

(此處由本局於收
文時黏貼條碼)

發明專利說明書

200528093

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：93/05094

※申請日期：93.2.27

※IPC 分類：A61K 31/40, 31/34

壹、發明名稱：(中文/英文)

A61K 35/78

來自牛樟芝(*ANTRODIA CAMPHORATA*)菌絲體之新穎混合物與化合物及

其用途/ NOVEL MIXTURE AND COMPOUNDS FROM MYCELIA OF

ANTRODIA CAMPHORATA AND USE THEREOF

貳、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

善笙生物科技股份有限公司/SIMPSON BIOTECH CO., LTD

代表人：(中文/英文) 許嘉欽/ Sheu, Chia Chin

住居所或營業所地址：(中文/英文)

桃園縣 333 龜山鄉文明二街 1 之 1 號/#1-1, Wen-Min 2nd St., Kuei Shan Hsiang,

Taoyuan County, 333 Taiwan R.O.C.

國 籍：(中文/英文) 中華民國/R. O. C.

參、發明人：(共 2 人)

姓 名：(中文/英文)

服部征雄/Masao Hattori

住居所地址：(中文/英文)

日本 930-0194 青山縣 Sugitani 2630/2630, Sugitani, Toyama 930-0194, Japan

國 籍：(中文/英文) 日本/Japan

姓 名：(中文/英文)

許嘉欽/ Sheu, Chia Chin

住居所地址：(中文/英文)

桃園縣 333 龜山鄉文明二街 1 之 1 號/#1-1, Wen-Min 2ndSt., Kuei Shan Hsiang,
Taoyuan County, 333 Taiwan R.O.C.

國 籍：(中文/英文) 中華民國/R.O.C.

肆、聲明事項：

☐ 本案係符合專利法第二十條第一項 ☐ 第一款但書或 ☐ 第二款但書規定之期間，其日期為： 年 月 日。

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 ☐ 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 2004. 03. 09 德國 UM 20 2004 003 714. 9

2. 2004. 03. 02 日本 2004-58125

3. 2004. 03. 12 韓國 2004-0016924

4.

5.

☐ 主張國內優先權(專利法第二十五條之一)：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

1.

2.

☐ 主張專利法第二十六條微生物：

☐ 國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

玖、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種來自牛樟芝 (*Antrodia Camphorata*) 菌絲體之新穎混合物與化合物及其醫藥用途。本發明另係關於一種包含本發明化合物之組合物或菌絲體。

【先前技術】

在台灣牛樟芝 (Polyporaceae, Aphyllophorales) 之子實體常被用來作為傳統中藥。它僅生長在台灣地方性常綠樟科樹 *Cinnamomun kanehirai* (Hay) (Lauraceae) 之心材壁內層，它很罕見且未被栽培出來。該子實體已經被用來治療食物與藥物中毒、腹瀉、腹痛、高血壓、皮膚疥癬、和肝癌。至今很少有相關之生物活性研究被報導出來。

在台灣，「牛樟芝」又叫「牛樟菇」，根據其子實體之圓柱型擔孢子，虛軟之澱粉體骨架菌絲，苦味和晝生樟樹倒生皮列特 (pileate) 擔子果，以及厚膜孢子與 anthroconidia 在純培養中的特徵，在最近被報導歸類為新的菌種。該新菌種之生長相當緩慢，並侷限於以地方性樹木品種 *Cinnamomum kanehirai* Hay (Lauraceae) 為宿主。牛樟芝之詳細描述與分類見述於 Wu, S.-H. 等人於 1997 年發表在 New combination of a medicinal fungus in Taiwan, Bot. Bull. Acad. Sin. 38: 273-275 之「*Antrodia cinnamomea*」中。

在台灣民俗藥物中，牛樟芝的子實體被認為具有某種程度的醫療效果。子實體依照傳統方法，被製成乾燥粉末或與其他草藥燉煮後經口服用，用來治療因中毒、腹瀉、腹痛、高血壓、皮膚疥癬、和肝癌所引起之症狀。然而並無任何藥理學或臨床研究被記載來佐證這些觀點。因為具明確之宿主與在自然中稀少，以及人工栽培失敗之故，"牛樟芝"在台灣的價格十分昂貴。近年來，具高品質之子實體已被販售至極高的價錢，約是每公斤 15,000 美金。

【發明內容】

發明摘述

本發明之標的物係提供來自牛樟芝菌絲體之新穎混合物。

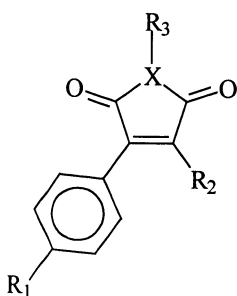
本發明之另一標的物係提供來自牛樟芝菌絲體之新穎化合物。

本發明之進一步標的物係提供包含本發明化合物之新穎組合物。

本發明之進一步標的物係提供包含本發明化合物之新穎牛樟芝菌絲體。

發明詳述

本發明提供一種具下式之化合物



其中

X 係 N 或 O；

R₁ 係 C₁₋₁₀ 烷氧基、C₂₋₁₀ 烯氧基或 C₂₋₁₀ 炔氧基；

R₂ 係 H、C₁₋₁₀ 烷基、C₂₋₁₀ 烯基或 C₂₋₁₀ 炔基；及

R₃ 係無、H 或羥基；

但當 X 係 O 時，則 R₃ 係無。

本發明化合物中，較佳 R₁ 係 C₂₋₆ 烯氧基或 C₂₋₆ 炔氧基；更佳 R₁ 係經 C₁₋₆ 烷基取代 C₂₋₆ 烯氧基而最佳 R₁ 係經甲基取代丁烯氧基。本發明化合物中，較佳 R₂ 係 C₁₋₆ 烷基而最佳 R₂ 係異丁基。是以，本發明之較佳化合物係

3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]呋喃-2,5-二酮；

3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]-1*H*-吡咯-2,5-二酮；

3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]-1*H*-吡咯-1-醇-2,5-二酮；

3*R**, 4*S**-1-羥基-3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]吡咯烷-2,5-二酮；或

3*R**, 4*R**-1-羥基-3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]吡咯烷-2,5-二酮。

本發明之更佳化合物係

3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]-1*H*-吡咯-2,5-二

酮；或

3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]-1*H*-吡咯-1-醇-2,5-二酮。

本發明之最佳化合物係 3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]-1*H*-吡咯-1-醇-2,5-二酮。

本發明亦提供牛樟芝菌絲體之混合物，包括本發明之化合物。本發明之混合物製備牛樟芝菌絲體混合物之水或有機溶劑萃取物。有機溶劑包括但不限於醇類(如 CH_3OH 、 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 或 $\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$)、酯類(如乙酸乙酯)、烷類(如己烷)及鹵烷(如 CH_3Cl 、 $\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_2$)。較佳有機溶劑係乙醇或不會引起人類副作用之醇系溶劑。本發明之混合物可減低收縮壓或增加高密度脂蛋白。此外，相同混合物具有中樞神經膽鹼激動作用、保肝作用、抗發炎或抗腫瘤活性。詳言之，本發明之混合物可抑制選自肝、腸、骨、血、淋巴及乳房之細胞或組織的腫瘤。接受本發明混合物之個體包括但非限於人、哺乳動物、大鼠、小鼠、馬、豬、雞、鴨、狗與貓。

本發明亦提供包含本發明化合物之組合物。本發明之組合物可減低收縮壓或增加高密度脂蛋白。此外，本發明之組合物具有中樞神經膽鹼激動作用、保肝作用、抗發炎或抗腫瘤活性。詳言之，本發明之組合物可抑制選自肝、腸、骨、血、淋巴及乳房之細胞或組織的腫瘤。接受本發明組合物之個體包括但非限於人、哺乳動物、大鼠、小鼠、馬、豬、雞、鴨、狗與貓。

本發明亦提供包含本發明化合物之牛樟芝菌絲體。較佳菌絲體其至少 1% 原菌絲體之重量係本發明化合物 1-5 之總重。更佳菌絲體其至少 3% 原菌絲體之重量係本發明化合物 1-5 之總重。牛樟芝菌絲體係依先前浸入液體發酵(submerged liquid fermentation)製備，浸入液體發酵如 T. L. M. Stamford 等人 Food Science “Protein enrichment of cashew wastes for animal feeds” 來自網站 <http://www.unu.edu/unupress/food/8F101e/8F101E0b.htm>。

【實施方式】

下列實例僅代表本發明之各種態樣及特徵，並非欲限制本發明之範圍。

一般實驗步驟

熔點係以 Yanagimoto 微熔點加熱裝置來測量，且不修改之。光學旋轉度係以 Jasco DIP-360 自動偏極計測量之。紫外光譜係以 Shimadzu UV-2200 分光光度紀錄計測量之。紅外光譜係以 Jasco FT/IR-230 紅外光譜儀測量之。 ^1H - 和 ^{13}C -NMR 之光譜係以 Varian Unity Plus 500 光譜儀測量之。EIMS 和 HR-EIMS 係以 Jeol JMS-AX 505 HAD 質譜儀在 70 eV 之電離電壓下測量之。管柱層析係採用 BW-820MH (正相) 和 Chromatorex-ODS DM1020T (逆相) (Fuji Silysia) 之矽膠凝體。

萃取與分離

取自 2001 年十月從台灣善笙生技公司之牛樟芝粉末菌絲 60 克，以氯仿在 3 小時逆流下萃取三次。氯仿萃取物 (5.3 克) 以矽膠凝體層析，並以正己烷丙酮 (19:1 - 14:6) 和氯仿-甲醇 (1:1) 洗提出九個部份 (Fr. 1-9)。其中第二部份以矽膠凝體層析後標定為 1 (8.7 毫克)，第四部份以正相與逆相之矽膠凝體層析後標定為 2 (13.6 毫克)，第五部份以矽膠凝體層析與正己烷丙酮 (8: 2) 洗提後標定為 6 (35.8 毫克)，第六部分以組合之正相及逆相矽膠凝體管柱層析後標定為 3 (14.6 毫克)，第七部份以管柱層析後產生混合物 4 和 5 (4:1)，混合物 4 和 5 隨後以準備好之 HPLC 分離之 [管柱：Tosoh TSK-gel ODS-80T_M (21.5 x 300 毫米)，移動相：含有 0.1% TFA 之甲醇-水 (70:30)]。

3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]-1*H*-吡咯-2,5-二酮 (化合物 1): 黃色油體; UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 227 (4.1)、258 (3.9)、275 (3.8)、355 (3.4) nm; IR (CHCl₃) $\lambda_{\max}$ 1763 cm⁻¹, 表 1 係 ¹H-NMR; 表 2 係 ¹³C-NMR; EIMS *m/z* 314 [M]⁺ (100)、246 (100)、131 (100); HR-EIMS *m/z* 314.1523 (C₁₉H₂₂O₄ 之計算值: 314.1518)。

3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]-1*H*-吡咯-2,5-二酮 (2):

黃色結晶 (*n*-己烷 - 乙酸乙酯); mp 110-111 °C; UV (甲醇) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 230 (4.3)、272 (3.5)、355 (3.7) nm; IR (CHCl₃)

$\nu_{\max}$ 1724 cm^{-1} ; 表 1 係 ^1H -NMR; 表 2 係 ^{13}C -NMR; EIMS m/z 313 $[\text{M}]^+$ (8)、245 (100)、203 (77)、131 (28); HR-EIMS m/z 313.1681 ($\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_3$ 之計算值:313.1678)。

化合物 2 之 X-射線結晶繞射：

由正己烷-乙酸乙酯結晶而獲得黃色針體且經選出後供數據收集。

結晶數據: $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_3$; $M_r=313.40$; 容積 0.15 x 0.02 x 0.02mm; 三斜, 空間基團 P1 (#2), $a=6.3505(5)$ Å, $b=12.205(1)$ Å, $c=12.560(2)$ Å, $\alpha=64.623(7)^\circ$, $\beta=75.358(4)^\circ$, $\gamma=84.681(5)^\circ$, $V=850.9(2)$ Å³, $Z=2$, $D_{\text{calc}}=1.223$ g/cm³, $\mu(\text{MoK}\alpha)=0.82$ cm⁻¹, $F_{000}=336.00$ 。於 93 K 時放射, 以具有單色石墨之 Rigaku RAXIS-RAPID 影象板衍射計進行測量 Mo-K α ($\lambda=0.71069$ Å)。收集 8950 反射, 4745 係獨特的 ($R_{\text{int}}=0.108$); 合併對等反射。以直接方法 (SHELXS86) 解出晶體結構且以全矩陣最小平方精算。非均質地算出非氫原子。氫原子包括但不推算。最終參數 $R=0.074$, $R_w=0.099$, 而 GOF(客體觀察設施)=1.06。最終差異傅立葉圖之最大與最小峰分別對應 0.83 及 -0.89 e⁻/Å³。

3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基) 苯基]-1*H*-吡咯-1-醇

-2,5-二酮(化合物 3): 黃色油體; UV (MeOH) $\lambda_{\max}(\log \epsilon)$: 232.5 (4.3)、296 (3.7)、374 (3.7) nm; IR (CHCl_3) $\nu_{\max}$

1717 cm^{-1} ; 表 1 係 ^1H -NMR; 表 2 係 ^{13}C -NMR; EIMS m/z 329 $[\text{M}]^+$ (12)、261 (100)、131 (50); HR-EIMS m/z : 329.1637 ($\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_4$ 之計算值: 329.1627)。

3*R, 4*S**-1-羥基-3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]吡咯烷-2,5-二酮(4):** 無色油體; $[\alpha]_{\text{D}}^{23} +2.5^\circ$ (c 0.2, 甲醇); UV (甲醇) λ_{max} ($\log \epsilon$): 225 (4.3)、275 (3.3)、283 (3.2) nm; IR (CHCl_3) ν_{max} 1715 cm^{-1} ; 表 1 係 ^1H -NMR; 表 2 係 ^{13}C -NMR; EIMS m/z 331 $[\text{M}]^+$ (2)、263 (67)、207 (66)、191 (30)、179 (40)、133 (64)、69 (100); HR-EIMS m/z : 331.1747 ($\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{NO}_4$ 之計算值: 331.1783)。

3*R, 4*R**-1-羥基-3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]吡咯烷-2,5-二酮 (5):** 無色油體; $[\alpha]_{\text{D}}^{23} +3.0^\circ$ (c 0.2, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$): 227 (4.3)、275 (3.4)、283 (3.3) nm; IR (CHCl_3) ν_{max} 1715 cm^{-1} ; 表 1 係 ^1H -NMR; 表 2 係 ^{13}C -NMR; EIMS m/z 331 $[\text{M}]^+$ (1)、263 (45)、207 (50)、191 (75)、179 (30)、133 (100)、69 (92); HR-EIMS m/z : 331.1766 ($\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{NO}_4$ 之計算值: 331.1783)。

過氧化麥角固醇: 無色結晶 (正-己烷-丙酮); mp 165-169 $^\circ\text{C}$ (lit² mp 171-174 $^\circ\text{C}$)。

細胞毒性試驗: 體外 LLC 腫瘤細胞試驗採用 sulforhodamin B (SRB) 法。50% 生長抑制 (ED_{50}) 是以 Probit 法計算之。

結果與討論

牛樟芝菌絲體之氣仿萃取物重複以正相及逆相矽膠凝體層析，以獲得足夠量之順丁烯二酸、丁二酸衍生物(化合物 1-5)與過氧化麥角固醇。

表 1: 化合物 1-5 之 ^1H -NMR 光譜數據 (ppm, J=Hz) (500 MHz, CDCl_3)

