

國立交通大學

應用化學系博士班

博士論文

2',3'-環氧黃樟素所形成 DNA 加成產物
之體外與體內研究

In vitro and *in vivo* studies of safrole 2',3'-oxide induced
DNA adducts

研究生：沈璫卿

指導教授：鍾文聖 博士

共同指導：吳焜裕 博士

中華民國一〇一年九月

2',3'-環氧黃樟素所形成 DNA 加成產物
之體外與體內研究

In vitro and *in vivo* studies of safrole 2',3'-oxide induced
DNA adducts

研究生：沈璫卿

Student : Li-Ching Shen

指導教授：鍾文聖 博士

Advisor : Wen-Sheng Chung

共同指導：吳焜裕 博士

Co-advisor : Kuen-Yuh Wu

國立交通大學

應用化學系博士班

博士論文

A Thesis

Submitted to Ph. D. Program, Department of Applied Chemistry

College of Science

National Chiao Tung University

in partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Doctor of Philosophy

in

Applied Chemistry

September 2012

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國一〇一年九月

2',3'-環氧黃樟素所形成 DNA 加成產物之體外與體內研究

學生：沈璫卿

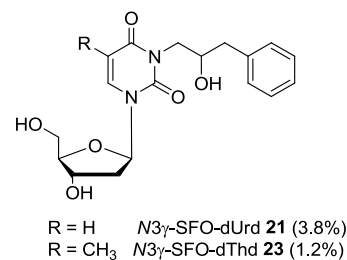
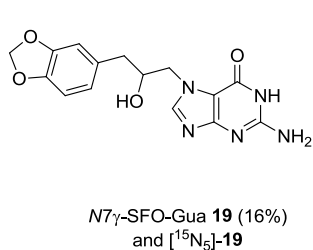
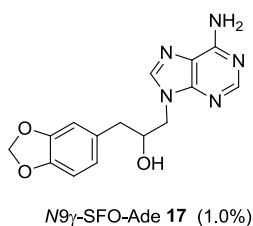
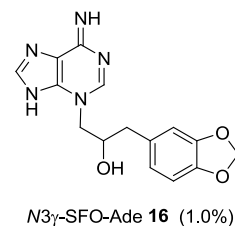
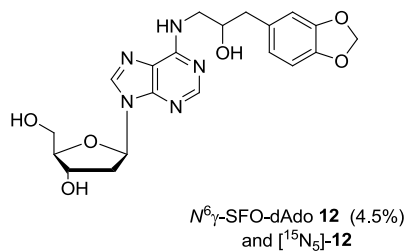
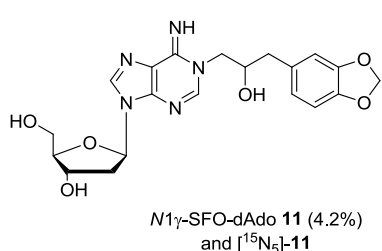
指導教授：鍾文聖 教授

共同指導：吳焜裕 教授

國立交通大學應用化學系博士班

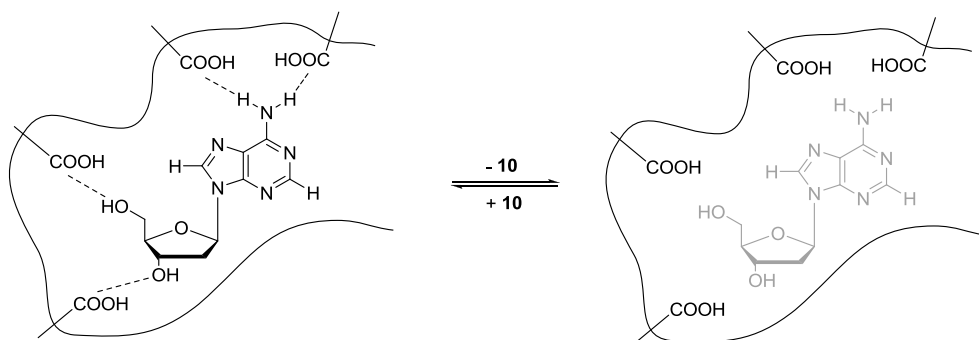
摘要

本論文第一部份首先合成黃樟素代謝產物 **3** 分別與 2'-去氧腺嘌呤 (2'-deoxyadenosine, 2'-dAdo **10**)、腺嘌呤 (adenine, Ade **15**)、2'-去氧鳥糞嘌呤 (2'-dioxoguanosine, 2'-dGuo **18**)、2'-去氧胞嘧啶 (2'-deoxycytidine, 2'-dCyt **20**) 和胸腺嘧啶 (2'-thymidine, 2'-dThd **22**) 以及 [¹⁵N₅]-**10** 和 [¹⁵N₅]-**18** 進行反應之加成產物的單離與鑑定。分離且鑑定的產物分別有 N1γ-SFO-dAdo **11** (4.2%)、N⁶γ-SFO-dAdo **12** (4.5%)、N3γ-SFO-Ade **16** (1.0%)、N9γ-SFO-Ade **17** (2.4%)、N7γ-SFO-Gua **19** (16%)、N3γ-SFO-dUrd **21** (3.8%) 和 N3γ-SFO-dThd **23** (1.2%) 以及內標準品 [¹⁵N₅]-**11**、[¹⁵N₅]-**12** 和 [¹⁵N₅]-**19**。



為了探討黃樟素代謝產物 **3** 是否會攻擊 DNA 形成 DNA 加成產物，選擇文獻上較先探討的嘌呤加成產物 **11**、**12**、**16** 和 **19** 當成生物指標，利用同位素稀釋 (isotope dilution) 高效液相層析電噴灑游離串聯質譜法 (liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry, LC-ESI-MS/MS) 定量這些加成產物體內與體外的生成量。體外實驗，將黃樟素代謝產物 **3** 與小牛胸腺 DNA (Calf thymus DNA) 反應，得到每 10^6 個核苷酸 (nucleotides) 中有 2000 個加成產物 **11**、170 個加成產物 **12**、660 個加成產物 **16** 以及 2670 個加成產物 **19**。接著以靜脈注射方式給予老鼠單一劑量之黃樟素代謝產物 **3** (30 mg/kg body weight) 並成功分析到尿液中加成產物 **19**，證實了黃樟素代謝產物 **3** 在體內會攻擊 DNA 產生 DNA 加成產物。

本論文第二部份是製備 2'-去氧腺嘌呤模版高分子。本研究將模版分子 **10**、甲基丙烯酸 **27** 單體、二甲基丙烯酸乙二醇酯 **28** 交聯劑與偶氮二異丁腈 **29** 在乙氫/水 (4/1, v/v) 之混合液，在 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下利用波長 365 nm 之紫外光燈源照射，進行聚合反應並利用索氏萃取 (Soxhlet extraction) 將模版分子移除得到具吸附 2'-去氧腺嘌呤專一性之模版高分子。



In vitro and *in vivo* studies of safrole 2',3'-oxide induced DNA adducts

Student : Li-Ching Shen

Advisor : Wen-Sheng Chung

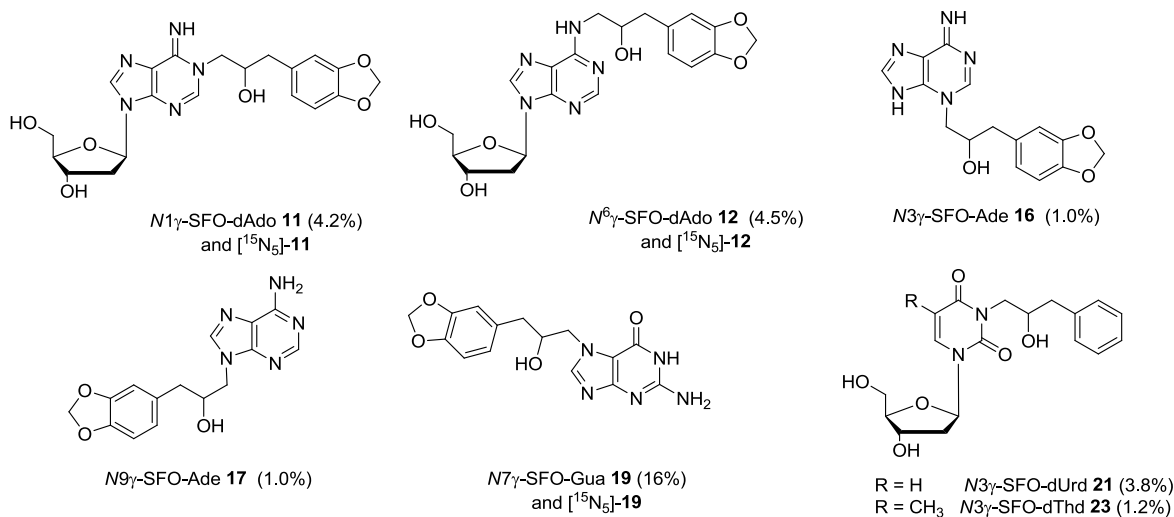
Co-advisor : Kuen-Yuh Wu

Ph. D. Program, Department of Applied Chemistry

National Chiao Tung University

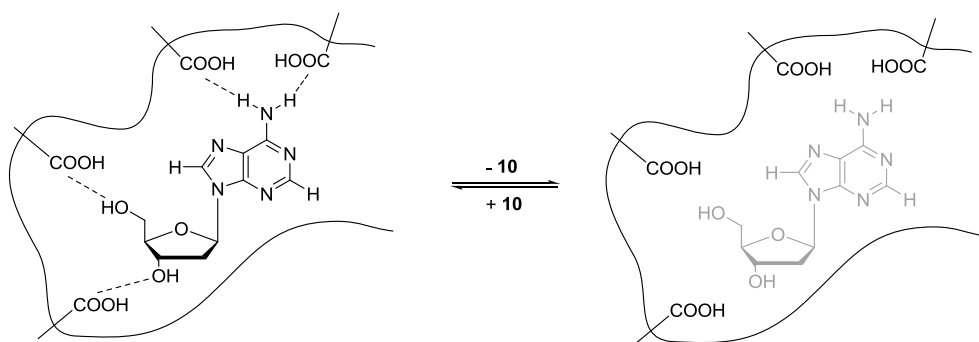
ABSTRACT

In the first part of this thesis, we synthesized SFO **3** and characterized the DNA adducts from the reactions of **3** with 2'-deoxyadenine (2'-dAdo, **10**), adenine (Ade, **15**), 2'-deoxyguanosine (2'-dGuo, **18**), 2'-deoxycytidine (2'-dCyt, **20**), and thymidine (Thd, **22**) to investigate the SFO-DNA adducts formed *in vivo* and *in vitro*. The reactions of **3** with **10**, **15**, **18**, **20**, and **22** were carried out under physiological conditions (pH 7.4, 37 °C) which gave five adducts *N1*γ-SFO-dAdo (**11**) (4.2%), *N*⁶γ-SFO-dAdo (**12**) (4.5%), *N3*γ-SFO-Ade (**16**) (1.0%), *N9*γ-SFO-Ade (**17**) (2.4%), *N7*γ-SFO-Gua (**19**) (16%), *N3*γ-SFO-dUrd (**21**) (3.8%), and *N3*γ-SFO-Thd (**23**) (1.6%). Moreover, ¹⁵N labeled analogs of adducts [¹⁵N₅]-**11**, [¹⁵N₅]-**12**, and [¹⁵N₅]-**19** were synthesized to serve as internal standards.



A newly-developed isotope-dilution high performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC–ESI-MS/MS) was developed to investigate the SFO-DNA adducts *in vitro* and *in vivo*. *In vitro* study, the reaction of **3** with Calf thymus DNA showed that the levels of **11**, **12**, **16**, and **19** were determined to be 2000, 170, 660, and 2670 adducts per 10^6 nucleotides. Subsequently, we measured the amount of adduct **19** in the urine of mice after intraperitoneally treatment with a single dose of **3** (30 mg/kg body weight). These results suggested that **3** can cause *in vivo* formation of DNA adducts.

In the second part of this thesis, we attempted to prepare a molecularly imprinted polymer (MIP) for 2'-deoxyadenosine **10**. A mixture of 2'-deoxyadenosine **10**, methacrylic acid (MAA, **27**), ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA, **28**), and 2, 2'-azoisobutyronitrile (AIBN, **29**) in acetonitrile/water (4/1) was initiated by UV light (365 nm) at 0 °C for 16 hours to obtain a polymer. The polymer after Soxhlet extraction to remove the 2'-deoxyadenosine was found to be a specific receptor for 2'-deoxyadenosine.



謝誌

會唸博班最先要感謝的是台大吳焜裕老師，因為吳老師的支持、鼓勵與引導，我來到了鍾文聖老師實驗室，挑戰了我最害怕的有機化學。感謝吳焜裕老師的指導有了這個研究，感謝鍾文聖老師的指導讓整個研究跨出了第一步，感謝江素瑛老師動物實驗的指導與協助讓研究更完整，尤其感謝這三位老師在文章發表的過程中，大家接力賽般不厭其煩的幫我修改，讓文章順利被接受。

驚頓的我這一路走來除了要比別人更加努力，也多虧一路上幫助我的人，其中特別要感謝學妹佳蓁與台大職衛所學弟明煥。佳蓁，一個陪我哭陪我笑的朋友，在這幾年不論研究上或生活上都會給我意見與幫忙；明煥體諒我通車到台北做實驗，總是事先幫我準備實驗器材，事後幫我收拾善後，為的就是幫我爭取更多的實驗時間，每當離開公衛大樓已經接近十二點時，也陪著我在冷清的台北街頭走到車站才離開，真的非常謝謝他們兩位。

要感謝的人真的太多太多了，實驗室羅鈞博士、怡婷學姐、豪志學長、永育、雨筠、小華、冠彰、偉新、孟榆、英材、映蓉、亨哲、亭伶，在我遇到困難時給我幫忙，心情低落時陪伴我，真的謝謝你們。

最後也要感謝老公至賢的支持，婆婆幫忙照顧小孩才能讓我專心的完成學業。

目錄

中文摘要.....	i
英文摘要.....	iii
謝誌.....	v
表目錄.....	xii
圖目錄.....	xiv
式圖目錄.....	xxi
附圖目錄.....	xxii

第一章 2',3'-環氧黃樟素與 DNA 鹼基反應所形成加成產物之探討

1.1 緒論.....	1
1.1.1 DNA 加成產物.....	1
1.1.2 DNA 加成產物的修復和癌症的關係.....	2
1.1.3 黃樟素 (Safrole) 1.....	4
1.1.4 黃樟素 (Safrole) 1 致癌機制的相關研究.....	5
1.1.5 DNA 加成產物的分析方法.....	10
1.1.6 研究動機.....	11
1.2 結果與討論.....	14

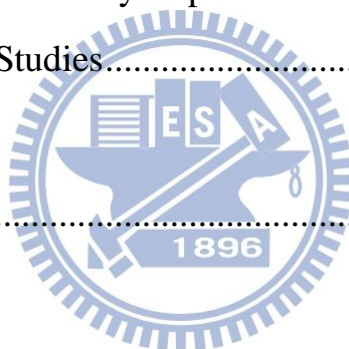
1.2.1	合成黃樟素代謝產物 2',3'-環氧黃樟素(safrole 2',3'-oxide, SFO 3)	14
1.2.2	2',3'-環氧黃樟素 DNA 加成產物之合成、純化、結構鑑定	14
1.2.2.1	黃樟素代謝產物(±)- 3 與 2'-去氧腺嘌呤 (2'-deoxyadenosine, 2'-dAdo 10)之反應	14
1.2.2.1.1	DNA 加成產物 N1 γ -SFO-dAdo 11 之結構鑑定	17
1.2.2.1.2	DNA 加成產物 N ⁶ γ -SFO-dAdo 12 之結構鑑定	21
1.2.2.2	黃樟素代謝產物(R)-(+)-enriched-SFO 3 與 2'-去氧腺嘌呤 10 之反應	24
1.2.2.2.1	合成具光學活性之 (R)-(+)-enriched-SFO 3	24
1.2.2.2.2	2'-去氧腺嘌呤 DNA 加成產物 (R)-enriched-N1 γ -SFO-dAdo 11 與 (R)-enriched-N ⁶ γ -SFO-dAdo 12 之結構鑑定	25
1.2.2.3	N1 γ -SFO-dAdo 11 經由 Dimroth rearrangement 重排形成 N ⁶ γ -SFO-dAdo 12	28
1.2.2.4	黃樟素代謝產物(±)- 3 與腺嘌呤 (Adenine, Ade 10)之反應	32
1.2.2.4.1	DNA 加成產物 N3 γ -SFO-Ade 16 之結構鑑定	34
1.2.2.4.2	DNA 加成產物 N9 γ -SFO-Ade 17 之結構鑑定	38
1.2.2.5	黃樟素代謝產物(±)- 3 與 2'-去氧鳥糞嘌呤(2'-deoxyguanosine,	

2'-dGuo 10)之反應	40
1.2.2.5.1 DNA 加成產物 <i>N</i> 7γ-SFO-Gua 19 之結構鑑定	42
1.2.2.6 黃樟素代謝產物(±)- 3 與 2'-去氧胞嘧啶 (2'-deoxycytidine, 2'-dCyt 20) 之反應	45
1.2.2.6.1 DNA 加成產物 <i>N</i> 3γ-SFO-dUrd 21 之結構鑑定	47
1.2.2.7 黃樟素代謝產物(±)- 3 與胸腺嘧啶(thymidine, 2'-dThd 22) 之 反應	51
1.2.2.7.1 DNA 加成產物 <i>N</i> 3γ-SFO-dThd 23 之結構鑑定	53
1.2.2.8 利用穩定同位素稀釋高效液相層析電噴灑游離串聯質譜法 定量黃樟素代謝產物 SFO 3 之 DNA 加成產物體外與體內的 生成量	55
1.2.2.8.1 合成同位素標定之內標準品 [¹⁵ N ₅]- <i>N</i> 1γ-SFO-dAdo 11 、 [¹⁵ N ₅]- <i>N</i> 6γ-SFO-dAdo 12 、[¹⁵ N ₅]- <i>N</i> 7γ-SFO-Gua 19	56
1.2.2.8.2 利用同位素稀釋高效液相層析電噴灑游離串聯質譜 (LC-ESI-MS/MS) 儀定量(±)-SFO 3 與小牛胸腺 DNA (Calf thymus DNA)反應之 DNA 加成產物	58
1.2.2.8.3 利用穩定同位素稀釋高效液相層析電噴灑游離串聯質 譜法定量老鼠尿液中 <i>N</i> 7γ-SFO-Gua 19 之分析方法開發 與方法確校	63

1.2.2.8.4	利用穩定同位素稀釋高效液相層析電噴灑游離串聯質譜法定量老鼠尿液中之 <i>N7</i> γ-SFO-Gua 19	65
1.3	結論	68
1.4	實驗方法	70
1.4.1	Purification of DNA Adducts.....	70
1.4.2	Spectroscopic and Spectrometric Methods.....	71
1.4.3	Synthesis of (±)-SFO 3	71
1.4.4	Enantioselective Synthesis of (<i>R</i>)-(+)-enriched-SFO 3	72
1.4.4.1	Synthesis of (<i>R</i>)-(+)-5-(2,3-Dihydroxypropyl)-1,3-benzodioxole 13	72
1.4.4.2	Synthesis of (<i>R</i>)-(+)-5-(2-Hydroxy-3-tosyloxypropyl)-1,3-benzodioxole 14	73
1.4.4.3	Synthesis of (<i>R</i>)-(+)-5-Oxiranylmethyl-1,3-benzodioxole 3	74
1.4.5	Synthesis of <i>N1</i> γ-SFO-dAdo 11 , (<i>R</i>)-enriched- <i>N1</i> γ-SFO-dAdo 11 , <i>N</i> ⁶ γ-SFO-dAdo 12 , and (<i>R</i>)-enriched- <i>N</i> ⁶ γ-SFO-dAdo 12	75
1.4.6	Rearrangement of <i>N1</i> γ-SFO-dAdo 11 to <i>N</i> ⁶ γ-SFO-dAdo 12	78
1.4.7	Synthesis of <i>N3</i> γ-SFO-Ade 16 and <i>N9</i> γ-SFO-Ade 17	78
1.4.8	Synthesis of <i>N7</i> γ-SFO-Gua 19	80
1.4.9	Synthesis of <i>N3</i> γ-SFO-dUrd 21	81
1.4.10	Synthesis of <i>N3</i> γ-SFO-dThd 23	82
1.4.11	Synthesis of [¹⁵ N ₅]- <i>N1</i> γ-SFO-dAdo 11 , [¹⁵ N ₅]- <i>N</i> ⁶ γ-SFO-dAdo 12 , and [¹⁵ N ₅]- <i>N7</i> γ-SFO-Gua 19	83
1.4.12	High Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization-	

Tandem Mass Spectrometry (HPLC–ESI-MS/MS) for Quantification of DNA Adducts in Calf Thymus DNA.....	84
1.4.13 Reaction of (±)-SFO 3 with Calf Thymus DNA	85
1.4.14 Animal Experiments	86
1.4.15 High Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization– Tandem Mass (HPLC-ESI–MS/MS) Spectrometryic Method for Mice Urine Analysis.....	87
1.4.16 Analysis of <i>N</i> 7γ-SFO-Gua 19 in Urines of Mouse Treated with (±)-SFO 3	88
第二章 製備 2'-去氧腺嘌呤模版分子	
2.1 緒論	89
2.1.1 分子模版的發展歷史.....	89
2.1.2 分子模版高分子(molecularly imprinted polymer, MIP)設計計概念	90
2.1.3 模版與單體間的作用力	91
2.1.4 研究動機	93
2.2 結果與討論	97
2.2.1 2'-去氧腺嘌呤(2'-deoxyadenosine, 2'-dAdo 10) 與甲基丙烯酸 (methacrylic acid, MAA 27) 結合之變溫 NMR 量測.....	97

2.2.2	2'-去氧腺嘌呤模版高分子之聚合.....	99
2.2.3	2'-去氧腺嘌呤模版高分子之鍵結能力.....	101
2.3	未來工作.....	103
2.4	結論.....	104
2.5	實驗方法.....	105
2.4.1	Preparation of Molecularly Imprinted Polymer	105
2.4.1	Batch Rebinding Studies.....	105
第三章	參考文獻.....	106
第四章	附圖.....	118



表目錄

表一、 DNA 鹼基上不同親核位置之相對反應性.....	12
表二、 ^1H and ^{13}C Chemical Shifts (δ), Spin-Spin Coupling Constants, $J_{\text{H,H}}$ (Hz) of Protons, and Long-Range C-H Correlations (HMBC) in $N1\gamma$ -SFO-dAdo 11	20
表三、 ^1H and ^{13}C Chemical Shifts (δ), Spin-Spin Coupling Constants, $J_{\text{H,H}}$ (Hz) of Protons, and Long-Range C-H Correlations (HMBC) in $N^6\gamma$ -SFO-dAdo 12	23
表四、 ^1H and ^{13}C Chemical Shifts (δ), Spin-Spin Coupling Constants, $J_{\text{H,H}}$ (Hz) of Protons, and Long-Range C-H Correlations (HMBC) in $N3\gamma$ -SFO-Ade 16	37
表五、 ^1H and ^{13}C Chemical Shifts (δ), Spin-Spin Coupling Constants, $J_{\text{H,H}}$ (Hz) of Protons, and Long-Range C-H Correlations (HMBC) in $N9\gamma$ -SFO-Ade 17	39
表六、 ^1H and ^{13}C Chemical Shifts (δ), Spin-Spin Coupling Constants, $J_{\text{H,H}}$ (Hz) of Protons, and Long-Range C-H Correlations (HMBC) in $N7\gamma$ -SFO-Gua 19	44
表七、 ^1H and ^{13}C Chemical Shifts (δ), Spin-Spin Coupling Constants, $J_{\text{H,H}}$ (Hz) of Protons, and Long-Range C-H Correlations (HMBC) in $N3\gamma$ -SFO-dUrd 21	49
表八、 ^1H and ^{13}C Chemical Shifts (δ), Spin-Spin Coupling Constants, $J_{\text{H,H}}$ (Hz) of Protons, and Long-Range C-H Correlations (HMBC) in $N3\gamma$ -SFO-dThd 23	55

表九、 小牛胸腺 DNA 與黃樟素代謝產物 SFO 3 在 pH 7.4，37 °C 下反應
72 小時之 DNA 加成產物 11、12、16 及 19 的生成量.....61



圖目錄

圖一、	去氧核糖核酸的基本構造	1
圖二、	DNA 加成產物之形成與修復和癌症的關係	3
圖三、	黃樟素 1 之代謝	6
圖四、	1'-hydroxysafrole 2 的 DNA 加成物	7
圖五、	³² P 同位素標記分析 safrole-DNA 加成產物	7
圖六、	³² P 同位素標記分析 SFO-DNA 加成產物	9
圖七、	(A) (±)-SFO 3 與 2'-去氧腺嘌呤 10 在 pH 7.4, 37 °C 下反應 72 小時與(B) (±)-SFO 3 在 pH 7.4, 37 °C 下反應 72 小時之高效液相層析圖譜。(C) 加成產物 N1γ-SFO-dAdo 11 與(D) 加成產物 N ⁶ γ-SFO-dAdo 12 之 UV 吸收光譜圖	15
圖八、	DNA 加成產物 N1γ-SFO-dAdo 11 和 N ⁶ γ-SFO-dAdo 12 正離子模式下之電噴灑游離質譜圖	16
圖九、	DNA 加成產物 N1γ-SFO-dAdo 11 之 HMBC (500 MHz, d ₆ -DMSO) 光譜圖	17
圖十、	C2-endo 與 C3-endo 構形示意圖	19
圖十一、	DNA 加成產物 N ⁶ γ-SFO-dAdo 12 之 H,H-COSY (500 MHz, d ₆ -DMSO) 光譜圖	22
圖十二、	DNA 加成產物 N1γ-SFO-dAdo 11 (下圖) 與(R)-enriched-	

	<i>N</i> 1 γ -SFO-dAdo 11 (上圖) 之 ¹³ C NMR (500 MHz, <i>d</i> ₆ -DMSO) 光譜圖疊圖	26
圖十三、	DNA 加成產物 (A) <i>N</i> 1 γ -SFO-dAdo 11 與 (B) (<i>R</i>)-enriched- <i>N</i> 1 γ -SFO-dAdo 11 之手性高效液相層析圖	27
圖十四、	DNA 加成產物 <i>N</i> ⁶ γ -SFO-dAdo 12 (下圖) 與 (<i>R</i>)-enriched- <i>N</i> ⁶ γ -SFO-dAdo 12 (上圖) 之 ¹³ C NMR (500 MHz, <i>d</i> ₆ -DMSO) 光譜圖疊圖	28
圖十五、	Dimroth rearrangement 反應機制圖	29
圖十六、	<i>N</i> 1 γ -SFO-dAdo 11 在 0.2 N K ₂ HPO ₄ (pH 7.4), 37 °C 下進行 Dimroth rearrangement 反應轉換成 <i>N</i> ⁶ γ -SFO-dAdo 12 之高效液相層析圖譜	29
圖十七、	Styrene oxide (SO) 與 2'-去氧腺嘌呤反應所形成之 DNA 加成產物	30
圖十八、	Styrene oxide (SO) 之 DNA 加成產物 <i>N</i> 1 α -SO-dAdo 去氨基形成 <i>N</i> 1 α -SFO-dIno 之反應機制.....	31
圖十九、	(A) (\pm)-SFO 3 與腺嘌呤 15 在 pH 7.4, 37 °C 下反應 72 小時與(B) (\pm)-SFO 3 在 pH 7.4, 37 °C 下反應 72 小時之高效液相層析圖譜。 (C)加成產物 <i>N</i> 3 γ -SFO-Ade 16 與 (D)加成產物 <i>N</i> 9 γ -SFO-Ade 17 之 UV 吸收光譜圖	33

圖二十、 DNA 加成產物 <i>N3</i> γ-SFO-Ade 16 和 <i>N9</i> γ-SFO-Ade 17 正離子模式 下之電噴灑游離質譜圖	34
圖二十一、 DNA 加成產物 <i>N3</i> γ-SFO-Ade 16 之 HMBC (500 MHz, <i>d</i> ₆ -DMSO) 光譜圖	36
圖二十二、 DNA 加成產物 <i>N9</i> γ-SFO-Ade 17 之 HMBC (500 MHz, <i>d</i> ₆ -DMSO) 光譜圖	38
圖二十三、 (A) (±)-SFO 3 與 2'-去氧鳥糞嘧啶 18 在 pH 7.4, 37 °C 下反應 72 小時與(B) (±)-SFO 3 在 pH 7.4, 37 °C 下反應 72 小時之高效液相 層析圖譜	41
圖二十四、 DNA 加成產物 <i>N7</i> γ-SFO-Ade 19 正離子模式下之電噴灑游離質 譜圖	42
圖二十五、 DNA 加成產物 <i>N7</i> γ-SFO-Gua 19 之 HMBC (500 MHz, <i>d</i> ₆ -DMSO) 光譜圖	43
圖二十六、 (A) (±)-SFO 3 與 2'-去氧胞嘧啶 20 在 pH 7.4, 37 °C 下反應 72 小 時與(B) (±)-SFO 3 在 pH 7.4, 37 °C 下反應 72 小時之高效液相層 析圖譜	46
圖二十七、 DNA 加成產物 <i>N3</i> γ-SFO-dUrd 21 正離子模式下之電噴灑游離質 譜圖	46
圖二十八、 DNA 加成產物 <i>N3</i> γ-SFO-dUrd 21 之 HMBC (500 MHz, <i>d</i> ₆ -DMSO)	

光譜圖	48
圖二十九、(A) (±)-SFO 3 與胸腺嘧啶 22 在 pH 7.4, 37 °C 下反應 72 小時與 (B) (±)-SFO 3 在 pH 7.4, 37 °C 下反應 72 小時之高效液相層析 圖譜	52
圖三十、DNA 加成產物 <i>N3</i> γ-SFO-dThd 23 正離子模式下之電噴灑游離質 譜圖	52
圖三十一、DNA 加成產物 <i>N3</i> γ-SFO-dThd 23 之 HMBC (500 MHz, <i>d</i> ₆ -DMSO) 光譜圖	54
圖三十二、(a) <i>N1</i> γ-SFO-dAdo 11 (430→314) 與 [¹⁵ N ₅]- <i>N1</i> γ-SFO-dAdo 11 (435→319) 和 (b) <i>N</i> ⁶ γ-SFO-dAdo 12 (430→314) 與 [¹⁵ N ₅]- <i>N</i> ⁶ γ-SFO-dAdo 12 (435→319) 正離子模式下之子離子掃 瞄質譜圖	57
圖三十三、 <i>N7</i> γ-SFO-Gua 19 (330→152) 與 [¹⁵ N ₅]- <i>N7</i> γ-SFO-Gua 19 (335→157) 正離子模式下之子離子掃瞄質譜圖	58
圖三十四、小牛胸腺 DNA 與 SFO 3 反應之高效液相層析電噴灑游離串聯 質譜圖。(A) 小牛胸腺 DNA 與 SFO 3 不進行水解的反應液：(1) 熱不穩定的自發性去嘌呤 DNA 加成產物 <i>N3</i> γ-SFO-Ade 16 與內 標準品 <i>N9</i> γ-SFO-Ade 17 ，(2) 除了內標準品 [¹⁵ N ₅]- <i>N1</i> γ-SFO-dAdo 11 和 [¹⁵ N ₅]- <i>N</i> ⁶ γ-SFO-dAdo 12 的訊號，並	

無偵測 DNA 加成產物 $N1\gamma$ -SFO-dAdo **11** 和 $N^6\gamma$ -SFO-dAdo **12**，
 (3)熱不穩定之自發性去嘌呤 DNA 加成產物 $N7\gamma$ -SFO-Gua **19** 及
 內標準品 $[^{15}\text{N}_5]$ - $N7\gamma$ -SFO-Gua **19**；(B)小牛胸腺 DNA 與 SFO **3**
 反應液，利用中性加熱水解 (反應液於 70 °C 加熱一小時)結合
 酵素水解：(1)熱不穩定的自發性去嘌呤 DNA 加成產物
 $N3\gamma$ -SFO-Ade **16** 與內標準品 $N9\gamma$ -SFO-Ade **17**，(2)DNA 加成產
 物 $N1\gamma$ -SFO-dAdo **11** 和 $N^6\gamma$ -SFO-dAdo **12** 與
 $[^{15}\text{N}_5]$ - $N1\gamma$ -SFO-dAdo **11** 和 $[^{15}\text{N}_5]$ - $N^6\gamma$ -SFO-dAdo **12**，(3)熱不穩定
 之自發性去嘌呤 DNA 加成產物 $N7\gamma$ -SFO-Gua **19** 及內標準品
 $[^{15}\text{N}_5]$ - $N7\gamma$ -SFO-Gua **19** 60

圖三十五、 $N7\gamma$ -SFO-Gua (1 ng/mL) 與 $[^{15}\text{N}_5]$ - $N7\gamma$ -SFO-Gua (1.1ng/mL) 配
 製在(a) H_2O 與 (b) 未暴露老鼠尿液中分析之高效液相層析電
 噴灑游離串聯質譜圖 64

圖三十六、將不同濃度之 $N7\gamma$ -SFO-Gua **19** (0.25–5 ng/mL) 分別加入
 $[^{15}\text{N}_5]$ - $N7\gamma$ -SFO-Gua **19** (1.1 ng/mL) 配製在未暴露老鼠尿液中
 分析所得之校正曲線 65

圖三十七、(a)未暴露老鼠尿液 (控制組) 與 (b) 靜脈注射 SFO **3** (30 mg/kg
 body wt) 之老鼠尿液 (實驗組) 分別加入 $[^{15}\text{N}_5]$ - $N7\gamma$ -SFO-Gua
19 (1.1 ng/mL) 之內標準品後，分析所得之高效液相層析電噴灑

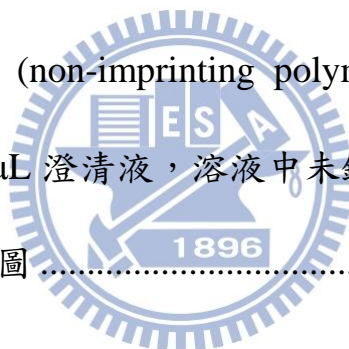
游離串聯質譜圖	66
圖三十八、Emil Fischer 所提出 “lock and key” 的理論示意圖	89
圖三十九、可選擇性吸附不同取代基的染料之矽高分子(silica polymer) ..	90
圖四十、 分子模版高分子設計概念	91
圖四十一、Phenyl- α -D-mannopyranoside 24 之分子模版高分子	92
圖四十二、L-Phenylaniline anilide 25 模版高分子	93
圖四十三、模版分子 1-methyladenosine 26 、甲基丙烯酸 27 單體與二甲基 丙烯酸乙二醇酯 28 交聯劑之構造	94
圖四十四、1-methyladenosine 26 分子模版高分子與不同核苷酸鹼基之結合 常數	94
圖四十五、高效液相層析圖譜。(A) 尿液樣品、(B) 加入 1-methyladenosine 26 的尿液樣品以及(C)將加入 1-methyladenosine 26 的尿液樣品 經過分子模版高分子萃取	95
圖四十六、DNA 加成產物 $N^6\gamma$ -SFO-dAdo 12 分子模版高分子	96
圖四十七、利用熱化學法 (60 °C) 製備 2'-去氧腺嘌呤模版高分子之掃描式 電子顯微鏡圖	98
圖四十八、2'-去氧腺嘌呤 10 與甲基丙烯酸 27 以 1:14 之莫耳比例混合後， 進行變溫實驗之 ^1H NMR 光譜(500 MHz, $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O} = 4:1$)	99

圖四十九、2'-去氧腺嘌呤 **10**、甲基丙烯酸 **27**、甲基丙烯酸乙二醇酯 **28**

以 1 : 14 : 75 和偶氮二異丁腈 **29** 反應監控之 ^1H NMR 光譜圖
(300 MHz, $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O} = 4:1$)。(A) 未光照之混合液、(B) 在 0
 $^\circ\text{C}$ 下以 UV 燈 (365 nm) 進行光照 1 分鐘、(C) 聚合反應 16
小時 100

圖五十、 分子模版高分子的掃描式電子顯微鏡圖。(A) 2'-去氧腺嘌呤模
版高分子；(B)文獻之 1-Methyladenosin 模版高分子..... 101

圖五十一、2'-去氧腺嘌呤 **10** (1 mM) 加入模版高分子 (20 mg、40 mg) 與
非模版高分子 (non-imprinting polymer, NIP 20 mg) 反應隔夜
後，注入 25 μL 澄清液，溶液中未鍵結之 2'-去氧腺嘌呤 **10** 之
高效液相層析圖..... 102



式圖目錄

式圖一、	實驗流程圖	13
式圖二、	黃樟素代謝產物(±)-SFO 3 的合成.....	14
式圖三、	2'-去氧腺嘌呤 10 與(±)-SFO 3 之加成產物 N1γ-SFO-dAdo 11 與 N ⁶ γ-SFO-dAdo 12 的合成.....	14
式圖四、	(R)-(+)-enriched-SFO 3 的合成	24
式圖五、	DNA 加 成 產 物 (R)-enriched-N1γ-SFO-dAdo 11 與 (R)-enriched-N ⁶ γ- SFO-dAdo 12 的合成	25
式圖六、	腺嘌呤 15 與(±)-SFO 3 之加成產物 N3γ-SFO-Ade 16 與 N9γ-SFO-Ade 17 的合成	32
式圖七、	DNA 加成產物 N7γ-SFO-Gua 19 的合成	40
式圖八、	2'-去氧胞嘧啶 20 與(±)-SFO 3 之加成產物 N3γ-SFO-dUrd 21 的合成	45
式圖九、	胸腺嘧啶 22 與(±)-SFO 3 之加成產物 N3γ-SFO-dThd 23 的合成	51
式圖十、	穩定同位素標定之內標準品 [¹⁵ N ₅]-N1γ-SFO-dAdo 11、 [¹⁵ N ₅]-N ⁶ γ- SFO-dAdo 12、[¹⁵ N ₅]-N7γ-SFO-Gua 19 的合成	56
式圖十一、	加成產物 N ⁶ γ-SFO-dAdo 12 的合成.....	103

附圖目錄

附圖一、	黃樟素代謝產物(±)-SFO 3 之 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) 光譜圖。.....	118
附圖二、	黃樟素代謝產物(±)-SFO 3 之 DEPT (75.4 MHz, CDCl_3) 光譜圖。.....	119
附圖三、	化合物 (a) (<i>R</i>)-(+)-enriched- 13 、(b) (<i>R</i>)-(+)-enriched- 14 、(c) (<i>R</i>)-(+)-enriched- 3 之手性高效液相層析圖譜。.....	120
附圖四、	化合物 (<i>R</i>)-(+)-5-(2,3-Dihydroxypropyl)-1,3-benzodioxole 13 之 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) 光譜圖。.....	121
附圖五、	化合物 (<i>R</i>)-(+)-5-(2,3-Dihydroxypropyl)-1,3-benzodioxole 13 之 DEPT (CDCl_3 , 75.4 MHz) 光譜圖。.....	122
附圖六、	化合物 (<i>R</i>)-(+)-5-(2-hydroxy-3-tosyloxypropyl)-1,3-benzodioxole 14 之 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) 光譜圖。.....	123
附圖七、	化合物 (<i>R</i>)-(+)-5-(2-hydroxy-3-tosyloxypropyl)-1,3-benzodioxole 14 之 DEPT (75.4 MHz, CDCl_3) 光譜圖。.....	124
附圖八、	化合物 (<i>R</i>)-(+)-5-Oxiranylmethyl-1,3-benzodioxole 3 之 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) 光譜圖。.....	125
附圖九、	化合物 (<i>R</i>)-(+)-5-Oxiranylmethyl-1,3-benzodioxole 3 之 ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3) 光譜圖。.....	126

附圖十、	加成產物 $N1\gamma$ -SFO-dAdo 11 之 ^1H NMR (500 MHz, d_6 -DMSO) 光譜圖。	127
附圖十一、	加成產物 $N1\gamma$ -SFO-dAdo 11 之 ^{13}C NMR (125.7 MHz, d_6 -DMSO)光譜圖。	128
附圖十二、	加成產物 $N1\gamma$ -SFO-dAdo 11 之 DEPT (125.7 MHz, d_6 -DMSO) 光譜圖。	129
附圖十三、	加成產物 $N1\gamma$ -SFO-dAdo 11 之 H,H-COSY (500 MHz, d_6 -DMSO) 光譜圖。	130
附圖十四、	加成產物 $N1\gamma$ -SFO-dAdo 11 之 HMQC (500 MHz, d_6 -DMSO) 光譜圖。	131
附圖十五、	加成產物(<i>R</i>)-enriched- $N1\gamma$ -SFO-dAdo 11 之 ^1H NMR (500 MHz, d_6 -DMSO) 光譜圖。	132
附圖十六、	加成產物(<i>R</i>)-enriched- $N1\gamma$ -SFO-dAdo 11 之 ^{13}C NMR (125.7 MHz, d_6 -DMSO) 光譜圖。	133
附圖十七、	加成產物 $N^6\gamma$ -SFO-dAdo 12 之 ^1H NMR (500 MHz, d_6 -DMSO) 光譜圖。	134
附圖十八、	加成產物 $N^6\gamma$ -SFO-dAdo 12 之 ^{13}C NMR (125.7 MHz, d_6 -DMSO) 光譜圖。	135
附圖十九、	加成產物 $N^6\gamma$ -SFO-dAdo 12 之 DEPT (125.7 MHz, d_6 -DMSO)	

	光譜圖。136
附圖二十、	加成產物 $N^6\gamma$ -SFO-dAdo 12 之 HMQC (500 MHz, d_6 -DMSO)	
	光譜圖。137
附圖二十一、	加成產物 $N^6\gamma$ -SFO-dAdo 12 之 HMBC (500 MHz, d_6 -DMSO)	
	光譜圖。138
附圖二十二、	加成產物 (<i>R</i>)-enriched- $N^6\gamma$ -SFO-dAdo 12 之 ^1H NMR (500 MHz, d_6 -DMSO)	
	光譜圖。139
附圖二十三、	加成產物 (<i>R</i>)-enriched- $N^6\gamma$ -SFO-dAdo 12 之 ^{13}C NMR (125.7 MHz, d_6 -DMSO)	
	光譜圖。140
附圖二十四、	加成產物 $N3\gamma$ -SFO-dAdo 16 之 ^1H NMR(500 MHz, d_6 -DMSO)	
	光譜圖。141
附圖二十五、	加成產物 $N3\gamma$ -SFO-dAdo 16 之 ^{13}C NMR(125.7 MHz, d_6 -DMSO)	
	光譜圖。142
附圖二十六、	加成產物 $N3\gamma$ -SFO-dAdo 16 之 DEPT (125.7 MHz, d_6 -DMSO)	
	光譜圖。143
附圖二十七、	加成產物 $N3\gamma$ -SFO-dAdo 16 之 H,H-COSY (300 MHz, d_6 -DMSO)	
	光譜圖。144
附圖二十八、	加成產物 $N3\gamma$ -SFO-dAdo 16 之 HMQC (500 MHz, d_6 -DMSO)	
	光譜圖。145

附圖二十九、加成產物 <i>N9</i> γ-SFO-Ade 17 之 ¹ H NMR (500 MHz, <i>d</i> ₆ -DMSO) 光譜圖。	146
附圖三十、加成產物 <i>N9</i> γ-SFO-Ade 17 之 ¹³ C NMR (125.7 MHz, <i>d</i> ₆ -DMSO) 光譜圖。	147
附圖三十一、加成產物 <i>N9</i> γ-SFO-Ade 17 之 DEPT (125.7 MHz, <i>d</i> ₆ -DMSO) 光譜圖。	148
附圖三十二、加成產物 <i>N9</i> γ-SFO-Ade 17 之 H,H-COSY (300 MHz, <i>d</i> ₆ -DMSO) 光譜圖。	149
附圖三十三、加成產物 <i>N9</i> γ-SFO-Ade 17 之 HMQC (500 MHz, <i>d</i> ₆ -DMSO) 光譜圖。	150
附圖三十四、加成產物 <i>N7</i> γ-SFO-Ade 19 之 ¹ H NMR (500 MHz, <i>d</i> ₆ -DMSO) 光譜圖。	151
附圖三十五、加成產物 <i>N7</i> γ-SFO-Ade 19 之 ¹³ C NMR (125.7 MHz, <i>d</i> ₆ -DMSO) 光譜圖。	152
附圖三十六、加成產物 <i>N7</i> γ-SFO-Ade 19 之 DEPT (125.7 MHz, <i>d</i> ₆ -DMSO) 光譜圖。	153
附圖三十七、加成產物 <i>N7</i> γ-SFO-Ade 19 之 H,H-COSY (500 MHz, <i>d</i> ₆ -DMSO) 光譜圖。	154
附圖三十八、加成產物 <i>N7</i> γ-SFO-Ade 19 之 HMQC (500 MHz, <i>d</i> ₆ -DMSO) 光	

譜圖。	155
附圖三十九、加成產物 <i>N</i> 3γ-SFO-dUrd 21 之 ¹ H NMR (500 MHz, <i>d</i> ₆ -DMSO)	
光譜圖。	156
附圖四十、 加成產物 <i>N</i> 3γ-SFO-dUrd 21 之 ¹³ C NMR (125.7 MHz,	
<i>d</i> ₆ -DMSO)光譜圖。	157
附圖四十一、加成產物 <i>N</i> 3γ-SFO-dUrd 21 之 DEPT (125.7 MHz, <i>d</i> ₆ -DMSO)	
光譜圖。	158
附圖四十二、加成產物 <i>N</i> 3γ-SFO-dUrd 21 之 H,H-COSY (300 MHz,	
<i>d</i> ₆ -DMSO)光譜圖。	159
附圖四十三、加成產物 <i>N</i> 3γ-SFO-dUrd 21 之 HMQC (500 MHz, <i>d</i> ₆ -DMSO)光	
譜圖。	160
附圖四十四、加成產物 <i>N</i> 3γ-SFO-dThd 23 之 ¹ H NMR (500 MHz, <i>d</i> ₆ -DMSO)	
光譜圖。	161
附圖四十五、加成產物 <i>N</i> 3γ-SFO-dThd 23 之 ¹³ C NMR (125.7 MHz,	
<i>d</i> ₆ -DMSO)光譜圖。	162
附圖四十六、加成產物 <i>N</i> 3γ-SFO-dThd 23 之 DEPT (125.7 MHz, <i>d</i> ₆ -DMSO)	
光譜圖。	163
附圖四十七、加成產物 <i>N</i> 3γ-SFO-dThd 23 之 H,H-COSY (300 MHz,	
<i>d</i> ₆ -DMSO)光譜圖。	164

附圖四十八、加成產物 $N3\gamma$ -SFO-dThd **23** 之 HMQC (500 MHz, d_6 -DMSO)

光譜圖。165

附圖四十九、文獻上 3',5'-di-*O*-(triisopropylsilyl)-7- 15 N-2'-deoxyadenosine 與

醋酸(1:4)在 $CDClF_2/CF_3$ (Freon solution) 溶劑中變溫實驗的

1H NMR 光譜圖。166

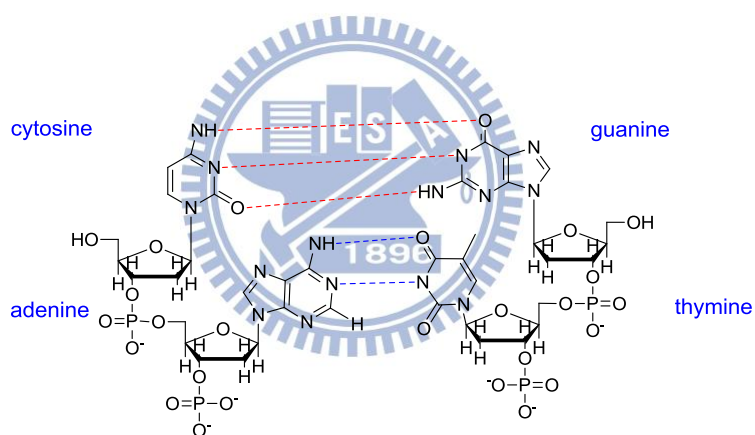


第一章 2',3'-環氧黃樟素與 DNA 鹼基反應所形成加成產物之探討

1.1 緒論

1.1.1 DNA 加成產物

去氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 主要是由去氧核糖、磷酸、與四個含氮鹼基 (base) 組成。腺嘌呤 (adenine)、鳥糞嘌呤 (guanine)、胞嘧啶 (cytosine) 與胸腺嘧啶 (thymine) 彼此間會以氫鍵鍵結並組成雙股螺旋 DNA (圖一)，鹼基之間的特定配對組合則蘊藏了生物遺傳訊息。



圖一、去氧核糖核酸的基本構造。

在癌症的發展過程中會因為基因上單一鹼基發生錯誤而活化原致癌基因或使腫瘤抑制基因活性降低，而導致癌症的生成(Chen, 2001)。根據化學致癌的理論，化學致癌物質在體內會被代謝活化，成為親電子性的活性代謝物質。這些代謝物會攻擊蛋白質與基因鹼基的親核性基團而形成共價鍵，產生穩定共價鍵結的產物，又稱為 DNA 加成產物 (DNA

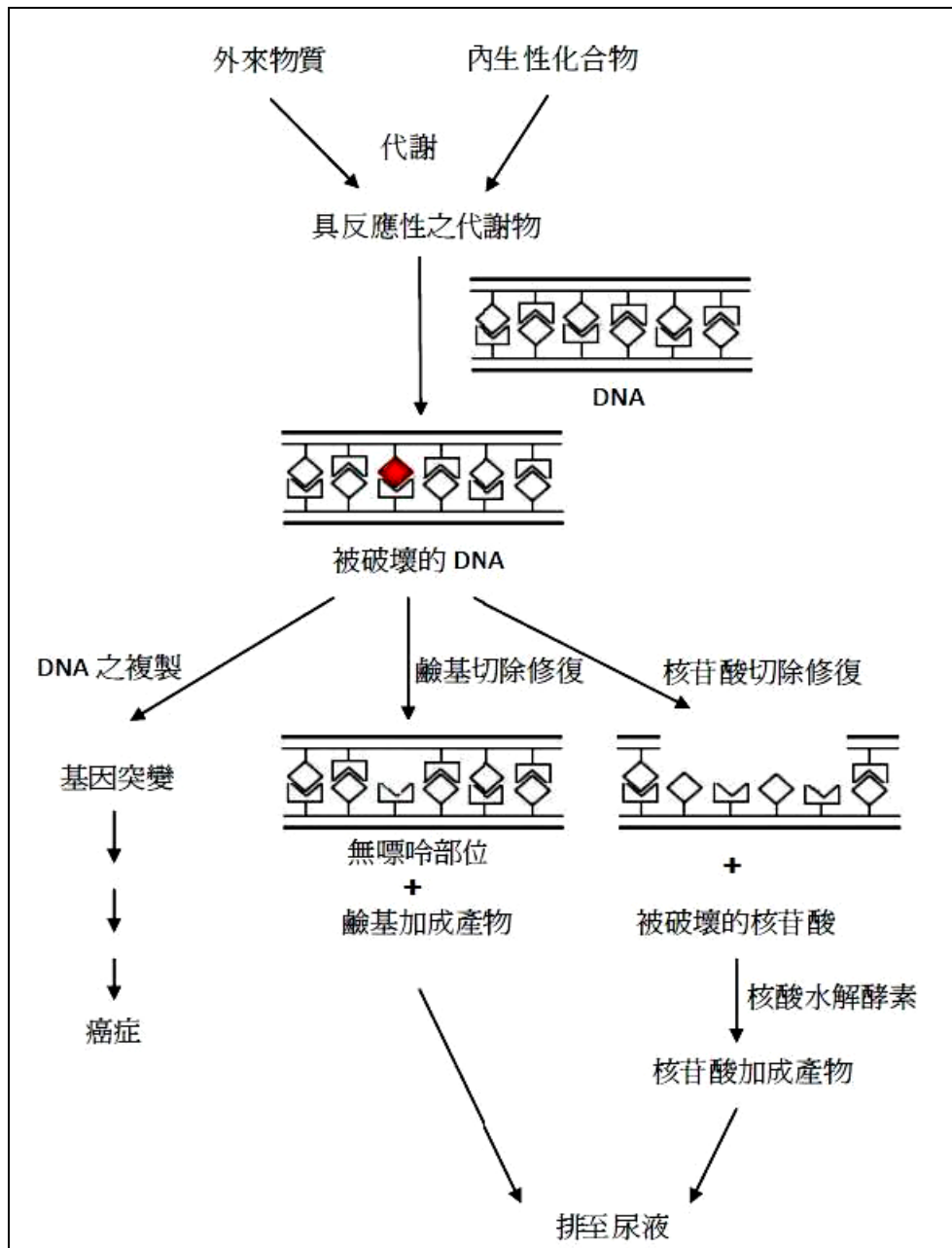
adducts)。這些被修飾的基因鹼基會使得 DNA 結構發生變化而改變正常鹼基的配對關係，如果 DNA 加成產物無法在基因複製前有效的被修復，導致基因複製過程中發生錯誤，就會造成基因突變最後有可能導致癌症 (Groopman and Kensler, 1999)。

1.1.2 DNA 加成產物的修復和癌症的關係

DNA 加成產物在體內的兩種修復機制(圖二)(Chen and Hong, 2001)

(1) 核酸切除修復機制(nucleotide excision repair, NER)：可從 3'端將去鹼基位置含去氧核糖之磷酸骨架單獨切除或整段切除之後形成 DNA 鏈斷裂 (DNA strand breakage)，再由 DNA 聚合酶 (DNA polymerase) 進行修補；(Cleaver et al., 2001) (2) 鹼基切除修復機制 (base excision repair, BER)：在修復過程中，DNA 加成產物會先被切除下來形成無嘌呤 DNA (abasic site DNA/apurinic site DNA, AP site DNA)，再由 3'端將去鹼基位置含去氧核糖之磷酸骨架單獨切除或整段切除之後形成 DNA 鏈斷裂 (DNA strand breakage)，經 DNA 聚合酶 (DNA polymerase) 進行修補，或由 DNA 聚合酶直接由 5'端進行複製將去鹼基位置 DNA 直接取代之修復路徑 (Boiteux and Guillet, 2004)，不論何種修復路徑最後這些被修復之 DNA 加成產物會經由尿液排出體外。因此不論 DNA 加成產物直接導致基因複製的錯誤，或者修復過程中導致基因突變都是誘導癌症形成

主因(Singh and Farmer, 2006)。所以 DNA 加成產物的生成量被認為是生物有效劑量的指標 (biologically-effective doses)，DNA 加成產物量愈高可能會有較高的致癌風險 (Chen, 2001; Swenberg et al., 2007)。



圖二、 DNA 加成產物之形成與修復和癌症的關係 (Chen and Hong, 2001)。

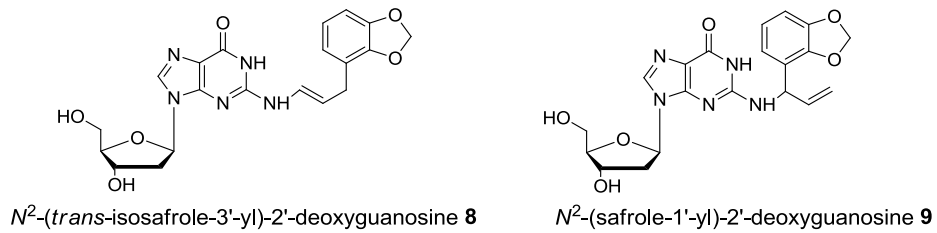
1.1.3 黃樟素(Safrole) 1

黃樟素 1 是黃樟油 (sassafras oil) 的主要成分，同時也存在於一些香料中，如：羅勒 (basil)、豆蔻 (nutmeg)、肉桂 (cinnamon)、黑胡椒 (black pepper) 中 (Munerato et al., 2005; Ueng et al., 2004)。目前被國際癌症研究署 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 歸類為 2B (可能對人類造成致癌) 的化合物 (IARC, 1976)。歐盟共同體食物科學委員會 (The Scientific Committee for Food of the European Union) 估計每人 (以體重 60 kg 計) 每日黃樟素平均攝取量 0.3 mg，而聯合國糧農組織與世界衛生組織的食品添加物聯合專家委員會 (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) 則是估計每人每日最大攝取量為 879 μg (Martati et al., 2011)。值得注意的是台灣檳榔 (areca quid) 中的萜花 (Inflorescence Piper betle) 每克就含有 15 mg 的黃樟素 1，在嚼食的過程中唾液裏黃樟素 1 的濃度可以高達 420 μM (Martati et al., 2011)。由於國人有許多嚼食檳榔者，不僅因嚼食檳榔導致口腔癌患者眾多，研究也顯示在台灣原住民當中發現嚼檳榔產生慢性肝病的風險比起未嚼檳榔者大 (Lin, 2002)，因此近年來對於嚼食檳榔與口腔癌 (Hsieh et al., 2001) 或肝癌之間的相關性是否與黃樟素 1 的暴露有關一直是生物學家所感興趣的課題。

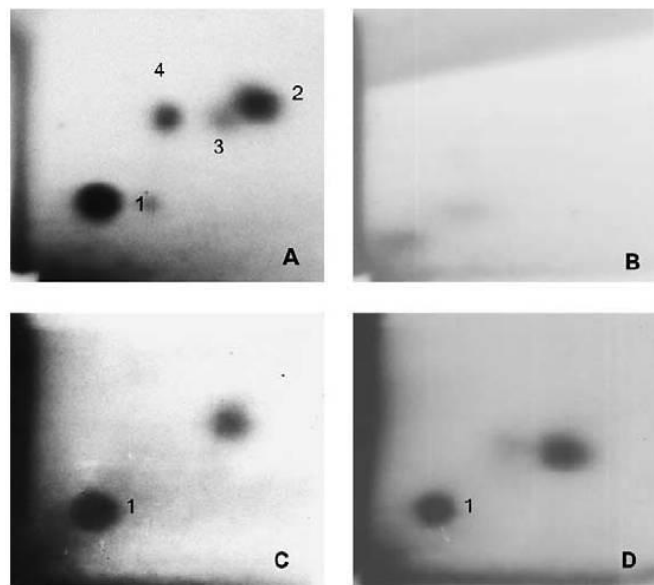
1.1.4 黃樟素 1 致癌機制的相關研究

黃樟素 1 被攝取進入人體後，在體內會被代謝成1'-羥基黃樟素 (1'-hydroxysafrole 2) (Borchert et al., 1973b; Stillwell et al., 1974)、2',3'-環氧黃樟素(safrole 2',3'-oxide, SFO 3) (Wislocki et al., 1976)、3'-羥基黃樟素(3'-hydroxysafrole 4) (Benedetti et al., 1977) 與1,2-羥基-4-烯丙基苯 (1,2-dihydroxy-4-allylbenzene 5) (Benedetti et al., 1977) (圖三)。從生理為基礎的動力學 (physiologically based biokinetic, PBBK) 模式代入體外代謝參數計算，給予黃樟素 1 (300 mg/kg body weight) 的老鼠黃樟素代謝產物 2、4、5與 7 的量分別為黃樟素 1 的10.0%、7.7%、74.0%與6.9% (Martati et al., 2011)。

過去的文獻報導，給老鼠餵食黃樟素 1 之後，發現老鼠的尿液中有1'-羥基黃樟素 2 的生成(Borchert et al., 1973b; Stillwell et al., 1974)。1976年，Wislocki 等人(Wislocki et al., 1976)給予老鼠服用[2',3'-³H]-1'-hydroxysafrole，發現肝臟內之DNA (hepatic DNA)、核糖體RNA (ribosomal RNA) 和蛋白質含有³H的衍生物，而這些主要是親電基在體內反應產生的致癌物質，因此黃樟素代謝產物 2 一直被認為是黃樟素 1 代謝過程中與體內DNA反應活性最大之致癌物，也是黃樟素的最終代謝產物 (Borchert et al., 1973a; Borchert et al., 1973b)。



圖四、1'-羥基黃樟素 **2** 的 DNA 加成產物： N^2 -(*trans*-isosafrole-3'-yl) - 2'-deoxyguanosine **8** (Phillips et al., 1981) 與 N^2 -(safrole-1'-yl)-2'-deoxyguanosine **9** (Chung et al., 2008)。



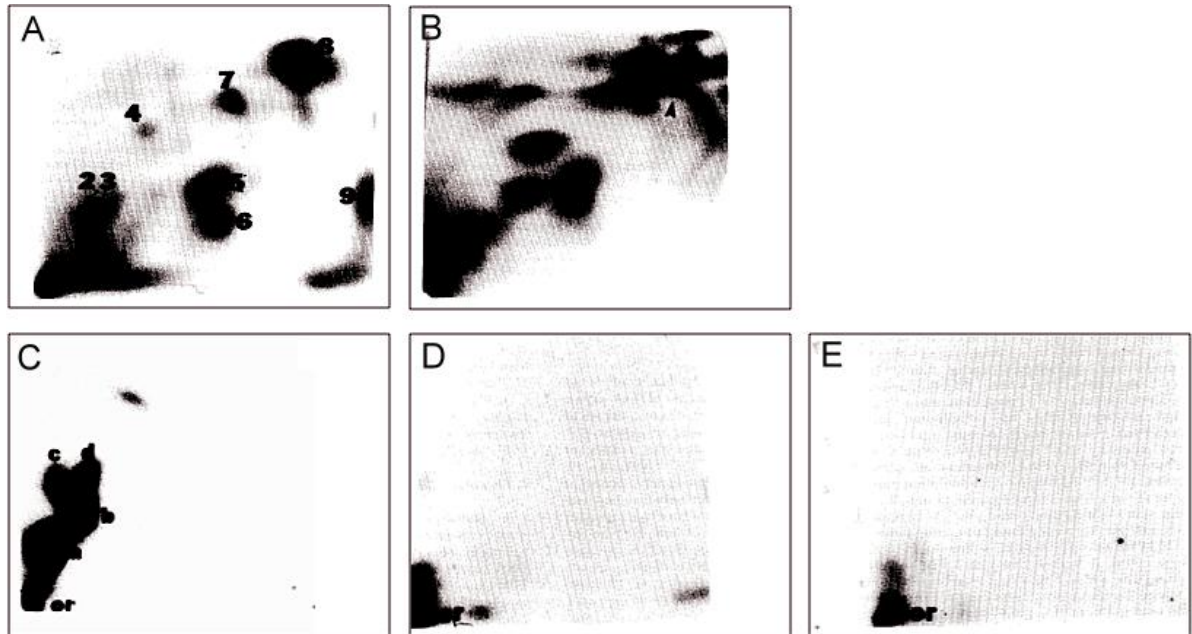
圖五、 ^{32}P 同位素標記分析黃樟素 DNA 加成產物，Spot 1: 加成產物 **8** 與 Spot 2: 加成產物 **9**，關於 spots 3 和 4 仍然不清楚其構造。(A) 在 HepG2 細胞中加入 1'-羥基黃樟素 **2** (400 μM) 培養 24 小時；(B) 未加入 1'-羥基黃樟素 **2** 的控制組；(C, D) 嚼食檳榔者之白血球細胞(對照組) (Liu et al., 2004)。

2004 年，Liu 等人在 HepG2 細胞中加入黃樟素的代謝產物 1'-羥基黃樟素 **2** 一起培養，利用 ^{32}P -後標籤法分析得到圖五-A，與有嚼食檳榔病史者的白血球細胞圖五-C、D 的自動放射顯影片比較，確定嚼食檳榔者的白血球細胞會有 1'-羥基黃樟素 **2** 的 DNA 加成產物: N^2 -(*trans*-isofurofuran-3'-yl) -2'-deoxyguanosine **8** (spot 1) 生成 (Liu et al., 2004)。除此之外，2008 年 Liu 等人也利用 ^{32}P -後標籤法分析 28 位嚼食檳榔 10 年之久的肝腫瘤患者，並在其中 2 位病患肝組織中分析到加成產物 **8** (Chung et al., 2008)。

而另一具親電反應之黃樟素代謝產物 2',3'-環氧黃樟素 **3**，雖然在沙門氏菌(*Salmonella typhimurium*) TA1535 和 TA100 的安姆氏試驗(Ames Test)中發現黃樟素代謝產物 **3** 具有中度致突變性 (moderate mutagenicity) (Swanson et al., 1979; Wislocki et al., 1977)，並且會造成人類肺癌細胞 A549 (A549 human lung cancer cells)的細胞凋亡(apoptosis) (Du et al., 2006a; Du et al., 2006b)，除此之外，暴露黃樟素代謝產物 **3** 的 CD-1 母鼠會生成不同的腫瘤(Miller et al., 1983)，而我們與中國醫藥大學江素瑛老師合作，發現給予黃樟素代謝產物 SFO **3** 的老鼠也會造成紅血球細胞中微核 (micronuclei) 的增加以及 DNA 的斷裂(Chiang et al., 2011)。

但是在 1995 年 Qato 等人(Qato and Guenther, 1995) 將黃樟素代謝產物 **3** 分別與小牛胸腺 DNA (calf thymus DNA) 和 2'-去氧鳥糞嘌呤進行

體外反應，利用 ^{32}P -後標籤法分析發現至少有九個加成產物生成 (圖六-A 與圖六-B)。



圖六、 ^{32}P 同位素標記分析 2',3'-環氧黃樟素 DNA 加成產物。(A) 2',3'-環氧黃樟素 3 與小牛胸腺 DNA 之反應; (B) 2',3'-環氧黃樟素 3 與 2'-去氧鳥糞核苷之反應; (C) 靜脈注射單一劑量黃樟素 1 (97.3 mg/kg body weight) 之老鼠肝臟 DNA: 老鼠體內生成之黃樟素 DNA 加成產物分別以 a-d 標示; (D) 正常老鼠之肝臟 DNA (控制組); (E) 靜脈注射單一劑量 2',3'-環氧黃樟素 3 (106.9 mg/kg body weight)。(Qato and Guenther, 1995)

同時在分析給予單一劑量黃樟素 1 (97.3 mg/kg body wt) 之老鼠肝臟中，也有發現黃樟素 DNA 加成產物生成 (圖六-C)，但在同樣給予單

一劑量黃樟素代謝產物 **3** (106.9 mg/kg body wt) 之老鼠肝臟 DNA (圖六-E) 與沒有藥物暴露之老鼠肝臟 DNA 比較發現並無任何黃樟素代謝產物 **3** 相關的 DNA 加成產物生成，作者推測此結果主要是因為黃樟素代謝產物 **3** 可以經由麩胺基硫轉移酵素 (glutathione S-transferases, GSTs) 和環氧化合物水解酶 (epoxide hydrolases, EHs) 去毒化的過程代謝掉 (Luo et al., 1992; Luo and Guenther, 1994, 1995)，所以無法在體內形成黃樟素代謝產物 **3** 相關的 DNA 加成產物，因此黃樟素代謝產物 **3** 一直被認為不具有任何基因毒性。

