

行政院農業委員會林務局委託研究計畫系列 98-00-5-14

相思樹抽出物及其成分作為痛風用藥之開發
Development of gout drugs from the extracts and their
compounds of *Acacia confusa*



委託機關：行政院農業委員會林務局

執行機關：國立臺灣大學 森林環境暨資源學系

中華民國 98 年 12 月

相思樹抽出物及其成分作為痛風用藥之開發

計畫主持人：張上鎮 教授

【摘要】相思樹 (*Acacia confusa*) 為臺灣傳統用藥，本研究首次針對相思樹乙醇抽出物抑制黃嘌呤氧化酶進行試驗。試驗結果顯示，相思樹心材乙醇抽出物具有極佳抑制黃嘌呤氧化酶之活性；至於相思樹心材乙醇抽出物各可溶部抑制黃嘌呤氧化酶之活性，則以乙酸乙酯可溶部的效果最佳。因此，進一步利用管柱層析及逆相高效能液相層析分離乙酸乙酯可溶部，得到 Melanoxetin、7,8,3',4-Tetrahydroxyflavone、Transilitin、Okanin、3,7,8,3'-Tetrahydroxy-4'-methoxyflavone、7,8,3'-Trihydroxy-3,4'-dimethoxyflavone、7,3',4'-Trihydroxyflavone 及 7,3',4'-Trihydroxy-3-methoxyflavone 等 8 個化合物，其中，以 Melanoxetin 及 Okanin 抑制黃嘌呤氧化酶之效果較佳，其 EC₅₀ 值分別為 0.274 及 0.076 μM，效果甚較目前已知之黃嘌呤氧化酶抑制劑-Allopurinol 為佳 (EC₅₀ 為 4.784 μM)。

【關鍵詞】相思樹、抽出物、Melanoxetin、Okanin、黃嘌呤氧化酶

【Abstract】 *Acacia confusa* Merr. (Leguminosae) is traditionally used as a medicinal plant in Taiwan. In the present study, XOD-inhibitory activity of ethanolic extracts from *A. confusa* was investigated for the first time. Results demonstrated that ethanolic extract of *A. confusa* heartwood had a strong XOD-inhibitory activity. Among all fractions derived from heartwood extracts, the EtOAc fraction exhibited the best inhibitory activity. Following column chromatography and reverse-phase high-performance liquid chromatography, 8 specific phytochemicals including melanoxetin, 7,8,3',4'-tetrahydroxyflavone, transilitin, okanin, 3,7,8,3'-tetrahydroxy-4'-methoxyflavone, 7,8,3'-trihydroxy-3,4'-dimethoxyflavone, 7,3',4'-trihydroxyflavone, and 7,3',4'-trihydroxy-3-methoxyflavone were isolated and identified from the EtOAc fraction. In addition, the EC₅₀ values indicated okanin showed the strongest XOD-inhibitory effect (EC₅₀ value of 0.076 μM), followed by melanoxetin (0.274 μM), allopurinol (4.784 μM). Results revealed that okanin and melanoxetin showed excellent performances on XOD activity and their inhibitory activity is better than that of allopurinol.

【Key words】 *Acacia confusa*, Extracts, Melanoxetin, Okanin, Xanthine oxidase

一、前言

痛風過去在臺灣是極少見的疾病，1960 年代僅佔風濕科門診人數約 5%，至 1980 年代已提高為 16%。隨著國民經濟水平的提高，飲食習慣跟著改變，痛風患者比率也急速增加，根據流行病的研究，臺灣至少有 40 萬痛風患者，究其原因與高嘌呤飲食習性及過度飲酒所致，儘管痛風易發生於 40–60 歲之成年男性，但目前已有年輕化的趨勢。全球痛風患者約 30%，足可見痛風已成現代人日益嚴重的文明疾病之一，因此如何做妥善的處置以降低其流行率，並減少併發症發生，成為醫學界的重大挑戰及責任。