H	1	2	3	4	5
3	—	—	—	2.87 (1H, m)	3.08 (1H, m)
4	—	—	—	3.52 (1H, d, J=4.0)	4.07 (1H, d, J=8.0)
1'	2.59 (2H, d, J=7.0)	2.51 (2H, d, J=7.0)	2.50 (2H, d, J=7.0)	1.51 (1H, m) 1.72~1.84 (1H)	1.02 (1H, m) 1.42~1.48 (1H)
2'	2.12 (1H, sep, J=7.0)	2.06 (1H, sep, J=7.0)	2.05 (1H, sep, J=7.0)	1.72~1.84 (1H)	1.42~1.48 (1H)
3'	—	—	—	0.70 (3H, d, J=6.5)	0.66 (3H, d, J=6.5)
4'	0.94 (6H, d, J=7.0)	0.90 (6H, d, J=7.0)	0.88 (6H, d, J=7.0)	0.89 (3H, d, J=6.5)	0.80 (3H, d, J=6.5)
2'', 6''	7.50 (2H, d, J=9.0)	7.50 (2H, d, J=9.0)	7.50 (2H, d, J=9.0)	7.07 (2H, d, J=8.5)	6.96 (2H, d, J=9.0)
3'', 5''	7.02 (2H, d, J=9.0)	6.95 (2H, d, J=9.0)	6.98 (2H, d, J=9.0)	6.87 (2H, d, J=8.5)	6.84 (2H, d, J=9.0)
1'''	4.57 (2H, d, J=6.6)	4.56 (2H, d, J=6.5)	4.55 (2H, d, J=6.9)	4.47 (2H, d, J=6.5)	4.47 (2H, d, J=6.5)
2'''	5.50 (1H, brt, J=6.6)	5.50 (1H, brt, J=6.5)	5.49 (1H, brt, J=6.9)	5.47 (1H, brt, J=6.5)	5.47 (1H, brt, J=6.5)
4'''	1.81 (3H, s)	1.81 (3H, s)	1.81 (3H, s)	1.79 (3H, s)	1.79 (3H, s)
5'''	1.76 (3H, s)	1.76 (3H, s)	1.76 (3H, s)	1.73 (3H, s)	1.73 (3H, s)

表 2: 化合物 1-5 之 ^{13}C -NMR 光譜數據 (δ ppm) (125 MHz, CDCl_3)

C	1	2	3	4	5
2	166.4 (s)	171.7 (s)	168.8 (s)	174.8 (s)	175.1 (s)
3	139.8 (s)	138.8 (s) ^{a)}	135.9 (s) ^{a)}	44.6 (d)	40.3 (d)
4	140.2 (s)	139.2 (s) ^{a)}	136.0 (s) ^{a)}	49.8 (d)	47.5 (d)
5	165.4 (s)	171.1 (s)	168.1 (s)	173.2 (s)	173.6 (s)
1'	33.6 (t)	32.8 (t)	33.2 (t)	40.4 (t)	35.3 (t)
2'	27.9 (d)	28.1 (d)	28.4 (d)	25.3 (d)	25.2 (d)

3'				21.3 (q)	21.8 (q)
4'	22.7 (q)	22.7 (q)	23.0 (q)	23.0 (q)	22.4 (q)
1''	119.9 (s)	121.2 (s)	120.8 (s)	127.9 (s)	125.1 (s)
2'', 6''	131.1 (d)	130.9 (d)	131.0 (d)	128.8 (d)	130.2 (d)
3'', 5''	115.1 (d)	114.9 (d)	115.0 (d)	115.4 (d)	115.0 (d)
4''	160.9 (s)	160.1 (s)	160.2 (s)	158.7 (s)	158.7 (s)
1'''	65.0 (t)	64.9 (t)	65.1 (t)	64.1 (t)	64.8 (t)
2'''	118.7 (d)	119.3 (d)	119.2 (d)	119.4 (d)	119.3 (d)
3'''	139.1 (s)	138.6 (s) ^{a)}	138.9 (s)	138.3 (s)	138.4 (s)
4'''	25.2 (q)	25.8 (q)	26.1 (q)	25.8 (q)	25.8 (q)
5'''	18.2 (q)	18.2 (q)	18.5 (q)	18.1 (q)	18.2 (q)

a) 轉讓可交互改變。

新化合物之結構以下列方法決定：

化合物 2 以黃色結晶在 mp 110-111°C 之條件下，由 HR-EIMS 分析出其分子式係 $C_{19}H_{23}NO_3$ 。紅外線光譜在 1724 cm^{-1} 顯示係硫亞羰基族之吸收。 ^{13}C -NMR 光譜顯示在脂肪族區有四個甲基碳、兩個亞甲基碳、與一個次甲亞胺碳之訊號，同時還有一個苯環、一個烯烴和兩個羰基碳。 ^1H -NMR 光譜顯示在 δ 0.90、2.06 和 2.51 有異丁基部份組成，在 δ 1.76、1.81、4.56 和 5.50 有 3-甲基-2-丁烯氧基部份組成，以及在 6.95 和 7.50 有對位-取代苯，這些結果隨後由 ^1H - ^1H COSY 和 HMQC 實驗進一步支持。以 HMBC 觀察到之長範圍關聯性見圖 1。基於分子式與 ^{13}C -NMR 光譜結果，此化合物推測含有更多 CHNO 原子，包括多於一個羰基碳。因此這個含糊不清的部份推測具有順丁烯亞胺基團。此化學結構遂以 X-射線分析確定係 3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]-1*H*-吡咯-2,5-二酮 (圖 2)。

化合物 1 分子式，由 HR-EIMS 分析出其分子式係 $C_{19}H_{22}O_4$ 。紅外線光譜顯示在 1763 cm^{-1} 處有無水酸之羰基吸收。化合物 1 之 1H -NMR 光譜結果與 2 類似，及顯示有異丁基、3-甲基 2-丁烯氧基、對位-取代苯環之部份組成。從 HMBC 光譜結果，基於分子式化合物 1 有與 2 部份相同之結構（圖 1），即皆存有順丁烯基團。化合物 1 結果定為 3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基] 呋喃-2,5-二酮。

化合物 3 分子式，由 HR-EIMS 分析出其分子式係 $C_{19}H_{23}O_4$ 。紅外線光譜顯示在 1717 cm^{-1} 處有羥基亞胺之羰基吸收。化合物 3 之 1H -和 ^{13}C -NMR 光譜結果與化合物 1 和 2 類似，顯示有異丁基、3-甲基 2-丁烯氧基、對位-取代苯環之部份組成。從 HMBC 實驗，化合物 3 有部份結構與 2 相同（圖 1），化合物 3 含有比 2 多過一個氧原子。因此，此化合物定為 3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]-1*H*-呋喃-1-醇-2,5-二酮。

由 HR-EIMS 分析出化合物 4 和 5 有相同之 R_f 值與分子式 ($C_{19}H_{25}NO_4$ ，分別在 331.1747 和 331.1766 發現)，然而二者可以 HPLC 分離。紅外線光譜顯示二化合物在 1715 cm^{-1} 處有羥基亞胺之羰基吸收。在 1H -和 ^{13}C -NMR 光譜結果，二化合物顯示有異丁基、3-甲基 2-丁烯氧基、對位-取代苯環之存在，但異丁基亞甲基之質子顯示為化合物 1-3 之多倍而非雙倍。 1H - 1H COSY 光譜顯示亞甲基團附屬在 -CH-CH-單位。化合物 4 和 5 之

^{13}C -NMR 之光譜表示有兩個額外的 sp^3 碳訊號，以取代化合物 1-3 發現之 sp^2 碳訊號。因此，化合物 4 和 5 因其於丁二亞胺環之 C-3 和 C-4 立體中心位置得知，並非為 *N*-羥基順丁烯二亞胺，亦非 *N*-羥基丁二亞胺。化合物 4 和 5 由在 H-3 和 H-4 間之偶合常數(化合物 4 和 5 分別為 4.0 與 8.0 Hz)，決定分別係反式與順式之同分異構物。化合物 4 由 NOESY (核歐沃豪斯效應光譜)發現在 H-3 和 H-4 間並無 NOE，而化合物 5 則發現有 NOE。化合物 4 和 5 之旋光性分別為 $+2.5^\circ$ 和 $+3.0^\circ$ ，但其 CD 光譜顯示在任何波長並無卡騰(Cotton)效應，表示化合物 4 和 5 可能為消旋混合物。使用具有含不同溶劑系統之光學異構物層析管之 HPLC 來解析這些消旋混合物並未成功。在目前我們無法完全推斷這些化合物是否為光學活性化合物或是消旋混合物。因此，其相對結構分別是 $3R^*, 4S^*$ -和 $3R^*, 4R^*$ -1-羥基-3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]吡咯烷-2,5-二酮。

再次根據 Aquaveque 等人的報告來分離這些來自天然的順丁烯二酸和丁二酸衍生物。

氣仿萃取物與分離化合物之細胞毒理活性係使用 LLC(Lewis 肺癌)細胞珠(表 3)。氣仿萃取物顯示有適度的細胞毒性，其 ED_{50} 值為 26.7 克/毫升。順丁烯二酸化合物 1 和 4 則不具細胞毒性作用，然而 2 和 3 發現對於 LLC 細胞珠具細胞毒性，其 ED_{50} 值低

於氯仿萃取物。

表 3 來自牛樟芝菌絲體之氯仿萃取物與化合物 1-4 對 LLC 細胞珠的 50% 生長抑制值 (ED₅₀)

	ED ₅₀ (μg/ml)
氯仿萃取物	26.7
1	>20
2	3.6
3	7.5
4	>10
Adriamycin ^{a)}	0.14

a) 陽性控制組

牛樟芝菌絲體之腫瘤試驗 (牛樟芝菌絲體之粉末)

A. 細胞株

附著細胞：

MCF-7：人類乳腺腫瘤

HT-29：人類結腸腺腫瘤

KATO III：人類胃腺腫瘤

SW480：人類結腸腺腫瘤

SW620：人類結腸腺腫瘤

HepG2：人類肝腺腫瘤

懸浮細胞：

EL4： 小鼠淋巴瘤

B. 樣品

化合物 1，化合物 3，牛樟芝菌絲體酒精萃取物，牛樟芝菌絲體水萃取物

C. 試驗方法

計算 ED_{50} （有效劑量之 50% 抑制作用）

附著細胞：MTT 法； MCF-7、HT-29、KATO III、SW480、

HepG2 之細胞進行 3 天。SW620 進行 4 天。

懸浮細胞：細胞計數法；EL4 細胞計數 5 天。

D. 結果

計算： $y = m \ln(x) + b$

例子

X	Y
0	0.97
10 ppm	0.941
30 ppm	0.6
100 ppm	0.331

當代入 X 值（10，30，50 ppm）與 Y 值可得計算式

$$y = -0.2643\ln(x) + 1.5321$$

$$ED_{50} = \exp \left[\left(0.97/2 - 1.5321 \right) / (-0.2643) \right]$$

樣品製備與樣品敘述

A. ACM (牛樟芝菌絲體粉末) 之水萃取法

1. 取 1 克之 ACM 加入裝有 40 毫升之逆滲透水的 250 毫升燒杯中，室溫下將燒杯置於超音波水浴槽內 20 分鐘。
2. 隨後在 45°C 下攪拌水浴槽 45 分鐘。
3. 將燒杯置於超音波水浴槽 20 分鐘。
4. 於 3000 rpm 下將樣品離心 15 分鐘。
5. 以細胞培養液將懸浮液作系列稀釋。

B. 測量樣品濃度

1. 蒸發盤秤重 (W1)。
2. 取 10 毫升之水萃取物置於蒸發盤內
3. 將蒸發盤置入烘箱以移除水分 (W2)

$$\text{樣品重/毫升} = (W2 - W1) / 10$$

C. ACM (牛樟芝菌絲體之粉末) 酒精萃取法

1. 取 20 克之 ACM 加入裝有 100 毫升之 95% 酒精的 500 毫升燒杯中，室溫下攪拌 10 分鐘。
2. 以 Advantec 1 號濾紙過濾懸浮液，並收集濾液。
3. 以旋轉式真空蒸發器濃縮濾液，並除去所有酒精。

D. 化合物 1：自 ACM 獲得之純化合物

E. 化合物 3：自 ACM 獲得之純化合物

MTT 試驗法

1. 細胞增生後移除舊培養液，以 PBS 清洗細胞一次。

2. 以 1X 胰蛋白酶-EDTA 處理細胞。
3. 1200 rpm 下離心 5 分鐘，倒掉上層液。
4. 以 10 毫升培養液將細胞再次懸浮。
5. 將 100 μ l 細胞懸浮液混合 100 μ l 之錐藍染劑以計算存活細胞。
6. 在 96 孔盤內，每孔放入 1×10^4 細胞/100 μ l 培養液，將盤置入 37°C 之二氧化碳培養箱培養 24 小時。
7. 除去舊培養液，以 PBS 清洗細胞一次。
8. 每孔加入 100 μ l 之樣品，將盤置入 37°C 之二氧化碳培養箱培養。
9. 在第 3、4 和 5 天移除舊培養液，以 PBS 清洗細胞一次。
10. 每孔加入 57 μ l 之 MTT (0.88 毫克/毫升)。
11. 4 小時後移除 MTT，以 PBS 清洗細胞一次。
12. 每孔加入 50 μ l DMSO。
13. 以 ELISA 儀在 OD545 下讀取結果。

細胞計數法 (EL4 細胞株)

1. 細胞增生後以離心除去舊培養液。
2. 以新鮮培養液將細胞混合均勻。
3. 將 100 μ l 細胞懸浮液混合 100 μ l 之錐藍染劑以計算存活細胞。
4. 置備含有 1×10^5 細胞/毫升之不同濃度樣品。

5. 於 96 孔盤內，每孔放入 100 μ l 之樣品，將盤置入 37℃ 之二氧化碳培養箱培養。

6. 在第 3、4 和 5 天時計算存活細胞數。

PBS

NaCl 8 克

KCl 0.2 克

Na₂HPO₄ 1.4 克

KH₂PO₄ 0.2 克

體積調為 1 升 PH 7.4

結果與討論

牛樟芝菌絲體於細胞株之 ED₅₀

細胞株	HepG2	HT-29	KATO III	EL4	SW480	SW620	MCF-7
化合物 1	21 ppm	52 ppm	38 ppm	3.5 ppm		15 ppm	6 ppm
化合物 3	35 ppm	42 ppm	69 ppm	2.6 ppm	20 ppm	27 ppm	0.02 ppm
牛樟芝菌 絲體 (ACM) 酒 精萃取物	32 ppm	52 ppm	156 ppm	2.6 ppm	71 ppm	4 ppm	
牛樟芝菌	295 ppm	707		20	207 ppm	132 ppm	318 ppm

絲體		ppm		ppm			
(ACM) 水							
萃取物。							

詳細實驗結果如下：

本發明之化合物 3： HepG2 (圖 4a)， EL4 (圖 4b)， HT-29(圖 4c) and Kato III (圖 4d)

ACM 水萃取物： HepG2 (圖 5a)， SW620 (圖 5b) 和 EL4 (圖 5c)。

ACM 酒精萃取物： HT-29(圖 6a)， SW480 (圖 6b)， SW620 (圖 6c)， EL4 (圖 6d)， HepG2 (圖 6e) 和 Kato III (圖 6f)。

本發明之化合物 1： MCF-7(圖 7a)， EL4 (圖 7b)， HT-29(圖 7c)， SW620 (圖 7d) 和 HepG2 (圖 7e)。

由以上之圖可證明，本發明之化合物與 ACM 萃取物對不同之腫瘤細胞有抑制效果。

以高效能液相層析法分析來自 ACM 酒精萃取物之所有新化合物 (1、2 和 3)

目的：為了測量來自牛樟芝菌絲體 (ACM) 酒精萃取物的所有新化合物 (1、2 和 3) 之總量，我們每日以高效能液相層析法來作例行性品管程序。

製備牛樟芝菌絲體酒精萃取物樣品：

1)、以電子天平精確秤重樣品粉末 20.000(克)，置入內含有 100

毫升之 95%酒精的刻度實驗瓶中，其瓶蓋勿旋緊。

- 2)、將上述之樣品瓶置於超音波震盪水槽十分鐘。
- 3)、將液態樣品倒入離心管，隨後以 6500 rpm 轉速離心五分鐘，
藉以將樣品之天然微粒移除。
- 4)、以一號濾紙過濾液體層。
- 5)、以旋轉式真空蒸散機濃縮過濾液，直至出現黏稠、不含酒精
之黃色液體。
- 6)、重複步驟 1 至 5 三次，並收集所有萃取產物(總牛樟芝菌絲
體酒精萃取物=4.60 克)，計算產率。

型號 2690 沃特斯系統之使用條件：

- 1)、管柱：逆相 C18
- 2)、移動相：甲醇、水、乙腈
- 3)、注射體積：20L
- 4)、偵測：光電二極體陣列偵測儀 996 於波長 254 nm 下
測量
- 5)、準備於 10 毫升酒精中含 1.000 (克)之牛樟芝菌絲體
酒精萃取物樣品，以進行 HPLC 分析

