

103 年度嘉南藥理大學研究計畫補研究成果報告

台灣蕘花根黃酮類成分的研究 (CN10319)

Studies on the Flavonoids from
the Roots of *Wikstroemia taiwanensis*

藥學系 陳莉螢

中華民國 104 年 2 月 26 日

Abstract

Three compounds, shikokianin B (1), pinoresinol (2), and wikstromol (3), were isolated from the roots of *Wikstroemia taiwanensis* (*Thymelaeaceae*). Their structures were elucidated by spectroscopic analysis. Shikokianin B (1) showed antitubercular activity, pinoresinol (2) showed anticancer, and wikstromol (3) was reported to show antileukemic activity

中文摘要

在台灣薺花的根部中我們目前發現有三個化合物,這些化合物經由光譜分析後分別為 shikokianin B(1), pinoresinol (2), and wikstromol (3),其中 shikokianin B 是已經有文獻指出其化合物有抗結核的藥理活性,而且 wikstromol 也在文獻上指出其化合物具有抗白血病的藥理活性, pinoresinol 目前在文獻則是指出他有抗癌症的藥理活性,因此相信在台灣薺花的根部應該還能找到一些特別的化合物,希望在未來的研究上能夠找到更多具有藥理活性的化合物。

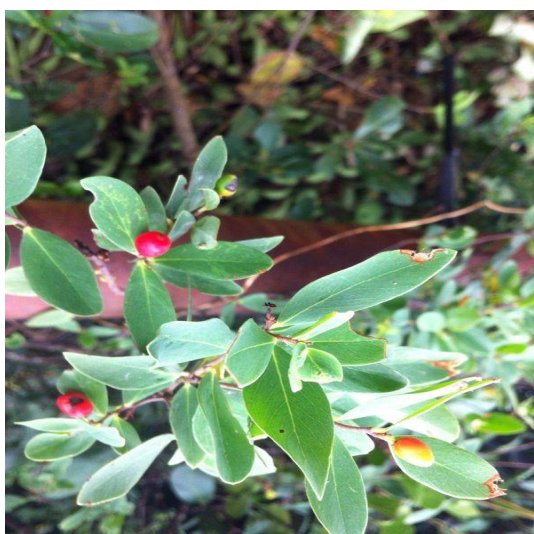
研究動機

由於先前研究台灣薺花其莖部發現了其莖部具有抗結核的成份¹³,所以這次利用其根部來做研究,因為根部在植物中是負責吸收營養的器官。所以便推測其根部所具有的成份應該會更加豐富,所以就以此根部來做研究。

在文獻記載中, *Wikstroemia* 屬的植物,除了台灣薺花 (*Wikstroemia taiwanensis*) 之外,以南嶺薺花(*Wikstroemia indica*) 的研究較多,在南嶺薺花中發現許多成分,介紹如下。

植物介紹

中文學名：南嶺薺花,了哥王,賊仔褲袋等



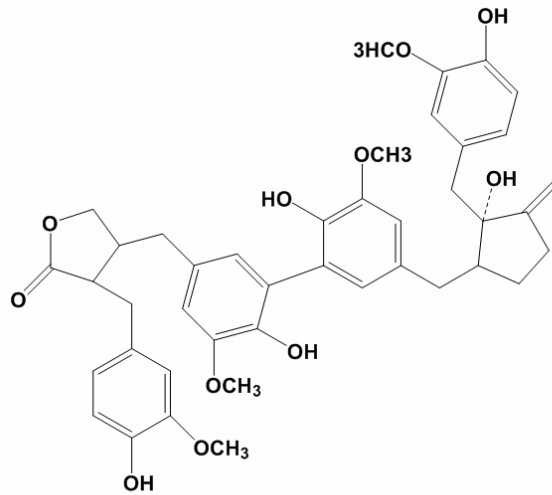
拉丁學名：*Wikstroemia indica* 產地：廣東、廣西、福建、台灣、浙江、江西、湖南、四川、越南、印度等分佈：台灣全島低海拔地區，最高可達 600 公尺處。開闊的裸露地，公路旁、崩壞地或叢林的邊緣，較常見

【功能主治】清熱解毒，消腫散結，止痛，治療癩，癰腫，風濕痛，百日咳，跌打損傷。

【現代藥理作用】抗氧化、抗病毒、抗發炎鎮痛、抗腫瘤、引產作用等。



文獻回顧



Bis-5,5-nortrachelogenin

Figure 1 是南嶺蕘花經由文獻報導出來的結構 (Adotey, J. P.; Adukpo, G. E.; Opoku-Boahen, Y.; Armah, 2012. *Chem. Pharm. Bull.* 2005, 53 (10), pp 1348—1351. *中国实验方剂学杂志* 2011, 24, pp 252-255) , 經由結構命名可以知道應該為 Loganin 類的結構此類結構具有刺激中樞神經系統以及鎮痛之作用。(Adotey, J. P, et al.)