痛風的發生是由於體內的普林代謝異常，導致高尿酸血症（Hyperuricemia），而使尿酸鹽（Urate crystals）在關節腔內沉積形成結晶，造成關節腫脹和變形。尿酸鹽是日常飲食及內生性嘌呤之最終產物，嘌呤經黃嘌呤氧化酶於肝、腸黏膜及乳液等代謝後產生尿酸。因此，使用黃嘌呤氧化酶抑制劑便能阻斷尿酸的生成。目前，安樂普利諾（Allopurinol）是降尿酸臨床藥物，它能有效降低血液中尿酸濃度，並減低痛風的產生，然而卻會造成腎負擔及過敏性症候群等副作用。

臺灣本土的相思樹（*Acacia confusa* Merr.）處處可見，除了傳統供作薪炭材外，一直未能有效的利用，本研究室先前曾針對相思樹抽出物進行一系列之抗氧化活性評估。試驗結果發現，相思樹心材抽出物具有極佳的抗氧化活性，於 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的低濃度時，即可有效抑制 75–85% DPPH 自由基，和兒茶素（Catechin）或維他命 C（Ascorbic acid）等抗氧化劑相當（Chang *et al.*, 2001）。此外，對超氧自由基而言，相思樹心材抽出物之超氧自由基清除能力亦較兒茶素為佳。除了相思樹心材抽出物具有相當優異的抗氧化能力外，研究結果亦證實相思樹樹皮、葉子、嫩枝及花等部位抽出物均具有良好的抗氧化能力（Chang *et al.*, 2001; Tung *et al.*, 2008; 2009a; 2009b; Wu *et al.*, 2005; 2008a; 2008b; 童鈺棠等，2005）。然而，相思樹抽出物抑制黃嘌呤氧化酶之能力尚不清楚，從開發利用之角度而言，確實有待進一步的研究證實。本計畫目標為開發相思樹之新用途，期能供作治療痛風之天然用藥，亦即評估相思樹抽出物及其成分抑制黃嘌呤氧化酶之活性，解決降尿酸藥—安樂普利諾造成腎負擔及過敏性症候群等副作用，如此將有助於開發本土相思樹加工利用之潛能，進一步擴展其應用領域，並提升其經濟價值。

二、材料與方法

(一) 試驗材料

本試驗所使用之試材為臺灣本土的相思樹 (*Acacia confusa* Merr.)，2002 年五月中伐採自國立臺灣大學實驗林水里營林區 14 林班，為光蠟樹、紅檜及臺灣杉混合林，相思樹樹齡 40 年 (胸高直徑 25 cm)。伐採後試材分別依心材、樹皮、葉子、嫩枝及花等 5 個部位進行萃取。

(二) 試驗方法

1. 相思樹各部位抽出成分之萃取

5 個部位之相思樹以乙醇冷浸萃取 3 次，每次浸泡 7 天，萃取液以 Whatman #1 濾紙抽氣過濾去除雜質，並將過濾所得萃取液以減壓濃縮機 (Rotatory vacuum evaporator) 濃縮，隨後移入冷凍乾燥機予以凍乾。

2. 成分萃取與初步分離

相思樹心材抽出物續以不同極性之溶劑，包括乙酸乙酯、正丁醇及水等，進行液相-液相分配 (Liquid-liquid partition)，將抽出物初步分為乙酸乙酯可溶部、正丁醇可溶部及水可溶部等 3 個分離部。

3. 純化合物的分離與鑑定

(1) 抽出成分之分離與純化

相思樹心材乙酸乙酯可溶部續利用薄層層析 (TLC, Thin layer chromatography)、管柱層析 (CC, Column chromatography) 及高效能液相層析 (HPLC, High performance liquid chromatography) 等技術進行分離與純化。所使用 TLC 薄片之吸附劑為 RP-18 膠體，展開溶劑為不同比例之甲醇與水，展開後以紫外光燈觀察，並利用 10% 硫酸溶劑為呈色劑。而乙酸乙酯可溶部以管柱層析分離前，均先以 RP-18 膠體吸附 (RP-18 膠體:抽出物 = 2:1)，之後再利用吸附劑作管柱層析，沖提溶劑為甲醇與水不同配比的混合液。每 2000–3000 mL 更換極性，每 500 mL 收集一瓶，並以 TLC 分析，成

