室溫培養 18 小時後，倒出並以洗液將未結合在微盤上的物質(包括樣品中的PGE<sub>2</sub>及試劑組的tracer)洗去，再加入Ellman's reagent反應 1.5 小時，以酵素免疫分析儀(ELISA Reader)讀取 415nm 的吸光值。

## (四) 計算

### 1. 計算 % B/B<sub>0</sub> (Sample or standard bound/maximum bound)

(1) % B/B<sub>0</sub> :  $(A_{\text{standard or sample}} - A_{\text{NSB}}) / (A_{B_0} - A_{\text{NSB}})$

(2) NSB(Non-specific Binding)：表示 PGE<sub>2</sub> tracer 非專一性結合於微孔的量  
(不加一級抗體的空白試驗)

(3) B<sub>0</sub>(Maximum Binding)：表示 PGE<sub>2</sub> tracer 藉一級抗體結合於微孔的最大量

(4) A<sub>standard or sample</sub>：表示標準品及樣品的吸光值

(5) A<sub>NSB</sub>：表示 NSB 的吸光值

(6) A<sub>B<sub>0</sub></sub>：表示 B<sub>0</sub> 的吸光值

### 2. 以 % B/B<sub>0</sub> 對標準品濃度建構標準曲線，並以內插法求出樣品中 PGE<sub>2</sub> 濃度。 樣品稀釋度使測定結果介於 80% B/B<sub>0</sub>~50% B/B<sub>0</sub> 間(30.9pg/mL~123.1pg/mL) 則可接受。

## 六 統計分析

實驗結果均以平均值±標準偏差(Mean ± SD)表示。樣品對PGE<sub>2</sub>生成量的影響之實驗結果以單向變方分析(one way ANOVA, Analysis of Variance)及鄧肯式多變域測驗(Duncan's Mutiple Range Test)測定不同處理間差異之顯著性。每個實驗至少重複三批且結果類似，每批實驗中每一處理皆進行三重複。

## 七 Maximum inhibition(%)及IC<sub>50</sub>的計算

### (一) Maximum inhibition(%)：

以空白組(blk)的抑制百分率為 100%，LPS 刺激組(0)的抑制百分率為 0%。求樣品最大抑制量相對於空白組(blk)，其抑制百分率為多少。

$$\text{Maximum inhibition(\%)} = (P_0 - P_{S(\text{max inhibition})}) / (P_0 - P_{\text{blk}}) \times 100\%$$

$P_{S(\text{max inhibition})}$ ：樣品在最高效應濃度下(即對PGE<sub>2</sub>生成達最大抑制量時)，RAW264.7 細胞 PGE<sub>2</sub>的生成量

$P_{\text{blk}}$ ：在無任何刺激下，RAW264.7 細胞PGE<sub>2</sub>的生成量

$P_{\text{FoL100}}$ ：在給予 100ng/mL LPS刺激下，RAW264.7 細胞PGE<sub>2</sub>的生成量

### (二) IC<sub>50</sub>：

以樣品最大抑制量的抑制百分率為 100%，LPS 刺激組的抑制百分率為 0%。求各濃度樣品的抑制百分率(%)為：

$$[1 - (P_{\text{sample}} - P_{S(\text{max inhibition})}) / (P_0 - P_{S(\text{max inhibition})})] \times 100\%$$

$P_{\text{sample}}$ ：LPS與各濃度樣品存在下，RAW264.7 細胞PGE<sub>2</sub>的生成量。

將各濃度樣品之抑制百分率與其濃度作圖，並以內插法求抑制百分率為 50%時的樣品濃度，即為IC<sub>50</sub>。