

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710004235.8

[51] Int. Cl.

C07C 403/02 (2006.01)

A61K 31/122 (2006.01)

A61K 36/07 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 7 月 23 日

[11] 公开号 CN 101225066A

[22] 申请日 2007.1.18

[21] 申请号 200710004235.8

[71] 申请人 国鼎生物科技股份有限公司

地址 台湾省台北县

[72] 发明人 刘胜勇 温武哲 邹宛玲 郭茂田

张君绶 黄俊鸿 李雅嫫 霍嘉恒

[74] 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司

代理人 钟 晶

权利要求书 3 页 说明书 14 页

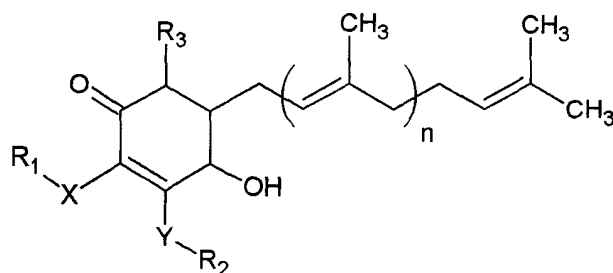
[54] 发明名称

牛樟芝的环己烯酮萃取物

[57] 摘要

本发明是关于一种新颖化合物及其用途，尤其是关于一种由牛樟芝萃取物中所分离出的 4-羟基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5(3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-环己烯酮(4-hydroxy-2,3-dimethoxy-6-methy-5(3,7,11-trimethyl-dodeca-2,6,10-trienyl)-cyclohex-2-enone)及其在抑制肿瘤细胞生长的应用。本发明中的前述化合物是首次见于牛樟芝中，其可应用于抑制乳癌、肝癌与摄护腺癌肿瘤细胞的生长，同时可作为抑制前述肿瘤细胞生长的医药组成物的成分，或进一步借由其抗氧化活性应用于心血管疾病的预防或添加于健康饮食品当中。

1. 一种化合物，包括下列结构式：



其中，X 是氧 (O) 或硫 (S)，Y 是氧或硫；R₁ 是氢基 (H)、甲基 (CH₃) 或 (CH₂)_m-CH₃，R₂ 是氢基、甲基或 (CH₂)_m-CH₃，R₃ 是氢基、甲基或 (CH₂)_m-CH₃，m=1~12；n=1~12。

2. 如权利要求 1 所述的化合物，其特征在于，所述化合物是分离自牛樟芝。

3. 如权利要求 2 所述的化合物，其特征在于，所述化合物是由牛樟芝的有机溶剂萃取物中所分离。

4. 如权利要求 3 所述的化合物，其特征在于，该有机溶剂是选自酯类、醇类、烷类或卤烷所组成的族群。

5. 如权利要求 4 所述的化合物，其特征在于，该醇类是乙醇。

6. 如权利要求 2 所述的化合物，其特征在于，所述化合物是由牛樟芝的水萃取物中所分离。

7. 如权利要求 1 所述的化合物，其特征在于，所述化合物是 4-羟基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5(3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-环己烯酮 (4-hydroxy-2,3-dimethoxy-6-methyl-5(3,7,11-trimethyl-dodeca-2,6,10-trienyl)-cyclohex-2-enone)。

