

國立交通大學

應用化學研究所

碩士論文

以離心分配層析法製備分離
桑葉中五種有效成分

Preparative Separations of Five Active Compounds
in Mulberry Leaves Using
Centrifugal Partition Chromatography

研究生：陳伶宜

指導教授：余艇 博士

中華民國九十九年六月

以離心分配層析法製備分離
桑葉中五種有效成分

Preparative Separations of Five Active Compounds
in Mulberry Leaves Using
Centrifugal Partition Chromatography

研究生：陳伶宜

Student : Ling-Yi Chen

指導教授：余 艇 博士

Advisor : Dr. Tiing Yu



A Thesis

Submitted to Institute of Applied Chemistry
National Chiao Tung University
in Partial Fulfillment of the Requirement
for the Degree of
Master of Science
In
Applied Chemistry
June 2010
Hsinchu, Taiwan, Republic of China.

中華民國九十九年六月

以離心分配層析法製備分離

桑葉中五種有效成分

學生：陳伶宜

指導教授：余 艇

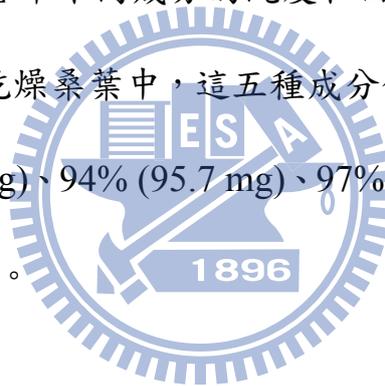
國立交通大學應用化學所

摘要

桑葉中的有效成分具有降低血液中總膽固醇濃度的效能，因而有助於預防動脈硬化病變。本研究是利用離心分配層析(centrifugal partition chromatography, CPC)來製備分離桑葉中的Chlorogenic acid、Isoquercitrin、Astragalin、Quercetin 3-(6-malonylglucoside)和Kaempferol 3-(6-malonylglucoside)五種成分。

離心分配層析是一種無固體靜相支持物的液相-液相層析技術，不會有固體吸附、靜相阻塞的問題，此外離心分配層析的分離管柱中比起典型的填充管柱可擁有更大量的靜相。根據上述兩種特性，因此離心分配層析很適合應用在生物分子及天然物等複雜物質的分離。桑葉經由 60% (v/v)的乙醇萃取後所獲得的五種有效成分先經由電噴灑質譜進行初步鑑定，然後再使用乙酸乙酯和去離子水做批式萃取。本

實驗中使用兩組離心分配層析的溶劑系統，分別是(methyl t-butyl ether (MTBE)/acetone/H₂O = 6 : 4 : 10) 和 (MTBE/acetone/ H₂O = 6 : 4 : 10)額外加入溶劑系統總體積 0.6% (v/v)的 formic acid，都是以上層有機相當作靜相，下層水相當作動相。在 900 rpm 轉速下，靜相滯留於總體積 220 mL 管柱中的量為 187 mL，靜相滯留率為 85%。前處理後的樣品經由離心分配層析製備分離，並使用紫外光-可見光譜儀線上偵測系統，其沖提液以分管收集器每 3 mL 收集一管，以高效能液相層析分析各收集管中不同成分的純度和回收率，並以核磁共振做結構定。在 20.0 g 的乾燥桑葉中，這五種成分依序分別得到的純度和回收量為 98% (59.2 mg)、94% (95.7 mg)、97% (56.7 mg)、93.5% (28.0 mg)、92.5% (23.0 mg)。



Preparative Separations of Five Active Compounds in Mulberry Leaves Using Centrifugal Partition Chromatography

Student : Ling-Yi Chen

Advisor : Tiing Yu

Institute of Applied Chemistry
National Chiao Tung University

Abstract



Active components in mulberry leaves are found effective in reducing the total cholesterol concentration in human blood, thus are able to help prevent atherosclerotic lesion. Preparative separations of five active compounds, including Chlorogenic acid, Isoquercitrin, Astragalin, Quercetin 3-(6-malonylglucoside) and Kaempferol 3-(6-malonylglucoside) in mulberry leaves, were carried out using centrifugal partition chromatography (CPC) in this study.

CPC is a technique of liquid-liquid chromatography which needs no solid-state support for the stationary phase. Accordingly, permanent

adsorption of analytic molecules can be avoided during elution. In addition, the stationary phase volume in the separation column can be very large compared with the packed column. These two properties make the technique very suitable for preparative separations of biomolecules and natural products. These five components in the crude extract by 60% (v/v) ethanol were first identified using ESI-MS. After pre-extractions using ethyl acetate and water, we used two solvent systems, i.e. methyl t-butyl ether (MTBE) / acetone / H₂O = 6:4:10 and MTBE / acetone / H₂O = 6:4:10 added with 0.6% (v/v) formic acid, to separate sample extracts. The descending elution mode was applied, i.e. the lower aqueous layer was used as the mobile phase, and the upper organic layer as the stationary phase. Under 900 rpm, the volume of the stationary phase retained was 187 mL in the separation cells of a total volume 220 mL. The CPC effluent monitored using an on-line UV/Vis detector was fraction-collected every 3 mL, and the fractions were further analyzed using HPLC and NMR. The purities and recoveries were 98% (59.2 mg) , 94% (95.7 mg) , 97% (56.7 mg) , 93.5% (28.0 mg) , 92.5% (23.0 mg), for Chlorogenic acid, Isoquercitrin, Astragalin, Quercetin 3-(6-malonylglucoside) and Kaempferol

3-(6-malonylglucoside), respectively, obtained from a 20-g dry mulberry leaf sample.



謝誌

我們三個終於…畢業了！兩年的碩士班生涯即將在此告一段落，一切一切的點點滴滴、歡笑與淚水，都將深深烙印在我記憶深處，令我今生難以忘懷呀！

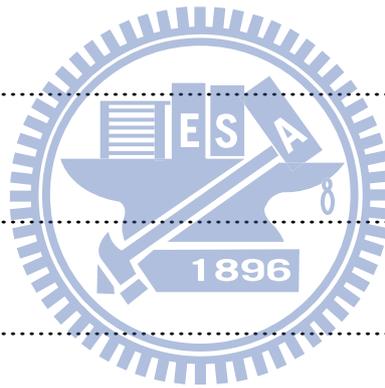
首先誠摯的感謝恩師余艇，給予我研究與實驗方面莫大的指導，使我獲益匪淺；感謝王念夏老師、黃賢達老師百忙之中抽空前來參加我的口試，並感謝所有口試委員提醒我論文應該注意的細節。

謝謝淑慧學姐，成為我們最後的精神支柱，且總會教導我做人處事的道理，在我迷惘時為我解惑，希望學姐未來在工作上能一切順利。也謝謝經緯學長不厭其煩的指導我，在實驗上給予我很大的幫助，並帶給我積極努力的觀念，希望幸運帶到女兵的學長當兵順利。接著謝謝大膽國~育國告訴我們許多社會新鮮事和小道消息，也謝謝典祐帶我探索 BG 世界，我們三個又可向前邁進囉！感謝琬茹學姐和印從學長為實驗室帶來歡樂的氣分，並謝謝宜儒、士峯以及詩軒幫我張羅口相關的東西，也希望你們的實驗順順利利，加油！

最後要謝謝我的家人，因為有你們的支持與關心，使我可以無後顧之憂的順利完成學業，盼著盼著這個日子，我終於畢業了！

總目錄

中文摘要.....	i
英文摘要.....	iii
謝誌.....	vi
總目錄.....	vii
圖目錄.....	xi
表目錄.....	xiv
第一章 緒論.....	1
1.1 前言.....	1
1.2 研究動機.....	2
第二章 研究背景與文獻回顧.....	3
2.1 桑葉的介紹.....	3
2.1.1 桑葉的成分.....	3
2.1.2 桑葉成分的功效.....	3
2.1.3 中草藥萃取物的類別.....	5
2.2 逆流層析技術.....	7

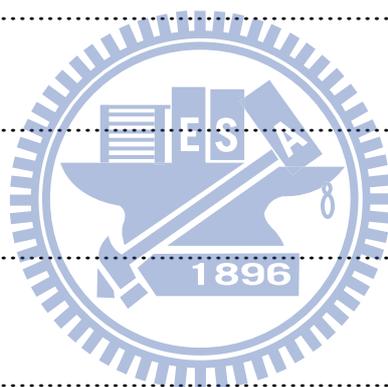


2.2.1 簡介	7
2.2.2 逆流層析的分離理論	7
2.2.3 逆流層析的儀器系統	10
2.2.4 逆流層析的優點	13
2.3 離心分配層析	14
2.3.1 原理	14
2.3.2 動相與靜相的流動模式	17
2.3.3 溶劑系統的選擇	18
2.3.4 影響靜相滯留量的因素	18
2.3.5 離心分配層析儀的應用	19
第三章 實驗	20
3.1 實驗藥品	20
3.2 實驗儀器	22
3.3 實驗流程	24
3.3.1 桑葉的前處理流程	24
3.3.2 偵測桑葉成分在分配系統中的分佈	28
3.3.3 配製不同的溶劑系統	28
3.3.4 純度的計算	30



3.3.5 回收率的計算.....	30
3.3.6 CPC 製備實驗步驟.....	31
3.3.5 HPLC 分析收集液實驗步驟.....	32
第四章 結果與討論.....	34
4.1 以 HPLC 分析桑葉 2 號萃取出的黏稠物.....	34
4.2 以質譜鑑定桑葉成分的結構.....	35
4.2.1 以質譜鑑定 Chlorogenic acid 結構.....	35
4.2.2 以質譜鑑定 Isoquercitrin 結構.....	37
4.2.3 以質譜鑑定 Astragaln 結構.....	38
4.2.4 以質譜鑑定 Quercetin 3-(6-malonylglucoside)結構.....	38
4.2.5 以質譜鑑定 Kaempferol 3-(6-malonylglucoside)結構.....	40
4.3 以 HPLC 分析初步批式萃取後的桑葉樣品.....	43
4.3.1 批式萃取後的 sample 1.....	43
4.3.2 批式萃取後的 sample 2.....	44
4.4 以 HPLC 分析標準品.....	45
4.5 以離心分配層析儀分離桑葉成分的實驗結果.....	46
4.5.1 sample 1 分離結果.....	49
4.5.2 sample 2 分離結果.....	52

4.6 以 NMR 鑑定桑葉成分的結構.....	56
4.6.1 以 NMR 鑑定 Chlorogenic acid 結構	57
4.6.2 以 NMR 鑑定 Isoquercitrin 結構	59
4.6.3 以 NMR 鑑定 Astragalin 結構.....	61
4.6.4 以 NMR 鑑定 Quercetin 3-(6-malonylglucoside)結構	63
4.6.5 以 NMR 鑑定 Kaempferol 3-(6-malonylglucoside)結構	66
4.6.6 探討 ^1H NMR 圖譜中-OH 官能基上氫訊號消失的原因 ..	68
4.7 純度的探討	68
4.8 回收率的探討	69
第五章 結論.....	71
參考文獻.....	73

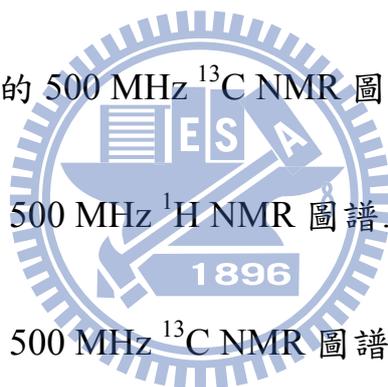


圖目錄

圖 2-1、桑葉中五種成分的結構圖	6
圖 2-2、液相-液相層析方法	9
圖 2-3、流體靜態平衡系統(HSES)示意圖	11
圖 2-4、流體動態平衡系統(HDES)示意圖	13
圖 2-5、CPC 儀器示意圖	16
圖 2-6、CPC 的兩種流動模式	17
圖 3-1、Rutin 的結構	20
圖 3-2、桑葉前處理的流程	26
圖 3-3、三次批式萃取示意圖	27
圖 3-4、CPC 實驗儀器裝置	32
圖 3-5、HPLC 實驗儀器裝置	33
圖 4-1、HPLC 分析桑葉萃取物的層析圖	34
圖 4-2、Chlorogenic acid 測 ESI-MS 負電荷質譜圖	36

圖 4-3、Chlorogenic acid 標準品測 ESI-MS 負電荷質譜圖	36
圖 4-4、Isoquercitrin 測 ESI-MS 負電荷質譜圖	37
圖 4-5、Astragalin 測 ESI-MS 負電荷質譜圖	38
圖 4-6、Quercetin 3-(6-malonylglucoside)測 ESI-MS 負電荷質譜圖 ..	39
圖 4-7、Quercetin 3-(6-malonylglucoside)成分中碎片訊號 548.9 m/z 測 MS-MS 質譜圖	40
圖 4-8、Kaempferol 3-(6-malonylglucoside)測 ESI-MS 負電荷質譜圖	41
圖 4-9、Kaempferol 3-(6-malonylglucoside)成分中碎片訊號測 MS-MS 質譜圖	42
圖 4-10、HPLC 分析 sample 1 的層析圖	43
圖 4-11、HPLC 分析 sample 2 的層析圖	44
圖 4-12、HPLC 分析桑葉 2 號萃取物和 Chlorogenic acid 標準品層析 圖	45
圖 4-13、HPLC 分析桑葉萃取物和 Rutin 標準品的層析圖	46
圖 4-14、CPC 分離 sample 1 的層析圖	51

圖 4-15、HPLC 分析波峰 II 和波峰 III 的層析圖	51
圖 4-16、CPC 分離 sample 2 的層析圖	54
圖 4-17、HPLC 分析波峰 B、波峰 C 和波峰 D 的層析圖	55
圖 4-18、Chlorogenic acid 的 500 MHz ^1H NMR 圖譜	58
圖 4-19、Chlorogenic acid 的 500 MHz ^{13}C NMR 圖譜	58
圖 4-20、Isoquercitrin 的 500 MHz ^1H NMR 圖譜	60
圖 4-21、Isoquercitrin 的 500 MHz ^{13}C NMR 圖譜	60
圖 4-22、Astragalin 的 500 MHz ^1H NMR 圖譜	62
圖 4-23、Astragalin 的 500 MHz ^{13}C NMR 圖譜	62
圖 4-24、Quercetin 3-(6-malonylglucoside) 的 500 MHz ^1H NMR 圖譜	64
圖 4-25、Quercetin 3-(6-malonylglucoside) 的 500 MHz ^{13}C NMR 圖譜	65
圖 4-26、Kaempferol 3-(6-malonylglucoside) 的 500 MHz ^1H NMR 圖譜	67
圖 4-27、Kaempferol 3-(6-malonylglucoside) 的 500 MHz ^{13}C NMR 圖譜	67



表目錄

表 3-1 EA/BuOH/H ₂ O 三項溶劑系統，測試不同組成比例.....	29
表 3-2 MTBE/Acetone/H ₂ O 三項溶劑系統，測試不同組成比例.....	29
表 4-1、EA/BuOH/H ₂ O 三項溶劑系統，測試在不同組成比例中，桑葉 中五種目標物的分配係數值(K_D).....	47
表 4-2、MTBE/Acetone/H ₂ O 三項溶劑系統，測試在不同組成比例中， Isoquercitrin、Astragalın 的分配係數值(K_D).....	48
表 4-3、MTBE/Acetone/H ₂ O 三項溶劑系統加甲酸，測試在不同組成 比例中，Chlorogenic acid、Quercetin 3-(6-malonylglucoside)、 Kaempferol 3-(6-malonylglucoside)的分配係數值(K_D).....	48
表 4-4、CPC 分離 sample 1 的實驗參數.....	49
表 4-5、Isoquercitrin 和 Astragalın 兩種成分在溶劑系統(MTBE / Acetone / H ₂ O = 6 : 4 : 10)的分配係數值.....	50
表 4-6、CPC 分離 sample 2 的實驗參數.....	52
表 4-7、Chlorogenic acid、Quercetin 3-(6-malonylglucoside)和 Kaempferol 3-(6-malonylglucoside)三種成分在溶劑系統(MTBE /	

Acetone / H₂O = 6 : 4 : 10)加 0.6% (v/v) formic acid 的分配係數值 ..53

表 4-8、利用 CPC 製備分離、純化桑葉中五種成分之純度69

表 4-9、利用 CPC 製備分離、純化 sample 1 之回收率70

表 4-10、利用 CPC 製備分離、純化 sample 2 之回收率70



第一章 緒論

1.1 前言

中草藥存在的歷史相當悠久。尤其在中國、埃及和印度等皆有幾千年的醫療貢獻，但在西醫西藥崛起後，因為證實醫學更可以針對病症用藥，所以中草藥有漸漸式微的趨勢，但近年來可能因為有下列的因素促成中草藥的再復甦：

(1) 西藥因為常有副作用，因此許多人常以傳統的療法做輔助治療，增加醫治機會，因而促使中草藥之興起。

(2) 中草藥產品開發的相關法規已相當完善，如國內衛生署亦已公告，“中藥新藥查驗登記需知”，“中藥藥品臨床實驗申請作業相關規定”等，因此使中草藥產品開發環境較完善，所以產業較積極投入。

中草藥的應用方式隨著社會不斷進步而逐漸地發展，最初是直接服用或塗敷草藥，後來發明湯劑，出現了中藥丸、中藥飲片，進而形成了中藥方面的產業鏈。隨著現代中藥產業的進一步發展，中藥萃取物已成為一種新型的中藥原料從中藥產業鏈中嶄露出來。由於世界各國對草藥日益重視，因此草藥已逐漸使用於藥品、食品、化妝品、保健用品、飲食補充劑等領域。

離心分配層析(centrifugal partition chromatography, CPC) 是一種不使用固體支撐靜相(support-free liquid stationary phase)的液相-液相

