



(21)申請案號：100100874 (22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 01 月 10 日

(51)Int. Cl. : **B01D11/00 (2006.01) G01N33/483 (2006.01)**

(71)申請人：高雄醫學大學(中華民國) KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY (TW)

高雄市三民區十全一路 100 號

(72)發明人：吳永昌 WU, YANG CHANG (TW)；張芳榮 CHANG, FANG RONG (TW)；呂美
津 LU, MEI CHIN (TW)；杜英齊 DU, YING CHI (TW)；吳東穎 WU, TUNG YING
(TW)；許育銘 HSU, YU MING (TW)

(74)代理人：蔡清福

(56)參考文獻：

TW 201029658A

審查人員：林春佳

申請專利範圍項數：16 項 圖式數：15 共 0 頁

(54)名稱

樟芝子實體苯類化合物、製備與分析方法

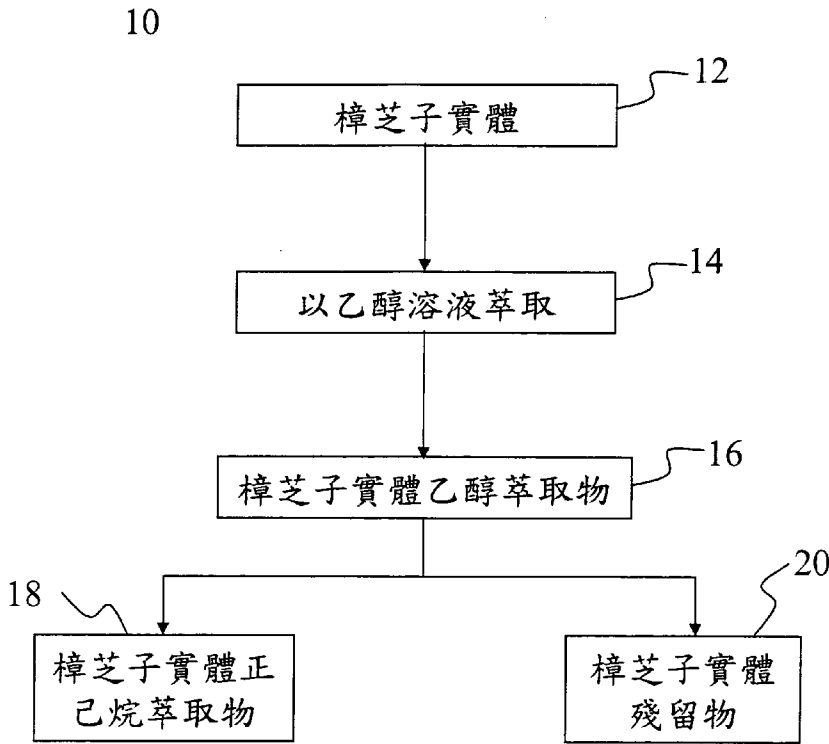
BENZENOID COMPOUNDS OF ANTRODIA CINNAMOMEA, PREPARATION AND ANALYSIS
METHOD THEREOF

(57)摘要

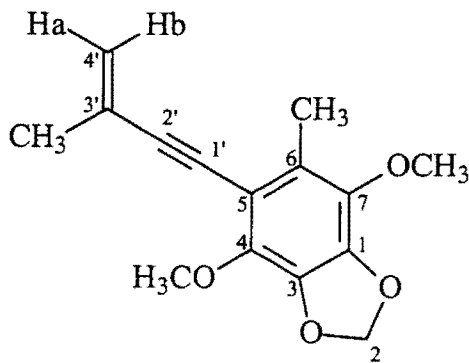
本案公開一種樟芝子實體正己烷萃取物的製備方法，係依序以乙醇溶液及正己烷溶液萃取樟芝子實體，獲得樟芝子實體正己烷萃取物。該樟芝子實體正己烷萃取物包括至少一苯類化合物，經過層析法、核磁共振圖譜及高效能液相層析法確定出至少一苯類化合物內含 4,7-二甲氧基-5-(3-甲基丁-3-烯-1-炔基)-6-甲基-1,3-亞甲二氧基苯、4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-亞甲二氧基苯、安卓凱因 A 及其組合的含量。此外，本案亦可應用於檢測一樟芝保健食品或藥品或樟芝子實體中之苯類化合物含量，具有產業上價值。

Disclosed are a method for preparing ann -hexane extract of the fruiting body of Antrodia cinnamomea (AC), wherein the fruiting body of AC is sequentially extracted with the ethanol solution and then -hexane solution to obtain then -hexane extract containing at least one benzenoid compound. The amounts of 4,7-dimethoxy-5-(3-methylbut-3-en-1-ynyl)-6-methyl-1,3-benzodioxole, 4,7-dimethoxy-5-methyl-1,3-benzodioxole, antrocamphine A and the combination thereof in the at least one benzenoid compound are determined using chromatography, NMR and HPLC. In addition, the present invention is applicable on detecting the amounts of benzenoid compounds in the AC healthcare food/drug or the fruiting body of AC, and thus owns the industrial values.

10 . . . 製備方法
12、14、16、18、
20 . . . 步驟



第1圖



式 I

公告本

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：

100100874

※申請日：

100.1.10

※IPC 分類：

B01D 11/00 (2006.01)

G01N 33/483 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

樟芝子實體苯類化合物、製備與分析方法/BENZENOID COMPOUNDS OF
ANTRODIA CINNAMOMEA, PREPARATION AND ANALYSIS METHOD
THEREOF

二、中文發明摘要：

本案公開一種樟芝子實體正己烷萃取物的製備方法，係依序以乙醇溶液及正己烷溶液萃取樟芝子實體，獲得樟芝子實體正己烷萃取物。該樟芝子實體正己烷萃取物包括至少一苯類化合物，經過層析法、核磁共振圖譜及高效能液相層析法確定出至少一苯類化合物內含 4,7-二甲氧基-5-(3-甲基丁-3-烯-1-炔基)-6-甲基-1,3-亞甲二氧基苯、4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-亞甲二氧基苯、安卓凱因 A 及其組合的含量。此外，本案亦可應用於檢測一樟芝保健食品或藥品或樟芝子實體中之苯類化合物含量，具有產業上價值。

三、英文發明摘要：

Disclosed are a method for preparing an *n*-hexane extract of the fruiting body of *Antrodia cinnamomea* (AC), wherein the fruiting body of AC is sequentially extracted with the ethanol solution and the *n*-hexane solution to obtain the *n*-hexane extract containing at least one benzenoid compound. The amounts of 4,7-dimethoxy-5-(3-methylbut-3-en-1-ynyl)-6-methyl-1,3-benzodioxole, 4,7-dimethoxy-5-methyl-1,3-benzodioxole, antrocamphine A and the combination thereof in the at least one benzenoid compound are determined using chromatography, NMR and HPLC. In addition, the present invention is applicable on detecting the amounts of benzenoid compounds in the AC healthcare food/drug or the fruiting body of AC, and thus owns the industrial values.

四、指定代表圖：

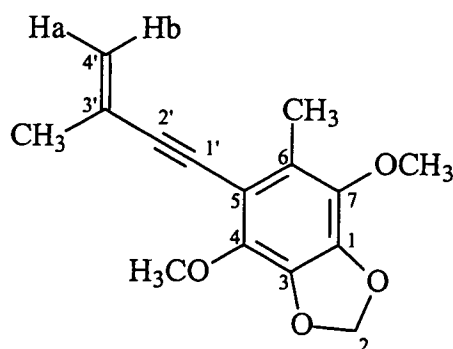
(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

10 製備方法

12、14、16、18、20 步驟

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



式 I

4,7-二甲氧基-5-(3-甲基丁-3-烯-1-炔基)-6-甲基-1,3-亞甲二氧基苯
 4,7-dimethoxy-5-(3-methylbut-3-en-1-ynyl)-6-methyl-1,3-benzodioxole

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本案係關於一種樟芝子實體萃取物，尤其，本案係關於一種樟芝子實體苯類組合物、製備與分析方法。

【先前技術】

樟芝(*Androdia cinnamomea*)又稱樟菇、牛樟菇、牛樟芝等，為台灣特有的真菌菌種，生長於海拔 400 至 2000 公尺特有的牛樟樹(*Cinnamomum kanehirai*)樹幹腐朽的心材內壁，或枯死倒伏的牛樟木材陰暗潮濕的表面。因此，要尋找到野生的樟芝子實體(fruiting body)或確認此多孔菌目(Aphylllophorales)真菌菌株的外觀並不容易，也由於其生物活性成分具潛在的醫藥價值，因此樟芝的價格居高不下。

由於樟芝子實體不易被發現及以人工方式培養，目前市面上多為樟芝菌絲體(mycelia)產品，其宣稱具有抗癌、減少治療引起的症狀及其他副作用。此外，樟芝菌絲體產品也被發現具有抗氧化、抗過敏、免疫刺激效果(Liu et al., 2007)。這些產品宣稱具有與樟芝子實體相似的主要成分，包括具有細胞毒殺效果的三萜類(triterpenes)、類固醇(steroid)及具有免疫刺激性的多醣體等(Chen et al., 1995; Yang et al., 1996)。

傳統上，樟芝被應用於健康食品，以避免發炎、過敏、皮膚癬、肝癌的發生，因此，樟芝菌絲體及子實體萃取物被認為是具有潛力的化學治療藥物，以對抗肝癌、前列腺癌、膀胱癌、肺癌細胞等(Chen et al., 2007; Hsu et al., 2007; Peng et al., 2007; Shetty et al., 2005; Wu et al., 2006)，但各類有效成分的活性機制與抑制癌症能力並未被完整釐清及探討。

此外，中華民國專利號 I299665 揭露了樟芝萃取物及其製備方法，其係以乙醇萃取樟芝菌絲體獲得多醣體，用以抑制基質金屬蛋白酶的活性，但並非以樟芝子實體進行萃取，其產物也未能抑制癌細胞的生長；中華民國專利號 I279439 揭露了以樟芝菌絲體進行培養，藉由調整培養時的酸鹼值獲得到培養物，並未揭露萃取方法；而中華民國專利號 591110 揭露了由樟芝菌絲體萃取出 γ -氨基丁酸，其係先以冷凍乾燥樟芝菌絲體，再以水或有機溶劑萃取。上述這些發明皆未以樟芝子實體進行有機溶劑或水萃取，而且未鑑定出其所內含的指標性二次代謝化合物。

本案申請人鑑於習知技術中的不足，經過悉心試驗與研究，並一本鍥而不捨之精神，終構思出本案「樟芝子實體苯類組合物、製備與分析方法」，能夠克服先前技術的不足，以下為本案之簡要說明。

【發明內容】

本發明從樟芝子實體中萃取較低極性分層但具有活性之萃取物，並確定其所包含之新穎苯類化合物。藉由該萃取方法，本發明並可應用於檢驗樟芝保健食品、藥物或樟芝子實體之苯類化合物之種類及含量，可做為產業上用途。

本發明提出一種樟芝子實體正己烷萃取物的製備方法，包括下列步驟：提供樟芝子實體；以乙醇溶液萃取樟芝子實體，獲得樟芝子實體乙醇萃取物；及以正己烷溶液萃取樟芝子實體乙醇萃取物，獲得樟芝子實體正己烷萃取物。其中樟芝子實體正己烷萃取物包括至少一苯類化合物。

該至少一苯類化合物係包括 4,7-二甲氧基-5-(3-甲基丁-3-烯-1-炔基)-6-甲基-1,3-亞甲二氧基苯(4,7-dimethoxy-5-(3-methylbut-

3-en-1-ynyl)-6-methyl-1,3-benzodioxole)、4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-亞甲二氧基苯(4,7-dimethoxy-5-methyl-1,3-benzodioxole)及/或安卓凱因 A (antrocaphine A)。而該製備方法還包括將樟芝子實體研磨為細粉的步驟。

本發明另提出一種以前述製備方法所製備之樟芝子實體正己烷萃取物，包括至少一苯類化合物，當溶於 C_5D_5N 時，其 1H 核磁共振圖譜於 δ 6.4 至 6.6 之間具有芳香環上單一個氫的訊號，於 δ 5.8 至 6.1 之間具有 methylenedioxy 訊號，於 δ 5.4 至 5.6 之間具有雙鍵訊號，於 δ 3.7 至 4.1 之間顯示出甲氧基訊號，於 δ 2.1 至 2.6 之間顯示出芳香環上甲基的訊號。