分類似者則予以合併成次分離部。各瓶中有結晶產生者則先收集，並利用再結晶法純化。其他則進一步利用 HPLC 進行分離及純化。高壓幫浦使用 Jasco model PU980，檢測器則使用：多波長檢測器 (Jasco MD910)。分離管柱採用 Phenomenex C18 分離管柱 (250 mm × 10 mm)，移動相 (Mobile phase) 為甲醇與水混合溶液。

(2) 化合物結構鑑定

本研究所使用之分析儀器包括：Electrothermal Model IA9100 熔點測定儀；Jasco V-550 紫外光光譜分析 (UV)；Bio-rad FTS-40 傅立葉轉換紅外光光譜分析 (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)，解析度 4 cm^{-1} ，掃瞄次數 64 次，光譜掃描範圍 $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ ；Finnigan MAT-95S 質譜儀分析 (HREIMS, EIMS)；Bruker Avance-500 MHz 傅立葉轉換核磁共振光譜分析 ($^{13}\text{C-NMR}$ 和 $^1\text{H-NMR}$)。此外，從事核磁共振光譜分析時亦使用 NOE, DEPT, HSQC 和 HMBC 等分析技術確定化合物結構。

4. 抑制黃嘌呤氧化酶試驗

取黃嘌呤 (Xanthine) 與黃嘌呤氧化酶 (Xanthine oxidase) 反應生成尿酸，在紫外光 295 nm 波長處有特定吸收。因此，將 2 μL 不同濃度之試驗樣品及安樂普利諾 (正對照組)、798 μL 0.2 M 焦磷酸鈉緩衝液 (pH 7.5) 與 0.1 U 黃嘌呤氧化酶，於 37°C 均勻混合 5 min 後，再加入 200 μL 0.6 mM 黃嘌呤，均勻振盪後，以紫外光/可見光分光光譜儀測量 295 nm 吸收值之經時變化，並計算出試驗樣品之黃嘌呤氧化酶抑制率 (%)。

$$\text{黃嘌呤氧化酶抑制率 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{實驗組反應速率}}{\text{對照組反應速率}}\right) \times 100$$

5. 統計分析

利用 SAS 系統中 Scheffe 統計方法，檢驗各試驗樣品間抑制黃嘌呤氧化酶活性是否具顯著差異，分析時所使用之信賴區間為 95%。

三、結果與討論

(一) 相思樹乙醇抽出物抑制黃嘌呤氧化酶之活性

在酵素系統中，黃嘌呤（Xanthine）與黃嘌呤氧化酶（Xanthine oxidase）作用會生成尿酸。因此，本試驗於 Xanthine-Xanthine oxidase 的反應系統中加入不同濃度之相思樹抽出物，以紫外光/可見光分光光譜儀測量 295 nm 吸收值之經時變化，並計算抽出物之黃嘌呤氧化酶抑制率。試驗結果如圖 1 所示，相思樹 5 個部位乙醇抽出物之黃嘌呤氧化酶抑制率皆隨濃度增高而增大。當使用濃度為 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，心材、樹皮、嫩枝、花及葉子之黃嘌呤氧化酶抑制率分別為 80、59、39、46 及 45%，此結果顯示，相思樹心材抽出物抑制黃嘌呤氧化酶之效果最佳，其次為樹皮、花、葉子及嫩枝。與傳統痛風用藥香脂白楊樹（*Populus balsamifera*）樹皮抽出物（Moerman., 1986）相比，使用濃度為 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，黃嘌呤氧化酶抑制率為 51%，顯示相思樹心材及樹皮抽出物抑制黃嘌呤氧化酶之效果皆較香脂白楊樹樹皮抽出物為佳。