1.1.5 DNA 加成產物的分析方法

³²P-後標籤法 (³²P-postlabeling)、免疫分析法 (immunoassays)、電化學檢測法 (electrochemical detection, ECD)、螢光偵測 (fluorescence detection) 與質譜法 (mass spectrometry) 都是用來定量 DNA 加成產物的方法 (Himmelstein et al., 2009)。在複雜的生物樣品中定量這些超微量的 DNA 加成產物，必須考慮方法之高專一性與高靈敏性 (Himmelstein et al., 2009; Koc and Swenberg, 2002)，³²P-後標籤法是這些方法中最具高靈敏度 (~1 adduct per 10⁹ normal base) 卻缺乏高專一性，其他的方法則是具高專一性缺乏高靈敏度，由於此方法必須利用聚核苷酸激酶 (polynucleotide kinase, PNK) 將 [γ -³²P]ATP 上之 ³²P-orthophosphate 轉移

到 2-deoxyribose 上 5'-OH 端 (Phillips and Arlt, 2007)，因此此方法最大的缺點就是不適合用於醣苷鍵不穩定（例如：*N*7-alkylguanine adducts）之 DNA 加成產物的分析 (Himmelstein et al., 2009; Koc and Swenberg, 2002; Swenberg et al., 2007)。

從 1990 年代開始，同位素稀釋質譜法 (isotope dilution mass spectrometry, IDMS) 不僅可以提供化合物的構造，同時可採用同位素當標準品在不同的質荷比 (m/z) 頻道測量，達到準確定量的目的，取代 ^{32}P -後標籤法成為分析 DNA 加成產物的主流 (Koc and Swenberg, 2002)。用同位素稀釋質譜法作定量分析的先決條件是要具備與分析物相同的同位素，除了一些常用藥品的同位素已商品化之外，通常這些同位素必須來自全合成或是半合成 (陳皓君, 2003)，因此合成 DNA 加成產物的同位素標準品以及鑑定其結構，也是發展同位素稀釋質譜法定量 DNA 加成產物上重要的一環。

1.1.6 研究動機

工業上常用的高分子原料苯乙烯 (styrene)、丁二烯 (butadiene)、乙烯 (ethylene) 與丙烯 (propylene) 其代謝過程中所形成的環氧代謝產物，一樣是經由麩胺基硫轉移酵素和環氧化合物水解酶去毒化 (Luo et al., 1992; Krause et al., 1997; Faller et al., 2001; Csanady et al., 2003; Wu et

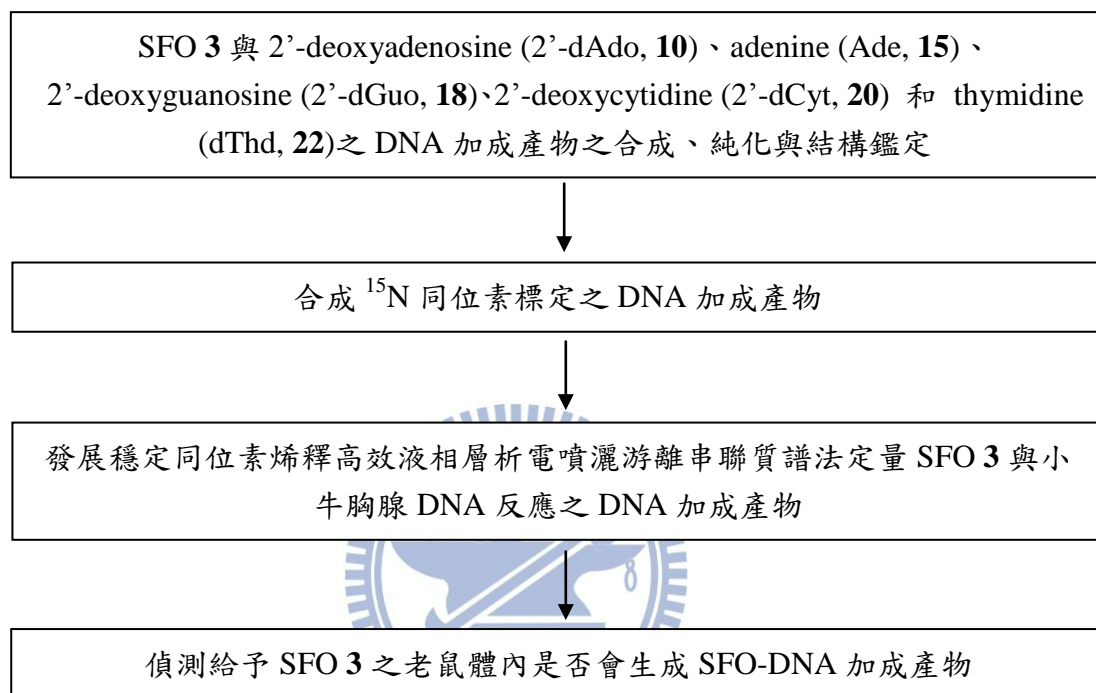
al., 2011), 卻仍然能夠在體內生成 DNA 加成產物, 並與 2'-去氧腺嘌呤反應形成 *N*1-、*N*⁶- 和 *N*3-位置取代之腺嘌呤 DNA 加成產物, 與 2'-去氧鳥糞嘌呤反應形成 *N*7- 和 *N*2-位置取代之鳥糞嘌呤 DNA, 與 2'-去氧胞嘧啶反應形成 *N*3-和 *N*4-位置取代之胞嘧啶 DNA 加成產物以及與胸腺嘧啶反應形成 *N*3-位置取代之胸腺嘧啶加成產物 (表一)。(Pongracz et al., 1989; Tretyakova et al., 1997; Koskinen and Plna, 2000; Koskinen et al., 2000b; Munter et al., 2002; Boysen et al., 2009)

表一、DNA 鹼基上不同親核位置之相對反應性(Boysen et al., 2009)。

Chemical carcinogens	<i>N</i> 7-Gua	<i>O</i> ⁶ -Gua	<i>N</i> ² -Gua	<i>N</i> 3-Ade	<i>N</i> 1-/ <i>N</i> ⁶ -Ade	<i>N</i> 3-Cyt	<i>N</i> ⁴ -Cyt
Propylene oxide	100	0.5	-	4.4/10	3.5	2	-
Ethylene oxide	100	-	-	10	10	1	-
Butadiene oxide	100	-	-	15	25	1.5	2
Styrene oxide	100	-	4.5	10	16	5	-

為了探討黃樟素代謝產物 **3** 是否也是黃樟素 **1** 致癌機轉之一, 因此我們必須先證實其在體內會攻擊 DNA 產生 DNA 加成產物, 而非直接被代謝成 1,2-羥基-4-烯丙基苯 **5** 排出體外。因此我們 (式圖一) 將合成並鑑定黃樟素代謝產物 **3** 與 2'-去氧腺嘌呤 **10**、腺嘌呤 **15**、2'-去氧鳥糞嘌呤 **18**、2'-去氧胞嘧啶 **20** 與胸腺嘧啶 **22** 反應之 DNA 加成產物, 及其 ¹⁵N 同位素標定之類似物作為內標準品, 並發展穩定同位素稀釋 (stable

isotope dilution) 高效液相層析電噴灑游離串聯質譜法 (high performance liquid chromatography– electrospray ionization-tandem mass, HPLC–EIS-MS/MS) 定量體外與體內黃樟素代謝產物 **3** 之 DNA 加成產物的量。

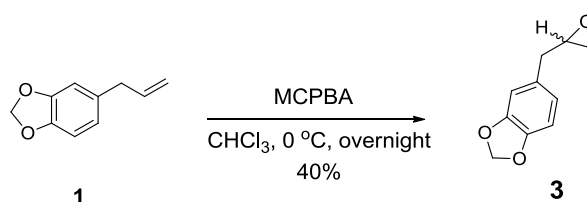


式圖一、實驗流程圖。

1.2 結果與討論

1.2.1 合成黃樟素代謝產物 2',3'-環氧黃樟素(safrole 2',3'-oxide, SFO 3)

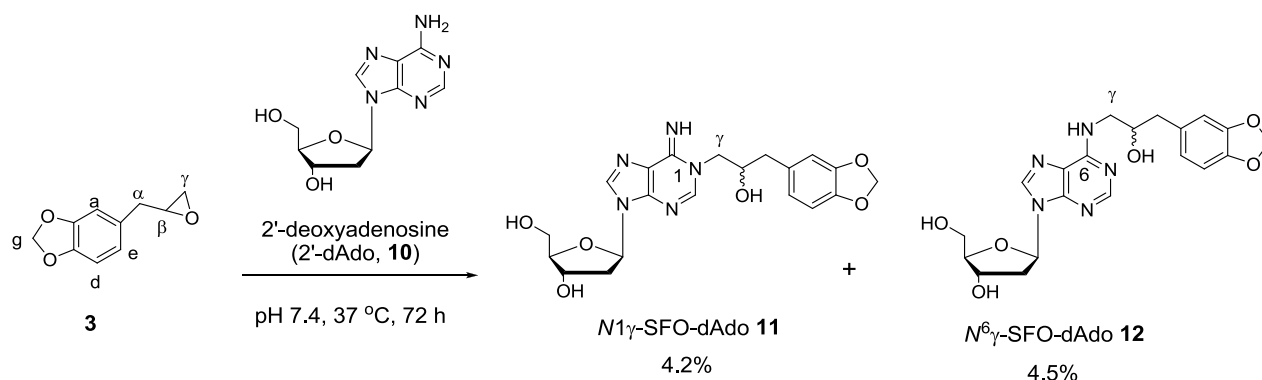
黃樟素 (safrole, 1) 代謝產物 (±)-2',3'-環氧黃樟素 ((±)-safrole 2',3'-oxide, (±)-SFO 3) 並無法經由商業採購取得，因此參照文獻 (Noller and Kneeland, 1946) 之方法製備合成 (式圖二)。



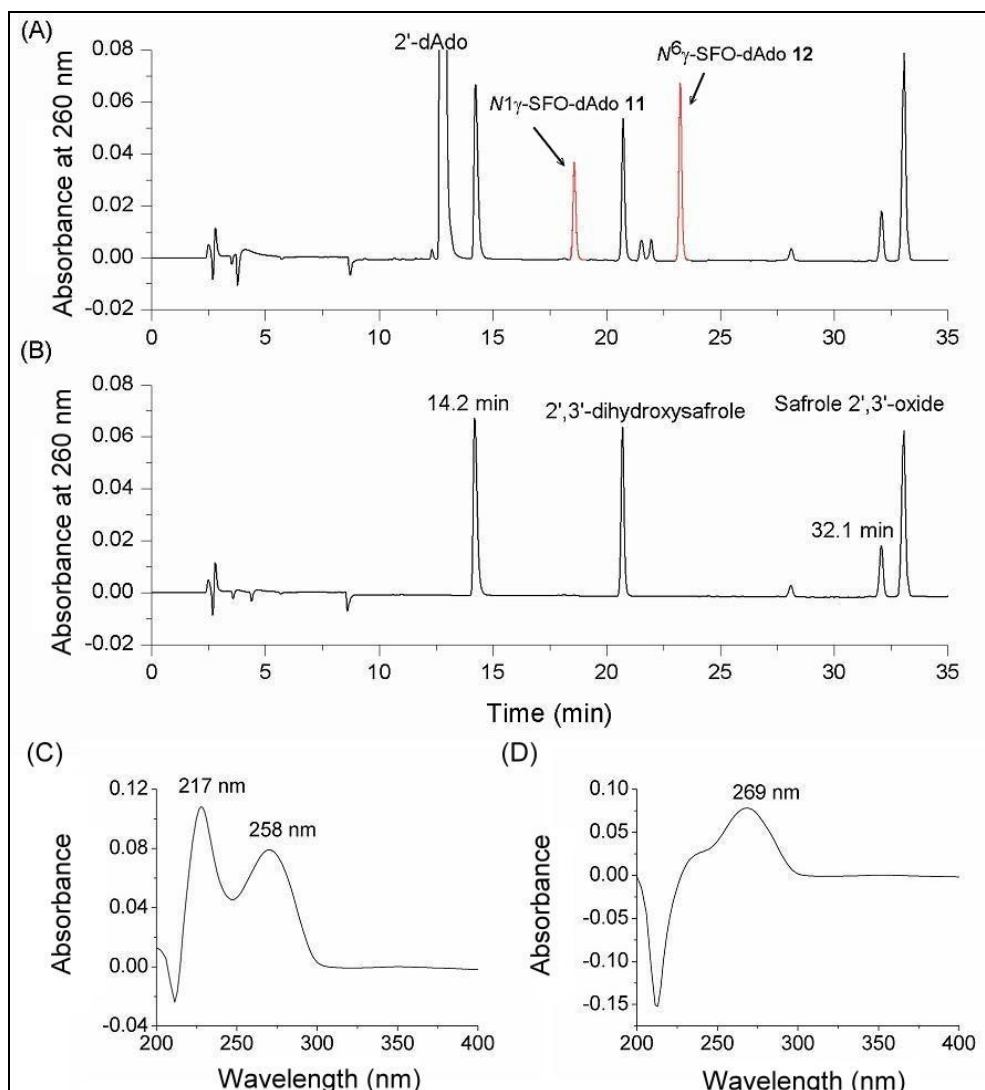
式圖二、黃樟素代謝產物 (±)-2',3'-環氧黃樟素 3 的合成。

1.2.2 2',3'-環氧黃樟素 DNA 加成產物之合成、純化與結構鑑定

1.2.2.1 黃樟素代謝產物 (±)-3 與 2'-去氧腺嘌呤 (2'-deoxyadenosine, 2'-dAdo 10) 之反應



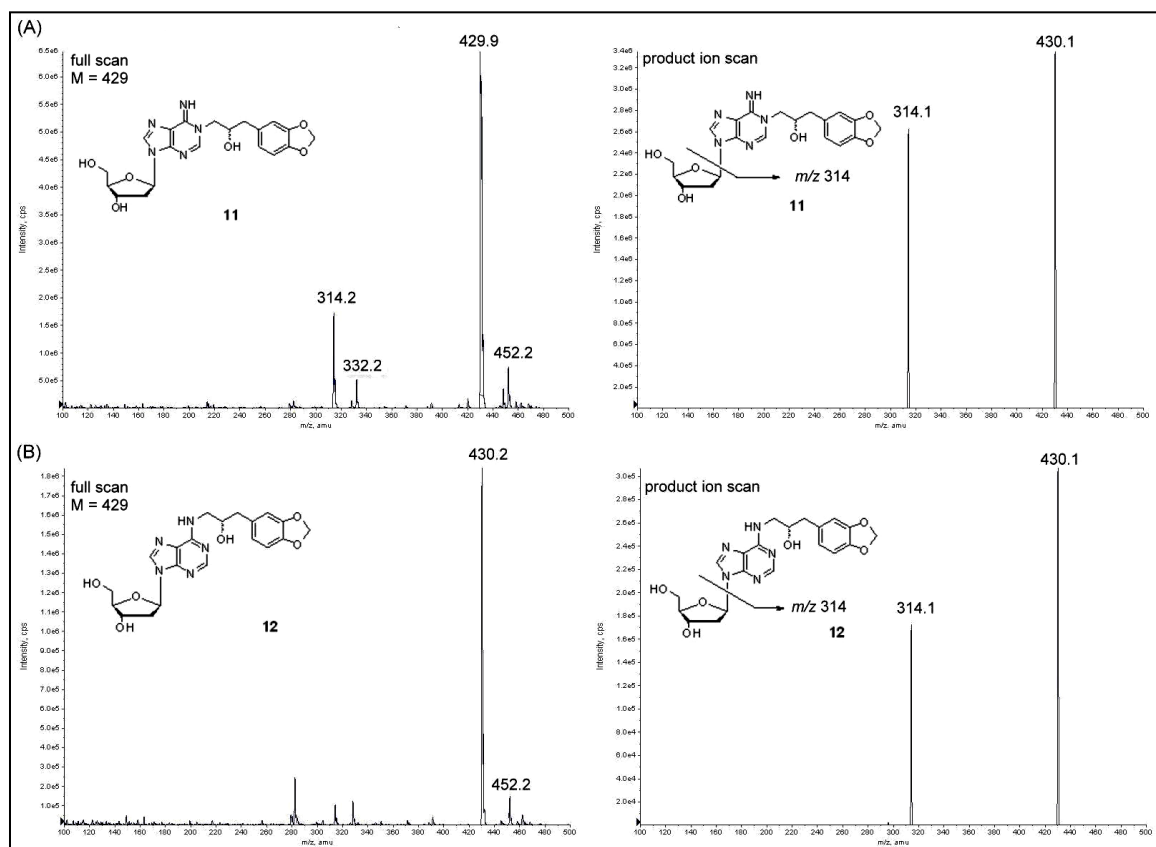
式圖三、2'-去氧腺嘧啶 10 與 (±)-SFO 3 之加成產物 *N*¹ γ -SFO-dAdo 11 與 *N*⁶ γ -SFO-dAdo 12 的合成。



圖七、(A) (±)-SFO 3 與 2'-去氧腺嘌呤 10 在 pH 7.4, 37°C 下反應 72 小時與(B) (±)-SFO 3 在 pH 7.4, 37°C 下反應 72 小時之高效液相層析圖譜。(C) 加成產物 N1 γ -SFO-dAdo 11 與(D)加成產物 N6 γ -SFO-dAdo 12 之 UV 吸收光譜圖。

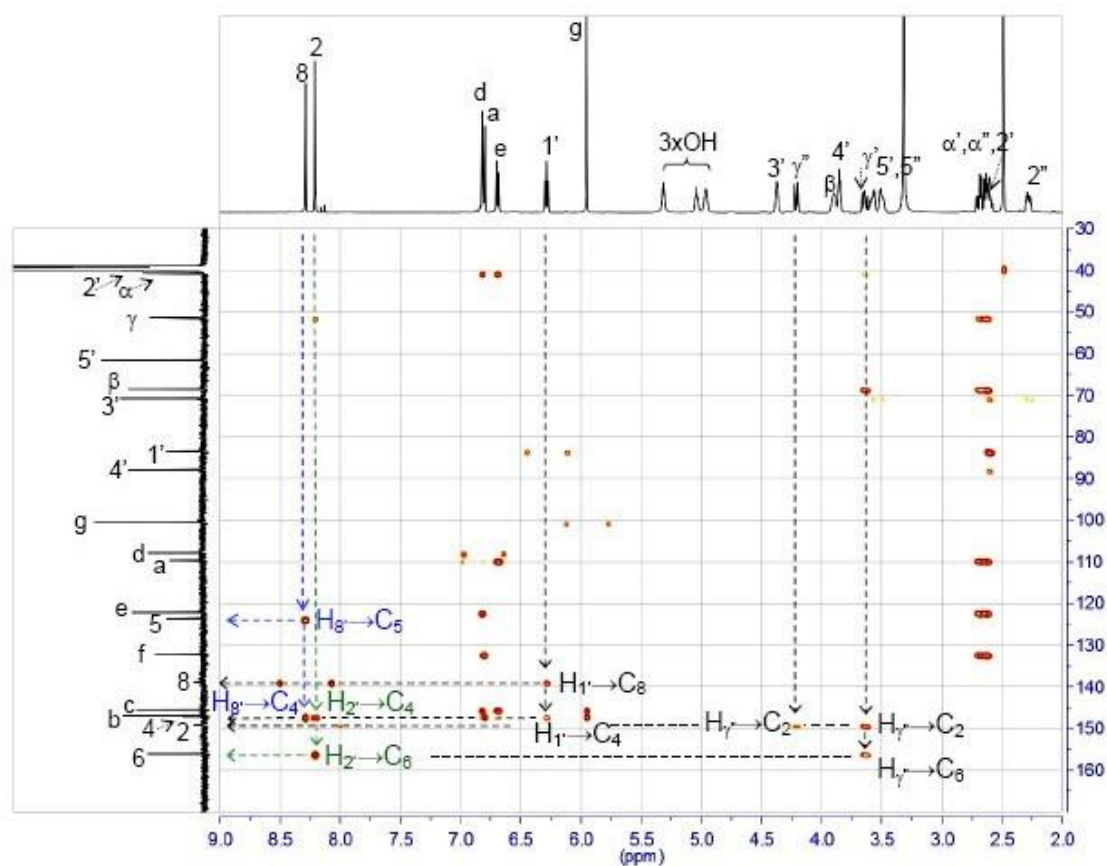
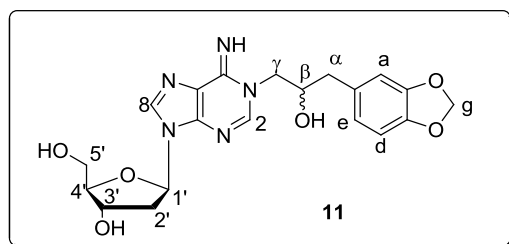
將黃樟素代謝產物(±)-SFO 3 與 2'-去氧腺嘌呤 (2'-deoxy- adenosine, 2'-dAdo 10) 在生理條件下 (pH 7.4, 37°C) (式圖三) 反應 72 小時，然後利用高效液相層析儀分析會有兩個吸收峰生成： $t_R = 18.6$ min 與 $t_R = 23.2$ min 分別為 N1 γ -SFO-dAdo 11 與 N6 γ -SFO-dAdo 12 (圖七)，將其分別收集

後利用電噴灑游離法 (electrospray ionization, ESI) 鑑定其分子量 (圖八)。得到 $N^1\gamma$ -SFO-dAdo **11** 之質荷比為: m/z 430 ($[M + H]^+$)、452 ($[M + H + Na]^+$)與 314 ($[M - 2'$ -deoxyribose + $H]^+$)，而 $N^6\gamma$ -SFO-dAdo**12** 之質荷比為: m/z 430 ($[M + H]^+$)、453 ($[M + H + Na]^+$)與 314 ($[M - 2'$ -deoxyribose + $H]^+$)，可以確定兩者皆為 **10** 接上 (\pm)-**3** 之後的 DNA 加成產物，因此我們利用高效液相層析儀分離上述二產物並收集樣品進行核磁共振結構鑑定。



圖八、DNA 加成產物 $N^1\gamma$ -SFO-dAdo **11** 和 $N^6\gamma$ -SFO-dAdo **12** 正離子模式下之電噴灑游離質譜圖。

1.2.2.1.1 DNA 加成產物 N1 γ -SFO-dAdo **11** 之結構鑑定

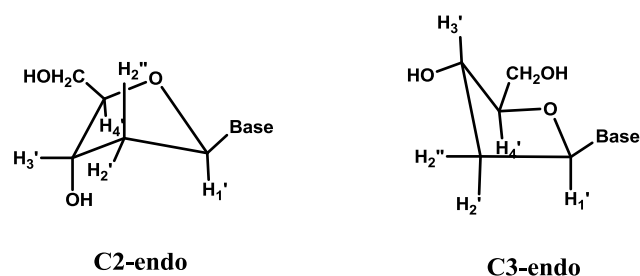


圖九、DNA 加成產物 N1 γ -SFO-dAdo **11** 之 HMBC (500 MHz, d_6 -DMSO) 光譜圖。

加成產物 **11** 之 ^1H NMR 光譜上化學位移 δ 6.33 之三重峰是 2-deoxyribose 上的 1'-H，因此從 HMQC 光譜圖 (附圖十四) 中將與 1'-H

(δ 6.33) 耦合的碳 (δ 83.44 and 83.52) 定為 C-1'，而在 HMBC 光譜中 (圖九) 1'-H 除了與 C-1' 有 $^1J_{CH}$ 的耦合之外，還跟腺嘌呤上的四級碳 C-4 (δ 147.15 and 147.10) 與三級碳 C-8 (δ 138.8) 分別有 $^3J_{CH}$ 耦合 (圖九和 DEPT 附圖十二)，在確認 C-8 的化學位移後，從 HMQC 光譜圖可以知道 H-8 在化學位移 δ 8.34，而且由於此化合物為非鏡像異構物 (diastereomers) 混合物，因此可以看到有些碳的訊號會分裂成兩組 (表二)。

至於 2-deoxyribose 上的 2''-H (δ 2.34) 和 2'-H (δ 2.66) 的訊號則是藉由 H,H-COSY 光譜圖 (附圖十三) 與 1'-H 相關的交叉峰定出，根據 Wood 和 Cadet 的研究知道 2'-去氧腺嘌呤的 2-deoxyribose 部分在溶液狀態下主要是以 C2-endo 的形式存在 (圖十) (Cadet et al., 1979)，並且推測 2-deoxyribose 這樣的折疊方式，使得 2''-H 位在 purine 六員環的遮蔽區 (shielding zone)，相反的 2'-H 則是接近五員環的 imidazole，因此 2''-H 化學位移會比 2'-H 位在高磁場 (upfield) 區域，同時會有特殊之耦合常數 $J_{2''3'} = 3.1$ Hz (*cis*) 與 $J_{2'3'} = 6.1$ Hz (*trans*) (Wood et al., 1974; Cadet et al., 1979)。所以從 800 MHz 高磁場核磁共振儀所測之氫譜計算所得到的耦合常數，我們將高磁場化學位移 δ 2.31–2.36； $^3J_{2''3'} = 3.2$ Hz (*cis*) 定為 2''-H；而低磁場 (down field) 化學位移 δ 2.63–2.70； $^3J_{2'3'} = 6.4$ Hz (*trans*) 定為 2'-H。



圖十、C2-endo 與 C3-endo 構形示意圖。

藉由已知的 C-4 在 HMBC 光譜上與三個氫： δ 6.33 (1'-H)、 δ 8.26 (2-H)、 δ 8.34 (8-H) 有 $^3J_{CH}$ 之相關，可以知道化學位移 δ 8.26 為 2-H，以及 HMQC 的 $^1J_{CH}$ 定出 C-2 (δ 149.2)；而化學位移 δ 156.0 的碳因為與 2-H ($^3J_{CH}$) 有耦合但是並無與 8-H ($^4J_{CH}$) 有耦合因此可以知道此四級碳是腺嘌呤上的 C-6。最後利用 C-4 (δ 147.15, 147.10) 和 C-6 (δ 156.0) 與 2-H (δ 8.34) 以及 C-4 (δ 147.15, 147.10) 和 C-5 (δ 123.6) 與 8-H (δ 8.26) 的 $^3J_{CH}$ 耦合可以再次驗證 2-H 和 8-H 在氫譜上訊號標定的正確性。同樣的我們從 HMBC 光譜上碳的訊號：C-a (δ 109.6)、C-e (δ 122.2)、C-f (δ 132.13 and 132.11)，與化學位移 δ 2.63–2.70 和 2.74 的氫訊號有耦合定出此兩組訊號分別為化合物 **11** 上 1,3-benzodioxole 基團上的 α' -H 和 α'' -H，如此我們依照 H,H-COSY 光譜圖定出 β -H (δ 3.90) 與 γ' -H (δ 3.67–3.72) 和 γ'' -H (δ 4.27)。最後從 C-2 和 C-6 與 γ' -H 和 γ'' -H 確認加成產物 **11** 為 2'-去氧腺嘌呤上 N1 位置 alkylation 的 N1 γ -SFO-dAdo (圖九和表二)。

表二、¹H and ¹³C Chemical Shifts (δ), Spin-Spin Coupling Constants, $J_{H,H}$ (Hz) of Protons, and Long-Range C-H Correlations (HMBC) in *N*1 γ -SFO-dAdo **11**.

proton ^e	δ (ppm)	multiplicity	$J_{H,H}$ (Hz)	carbon	δ (ppm)		HMBC
					(<i>R</i>)/(<i>S</i>) = 1/1	(<i>R</i>)/(<i>S</i>) = 2/1	
2-H	8.26	s		C-2	149.2	149.2	2-H; γ -H
8-H	8.34	s		C-8 ^[e]	138.8	138.74; 138.79	1'-H; 8-H
6-NH	n.d. ^[c]			C-6	156.0	156.0	2-H; γ -H
				C-4 ^[e]	147.15; 147.10	147.12; 147.07	1'-H; 8-H
1'-H	6.33	t	$J_{1'2'} = 7.2$ ^[f]	C-5	123.6	123.6	8-H
			$J_{1'2''} = 6.4$ ^[f]	C-1' ^[e]	83.44; 83.52	83.41; 83.48	2'-H; 1'-H
2''-H	2.31–2.36	ddd	$J_{1'2''} = 6.4$ ^[g]	C-2'	–	–	
			$J_{2'2''} = -12.8$ ^[g]				
			$J_{2'3'} = 3.2$ ^[g]				
2'-H	2.63–2.70 ^[d]	m	$J_{1'2'} = 7.2$ ^[g]				
			$J_{2'2''} = -12.8$ ^[g]				
			$J_{2'3'} = 6.4$ ^[g]				
3'-H	4.42	brs		C-3' ^[e]	70.67; 70.65	70.6	2'-H; 5'-H
4'-H	3.90	brs ^[b]		C-4' ^[e]	87.92; 87.94	87.9	2'-H
5''-H	3.53–3.56	m ^[b]		C-5'	61.6	61.6	
5'-H	3.61–3.64	m ^[b]					
3'-OH	5.37	brs					
5'-OH	5.08–5.10	m ^[b]					
β -OH	5.01	d	4.4				
α -H	2.63–2.70 ^[d]	m	5.0; -14.0	C- α	40.7	40.7	e-H; d-H
	2.74	dd					
β -H	3.90	brs ^[b]		C- β	68.5	68.5	α -H; γ -H
γ -H	3.67–3.72	m ^[b]		C- γ	51.4	51.4	2-H; α -H
	4.27	dd	2.4; -13.3				
a-H	6.87	d	1.2	C-a	109.6	109.6	α -H; e-H; d-H
				C-b	147.0	146.9	g-H; a-H
				C-c	145.4	145.4	g-H; e-H; a-H
d-H	6.86	d	7.9	C-d	107.9	107.9	d-H
e-H	6.74	dd	1.1; 7.9	C-e	122.2	122.1	α -H; e-H
				C-f ^[e]	132.13; 132.11	132.11; 132.09	α -H; e-H
g-H	6.00	s		C-g	100.6	100.6	g-H

[a] Diastereomeric mixture of racemic *N*1 γ -SFO-dAdo **11** or (*R*)-enriched-*N*1 γ -SFO-dAdo **11**. [b]

Unresolved multiplet due to a mixture of diastereomers. [c] n.d. denotes not detected. [d] Signals of H-2''

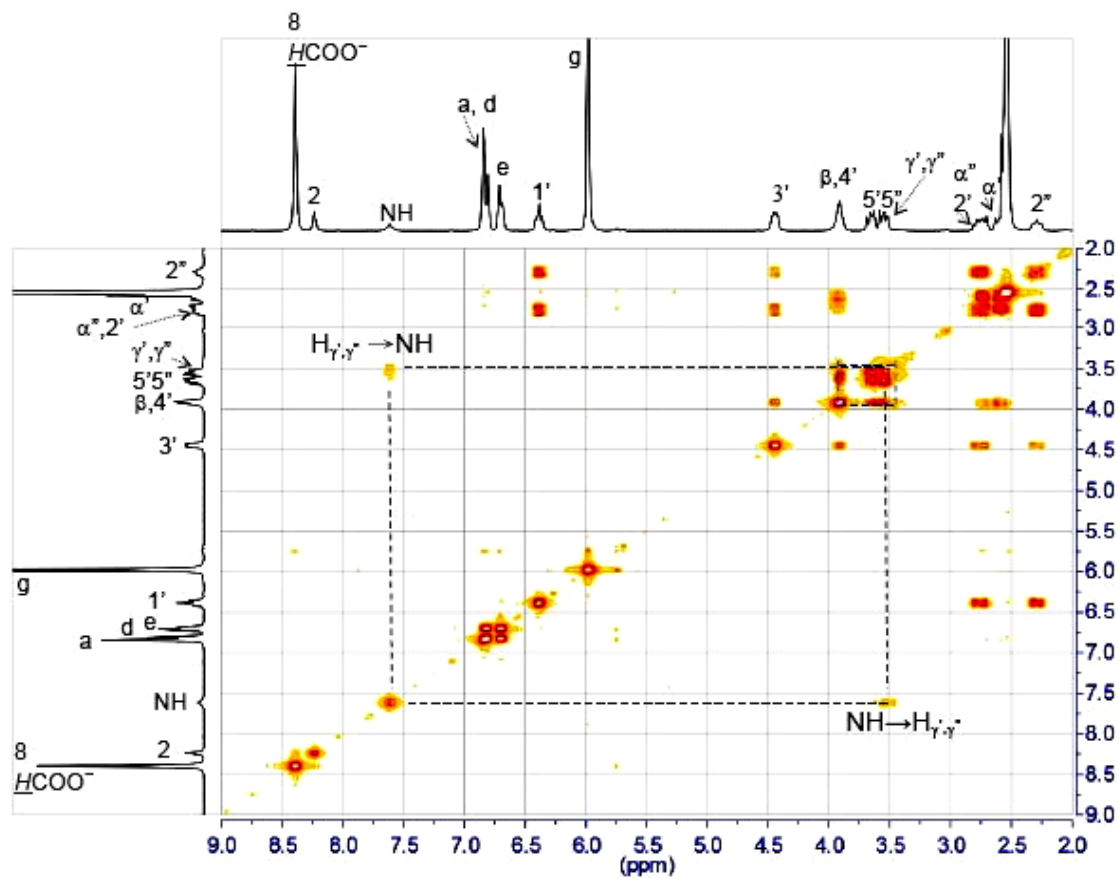
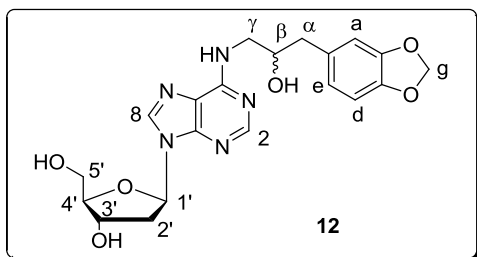
and H- α were overlapped. [e] Separated shifts due to a mixture of diastereomers. [f] Selective decoupling of

H-2' or H-2''. [g] Proton NMR spectra measured in an 800 MHz spectrometer.

1.2.2.1.2 DNA 加成產物 $N^6\gamma$ -SFO-dAdo 12 之結構鑑定

加成產物 12 的 HMQC (附圖二十) 光譜中出現一根化學位移 δ 8.39 之氫訊號與另外兩根化學位移 δ 139.4 和 δ 164.6 之一級碳 (-CH; 附圖十九之 DEPT 光譜圖) 訊號相關 $^1J_{CH}$ 耦合, 其中 $\delta_C = 164.6$ ppm 和 $\delta_H = 8.39$ ppm 未預期的訊號主要來自於甲酸銨 ($HCOO^-NH_4^+$) 的干擾; 並且從 HMBC (附圖二十一) 光譜圖 $\delta_H = 8.39$ ppm 與 C-4 (δ 148.1) 和 C-5 (δ 119.7) 的 $^3J_{CH}$ 耦合, 可以知道另一組關連訊號 $\delta_C = 139.4$ ppm 和 $\delta_H = 8.39$ ppm 則是腺嘌呤上的 C-8 與 8-H。

加成產物 12 上 1,3-benzodioxole 基團上 β -H 的化學位移在 δ 3.91–3.95 則是由 HMQC 光譜中與三級碳 C- β (δ 70.2) 的耦合定出, 同時在 H,H-COSY 的光譜中也出現了與 β -H 相鄰之 γ',γ'' -H 和 α',α'' -H 相關之交叉峰。藉由 HMBC 光譜中與 C-a (δ 109.7)、C-e (δ 122.1) 與 C-f (δ 132.9) 耦合之氫的訊號分別為 α' -H (δ 2.58–2.63) 和 α'' -H (δ 2.73–2.80), 而另外一組在 H,H-COSY (圖十一) 的光譜中與 β -H 相關之交叉峰可被定為 γ',γ'' -H (δ 3.46)。因為 HMBC 光譜中並無與 γ',γ'' -H 耦合的碳訊號出現, 因此無法確認 alkylation 的位置, 但是從圖十一 H,H-COSY 光譜中 γ' -H 和 γ'' -H 與 -NH (δ 7.59) 交叉峰中確認加成產物 12 是 N^6 位置 alkylation 的 $N^6\gamma$ -SFO-dAdo 加成產物 (表三)。



圖十一、DNA 加成產物 $N^6\gamma$ -SFO-dAdo **12** 之 H,H-COSY (500 MHz, d_6 -DMSO) 光譜圖。

表三、 ^1H and ^{13}C Chemical Shifts (δ), Spin-Spin Coupling Constants, $J_{\text{H,H}}$ (Hz)

of Protons, and Long-Range C-H Correlations (HMBC) in $N^6\gamma$ -SFO-dAdo **12**.

proton ^[a]	δ (ppm)	multiplicity	$J_{\text{H,H}}$ (Hz)	carbon	δ (ppm) ^[a] (<i>R</i>)/(<i>S</i>) = 1/1	δ (ppm) ^[a] (<i>R</i>)/(<i>S</i>) = 2/1	HMBC Correlation(s)
2-H	8.24	s		C-2	152.2	152.3	
8-H ^[h]	8.39	s		C-8	139.4	139.5	1'-H; 8-H
6-NH	7.58	s		C-6	154.7	154.6	
				C-4	148.1	148.1	1'-H; 8-H
				C-5	119.7	119.7	8-H
1'-H	6.38-6.41	dd ^[i,j]	$J_{1'2'} = 7.2$ ^[i] $J_{1'2''} = 5.6$ ^[i]	C-1'	84.0	84.0	2'-H; 1'-H
2''-H	2.30	ddd	$J_{1'2''} = 5.6$ ^[j] $J_{2'2''} = -13.6$ ^[j] $J_{2'3'} = 3.2$ ^[j]	C-2' ^[f]	–	–	
2'-H	2.73–2.80 ^[c]	m					
3'-H	4.44–4.47	m		C-3'	70.9	71.0	2'-H; 4'-H; 5'-H
4'-H	3.91–3.95 ^[d]	m		C-4'	88.0	88.0	2'-H; 5'-H
5''-H	3.56	dd	4.2; –11.8	C-5'	61.9	61.9	
5'-H	3.66	dd	4.4; –11.8				
3'-OH	n.d. ^[e]						
5'-OH	n.d. ^[e]						
β -OH	n.d. ^[e]						
α -H	2.58–2.63 ^[f]	m		C- α	40.7	40.7	e-H; d-H
	2.73–2.80 ^[c]	m					
β -H	3.91–3.95 ^[d]	m		C- β	70.2	70.2	α -H
γ -H	3.46 ^[g]	m		C- γ	46.0	46.0	α -H
a-H	6.85	d	0.61	C-a	109.7	109.8	α -H; e-H; d-H
				C-b	146.9	146.9	g-H; a-H
				C-c	145.2	145.3	g-H; e-H; a-H
d-H	6.83	d	7.9	C-d	107.8	107.9	d-H
e-H	6.71	dd	1.2; 7.9	C-e	122.1	122.2	α -H; e-H
				C-f	132.9	133.0	α -H; e-H
g-H	5.99	s		C-g	100.5	100.6	g-H
$\underline{\text{HCOO}}^-$ ^[h]	8.39	s		$\underline{\text{HCOO}}^-$	164.6	–	$\underline{\text{HCOO}}^-$

[a] Diastereomeric mixture of racemic $N^6\gamma$ -SFO-dAdo **12** or (*R*)-enriched- $N^6\gamma$ -SFO-dAdo **12**. [b]

Unresolved multiplet due to a mixture of diastereomers. [c] Signals of 2'-H and α'' -H were overlapped. [d]

Signals of 4'-H and β -H were overlapped. [e] n.d. denotes not detected. [f] Signals were overlapped with

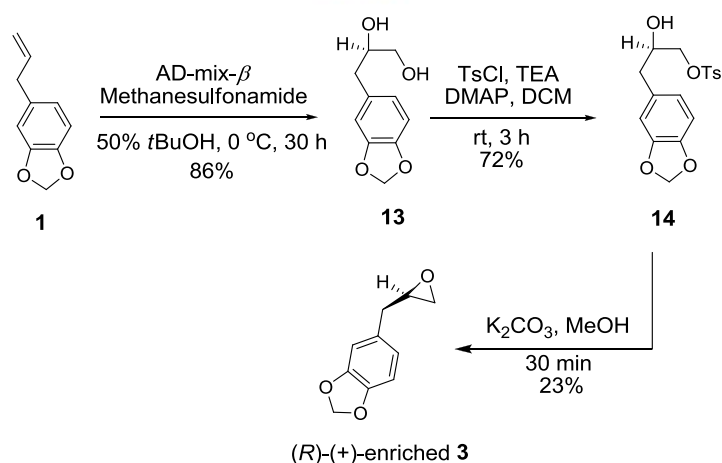
solvent. [g] Signals of 5'-H and γ -H were overlapped. [h] Signals of 8-H and $\underline{\text{HCOO}}^-$ were overlapped. [i]

Selective decoupling of 2'-H or 2''-H. [j] Proton NMR spectra measured in an 800 MHz spectrometer.

1.2.2.2 黃樟素代謝產物(*R*)-(+)-Enriched-SFO 3 與 2'-去氧腺嘌呤 10 之反應

黃樟素代謝產物(\pm)-3 與 2'-去氧腺嘌呤 10 所生成之 DNA 加成產物 $N1\gamma$ -SFO-dAdo 11 的碳譜訊號有些會分裂成兩組，主要是因為環氧代謝產物與核苷酸反應後生成之加成產物為非對映異構體 (diastereomer)，造成 NMR 訊號的不同，這樣的結果也與文獻上所得到的結果一致 (Olsen et al., 2005)。為了清楚區別這些分裂的訊號哪一組是屬於 (*R*)-或(*S*)-的 3 反應所得加成產物的訊號，進一步嘗試合成具光學活性的 3 進行核磁共振光譜的探討。

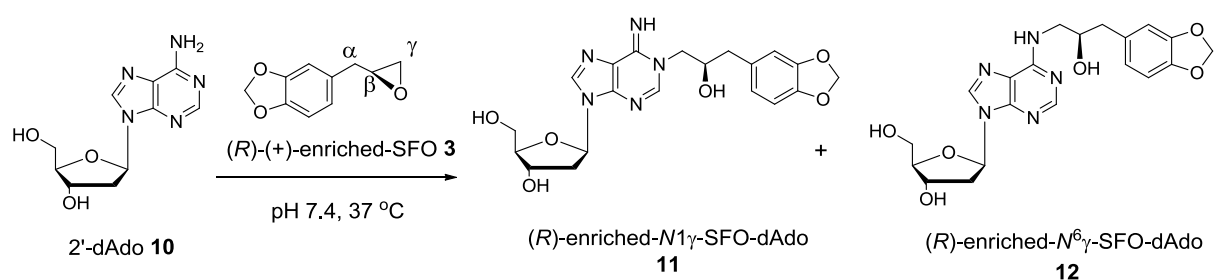
1.2.2.2.1 合成具光學活性之(*R*)-(+)-enriched-SFO 3



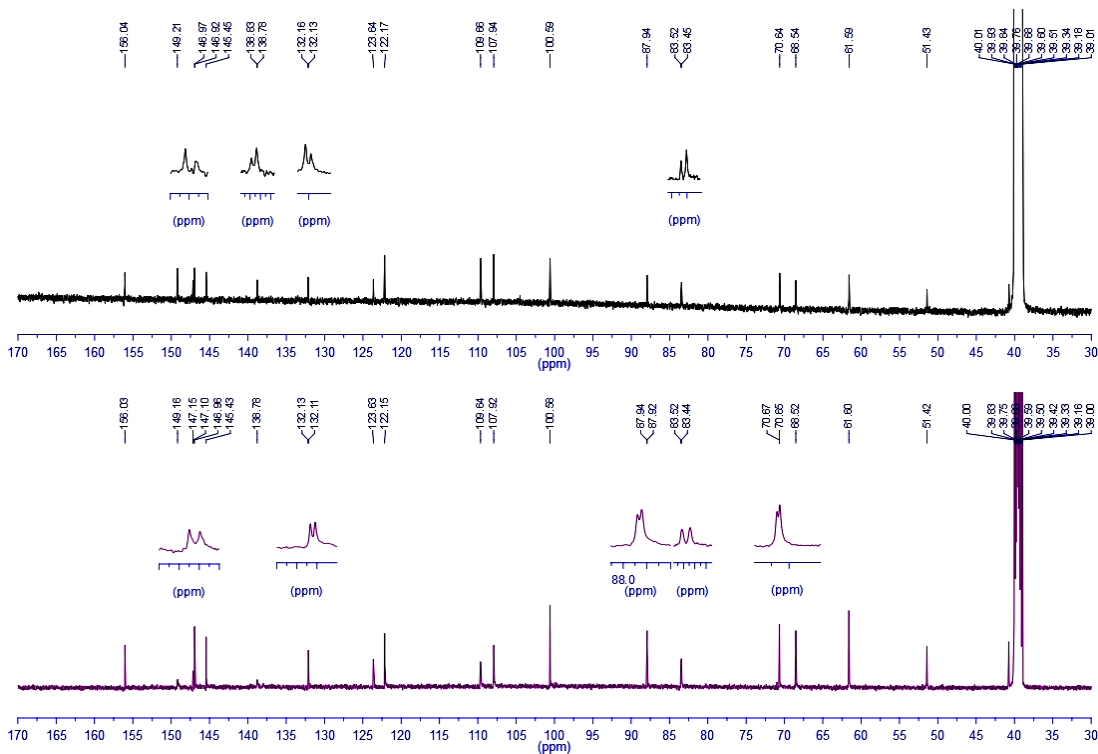
式圖四、(*R*)-(+)-enriched SFO 3 的合成。

我們參考文獻合成具有光學活性的黃樟素代謝產物 **3** (Mohan and Rao, 1998), 合成之流程圖如式圖四。首先利用 Sharpless asymmetric dihydroxylation 合成化合物 **13**, $[\alpha]^{25} = +21.7^\circ$ (c, 0.003, CH₂Cl₂), 再利用手性高效液相層析(chiral HPLC)分離決定其對映體過量百分率為 96.0% (percent enantiomeric excess)(附圖三(a))。但是在化合物 **14**, $[\alpha]^{25} = +12.5^\circ$ (c, 0.002, CH₂Cl₂)對映體過量百分率只有 39.7% (附圖三(b))。同樣利用手性高效液相層析來分離化合物 **3**(附圖三(c)), 得到之層析峯面積比為 2:1, optical rotation 分別為 $[\alpha]^{25} = +11.8^\circ$ (c, 0.003, CH₂Cl₂)、 $[\alpha]^{25} = -11.6^\circ$ (c,0.003, CH₂Cl₂), 對映體過量百分率為 39.3%的黃樟素代謝產物 **3**。

1.2.2.2.2 2'-去氧腺嘌呤 DNA 加成產物 (*R*)-enriched-*N*¹ γ -SFO-dAdo **11** 與 (*R*)-enriched-*N*⁶ γ -SFO-dAdo **12** 之結構鑑定

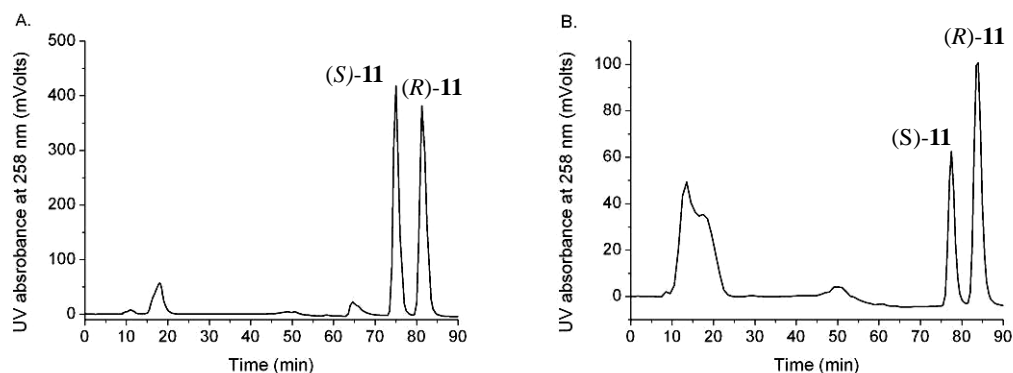


式圖五、2'-去氧腺嘌呤 **10** 與(*R*)-(+)-enriched SFO **3** 之加成產物 (*R*)-enriched-*N*¹ γ -SFO-dAdo **11** 與(*R*)-enriched-*N*⁶ γ -SFO-dAdo **12** 的合成。



圖十二、DNA 加成產物 $N1\gamma$ -SFO-dAdo **11** (下圖) 與 (*R*)-enriched- $N1\gamma$ -SFO-dAdo **11** (上圖) 之 ^{13}C NMR (500 MHz, d_6 -DMSO) 光譜圖疊圖。

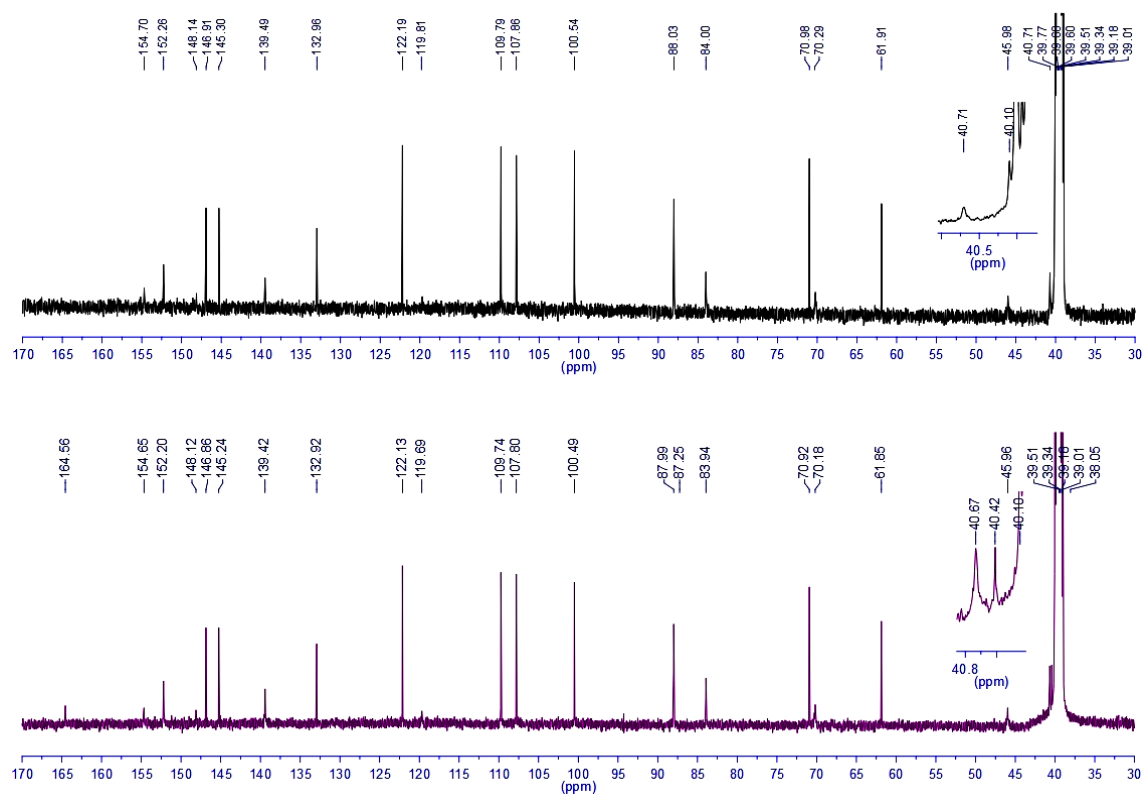
雖然只得到 (*R*)/(*S*) 為 2:1 的 (*R*)-(+)-enriched-SFO **3**，但是預期所得之 DNA 加成產物 (*R*)-enriched- $N1\gamma$ -SFO-dAdo **11** 與 (*R*)-enriched- $N^6\gamma$ -SFO-dAdo **12** 的 ^{13}C NMR 光譜圖應該也會有 2:1 的訊號強度，因此利用 (*R*)-(+)-enriched-SFO **3** 與 2'-去氧腺嘌呤 **10** 反應。



圖十三、DNA 加成產物 (A) $N^{1\gamma}$ -SFO-dAdo **11** 與 (B) (R) -enriched- $N^{1\gamma}$ -SFO-dAdo **11** 之手性高效液相層析圖。

從圖十二可以看到 (R) -enriched- $N^{1\gamma}$ -SFO-dAdo **11** 碳譜分裂的訊號具有 2:1 的訊號強度，可以定出 $N^{1\gamma}$ -SFO-dAdo **11** 分裂的碳譜中屬於 (R) 或 (S) 的訊號，除此之外我們也嘗試利用 Chiral HPLC 搭配 AS-H (4.6*250 mm, 5 μ m) 之手性層析管柱，在 isopropanol/hexane 為動相的條件下成功的分離非對映異構體 $N^{1\gamma}$ -SFO-dAdo **11** 與 (R) -enriched- $N^{1\gamma}$ -SFO-dAdo **11**，並分別得到 1:1 與 2:1 之訊號強度 (圖十三)。

不過很可惜， $N^{6\gamma}$ -SFO-dAdo **12** 與 (R) -enriched- $N^{6\gamma}$ -SFO-dAdo **12** 不論在 ^{13}C NMR 光譜 (圖十四) 或手性高效液相層析都無法區分。

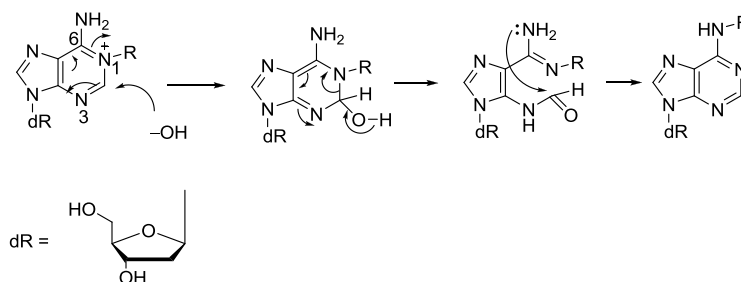


圖十四、DNA 加成產物 $N^6\gamma$ -SFO-dAdo **12** (下圖) 與 (R) -enriched- $N^6\gamma$ -SFO-dAdo **12** (上圖) 之 ^{13}C NMR (500 MHz, d_6 -DMSO) 光譜圖疊圖。

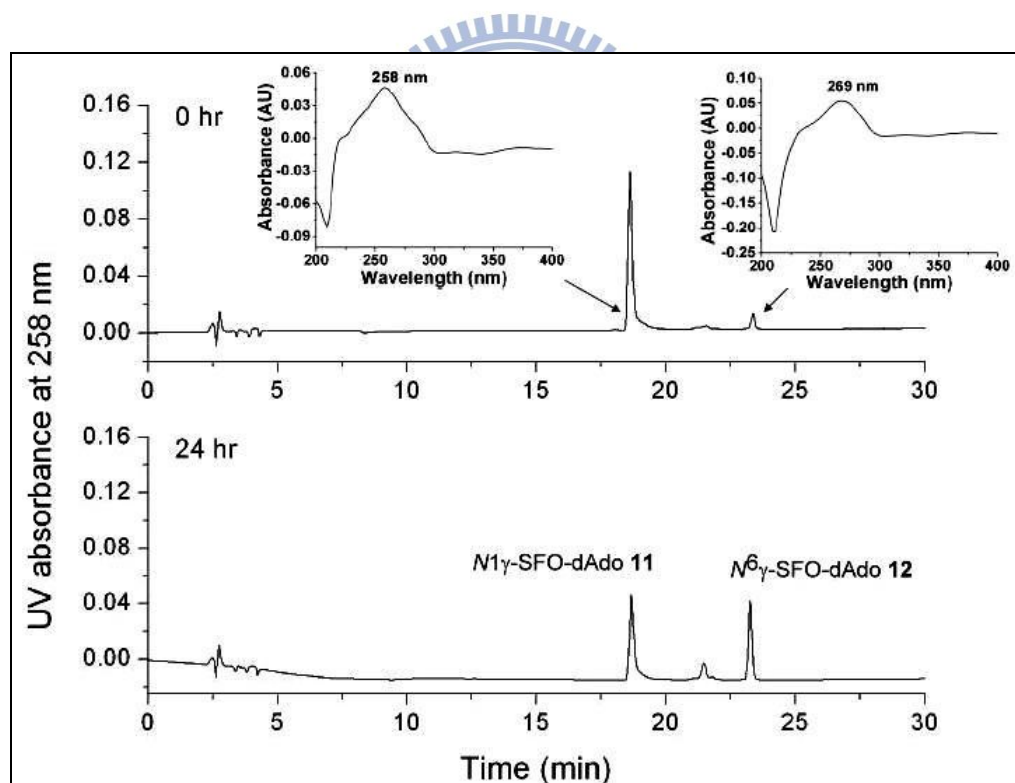
1.2.2.3 $N1\gamma$ -SFO-dAdo **11** 經由 Dimroth rearrangement 重排形成 $N^6\gamma$ -SFO-dAdo **12**

根據過去文獻上環氧黃樟素代謝產物(propylene oxide, butadiene oxide, styrene oxide)與 2'-去氧腺嘌呤 **10** 反應的研究中知道，2'-去氧腺嘌呤 **10** 上的 $N1$ 是進行親核反應形成 $N1$ -dAdo 加成產物的主要位置，再經由 Dimroth rearrangement 形成 N^6 -dAdo 加成產物。Dimroth rearrangement 反應機制主要是經由鹼催化打開 2'-去氧腺嘌呤 **10** 的六員環再重新合環

(recyclization)使得環上的氮原子($N1$)與環外的氮原子(N^6)位置交換 (圖十五) 形成 N^6 -dAdo 加成產物 (Kim et al., 2000)。



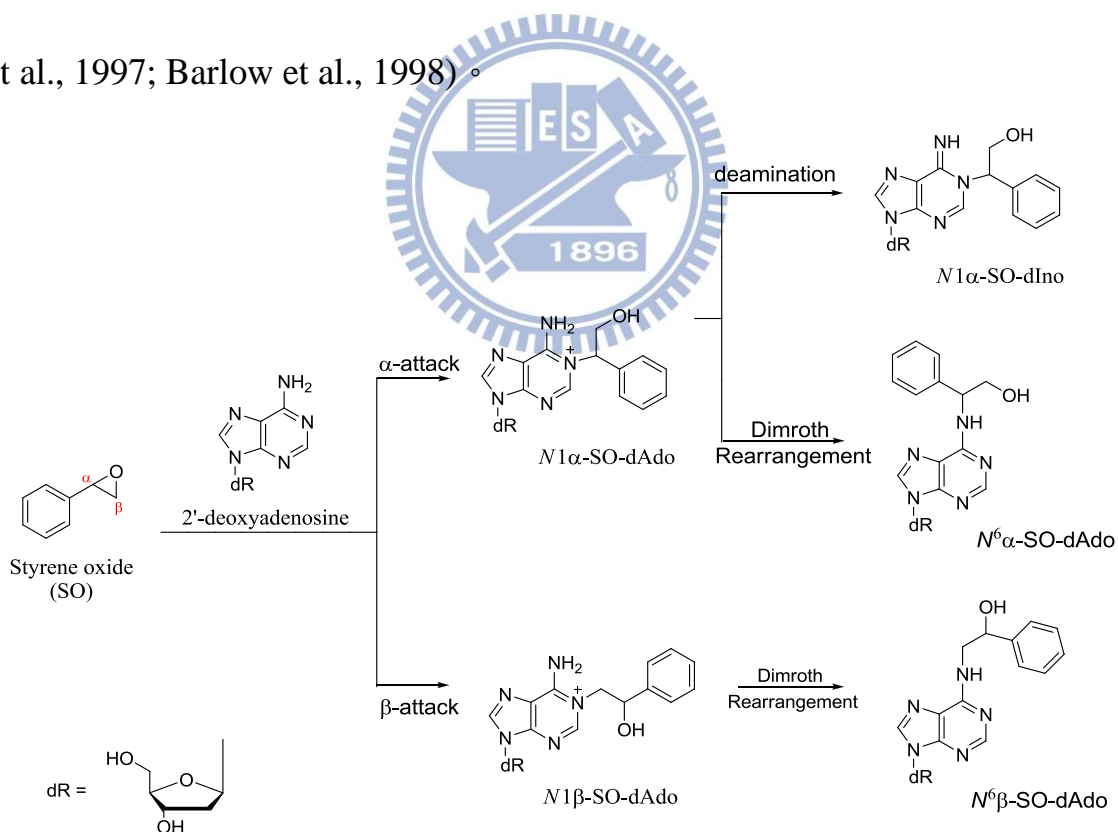
圖十五、Dimroth rearrangement 反應機制圖。



圖十六、 $N1\gamma$ -SFO-dAdo 11 在 0.2N K_2HPO_4 (pH 7.4), $37^\circ C$ 下進行 Dimroth rearrangement 反應轉換成 $N6\gamma$ -SFO-dAdo 12 之高效液相層析圖譜。

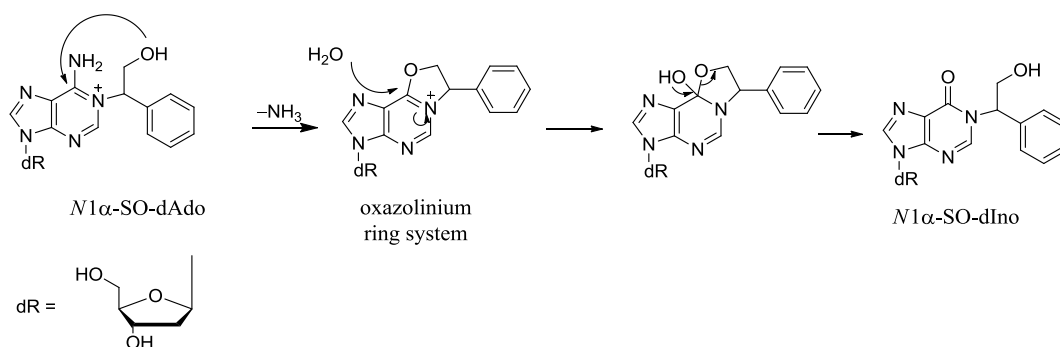
為了印證 Dimroth rearrangement 的反應，我們將 $N1\gamma$ -SFO-dAdo **11** 配製在 0.2 N K_2HPO_4 (pH 7.4) 的溶液，並在 37 °C 下利用高效液相層析儀監控其重排反應（圖十六），實驗結果顯示在此條件下反應 24 小時後會有一半量的 $N1\gamma$ -SFO-dAdo **11** 經由重排反應轉換成 $N^6\gamma$ -SFO-dAdo **12**。

在 styrene oxide (SO) 與 2'-去氧腺嘌呤反應所形成不同的方位異構物 (regioisomer) 加成產物中，不同於 styrene oxide，此反應中 2'-去氧腺嘌呤並無攻擊 SFO 的 β 位置與去氨基 $N1$ -肌嘌呤 ($N1$ -inosine, $N1$ -dIno) 的加成產物生成（圖十七）（Qian and Dipple, 1995; Selzer and Elfarra, 1996; Barlow et al., 1997; Barlow et al., 1998）。



圖十七、Styrene oxide (SO) 與 2'-去氧腺嘌呤反應所形成之 DNA 加成產物。

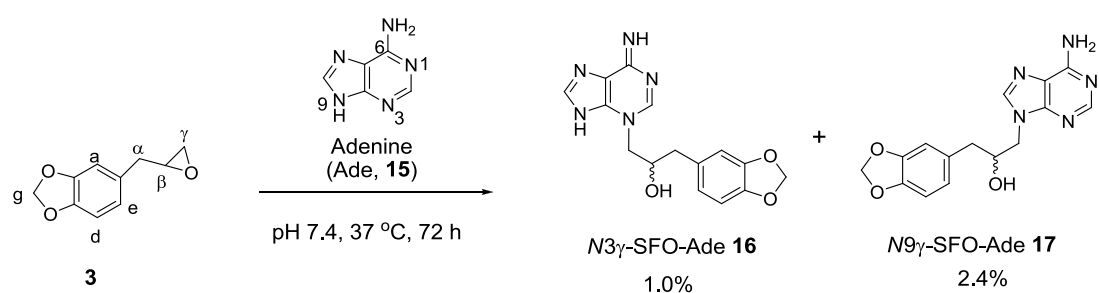
去氨基化 (Deamination). 在 *N1*-alkyladenine 的 DNA 加成產物去氨基化必須在 *N1* 氮取代基上的碳必須被質子化產生正電荷(Shapiro and Klein, 1966; Barlow et al., 1997)，但是對於簡單的 *N1*-alkyladenine 的結構去氨基化的速率仍然是非常的慢 (Macon and Wolfenden, 1968)。可是 Styrene oxide 的 DNA 加成產物 *N1*-(2-hydroxy-1-phenylethyl)adenosine 卻非常容易進行去氨基化 (圖十八)，因此推測烷基鍊上的羥基在去氨基化的過程中扮演著鹼催化角色將水分子去質子化，雖然一級醇與二級醇的 pKa 相近 (Shapiro and Klein, 1966; Barlow et al., 1997)，因此 *N1* α -SO-dAdo 上的一級醇可以促進快速的去氨基化，而擁有二級醇的 *N1* β -SO-dAdo 則是因為立障(steric effect)大於一級醇而不利於去氨基化的進行 (Qian and Dipple, 1995; Barlow et al., 1997)。



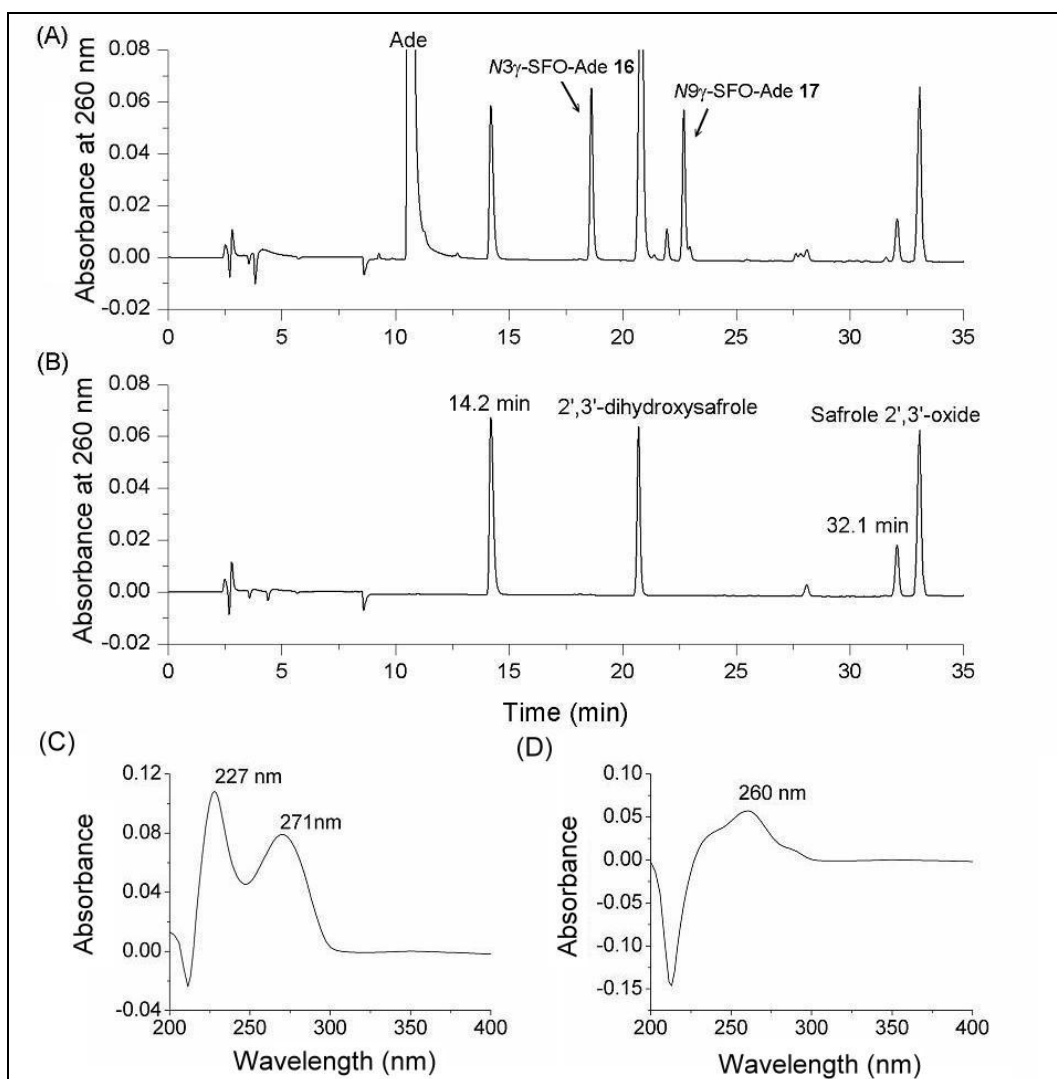
圖十八、Styrene oxide (SO) 之 DNA 加成產物 *N1* α -SO-dAdo 去氨基形成 *N1* α -SFO-dIno 之反應機制。