該樟芝子實體正己烷萃取物係以乙醇溶液及正己烷溶液依序萃取樟芝子實體所獲得。而所包括的至少一苯類化合物之種類亦如同前述。

本發明另提供一種樟芝子實體正己烷萃取物，包括至少一苯類化合物，當該樟芝子實體正己烷萃取物溶於 $CDCl_3$ 時，其 1H 核磁共振圖譜於 δ 6.2 至 6.4 之間具有芳香環上單一個氫的訊號，於 δ 5.8 至 6.0 之間具有 methylenedioxy 訊號，於 δ 5.2 至 5.5 之間具有雙鍵訊號，於 δ 3.6 至 4.1 之間具有甲氧基訊號，於 δ 2.1 至 2.4 之間顯示出芳香環上甲基的訊號。

本發明另提供一種方法，用以檢測樟芝子實體中至少一苯類化合物的含量，該方法包括下列步驟：以乙醇溶液萃取樟芝子實體，獲得樟芝子實體乙醇萃取物；以正己烷溶液萃取樟芝子實體乙醇萃取物，獲得樟芝子實體正己烷萃取物；以 1H 核磁共振圖譜儀檢測樟芝子實體正己烷萃取物中是否具有至少一苯類化合物；當樟芝子實體正己烷萃取物中具有至少一苯類化合物時，以高效液相層析儀檢測樟芝子實體正己烷萃取物中苯類化合物的含量。

前述檢測方法還包括以 ^1H 核磁共振圖譜分析儀檢測苯類化合物的訊號，訊號係選自由芳香族訊號、雙鍵訊號、甲氧基訊號及甲基訊號及其組合所組成的群組其中之一。

當樟芝子實體正己烷萃取物溶於 $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ 溶液時，在 ^1H 核磁共振圖譜上所出現的訊號之化學偏移如上所述。同理，當溶於 CDCl_3 溶液時，其在 ^1H 核磁共振圖譜上所出現的訊號之化學偏移亦如上所述。

根據上述構想，實驗所使用的高效液相層析儀包括偵測器，該偵測器包括全波長偵測器、單波長偵測器及/或電噴霧離子化質譜儀。而單波長偵測器的波長設定為 254 nm 以及 270 nm。

本發明另提出一種以 ^1H 核磁共振圖譜偵測含苯類化合物之樟芝子實體正己烷萃取物之方法，該 ^1H 核磁共振圖譜以吡嗪 (pyrazine) 為內標準品，該方法包括下列步驟：檢測樟芝子實體正己烷萃取物是否具有甲氧基訊號於 δ 3.9 至 4.0 之間；檢測樟芝子實體正己烷萃取物是否具有第一甲基訊號於 δ 2.1 至 2.2 之間；以及檢測樟芝子實體正己烷萃取物是否具有第二甲基訊號於 δ 2.3 至 2.4 之間。

而出現甲氧基訊號、第一甲基訊號及第二甲基訊號分別表示樟芝子實體正己烷萃取物具有 4,7-二甲氧基-5-(3-甲基丁-3-烯-1-炔基)-6-甲基-1,3-亞甲二氧基苯、4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-亞甲二氧基苯及安卓凱因 A。

再者，當出現甲氧基訊號時，以內標準品為基礎計算甲氧基訊號之第一強度。同理，當出現第一甲基訊號及/或第二甲基訊號時，以內標準品為基礎計算第一甲基訊號之第二強度及/或第二甲基訊號之第三強度，並且由第一、第二及第三強度依序計算樟芝子實體正己烷萃取物中 4,7-二甲氧基-5-(3-甲基丁-3-烯-1-炔基)-6-

甲基-1,3-亞甲二氧基苯、4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-亞甲二氧基苯及安卓凱因 A 的含量。

本發明另提出一種自樟芝子實體中萃取出之苯類化合物，其化學式如前一段所述的化合物及其組合。

本發明另提出一種檢測方法，係以高效液相層析儀同時檢測 4,7-二甲氧基-5-(3-甲基丁-3-烯-1-炔基)-6-甲基-1,3-亞甲二氧基苯、4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-亞甲二氧基苯及安卓凱因 A 之含量。

本發明另提出一種檢測方法，係以 ^1H 核磁共振質譜儀同時檢測 4,7-二甲氧基-5-(3-甲基丁-3-烯-1-炔基)-6-甲基-1,3-亞甲二氧基苯、4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-亞甲二氧基苯及安卓凱因 A 至少其中之一之含量。

【實施方式】

本案所提出之「樟芝子實體苯類組合物、製備與分析方法」將可由以下的實施例說明而得到充分瞭解，使得熟習本技藝之人士可以據以完成之，然而本案之實施並非可由下列實施例而被限制其實施型態，熟習本技藝之人士仍可依據除既揭露之實施例的精神推演出其他實施例，該等實施例皆當屬於本發明之範圍。

實驗1、樟芝子實體正己烷萃取物之製備

請參閱第 1 圖的製備方法 10，將乾燥樟芝子實體磨成細粉(步驟 12)，以 1:10 比例(重量/體積)置於 75°C 的乙醇溶液迴流 2 小時(步驟 14)。冷卻萃取物，再置於 4°C 進行隔夜沈澱。進一步以濾紙過濾該萃取物的上清液，以 3,000 rpm 離心 30 分鐘以去除沈澱物，將萃取物冷凍乾燥並儲存於-70°C，此即為樟芝子實體乙醇萃取物(步驟 16)。再將樟芝子實體乙醇萃取物以正己烷萃取，獲得樟芝子實體正己烷萃取物(簡稱正己烷萃取物，FNH，步驟 18)

及樟芝子實體殘留物(步驟 20)。

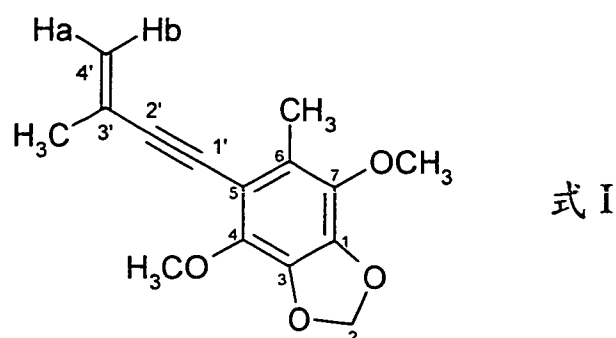
為了在正己烷萃取物中探尋新穎之化合物，且為證實該化合物僅存在於正己烷萃取物而不存在於樟芝子實體的其他萃取物中，發明人參照中華民國專利申請號 098104772 所公開之方法，將前述的樟芝子實體殘留物依序以乙酸乙酯及乙醇進行萃取，分別獲得乙酸乙酯萃取物以及乙醇再萃取物，將本發明的正己烷萃取物與前述兩種萃取物進行比較。

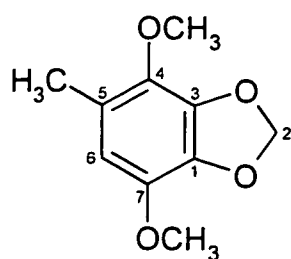
實驗 2、樟芝子實體正己烷萃取物之核磁共振圖譜分析

將正己烷萃取物(FNH)溶於 C_5D_5N 溶液，濃度為11.6 mg/0.75 ml，以解析度400 MHz進行 1H 核磁共振圖譜實驗。請參閱第2圖，其於 δ 6.48、5.93顯示出FNH具有芳香族成分的主要特徵訊號(δ 6.48為芳香環上單一個氫的訊號， δ 5.93為methylenedioxy的訊號)，於 δ 5.50顯示出雙鍵結構的特徵訊號，於 δ 3.87、3.78顯示出甲氧基的特徵訊號。然而，在相同實驗條件下，乙酸乙酯萃取物以及乙醇再萃取物則無上述特徵訊號(結果未顯示)。而且FNH在高磁場區並未顯示三萜類的甲基特徵訊號，僅於 δ 1.27、0.88出現長鏈結構訊號。因此，由上述實驗分析可確定正己烷萃取物為苯類化合物的濃縮層。

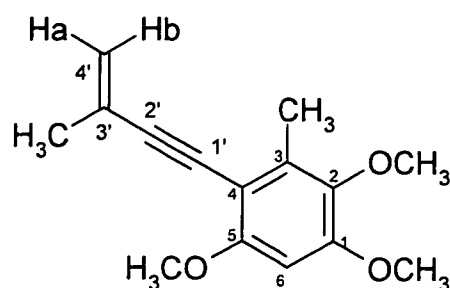
實驗3、樟芝子實體正己烷萃取物之成分分離

本發明萃取出化合物 1~3，在此先將化合物 1~3 對應的結構式(式 I 至式 III)詳列如下。





式 II



式 III

為了區別式 I 及式 III 化合物之 4' 號碳上的兩個 H 原子，將該兩個 H 原子分別命名為 Ha 及 Hb。

為了分析此苯類化合物濃縮層的成分組成，將正己烷萃取物 (FNH) 進行管柱分離分析，以矽膠 60 (silica gel 60, Merck, 230-400 mesh) 及正己烷—乙酸乙酯 (依序為 1:0, 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 5:1, 1:1, 0:1) 梯度層析 897.7 mg 正己烷萃取物，獲得 12 種分餾產物，各分餾產物分別溶於 CDCl_3 溶液，以解析度 200 MHz 進行 ^1H 核磁共振圖譜分析，由第 1 分餾產物 (Fraction 1) 及第 3 分餾產物 (Fraction 3) 的圖譜顯示出芳香族成分的主要特徵訊號，詳如下述。

將 245.4 mg 的第 1 分餾產物以 Sephadex LH-20 樹脂及乙酸乙酯—二氯甲烷 (1:1) 層析，分離出 5 種次分餾物。將 55.01 mg 的第 4 次分餾物 (Subfraction 1-4) 以製備型薄膜色層分析及正己烷—乙酸乙酯 (10:1) 層析，取得 47.5 mg 的次分餾產物。再將 47.5 mg 的次分餾產物以 ODS 高效能逆向層析管柱 (250×10 mm，乙腈—水 (80:20)，流速 2 ml/min) 純化，於滯留時間 9.94 分鐘收集得 3.3 mg 的化合物 2，即 4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-亞甲二氧基苯 (4,7-dimethoxy-5-methyl-1,3-benzodioxole)；於滯留時間 17.25 分鐘

時收集得 3.3 mg 的化合物 1，即 4,7-二甲氧基-5-(3-甲基丁-3-烯-1-炔基)-6-甲基-1,3-亞甲二氧基苯(4,7-dimethoxy-5-(3-methylbut-3-en-1-ynyl)-6-methyl-1,3-benzodioxole)。

將 27.7 mg 的第 3 分餾產物以 Sephadex LH-20 樹脂及乙酸乙酯—二氯甲烷(1:1)進行分離，得到 2 個次分餾物。將 11.8 mg 的第 2 次分餾產物(Subfraction 3-2)以製備型薄膜色層分析及二氯甲烷進行分離，得到 10.0 mg 的化合物 3，即安卓凱因 A (antrocaphine A)，或稱為 1,2,5-三甲氧基-3-甲基-4-(3-甲基丁-3-烯-1-炔基)苯(1,2,5-trimethoxy-3-methyl-4-(3-methylbut-3-en-1-ynyl)benzene)。

實驗 4、樟芝子實體正己烷萃取物之主成分結構鑑定

化合物 1 為白色非結晶固體，以電噴灑離子化質譜(ESIMS, m/z 261 $[M+H]^+$ 、283 $[M+Na]^+$)及核磁共振圖譜分析後的分子式為 $C_{15}H_{16}O_4$ 。請參閱表 1，化合物 1 之 1H 核磁共振圖譜顯示兩個甲基的訊號在 δ_H 2.01 (3H, s)及 2.27 (3H, s)，兩個甲氧基的訊號在 δ_H 3.87 (3H, s)及 3.98 (3H, s)，兩個末端烯炔亞甲基質子(terminal olefinic methylene proton) (δ_H 5.26 及 5.37)，一個 methylenedioxy 的訊號在 δ_H 5.94 (2H, s)。藉由量子相關(quantum coherence, QC)以及異核多鍵相關(heteronuclear multiple-bond coherence, HMBC)的輔助，可確定 ^{13}C 核磁共振圖譜所對應於 1H 核磁共振圖譜的訊號(表 1)，顯示一個芳香環上甲基(aromatic methyl)的訊號在 δ_C 13.9 (6- CH_3)，一組 3-甲基丁基-3-烯-1-炔基(3-methylbut-3-en-1-ynyl)的訊號在 δ_C 83.5 (C-1')、97.5 (C-2')、127.2 (C-3')、121.0 (CH_2 -4')、23.6 (3'- CH_3)，兩個甲氧基的訊號在 δ_C 60.4 (4- OCH_3)及 60.0 (7- OCH_3)，一組亞甲二氧基苯(benzodioxole)的訊號在 δ_C 139.5 (C-1)、101.4 (CH_2 -2)及 136.2 (C-3)。