8. 一种将具有如权利要求 1 或 7 所述化合物利用于抑制乳癌肿瘤细胞生长的应用。

9. 如权利要求 8 所述的将该化合物利用于抑制乳癌肿瘤细胞生长的应用，其特征在于，该化合物是分离自牛樟芝。

10. 如权利要求 9 所述的将该化合物利用于抑制乳癌肿瘤细胞生长的应用, 其特征在于, 该化合物是由牛樟芝的有机溶剂萃取物中所分离。

11. 如权利要求 10 所述的将该化合物利用于抑制乳癌肿瘤细胞生长的应用, 其特征在于, 该有机溶剂是选自酯类、醇类、烷类或卤烷所组成的族群。

12. 如权利要求 11 所述的将该化合物利用于抑制乳癌肿瘤细胞生长的应用, 其特征在于, 该有机溶剂是乙醇。

13. 如权利要求 9 所述的将该化合物利用于抑制乳癌肿瘤细胞生长的应用, 其特征在于, 该化合物是由牛樟芝的水萃取物中所分离。

14. 如权利要求 8 所述的将该化合物利用于抑制乳癌肿瘤细胞生长的应用, 其特征在于, 该乳癌肿瘤细胞是 MCF-7 或 MDA-MB-231 细胞系。

15. 一种将具有如权利要求 1 或 7 所述的化合物利用于抑制肝癌肿瘤细胞生长的应用。

16. 如权利要求 15 所述的将该化合物利用于抑制肝癌肿瘤细胞生长的应用, 其特征在于, 该化合物是分离自牛樟芝。

17. 如权利要求 16 所述的将该化合物利用于抑制肝癌肿瘤细胞生长的应用, 其特征在于, 该化合物是由牛樟芝的有机溶剂萃取物中所分离。

18. 如权利要求 17 所述的将该化合物利用于抑制肝癌肿瘤细胞生长的应用, 其特征在于, 该有机溶剂是选自酯类、醇类、烷类或卤烷所组成的族群。

19. 如权利要求 18 所述的将该化合物利用于抑制肝癌肿瘤细胞生长的应用, 其特征在于, 该有机溶剂是乙醇。

20. 如权利要求 16 所述的将该化合物利用于抑制肝癌肿瘤细胞生长的应用, 其特征在于, 该化合物是由牛樟芝的水萃取物中所分离。

21. 如权利要求 15 所述的将该化合物利用于抑制肝癌肿瘤细胞生长的应用, 其特征在于, 该肝癌肿瘤细胞是 Hep 3B 或 Hep G2 细胞系。

22. 一种将具有如权利要求 1 或 7 所述的化合物利用于抑制摄护腺癌肿瘤细胞生长的应用。

23. 如权利要求 22 所述的将该化合物利用于抑制摄护腺癌肿瘤细胞生长的应用, 其特征在于, 该化合物是分离自牛樟芝。

24. 如权利要求 23 所述的将该化合物利用于抑制摄护腺癌肿瘤细胞生长

的应用，其特征在于，该化合物是由牛樟芝的有机溶剂萃取物中所分离。

25. 如权利要求 24 所述的将该化合物利用于抑制摄护腺癌肿瘤细胞生长的应用，其特征在于，该有机溶剂是选自酯类、醇类、烷类或卤烷所组成的族群。

26. 如权利要求 25 所述的将该化合物利用于抑制摄护腺癌肿瘤细胞生长的应用，其特征在于，该有机溶剂是乙醇。

27. 如权利要求 23 所述的将该化合物利用于抑制摄护腺癌肿瘤细胞生长的应用，其特征在于，该化合物是由牛樟芝的水萃取物中所分离。

28. 如权利要求 22 所述的将该化合物利用于抑制摄护腺癌肿瘤细胞生长的应用，其特征在于，该摄护腺癌肿瘤细胞是 LNCaP 或 DU145 细胞系。

29. 如权利要求 1 或 7 所述的化合物，其特征在于，所述化合物具有抗氧化活性。

30. 一种利用于抑制肿瘤细胞生长的医药组成物，其包括有效剂量的如权利要求 1 所述的化合物以及药学上可接受的载体，其中该肿瘤细胞是选自乳癌、肝癌或摄护腺癌的肿瘤细胞。

31. 一种利用于抑制肿瘤细胞生长的医药组成物，其特征在于，其包括有效剂量的如权利要求 7 所述的化合物以及药学上可接受的载体，其中该肿瘤细胞是选自乳癌、肝癌或摄护腺癌的肿瘤细胞。

牛樟芝的环己烯酮萃取物

技术领域

本发明是关于一种新颖化合物，尤其是关于一种由牛樟芝（*Antrodia camphorata*）萃取物中所分离纯化的化合物及其在抑制肿瘤细胞生长的应用。

背景技术

牛樟芝（*Antrodia camphorata*），又称樟芝、牛樟菇、红樟、红樟芝、樟蕈或樟窟内蕈等，为台湾特有种真菌，只生长于台湾山区海拔 450~2000 公尺间的牛樟树（*Cinnamoum kanehirai* Hay）的中空腐朽心材内壁上，因此是由树干内面生长出子实体。牛樟树目前主要分布于桃园、南投等山区，由于牛樟树是台湾数量极为稀少的保育类树种，加上人为的盗伐，使得寄生于其中方能生长的野生牛樟芝数量更形稀少，且由于其生长相当缓慢，生长期也仅在六月至十月之间，因此价格非常昂贵。

牛樟芝的子实体为多年生，无柄，呈木栓质至木质，其外形多变，有板状、钟状、马蹄状或塔状。初时为扁平型，贴生于木材表面，之后其前缘会略为卷曲翘起，而呈板块状（层纹板状）或如钟乳石状。牛樟芝顶部表面呈褐色至黑褐色，具不明显的皱纹，有光泽，边缘平而钝，其腹面则为橘红色或局部黄色，并有许多细孔。

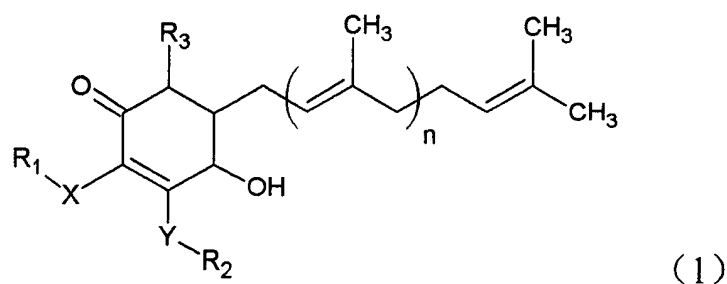
此外，牛樟芝具有强烈的黄樟香气，其晒干后褪色成土黄白色，味极苦，民间将其用作解毒、保肝、抗癌的草药。牛樟芝如同一般食药用的蕈菇类，具有许多复杂的成分，已知的生理活性成分中，包括：多醣体（polysaccharides，如 β -葡萄糖聚糖）、三萜类化合物（triterpenoids）、超氧歧化酶（superoxide dismutase, SOD）、腺苷（adenosine）、蛋白质（含免疫球蛋白）、维生素（如维生素 B、烟碱酸）、微量元素（如钙、磷及锗等）、核酸、凝集素、胺基酸、固醇类、木质素以及血压稳定物质（如 antodia acid）等，这些生理活性成分被认为具有抗肿瘤、增加免疫能力、抗过敏、抑制血小板凝集、抗病毒、抗细菌、抗高血压、降血糖、降胆固醇以及保护肝脏等功能。

