

國立交通大學

應用化學系

碩士論文

蛇床子素衍生物合成及其細胞毒性之研究

Study on the Synthesis and Cytotoxic Activity of the
Derivatives of Osthol

The logo of National Tsing Hua University is a circular emblem. It features a blue outer ring with the university's name in Chinese and English. Inside the ring is a shield-shaped crest containing the letters 'ES' and 'A' in a stylized font, with the year '1896' at the bottom.

研究生：廖立民

指導教授：莊祚敏 教授

中華民國九十四年七月

蛇床子素衍生物合成及其細胞毒性之研究

Study on the Synthesis and Cytotoxic Activity of the Derivatives of Osthol

研 究 生：廖立民

Student：Li-Min Liao

指導教授：莊祚敏

Advisor：Dr. Tzuoh-Miin Juang

國立交通大學
應用化學系
碩 士 論 文



Submitted to Department of Applied Chemistry

College of Science

National Chiao Tung University

in partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Science

In

Applied Chemistry

July 2005

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十四年七月

蛇床子素衍生物合成及其細胞毒性之研究

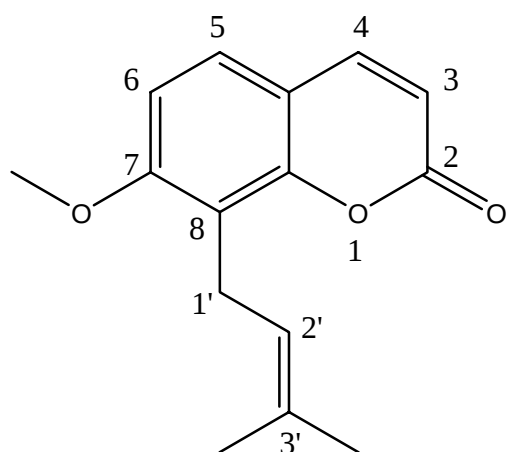
學生：廖立民

指導教授：莊祚敏 博士

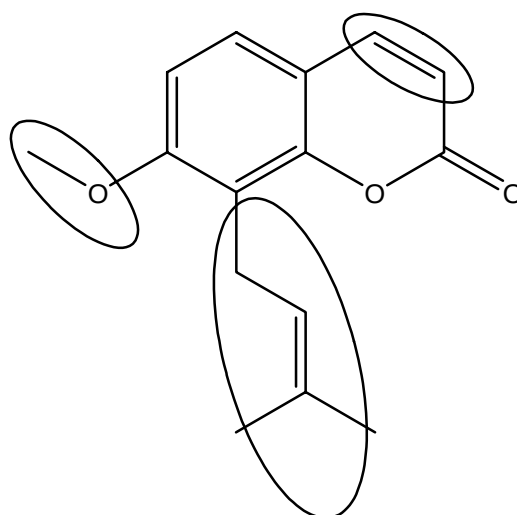
國立交通大學應用化學所

摘要

蛇床子為繖形科蛇床屬植物蛇床(*Cnidium monnieri*(L.)CUSS)之乾燥成熟果實，屬於補益藥。在近代藥理研究方面，發現蛇床子中的香豆素類化合物蛇床子素(osthol)能誘導血癌細胞(HL-60)走向細胞凋亡^{2、3}。所以我們選擇蛇床子素進行結構上的修飾並與薑黃素(curcumin)的部分結構形成的化合物 ferulic acid 結合合成出一系列的衍生物，進行抗癌細胞毒殺活性測試來探討其結構與活性的關係，發現 osthol 上的 isoprenyl group 對於抗癌活性有重要的影響，且 isoprenyl group 位於 C8 的位置對於抗癌活性有較好的表現。而 3,4-olefinic bond 對抗癌活性有影響，但作用機制不明。當化合物 osthenol 與 demethylsuberosin 接上 ferulic acid 形成衍生物(26)與(35)，發現抗癌活性與 IC₅₀ 表現比蛇床子素要來的優異，可將其做為先導藥物發展出新的抗癌藥物。此外，因為薑黃素不僅在抗癌方面表現優異，對於抗發炎亦有不錯的表現，因此我們相信取薑黃素部分結構形成的化合物 ferulic acid 做為取代基所合成出來的一系列衍生物對於抗發炎也會有不錯的結果。

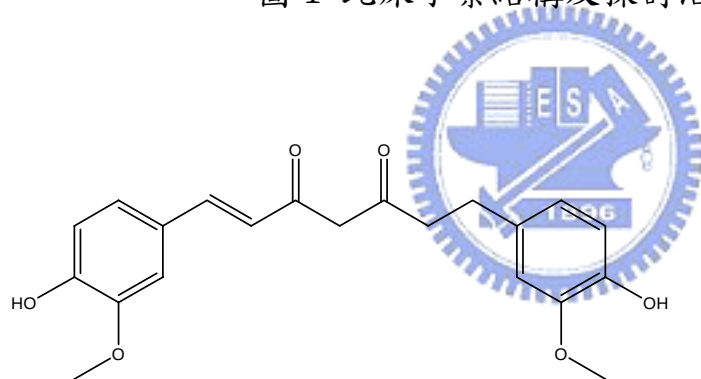


Osthol(1)

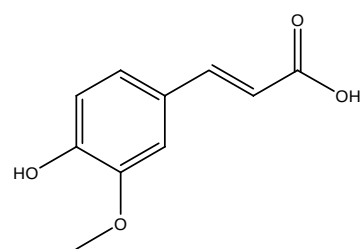


預計探討活性之位置

圖 1 蛇床子素結構及探討活性之位置



curcumin



ferulic acid

圖 2 薑黃素與其部分結構形成的化合物

Study on the Synthesis and Cytotoxic Activity of the Derivatives of Osthol

Student : Li-Min Liao

Advisor : Dr. T. M. Juang

Instituted of Applied Chemistry

National Chiao Tung Univeris

Abstract

Cnidii fructus, the dried mature fruits of *Cnidium monnieri* (L.) Cusson (Umbelliferae), is used as a tonic agent in traditional Chinese medicine. In modern medical study, osthol could induce apoptosis in HL-60 cells^{2, 3}. So we choose osthol and ferulic acid to develop a series of derivatives. We used the derivatives to do the MTT assay test and to discuss the SAR, the result told us the isoprenyl group and the 3,4-olefinic bond of osthol is essential for its activity, and the isoprenyl group at position 8 had the better cytotoxicity. When osthol and demethylsuberosin reacted with ferulic acid to form the derivatives of (26) and (35) have the better effect of anti-cancer and IC_{50} value than osthol. So the derivatives of (26) and (35) can be the lead compounds to develop the anticancer drug.

Therefore, because curcumin not only had the good effect to anticancer,

but also to anti- inflammation. So we believe the derivatives has the good effect to anti-inflammation.