表 1、化合物 1 的 ^1H 及 ^{13}C NMR 數據(CDCl_3 之 600 及 150 MHz, δ 以 ppm 為單位, J 以 Hz 為單位)

位置	化合物 1	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1		139.5 (s)
2	5.94 (2H, s)	101.4 (t)
3		136.2 (s)
4		139.8 (s)
5		109.8 (s)
6		127.9 (s)
7		137.2 (s)
1'		83.5 (s)
2'		97.5 (s)
3'		127.2 (s)
4'	a 5.26 (1H, br s) b 5.37 (1H, br s)	121.0 (t)
4-OCH ₃	3.98 (3H, s)	60.4 (q)
6-CH ₃	2.27 (3H, s)	13.9 (q)
7-OCH ₃	3.87 (3H, s)	60.0 (q)
3'-CH ₃	2.01 (3H, s)	23.6 (q)

請參閱第 3 圖，根據化合物 1 之 NOESY 圖譜的分析數據： δ_{H} 3.98 (4-OCH₃)/2.01 (3'-CH₃)、 δ_{H} 2.01 (3'-CH₃)/5.26 (4'-Ha)、5.26 (4'-Ha)/5.37 (4'-Hb) 及 2.27 (6-OCH₃)/3.87 (7-OCH₃)，可確定化合物 1 之各官能基在苯環上的取代位置。

請參閱第 4 圖，再藉由 HMBC 確認，化合物 1 之一組亞甲二氧基苯訊號位在 C-1 位置(δ_{C} 139.5) 以及 C-3 位置(δ_{C} 136.2)，兩個甲氧基分別位在 C-4 位置(δ_{C} 139.8) 以及 C-7 位置(δ_{C} 137.2)、一組 3-甲基丁基-3-烯-1-炔基位在 C-5 位置(δ_{C} 109.8)，一個甲基位在 C-6 位置(δ_{C} 127.9)。因此，此新穎化合物 1 被命名為 4,7-二甲氧基-5-(3-甲基丁-3-烯-1-炔基)-6-甲基-1,3-亞甲二氧基苯 (4,7-dimethoxy-5-(3-methylbut-3-en-1-ynyl)-6-methyl-1,3-benzodioxole)。

化合物 2 為白色的非結晶固體，以電噴灑離子化質譜(ESIMS,

m/z 197 $[M+H]^+$)及核磁共振圖譜分析後的分子式為 $C_{10}H_{12}O_4$ 。其 1H 核磁共振圖譜($CDCl_3$ 之 400 MHz)的特徵訊號顯示一個芳香環上甲基的訊號在 δ_H 2.18 (3H, d, $J = 0.6$ Hz), 兩個甲氧基的訊號在 δ_H 3.84 (7- OCH_3 , s)及 3.88 (4- OCH_3 , s), 一個 methylenedioxy 的訊號在 δ_H 5.93 (2H, s), 芳香環上單一個氫的訊號在 δ_H 6.30 (1H, d, $J = 0.6$ Hz)。 ^{13}C 核磁共振圖譜($CDCl_3$ 之 100 MHz)的特徵訊號顯示一個芳香環上甲基的訊號在 δ_C 15.9, 兩個甲氧基的訊號在 δ_C 56.9 及 59.9, 一個 methylenedioxy 的訊號在 δ_C 101.4。根據 NOESY 圖譜的分析數據: δ_H 3.88 (4- OCH_3)/2.18 (5- CH_3)、 δ_H 2.18 (5- CH_3)/6.30 (6-H)及 6.30 (6-H)/3.84 (7- OCH_3), 確定出化合物 2 之各官能基在苯環上的取代位置。藉由 HMBC 的輔助可確認六個芳香環的碳訊號在 δ_C 134.7 (C-1)、138.6 (C-3)、136.5 (C-4)、123.7 (C-5)、108.8 (CH-6)及 138.8 (C-7)。如上所示之結構。

化合物 3 為黃色油膏狀, 以電噴灑離子化質譜(ESIMS, m/z 247 $[M+H]^+$)及核磁共振圖譜分析後的分子式為 $C_{15}H_{18}O_3$ 。其 1H 核磁共振圖譜($CDCl_3$ 之 400 MHz)的特徵訊號為兩個甲基的訊號在 δ_H 2.01 (3'- CH_3 , t, $J = 1.6$ Hz)及 2.36 (3- CH_3 , s), 三個甲氧基的訊號在 δ_H 3.72 (2- OCH_3 , s)、3.86 (1- OCH_3 , s)及 3.88 (5- OCH_3 , s), 兩個末端烯烴亞甲基質子在 δ_H 5.25 及 5.37, 芳香環上單一個氫的訊號在 δ_H 6.33 (1H, s)。 ^{13}C 核磁共振圖譜($CDCl_3$ 之 100 MHz)的特徵訊號顯示一個芳香環上甲基的訊號在 δ_C 14.1 (3- CH_3), 一組 3-甲基丁基-3-烯-1-炔基的訊號在 δ_C 83.5 (C-1')、97.5 (C-2')、127.3 (C-3')、120.7 (CH₂-4')及 23.7 (3'- CH_3), 三個甲氧基的訊號在 δ_C 56.3 (1- OCH_3)、60.4 (2- OCH_3)及 55.8 (5- OCH_3), 六個芳香環的碳訊號在 δ_C 157.2 (C-1)、141.1 (C-2)、135.3 (C-3)、104.8 (C-4)、153.4 (C-5)及 94.4 (CH-6)。藉由 NOESY 以及 HMBC 的輔助可確認此化合物 3 如上

所示之結構。

實驗 5、樟芝子實體正己烷萃取物與其主成分之核磁共振圖譜比較

將正己烷萃取物(FNH)及化合物 1~3 皆溶於 CDCl_3 溶液，比較其 ^1H 核磁共振圖譜。請參閱第 5(a)圖，可觀察到正己烷萃取物之甲氧基的特徵訊號在 δ_{H} 3.7-4.0 之間，methylenedioxy 的特徵訊號在 δ_{H} 5.9-6.0 之間，芳香環上單一個氫的特徵訊號在 δ_{H} 6.2-6.4 之間。請參閱第 5(b)圖至第 5(d)圖，正己烷萃取物所呈現的特徵訊號皆與化合物 1~3 的個別特徵訊號符合。由上述實驗分析不但可再次確定正己烷萃取物為苯類化合物的濃縮層，而化合物 1~3 也是此苯類化合物濃縮層的主成分。

實驗 6、以核磁共振圖譜檢測樟芝子實體苯類化合物之含量

檢測實驗流程如下，首先選擇適當的內部標準品，此標準品須具備高純度及高安定性，且其核磁共振光譜的特徵訊號不被分析樣品中所含之特徵訊號干擾。接著添加一定量的內部標準品於所分析的樣品中，選擇適當的氘代溶劑進行核磁共振光譜分析，計算化合物標的特徵訊號與內部標準品特徵訊號的積分面積比值，帶入絕對含量公式即可求得各化合物的絕對含量。

本發明利用核磁共振圖譜分析法進行正己烷萃取物(FNH)的主成分化合物 1~3 之定量分析。實驗條件如下，取 10.0 mg 的正己烷萃取物，加入 0.132 mg 的內部標準品吡嗪(pyrazine)，同時溶於 0.6 mL 的 CDCl_3 溶液作為進行核磁共振光譜分析之測試溶劑，核磁共振儀為 Varian UNITY plus 400 MHz 光譜儀，掃描次數為 10 次(7 分鐘)，光譜寬度為 6002.4 Hz，強度脈衝寬度為 6.3 μs 。再進一步使用手動選擇各化合物之標的特徵質子吸收訊號的起點及終點求得該波峰積分面積作為此定量分析方法之依據，整個試驗進行三重複並計算其相對標準偏差之數值(RSD %)。

藉由實驗 4 中建立的三主量化合物 ¹H 核磁共振圖譜訊號，選定各別化合物的特徵質子訊號作為標的特徵訊號，分別是化合物 1 中 C-4 位置的甲氧基訊號δ_H 3.98 (3H, s)、化合物 2 中 C-5 位置的甲基訊號δ_H 2.18 (3H, d, J= 0.6 Hz)以及化合物 3 中 C-3 位置的甲基訊號δ_H 2.36 (3H, s)。請參閱第 6(a)圖至第 6(c)圖，以內部標準品特徵訊號(δ_H 8.60)之積分面積為基準，分別求得化合物 1~3 中各標的特徵訊號與內部標準品特徵訊號之積分面積比值，結果請參閱表 2。

表 2、各化合物 ¹H 核磁共振標的特徵訊號與內部標準品特徵訊號之積分面積比值(三重複試驗)

化合物	標的特徵訊號	δ _H (J in Hz)	面積積分比		
			實驗一	實驗二	實驗三
1	4-OCH ₃	3.98 s	0.42	0.41	0.40
2	5-CH ₃	2.18 d (0.6)	3.34	3.50	3.38
3	3-CH ₃	2.36 s	0.90	0.94	0.92

將所得之積分面積比值帶入下列定量公式 1，即可求得化合物 1~3 於樟芝子實體正己烷萃取物中的含量。

$$\left[\frac{(0.22\text{mg}/80)\times B\times A}{H}\right]\times MW$$

(定量公式 1)

其中 80 為內部標準品吡嗪的分子量，A 為化合物 1~3 中各標的特徵訊號與內部標準品特徵訊號之積分面積比值，B 表示內部標準品氫質子的數目(吡嗪的氫質子數目為 4)，H 代表化合物 1~3 中各標的化合物之特徵訊號的氫質子數目(化合物 1 標的特徵訊號為 4-OCH₃，H 為 3；化合物 2 標的特徵訊號為 5-CH₃，H 為 3；化合物 3 標的特徵訊號為 3-CH₃，H 為 3)，MW 為各化合物之分子量(化合物 1 為 260，化合物 2 為 196，化合物 3 為 246)。

由上述檢測方式求得樟芝子實體正己烷萃取物中化合物 1~3 之絕對含量以及實驗的相對標準偏差之數值(RSD %)。請參閱表 3，三重複試驗中的相對標準偏差值在可接受之範圍，由此可得知化合物 1~3 為樟芝子實體正己烷萃取物中之主成分，也為樟芝子實體苯類化合物中之主成分。

表 3、各化合物占樟芝子實體正己烷萃取物中之含量(三重複試驗)

化合物	含量(每 10 mg 樟芝子實體正己烷 萃取物中所含重量)			平均值	相對標準偏差
	實驗一	實驗二	實驗三		
1	0.40 mg	0.39 mg	0.38 mg	0.39 mg	2.6 %
2	2.40 mg	2.51 mg	2.42 mg	2.44 mg	2.4%
3	0.81 mg	0.85 mg	0.83 mg	0.83 mg	2.4%

實驗 7、利用高效能液相層析及質譜儀分析法進行樟芝子實體苯類化合物含量檢測

利用高效能液相層析法進行樟芝子實體正己烷萃取物(FNH)中的主成分相對含量分析，將所獲得的三個主成分化合物 1~3 與樟芝子實體正己烷萃取物進行高效液相層析圖的比對，高效液相層析的條件如下：高效液相層析儀為 Shimadzu LC-10AT；偵測器為 Shimadzu SPD-M10A photodiode array detector；自動取樣器為 Shimadzu SIL-20A prominence auto sampler；高效液相層析管柱為 Cosmosil 5C-18-MS 250 x 4.6 mm；動相中的溶劑 A 為乙腈、溶劑 B 為水；流速為 1 ml/min；管柱溫度為室溫、偵測波長為 254 nm 及 270 nm。溶媒系統條件如下：動相包括溶劑 A 及 B、線性梯度為 0~60 分鐘 30% A~100% A；流速及管柱溫度如上所述。

請參閱第 7(a)圖、第 7(b)圖及表 4，為樟芝子實體正己烷萃取物於 254 nm 波長進行高效液相層析後之各種成分的面積及高度百分比比較。於波長 254 nm、延遲時間為 41.149、24.489 以及 30.006

分鐘，分別代表化合物 1~3 之層析波峰。三種化合物的面積百分比分別是 16.91%、17.30%以及 24.87%，而總計為 59.08%；而高度百分比分別是 15.90%、17.62%以及 24.30%，而總計為 57.82%。由此可得知化合物 1~3 為樟芝子實體正己烷萃取物中之主成分，也為樟芝子實體苯類化合物中之主成分。