分離技術，由於 CPC 是使用中空的管柱，內部的靜相佔總管柱體積的比例往往可達 60%以上，因為 CPC 的管柱中含有大量的靜相，所以 CPC 比起典型的高效能液相層析 (high performance liquid chromatography, HPLC) 更適合用來分離大量的樣品。因此 CPC 目前被定位在製備型的層析儀器，可應用在中草藥的分離，能製備大量的中草藥標準品，對於醫學研究、藥物開發、以及科學中藥的法令制定有相當大的幫助。

1.2 研究動機

在本研究中，我們利用離心分配層析儀的技術，搭配有機-水相溶劑系統，並找出最合適的 CPC 溶劑系統，使桑葉樣品具有理想的分佈，以期達到製備分離、純化桑葉中五種具有療效的成分，包括 Chlorogenic acid (綠原酸)、Isoquercitrin、Astragalin、Quercetin 3-(6-malonylglucoside)、Kaempferol 3-(6-malonylglucoside) (K3MG) 等，藉由 CPC 製備分離這五種有效成分的標準品，期望在醫學研究、藥物或保健食品開發都能有所貢獻。在進行 CPC 分離實驗前，這些成分也預先藉由 ESI-MS (electrospray ionization-tandem mass spectrometry) 初步確認結構，證實這五個目標物確實存在桑葉中，之後經由 CPC 製備分離，再大量分管收集並由 NMR (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy) 更進一步做結構鑑定。

第二章 研究背景與文獻回顧

2.1 桑葉的介紹

2.1.1 桑葉的成分

桑葉為桑科植物，在古書籍中又稱神仙葉，《本草綱目》記載：“桑葉治勞熱咳嗽，明目，長髮。”桑葉的樹皮和樹枝早已被用在中醫治療發燒、保護肝臟、改善視力、強化關節、促進尿液排放、降低血壓等功用[1]。在日本，桑葉茶或粉末的銷售量有增加趨勢，研究報告顯示由丁醇萃取出桑葉中的抗氧化物，可有效抑制低密度脂蛋白氧化[2]。根據文獻[3;4;5]的研究，桑葉中存在 Q3MG、Chlorogenic acid、Rutin、Isoquercitrin、Astragaloside、K3MG 這幾種主要的抗氧化物，大部分屬於黃酮類(Flavonoid)的成分。

2.1.2 桑葉成分的功效

過去曾經有學者研究老鼠血管的動脈硬化實驗時發現[6]，餵食老鼠吃會造成動脈血管阻塞的食物，而導致動脈硬化情況下，若在食物中添加 Quercetin 3-(6-malonylglucoside)此成分，則可以明顯改善動脈血管阻塞的現象，若在食物中改成添加桑葉的粉末，也同樣具有相同的效果。之後作者也提到，餵食老鼠吃含有桑葉或 Q3MG 成分的食物，比起先前沒有吃的情形時，血液中總膽固醇濃度明顯的降低許

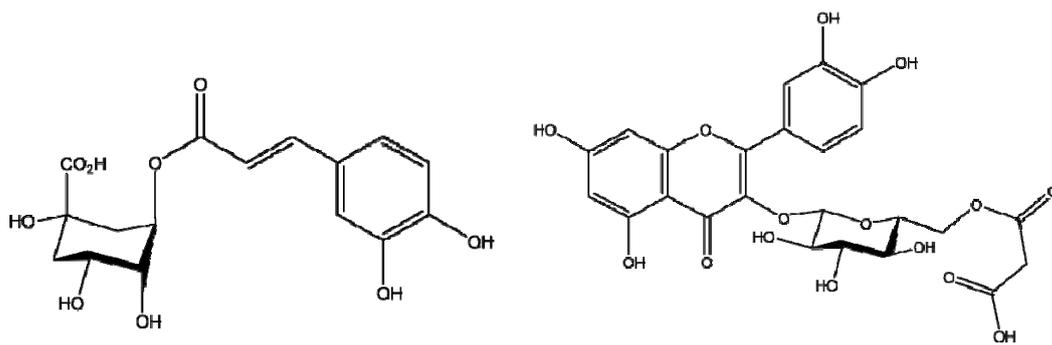
多，可由 25 mmol/L 降至 19 mmol/L 左右，事實上，若能有效降低膽固醇的濃度，就可以預防動脈硬化疾病的發生。

Chlorogenic acid (綠原酸)[7;8;9]長期以來被作為一種抗氧化劑，存在於咖啡豆中，在未經烘培的咖啡豆中含量高達 45%以上，而經過烘培的咖啡豆僅存 5~10%。綠原酸的功用包括阻止小腸吸收葡萄糖 (reducing the absorption of glucose)、阻止肝糖酵素釋放葡萄糖進入血液(reduce hepatic glycogenolysis)、幫助脂肪燃燒和提供能量給肌肉等；Rutin[10;11;12]可以抑制血小板聚集(inhibiting platelet aggregation)，以及降低毛細血管的通透性(decreasing capillary permeability)，作為血液稀釋劑和改善血液循環(blood thinner and improving circulation)；Isoquercitrin[13 ; 14]能抑制肥胖細胞的去顆粒化 (inhibiting degranulation of mast cells)，且具有抗發炎的作用(anti-inflammatory effect)；Astragalin[15 ; 16]有助於減少發炎反應(reducing inflammation)和止癢的功用 (antipruritic effect) ； Kaempferol 3-(6-malonylglucoside)[17]具有預防罹患動脈粥樣硬化之相關病症 (prevention of atherosclerosis)。

2.1.3 中草藥萃取物的類別

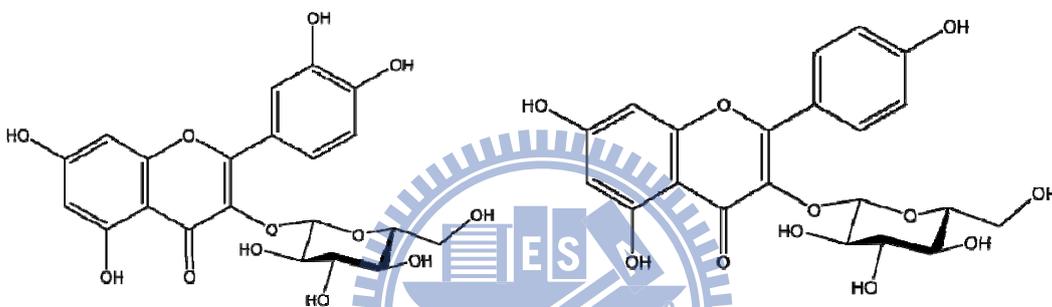
根據不同的目的或要求可以對中草藥萃取物進行多種方式的分類。例如根據用途可分為藥用萃取物、食用萃取物等；依照萃取溶劑不同可分為水萃取物、乙醇萃取物、乙酸乙酯萃取物等。此外，目前對於研究中草藥萃取物的種類有很多，按其作用和功效可分為：

- (1) 抗氧化劑：葡萄籽萃取物、綠茶萃取物等[18]。
- (2) 鎮靜劑：纈草萃取物、啤酒花萃取物等。
- (3) 植物雌激素與婦女保健類：當歸萃取物、黑升麻萃取物、大豆萃取物（大豆異黃酮）[19]等。
- (4) 減肥藥：烏龍茶萃取物、麻黃萃取物等。
- (5) 護肝類：水飛薊萃取物、五味子萃取物[20]等。
- (6) 改善心血管系統及神經保護功能類：銀杏葉萃取物、紅景天萃取物等。



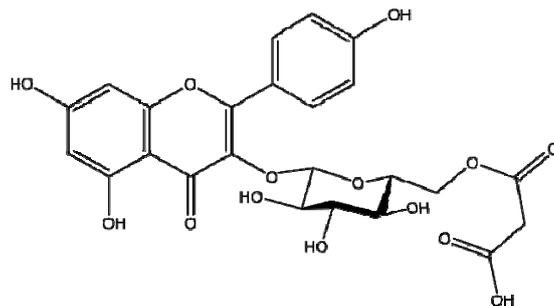
Chlorogenic acid

Quercetin 3-(6-malonylglucoside)



Isoquercitrin

Astragalin



Kaempferol 3-(6-malonylglucoside)

圖2-1、桑葉中五種成分的結構圖

2.2 逆流層析技術

2.2.1 簡介

逆流層析[21]是一種不需固體靜相支持物的液相-液相萃取技術，所使用的動相和靜相皆為液體，並利用樣品在兩相溶劑中的分配系數(partition coefficient)不同而分離，逆流層析的液態靜相不會有吸附現象，所以可以避免樣品流失和管柱阻塞而失效。

早期的逆流層析技術起源於上世紀 50 年代的逆流分佈法(countercurrent distribution, CCD)[22]，是一種不連續式分液漏斗的液相萃取，它採用數百個玻璃的分離管進行操作，但因其儀器複雜龐大容易損壞且分離時間長。Yoichiro Ito 等人對於 CCD 的理論基礎開始深入研究而發展出離心系統，根據離心力場的不同可將現代逆流層析分為離心分配層析(centrifugal partition chromatography, CPC)，也稱盤管行星離心層析(coil plant centrifugal, CPC)，和逆流層析(countercurrent chromatography, CCC)。

2.2.2 逆流層析的分離理論[23；24]

逆流層析分離的基礎是建立於逆流分佈法，CCD 是一連串的萃取過程，其過程可用圖 2-2(A)說明：若有多個連續的萃取槽，最初分析物在 L_0 中，而 U_0 、 U_1 ... U_n 和 L_1 、 L_2 ... L_n 分別為不含分析物的兩相(L 代表下層液；U 代表上層液)。當 U_0 和 L_0 混和後，物質在液相-

液相系統中分配，達到濃度平衡時， U_0 會萃走部份分析物，接著和 L_1 混合，完成平衡後，再依序與 L_2 、 L_3 ... L_n 混合；新的上層液 U_1 、 U_2 、 U_3 ...依序緊隨在 U_0 後做相同的步驟。由二項式定理計算可知，大部份的分析物最後會集中在某幾個萃取槽中，若一開始含有兩個分配係數不同的混合物，藉由增加萃取槽的數目，就可以提高分離的解析度，然而隨著萃取次數的增加，分析物的分佈也會變得比較寬 (broad)。

圖 2-2(B)，為液相-液相分配層析法，亦為 CCD 概念的延伸，分析物在無限多個萃取槽間連續進行分配，不同的物質會由分配係數不同而產生分離的情形，此為液相層析的原始觀點。圖 2-2(C)，為一般所熟知的液相層析，藉由管柱中填充固體支持物，使液體靜相以物理性吸附或化學鍵結的方式留在固體支持物的表面。前者的缺點是因為物理性吸附性弱造成靜相易在沖提過程中溶解在動相中而減少，後者之靜相雖然不會被帶走，但是未被靜相完全覆蓋的固體支持物，則會吸附部份的分析物，因而造成層析峰拖尾的現象。

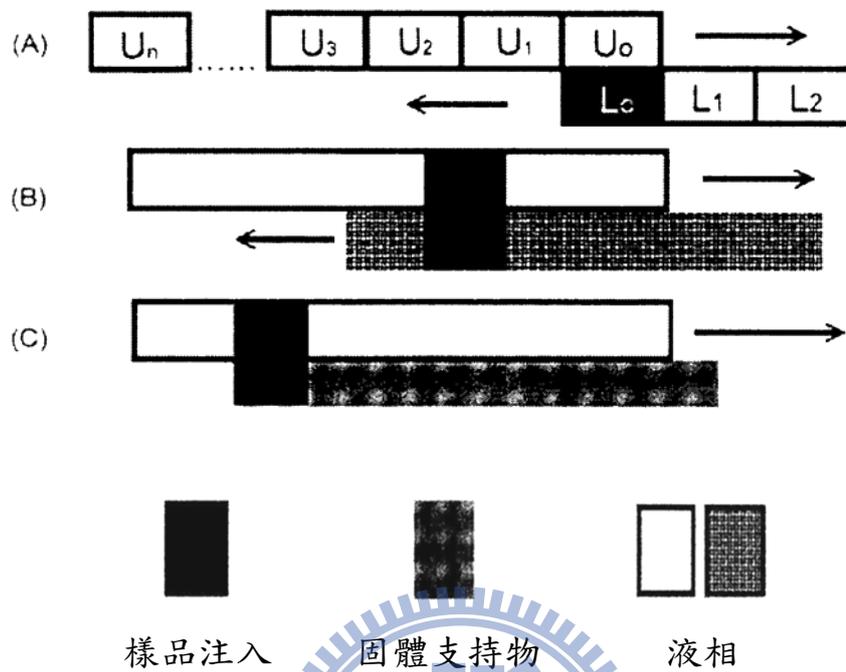


圖2-2、液相-液相層析方法

- (A) 傳統步驟式液相萃取。
- (B) 逆流萃取(CCE)，兩相都是動相，分別往反方向移動。
- (C) 液相-液相層析(LLC)，靜相是以固體支持物滯留在管柱中。

2.2.3 逆流層析的儀器系統[23；24]

為了能發展逆流層析成為實用的層析儀器，陸續開發出具有穿流(flow-through)性質、不同管柱結構和不同力場的儀器。因此，逆流層析的儀器系統依分離的管柱本身的轉動方式可區分為兩種：流體靜態平衡系統和流體動態平衡系統。

(1) 流體靜態平衡系統(Hydrostatic Equilibrium System，HSES)

在 HSES 系統中，管柱每一個部份所受力大小固定。靜相因重力場滯留在管柱中，樣品隨著動相穿越靜相，並藉著樣品在動靜相的分配係數不同而達到分離。圖 2-3 為 HSES 示意圖。圖 2-3(A)，所使用的動、靜相事先平衡過，選擇靜相為下層相，先使其充滿管柱後將動相(上層相)由一端緩緩的注入，靜相會被動相推出直到兩相的界面到達螺管底部，此時由於重力場的作用，動相開始往上穿越靜相直到螺管頂端，如此一直重複直到分離管柱的末端，其每一圈的螺管都會保留住一半的靜相。圖 2-3(B)和 2-3(A)相反，使用平衡過的上層相當作靜相，而下層相為動相，因此動靜相在螺管中會產生不同的平衡狀態。

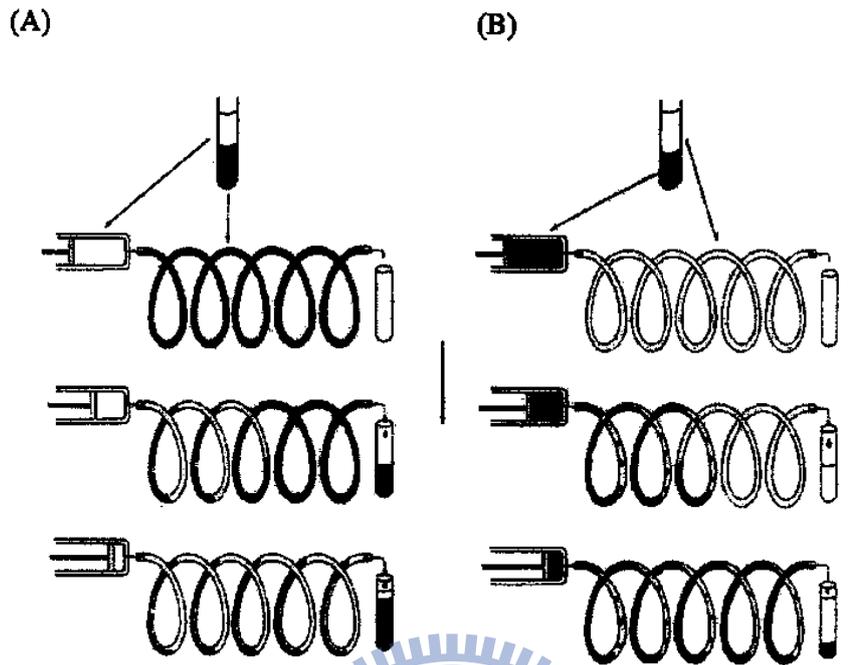


圖2-3、流體靜態平衡系統(HSES)示意圖[21]

(A) 靜相為下層相，動相為上層相。

(B) 靜相為上層相，動相為下相。

(2) 流體動態平衡系統(Hydrodynamic Equilibrium System, HDES)

在 HDES 系統中，螺旋管柱會藉由轉動所產生的扭力及離心力，將靜相滯留在管柱中，這扭力是由希臘數學家阿基米德發現，藉由轉動螺旋形的管子，可將河水取至水壩，此即所謂阿基米德扭力 (Archimedes screw force)。此原理亦被應用在 HDES 系統中。若螺旋管柱內存在有輕重兩相，受阿基米德扭力及重力之作用下，輕重兩相

因為受力不均，而在管柱中有不同的分佈，圖 2-4 說明在重力場作用下，阿基米德扭力對旋轉中螺管的影響、圖 2-4(a)先將螺旋管中注滿水，再導入氣泡或玻璃珠，封住螺管兩端，接著將螺管緩慢旋轉，由於阿基米德扭力的作用，將使氣泡與玻璃珠帶往螺管的左端，此表示不管比水輕或比水重的物質皆會向螺管的某一端移動，此端稱為螺管的頭端(head)，而另一端則稱為尾端(tail)。圖 2-4(b)中，利用平衡過的溶劑系統進行相同的實驗，圖 2-4(b)上圖是先將螺管注滿較輕的一相，也就是溶劑系統的上層相，而較重的一相則由尾端打入，此時較重的一項行為就像是水中的玻璃珠會往頭端移動，圖 2-4(b)下圖則先將較重的一相注滿螺管，由尾端打入較輕的一相，其行為就像是水中的氣泡。圖 2-4(c)，先將螺管內填入等體積的輕重兩相，兩相會在螺管的每一圈形成分離，當螺管開始轉動，任一相多餘的量則會被推至螺管尾端。因此，當螺管達到動力學平衡，則兩相在螺管中的分佈將保持不變，使靜相維持程度的滯留。