N^1 -或 N^6 -腺嘌呤的 alkylation 通常與 AT 鹼基配對的突變有關，在氧化苯乙烯 (styrene oxide) 主要因為 AT→GC 同類置放 (transition) 造成的亞黃嘌呤-鳥糞嘌呤磷酸核糖基轉基酶 (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase, *hprt*) 突變 (Bastlova and Podlutzky, 1996) 以及在 *N-ras* gene codon 61 發現苯乙烯氧化物的 N^6 -腺嘌呤 DNA 加成產物並造成 AT→GC 同類置放 (Latham et al., 1993)，而丁二烯 (butadiene) 暴露的動物實驗主要也是造成 AT 鹼基配對的錯誤 (Sisk et al., 1994; Recio and Meyer, 1995)。其中又以 N^1 -腺嘌呤 DNA 加成產物致突變性較 N^6 -腺嘌呤 DNA 加成產物高，此現象主要因為 N^6 -腺嘌呤的 DNA 加成產物還是可以與 thymidine 作用，而 N^1 -腺嘌呤加成產物會破壞氫鍵作用。

1.2.2.4 黃樟素代謝產物 (±)-SFO 3 與腺嘌呤 (Adenine, Ade 15) 之反應



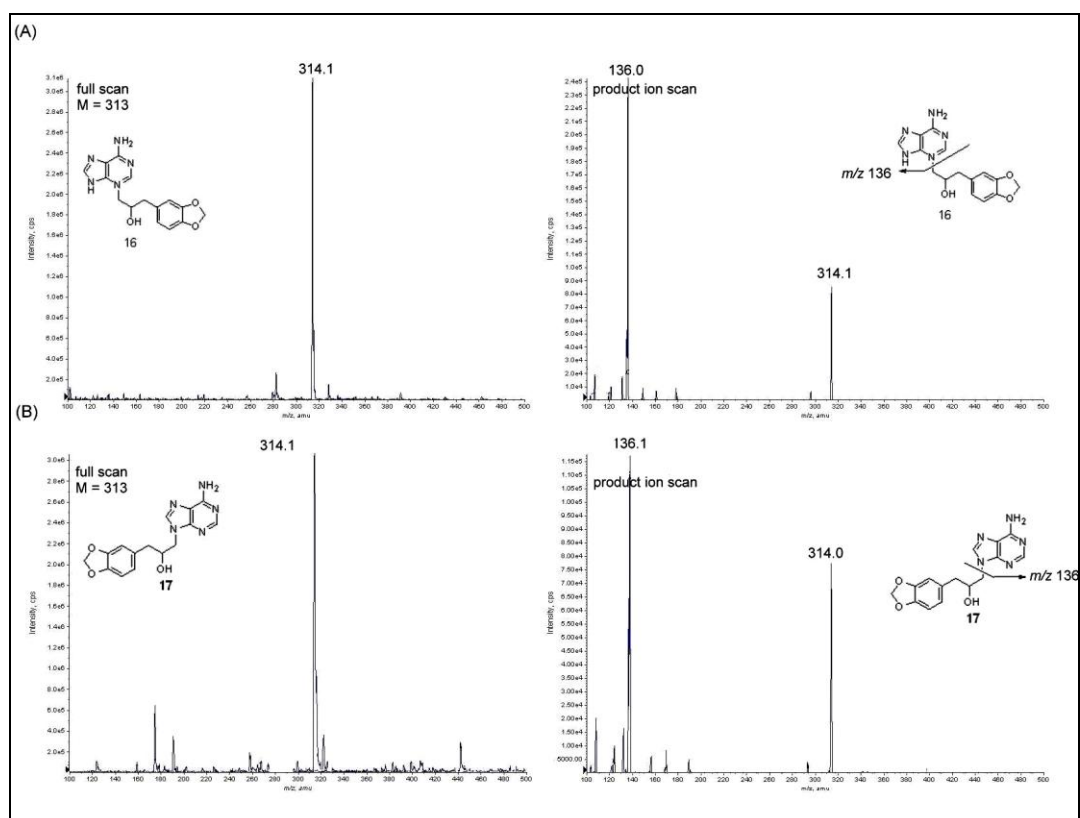
式圖六、腺嘌呤 15 與 (±)-SFO 3 之加成產物 $N^3\gamma$ -SFO-Ade 16 與 $N^9\gamma$ -SFO-Ade 17 的合成。



圖十九、(A) (±)-SFO 3 與腺嘌呤 15 在 pH 7.4, 37°C 下反應 72 小時與(B) (±)-SFO 3 在 pH 7.4, 37°C 下反應 72 小時之高效液相層析圖譜。(C)加成產物 $N3\gamma$ -SFO-Ade 16 與 (D)加成產物 $N9\gamma$ -SFO-Ade 17 之 UV 吸收光譜圖。

為了得到大量的 $N3$ -腺嘌呤 DNA 加成產物，我們利用腺嘌呤 15 與 (±)-SFO 3 在生理條件下 (pH 7.4, 37°C) 反應 (式圖六) 72 小時，從高效液相層析圖譜(圖十九)觀察到在滯留時間 $t_R = 18.6$ min 與 $t_R = 22.7$ min 會有兩個新生成的層析峯，分別收集後利用電噴灑游離法鑑定其分子量 (圖二十)，可以得知兩者為具有相同分子量以及相同碎片 ($m/z =$

314→136), 但不同 UV 吸收波長 [$\lambda_{\max} = 271 \text{ nm}$ (**16**)、 260 nm (**17**)] 之 (\pm)-SFO **3** 與腺嘌呤 **15** 反應的方位異構物 (regioisomer), 因此我們分別收集這兩個 DNA 加成產物, 並進一步利用核磁共振光譜進行結構鑑定。



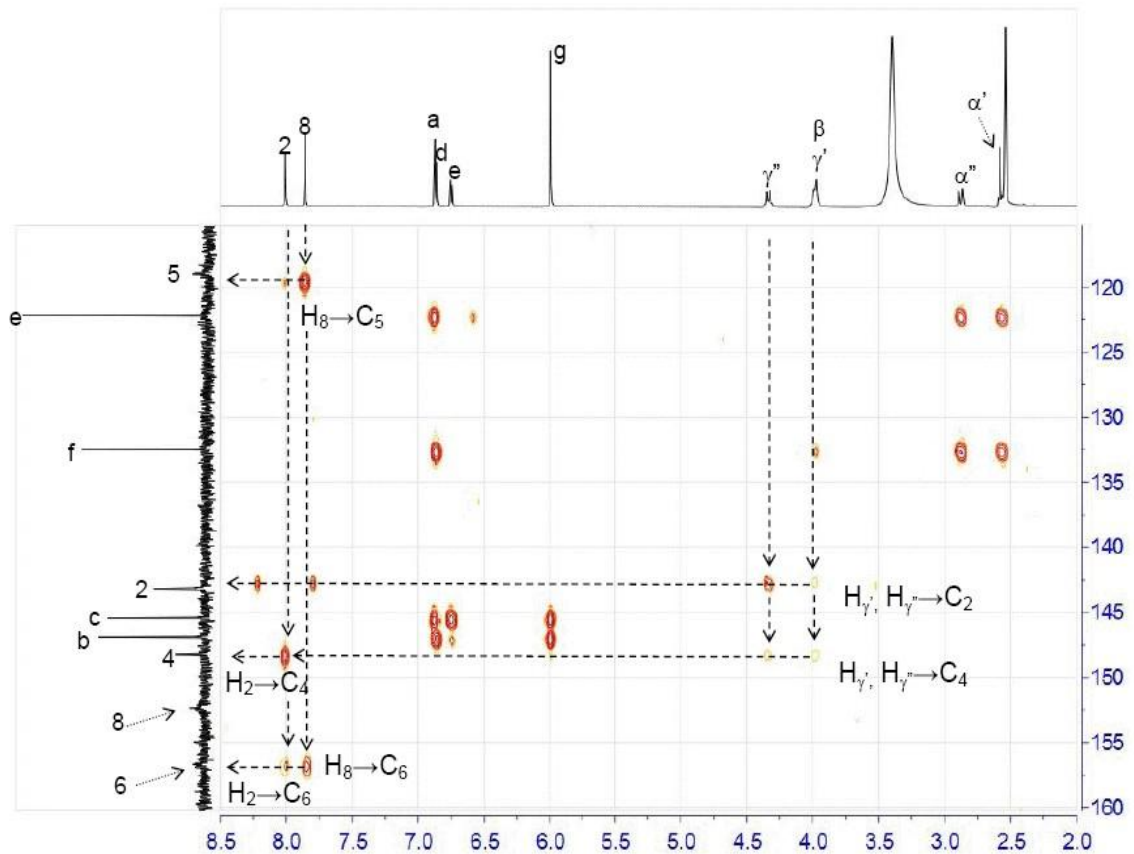
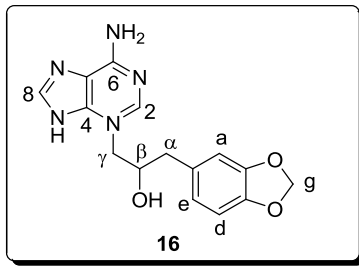
圖二十、 加成產物 *N3* γ -SFO-Ade **16** 和 *N9* γ -SFO-Ade **17** 正離子模式下之電噴灑游離質譜圖。

1.2.2.4.1 DNA 加成產物 *N3* γ -SFO-Ade **16** 之結構鑑定

首先將加成產物 **16** 之 ^1H NMR 光譜中(附圖二十四)化學位移 $\delta = 8.01$ 和 7.86 ppm 分別定為腺嘌呤上的 2-H 和 8-H, 因為根據文獻的研究指出腺嘌呤上 2-H 的化學位移比 8-H 的位在較低磁場區 (Iyer et al., 1994; Krouželka et al., 2008); 接著再由 DEPT (附圖二十六) 和 HMQC (附圖二十

八) 之光譜圖可以定出 ^{13}C NMR 光譜圖上化學位移 $\delta = 143.3$ 和 $\delta = 152.3$ ppm 的次甲基 (methine, -CH) 分別為 C-2 和 C-8。化學位移 $\delta 118.9$ 之四級碳則是藉由加成產物 **16** 的 HMBC 光譜圖 (圖二十一) 上與 8-H ($^3J_{\text{CH}}$; 強) 及 2-H ($^4J_{\text{CH}}$; 弱) 的耦合(coupling)將其定為腺嘌呤 **15** 上的 C-5, 此化學位移與 styrene oxide 與腺嘌呤 **15** 的加成產物 3-(2-hydroxy-2-phenylethyl) adenine (C-5, $\delta 120.3$)相近(Krouželka et al., 2008)。

進一步依據 3-(2-hydroxy-2-phenylethyl)adenine (C-4, $\delta 149.7$; C-6, $\delta 155.0$) (表四) 的結果將此化合物在碳譜上化學位移 $\delta 148.2$ 定為 C-4 與另一個化學位移 $\delta 156.7$ 定為 C-6, 並且從 HMBC 光譜 C-4 ($\delta 148.2$) 與 2-H ($^3J_{\text{CH}}$; 強)的耦合; C-6 ($\delta 156.7$) 與 2-H ($^3J_{\text{CH}}$) 及 8-H ($^4J_{\text{CH}}$)的耦合確認 C-4 與 C-6 的訊號的標定, 而上述 C-4、C-5、C-6 與氫之間卻有一些不常見的耦合訊號出現在 HMBC 光譜圖中: 包括一組 $^3J_{\text{CH}}$ 耦合 (C-4 對 8-H) 消失以及出現兩組 $^4J_{\text{CH}}$ (C-5 對 2-H; C-6 對 8-H) 耦合的訊號, 這現象的發生有可能是這些碳原子的特殊混成 (hybridizations) 或者其他未知的因素所造成 (R. M. Silverstein)。



圖二十一、DNA 加成產物 *N*3 γ -SFO-Ade **16** 之 HMBC (500 MHz, *d*₆-DMSO) 光譜圖。

由於有兩組氫在化學位移 δ 2.58–2.60 以及 δ 2.89 ppm 在 HMBC 光譜上與 C-a、C-e、C-f 耦合因此分別定為 α' -H 和 α'' -H，接著再藉由 DEPT, HMQC 以及 H,H-COSY (附圖二十七) 等光譜圖可以定出氫的化學位移 δ 3.99–4.03 和 4.35 分別為另一組亞甲基 (methylene, -CH₂) γ' -H 和 γ'' -H，

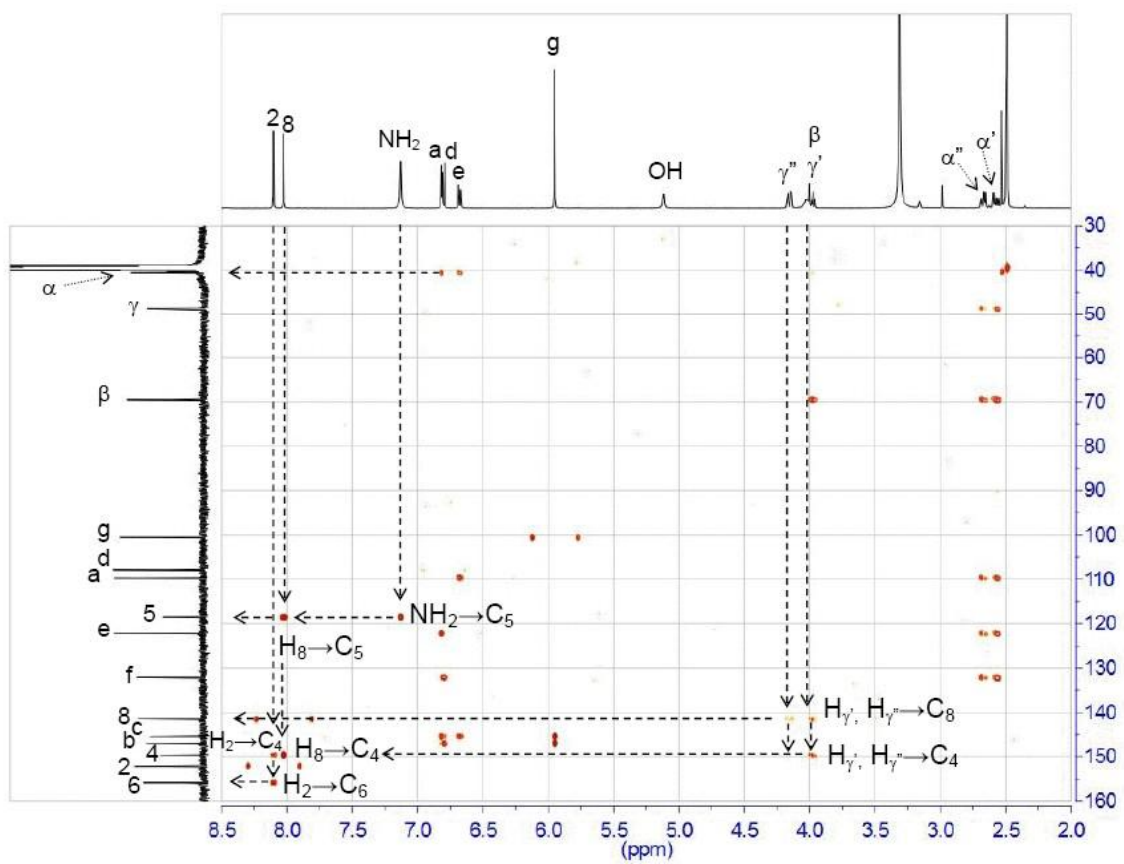
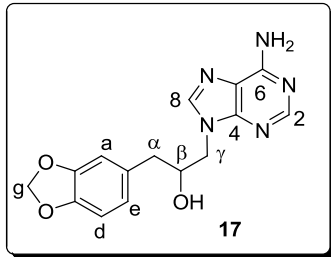
最後經由 γ' -H 和 γ'' -H 與 C-2 和 C-4 在 HMBC 光譜上的偶合訊號，可以知道加成產物 **16** 是 N3 位置 alkylation 的 N3 γ -SFO-Ade。

表四、 ^1H and ^{13}C Chemical Shifts (δ), Spin-Spin Coupling Constants, $J_{\text{H,H}}$ (Hz) of Protons, and Long-Range C-H Correlations (HMBC) in N3 γ -SFO-Ade **16**.

proton	δ (ppm)	multiplicity	$J_{\text{H,H}}$ (Hz)	carbon	δ (ppm)	HMBC correlation(s)	δ (ppm) ^[d]
2-H	8.01	s		C-2	143.3	2-H; γ -H	143.9
8-H	7.86	s		C-8	152.3		152.3
NH ₂	n.d. ^[a]			C-6	156.7	2-H; 8-H	155.0
				C-4	148.2	2-H; γ -H	149.7
				C-5	118.9	8-H	120.3
β -OH	n.d. ^[a]						
α -H	2.58–2.60 ^[b]	m		C- α	40.4	e-H; a-H	
	2.89	d	-13.2				
β -H	3.99–4.03 ^[c]	m		C- β	68.4	α -H; γ -H	
γ -H	3.99–4.03 ^[c]	m		C- γ	54.1	α -H; 2-H	
	4.35	ddd	7.7; 7.9; -19.6				
a-H	6.88	s		C-a	109.7	α -H; e-H	
				C-b	146.9	g-H; a-H	
				C-c	145.4	g-H; e-H; a-H	
d-H	6.87	d	7.9	C-d	107.9	d-H	
e-H	6.76	d	7.9	C-e	122.2	α -H; a-H	
				C-f	132.5	α -H; a-H	
g-H	6.00	s		C-g	100.5	g-H	

[a] n.d. denotes not detected. [b] Signals were overlapped with solvent signal. [c] Signals of γ -H and β -H were overlapped. [d] Chemical signals of 3-(2-hydroxy-2-phenylethyl)adenine (Krouželka et al., 2008).

1.2.2.4.2 DNA 加成產物 *N*9 γ -SFO-Ade 17 之結構鑑定



圖二十二、DNA 加成產物 *N*9 γ -SFO-Ade 17 之 HMBC (500 MHz, d_6 -DMSO)

光譜圖。

^1H NMR 光譜圖 (附圖二十九) 化學位移 δ 8.10、8.02 和 7.12 分別定為腺嘌呤 **15** 上 2-H、8-H 和 NH_2 的訊號，其中從 HMQC (附圖三十三) 光譜中與 2-H 偶合化學位移為 δ 152.2 的碳定為 C-2，另外從 HMBC (圖二十二) 光譜中與 8-H 有 $^1J_{\text{CH}}$ 偶合化學位移 δ 141.5 的三級碳 (DEPT；附圖三十一) 定為 C-8。

表五、 ^1H and ^{13}C Chemical Shifts (δ), Spin-Spin Coupling Constants, $J_{\text{H,H}}$ (Hz) of Protons, and Long-Range C-H Correlations (HMBC) in *N*9 γ -SFO-Ade **17**.

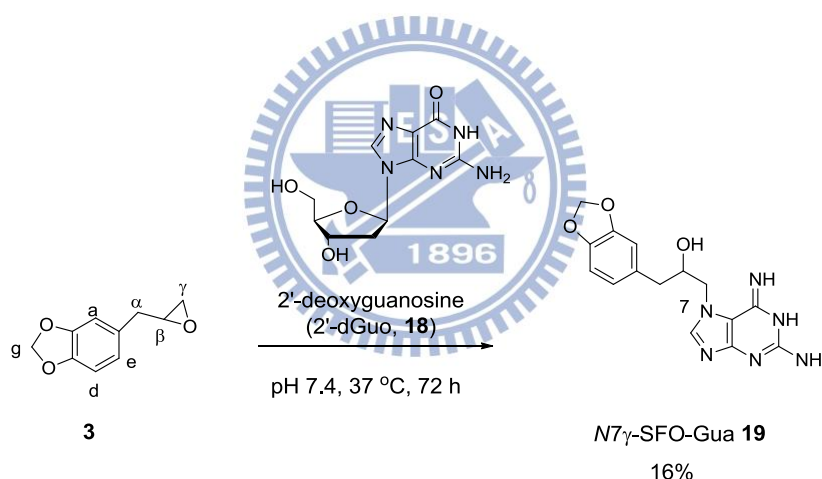
proton	δ (ppm)	multiplicity	$J_{\text{H,H}}$ (Hz)	carbon	δ (ppm)	HMBC correlation(s)	δ (ppm) ^[b]
2-H	8.10	s		C-2	152.2		152.3
8-H	8.02	s		C-8	141.5	γ -H	141.3
NH_2	7.12			C-6	155.8	2-H	155.9
				C-4	149.6	2-H; 8-H; γ -H	149.6
				C-5	118.5	NH_2 ; 8-H	118.5
β -OH	5.12	d	5.5				
α -H	2.57	dd	7.0; 7.3; -13.8	C- α	40.6	e-H; a-H	
	2.67	dd	4.6; 4.9; -13.7				
β -H	4.00–4.02 ^[a]	m		C- β	69.5	α -H; γ -H	
γ -H	3.98	dd	8.2; -13.0	C- γ	48.7	α -H	
	4.15	dd	2.6; 2.7; -13.0				
a-H	6.81	d	1.5	C-a	109.7	α -H; e-H	
				C-b	146.9	g-H; a-H	
				C-c	145.4	g-H; e-H; d-H	
d-H	6.80	d	7.9	C-d	107.9		
e-H	6.68	dd	7.9; 1.5	C-e	122.2	α -H; d-H	
				C-f	132.1	α -H; a-H	
g-H	5.95	s		C-g	100.6	g-H	

[a] Signals of γ -H and β -H were overlapped. [b] Chemical signals of 9-(2-hydroxy-2-phenylethyl)adenine (Krouželka et al., 2008).

腺嘌呤上四級碳 (C-4、C-5 及 C-6) 的化學位移則由 HMBC 光譜圖 $^3J_{\text{CH}}$ 之偶合訊號定出：(1) 化學位移 δ 149.6 的碳與 2-H 和 8-H 之 $^3J_{\text{CH}}$ 偶合而定為 C-4；(2) 化學位移 δ 118.5 的碳與 8-H 和 NH_2 之 $^3J_{\text{CH}}$ 偶合

而定為 C-5；(3) 化學位移 δ 155.8 的碳與 2-H 有 $^3J_{CH}$ 耦合，而且與 8-H 無 $^4J_{CH}$ 的耦合訊號而將其定為 C-6。對於 γ' -H 和 γ'' -H (δ 3.98, δ 4.15) 則由 DEPT、HMQC、HMBC 和 H,H-COSY 光譜圖 (附圖三十二) 定出，因此從 γ' -H 和 γ'' -H 與 C-8 和 C-4 在 HMBC 光譜上的耦合訊號，可以確定此化合物應為 N9 位置 alkylation 的 N9 γ -SFO-Ade (表五)。

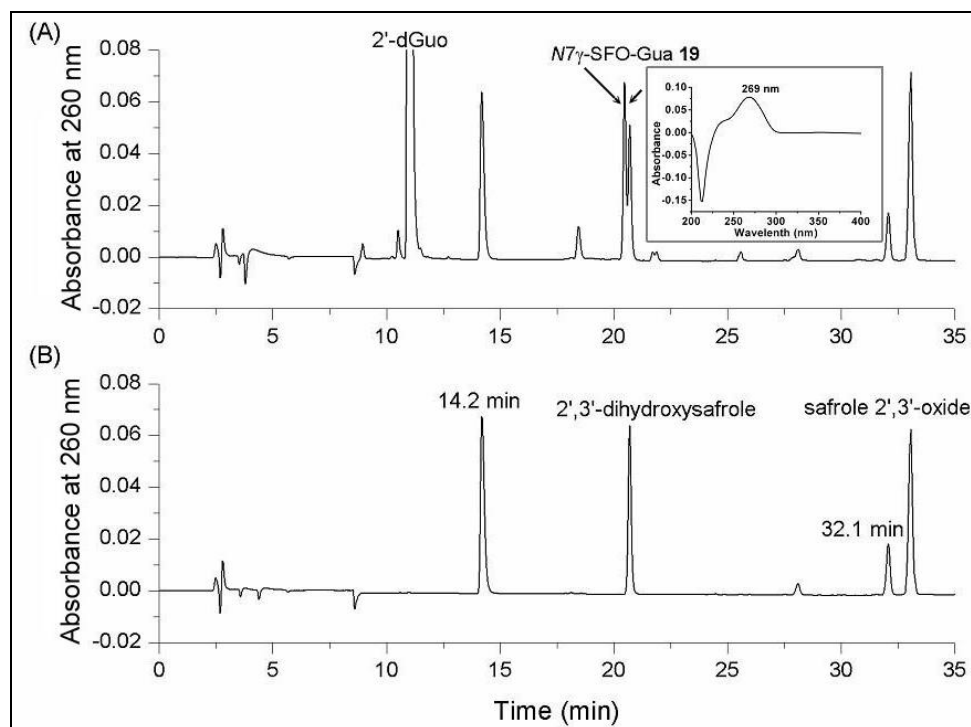
1.2.2.5 黃樟素代謝產物 (±)-SFO 3 與 2'-去氧鳥糞嘌呤 (2'-deoxyguanosine, 2'-dGuo 18) 之反應



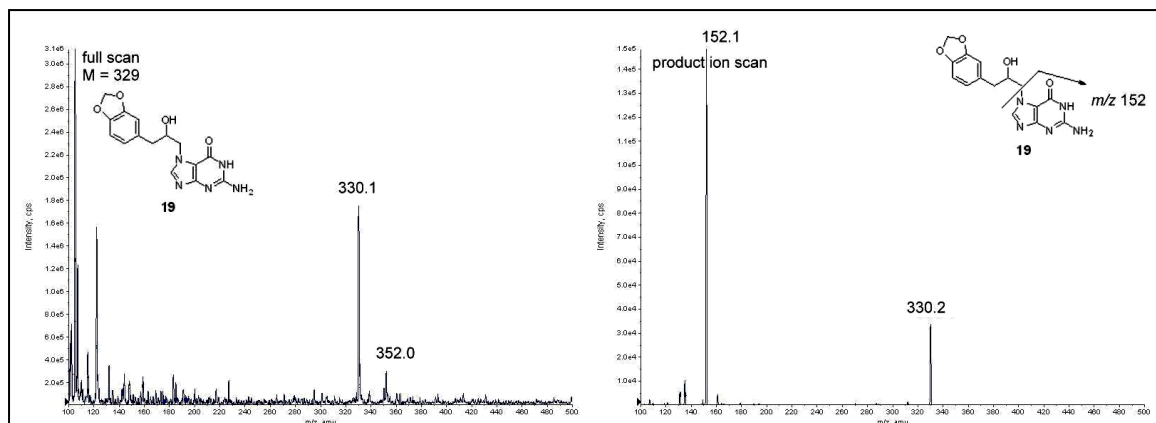
式圖七、2'-去氧鳥糞嘌呤 18 與 (±)-SFO 3 之加成產物 N7 γ -SFO-Gua 19 的合成。

將黃樟素代謝產物 (±)-SFO 3 與 2'-去氧鳥糞嘌呤 18 在生理條件下 (pH 7.4, 37°C) 反應 72 小時 (式圖七)，從高效液相層析圖中 (圖二十三)，觀察到滯留時間 $t_R = 20.5$ min 有一主要新生成之層析峯，將其收集後利用

電噴灑游離方式在正電荷模式下測得其 m/z 330 (圖二十四)，而其 UV 吸收波長 $\lambda_{\max} = 285 \text{ nm}$ ，推測是不含五碳醣之鳥糞嘌呤加成產物，接著將此加成產物收集，並進一步利用核磁共振光譜進行結構鑑定。



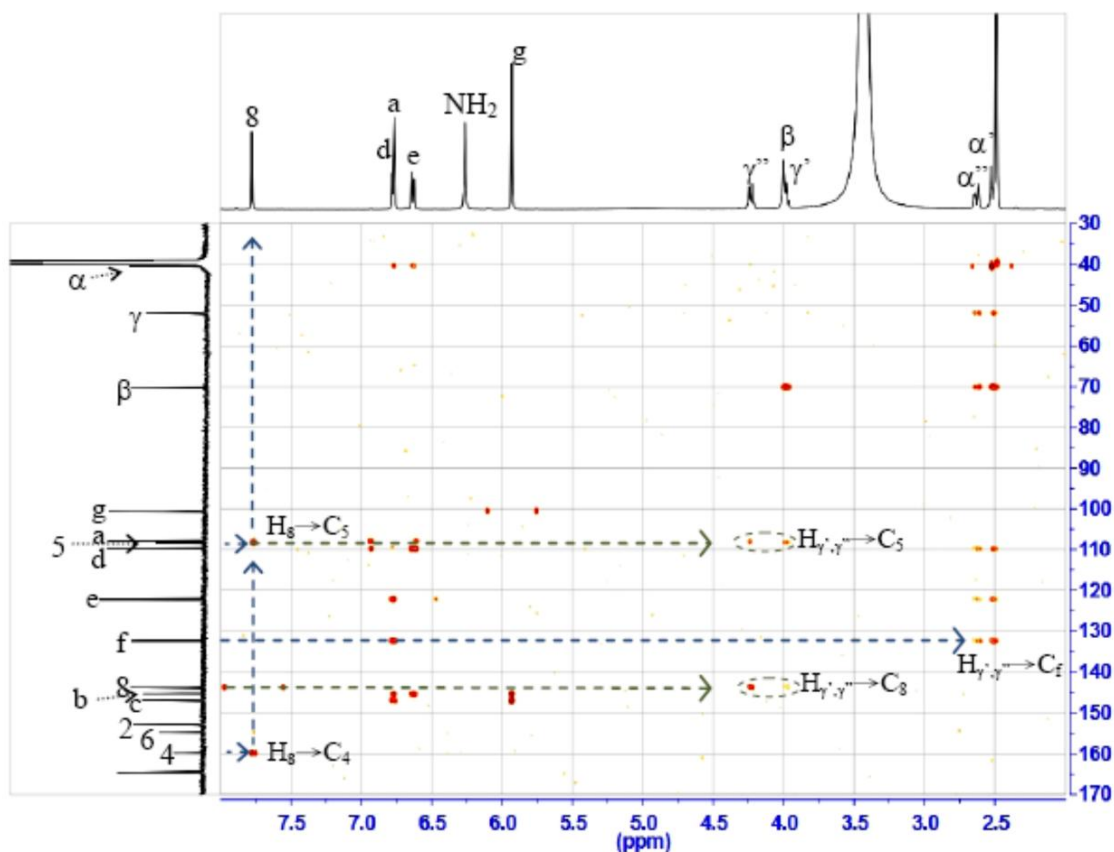
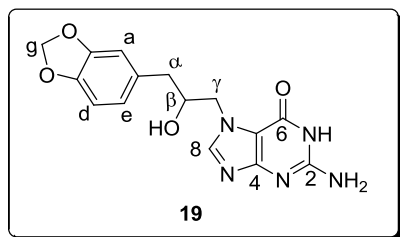
圖二十三、(A) (+)-SFO 3 與 2'-去氧鳥糞嘌呤 18 在 pH 7.4, 37°C 下反應 72 小時與(B) (+)-SFO 3 在 pH 7.4, 37°C 下反應 72 小時之高效液相層析圖譜。



圖二十四、DNA 加成產物 *N7*γ-SFO-Gua **19** 正離子模式下之電噴灑游離質譜圖。

1.2.2.5.1 DNA 加成產物 *N7*γ-SFO-Gua **19** 之結構鑑定

根據文獻上 styrene oxide 的 *N7*-鳥糞嘌呤加成產物之特徵，我們將 *N7*γ-SFO-Gua 的 ^1H NMR 光譜上（附圖三十四）化學位移 δ 6.27 和 δ 7.79 的訊號分別定為 NH_2 和 8-H (Novák et al., 2004)，並且從 HMQC 光譜圖中（附圖三十八）8-H 與 $\delta_{\text{C}} = 148.3$ ppm 之交叉峰定出 C-8 的訊號（附圖三十六之 DEPT 光譜圖）。由圖二十五之 HMBC 光譜圖 $\delta_{\text{C}} = 159.8$ ppm 和 $\delta_{\text{C}} = 108.2$ ppm 與 8-H 之 $^3J_{\text{CH}}$ 耦合訊號，分別定出低磁場區域的 δ 159.8 為相鄰兩個氮原子之 C-4 與高磁場區域 δ 108.2 為相鄰一個氮原子之 C-5。



圖二十五、DNA 加成產物 *N7*γ-SFO-Gua **19** 之 HMBC (500 MHz, *d*₆-DMSO) 光譜圖。

同樣由 HMBC 光譜上 $\delta_{\text{H}} = 2.64$ ppm 和 $\delta_{\text{H}} = 2.52\text{--}2.55$ ppm 與 C-f ($\delta 132.4$, ${}^2J_{\text{CH}}$)、C-a ($\delta 107.9$, ${}^3J_{\text{CH}}$) 及 C-e ($\delta 122.2$, ${}^3J_{\text{CH}}$) 的耦合訊號，知道其分別為化合物 **19** 上 1,3-benzodioxole 基團上的 α' -H 和 α'' -H，因此再由 H,H-COSY 光譜(附圖三十七)中與 α' , α'' -H 的交叉峰可以知道 β -H

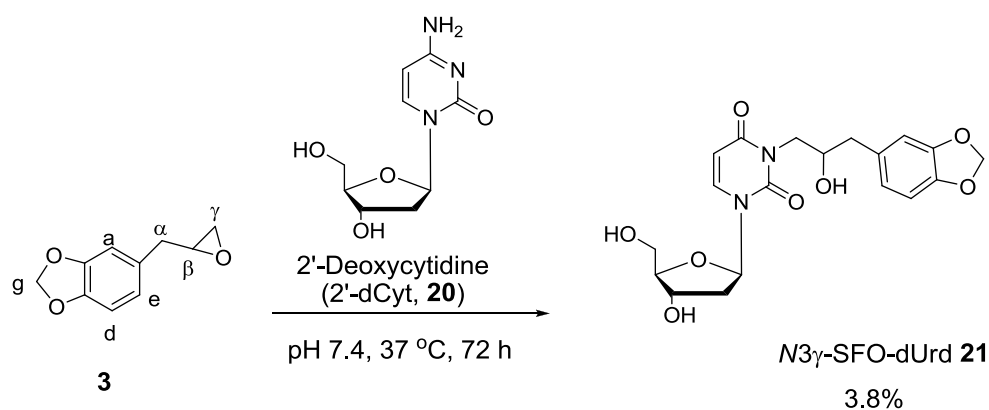
的化學位移在 δ 3.97–4.01；除此之外另一個與 β -H 重疊之 $\delta_{\text{H}} = 3.97\text{--}4.01$ ppm 與 $\delta_{\text{H}} = 4.24$ ppm 則是屬於 γ' -H 與 γ'' -H，並且同時跟二級碳 C- γ (δ 52.0) 在 HMQC 光譜圖中有耦合，最後依據 γ' -H 和 γ'' -H 與鳥糞嘌呤上 C-5 和 C-8 之 $^3J_{\text{CH}}$ 耦合訊號，確定此加成產物為 *N7* γ -SFO-Gua (表六)。

表六、 ^1H and ^{13}C Chemical Shifts (δ), Spin-Spin Coupling Constants, $J_{\text{H,H}}$ (Hz) of Protons, and Long-Range C-H Correlations (HMBC) in *N7* γ -SFO-Gua **19**.

proton	δ (ppm)	multiplicity	$J_{\text{H,H}}$ (Hz)	carbon	δ (ppm)	HMBC
2-NH ₂	6.27	s		2-C	152.8	
8-H	7.79	s		8-C	143.8	8H; γ H
				4-C	159.8	8H
				5-C	108.2	8H; γ H
				6-C	154.8	8-H
β -OH	n.d. ^a					
α -H	3.96 ~ 4.00 ^b	m		α -C	40.36	a-H; e-H
	2.64	dd	2.7; 2.2; 13.8			
β -H	3.97 ~ 4.01 ^c	m		β -C	70.2	γ -H; α -H
γ -H	3.97 ~ 4.01 ^c	m		γ -C	52.0	α -H
	4.24	dd	7.4; 17.6			
a-H	6.79	s		a-C	107.9	a-H; α -H
				b-C	146.9	g-H; a-H; d-H
				c-C	145.4	g-H; e-H; a-H; d-H
d-H	6.78	s		d-C	109.7	d-H
e-H	6.65	d	8.0	e-C	122.2	α -H; a-H
				f-C	132.4	α -H; a-H
g-H	5.94	s		g-C	100.6	g-H

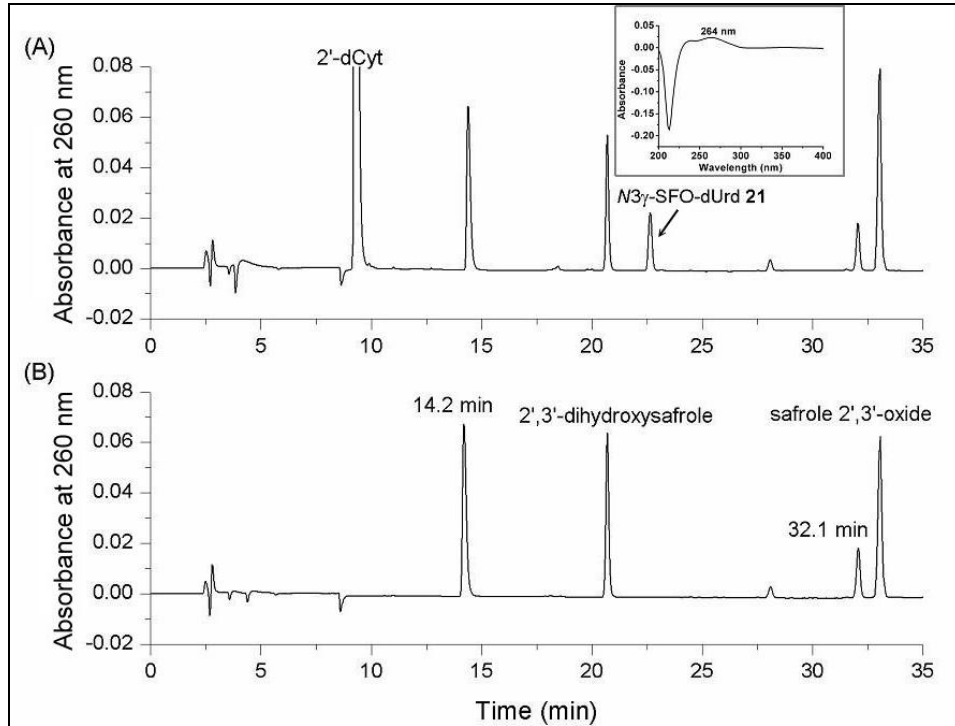
^an.d. denotes not detected. ^bSignals overlapped by solvent. ^cSignals of β -H and γ' -H overlapped.

1.2.2.6 黃樟素代謝產物(±)-SFO 3 與 2'-去氧胞嘧啶 (2'-deoxycytidine, 2'-dCyt 20) 之反應

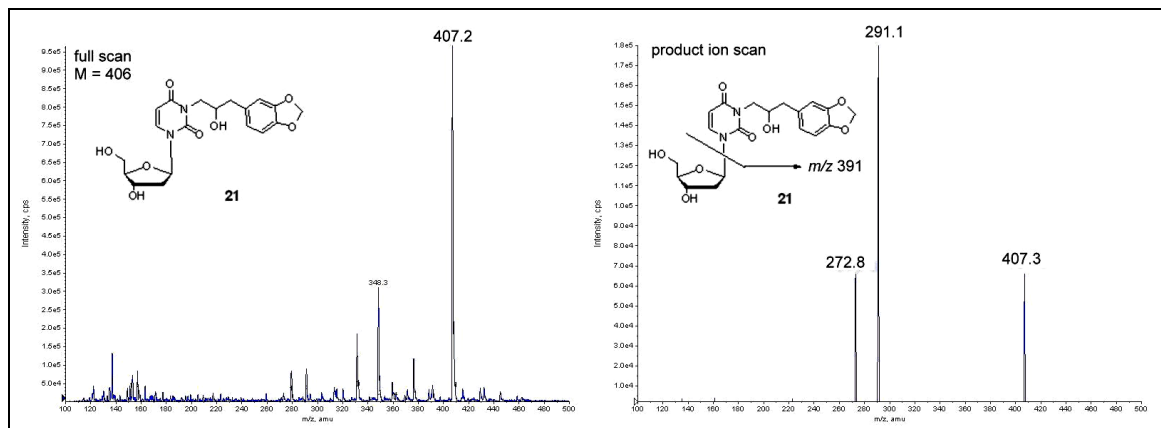


式圖八、2'-去氧胞嘧啶 **20** 與(±)-SFO **3** 之加成產物 *N*3γ-SFO-dUrd **21** 的合成。

將黃樟素代謝產物(±)-SFO **3** 與 2'-去氧胞嘧啶 **20** 在生理條件下(pH 7.4, 37°C)反應 72 小時 (式圖八)，從高效液相層析圖中(圖二十六)，觀察到滯留時間 $t_R = 22.5$ min 有一主要新生成之層析峯，將其收集後利用電噴灑游離法鑑定其分子量。得到 *N*3γ-SFO-dUrd **21** 之質荷比為: m/z 407 ($[M + H]^+$), 291($[M - 2\text{'-deoxyribose} + H]^+$) (圖二十七)，可以確定此化合物 **21** 為接上 (±)-**3** 之後的 DNA 加成產物，因此我們利用高效液相層析儀分離上述產物並收集樣品進行核磁共振結構鑑定。



圖二十六、(A) (±)-SFO 3 與 2'-去氧胞嘧啶 20 在 pH 7.4, 37 °C 下反應 72 小時與 (B) (±)-SFO 3 在 pH 7.4, 37 °C 下反應 72 小時之高效液相層析圖譜。



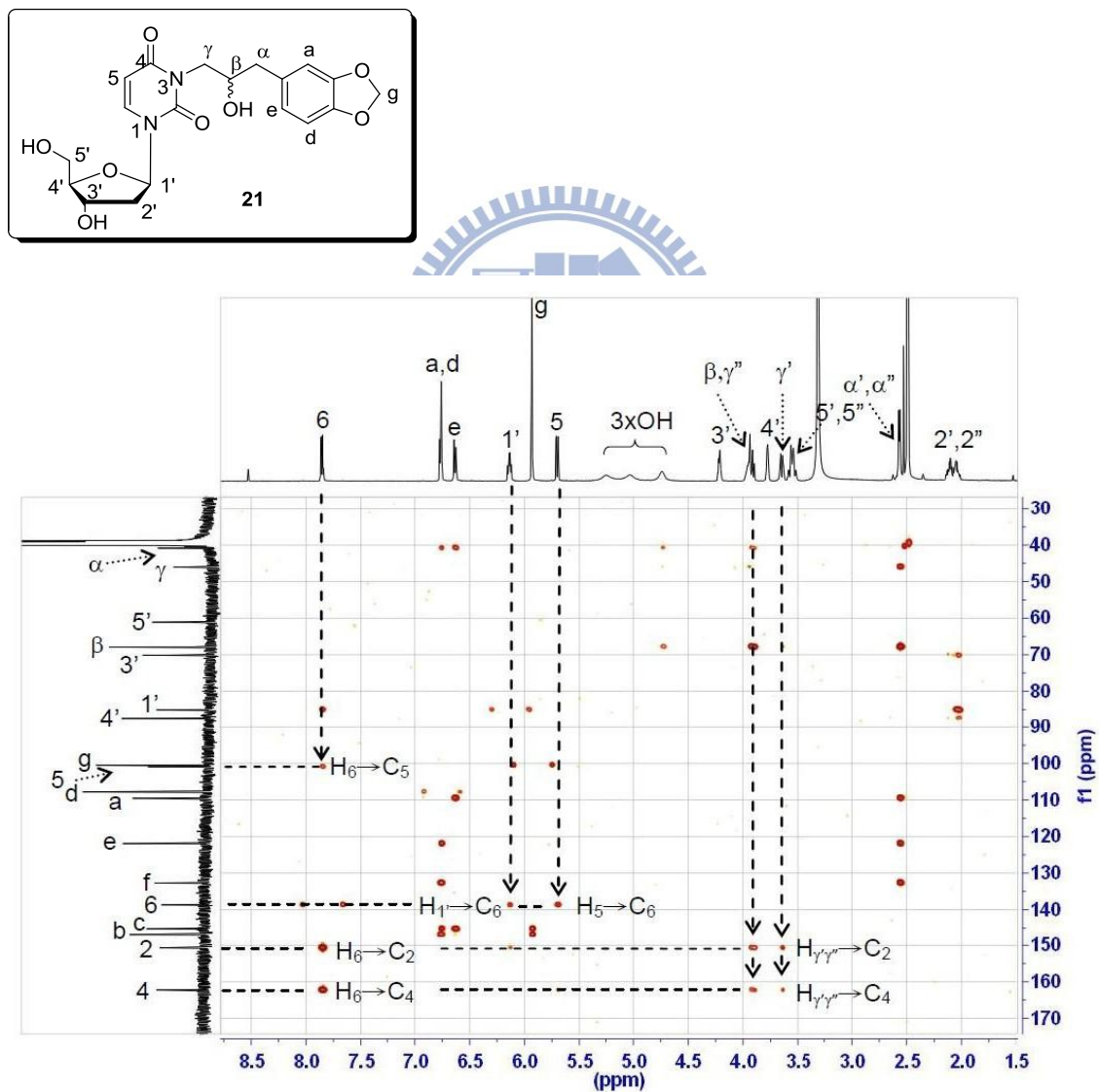
圖二十七、DNA 加成產物 $N3\gamma$ -SFO-dUrd 21 正離子模式下之電噴灑游離質譜圖。

1.2.2.6.1 DNA 加成產物 *N*3 γ -SFO-dUrd **21** 之結構鑑定

過去文獻上即有報導，環氧代謝產物 propylene oxide (Solomon et al., 1988)、ethylene oxide (Li et al., 1992)、butadiene oxide (Selzer and Elfarra, 1997) 和 styrene oxide (Barlow and Dipple, 1999) 與 2'-去氧胞嘧啶反應，主要會先形成 *N*3-取代 2'-去氧胞嘧啶加成產物，接著進行去氨基化反應形成首先 *N*3-取代的 2'-去氧尿嘧啶。由於 ¹H NMR 光譜(附圖三十九)上並沒有積分值為 2 且單峰 (singlet) 的 NH₂ 訊號，從文獻上可以知道應該是得到 *N*3-取代的 2'-去氧胞嘧啶 DNA 加成產物，並進行去氨基化最後形成 *N*3-取代的 2'-去氧尿嘧啶(2'-deoxyuridine, dUrd) DNA 加成產物 *N*3 γ -SFO-dUrd **21** (Koskinen et al., 2000a)。

DNA 加成產物 **21** 為非鏡相異構物混合物，因此 ¹³C NMR 光譜可以看到多組碳的化學位移分裂為兩組。首先此加成產物 **21** 的 2-deoxyribose 上氫的化學位移先由前面已鑑定的加成產物 **11** 確認 $\delta_{\text{H}} = 6.18\text{-}6.21$ ppm 與 $\delta_{\text{C}} = 85.08; 85.14$ ppm 的二根訊號分別為 1'-H 與 C-1'，接著由 H,H-COSY (附圖四十二) 從與 1'-H 的相關交叉峰開始依序定出 2'-H (δ 2.07-2.22)、3'-H (δ 4.26-4.29)、4'-H (δ 3.83-3.84) 和 5'-H (δ 3.57-3.65) 的訊號。接著從 DEPT (附圖四十一)、HMQC (附圖四十三) 和 H,H-COSY (附圖四十二) 光譜互相偶合的訊號可以定出氫的化學位移 $\delta_{\text{H}} = 5.75; 5.76$ ppm 與 $\delta_{\text{H}} = 7.91; 7.92$ ppm 以及碳的化學位移 $\delta_{\text{C}} = 100.9$

ppm 與 $\delta_c = 138.68; 138.74$ ppm 分別為尿嘧啶 (uridine) 上的 5-H 與 6-H 以及 C-5 與 C-6；其中 6-H 的訊號主要經由其與 2-deoxyribose 上的 1'-H 有 $^3J_{CH}$ 耦合而 5-H 沒有耦合確認。值得注意的此非鏡相異構物混合物大部分氫譜的訊號都重疊在一起，但是尿嘧啶上的 5-H 與 6-H 則是分裂為強度 1:1 的兩組雙峰 (doublet)。



圖二十八、DNA 加成產物 $N3\gamma$ -SFO-dUrd **21** 之 HMBC (500 MHz, d_6 -DMSO) 光譜圖。

表七、 ^1H and ^{13}C Chemical Shifts (δ), Spin-Spin Coupling Constants, $J_{\text{H,H}}$ (Hz) of Protons, and Long-Range C-H Correlations (HMBC) in *N*3 γ -SFO-dUrd **21**.

proton ^[a]	δ (ppm)	multiplicity	$J_{\text{H,H}}$ (Hz)	carbon	δ (ppm)	HMBC Correlation(s)
				C-2	150.71;150.73	6-H; α -H
				C-4	162.21;162.23	6-H; α -H
5-H ^[d]	5.75; 5.76	d	$J = 8.1$ Hz	C-5	100.9	6-H
6-H ^[d]	7.91; 7.92	d	$J = 8.1$ Hz	C-6	138.68;138.74	1-H; 5-H; 6-H
1'-H	6.18-6.21	m ^[b]		C-1'	85.08; 85.14 ^[d]	2'-H; 1'-H; 6-H
2',2''-H	2.07-2.22	m		C-2'	40.4	
3'-H	4.26-4.29	m		C-3'	70.13; 70.19 ^[d]	2'-H
4'-H	3.83-3.84	m		C-4'	87.4	2'-H
5', 5''-H	3.57-3.65	m		C-5'	61.11; 61.13 ^[d]	
OH	4.80					
OH	5.09					
OH	5.30					
α -H	2.62-2.63	m		C- α	40.84; 40.90 ^[d]	a-H; e-H; d-H
β -H	3.95-4.04 ^[c]	m		C- β	67.9	γ -H; α -H
γ' -H	3.69-3.72	m		C- γ	46.01;46.07 ^[d]	α -H
γ'' -H	3.95-4.04 ^[c]	m				
a-H	6.83	d	1.5	C-a	109.53;109.56 ^[d]	α -H; e-H
				C-b	146.8	g-H; a-H
				C-c	145.3	g-H; e-H; a-H
d-H	6.81-6.82	m ^[b]		C-d	107.8	d-H
e-H	6.69	d		C-e	121.93;121.95 ^[d]	α -H; a-H
				C-f	132.67;132.71 ^[d]	α -H; a-H
g-H	5.99	s		C-g	100.5	g-H

[a] Diastereomeric mixture of racemic *N*3 γ -SFO-dUrd **21**. [b] Unresolved multiplet due to a mixture of diastereomers. [c] Signals of β -H and γ'' -H were overlapped. [d] Two sets of signals due to a mixture of diastereomers.

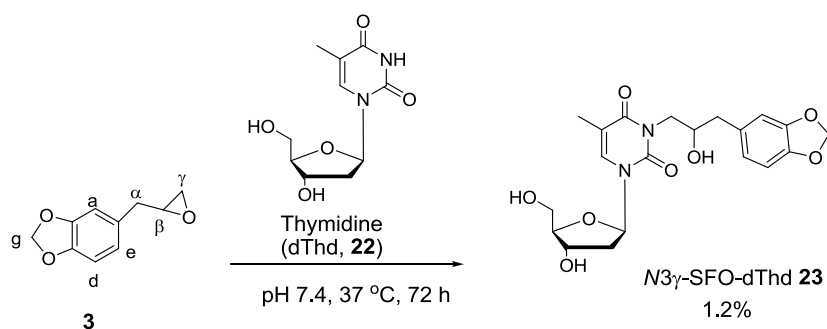
加成產物 **21** 上的 1,3-benzodioxole 基團上 β -H 的化學位移在 δ 3.95-4.04 ppm 則是由 HMQC 光譜與三級碳 C- β (δ 67.9) 的耦合定出，同時在 H,H-COSY 的光譜也出現了與 β -H 相鄰之 γ' -H (δ 3.69-3.72); γ'' -H (δ 3.95-4.04) 與 α -H (δ 2.62-2.63) 相關之交叉峰；而 α -H 的訊號可以再進一步藉由其在 HMBC 光譜中與 C-a (δ 109.53; 109.56)、C-e (δ 121.93; 121.95) 和 C-f (δ 132.67; 132.71) 有耦合的訊號可以確定。因此最後我們

可以藉由 HMBC 光譜上 C-2 和 C-4 與 γ' -H 和 γ'' -H 確認加成產物 **21** 為 2'-去氧尿嘧啶上 N3 位置 alkylation 的 N3 γ -SFO-dUrd **21** (圖二十八和表七)。

文獻上報導經由乙烯代謝產物 ethylene oxide 所形成的 N3-取代 2'-去氧胞嘧啶 DNA 加成產物，可以進行自發性的去氨基化的 N3-取代的 2'-去氧尿嘧啶 (2'-deoxyuridine, dUrd) 具有重要的生物意義 (Li et al., 1992; Solomon et al., 1988)。而由 propylene oxide 所形成的 N3-(2-hydroxypropyl)uracil 的 2'-去氧尿嘧啶 DNA 加成產物則具有致癌性的傷害 (Snow et al., 1994)，因為 2'-去氧胞嘧啶的 N3 是主要參與氫鍵作用的位置，因此在複製之前沒有被修復就會導致 GC→AT transitions 或者 GC→TA 和 GC→CG transversions (Zhang et al., 1995)，而最近的研究發現，從哺乳動物細胞 (mammalian cells) 萃取出來的修復酵素並不是 uracil glycosylase 的受質，因此可以移除 N3-(2-hydroxypropyl)cytosine 的 DNA 加成產物但是卻無法移除去氨基化的 uracil 加成產物 (Plna et al., 1999)。

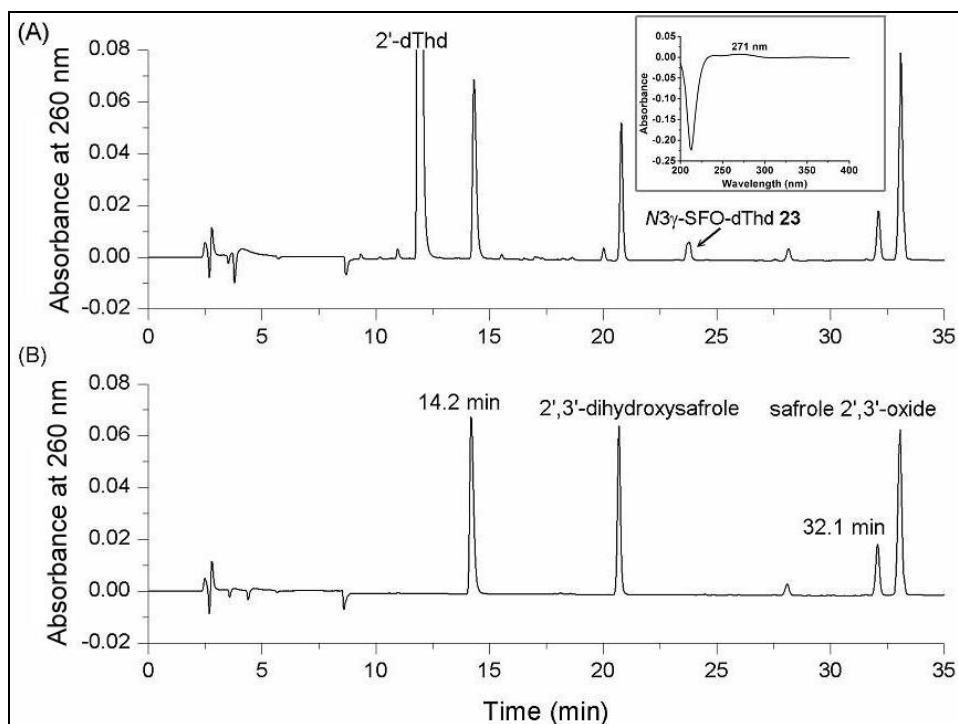
1.2.2.7 黃樟素代謝產物 (±)-SFO 3 與胸腺嘧啶 (Thymidine, 2'-dThd 22)

之反應

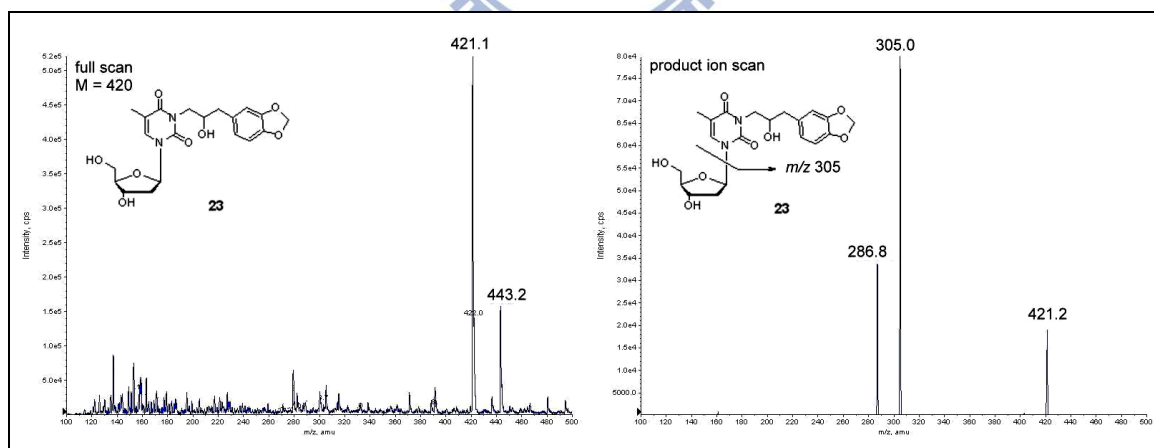


式圖九、胸腺嘧啶 **22** 與(±)-SFO **3** 之加成產物 *N*3γ-SFO-dThd **23** 的合成。

將黃樟素代謝產物 (±)-SFO **3** 與胸腺嘧啶 **22** 在生理條件下 (pH 7.4, 37°C) 反應 72 小時 (式圖八)，從高效液相層析圖中 (圖二十九)，觀察到滯留時間 $t_R = 23.6$ min 有一主要新生成之層析峯，將其收集後利用電噴灑游離法鑑定其分子量，得到 *N*3γ-SFO-Thd **23** 之質荷比為: m/z 421 ($[M + H]^+$) 和 305 ($[M - 2'$ -deoxyribose + $H]^+$) (圖三十)，可以確定此化合物 **23** 為接上 (±)-**3** 之後的 DNA 加成產物，因此我們利用高效液相層析儀分離上述產物並收集樣品進行核磁共振結構鑑定。



圖二十九、(A) (\pm) -SFO 3 與胸腺嘧啶 22 在 pH 7.4, 37°C 下反應 72 小時與
(B) (\pm) -SFO 3 在 pH 7.4, 37°C 下反應 72 小時之高效液相層析圖譜。



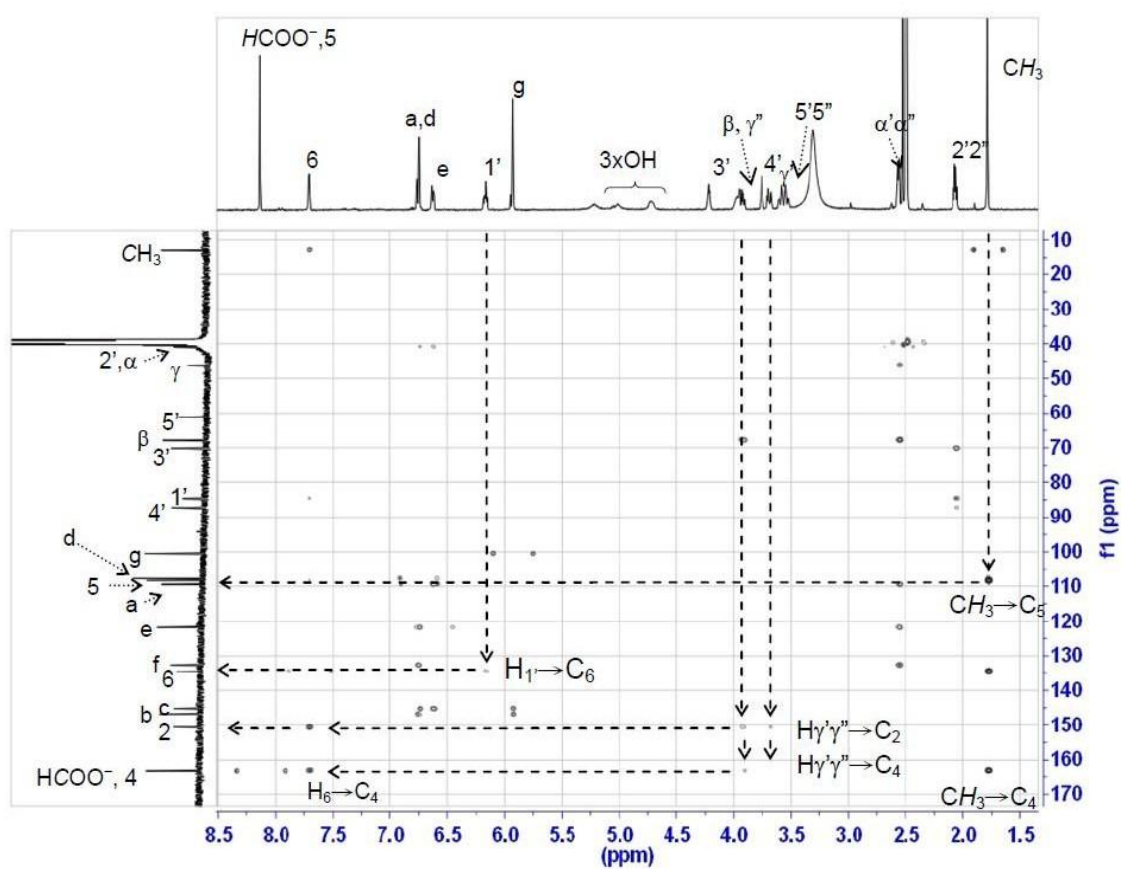
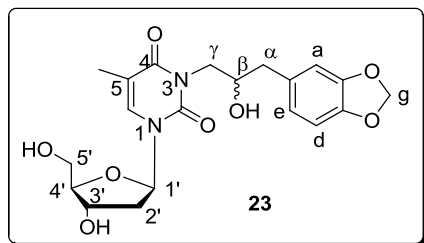
圖三十、加成產物 $N3\gamma$ -SFO-Thd 23 正離子模式下之電噴灑游離質譜圖。

1.2.2.7.1 DNA 加成產物 N3 γ -SFO-dThd **23** 之結構鑑定

DNA 加成產物 **23** 為非鏡相異構物混合物，因此 ^{13}C NMR 光譜可以看到多組碳的化學位移分裂為兩組。首先此加成產物 **23** 的 2-deoxyribose 上氫的化學位移先由前面已鑑定的加成產物 **11** 確認 $\delta_{\text{H}} = 6.15\text{--}6.19$ ppm 與 $\delta_{\text{C}} = 84.63; 84.73$ ppm 分別為 1'-H，接著由 H,H-COSY (附圖四十七) 從與 1'-H 的相關交叉峰開始依序定出 2'-H (δ 2.08–2.24)、3'-H (δ 4.21–4.24)、4'-H (δ 3.75–3.77) 和 5'-H (δ 3.52–3.60) 的訊號。接著從 DEPT (附圖四十六) 和 HMQC (附圖四十八) 光譜互相耦合的訊號可以定出兩根單峰的氫：化學位移分別為 $\delta_{\text{H}} = 1.79$ ppm； $\delta_{\text{C}} = 12.9$ ppm 與 $\delta_{\text{H}} = 7.71$ ppm； $\delta_{\text{C}} = 134.48; 134.53$ ppm 為胸嘧啶 (thymidine) 上的 CH_3 與 6-H；其中 6-H 的訊號主要經由其與 2-deoxyribose 上的 1'-H 有 $^3J_{\text{CH}}$ 耦合可以確認。

加成產物 **23** 上的 1,3-benzodioxole 基團上 β -H 的化學位移在 δ 3.90–3.98 ppm 則是由 HMQC 光譜與三級碳 C- β (δ 67.9) 的耦合定出，同時在 H,H-COSY 的光譜也出現了與 β -H 相鄰之 γ' -H (δ 3.67–3.71)； γ'' -H (δ 3.90–3.98) 與 α -H (δ 2.56–2.57) 相關之交叉峰；而 α -H 的訊號可以再進一步藉由其在 HMBC 光譜中與 C-a (δ 109.46; 109.49)、C-e (δ 121.86; 121.88) 和 C-f (δ 132.62; 132.67) 有耦合的訊號可以確定。因此最後我們可以藉由 HMBC 光譜上 C-2 和 C-4 與 γ' -H 和 γ'' -H 確認加成產物 **23**

為胸腺嘧啶上 $N3$ 位置 alkylation 的 $N3\gamma$ -SFO-Thd **23** (圖三十一和表八)。



圖三十一、DNA 加成產物 $N3\gamma$ -SFO-Thd **23** 之 HMBC (500 MHz, d_6 -DMSO)

光譜圖。

表八、 ^1H and ^{13}C Chemical Shifts (δ), Spin-Spin Coupling Constants, $J_{\text{H,H}}$ (Hz) of Protons, and Long-Range C-H Correlations (HMBC) in ***N3*** γ -SFO-dThd **23**.

proton ^[a]	δ (ppm)	multiplicity	$J_{\text{H,H}}$ (Hz)	carbon	δ (ppm)	HMBC Correlation(s)
CH_3	1.79	s		CH_3	12.9	6-H; CH_3
				C-2	150.61;150.64 ^[d]	6-H; γ -H
				C-4	162.91;162.93 ^[d]	6-H; γ -H
				C-5	108.4	CH_3
6-H	7.71	s		C-6	134.48;134.53 ^[d]	1-H; 6-H
1'-H	6.15-6.19	m ^[b]		C-1'	84.63; 84.73 ^[d]	2'-H
2',2''-H	2.08-2.24	m		C-2'	40.4	
3'-H	4.21-4.24	m		C-3'	70.15; 70.21 ^[d]	2'-H
4'-H	3.75-3.77	m		C-4'	87.3	2'-H
5', 5''-H	3.52-3.60	m		C-5'	61.2	
OH	4.72					
OH	5.01					
OH	5.23					
α -H	2.56-2.57	m		C- α	40.90; 40.96 ^[d]	e-H; d-H
β -H	3.90-3.98 ^[c]	m		C- β	67.9	γ -H; α -H
γ' -H	3.67-3.71	m		C- γ	46.24;46.30 ^[d]	α -H
γ'' -H	3.90-3.98 ^[c]	m				
a-H	6.76-6.77	m		C-a	109.46;109.49 ^[d]	α -H; e-H
				C-b	146.8	g-H; a-H
				C-c	145.20;145.22	g-H; e-H; a-H
d-H	6.74-6.75	m ^[b]		C-d	107.8	d-H
e-H	6.61-6.62	m		C-e	121.86;121.88 ^[d]	α -H; e-H
	6.63-6.64	m				
				C-f	132.62;132.67 ^[d]	α -H; a-H
g-H	5.93	s		C-g	100.5	g-H
HCOO^-	8.12	s		HCOO^-	163.1	

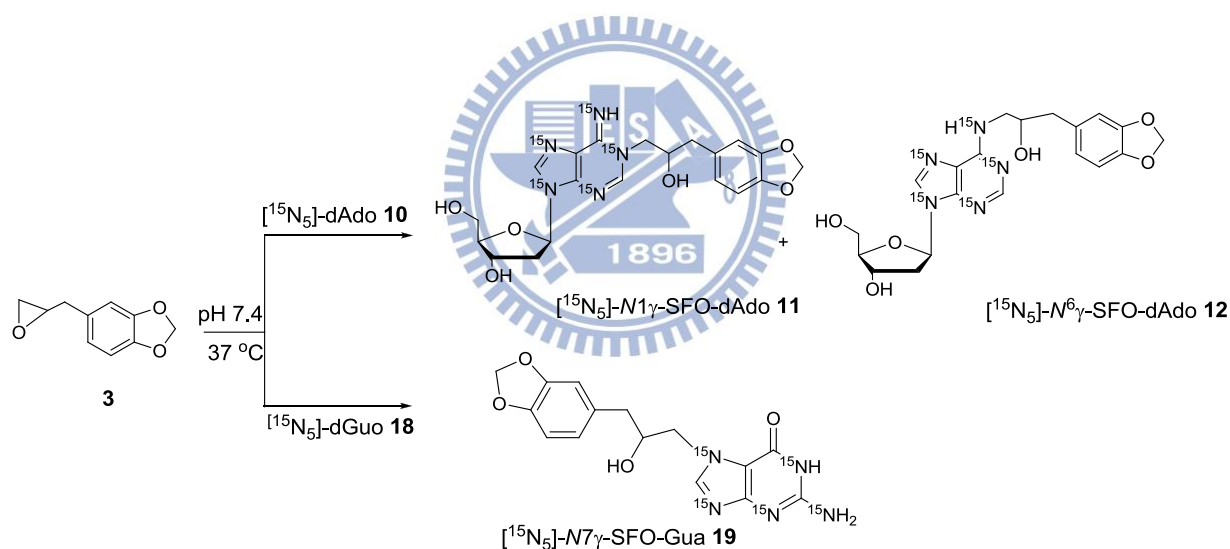
[a] Diastereomeric mixture of racemic *N3* γ -SFO-Thd **23**. [b] Unresolved multiplet due to a mixture of diastereomers. [c] Signals of β -H and γ'' -H were overlapped. [d] Two sets of signals due to a mixture of diastereomers.