牛樟芝众多成分中以三萜类化合物被研究的最多，三萜类化合物是由三十个碳元素结合成六角形或五角形天然化合物的总称，牛樟芝所具的苦味即主要来自三萜类此成分。1995 年时，Cherng 等人发现牛樟芝子实体萃取物中含有三种新的以麦角甾烷(ergostane)为骨架的三萜类化合物：antcin A、antcin B 与 antcin C (Cherng, I. H., and Chiang, H. C. 1995. Three new triterpenoids from *Antrodia cinnamomea*. J. Nat. Prod. 58:365-371)。Chen 等人以乙醇萃取樟芝子实体后发现 zhankuic acid A、zhankuic acid B 及 zhankuic acid C 等三种三萜类化合物 (Chen, C. H., and Yang, S. W. 1995. New steroid acids from *Antrodia cinnamomea*, a fungus parasitic on *Cinnamomum micranthum*. J. Nat. Prod. 58:1655-1661)。此外，Chiang 等人于 1995 年也由子实体萃取物中发现另外三种分别为倍半萜内酯 (sesquiterpene lactone) 与两种双酚类衍生物的新三萜类化合物，此即 antrocin, 4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯并二氧环 (4,7-dimethoxy-5-methy-1,3-benzodioxole) 与 2,2',5,5'-四甲氧基-3,4,3',4'-双-亚甲二氧基-6,6'-二甲基联苯 (2,2',5,5'-teramethoxy-3,4,3',4'-bi-methylenedioxy-6,6'-dimethyl biphenyl) (Chiang, H. C., Wu, D. P., Cherng, I. W., and Ueng, C. H. 1995. A sesquiterpene lactone, phenyl and biphenyl compounds from *Antrodia cinnamomea*. Phytochemistry. 39:613-616)。到了 1996 年，Cherng 等人以同样分析方法再度发现四种新的三萜类化合物：antcin E、antcin F、methyl antcinate G、methyl antcinate H (Cherng, I. H., Wu, D. P., and Chiang, H. C. 1996. Triteroenoids from *Antrodia cinnamomea*. Phytochemistry. 41:263-267)；而 Yang 等人则发现了二种以麦角甾烷为骨架的新化合物 zhankuic acid D、zhankuic acid E 和三种以羊毛甾烷 (lanostane) 为骨架的新化合物：15 α -乙酰-去氢硫色多孔菌酸 (15 α -acetyl-dehydrosulphurenic acid)、去氢齿孔酸 (dehydroeburicoic acid) 与去水硫色多孔菌酸 (dehydrasulphurenic acid) (Yang, S. W., Shen, Y. C., and Chen, C. H. 1996. Steroids and triterpenoids of *Antrodia cinnamomea* — a fungus parasitic on *Cinnamomum micranthum*. Phytochemistry. 41:1389-1392)。虽然由目前诸多实验可得知牛樟芝萃取物具有抑癌的功效 (如前述 Chen (1995))，但究为何种有效成分可达到抑制肿瘤细胞效果的研究，目前则仍处于试验阶段，并未有具体的有效成分发表，故

若能将该萃取物进一步纯化分析,找出其真正有效抑癌成分,对于人类癌症的治疗实将产生莫大的帮助。

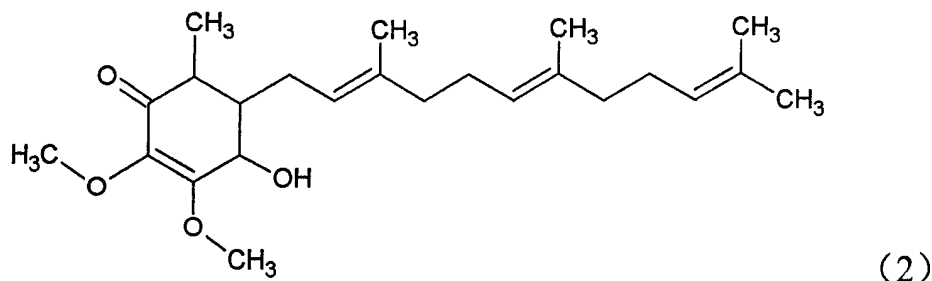
发明内容

为明了牛樟芝萃取物中究竟是何成分具有抑癌的效果,本发明由牛樟芝萃取物中分离纯化出具有式(1)结构式的新颖化合物:



其中, X 是氧(O)或硫(S), Y 是氧或硫; R_1 是氢基(H)、甲基(CH_3)或 $(CH_2)_m-CH_3$, R_2 是氢基、甲基或 $(CH_2)_m-CH_3$, R_3 是氢基、甲基或 $(CH_2)_m-CH_3$, $m=1\sim 12$; $n=1\sim 12$ 。