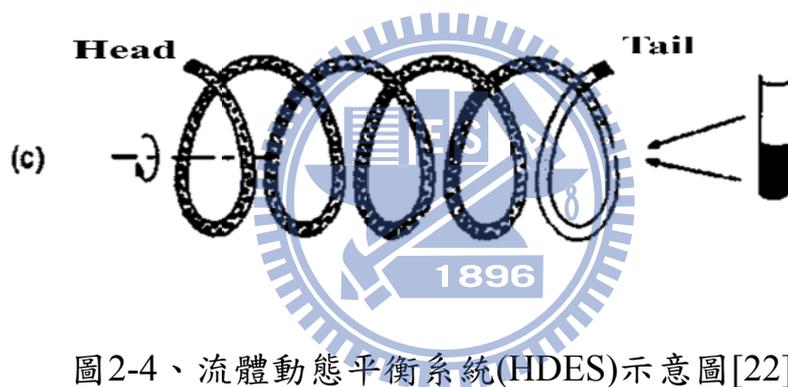


圖2-4、流體動態平衡系統(HDES)示意圖[22]

- (a) 將螺旋管中注滿水，再導入氣泡或玻璃珠，封住螺旋管兩端。
- (b) 先將較重的一相注滿螺旋管，由尾端打入較輕的一相。
- (c) 將螺旋管內填入等體積的輕重兩相，兩相會在螺旋管的每一圈形成分離。

2.2.4 逆流層析的優點

現代逆流層析技術為化合物的分離純化提供了一種新的方法，有別於一般的高效液能層析管柱，它無需固體作固定相，所以不存在固體對樣品的吸附、變性、失活、拖尾等現象，且能達到很高的回收率，

節省昂貴的材料和溶劑的消耗。逆流層析在不需更換不同極性的層析管柱情況下，藉由提高極性溶劑或非極性溶劑比例的方法，可以實現流動相從弱極性到強極性或相反的轉化。由於層析管柱容積大，無填料，管柱內的空間全部都是有效空間，因此樣品的負載能力強，製備分離量大，再現性好。

2.3 離心分配層析(centrifugal partition chromatography, CPC)

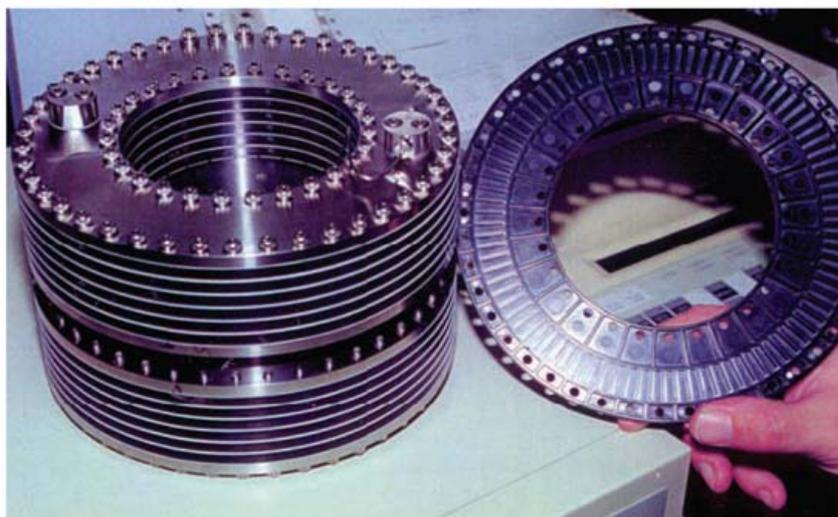
2.3.1 原理[25]

離心分配層析屬於流體靜力平衡系統，其儀器設計原理如圖 2-5 所示，層析管柱由一系列刻在圓盤或圓筒內的導管相聯的柱體組成，依管徑大小的不同管柱又可分為兩種，管徑小的稱 duct，主要是動相流動的通道，管徑大的稱 channel，滯留靜相的管柱部分，透過單軸旋轉產生恆定的重力場，靜相被滯留在管柱中。管柱中兩個旋轉密封的接口分別連接流動相的進口和出口，動相是以液滴的形式在靜相中傳遞，樣品成分會在液滴的表面進行分佈，因為不同的物質有不同的分配係數，因此經由自動化且連續式的萃取，就可以把樣品成分分離。

(A)



(B)



(C)

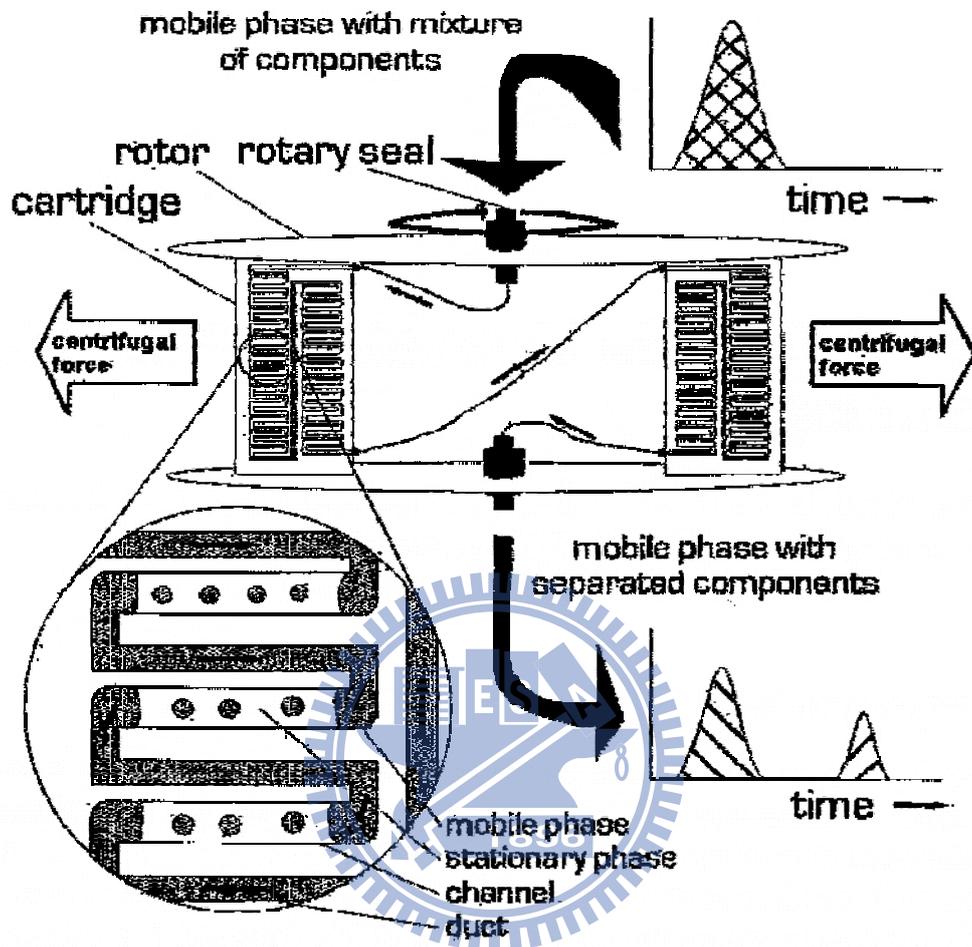


圖2-5、CPC儀器示意圖[26]

(A) CPC 外部構造與蝕刻在圓盤上的層析管柱。

(B) CPC 內部結構，由一系列圓盤組成。

(C) CPC 管柱中運作原理，動相是以液滴的形式在靜相中傳遞。

2.3.2 動相與靜相的流動模式

由於 CPC 是屬於液相-液相層析技術，根據實驗條件的不同，可以選擇其中一相當作靜相，另一相則當作動相，動靜相可以互相交換。因此存在兩種模式，一種是上升法(ascending mode)，另一種是下降法(descending mode)如圖 2-6 所示，上升法是以下層相當作靜相，上層相當作動相；下降法則是以上層相當作靜相，下層相當作動相。

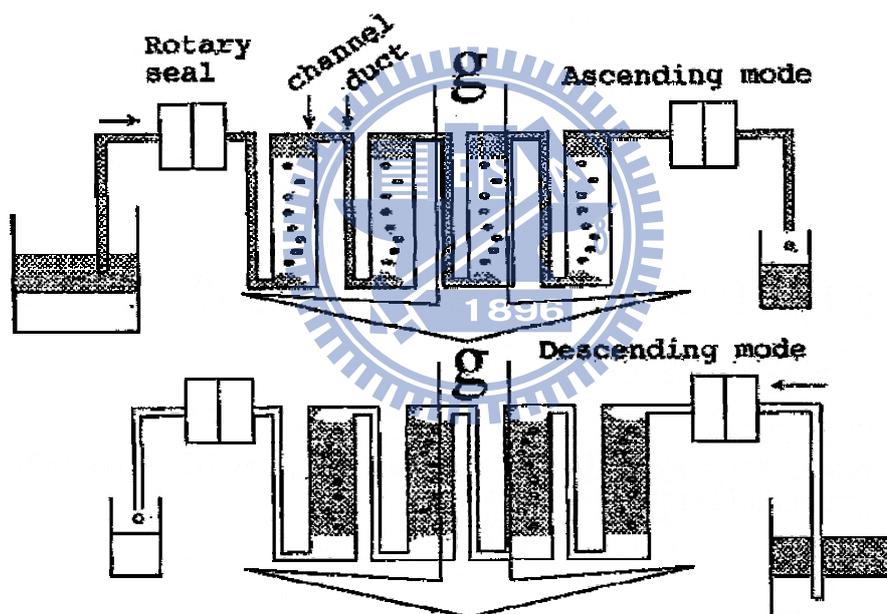


圖2-6、CPC的兩種流動模式[27]

上圖：ascending mode，下層相當作靜相，上層相當作動相。

下圖：descending mode，上層相當作靜相，下層相當作動相。

2.3.3 溶劑系統的選擇[28；29]

大部分的溶劑系統含水，加上其他有機溶劑，相互達到飽和而成為不互溶的兩相，分別為動相和靜相。其溶劑的成分組合視其實驗的分離條件而決定。在離心分配層析當中，溶劑系統的選擇有幾點必須注意：(1) 樣品有充分的溶解度 (2) 樣品不會被分解和去活性 (3) 適當的分配係數 (4) 良好的靜相滯留量。

2.3.4 影響靜相滯留量的因素

在離心分配層析中，液體靜相在管柱中滯留的多寡影響了分離的效率，在較高的靜相滯留量下可提高對樣品的承載量和分離的解析度。影響靜相滯留量及分離的效率的因素分為下列幾點[30]

- (a) 溶劑系統：在選擇適當的溶劑系統時必須考慮溶劑極性、對溶質的選擇性以及溶質在不同溶劑中的溶解度。一般而言，分析物在兩相溶極間最佳的分配係數 K_D 需在 0.2~5 之間，才能獲得較佳的分離效果。但在二元的溶劑系統中， K_D 值要落在此範圍不容易，因此，常藉由加入第三種甚至第四種可溶於原先兩者的溶劑，用來調和原先溶劑在極性或是界面張力的差異。然後依 K_D 來判斷分離結果，並決定動靜相。
- (b) 儀器轉速：在較大的轉速下，使靜相越容易滯留在管柱中，且因為轉動速度大，離心力也較大，因此還可以加速動相與靜相的分

層，這兩個結果均可提供較高的靜相滯留量，在有關於離心分配層析分離效果的研究中，若可以得到靜相滯留量越大，解析度也較佳，所以在 CPC 機械結構可以承受的轉速之下，轉動速度越快，分離效果越好。

(c) 動相流速：當動相流速越快時，越容易將靜相推出管柱，因此靜相的滯留量會比較少，分離效果較差。反之動相流速若較慢，會達到較佳的靜相滯留量，且可提高分離解析度，但相對地分離時間會變長。

2.3.5 離心分配層析儀的應用

以往 CPC 主要應用在天然物製備分離，曾經有學者研究葡萄籽與葡萄藤蔓中的成分 [31]，並大量分離出葡萄藤蔓中的 trans-resveratrol，此成分具有降低血小板凝集效果，相當於活血作用，所以也可以防止血栓，甚至中風等疾病。近年來有學者將 CPC 與 chiral selectors 結合，應用在分離鏡像異構物的分子 [32]，根據研究結果指出，CPC 也可成功製備分離鏡像異構物。



第三章 實驗

3.1 實驗藥品

(1) 桑葉

購買自苗栗縣泉明生態教育蠶業農場，編號為台灣桑葉 2 號(Mulberry NO.2)。大部分研究桑葉的文獻[3;6;33;34]所選用的都是屬於 *Morus alba* L. 品種的乾燥桑葉，根據文獻[34]的記載，苗栗縣的泉明生態教育蠶業農場可購買到此品種的乾燥 2 號桑葉。

(2) 標準品

Chlorogenic acid, $C_{16}H_{18}O_9$, M.W. 354.3, 99%, GR grade (ACROS, Geel, Belgium, USA)

Rutin(圖 3-1), $C_{27}H_{30}O_{16}$, M.W. 664.6, 97% up, GR grade (ACROS, Geel, Belgium, USA)

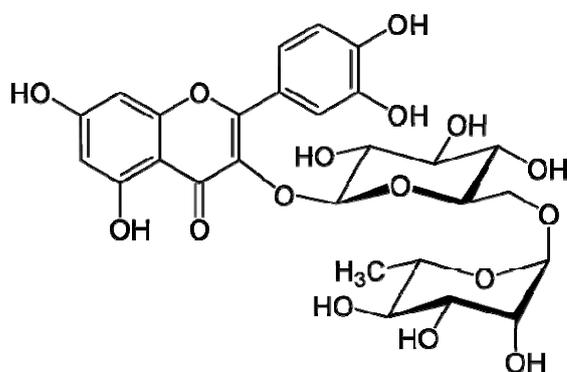


圖3-1、Rutin的結構

(3) 溶劑

Acetonitrile (ACN), HPLC grade, 99.9%, (TEDIA, Fairfield, OH, USA)

Deionized water, purified from Milli-Q plus, (Bedford, MA, USA)

Methyl t-Butyl Ether (MTBE), HPLC grade, 99.8%, (TEDIA, Fairfield, OH, USA)

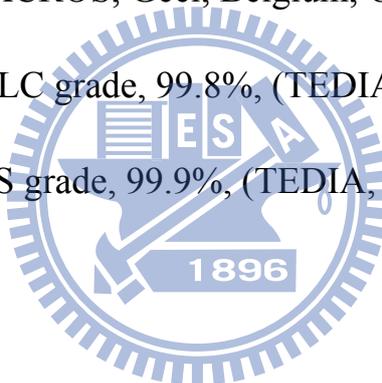
Ethanol, 99.5%, (TEDIA, Fairfield, OH, USA)

Acetone, HPLC grade, 99.9%, (TEDIA, Fairfield, OH, USA)

Formic acid, 98% up, (ACROS, Geel, Belgium, USA)

Ethyl Acetate (EA), HPLC grade, 99.8%, (TEDIA, Fairfield, OH, USA)

n-Butanol (BuOH), ACS grade, 99.9%, (TEDIA, Fairfield, OH, USA)



3.2 實驗儀器

(1) 離心分配層析儀

CPC 是由 Sanki (Tokyo, Japan) 所生產，型號是 CPC 240，內部主體由 12 個 disks 所構成，包含 3136 個 channels，最高可耐壓為 $6.2 \times 10^6 \text{ N/m}^2$ (900 psi)，管柱總容積大約 220 毫升，此儀器的轉速可以控制在 0 ~ 2000 rpm。藉由轉動外部控制閥，就可輕易選擇 ascending mode 或 descending mode 的操作模式。

(2) 往覆式幫浦

此幫浦為 Series II Digital HPLC pump，流速可由 0.01 mL/min ~ 9.99 mL/min，購買自 Pharma-Tech Research Company (Baltimore, MD, USA)。



(3) 梯度沖提幫浦

梯度控制器 LabGrad 是由 Lab Alliance (Apple Valley, MN, USA) 公司製造，並結合了 Series III pump，流速設定可由 0.01 mL/min ~ 10.00 mL/min，最多可做四種動相組成的混合梯度。

(4) 高效能液相層析管柱

由 Polymer Laboratories 製造的 PLRP-S column (250 mm × 4.6 mm, 15 μm)，屬於 reverse phase column，用於桑葉成分的分析。

(5) 紫外光-可見光偵測器(UV-Visible Detector)

型號為 Bio-Rad Model 1801 UV-Visible detector (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)，偵測器外部與個人電腦連接，利用色層分析儀數據處理系統(訊華公司，台北市)擇取實驗訊號。

(6) 紫外光-可見光譜儀(UV-Visible Spectrophotometer)

Hewlett Packard 8453, (Waldronn, Germany)。

(7) 離心機

型號為 EBA20 (Hettich, Germany)，最大轉速 6000 rpm，最大離心力為 3421 g。

(8) 迴旋減壓蒸餾器

廠牌為 Buchi (Switzerland)，型號是 R-114。

(9) 分管收集器

廠牌為 Advantec (Tokyo, Japan)，型號是 CHF1215A。

(10) ESI-MS

廠牌為 Micromass (Manchester, England)，型號是 Quattro Micro，主要使用分子量小於 2000 電灑游離法質譜。

(11) NMR 500

此儀器廠牌為美國 Varian (Lexington, MA, USA)，型號是 Unity Inova -500。重要規格具有(a)超導體磁鐵、電子控制系統、工作站電腦(b)雙射頻配合 Z 的脈衝磁場梯度(c)變溫裝置(d)探頭分為 5 mm



SWPFG 正向探頭、5 mm IDPFG 反向探頭、Nano probe 超微量膠態用。

3.3 實驗流程

3.3.1 桑葉的前處理流程

桑葉前處理的流程如圖 3-2 所示

在進入 HPLC 分析前，桑葉樣品必須做前處理的步驟，據由文獻 [35] 的研究，作者秤 2.0 g 的乾燥桑葉粉末，嘗試利用 20 mL 不同濃度的乙醇水溶液(0%、20%、40%、60%、80%、100%，v/v)做兩次萃取，然後再進行 HPLC 的分離，結果可發現桑葉經由 60% 乙醇水溶液萃取後，所得到的 Flavonol compounds 含量最多，由於我們的研究目的是想分離出桑葉中的 Chlorogenic acid、Isoquercitrin、Astragaln、Q3MG、K3MG 五種成分如圖 2-1 所示，大部分是屬於 Flavonol compounds，故在桑葉樣品的前處理步驟中，則選用 60% 乙醇水溶液做萃取。