Figure 1. Bis-5,5 nortrachelogenin

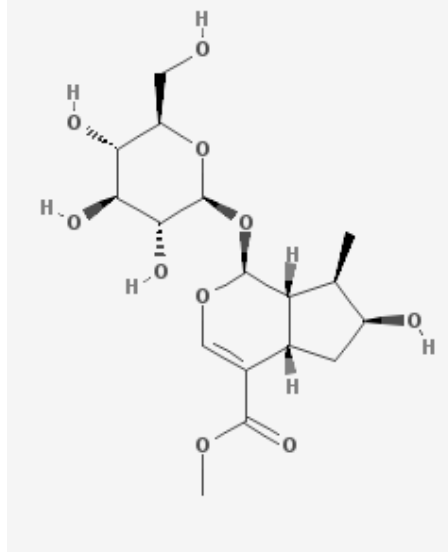


Figure 2. Loganin

Figure 2 則是 Loganin 的基本結構型態,由 Figure 1 及 Figure 2 相互比對發現它是兩個 Loganin 所以是 Bis Loganin 的結構,此種化合物可以阻止炎症部位產生 NO (*中国实验方剂学杂志* 2011, 24, pp 252-255)



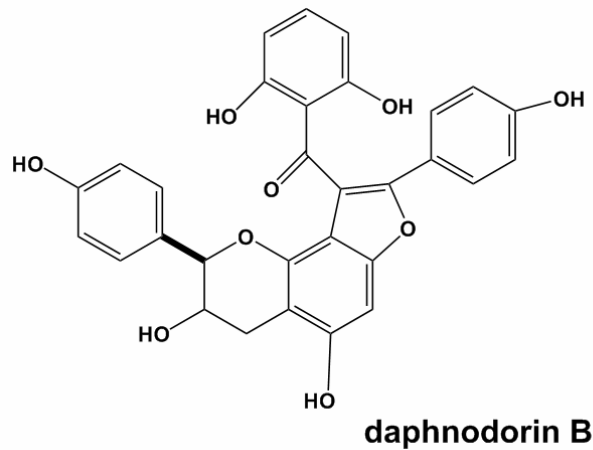


Figure 3. daphnodorin B

Figure 3 為 daphnodorin B,也是在了哥王中文獻報導的成分,此成分為 Loganin 類的結構,經由文獻指出除了上述 Loganin 類會有的藥理活性外另外還得知此種化合物具有抗病毒,抗 B 型肝炎的作用 (中国实验方剂学杂志 2011, 24, pp 252-255, Antiviral research 1994, 25(1), pp 57-66)

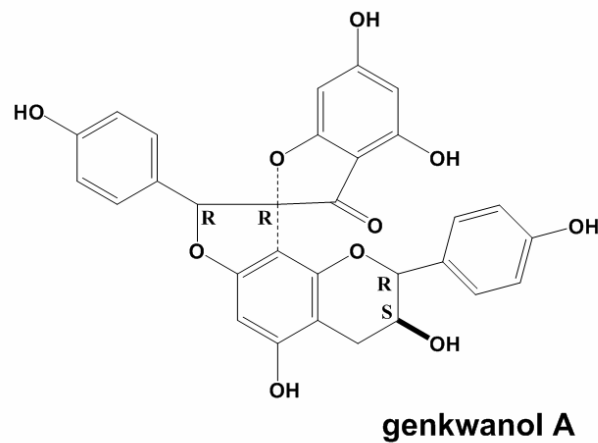


Figure 4. genkwanol A

Figure 4 為文獻報導中了哥王中具有化合物結構,此化合物具有抗病毒的作用,具有抗 HIV-1 的活性作用。(中国实验方剂学杂志 2011, 24, pp 252-255, Planta Medica 2000, 66(6), pp 564-567)

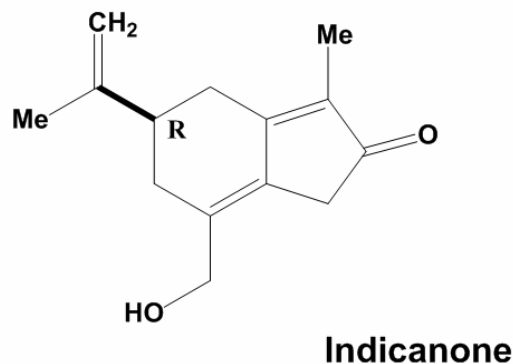


Figure 6 Indicanone

Figure 6 的化合物在文獻報告指出此化合物與前面的 Bis-5, 5-nortachelogenin 一樣是可以阻止炎症部位產生 NO,進一步避免發炎現象的產生 (中国实验方剂学杂志 2011,24),此外 Indicanone 還可以抑制誘導 NO 合成酶(iNDS)基因的表達,為其抗炎作用機