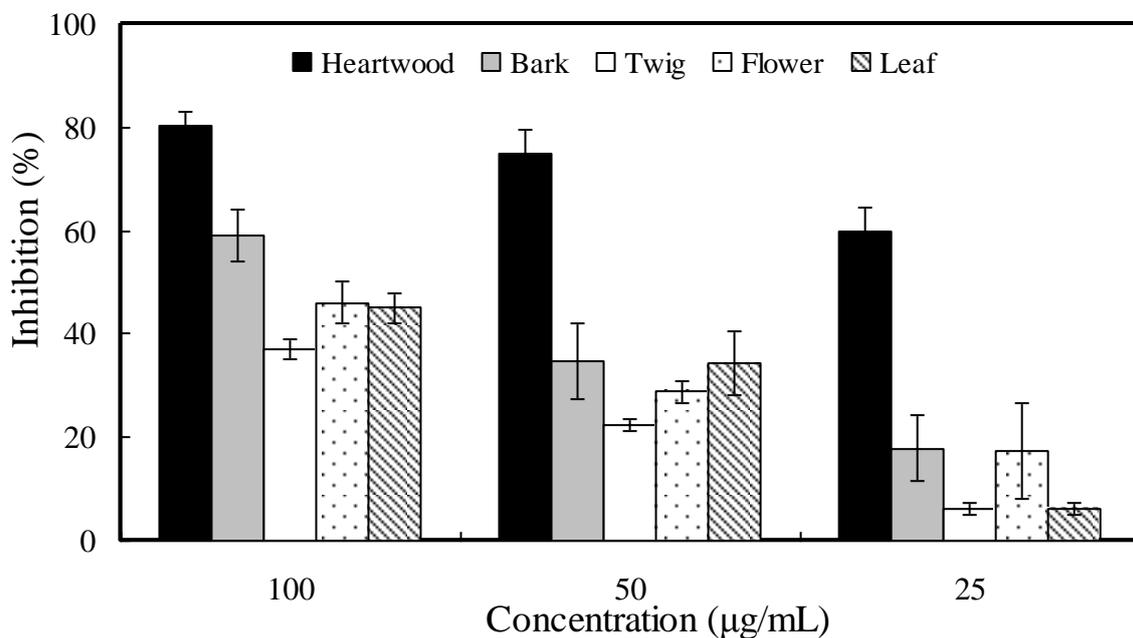


圖 1 相思樹乙醇抽出物抑制黃嘌呤氧化酶之活性。

Figure 1 XOD-inhibitory activity of ethanolic extracts from *A. confusa*.

(二) 相思樹心材乙醇抽出物及各可溶部抑制黃嘌呤氧化酶之活性

圖 2 為相思樹心材乙醇抽出物及各可溶部抑制黃嘌呤氧化酶活性之結果，由此可以發現乙醇抽出物及各個可溶部之抑制率隨濃度的增加而增大。比較各個可溶部之抑制率，則以乙酸乙酯可溶部的效果最佳，使用濃度為 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，其抑制率為 75%，其次分別為乙醇抽出物、正丁醇可溶部及水可溶部正己烷可溶部（抑制率分別為 74、35 及 32%）。進一步選用不同濃度進行試驗以求得 EC_{50} 值，乙醇抽出物、乙酸乙酯可溶部、正丁醇可溶部及水可溶部的 EC_{50} 值分別為 11.7、7.8、 > 100 及 > 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，然而已知降尿酸臨床藥物—安樂普利諾（Allopurinol）之 EC_{50} 值為 1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。至於被報導具抑制黃嘌呤氧化酶之肉桂（*Cinnamomum cassia*）枝條、油菊（*Chrysanthemum indicum*）花及歐地筍（*Lycopus europaeus*）葉子甲醇抽出物，其 EC_{50} 值分別為 18、22 及 26 $\mu\text{g}/\text{mL}$ （González *et al.*, 1995），由此顯示相思樹心材乙醇抽出物及乙酸乙酯可溶部抑制黃嘌呤氧化酶之活性極佳，其活性甚至較肉桂枝條、油菊花及歐地筍葉子甲醇抽出物為佳。