(1) 先用天平秤 20.0 g 的乾燥台灣桑葉 2 號，然後使用 500 mL 的 60% (v/v) 乙醇做萃取，在 40 °C 的水浴中利用磁石攪拌萃取 2 小時，之後使用抽器過濾來除去殘渣的部分，並保留濾液的部分，再使用迴旋減壓蒸餾器把溶劑抽乾。由於桑葉中的成分相當複雜，希望藉由初步的

批式萃取除去極性較大的化合物，使分離的目標物單純化。

(2) 把溶劑抽乾後的黏稠物，先溶於 100 mL 的去離子水中，使用 300 mL 的 EA 做批式萃取(圖 3-3)，首先加入 100 mL EA，劇烈搖晃後，靜置 30 分鐘使兩相達到平衡，之後將下層相轉移至另一個分液漏斗中，再加入新鮮的 100 mL EA 於下層相中，同樣劇烈搖晃後，靜置 30 分鐘使兩相達到平衡，再作一次下層相的轉移，最後加入一次新的 100 mL EA，待至平衡，上述總共做了三次批式萃取，故會得到大約 300 mL 的 EA 相和 100 mL 的水相。保留三次 EA 有機相的部分，並使用迴旋減壓蒸餾器把溶劑抽乾，當作 sample 1。

(3) 經由三次 100 mL 的 EA 做批式萃取後的下層水相，再使用每次 100 mL 的 EA 加 0.5 mL 的甲酸做兩次的批式萃取，總共使用 200 mL 的 EA，保留兩次 EA 有機相的部分，並使用迴旋減壓蒸餾器把溶劑抽乾，當作 sample 2。加入甲酸的目的是希望萃取出含有-COOH 官能基的目標物，因為酸可以防止-COOH 官能基解離，而降低化合物的極性，所以可以使得含有-COOH 官能基的成分從水相被萃取出有機相中。

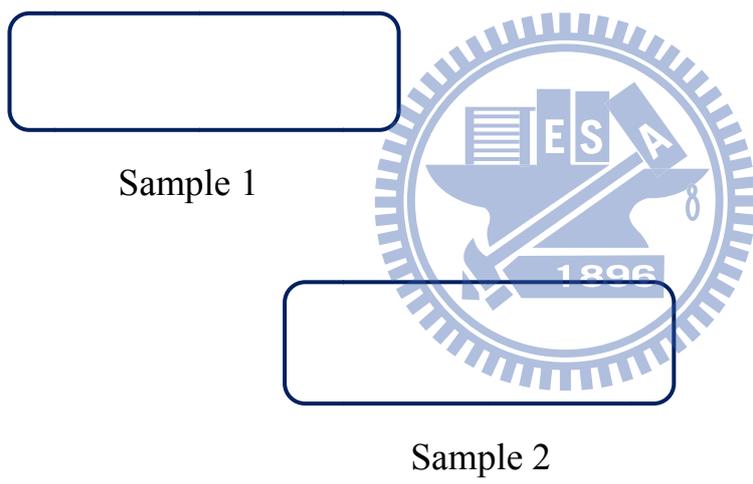


圖3-2、桑葉前處理的流程

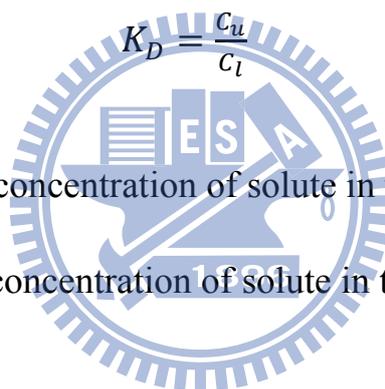


圖3-3、三次批式萃取示意圖

先將桑葉萃取黏稠物溶於 100 mL 的去離子水中，並加入 100 mL EA，劇烈搖晃後，靜置 30 分鐘使兩相達到平衡，之後將下層相轉移至另一個分液漏斗中，再加入新鮮的 100 mL EA，同樣劇烈搖晃後並靜置 30 分鐘，再作一次下層相的轉移，最後加入一次新的 100 mL EA，待至平衡，上述總共做了三次批式萃取，故會得到大約 300 mL 的 EA 相和 100 mL 的水相。

3.3.2 偵測桑葉成分在分配系統中的分佈

在實驗過程中，將所配製的 20 mL 有機-水相系統，加入 10 mg 的桑葉樣品，劇烈的搖晃待至平衡後，上、下層相各取 4 毫升，然後用迴旋減壓蒸餾器把溶劑抽乾，再分別加入 1 毫升的 HPLC 動相，之後進樣 HPLC 做分析，可得到上、下層相的層析圖，同一個成分在兩相的濃度比值，也就是層析峰面積積分比值，可得到桑葉各個成分在兩相中的分佈(K_D)。



C_u : concentration of solute in the upper phase

C_l : concentration of solute in the lower phase

3.3.3 配製不同的溶劑系統

一開始曾嘗試使用 EA/BuOH/H₂O 三項溶劑系統(ternary solvent systems)，經過多組不同比例(表 3-1)測試發現，桑葉中五種目標物都傾向分佈在有機相，表示樣品分佈不是很理想，所以 EA/BuOH/H₂O 組成的溶劑系統不適合應用在 CPC 分離桑葉方面。

之後根據文獻[28]的研究，嘗試選用 MTBE/Acetone/H₂O 三項溶

劑系統，測試多組不同比例(表 3-2)，並得到兩組最佳化的溶劑系統，分別應用在 CPC 分離 sample 1 和 sample 2。桑葉中五種目標物在兩相中都有理想的分佈。

表3-1 EA/BuOH/H₂O三項溶劑系統，測試不同組成比例

EA/BuOH/H ₂ O	4 : 6 : 10	6 : 4 : 10	9 : 1 : 10
--------------------------	------------	------------	------------

表3-2 MTBE/Acetone/H₂O三項溶劑系統，測試不同組成比例

MTBE/Acetone/H ₂ O	4 : 6 : 10	6 : 4 : 10	8 : 2 : 10
MTBE/Acetone/H ₂ O 加 formic acid	6 : 4 : 10 加 0.2% (v/v) formic acid	6 : 4 : 10 加 0.6% (v/v) formic acid	6 : 4 : 10 加 1.0% (v/v) formic acid

3.3.4 純度的計算

大部份利用 CPC 或 CCC 儀器應用在製備分離中草藥方面[31；32]，其純度計算方法，主要是藉由不同物質在 HPLC 層析圖中，單一物質的波峰面積佔總面積的百分比。

純度的計算：

$$\text{純度}(\%) = \frac{\text{單一成分波峰面積}}{\text{HPLC 所有層析峰的總面積}} \times 100\%$$

3.3.5 回收率的計算

根據文獻[36]提到，回收率的計算方法，首先要確認樣品進樣於 CPC 的重量，然後與 HPLC 層析圖中，單一物質的波峰面積佔總面積的百分比相乘，就可估算出單一成分的回收量，之後再與 CPC 製備分離實驗後真正得到單一成分的量相除，便可計算出樣品回收率。

回收量估計值的計算：

$$\text{回收量估計值}(\text{mg}) = \text{樣品進樣量}(\text{mg}) \times \frac{\text{單一成分波峰面積}}{\text{HPLC 所有層析峰的總面積}}$$

回收率的計算：

$$\text{回收率}(\%) = \frac{\text{回收量實際值}(\text{mg})}{\text{回收量估計值}(\text{mg})} \times 100\%$$

3.3.6 CPC 製備實驗步驟

CPC 實驗儀器裝置如圖 3-4 所示[27]

- (1) 利用量筒量取特定體積溶劑，並置於分液漏斗內，配製成所需的溶劑系統，然後靜置至兩相分層，分別取出上層與下層相。
- (2) CPC 調至 descending 方向，用氮氣把管柱內的去離子水保存液吹出，之後使用往復式幫浦以流速 8 mL/min 將有機靜相填滿整個管柱。
- (3) 啟動 CPC，使其轉速達到 900 rpm。
- (4) 待其轉速穩定後，以流速 1 mL/min 將動相打入 CPC，此時會有靜相從 CPC 中被推出，動相與靜相會在內部達到一個平衡，直到靜相不再持續被推出時，紀錄被推出的靜相體積，並可以初步計算出此溶劑系統的靜相滯留率。
- (5) 當有機相不再流出，表示動靜相已達到平衡，開啟 UV-Vis 偵測器(350 nm)，並等待訊號穩定。
- (6) 注入桑葉樣品溶液 5 mL，以下層當動相來沖提，並在樣品注入的同時紀錄層析訊號。
- (7) 每 3 分鐘收集一管，即每管中含有 3 mL 的樣品液。
- (8) 實驗完成後，CPC 停止轉動，用氮氣將管柱內的液體吹出並收集，紀錄有機相和水相的體積，上層有機相的體積與總體積相除就是靜相

滯留率。

(9) 在 CPC 停止轉動的情況下，先以 300 mL 甲醇沖洗管柱，再以 300 mL 去離子水清洗，未流出之去離子水保存在 CPC 中。

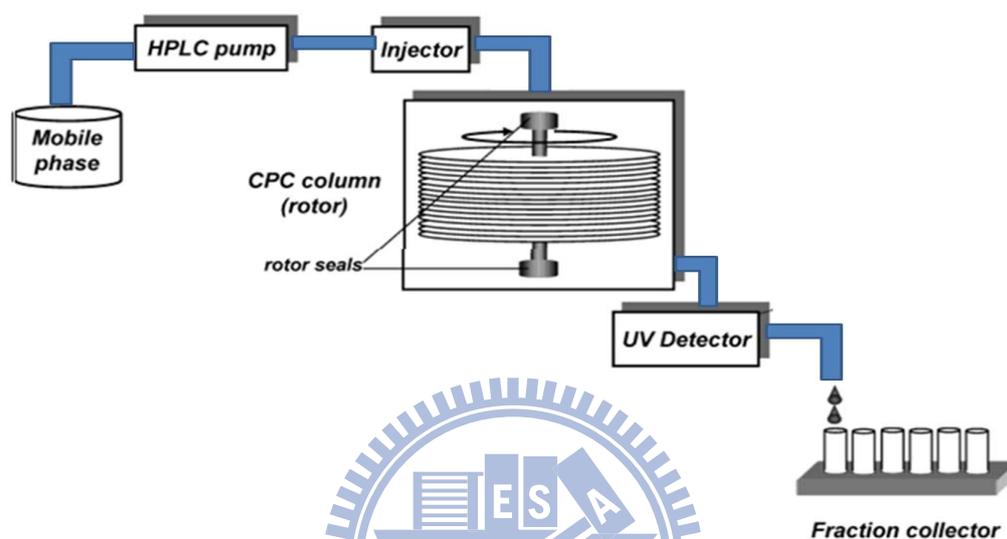


圖3-4、CPC實驗儀器裝置

包含了梯度幫浦、CPC 儀器、紫外光偵測器、以及分管收集器。

3.3.5 HPLC 分析收集液實驗步驟

HPLC 實驗儀器裝置如圖 3-5 所示

(1) 使用 reversed phase HPLC 系統，先以純的 Acetonitrile 清洗管柱 15 分鐘，再用 solvent A [Tetrahydrofuran:0.1%(v/v) formic acid = 25 : 75 (v/v)]當動相沖提管柱 15 分鐘。

- (2) 開啟 UV-Vis 偵測器，偵測波長設定在 350 nm，並等待訊號穩定。
- (3) 每支收集管先用迴旋減壓蒸餾裝置把溶劑抽乾，再加入 1 mL 的 solvent A 溶解樣品，選擇用 HPLC 沖提的動相來溶解樣品，可避免掉因為溶劑不同而產生的背景干擾訊號。
- (4) 注入桑葉樣品溶液於六向閥的 20 μ L sample loop 中，並將六向閥由 inject 調至 load 的同時紀錄層析訊號。

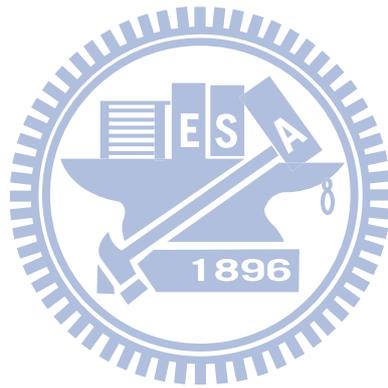


圖3-5、HPLC實驗儀器裝置
包含了梯度幫浦、HPLC 管柱、紫外光偵測器。

第四章 結果與討論

4.1 以 HPLC 分析桑葉 2 號萃取出來的黏稠物

我們利用 HPLC 可以在 50 分鐘內分析桑葉中的混合物，以波長 350 nm 的偵測器偵測，桑葉中 60% (v/v) 乙醇萃取物的層析圖(圖 4-1) 出現許多個波峰，由於桑葉中的成分相當複雜，所以先為這些波峰由 a ~ i 標記上編號，其中 a、e、g、h、i 依序分別為 Chlorogenic acid、Isoquercitrin、Astragalin、Q3MG、K3MG 這五個成分，也就是我們要製備分離的目標物，這些成分的確認是經由收集之後偵測 ESI-MS 得知。其依序的滯留時間分別為 8.2 min、17.8 min、21.1 min、26.3 min 和 34.9 min。

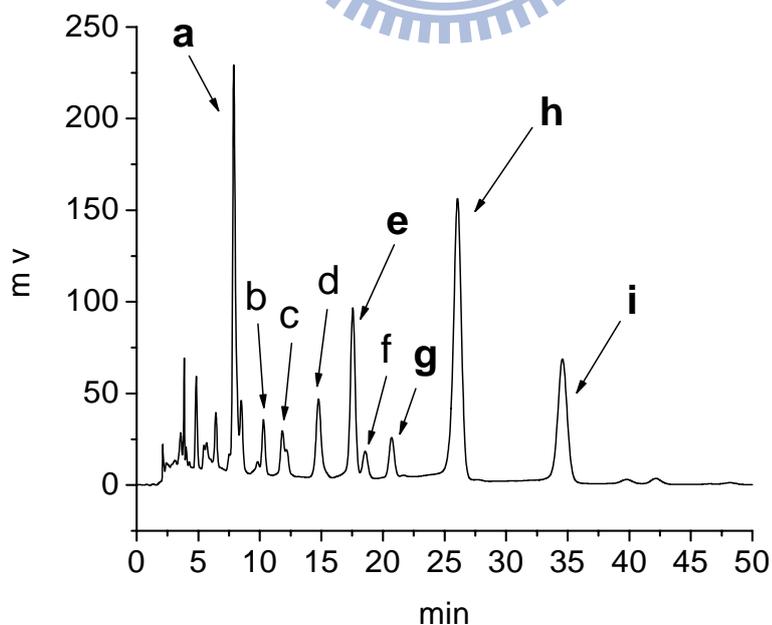


圖4-1、HPLC分析桑葉萃取物的層析圖

4.2 以質譜鑑定桑葉成分的結構

藉由 HPLC 分析並收集 a、e、g、h、i 五個目標物，樣品進樣量由原本的 20 μL 換成體積較大的 100 μL ，分別收集八次後，再用減壓迴旋蒸餾把溶劑抽乾，然後進一步由 ESI-MS 負電荷做結構鑑定，此儀器是選用低解析度的模式，準確值到整數位。

4.2.1 以質譜鑑定 Chlorogenic acid 結構

Chlorogenic acid 的分子量是 354.3 Da，由 ESI-MS 負電荷分析結果(圖 4-2)，由圖中可發現 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 為 353.1 m/z 的訊號，此為綠原酸失去一個氫的分子訊號。191.1 m/z 的訊號，則是綠原酸斷 C-O 鍵後，左邊氧帶負電結構的 fragment 訊號，因為測的樣品純度不是 100% 所以其它的訊號可能是雜質。由於 Chlorogenic acid 標準品可購買到，故也測了 Chlorogenic acid 標準品的 ESI-MS 負電荷(圖 4-3)，並與收集的綠原酸作比對，同樣可發現 353.1 m/z 和 191.1 m/z 這兩個訊號。因此由質譜偵測鑑定後，可初步確定 peak a 即為 Chlorogenic acid 成分。