表 4、樟芝子實體正己烷萃取物於 254 nm 波長進行高效液相層析後之各種成分的面積及高度比較

產物	延遲時間	面積百分比	高度百分比
化合物1	41.149	16.91	15.90
化合物2	24.489	17.30	17.62
化合物3	36.006	24.87	24.30
其餘		40.92	42.18
總計		100.00	100.00

請參閱第 8(a)圖、第 8(b)圖及表 5，為樟芝子實體正己烷萃取物於 270 nm 波長進行高效液相層析後之各種成分的面積及高度百分比比較。於波長 270 nm、延遲時間為 41.149、24.489 以及 30.006 分鐘，分別代表化合物 1~3 之層析波峰。三種化合物的面積百分比分別是 16.97%、11.50%以及 25.54%，而總計為 54.01%；而高度百分比分別是 19.81%、12.52%以及 27.00%，而總計為 59.33%。由此可得知化合物 1~3 為樟芝子實體正己烷萃取物中之主成分，也為樟芝子實體苯類化合物中之主成分。

表 5、樟芝子實體正己烷萃取物於 270 nm 波長進行高效液相層析後之各種成分的面積及高度比較

產物	延遲時間	面積百分比	高度百分比
化合物1	41.149	16.97	19.81
化合物2	24.489	11.50	12.52
化合物3	36.006	25.54	27.00
其餘		45.99	40.67
總計		100.00	100.00

此外，利用高效能液相層析儀串聯電噴霧離子化法質譜儀(HPLC-ESI-MS)於正離子模式中確認進行樟芝子實體正己烷萃取物(FNH)中的主成分化合物 1~3 標準品之分子量。高效液相層析的條件如下：高效液相層析儀為 Agilent 1100 series；高效液相層析管柱為 Cosmosil 5C-18-MS 250×4.6 mm；動相中的溶劑 A 為乙腈、溶劑 B 為 0.1% formic acid H₂O；流速為 1 ml/min；管柱溫度為室溫、偵測波長為 254 nm 及 270 nm。溶媒系統條件如下：動相包括溶劑 A 及 B、線性梯度為 0~60 分鐘 30% A~100% A；流速及管柱溫度如上所述。質譜儀為 Thermo Finnigan LCQ DECA XP^{plus}。我們得到化合物 1 延遲時間為 38.22 分鐘，主離子峰位於 m/z 261 $[M+H]^+$ ，偵測得化合物 1 分子量為 260；化合物 2 延遲時間為 22.39 分鐘，主離子峰位於 m/z 197 $[M+H]^+$ ，偵測得化合物 2 分子量為 196；化合物 3 延遲時間為 33.13 分鐘，主離子峰位於 m/z 247 $[M+H]^+$ ，偵測得化合物 3 分子量為 246。

由上述核磁共振分析及高效能液相層析串聯質譜儀分析的結果可知，4,7-二甲氧基-5-(3-甲基丁-3-烯-1-炔基)-6-甲基-1,3-亞甲二氧基苯(化合物 1)、4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-亞甲二氧基苯(化合物 2)及 1,2,5-三甲氧基-3-甲基-4-(3-甲基丁-3-烯-1-炔基)苯(化合物 3)為樟芝子實體正己烷萃取物中的主要成分。前述的實驗方法可做為產業上檢測樟芝子實體苯類化合物的利器。

本發明實屬難能的創新發明，深具產業價值，援依法提出申請。此外，本發明可以由本領域技術人員做任何修改，但不脫離如所附申請專利範圍所要保護的範圍。

【圖式簡單說明】

第 1 圖為本發明的樟芝子實體正己烷萃取物的製備方法流程

七、申請專利範圍：

1.一種樟芝子實體正己烷萃取物的分析方法，包括下列步驟：

提供一樟芝子實體；

以一乙醇溶液萃取該樟芝子實體，獲得一樟芝子實體乙醇萃取物；

以一正己烷溶液萃取該樟芝子實體乙醇萃取物，獲得該樟芝子實體正己烷萃取物；以及

以一 ^1H 核磁共振圖譜分析溶於 $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ 或 CDCl_3 之該樟芝子實體正己烷萃取物，

其中該樟芝子實體正己烷萃取物包括至少一苯類化合物。

2.如申請專利範圍第 1 項所述的分析方法，其中該至少一苯類化合物係選自由 4,7-二甲氧基-5-(3-甲基丁-3-烯-1-炔基)-6-甲基-1,3-亞甲二氧基苯 (4,7-dimethoxy-5-(3-methylbut-3-en-1-ynyl)-6-methyl-1,3-benzodioxole)、4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-亞甲二氧基苯 (4,7-dimethoxy-5-methyl-1,3-benzodioxole)、安卓凱因 A (antrocaphine A) 及其組合的群組其中之一。

3.如申請專利範圍第 1 項所述的分析方法，還包括步驟：研磨該樟芝子實體為細粉。

4.如申請專利範圍第 1 項所述的分析方法，其中，當該樟芝子實體正己烷萃取物溶於 $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ 時，該 ^1H 核磁共振圖譜於 δ 6.4 至 6.6 之間具有芳香環上單一個氫的訊號，於 δ 5.8 至 6.1 之間具有 methylenedioxy 訊號，於 δ 5.4 至 5.6 之間具有雙鍵訊號，於 δ 3.7 至 4.1 之間顯示出甲氧基訊號，於 δ 2.1 至 2.6 之間顯示出芳香環上甲基的訊號。

5.如申請專利範圍第 1 項所述的分析方法，其中，當該樟芝子實體正己烷萃取物溶於 CDCl_3 時，該 ^1H 核磁共振圖譜於 δ 6.2 至 6.4

之間具有芳香環上單一個氫的訊號，於 δ 5.8 至 6.0 之間具有 methylenedioxy 訊號，於 δ 5.2 至 5.5 之間具有雙鍵訊號，於 δ 3.6 至 4.1 之間具有甲氧基訊號，於 δ 2.1 至 2.4 之間顯示出芳香環上甲基的訊號。

- 6.一種方法，用以檢測一樟芝子實體中至少一苯類化合物的含量，該方法包括下列步驟：

以一乙醇溶液萃取該樟芝子實體，獲得一樟芝子實體乙醇萃取物；

以一正己烷溶液萃取該樟芝子實體乙醇萃取物，獲得一樟芝子實體正己烷萃取物；

以一 ^1H 核磁共振圖譜儀檢測該樟芝子實體正己烷萃取物中是否具有該至少一苯類化合物；及

當該樟芝子實體正己烷萃取物中具有該至少一苯類化合物時，以一高效液相層析儀檢測該樟芝子實體正己烷萃取物中該苯類化合物的含量。

- 7.如申請專利範圍第 6 項所述的方法，還包括以一 ^1H 核磁共振圖譜分析儀檢測該苯類化合物之一訊號，該訊號係選自由芳香族訊號、雙鍵訊號、甲氧基訊號及甲基訊號及其組合所組成的群組其中之一。

- 8.如申請專利範圍第 7 項所述的方法，在 $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ 溶液條件下，其中該芳香族訊號於 δ 6.4 至 6.6 之間以及 δ 5.8 至 6.1 之間，該雙鍵訊號於 δ 5.4 至 5.6 之間，該甲氧基訊號於 δ 3.7 至 4.1 之間，且該甲基訊號於 δ 2.1 至 2.6 之間。

- 9.如申請專利範圍第 7 項所述的方法，在 CDCl_3 溶液條件下，其中該芳香族訊號於 δ 6.2 至 6.4 之間以及 δ 5.8 至 6.0 之間，該雙鍵訊號於 δ 5.2 至 5.5 之間，該甲氧基訊號於 δ 3.6 至 4.1 之間，且

該甲基訊號於 δ 2.1 至 2.4 之間。

10.如申請專利範圍第 6 項所述的方法，其中該高效液相層析儀包括一偵測器，該偵測器係選自由一全波長偵測器、一單波長偵測器及一電噴霧離子化質譜儀及其組合所組成的群組其中之一。

11.如申請專利範圍第 10 項所述的方法，該單波長偵測器的波長設定為 254 nm 以及 270 nm。

12.一種以 ^1H 核磁共振圖譜偵測含一苯類化合物之一樟芝子實體正己烷萃取物之方法，該 ^1H 核磁共振圖譜以吡嗪為內標準品，該方法包括下列步驟：

檢測該樟芝子實體正己烷萃取物是否具有甲氧基訊號於 δ 3.9 至 4.0 之間；

檢測該樟芝子實體正己烷萃取物是否具有第一甲基訊號於 δ 2.1 至 2.2 之間；以及

檢測該樟芝子實體正己烷萃取物是否具有第二甲基訊號於 δ 2.3 至 2.4 之間。

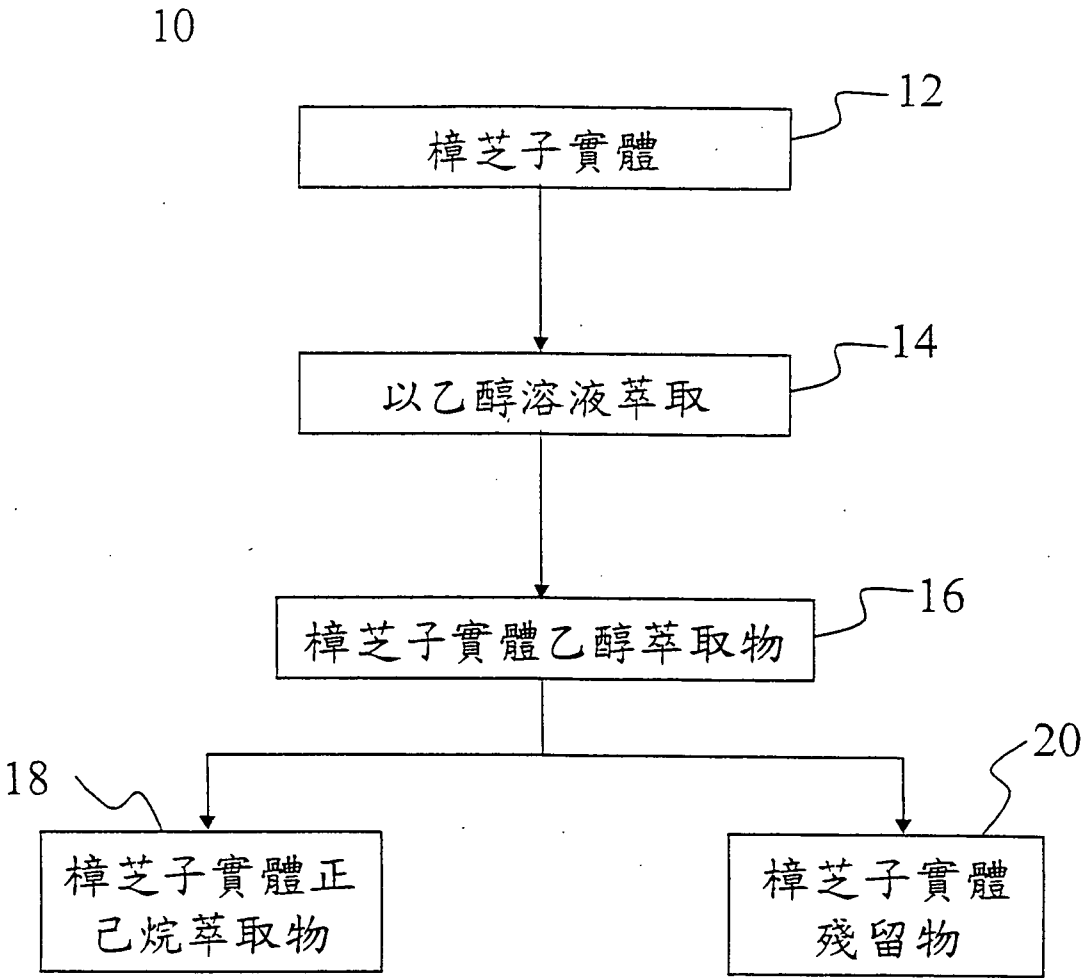
13.如申請專利範圍第 12 項所述的方法，其中出現該甲氧基訊號、該第一甲基訊號及該第二甲基訊號分別表示該樟芝子實體正己烷萃取物具有 4,7-二甲氧基-5-(3-甲基丁-3-烯-1-炔基)-6-甲基-1,3-亞甲二氧基苯、4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-亞甲二氧基苯及安卓凱因 A。

14.如申請專利範圍第 12 項所述的方法，其中當出現該甲氧基訊號時，以該內標準品為基礎計算該甲氧基訊號之第一強度，當出現該第一甲基訊號時，以該內標準品為基礎計算該第一甲基訊號之第二強度，以及當出現該第二甲基訊號時，以該內標準品為基礎計算該第二甲基訊號之第三強度，並且由該第一、該第