1.2.2.8 利用穩定同位素稀釋高效液相層析電噴灑游離串聯質譜法定量黃樟素代謝產物 SFO 3 之 DNA 加成產物體外與體內的生成量

N3-、*N1*-/*N6*-取代之腺嘌呤加成產物與 *N7*-取代之鳥糞嘌呤加成產物是環氧代謝產物與雙股螺旋 DNA 反應生成量較多之 DNA 加成產物 (表

一)，同時在動物實驗研究也是最先被分析的 DNA 加成產物，因此我們把加成產物 $N1\gamma$ -SFO-dAdo **11**、 $N^6\gamma$ -SFO-dAdo **12**、 $N3\gamma$ -SFO-dAdo **16** 與 $N7\gamma$ -SFO-Gua **19** 當成生物指標，利用穩定同位素稀釋高效液相層析電噴灑游離串聯質譜法分析黃樟素代謝產物 SFO **3** 之 DNA 加成產物體內與體外的生成量。

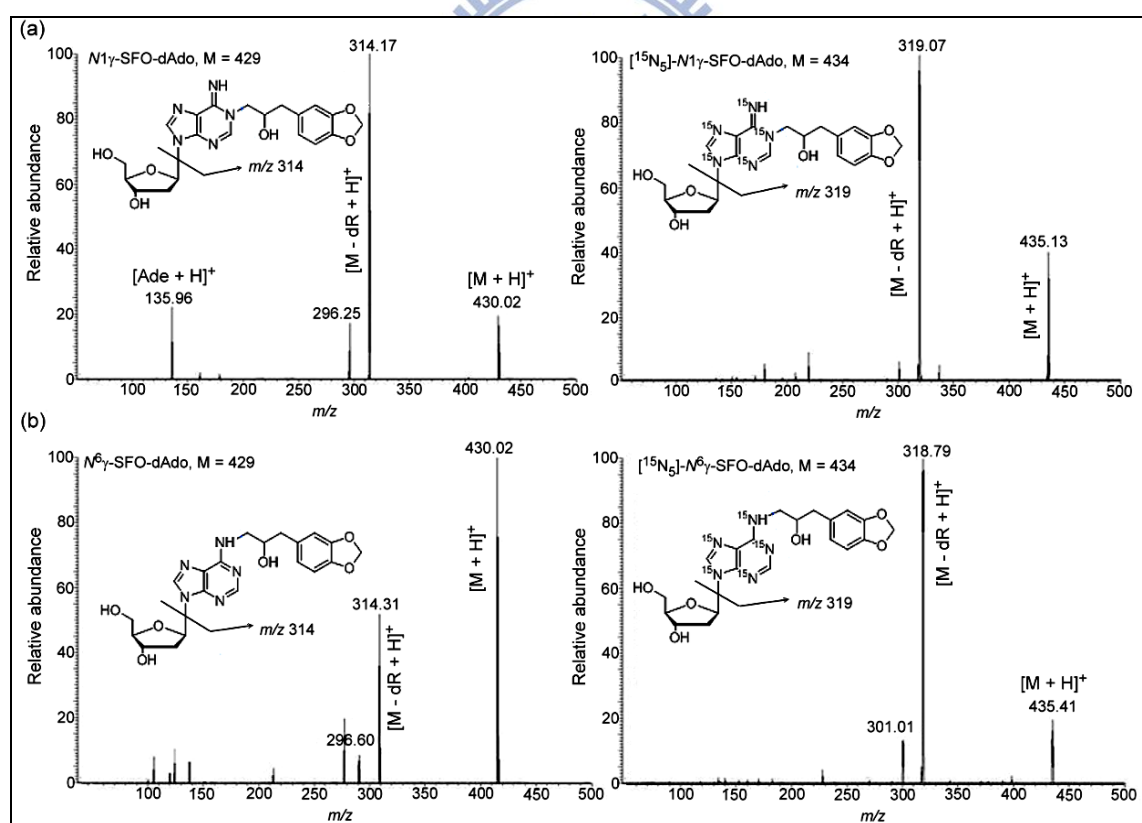
1.2.2.8.1 合成同位素標定之內標準品 $[^{15}\text{N}_5]$ - $N1\gamma$ -SFO-dAdo **11**、 $[^{15}\text{N}_5]$ - $N^6\gamma$ -SFO-dAdo **12** 和 $[^{15}\text{N}_5]$ - $N7\gamma$ -SFO-Gua **19**



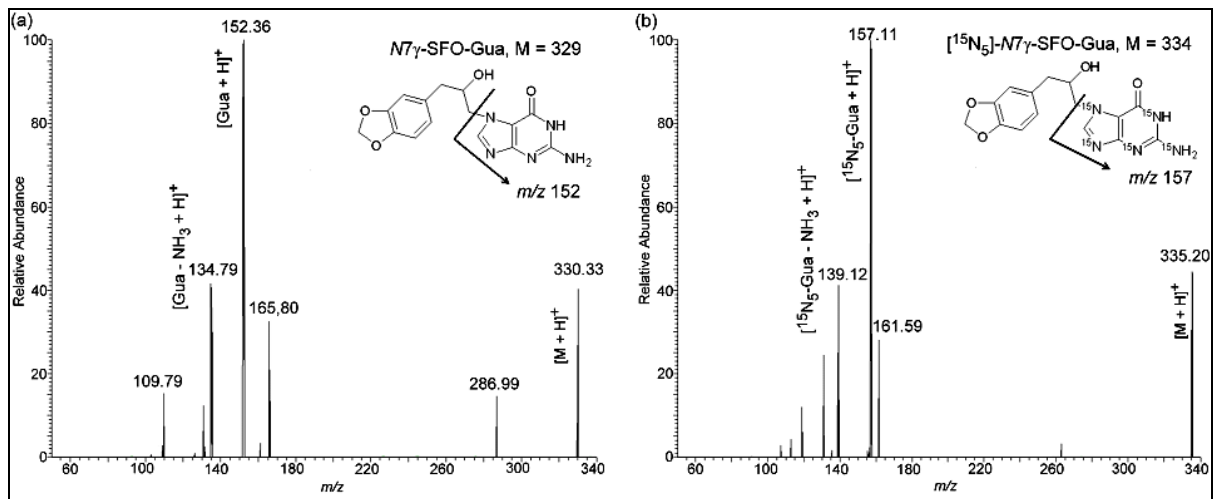
式圖十、穩定同位素標定之內標準品 $[^{15}\text{N}_5]$ - $N1\gamma$ -SFO-dAdo **11**、 $[^{15}\text{N}_5]$ - $N^6\gamma$ -SFO-dAdo **12** 和 $[^{15}\text{N}_5]$ - $N7\gamma$ -SFO-Gua **19** 的合成。

為發展穩定同位素稀釋高效液相層析電噴灑游離串聯質譜法我們將黃樟素代謝產物 **3** 分別與市售同位素標定之 $[^{15}\text{N}_5]$ -2'-去氧腺嘌呤

($[^{15}\text{N}_5]$ -2'-dAdo **10**)與 $[^{15}\text{N}_5]$ -2'-去氧鳥糞嘌呤($[^{15}\text{N}_5]$ -2'-dGuo **18**) 在生理條件下 (pH 7.4, 37 °C)反應 72 小時,並利用上述之純化方法得到與上述結構相同之 ^{15}N 同位素標定之 DNA 加成產物,包括: $[^{15}\text{N}_5]$ -N1 γ -SFO-dAdo **11**、 $[^{15}\text{N}_5]$ -N⁶ γ -SFO-dAdo **12** 和 $[^{15}\text{N}_5]$ -N7 γ -SFO-Gua **19**,且利用質譜子離子掃描 (product ion scan) 鑑定其分子量 (圖三十二與圖三十三),作為定量體內與體外 SFO-DNA 加成產物之生成量之內標準品。值得注意的是,因為 N9 γ -SFO-Ade **17** 在體內並不會生成,因此可以當成分析 N3 γ -SFO-Ade **16** 的内標準品。



圖三十二、(a)N1 γ -SFO-dAdo **11** (430→314) 與 $[^{15}\text{N}_5]$ -N1 γ -SFO-dAdo **11** (435→319) 和 (b) N⁶ γ -SFO-dAdo **12** (430→314) 與 $[^{15}\text{N}_5]$ -N⁶ γ -SFO-dAdo **12** (435→319) 正離子模式下之子離子掃描質譜圖。



圖三十三、 $N7\gamma$ -SFO-Gua **19** (330→152) 與 $[^{15}\text{N}_5]$ - $N7\gamma$ -SFO-Gua **19** (335→157) 正離子模式下之子離子掃瞄質譜圖。

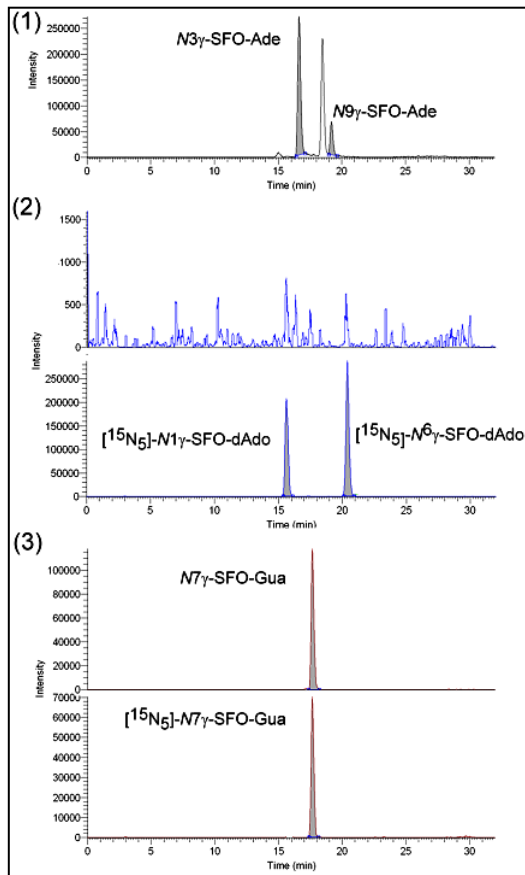
1.2.2.8.2 利用同位素稀釋高效液相層析電噴灑游離串聯質譜 (HPLC-ESI-MS/MS) 儀定量(±)-SFO **3** 與小牛胸腺 DNA (Calf thymus DNA) 反應之 DNA 加成產物

由於文獻上報導 $N3$ -腺嘌呤與 $N7$ -鳥糞嘌呤為熱不穩定之 DNA 加成產物 (Goggin et al., 2009)，因此我們將小牛胸腺 DNA 與 SFO **3** 反應後，以兩種不同處理方式，包括：(1) 不進行水解，直接分析反應液 (圖三十四 A) 即可得到熱不穩定之自發性去嘌呤 DNA 加成產物，以及 (2) 利用中性加熱水解結合酵素水解(圖三十四 B) 之處理方式，得到所有生成之 DNA 加成產物，再分別利用利用穩定同位素稀釋高效液相層析電噴灑游離串聯質譜法並結合多重反應監測模式 (multiple reaction monitoring, MRM) 分析。設定：(1) 標準品 $N1\gamma$ -SFO-dAdo **11** (430→314) 內標準品

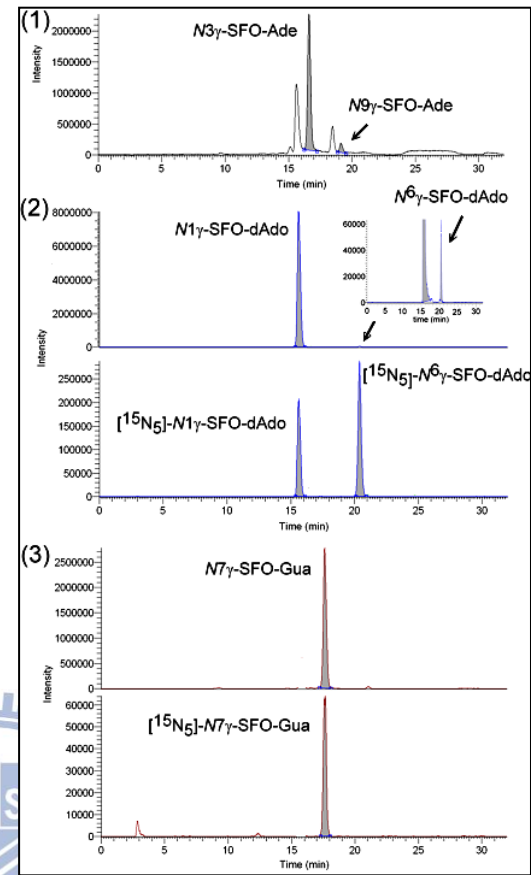
[¹⁵N₅]-N1γ-SFO-dAdo **11** (435→319) ; (2) 標準品 N⁶γ-SFO-dAdo **12** (430→314) 內標準品 [¹⁵N₅]-N⁶γ-SFO-dAdo **12** (435→319) ; (3) 標準品 N3γ-SFO-Ade **16** (314→136) 與內標準品 N9γ-SFO-Ade **17** (314→136) ; (4) N7γ-SFO-Gua **19** (330→ 152) 與內標準品 [¹⁵N₅]-N7γ-SFO-Gua **19** (335→157) , 分析小牛胸腺 DNA 加成產物的量。

從實驗結果得知，不進行水解的反應液中只分析到 N3γ-SFO-Ade **16** (圖三十四 A-(1)) 與 N7γ-SFO-Gua **19** (圖三十四 A-(3))，而無任何 N1γ-SFO-dAdo **11** 與 N⁶γ-SFO-dAdo **12** 的加成產物(圖三十四 A-(2))，而可以知道 N3γ-SFO-Ade **16** 與 N7γ-SFO-Gua **19** 為糖苷鍵不穩定 (glycosidic bond labile) 之 DNA 加成產物。為量測小牛胸腺 DNA 上所有 DNA 加成產物的量，我們先將反應液進行中性加熱水解，將熱不穩定之 DNA 加成產物 N3γ-SFO-Ade **16** (圖三十四 B-(1)) 與 N7γ-SFO-Gua **19** (圖三十四 B-(3)) 從 DNA 骨架上水解下來，再進行酵素水解之處理方式，得到穩定之 DNA 加成產物 N1γ-SFO-dAdo **11** 與 N⁶γ-SFO-dAdo **12** (圖三十四 B-(2))，並且得到每 10⁶ 個核苷酸中會有 N1γ-SFO-dAdo **11**、N⁶γ-SFO-dAdo **12**、N3γ-SFO-Ade **16** 及 N7γ-SFO-Gua **19** 分別為 2000、170、660 及 2670 個之加成產物生成(表九)。

(A)



(B)



圖三十四、小牛胸腺 DNA 與 SFO 3 反應之高效液相層析電噴灑游離串聯質譜圖。(A)小牛胸腺 DNA 與 SFO 3 不進行水解的反應液：(1)熱不穩定的自發性去嘌呤 DNA 加成產物 $N3\gamma$ -SFO-Ade 16 與內標準品 $N9\gamma$ -SFO-Ade 17，(2)除了內標準品 $[^{15}N_5]$ - $N1\gamma$ -SFO-dAdo 11 和 $[^{15}N_5]$ - $N6\gamma$ -SFO-dAdo 12 的訊號，並無偵測到 DNA 加成產物 $N1\gamma$ -SFO-dAdo 11 和 $N6\gamma$ -SFO-dAdo 12，(3)熱不穩定之自發性去嘌呤 DNA 加成產物 $N7\gamma$ -SFO-Gua 19 及內標準品 $[^{15}N_5]$ - $N7\gamma$ -SFO-Gua 19；(B)小牛胸腺 DNA 與 SFO 3 反應液，利用中性加熱水解（反應液於 $70^\circ C$ 加熱一小時）結合酵素水解：(1)熱不穩定的自發性去嘌呤 DNA 加成產物 $N3\gamma$ -SFO-Ade 16 與內標準品 $N9\gamma$ -SFO-Ade 17，(2)DNA 加成產物 $N1\gamma$ -SFO-dAdo 11 和 $N6\gamma$ -SFO-dAdo 12，與 $[^{15}N_5]$ - $N1\gamma$ -SFO-dAdo 11 和 $[^{15}N_5]$ - $N6\gamma$ -SFO-dAdo 12，(3)熱不穩定之自發性去嘌呤 DNA 加成產物 $N7\gamma$ -SFO-Gua 19 及內標準品 $[^{15}N_5]$ - $N7\gamma$ -SFO-Gua 19。

表九、小牛胸腺 DNA 與 SFO 3 在 pH 7.4，37 °C 下反應 72 小時之 DNA 加成產物 **11**、**12**、**16** 及 **19** 的生成量。

	Alkylation level (10^6 nucleotides)			
	<i>N1</i> γ-SFO-dAdo 11	<i>N</i> ⁶ γ-SFO-dAdo 12	<i>N3</i> γ-SFO-Ade 16	<i>N7</i> γ-SFO-Gua 19
Incubation solution ^a	ND ^b	ND ^b	400	1400
Enzyme hydrolysis	2000	170	660	2670

^aAdducts spontaneously released during the preparation of SO-modified DNA, analysed from incubation solution followed by filtration through 0.22 μm syringe membrane. ^bND denotes not detected.

不同位置取代之 DNA 加成產物所造成的致突變性 (mutagenic) 與致癌性 (carcinogenic) 並不相同，在有參與 Watson-Crick 鹼基配對位置所形成的 DNA 加成產物，*N1*-與 *N*⁶-腺嘌呤 DNA 加成產物主要會造成 AT→GC 同類置放(transition) (Latham et al., 1993; Sisk et al., 1994; Recio and Meyer, 1995; Bastlova and Podlutsky, 1996)，因此其致突變性更甚於 *N7*-鳥糞嘌呤和 *N3*-腺嘌呤之 DNA 加成產物 (Koskinen and Plna, 2000)，其中又以 *N1*-腺嘌呤 DNA 加成產物致突變性較 *N*⁶-腺嘌呤 DNA 加成產物高，此現象主要因為 *N*⁶-腺嘌呤的 DNA 加成產物還是可以與胸腺嘧啶作用，而 *N1*-腺嘌呤加成產物會破壞氫鍵作用。

相反的，*N7*-鳥糞嘌呤和 *N3*-腺嘌呤之 DNA 加成產物主要會形成致突變性的去嘌呤位置 (Koskinen and Plna, 2000) 造成 GC→TA 和

AT→TA 異位 (transversion)，因為 DNA 聚合酶 (polymerase) 會在去嘌呤位置 (apurinic site, AP site) 對面插入腺嘌呤 (Bastlova and Podlutsky, 1996)。在基因體 DNA 中，每 10^5 個核苷酸(nucleotides)中會有~1 個去嘌呤的 DNA 損傷 (Nakamura and Swenberg, 1999)，在實驗動物中則是每 10^6 個核苷酸 (nucleotides) 中會有數個去嘌呤的 DNA 損傷，而在人體中則是每 10^8 個核苷酸 (nucleotides) 中才有數個去嘌呤的 DNA 損傷 (Koskinen and Plna, 2000)。由於這些去嘌呤位置通常可以被修復而且 *N7*-鳥糞嘌呤和 *N3*-腺嘌呤也不參與 Watson-Crick 鹼基配對(base pairing)，因此相較於其他的 DNA 加成產物並沒那麼重要 (Koskinen and Plna, 2000)，但是因為 *N7*-鳥糞嘌呤加成產物的生成量最多，而其生成也伴隨著其他致突變性之 DNA 加成產物的生成，因此可以最先用來探討化學物質是否會攻擊體內 DNA 形成 DNA 加成產物之生物指標。

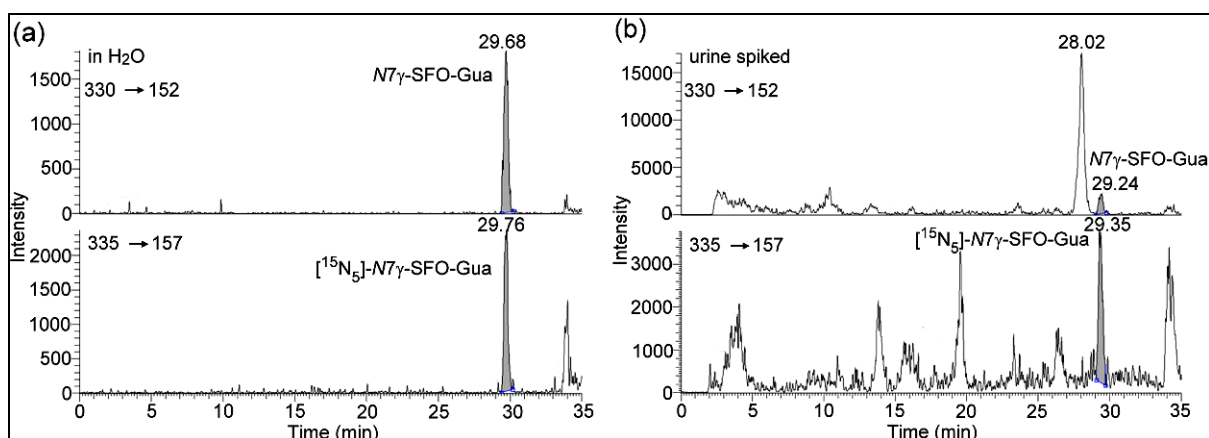
從小牛胸腺 DNA 的實驗結果，我們可以知道目前所合成之 DNA 加成產物中，以 *N7*γ-SFO-Gua **19** 的生成量最多，這些受損傷之 DNA 在體內會經由核酸切除修復機制或鹼基切除修復機制移除。雖然 *N1*γ-SFO-dAdo **11** 的生成量也為 *N7*γ-SFO-Gua **19** 的 75%，但從體外實驗結果可以知道反應 72 小時後約有 52.4% 之 *N7*γ-SFO-Gua **19** 會產生自發性的去嘌呤作用 (Shen, et al., 2012a; Shen et al., 2012b)，文獻也指出 *N7*-鳥糞嘌呤的 DNA 加成產物除了可被修復酵素移除也具有自發性去嘌呤作用

(Vodicka et al., 2006)，而這些被修復之 DNA 加成產物通常不再被代謝而直接排除到尿液中。因此為了證實黃樟素代謝產物 SFO 3 在體內是否會攻擊 DNA 造成 DNA 的損傷，我們以靜脈注射方式給予老鼠單一劑量 (30 mg/kg body weight) 之黃樟素代謝產物(±)-SFO 3，並以非侵入性之方式分析收集 24 小時、48 小時及 72 小時之老鼠尿液，分析尿液中 *N7*γ-SFO-Gua 19 的量。

1.2.2.8.3 利用穩定同位素稀釋高效液相層析電噴灑游離串聯質譜法定量老鼠尿液中 *N7*γ-SFO-Gua 19 之分析方法開發與方法確校

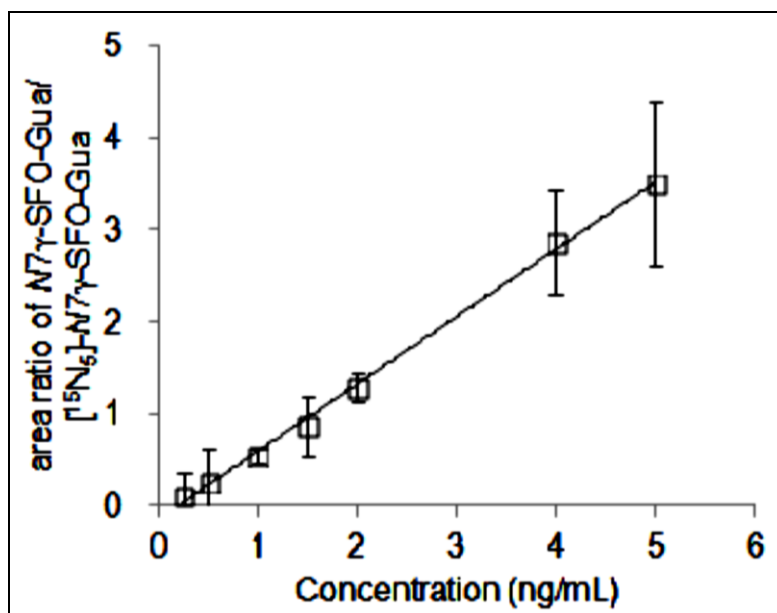
為了利用穩定同位素稀釋高效液相層析電噴灑游離串聯質譜法來決定老鼠尿液中 *N7*γ-SFO-Gua 19 之量，首先將 *N7*γ-SFO-Gua 19 之標準品與 [¹⁵N₅]-*N7*γ-SFO-Gua 19 之內標準品分別配製在 H₂O 與未暴露之老鼠尿液中，並且利用多重反應監測模式，設定：*N7*γ-SFO-Gua 19：*m/z* 330→*m/z* 152；[¹⁵N₅]-*N7*γ-SFO-Gua 19：*m/z* 335→*m/z* 157，進行分析方法之開發。從圖三十五可以看到，我們的分析方法可以成功的將 *N7*γ-SFO-Gua 19 與老鼠尿液中之干擾物 (*t_R* = 28.02 min) 分開。當注入 22 μL 的樣品量，*N7*γ-SFO-Gua 在 H₂O 中訊雜比 (signal-to-noise, S/N) 大於 3 時此分析方法之偵測極限 (limit of detection, LOD) 為 5.5 pg (0.25 ng/mL)；而當 *N7*γ-SFO-Gua 在老鼠尿液中訊雜比大於 10 時，此分析方

之定量極限 (limit of quantitation, LOQ) 為 11 pg (0.5 ng/mL)。



圖三十五、 $N7\gamma$ -SFO-Gua (1 ng/mL) 與 $[^{15}\text{N}_5]$ - $N7\gamma$ -SFO-Gua (1.1 ng/mL) 配製在(a) H_2O 與 (b) 未暴露老鼠尿液中分析之高效液相層析電噴灑游離串聯質譜圖。

在生物樣品中，與分析物一同流析之未知間質可能會抑制或增強分析物之離子強度(ion intensity) (Matuszewski et al., 2003)，因此將不同濃度之 $N7\gamma$ -SFO-Gua **19** (0.25 to 5 ng/mL) 分別加入固定量之 $[^{15}\text{N}_5]$ - $N7\gamma$ -SFO-Gua **19** (1.1 ng/mL) 配製在未暴露老鼠尿液中建立校正曲線，並得到 $y = 0.73x - 0.14$ ($r^2 = 0.9979$) 之回歸曲線(圖三十六)。同日間變異係數 (intra-day variation) 和異日間變異係數 (inter-day variation) 分別為 2%–10% 和 7%–13%。

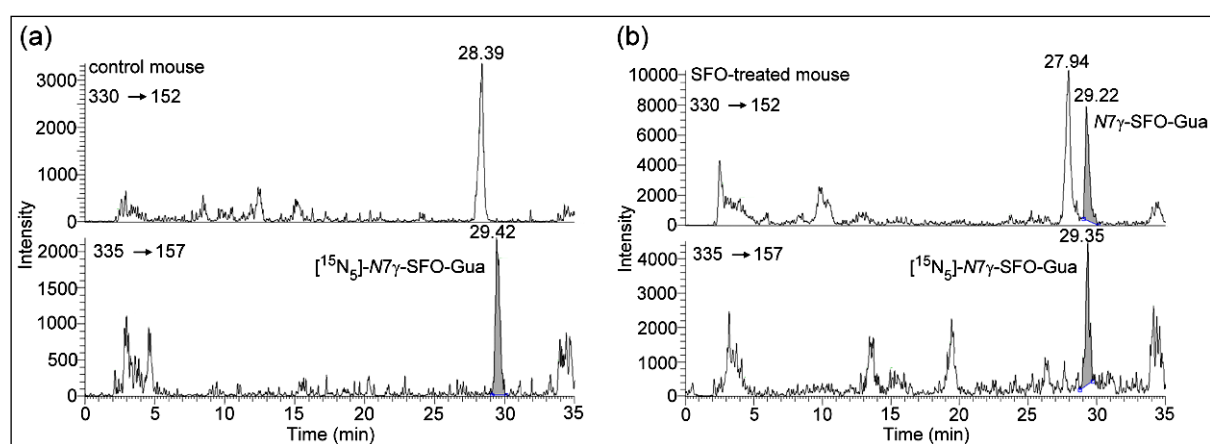


圖三十六、將不同濃度之 $N7\gamma$ -SFO-Gua 19 (0.25 to 5 ng/mL) 分別加入 $[^{15}\text{N}_5]$ - $N7\gamma$ -SFO-Gua 19 (1.1 ng/mL) 配製在未暴露老鼠尿液中分析所得之校正曲線。

1.2.2.8.4 利用穩定同位素稀釋高效液相層析電噴灑游離串聯質譜法定量老鼠尿液中之 $N7\gamma$ -SFO-Gua 19

1995 年 Qato 等人 (Qato and Guenther, 1995) 利用 ^{32}P -後標籤法分析給予單一劑量黃樟素代謝產物 SFO 3 (106.9 mg/kg body weight) 或黃樟素 1 (97.3 mg/kg body wt) 之 Balb/C 老鼠肝臟組織中並沒有分析到任何 SFO-DNA 加成產物，因此為了可以分析到尿液中 $N7\gamma$ -SFO-Gua，我們以靜脈注射 (intraperitoneally) 給予單一劑量 (30 mg/kg body weight) 之 SFO 3 後，將三隻老鼠為一組 (共四組) 關在同一代謝籠中，收集給藥後 24 小時、48 小時及 72 小時之尿液。

利用新開發之穩定同位素稀釋高效液相層析電噴灑游離串聯質譜法分析老鼠尿液中之 $N7\gamma$ -SFO-Gua，從圖三十七中可以看到，未給予黃樟素代謝產物 SFO 3 的老鼠尿液(控制組)中並沒有測到 $N7\gamma$ -SFO-Gua 19，而給予黃樟素代謝產物 SFO 3 的老鼠尿液(實驗組)中可以偵測到 $N7\gamma$ -SFO-Gua 19 的訊號。



圖三十七、(a) 未暴露老鼠尿液 (控制組) 與 (b) 靜脈注射黃樟素代謝產物 SFO 3 (30 mg/kg body wt) 之老鼠尿液 (實驗組) 分別加入 $[^{15}\text{N}_5]$ - $N7\gamma$ -SFO-Gua 19 (1.1 ng/mL) 內標準品後，分析所得之高效液相層析電噴灑游離串聯質譜圖。

實驗結果顯示，第一天和第二天尿液中 $N7\gamma$ -SFO-Gua 含量分別為 1.02 ± 0.14 和 0.73 ± 0.68 ng/mg creatinine ($n = 4$)，到第三天尿液中 $N7\gamma$ -SFO-Gua 含量已經低於定量極限而無法偵測到。在給予 SFO 後，第二天尿液中 $N7\gamma$ -SFO-Gua 的含量已經減少為第一天的 28.4%，而第三

天已經低於定量極限，因此可以知道 $N7\gamma$ -SFO-Gua 在體內的半衰期約為 60 小時 (Shen et al., 2012b)。



1.3 結論

環氧化合物主要是烯類在體內代謝所生成的中間產物，在毒理學的研究已經發現環氧代謝產物跟 DNA 形成共價鍵結產物與其基因毒性有相關性 (Koskinen and Plna, 2000)。在本研究中，我們成功合成黃樟素代謝產物 SFO **3** 與 2'-去氧腺嘌呤 **10** 與腺嘌呤 **15** 所形成之 DNA 加成產物 $N1\gamma$ -SFO-dAdo **11** 和 $N^6\gamma$ -SFO-dAdo **12** 與 $N3\gamma$ -SFO-Ade **16** 和 $N9\gamma$ -SFO-Ade **17**、2'-去氧鳥糞嘌呤 **18** 所形成之 DNA 加成產物 $N7\gamma$ -SFO-Gua **19**、2'-去氧胞嘧啶 **20** 所形成之 DNA 加成產物 $N3\gamma$ -SFO-dUrd **21** 以及胸腺嘧啶 **22** 所形成之 DNA 加成產物 $N3\gamma$ -SFO-dThd **23**，並利用 UV-vis、質譜及核磁共振光譜完成結構鑑定。

由於 $N3$ -、 $N1$ -/ N^6 -取代之腺嘌呤加成產物與 $N7$ -取代之鳥糞嘌呤加成產物是環氧代謝產物與雙股螺旋 DNA 反應生成量較多之 DNA 加成產物 (表一)，因此我們把加成產物 $N1\gamma$ -SFO-dAdo **11**、 $N^6\gamma$ -SFO-dAdo **12**、 $N3\gamma$ -SFO-dAdo **16** 與 $N7\gamma$ -SFO-Gua **19** 當成生物指標，然後進一步合成這些 DNA 加成產物之 ^{15}N 同位素標定之內標準品: $[^{15}\text{N}_5]$ - $N1\gamma$ -SFO-dAdo **11**、 $[^{15}\text{N}_5]$ - $N^6\gamma$ -SFO-dAdo **12** 和 $[^{15}\text{N}_5]$ - $N7\gamma$ -SFO-Gua **19**，其中 $N9\gamma$ -SFO-Ade **17** 在體內並不會形成，因此將其作為定量 $N3\gamma$ -SFO-Ade **16** 之內標準品，成功發展同位素稀釋高效液相層析電噴灑游離串聯質譜法定量體外與體內之 SFO-DNA 加成產物生成量。

從小牛胸腺 DNA (體外) 實驗結果知道，加成產物 *N7*γ-SFO-Gua **19** (2670/10⁶ nucleotides) 的生成量最多，其次是 *N1*γ-SFO-dAdo **11** (2000/10⁶ nucleotides) 和 *N3*γ-SFO-Ade **16** (660/10⁶ nucleotides) 以及 *N1*γ-SFO-dAdo **11** 經由 Dimroth rearrangement 轉換之 *N*⁶γ-SFO-dAdo **12** (170/10⁶ nucleotides)。由於加成產物 *N7*γ-SFO-Gua **19** 之生成量最多，除此之外這類糖苷鍵不穩定之 DNA 加成產物不僅會進行自發性去嘌呤作用，也會經由酵素的修復作用將其從 DNA 骨架上被移除，最後排到尿液中，因此我們以非侵入性的方式，分析給予黃樟素代謝產物 SFO **3** 的老鼠尿液中之加成產物 *N7*γ-SFO-Gua **19** 的量。實驗結果顯示，第一天和第二天老鼠尿液中之加成產物 *N7*γ-SFO-Gua **19** 的含量分別為 1.02±0.14 和 0.73±0.68 ng/mg creatinine (*n* = 4)，而第三天尿液中加成產物 *N7*γ-SFO-Gua **19** 的量已經低於定量極限而無法偵測到，進而推估加成產物 *N7*γ-SFO-Gua **19** 的半衰期大約為 60 小時。

經由本研究我們證實了黃樟素代謝產物 SFO **3** 在體內會與 DNA 反應形成 DNA 加成產物，因此未來將繼續分析這些 DNA 加成產物在組織 DNA 上的生成量，進一步探討黃樟素代謝產物 SFO **3** 之基因毒性。

1.4 實驗方法

1.4.1 Purification of DNA Adducts.

Reverse phase HPLC analysis was performed by using a Hitachi L-7000 pump system with a D-7000 interface, L-7200 autosampler (Hitachi Ltd., Tokyo), column oven, L-7450A photodiode array detector (Hitachi Ltd., Tokyo), and a Prodigy ODS (3) column, 4.6 × 250 mm, 5 μm (Phenomenex, Torrance, CA). The mobile phase consisted of 50 mM ammonium formate, pH 5.5 (A) and acetonitrile (B). For purification of *N*¹γ-SFO-dAdo **11**, *N*⁶γ-SFO-dAdo **12**, *N*³γ-SFO-Ade **16**, and *N*⁹γ-SFO-Ade **17**, a gradient of 0–30 min 0–42% B was employed. For purification of *N*⁷γ-SFO-Gua **19**, a gradient of 0–20 min 0–20% B, 20–30 min 20% B, 30–45 min 20–80% B was employed. All the isolated compounds were further purified and desalted by changing eluent A to deionized water with a linear gradient from 0% B to 50% B over 30 min.

Chiral HPLC analysis was performed using a Gilson 321-H1 pump system with a 506C interface, a Rheodyne 7725I injector, a Gilson 155 UV-vis detector, Gilson Unipoint software (Gilson, Inc., Middleton, WI), and CHIRALPAK AS-H column, 4.6 × 250 mm, 5 μm (Daicel Chemical Industrial Ltd., Tokyo). Mobile phase of isopropanol/hexane (v/v, 20:80) solution was eluted isocratically at a flow rate of 0.5 mL/min to purify compounds **13**, **14**, and (*R*)-(+)-enriched **3**. Compounds **11** and **12** were eluted with isopropanol/hexane (v/v, 2:98) solution at a flow rate of 0.5 mL/min for 5 min, and then eluted with isopropanol/hexane (v/v, 90:10) solution with the flow rate decreased to 0.1 mL/min from 5 to 6 min and maintained for 90 min.

1.4.2 Spectroscopic and Spectrometric Methods.

^1H NMR spectra were measured with either a 300 or 500 MHz spectrometer. Natural abundance ^{13}C NMR spectra were recorded using pulse Fourier transform techniques, with a 300 or 500 MHz NMR spectrometer operating at 75.4 or 125.7 MHz, respectively. Broadband decoupling, H,H-COSY (Correlated Spectroscopy), HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence), and HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) were carried out to simplify spectra and aid peak identification. Samples were dissolved in d_6 -DMSO for NMR analysis. The alkylation positions of DNA adducts were mainly determined by long-range H,C correlations of HMBC spectra. UV-vis spectra of these adducts at pH 1, pH 7 and pH 13 were recorded on a HP-8453 spectrophotometer with diode array detection.

1.4.3 Synthesis of (\pm)-SFO 3 (Noller and Kneeland, 1946).

m-Chloroperbenzoic acid (30 g, 0.17 mol) in chloroform (200 mL) was added slowly to a solution of safrole **1** (22.7 mL, 0.15 mol) in chloroform (50 mL) at 0 °C. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight, and the excess *m*-chloroperbenzoic acid was treated with 10% sodium sulfite. After being extracted three times with 5% NaHCO_3 (3×250 mL) and twice with water (2×200 mL), the organic layers were combined and dried over MgSO_4 and evaporated to dryness. The residue was purified by column chromatography with hexane/EtOAc (v/v, 10:1) as the eluent to give (\pm)-SFO **2** as a yellow liquid (10.6 g, 40%); ESI^+/MS : m/z 179 ($[\text{M} + \text{H}]^+$); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, in CDCl_3): δ 2.51 (dd, 1H, γ' -H, $J_1 = 2.6$ Hz, $J_2 =$

4.9 Hz), 2.70–2.81 (m, 3H, γ'' -H, α' -H, α'' -H), 3.06–3.11 (m, 1H, β -H), 5.91 (s, 2H, g-H), 6.66–6.69 (m, 1H, Ar-CH), 6.73–6.75 (m, 2H, Ar-CH) (附圖一). ^{13}C NMR (75.4 MHz, in CDCl_3): δ 38.3 (C- γ), 46.7 (C- α), 52.4 (C- β), 100.8 (C-g), 108.2 (C-d), 109.4 (C-a), 121.8 (C-e), 130.7 (C-f), 146.2 (C-c), 147.6 (C-b) (附圖二).

1.4.4 Enantioselective Synthesis of (*R*)-(+)-enriched-SFO **3** (Mohan and Rao, 1998).

4.4.1 Synthesis of (*R*)-(+)-5-(2,3-Dihydroxypropyl)-1,3-benzodioxole **13**.

Safrole **1** (0.16 mL, 1.0 mmol), AD-mix- β (1.4 g, 0.1 mmol), and methanesulfonamide (98 mg, 1.0 mmol) in 50% aqueous *t*BuOH (10 mL) was stirred at 0 °C for 30 h. The reaction mixture was added with Na_2SO_3 (1.5 g) and extracted three times with EtOAc (3×10 mL). The organic layer was washed with brine, dried with MgSO_4 , and evaporated under reduced pressure on a rotary evaporator. The sample was recrystallized from CH_2Cl_2 to produce a white solid **13** in 86%. Compound **13** showed a 96% *ee* as determined by Chiral HPLC (附圖三). The optical rotation of **6**, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +21.7^\circ$ ($c = 0.003$ in CH_2Cl_2), had some discrepancy with literature value ($[\alpha]_{\text{D}} = +32^\circ$).^(Mohan and Rao, 1998) ^1H NMR (300 MHz, in CDCl_3): δ 2.61–2.74 (m, 2H, α -H), 3.49 (dd, 1H, γ' -H, $J_1 = 7.0$ Hz, $J_2 = -11.2$ Hz), 3.67 (dd, 1H, γ'' -H, $J_1 = 3.2$ Hz, $J_2 = -11.2$ Hz), 3.83–3.91 (m, 1H, β -H), 5.93 (s, 2H, g-H), 6.66 (dd, 1H, e-H, $J_1 = 1.6$ Hz, $J_2 = 7.9$ Hz), 6.72 (d, 1H, a-H, $J = 1.6$ Hz), 6.75 (d, 1H, d-H, $J = 7.9$ Hz) (附圖四). ^{13}C NMR (75.4 MHz, in CDCl_3): δ

39.4 (C- α), 65.9 (C- γ), 73.0 (C- β), 100.9 (C-g), 108.3 (C-d), 109.6 (C-a), 122.2 (C-e), 131.3 (C-f), 146.3 (C-c), 147.8 (C-b) (附圖五).

1.4.4.2 Synthesis of (*R*)-(+)-5-(2-Hydroxy-3-tosyloxypropyl)-1,3-benzodioxole **14**.

A mixture of **13** (0.42 g, 2.14 mmol), tosyl chloride (0.45 g, 2.35 mmol), and 4-dimethylaminopyridine (0.03 g, 0.24 mmol) dissolved in CH₂Cl₂ (7 mL) was added triethylamine (0.36 mL in 7 mL CH₂Cl₂) dropwisely at 0 °C and stirred at room temperature for 3 h. The residue was purified by column chromatography (hexane/EtOAc = 75/25, R_f = 0.12) to give **14** as a light yellow liquid in 72% yield. The product **14** was determined to be 40% *ee* by chiral HPLC analysis (附圖三). $[\alpha]_D^{25} = +12.5^\circ$ (c = 0.002, in CH₂Cl₂). ¹H NMR (300 MHz, in CDCl₃): δ 2.46 (s, 3H, CH₃), 2.67–2.71 (m, 2H, α -H), 3.90–4.06 (m, 3H, β -H, γ' -H, γ'' -H), 5.93 (s, 2H, f-H), 6.59 (dd, 1H, e-H, $J_1 = 1.6$ Hz, $J_2 = 7.9$ Hz), 6.63 (d, 1H, a-H, $J = 1.5$ Hz), 6.72 (d, 1H, d-H, $J = 7.9$ Hz), 7.34 (d, 2H, Ar-CH, $J = 8.1$ Hz), 7.80 (d, 2H, Ar-CH, $J = 8.3$ Hz) (附圖六). ¹³C NMR (75.4 MHz, in CDCl₃): δ 21.6 (CH₃), 38.9 (C- α), 70.3 (C- β), 72.5 (C- γ), 100.9 (C-g), 108.3 (C-d), 109.5 (C-a), 122.2 (C-e), 127.9 (CHCSO₃), 129.9 (CH₃CCH), 130.2 (C-f), 132.5 (CH₃CCH), 145.1 (CHCSO₃), 146.3 (C-c), 147.7 (C-b) (附圖七).

1.4.4.3 Synthesis of (*R*)-(+)-5-Oxiranylmethyl-1,3-benzodioxole 3.

Tosylate **14** (0.13 g, 0.40 mmol) and K_2CO_3 (0.49 g, 3.57 mmol) in methanol (25 mL) was stirred at room temperature for 30 min. Methanol was removed with a rotary evaporator under vacuum. The residue was diluted with water and extracted with EtOAc. The organic layer was dried over $MgSO_4$ and the solvent was removed by a rotary evaporator. The crude product was further purified using column chromatography (hexane/EtOAc = 7/3, R_f = 0.58) to give a light yellow liquid **3** in 23% yield. The product **3** was determined to be 39% *ee* using chiral HPLC analysis (附圖三). Separated enantiomers were collected for optical rotation measurements. (*R*)-(+)-5-Oxiranylmethyl-1,3-benzodioxole **3**: $[\alpha]_D^{25} = +11.8^\circ$ ($c = 0.003$ in CH_2Cl_2); (*S*)-(-)-5-Oxiranylmethyl-1,3-benzodioxole **2**: $[\alpha]_D^{25} = -11.6^\circ$ ($c = 0.003$ in CH_2Cl_2). $[\alpha]_D^{25} = +13^\circ$ was reported for the (*R*)-(+)-enantiomer. (Mohan and Rao, 1998) 1H NMR (300 MHz, in $CDCl_3$) δ 2.47 (dd, 1H, γ' -H, $J_1 = 2.6$ Hz, $J_2 = 4.9$ Hz), 2.65–2.79 (m, 3H, γ'' -H, α' -H, α'' -H), 3.01–3.07 (m, 1H, β -H), 5.87 (s, 2H, CH_2), 6.60–6.64 (m, 1H, Ar-CH), 6.68 (s, 1H, Ar-CH), 6.95 (d, 1H, Ar-CH, $J = 6.1$ Hz) (附圖八). ^{13}C NMR (75.4 MHz, in $CDCl_3$): δ 38.4 (C- γ), 46.8 (C- α), 52.5 (C- β), 100.9 (C-g), 108.3 (C-d), 109.5 (C-a), 121.9 (C-e), 130.8 (C-f), 146.5 (C-c), 147.7 (C-b) (附圖九).

1.4.5 Synthesis of *N*1 γ -SFO-dAdo **11**, (*R*)-enriched-*N*1 γ -SFO-dAdo **11**, *N*⁶ γ -SFO-dAdo **12**, and (*R*)-enriched-*N*⁶ γ -SFO-dAdo **12**.

A solution of either (\pm)-SFO **3** or (*R*)-(+)-enriched-SFO **3** was reacted with 2'-deoxyadenosine **10** at a 2:1 molar ratio in 0.2 N K₂HPO₄ (pH 7.4) solution and incubated at 37 °C for 72 h. Products were purified and further desalted using reverse phase HPLC. The solutions containing pure adducts were dried under vacuum. Each pure adduct was subjected to spectroscopic and spectrometric characterization.

N1 γ -SFO-dAdo 11. The ESI⁺/MS/MS of adducts **11** showed the fragments at m/z 430 ([M + H]⁺), 452 ([M + Na]⁺), and 314 ([M - dR + H]⁺). HRMS (ESI): m/z calcd. for C₂₀H₂₄N₅O₆ [M + H]⁺ 430.1728; found 430.1729. The maximum absorbance (λ_{\max}) was 259 nm at pH 1, 259 nm at pH 7, and 261 nm at pH 13. ¹H NMR (500 MHz, in *d*₆-DMSO) δ 2.31–2.36 (m, 1H, 2''-H), 2.63–2.70 (m, 2H, 2'-H, α' -H), 2.74 (dd, 1H, α'' -H), 3.53–3.56 (m, 1H, 5''-H), 3.61–3.64 (m, 1H, 5'-H), 3.67–3.72 (m, 1H, γ' -H), 3.90 (brs, 1H, β -H), 4.27 (dd, 1H, γ'' -H, $J_1 = 2.4$ Hz, $J_2 = -13.3$ Hz), 5.01 (d, 1H, β -OH, $J = 4.4$ Hz), 5.08–5.10 (m, 1H, 5'-OH), 5.37 (brs, 1H, 3'-OH), 6.00 (s, 2H, g-H), 6.33 (t, 1H, 1'-H, $J_{1'2''} = 6.4$ Hz, $J_{1'2'} = 7.2$ Hz), 6.74 (dd, 1H, e-H, $J_1 = 1.1$ Hz, $J_2 = 7.9$ Hz), 6.86 (d, 1H, d-H, $J = 7.9$ Hz), 6.87 (d, 1H, a-H, $J = 1.2$ Hz), 8.26 (s, 1H, 2-H), 8.34 (s, 1H, 8-H) (附圖十). ¹³C NMR (125.7 MHz, in *d*₆-DMSO) δ 40.7 (C- α), 51.4 (C- γ), 61.6 (C-5'), 68.5 (C- β), 70.65 and 70.67 (C-3'), 83.44 and 83.52 (C-1') overlapped with solvent (C-2'), 87.92 and 87.94 (C-4'), 100.6 (C-g), 107.9 (C-d), 109.6 (C-a), 122.2 (C-e), 123.6 (C-5),

132.11 and 132.13 (C-f), 138.8 (C-8), 145.4 (C-c), 147.0 (C-b), 147.10 and 147.15 (C-4), 149.2 (C-2), 156.0 (C-6) (附圖十一)。

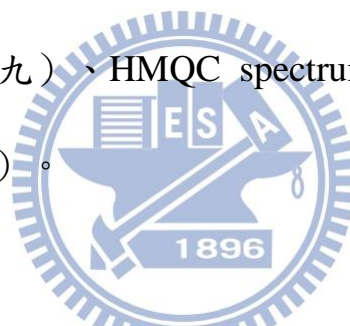
DEPT spectra (附圖十二)、H,H-COSY spectrum (附圖十三)與 HMQC spectrum (附圖十四)。

(R)-enriched-N1 γ -SFO-dAdo 11. ^1H NMR (500 MHz, in d_6 -DMSO) δ 2.29–2.37 (m, 1H, 2''-H), 2.62–2.78 (m, 3H, 2'-H, α' , α'' -H), 3.51–3.73 (m, 3H, 5', 5''-H, γ' -H), 3.87–3.91 (m, 2H, 4'-H, β -H), 4.24–4.29 (m, 1H, γ'' -H), 4.41–4.43 (m, 1H, 3'-H), 6.00 (s, 2H, g-H), 6.31–6.36 (m, 1H, 1'-H), 6.75 (dd, 1H, e-H, $J_1 = 1.6$ Hz, $J_2 = 7.9$ Hz), 6.86 (d, 1H, d-H, $J = 7.9$ Hz), 6.87 (s, 1H, a-H), 8.26 (s, 1H, 2-H), 8.35 (s, 1H, 8-H) (附圖十五)。 ^{13}C NMR (125.7 MHz, in d_6 -DMSO) δ 40.7 (C- α), 51.4 (C- γ), 61.6 (C-5'), 68.5 (C- β), 70.6 (C-3'), 83.41 and 83.48 (C-1') overlapped with solvent (C-2'), 87.9 (C-4'), 100.6 (C-g), 107.9 (C-d), 109.6 (C-a), 122.1 (C-e), 123.6 (C-5), 132.09 and 132.11 (C-f), 138.74 and 138.79 (C-8), 145.4 (C-c), 146.9 (C-b), 147.07 and 147.12 (C-4), 149.2 (C-2), 156.0 (C-6) (附圖十六)。

N 6 γ -SFO-dAdo 12. The ESI $^+$ /MS/MS of adducts **12** showed the fragments at m/z 430 ($[\text{M} + \text{H}]^+$), 452 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$), and 314 ($[\text{M} - \text{dR} + \text{H}]^+$). HRMS (ESI): m/z calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{O}_6$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 430.1728; found 430.1723. The maximum absorbance (λ_{max}) was 267 nm at pH 1, 271 nm at pH 7, and 271 nm at pH 13. ^1H NMR (500 MHz, in d_6 -DMSO) δ 2.30 (ddd, 1H, 2''-H, $J_{2''3'} = 3.2$ Hz, $J_{1'2''} = 5.6$ Hz, $J_{2'2''} = -13.6$ Hz), 2.58–2.63 (m, 1H, α' -H), 2.73–2.80 (m, 2H, 2'-H, α'' -H), 3.46 (m, γ' , γ'' -H overlap with 5'-H), 3.56 (dd,

1H, 5''-H, $J_1 = 4.2$ Hz, $J_2 = -11.8$ Hz), 3.66 (dd, 1H, 5'-H, $J_{4'5'} = 4.4$ Hz, $J_{5'5''} = -11.8$ Hz), 3.91–3.95 (m, 2H, 4'-H, β -H), 4.44–4.47 (m, 1H, 3'-H), 5.99 (s, 2H, g-H), 6.38–6.41 (dd, 1H, 1'-H, $J_{1'2''} = 5.6$ Hz, $J_{1'2'} = 7.2$ Hz), 6.71 (dd, 1H, e-H, $J = 1.2$ Hz, $J = 7.9$ Hz), 6.83 (d, 1H, d-H, $J = 7.9$ Hz), 6.85 (d, 1H, a-H, $J = 0.61$ Hz), 7.58 (s, 1H, 6-NH), 8.24 (s, 1H, 2-H), 8.39 (s, 2H, 8-H, HCOO⁻) (附圖十七). ¹³C NMR (125.7 MHz, in *d*₆-DMSO) δ 40.7 (C- α), 46.0 (C- γ), 61.9 (C-5'), 70.2 (C- β), 70.9 (C-3'), 84.0 (C-1') overlapped with solvent (C-2'), 88.0 (C-4'), 100.5 (C-g), 107.8 (C-d), 109.7 (C-a), 119.7 (C-5), 122.1 (C-e), 132.9 (C-f), 139.4 (C-8), 145.2 (C-c), 146.9 (C-b), 148.1 (C-4), 152.2 (C-2), 154.7 (C-6) (附圖十八).

DEPT spectra (附圖十九)、HMQC spectrum (附圖二十) 與 HMBC spectrum (附圖二十一)。



(R)-enriched-N⁶ γ -SFO-dAdo 12. ¹H NMR (500 MHz, in *d*₆-DMSO) δ 2.30 (ddd, 1H, 2''-H, $J_{2''3'} = 2.9$ Hz, $J_{1'2''} = 6.1$ Hz, $J_{2'2''} = -13.1$ Hz), 2.60–2.63 (m, 1H, H- α'), 2.72–2.79 (m, 2H, 2'-H, α'' -H), 3.54 (brs, γ' , γ'' -H overlap with H₂O), 3.54–3.57 (m, 1H, 5''-H), 3.66 (dd, 1H, 5'-H, $J_{4'5'} = 3.4$ Hz, $J_{5'5''} = -11.7$ Hz), 3.91–3.93 (m, 2H, 4'-H, β -H), 4.44–4.45 (m, 1H, 3'-H), 5.03 (brs, 1H, OH), 5.28 (brs, 1H, OH), 5.37 (brs, 1H, OH), 5.98 (s, 2H, g-H), 6.38 (dd, 1H, 1' -H, $J_{1'2''} = 6.2$ Hz, $J_{1'2'} = 7.7$ Hz), 6.70 (d, 1H, e-H, $J = 7.9$ Hz), 6.82 (d, 1H, d-H, $J = 7.9$ Hz), 6.84 (s, 1H, a-H), 7.59 (brs, 1H, 6-NH), 8.23 (s, 1H, 2-H), 8.38 (s, 1H, 8-H) (附圖二十二). ¹³C NMR (125.7 MHz, in *d*₆-DMSO) δ 40.7 (C- α), 46.0 (C- γ), 61.9 (C-5'), 70.3 (C- β), 71.0 (C-3'), 84.0 (C-1') overlapped with solvent (C-2'), 88.0 (C-4'), 100.6 (C-g), 107.9

(C-d), 109.8 (C-a), 119.7 (C-5), 122.2 (C-e), 133.0 (C-f), 139.5 (C-8), 145.3 (C-c), 146.9 (C-b), 148.1 (C-4), 152.3 (C-2), 154.6 (C-6) (附圖二十三).

1.4.6 Rearrangement of *N*1 γ -SFO-dAdo **11** to *N*⁶ γ -SFO-dAdo **12**.

A sample of **11** (30 μ g) in 1 mL of 0.2 N K₂HPO₄ (pH 7.4) solution was incubated at 37 °C, and the solution was analyzed at various elapsed time by reverse phase HPLC.

1.4.7 Synthesis of *N*3 γ -SFO-Ade **16** and *N*9 γ -SFO-Ade **17**.

(\pm)-SFO **3** and adenine **15** at a 2:1 molar ratio in 0.2 N K₂HPO₄ (pH 7.4) buffer solution was incubated at 37 °C for 72 h. Adducts were purified and further desalted using reverse phase HPLC. The pure adduct was dried under vacuum and subjected to spectroscopic and spectrometric characterization.

N3 γ -SFO-Ade 16. The ESI⁺/MS/MS of adducts **16** showed the fragments at m/z 314 ([M + H]⁺) and 136 ([M – SFO + H]⁺). HRMS (ESI): m/z calcd. for C₁₅H₁₆N₅O₃ [M + H]⁺ 314.1255; found 314.1243. The maximum absorbance (λ_{\max}) was 274 nm at pH 1, 274 nm at pH 7, and 273 nm at pH 13. ¹H NMR (500 MHz, in *d*₆-DMSO) δ 2.58–2.60 (m, 1H, α' -H), 2.89 (d, 1H, α'' -H, $J = -13.2$ Hz), 3.99–4.03 (m, 2H, β -H, γ' -H), 4.35 (ddd, 1H, γ'' -H, $J_1 = 7.7$ Hz, $J_1 = 7.9$ Hz, $J_2 = -19.6$ Hz), 6.00 (s, 2H, g-H), 6.76 (d, 1H, e-H, $J = 7.9$ Hz), 6.87 (d, 1H, d-H, $J = 7.9$ Hz), 6.88 (s, 1H, a-H), 7.86 (s, 1H, 8-H), 8.01 (s, 1H, 2-H) (附圖二十四). ¹³C NMR (125.7 MHz, in *d*₆-DMSO) δ 40.4 (C- α),

54.1 (C- γ), 68.4 (C- β), 100.5 (C-g), 107.9 (C-d), 109.7 (C-a), 118.9 (C-5), 122.2 (C-e), 132.5 (C-f), 143.3 (C-2), 145.4 (C-c), 146.9 (C-b), 148.2 (C-4), 152.3 (C-8), 156.7 (C-6) (附圖二十五).

DEPT spectra (附圖二十六)、H,H-COSY spectrum (附圖二十七) 與 HMQC spectrum (附圖二十八)。

N γ -SFO-Ade 17. The ESI⁺/MS/MS of adducts **17** showed the fragments at m/z 314 ($[M + H]^+$) and 136 ($[M - \text{SFO} + H]^+$). HRMS (ESI): m/z calcd. for C₁₅H₁₆N₅O₃ $[M + H]^+$ 314.1255; found 314.1242. The maximum absorbance (λ_{max}) was 260 nm at pH 1, 263 nm at pH 7, and 263 nm at pH 13. ¹H NMR (500 MHz, in *d*₆-DMSO) δ 2.57 (dd, 1H, α' -H, $J = 7.0$ Hz, $J = 7.3$ Hz, $J = -13.8$ Hz), 2.69 (dd, 1H, α'' -H, $J = 4.6$ Hz, $J = 4.9$ Hz, $J = -13.7$ Hz), 4.00–4.02 (m, 2H, β -H), 3.98 (dd, 1H, γ' -H, $J_1 = 8.2$ Hz, $J_2 = -13.0$ Hz), 4.15 (dd, 1H, γ'' -H, $J_1 = 2.6$ Hz, $J_1 = 2.7$ Hz, $J_2 = -13.0$ Hz), 5.95 (s, 2H, g-H), 6.68 (dd, 1H, e-H, $J = 1.5$ Hz, $J = 7.9$ Hz), 6.80 (d, 1H, d-H, $J = 7.9$ Hz), 6.81 (s, 1H, a-H), 5.12 (d, 1H, β -OH, $J = 5.5$ Hz), 7.12 (s, 2H, NH₂), 8.02 (s, 1H, 8-H), 8.10 (s, 1H, 2-H) (附圖二十九). ¹³C NMR (125.7 MHz, in *d*₆-DMSO) δ 40.6 (C- α), 48.7 (C- γ), 69.5 (C- β), 100.6 (C-g), 107.9 (C-d), 109.7 (C-a), 118.5 (C-5), 122.2 (C-e), 132.1 (C-f), 141.5 (C-8), 145.4 (C-c), 146.9 (C-b), 149.6 (C-4), 152.2 (C-2) 155.8 (C-6) (附圖三十).

DEPT spectra (附圖三十一)、H,H-COSY spectrum (附圖三十二) 與 HMQC spectrum (附圖三十三)。

1.4.8 Synthesis of *N*7γ-SFO-Gua 19.

(±)-SFO **3** was reacted with 2'-deoxyguanosine **18** at a 2:1 molar ratio in 0.2 N K₂HPO₄ (pH 7.4) and incubated at 37 °C for 72 h. Adducts were purified and further desalted using reverse phase HPLC. The pure adduct was dried under vacuum and subjected to spectroscopic and spectrometric characterization.

N7γ-SFO-Gua 19. . The ESI⁺/MS/MS of adducts **19** showed the fragments at *m/z* 330 ([M + H]⁺) and 152 ([M – SFO + H]⁺). HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₂₀H₂₄N₅O₆ [M + H]⁺ 330.1202; found 330.1193. The maximum absorbance (λ_{\max}) was 279 nm at pH 1, 286 nm at pH 7, and 283 nm at pH 13. ¹H NMR (500 MHz, in *d*₆-DMSO) δ 2.64 (dd, 1H, α' -H, $J_1 = 2.2$ Hz, $J_2 = 2.7$ Hz, $J_3 = -13.8$ Hz), 2.52 (m, 1H, α'' -H overlap with solvent), 3.97–4.01 (m, 2H, β -H, γ'' -H), 4.24 (dd, 1H, γ'' -H, $J_1 = 7.4$ Hz, $J_2 = -17.6$ Hz), 5.94 (s, 2H, γ -H), 6.27 (s, 2H, NH₂), 6.65 (d, 1H, e-H, $J = 8.0$ Hz), 6.78 (s, 1H, d-H), 6.79 (s, 1H, a-H), 7.79 (s, 1H, 8-H) (附圖三十四). ¹³C NMR (125.7 MHz, in *d*₆-DMSO) δ 40.4 (C- α), 52.0 (C- γ), 70.2 (C- β), 100.6 (C-g), 107.9 (C-a), 108.2 (C-5), 109.7 (C-d), 122.2 (C-e), 132.4 (C-f), 143.8 (C-8), 145.4 (C-c), 146.9 (C-b), 152.8 (C-2), 154.8 (C-6), 159.8 (C-4) (附圖三十五)。

DEPT spectra (附圖三十六) 、H,H-COSY spectrum (附圖三十七) 與 HMQC spectrum (附圖三十八) 。

1.4.9 Synthesis of *N*3 γ -SFO-dUrd **21**.

A solution of either (\pm)-SFO **3** was reacted with 2'-deoxycytidine **20** at a 2:1 molar ratio in 0.2 N K₂HPO₄ (pH 7.4) solution and incubated at 37 °C for 72 h. Products were purified and further desalted using reverse phase HPLC. The solutions containing pure adducts were dried under vacuum. Each pure adduct was subjected to spectroscopic and spectrometric characterization.