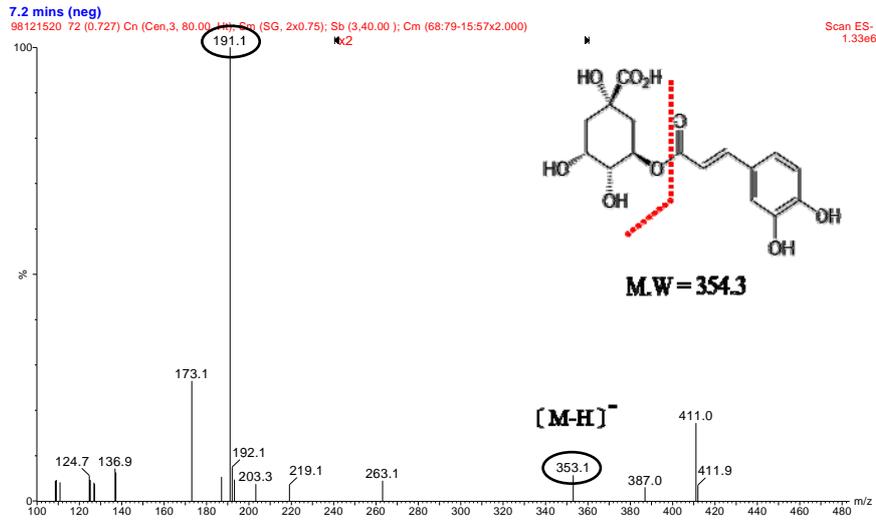


圖4-2、Chlorogenic acid測ESI-MS負電荷質譜圖

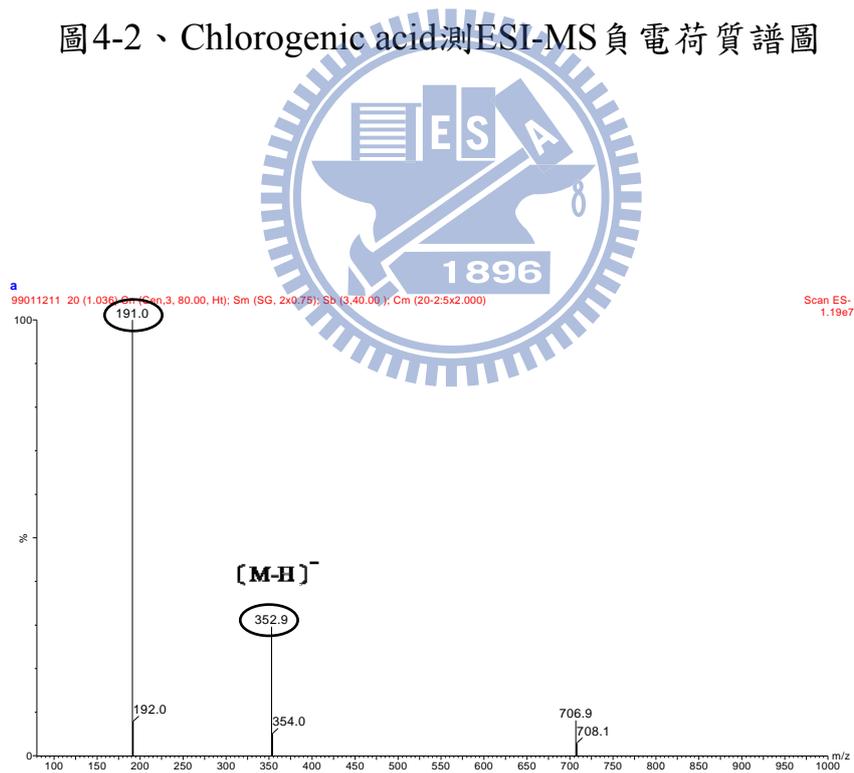


圖4-3、Chlorogenic acid標準品測ESI-MS負電荷質譜圖

4.2.2 以質譜鑑定 Isoquercitrin 結構

Isoquercitrin 的分子量是 464.4 Da，藉由 ESI-MS 負電荷分析結果 (圖 4-4) 發現，由質譜圖中可獲得兩個強度較大的訊號，463.1 m/z 的訊號代表 $[M-H]^-$ ，此為 Isoquercitrin 失去一個氫的分子訊號。927.1 m/z 的訊號，則是 Isoquercitrin dimer 的訊號。根據質譜偵測鑑定的結果，可初步確定 peak *e* 即為 Isoquercitrin 成分。

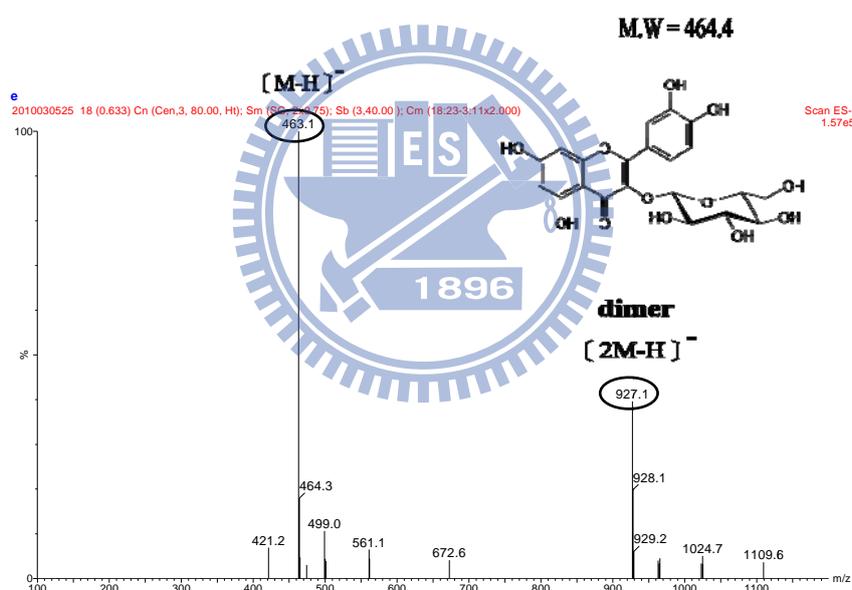


圖4-4、Isoquercitrin測ESI-MS負電荷質譜圖

4.2.3 以質譜鑑定 Astragalin 結構

Astragalin 的分子量是 448.4 Da，由 ESI-MS 負電荷分析結果(圖 4-5)，由圖中可發現 $[M-H]^-$ 為 446.9 m/z 的訊號，此為 Astragalin 失去一個氫的分子訊號。因此由質譜偵測鑑定後，可初步確定 peak g 即為 Astragalin 成分。

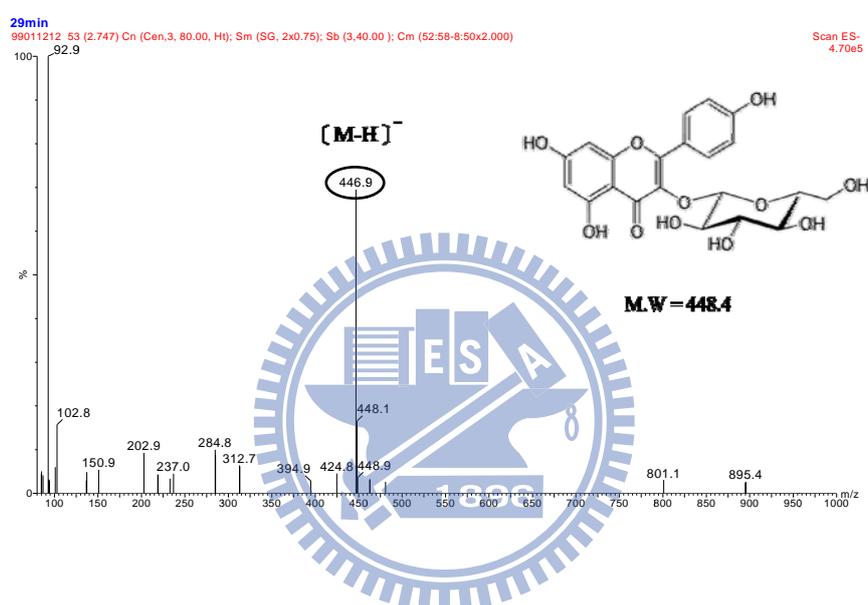


圖4-5、Astragalin測ESI-MS負電荷質譜圖

4.2.4 以質譜鑑定 Quercetin 3-(6-malonylglucoside)結構

Q3MG 的分子量是 550.4 Da，藉由 ESI-MS 負電荷分析結果(圖 4-6)發現，由質譜圖中可獲得三個強度較大的訊號，548.9 m/z 的訊號代表 $[M-H]^-$ ，此為 Q3MG 失去一個氫的分子訊號。504.9 m/z 和 301.1 m/z 則可能是屬於 Q3MG 成分的兩個 fragment 訊號。為了進一步確

認這兩個訊號都是 Q3MG 的部分結構訊號，所以針對 $[M-H]^-$ 訊號 548.9 m/z 作 MS-MS 偵測(圖 4-7)，經由質譜圖的觀察發現，548.9 m/z 被打碎後所得到的碎片訊號，確實包含了 504.9 m/z 和 301.1 m/z，所以判斷 504.9 m/z 和 301.1 m/z 應該都是屬於 Q3MG 成分的 fragment 訊號。推測 504.9 m/z 訊號是 Q3MG 失去 CO_2 結構，則 301.1 m/z 訊號主要是 Q3MG 斷 C-O 鍵後，上半部 quercetin 氧帶負電結構的 fragment 訊號。根據質譜偵測鑑定的結果，可初步確定 peak *h* 即為 Quercetin 3-(6-malonylglucoside)成分。

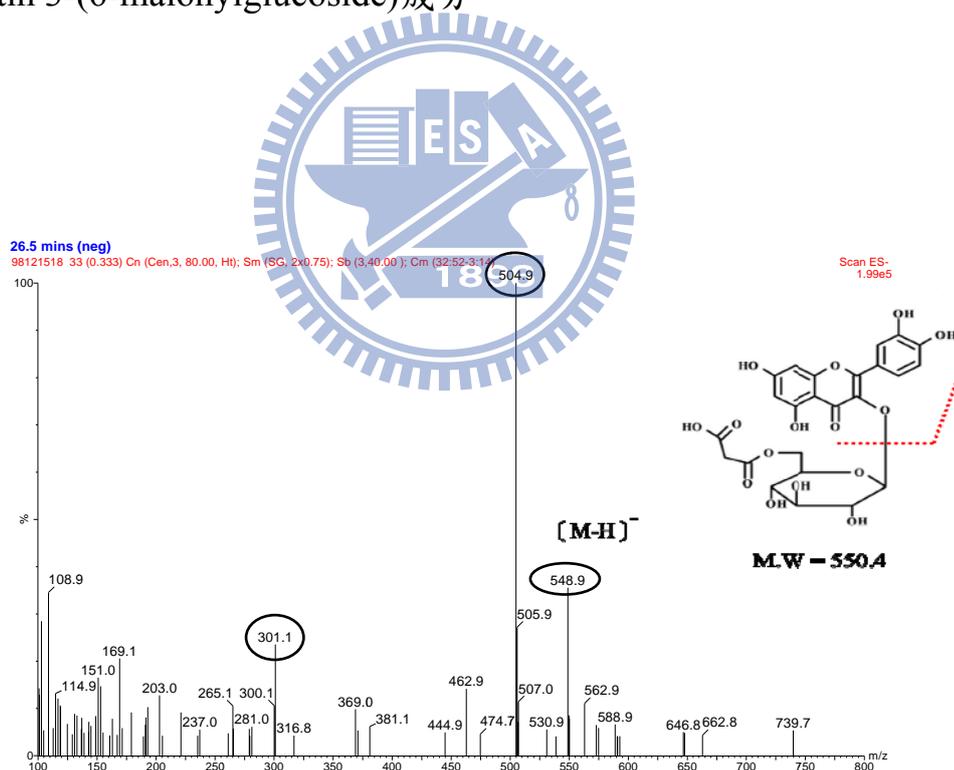


圖4-6、Quercetin 3-(6-malonylglucoside)測ESI-MS負電荷質譜圖

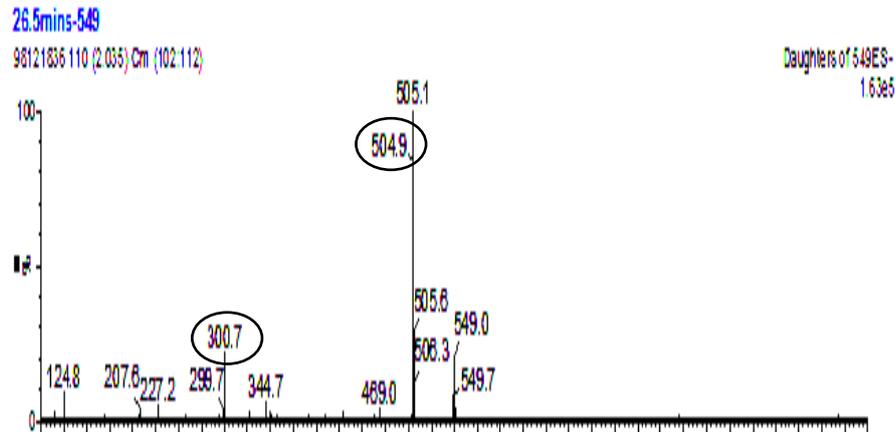


圖4-7、Quercetin 3-(6-malonylglucoside)成分中碎片訊號548.9 m/z 測MS-MS質譜圖

4.2.5 以質譜鑑定 Kaempferol 3-(6-malonylglucoside)結構

K3MG 的分子量是 534.0 Da，藉由 ESI-MS 負電荷分析結果(圖 4-8)發現，由質譜圖中可獲得三個強度較大的訊號，532.9 m/z 的訊號代表 [M-H]⁻，此為 K3MG 失去一個氫的分子訊號。488.9 m/z 和 285.0 m/z 則可能是 K3MG 成分的兩個 fragment 訊號。為了更進一步證實這兩個訊號都是屬於 K3MG 的部分結構訊號，所以針對 [M-H]⁻ 訊號 532.9 m/z 和 488.9 m/z 作 MS-MS 偵測(圖 4-9)，經由質譜圖的觀察發現，532.9 m/z 被打碎後所得到的碎片訊號，確實包含了 488.9 m/z 和 285.0 m/z；而 488.9 m/z 的碎片訊號則包含了 285.0 m/z，所以判斷 488.9 m/z 和 285.0 m/z 應該都是屬於 K3MG 成分的 fragment 訊號。推測 488.9 m/z 訊號是 K3MG 失去 CO₂ 結構，則 285.0 m/z 訊號主要

是 K3MG 斷 C-O 鍵後，上半部 kaempferol 氧帶負電結構的 fragment 訊號。因此由質譜偵測鑑定後，可初步確定 peak *i* 即為 Kaempferol 3-(6-malonylglucoside)成分。

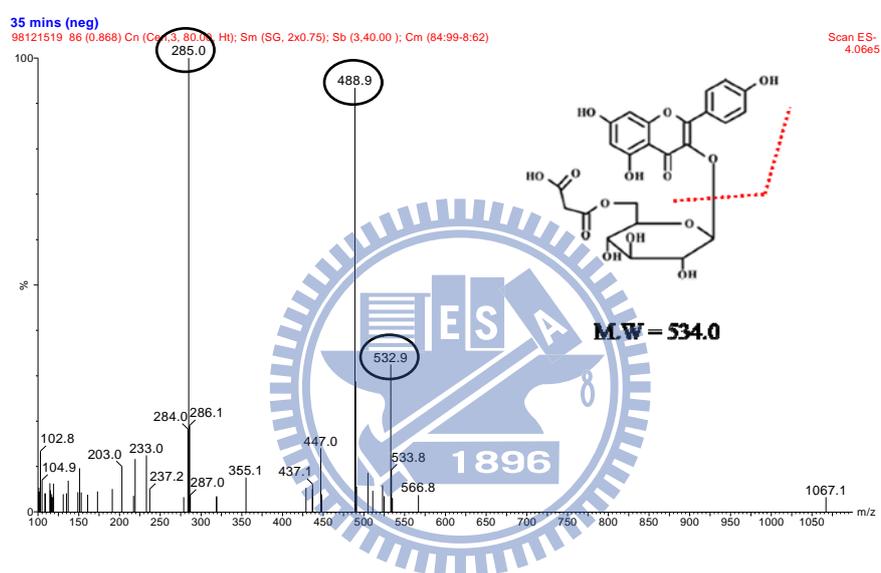
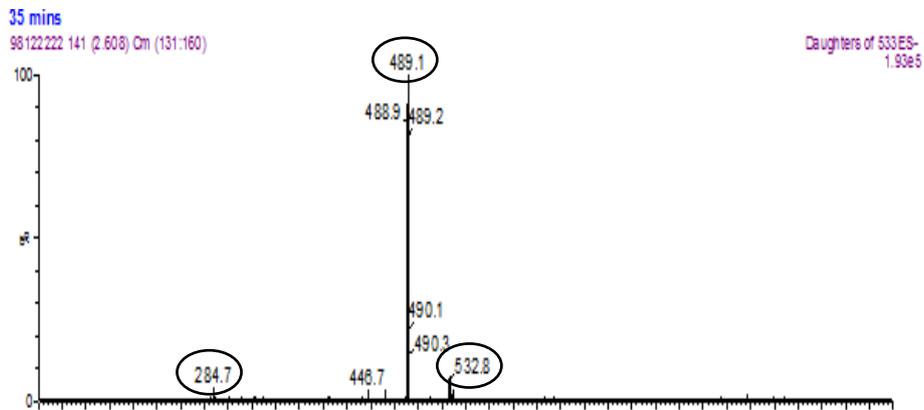


圖4-8、Kaempferol 3-(6-malonylglucoside)測ESI-MS負電荷質譜圖

(A)



(B)

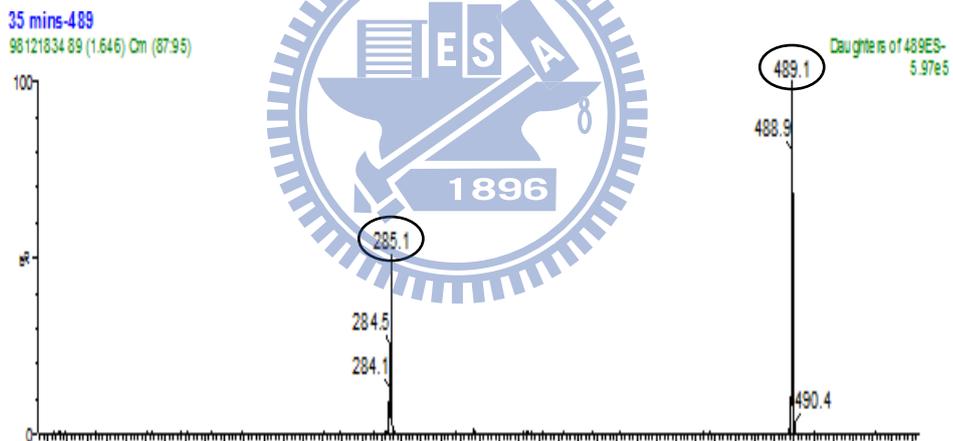


圖4-9、Kaempferol 3-(6-malonylglucoside)成分中碎片訊號測
MS-MS質譜圖

(A) 532.9 m/z fragment 訊號的 MS-MS 質譜圖。

(B) 488.9 m/z fragment 訊號的 MS-MS 質譜圖。

4.3 以 HPLC 分析初步批式萃取後的桑葉樣品

4.3.1 批式萃取後的 sample 1

桑葉中的成分相當的複雜，因為雜質物過多，所以若要直接從如此多物質當中，針對目標物找出合適的 CPC 溶劑系統，使其具有較佳的分配係數值，其實相當不容易。藉由 EA 的初步批式萃取，把低極性的目標物萃取至有機相，進而把欲分離的樣品簡單化，因此可以比較容易找到適合的 CPC 的溶劑系統和分配係數值。由層析圖(圖 4-10)發現，經由 EA 的初步批式萃取後，e、g 這兩個目標物會被萃取到有機相當中，分別是 Isoquercitrin 和 Astragalin。