如式(1)结构式的化合物中,较佳者为如下所示式(2)的化合物:



式(2)的化合物,其化学名为 4-羟基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5(3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-环己烯酮(4-hydroxy-2,3-dimethoxy-6-methyl-5-(3,7,11-trimethyl-dodeca-2,6,10-trienyl)-cyclohex-2-enone), 分子式为 $C_{24}H_{38}O_4$, 外观为淡黄色粉末状, 分子量为 390。

本发明中式(1)、式(2)的化合物是分离纯化自牛樟芝水萃取物或有机溶剂萃取物,有机溶剂可包括醇类(例如甲醇、乙醇或丙醇)、酯类(例如乙酸乙酯)、烷类(例如己烷)或卤烷(例如氯甲烷、氯乙烷),但并不以此为限,其中较佳者为醇类,更佳者为乙醇。

借由前述化合物,本发明是将其应用在抑制肿瘤细胞生长上,使能进一

步应用于治疗癌症的医药组成份中，增益癌症的治疗效果。本发明化合物的应用的范围包括对于乳癌肿瘤细胞、肝癌肿瘤细胞与摄护腺癌肿瘤细胞等细胞的生长产生抑制效果，使该等肿瘤细胞无法迅速生长，进而抑制肿瘤的增生，延缓肿瘤的恶化，因此，可进一步利用于乳癌、肝癌与摄护腺癌等癌症的治疗。

另一方面，本发明中也可将式（1）或/与式（2）的化合物利用于治疗乳癌、肝癌与摄护腺癌等医药组成物的成分中，借以抑制该等肿瘤细胞的生长。前述医药组成物除包括有效剂量的式（1）或/与式（2）的化合物外，尚可包括药学上可接受的载体。载体可为赋形剂（如水）、填充剂（如蔗糖或淀粉）、黏合剂（如纤维素衍生物）、稀释剂、崩解剂、吸收促进剂或甜味剂，但并未仅限于此。本发明医药组成物可依一般已知药学的制备方法生产制造，将式（1）或/与式（2）有效成分剂量与一种以上的载体相混合，制备出所需的剂型，此剂型可包括锭剂、粉剂、粒剂、胶囊或其它液体制剂，但未以此为限。

此外，由于本发明中的化合物同时具有抗氧化活性，因此亦可将其添加于保健食品、饮食品、医药品、化妆品当中，借由其抗氧化能力达到预防心血管疾病或避免细胞突变等效用，使助益于施用人体的健康。

以下将配合图式进一步说明本发明的实施方式，下述所列举的实施例是用以阐明本发明，并非用以限定本发明的范围，任何熟悉该技术人员，在不脱离本发明的精神和范围内，当可做些许修改与改进，因此本发明的保护范围应该视后附的权利要求书所限定为准。

实施方式

首先取牛樟芝（*Antrodia camphorata*）菌丝体、子实体或二者的混合物，利用已知的萃取方式，以水或有机溶剂进行萃取，借以取得牛樟芝水萃取物或有机溶剂萃取物。其中，有机溶剂可包括醇类（例如甲醇、乙醇或丙醇）、酯类（例如乙酸乙酯）、烷类（例如己烷）或卤烷（例如氯甲烷、氯乙烷），但并不以此为限。其中较佳者为醇类，更佳者为乙醇。

经萃取过后的牛樟芝水萃取物或有机溶剂萃取物，可进一步借由高效液相层析加以分离纯化，之后再对每一分液（fraction）进行抑癌效果的测试。最后，则针对具抑癌效果的分液进行成分分析，将可能产生抑癌效果的成分

再分别进一步做不同癌症肿瘤细胞的抑制效果测试。最终即发现本发明中如式(1)/式(2)的化合物是具有抑制不同癌症肿瘤细胞生长的效果,且该化合物经与已知文献对比,并未曾在牛樟芝中发现,因此是新颖的化合物。

为方便说明本发明,以下将以式(2)的 4-羟基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5(3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-环己烯酮化合物进行说明。此外,为证实 4-羟基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5(3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-环己烯酮化合物对肿瘤细胞生的抑制效果,本发明中是以 MTT 分析法,根据美国国家癌症研究所(National Cancer Institute, NCI)抗肿瘤药物筛检模式,对包括乳癌、肝癌与摄护腺癌等肿瘤细胞进行细胞存活率的测试。由这些测试证实,4-羟基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5(3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-环己烯酮对于乳癌肿瘤细胞(包括 MCF-7 与 MDA-MB-231)、肝癌肿瘤细胞(包括 Hep 3B 与 Hep G2)与摄护腺癌肿瘤细胞(包括 LNCaP 与 DU-145)等都可降低其存活率,相对之下并可同时降低生长半抑制率所需浓度(即 IC_{50} 值),因此得借由 4-羟基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5(3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-环己烯酮,应用于包括乳癌、肝癌与摄护腺癌等肿瘤细胞的生长抑制上,而进一步可利用于乳癌、肝癌与摄护腺癌等癌症的治疗。现对前述实施方式详尽说明如下:

实施例 1: 4-羟基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5(3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-环己烯酮的分离