N3 γ -SFO-dUrd **21.** The ESI⁺/MS/MS of adducts **21** showed the fragments at m/z 407 ([M + H]⁺), 291 ([M - dR + H]⁺), and 273 ([M - dR - H₂O + H]⁺). HRMS (ESI): m/z calcd. for C₁₉H₂₂N₂O₈ [M + H]⁺ 407.1454; found 407.1463. The maximum absorbance (λ_{\max}) was 265 nm at pH 1, 266 nm at pH 7, and 266 nm at pH 13. ¹H NMR (500 MHz, in *d*₆-DMSO) δ 2.07–2.22 (m, 2H, 2',2''-H), 2.62–2.63 (m, 2H, α' , α'' -H), 3.57–3.65 (m, 2H, 5',5''-H), 3.69–3.72 (m, 1H, γ' -H), 3.83–3.84 (m, 1H, 4'-H), 3.95–4.04 (m, 2H, γ'' -H, β -H), 4.26–4.29 (m, 1H, 3'-H), 4.80 (brs, 1H, OH), 5.09 (brs, 1H, OH), 5.30 (brs, 1H, OH), 5.75(d, 1H, 5-H, J = 8.1 Hz), 5.76 (d, 1H, 5-H, J = 8.1 Hz), 5.99 (s, 2H, g-H), 6.18–6.21 (m, 1H, 1'-H), 6.69 (dd, 1H, e-H, J = 8.0 Hz), 6.81–6.82 (m, 1H, e-H), 6.83 (d, 1H, a-H, J = 1.5 Hz), 7.91 (d, 1H, 6-H, J = 8.1 Hz), 7.92 (d, 1H, 6-H, J = 8.1 Hz) (附圖三十九). ¹³C NMR (125.7 MHz, in *d*₆-DMSO) δ 40.4 (C-2'), 40.84; 40.90 (C- α), 46.01; 46.07 (C- γ), 61.11; 61.13 (C-5'), 67.9 (C- β), 70.13; 70.19 (C-3'), 85.08; 85.14 (C-1'), 87.4 (C-4'), 100.5 (C-g), 100.9 (C-5), 107.8 (C-d), 109.53; 109.56 (C-a), 121.93; 121.95

(C-e), 132.67; 132.71 (C-f), 138.68; 138.74 (C-6), 145.3 (C-c), 146.8 (C-b), 150.71; 150.73 (C-2), 162.21; 162.23 (C-4). (附圖四十).

DEPT spectra (附圖四十一)、H,H-COSY spectrum (附圖四十二) 與 HMQC spectrum (附圖四十三)。

1.4.10 Synthesis of *N*3γ-SFO-Thd **23**.

A solution of either (±)-SFO **3** was reacted with thymidine **22** at a 2:1 molar ratio in 0.2 N K₂HPO₄ (pH 7.4) solution and incubated at 37 °C for 72 h. Products were purified and further desalted using reverse phase HPLC. The solutions containing pure adducts were dried under vacuum. Each pure adduct was subjected to spectroscopic and spectrometric characterization.

N3γ-SFO-Thd **23**. The ESI⁺/MS/MS of adducts **23** showed the fragments at *m/z* 421 ([M + H]⁺), 305 ([M - dR + H]⁺), and 287 ([M - dR - H₂O + H]⁺). HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₂₀H₂₄N₂O₈ [M + H]⁺ 421.1611; found 421.1614. The maximum absorbance (λ_{\max}) was 273 nm at pH 1, 273 nm at pH 7, and 273 nm at pH 13. ¹H NMR (500 MHz, in *d*₆-DMSO) δ 1.79 (s, 3H, CH₃), 2.08–2.24 (m, 2H, 2'-H, 2''-H), 2.56–2.57 (m, 2H, α' -H, α'' -H), 3.52–3.60 (m, 2H, 5'-H, 5''-H), 3.67–3.71 (m, 1H, γ' -H), 3.75–3.77 (m, 1H, 4'-H), 3.90–3.98 (m, 2H, γ'' -H, β -H), 4.21–4.24 (m, 1H, 3'-H), 4.72 (brs, 1H, OH), 5.01 (brs, 1H, OH), 5.23 (brs, 1H, OH), 5.93 (s, 2H, g-H), 6.61–6.62 (m, 1H, e-H), 6.63–6.64 (m, 1H, e-H), 6.15–6.19 (m, 1H, 1'-H), 6.74–6.75 (m, 1H, d-H), 6.76–6.77 (m, 1H, a-H), 7.70 (s, 1H, 6-H), 7.71 (s, 1H, 6-H), 8.12 (HCOO⁻) (附圖四十四). ¹³C NMR (125.7 MHz, in *d*₆-DMSO) δ 12.9

(CH₃), 40.4 (C-2'), 40.90; 40.96 (C-α), 46.24; 46.30 (C-γ), 61.2 (C-5'), 67.9 (C-β), 70.15; 70.21 (C-3'), 84.63; 84.73 (C-1'), 87.3 (C-4'), 100.5 (C-g), 107.8 (C-d), 108.4 (C-5), 109.46; 109.49 (C-a), 121.86; 121.88 (C-e), 132.62; 132.67 (C-f), 134.48; 134.53 (C-6), 145.20; 145.22 (C-c), 146.8 (C-b), 150.61; 150.64 (C-2), 162.91; 162.93 (C-4), 163.1 (HCOO⁻) (附圖四十五).

DEPT spectra (附圖四十六)、H,H-COSY spectrum (附圖四十七) 與 HMQC spectrum (附圖四十八)。

1.4.11 Synthesis of [¹⁵N₅]-N1γ-SFO-dAdo **11**, [¹⁵N₅]-N⁶γ-SFO-dAdo **12**, and [¹⁵N₅]-N7γ-SFO-Gua **19**.

[¹⁵N₅]-2'-deoxyadenosine **10** and [¹⁵N₅]-2'-deoxy-guanosine **18** (5 mg) was dissolved into H₂O (1 mL), respectively, to serve as the stock solution. For synthesis of [¹⁵N₅]-N1γ-SFO-dAdo **11** and [¹⁵N₅]-N⁶γ-SFO-dAdo **12**, (±)-SFO **3** (20 μmol) was added to [¹⁵N₅]-2'-deoxy-adenosine **10** (500 μL, 10 μmol) in 0.2 N K₂HPO₄ (pH 7.4) buffer solution and incubated at 37 °C for 72 h. For synthesis of [¹⁵N₅]-N7γ-SFO-Gua **19**, (±)-SFO **3** (14 μmol) was added to [¹⁵N₅]-2'-deoxyguanosine **18** (400 μL, 7 μmol) in 0.2 N K₂HPO₄ (pH 7.4) buffer solution and incubated at 37 °C for 72 h. The reaction mixture was subjected to HPLC separation as mentioned above. The corresponding peaks were collected and concentrated to serve as a stock solution without further purification.

1.4.12 High Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry (HPLC–ESI-MS/MS) for Quantification of DNA Adducts in Calf Thymus DNA.

HPLC-ESI-MS/MS analyses were performed on an API 3000TM spectrometer (Applied Biosystems/ MDS SCIEX, Foster City, CA) together with Hitachi L-7000 pump and L-7200 autosampler (Hitachi Ltd., Tokyo). Electrospray ionization source was used in the positive mode (ESI⁺-MS/MS) throughout the study. A Prodigy ODS (3) column, 150 × 2.1 mm, 5 μm (Phenomenex, Torrance, CA) was utilized. Total ion chromatograms and mass spectra were recorded on a personal computer with the Analyst software version 1.1 (Applied Biosystems). The mobile phase consisted of a linear gradient from 0% to 42% acetonitrile in 50 mM ammonium formate buffer (pH 5.5) from 0 to 25 min at a flow rate of 200 μL/min. The MRM mode was used for quantitative analysis of adducts **11** and **12** (m/z 430→314), isotope enriched adducts [¹⁵N₅]-N¹γ-SFO-dAdo **11** and [¹⁵N₅]-N⁶γ-SFO-dAdo **12** (m/z 435→319), adducts **16** and **17** (m/z 314→136), adducts **19** (m/z 330→152), isotope enriched adducts [¹⁵N₅]-N⁷γ-SFO-Gua **19** (m/z 335→157), with the collision energy set at 29, 27, 35 and 39 V, respectively. The dwell time for MRM experiments was set at 150 ms. Nitrogen was used as the turbo gas with temperature set at 450 °C; it was further used as the nebulizer, curtain, and collision gas with pressure settings of 8, 8, and 12 psi, respectively. Calibration curves were established in the concentration range 5 to 250 ng/mL for adducts **11**, **12**, **16**, and **19**.

1.4.13 Reaction of (\pm)-SFO 3 with Calf Thymus DNA.

Calf thymus DNA (1 mg) in Tris-HCl buffer (pH 7.5–8.5, 1 mL) containing 1 mM EDTA was kept at 4 °C for overnight as a stock solution. A solution of 100 μ L of DNA (100 μ g) was hydrolyzed with a mixture of DNase I (4 U), phosphodiesterase I (32 mU), phosphodiesterase II (80 mU), and acid phosphatase (1 U), and incubated at 37 °C for 8–10 h (Matter et al., 2006; Pang et al., 2007). The amounts of reagents were adjusted according to the amounts of DNA in the sample. To evaluate the efficiency of enzymatic hydrolysis, calibration curves of dAdo, dGuo, dCyd, and dThd were established using HPLC analysis. The retention time of each 2'-deoxyribonucleosides was at 9.9 min (dCyd), 12.4 min (dGuo), 14.6 min (dThd), and 16.7 min (dAdo) (data not shown), respectively. The hydrolysis efficiency of double strand calf thymus DNA was estimated to be 97.8%.

Calf thymus DNA (10 mg) was reacted with (\pm)-SFO 3 (60 μ mol) in 10 mL of 0.2 N K_2HPO_4 buffer at pH 7.4 and incubated at 37 °C for 72 h. All samples were then kept in an ice bath for a few hours to vaporize the Et_2O and then analyzed using two different methods modified from Goggin et al. (Goggin et al., 2007) Method 1: The solution was spiked with 100 μ L of the isotope enriched [$^{15}N_5$]- $N1\gamma$ -SFO-dAdo **11** (4 ng), [$^{15}N_5$]- $N^6\gamma$ -SFO-dAdo **12** (9 ng), $N9\gamma$ -SFO-Ade **16** (5 ng), and [$^{15}N_5$]- $N7\gamma$ -SFO-Gua **19** (4 ng) to serve as internal standards and then filtered with a 0.22 μ m PVDF membrane to remove the DNA backbone for HPLC-ESI-MS/MS analysis. Method 2: The reaction mixture was subjected to neutral thermal hydrolysis at 70 °C for 1 h follow by hydrolysis

of the biopolymer using an enzymatic method described above (final volume 1 mL), and then analyzed after removal of the enzymes by filtration. Calibration curve of each DNA adduct with added internal standards was established for quantitative analysis by HPLC-ESI-MS/MS method.

1.4.14 Animal Experiments.

The animal experiment was approved by and conducted in accordance with the China Medical University Animal Ethics Committee guidelines on animal care. Sixteen male FVB mice aged 6 to 7 weeks and weighing 20–25 g were purchased from the National Laboratory Animal Center (Taipei, Taiwan). Animals were acclimatized for seven days prior to (±)-SFO **3** treatment. (±)-SFO **3** was dissolved in olive oil and the final concentration was 9 mg/mL of (±)-SFO **3**. Mice were divided into control (5 mice) and exposed groups (four groups with a total of 11 mice). For the exposed group, mice were intraperitoneally injected with 30 mg/kg body weight of (±)-SFO **3** in olive oil and then housed in 4 metabolic cages. There were 2, 3, 3, and 3 mice in each group. For the control group, mice were intraperitoneally injected with the same volume of olive oil as the exposed group. Urine samples were collected at 24, 48, and 72 h after treatment. The collected urine samples were mixed with 10 µL of sodium azide (final concentration 0.05%) and centrifuged at 3000 rpm for 10 min at room temperature. The supernatant was collected and stored at –80 °C until used for analysis.

1.4.15 High Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization-Tandem Mass (LC–ESI-MS/MS) Spectrometric Method for Mice Urine Analysis.

A reversed-phase HPLC system with an autosampler (ACCELA, Thermo Scientific, MA) was used for quantification. Sample (20 μ L) was injected into a C₁₈ column (150 \times 2.1 mm, 3 μ m, HyPURITY® C18; Thermo Hypersil-Keystone). The mobile phase consisted of 10 mM ammonium formate buffer pH 5.1 (solution A) and 0.1 % formic acid in acetonitrile (solution B) and was delivered at 200 μ L/min. For the analysis of mouse urine, a gradient of 0% B from 0 to 3 min, 0–18% B from 3 to 28 min, 18–100% B from 28 to 31 min, 100–0% B from 31 to 32 min, and 0% B from 32 to 35 min was applied. A triple-quadrupole tandem mass spectrometer (TSQ Quantum ACCESS, Thermo Scientific, MA) comprising a heated-electrospray ionization (H-ESI) source was operated in the positive ion mode. Quantification of *N*7 γ -SFO-Gua **19** was carried out by monitoring the ion pairs m/z 330 \rightarrow 152 and [¹⁵N₅]-*N*7 γ -SFO-Gua **19** was monitored by the ion pairs m/z 335 \rightarrow 157 in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The vaporizer temperature was set at 300 °C, nitrogen sheath gas was set at 35, auxiliary gas was set at 15, and the heated capillary temperature was set at 300 °C. Collision energy of 23 eV was applied. The argon gas pressure was set at 0.2 Pa for collision-induced dissociation (CID), and the discharge current was set at 5 μ A. Total ion chromatograms and mass spectra were recorded on a personal computer with Xcalibur software (Version 2.0.7, Thermo Fisher Scientific Inc., MA).

1.4.16 Analysis of *N7* γ -SFO-Gua **19** in Urines of Mouse Treated with (\pm)-SFO **3**.

Urine samples (200 μ l) of mice were spiked with 17 μ L of [$^{15}\text{N}_5$]-*N7* γ -SFO-Gua **19** (13 pg/ μ L) with a final concentration of 1.1 ng/mL. These samples were filtered through 0.22 μ m PVDF membrane filter, and then analyzed using the newly-developed isotope-dilution HPLC-ESI-MS/MS method. Creatinine in each urine sample was analyzed at a local hospital (Taipei, Taiwan). The concentration of *N7* γ -SFO-Gua **19** in urine was adjusted to the level of creatinine and expressed as ng/mg creatinine.

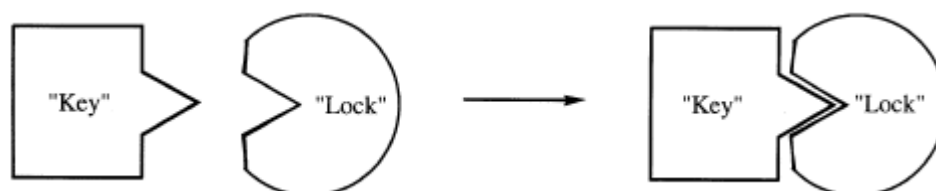
N7 γ -SFO-Gua **19** standard solutions (0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, and 5 ng/mL) were prepared in urine from control mice. Each standard solution was spiked with 17 μ L of [$^{15}\text{N}_5$]-*N7* γ -SFO-Gua **19** (13 pg/ μ L) with a final concentration of 1.1 ng/mL, follow by filtration through a 0.22 μ m PVDF membrane filter. Linear calibration curve were constructed by plotting the ratios of the peak areas for *N7* γ -SFO-Gua **19** and [$^{15}\text{N}_5$]-*N7* γ -SFO-Gua **19** versus the concentrations of the standards, the sample was ready for analysis with our newly developed isotope-dilution HPLC-ESI-MS/MS method. The precision was evaluated by repeatedly analyzing the calibration standard solutions 5 times on three different days.

第二章 製備 2'-去氧腺嘌呤模版高分子

2.1 緒論

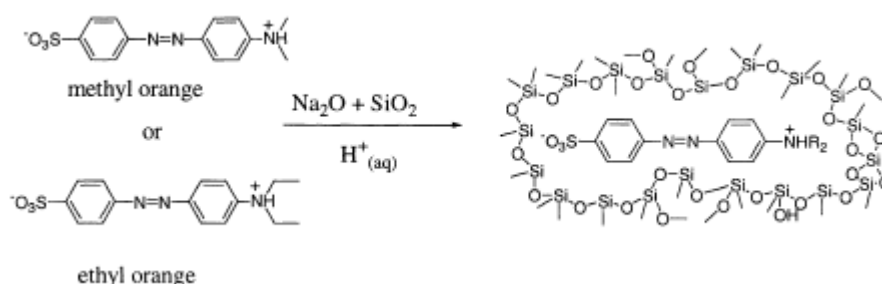
2.1.1 分子模版的發展歷史

早期的分子模版 (molecular imprinting) 是以酵素的功能 (enzyme function) 與抗體的形成 (antibody formation) 為理論基礎所發展出來。1894 年德國科學家 Emil Fischer 提出了 “lock and key” 的理論描述酵素的專一性 (specificity) (圖三十八), 酵素除了形狀與受質 (substrate) 互補 (complementary) 之外也必須具有與受質作用之功能性基團 (functional group), 而這些作用包括: 氫鍵作用力 (hydrogen bonding)、靜電作用力 (electrostatic bonding) 和疏水作用力 (hydrophobic force)。而 Mudd 和 Pauling 提出抗體的形成是氨基酸或胜肽在抗原 (antigen) 表面進行合成所得, 而抗體的專一性便是來自於其具有與抗原互補結構的立體化學, 這種以目標物分子形成自己的辨識基座的理論對接下來發展分子模版的影響非常大 (Mudd, 1932; Pauling, 1940)。



圖三十八、Emil Fischer 所提出 “lock and key” 的理論示意圖 (Spivak and Shea, 2001)。

1940 年開始，Pauling 與 Dickey 利用酵素和抗體為理論基礎，將不同取代之 alkylorange 染料與矽酸鈉一起聚合（圖三十九），之後利用溶劑將這些染料洗去，得到對這些染料具有選擇性之矽膠凝體，正式開啟了分子模版研究的大門（Pauling, 1940; Dickey, 1949）。

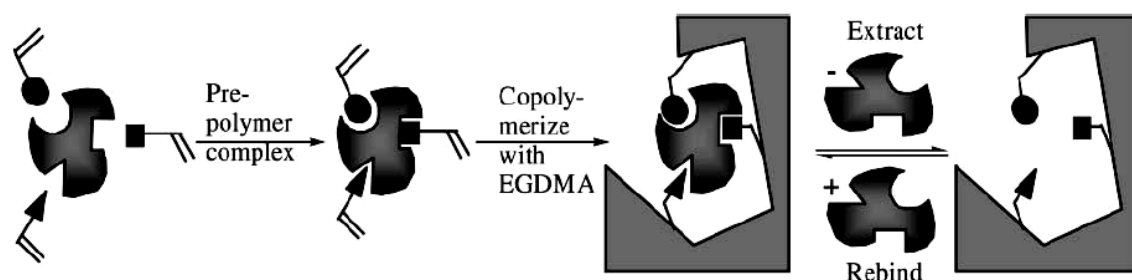


圖三十九、可選擇性吸附不同取代基的染料之矽高分子(silica polymer) (Dickey, 1949; Spivak and Shea, 2001)。

2.1.2 分子模版高分子 (molecularly imprinted polymer, MIP) 設計概念

分子模版高分子設計概念如下圖四十所示 (Spivak et al., 1997)，首先將想要辨識之目標分子當成模版 (template)，利用高分子單體 (monomer) 將模版分子圍繞聚合起來輔助高分子孔洞的形成，接著加入大量的交聯單體 (cross-linking monomer) 與等體積之不具反應性之溶劑做為致孔劑 (porogen)，最後再加入自由基的起始劑利用熱化學

(thermalchemical)或光化學 (photochemical) 方式進行分子模版高分子的反應，形成不可溶之網狀高分子，最後在不破壞分子模版高分子共價鍵結的情況下利用溶劑將模版分子移除，形成具專一性辨識之分子模版高分子 (macroporous polymer)。



圖四十、分子模版高分子設計概念 (Spivak and Shea, 2001)。

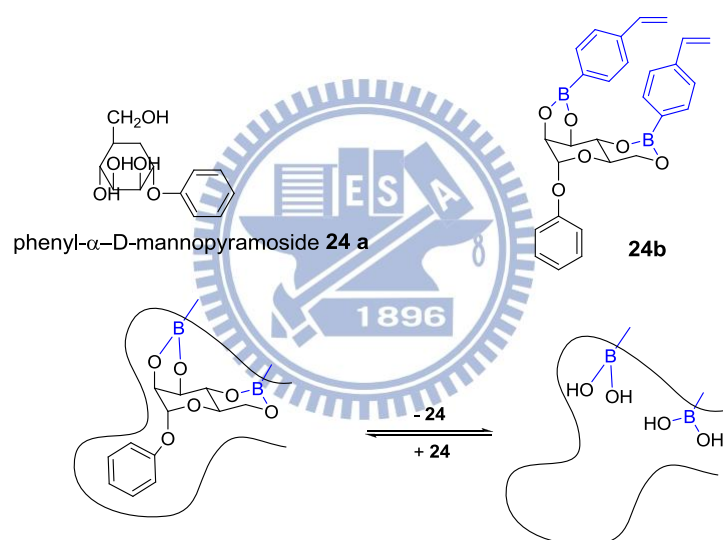
2.1.3 模版與單體間的作用力

模版與單體之間的作用力是主要決定模版高分子孔洞形成的關鍵因素，而這個作用力可以是共價鍵 (covalent bond) 或是非共價鍵 (noncovalent bond) 來輔助孔洞的形成，不論哪一種作用力，都必須可以在不破壞分子模版高分子的結構下，將模版移除形成具專一性辨識之孔洞。

共價鍵結

利用共價鍵結來輔助孔洞的形成，最早是由 Wulff 研究團隊 1977 年

(Wulff et al., 1977a; Wulff et al., 1977b) 提出，將模版分子 phenyl- α -D-mannopyranoside (**24a**) 與兩分子的 4-vinylphenylboronic acid 單體 (**24b**) 反應形成共價鍵結後，再加入大量的交聯試劑二甲基丙烯酸乙二醇酯 (ethylene glycol dimeth acrylate, EGDMA) 在惰性溶劑中共同聚合 (copolymerization) 製備出分子模版高分子 (圖四十一)，接著利用水或甲醇可以移除 95% 的模版 (Wulff and Schauhoff, 1991)。

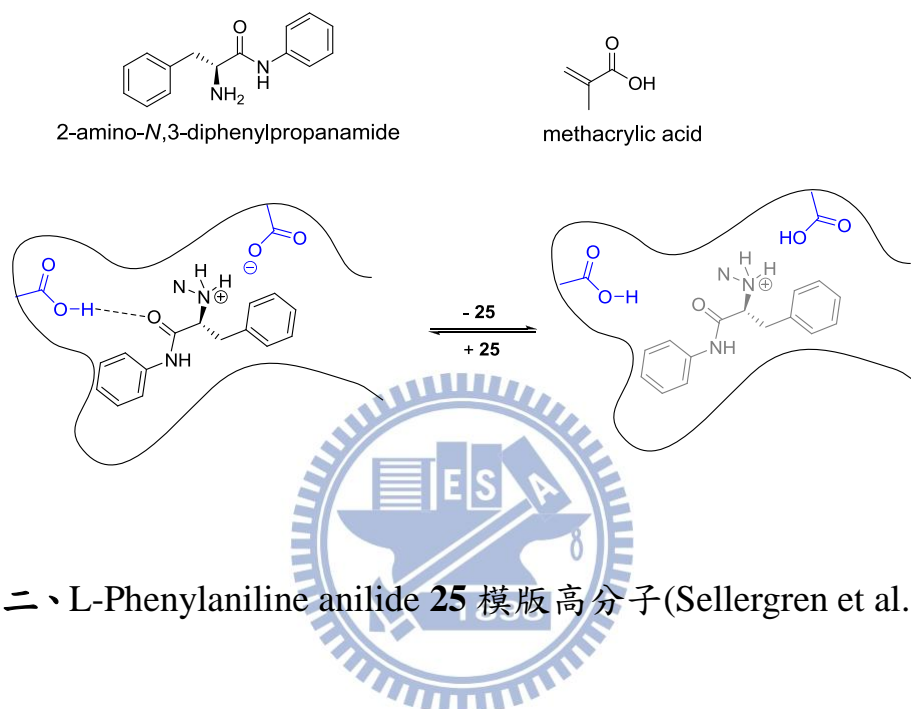


圖四十一、Phenyl- α -D-mannopyranoside **24** 之分子模版高分子(Wulff et al., 1977b)。

非共價鍵結

利用非共價鍵結來輔助孔洞的形成，最早是由 Mosbach 與 Shea 的

研究團隊將 L-phenylalanine anilide (**25**) 做為模版分子，methacrylic acid 為單體（圖四十二），利用模版分子與單體之間存在靜電與氫鍵的非共價鍵結作用力形成分子孔洞，讓分子模版應用更廣。

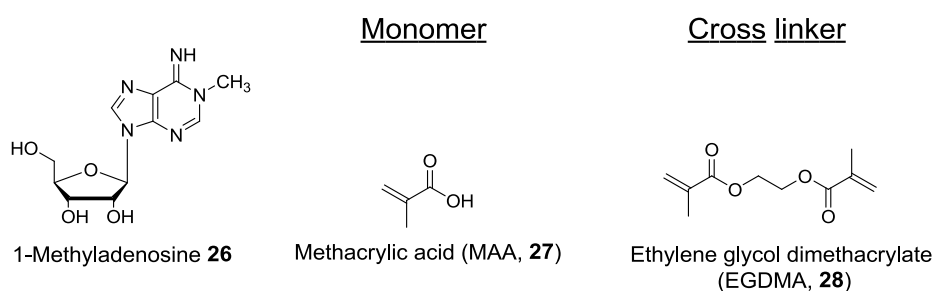


圖四十二、L-Phenylalanine anilide **25** 模版高分子(Sellergren et al., 1988)。

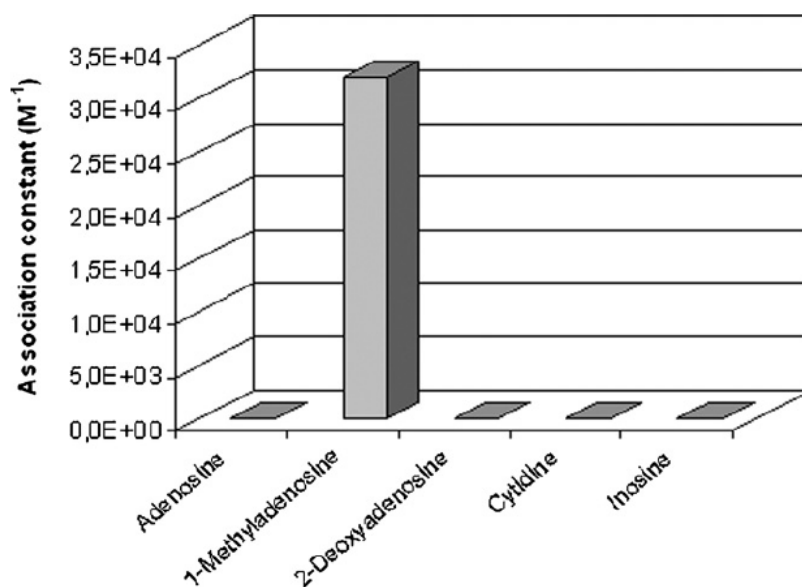
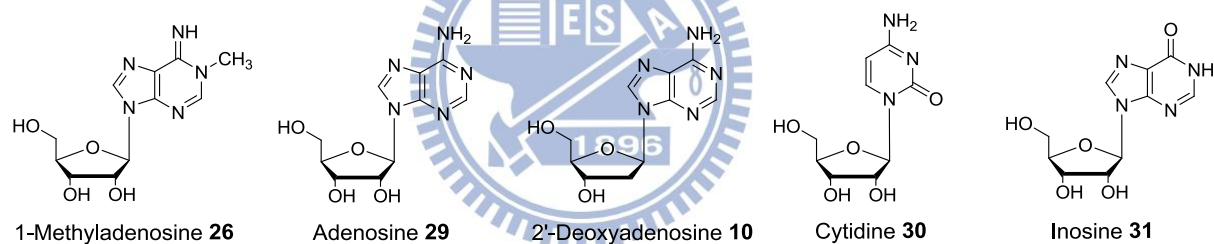
2.1.4 研究動機

核苷酸鹼基 (nucleotide bases) 分子模版高分子的研究，最早是由 Shea 研究團隊於 1993 年合成 9-ethyladenine 模版高分子開啟了核苷酸鹼基分子模版高分子的研究 (Shea et al., 1993; Spivak et al., 1997; Spivak and Shea, 1998)。2010 年 Scorrano 等人利用甲基丙烯酸 (methacrylic acid, MAA **27**) 當成單體 (monomer)、二甲基丙烯酸乙二醇酯 **28** 當成交聯劑 (crosslinker) (圖四十三) 以及乙氰/水(4/1, v/v)混合溶劑當成致孔劑，製備辨識 1-methyladenosine **26** 的 1-methyladenosine 模版高分子。實驗結

果顯示所製備的分子模版高分子在 adenosine **29**、2'-deoxyadenosine **10**、cytidine **30**、inosine **31** 同時存在下僅對 1-methyladenosine **26** 具有專一選擇性 (圖四十四)。

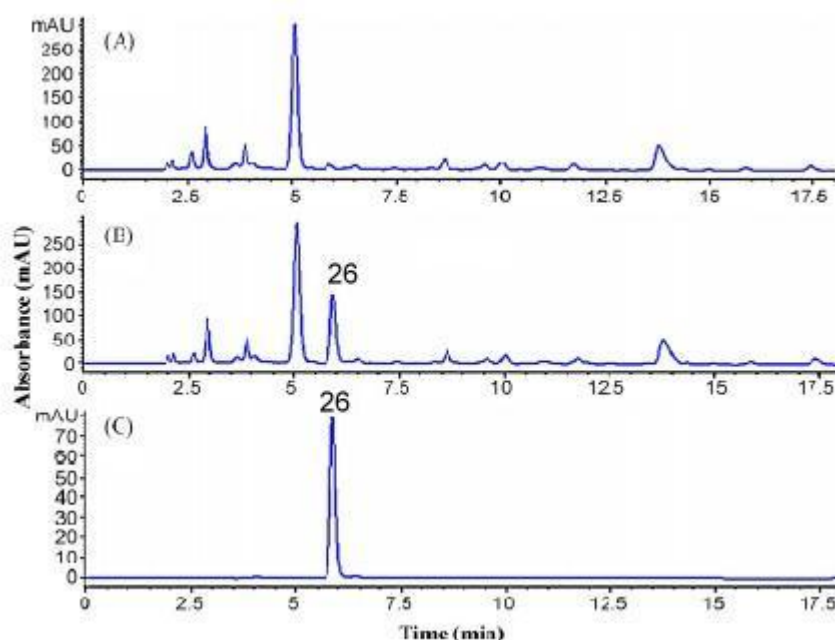


圖四十三、模版分子 1-methyladenosine **26**、甲基丙烯酸 **27** 單體與二甲基丙烯酸乙二醇酯 **28** 交聯劑之構造。



圖四十四、1-methyladenosine **26** 分子模版高分子與不同核苷酸鹼基之結合常數。

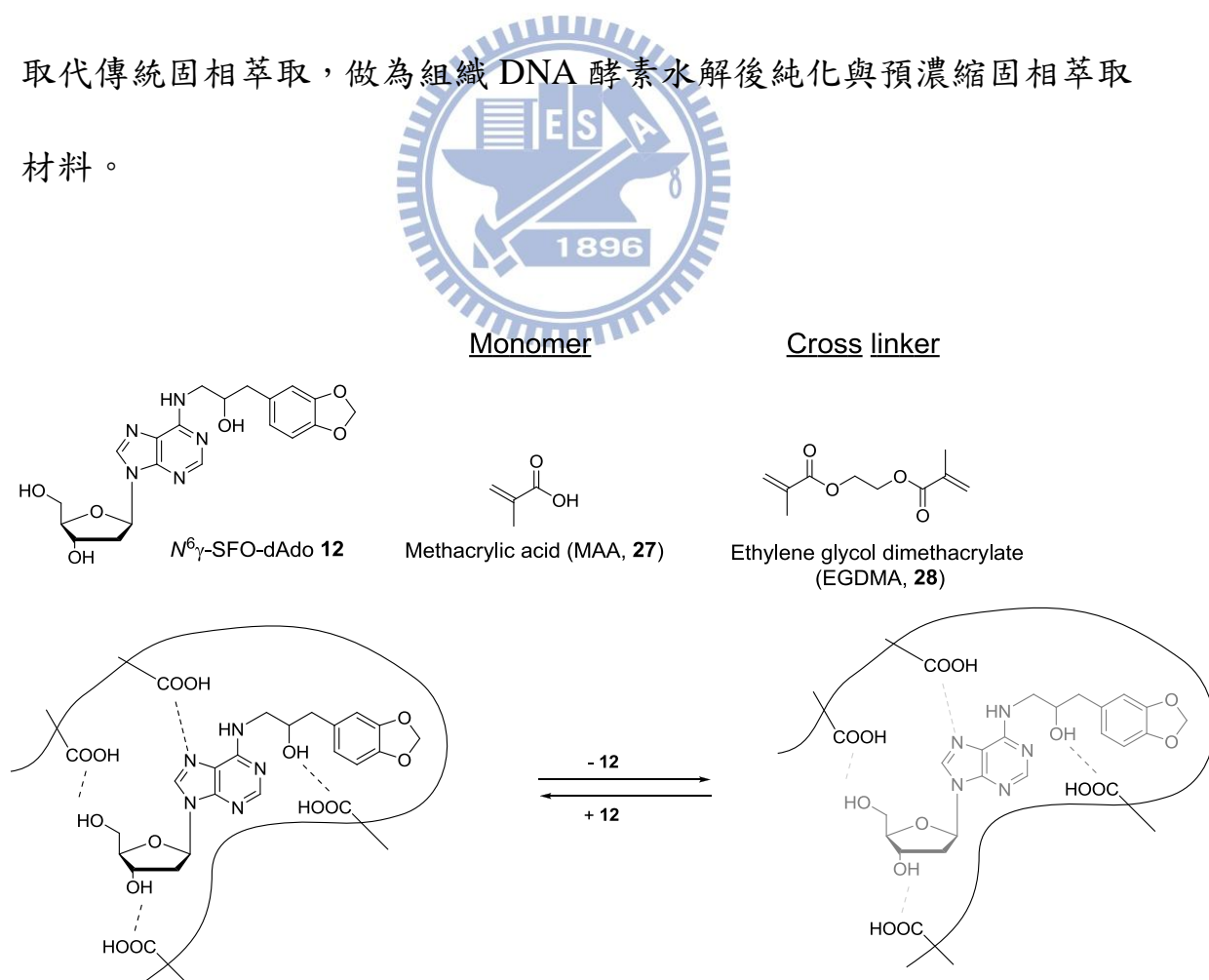
除此之外，作者也將此 1-methyladenosine **26** 分子模版高分子做為固相萃取 (MIP-SPE) 的填充材料，並將加入 1-methyladenosine **26** 的尿液樣本進行固相萃取並以乙腈/水/醋酸 (4/1/1, v/v/v) 之混合液沖提。利用高效液相層析分析 (圖四十五)，可看到經過固相萃取可將尿液中的間質去除。



圖四十五、高效液相層析圖譜。(A) 尿液樣品、(B) 加入 1-methyladenosine **26** 的尿液樣品以及(C)將加入 1-methyladenosine **26** 的尿液樣品經過分子模版高分子萃取 (Scorrano et al., 2010)。

間質影響 (matrix effect) 是分析生物樣品時最大的干擾，因此可以發展對分析物具專一性鍵結之分子模版高分子作為固相萃取或是層析管柱填充材料，提高分析之靈敏度。在本論文第一部份已經由動物實驗

證實黃樟素代謝產物 SFO 3 在體內會攻擊 DNA 產生 SFO-DNA 加成產物，為了進一步探討 SFO 的基因毒性，我們將分析給予黃樟素代謝產物 SFO 3 的老鼠不同器官之組織 DNA，並經由酵素將組織 DNA 水解後分析 $N^1\gamma$ -SFO-dAdo 11 與 $N^6\gamma$ -SFO-dAdo 12 的生成量。由於 $N^1\gamma$ -SFO-dAdo 11 會經由 Dimroth rearrangement 重排成 $N^6\gamma$ -SFO-dAdo 12，所以我們會在鹼性條件下將 $N^1\gamma$ -SFO-dAdo 11 重排成 $N^6\gamma$ -SFO-dAdo 12 並在分析之前利用 C18 之固相萃取匣進行樣品的純化以及預濃縮，因此我們想發展可辨識 $N^6\gamma$ -SFO-dAdo 12 分子模版高分子（圖四十六）取代傳統固相萃取，做為組織 DNA 酵素水解後純化與預濃縮固相萃取材料。



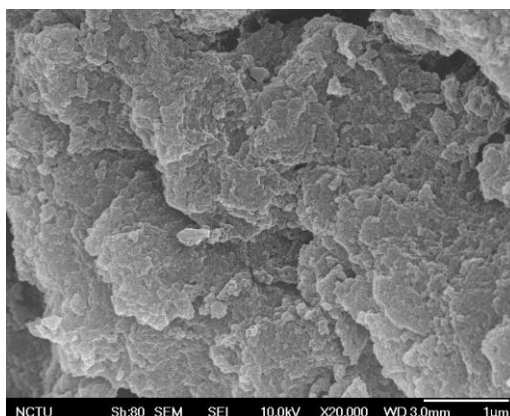
圖四十六、DNA 加成產物 $N^6\gamma$ -SFO-dAdo 12 分子模版高分子。

2.2 結果與討論

由於所合成之 $N^6\gamma$ -SFO-dAdo **12** 量非常的少，我們先依照文獻的實驗方法先合成 2'-去氧腺嘌呤 **10** 模版高分子，建立分子模版高分子技術。

2.2.1 2'-去氧腺嘌呤 (2'-deoxyadenosine, 2'-dAdo **10**) 與甲基丙烯酸 (methacrylic acid, MAA **27**) 結合之變溫 NMR 量測

本實驗開始之初參照文獻 (Scorrano et al., 2010) 在 60 °C 下加熱進行分子模版高分子之聚合反應，並利用乙氰/水/醋酸 (4/1/1, v/v/v) 之混合液將模版分子洗去，但得到之分子模版高分子經測試並不具任何分子鍵結能力，同時掃描式電子顯微鏡 (scanning electron microscope, SEM) 拍攝所得到的 MIP 形態 (morphology) (圖四十七) 也與文獻上所報導這類分子模版高分子會有花椰菜的形態不同，因此我們推測在 60 °C 下，模版分子與單體 **27** 之間的氫鍵作用力已經不存在因此無法得到具辨識效果孔洞之分子模版高分子。

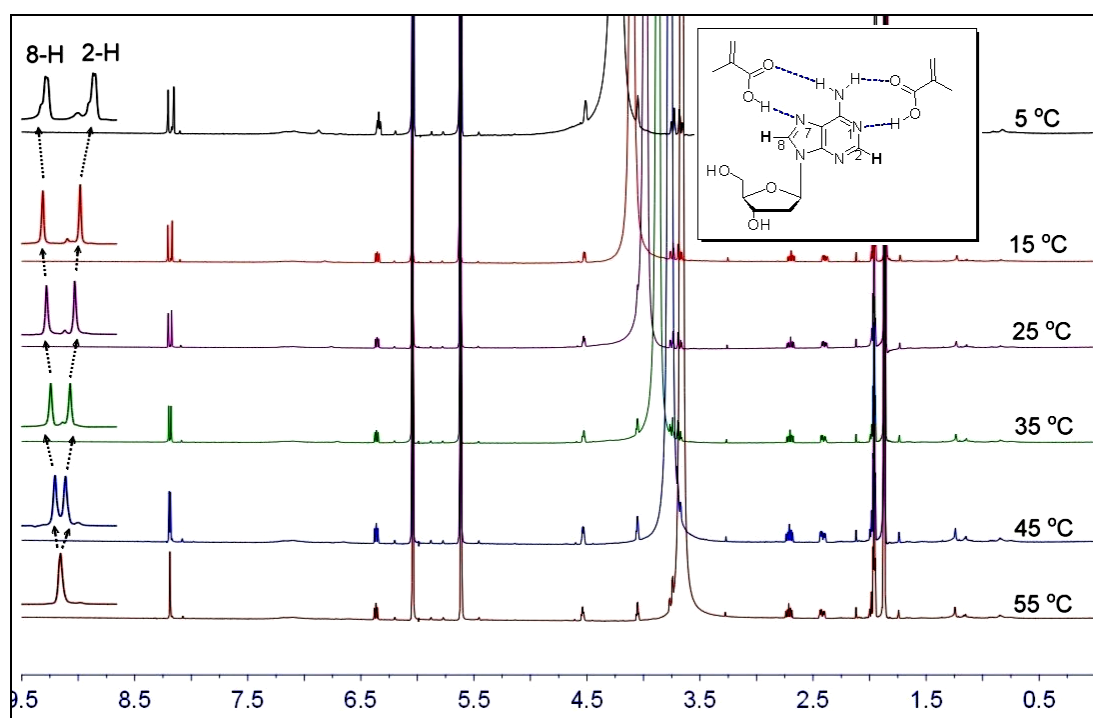


圖四十七、利用熱化學法 (60 °C) 製備 2'-去氧腺嘌呤模版高分子之掃描式電子顯微鏡圖。

由於文獻上報導，當 2'-去氧腺嘌呤上的鹼基與醋酸間有氫鍵作用力存在時，2-H 與 8-H 隨著溫度降低時會分別往高磁場區 (upfield) 與低磁場(downfield) 區位移 (附圖三十九) (Rao et al., 1999; Basilio Janke et al., 2004) 為了找尋最佳化反應條件，我們將 2'-去氧腺嘌呤與甲基丙烯酸配製在合成分子模版高分子 (molecular imprinting polymer, MIP) 時的 $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O} = 4:1$ 混合溶劑，利用 ^1H NMR 進行變溫實驗，探討 2'-去氧腺嘌呤與甲基丙烯酸之間的氫鍵作用。

根據文獻上的研究我們將 25 °C 所測得之 ^1H NMR 光譜，化學位移 $\delta 8.17$ ppm 與 $\delta 8.20$ ppm 的訊號分別定為 2'-去氧腺嘌呤上 2-H 與 8-H 的訊號 (圖四十八) (Narukulla et al., 2008)。從變溫實驗中，我們可以看到在 55 °C 所測得之 ^1H NMR 光譜，化學位移 $\delta 8.19$ ppm 為 2-H 與 8-H 重疊在一起之訊號隨著溫度降低氫鍵作用越強，2-H 會朝高磁場區移動

而 8-H 會朝低磁場區移動，可確定一開始所使用加熱 (60 °C) 進行模版
高分子聚合反應已經破壞了模版分子與甲基丙烯酸單體 **27** 之間的氫
鍵，因此我們修改反應方法利用照光裂解產生自由基進行分子模版高
分子聚合。

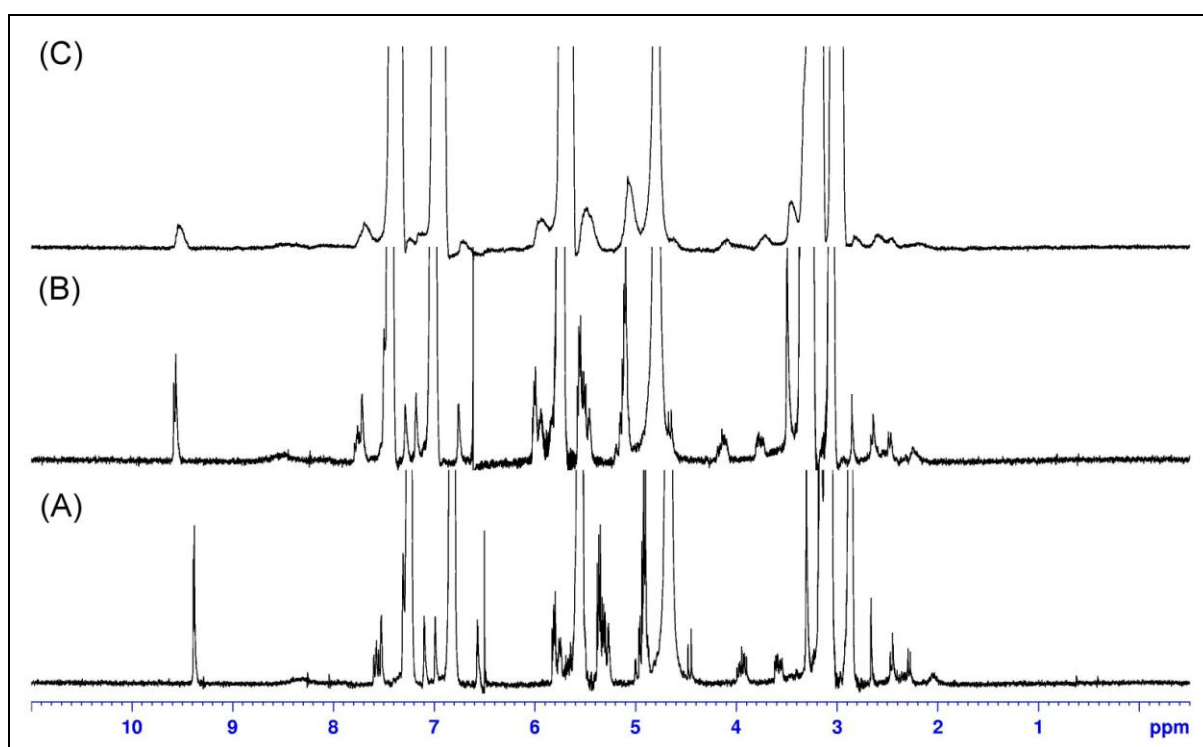


圖四十八、2'-去氧腺嘌呤 **10** 與甲基丙烯酸 **27** 以 1:14 之莫耳比例混合
後，進行變溫實驗之 ^1H NMR 光譜(500 MHz, $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O} = 4:1$)。

2.2.2 2'-去氧腺嘌呤模版高分子之聚合

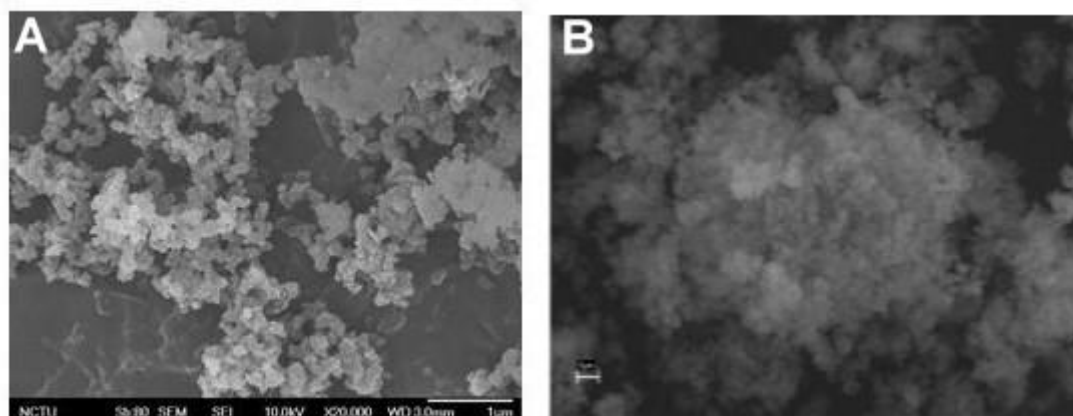
為了監控 2'-去氧腺嘌呤模版高分子的聚合，將 2'-去氧腺嘌呤 **10**、

甲基丙烯酸 **27**、甲基丙烯酸乙二醇酯 **28** 與偶氮二異丁腈 **32** 以 1:14:75:9 的莫耳比例配製在 $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O} = 4:1$ 之氘溶劑中，並利用 $^1\text{H NMR}$ 進行反應的監控。從圖四十九可看到，隨著時間增加氫譜的訊號逐漸變寬而可以知道利用 UV 燈 (365 nm) 在 0°C 下照射一分鐘反應 16 小時後雖然沒有看到固體的生成，但是從氫譜的訊號逐漸變寬 (圖四十九 C) 可以確認知道聚合反應的進行。



圖四十九、2'-去氧腺嘌呤 **10**、甲基丙烯酸 **27**、甲基丙烯酸乙二醇酯 **28** 以 1:14:75 和偶氮二異丁腈 **29** 反應監控之 $^1\text{H NMR}$ 光譜圖 (300 MHz, $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O} = 4:1$)。(A) 未光照之混合液、(B) 在 0°C 下以 UV 燈 (365 nm) 進行光照 1 分鐘、(C) 聚合反應 16 小時。

除此之外所得之高分子固體，利用掃描式電子顯微鏡 (scanning electron microscope, SEM) 拍攝所得到的 MIP 的形態(morphology) (圖五十 A)，與文獻報導此類的分子模版高分子會有類似花椰菜(cauliflower) 的形態 (圖五十 B) 相似 (Scorrano et al., 2010)。

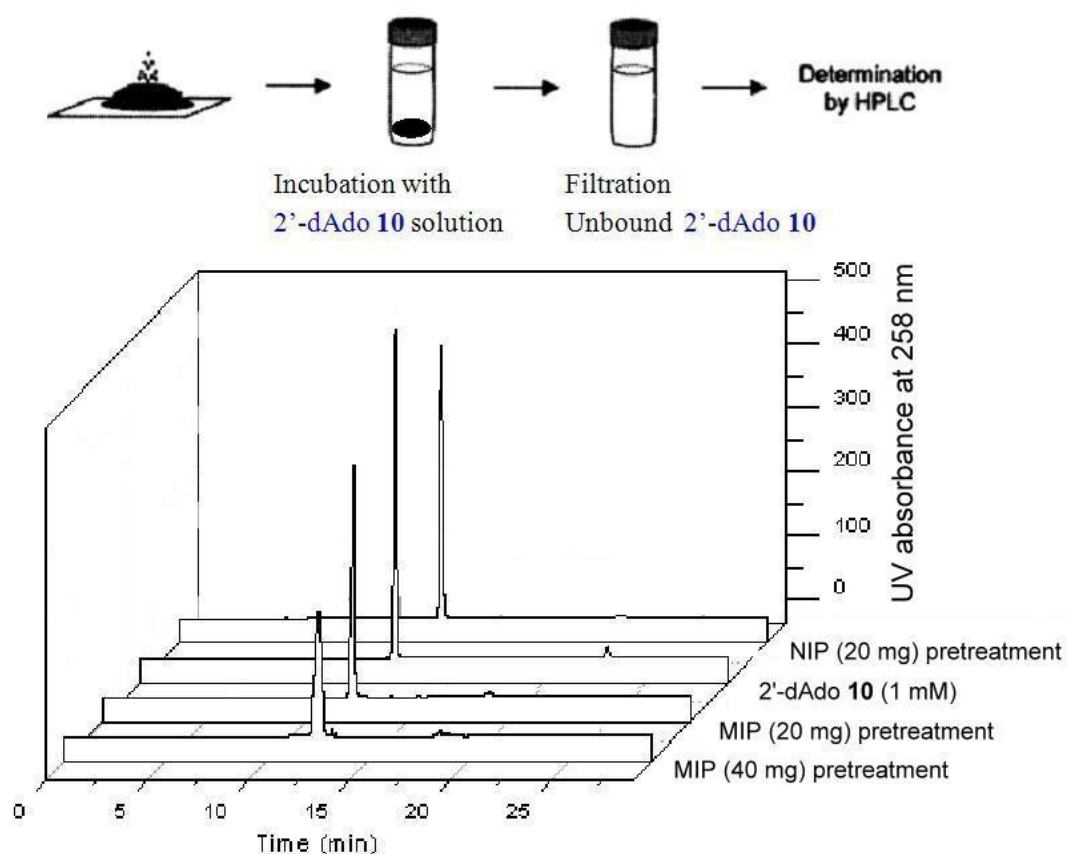


圖五十、分子模版高分子的掃描式電子顯微鏡圖。(A) 2'-去氧腺嘌呤模版高分子；(B)文獻之 1-Methyladenosin 模版高分子 (Scorrano et al., 2010)。

2.2.3 2'-去氧腺嘌呤模版高分子之鍵結能力

為了評估所得之 2'-去氧腺嘌呤 **10** 分子模版高分子是否具有鍵結能力，我們將 2'-去氧腺嘌呤 **10** 溶液加入 MIP (實驗組) 與 NIP (non-imprinting polymer) (控制組) 混合隔夜偵測溶液中 2'-去氧腺嘌呤 **10** 濃度是否減少。從圖五十一可以得知，只有加入 MIP 溶液中 2'-去氧

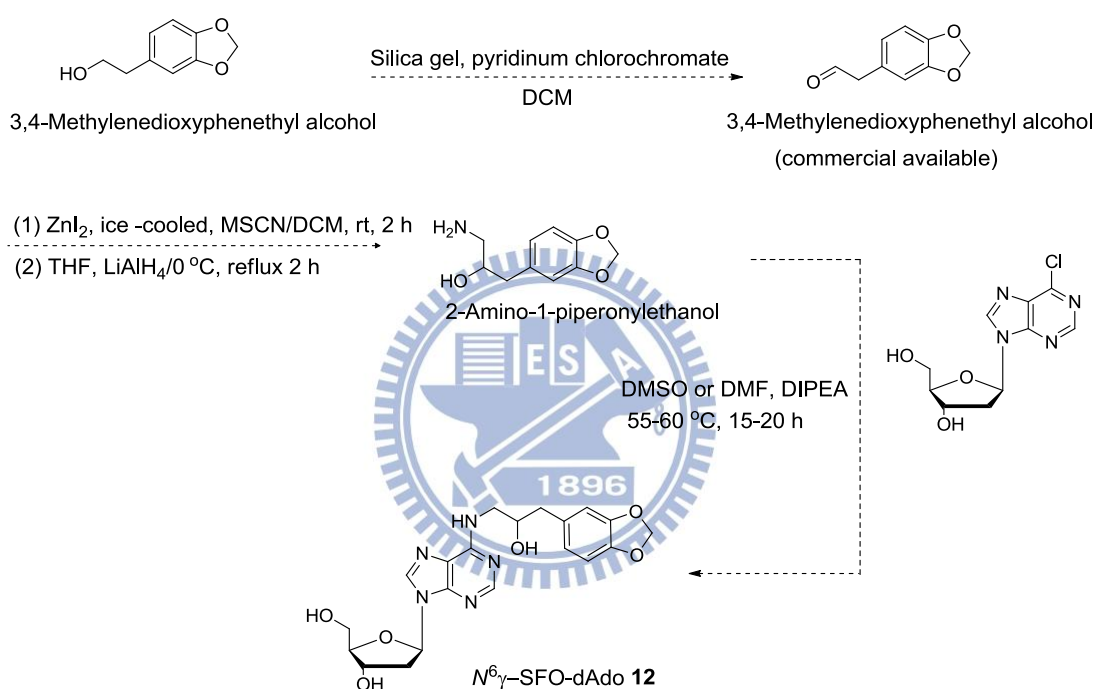
腺嘌呤 **10** 濃度有減少，同時隨著加入 MIP 的量增加溶液中 2'-去氧腺嘌呤 **10** 濃度也減少，更可以證明我們所合成之分子模版高分子對 2'-去氧腺嘌呤 **10** 具有再鍵結 (rebind) 的能力。



圖五十一、2'-去氧腺嘌呤 **10** (1 mM) 加入模版高分子 (20 mg、40 mg) 與非模版高分子 (non-imprinting polymer, NIP 20 mg) 反應隔夜後，注入 25 μ L 澄清液，溶液中未鍵結之 2'-去氧腺嘌呤 **10** 之高效液相層析圖。

2.3 未來工作

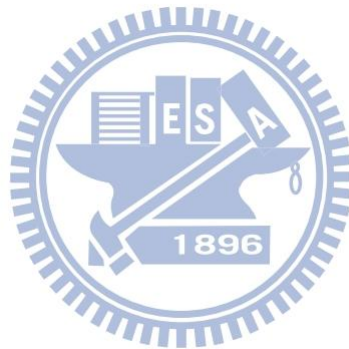
由於目前 $N^6\gamma$ -SFO-dAdo **12** 的合成主要是在生理條件下進行反應並利用高效液相層析純化收集，並無法得到大量的產物，因此我們必須修改合成路徑來取得 $N^6\gamma$ -SFO-dAdo **12**，修正後之合成路徑如下：



式圖十一、加成產物 $N^6\gamma$ -SFO-dAdo **12** 的合成。

2.4 結論

第二部分的研究我們最佳化反應條件，成功合成可鍵結 2'-去氧腺嘌呤 **10** 之分子模版高分子，而此分子模版高分子技術的建立，未來將可針對不同之模版分子合成具專一性鍵結之分子模版高分子。



2.5 實驗方法

2.4.1 Preparation of Molecularly Imprinted Polymer.

The polymer imprinted with 2'-deoxyadenosine **10** (MIP) was prepared as follows: 0.0468 mmol of **10** were dissolved in 2 mL of acetonitrile/water (4/1, v/v) in a round bottle and 0.661 mmol of MAA **20** and 3.520 mmol of EGDMA were added to the solution. Then, 0.042 mmol of AIBN as initiator was added and the mixture was degassed in a sonicating bath flushing with nitrogen gas for 5 min to remove oxygen and sealed. The polymerization was initiated photochemically by a standard laboratory UV light source at 0 °C for 1 min and allowed to proceed for 24 h. The resulting polymer was ground in a mortar. After crushing, the polymers were soxhlet extracted in methanol overnight, then dried under vacuum. A control (non-imprinted) polymer (NIP) was prepared using the same conditions except for the addition of the template.

2.4.2 Batch Rebinding Studies.

A stock solution of 1 mM of 2'-deoxyadenosine (2'-dAdo **10**) in CHCN₃/H₂O (4:1) solution was prepared. A 3.5 mL of 2'-dAdo solution was then added to 4 mL glass vial containing 20 mg NIP, no polymer, 20 mg MIP, and 40 mg MIP. The vials were then shaken overnight. The concentration of unbinding 2'-dAdo **10** was measured by HPLC after filtration on 0.22 μm PVDF syringe filter.

第三章 參考文獻

- Barlow, T.; Ding, J.; Vouros, P.; Dipple, A. Investigation of hydrolytic deamination of 1-(2-hydroxy-1-phenylethyl)adenosine. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 1247-1249.
- Barlow, T.; Dipple, A. Formation of deaminated products in styrene oxide reactions with deoxycytidine. *Chem. Res. Toxicol.* **1999**, *12*, 883-886.
- Barlow, T.; Takeshita, J.; Dipple, A. Deamination and dimroth rearrangement of deoxyadenosine styrene oxide adducts in DNA. *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11*, 838-845.
- Basilio Janke, E.M.; Limbach, H.H.; Weisz, K. Binding of an acetic acid ligand to adenosine: a low-temperature NMR study. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2135-2141.
- Bastlova, T.; Podlutsky, A. Molecular analysis of styrene oxide-induced hprt mutation in human T-lymphocytes. *Mutagenesis* **1996**, *11*, 581-591.
- Benedetti, M.S.; Malnoe, A.; Broillet, A.L. Absorption, metabolism and excretion of safrole in the rat and man. *Toxicology* **1977**, *7*, 69-83.
- Boiteux, S.; Guillet, M. Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair* **2004**, *3*, 1-12.
- Borchert, P.; Miller, J.A.; Miller, E.C.; Shires, T.K. 1'-Hydroxysafrole, a proximate carcinogenic metabolite of safrole in the rat and mouse. *Cancer Res.* **1973a**, *33*, 590-600.
- Borchert, P.; Wislocki, P.G.; Miller, J.A.; Miller, E.C. The metabolism of the naturally occurring hepatocarcinogen safrole to 1'-hydroxysafrole and the electrophilic reactivity of 1'-acetoxysafrole. *Cancer Res.* **1973b**, *33*, 575-589.

- Boysen, G.; Pachkowski, B.F.; Nakamura, J.; Swenberg, J.A. The formation and biological significance of *N7*-guanine adducts. *Mutat. Res.* **2009**, *678*, 76-94.
- Cadet, J.; Ducolomb, R.; Hruska, F.E. Proton magnetic resonance studies of 5,6-saturated thymidine derivatives produced by ionizing radiation. Conformational analysis of 6-hydroxylated diastereoisomers. *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *563*, 206-215.
- Chen, H.J.C.; Hong, C. L. Endogenous DNA adduct: formation and analysis. *The Chinese Chem. Soc.* **2001**, *59*, 299-310.
- Chiang, S.Y.; Lee, P.Y.; Lai, M.T.; Shen, L.C.; Chung, W.S.; Huang, H.F.; Wu, K.Y.; Wu, H.C. Safrole 2',3'-oxide induces cytotoxic and genotoxic effects in HepG2 cells and in mice. *Mutat. Res.* **2011**, *726*, 234-241.
- Chung, Y.T.; Chen, C.L.; Wu, C.C.; Chan, S.A.; Chi, C.W.; Liu, T.Y. Safrole-DNA adduct in hepatocellular carcinoma associated with betel quid chewing. *Toxicol. Lett.* **2008**, *183*, 21-27.
- Cleaver, J.E.; Karplus, K.; Kashani-Sabet, M.; Limoli, C.L. Nucleotide excision repair : a legacy of creativity. *Mutat. Res.* **2001**, *485*, 23-36.
- Csanady, G.A.; Kessler, W.; Hoffmann, H.D.; Filser, J.G. A toxicokinetic model for styrene and its metabolite styrene-7,8-oxide in mouse, rat and human with special emphasis on the lung. *Toxicol. Lett.* **2003**, *138*, 75-102.
- Dickey, F.H. The preparation of specific adsorbents. *Proc. Natl. Acad. Sci* **1949**, *35*, 227-229.
- Du, A.Y.; Zhao, B.X.; Miao, J.Y.; Yin, D.L.; Zhang, S.L. Safrole oxide induces apoptosis by up-regulating Fas and FasL instead of integrin β 4 in A549 human lung cancer cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006a**, *14*,

2438-2445.

Du, A.Y.; Zhao, B.X.; Yin, D.L.; Zhang, S.L.; Miao, J.Y. Safrole oxide induces apoptosis by activating caspase-3, -8, and -9 in A549 human lung cancer cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006b**, *16*, 81-83.

Faller, T.H.; Csanady, G.A.; Kreuzer, P.E.; Baur, C.M.; Filser, J.G. Kinetics of propylene oxide metabolism in microsomes and cytosol of different organs from mouse, rat, and humans. *Toxicol. Appl. Pharm.* **2001**, *172*, 62-74.

Goggin, M.; Loeber, R.; Park, S.; Walker, V.; Wickliffe, J.; Tretyakova, N. HPLC-ESI⁺-MS/MS analysis of *N7*-guanine-*N7*-guanine DNA cross-links in tissues of mice exposed to 1,3-butadiene. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20*, 839-847.

Goggin, M.; Swenberg, J.A.; Walker, V.E.; Tretyakova, N. Molecular dosimetry of 1,2,3,4-Diepoxybutane-induced DNA-DNA cross-links in B6C3F1 mice and F344 rats exposed to 1,3-butadiene by inhalation. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 2479-2486.

Groopman, J.D.; Kensler, T.W. The light at the end of the tunnel for chemical-specific biomarkers: daylight or headlight? *Carcinogenesis* **1999**, *20*, 1-11.

Himmelstein, M.W.; Boogaard, P.J.; Cadet, J.; Farmer, P.B.; Kim, J.H.; Martin, E.A.; Persaud, R.; Shuker, D.E.G. Creating context for the use of DNA adduct data in cancer risk assessment: II. Overview of methods of identification and quantitation of DNA damage. *Crit. Rev. Toxicol.* **2009**, *39*, 679-694.

Hsieh, L.L.; Wang, P.F.; Chen, I.H.; Liao, C.T.; Wang, H.M.; Chen, M.C.; Chang, J.T.C.; Cheng, A.J. Characteristics of mutations in the p53 gene in

oral squamous cell carcinoma associated with betel quid chewing and cigarette smoking in Taiwanese. *Carcinogenesis* **2001**, 22, 1497-1503.

IARC, 1976. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some Naturally Occurring Substances, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

Iyer, R.S.; Voehler, M.W.; Harris, T.M. Adenine adduct of aflatoxin B1 epoxide. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 8863-8869.

Kim, H.Y.H.; Finneman, J.I.; Harris, C.M.; Harris, T.M. Studies of the mechanisms of adduction of 2'-deoxyadenosine with styrene oxide and polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiol epoxides. *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, 13, 625-637.

Koc, H.; Swenberg, J.A. Applications of mass spectrometry for quantitation of DNA adducts. *J. Chromatogr. B* **2002**, 778, 323-343.

Koskinen, M.; Calebiro, D.; Hemminki, K. Styrene oxide-induced 2'-deoxycytidine adducts: implications for the mutagenicity of styrene oxide. *Chem.-Biol. Interact.* **2000a**, 126, 201-213.

Koskinen, M.; Plna, K. Specific DNA adducts induced by some mono-substituted epoxides *in vitro* and *in vivo*. *Chem.-Biol. Interact.* **2000**, 129, 209-229.

Koskinen, M.; Vodicka, P.; Hemminki, K. Adenine N3 is a main alkylation site of styrene oxide in double-stranded DNA. *Chem.-Biol. Interact.* **2000b**, 124, 13-27.

Krause, R.J.; Sharer, J.E.; Elfarra, A.A. Epoxide hydrolase-dependent metabolism of butadiene monoxide to 3-butene-1,2-diol in mouse, rat, and human liver. *Drug Metab. Dispos.* **1997**, 25, 1013-1015.

- Krouželka, J.; Linhart, I.; Tobrman, T. Synthesis of 3-(2-hydroxy-1-phenylethyl)- and 3-(2-hydroxy-2-phenylethyl)adenine, DNA adducts derived from styrene. *J. Heterocyclic Chem.* **2008**, *45*, 789-795.
- Latham, G.J.; Zhou, L.; Harris, C.M.; Harris, T.M.; Lloyd, R.S. The replication fate of R- and S-styrene oxide adducts on adenine N^6 is dependent on both the chirality of the lesion and the local sequence context. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 23427-23434.
- Li, F.; Segal, A.; Solomon, J.J. *In vitro* reaction of ethylene oxide with DNA and characterization of DNA adducts. *Chem.-Biol. Interact.* **1992**, *83*, 35-54.
- Lin, H.H.; Wang, L.Y.; Shaw, C.K.; Cheng, M.L.; Chung, W.K.; Chiang, H.J.; Lin, T.Y.; Chen, C.J. Combined effects of chronic hepatitis virus infections and substance-use habits on chronic liver diseases in Taiwanese aborigines. *J. Formos. Med. Assoc.* **2002**, *101*, 826-834.
- Liu, T.Y.; Chung, Y.T.; Wang, P.F.; Chi, C.W.; Hsieh, L.L. Safrole-DNA adducts in human peripheral blood-an association with areca quid chewing and CYP2E1 polymorphisms. *Mutat. Res.* **2004**, *559*, 59-66.
- Luo, G.; Guenther, T.M. Detoxication of the 2',3'-epoxide metabolites of allylbenzene and estragole. Conjugation with glutathione. *Drug Metab. Dispos.* **1994**, *22*, 731-737.
- Luo, G.; Guenther, T.M. Metabolism of allylbenzene 2',3'-oxide and estragole 2',3'-oxide in the isolated perfused rat liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1995**, *272*, 588-596.
- Luo, G.; Qato, M.K.; Guenther, T.M. Hydrolysis of the 2',3'-allylic epoxides of allylbenzene, estragole, eugenol, and safrole by both microsomal and cytosolic epoxide hydrolases. *Drug Metab. Dispos.* **1992**, *20*, 440-445.