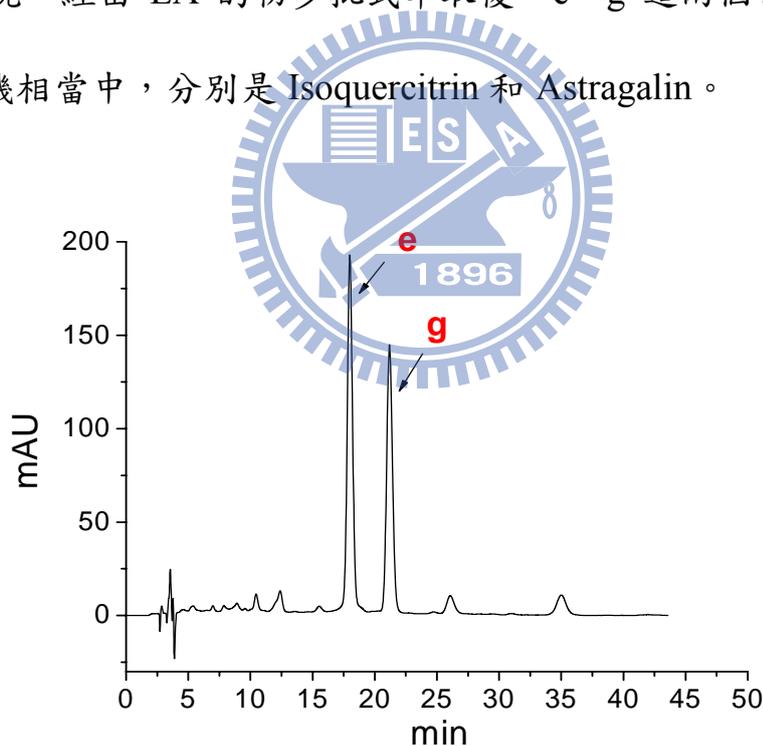


圖4-10、HPLC分析sample 1的層析圖

4.3.2 批式萃取後的 sample 2

藉由 EA 加 5 mL 的甲酸做批式萃取，主要是想萃取到含有 -COOH 官能基的目標物，藉由加酸可以防止 -COOH 官能基解離，而使化合物的極性降低，所以可以使含有 -COOH 官能基的成分從水相被萃取到有機相中，由層析圖(圖 4-11)發現，經由 EA 加 5 mL 的甲酸做批式萃取後，a、h、i 這三個目標物會被萃取到有機相當中，分別是 Chlorogenic acid、Quercetin 3-(6-malonylglucoside) 和 Kaempferol 3-(6-malonylglucoside)。

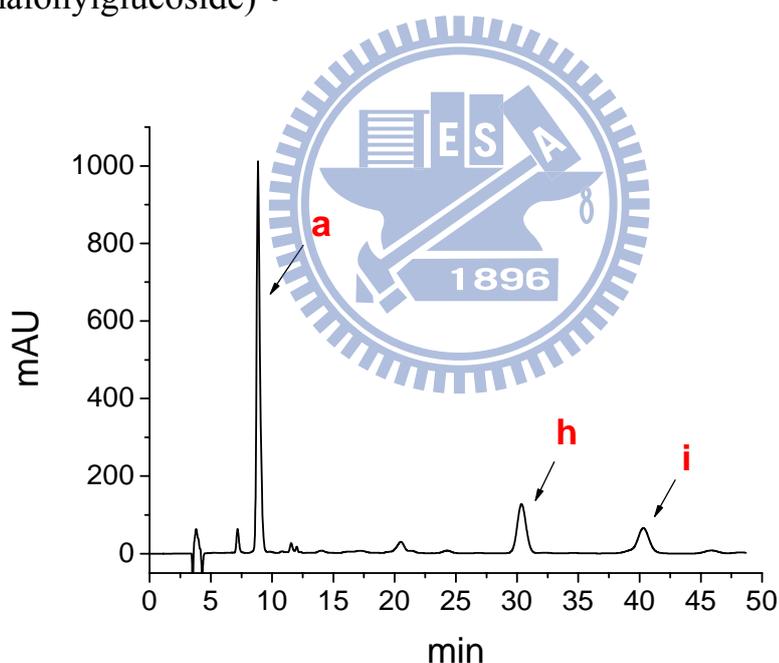


圖4-11、HPLC分析sample 2的層析圖

4.4 以 HPLC 分析標準品

根據文獻[3]提到，桑葉中存在 Chlorogenic acid、Rutin、Isoquercitrin、Astragaloside、Quercetin 3-(6-malonylglucoside)、Kaempferol 3-(6-malonylglucoside) 這幾種主要的抗氧化物，但實際上只有 Chlorogenic acid 和 Rutin 這兩種化合物可以購買的到標準品，所以我們進一步用 HPLC 來分析這兩種成分的標準品，並與桑葉萃取的黏稠物層析圖相互比對，可以初步確認 Chlorogenic acid(圖 4-12)和 Rutin(圖 4-13)分別存在的波峰位置。

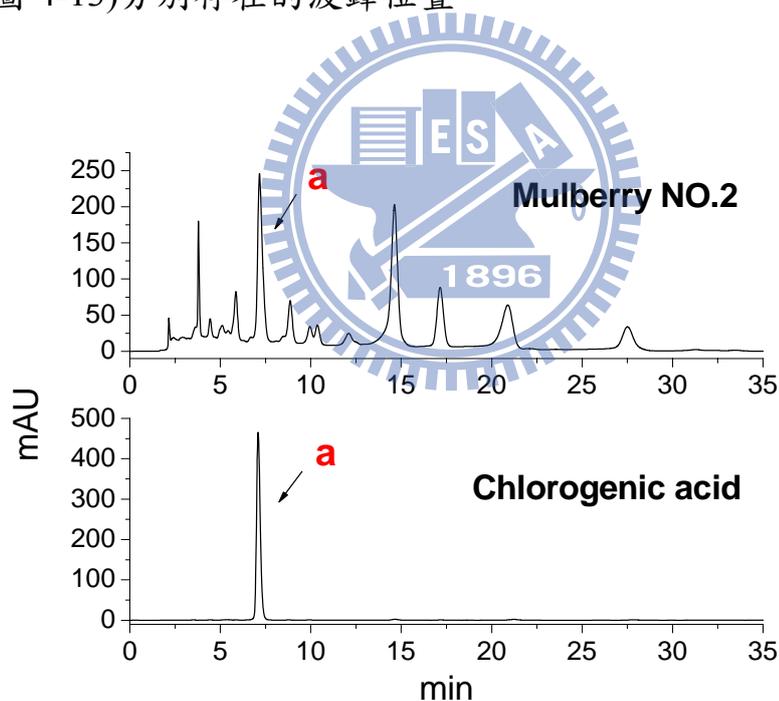


圖4-12、HPLC分析桑葉2號萃取物和Chlorogenic acid標準品層析圖

上圖：桑葉 2 號的乙醇萃取物之層析圖。

下圖：Chlorogenic acid 標準品之層析圖。

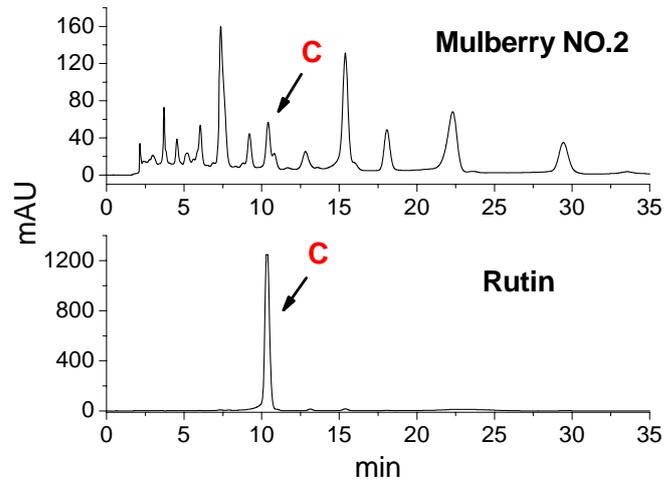


圖4-13、HPLC分析桑葉萃取物和Rutin標準品的層析圖

上圖：桑葉 2 號的乙醇萃取物之層析圖。

下圖：Rutin 標準品之層析圖。



4.5 以離心分配層析儀分離桑葉成分的實驗結果

先前提到我們一開始使用 EA/BuOH/H₂O 三項溶劑系統，經過多組不同比例(表 4-1)測試發現，桑葉中五種目標物都傾向分佈在有機相，表示樣品的分配係數值不理想，所以 EA/BuOH/H₂O 組成的溶劑系統不適合應用在 CPC 分離 Chlorogenic acid、Isoquercitrin、Astragaln、Quercetin 3-(6-malonylglucoside)、Kaempferol 3-(6-malonylglucoside) 這五個成分。

之後根據文獻[31]的研究，嘗試選用 MTBE/Acetone/H₂O 三項溶

劑系統，測試多組不同比例(表 4-2；4-3)，並得到兩組最佳化的溶劑系統，分別應用在 CPC 分離 sample 1 和 sample 2。桑葉中五種目標物在兩相中不僅都有理想的分佈(K_D 在 0.2~5 之間)，且任意兩個成分的 K_D 值相除，會得到較大的選擇因子(selectivity factor, α)[37]，選擇因子越大表示不同的成分越容易被分開。

(1) CPC 分離 Sample1 的最佳化溶劑系統比例，(MTBE/Acetone/H₂O = 6 : 4 : 10)

(2) CPC 分離 Sample2 的最佳化溶劑系統比例，(MTBE/Acetone/H₂O = 6 : 4 : 10)額外加入溶劑系統總體積 0.6% (v/v)的 formic acid



表4-1、EA/BuOH/H₂O三項溶劑系統，測試在不同組成比例中，桑葉中五種目標物的分配係數值(K_D)

EA/BuOH/H ₂ O	4 : 6 : 10	6 : 4 : 10	9 : 1 : 10
Chlorogenic acid	13.53	7.43	1.83
Isoquercitrin	11.05	6.75	2.95
Astragalin	12.73	5.32	3.86
Quercetin 3-(6-malonylglucoside)	28.17	10.41	6.21
Kaempferol 3-(6-malonylglucoside)	31.87	10.37	9.46

表4-2、MTBE/Acetone/H₂O三項溶劑系統，測試在不同組成比例中，

Isoquercitrin、Astragalin的分配係數值(K_D)

MTBE/Acetone/H ₂ O	4 : 6 : 10	6 : 4 : 10	8 : 2 : 10
Isoquercitrin	0.22	0.23	0.52
Astragalín	0.32	0.45	0.65

表4-3、MTBE/Acetone/H₂O三項溶劑系統加甲酸，測試在不同組成比

例中，Chlorogenic acid、Quercetin 3-(6-malonylglucoside)、Kaempferol

3-(6-malonylglucoside)的分配係數值(K_D)

MTBE/Acetone/H ₂ O 加 formic acid	6 : 4 : 10 加 0.2% (v/v) formic acid	6 : 4 : 10 加 0.6% (v/v) formic acid	6 : 4 : 10 加 1.0% (v/v) formic acid
Chlorogenic acid	0.38	0.23	0.68
Quercetin 3-(6-malonylglucoside)	0.56	0.54	0.80
Kaempferol 3-(6-malonylglucoside)	1.34	1.13	1.37

4.5.1 sample 1 分離結果

sample 1 中主要包含 Isoquercitrin 和 Astragalalin 兩個成分，我們已找出分離 sample 1 的 CPC 最佳化條件(表 4-4)，選用 MTBE / Acetone / H₂O 這組溶劑系統的原因，主要是因為溶劑極性所適合分離的樣品範圍，包含目標物的成分，溶劑組成的體積比(MTBE / Acetone / H₂O = 6 : 4 : 10)是經由多次嘗試後，發現此組比例，目標物可以得到最佳的分配係數值(表 4-5)。由表中可知 K_D 值都小於 1，表示樣品傾向分佈在下層相，故最後選擇以 descending mode 作為實驗條件。管柱總體積 220 mL，靜相滯留量大約 187 mL，表示靜相滯留率可高達 85%。

表4-4、CPC分離sample 1的實驗參數

溶劑系統	(MTBE / Acetone / H ₂ O = 6 : 4 : 10)
流動模式	Descending mode (下層相當動相)
樣品進樣量	5 mL (75 mg 溶於 6 mL 的動相)
轉速	900 rpm
流速	1.0 mL/min
偵測波長	350 nm

表 4-5、Isoquercitrin 和 Astragalín 兩種成分在溶劑系統(MTBE / Acetone / H₂O = 6 : 4 : 10)的分配係數值

	Isoquercitrin	Astragalín
分配係數(K_D)	0.23	0.45

經由上述實驗參數進行 CPC 分離 sample 1, 所得到的結果(圖 4-14)可明顯觀察出存在 I、II、III 三個波峰, 使用分管收集器收集這三個波峰, 先將分管收集器設定在第 45 分鐘前的沖提溶液不作收集, 之後設定每 3 分鐘收集一管, 波峰 I 收集 51-69 min(3-8 管); 波峰 II 收集 75-99 min(11-18 管); 波峰 III 收集 114-141 min(24-32 管), 然後進一步做 HPLC 分析。由 HPLC 層析圖(圖 4-15)可得知, 波峰 I 所含蓋的都是屬於極性較大的化合物, 分配係數值較小, 所以最先被沖提出管柱外; 波峰 II 主要是 Isoquercitrin 成分, 且純度是 94.0%; 波峰 III 則以 Astragalín 成分為主, 純度有 97.0%。經由 CPC 製備分離的兩個成分, 純度都可到達 90% 以上, 比起一般的 silica gel chromatography 方法[38], 樣品可以擁有更純化的結果。

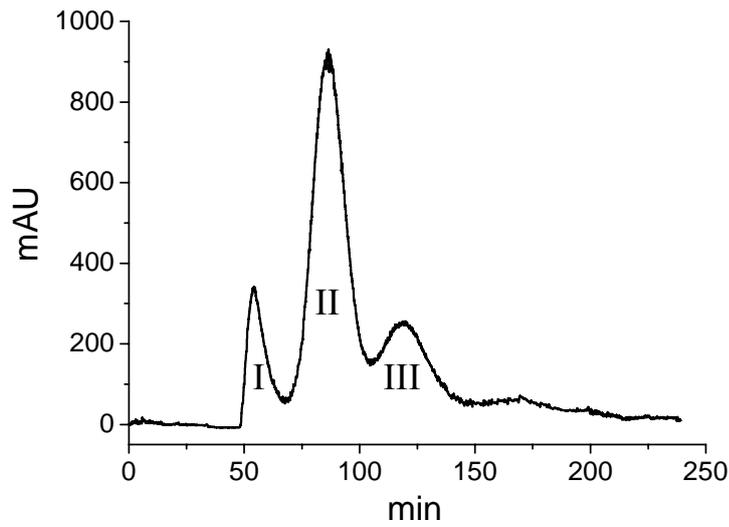


圖4-14、CPC分離sample 1的層析圖

波峰 I 收集 51-69 min(3-8 管)；波峰 II 收集 75-99 min(11-18 管)；波峰 III 收集 114-141 min(24-32 管)。

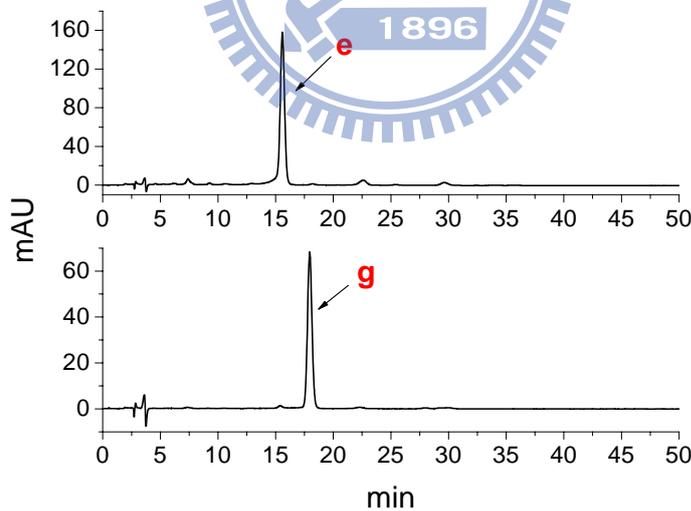


圖4-15、HPLC分析波峰II和波峰III的層析圖

上圖：波峰 II 主要包含 e (Isoquercitrin) 成分。

下圖：波峰 III 主要包含 g (Astragalin) 成分。

4.5.2 sample 2 分離結果

sample 2 中主要包含 Chlorogenic acid、Quercetin 3-(6-malonylglucoside)和 Kaempferol 3-(6-malonylglucoside)三個成分，已找出分離 sample 2 的 CPC 最佳化條件(表 4-6)，溶劑系統(MTBE / Acetone / H₂O = 6 : 4 : 10)加 0.6% (v/v)formic acid 的組成比例，使得這三個目標物可以得到最佳的分配係數值(表 4-7)。靜相滯留量大約 185 mL，表示靜相滯留率也可高達 85%。

表4-6、CPC分離sample 2的實驗參數

溶劑系統	(MTBE / Acetone / H ₂ O = 6 : 4 : 10) 加 0.6% (v/v) formic acid
流動模式	Descending mode (下層相當動相)
樣品進樣量	5 mL (73 mg 溶於 6 mL 的動相)
轉速	900 rpm
流速	1.0 mL/min
偵測波長	350 nm