将 100 克左右的牛樟芝菌丝体、子实体或二者的混合物,置入三角锥形瓶中,加入适当比例的水与醇类(70%~100%醇类水溶液),在 20~25℃下搅拌萃取至少 1 小时以上,之后以滤纸及 0.45 μ m 滤膜过滤,收集萃取液。

将前述收集的牛樟芝萃取液,利用高效能液相层析仪(High Performance Liquid chromatography),以 RP18 的层析管(column)进行分析,并以甲醇(A)及 0.1%~0.5%醋酸水溶液(B)做为移动相(mobile phase)(其溶液比例是: 0~10 分钟, B 比例为 95%~20%; 10~20 分钟, B 比例为 20%~10%; 20~35 分钟, B 比例为 10%~10%; 35~40 分钟, B 比例为 10%~95%),在每分钟 1ml 的速度下冲提,同时以紫外-可见光全波长侦测器分析。

将 25 分钟至 30 分钟的冲提液收集浓缩即可得淡黄色粉末状的固体产物,

此即 4-羟基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5 (3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-环己烯酮。经分析,其分子式为 $C_{24}H_{38}O_4$, 分子量 390, 熔点 (m.p.) 为 $48^{\circ}\text{C} \sim 52^{\circ}\text{C}$ 。核磁共振 (NMR) 分析值则如下所示: $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta(\text{ppm})$: 1.51、1.67、1.71、1.75、1.94、2.03、2.07、2.22、2.25、3.68、4.05、5.07 与 5.14。 $^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta(\text{ppm})$: 12.31、16.1、16.12、17.67、25.67、26.44、26.74、27.00、39.71、39.81、40.27、43.34、59.22、60.59、120.97、123.84、124.30、131.32、135.35、135.92、138.05、160.45 与 197.12。

经将 4-羟基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5 (3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-环己烯酮与化学式数据库对比后,并未发现与前述相同的化合物结构,因此,此化合物是一新颖且前所未见的化合物。

实施例 2: 体外抗乳腺癌肿瘤细胞的活性测试

为进一步测试实施例 1 中所发现化合物对肿瘤细胞的抑制效果,本实施例将根据美国国家癌症研究所 (National Cancer Institute, NCI) 抗肿瘤药物筛选模式,首先取实施例 1 中所分离的 4-羟基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5 (3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-环己烯酮化合物,加入 MCF-7 与 MDA-MB-231 人类肿瘤细胞培养液中,进行肿瘤细胞存活性的测试。细胞存活性的测试可采用已知的 MTT 分析法进行分析,而 MCF-7 与 MDA-MB-231 都是人类的乳腺癌肿瘤细胞系。

MTT 分析法是一种常见用于分析细胞增生 (cell proliferation)、存活率 (percent of viable cells) 以及细胞毒性 (cytotoxicity) 的分析方法。其中,MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]2,5-diphenyltetrazolium bromide) 为一黄色染料,它可被活细胞吸收并被粒腺体中的琥珀酸四唑还原酶 (succinate tetrazolium reductase) 还原成不溶于水且呈蓝紫色的 formazan,因此借由 formazan 形成与否,即可判断并计算细胞的存活率。

首先将人类乳腺癌细胞 MCF-7 与 MDA-MB-231 分别于含有胎牛血清的培养液中培养 24 小时。将增生后的细胞以 PBS 清洗一次,并以 1 倍的胰蛋白酶-EDTA 处理细胞,随后于 1,200rpm 下离心 5 分钟,将细胞沉淀并丢弃上清液。之后加入 10ml 的新培养液,轻微摇晃使细胞再次悬浮,再将细胞分置于 96 孔微量盘内。测试时,分别于每一孔内加入 30、10、3、1、0.3、0.1 与 0.03

$\mu\text{g/ml}$ 牛樟芝乙醇萃取物(对照组, 未经纯化分离的总萃取物)以及 4-羟基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5(3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-环己烯酮(试验组), 于 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 下培养 48 小时。其后, 于避光的环境下于每一孔内加入 2.5mg/ml 的 MTT, 反应 4 小时后再于每一孔内加入 $100\mu\text{l}$ 的 lysis buffer 终止反应。最后以酵素免疫分析仪在 570nm 吸光波长下测定其吸光值, 借以计算细胞的存活率, 并推算出其生长半抑制率所需浓度(即 IC_{50} 值), 其结果如表一所示。

表一：体外对乳癌肿瘤细胞存活率的测试结果

测试样品	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
对照组(加入牛樟芝萃取物)	
MCF-7	11.132
MDA-MB-231	25.812
试验组(加入式 2)	
MCF-7	0.852
MDA-MB-231	1.031

由表一中可知, 借由 4-羟基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5(3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-环己烯酮的作用, 其对于 MCF-7 人类乳癌肿瘤细胞的 IC_{50} 值为 $0.852\mu\text{g/ml}$, 对于 MDA-MB-231 人类乳癌肿瘤细胞的 IC_{50} 值则为 $1.031\mu\text{g/ml}$, 相较于牛樟芝萃取混合物所测得的 IC_{50} 值是低的多, 因此可证实牛樟芝萃取物中的 4-羟基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5(3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-环己烯酮确实能够利用于乳癌肿瘤细胞生长的抑制。