- Macon, J.B.; Wolfenden, R. 1-Methyladenosine. Dimroth rearrangement and reversible reduction. *Biochemistry* **1968**, *7*, 3453-3458.
- Martati, E.; Boersma, M.G.; Spenkeliink, A.; Khadka, D.B.; Punt, A.; Vervoort, J.; van Bladeren, P.J.; Rietjens, I.M.C.M. Physiologically based biokinetic (PBBK) model for safrole bioactivation and detoxification in rats. *Chem. Res. Toxicol.* **2011**, *24*, 818-834.
- Matter, B.; Malejka-Giganti, D.; Csallany, A.S.; Tretyakova, N. Quantitative analysis of the oxidative DNA lesion, 2,2-diamino-4-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)amino]-5(2H)-oxazolone (oxazolone), *in vitro* and *in vivo* by isotope dilution-capillary HPLC-ESI-MS/MS. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 5449-5460.
- Matuszewski, B.K.; Constanzer, M.L.; Chavez-Eng, C.M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 3019-3030.
- Miller, E.C.; Swanson, A.B.; Phillips, D.H.; Fletcher, L.; Liem, A.; Miller, J.A. Structure-activity studies of the carcinogenicities in the mouse and rat of some naturally occurring and synthetic alkenylbenzene derivatives related to safrole and estragole. *Cancer Res.* **1983**, *43*, 1124-1134.
- Mohan, H.R.; Rao, A.S. Enantioselective synthesis of (*R*)-(+)-safrole oxide. *Indian J. Chem. B* **1998**, *29*, 78-79.
- Mudd, S. A hypothetical mechanism of antibody formation. *J. Immunol.* **1932**, *23*, 423-427.
- Munerato, M.C.; Sinigaglia, M.; Reguly, M.L.; de Andrade; H.H.R. Genotoxic effects of eugenol, isoeugenol and safrole in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* **2005**, *582*, 87-94.
- Munter, T.; Cottrell, L.; Hill, S.; Kronberg, L.; Watson, W.P.; Golding, B.T.

- Identification of adducts derived from reactions of (1-chloroethenyl)oxirane with nucleosides and calf thymus DNA. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15*, 1549-1560.
- Nakamura, J.; Swenberg, J.A. Endogenous apurinic/aprimidinic sites in genomic DNA of mammalian tissues. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 2522-2526.
- Narukulla, R.; Shuker, D.E.G.; Ramesh, V.; Xu, Y.Z. Unambiguous structural elucidation of base-modified purine nucleosides using NMR. *Magn. Reson. Chem.* **2008**, *46*, 1-8.
- Noller, C.R.; Kneeland, P.D. The synthesis of some tertiary amino alcohols related to chelidonine. *J. Am. Chem. Soc.* **1946**, *68*, 201-202.
- Novák, J.; Linhart, I.; Dvorčáková, H. Syntheses of 7-(2-hydroxy-1-phenylethyl)- and 7-(2-hydroxy-2-phenylethyl)guanine, DNA Adducts derived from styrene 7,8-oxide. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, *2004*, 2738-2746.
- Olsen, R.; Molander, P.; Ovrebø, S.; Ellingsen, D.G.; Thorud, S.; Thomassen, Y.; Lundanes, E.; Greibrokk, T.; Backman, J.; Sjøholm, R.; Kronberg, L. Reaction of glyoxal with 2'-deoxyguanosine, 2'-deoxyadenosine, 2'-deoxycytidine, cytidine, thymidine, and calf thymus DNA: Identification of DNA Adducts. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 730-739.
- Pang, B.; Zhou, X.; Yu, H.; Dong, M.; Taghizadeh, K.; Wishnok, J.S.; Tannenbaum, S.R.; Dedon, P.C. Lipid peroxidation dominates the chemistry of DNA adduct formation in a mouse model of inflammation. *Carcinogenesis* **2007**, *28*, 1807-1813.
- Pauling, L. A. Theory of the structure and process of formation of antibodies. *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, *62*, 2643-2657.
- Phillips, D.H.; Arlt, V.M. The ³²P-postlabeling assay for DNA adducts. *Nature*

2007, 2, 2772-2781.

Phillips, D.H.; Miller, J.A.; Miller, E.C.; Adams, B. N^2 Atom of guanine and N^6 Atom of adenine residues as sites for covalent binding of metabolically activated 1'-hydroxysafrole to mouse liver DNA *in vivo*. *Cancer Res.* **1981**, *41*, 2664-2671.

Plna, K.; Nilsson, R.; Koskinen, M.; Segerback, D. ^{32}P -postlabelling of propylene oxide 1- and N^6 -substituted adenine and 3-substituted cytosine/uracil: formation and persistence *in vitro* and *in vivo*. *Carcinogenesis* **1999**, *20*, 2025-2032.

Pongracz, K.; Kaur, S.; Burlingame, A.L.; Bodell, W.J. O^6 -substituted-2'-deoxyguanosine-3'-phosphate adducts detected by ^{32}P past-labeling of styrene oxide treated DNA. *Carcinogenesis* **1989**, *10*, 1009-1013.

Qato, M.K.; Guenther, T.M. ^{32}P -postlabeling analysis of adducts formed between DNA and safrole 2',3'-epoxide: absence of adduct formation *in vivo*. *Toxicol. Lett.* **1995**, *75*, 201-207.

Qian, C.; Dipple, A. Different mechanisms of aralkylation of adenosine at the 1- and N^6 -positions. *Chem. Res. Toxicol.* **1995**, *8*, 389-395.

Silverstein, R. M.; Webster, F.X.; Kiemle, D. J. in *Spectrometric Identification of Organic Compounds* (Eds: D. Brennan, J. Yee, S. Wolfman-Robichaud, S. Rigby), Wiley-VCH, New York, 2005, pp. 245-285. The interpretation of HMBC spectra requires a degree of flexibility because we do not always find what we expect to find. In particular, depending on the hybridization of carbon and other factors, some of the two-bond ($^2J_{\text{CH}}$) or three-bond ($^3J_{\text{CH}}$) correlations are occasionally absent. To add to the confusion, we sometimes find four-bond ($^4J_{\text{CH}}$) correlations.

Rao, P.; Ghosh, S.; Maitra, U. Binding of 9-*N*-butyladenine by carboxylic

Acids: evidence that Hoogsteen binding can dominate in solution. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 4528-4533.

Recio, L., Meyer, K.G. Increased frequency of mutations at A:T base pairs in the bone marrow of B6C3F1 lacI transgenic mice exposed to 1, 3-butadiene. *Environ. Mol. Mutagen.* **1995**, *26*, 1-8.

Scorrano, S.; Longo, L.; Vasapollo, G. Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction of 1-methyladenosine from human urine. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *659*, 167-171.

Sellergren, B.; Lepistoe, M.; Mosbach, K. Highly enantioselective and substrate-selective polymers obtained by molecular imprinting utilizing noncovalent interactions. NMR and chromatographic studies on the nature of recognition. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5853-5860.

Selzer, R.R.; Elfarra, A.A. Characterization of N1- and N⁶-adenosine adducts and N1-inosine adducts formed by the reaction of butadiene monoxide with adenosine: evidence for the N1-adenosine adducts as major initial products. *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, *9*, 875-881.

Selzer, R.R.; Elfarra, A.A. Chemical modification of deoxycytidine at different sites yields adducts of different stabilities: characterization of N3- and O²-deoxycytidine and N3-deoxyuridine adducts of butadiene monoxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, *343*, 63-72.

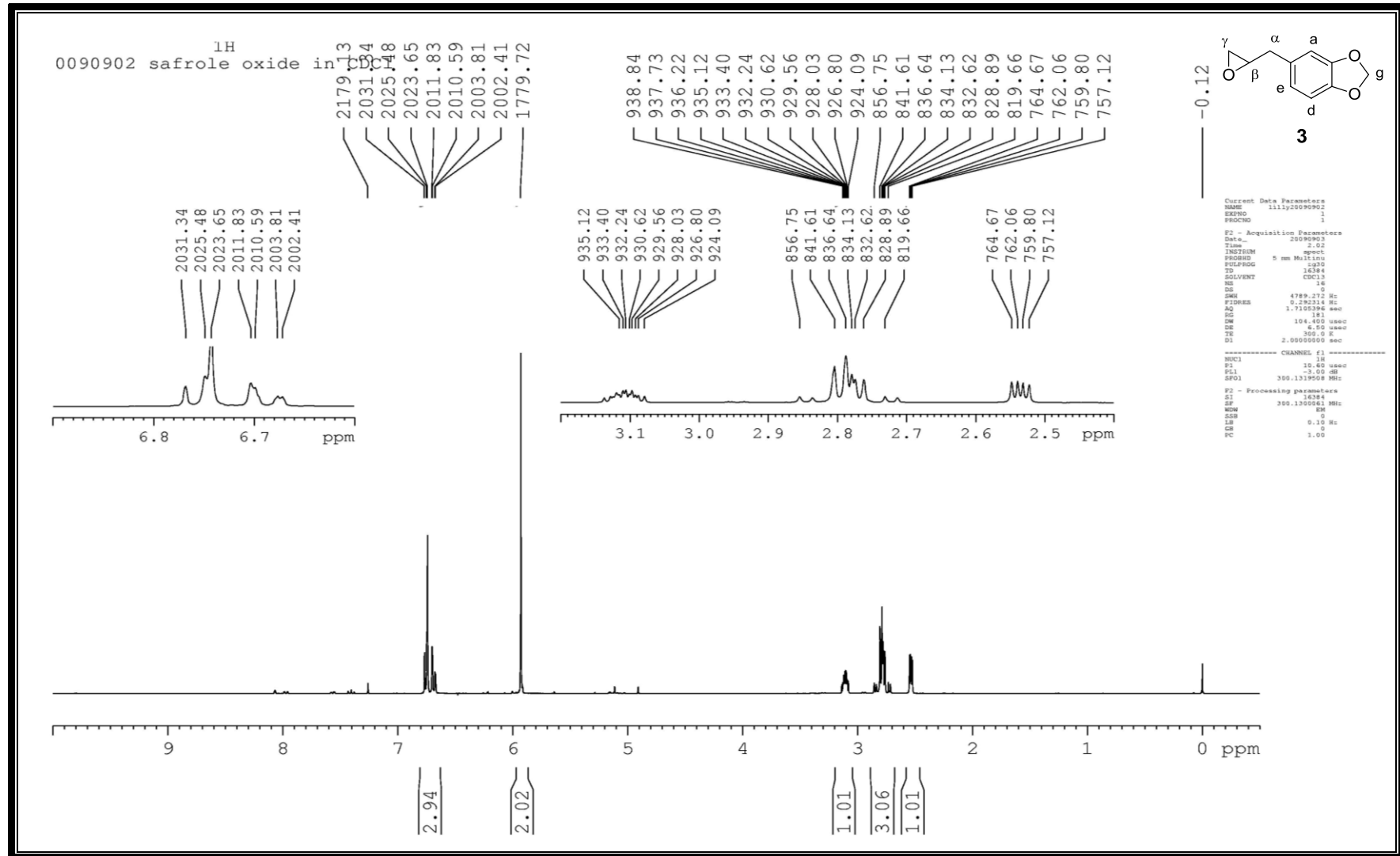
Shapiro, R.; Klein, R.S. The deamination of cytidine and cytosine by acidic buffer solutions. *Biochemistry* **1966**, *5*, 2358-2362.

Shen, L. C.; Chiang, S. Y.; Ho, I. T.; Wu, K. Y.; Chung, W. S. Synthesis and characterization of adducts formed in the reactions of safrole 2',3'-oxide with 2'-deoxyadenosine, adenine, and calf thymus DNA. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012*, 792-800.

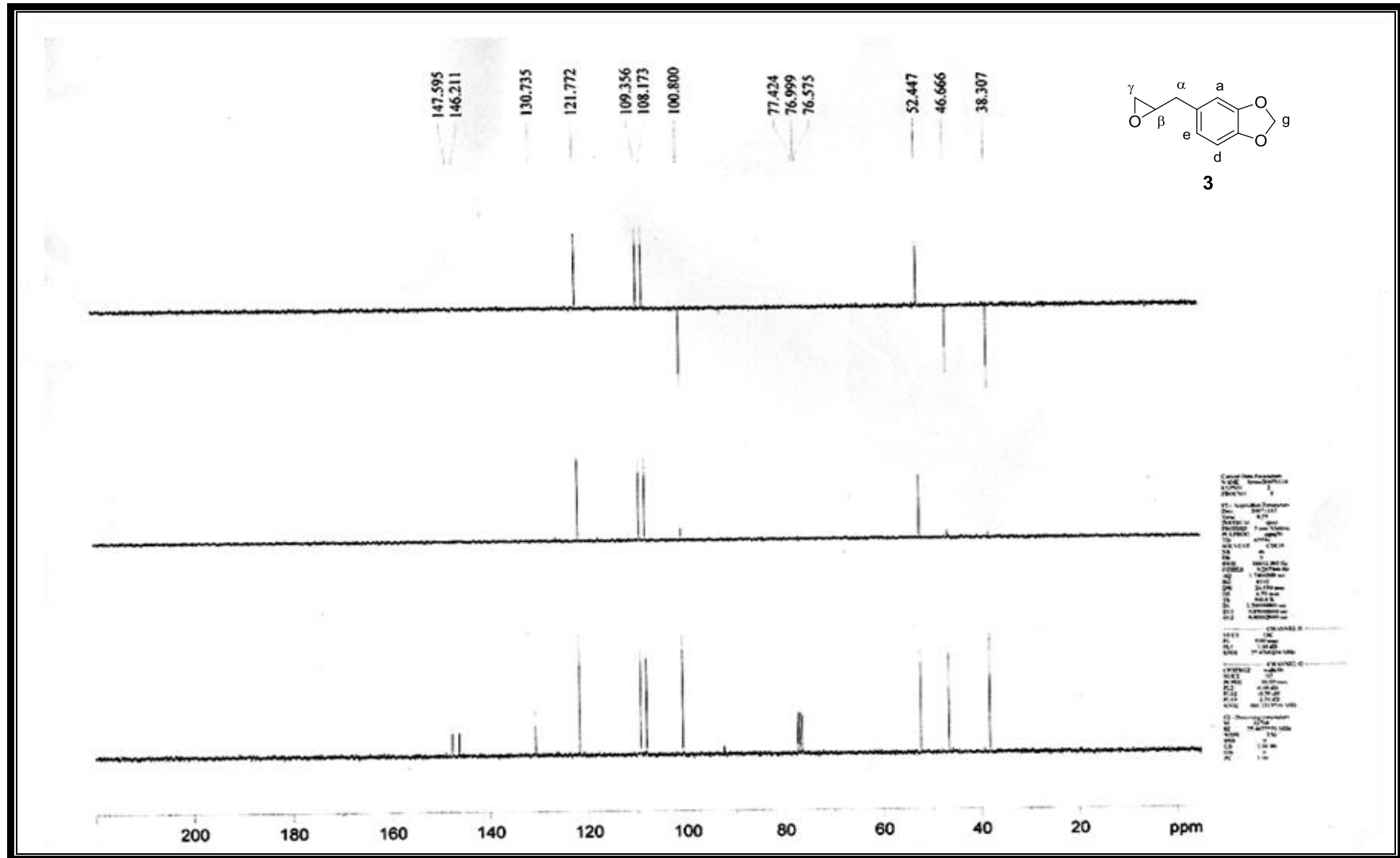
- Shen, L. C.; Chiang, S. Y.; Lin, M. H.; Chung, W. S.; Wu, K. Y. In vivo formation of N7-guanine DNA adduct by safrole 2',3'-oxide in mice. *Toxicol. Lett.* **2012**, *213*, 309-315.
- Shea, K.J.; Spivak, D.A.; Sellergren, B. Polymer complements to nucleotide bases. Selective binding of adenine derivatives to imprinted polymers. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3368-3369.
- Singh, R.; Farmer, P.B. Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry: the future of DNA adduct detection. *Carcinogenesis* **2006**, *27*, 178-196.
- Sisk, S.C.; Pluta, L.J.; Bond, J.A.; Recio, L. Molecular analysis of lacI mutants from bone marrow of B6C3F1 transgenic mice following inhalation exposure to 1,3-butadiene. *Carcinogenesis* **1994**, *15*, 471-477.
- Snow, E.T.; Singh, J.; Koenig, K.L.; Solomon, J.J. Propylene oxide mutagenesis at template cytosine residues. *Environ. Mol. Mutagen.* **1994**, *23*, 274-280.
- Solomon, J.J.; Mukai, F.; Fedyk, J.; Segal, A. Reactions of propylene oxide with 2'-deoxynucleosides and in vitro with calf thymus DNA. *Chem-Biol Interact* **1988**, *67*, 275-294.
- Spivak, D.; Gilmore, M.A.; Shea, K.J. Evaluation of binding and origins of specificity of 9-ethyladenine imprinted polymers. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4388-4393.
- Spivak, D.A.; Shea, K.J. Binding of nucleotide bases by imprinted polymers. *Macromolecules* **1998**, *31*, 2160-2165.
- Spivak, D.A.; Shea, K.J. Investigation into the scope and limitations of molecular imprinting with DNA molecules. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *435*, 65-74.

- Stillwell, W.G.; Carman, M.J.; Bell, L.; Horning, M.G. The metabolism of safrole and 2',3'-epoxysafrole in the rat and guinea pig. *Drug Metab. Dispos.* **1974**, *2*, 489-498.
- Swanson, A.B.; Chambliss, D.D.; Blomquist, J.C.; Miller, E.C.; Miller, J.A. The mutagenicities of safrole, estragole, eugenol, *trans*-anethole, and some of their known or possible metabolites for *Salmonella typhimurium* mutants. *Mutat. Res.* **1979**, *60*, 143-153.
- Swenberg, J.A.; Fryar-Tita, E.; Jeong, Y.C.; Boysen, G.; Starr, T.; Walker, V.E.; Albertini, R.J. Biomarkers in toxicology and risk assessment: informing critical dose-response relationships. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *21*, 253-265.
- Tretyakova, N.; Lin, Y.; Sangaiah, R.; Upton, P.B.; Swenberg, J.A. Identification and quantitation of DNA adducts from calf thymus DNA exposed to 3,4-epoxy-1-butene. *Carcinogenesis* **1997**, *18*, 137-147.
- Ueng, Y.F.; Hsieh, C.H.; Don, M.J.; Chi, C.W.; Ho, L.K. Identification of the main human cytochrome P450 enzymes involved in safrole 1'-hydroxylation. *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, *17*, 1151-1156.
- Vodicka, P.E.; Linhart, I.; Novak, J.; Koskinen, M.; Vodickova, L.; Hemminki, K. 7-Alkylguanine adduct levels in urine, lungs and liver of mice exposed to styrene by inhalation. *Toxicol. Appl. Pharm.* **2006**, *210*, 1-8.
- Wislocki, P.G.; Borchert, P.; Miller, J.A.; Miller, E.C. The metabolic activation of the carcinogen 1'-hydroxysafrole *in vivo* and *in vitro* and the electrophilic reactivities of possible ultimate carcinogens. *Cancer Res.* **1976**, *36*, 1686-1695.
- Wislocki, P.G.; Miller, E.C.; Miller, J.A.; McCoy, E.C.; Rosenkranz, H.S. Carcinogenic and mutagenic activities of safrole, 1'-hydroxysafrole, and

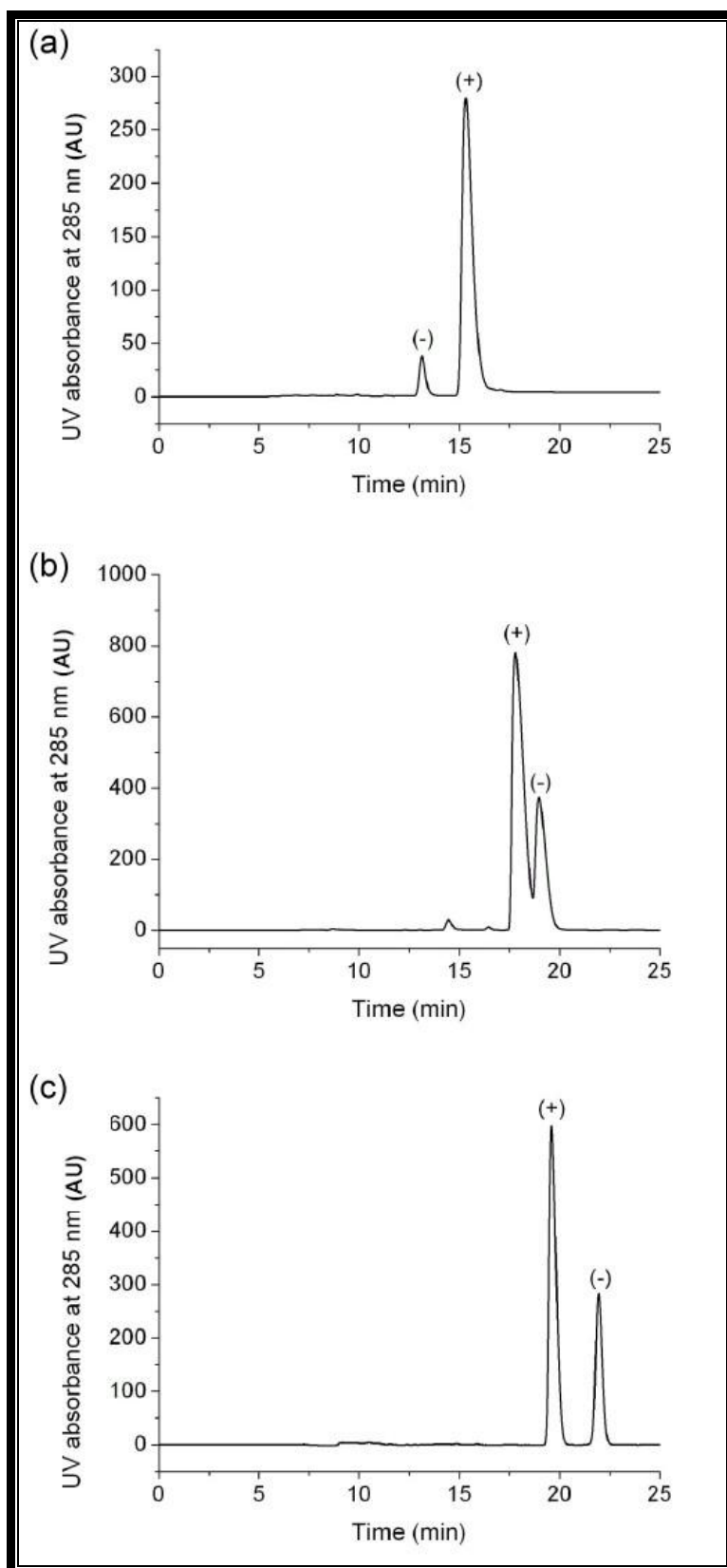
- some known or possible metabolites. *Cancer Res.* **1977**, *37*, 1883-1891.
- Wood, D.J.; Hruska, F.E.; Ogilvie, K.K. Proton magnetic resonance studies of 2'-deoxythymidine, its 3'- and 5'-monophosphates and 2'-deoxythymidylyl-(3',5')-2'-deoxythymidine in aqueous solution. *Can. J. Chem.* **1974**, *52*, 3353-3366.
- Wu, K.Y.; Chiang, S.Y.; Shih, W.C.; Huang, C.C.J.; Chen, M.F.; Swenberg, J.A. The application of mass spectrometry in molecular dosimetry: ethylene oxide as an example. *Mass Spectrom. Rev.* **2011**, *30*, 733-756.
- Wulff, G.; Grobe-Einsler, R.; Vesper, W.; Sarhan, A. Enzyme-analogue built polymers, 5. On the specificity distribution of chiral cavities prepared in synthetic polymers. *Macromol. Chem. Phys.* **1977a**, *178*, 2817-2825.
- Wulff, G.; Schauhoff, S. Enzyme-analog-built polymers. 27. Racemic resolution of free sugars with macroporous polymers prepared by molecular imprinting. Selectivity dependence on the arrangement of functional groups versus spatial requirements. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 395-400.
- Wulff, G.; Vesper, W.; Grobe-Einsler, R.; Sarhan, A. Enzyme-analogue built polymers, 4. On the synthesis of polymers containing chiral cavities and their use for the resolution of racemates. *Macromol. Chem. Phys.* **1977b**, *178*, 2799-2816.
- Zhang, W.; Johnson, F.; Grollman, A.P.; Shibutani, S. Miscoding by the exocyclic and related DNA adducts 3,*N*⁴-etheno-2'-deoxycytidine, 3,*N*⁴-ethano-2'-deoxycytidine, and 3-(2-hydroxyethyl)-2'-deoxyuridine. *Chem. Res. Toxicol.* **1995**, *8*, 157-163.
- 陳皓君, 2003. 液相層析質譜儀於致癌風險評估上之應用. 科儀新知 *25*, 47-54.



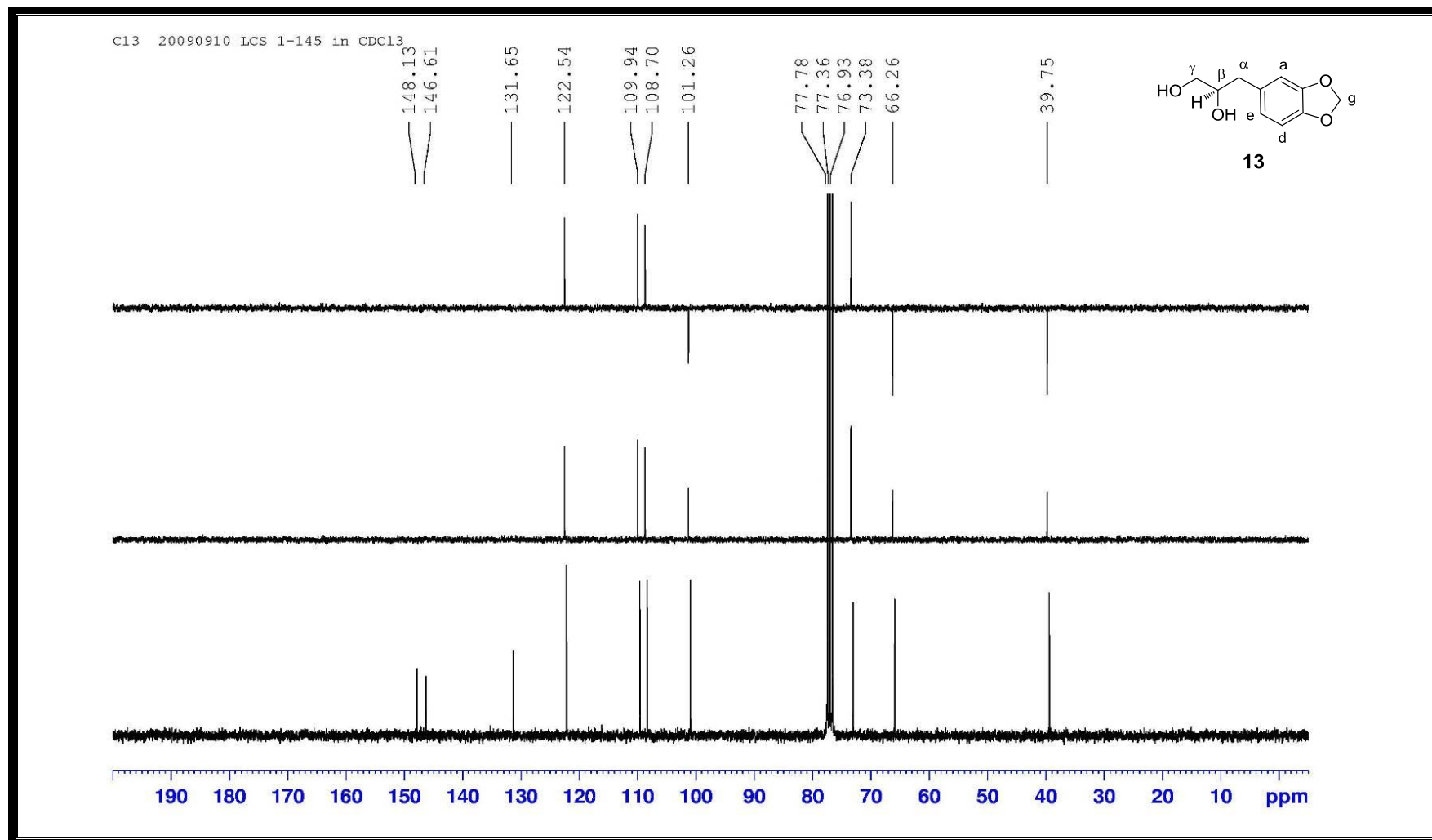
附圖一、黃樟素代謝產物 (±)-SFO 3 之 ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) 光譜圖。



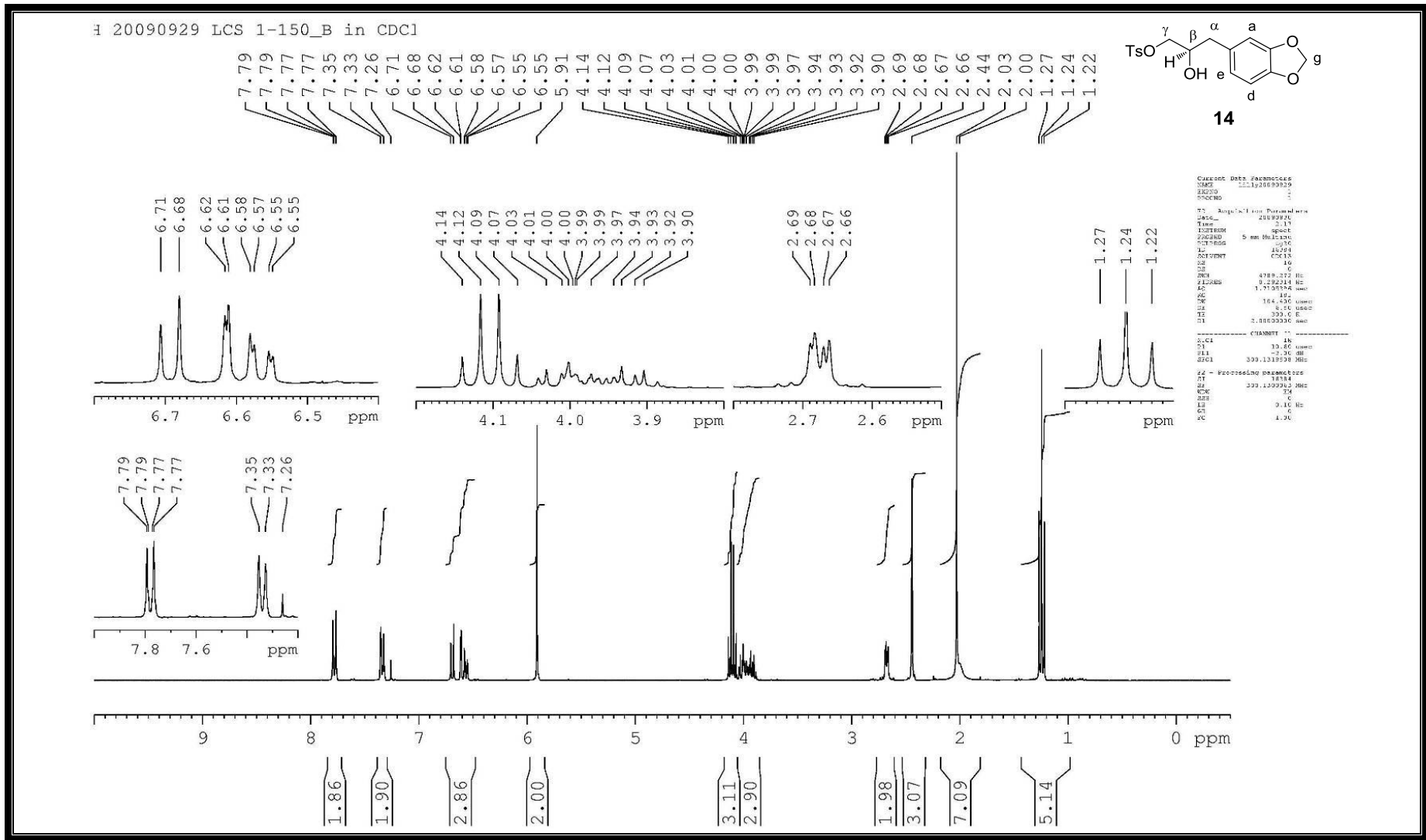
附圖二、黃樟素代謝產物(±)-SFO 3 之 DEPT (75.4 MHz, CDCl_3) 光譜圖。



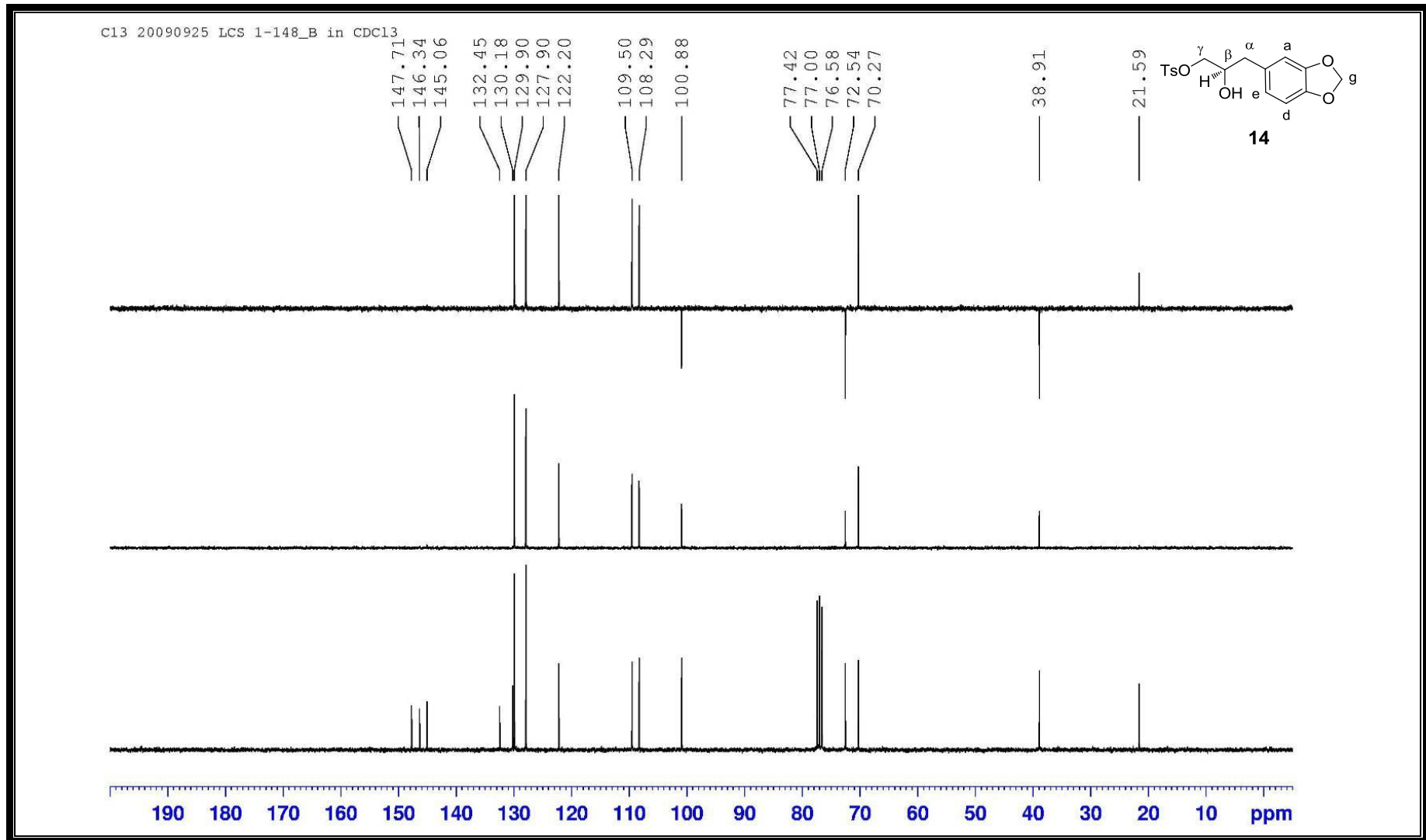
附圖三、化合物 (a) (*R*)-(+)-enriched-13、(b) (*R*)-(+)-enriched-14、(c) (*R*)-(+)-enriched-3 之手性高效液相層析圖譜。



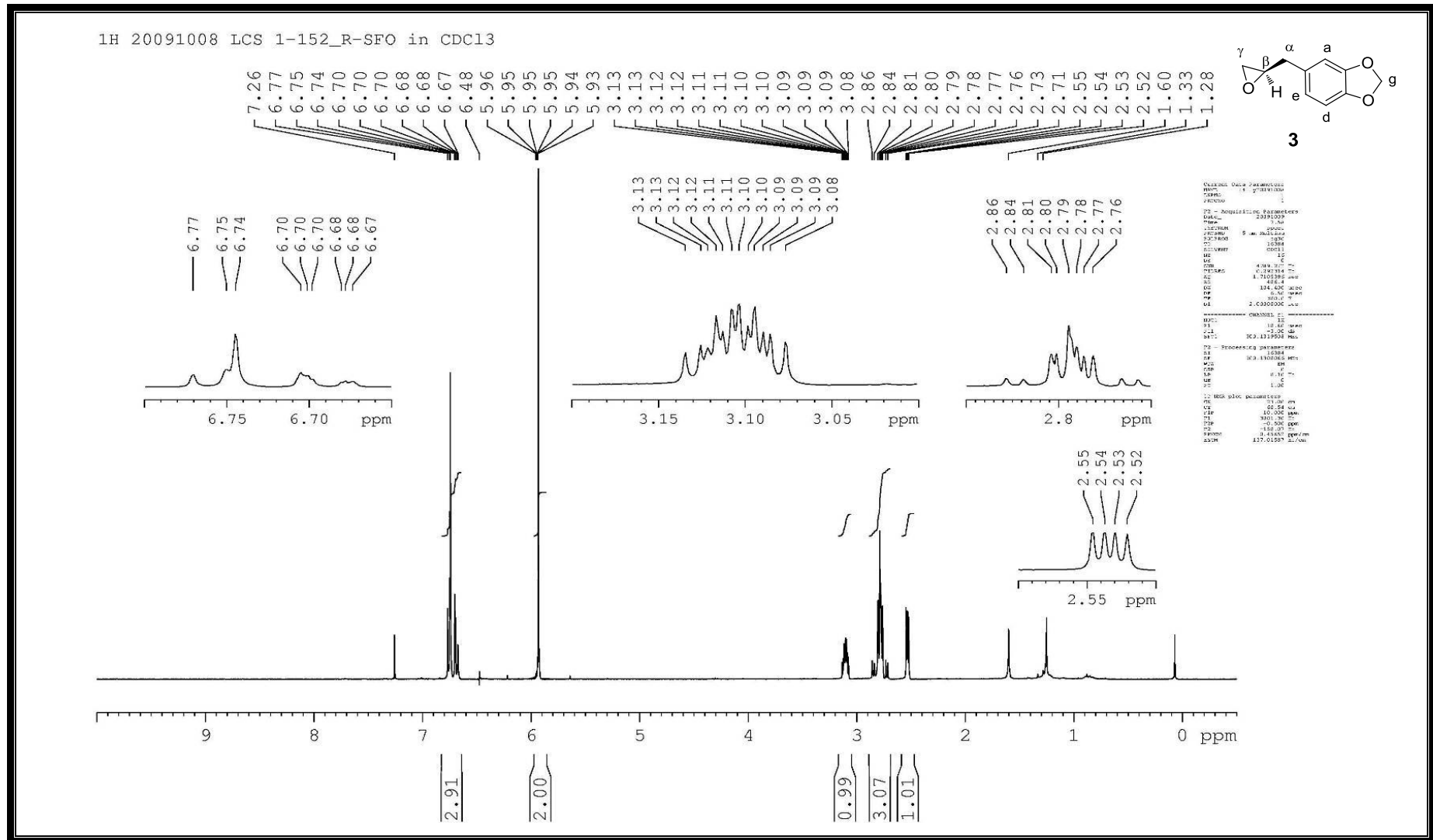
附圖五、化合物 (*R*)-(+)-5-(2,3-Dihydroxypropyl)-1,3-benzodioxole **13** 之 DEPT (75.4 MHz, CDCl₃) 光譜圖。



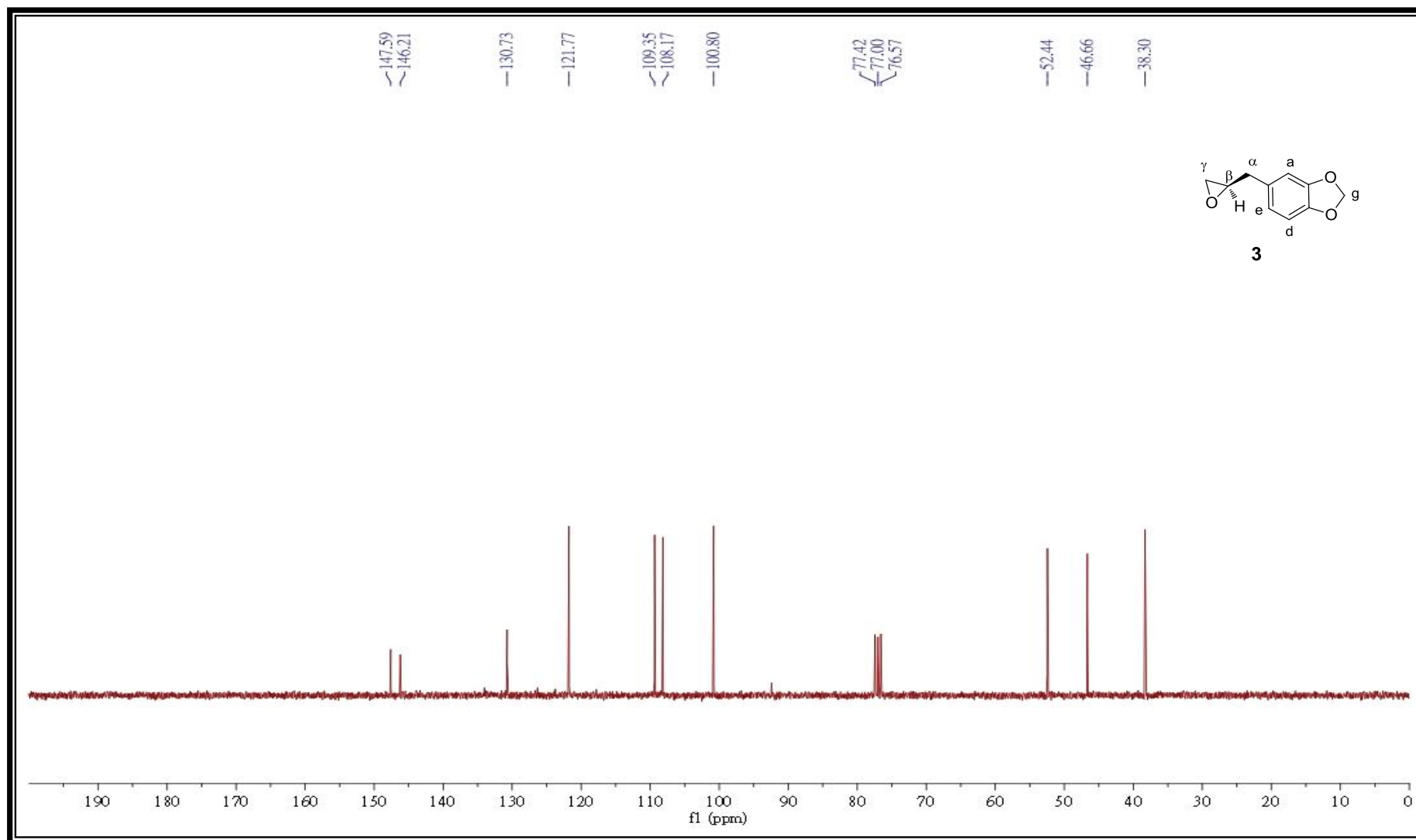
附圖六、化合物 (R)-(+)-5-(2-hydroxy-3-tosyloxypropyl)-1,3-benzodioxole **14** 之 ¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) 光譜圖。



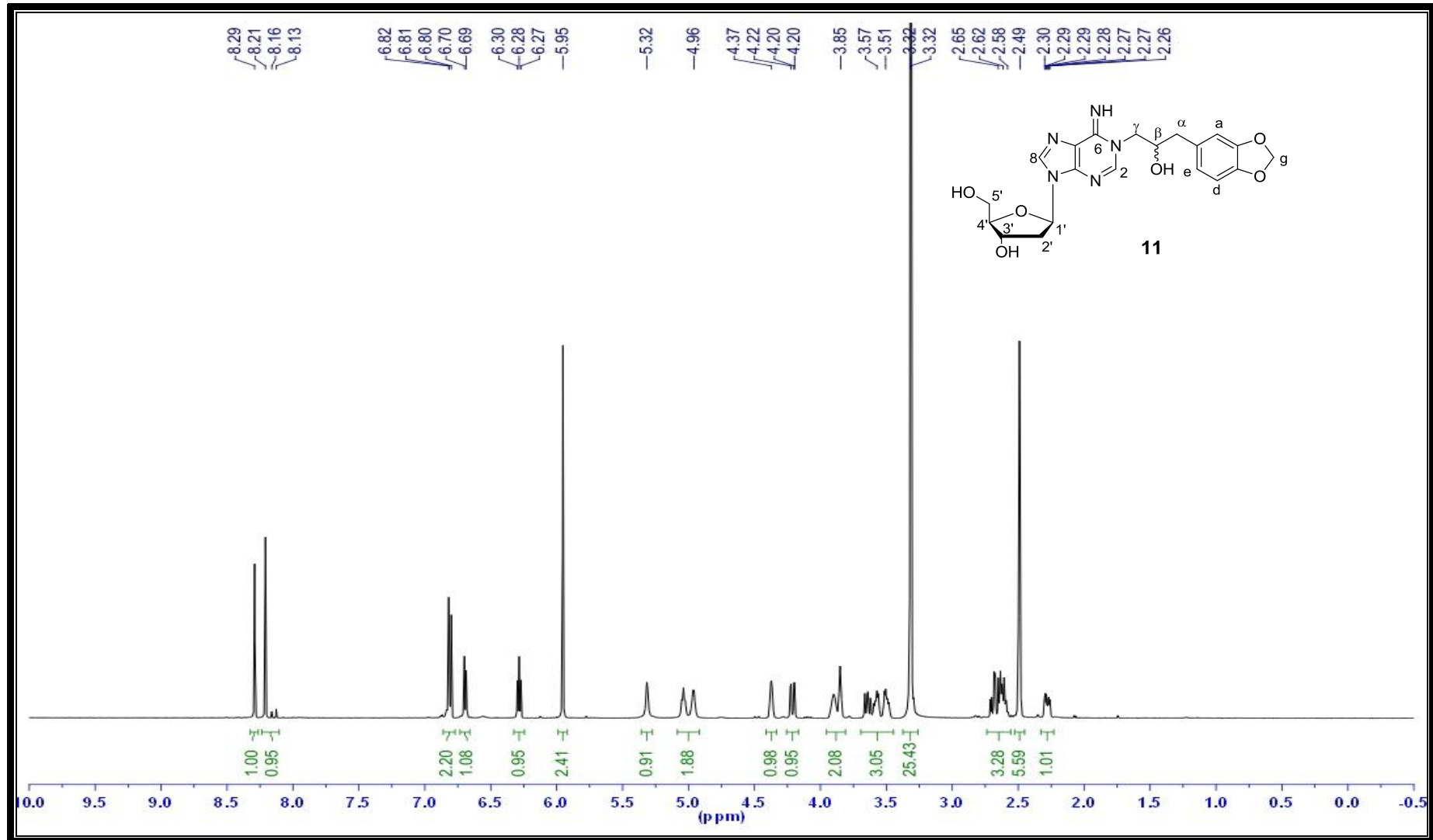
附圖七、化合物 *(R)*-(+)-5-(2-hydroxy-3-tosyloxypropyl)-1,3-benzodioxole **14** 之 DEPT (75.4 MHz, CDCl₃) 光譜圖。



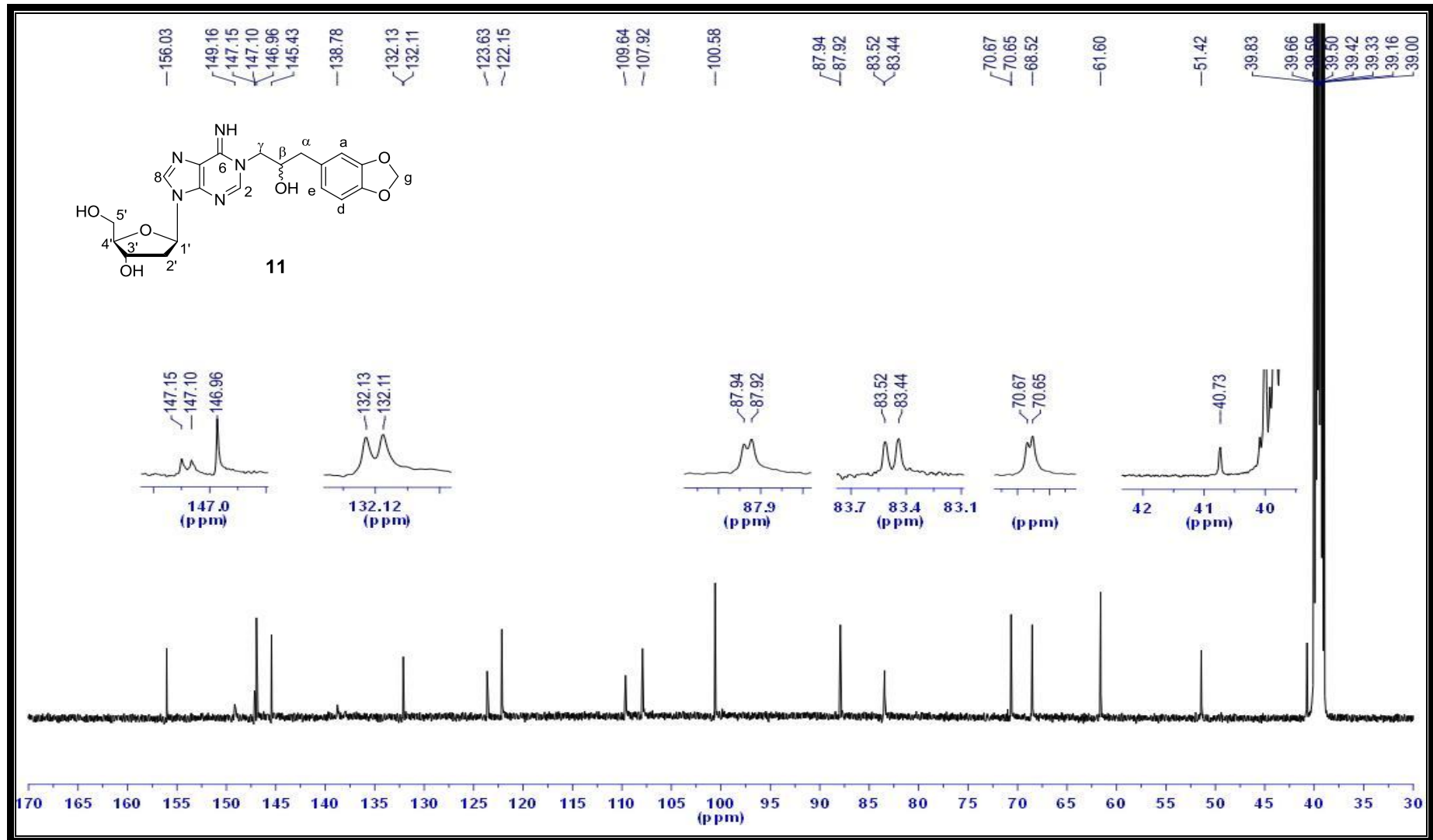
附圖八、化合物 (R)-(+)-5-Oxiranylmethyl-1,3-benzodioxole **3** 之 ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) 光譜圖。



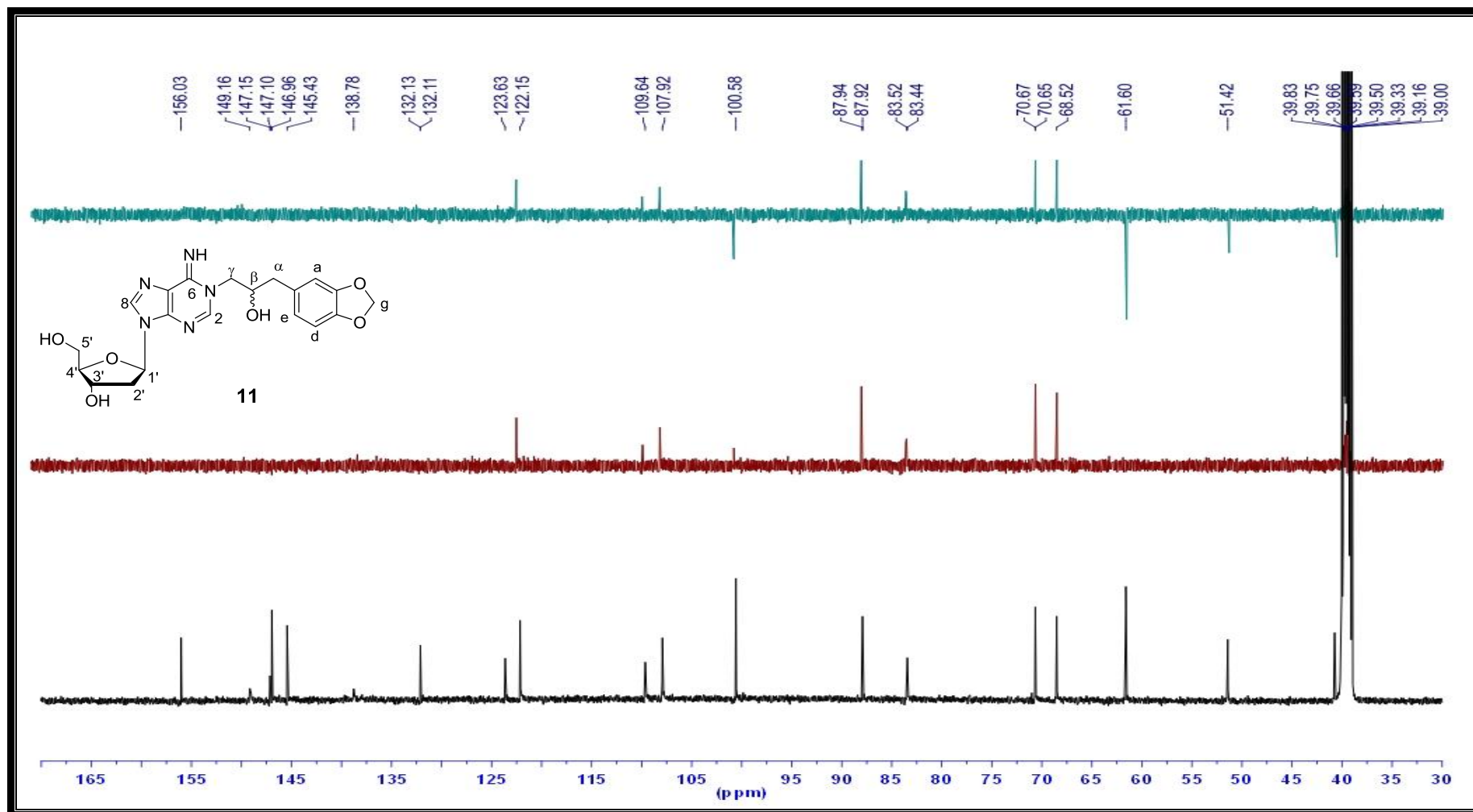
附圖九、化合物(*R*)-(+)-5-Oxiranylmethyl-1,3-benzodioxole **3** 之 ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3) 光譜圖。



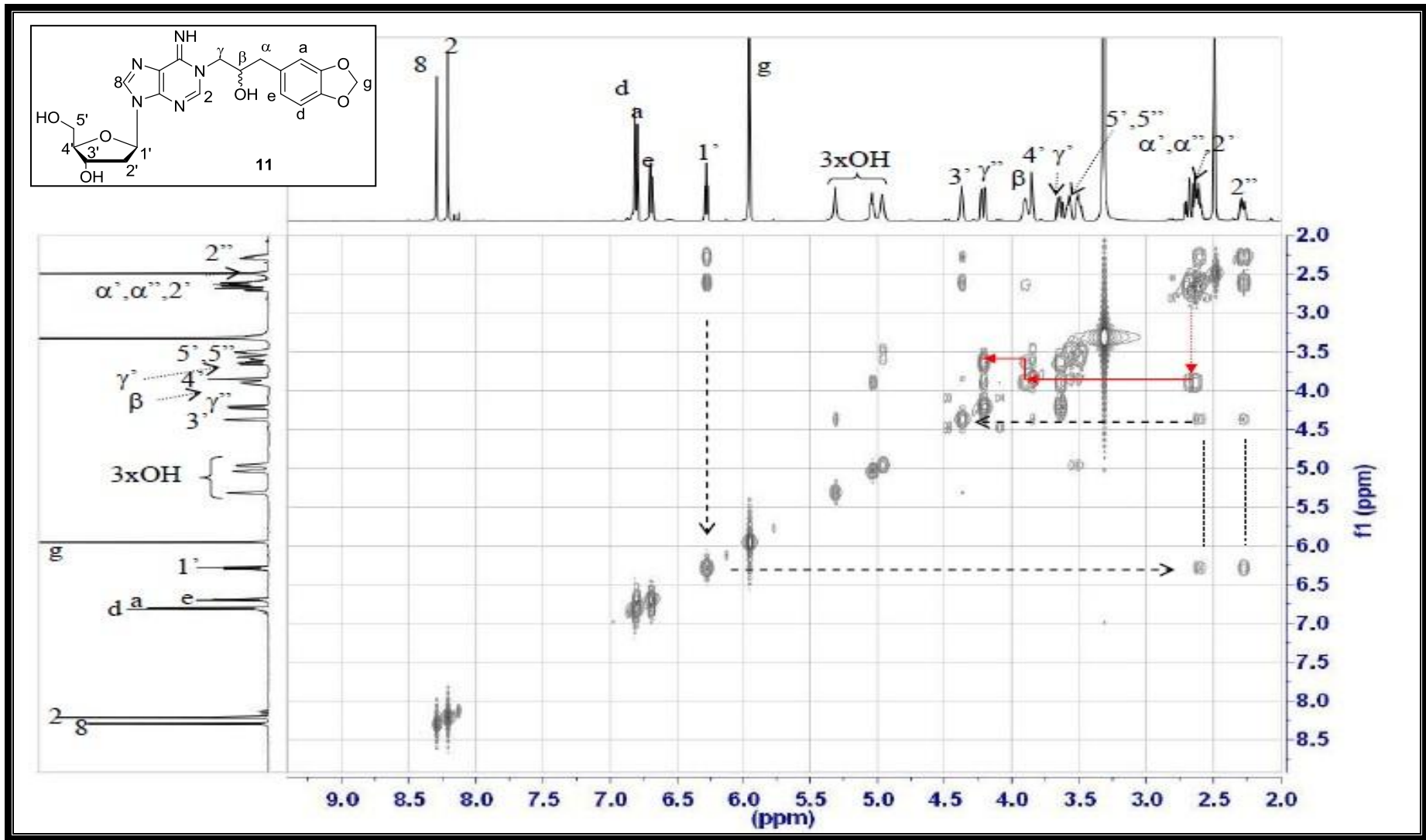
附圖十、加成產物 *N*1 γ -SFO-dAdo **11** 之 ^1H NMR (500 MHz, d_6 -DMSO) 光譜圖。



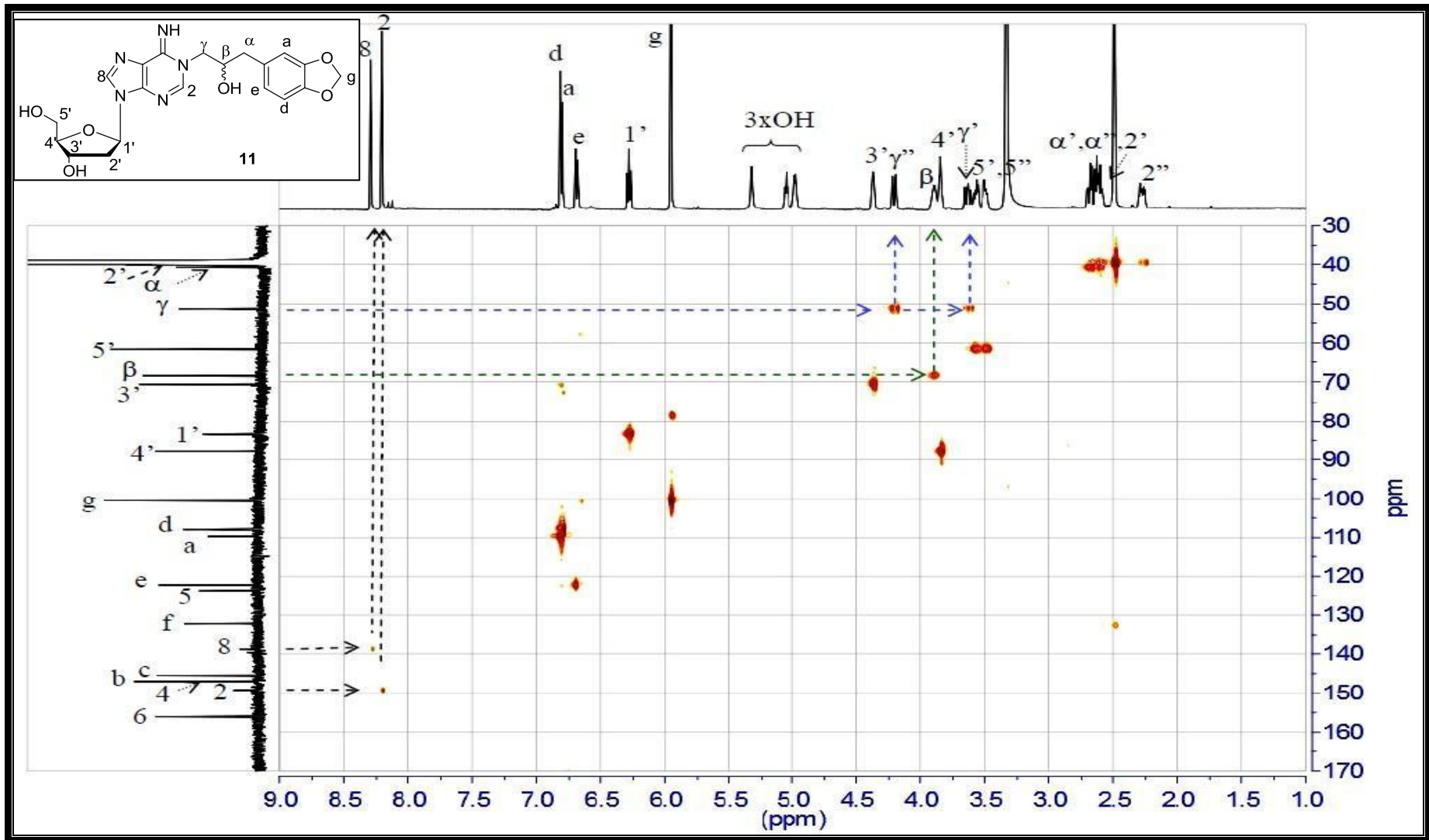
圖十一、加成產物 $N1\gamma$ -SFO-dAdo **11** 之 ^{13}C NMR (125.7 MHz, d_6 -DMSO) 光譜圖。



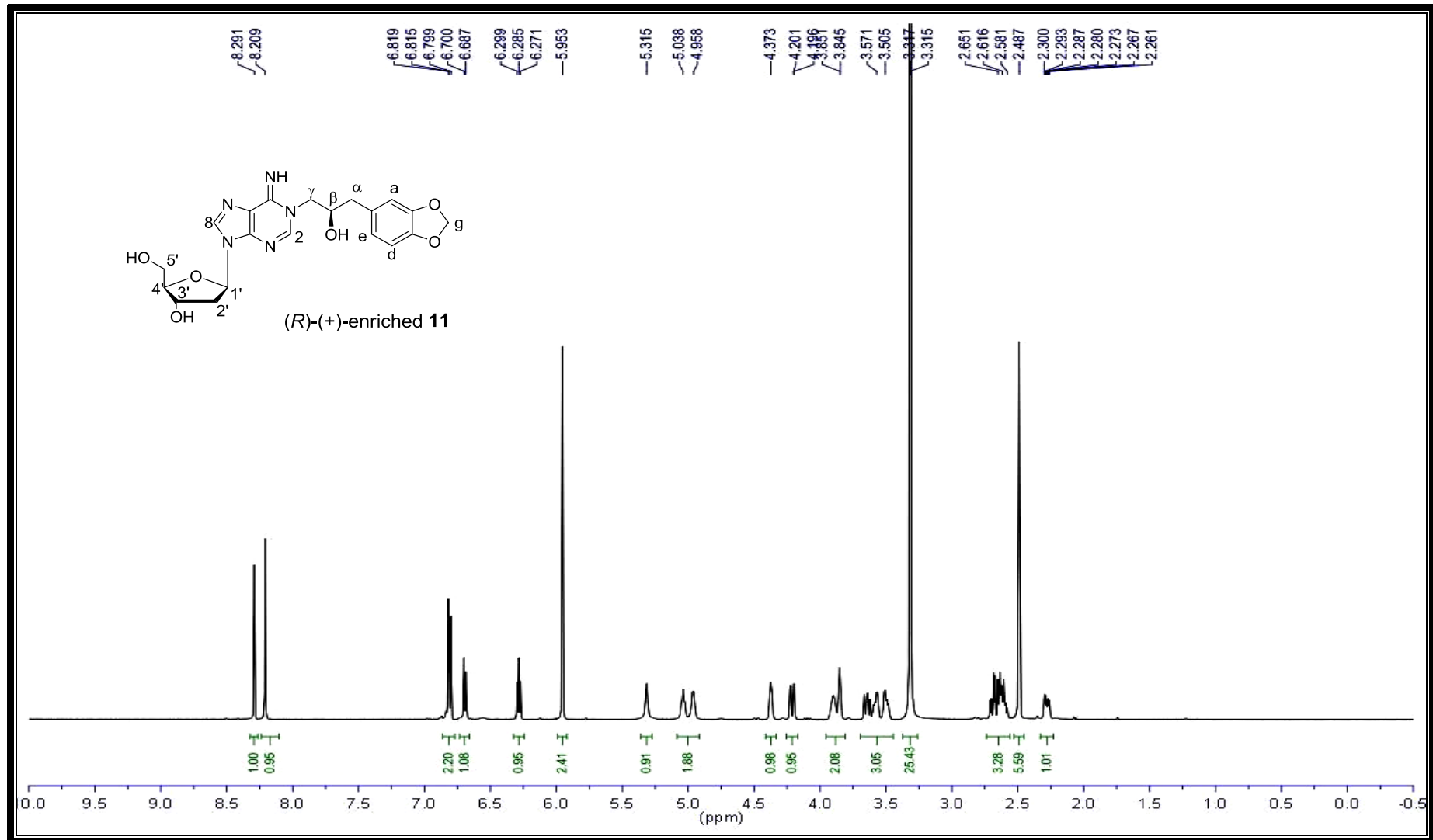
附圖十二、 $N1\gamma$ -SFO-dAdo **11** 之 DEPT (125.7 MHz, d_6 -DMSO) 光譜圖。