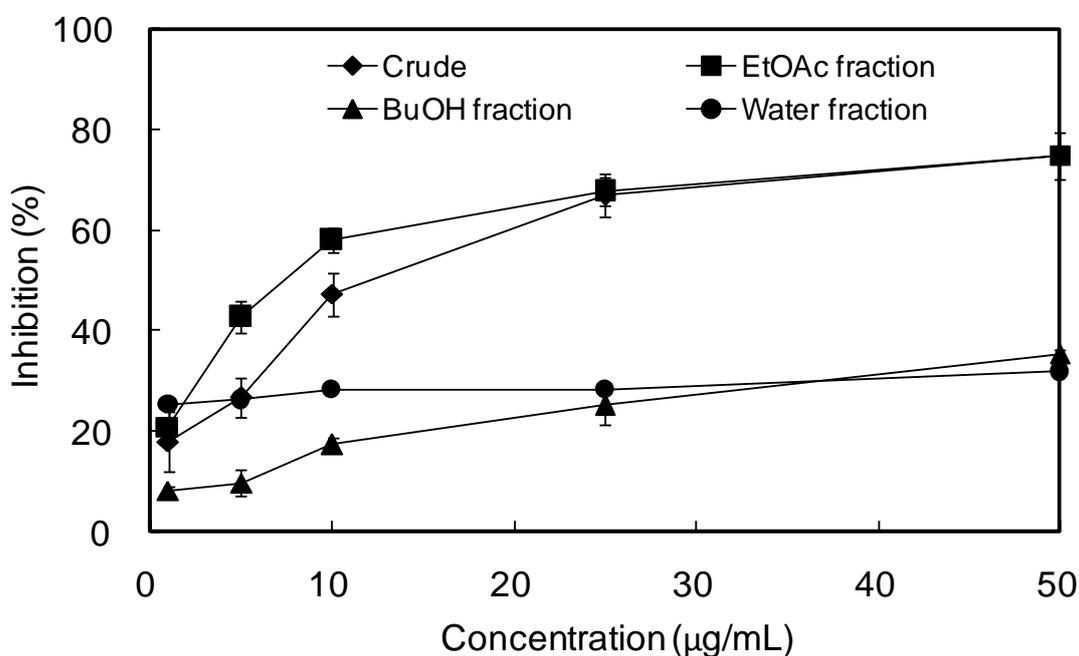


圖 2 相思樹心材乙醇抽出物及各可溶部抑制黃嘌呤氧化酶之活性。

Figure 2 XOD-inhibitory activity of *A. confusa* heartwood extract and its derived fractions.

(三) 相思樹心材乙酸乙酯可溶部之次分離部抑制黃嘌呤氧化酶之活性

由於乙酸乙酯可溶部具有極佳抑制黃嘌呤氧化酶活性，因此，為進一步了解乙酸乙酯可溶部具抑制黃嘌呤氧化酶活性成分，乃以 RP-18 膠體管柱層析對具抑制黃嘌呤氧化酶之可溶部（乙酸乙酯可溶部）進行初步分離，並將沖提所得之抽出物分為 EA1（沖提液為 10%–20% MeOH/H₂O）、EA2–EA3（30% MeOH/H₂O）、EA4（30%–40% MeOH/H₂O）、EA5（40%–50% MeOH/H₂O）、EA6（50%–60% MeOH/H₂O）、EA7（60% MeOH/H₂O）、EA8（70%–80% MeOH/H₂O）、EA9（80%–100% MeOH/H₂O）、EA10（100% THF）等 10 個次分離部（EA1–EA10），其抑制黃嘌呤氧化酶活性之結果如圖 3 所示，使用濃度為 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，EA1–EA10 之黃嘌呤氧化酶抑制率依序為 35.9、39.4、49.4、64.1、78.7、77.8、80.5、74.8、37.9 及 39.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。因此，EA5–EA8 抑制黃嘌呤氧化酶之效果極佳。