謝誌

時光飛逝，兩年的碩士生涯即將告一段落，回首其中，真覺五味雜陳，難以言喻。但不論是好或壞，畢竟都已走過這一段人生旅途中難忘的路程。

首先，本論文承蒙指導教授莊教授的指導，並感謝工研院生醫中心的李連滋組長與黃崇雄經理提供了完善的實驗場所及在實驗和論文方向上的細心指導。也要感謝王靜瓊教授對於本論文提供了寶貴的意見。接著要謝謝所有在生醫中心的所有同仁：岩芳學姐、美華學姐、志宏大哥、阿邦大哥、孟昀大姊及秘書舒蓉在實驗及事情上的諸多指導及幫忙。也多謝實驗室的兩位同學：小潔及建邦的幫忙與鼓勵，讓兩年來的日子不至於枯燥乏味。特別感謝台北醫學大學的簡廷易學長於最後關頭時在生物活性測試上全力的配合與幫忙才能如期完成本論文。還有其他實驗室的同學：周小棟、哈比人、大餅、俊竹、月杏、俊宏以及學弟妹：吳大、阿川、阿嚕咪、智祥、J C、淑嫻還有學姐淑慧，很高興能認識你們讓這兩年的生活增添不少色彩。

最後，要感謝我的家人在精神及物質上無限的支持，才得以讓我無後顧之憂的過完這段碩士生涯，謝謝小田及奕誠每每在我不如意時幫我打氣加油。再次謝謝大家，沒有你們，本論文是無法這麼順利完成的。

英文縮寫對照表

AGS	Gastric epithelial cells	胃癌細胞株
HeLa	Human cervical epithelial carcinoma	人類子宮頸（上皮）癌細胞
HL-60	Human leukemia cells	血癌細胞
HT-29	Human colon cancer cells	結腸癌細胞
IC ₅₀	The concentration of 50% inhibition	
MTT	3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide	
NF- κ B	nuclear factors- κ B	
P-388	Mouse lymphocytic leukaemia	老鼠淋巴癌細胞
RAW 264.7cells	老鼠巨噬細胞	
SAR	Structure and Activity Relationship	
V-79	Chinese hamster	

目錄

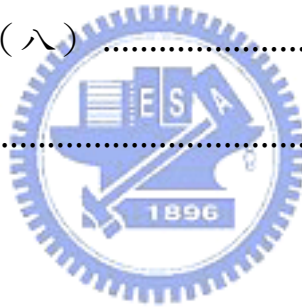
中文摘要.....	i
英文摘要.....	iii
謝誌.....	v
英文縮寫對照表	vi
目錄.....	vii
表目錄.....	ix
圖目錄.....	x
第一章、序論.....	1
1-1 蛇床子素	1
1-2 蛇床子素之文獻回顧.....	3
1-2-1 蛇床子素之藥理活性.....	3
1-2-2 蛇床子素之合成研究.....	5
第二章、研究動機與合成策略	8
2-1 研究動機	8
2-2 合成策略	10
第三章、實驗.....	16
3-1 藥品器材	16
3-1-1 實驗試劑.....	16

3-1-2 實驗儀器.....	17
3-2 實驗步驟.....	18
第四章、細胞毒性活性測試結果.....	50
4-1 細胞毒性實驗.....	50
4-1-1 實驗材料.....	50
4-1-2 實驗方法.....	52
4-2 細胞毒性實驗結果.....	56
第五章、結果與討論.....	62
第六章、結論.....	67
參考文獻.....	68



表目錄

表 1 細胞毒性測試結果（一）	58
表 2 細胞毒性測試結果（二）	59
表 3 細胞毒性測試結果（三）	60
表 4 細胞毒性測試結果（四）	61
表 5 細胞毒性測試結果（五）	62
表 6 細胞毒性測試結果（六）	64
表 7 細胞毒性測試結果（七）	64
表 8 細胞毒性測試結果（八）	65
表 9 IC ₅₀	66



圖目錄

圖 1 蛇床子素結構及探討活性之位置	i
圖 2 薑黃素與其部分結構形成的化合物	ii
圖 3 蛇床的果實	2
圖 4.....	5
圖 5.....	5
圖 6.....	6
圖 7.....	6
圖 8.....	7
圖 9 Osthenol (2) 之結構.....	8
圖 10 薑黃素 (curcumin) 之結構.....	9
圖 11.....	10
圖 12.....	11
圖 13.....	12
圖 14.....	12
圖 15.....	14
圖 16 MTT 被活細胞粒線體內的去氫酶間接還原成 Formazan 之原 理。	54
圖 17 結構 (一)	57

圖 18 測試結果 (一)	58
圖 19 測試結果 (二)	59
圖 20 測試結果 (三)	60
圖 21 測試結果 (四)	61
圖 22 結構 (二)	62
圖 23 結構 (三)	63
圖 24 結構 (四)	64
圖 25 結構 (五)	65
圖 26 結構 (六)	66
圖 27 化合物(2)之 ^1H NMR 光譜圖	71
圖 28 化合物(4)之 ^1H NMR 光譜圖	72
圖 29 化合物(5)之 ^1H NMR 光譜圖	73
圖 30 化合物(7)之 ^1H NMR 光譜圖	74
圖 31 化合物(8)之 ^1H NMR 光譜圖	75
圖 32 化合物(9)之 ^1H NMR 光譜圖	76
圖 33 化合物(10)之 ^1H NMR 光譜圖	77
圖 34 化合物(11)之 ^1H NMR 光譜圖	78
圖 35 化合物(12)之 ^1H NMR 光譜圖	79
圖 36 化合物(13)之 ^1H NMR 光譜圖	80

圖 37 化合物(14)之 ^1H NMR 光譜圖	81
圖 38 化合物(15)之 ^1H NMR 光譜圖	82
圖 39 化合物(16)之 ^1H NMR 光譜圖	83
圖 40 化合物(18)之 ^1H NMR 光譜圖	84
圖 41 化合物(19)之 ^1H NMR 光譜圖	85
圖 42 化合物(20)之 ^1H NMR 光譜圖	86
圖 43 化合物(21)之 ^1H NMR 光譜圖	87
圖 44 化合物(22)之 ^1H NMR 光譜圖	88
圖 45 化合物(26)之 ^1H NMR 光譜圖	89
圖 46 化合物(27)之 ^1H NMR 光譜圖	90
圖 47 化合物(28)之 ^1H NMR 光譜圖	91
圖 48 化合物(29)之 ^1H NMR 光譜圖	92
圖 49 化合物(30)之 ^1H NMR 光譜圖	93
圖 50 化合物(31)之 ^1H NMR 光譜圖	94
圖 51 化合物(32)之 ^1H NMR 光譜圖	95
圖 52 化合物(33)之 ^1H NMR 光譜圖	96
圖 53 化合物(34)之 ^1H NMR 光譜圖	97
圖 54 化合物(35)之 ^1H NMR 光譜圖	98
圖 55 化合物(37)之 ^1H NMR 光譜圖	99