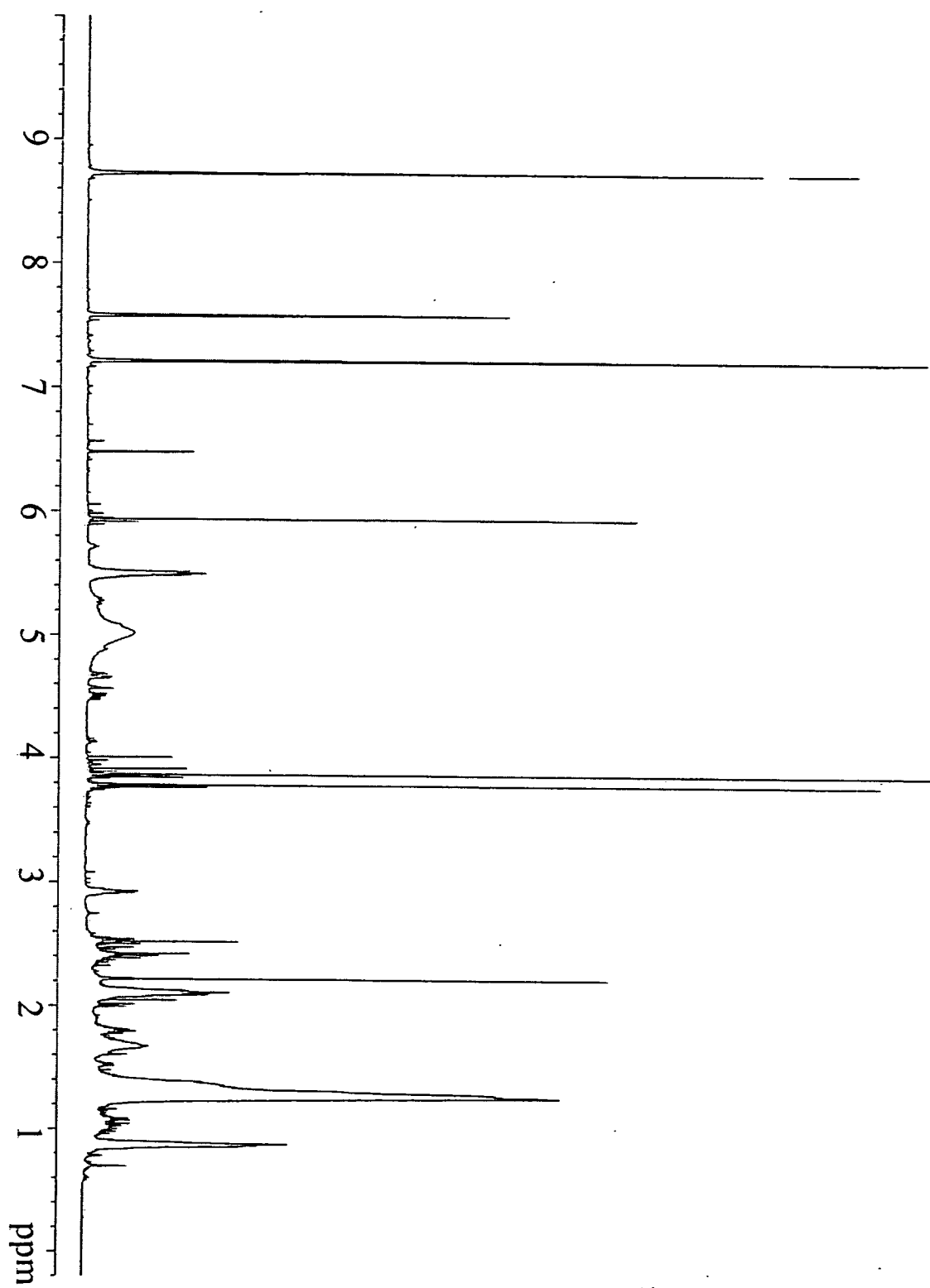
二及該第三強度計算該樟芝子實體正己烷萃取物中該 4,7-二甲氧基-5-(3-甲基丁-3-烯-1-炔基)-6-甲基-1,3-亞甲二氧基苯、該 4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-亞甲二氧基苯及該安卓凱因 A 的含量。

15. 一種檢測方法，係以一高效液相層析儀同時檢測 4,7-二甲氧基-5-(3-甲基丁-3-烯-1-炔基)-6-甲基-1,3-亞甲二氧基苯、4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-亞甲二氧基苯及安卓凱因 A 之含量。

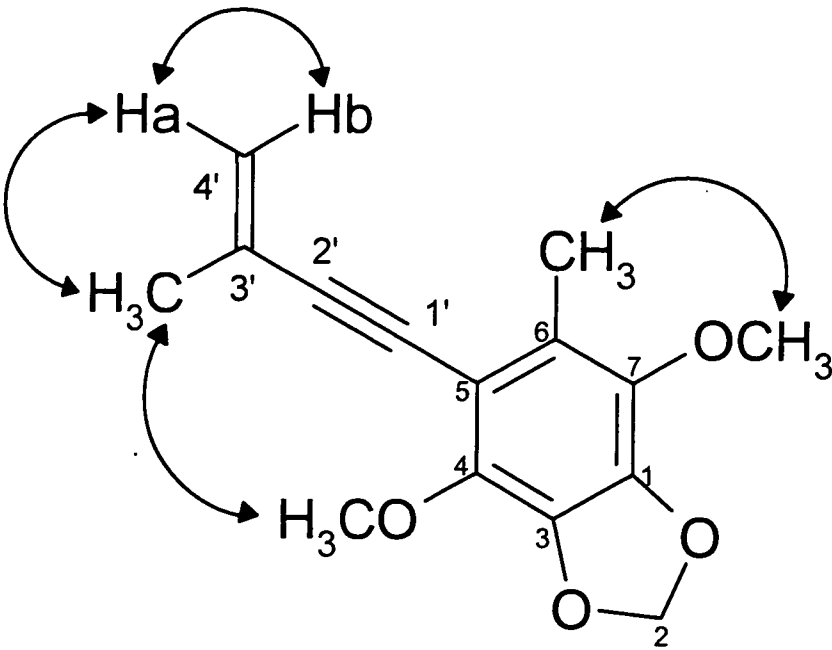
16. 一種檢測方法，係以一 ^1H 核磁共振質譜儀同時檢測 4,7-二甲氧基-5-(3-甲基丁-3-烯-1-炔基)-6-甲基-1,3-亞甲二氧基苯、4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-亞甲二氧基苯及安卓凱因 A 至少其中之一的含量。