制闡明的更明顯 (中国实验方剂学杂志 2011,24)。

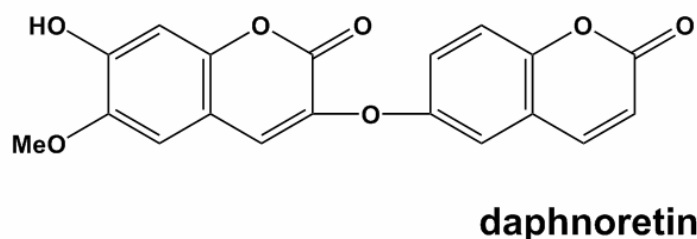


Figure 7. daphnoretin

daphnoretin 為 coumarin 類的化合物,(Figure 7) 此化合物在文獻上面報導此化合物對肺腺癌細胞 AGZY-83a、咽喉癌的細胞 Hep2 和肝癌細胞 HepG2 均有明顯的抑制作用 (中国实验方剂学杂志 2011, 24, pp 252-255)。

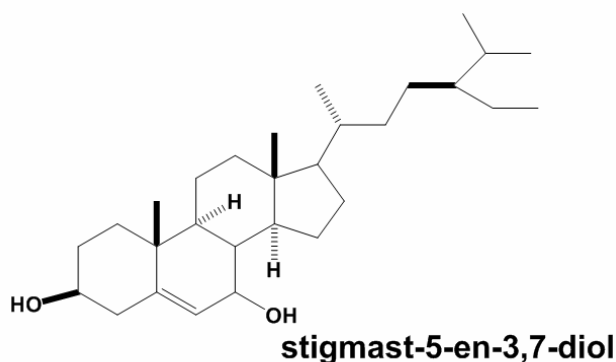


Figure 8. Stigmast-5-en-3,7-diol

Stigmast-5-en-3,7-diol 也是在了哥王中具有的一個很特別的結構,此結構與 hormone 之結構相似。在文獻上指出他有引產的作用,所以懷孕期間的婦女需要注意可能會有流產的問題。(中国实验方剂学杂志 2011, 24, pp 252-255)

因為台灣蕘花與南嶺蕘花為同科同屬不同種之植物,而被拿來做研究的資料還較少,所以前面就先南嶺蕘花的文獻報導做介紹,由於兩株植物的為同科同屬不同種所以應該也會具有大部分上列的成分,並且可能因為產地的不同台灣種的也會有不同的成分,而去研究其莖部。

台灣蕘花一般生長在台灣南部高雄屏東等地,是矮型灌木側葉有八九對葉長3-4公分葉寬大概就是1.2-1.8公分,在此植物的莖部我們有找到 shikokianin B 及 shikokianin C 此兩種抗結核病的結構。(其結構如 Figure 9)



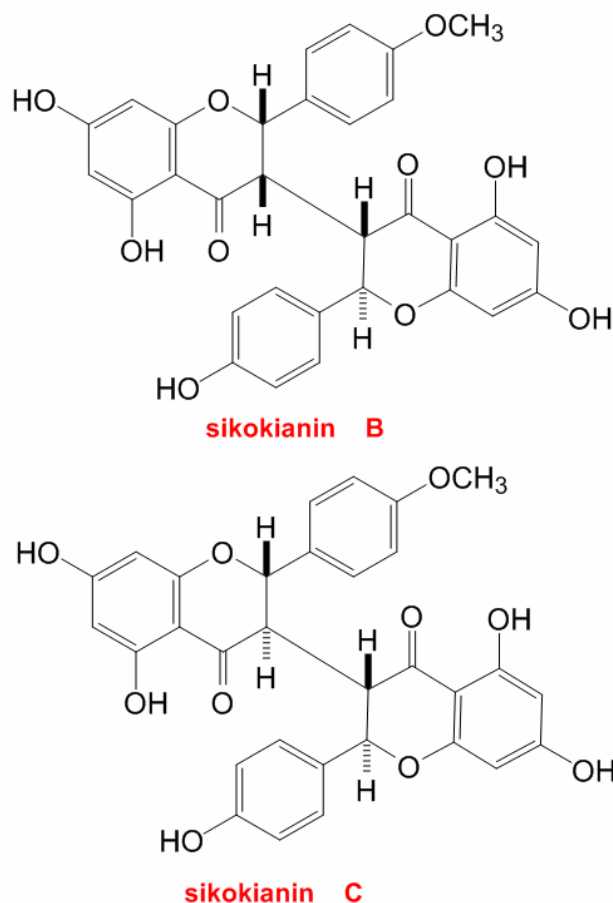


Figure 9.

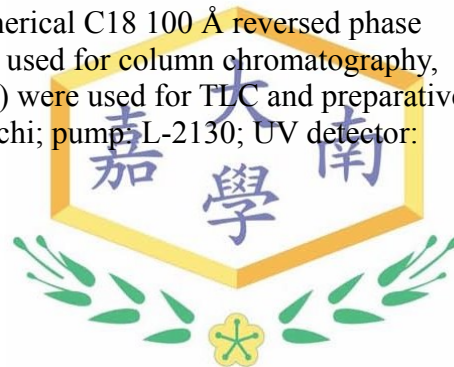
Roots of *Wikstoremia taiwanensis*

Stems of *W. taiwanensis* were collected in May, 2008 at Mountain Goshifer, Pingtung County, and identified by Professor Ih-Sheng Chen. A voucher specimen (Chen 6163) has been deposited in the Herbarium of the College of Pharmacy, Kaohsiung Medical University, Kaohsiung, Taiwan.