圖 56 化合物(38)之 ^1H NMR 光譜圖	100
圖 57 化合物(39)之 ^1H NMR 光譜圖	101
圖 58 化合物(40)之 ^1H NMR 光譜圖	102
圖 59 化合物(26)之 ^{13}C NMR 光譜圖	103
圖 60 化合物(27)之 ^{13}C NMR 光譜圖	104
圖 61 化合物(28)之 ^{13}C NMR 光譜圖	105
圖 62 化合物(29)之 ^{13}C NMR 光譜圖	106
圖 63 化合物(31)之 ^{13}C NMR 光譜圖	107
圖 64 化合物(32)之 ^{13}C NMR 光譜圖	108
圖 65 化合物(35)之 ^{13}C NMR 光譜圖	109
圖 66 化合物(38)之 ^{13}C NMR 光譜圖	110
圖 67 化合物(39)之 ^{13}C NMR 光譜圖	111
圖 68 化合物(40)之 ^{13}C NMR 光譜圖	112

第一章 序論

1-1 蛇床子素

蛇床子為繖形科蛇床屬植物蛇床(*Cnidium monnieri*(L.)CUSS)之乾燥成熟果實，始著錄於神農本草經上品，有溫腎壯陽，祛風燥濕、殺蟲等功效。近代藥理研究證實其在心血管系統、抗骨質疏鬆、抗氧化及抗癌細胞等方面均有作用，並證實其有效成份是香豆素類化合物¹。在抗癌細胞方面，發現蛇床子的乙醇萃取物對於血癌

(HL-60)細胞具有明顯的抑制效果，更進一步的實驗證明其中的成份蛇床子素(osthol)能誘導HL-60 cells走向細胞凋亡(apoptosis)^{2、}

³。蛇床子素(osthol)的化學名7-methoxy-8-[3-methylpent-2-enyl]

coumarin，分子式： $C_{15}H_{16}O_3$ 、分子量：244.29、熔點：83-84。在

1972 年日本學者Hata 等從其果實中分離得到蛇床子素，顏焜熒教

授亦從台灣北部海濱採集濱當歸(*Angelica hirsutiflora* LIU, CHAO et

CHUANG)之根部亦分離得到蛇床子素(osthol)⁴。在1996年Itokawa

探討蛇床子素的結構及藥理活性⁵，2001年Furukawa取了33種香豆素

類化合物研究對於抗癌細胞的功效⁶，發現含有isopentenyl 或

1,1-dimethylallyl group的化合物對於抑制癌細胞的生長具有不錯的效果。

由於蛇床子素在抗癌細胞方面有效果^{2、3、6、7}，所以我們將蛇床子

素(osthol)視為不錯的抗癌先導藥物做更深入的研究與探討。



圖 3 蛇床的果實



1-2 蛇床子素之文獻回顧

1-2-1 蛇床子素之藥理活性

抑制B 型肝炎作用⁸⁻¹⁰

用MS-G2 及HuH7 細胞培養B 型肝炎表面抗原 (HBsAg)，並使用 osthol (1) 做體外試驗，發現具有抑制B 型肝炎病毒分泌的現象，其作用機制與增加B 型肝炎表面抗原之糖化作用(glycostlation)有關。

抗癌^{2、3、6、7}

Osthol (1) 對 HeLa cells (S3 cultured) 的生長具有明顯的抑制作用。2003 年發現 osthol (1) 對於 HL-60 cells 和 P-388 cells 有著強烈的細胞毒性 ($IC_{50}=14.9$ & $9.3\mu g/ml$)。更進一步的實驗發現 osthol (1) 能誘導 HL-60 cells 走向細胞凋亡 (apoptosis)。

抗血小板凝聚¹¹

2001 年發現 osthol (1) 對於兔子的血小板具有抗凝聚的功能。

抗骨質疏鬆¹²

Osthol (1) 對於 OVX (ovariectomized) 老鼠具有預防骨質疏鬆的效果。

抗 NO¹³

1999 年 Ohigashi 教授發現含有 isoprenyl group 的香豆素類化合物對於 RAW 264.7 cells 的 NO 分泌具有良好的抑制效果。

Osthol (1) 活性探討⁵

1996 年 Itokawa 教授合成 osthol (1) 的衍生物並利用 V-79 cells 做抗癌細胞的測試。



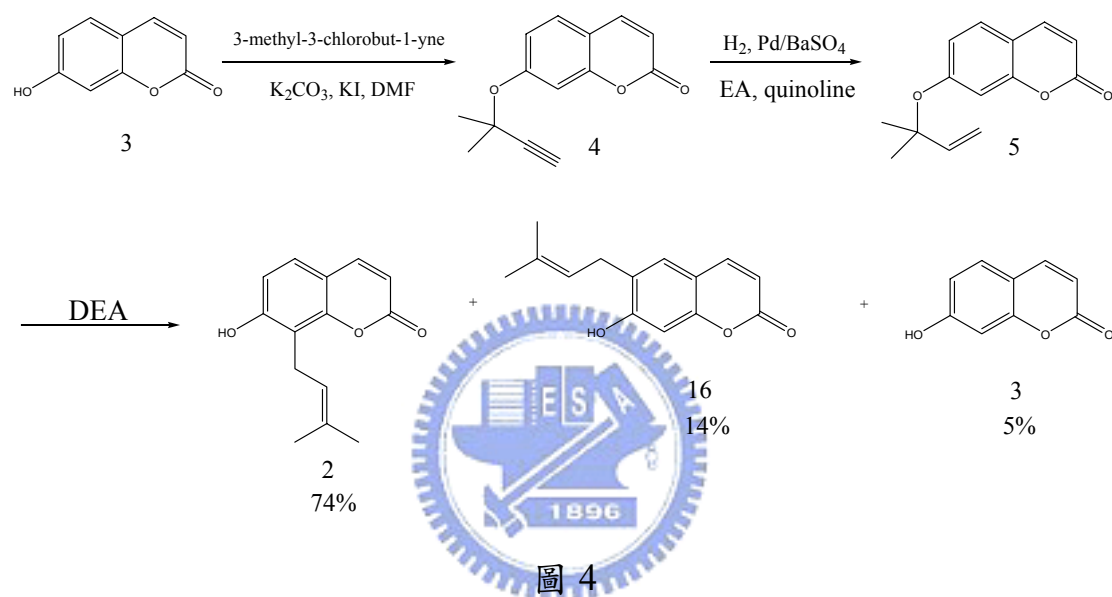
1-2-2 蛇床子素之合成研究

Synthesis of Osthénol (2)

(1) CLAISEN REARRANGEMENT¹⁴⁻¹⁸

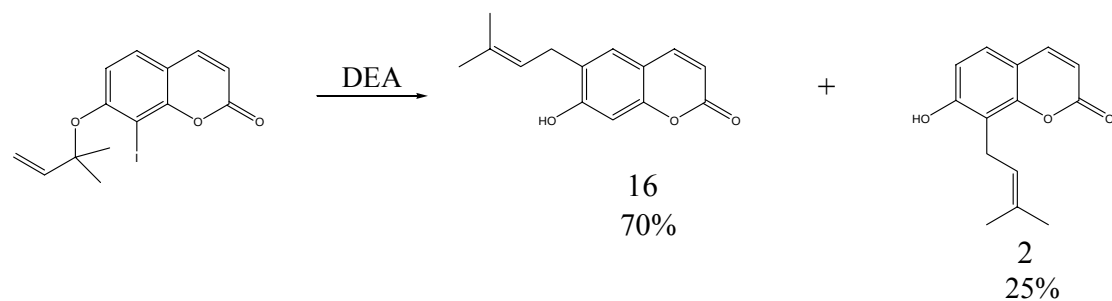
1971 年 Murray 利用 CLAISEN REARRANGEMENT 合成 osthénol (1)