实施例 3：体外对乳癌肿瘤细胞辅助治疗的活性测试

本测试同样是根据美国国家癌症研究所的体外筛检模式进行测试。首先, 取人类乳癌细胞 MCF-7 与 MDA-MB-231, 分别于含有胎牛血清的培养液中培养 24 小时后, 将增生后的细胞以 PBS 清洗一次, 并以 1 倍的胰蛋白酶-EDTA 处理细胞, 随后于 $1,200\text{rpm}$ 下离心 5 分钟, 将细胞沉淀并丢弃上清液。之后加入 10ml 的新培养液, 轻微摇晃使细胞再次悬浮。测试前, 先加入 $0.0017\mu\text{g/ml}$ 紫杉醇 (Taxol) 处理细胞 72 小时, 再将细胞分置于 96 孔微量盘内, 之后分别于每孔内加入 $0\mu\text{g/ml}$ (对照组), 30、10、3、1、0.3、0.1 与 $0.03\mu\text{g/ml}$

实施例 1 中所分离的 4-羟基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5（3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯）-2-环己烯酮（试验组），于 37℃、5%CO₂ 下培养 48 小时。其后，于避光的环境下于每一孔内加入 2.5mg/ml 的 MTT，反应 4 小时后于每一孔内加入 100μl 的 lysis buffer 终止反应。最后以酵素免疫分析仪在 570nm 吸光波长下测定其吸光值，借以计算细胞的存活率，并推算出其生长半抑制所需浓度（即 IC₅₀ 值），其结果如表二所示。

表二：体外对乳癌肿瘤细胞经紫杉醇辅助治疗后抑制的测试结果

测试样品	结果
对照组	细胞存活率 (%)
MCF-7 (0.0017 μg/ml Taxol)	65 ±1
MDA-MB-231 (0.0017μg/ml Taxol)	76±3
试验组	IC ₅₀ (μg/ml)
MCF-7 (0.0017 μg/ml Taxol+式 2)	0.009
MDA-MB-231 (0.0017μg/ml Taxol+式 2)	0.011

由表二中可知，透过紫杉醇的协同作用，4-羟基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5（3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯）-2-环己烯酮对于 MCF-7 人类乳癌肿瘤细胞的 IC₅₀ 值降为 0.009μg/ml，对于 MDA-MB-231 人类乳癌肿瘤细胞的 IC₅₀ 值也降为约 0.011μg/ml，因此可证实牛樟芝萃取物中的 4-羟基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5（3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯）-2-环己烯酮确实能够利用于乳癌肿瘤细胞生长的抑制，且在紫杉醇的协同作用下，有更加的抑制效果。

实施例 4：体外抗肝癌肿瘤细胞的活性测试

本测试也是根据美国国家癌症研究所抗肿瘤药物筛检模式进行，将实施例 1 中所分离的 4-羟基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5（3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯）-2-环己烯酮化合物，加入 Hep 3B 与 Hep G2 人类肝癌肿瘤细胞培养液中进行培养，借以进行肿瘤细胞存活性的测试。

首先将人类肝癌细胞 Hep 3B 与 Hep G2 分别于含有胎牛血清的培养液中培养 24 小时。将增生后的细胞以 PBS 清洗一次，并以 1 倍的胰蛋白酶-EDTA

处理细胞，随后于 1,200rpm 下离心 5 分钟，将细胞沉淀并丢弃上清液。之后加入 10ml 的新培养液，轻微摇晃使细胞再次悬浮，再将细胞分置于 96 孔微量盘内。测试时，分别于每一孔内加入 30、10、3、1、0.3、0.1 与 0.03 $\mu\text{g/ml}$ 的牛樟芝乙醇萃取物（对照组，未经纯化分离的总萃取物）以及 30、10、3、1、0.3、0.1 与 0.03 $\mu\text{g/ml}$ 的 4-羟基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5(3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-环己烯酮（试验组），于 37℃、5%CO₂ 下培养 48 小时。其后，于避光的环境下于每一孔内加入 2.5mg/ml 的 MTT，反应 4 小时后再于每一孔内加入 100 μl 的 lysis buffer 终止反应。最后以酵素免疫分析仪在 570nm 吸光波长下测定其吸光值，借以计算细胞的存活率，并推算出其 IC₅₀ 值，其结果如表三所示。

表三：体外对肝癌肿瘤细胞抑制的测试结果

测试样品	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
对照组(加入牛樟芝萃取物)	
Hep 3B	5.121
Hep G2	18.631
试验组(加入式 2)	
Hep 3B	0.005
Hep G2	1.679

由表三中可知，借由 4-羟基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5(3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-环己烯酮的作用，其对于 Hep 3B 人类肝癌肿瘤细胞的 IC₅₀ 值降为 0.005 $\mu\text{g/ml}$ ，对于 Hep G2 人类肝癌肿瘤细胞的 IC₅₀ 值则降为 1.679 $\mu\text{g/ml}$ ，相较于牛樟芝萃取混合物所测得的 IC₅₀ 值是低的多，因此可证实牛樟芝萃取物中的 4-羟基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5(3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-环己烯酮确实能够利用于肝癌肿瘤细胞生长的抑制。