結果：根據 HPLC 之分析，包含純化合物 1、 2、和 3 之萃取產
物顯示於表 4

表 4：

三個標準化合物之組成

：1 毫升之酒精中含 0.0100 (克重)			
標準名稱	化合物 1	化合物 2	化合物 3
濃度 (克/毫升)	0.01	0.01	0.01
波峰面積	49,315,783	129,327,136	136,255,406
留置時間(分鐘)	134.8	124.3	119.8
*牛樟芝菌絲體酒精萃取樣品			
：10 毫升之酒精中含 1.000 (克)			
濃度 (克/毫升)	8.59×10^{-3}	5.59×10^{-4}	1.659×10^{-2}
波峰面積	42,374,766	7,226,937	226,102,223
產率 % (w/w)	8.59	0.559	16.59

因此，化合物 1、2 和 3 之總重為 ACM 樣品重量之 5.92%。

牛樟芝菌絲體-酒精試驗

材料與設備

1. 試驗物質和給藥形式

所有體外試驗皆以口服下 2% Tween 80 之載體，其含有最初劑量為 1000 毫克/公斤之試驗物質。每個試驗的觀察時間詳述於方法中。

2. 實驗動物

雄或雌性 ICR 小鼠, Wistar-Okamoto 自然衍生系雄性低血壓大鼠 (SHR)，使用由台灣泛球藥理研究所提供之 Wistar 與 Long

Evans 衍生系大鼠。動物飼養空間如下：29 x 18 x 13 公分空間飼養 10 隻小鼠，45 x 23 x 21 公分空間飼養 6 隻大鼠，45 x 23 x 21 公分空間飼養 3 隻天竺鼠。小鼠和大鼠飼養在 APEC^R 籠子內。由國立台灣大學動物中心提供之重 21 ± 2 克，6-8 週大之 C57BL/6J 免疫雄小鼠，亦在本研究中使用。實驗動物飼養在獨立通風之籠架(IVC 架，36 迷你隔離系統)。每個籠子予以消毒，並飼養 5 隻小鼠(在 26.7x20.7x14 公分之空間內)。所有動物均控溫($21^{\circ} - 23^{\circ} \text{C}$)及控濕(60%-70%)，與在實驗使用前至少一週處於光照週期的環境下。提供標準實驗飼料(LabDiet Rodent Diet 與 Guinea Pig Diet, PMI Nutrition International, 美國)與水源自由進食。

3. 細胞株與培養液

鼠科黑色素細胞瘤細胞株 B16-F0 (ATCC CRL-6322)由 American Type Culture Collection 提供，並以 Dulbecco' s Modified Eagle' s Medium (GIBCO, 美國)作為細胞培養液。腫瘤細胞培養於 37°C 並含有 5% CO_2 之空氣中。

4. 化學藥品

一般：

滅菌水 (公司內製)，二甲基亞砷(DMSO, Merck, 德國)，等張氯化鈉溶液 (台灣信東化學工業股份有限公司)，硫化鎂

($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Wako, 日本), 甲氯胺苯酸鈉 (Sigma, 美國), 甲基纖維素 (Sigma, 美國), 氫氧化鈉 (NaOH , Wako, 日本), 磷酸緩衝液 (Sigma, 美國) 和 Tween 80 (Wako, 日本)。

試劑

Glicose-HA 試驗試劑套組 (Wako, 日本), 丙氨酸轉胺酵素 (ALT) 試驗試劑套組 (Wako, 日本), 天門冬氨酸轉胺酵素 (AST) 試驗試劑套組 (Wako, 日本), T-Cholesterol-HA 與 HDL 試驗試劑套組 (Wako, 日本), Hemolynac 3 Hemolys (Nihon Kodan, 日本), Isotonic 3 Diluent (Nihon Kodan, 日本)。

5. 設備

一般使用：

動物箱 (信德, 中華民國), 250 毫升與 1000 毫升之燒杯 (Kinmax, 美國), 丟棄式注射器 (1 毫升, Top Corporation, 日本), 不鏽鋼鑷子 (klappencker, 德國), 鼠秤 #Z-40 (Taconic, 美國), 口服餵食注射筒 (Natsune, 日本), 皮下注射針 23 G x 1' ' (Top Corporation, 日本), 酸鹼度計 (Suntex, 美國), 鼠秤 500 克 $\pm$ 2 克 (Chien-chun, 中華民國), 玻璃注射筒 1 毫升, 2 毫升和 5 毫升 (Mitsuba, 日本), 以及不鏽鋼剪刀 (Klappencker, 德國)。

方法與結果：

1. 中樞/週邊之膽鹼性協同物之實驗參考 Lippmann W 和

Pugsley TA 在 1977 年發表於 Arch Int Pharmacodyn. 227:324

上之文獻。

受測物以口服方式給於 3 隻重 150 ± 20 克之 Wistar 衍生系雄或母鼠實驗組。再經 30-60 分鐘後，實驗動物經累積測量出現超過 10 秒之咀嚼行為（口和/或舌動作），以及出現分泌唾液情況。觀察到 2 隻或超過 (≥ 2) 3 隻大鼠之正相反應表示可能在中樞和週邊之乙醯膽鹼已有作用。

表 5：大鼠中樞/週邊神經之乙醯膽鹼催動作用的結果

處理	途徑	劑量	組別	中樞神經		週邊神經	
				咀嚼	分數	唾液分泌	分數
載體	PO	10 ml/kg	1	-		-	
			2	-		-	
			3	-	0/3	-	0/3
ACM 酒精萃取物	PO	1000 mg/kg	1	+		-	
			2	+		-	
			3	+		-	0/3
		300 mg/kg	1	-	(3/3)	-	
			2	-		-	
			3	+		-	0/3
					1/3		

Arecoline-	IP	30 mg/kg	1	+		+	
HBR			2	+		+	
			3	+		+	
					(3/3)		(3/3)

載體與受測物以口服 (PO) 給予，而陽性參考化合物以腹腔注射方式 (IP) 給予。之後經過 30-60 分鐘，實驗動物經累積測量出現超過 10 秒之咀嚼行為 (口和/或舌動作)，以及出現分泌唾液情況。觀察到 2 隻或超過 (≥ 2) 3 隻大鼠之正相反應表示可能在中樞和週邊之乙醯膽鹼已有作用。

2. 心血管、血壓和心跳速率 (SHR 0、1、2、4 小時) 實驗參考 Yen TT 等人 1978 年於 Life Sci. 22: 359 上發表之文獻

使用 3 隻重 250 ± 20 克之 Wistar-Okamoto 衍生系自然高血壓雄鼠 (SHR) 實驗組，其平均收縮壓在 200 ± 20 mmHg，心跳速率是 400 ± 30 次/分鐘。血壓與心跳速率是經由 tail cuff 法在控溫環境 ($32 \pm 1^\circ\text{C}$) 下，於口服給予受測物或載體前 0 時和 1、2、4 小時作間接紀錄。當每次於間隔時間測量後與 0 時相較，其收縮壓下降 10% 或更多 ($\geq 10\%$)，或心跳速率下降 20% 或更多 ($\geq 20\%$)，則視為有意義。

表 6：大鼠之心血管、血壓結果 (SHR 0、1、2、4 小時)

處理	途	劑量	組	對照組% (與 0 時比較)
----	---	----	---	----------------

	徑		別	1 小時	2 小時	4 小時
載 體	PO	10 ml/kg	1	100	96	90
			2	97	100	91
			3	90	92	92
			平 均	96	96	91
ACM- 酒精萃取 物	PO	1000 mg/kg	1	78	85	71
			2	86	89	80
			3	89	89	89
			平 均	(84)	(88)	(80)
Clonidine	PO	0.1 mg/kg	1	71	67	71
			2	95	86	88
			3	72	85	69
			平 均	(79)	(79)	(76)

表 7：心血管、心跳速率之結果 (SHR 0、 1、 2、 4 小時)

處 理	途 徑	劑 量	組 別	對 照 組 % (與 0 時 比 較)		
				1 小 時	2 小 時	4 小 時
載 體	PO	10	1	87	100	99

		ml/kg	2	116	103	107
			3	108	104	121
			平均	104	102	109
ACM- 酒精萃取 物	PO	1000 mg/kg	1	98	93	95
			2	81	100	88
			3	83	78	92
			平均	87	90	92
Clonidine	PO	0.1 mg/kg	1	62	97	112
			2	84	87	104
			3	68	86	78
			平均	(71)	90	98

係使用收縮壓 200 ± 20 mmHg 與心跳速率 400 ± 50 mmHg 次/分鐘之 SHR 鼠。血壓是經由 vial tail cuff 法於口服給予受測物或載體後 0 時和 1、2、4 小時作間接紀錄。當每次於測量時間點後與 0 時相較（見以下描述），其血壓下降 10% 或更多 ($\geq 10\%$)，或心跳速率下降 20% 或更多 ($\geq 20\%$)，則視為有意義。

載體 10ml/kg 0 時 229mmHg 與 403 mmHg 次/分鐘 當作 100%。

ACM-酒精萃取物 1000mg/kg 0 時 223mmHg 與 452 mmHg
次/分鐘當作 100%。

Clonidine 0.1mg/kg 0 時 228mmHg 與 379
mmHg 次/分鐘 當作 100%。

表 8：大鼠之心血管、血壓結果（SHR 0、1、2、4 小時）

處理	途徑	劑量	組別	對照組 %（與 0 時比較）		
				1 小時	2 小時	4 小時
載體	PO	10 ml/kg	1	94	97	97
			2	88	97	94
			3	94	97	103
			平均	92	97	98
ACM- 酒精萃取 物	PO	300 mg/kg	1	111	102	103
			2	94	84	100
			3	112	110	112
			平均	106	99	105
Clonidine	PO	0.1 mg/kg	1	86	73	81
			2	63	73	90
			3	62	68	80

			平 均	(70)	(71)	(85)
--	--	--	--------	------	------	------

表 9：心血管、心跳速率之結果（SHR 0、1、2、4 小時）

處理	途 徑	劑量	組 別	對照組 %（與 0 時比較）		
				1 小時	2 小時	4 小時
載體	PO	10 ml/kg	1	82	85	84
			2	88	115	102
			3	109	111	119
			平 均	93	104	102
ACM- 酒精萃取 物	PO	300 mg/kg	1	97	96	92
			2	105	108	98
			3	85	96	82
			平 均	96	100	91
Clonidine	PO	0.1 mg/kg	1	77	85	102
			2	78	78	100
			3	62	94	104
			平 均	(72)	86	102

係使用收縮壓 200 ± 20 mmHg 與心跳速率 400 ± 50 mmHg 次/分鐘之 SHR 鼠。血壓是經由 vial tail cuff 法於口服給予受測物或載體後於 0 時（前）和 1、2、4 小時作間接紀錄。當每次於測量時間點後與 0 時相較（見以下補述），其血壓下降 10% 或更多（ $\geq 10\%$ ），或心跳速率下降 20% 或更多（ $\geq 20\%$ ），則視為有意義。

載體 10ml/kg 0 時 220mmHg 與 410 mmHg
次/分鐘 當作 100%。

ACM-酒精萃取物 300mg/kg 0 時 205mmHg 與 446 mmHg
次/分鐘當作 100%。

Clonidine 0.1mg/kg 0 時 235mmHg 與 417
mmHg 次/分鐘 當作 100%。

3. 由飲食引起之膽固醇、血清(HDL 總量、 總量/HDL 比率)實驗
參考 Schurr PE 等人 1976 在 Atherosclerosis Drug
Discovery. Plenum, New York, pp. 215-229 上發表之文獻。

重量係 22 ± 2 克之 5 隻 ICR 衍生系雄性小鼠餵食高脂食物 (g/100g: 椰子油, 8; 膽固醇, 1.0; 膽鹼酸, 0.3; 豬油, 2; 標準食物 88.7) 7 天以引發高膽固醇血症。測試物在第 5、6、7 天以口服給予。經整夜禁食後, 每隻小鼠之血清用來檢測總膽固醇量 (Total)、高密度脂蛋白 (HDL) 和總量/HDL 之改變率。

當每次與以載體處理對照組動物相比較，其血清總量下降 20%或更多 ($\geq 20\%$)，或血清 HDL 上升 20%或更多 ($\geq 20\%$)，或其總量/HDL 下降 40%或更多 ($\geq 40\%$)時，則視為有意義。

表 10：小鼠由飲食引起之膽固醇(總/HDL, 總/HDL 比率)結果

處理	途徑	劑量	組別	總量		HDL		總量/HDL	
				Indiv.	%Dce	Indiv.	%Dce	Indiv	%Dce
載體	PO	10 ml/kg x 3	1	361		70		5.16	
			2	316		82		3.85	
			3	379		79		4.80	
			4	392		78		5.03	
			5	367		86		4.27	
			平均	363	--	79	--	4.59	--
ACM-酒精萃取物	PO	1000 mg/kg x 3	1	420		117		3.95	
			2	327		115		2.84	
			3	332		104		3.19	
			4	363		98		3.70	
			5	294		117		2.51	
			平均	347	4	110	(39)	3.15	31

	P0	300	1	370		66		5.61	
		mg/kg	2	301		65		4.63	
		x 3	3	217		74		2.93	
			4	379		76		4.99	
			5	328		98		3.35	
			平均	319	12	76	-4	4.20	8
Benzafibrate	P0	100	1	230		91		2.53	
		mg/kg	2	214		120		1.78	
		x 3	3	225		133		1.69	
			4	231		123		1.88	
			5	242		97		2.49	
			平均	228	(37)	113		2.02	
							(43)		(56)

載體、測試物或參考陽性化合物在餵食高膽固醇食物後之第 5、6、7 天以口服(P0)給予。在第三次餵食後二十四小時，將整夜禁食之實驗動物犧牲，以評估其血清總膽固醇量(Total)和高密度脂蛋白 (HDL)。當其血清總量下降 20%或更多($\geq 20\%$)，或血清 HDL 上升 20%或更多($\geq 20\%$)，或其總量/HDL 比率下降 40%或更多($\geq 40\%$)時，則視為有意義。

4. D-半乳糖胺對大鼠之肝損傷實驗參考 Wrobel J 等人 1998 年

於 J. Med Chem 41: 1084 上發表之文獻。

使用重量係 200 ± 20 克之 5 隻 Wistar 衍生系雄性小鼠。每個動物以單一注射 D-半乳糖胺 (500 mg/kg, IP) 處理。測試物在注射 D-半乳糖胺前 0.5 小時與 4 小時和 8 小時後以口服給予，隨後動物在 24 小時後犧牲。血清丙氨酸轉胺酵素 (ALT) 和天門冬氨酸轉胺酵素 (AST) 的量以 HITACHI 分析儀 (型號 7050) 根據最佳 UV 法來測量。與以載體處理對照組動物相比較，ALT 或 AST 活性下降 30% 或更多 ($\geq 30\%$)，則視為具保護意義。

表 11: 半乳糖胺對大鼠之肝損傷實驗結果

處理	途徑	劑量	組別	血清		血清	
				ALT (X±SEM)		AST (X±SEM)	
				U/L	Dec. %	U/L	Dec. %
載體	PO	10 ml/kg x 3	1	816	-	1628	--
			2	1044		1716	
			3	652		888	
			4	656		828	
			5	644		956	
			X SEM	762.4 77.4		1203.2 193.0	
ACM- 酒精萃取物	PO	1000 mg/kg x 3	1	364	(44)	516	(57)
			2	376		532	
			3	596		672	
			4	452		524	
			5	336		356	
			X SEM	424.8 46.9		520.0 50.1	
		300 mg/kg x 3	1	460	20	852	28
			2	656		880	
			3	640		876	
			4	752		1004	
			5	536		692	
			X SEM	608.8 50.6		860.8 49.8	
Guanine	PO	300 mg/kg x 3	1	508	(34)	656	(33)
			2	532		912	
			3	412		776	
			4	436		652	
			5	636		1028	
			X SEM	504.8 39.6		804.8 73.4	