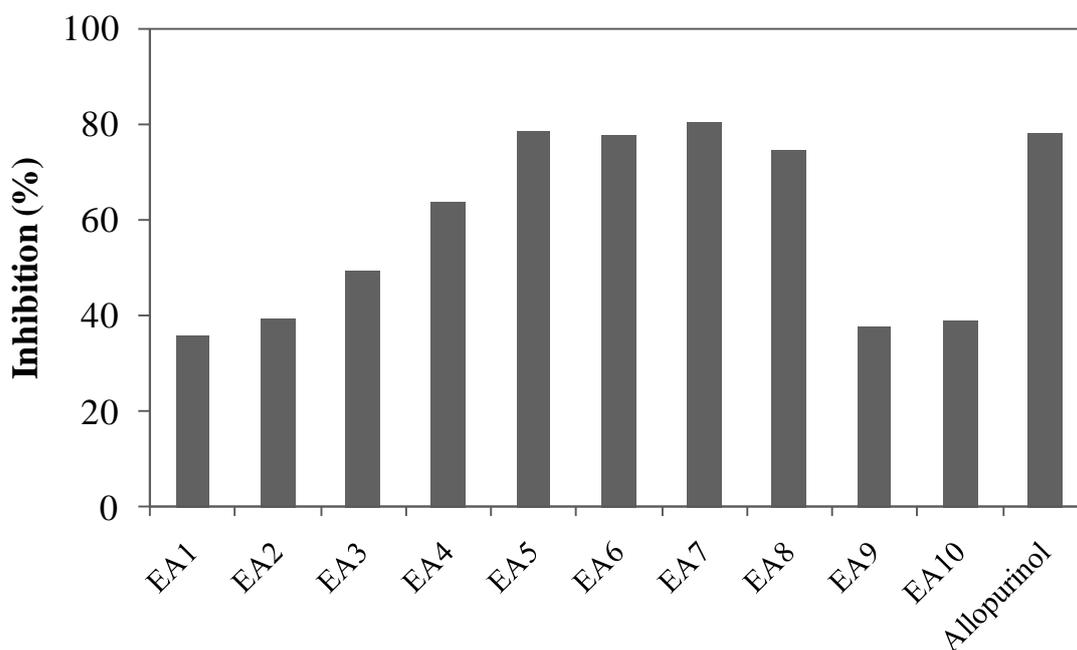


圖 3 相思樹心材乙酸乙酯可溶部之次分離部抑制黃嘌呤氧化酶之活性（使用濃度為 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。

Figure 3 XOD-inhibitory activity of EtOAc subfractions from *A. confusa* heartwood (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

(四) 相思樹心材主成分抑制黃嘌呤氧化酶之活性

進一步將相思樹心材 EA5-EA8 等 4 個次分離部進行分離純化，得到 8 個主成分 Melanoxetin、7,8,3',4'-Tetrahydroxyflavone、Transilitin、Okaniin、3,7,8,3'-Tetrahydroxy-4'-methoxyflavone、7,8,3'-Trihydroxy-3,4'-dimethoxyflavone、7,3',4'-Trihydroxyflavone 及 7,3',4'-Trihydroxy-3-methoxyflavone，其抑制黃嘌呤氧化酶活性之結果如圖 4 所示。結果顯示以 Melanoxetin、7,8,3',4'-Tetrahydroxyflavone 及 Okaniin 效果較佳，其抑制黃嘌呤氧化酶之 EC_{50} 值分別為 0.274、10.488 及 0.076 μM ；其中，Melanoxetin 及 Okaniin 的效果甚較目前已知之黃嘌呤氧化酶抑制劑-Allopurinol 為佳 (EC_{50} 為 4.784 μM)，Melanoxetin 及 Okaniin 之抑制能力為 Allopurinol 的 17 及 63 倍。因此，Melanoxetin 及 Okaniin 極具潛力抑制黃嘌呤氧化酶所產生的相關疾病。