实施例 5：体外对肝癌肿瘤细胞辅助治疗的活性测试

本测试同样是根据美国国家癌症研究所的体外筛检模式进行测试。首先，取人类肝癌细胞 Hep 3B 与 Hep G2，分别于含有胎牛血清的培养液中培养 24 小时后，将增生后的细胞以 PBS 清洗一次，并以 1 倍的胰蛋白酶-EDTA 处理

细胞，随后于 1,200rpm 下离心 5 分钟，将细胞沉淀并丢弃上清液。之后加入 10ml 的新培养液，轻微摇晃使细胞再次悬浮。测试前，先于 Hep 3B 细胞株试验加入 0.0043μg/ml 的 Lovastatin，而于 Hep G2 细胞株试验加入 0.0017μg/ml 紫杉醇（Taxol），处理细胞 72 小时，再将细胞分置于 96 孔微量盘内，之后分别于每孔内加入 0μg/ml（对照组），30、10、3、1、0.3、0.1 与 0.03μg/ml 实施例 1 中所分离的 4-羟基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5（3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯）-2-环己烯酮（试验组），于 37℃、5%CO₂ 下培养 48 小时。其后，于避光的环境下于每一孔内加入 2.5mg/ml 的 MTT，反应 4 小时后于每一孔内加入 100μl 的 lysis buffer 终止反应。最后以酵素免疫分析仪在 570nm 吸光波长下测定其吸光值，借以计算细胞的存活率，并推算出其 IC₅₀ 值，其结果如表四所示。

表四：体外对肝癌肿瘤细胞经紫杉醇辅助治疗后抑制的测试结果

测试样品	结果
对照组	细胞存活率 (%)
Hep 3B (0.0043 μg/ml Lovastatin)	61±3
Hep G2 (0.0017 μg/ml Taxol)	81±2
试验组	IC ₅₀ (μg/ml)
Hep 3B (0.0043 μg/ml Lovastatin+式 2)	0.002
Hep G2 (0.0017 μg/ml Taxol +式 2)	0.008

由表四中可知，透过 Lovastatin 及紫杉醇的协同作用，4-羟基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5（3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯）-2-环己烯酮对于 Hep 3B 人类肝癌肿瘤细胞的 IC₅₀ 值降为 0.002μg/ml，对于 Hep G2 人类肝癌肿瘤细胞的 IC₅₀ 值也降为约 0.008μg/ml，因此可证实牛樟芝萃取物中的 4-羟基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5（3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯）-2-环己烯酮确实能够利用于肝癌肿瘤细胞生长的抑制，且在紫杉醇的协同作用下，有更加的抑制效果。

实施例 6：体外抗摄护腺癌肿瘤细胞的活性测试

本测试也是根据美国国家癌症研究所抗肿瘤药物筛检模式进行，将实施

例 1 中所分离的 4-羟基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5 (3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-环己烯酮化合物,加入 LNCaP 与 DU-145 人类摄护腺癌肿瘤细胞培养液中进行培养,借以进行肿瘤细胞存活性的测试。

首先将人类摄护腺癌细胞 LNCaP 与 DU-145 分别于含有胎牛血清的培养液中培养 24 小时。将增生后的细胞以 PBS 清洗一次,并以 1 倍的胰蛋白酶-EDTA 处理细胞,随后于 1,200rpm 下离心 5 分钟,将细胞沉淀并丢弃上清液。之后加入 10ml 的新培养液,轻微摇晃使细胞再次悬浮,再将细胞分置于 96 孔微量盘内。测试时,分别于每一孔内加入 30、10、3、1 与 0.3μg/ml 牛樟芝乙醇萃取物(对照组,未经纯化分离的总萃取物)以及 30、10、3、1 与 0.3μg/ml 由实施例 1 所分离的 4-羟基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5 (3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-环己烯酮(试验组),于 37℃、5%CO₂ 下培养 48 小时。其后,于避光的环境下于每一孔内加入 2.5mg/ml 的 MTT,反应 4 小时后再于每一孔内加入 100μl 的 lysis buffer 终止反应。最后以酵素免疫分析仪在 570nm 吸光波长下测定其吸光值,借以计算细胞的存活率,并推算出其 IC₅₀ 值,其结果如表五所示。

表五：体外对摄护腺癌肿瘤细胞抑制的测试结果

测试样品	IC ₅₀ (μg/ml)
对照组(加入牛樟芝萃取物)	
LNCaP	11.491
DU-145	41.392
试验组(加入式 2)	
LNCaP	2.378
DU-145	1.812

由表五中可知,借由 4-羟基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5 (3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-环己烯酮的作用,其对于 LNCaP 人类摄护腺癌肿瘤细胞的 IC₅₀ 值降为 2.378μg/ml,对于 DU-145 人类摄护腺癌肿瘤细胞的 IC₅₀ 值则降为 1.812μg/ml,相较于牛樟芝萃取混合物所测得的 IC₅₀ 值是低的多,因此可证

实牛樟芝萃取物中的 4-羟基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5 (3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-环己烯酮确实能够利用于摄护腺癌肿瘤细胞生长的抑制。