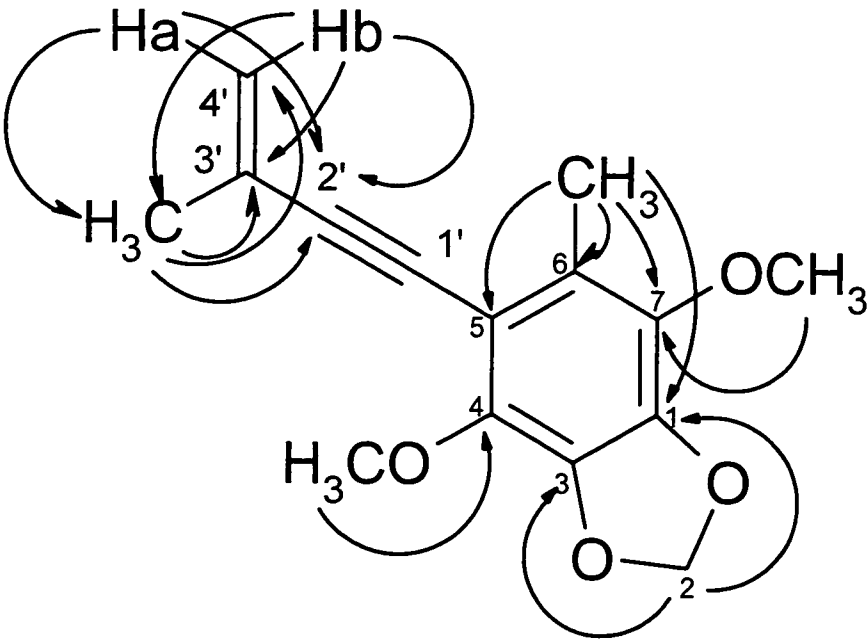
第1圖



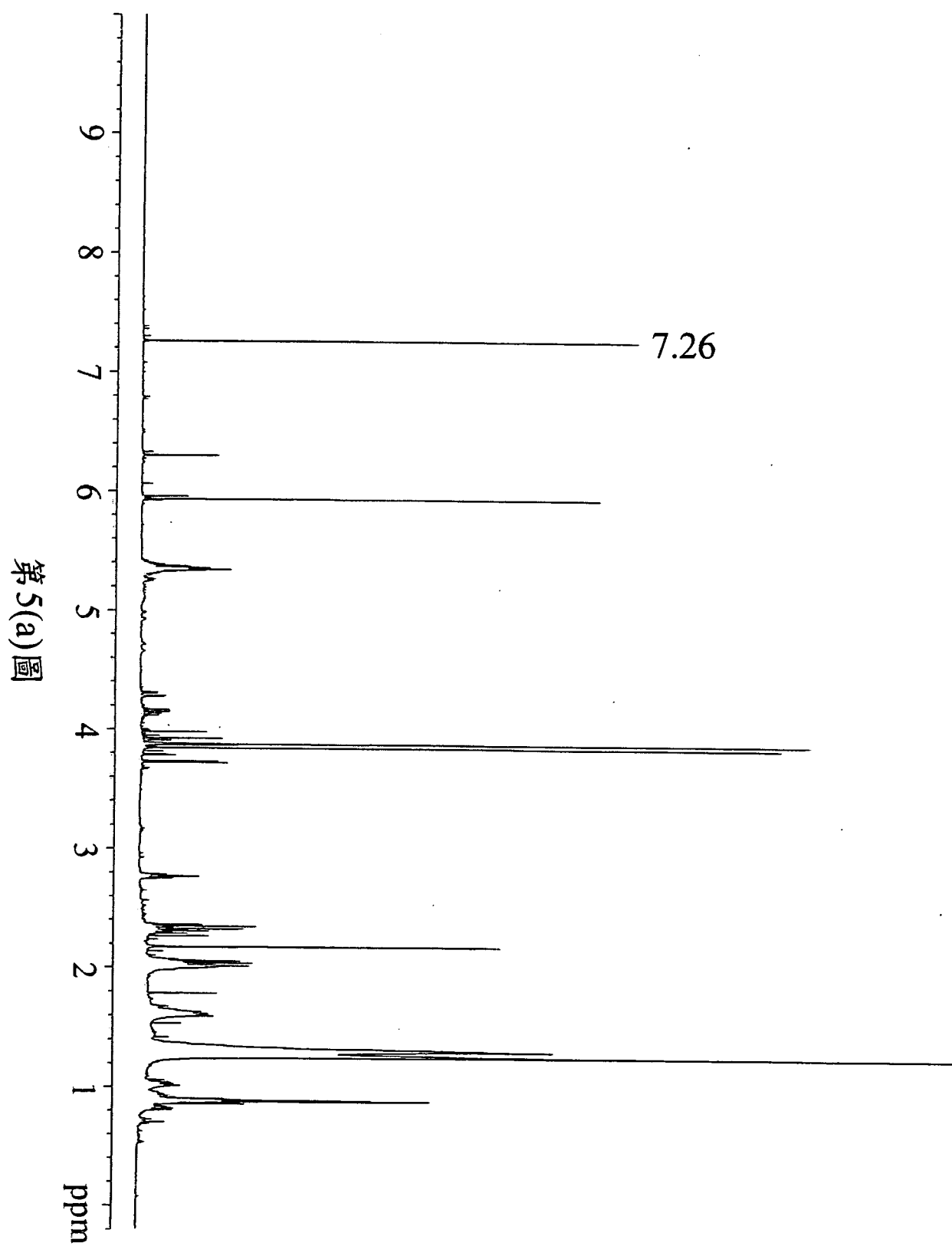
第2圖



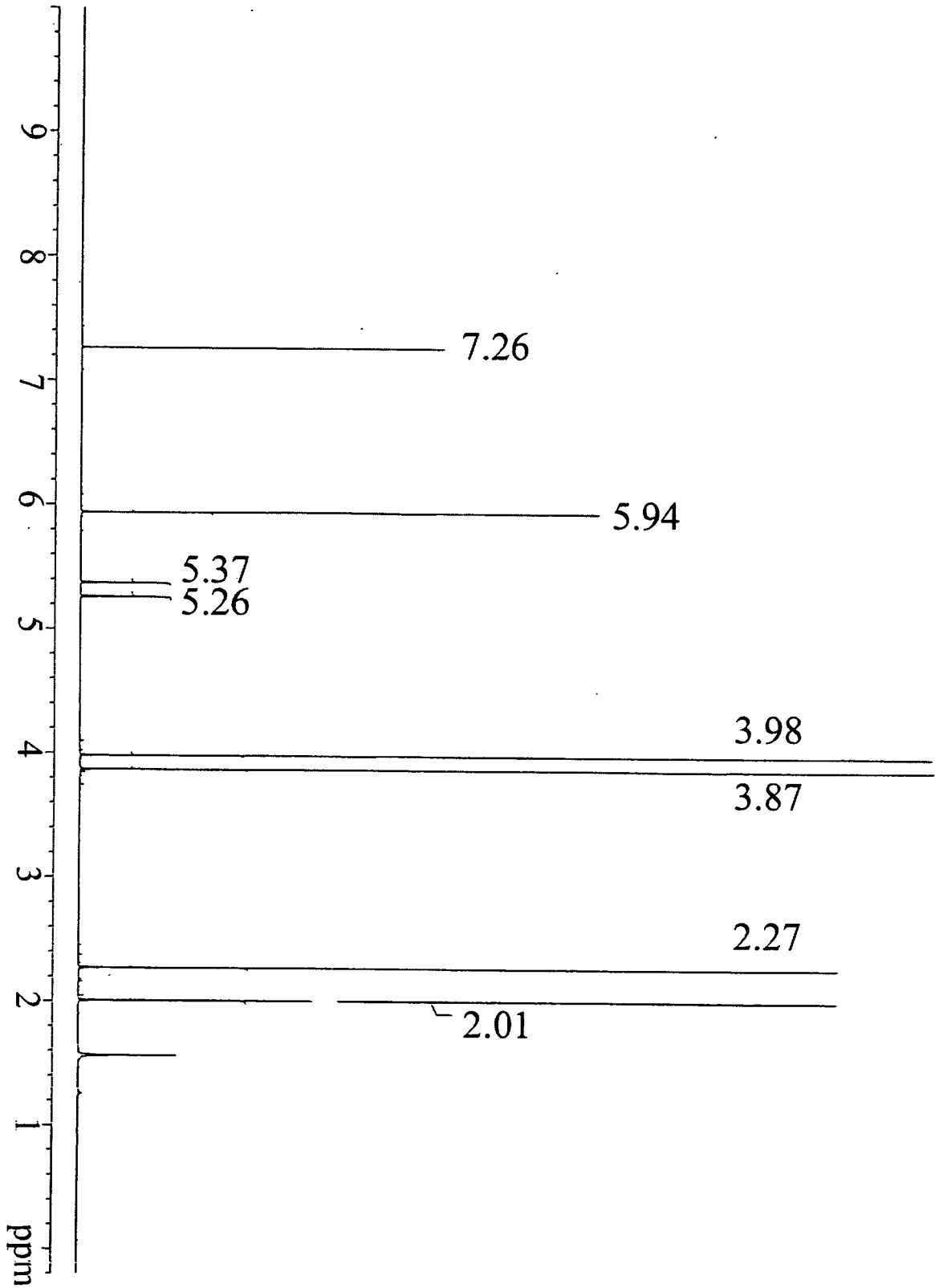
第3圖



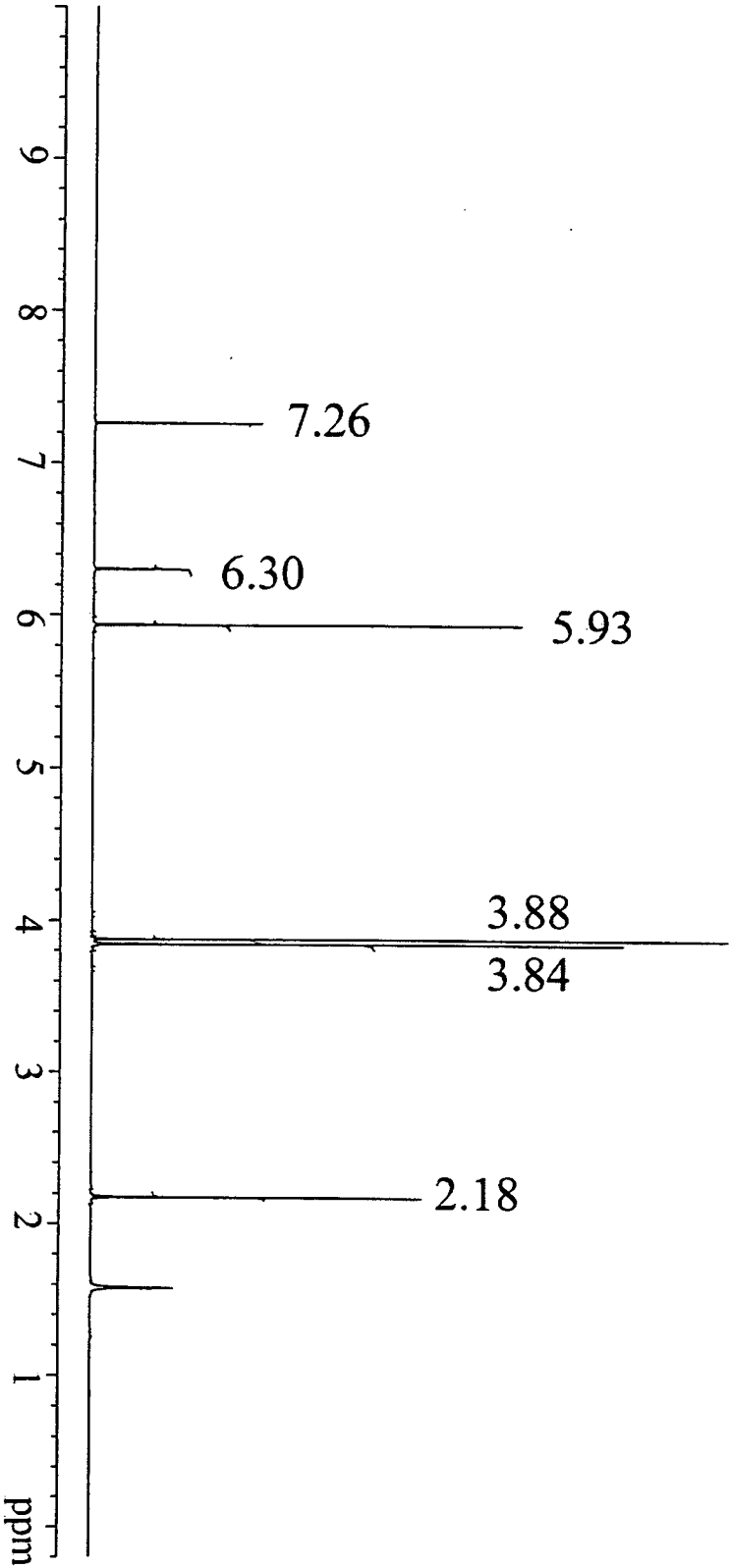
第4圖