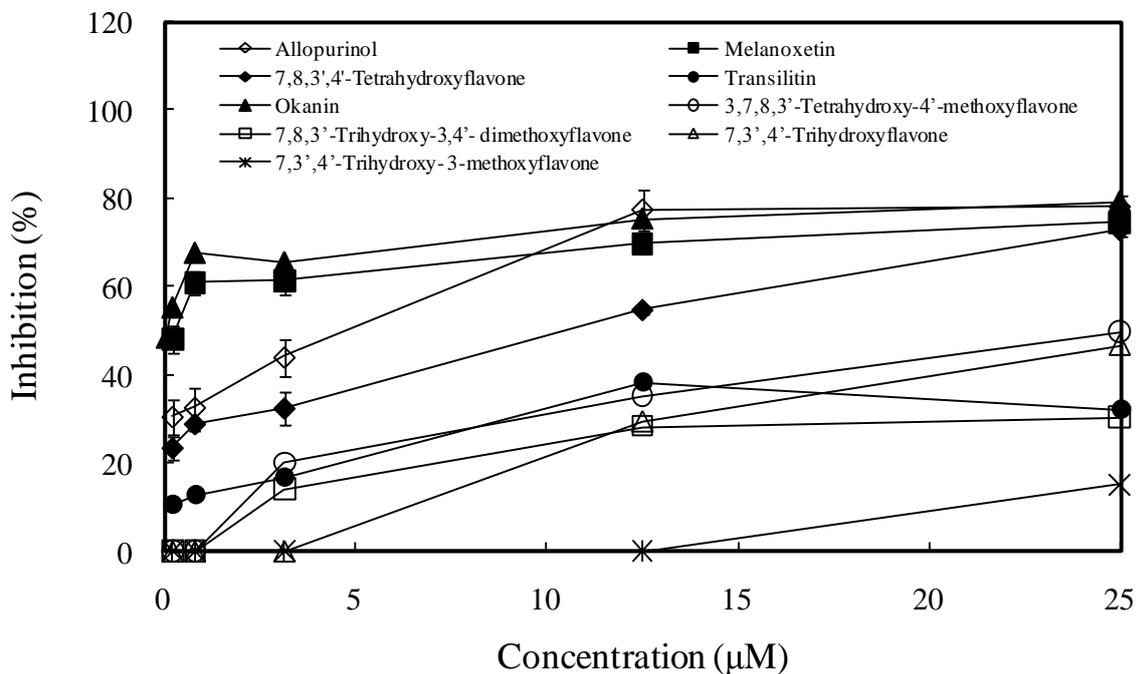


圖 4 相思樹心材主成分抑制黃嘌呤氧化酶之活性。

Figure 4 XOD-inhibitory activity of phytochemicals of *A. confusa* heartwood extract.

四、結論

相思樹為臺灣的本土樹種，目前研究已證實相思樹心材、樹皮、葉子、嫩枝及花等部位抽出物均具有良好的抗氧化能力。本試驗進一步利用抑制黃嘌呤氧化酶試驗評估相思樹 5 個部位抽出物抑制黃嘌呤氧化酶之能力。試驗結果得知，相思樹心材抽出物抑制黃嘌呤氧化酶活性之效果最佳，進一步由相思樹心材乙酸乙酯可溶部分離出來的 Melanoxetin 及 Okanin 亦能有效的抑制黃嘌呤氧化酶，其抑制能力甚較目前已知之黃嘌呤氧化酶抑制劑-Allopurinol 為佳。綜合上述結果，確知相思樹心材抽出物及其成分抑制黃嘌呤氧化酶能力極佳，極具潛力開發為痛風用藥，如能更深入研究並予以開發應用，將有助於開發本土相思樹加工利用之潛能，進一步擴展其應用領域，並提升其經濟價值。

五、引用文獻

- 童鈺棠、吳志鴻、張上鎮 (2005) 相思樹枝條抽出物抗氧化活性之初探。中華林學季刊 38(3): 367-375。
- Chang, S.T., J.H. Wu, S.Y. Wang, P.L. Kang, N.S. Yang and L.F. Shyur (2001) Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. J. Agric. Food Chem. 49:3420-3424.
- González, A.G., I.L. Bazzocchi., L. Moujir, A.G. Ravelo, M.D. Correa and M.P. Gupta (1995) Xanthine oxidase inhibitory activity of some Panamanian plants from Celastraceae and Lamiaceae. Journal of Ethnopharmacology 46:25-29.
- Moerman, D.E. (1986) Medicinal Plants of Native America. University of Michigan Museum of Anthropology. Michigan. Technical Reports p. 910.
- Tung, Y.T., J.H. Wu, C.Y. Hsieh, P.S. Chen and S.T. Chang (2009a) Free radical-scavenging phytochemicals of hot water extracts of *Acacia confusa* leaves detected by on-line screening method. Food Chem. 115: 1019-1024.
- Tung, Y.T., J.H. Wu, C.Y. Huang, Y.H. Kuo and S.T. Chang (2009b) Antioxidant activities and phytochemical characteristics of extracts from *Acacia confusa* bark. Bioresource Technol. 100:509-514.