的中間體 osthénol (2)¹⁵。



1987 年 Salva 亦利用 CLAISEN REARRANGEMENT 合成出 osthénol

(2)¹⁹。



(2) C-Prenylation of Phenols Promoted by Aluminum Oxide Surfaces

1986 年 Buchi 利用 Aluminum Oxide 催化合成 osthenol (2)²⁰。

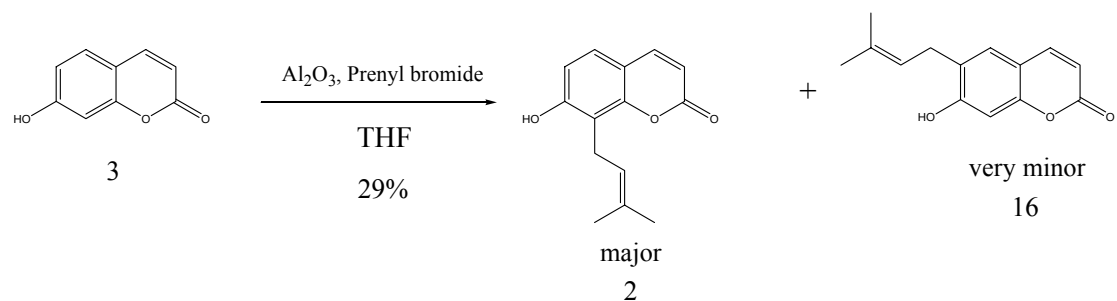


圖 6

(3) Demethylation of osthol (1)

2000 年 Gopalakrishnan 用 AlCl₃/DMS 對 osthol (1) 做 Demethylation 生成 osthenol (2)²¹。

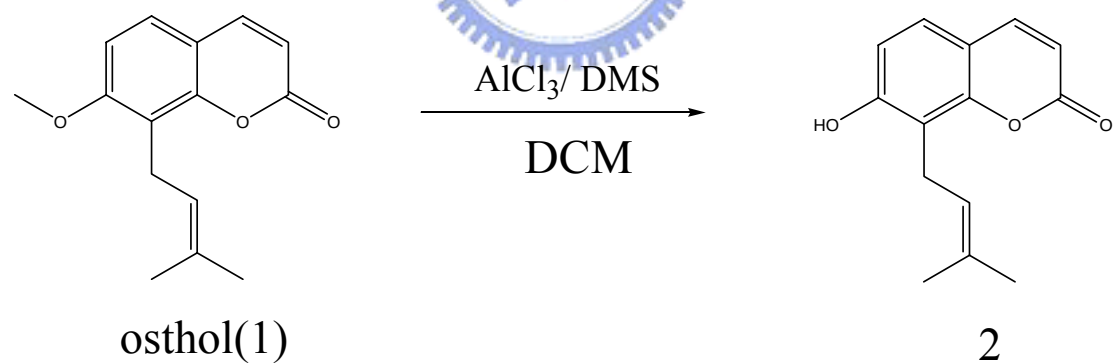


圖 7

Osthol (1) 衍生物^{22、23}

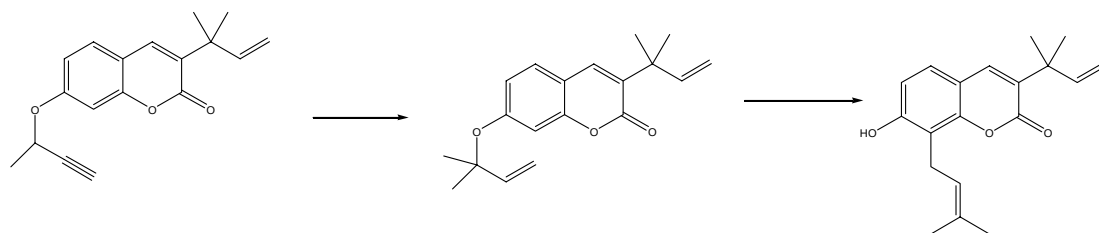


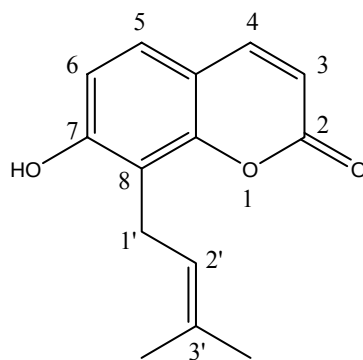
圖 8



第二章 研究動機與合成策略

2-1 研究動機

在近代藥理研究發現蛇床子素對於抑制癌細胞^{2,3,6,7}具有不錯的效果，但是討論其結構與活性關係(SAR)的文獻卻很少，我們希望能更進一步的討論其 SAR。根據文獻記載，在 umbeliferone(3) 的 benzene ring 上接上 isoprenyl group 能夠增進其抗癌活性⁶，所以我們選擇幾種 isoprenyl group 接在 umbeliferone(3) 不同位置上的化合物(osthenol (2)、demethylsuberosin (16)) 來發展新的衍生物。另一方面，文獻指出在 3,4-olefinic bond 對於毒殺癌細胞活性效果是必須的⁵，所以我們在 osthenol (2) C4 的位置上接上甲基，希望能更進一步的探討其毒殺癌細胞的運作機制。此外，在 osthenol (2) 的 7-hydroxy 位置接上 prenyl group 也能提高抗癌活性⁵，所以我們分別在化合物 (2)、(3)、(9)、(11)、(16) 的 7-hydroxy 位置上接上其他取代基，希望能進一步探討 SAR 並找到有發展潛力的抗癌前驅藥物。



Osthenol(2)

圖 9 Osthenol (2) 之結構

至於要接上何種取代基，我們選擇了薑黃素（curcumin）部分結構所形成的化合物ferulic acid(23)來和osthenol(2)、demethylsuberosin(16)……等化合物反應合成出新的衍生物。至於為甚麼會挑選薑黃素來做為取代基的基礎結構，主要是因為薑黃素具有抗發炎、抗氧化和抗癌作用。在抗癌作用方面²⁴，薑黃素會引起人類大腸腫瘤細胞株(ovo)細胞凋亡及細胞週期停滯於S，G2/M期²⁵，也會引起腫瘤細胞如HL-60、HT-29的細胞凋亡（apoptosis）^{26、27}。薑黃素也被發現對於人類大腸上皮細胞之NF-κB活性起抑制作用，並進而降低Cyclo-oxygenase 2 (COX2)的過度表現來達到防止癌化的作用²⁸。所以我們選取薑黃素做為取代基的基礎架構來發展衍生物。