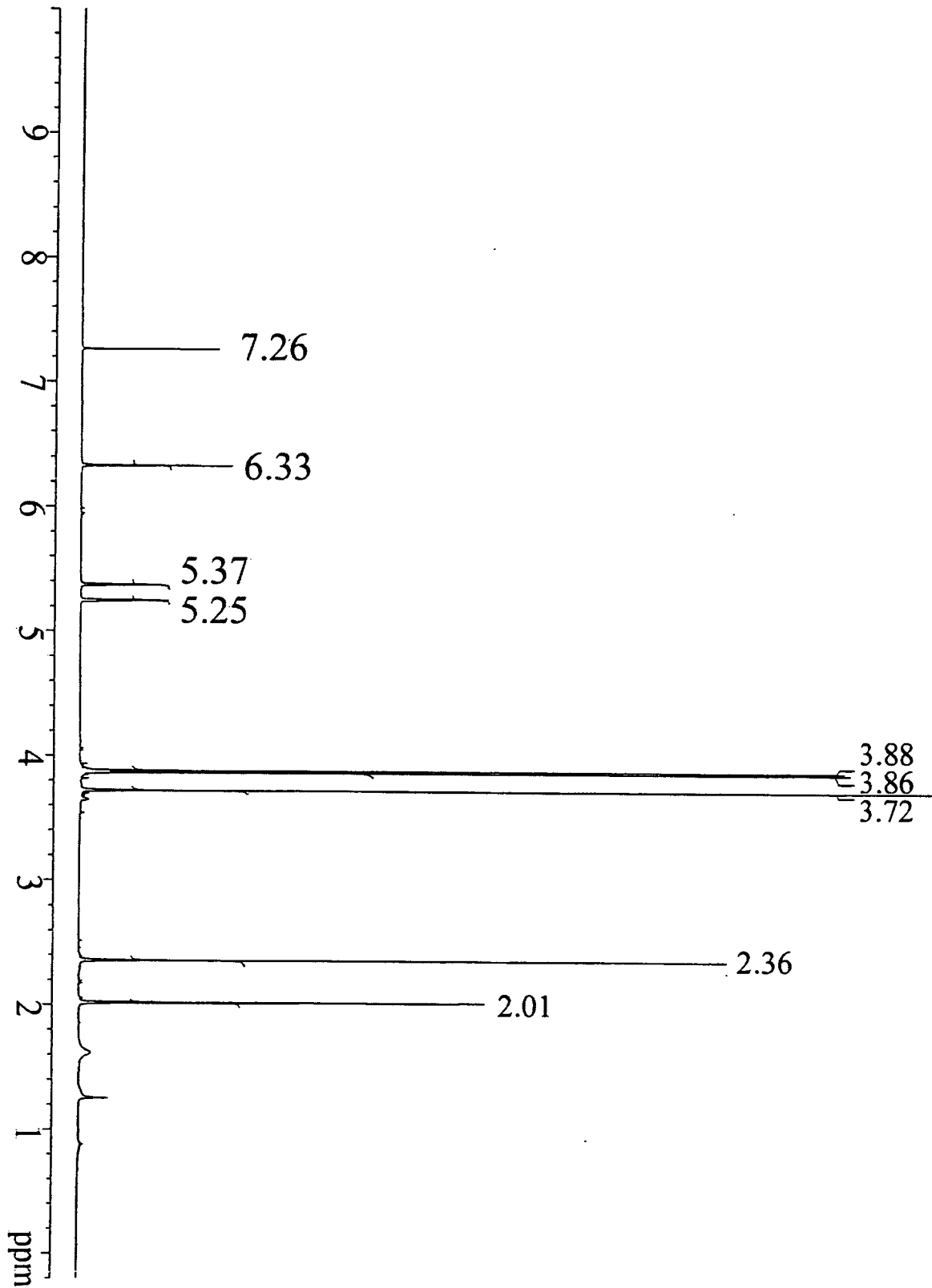
第5(b)圖



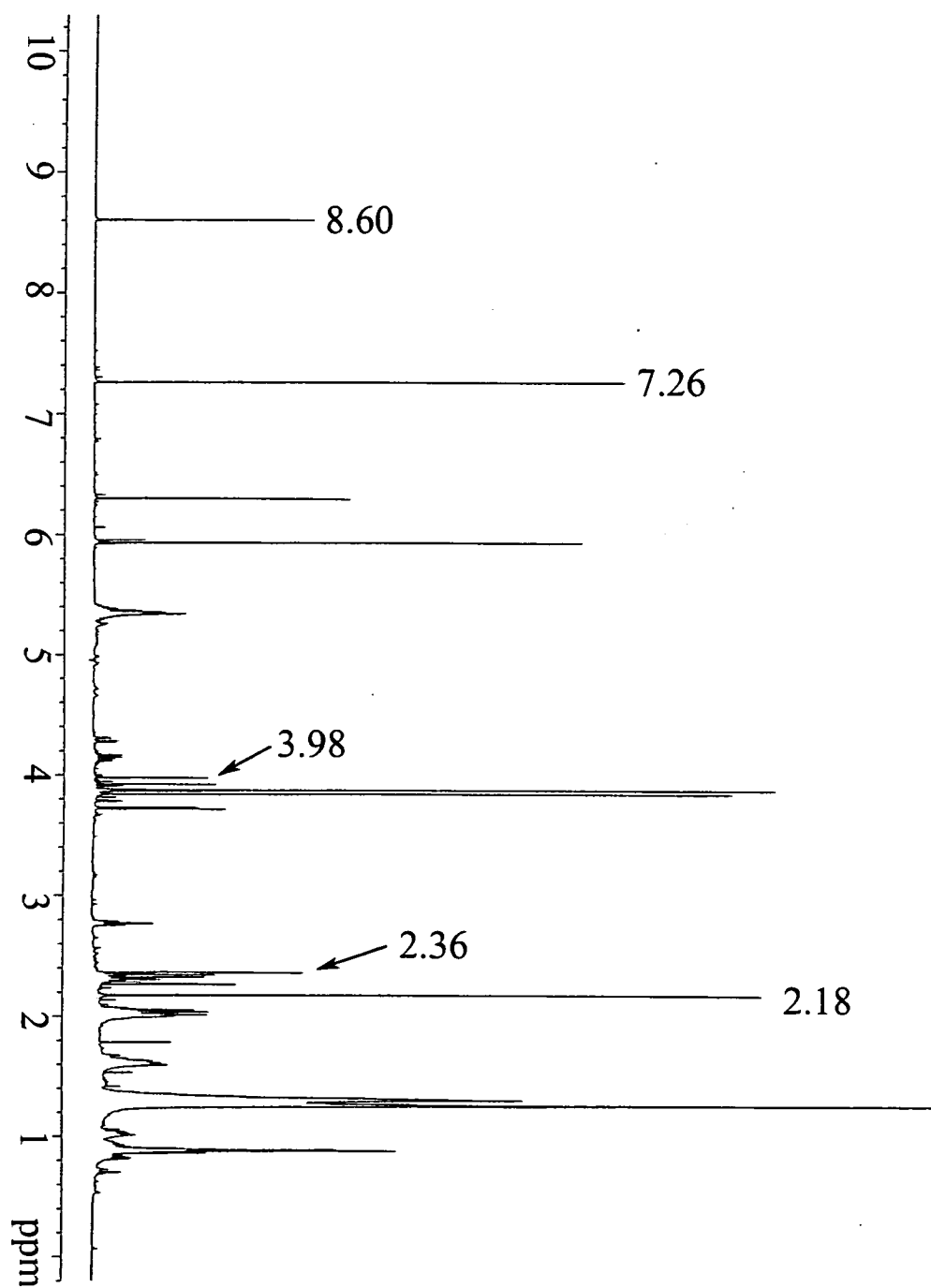
第5(c)圖

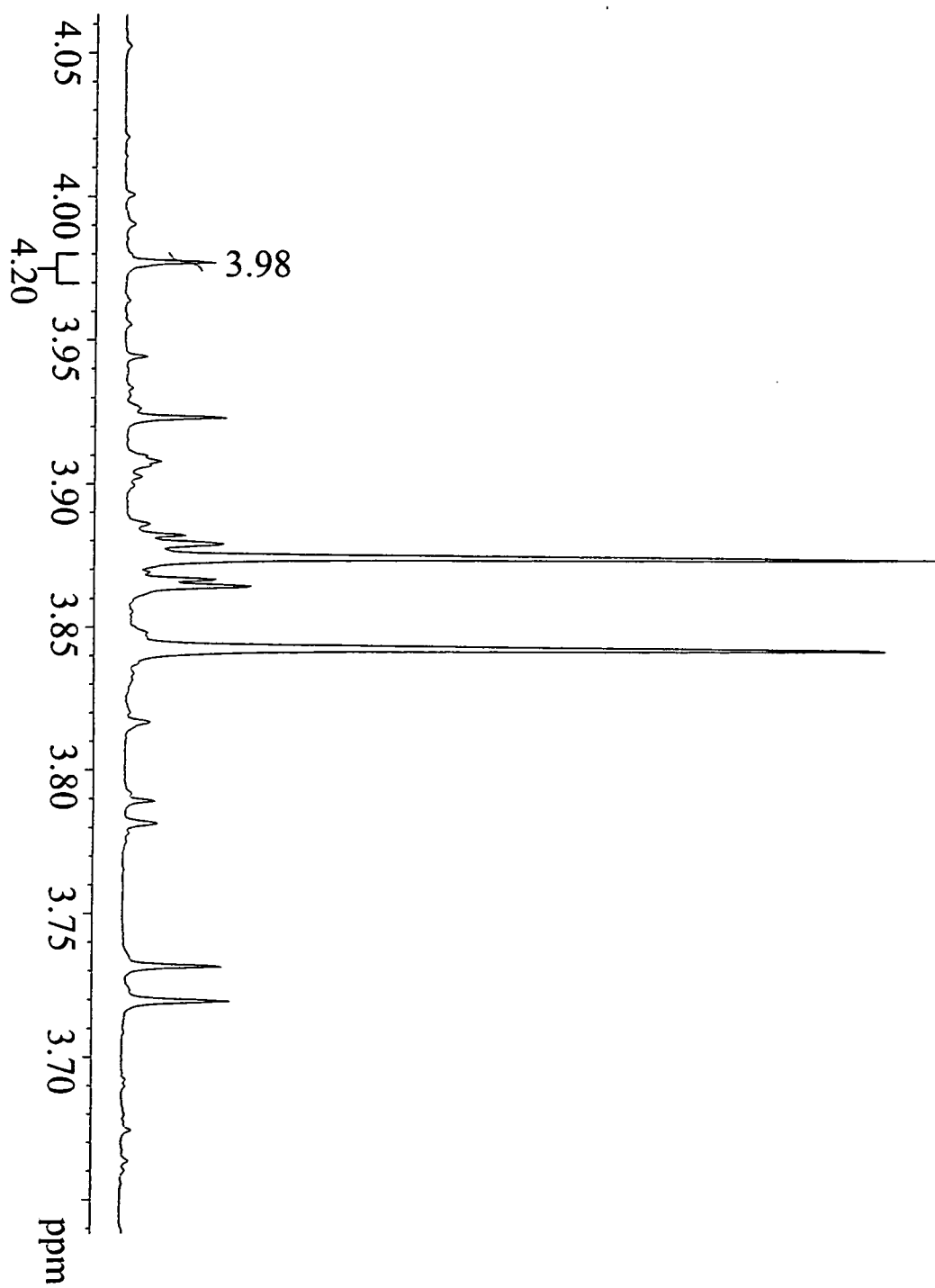


第5(d)圖

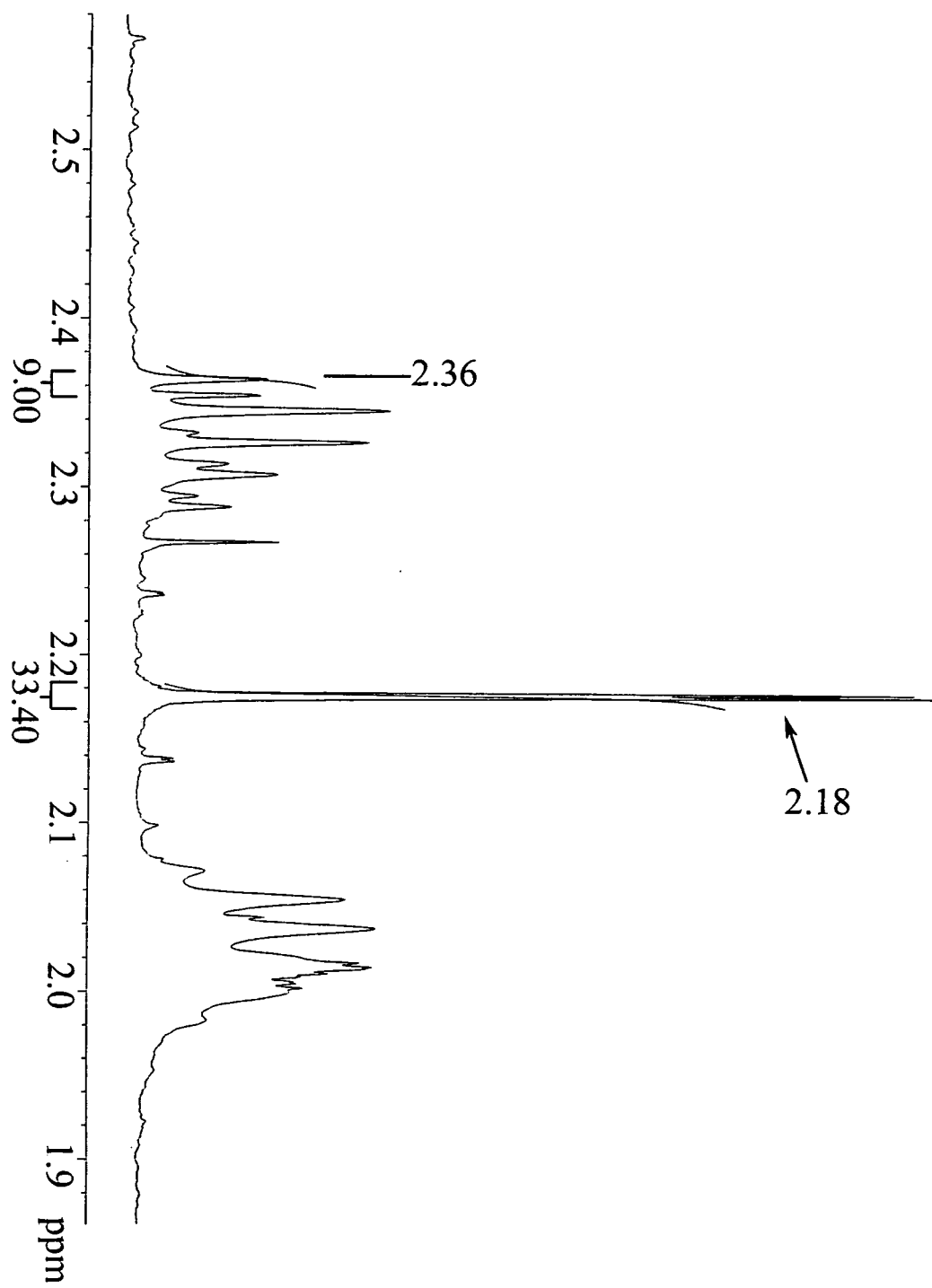


第6(a)圖