- Tung, Y.T., M.T. Chua, S.Y. Wang and S.T. Chang (2008) Anti-inflammation activities of essential oil and its constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) twigs. *Bioresource Technol.* 99:3908–3913.
- Wu, J.H., C.Y. Huang, Y.T. Tung and S.T. Chang (2008b) Online RP-HPLC-DPPH screening method for detection of radical-scavenging phytochemicals from flowers of *Acacia confusa*. *J. Agric. Food Chem.* 56:328–332.
- Wu, J.H., Y.T. Tung, S.C. Chien, S.Y. Wang, Y.H. Kuo, L.F. Shyur and S.T. Chang (2008a) Effect of phytochemicals from the heartwood of *Acacia confusa* on inflammatory mediator production. *J. Agric. Food Chem.* 56:1567–1573.
- Wu, J.H., Y.T. Tung, S.Y. Wang, L.F. Shyur, Y.H. Kuo and S.T. Chang (2005) Phenolic antioxidants from the heartwood of *Acacia confusa*. *J. Agric. Food Chem.* 53:5917–5921.

98 年度委託研究計畫期末報告委員審查意見辦理情形表

計畫編號：98-00-5-14

計畫名稱：相思樹抽出物及其成分作為痛風用藥之開發

審查委員意見	辦理情形
<p>1. 依本報告評估結果相思樹心材抽出物抑制黃嘌呤氧化酶活性之效果甚佳，進一步由相思樹心材乙酸乙酯可溶部分離出來的 Melanoxein 及 okanin 亦能有效的抑制黃嘌呤氧化酶，其效果甚至較已知之黃嘌呤氧化酶抑制劑 Allopurinol 為佳。但目前是將生立木砍伐後，取得木材所進行結果，今後也許可對枯立木或倒木，如漂流木狀態進行探討，如也能得到同樣結果，其資源將可充分供應。</p>	<p>針對枯立木、倒木或漂流木之活性成分研究，如蒙林務局補助經費，將再申請計畫執行。</p>
<p>2. 第 6 頁圖 1 之圖示與文中說明，最好能配對，讀起來較易理解。</p>	<p>已遵照審查委員所提之意見，修正第 6 頁之文中說明。</p>

<p>3. 第 8 頁圖 3 之柱狀圖少掉 EA1，因此與文中說明較不易對應，建議能補充。</p>	<p>已遵照審查委員所提之第 3 點意見，修正第 8 頁之圖 3。</p>
<p>4. 已符合期末審查標準。</p>	<p>謝謝審查委員的意見。</p>
<p>5. 不明未來再現性如何？</p>	<p>依據本實驗室另外之研究成果，樹齡為 35 年生以上之相思樹心材抽出物皆含有活性成分 Melanoxein 及 Okanin，因此，相思樹心材抽出物抑制黃嘌呤氧化酶活性是具有再現性的。</p>
<p>6. 如要生合成須瞭解其化合物，如欲直接使用時，直接以抽出物應用效果即可。</p>	<p>謝謝委員提供之意見，關於相思樹心材抽出物抑制黃嘌呤氧化酶活性之應用，若以開發成為保健食品為目標，可望直接利用粗抽出物，但作為痛風用藥，通常須以純化合物的形式才有機會開發成為新藥。</p>

<p>7. 本計畫以提升森林非木資源的利用為目的，探討以相思樹之抽出物之成分作為痛風治療藥劑之開發。</p>	<p>謝謝審查委員的意見。</p>
<p>8. 計畫執行成果優異，自乙醇抽出物中篩選具黃嘌呤氧化酶的活性之次分離部，並自其中分離出較目前痛風治療用藥 Allopurinol 黃嘌呤抑制酶活性佳之二化合物 Melanoxein 及 okanin。</p>	<p>謝謝委員之意見。</p>
<p>9. 宜維持進行藥理研究，並嘗試申請專利。</p>	<p>謝謝審查委員之意見，本研究成果已經申請臺灣及美國之專利。</p>
<p>10. 符合計畫的進度執行。</p>	<p>謝謝審查委員之意見。</p>