General Experimental Procedures

Optical rotations were measured on a polarimeter (JASCO, Japan), UV spectra were obtained with a Jasco V-530 UV/VIS spectrophotometer. IR spectroscopic data were recorded on a Genesis II FTIR spectrophotometer with KBr pellets. NMR spectra were obtained on a Varian Unity Plus 400 spectrometer (400 MHz for ¹H-NMR, 100 MHz for ¹³C-NMR) and Varian Unity Inova 600 spectrometer (600 MHz for ¹H-NMR, 150 MHz for ¹³C-NMR). Chemical shifts were reported with respect to acetone-d₆, methanol-d₄ or DMSO solvents. Low-resolution MS spectra were obtained with Micromass Trio-2000 GC/MS, VG Biotech Quattro 5022, and JEOL-JMS-HX 100 mass spectrometers. The HRMS spectra were recorded on JEOL JMS-SX102A GC/LC/MS and Finnigan MAT-95XL high-resolution mass spectrometers.

Silica gel (70–230 and 230–400 mesh; Merck) and Spherical C18 100 Å reversed phase silica gel (RP-18; particle size 20–40 μm; Silicycle) were used for column chromatography, and silica gel 60 F254 (Merck) and RP-18 F254S (Merck) were used for TLC and preparative TLC. Further purification was performed by HPLC (Hitachi; pump: L-2130; UV detector: L-2400)



Extraction and Isolation

Roots of *Wikstroemia taiwanensis* (2.1 kg)

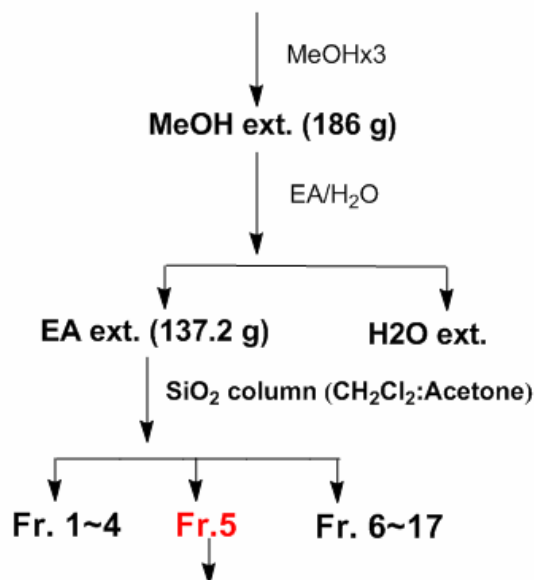


Figure 17.

實驗方法 1

先將台灣薺花的根 2.1 kg 利用甲醇萃取三次以後得到甲醇萃取物 (186 g) 後，再分別以乙酸乙酯及水做分配，獲得水層以及乙酸乙酯層，然後用 open column 以 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Acetone}$ 系統分離，獲得 17 個 fractions，取 Fr.5 再進行純化。(Figure 17)

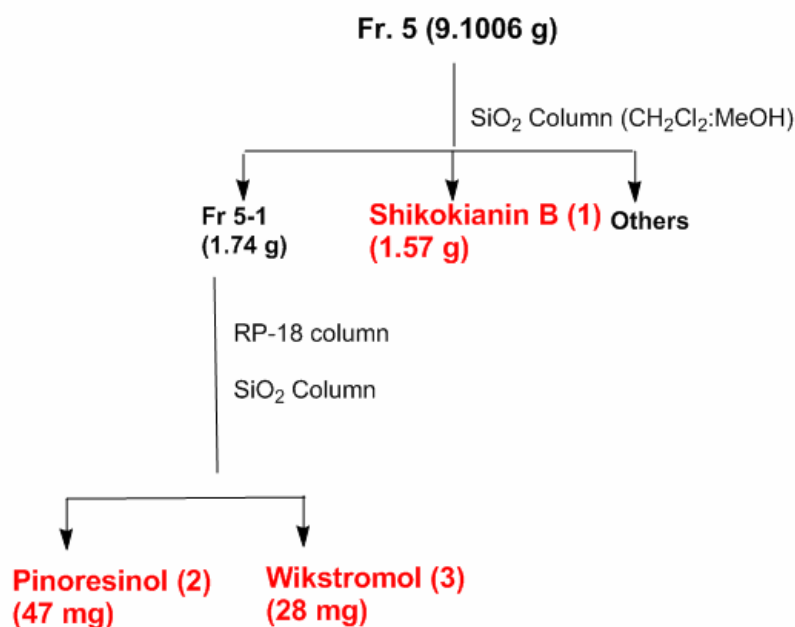


Figure 18.