測試物和載體在注射單一劑量之半乳糖胺(500 mg/kg, IP)前 0.5

小時與 4 小時和 8 小時後以口服給予，隨後動物在 24 小時後犧牲

牲，並檢測 ALT 和 AST 數值。與以載體組相比較，ALT 和 AST 下降 $\geq 30\%$ 視為有意義。

5. 鹿角菜膠之發炎實驗參考 Winter CA 等人 1962 於 Proc Soc Exp Biol Med. 111:544 上發表之文獻。

重量係 150 ± 20 克之 3 隻 Long Evans 衍生系雄性或雌性小鼠，在實驗前先禁食整晚。測試物在注射鹿角菜膠 (1 % 內置 (intraplantar) 懸浮物 0.1 毫升) 於右後爪 1 小時前以口服給予，後爪水腫視為發炎的判斷，經給予鹿角菜膠後使用含水細胞 (直徑 25 毫米) 之器官充滿度測量器紀錄 3 小時。後爪水腫下降 30% 或更多 ($\geq 30\%$) 表示其急性抗發炎作用有意義。

表 12：鹿角菜膠之大鼠發炎實驗結果

處理	途徑	劑量	組別	爪體積 (x 0.01 ml)			抑制%
				R. P.	L. P.	Diff	
載體	PO	10 ml/kg	1	194	103	91	
			2	202	108	94	
			3	199	104	95	
			平均	198	105	93	
ACM-酒精萃取物	PO	1000 mg/kg	1	146	101	45	
			2	147	95	52	
			3	160	104	56	
			平均	151	100	51	(45)
Aspirin	PO	150 mg/kg	1	152	102	50	
			2	146	102 106	44	
			3	163		57	
			平均	154	103	50	(46)

表 13：鹿角菜膠之大鼠發炎實驗結果

處理	途徑	劑量	組別	爪體積(x 0.01 ml)			抑制%
				R.P.	L.P.	Diff	
載體	PO	10 ml/kg	1	193	105	88	
			2	198	107	91	
			3	199	102	97	
			平均	197	105	92	
ACM-酒精萃取物	PO	300 mg/kg	1	195	104	91	
			2	187	103	84	
			3	196	103	93	
			平均	193	103	89	3
Aspirin	PO	150 mg/kg	1	146	103	43	
			2	149	101 104	48	
			3	169		65	
			平均	155	103	52	(43)

在注射鹿角菜膠(1%內置(intraplantar)懸浮物 0.1 毫升) 於整夜禁食大鼠之右後爪(R.P.)1 小時前給予測試物和載體；左後爪(L.P.)則不注射。後爪水腫下降 30%或更多($\geq 30\%$)，見以下補述，表示其急性抗發炎作用有意義。

同源黑色素瘤 B16-F0 細胞株之腫瘤實驗乃參考 Farrugia CA 和 Groves MJ. 1999 年在 Anticancer Research 19: 1027-1032 上發表之文獻。

使用 5 隻無病原(SPF)、免疫力(6-8 週大)之 C57BL/6J 雄性小鼠，飼養於無病原(SPF)環境之動物隔離間(IVC 架)內。將與 C57BL/6J 小鼠同源之鼠科 B16-F0 黑色素瘤活細胞株(ATCC CRL-6322，0.2 毫升內有 1.0×10^5 個細胞)皮下注射入實驗小鼠之背側。腫瘤接種後 24 小時開始處理，試驗化合物每日以口服飼料方式給予 21 天，當出現明顯毒性症狀得減少天數。小鼠自

第 1 天至第 22 天監控其體重、腫瘤大小與存活。此外實驗小鼠監控其存活狀況至研究後第 45 天結束。

根據公式來評估腫瘤重量(毫克):長(毫米) $\times$ [寬(毫米)]² $\times$ 0.5, 其中比重假設為 1, π 為 3。化合物處理動物之腫瘤增生以 T/C (實驗組/對照組) $\times$ 100%來計算; 若 T/C 值 $\leq$ 42%視為具顯著抗腫瘤活性之證據。T/C (實驗組/對照組)之平均存活時間 $\geq$ 125%亦視為具顯著抗腫瘤活性證據。

表 14: 同源黑色素瘤 B16-F0 細胞株之腫瘤實驗結果

處理	途徑	劑量	組別	腫瘤重量(毫克)與% T/C, 平均值 $\pm$ SEM					
				第 1 日	T/C(%)	第 8 日	T/C(%)	第 11 日	T/C(%)
載體	PO	10 ml/kg x 21	1	0		0		60	
			2	0		39		298	
			3	0		0		49	
			4	0		54		541	
			5	0		21		117	
				0	100	23 $\pm$ 11	100	213 $\pm$ 93	100
ACM-酒精萃取物	PO	1000 mg/kg x 21	1	0		0		0	
			2	0		0		0	
			3	0		0		0	
			4	0		0		14	
			5	0		0		32	
				0	100	0 $\pm$ 0	0*	9 $\pm$ 6	4*
Mitomycin	IP	2 mg/kg x 6	1	0		0		0	
			2	0		0		64	
			3	0		0		0	
			4	0		0		68	
			5	0		0		41	
				0	100	0 $\pm$ 0	0*	34 $\pm$ 15	16*

表 15: 同源黑色素瘤 B16-F0 細胞株之腫瘤實驗結果

處理	途徑	劑量	組	腫瘤重量(毫克)與% T/C, 平均值 $\pm$ SEM
----	----	----	---	-------------------------------

			別	第 15 日	T/C(%)	第 18 日	T/C(%)	第 22 日	T/C(%)
載體	PO	10 ml/kg	1	211		746		2054	
		x 21	2	657		1597		2870	
			3	216		669		1419	
			4	835		2455		3688	
			5	240		726		1682	
				432±	100	1239±	100	2343±	100
				131		349		416	
ACM-酒精萃 取物	PO	1000	1	49		280		913	
		mg/kg	2	62		630		1545	
		x 21	3	388		1079		2560	
			4	148		435		1514	
			5	229		535		1637	
				175±62	41*	592±135	48	1634±	70
								265	
Mitomycin	IP	2 mg/kg	1	36		256		437	
		x 6	2	136		849		1248	
			3	0		0		0	
			4	213		525		663	
			5	207		327		Died	

				119±44	27*	391±142	32*	587± 260	25*
--	--	--	--	--------	-----	---------	-----	-------------	-----

腫瘤細胞植入 24 小時後，每天給予實驗動物載體與測試物，總共 21 天。同時參考化合物與絲裂黴素以 IP 方式每週給予兩次，總共 6 次。腫瘤尺寸每週測量與紀錄兩次，為期 22 天。抑制腫瘤成長以 T/C (實驗組/對照組) $\times 100$ 計算之。 T/C 值 $\leq 42\%$ 視為具顯著抗腫瘤活性證據。

表 16：同源黑色素瘤 B16-F0 細胞株之腫瘤實驗結果

處理	途徑	劑量	組別	腫瘤重量(毫克), 平均值 $\pm$ SEM					
				第 1 日	第 8 日	第 11 日	第 15 日	第 18 日	第 22 日
載體	PO	10 ml/kg x 21	1	21	20	20	21	22	25
			2	22	22	21	22	26	30
			3	21	21	20	20	22	21
			4	21	20	20	20	21	24
			5	22	21	20	19	20	23
				21.4 $\pm$ 0.2	20.8 $\pm$ 0.4	20.2 $\pm$ 0.2	20.4 $\pm$ 0.5	22.2 $\pm$ 1.0	24.6 $\pm$ 1.5
ACM-酒精萃取物	PO	1000 mg/kg x 21	1	20	21	21	22	22	23
			2	20	19	19	21	22	24
			3	20	18	18	19	21	26
			4	21	20	19	21	20	21
			5	20	20	21	22	23	25
				20.2 $\pm$ 0.2	19.6 $\pm$ 0.5	19.6 $\pm$ 0.6	21.0 $\pm$ 0.5	21.6 $\pm$ 0.5	23.8 $\pm$ 0.9
Mitomycin	IP	2 mg/kg x 6	1	25	25	26	25	24	27
			2	22	22	22	25	27	30
			3	19	21	21	21	22	21
			4	22	22	22	24	26	27
			5	19	20	19	20	21	Died
				21.4 $\pm$ 1.1	22.2 $\pm$ 0.8	22.0 $\pm$ 1.1	23.0 $\pm$ 1.0	24.0 $\pm$ 1.1	26.3 $\pm$ 1.9

腫瘤細胞植入 24 小時後，每天給予實驗動物載體與測試物，總共 21 天。同時參考化合物與絲裂黴素 (Mitomycin) 以 IP 方式

每週給予兩次，總共 6 次。腫瘤尺寸每週測量與紀錄兩次，為期 22 天。以 Student' s t 試驗來決定測試化合物與載體對照組之體重改變是否具顯著差異。

表 17: 同源黑色素瘤 B16-F0 細胞株之腫瘤實驗結果

處理	途徑	劑量	組別	存活時間 (日), 平均值 $\pm$ SEM	
				後續處理日數	T/C (%)
載體	PO	10 ml/kg x 21	1	23	
			2	28	
			3	30	
			4	28	
			5	27	
				27.2 $\pm$ 1.2	100
ACM-酒精 萃取物	PO	1000 mg/kg x 21	1	44	
			2	31	
			3	25	
			4	42	
			5	32	
				34.8 $\pm$ 3.6	128*
Mitomycin	IP	2 mg/kg x 6	1	45 ^a	
			2	28	
			3	45 ^a	
			4	30	
			5	22	
				34.0 $\pm$ 4.7	125*

a: 若動物於 45 天後並未死亡，則其存活期當作 45 天。

監控實驗動物之存活於 45 天研究期，或直到實驗動物死亡為止。T/C (實驗組/對照組) 之平均存活時間 $\geq$ 125% 亦視為具顯著抗腫瘤活性證據。

討論：

依照公司內部已建立之標準，每日口服(PO)給予 ACM-酒精萃取物，依照下列小鼠與大鼠試驗以產生顯著作用：

大鼠給予中樞膽鹼性協同物 1000 毫克/公斤；非顯著之協同物最少給予 300 毫克/公斤；作用於週邊膽鹼性神經之非顯著之協同物或拮抗物給予 1000 毫克/公斤(表 5)。

自發性高血壓大鼠(SH)於 1000 毫克/公斤劑量下，其收縮壓減少(16%、12 % 和 20% ，分別於 1、2 和 4 小時之時間點觀察 vs. 100 % ，0 時)，且心跳速率中度但非顯著減少(表 6 和 7)；300 毫克/公斤之劑量並未對收縮壓和心跳速率造成顯著變化(表 8 和 9)。

1000 毫克/公斤之劑量，會使飲食誘發小鼠之高密度脂蛋白(HDL，載體對照組多於 39%)增加(表 10)；當 HDL/total 比率顯著下降至接近 31 %，但總膽固醇(Total)未顯著改變；300 毫克/公斤之劑量並未造成 Total、HDL 和 HDL/Total 比率改變。

以半乳糖胺引發大鼠肝損傷後，以 1000 毫克/公斤 x 3 劑量處理產生肝保護作用(與載體對照組相較，ALT 下降 44% 而 AST 下降 57%)，以及於 300 毫克/公斤 x 3 劑量下，ALT 下降 20 %而 AST 下降 28 % (表 11)。

1000 毫克/公斤劑量對鹿角菜膠引發大鼠爪水腫之抗發炎反應(與載體對照組相比具 45%抑制作用)(表 12)；較低程度 300 毫克/公斤並無顯著作用(與載體相比有 3%抑制作用，表 13)。

C57BL/6J 小鼠之同源黑色素瘤 B16-F0 細胞株實驗，在 1000 毫

克/公斤劑量下，於第 8、11 和 11 天(表 14 和 15) 具抗腫瘤作用，與能延長動物存活時間(表 17)；動物體重無顯著差異(表 16)。

[0050] 本發明之 ACM、ACM-酒精萃取物和化合物 3

使用九組 ICR 衍生系雄性鼠(重 22 ± 2 克)中之 5 隻。每隻動物給予單一劑量之四氯化碳(CCl_4 ，50%橄欖油中含 0.1 毫升/公斤，P0)。ACM 之測試物於 30、100 和 300 毫克/公斤劑量下，在處理四氯化碳前 30 分與 4 和 8 小時後以口服給予；ACM-酒精萃取物，在處理四氯化碳前 30 分與 4 和 8 小時後，以 300 和 1000 毫克/公斤劑量每日(每日兩次)重複口服給予。動物以四氯化碳處理後 24 小時犧牲。丙氨酸轉胺酵素(ALT)和天門冬氨酸轉胺酵素(AST)之值由 HITACHI 自動分析儀(型號 7050)以最佳 UV 法測量。與載體組相比，ALT 或 AST 值下降 30% 或更多($\geq 30\%$)，代表對肝損傷有保護作用。

結果

表 18：四氯化碳對小鼠之肝損傷

處理	途徑	劑量	組別	ALT		AST	
				U/L		U/L	
載體 (2% Tween 80)	P0	10 ml/kg x 3	1	3936		2056	
			2	3456		1856	
			3	3712		1528	
			4	2560		1328	
			5	2968		1696	
			X	3326	0	1693	0
			SEM	250		126	

ACM	PO	1000 mg/kg x 3	1	1440	(46)	888	(36)
			2	2720		1520	
			3	2272		1328	
			4	1272		792	
			5	1320		880	
		300 mg/kg x 3	X	180.5	8	1082	-6
			SEM	292		144	
			1	2336		1256	
			2	1552		1072	
			3	3720		1512	
			4	3816		2336	
			5	3952		2792	
			X	3075		1794	
			SEM	480		330	
ACM-酒精萃 取物	PO	1000 mg/kg x 5	1	1936	(36)	1232	25
			2	1528		768	
			3	1896		1136	
			4	2752		1656	
			5	2472		1592	
		300 mg/kg x 5	X	2117	(34)	1277	20
			SEM	219		162	
			1	1656		976	
			2	3536		1712	
			3	2328		1808	
			4	1736		1416	
			5	1792		888	
			X	2210		1360	
			SEM	352		187	
化合物 3	PO	300 mg/kg x 3	1	1368	(41)	776	(33)
			2	1576		896	
			3	1440		896	
			4	2728		1352	
			5	2720		1728	
		100 mg/kg x 3	X	1966		1130	
			SEM	311		179	
			1	3200		2256	
			2	4576		2976	
			3	2512		1536	
			4	2728		1552	
			5	3696		1600	

			X	3342	0	1984	-17
			SEM	370		282	
			1	4296		2136	
			2	3696		2288	
		30 mg/kg	3	2152		1096	
		x 3	4	2400		1792	
			5	4256		2496	
			X	3360	-1	1962	-16
			SEM	457		245	
水飛薊素 (Silymarin)	PO	100	1	2856		1296	
		mg/kg	2	1832		1152	
		x 3	3	1296		952	
			4	2792		1072	
			5	2728		1336	
			X	2301	(31)	1162	(31)
			SEM	313		71	

討論：

本發明之 ACM、ACM-酒精萃取物和化合物 3 經評估，對於由四氯化碳引發 ICR 小鼠之肝損傷可能具有保護作用。ACM 測試物於動物處理四氯化碳前 0.5 小時與 4 小時和 8 小時後，以 30、100 和 300 毫克/公斤劑量口服給予。ACM-酒精萃取物以 300 和 1000 毫克/公斤劑量，在處理四氯化碳前一天中 (9:00 AM and 16:00 PM) 給予兩次 (b. i. d.)，以及開始處理四氯化碳前 0.5 小時與 4 小時和 8 小時後 (總計給 5 劑)。決定肝損傷程度是藉由相對於處理載體動物之血清中丙氨酸轉胺酵素 (ALT) 和天門冬氨酸轉胺酵素 (AST)。本發明中劑量 1000 毫克/公斤 x 3 之 ACM 與劑量 300 毫克/公斤 x 3 之化合物 3，相較於處理載體動物，造成 ALT (46% 和 41%) 和 AST (36% 和 33%) 顯著下降。同時劑量為 300 和 1000 毫克/公斤 x 5 之 ACM-酒精萃取物，也造成 ALT (36% 和 34%)