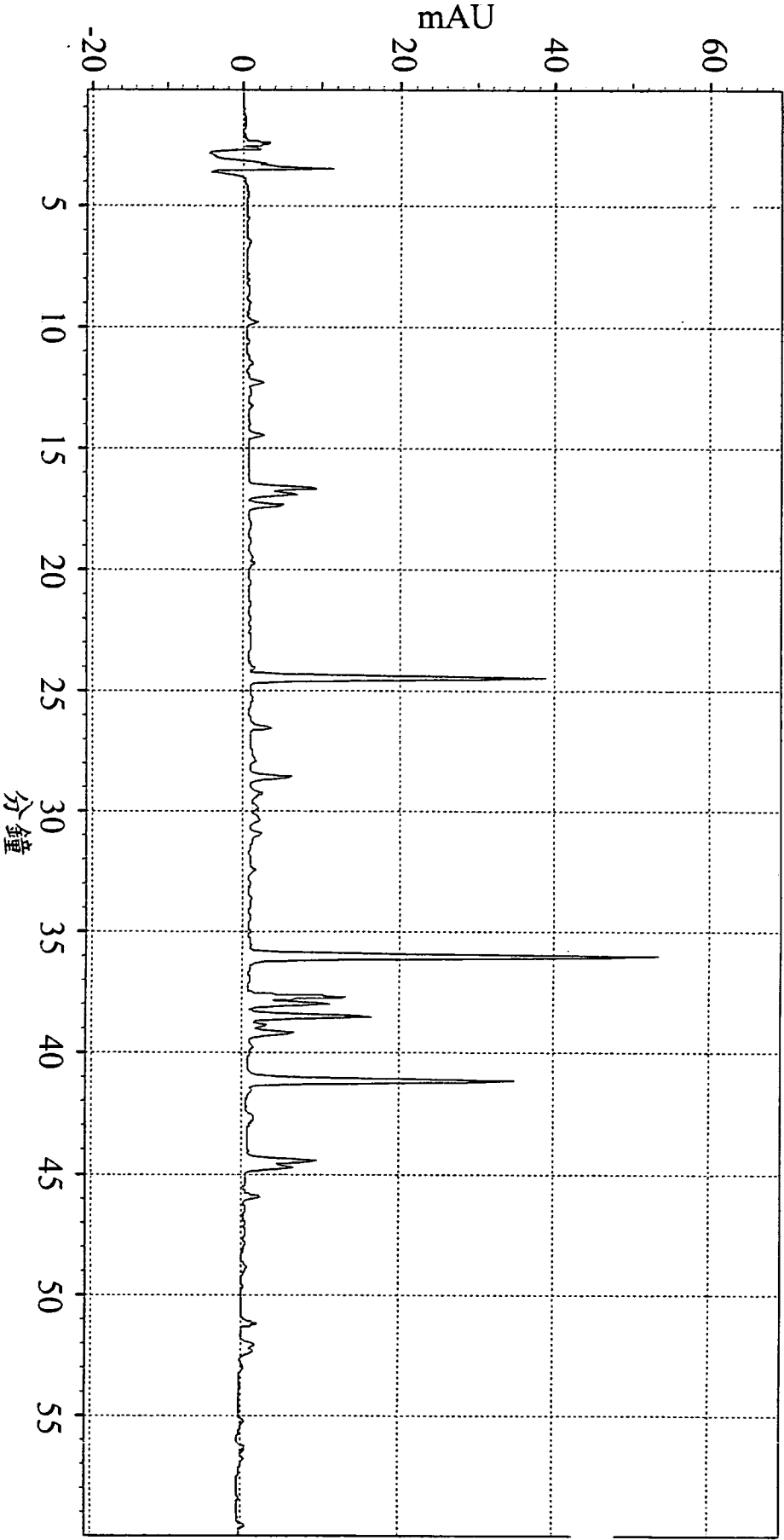




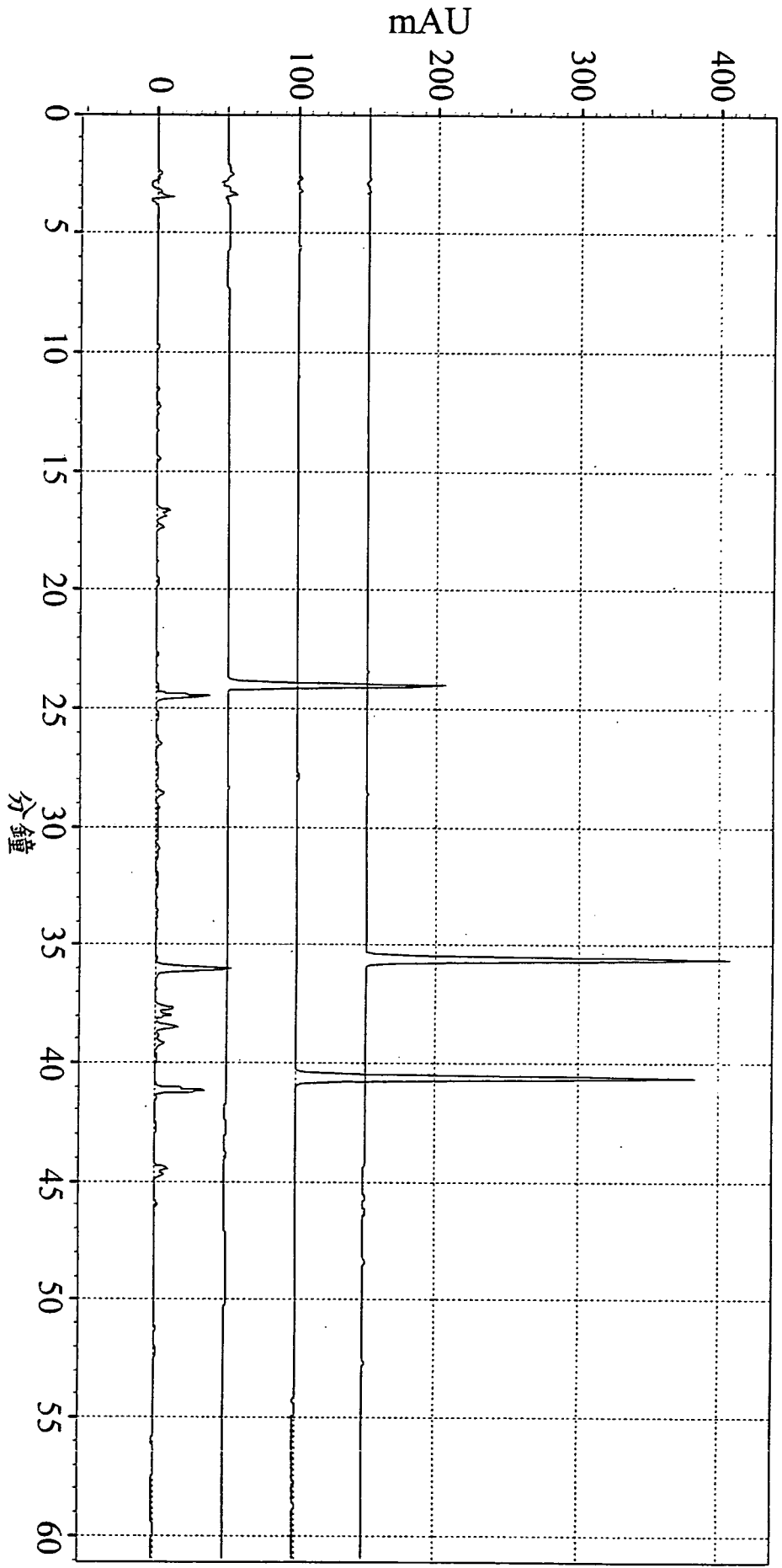
第6(b)圖



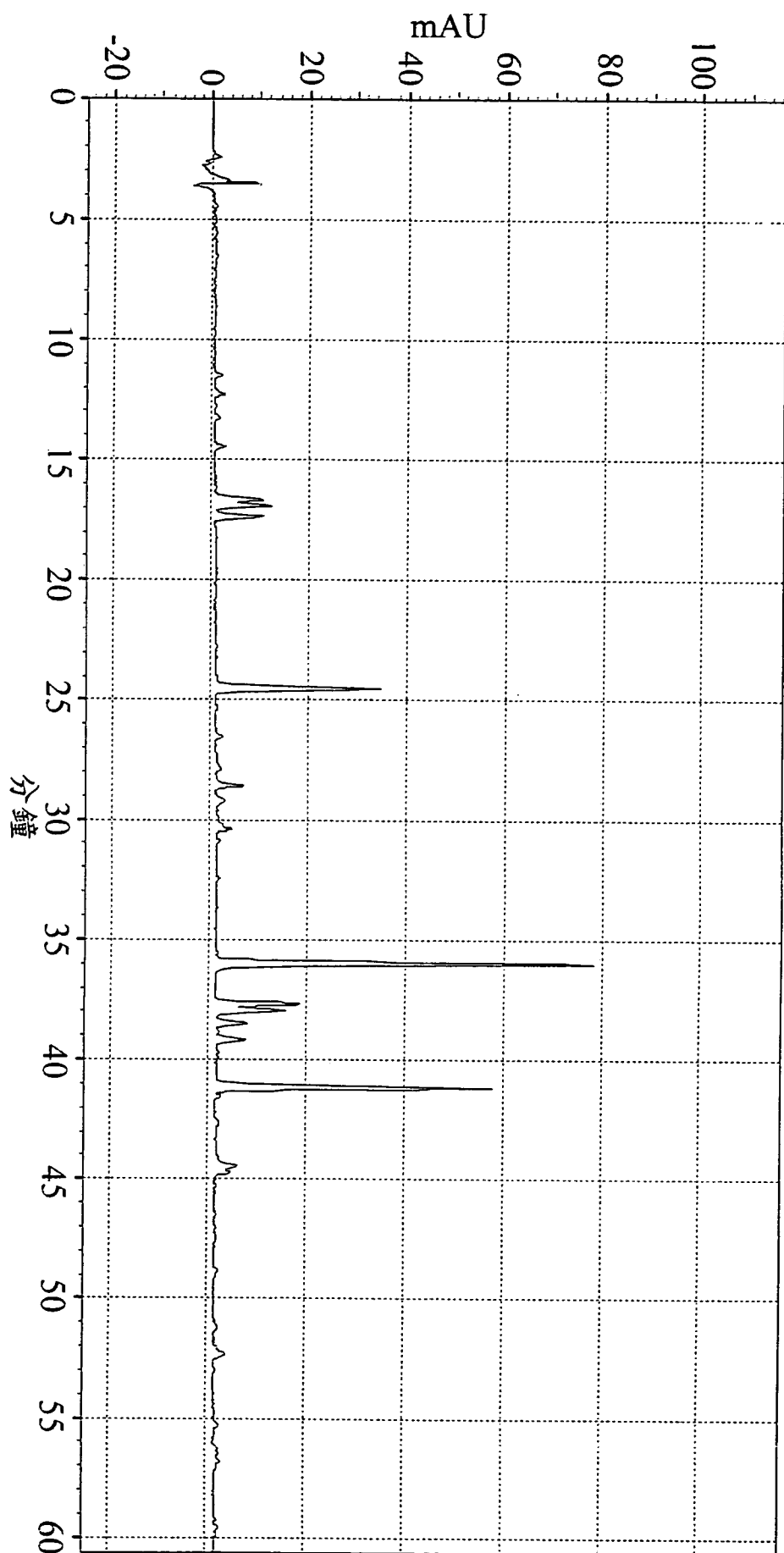
第6(c)圖



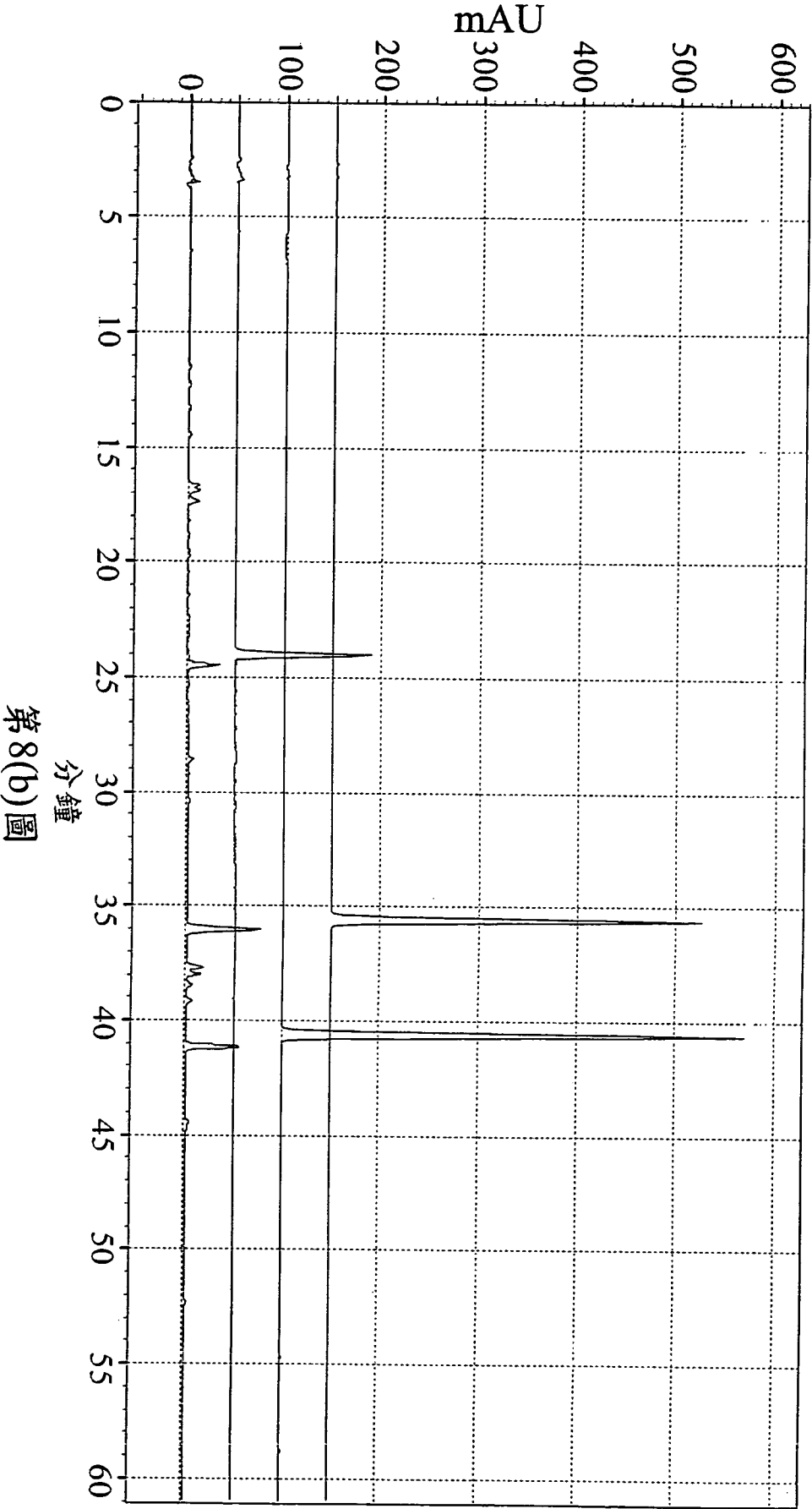
第7(a)圖



第7(b)圖



第8(a)圖



第8(b)圖