Fr. 5 繼續使用 open Column ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ 30:1) 進行純化，得到 7 個 fractions，當中得到一雙黃酮類成分 shikokianin B (1, 1.57 g)，之後再將 Fr 5-1 利用 RP-18 Column 以及 SiO_2 Column 純化獲得 pinoresinol (2, 47 mg) 與 Wikstromol (3, 28 mg)。(Figure 18)

關於 shikokianin B (**1**)的構造決定，**1** 為黃色粉末，旋光度 $[\alpha]_{25}^D +58.0$ (c 0.02, MeOH). ESI-MS and HR-ESI-MS 測得其分子式 $C_{31}H_{24}O_{10}$ 。有 20 個不飽和度， 1H , ^{13}C -NMR 顯示其是一個 flavone moiety 和一個 flavanol moiety 的二量體 UV 在 211 sh, 223 sh, and 295 sh nm 有吸收，添加 aq. KOH 後有一 bathochromic shift 顯示有一個 phenolic flavonoid moiety. 在 IR spectrum 3449cm^{-1} 有 hydroxy group 的吸收， 1639cm^{-1} 有 carbonyl group。 1H , ^{13}C -NMR, COSY 與 HMQC 發現 **1** 有 2 個 four-substituted benzene ring，2 個 keton，2 個 meta-coupled protons, 2 個 oxygenated protons, 和 10 個 aromatic tertial carbons。部分構造如 Figure 19 所示。

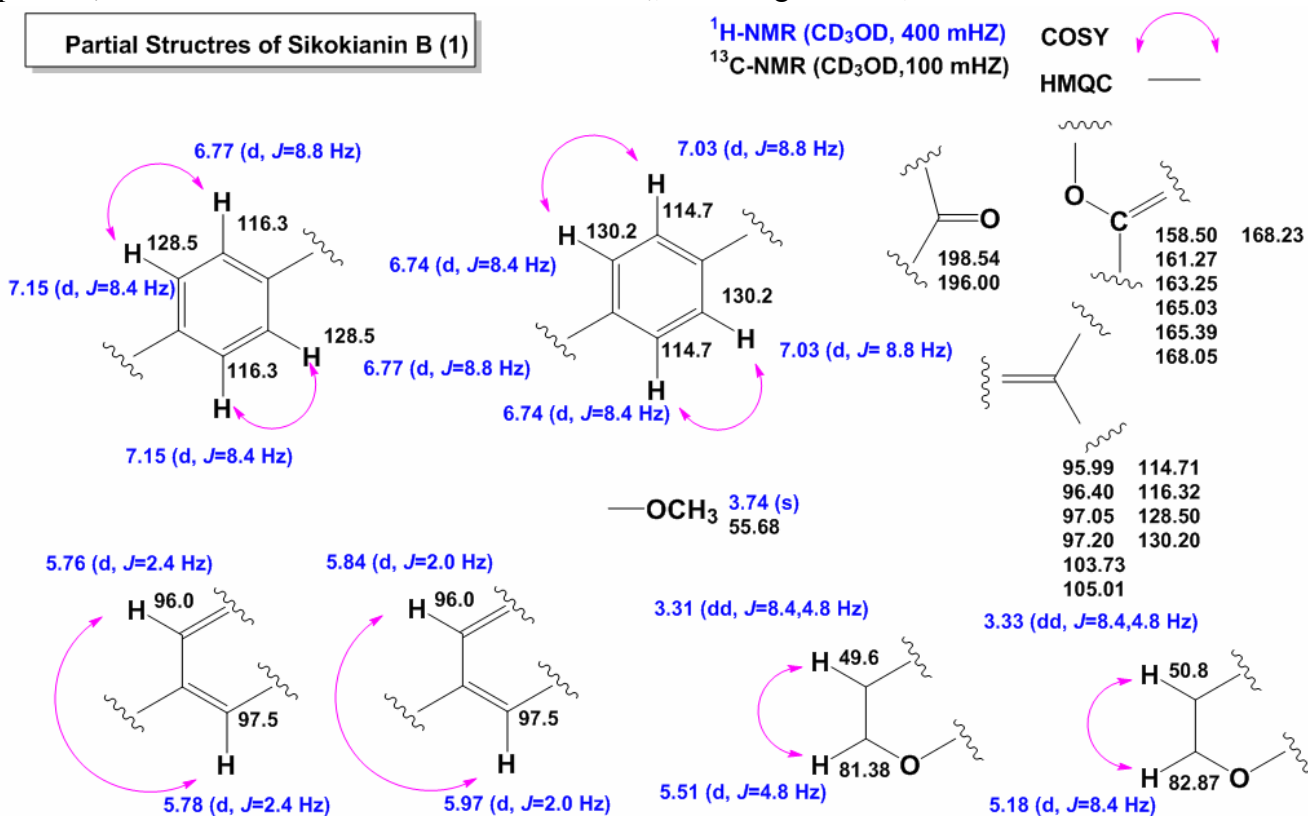
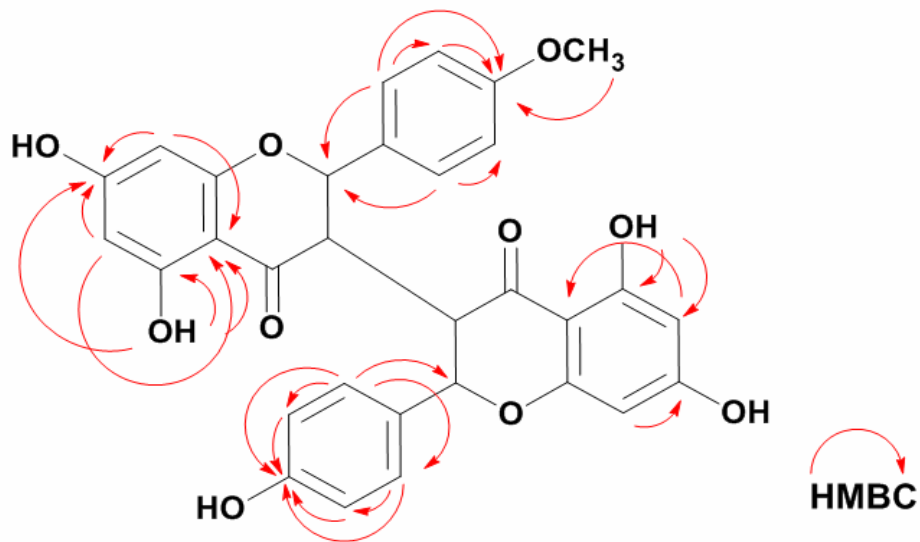