以及 AST (25% 和 20%)顯著下降。

同時試驗水飛薊素(silymarin) (100 毫克/公斤 x 3, IP)顯示相較於處理載體動物, ALT (31%) 和 AST (31%)顯著下降。

本發明之 ACM、ACM-酒精萃取物和化合物 3, 在小鼠處理四氯化碳模式中具有明顯肝保護作用。

本發明已詳細說明及例示, 以使熟習此項技術者能施行並加以利用, 唯任何替代、變更與修改均應在不脫離本發明之精神與範圍內進行。

熟習此項技術者很快便會發現到本發明很容易便可達到目標, 並得到本文中所述之結果及優點。細胞株、胚胎、動物及其製造過程和方法僅為示範性之較佳實施例代表, 並非欲限制發明之範圍。熟習此項技術者將會想到對本發明進行修改及其他用途, 唯這些修改均應包含在本發明的精神內並僅限於申請專利範圍內。熟習此項技術之人顯然很容易便可在不脫離本發明之精神與範圍內對本發明進行變更與修改。

本說明書所述之所有專利及發表著作, 均為此領域中和發明有關之一般技術。當每件個別之發表著作係具體且逐個地顯示與參考資料合併在一起時, 所有與參考資料合併在一起之專利及發表著作係具相同之範圍。

本文所述之發明圖式可在沒有任何要件或限制下施行, 而非特定本文所揭露者。所使用之名詞及表達僅為說明之用, 而非用於限制, 且非欲利用這些名詞及表達來排除任何所示及所述或其部分

特徵之均等物，而是認為各種變更修改仍可能在發明申請專利範圍內。因此，應該了解雖然已利用較佳實施例及選擇性的特徵來具體揭露本發明，但熟習此項技術之人可能會根據此中所揭露之構想加以修改及變更，唯這些修改與變更，應當在本發明所附申請專利請求項所定義之範圍內。

【圖式簡單說明】

圖 1 顯示本發明化合物 2 之 HMBC 對射。

圖 2 顯示本發明化合物。

圖 3 顯示本發明化合物 4 及 5 之 NOE (核歐沃豪斯效應)對射。

圖 4 (a)-(d) 顯示本發明化合物 3 之試驗結果。

圖 5 (a)-(c) 顯示牛樟芝菌絲體粉末 [ACM (*Antrodia camphorata* mycelia powder)] 水萃取物之試驗結果。

圖 6 (a)-(f) 顯示牛樟芝菌絲體粉末酒精萃取物之試驗結果。

圖 7 (a)-(e) 顯示本發明化合物 1 之試驗結果。

伍、中文發明摘要：

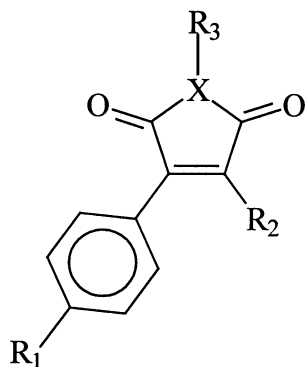
本發明係關於一種來自牛樟芝 (*ANTRODIA CAMPHORATA*) 菌絲體之新穎混合物與順丁烯二酸與丁二酸衍生物及其醫藥用途。本發明另係關於一種包含本發明化合物之組合物或菌絲體。

陸、英文發明摘要：

The present invention relates to novel mixture and maleic and succinic acid derivatives from mycelium of *Antrodia Camphorata* and the medical use thereof. The present invention relates to the composition or mycelium comprising the compounds of the invention.

拾、申請專利範圍：

1. 一種具下式之化合物



其中

X 係 N 或 O；

R₁ 係 C₁₋₁₀ 烷氧基、C₂₋₁₀ 烯氧基或 C₂₋₁₀ 炔氧基；

R₂ 係 H、C₁₋₁₀ 烷基、C₂₋₁₀ 烯基或 C₂₋₁₀ 炔基；及

R₃ 係無、H 或羥基；

但當 X 係 O 時，則 R₃ 係無。

2. 根據申請專利範圍第 1 項之化合物，其中 R₁ 係 C₂₋₆ 烯氧基或

C₂₋₆ 炔氧基。

3. 根據申請專利範圍第 2 項之化合物，其中 R₁ 係經 C₁₋₆ 烷基取

代 C₂₋₆ 烯氧基。

4. 根據申請專利範圍第 1 項之化合物，其中 R₂ 係異丁基。

5. 根據申請專利範圍第 1 項之化合物，其係

3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]呋喃-2,5-二酮；

3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]-1*H*-吡咯-2,5-二酮；

3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]-1*H*-吡咯-1-醇-2,5-二酮；

3*R**, 4*S**-1-羥基-3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]吡咯烷-2,5-二酮；或

3*R**, 4*R**-1-羥基-3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]吡咯烷-2,5-二酮。

6. 一種牛樟芝菌絲體之混合物，其係由牛樟芝菌絲體之水或有機溶劑萃取物製備。

7. 根據申請專利範圍第 6 項之混合物，其中有機溶劑係醇類、酯類、烷類或鹵烷。

8. 根據申請專利範圍第 7 項之混合物，其中醇類係酒精。

9. 根據申請專利範圍第 6 項之混合物，其中該化合物係

3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]呋喃-2,5-二酮；

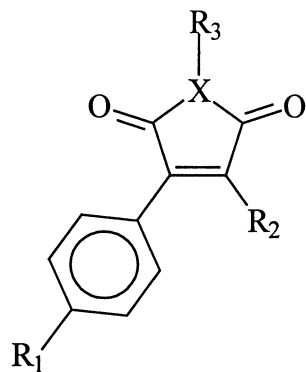
3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]-1*H*-吡咯-2,5-二酮；

3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]-1*H*-吡咯-1-醇-2,5-二酮；

3*R**, 4*S**-1-羥基-3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]吡咯烷-2,5-二酮；或

3*R**, 4*R**-1-羥基-3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]
吡咯烷-2,5-二酮。

10. 根據申請專利範圍第 6 項之混合物，其減低收縮壓或增加高密度脂蛋白。
11. 根據申請專利範圍第 6 項之混合物，其具有中樞神經膽鹼激動作用、保肝作用、抗發炎或抗腫瘤活性。
12. 根據申請專利範圍第 11 項之混合物，其中腫瘤係選自肝、腸、骨、血、淋巴及乳房之細胞或組織的腫瘤。
13. 一種組合物，包括具下式之化合物



其中

X 係 N 或 O；

R₁ 係 C₁₋₁₀ 烷氧基、C₂₋₁₀ 烯氧基或 C₂₋₁₀ 炔氧基；

R₂ 係 H、C₁₋₁₀ 烷基、C₂₋₁₀ 烯基或 C₂₋₁₀ 炔基；及

R₃ 係無、H 或羥基；

但當 X 係 O 時，則 R₃ 係無。

14. 根據申請專利範圍第 13 項之組合物，其中化合物係

3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]呋喃-2,5-二酮;

3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]-1*H*-吡咯-2,5-二酮;

3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]-1*H*-吡咯-1-醇-2,5-二酮;

3*R**, 4*S**-1-羥基-3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]吡咯烷-2,5-二酮; 或

3*R**, 4*R**-1-羥基-3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]吡咯烷-2,5-二酮。

15. 根據申請專利範圍第 14 項之組合物, 其中化合物係

3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]-1*H*-吡咯-2,5-二酮; 或

3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]-1*H*-吡咯-1-醇-2,5-二酮。

16. 根據申請專利範圍第 13 項之組合物, 其減低收縮壓或增加高密度脂蛋白。

17. 根據申請專利範圍第 13 項之組合物, 其具有中樞神經膽鹼激動作用、保肝作用、抗發炎或抗腫瘤活性。

18. 根據申請專利範圍第 13 項之組合物, 其中腫瘤係選自肝、腸、骨、血、淋巴及乳房之細胞或組織的腫瘤。

19. 一種牛樟芝菌絲體, 包含申請專利範圍第 1 項之化合物。

20. 根據申請專利範圍第 19 項之菌絲體，其中化合物係

3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]呋喃-2,5-二酮；

3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]-1*H*-吡咯-2,5-二酮；

3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]-1*H*-吡咯-1-醇-2,5-二酮；

3*R**, 4*S**-1-羥基-3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]吡咯烷-2,5-二酮；或

3*R**, 4*R**-1-羥基-3-異丁基-4-[4-(3-甲基-2-丁烯氧基)苯基]吡咯烷-2,5-二酮。

拾壹、圖式：

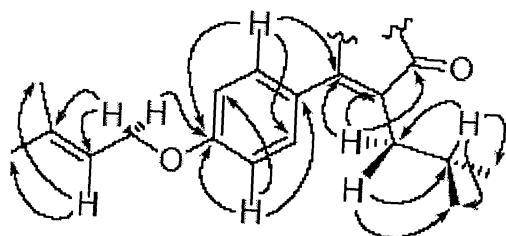


圖 1

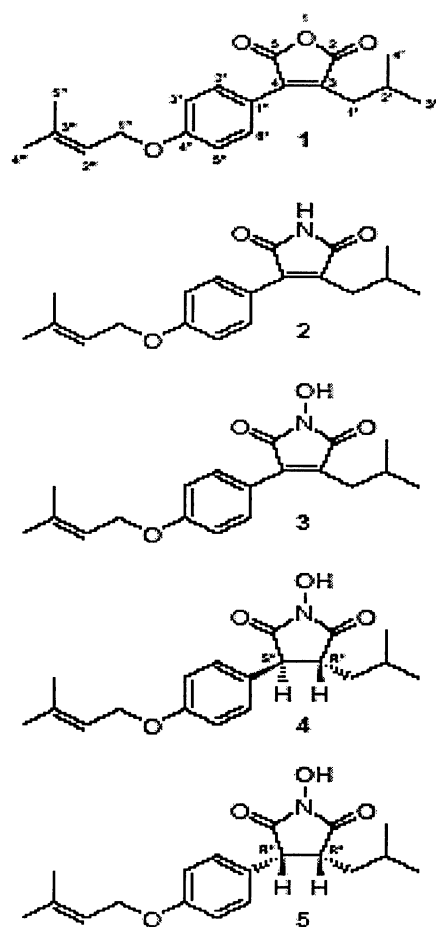


圖 2

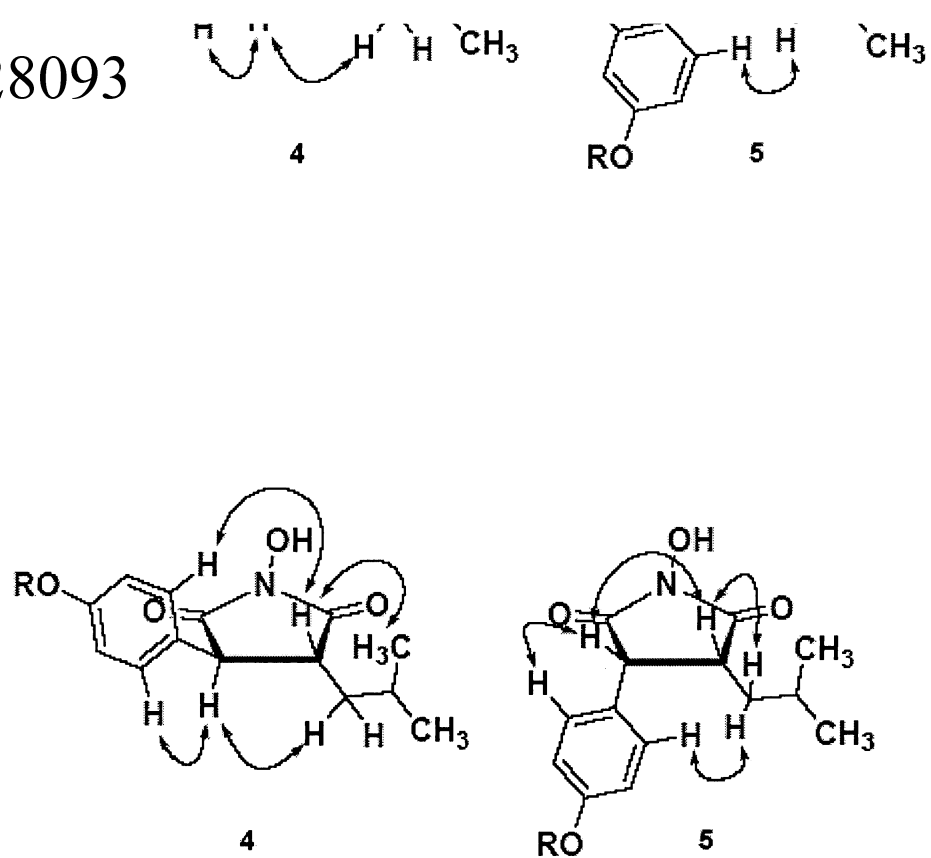


圖 3

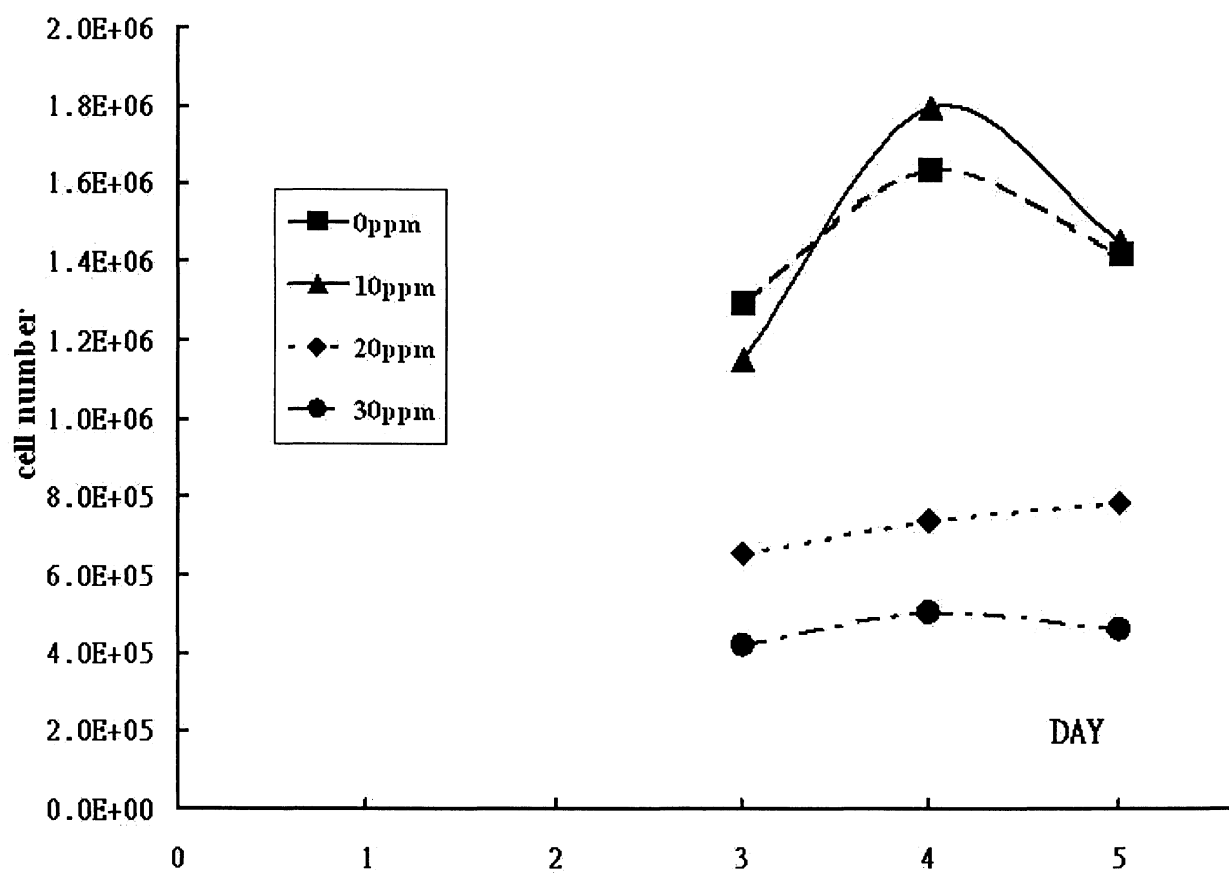
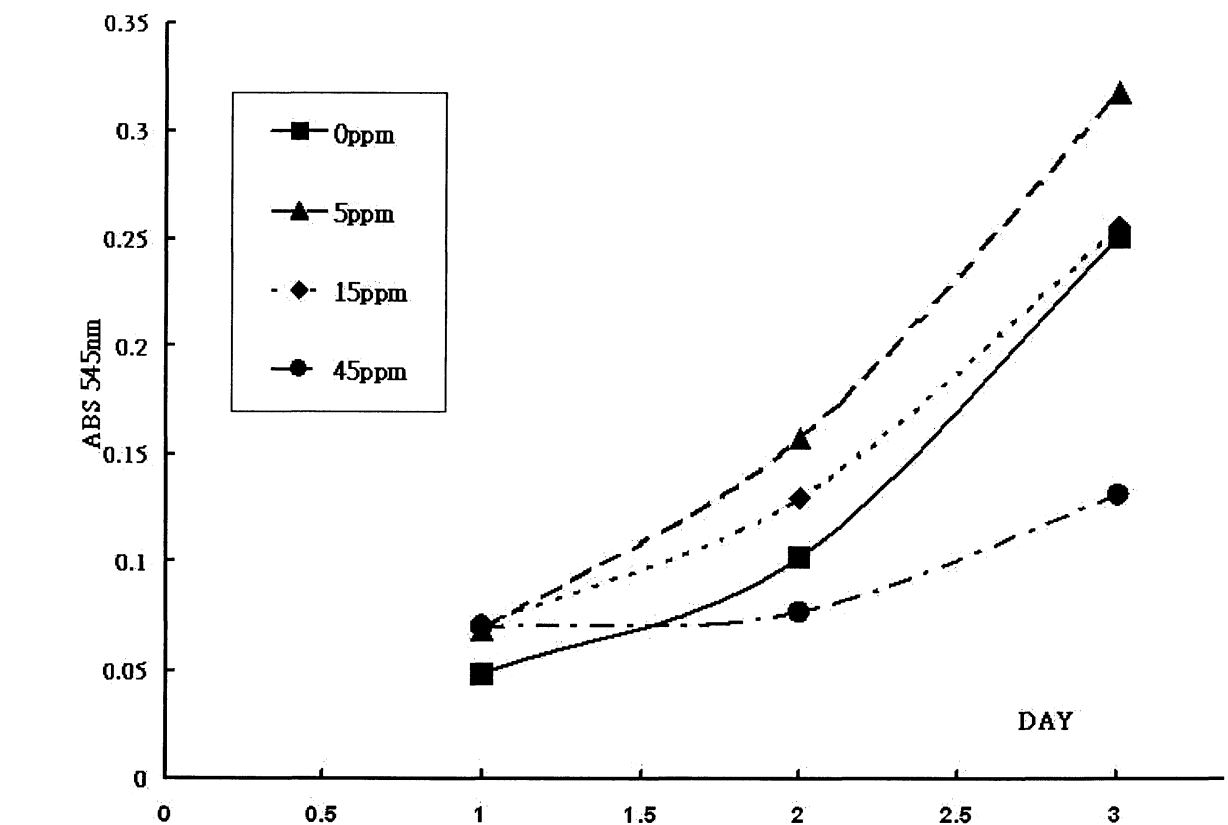