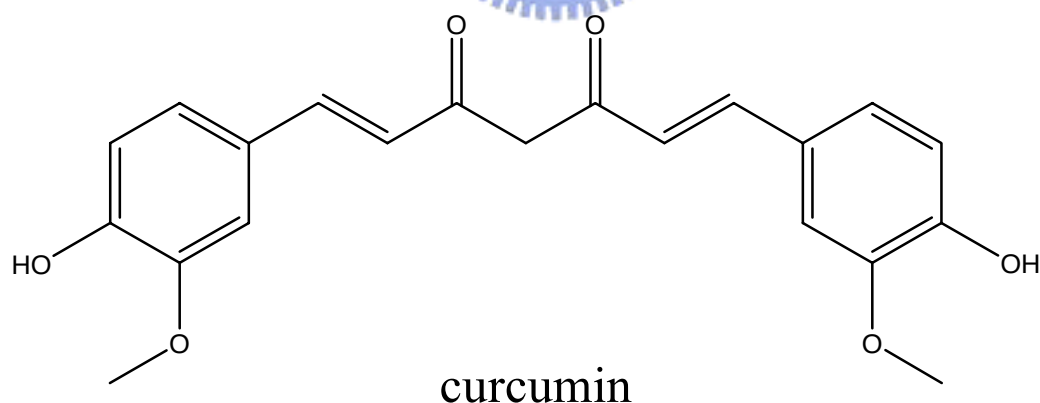


圖 10 薑黃素(curcumin)之結構

2-2 合成策略

由於我們希望能在 osthenol (2) 的 7-hydroxy 上接上其他取代基形成新的衍生物，因此我們先拿台北醫學大學王靜瓊副教授實驗室所提供的 osthol (1) 做 demethylation²¹，希望能得到 osthenol (2)，但是所得到的產物卻是環化後的 pyranocoumarin。另一方面，雖然經由 CLAISEN REARRANGEMENT 合成的方法可以獲得 osthenol (2)^{15、19、20}，卻無可避免的會同時得到 isomer (16) 的產物增加純化分離上的困難，但我們還是選擇用合成的方法來得到 osthenol (2)。

首先，我們先由 umbeliferone (3) 做為起始物，接上 3-methyl-3-chlorobut-1-yne 後做氫化，進行 CLAISEN REARRANGEMENT 後得到主產物 osthenol (2)、副產物 demethylsuberosin (16) 以及 umbeliferone (3)¹⁵。

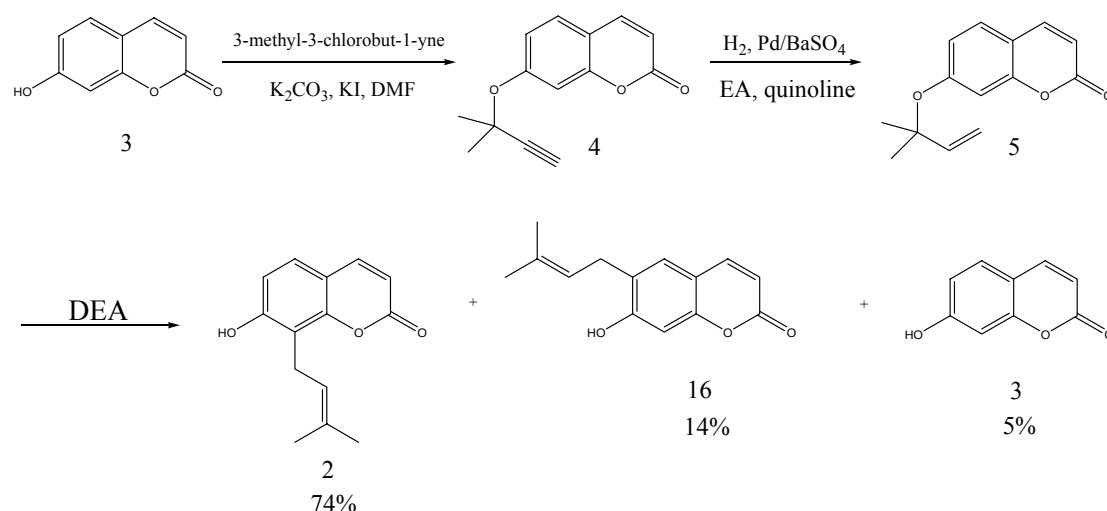
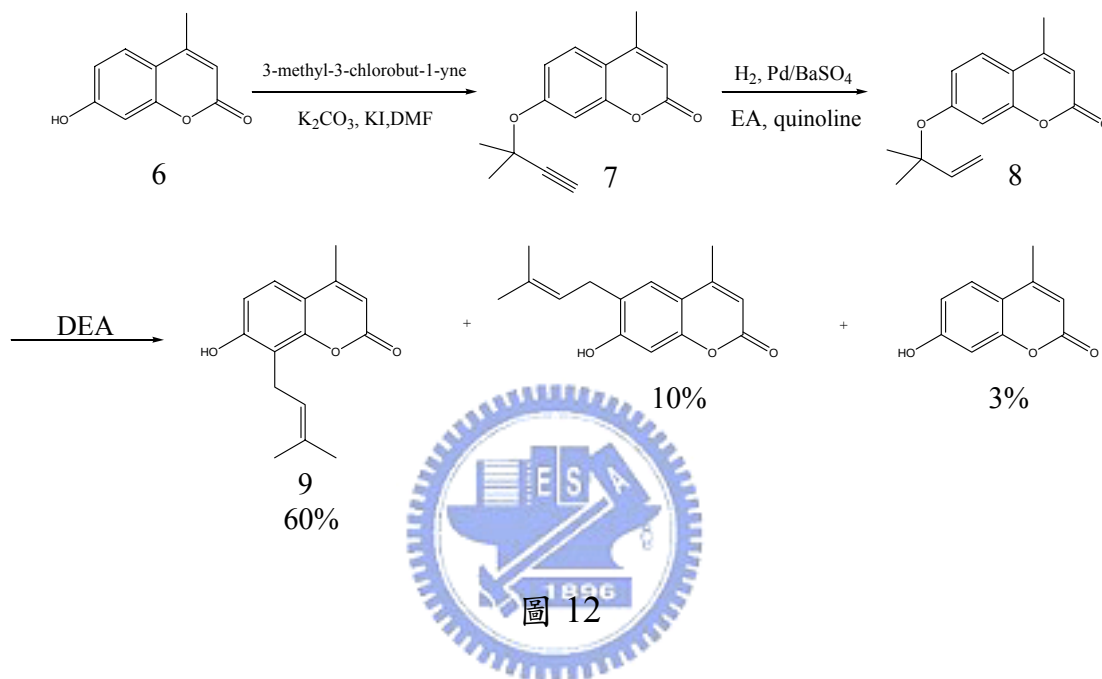