实施例 7：体外对摄护腺癌肿瘤细胞辅助治疗的活性测试

本测试同样是根据美国国家癌症研究所的体外筛检模式进行测试。首先，取人类摄护腺癌细胞 LNCaP 与 DU-145，分别于含有胎牛血清的培养液中培养 24 小时后，将增生后的细胞以 PBS 清洗一次，并以 1 倍的胰蛋白酶-EDTA 处理细胞，随后于 1,200rpm 下离心 5 分钟，将细胞沉淀并丢弃上清液。之后加入 10ml 的新培养液，轻微摇晃使细胞再次悬浮。测试前，先于 LNCaP 细胞株试验加入 0.0017 μ g/ml 紫杉醇，而于 DU-145 胞株试验加入 0.0043 μ g/ml 紫杉醇分别处理细胞 72 小时，再将细胞分置于 96 孔微量盘内，之后分别于每孔内加入 0 μ g/ml (对照组)，30、10、3、1、0.3、0.1 与 0.03 μ g/ml 于实施例 1 中所分离的 4-羟基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5 (3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-环己烯酮 (试验组)，于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 下培养 48 小时。其后，于避光的环境下于每一孔内加入 2.5mg/ml 的 MTT，反应 4 小时后于每一孔内加入 100 μ l 的 lysis buffer 终止反应。最后以酵素免疫分析仪在 570nm 吸光波长下测定其吸光值，借以计算细胞的存活率，并推算出其 IC₅₀ 值，其结果如表六所示。

表六：体外对摄护腺癌肿瘤细胞经紫杉醇辅助治疗后抑制的测试结果

测试样品	结果
对照组	细胞存活率 (%)
LNCaP (0.0017 μ g/ml Taxol)	56 \pm 3
DU-145 (0.0043 μ g/ml Taxol)	70 \pm 2
试验组	IC ₅₀ (μ g/ml)
LNCaP (0.0017 μ g/ml Taxol+式 2)	0.961
DU-145 (0.0043 μ g/ml Taxol+式 2)	0.515

由表六中可知，透过紫杉醇的协同作用，4-羟基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5 (3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-环己烯酮对于 LNCaP 人类摄护腺癌肿瘤细胞的 IC₅₀ 值降为 0.961 μ g/ml，对于 DU-145 人类摄护腺癌肿瘤细胞的 IC₅₀

值也降为约 0.515 $\mu\text{g/ml}$ ，相较于牛樟芝萃取混合物所测得的 IC_{50} 值是低的多，因此可证实牛樟芝萃取物中的 4-羟基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5 (3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-环己烯酮确实能够利用于摄护腺癌肿瘤细胞生长的抑制，且在紫杉醇的协同作用下，有更佳的抑制效果。

实施例 8：体外抗氧化活性的试验

一般抗氧化活性的测试，是利用人类低密度脂蛋白 (human low density lipoprotein, LDL)，加入铜离子 (Cu^{2+}) 与待测样本进行氧化反应，检测 LDL 上二烯的反应结果后，以维生素 E 的水溶性类似物 Trolox 作为对照 (Trolox 浓度为 2 μM 时，其效力值定为标准值 1.0)，计算出待测样本的抗氧化活性。

首先准备二次纯水(控制组)，并配制 5mM 磷酸钠缓冲溶液 (sodium phosphate buffer, SPB)、1 μM 与 2 μM 的 Trolox (对照组)及 40 $\mu\text{g/ml}$ 由实施例 1 中所分离的 4-羟基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5 (3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-环己烯酮 (试验组)。利用酵素法测得低密度胆固醇浓度(LDL-C)后，利用 5mM 的 SPB 将 LDL 稀释至 0.10~0.25mg/ml 间。取 96 孔的石英微量盘，于其中先加入 100 μl 的 LDL，再分别加入前述预定浓度的 Trolox 及由实施例 1 中所分离的化合物，之后再分别加入 CuSO_4 溶液以启动氧化反应(每 250 μl 孔中的铜 (II) 浓度为 5.0 μM)，最后将该微量盘置于酵素免疫微量盘分析仪 (ELISA reader) 中进行检测。酵素免疫微量盘分析仪检测波长设为 232nm，温度设为 37 $^{\circ}\text{C}$ ，监测时间为 12 小时，采样间隔时间为 15 分钟，其结果如表七所示。

表七：体外抗氧化活性的测试结果

测试样品	Tlag(分)	ΔTlag (分)	效力值
H_2O (控制组, Tlag_0)	185		
1 μM Trolox (对照组)	266	81	0.48
2 μM Trolox	344	159	1.00
40 $\mu\text{g/ml}$ 式 2	439	208	1.30

注 1: Tlag(分)是指在吸收光波长为 234 nm 下，延滞期(lag phase)与连锁期(propagation phase)的交差点； ΔTlag (分)是指各测试样品 Tlag 时间与 Tlag_0

时间的差值。

注 2：效力值 >0.5 时，表示其具抗氧化作用。

由表七中可知，4-羟基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5（3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯）-2-环己烯酮具有 1.30 的效力值，其比具抗氧化能力的标准值 0.5 高出甚多，也就是，其具有相当的抗氧化能力，因此可用作保健食品、饮食品、医药品、化妆品当中的成分，借由其抗氧化能力达到预防心血管疾病或避免细胞突变等效用，使对于施用的人体健康产生莫大的帮助。