圖 4-a (上)及圖 4-b (下)

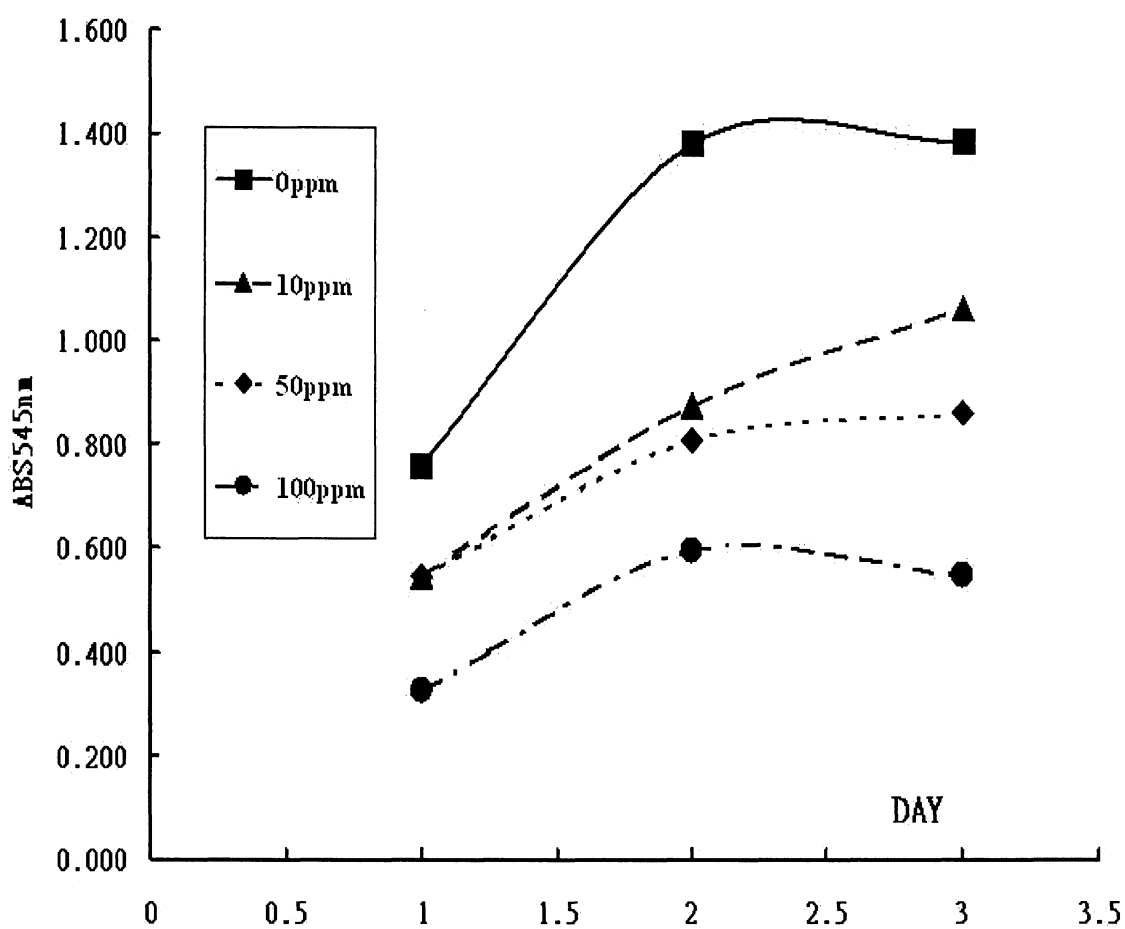
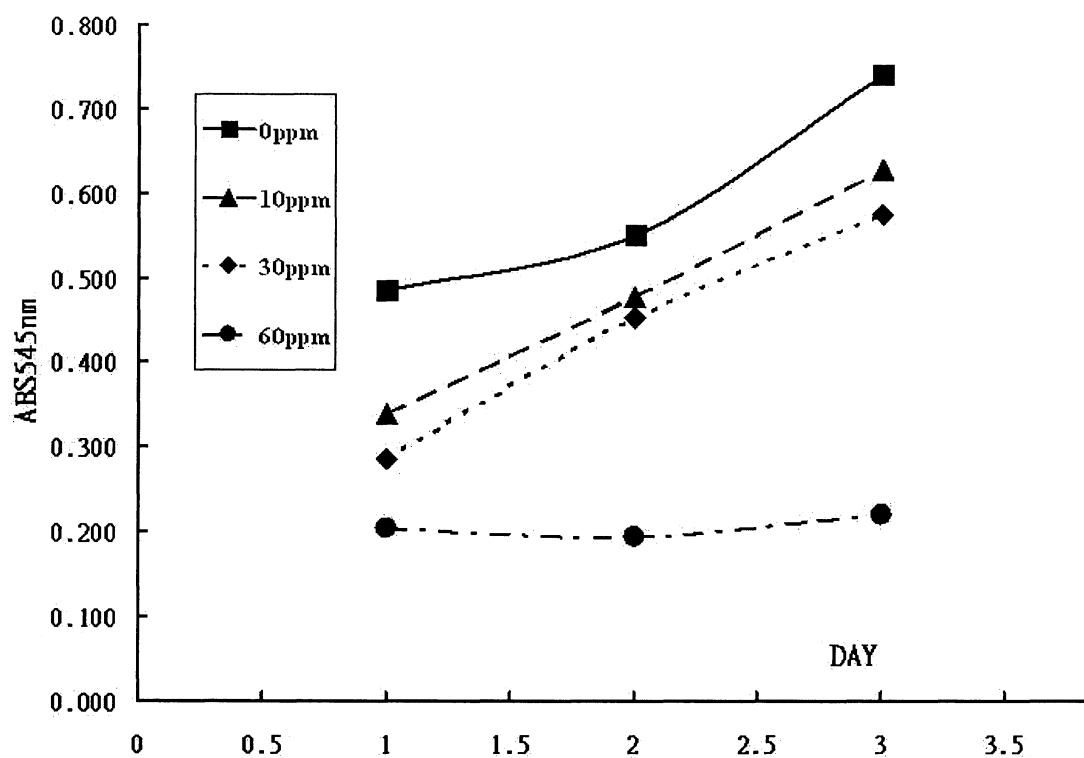


圖 4-c (上)及圖 4-d (下)

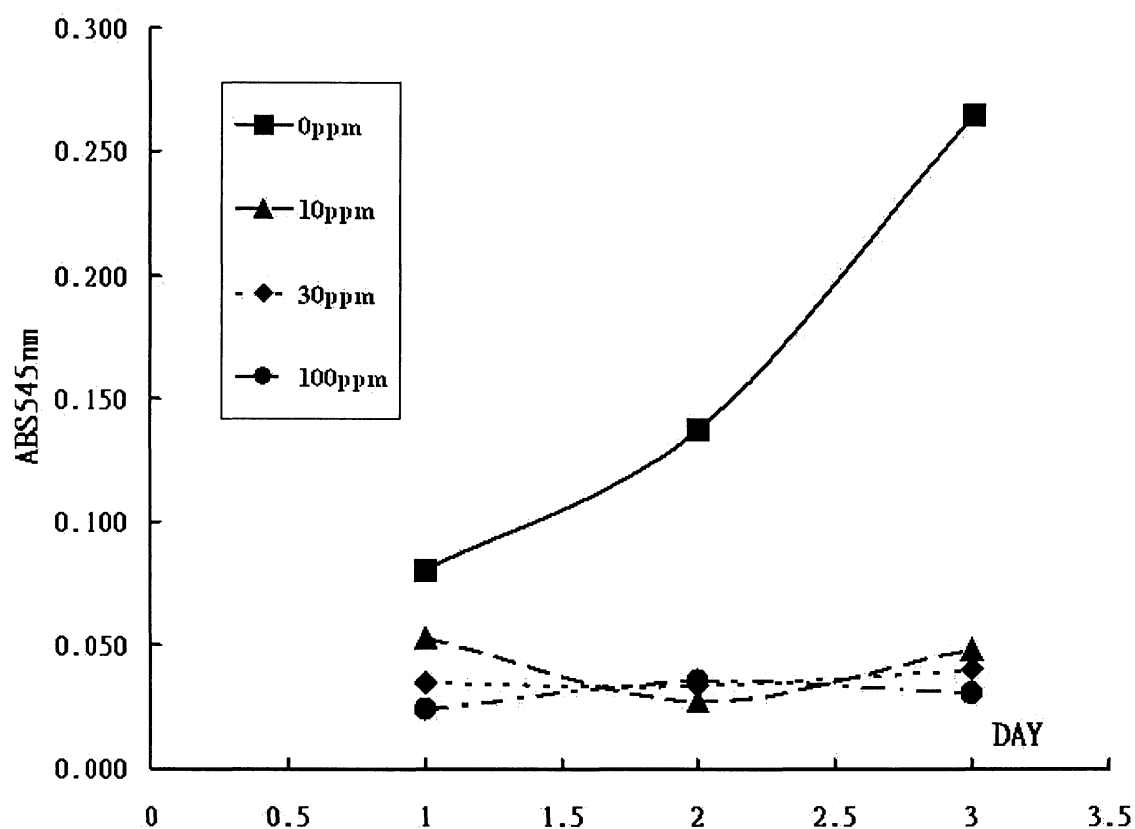
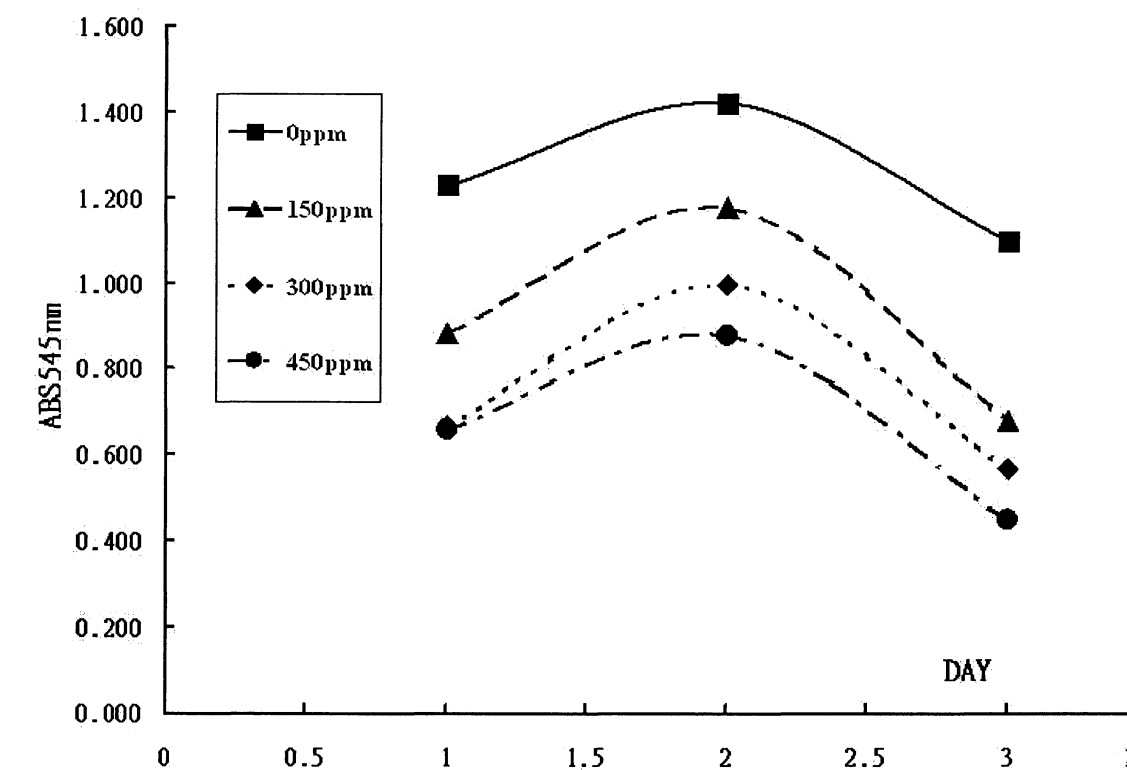


圖 5-a (上)及圖 5-b (下)