圖 11

再來，為了探討 3,4-olefinic bond 接上不同的官能基對於毒殺癌細胞活性效果有何影響，我們利用相同的方法¹⁵，選擇 4-methyl-umbeliferone (6) 作為起始物合成出 4-methyl-osthenol (9)，亦同時得到 4-methyl-7-demethylsuberosin 及 4-methyl umbeliferone。



此外，為了探討對於不同位置與不同數量的 isoprenyl 接在 umbeliferone (3) 上、以及將 osthenol (2) 上的 isoprenyl group 替換成 ally group 對於癌細胞的細胞活性究竟有何影響，因此我們分別合成出 demethylsuberosin (16)^{29, 30}、化合物 (12)³⁰、以及 8-allyl-7-hydroxycoumarin (11)³¹ 來和 osthenol (2) 來做一系列比較與探討。

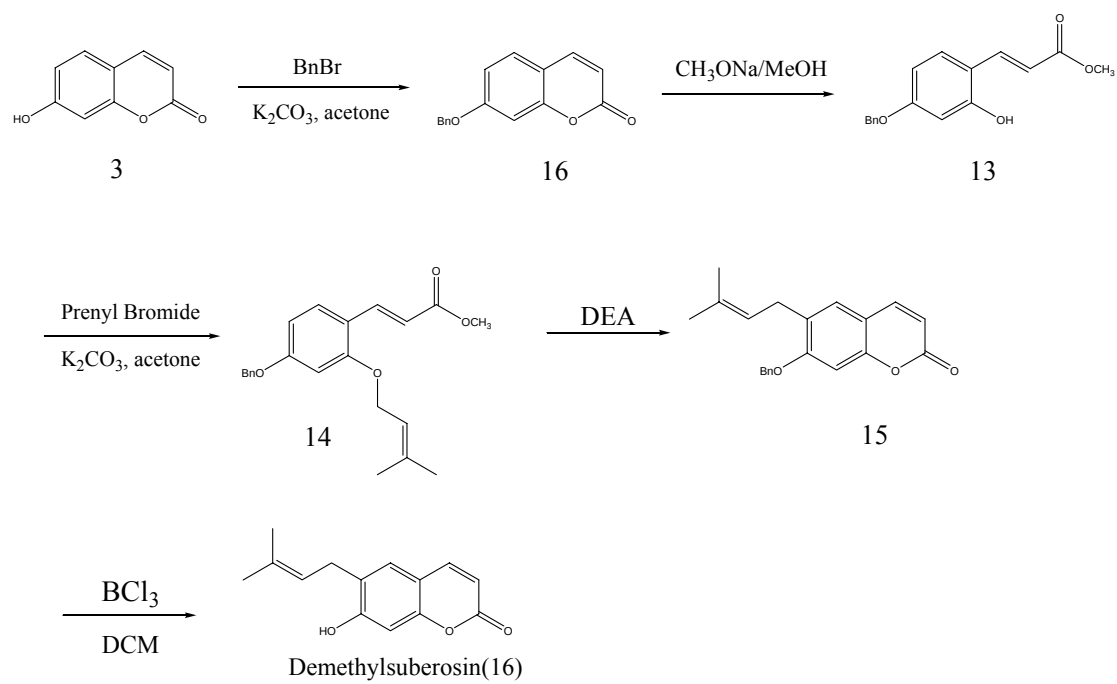


圖 13

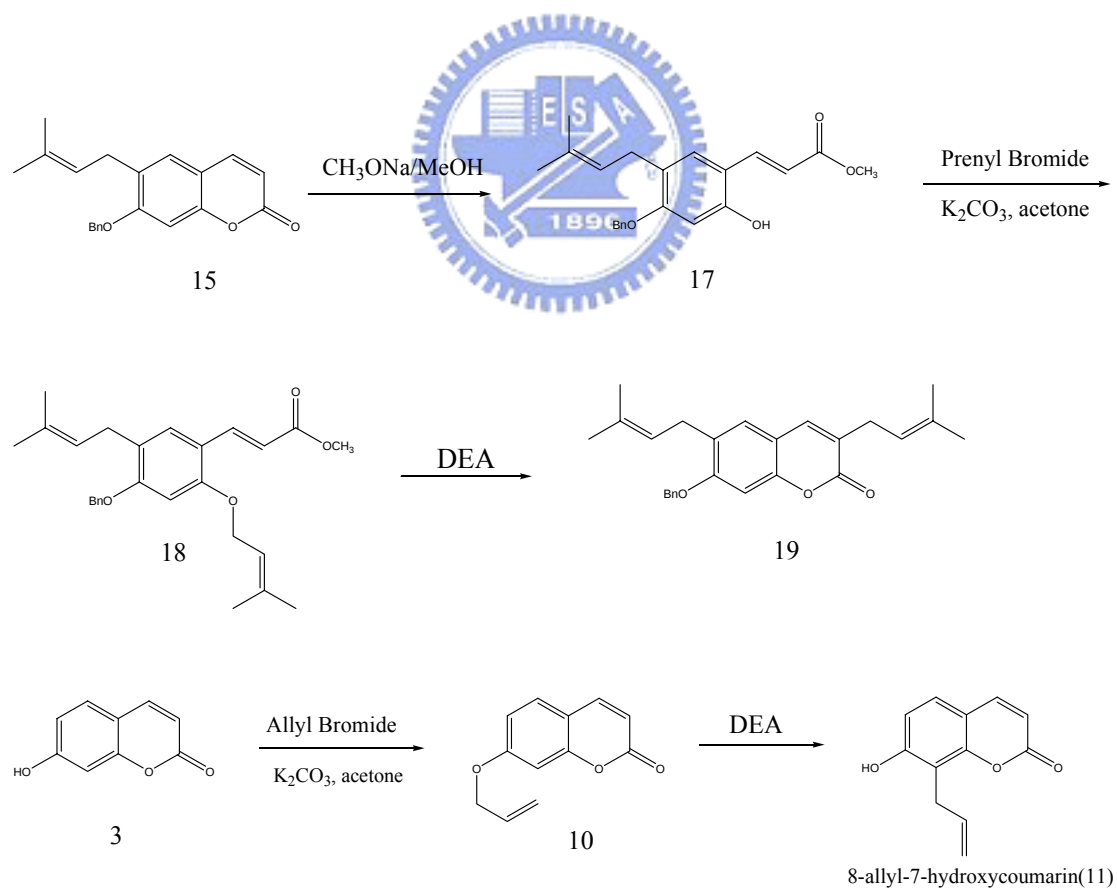
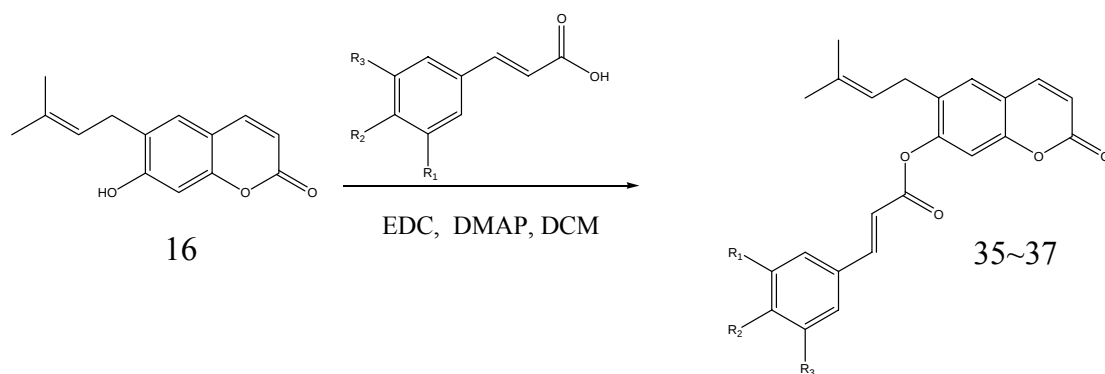
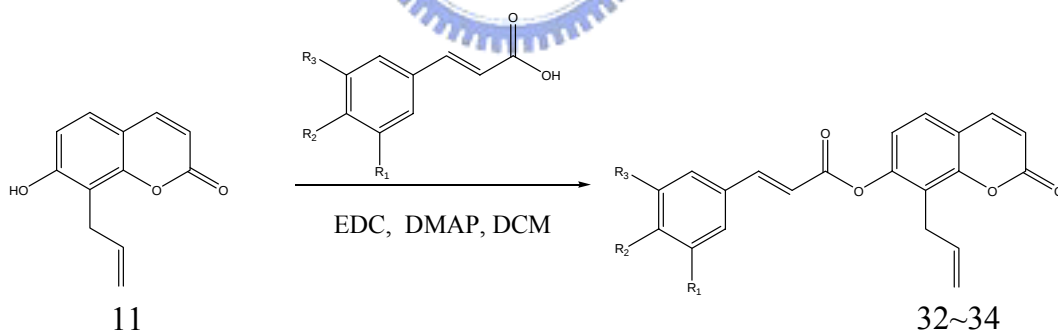
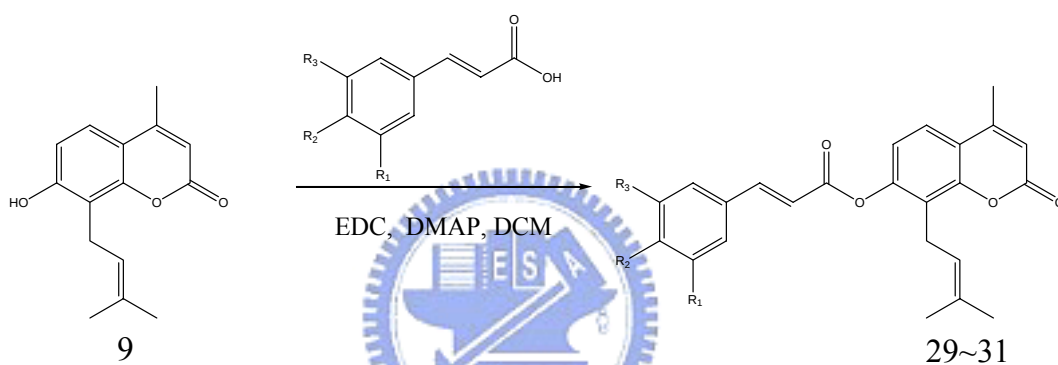
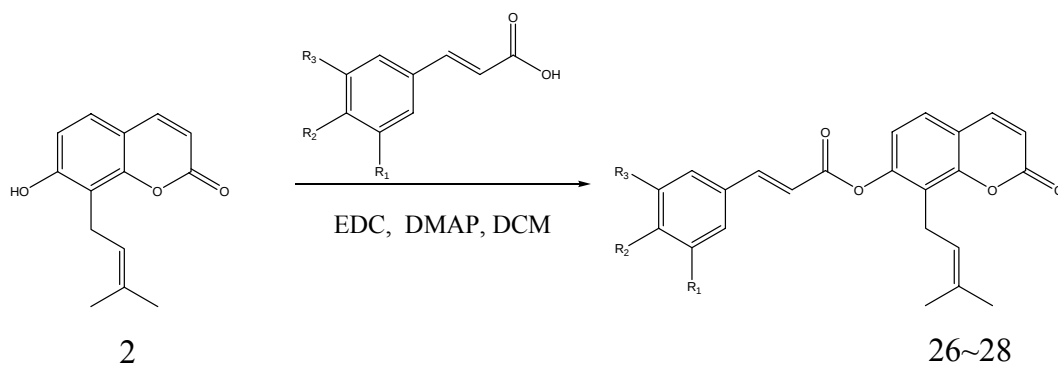


圖 14

再者，由於在 7-hydroxy 的位置接上 prenyl 後可增進毒殺癌細胞活性的效果⁵，因此我們便在 7-hydroxy 的位置上接上 ferulic acid (23) 等取代基，希望能增進其抗癌活性。



23: $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{H}$; (feulic acid)
 24: $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{OCH}_3$; (sinapic acid)