Figure 19

以 HMBC 將所示的部分構造連結起來，得到 Figure 20 所示的平面構造



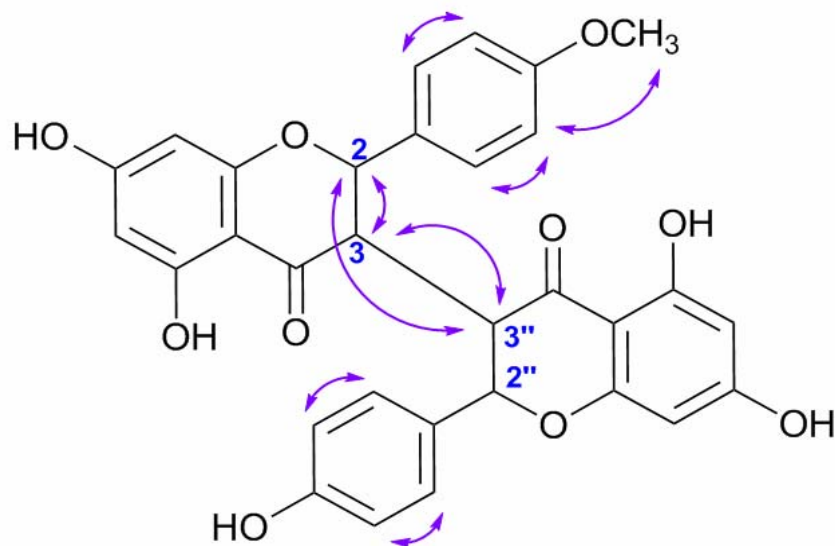
Planar Structure of Sikokianin B (1)



Key HMBC Correlations for Sikokianin B (1)

Figure 20

其中關於 H-2, H-2'', H-3 與 H-3'' 的相對立體構造, 以 NOESY 得的結果顯示, H-2/H-3, H-2/H-3'', H-3/H-3'' 為 *cis* 配置, 而 H-2'' 與 H-2, H-3, H-3'' 為 *trans* 配置。(Figure 21)



NOESY

Figure 21



Physical Data of sikokianin B (1)