表 4-7、Chlorogenic acid、Quercetin 3-(6-malonylglucoside) 和 Kaempferol 3-(6-malonylglucoside) 三種成分在溶劑系統(MTBE / Acetone / H₂O = 6 : 4 : 10) 加0.6% (v/v) formic acid的分配係數值

	Chlorogenic acid	Quercetin 3-(6-malonylglucoside)	Kaempferol 3-(6-malonylglucoside)
分配係數(K_D)	0.23	0.54	1.13

經由上述實驗參數進行CPC分離 sample 2, 所得到的結果(圖 4-16) 可明顯觀察出存在 A、B、C、D 四個波峰, 同樣使用分管收集器收集這四個波峰, 先將分管收集器設定在第 45 分鐘前的沖提溶液不作收集, 之後設定每 3 分鐘收集一管, 波峰 A 收集 51-66 min(3-7 管); 波峰 B 收集 72-90 min(10-15 管); 波峰 C 收集 105-129 min(21-28 管); 波峰 D 收集 180-252 min(46-69 管), 然後進一步做 HPLC 分析。由 HPLC 層析圖(圖 4-17)可得知, 波峰 A 所含蓋的都是屬於極性較大的化合物, 所以最容易被沖提出管柱外, 其中包含了 Rutin 這個成分, 由於 Rutin 存在的量很少, 所以並沒有額外分離出 Rutin 化合物; 波峰 B 主要是 Chlorogenic acid 成分, 且純度可達到 98.0%; 波峰 C 則以 Quercetin 3-(6-malonylglucoside) 成分為主, 純度有 93.5%; 波峰 D

則是 Kaempferol 3-(6-malonylglucoside)成分，純度有 92.5%。經由 CPC 製備分離的三個成分，純度也都可到達 90%以上，因此樣品確實具有被純化的效果。

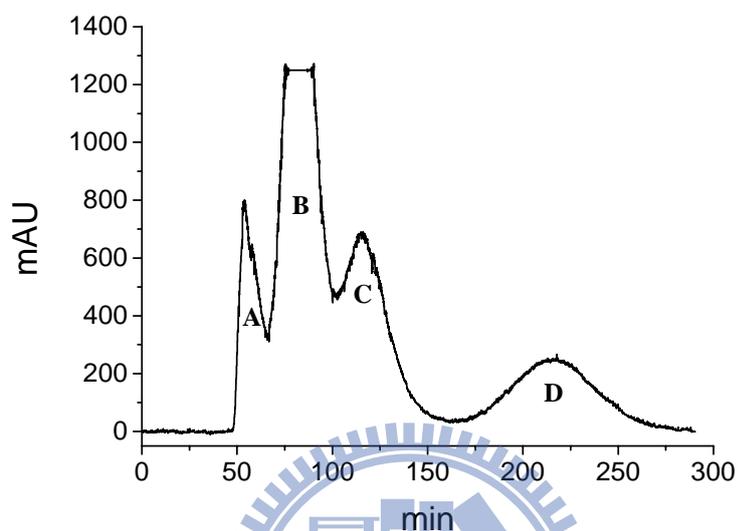
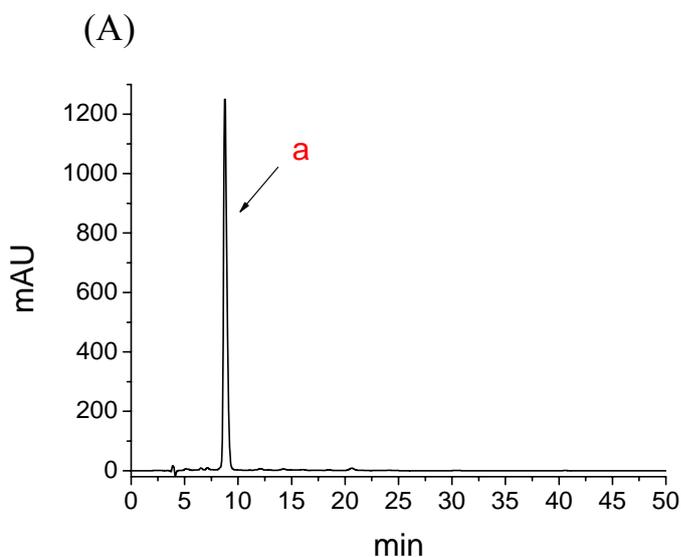


圖4-16、CPC分離sample 2的層析圖

波峰 A 收集 51-66 min(3-7 管)；波峰 B 收集 72-90 min(10-15 管)；波峰 C 收集 105-129 min(21-28 管)；波峰 D 收集 180-252 min(46-69 管)。



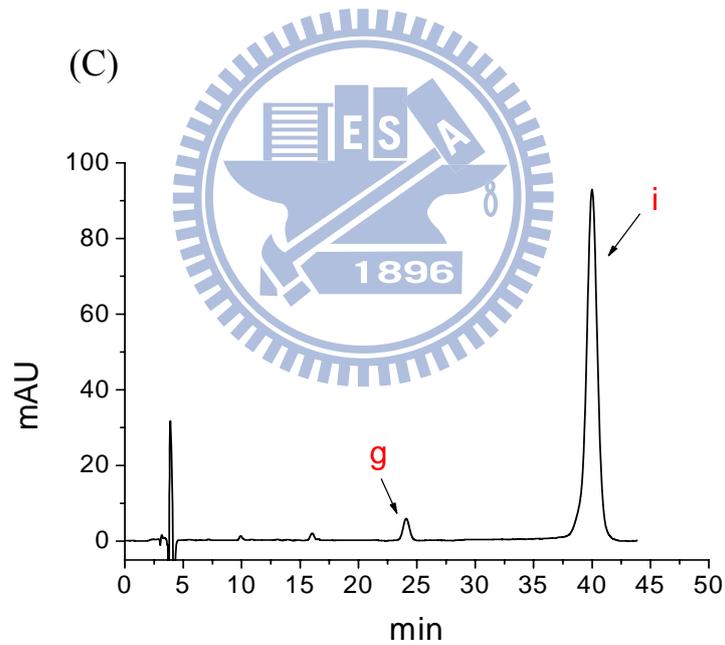
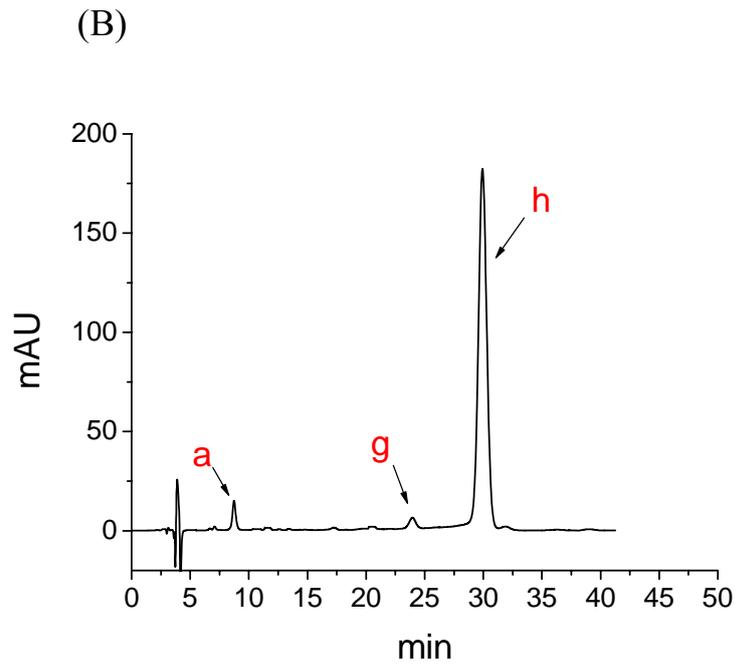


圖4-17、HPLC分析波峰B、波峰C和波峰D的層析圖

- (A) 波峰 B 主要包含 a (Chlorogenic acid)成分。
- (B) 波峰 C 主要包含 h [Quercetin 3-(6-malonylglucoside)]成分。
- (C) 波峰 D 主要包含 i [Kaempferol 3-(6-malonylglucoside)]成分。

4.6 以 NMR 鑑定桑葉成分的結構

為了增加個別成分的量，以達到測 NMR 所需的量，將 150 mg 樣品分別溶在 6 mL 動相中，進樣於 5 mL sample loop，經由 CPC 製備分離並收集 a、e、g、h、i 五個目標物，分別收集五次後，再用減壓迴旋蒸餾把溶劑抽乾，然後由 ^1H 和 ^{13}C NMR 做結構鑑定。雖然先前已由偵測質譜結果可初步確認這五個成分，藉由進一步偵測 NMR 來更加證實這五個目標物的結構。在 NMR 實驗中，選擇 $\text{DMSO-}d_6$ 當作溶解樣品的溶劑，偵測後的結果分別可得到 Chlorogenic acid、Isoquercitrin、Astragalin、Quercetin 3-(6-malonylglucoside) 和 Kaempferol 3-(6-malonylglucoside) ^1H 和 ^{13}C NMR 圖譜，進一步與參考文獻[3；39；40]做比對，並在圖譜標記上個別結構訊號出現的位置，由結果發現，不論是 ^1H 或 ^{13}C NMR 圖譜，文獻中提及的訊號，幾乎都可以在圖 4-18~4-27 的 NMR 圖譜中顯示出。

4.6.1 以 NMR 鑑定 Chlorogenic acid 結構[39]

Chlorogenic acid 的結構標記分為兩個部份，由偵測 NMR 結果發現(圖 4-18；4-19)，文獻上所提到的訊號在綠原酸的 ^1H 和 ^{13}C NMR 圖譜中都可被觀察到，但因為樣品的純度不是 100%，所以其它的訊號可能是雜質所造成。其中綠原酸-OH 官能基上氫的訊號在文獻中和本實驗之 NMR 結果中都未偵測到，在之後探討中會加以解釋。在 ^1H NMR 圖譜中，3 ~ 4 ppm 存在一個較強訊號，是 DMSO- d_6 溶劑訊號；而 ^{13}C NMR 溶劑訊號則出現在 40 ppm 左右的位置。 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) : δ 7.42 (1H, d, $J = 16$ Hz, H-7 caffeoyl), 7.03 (1H, d, $J = 2$ Hz, H-2 caffeoyl), 6.98 (1H, dd, $J = 2$ and 8 Hz, H-6 caffeoyl), 6.77 (1H, d, $J = 8$ Hz, H-5 caffeoyl), 6.15 (1H, d, $J = 16$ Hz, H-8 caffeoyl), 5.08 (1H, br d, $J = 5$ Hz, H-3' quinic), 3.94 (1H, br s, H-5' quinic), 3.55 (1H, br d, $J = 4$ Hz, H-4' quinic), 1.7-2.1 (2H, m, H-6' quinic), 1.98 (2H, br d, $J = 5$ Hz, H-2' quinic) ; ^{13}C NMR (500 MHz, DMSO- d_6) : δ 174.9 (C-7' quinic), 165.7 (C-9 caffeoyl), 148.3 (C-4 caffeoyl), 145.5 (C-3 caffeoyl), 144.8 (C-7 caffeoyl), 125.6 (C-1 caffeoyl), 121.2 (C-6 caffeoyl), 115.7 (C-5 caffeoyl), 114.7 (C-2 caffeoyl), 114.3 (C-8 caffeoyl), 73.6 (C-1' quinic), 70.9 (C-3' quinic), 70.6 (C-4' quinic), 68.3 (C-5' quinic), 37.2 (C-6' quinic), 36.5 (C-2' quinic).

圖4-18、Chlorogenic acid的500 MHz ^1H NMR圖譜

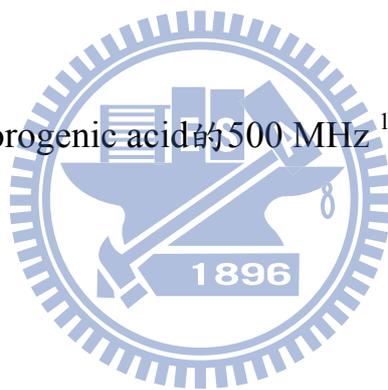


圖4-19、Chlorogenic acid的500 MHz ^{13}C NMR圖譜

4.6.2 以 NMR 鑑定 Isoquercitrin 結構[40]

Isoquercitrin 的結構標記分為三個部份，根據偵測 NMR 結果發現 (圖 4-20；4-21)，文獻上所提到的訊號在 Isoquercitrin 的 ^1H 和 ^{13}C NMR 圖譜中都可被觀察到，但因為樣品的純度不是 100%，所以其它的訊號可能是雜質所造成。其中 Isoquercitrin -OH 官能基上氫的訊號在文獻中和本實驗之 NMR 結果中都未偵測到，只有 5 號位置-OH 官能基上氫的訊號會顯示出在 12.65 ppm 處，在之後探討中會加以解釋。同樣在 ^1H NMR 圖譜中，3~4 ppm 存在一個較強訊號，是 DMSO- d_6 溶劑訊號；而 ^{13}C NMR 溶劑訊號則出現在 40 ppm 左右的位置。 ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) : δ 12.65 (1H, s, 5-OH), 7.69–7.57 (2H, m, H-2', 6'), 6.85 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-5'), 6.40 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-8), 6.20 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-6), 5.48 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, H-1'') ; ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) : δ 156.7 (C-2), 133.9 (C-3), 177.9 (C-4), 161.7 (C-5), 99.1 (C-6), 164.6 (C-7), 94.0 (C-8), 156.8 (C-9), 104.5 (C-10), 121.1 (C-1'), 115.7 (C-2'), 145.3 (C-3'), 148.9 (C-4'), 116.7 (C-5'), 121.7 (C-6'), 101.4 (C-1''), 74.6 (C-2''), 77.0 (C-3''), 70.5 (C-4''), 78.0 (C-5''), 61.5 (C-6'').

圖4-20、Isoquercitrin的500 MHz ^1H NMR圖譜

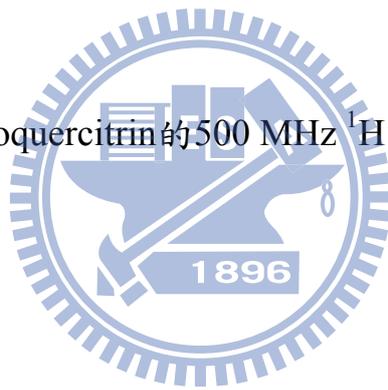


圖4-21、Isoquercitrin的500 MHz ^{13}C NMR圖譜

4.6.3 以 NMR 鑑定 Astragalín 結構[40]

Astragalín 的結構標記分為三個部份，根據偵測 NMR 結果發現(圖 4-22；4-23)，文獻上所提到的訊號在 Astragalín 的 ^1H 和 ^{13}C NMR 圖譜中都可被偵測到，但因為樣品的純度不是 100%，所以其它的訊號可能是雜質所造成。其中 Astragalín -OH 官能基上氫的訊號在文獻中和本實驗之 NMR 結果中都未偵測到，只有 5 號位置-OH 官能基上氫的訊號會顯示出在 12.62 ppm 處，在之後探討中會加以說明。在 ^1H NMR 圖譜中，3 ~ 4 ppm 存在一個較強訊號，是 DMSO- d_6 溶劑訊號；而 ^{13}C NMR 溶劑訊號則出現在 40 ppm 左右的位置。 ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) : δ 12.62 (1H, s, 5-OH), 8.05 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2', 6'), 6.90 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', 5'), 6.44 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-8), 6.21 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-6), 5.47 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1'') ; ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) : δ 156.9 (C-2), 133.7 (C-3), 178.0 (C-4), 161.7 (C-5), 99.2 (C-6), 164.6 (C-7), 94.1 (C-8), 156.8 (C-9), 104.5 (C-10), 121.4 (C-1'), 131.4 (C-2', 6'), 115.6 (C-3', 5'), 160.4 (C-4'), 101.4 (C-1''), 74.7 (C-2''), 76.9 (C-3''), 70.4 (C-4''), 78.0 (C-5''), 61.4 (C-6'').

圖4-22、Astragalin的500 MHz ^1H NMR圖譜



圖4-23、Astragalin的500 MHz ^{13}C NMR圖譜

4.6.4 以 NMR 鑑定 Quercetin 3-(6-malonylglucoside) 結構[39]

Q3MG 的結構較複雜所以標記分為四個部份，根據偵測 NMR 結果發現(圖 4-24；4-25)，文獻上所提到的訊號在 Q3MG 的 ^1H 和 ^{13}C NMR 圖譜中都可被偵測到，因為樣品的純度不是 100%，所以其它的訊號可能是雜質所造成。但在 ^{13}C NMR 圖譜中觀察到，雜訊的訊號有些似乎特別強，與 Chlorogenic acid ^{13}C NMR 結果做比對後，發現 Q3MG ^{13}C NMR 圖譜存在的兩個雜訊訊號 174.9 ppm 和 70.6 ppm，同樣也存在於 Chlorogenic acid ^{13}C NMR 圖譜中，根據比對後判斷，174.9 ppm 和 70.6 ppm 則是屬於 Chlorogenic acid 的結構訊號。會造成此現象的發生，主要是因為偵測 NMR 的樣品量需要很多，在 CPC 製備分離後，分管收集 Q3MG 的過程中，由於 Q3MG 的 peak 和 Chlorogenic acid 的 peak 相鄰，所以大量收集時會同時收集到部份的 Chlorogenic acid 成分，才會造成 Q3MG ^{13}C NMR 圖譜中出現 Chlorogenic acid 的結構訊號。也發現 Q3MG -OH 官能基上氫的訊號在文獻中和本實驗之 NMR 結果中都未偵測到，在之後探討中會加以解釋。在 ^1H NMR 圖譜中，3 ~ 4 ppm 存在一個較強訊號，是 DMSO- d_6 溶劑訊號；而 ^{13}C NMR 溶劑訊號則出現在 40 ppm 左右的位置。 ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) : δ 7.52 (1H, d, $J = 2$ Hz, H-2'), 7.49 (1H, dd, $J = 2$ and 9Hz, H-6'), 6.84 (1H, d, $J = 9$ Hz, H-5'), 6.40 (1H, d, $J = 2$ Hz, H-8), 6.20 (1H, d, $J =$

2 Hz, H-6), 5.39 (1H, d, $J = 8$ Hz, H-1''), 4.21 (1H, dd, $J = 11$ and 1.5 Hz, H-6_A''), 4.03 (1H, dd, $J = 11$ and 5 Hz, H-6_B''), 3.10 (2H, s, CH₂ malonyl) ;
¹³C NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 177.3 (C-4), 167.7 (CO malonyl), 166.5 (CO malonyl), 164.1 (C-7), 161.2 (C-5), 156.3 (C-2 and C-9), 148.4 (C-4'), 144.7 (C-3'), 133.1 (C-3), 121.5 (C-1'), 121.0 (C-6'), 116.1 (C-5'), 115.1 (C-2'), 103.9 (C-10), 101.0 (C-1''), 98.7 (C-6), 93.5 (C-8), 76.1 (C-3''), 73.9 (C-2'' and C-5''), 69.5 (C-4''), 63.6 (C-6''), 41.0 (CH₂ malonyl).