 25: $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{OCH}_3$, $R_3 = \text{H}$; (3,4-Dimethoxycinnamic acid)



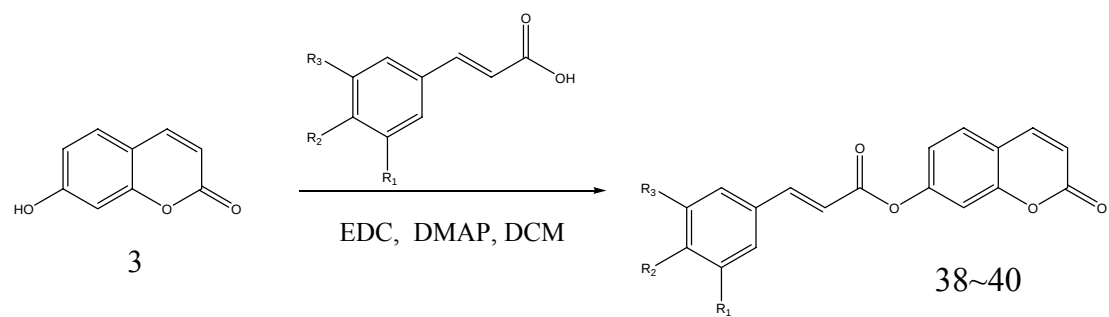


圖 15



第三章 實驗

3-1 藥品材料

3-1-1 實驗試劑

acetone	Merck
allyl bromide	Lancaster
Benzyl bromide(BnBr)	Merck
Boron trichloride(BCl_3)(1M solution in DCM)	Fluka
Celite	SHOWA
Dichloromethane(DCM)	Acros
4-Dimethylaminopyridine(DMAP)	Lancaster
Dimethyl sulfide(DMS)	Lancaster
3,4-Dimethoxycinnamic acid	Acros
3,3-Dimethyl acryloyl chloride	Acros
N,N-Dimethylformamide(DMF)	Acros
N,N-Diethylaniline(DEA)	Acros
Ethyl acetate(EA)	Merck
1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride(EDC)	Lancaster
Ethyl ether	Merck
Ferulic acid	MP Biomedical Inc.
n-Hexane	Merck
3-methyl-3-chlorobut-1-yne	Aldrich
Methanol(MeOH)	Merck
4-methyl umbeliferone	MP Biomedical Inc.
Palladium on barium sulfate(Pd/BaSO_4)	Lancaster
Palladium on carbon(Pd/C)	Lancaster
Potassium carbonate(K_2CO_3)	SHOWA
Potassium iodide(KI)	SHOWA
Prenyl bromide	Aldrich
Quinoline	Acros
Sinapic acid	SIGMA
Umbeliferone	Lancaster