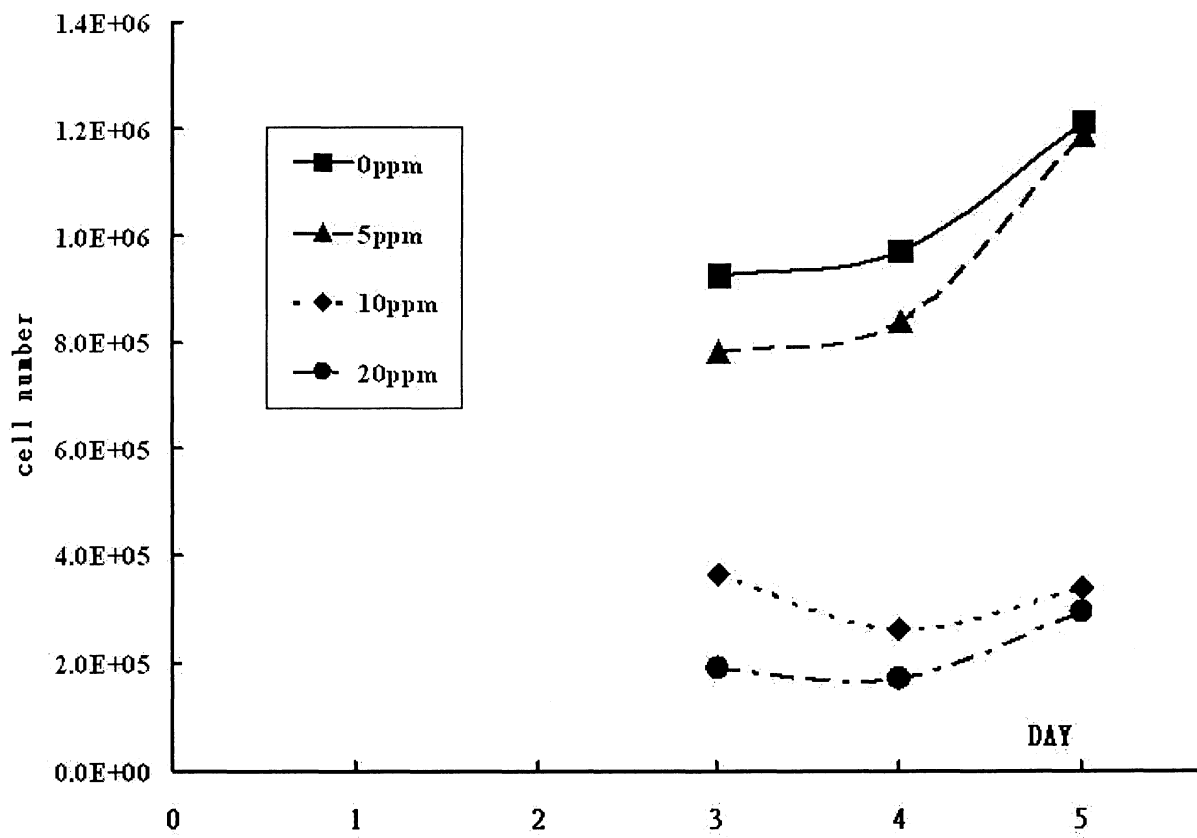


圖 5-c

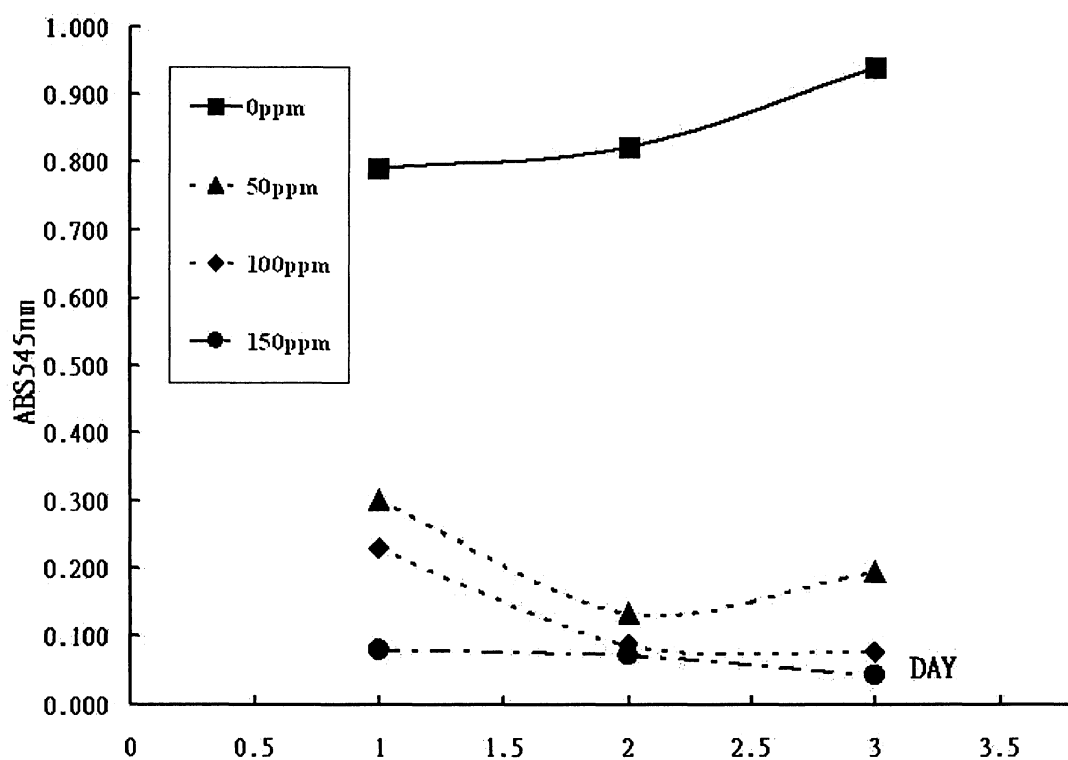
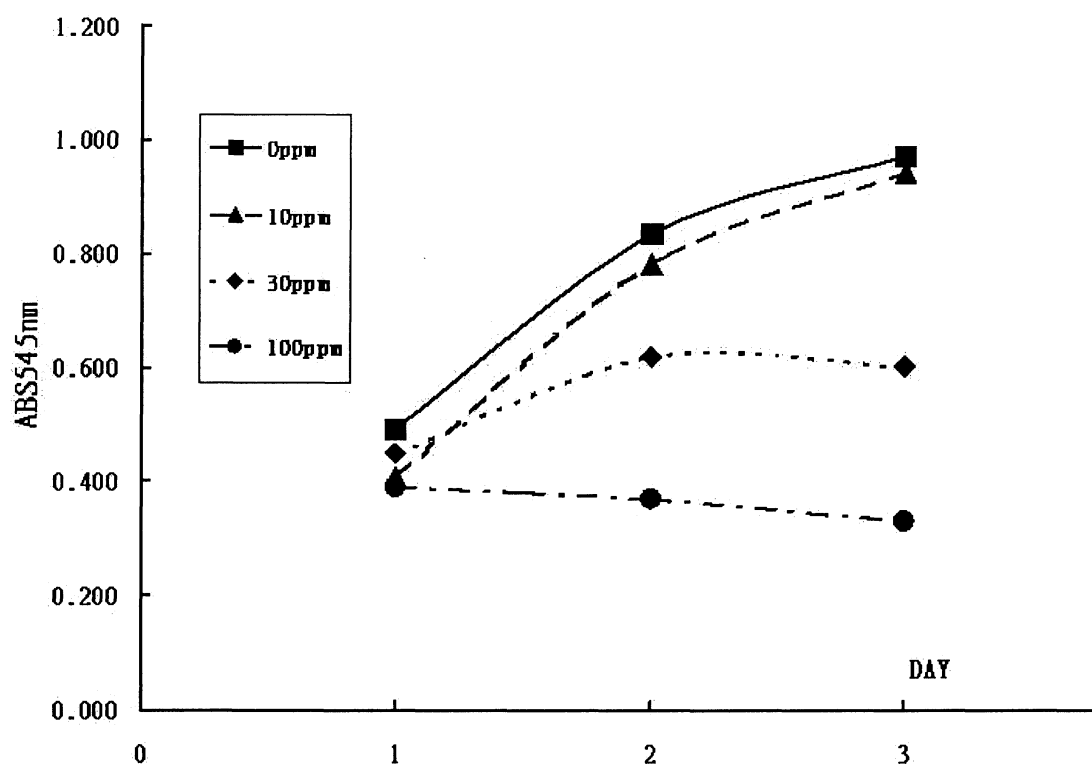


圖 6-a (上)及圖 6-b (下)

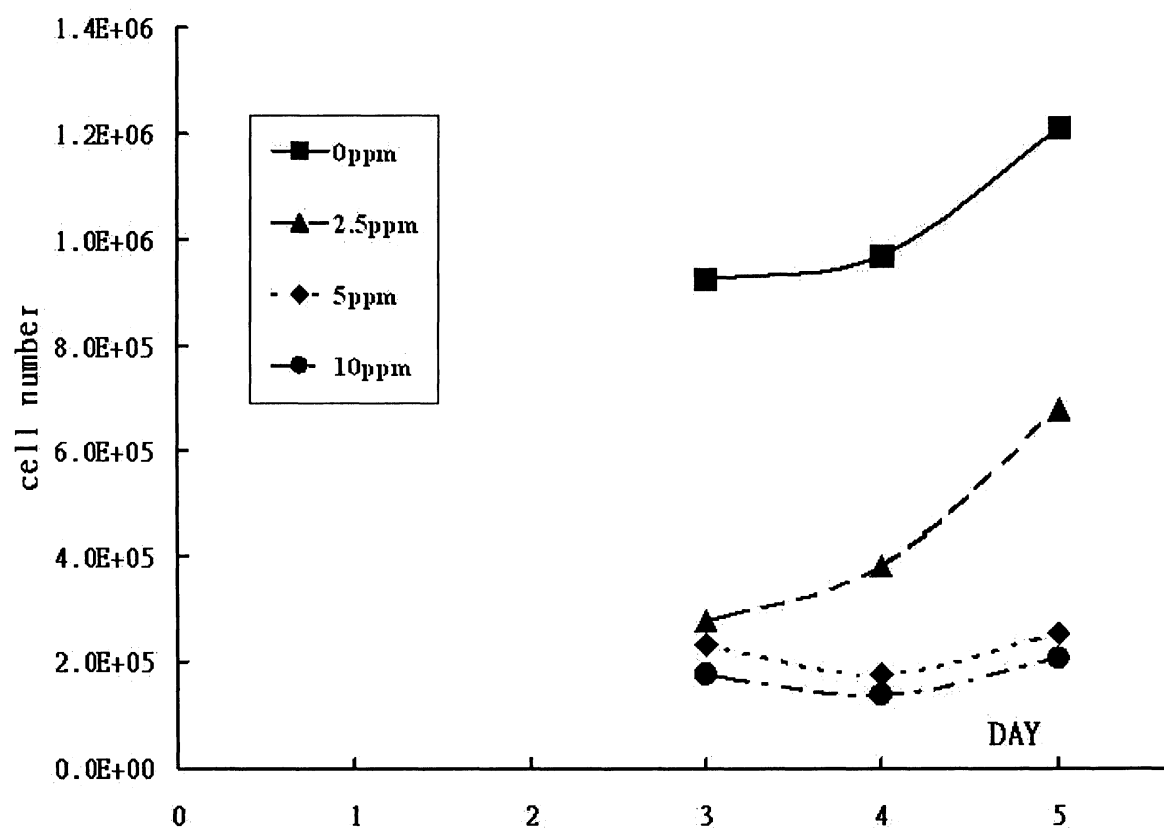
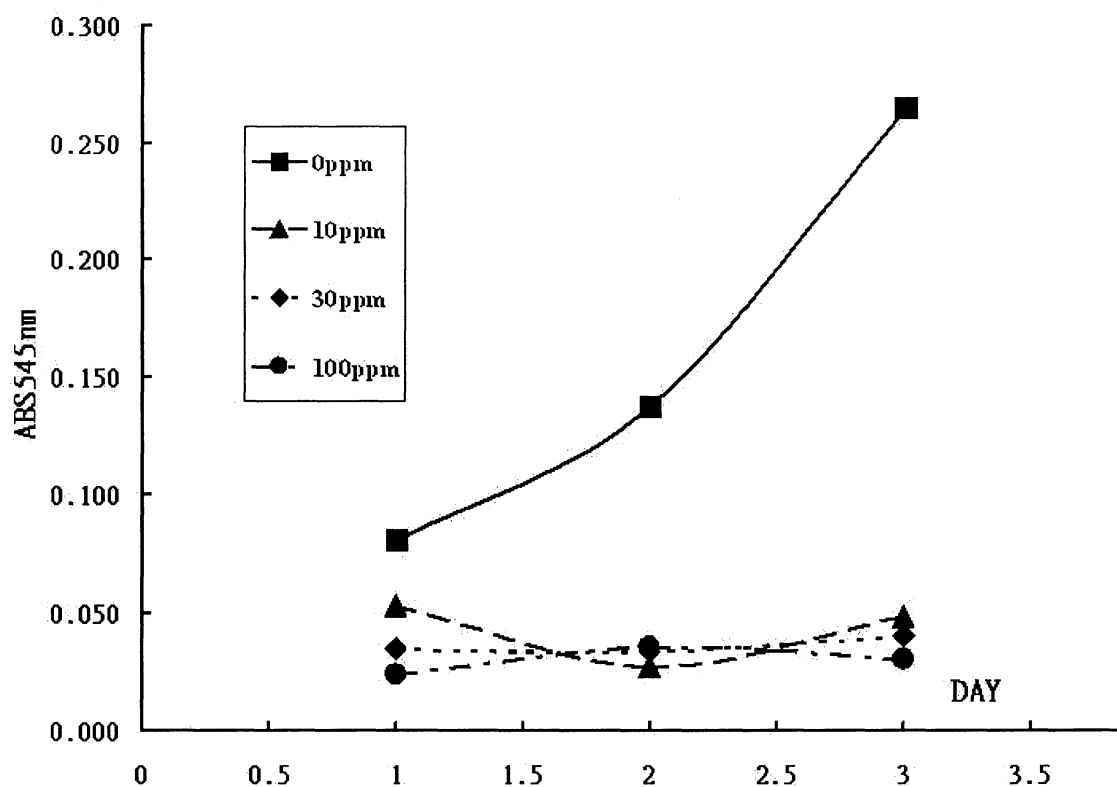


圖 6-c (上)及圖 6-d (下)

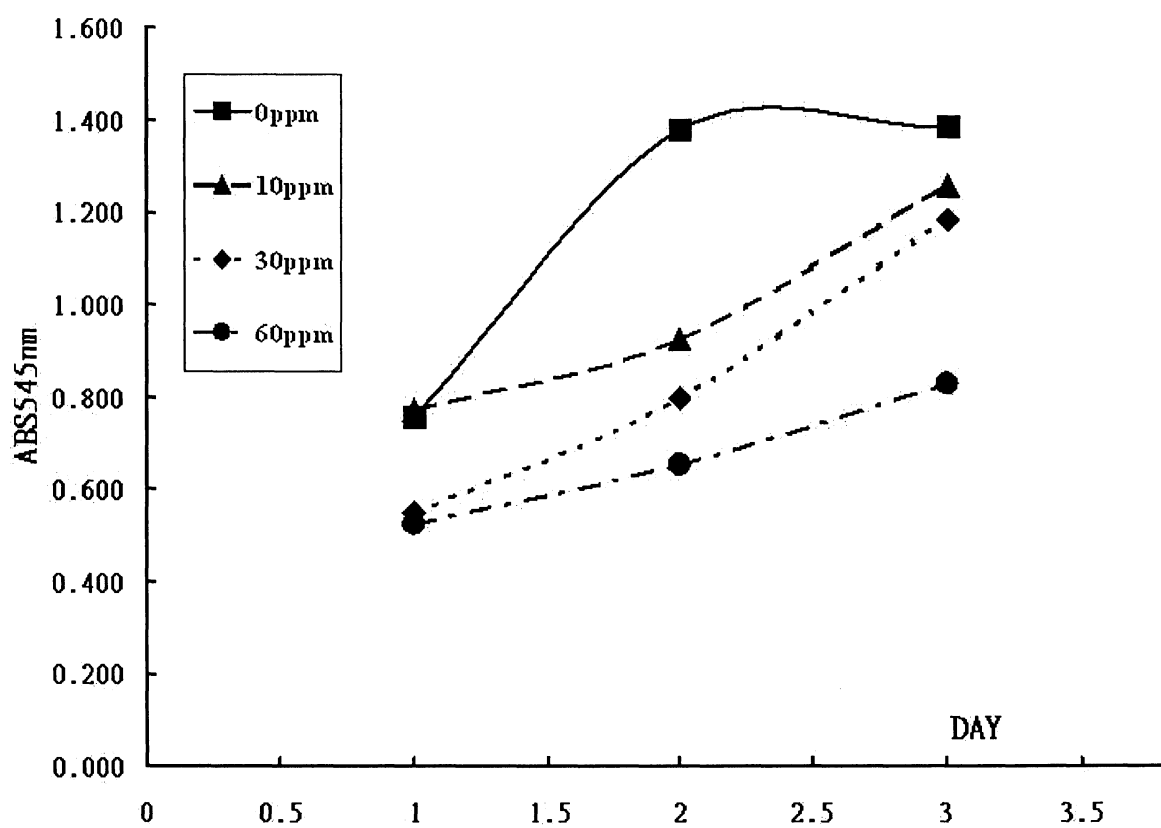
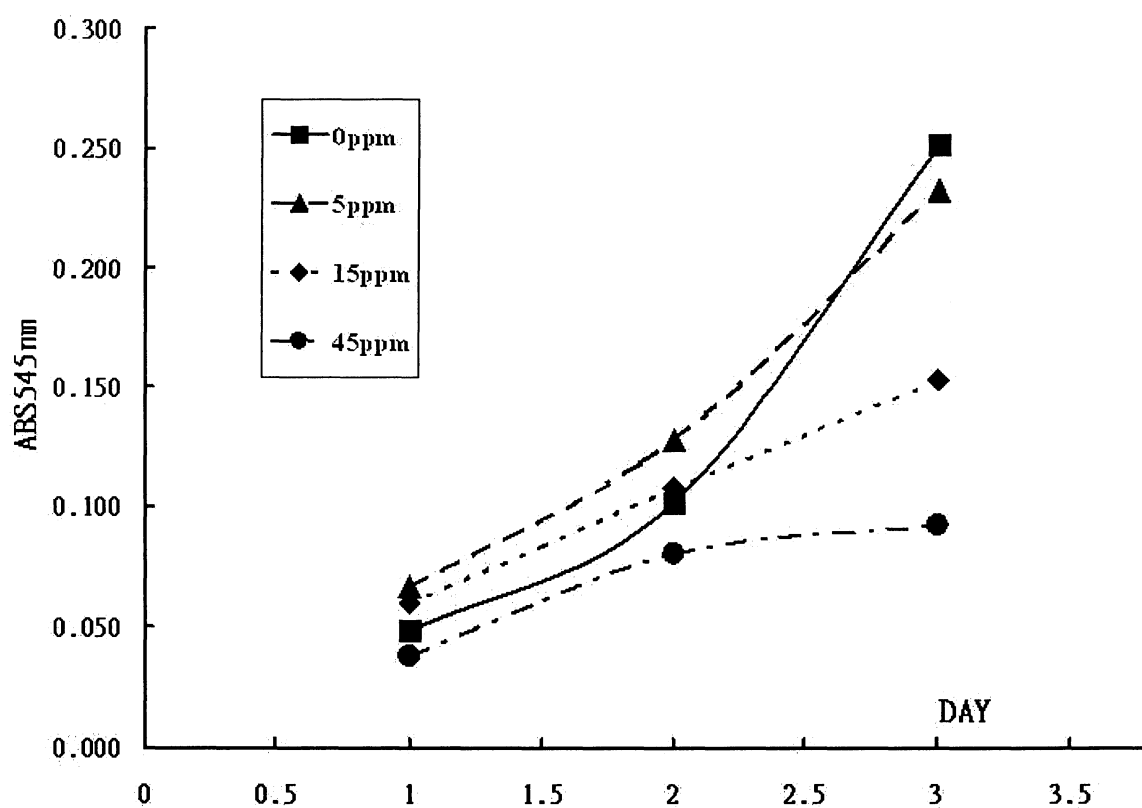