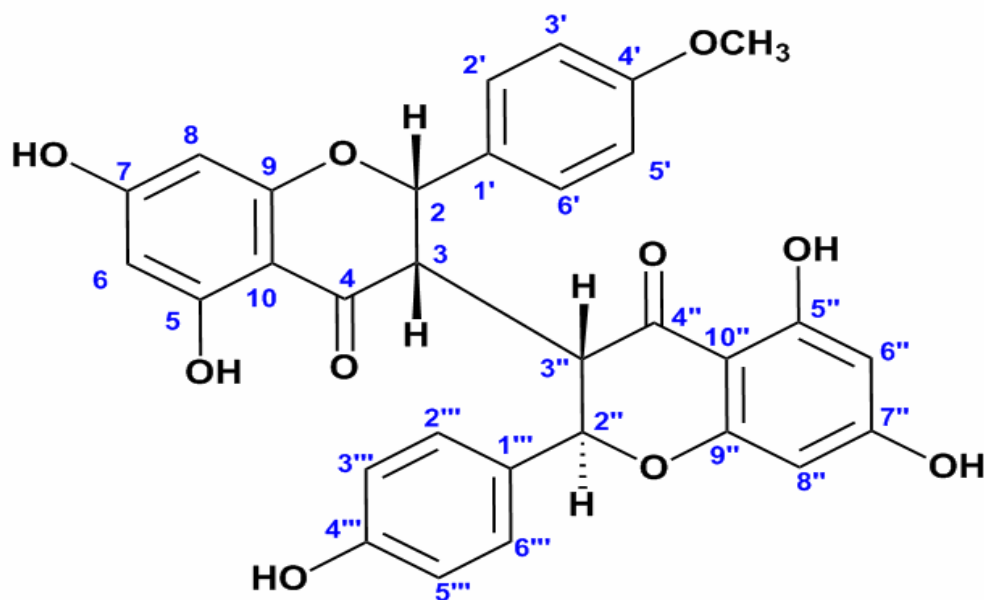
ESIMS of $[M+Na]^+$ m/z **579**

HRESIMS of $[M+Na]^+$ m/z **579.1267** (calcd for $C_{31}H_{24}O_{10}$ 579.1267).

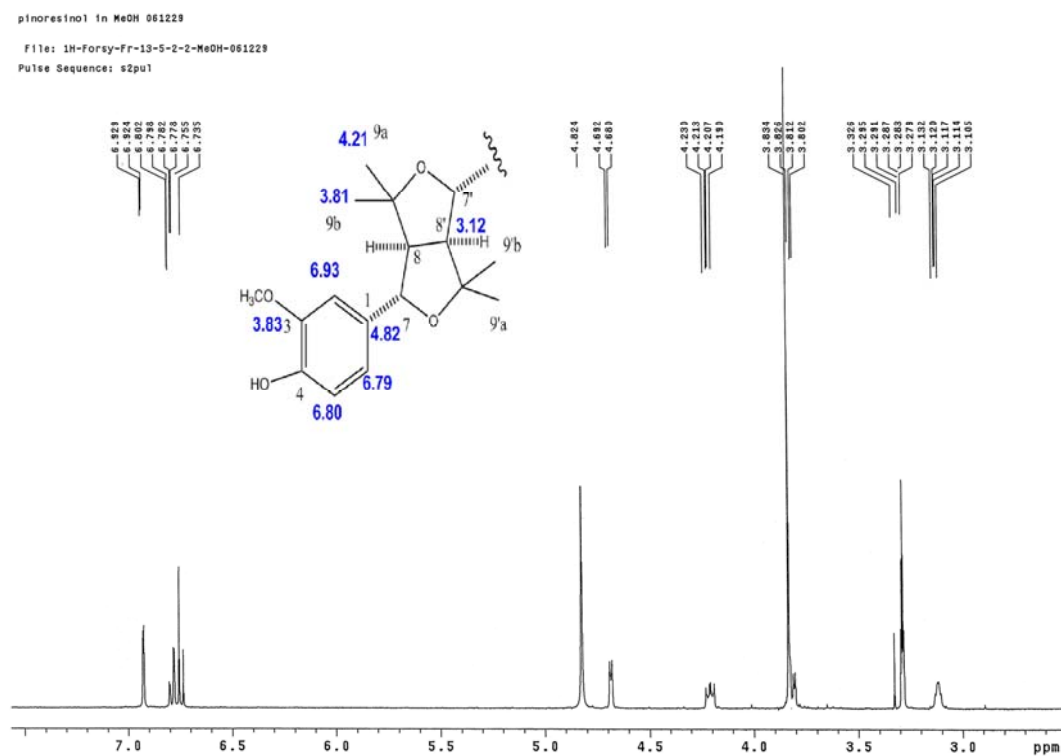
$[\alpha]_D^{25}$: +58.0 (c0.02, MeOH)

IR ν_{max} (KBr) **3449** (OH), **1639** (carbonyl), **1614, 1519, 1468** (benzene ring) cm^{-1}