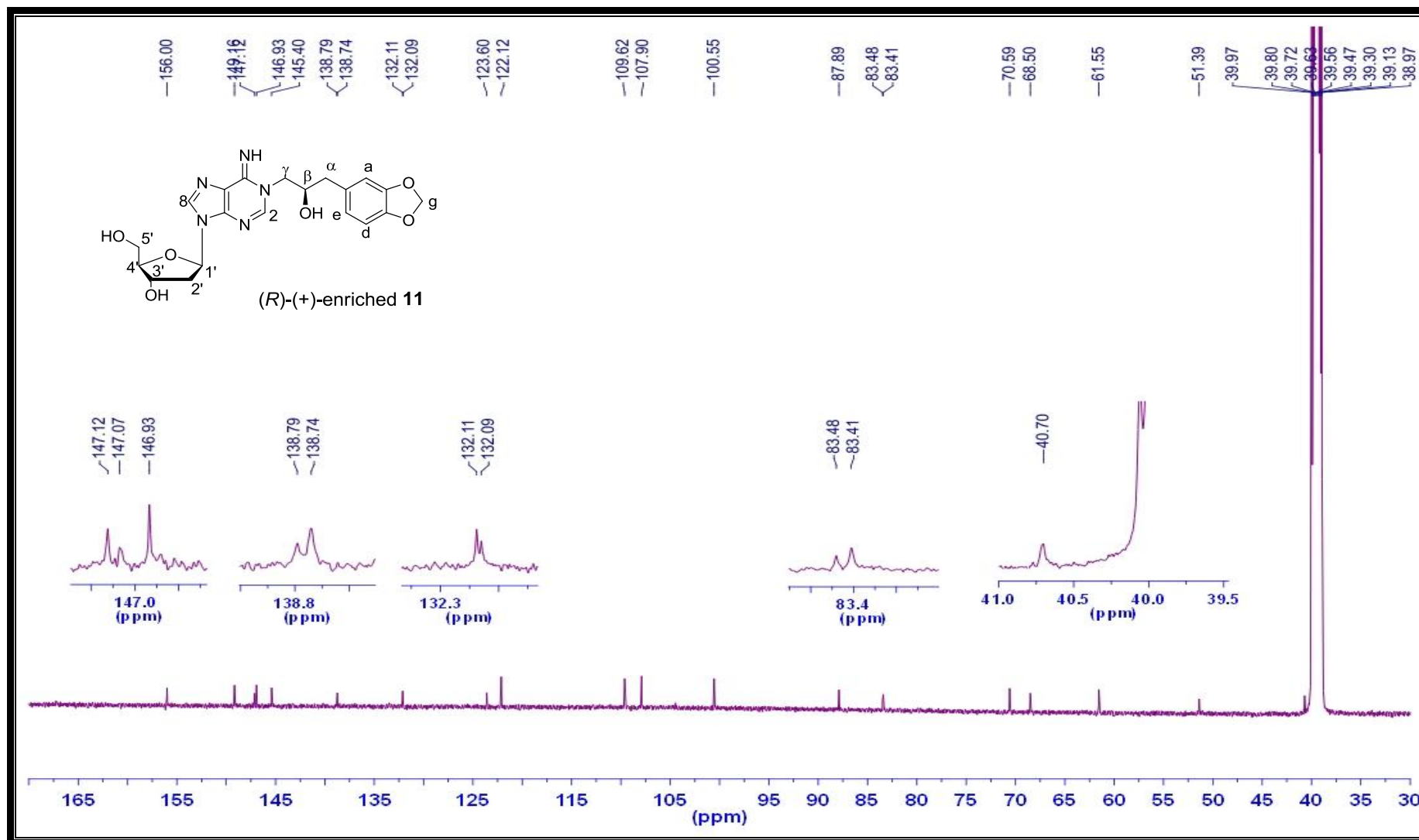
附圖十三、加成產物 $N1\gamma$ -SFO-dAdo **11** 之 H,H-COSY (500 MHz, d_6 -DMSO) 光譜圖。



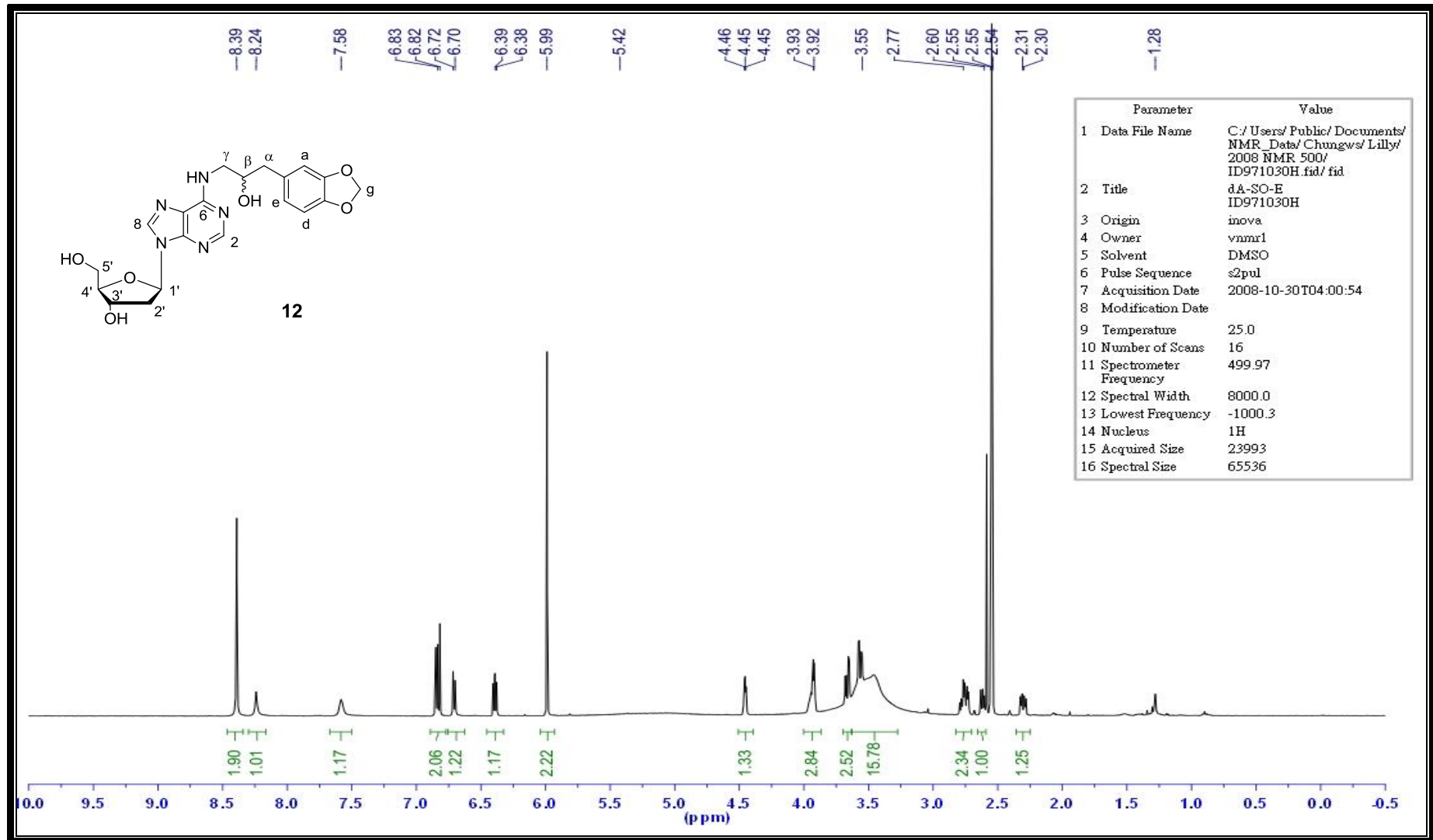
附圖十四、加成產物 *N*1γ-SFO-dAdo **11** 之 HMQC (500 MHz, *d*₆-DMSO) 光譜圖。



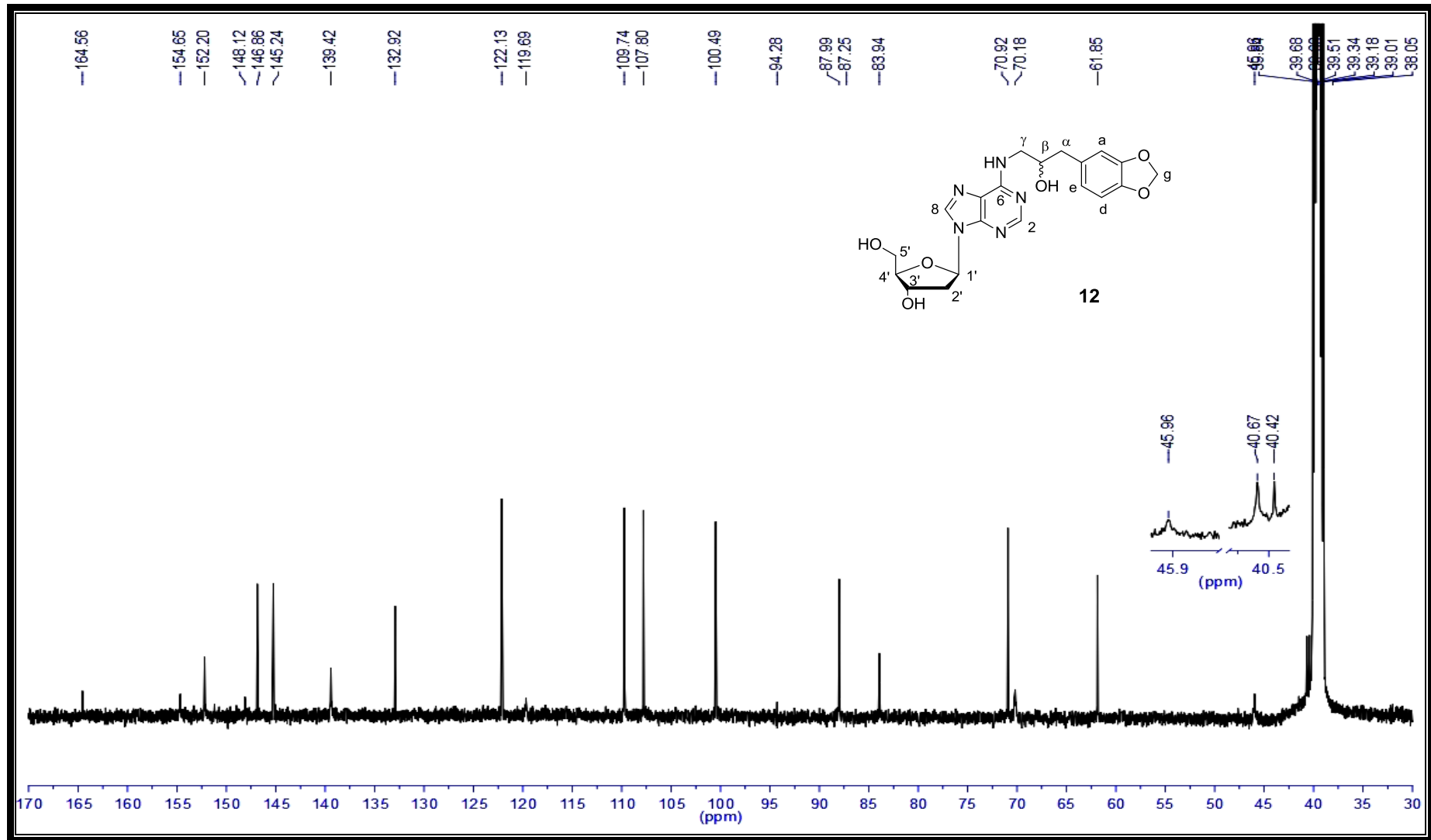
附圖十五、加成產物(R)-enriched-N1 γ -SFO-dAdo 11 之 ^1H NMR (500 MHz, d_6 -DMSO) 光譜圖。



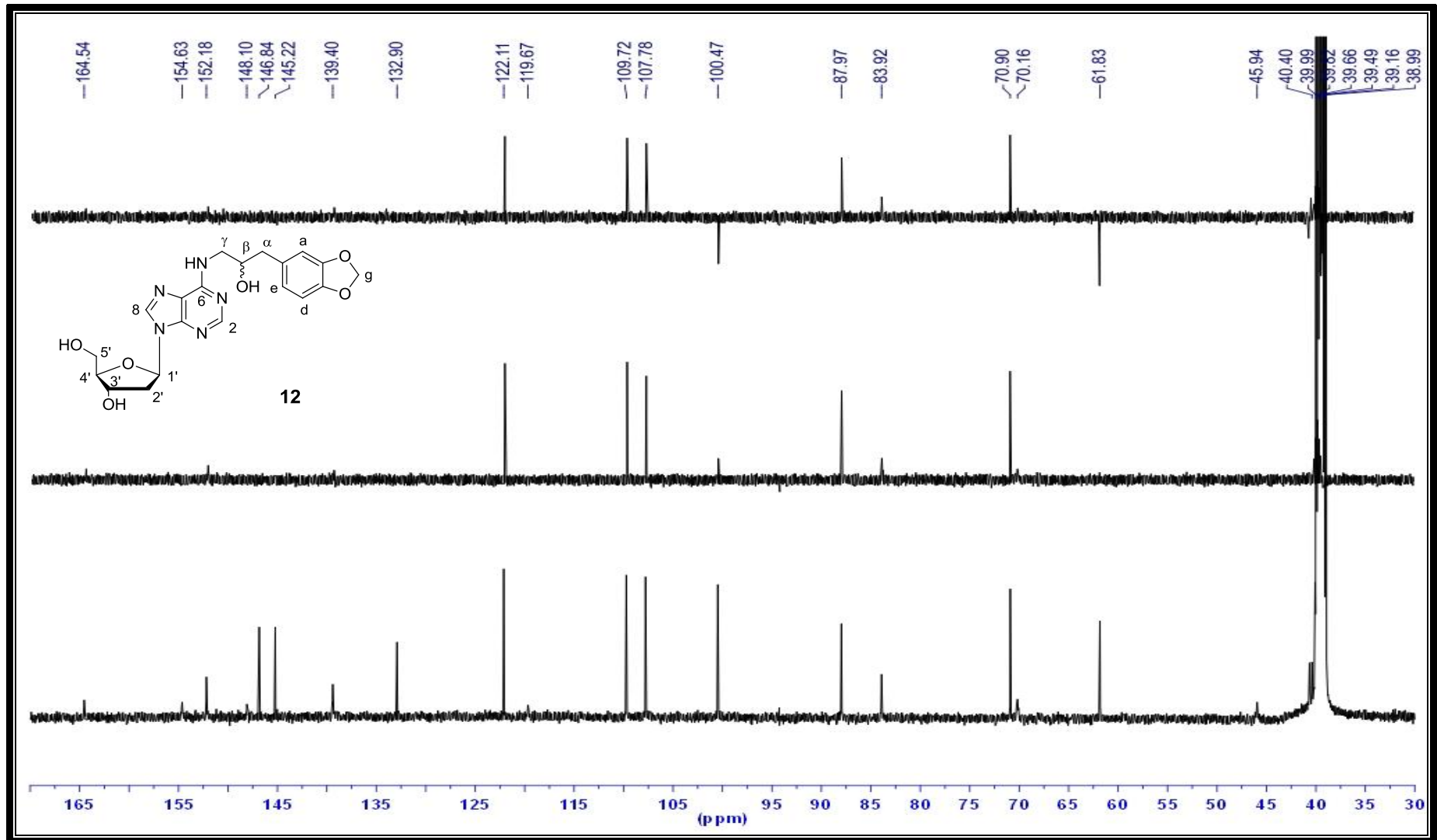
附圖十六、加成產物*(R)*-enriched-*N*1 γ -SFO-dAdo **11** 之 ^{13}C NMR (125.7 MHz, d_6 -DMSO) 光譜圖。



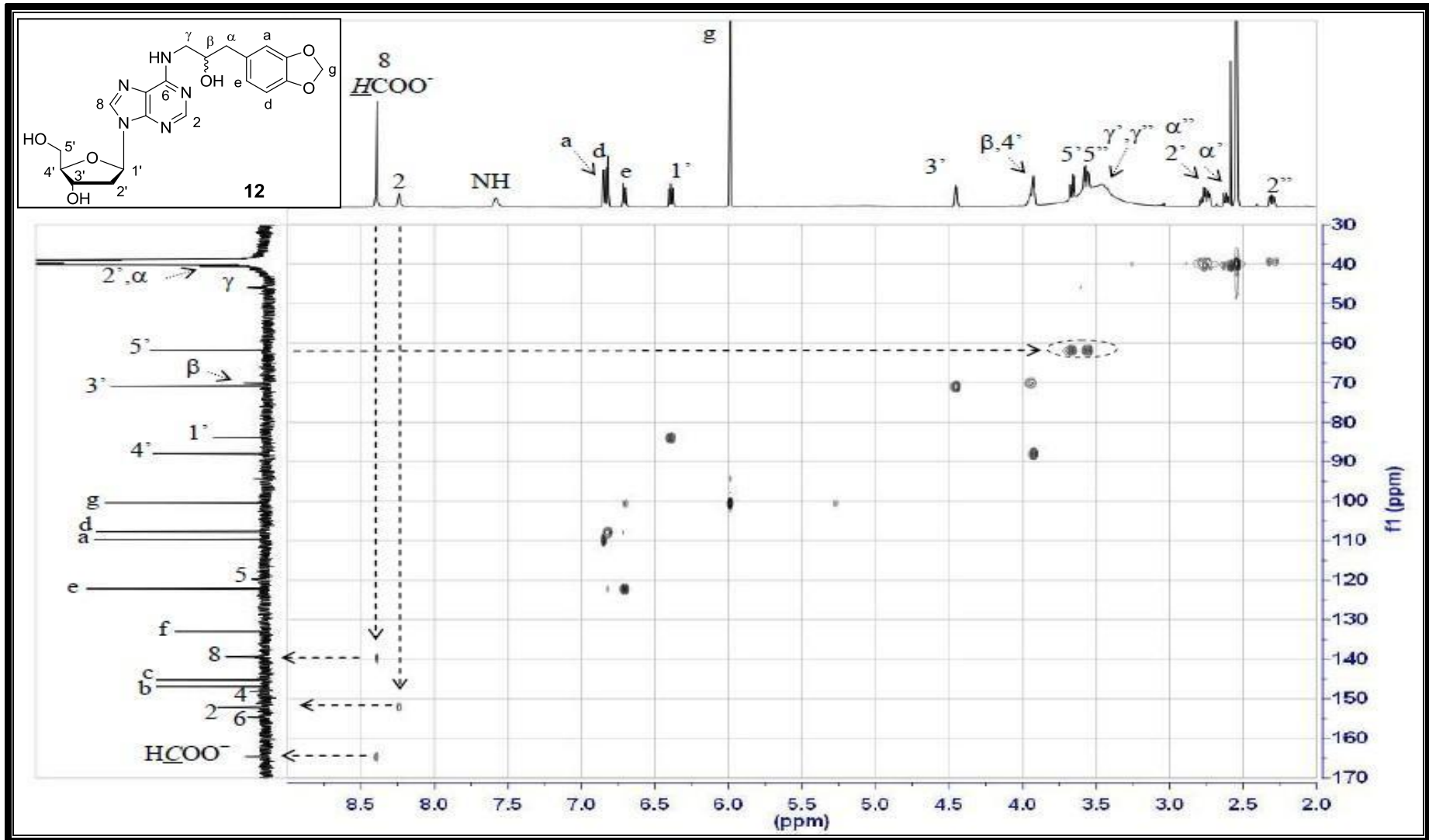
附圖十七、加成產物 $N^6\gamma$ -SFO-dAdo **12** 之 ^1H NMR (500 MHz, d_6 -DMSO) 光譜圖。



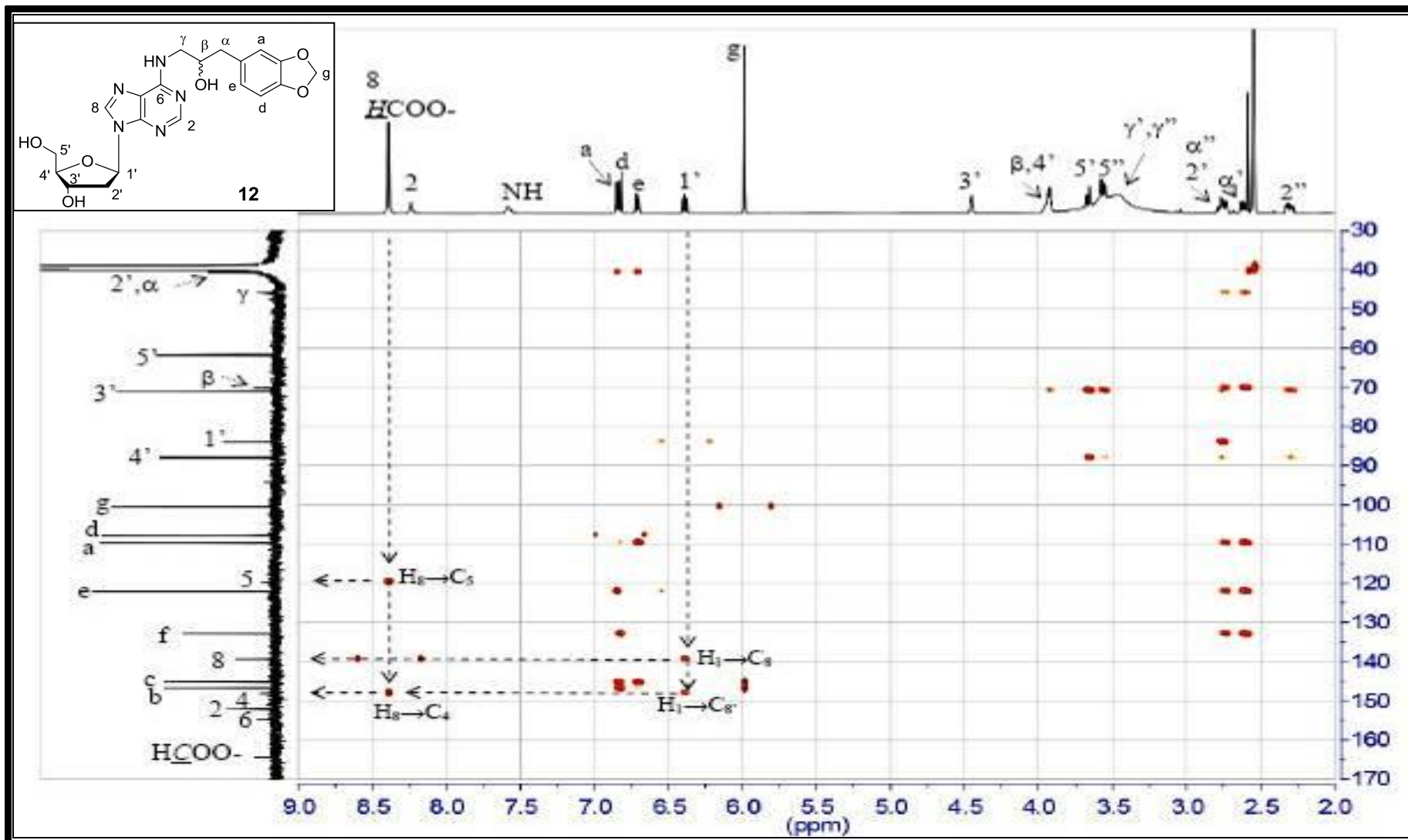
附圖十八、加成產物 *N*⁶ γ -SFO-dAdo **12** 之 ¹³C NMR (125.7 MHz, *d*₆-DMSO) 光譜圖。



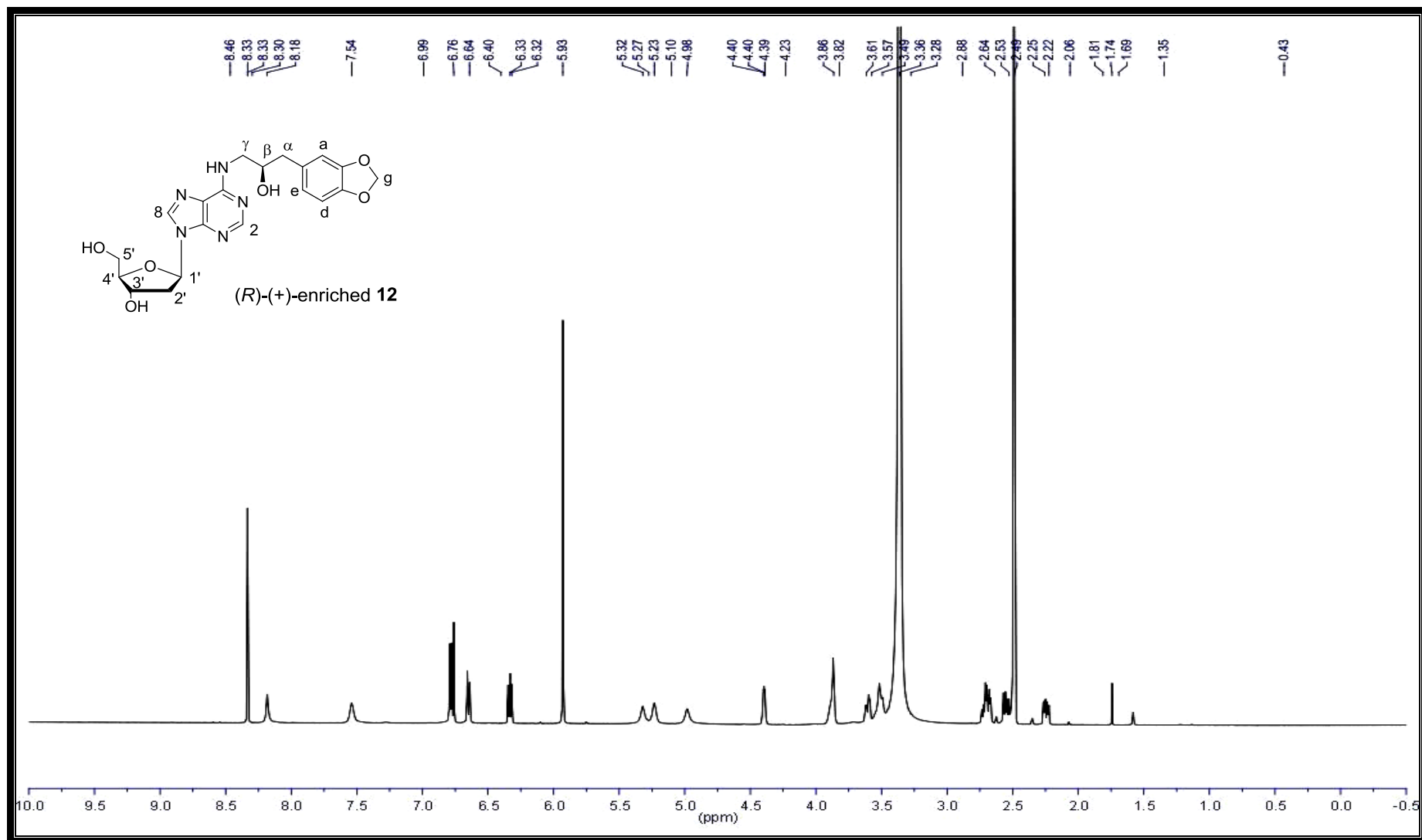
附圖十九、加成產物 $N^6\gamma$ -SFO-dAdo **12** 之 DEPT (125.7 MHz, *d*₆-DMSO) 光譜圖。



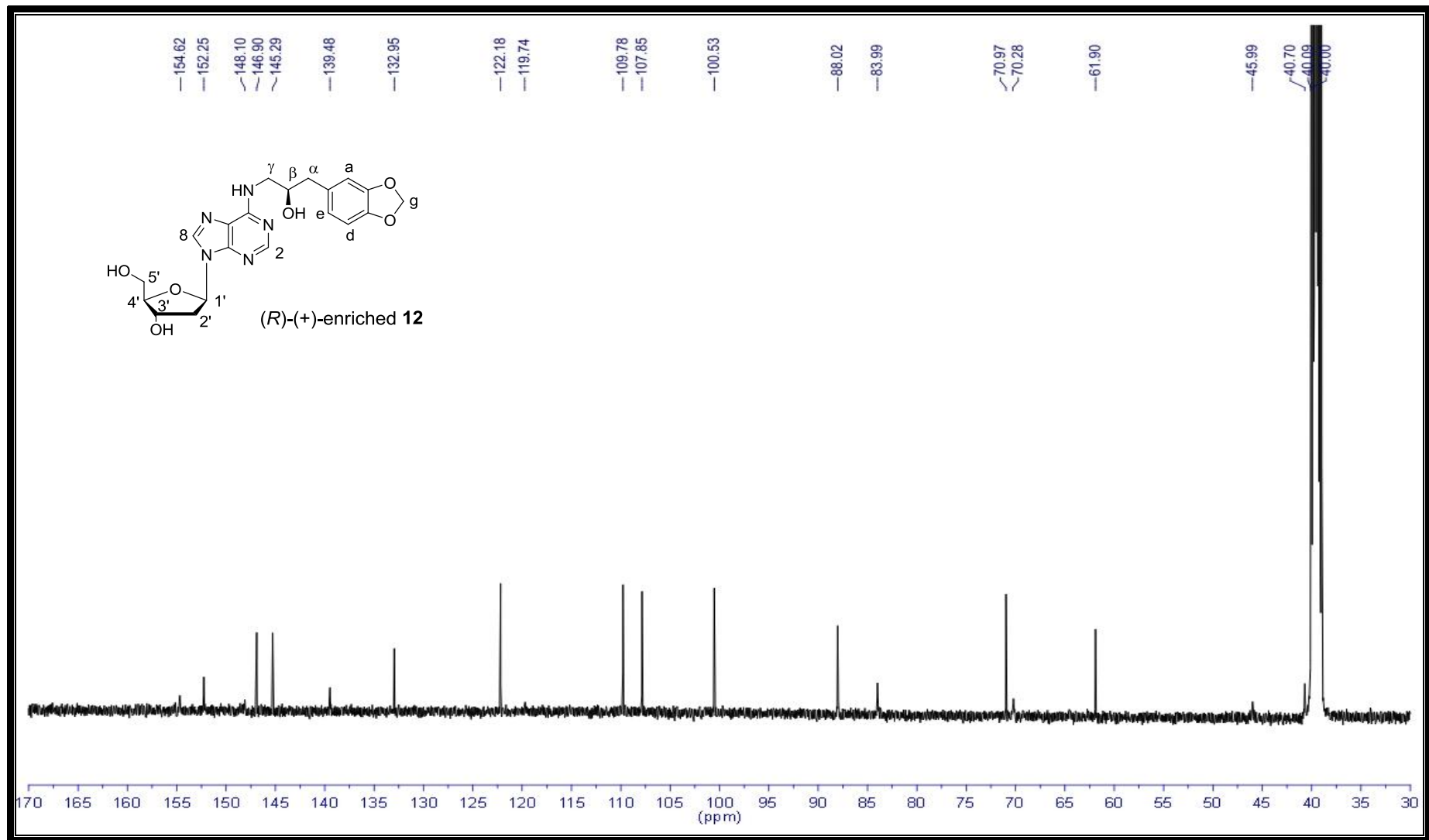
附圖二十、加成產物 $N^6\gamma$ -SFO-dAdo **12** 之 HMQC (500 MHz, d_6 -DMSO) 光譜圖。



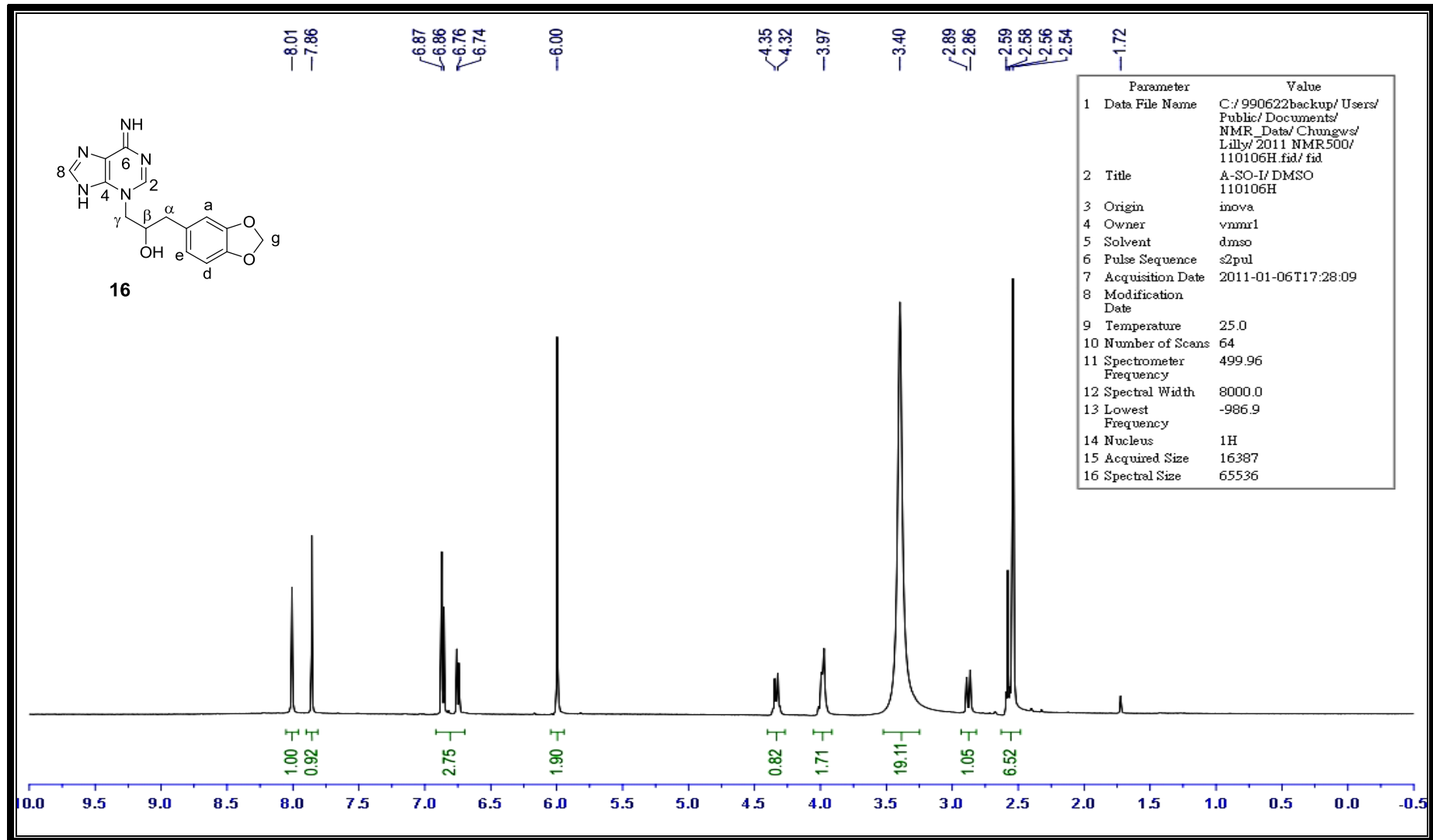
附圖二十一、加成產物 $N^6\gamma$ -SFO-dAdo 12 之 HMBC (500 MHz, d_6 -DMSO) 光譜圖。



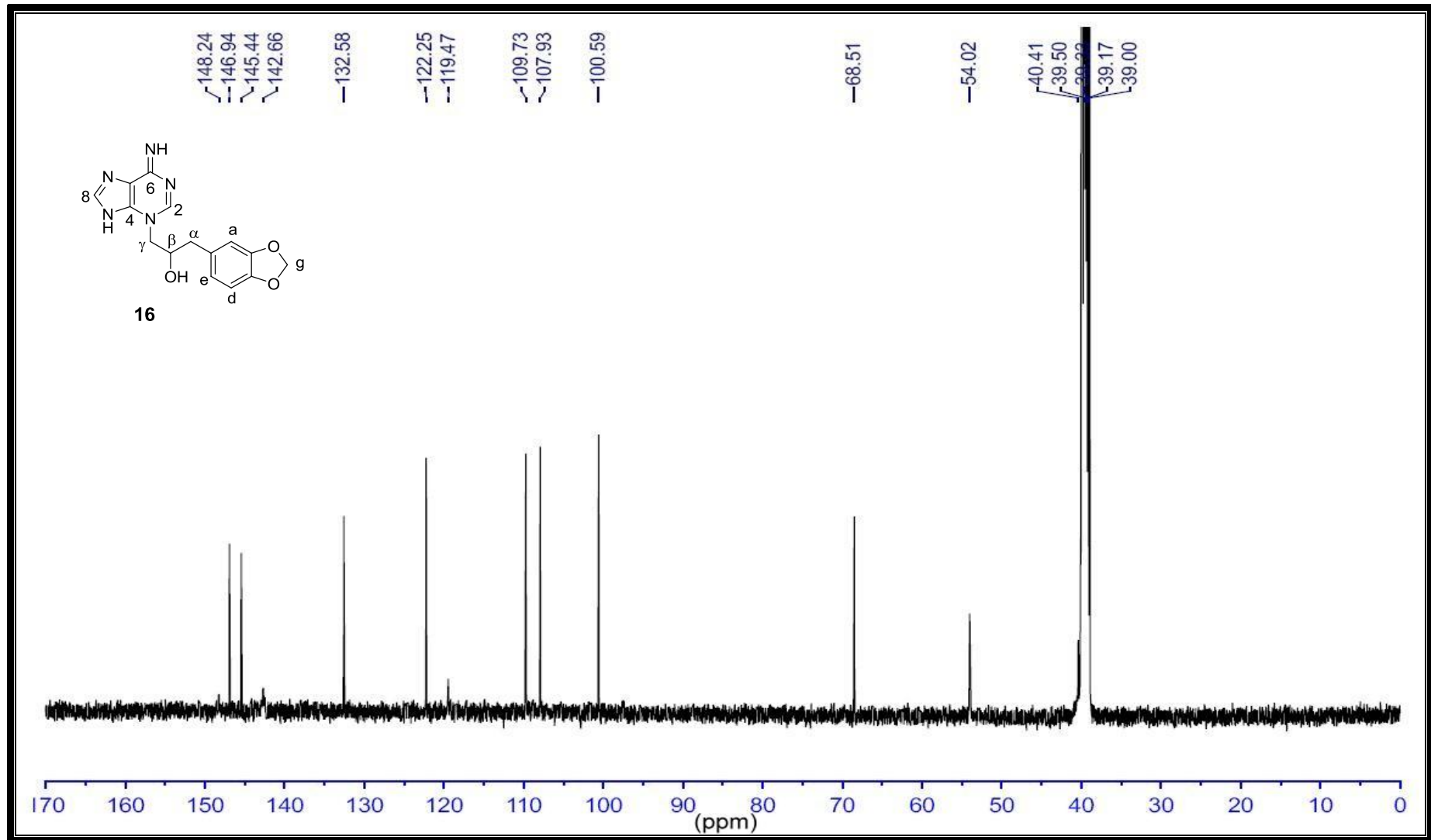
附圖二十二、加成產物 (R) -enriched- N^{γ} -SFO-dAdo **12** 之 ^1H NMR (500 MHz, d_6 -DMSO) 光譜圖。



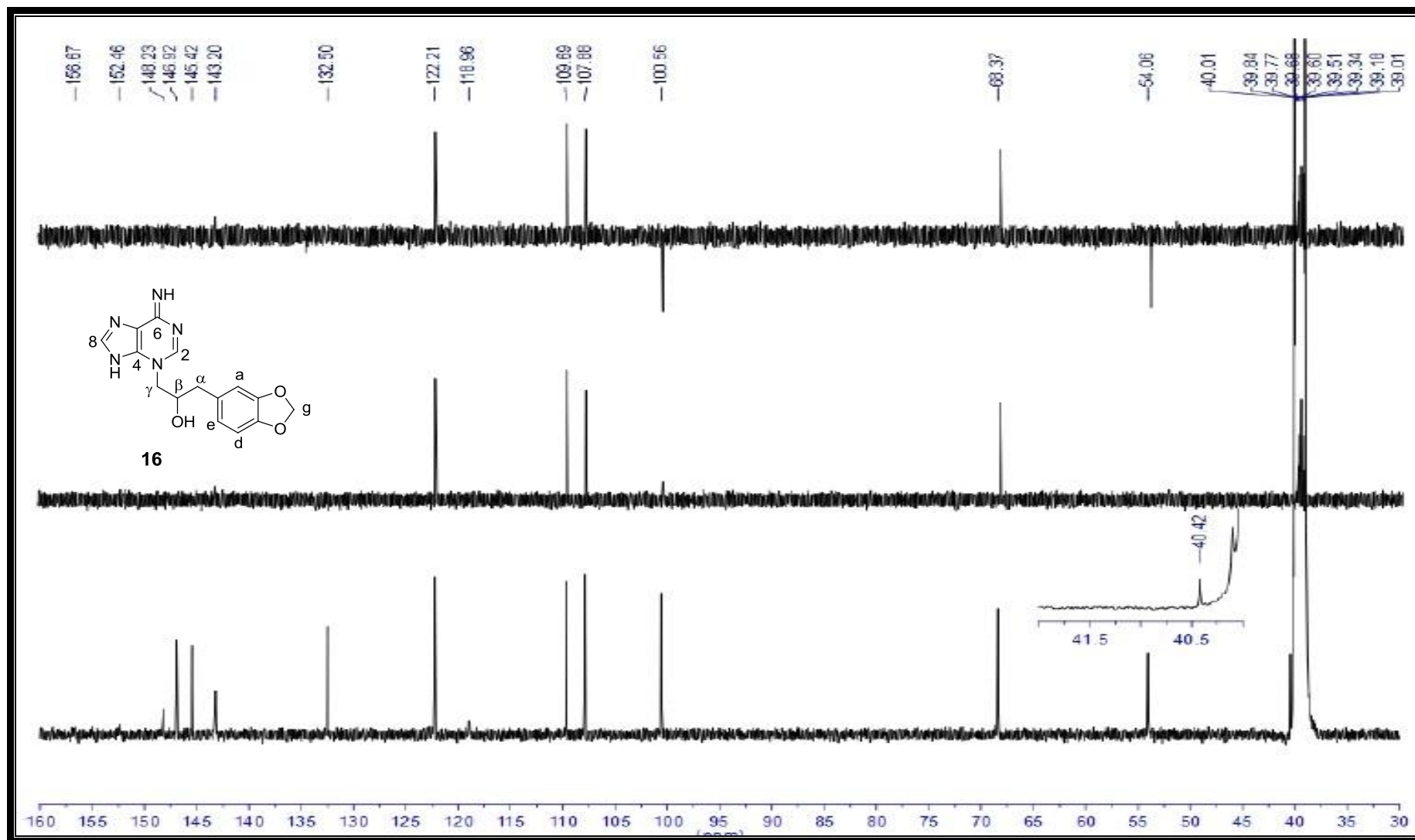
附圖二十三、加成產物 (R) -enriched- $N^6\gamma$ -SFO-dAdo **12** 之 ^{13}C NMR (125.7 MHz, d_6 -DMSO) 光譜圖。



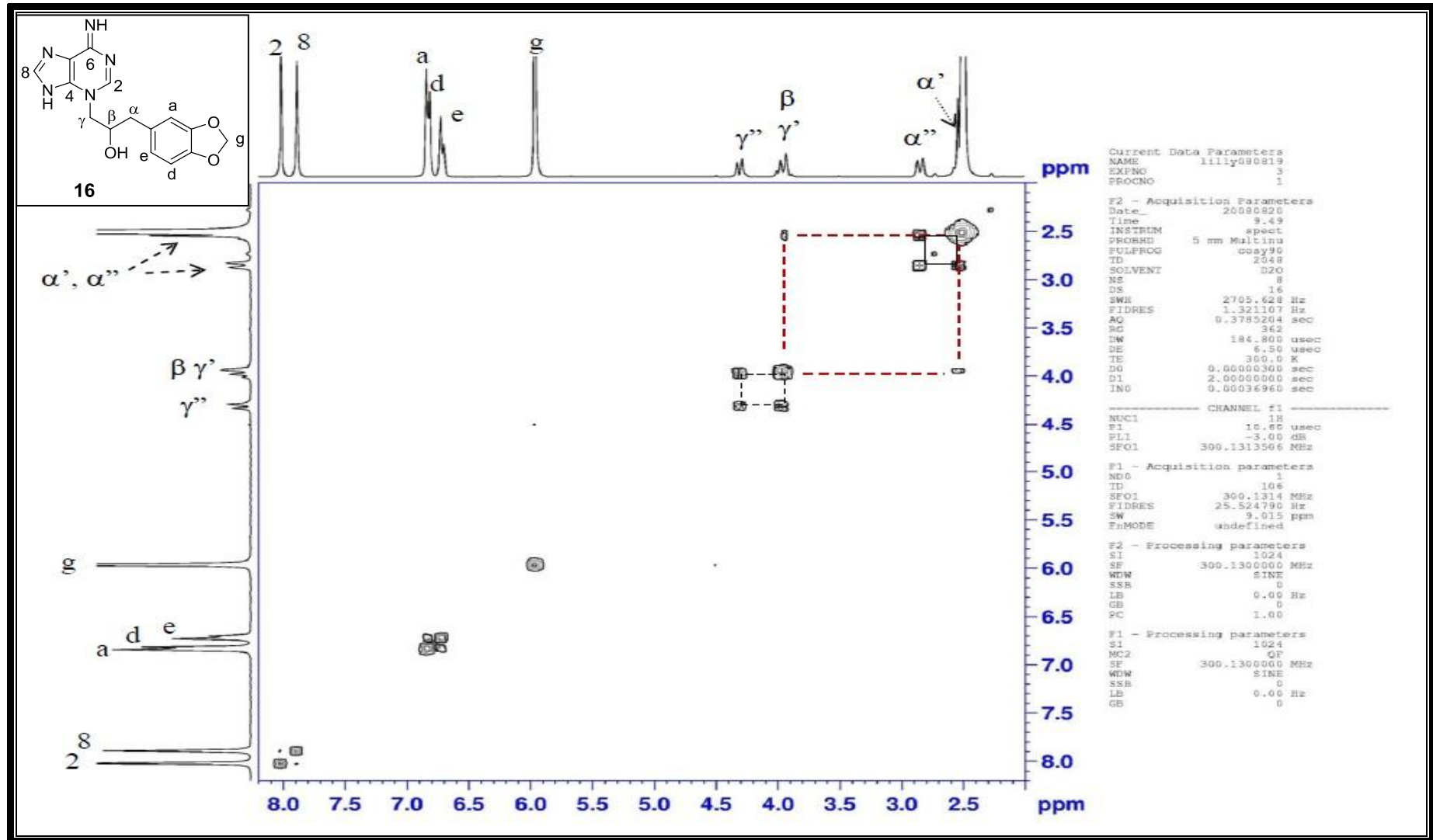
附圖二十四、加成產物 $N3\gamma$ -SFO-dAdo **16** 之 ^1H NMR(500 MHz, d_6 -DMSO) 光譜圖。



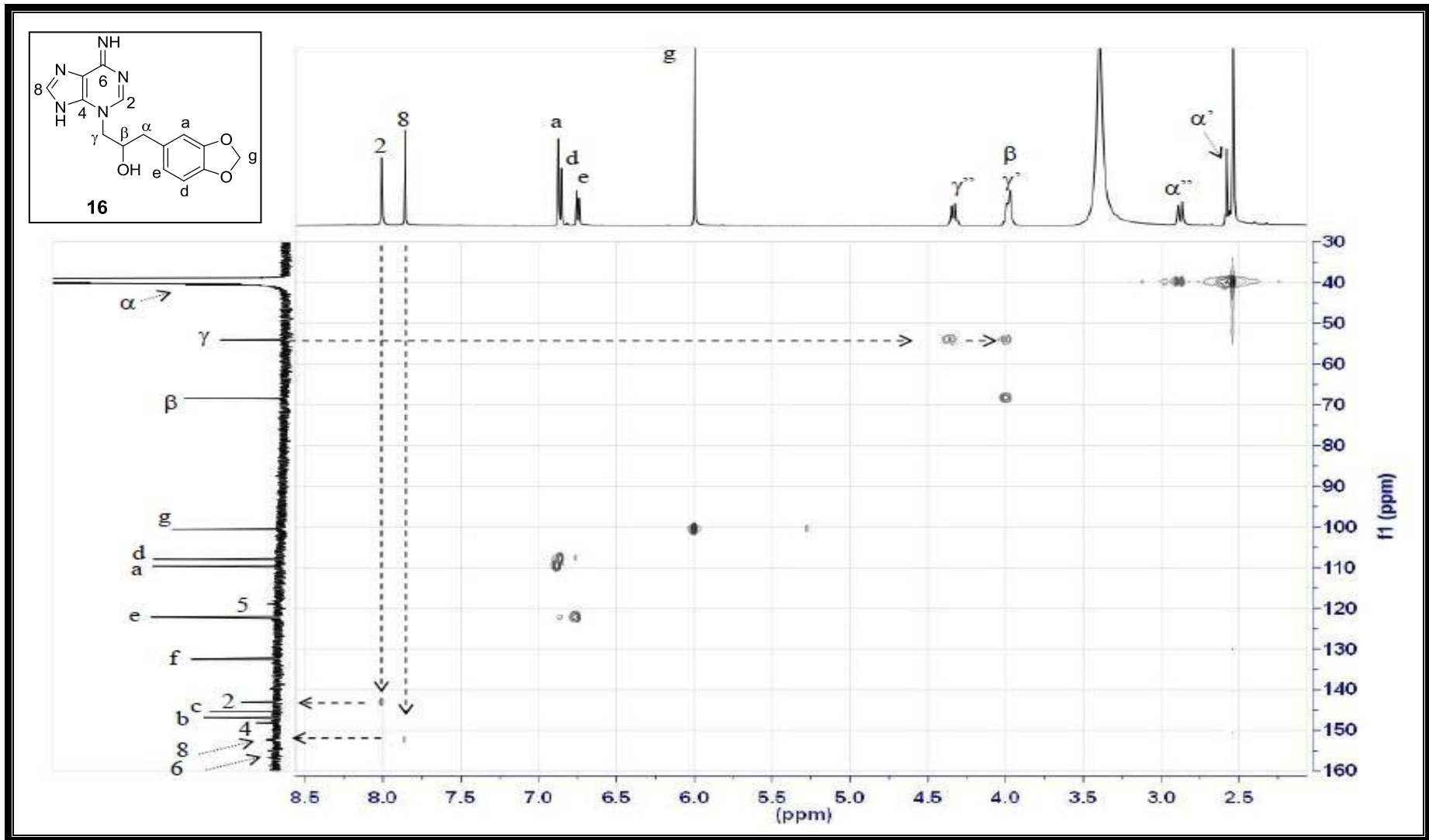
附圖二十五、加成產物 *N*3 γ -SFO-dAdo **16** 之 ^{13}C NMR(125.7 MHz, d_6 -DMSO)光譜圖。



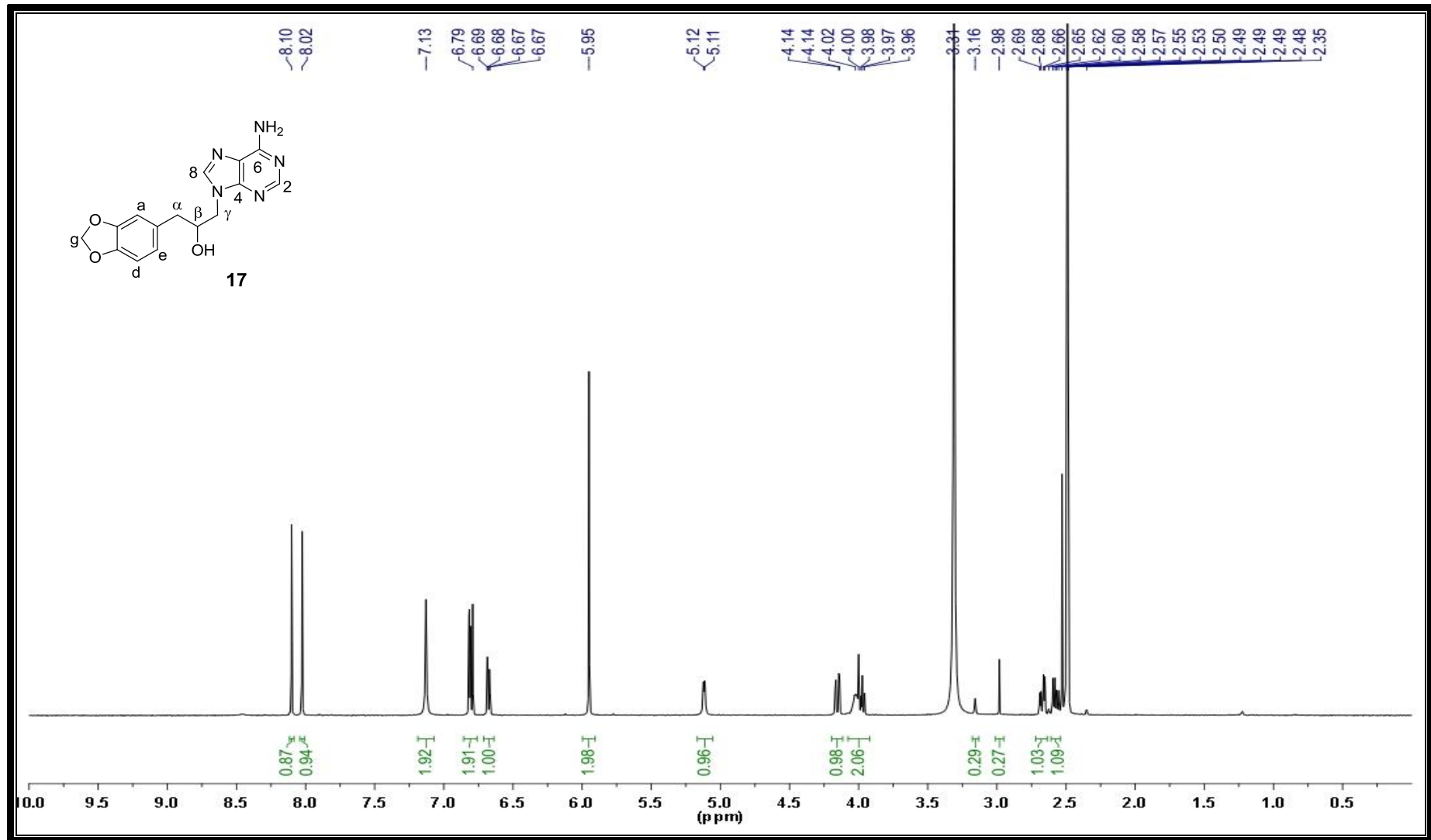
附圖二十六、加成產物 *N*3 γ -SFO-dAdo **16** 之 DEPT (125.7 MHz, d_6 -DMSO) 光譜圖。



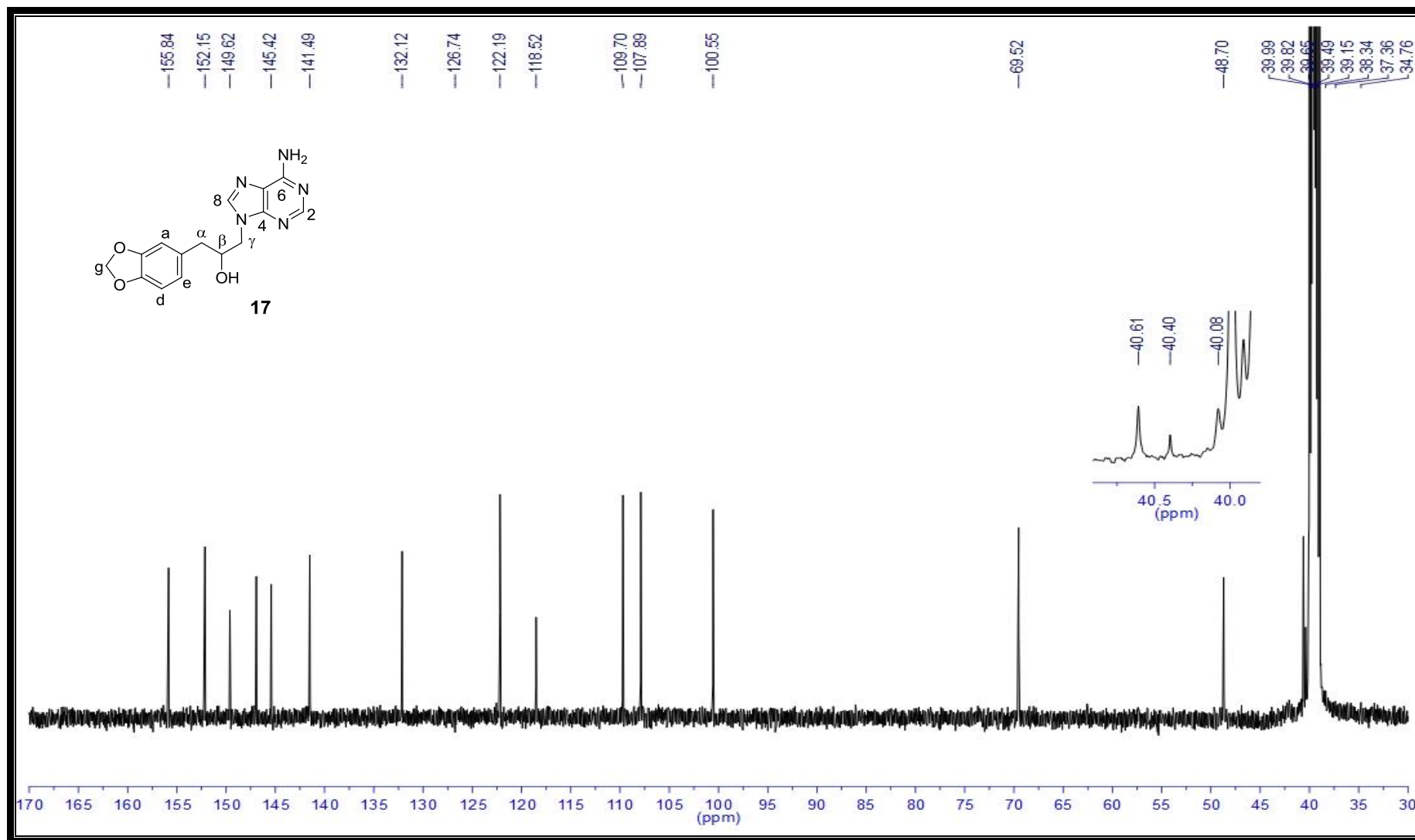
附圖二十七、加成產物 *N*3 γ -SFO-dAdo **16** 之 H,H-COSY (300 MHz, *d*₆-DMSO)光譜圖。



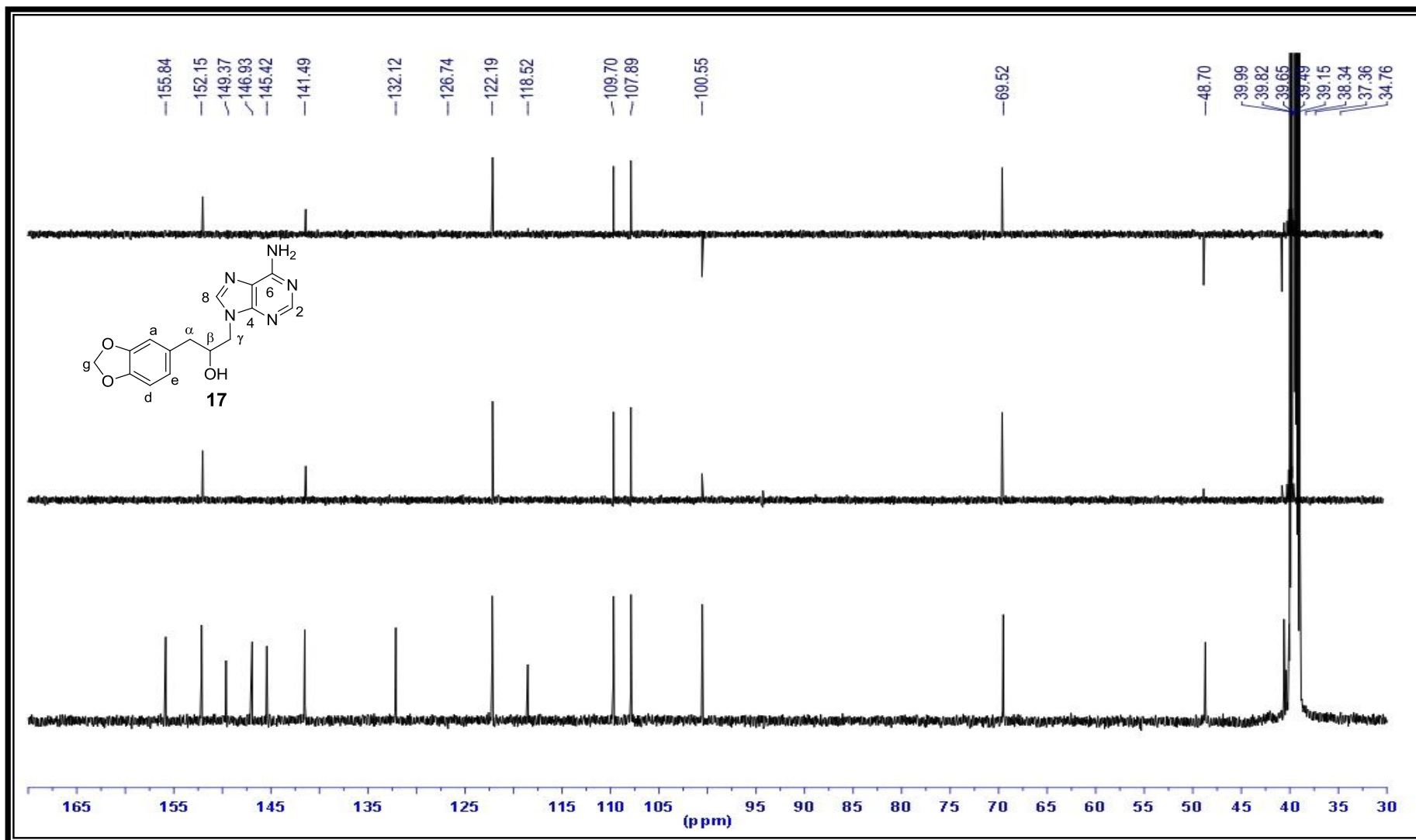
附圖二十八、加成產物 *N*3 γ -SFO-dAdo 16 之 HMQC(500 MHz, *d*₆-DMSO)光譜圖。



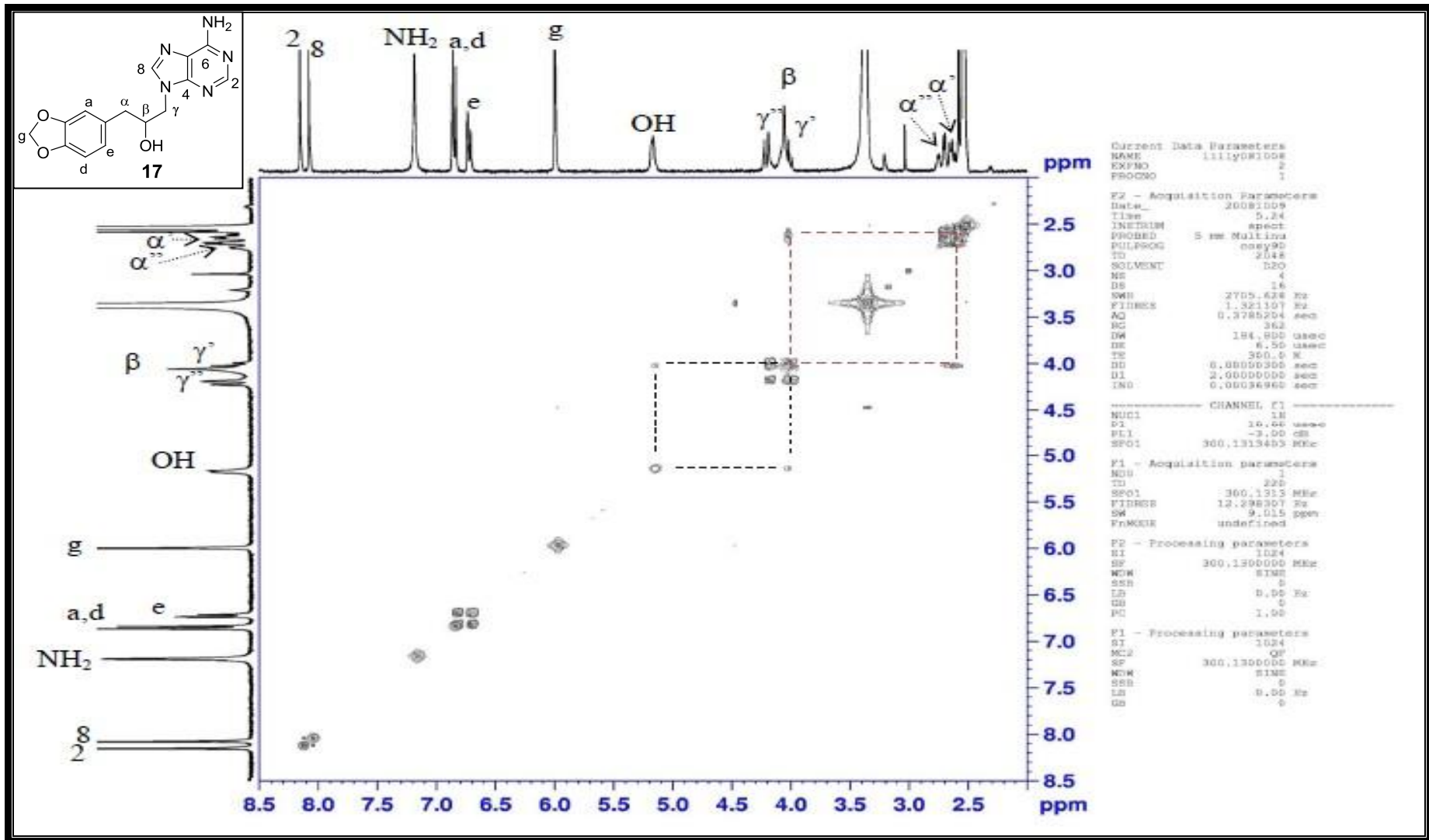
附圖二十九、加成產物 *N*9 γ -SFO-Ade **17** 之 ^1H NMR (500 MHz, d_6 -DMSO) 光譜圖。