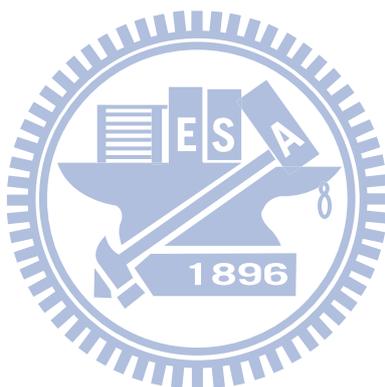
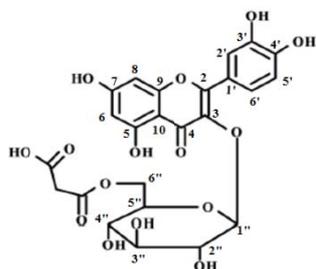


圖4-24、Quercetin 3-(6-malonylglucoside)的500 MHz ¹H NMR圖譜

圖4-25、Quercetin 3-(6-malonylglucoside)的500 MHz ^{13}C NMR圖譜



4.6.5 以 NMR 鑑定 Kaempferol 3-(6-malonylglucoside) 結構[3]

K3MG 的結構較複雜所以標記分為四個部份，根據偵測 NMR 結果發現(圖 4-26；4-27)，文獻上所提到的訊號在 K3MG 的 ^1H 和 ^{13}C NMR 圖譜中都可被偵測到，因為樣品的純度不是 100%，所以其它的訊號可能是雜質所造成。其中 K3MG -OH 官能基上氫的訊號在文獻中和本實驗之 NMR 結果中都未偵測到，在之後探討中會加以說明。在 ^1H NMR 圖譜中，3~4 ppm 存在一個較強訊號，是 DMSO- d_6 溶劑訊號；而 ^{13}C NMR 溶劑訊號則出現在 40 ppm 左右的位置。 ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ 7.51 (2H, d, H-2', 6'), 6.86 (2H, d, H-3', 5'), 6.39 (1H, d, $J = 2$ Hz, H-8), 6.22 (1H, d, $J = 2$ Hz, H-6), 5.40 (1H, d, $J = 8$ Hz, H-1''), 4.22 (1H, dd, $J = 11$ and 1.5 Hz, H-6_A"), 4.01 (1H, dd, $J = 11$ and 5 Hz, H-6_B"), 3.08 (2H, s, CH₂ malonyl); ^{13}C NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 177.3 (C-4), 167.7 (CO malonyl), 166.5 (CO malonyl), 164.2 (C-7), 161.2 (C-5), 156.3 (C-2 and C-9), 148.8 (C-4'), 133.1 (C-3), 121.5 (C-2' and C-6'), 120.7 (C-1'), 115.0 (C-3' and C-5'), 103.9 (C-10), 101.1 (C-1''), 98.7 (C-6), 93.7 (C-8), 76.1 (C-3''), 74.0 (C-2'' and C-5''), 69.5 (C-4''), 63.5 (C-6''), 41.0 (CH₂ malonyl).

圖4-26、Kaempferol 3-(6-malonylglucoside)的500 MHz ^1H NMR圖譜



圖4-27、Kaempferol 3-(6-malonylglucoside)的500 MHz ^{13}C NMR圖譜

4.6.6 探討 ^1H NMR 圖譜中-OH 官能基上氫訊號消失的原因

根據文獻[39;40]提供的 NMR 數據以及上述五張 500 Hz ^1H NMR 圖譜發現一個共同點，這五個目標化合物中-OH 官能基上氫訊號未被偵測到，進一步探討氫訊號消失的可能原因，或許是-OH 官能基上的氫較易受到周遭環境的影響，在 NMR 實驗中，選擇 DMSO- d_6 當作溶解樣品的溶劑，可能因為 DMSO- d_6 溶劑中含水，使得-OH 官能基上的氫容易解離，而造成氫訊號消失的結果。但在上述 ^1H NMR 圖譜中發現，圖 4-20 和 4-22 的 5 號位置-OH 官能基上的氫訊號則可被偵測到， δ 12.65 (1H, s, 5-OH)，推測可能是因為 4 號位置的 C=O 鍵與 5 號位置的-OH 官能基之間產生了分子內氫鍵作用力，所以-OH 上的氫才不易被解離，因此才可被觀察到。

4.7 純度的探討

經由 CPC 大量分離桑葉中的五種成分，然後分管收集並進行 HPLC 偵測，就可分別得到層析圖，再依照上述純度的計算就可獲得五個目標物的純度(表 4-8)。

表4-8、利用CPC製備分離、純化桑葉中五種成分之純度

	純度
(a) Chlorogenic acid	98.0%
(e) Isoquercitrin	94.0%
(g) Astragalin	97.0%
(h) Quercetin 3-(6-malonylglucoside)	93.5%
(i) Kaempferol 3-(6-malonylglucoside)	92.5%

4.8 回收率的探討

在 20.0 g 的乾燥桑葉中，經由前處理後分別可得到 sample 1 和 sample 2 的量為 225.0 mg 和 146.0 mg，經由個別進樣 75.0 mg 和 73.0 mg 的樣品量於 CPC 做製備分離，並計算回收率(表 4-9；4-10)。

表4-9、利用CPC製備分離、純化sample 1之回收率

	樣品 進樣量	估計 回收量	真正 回收量	回收率
(e) Isoquercitrin	75.0 mg	40.9 mg	31.9 mg	78%
(g) Astragalin	75.0 mg	25.9 mg	18.9 mg	73%

表4-10、利用CPC製備分離、純化sample 2之回收率

	樣品 進樣量	估計 回收量	真正 回收量	回收率
(a) Chlorogenic acid	73.0 mg	37.5 mg	29.6 mg	79%
(h) Quercetin 3-(6-malonylglucoside)	73.0 mg	19.4 mg	14.0 mg	72%
(i) Kaempferol 3-(6-malonylglucoside)	73.0 mg	13.9 mg	11.5 mg	83%

第五章 結論

本實驗的主要目的，是以離心分配層析來製備分離、純化桑葉中五種具有療效的成分，包括 Chlorogenic acid、Isoquercitrin、Astragalin、Quercetin 3-(6-malonylglucoside)、Kaempferol 3-(6-malonylglucoside) 等，經由偵測 ESI-MS 已可初步確認這些成分結構。這些成分的功效包括：Chlorogenic acid 可以減緩釋放葡萄糖進入血液中；Isoquercitrin 能抑制肥胖細胞的去顆粒化；Astragalin 可有效減少發炎反應；Q3MG 和 K3MG 具有預防罹患動脈粥樣硬化之相關病症。

由於桑葉中的成分相當複雜，所以藉由 EA 和 H₂O 初步的批式萃取除去極性較大的化合物，使欲分離的目標物單純化，因此更容易嘗試出最佳化的溶劑系統。本實驗使用兩組 CPC 的溶劑系統，分別是 (MTBE/acetone/H₂O = 6 : 4 : 10) 和 (MTBE/acetone/H₂O = 6 : 4 : 10) 額外加入溶劑系統總體積 0.6% (v/v) 的 formic acid，都是以 descending mode 進行操作，靜相滯留率均可以高達 85% 以上，實驗結果可成功分離出五種有效成分，且純度在 90% 以上，本實驗雖然採取相對小量的製備，但 CPC 具有在實驗條件不變的情況下容易被放大之特性。最後再藉由 NMR 進一步做結構鑑定。

在本實驗中這五種目標物的純度仍無法到達 99% 以上，若要提高純度，未來還可以將第一次分管收集回收的樣品，再嘗試尋找另一組合適的溶劑系統，然後藉由 HPLC 的分析，並計算出 K_D 值，若欲分離的目標物在選用的 CPC 溶劑系統中有好的分佈 (K_D 值介於 0.2~5 之間)，就可再進行一次 CPC 的製備分離，經由分管收集然後進行 HPLC 的分析並計算純度，希望可達到純度提高的效果。



参考文献

- [1] Z. S. Jia, M. C. Tang, J. M. Wu, "The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals". *Food Chem.* 64 (1995) 555–559.
- [2] K. Doi, T. Kojima, M. Makino, Y. Kimura, Y. Fujimoto, "Studies on the constituents of the leaves of *M. alba* L.". *Chem. Pharm. Bull.* 49 (2001) 151–153.
- [3] T. Katsube, Y. Tsurunaga, M. Sugiyama, T. Furuno, Y. Yamasaki, "Effect of air-drying temperature on antioxidant capacity and stability of polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.) leaves". *Food Chem.* 113 (2009) 964–969.
- [4] T. Matsuoka, T. Kimura, N. Muraoka, "Research of the available constituents from mulberry tree". *Tohoku Agricultural Research* 47 (1994) 361–362.
- [5] A. Onogi, K. Osawa, H. Yasuda, A. Sakai, H. Morita, H. Itokawa, "Flavonol glycosides from the leaves of *M. alba* L.". *Shoyakugaku Zasshi* 47 (1993) 423–425.
- [6] B. Enkhmaa, K. Shiwaku, T. Katsube, K. Kitajima, E. Anuurad, M. Yamasaki, Y. Yamane, "Mulberry (*Morus alba* L.) Leaves and Their Major Flavonol Quercetin 3-(6-Malonylglucoside) Attenuate Atherosclerotic Lesion Development in LDL Receptor-Deficient Mice". Shimane Institute for Industrial Technology, Matsue City, Shimane 690-0816, Japan.
- [7] W. Zheng, M. N. Clifford, "Profiling the chlorogenic acids of sweet potato (*Ipomoea batatas*) from China". *Food Chem.* 106 (2008) 147–152.
- [8] K. L. Johnston, M. N. Clifford, L. M. Morgan, "Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: Glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine". *Am. J. Clinical Nutrition* 78 (2003) 728–733.

- [9] K. L. Johnston, M. N. Clifford, L. M. Morgan, "Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: Glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine". *Am. J. Clinical Nutrition* 78 (2003) 728–733.
- [10] T. Koda, Y. Kuroda, H. Imai, "Protective effect of rutin against spatial memory impairment induced by trimethyltin in rats". *Nutrition Research* 28 (2008) 629–634.
- [11] C. L. Casa, I. Villegas, C. A. Lastra, V. Motilva, M. Calero, "Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions". *J. Ethnopharmacol.* 71 (2000) 45-53.
- [12] N. Kamalakkannan, P. Prince, "Rutin improves the antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rat tissues". *Mol. Cell Biochem* 293 (2006) 211-9.
- [13] C. G. Silva, R. J. Raulino, D. M. Cerqueira, S. C. Mannarino, M. D. Pereira, A. D. Panek, J. F. M. Silva, F. S. Menezes, E. C. A. Eleutherio, "In vitro and in vivo determination of antioxidant activity and mode of action of isoquercitrin and Hyptis fasciculata". *Phytomedicine* 16 (2009) 761–767.
- [14] W.H. Mager, J. Winderickx, "Yeast as a model for medical and medicinal research". *Trends Pharmacol. Sci.* 26 2005 265–273.
- [15] M. Kotani, M. Matsumoto, A. Fujita, S. Higa, W. Wang, M. Suemura, T. Kishimoto, T. Tanaka, "Persimmon leaf extract and astragaloside inhibit development of dermatitis and IgE elevation in NC/Nga mice". *J. Allergy Clin. Immunol.* July (2000).
- [16] K. Ishiguro, H. Oku, "Antipruritic effect of flavonol and 1,4-naphthoquinone derivatives from *Impatiens balsamina* L.". *Phytother Res* 11 (1997) 343-7.

- [17] L. Wang, Y. C. Tu, T. W. Lian, J. T. Hung, J. H. Yen, M. J. Wu,. "Distinctive antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonols". J. Agric and Food Chem. 54 (2006) 9798-9804.
- [18] F. Li, F. Wang, F. Yu, Y. Fang, Z. Xin, F. Yang, J. Xu, L. Zhao, Q. Hu, "In vitro antioxidant and anticancer activities of ethanolic extract of selenium-enriched green tea". Food Chem. 111 (2008) 165-170.
- [19] S. Komatsu, N. Ahsan, "Soybean proteomics and its application to functional analysis". J Proteomics 72 (2009) 325 – 336.
- [20] A. Panossian, G. Wikman, "Pharmacology of *Schisandra chinensis* Bail.: An overview of Russian research and uses in medicine". J Ethnopharmacology 118 (2008) 183-212.
- [21] Y. Ito, "Development of Countercurrent Chromatography". Anal. Chem.(1984), (56), 534-551.
- [22] Y. Ito, N. B. Mandava, "Countercurrent Chromatography : Theory and Practice ". Marcel Dekker, Inc., New York, (1998).
- [23] W. D. Conway, "Countercurrent Chromatography : Theory and Applications". VCH Publishers, Inc., (1990).
- [24] Y. Ito, W. D. Conway, "High-Speed Countercurrent Chromatography". John Wiley & Sons, Inc., (1996).
- [25] E. Delannay, A. Toribio, L. Boudesocque, J. M. Nuzillard, Z. H. Monique, E. Dardennes, G. L. Dour, J. Sapi, J. H. Renault, "Multiple dual-mode centrifugal partition chromatography, a semi-continuous development mode for routine laboratory-scale purifications". J. Chromatogr. A, 1127 (2006) 45–51.

- [26] E. Delannay, A. Toribio, L. Boudesocque, J. M. Nuzillard, M. Hanrot, E. Dardennes, G. L. Dour, J. Sapi, J. H. Renault, "Multiple dual-mode centrifugal partition chromatography, a semi-continuous development mode for routine laboratory-scale purifications". *J. Chromatogr. A* 1127 (2006) 45–51.
- [27] E. Gavioli, N. M. Maier, C. Minguillo'n, and W. Lindner, "Preparative Enantiomer Separation of Dichlorprop with a Cinchona-Derived Chiral Selector Employing Centrifugal Partition Chromatography and High-Performance Liquid Chromatography: A Comparative Study". *Anal. Chem.* (2004), 76, 5837-5848.
- [28] J. B. Friesen, G. F. Pauli, "Rational development of solvent system families in counter-current chromatography". *J. Chromatogr. A*, 1151 (2007) 51–59.
- [29] Y. Ito, "Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography". *J. Chromatogr. A*, 1065 (2005) 145–168.
- [30] W. D. Conway, Y. Ito, "Resolution in Countercurrent Chromatography". *J. Liq. Chromatogr.* (1985), 8, (12), 2198-2207.
- [31] J. C. Delaunay, C. Castagnino, C. Che`ze, J. Vercauteren, "Preparative isolation of polyphenolic compounds from *Vitis vinifera* by centrifugal partition chromatography". *J. Chromatogr. A*, 964 (2002) 123–128.
- [32] N. Rubio, C. Minguillon, "Preparative enantioseparation of (\pm)-N-(3,4-cis-3-decyl-1,2,3,4-tetrahydrophenanthren-4-yl)-3,5-dinitrobenzamide by centrifugal partition chromatography". *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 1183-1190.
- [33] G. C. Yen, S. C. Wu, P. D. Duh, "Extraction and Identification of Antioxidant Components from the Leaves of Mulberry (*Morus alba* L.)". *J. Agric. Food Chem.*, (1996), 44.

- [34] H. Y. Lin, L. S. Lai, "Isolation and viscometric characterization of hydrocolloids from mulberry (*Morus alba* L.) leaves". *Food Hydrocolloids* 23 (2009) 840–848.
- [35] T. Katsube, N. Imawaka, Y. Kawano, Y. Yamazaki, K. Shiwaku, Y. Yamane, "Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*Morus alba* L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity". *Food Chem.* 97 (2006) 25–31.
- [36] W. Zhi, Q. Deng, "Purification of salvianolic acid B from the crude extract of *Salvia miltiorrhiza* with hydrophilic organic/salt-containing aqueous two-phase system by counter-current chromatography". *J. Chromatogr. A*, 1116 (2006) 149–152.
- [37] N. Rubioa, S. Ignatovac, C. Minguillona, I. A. Sutherlandc, "Multiple dual-mode countercurrent chromatography applied to chiral separations using a (S)-naproxen derivative as chiral selector". *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 8505-8511.
- [38] B. Pinel, G. Audob, S. Mallet, M. Lavault, F. D. L. Poype, D. S'eraphin, P. Richommea, "Multi-grams scale purification of xanthanolides from *Xanthium macrocarpum* Centrifugal partition chromatography versus silica gel chromatography". *J. Chromatogr. A*, 1151 (2007) 14–19.
- [39] K. Azuma, M. Nakayama, M. Koshioka, K. Ippoushi, Y. Yamaguchi, K. Kohata, Y. Yamauchi, H. Ito, H. Higashio, "Phenolic Antioxidants from the Leaves of *Corchorus olitorius* L". *J. Agric. Food Chem.* (1999), 47, 3963-3966.
- [40] S. Deng, Z. Deng, Y. Fan, Y. Peng, J. Li, D. Xiong, R. Liu, "Isolation and purification of three flavonoid glycosides from the leaves of *Nelumbo nucifera* (Lotus) by high-speed counter-current chromatography". *J. Chromatogr. B*, 877 (2009) 2487-2492.