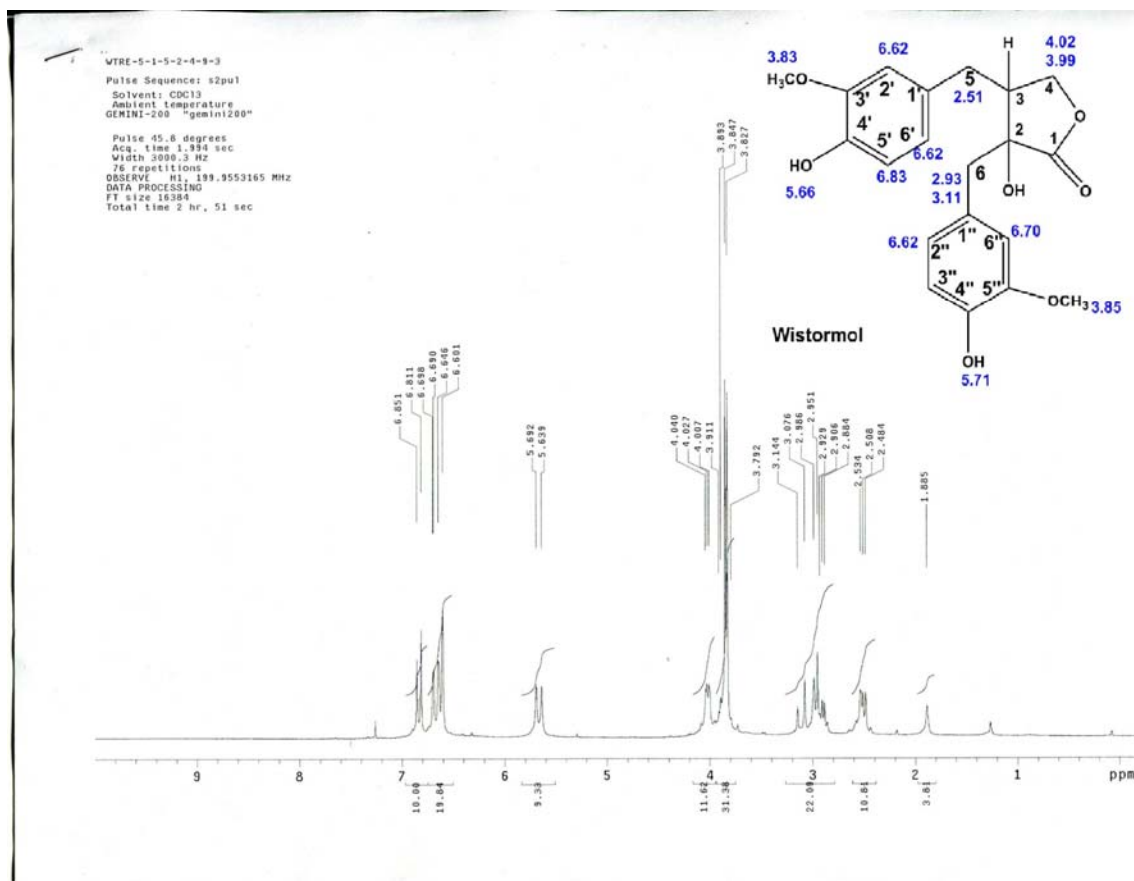
UV λ_{max} (MeOH) (log ϵ): **211 sh** (4.73), **223 sh** (4.69), **295** (4.55) nm



sikokianin B (1)



上圖是 pinosresinol 的 NMR 的圖譜,雖然經由 NMR 圖譜可以去判斷結構大致上為何不過還需要經過 2D NMR 的測試之後才能確定出來



上圖是 Wistormol 的 NMR 的質子譜 經由質子譜我們可以推得結構相似於 Wistormol 不過仍然需要經過像 sikokianin B 的這些分析方法在加以測試才能完全去確定是這個結構。

結論

- Three compounds, shikokianin B (1), pinoresinol (2), and wikstromol (3), were isolated from the roots of *Wikstroemia taiwanensis*.
- Sikokianin B (1) showed antitubercular activity¹, wikstormol (3) was reported to show antileukemic activity^{2,3}.

1) *International Journal Molecular Sciences*, 2012, 13(1), pp 1029-1038

2) *J. Nat. Prod.*, 1981, 44 (5), pp 530-535

3) *中国实验方剂学杂志*, 2011, 24, pp 252-255

參考文獻

1. *中国实验方剂学杂志* *Reviews on Chemical Constituents and Pharmacological Action of Wikstroemia indica*, 2011, 24, pp 252-255
2. *Interpretation of Mass Spectra*. Mill Valley, CA, 1980. 3rd
3. *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: An Introduction to Principles, Applications, and Experimental Methods*, Lambert, Joseph B and Eugene P Mazzola. 2004,
4. *Physical Chemistry for the Biosciences*, Chang, Raymond 2005
5. *Introduction to Organic Chemistry*, Brown. Raymond 2005, 3rd ed.
6. *J. Nat. Prod.*, 2008, 71, pp 1902-1905

7. *Chem. Pharm. Bull.*, 2005, 53. pp 1348-1351
 8. *Protein NMR spectroscopy: principles and practice*, Cavanagh
 9. “*Molecular Spectra and Molecular Structure II. Infrared and Roman Spectra of Polyatomic Molecules*”, G. Hersberg, 1945.
 10. *Assignments for Vibrational Spectra of Seven Hundred Benzene Derivatives* , Varsanyi, 1974.
 11. *Elements of Physical Chemistry*, P. Atkins and J. de Paula, 2005. 4th ed.
 12. *J. Nat. Prod.*, 1981, 44 (5), pp 530–535
 13. *International Journal Molecular Sciences*, 2012, 13(1), 1029-1038
 - 14.
- http://140.117.34.2/faculty/phy/sw_ding/teaching/nmri01_underg/nmri01_underg_exp05.pdf