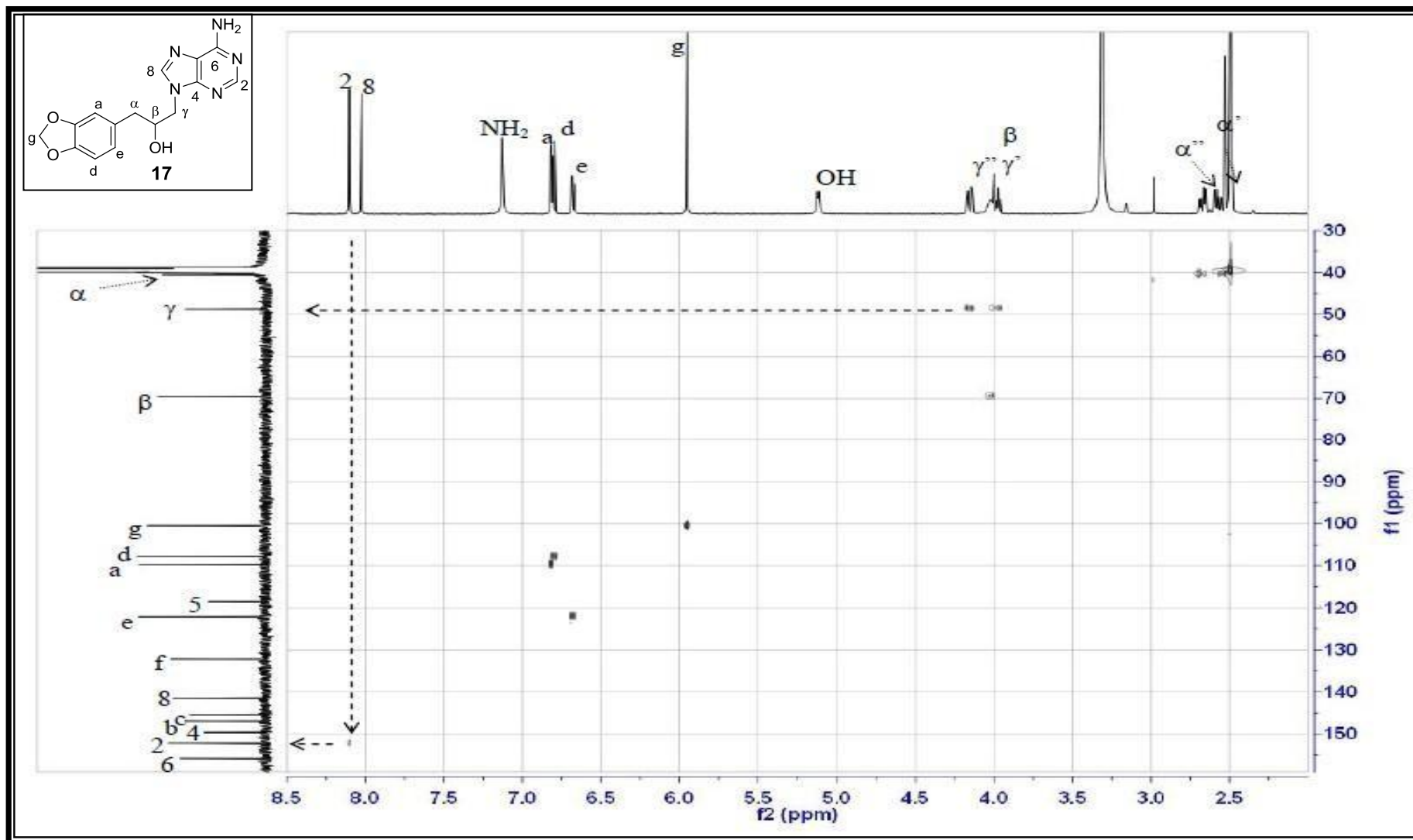
附圖三十、加成產物 *N*9 γ -SFO-Ade **17** 之 ^{13}C NMR (125.7 MHz, d_6 -DMSO) 光譜圖。



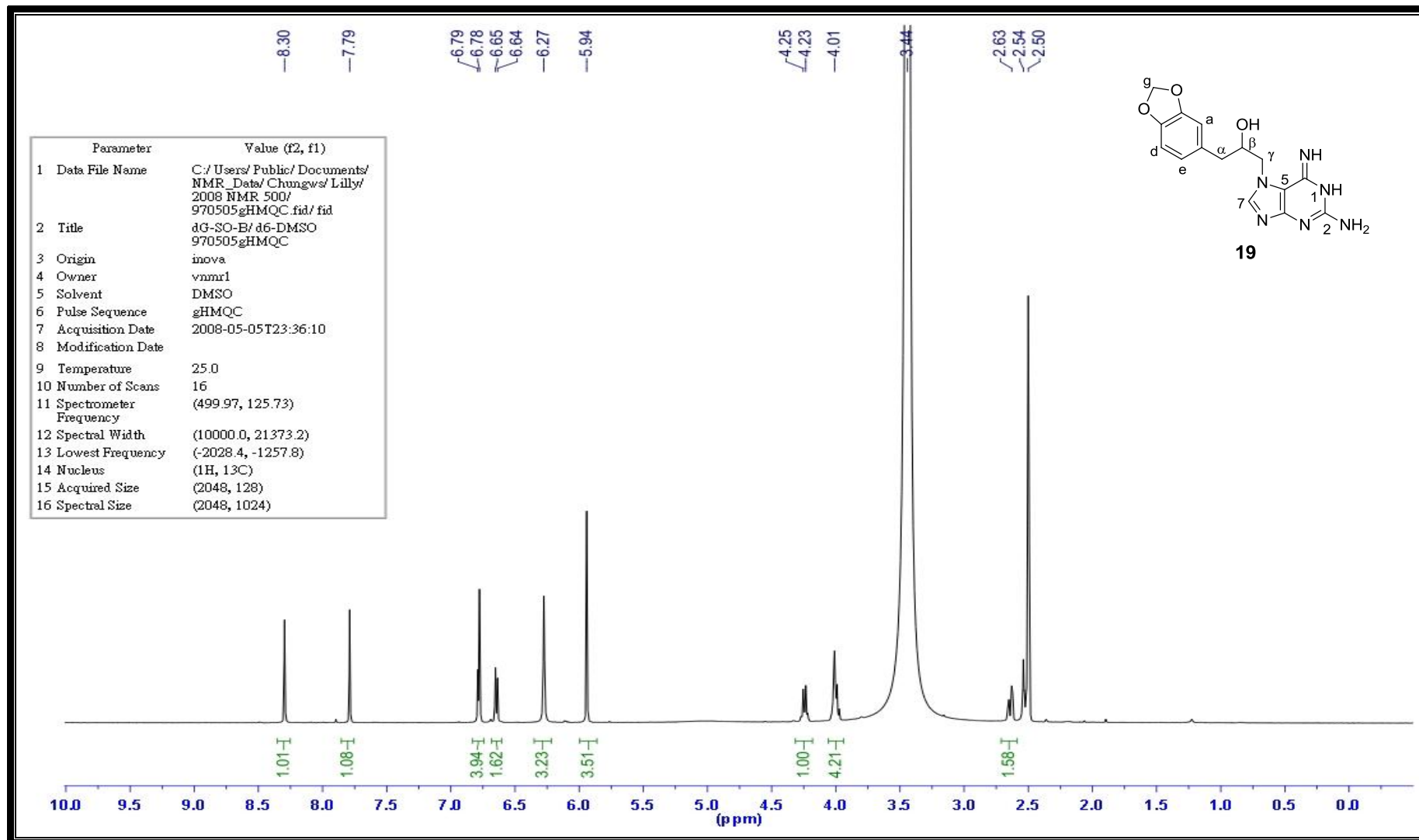
附圖三十一、加成產物 *N*9γ-SFO-Ade **17** 之 DEPT (125.7 MHz, *d*₆-DMSO) 光譜圖。



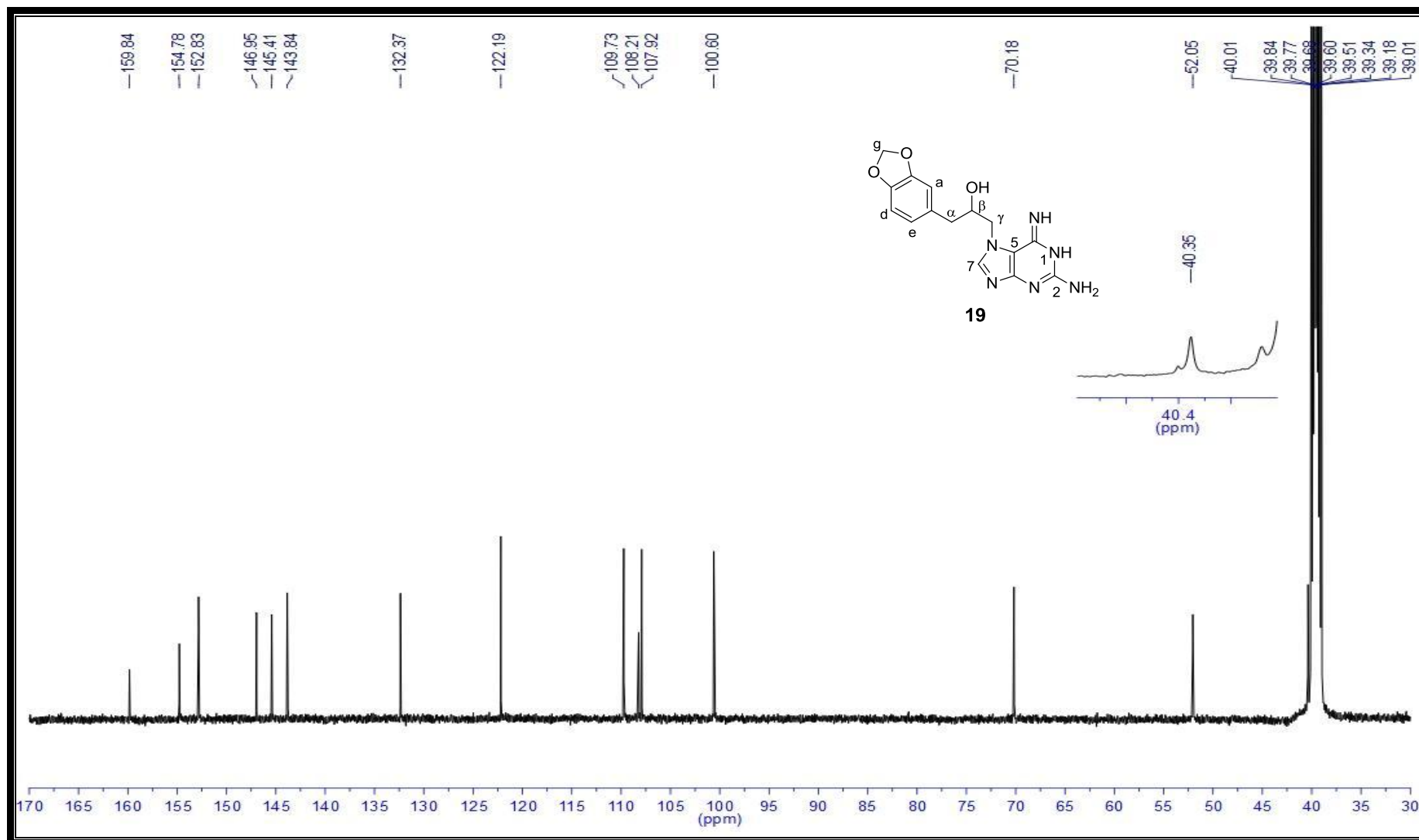
附圖三十二、加成產物 *N*9 γ -SFO-Ade **17** 之 H,H-COSY (300 MHz, *d*₆-DMSO)光譜圖。



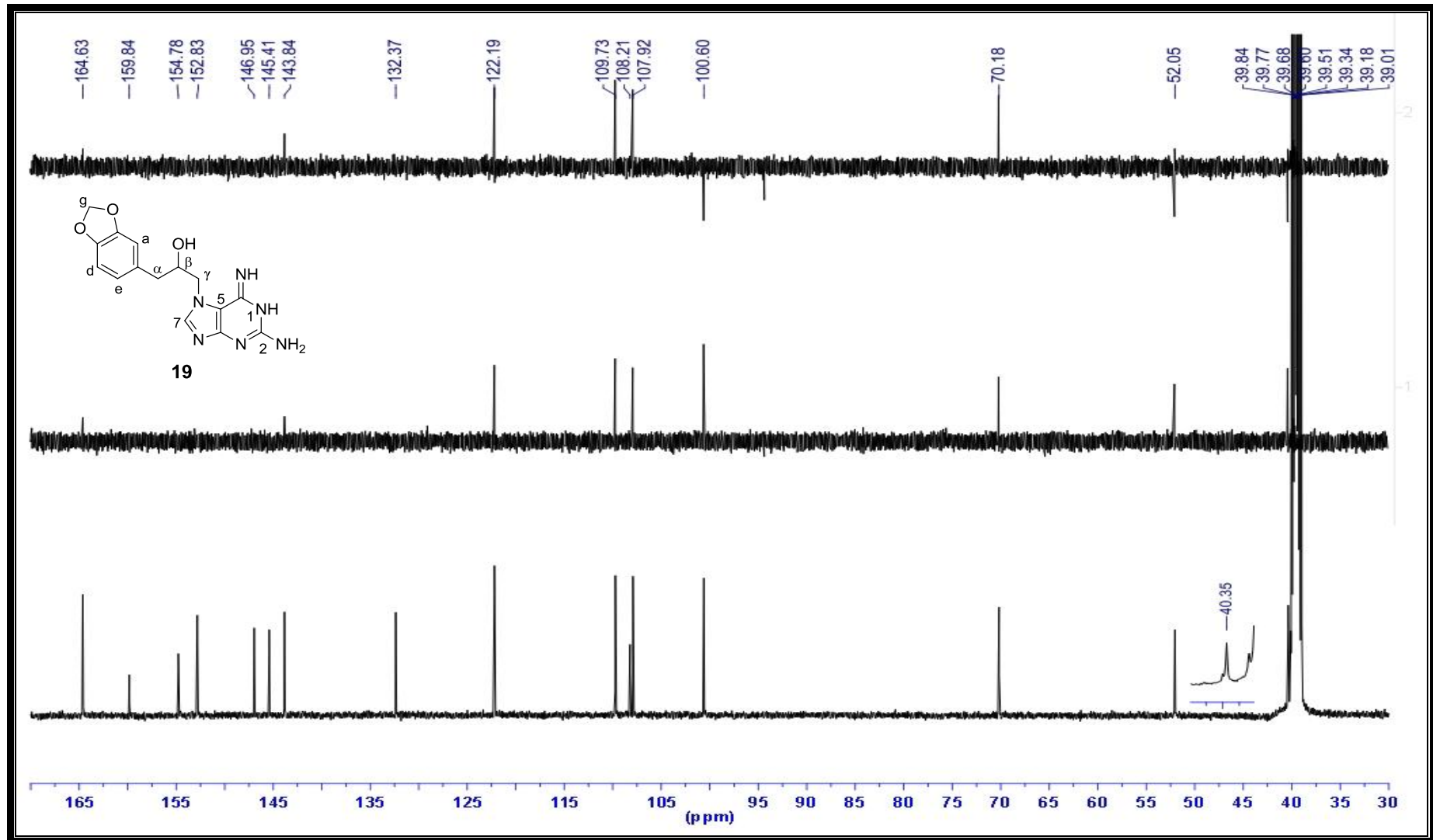
附圖三十三、加成產物 *N*9 γ -SFO-Ade **17** 之 HMQC (500 MHz, *d*₆-DMSO) 光譜圖。



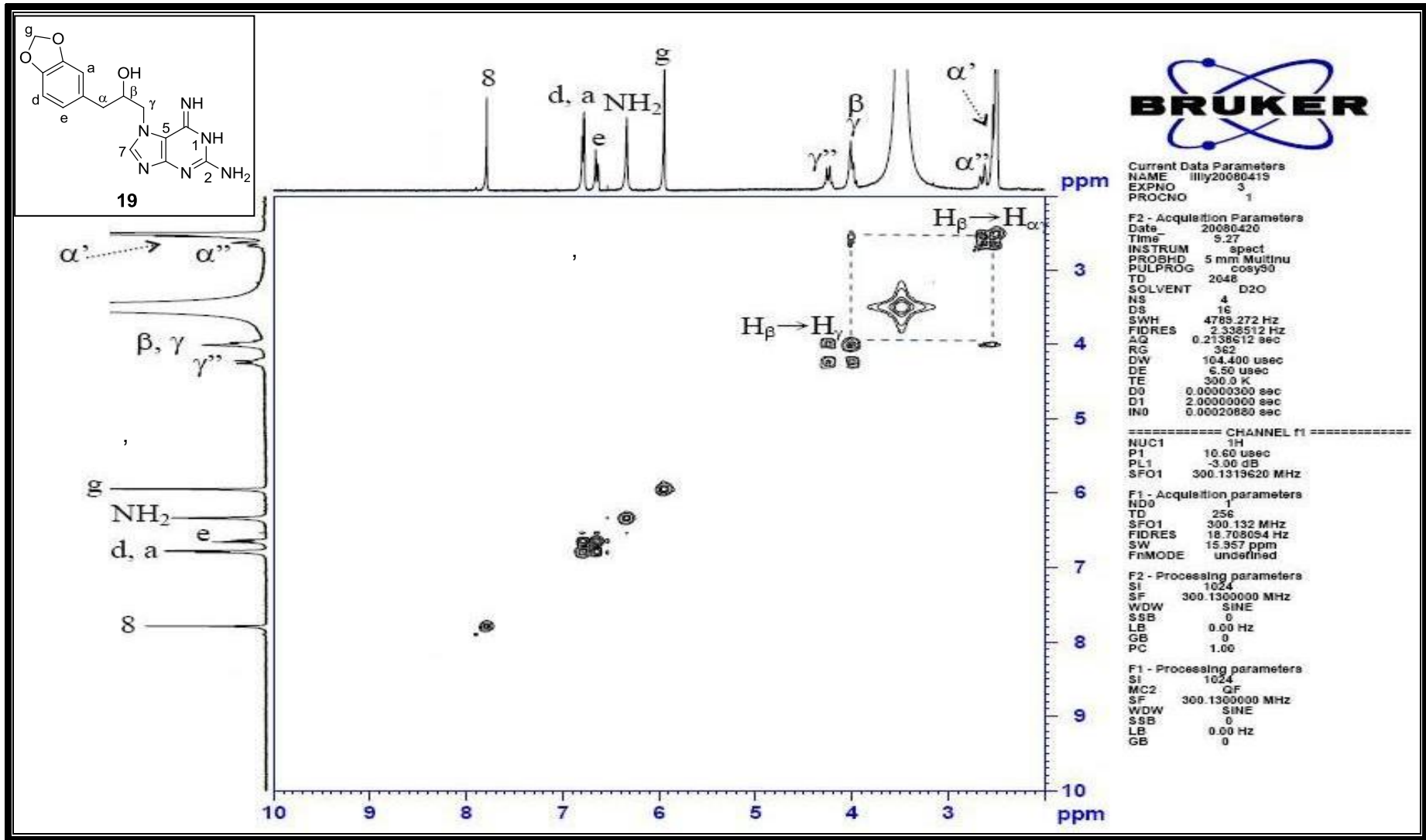
附圖三十四、加成產物 *N*7 γ -SFO-Gua **19** 之 ^1H NMR (500 MHz, d_6 -DMSO) 光譜圖。



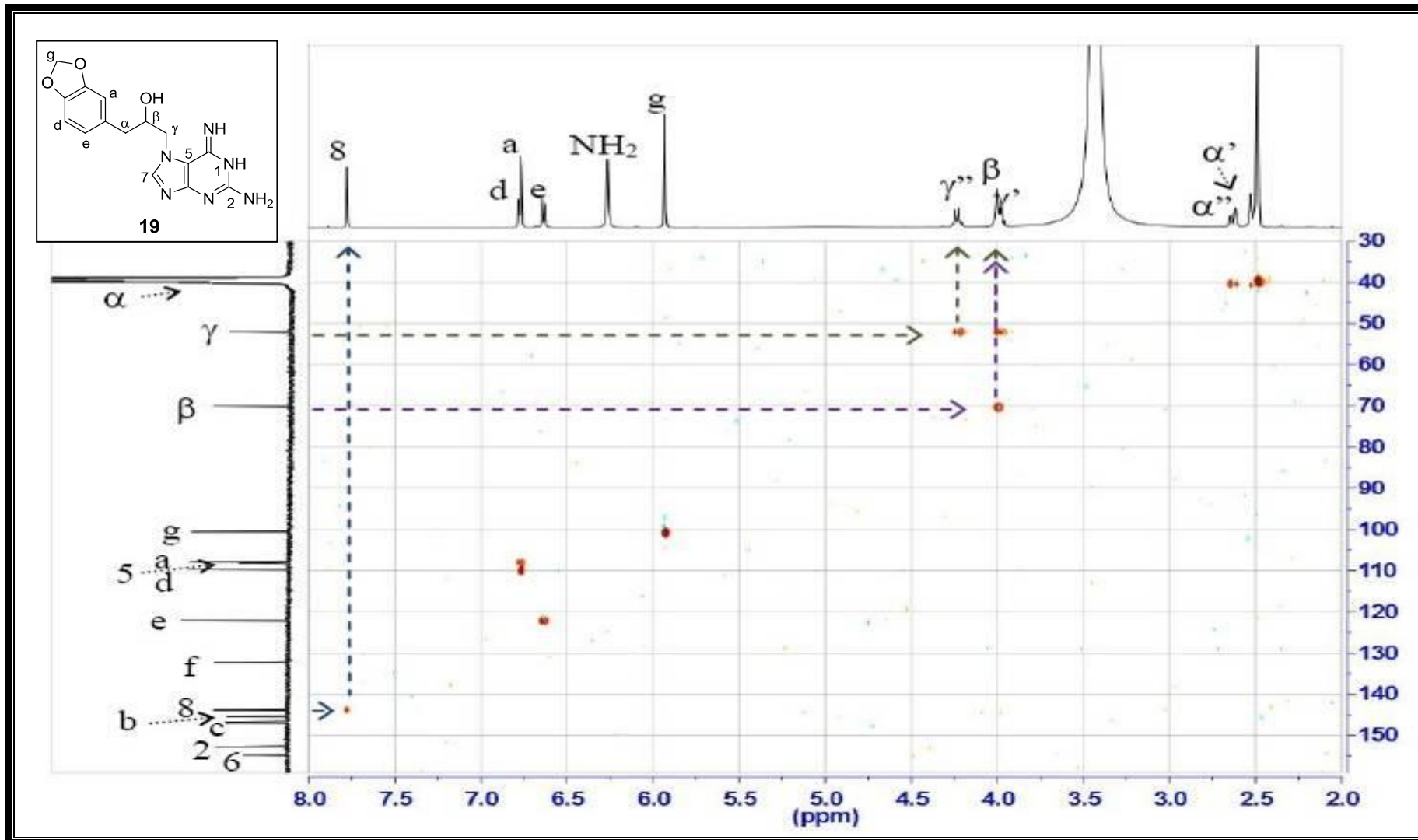
附圖三十五、加成產物 *N*7 γ -SFO-Gua **19** 之 ^{13}C NMR (125.7 MHz, d_6 -DMSO) 光譜圖。



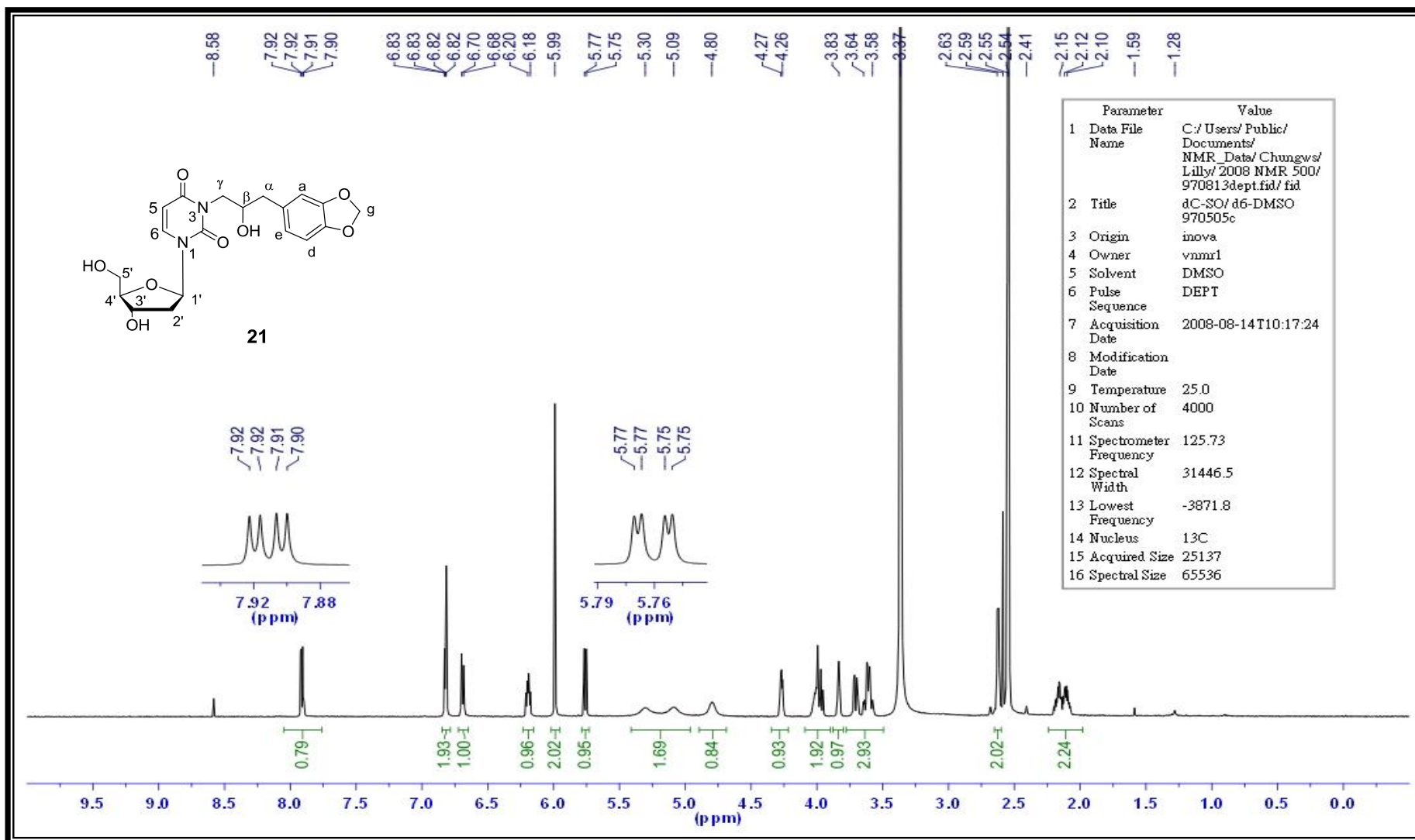
附圖三十六、加成產物 *N*7-γ-SFO-Gua **19** 之 DEPT (125.7 MHz, d_6 -DMSO) 光譜圖。



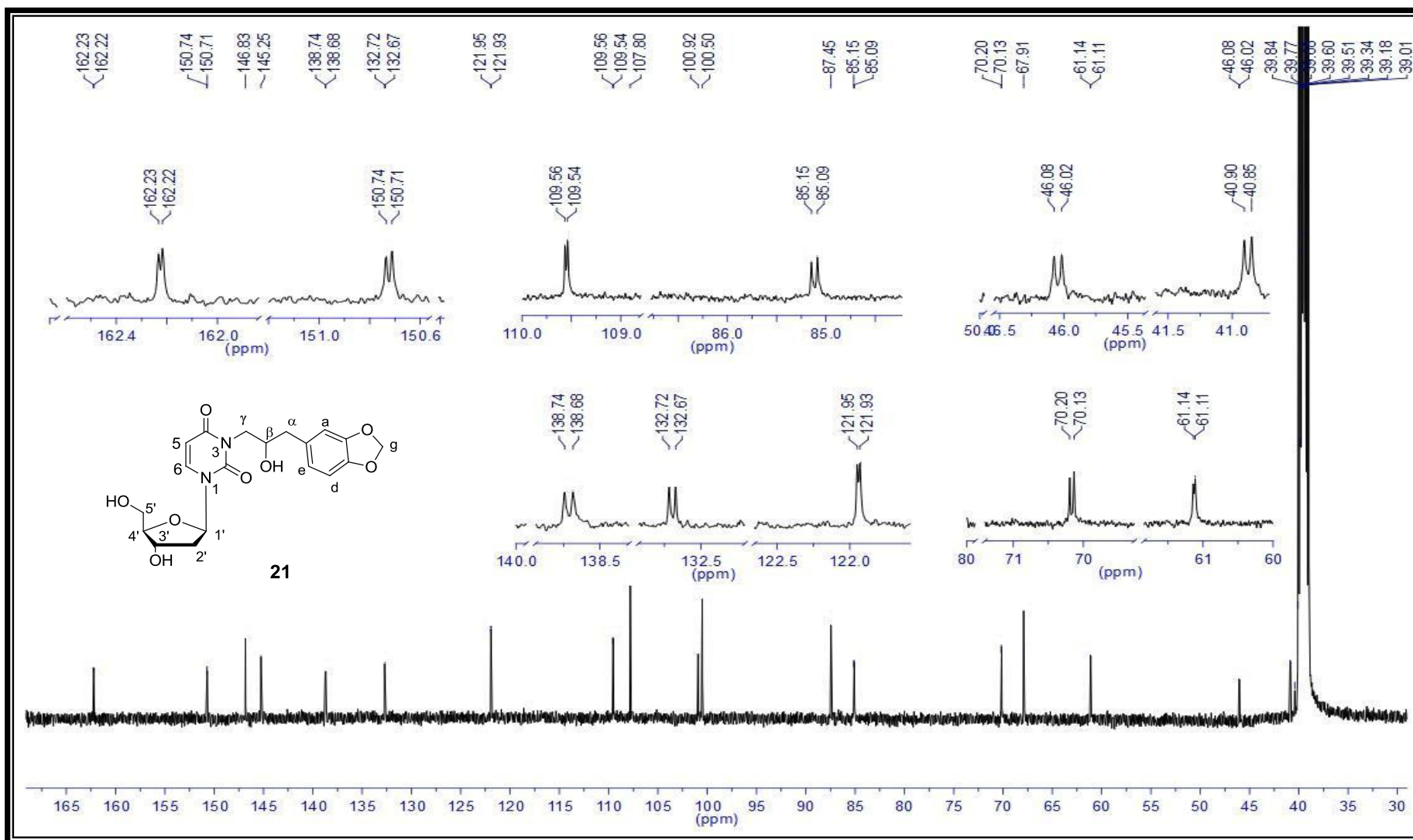
附圖三十七、加成產物 *N7* γ -SFO-Gua **19** 之 H,H-COSY (500 MHz, *d*₆-DMSO)光譜圖。



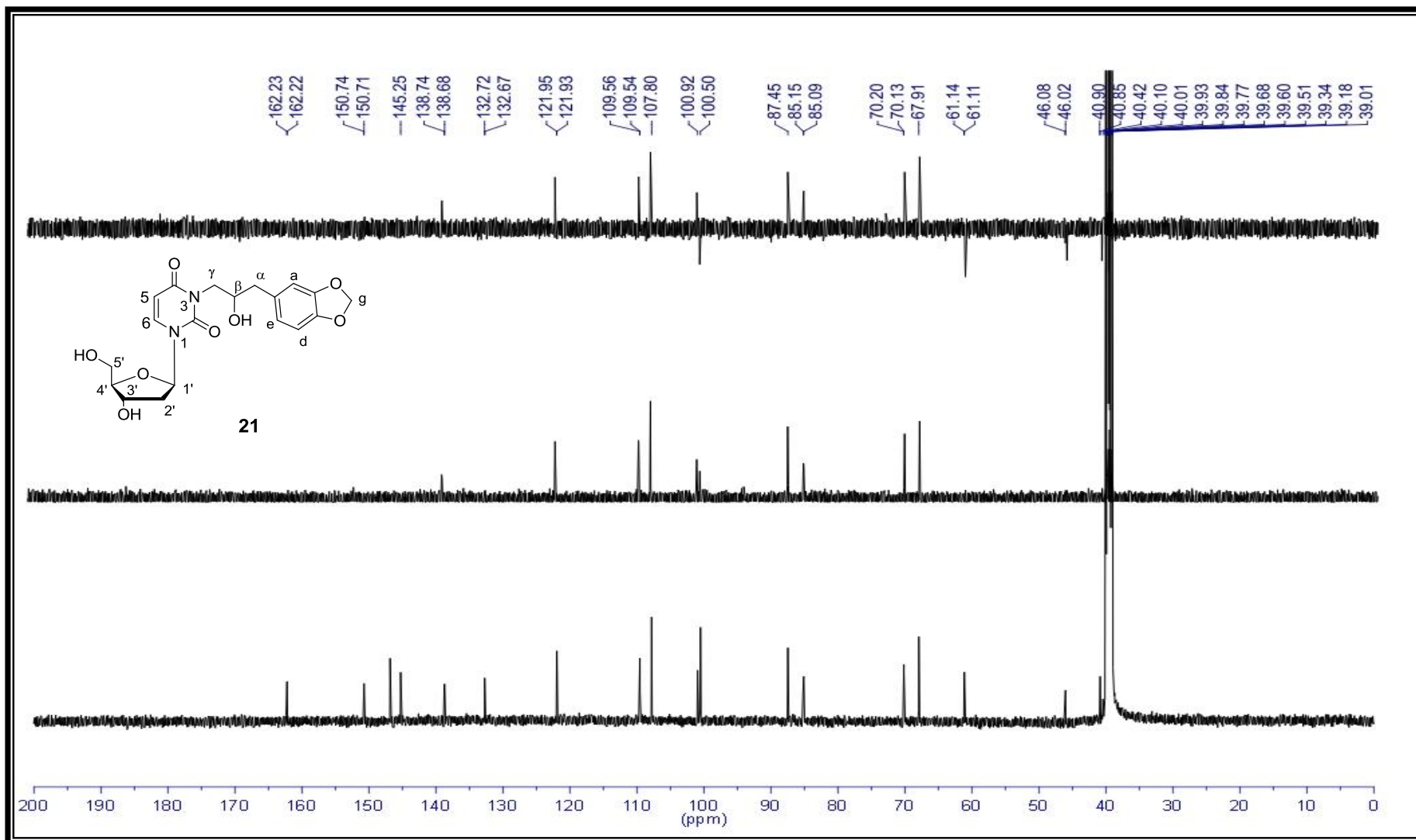
附圖三十八、加成產物 *N*7γ-SFO-Gua **19** 之 HMQC (500 MHz, *d*₆-DMSO) 光譜圖。



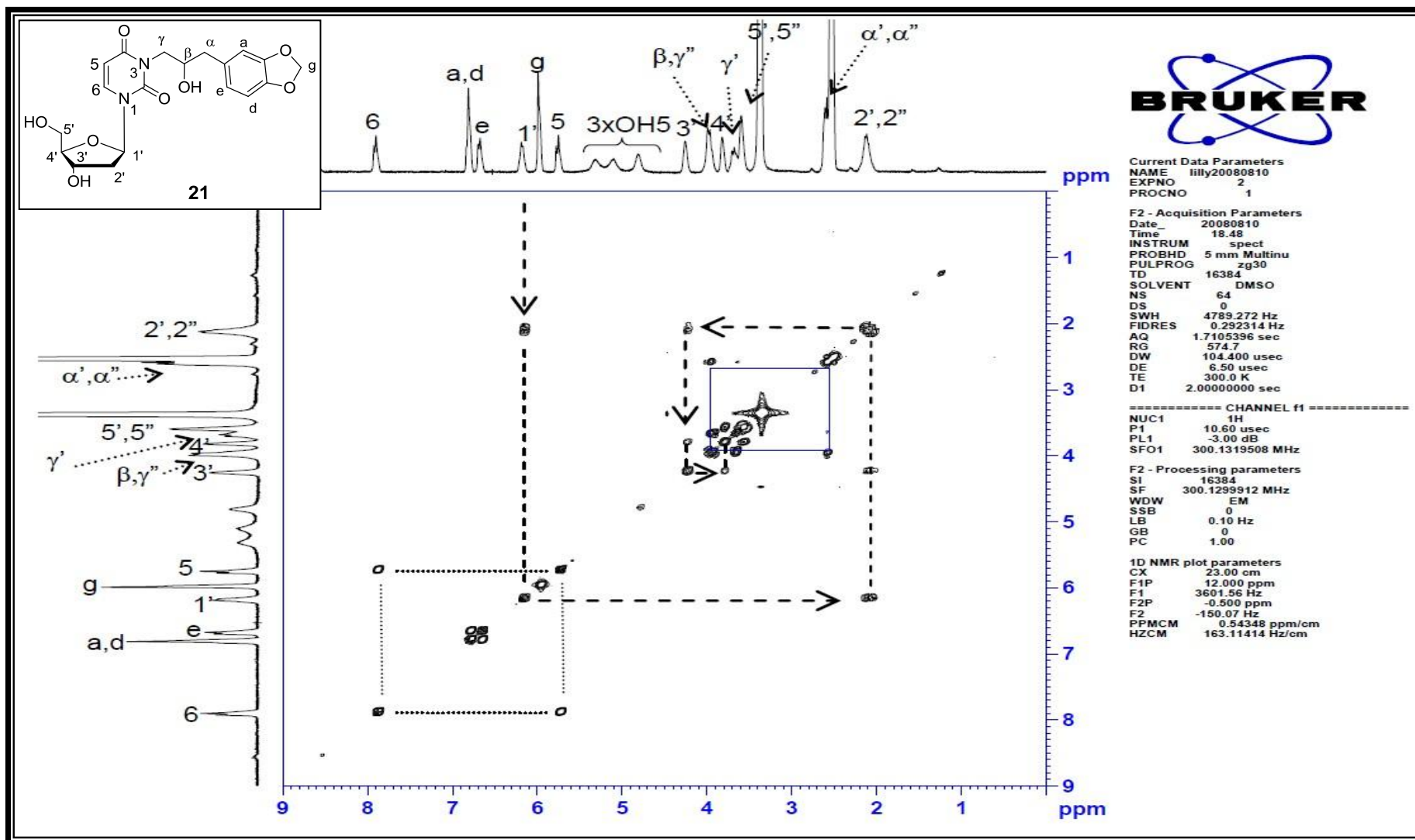
附圖三十九、加成產物 *N*3 γ -SFO-dUrd **21** 之 ^1H NMR (500 MHz, d_6 -DMSO) 光譜圖。



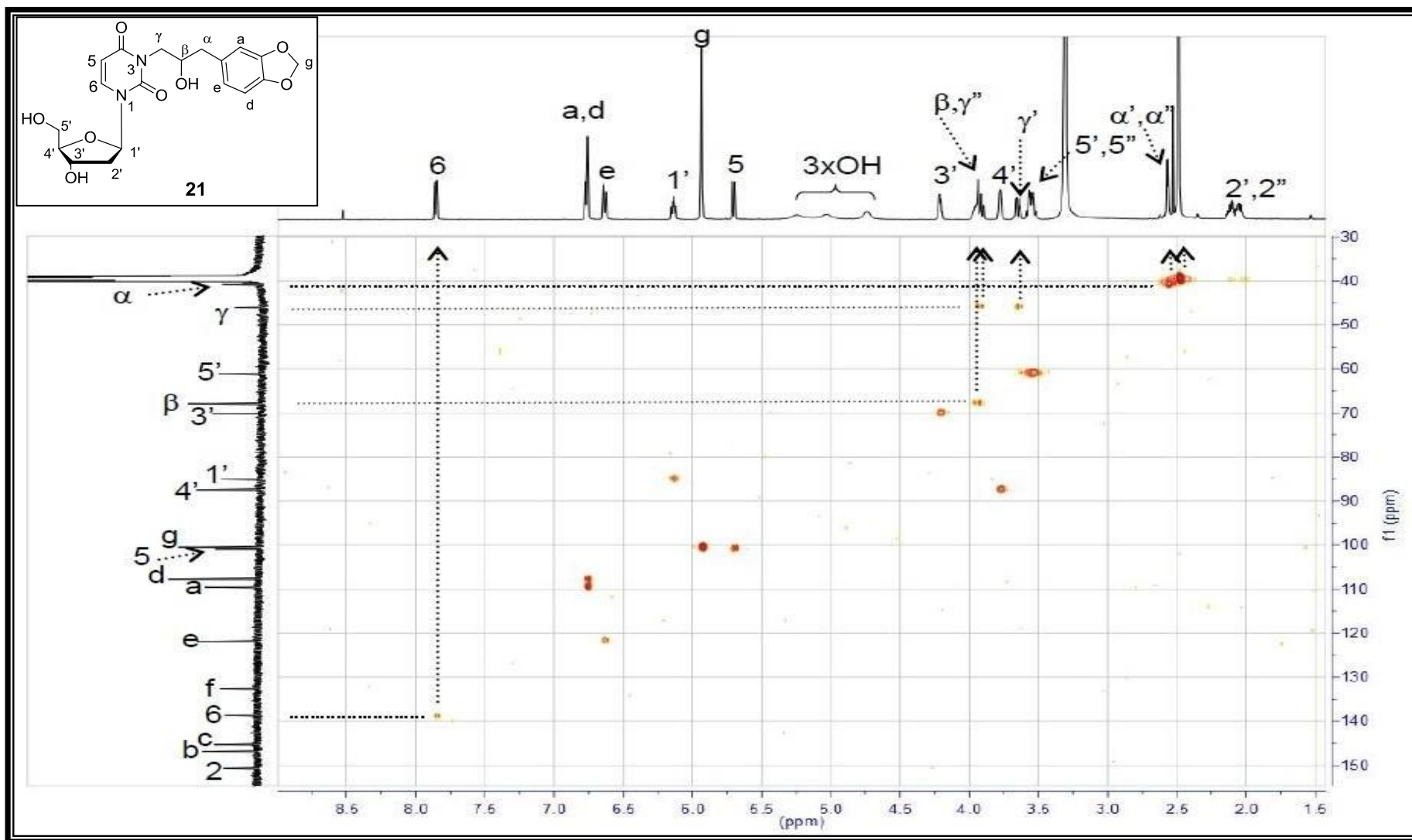
附圖四十、加成產物 *N*³γ-SFO-dUrd **21** 之 ¹³C NMR (125.7 MHz, *d*₆-DMSO) 光譜圖。



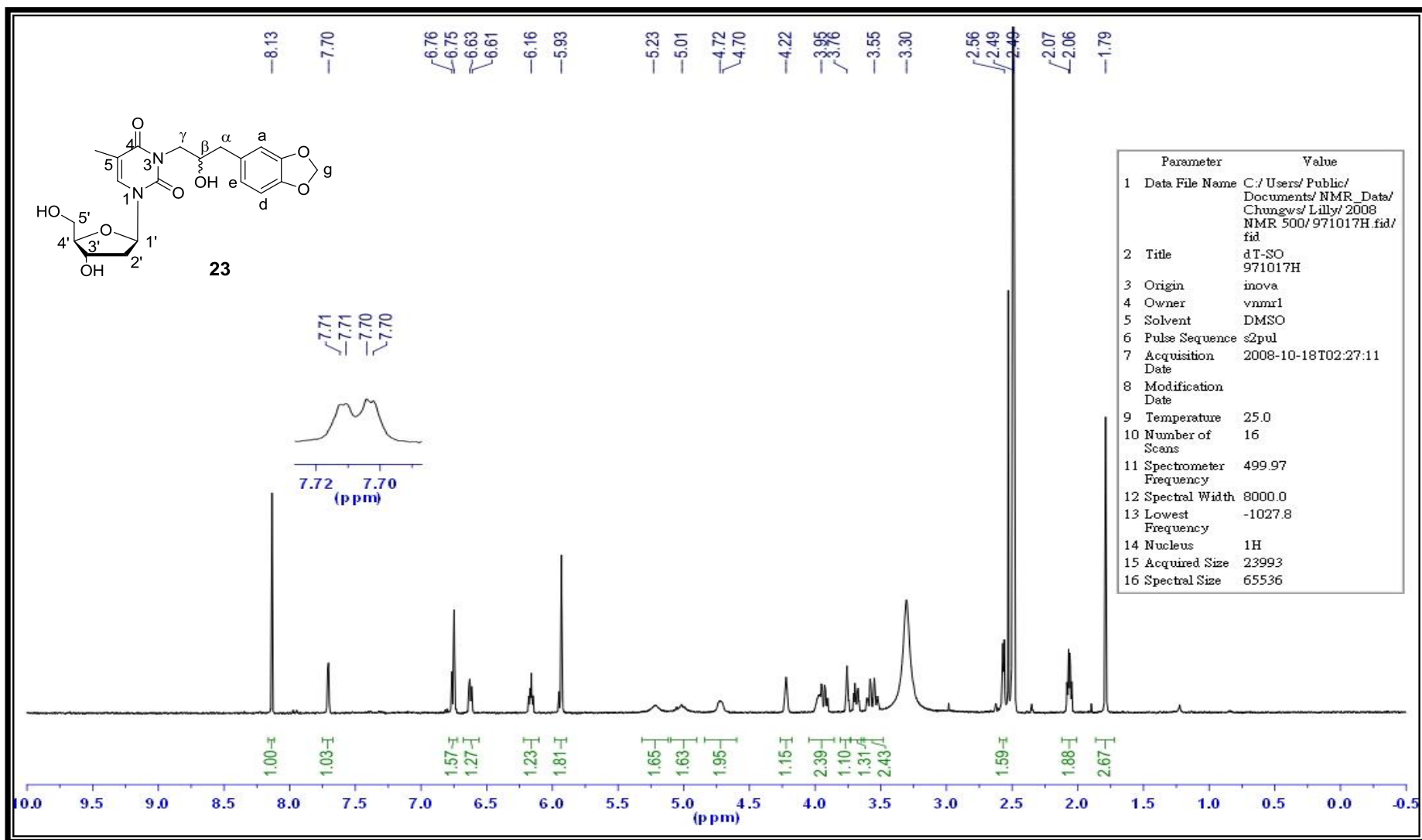
附圖四十一、加成產物 $N3\gamma$ -SFO-dUrd **21** 之 DEPT (125.7 MHz, d_6 -DMSO) 光譜圖。



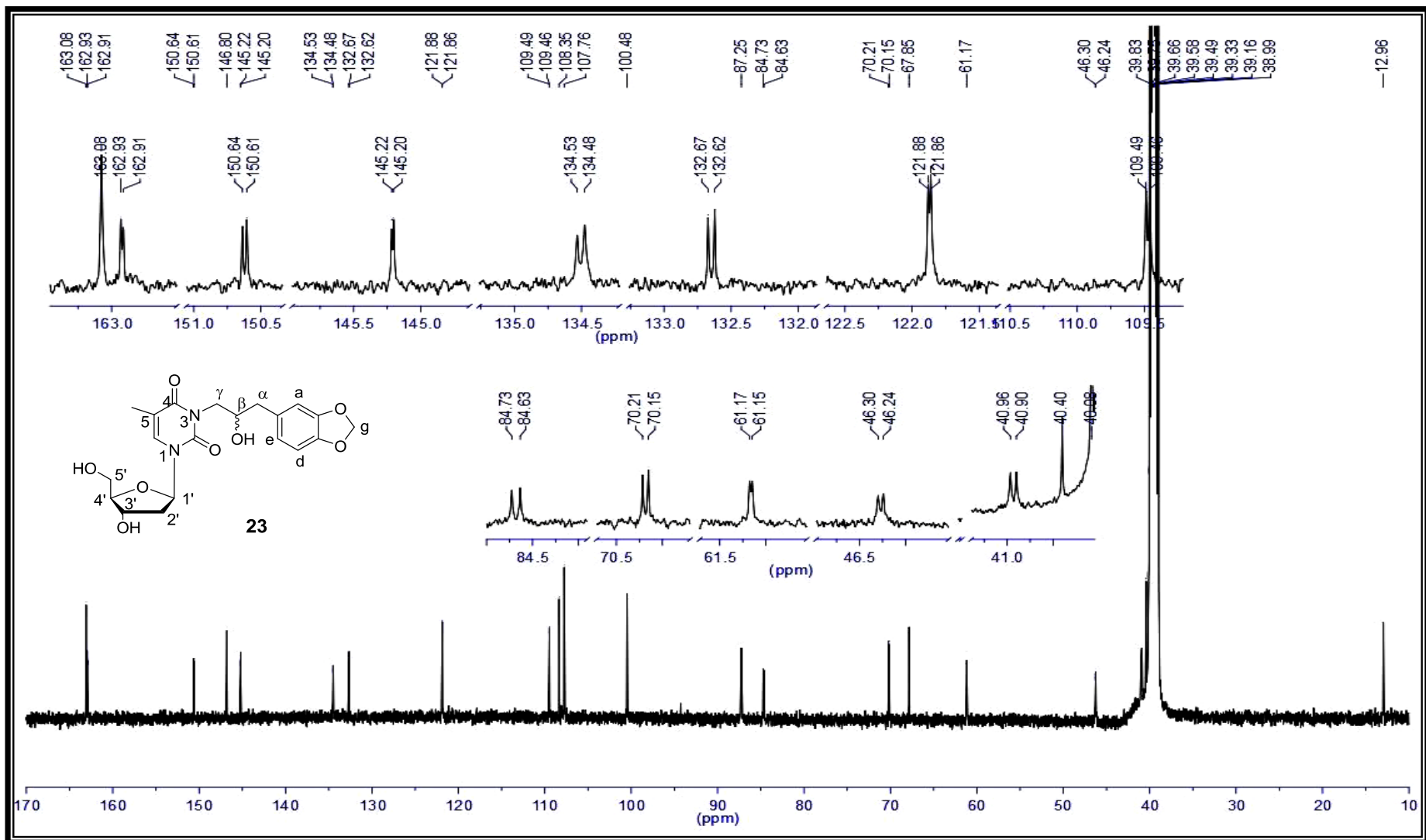
附圖四十二、加成產物 $N3\gamma$ -SFO-dUrd **21** 之 H,H-COSY (300 MHz, d_6 -DMSO) 光譜圖。



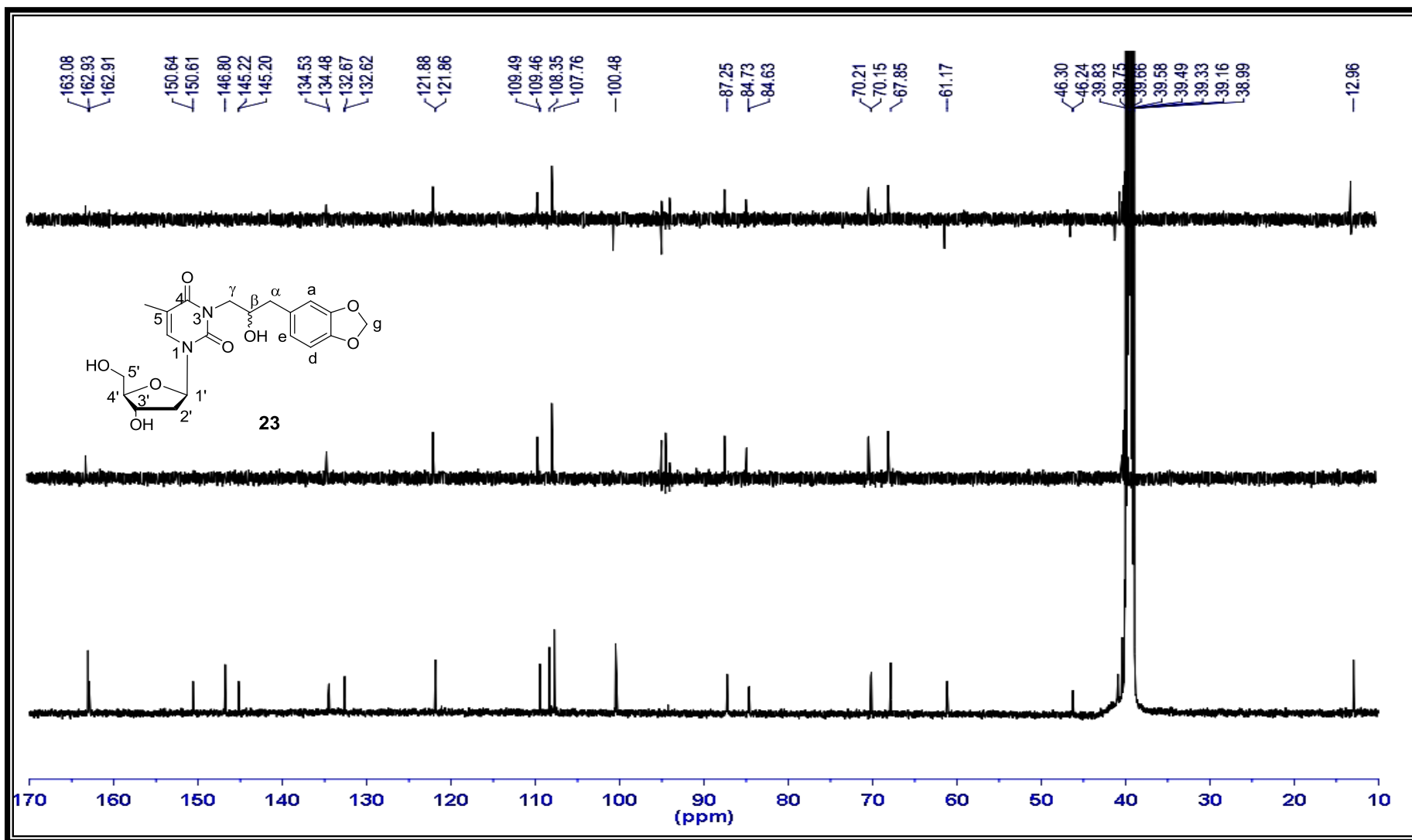
附圖四十三、加成產物 *N*3 γ -SFO-dUrd **21** 之 HMQC (500 MHz, *d*₆-DMSO) 光譜圖。



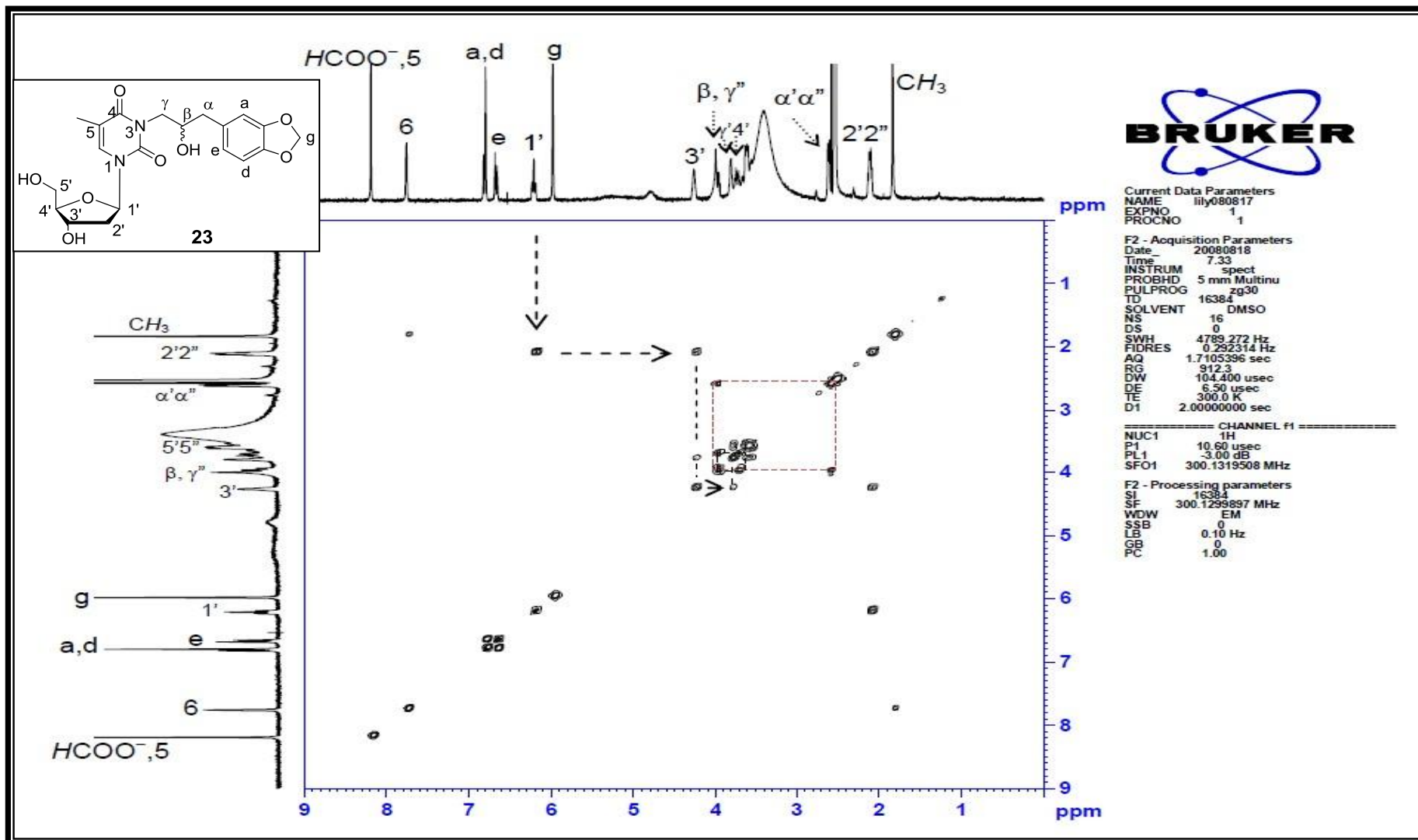
附圖四十四、加成產物 *N*3 γ -SFO-dThd **23** 之 ¹H NMR (500 MHz, *d*₆-DMSO) 光譜圖。



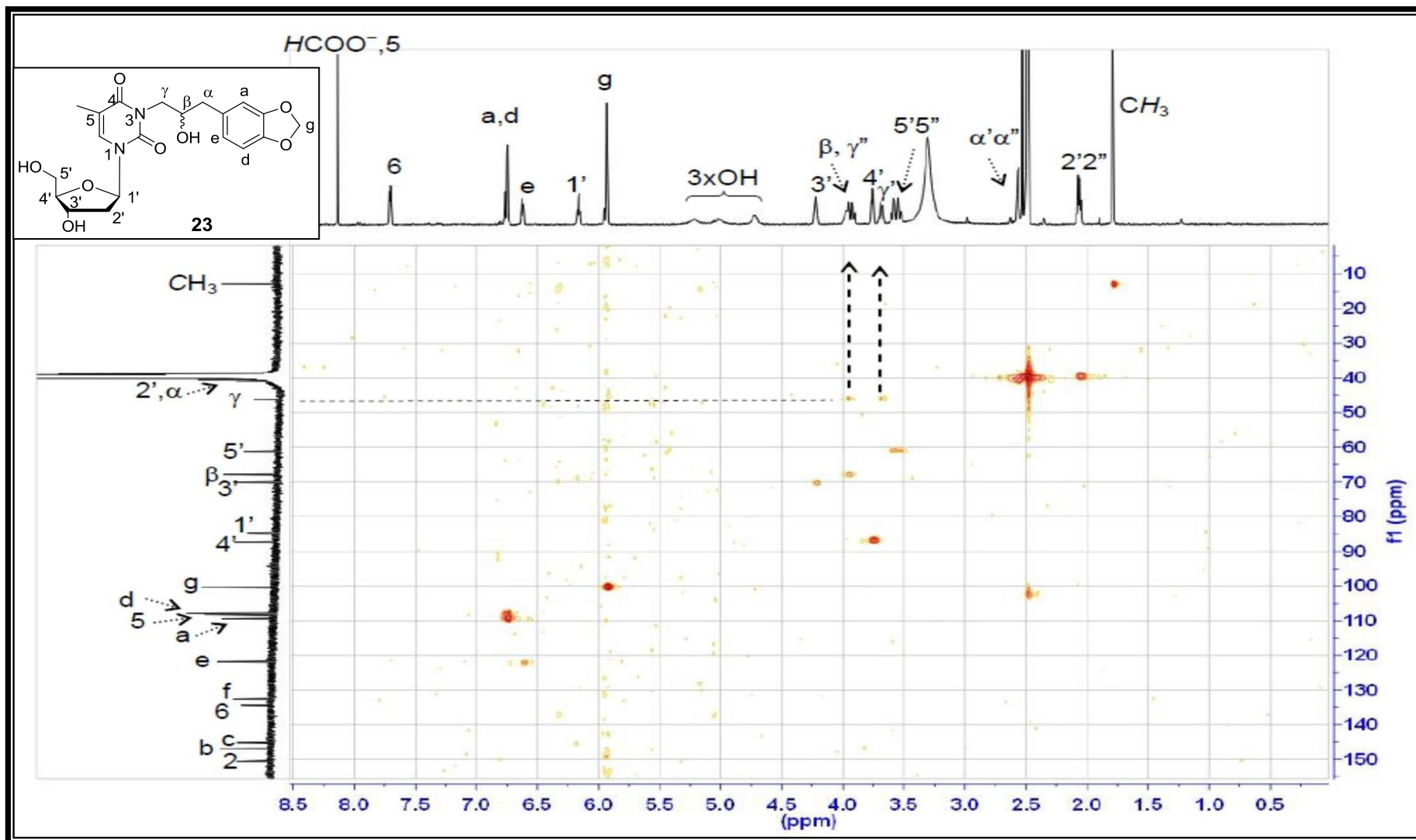
附圖四十五、加成產物 $N3\gamma$ -SFO-dThd **23** 之 ^{13}C NMR (125.7 MHz, d_6 -DMSO) 光譜圖。



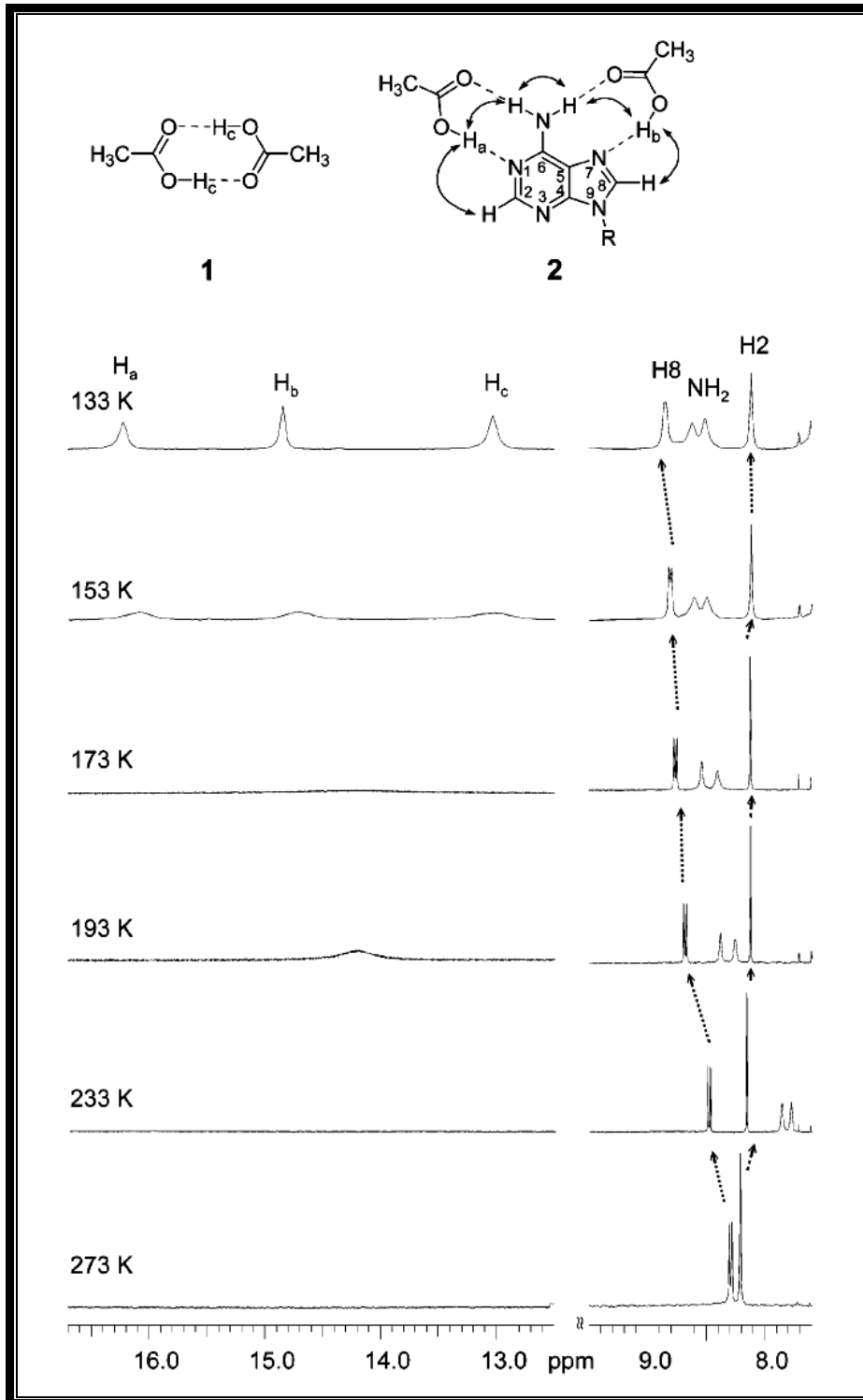
附圖四十六、加成產物 *N*3 γ -SFO-dThd **23** 之 DEPT (125.7 MHz, *d*₆-DMSO) 光譜圖。



附圖四十七、加成產物 *N*3 γ -SFO-dThd **23** 之 $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY (300 MHz, d_6 -DMSO)光譜圖。



附圖四十八、加成產物 *N*3 γ -SFO-dThd **23** 之 HMQC (500 MHz, *d*6-DMSO) 光譜圖。



附圖四十九、文獻上 3',5'-di-O-(triisopropylsilyl)-7- ^{15}N -2'-deoxyadenosine 與醋酸(1:4)在 $\text{CDClF}_2/\text{CDF}_3$ (Freon solution) 溶劑中變溫實驗的 ^1H NMR 光譜圖。(Basilio Janke et al., 2004)