圖 6-e (上)及圖 6-f(下)

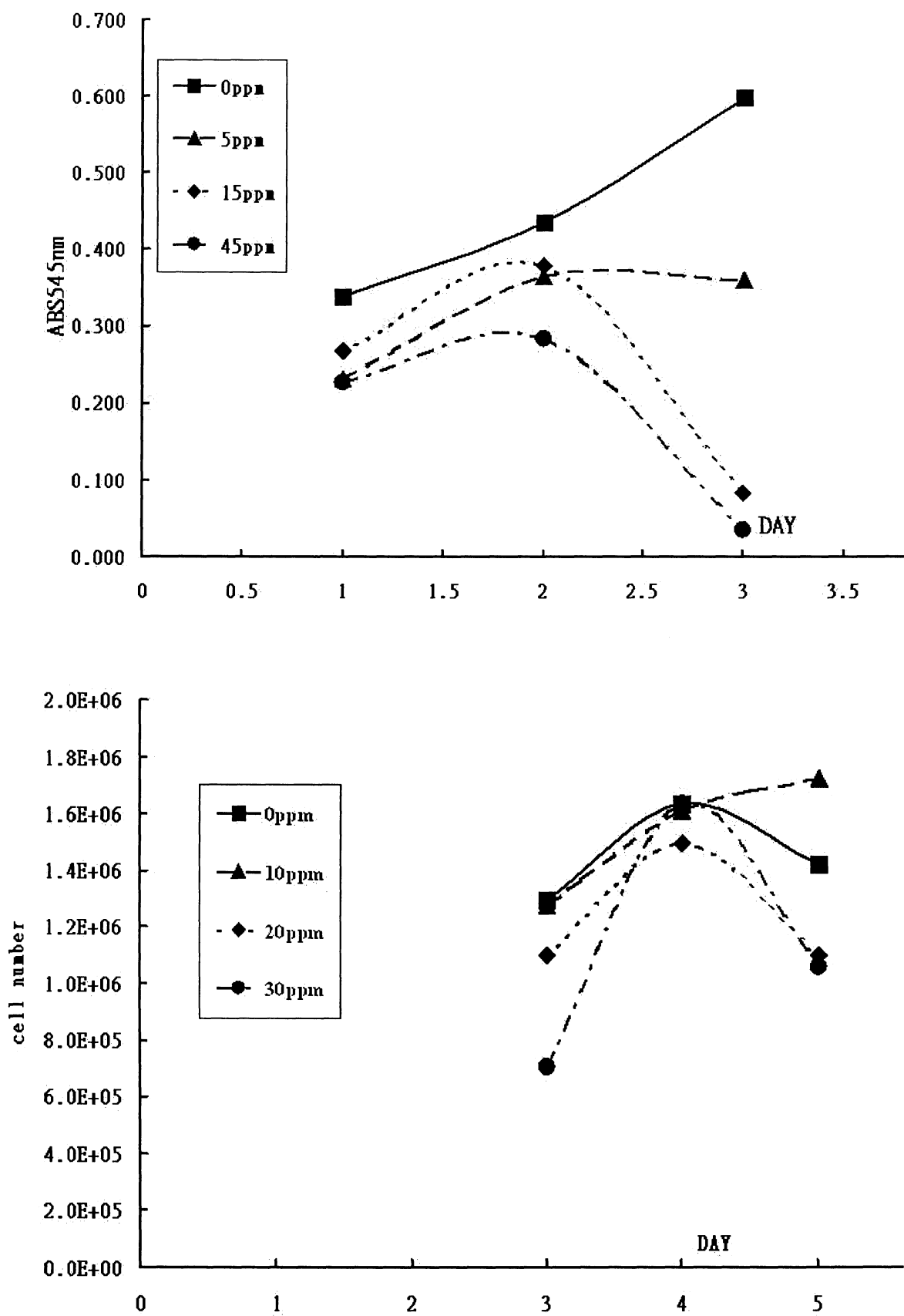


圖 7-a (上)及圖 7-b (下)

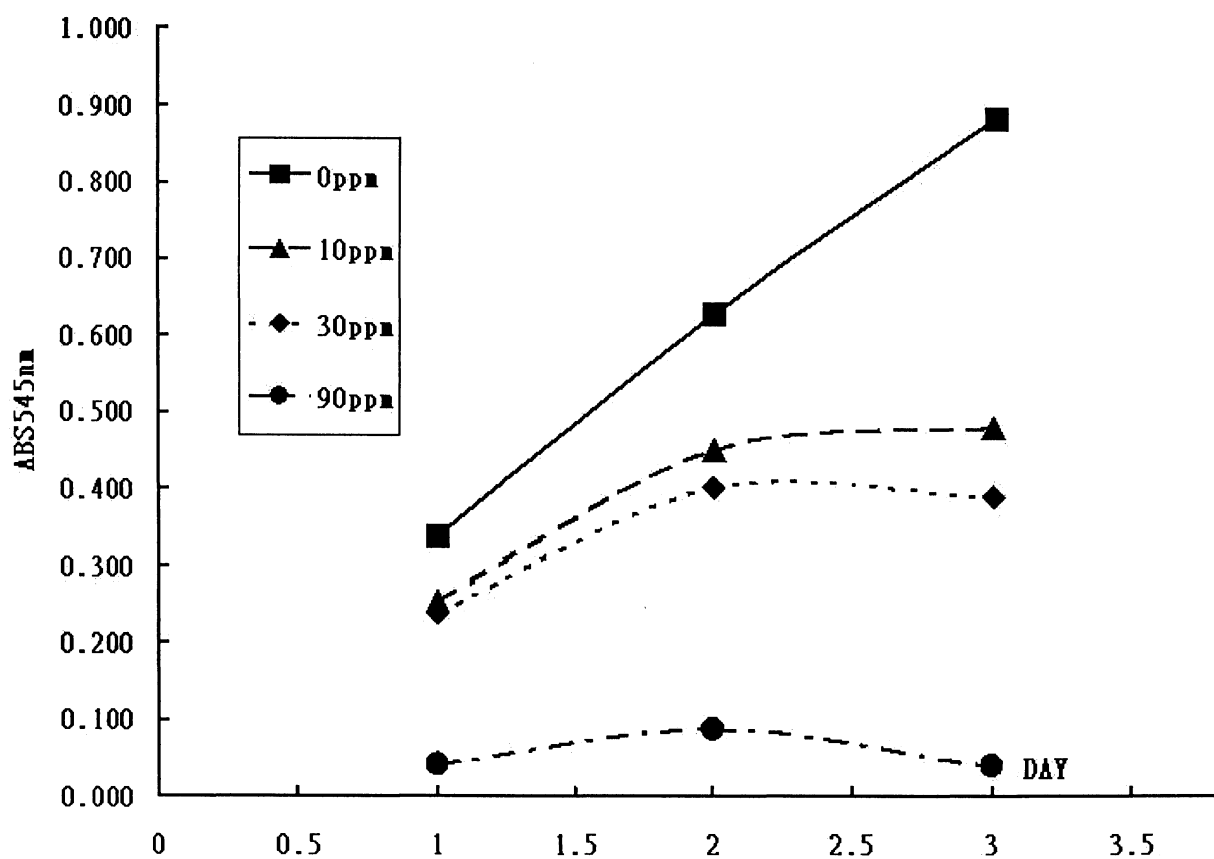
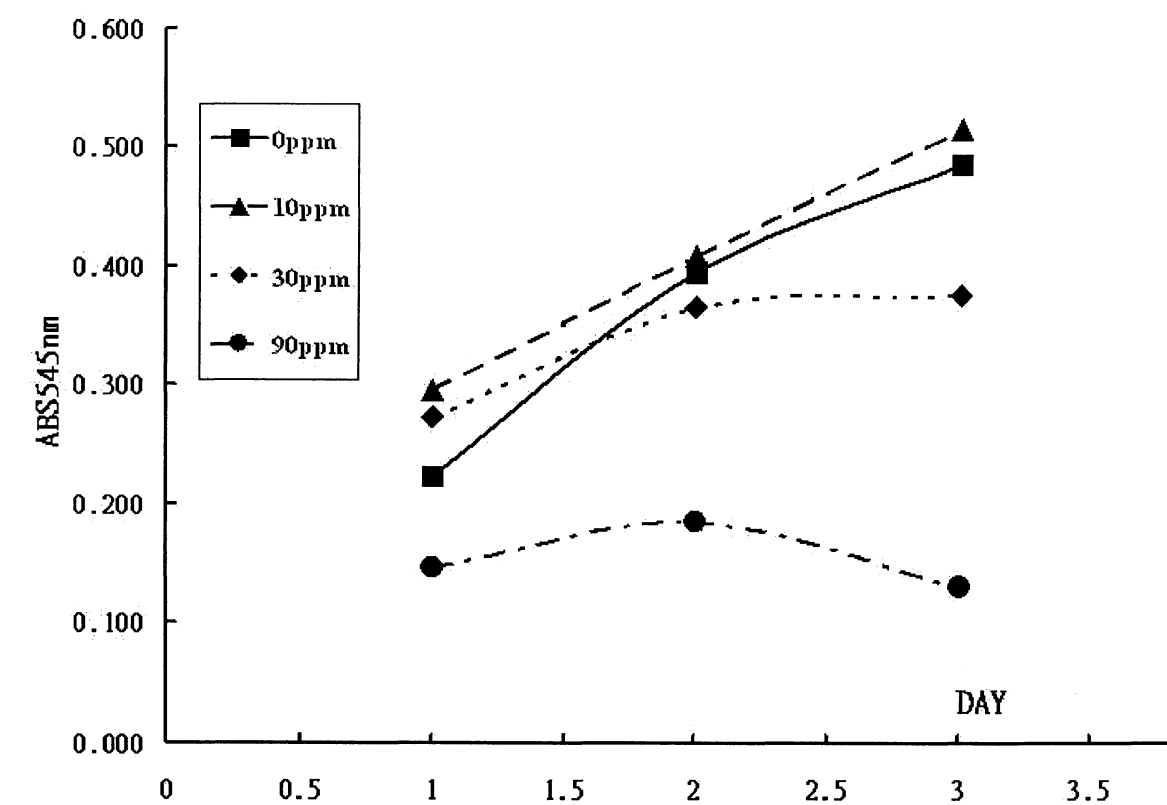


圖 7-c (上)及圖 7-d (下)

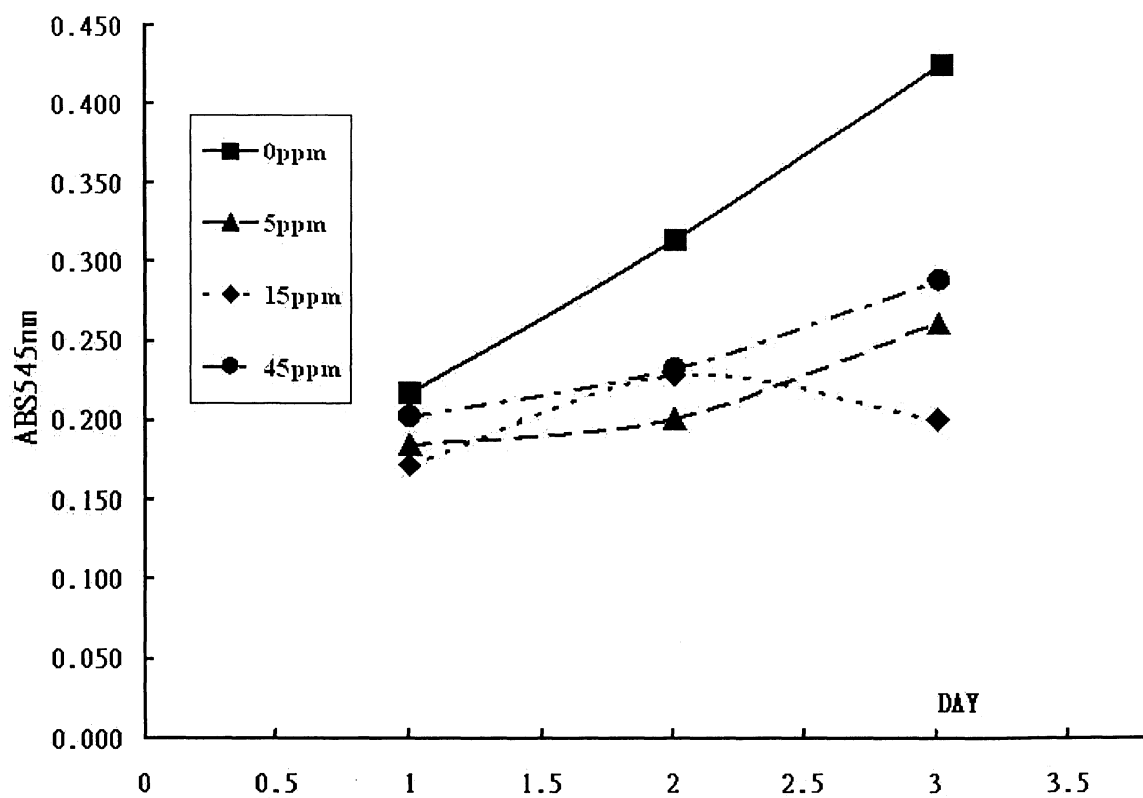
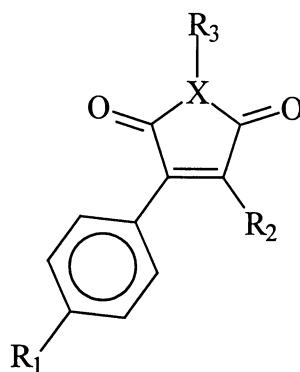


圖 7-e

柒、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(二)圖。

(二)本代表圖之元件代表符號簡單說明：



捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：