感謝台北醫學大學王靜瓊副教授實驗室提供 osthol (1)。

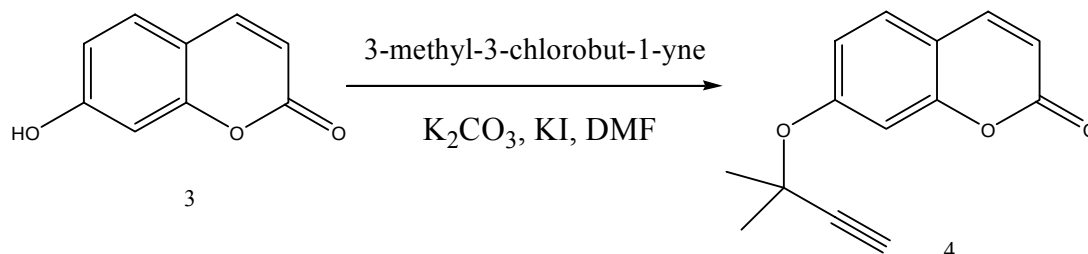
3-1-2 實驗儀器

- (1) FT-IR 紅外線光譜儀 (FT-730)
- (2) LC 液相層析儀 (HP 4890A)
- (3) GC-MASS 氣象層析質譜儀 (PERKIN ELMER/Turbo Mass)
- (4) NMR 核磁共振光譜儀 (Varian Unity Inova-500)
- (5) HRMS 高解析度質譜儀 (清大貴儀中心)



3-2 實驗步驟

7-O- (1,1-Dimethylpropargyl) umbelliferone (4)¹⁵

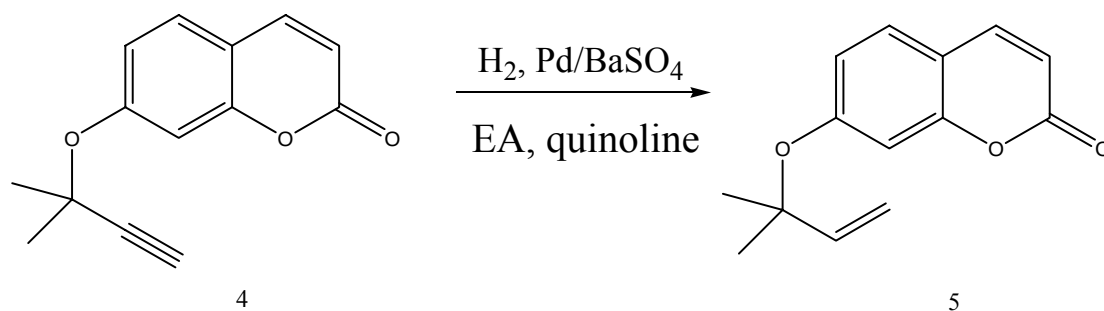


將 28mg (0.1728mmole) Umbelliferone (3) 及 35.3mg (0.2108mmole) KI 溶於 acetone，加入 0.0833g (0.6036mmole) K_2CO_3 於室溫下攪拌 30 分鐘，加入 0.1ml (0.8901mmole) 3-methyl-3-chlorobut-1-yne 後氮氣下迴流 24 小時。將溫度回到室溫，過濾溶液，濃縮後的固體用 EA 溶解，用飽和 K_2CO_3 水溶液及飽和食鹽水洗有機層，用無水硫酸鎂乾燥，濃縮後得到淡黃色固體。經管柱層析純化，得到 21.7mg 白色固體 (4)，產率 55 %。

化合物 4 的光譜資料如下：

1H NMR (500MHz, $CDCl_3$): δ 1.70(6H, s), 2.64(1H, s), 6.26(1H, d, $J=9$ Hz), 7.03(1H, dd, $J=8.75, 2$ Hz), 7.30(1H, s), 7.34(1H, d, $J=9$ Hz), 7.62(1H, d, $J=9$ Hz);

7-O- (1,1-Dimethylallyl) umbelliferone (5) ¹⁵

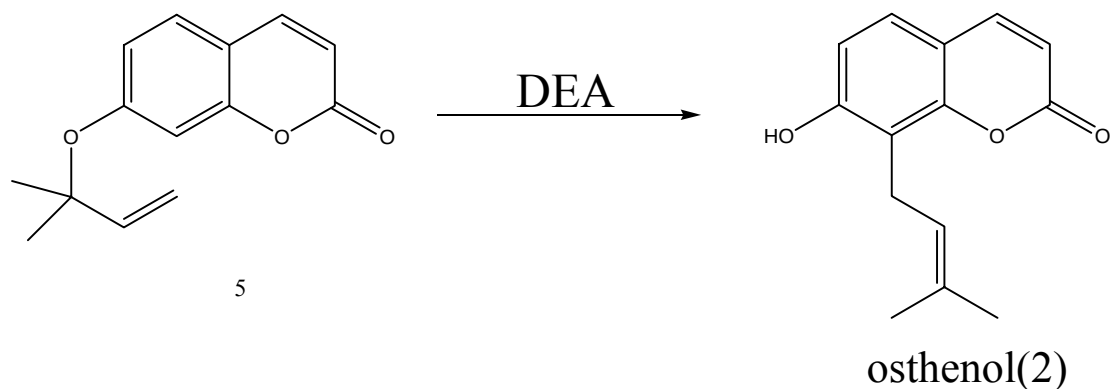


將 8mg (0.0351mmole) 化合物 (4) 及 2.4mg (30wt%) Pd/BaSO₄ 溶於 EA 中，加入 0.05ml quinoline，在氫氣下室溫攪拌 30 分鐘，用 Celite 過濾溶液，用 1M HCl 及飽和食鹽水洗有機層，用無水硫酸鎂乾燥，濃縮後得到淡黃色固體。經管柱層析純化，得到 7.8mg 白色固體 (5)，產率 99%。

化合物 5 的光譜資料如下：

¹H NMR (500MHz, CDCl₃) : δ 1.51(6H, s), 5.19~5.24(2H, m), 6.11(1H, dd, *J* = 20, 11Hz), 6.21(1H, d, *J* = 9.5Hz), 6.85(1H, dd, *J* = 10, 2.5Hz), 6.91~6.956(1H, m), 7.28(1H, d, *J* = 8.5Hz), 7.59(1H, d, *J* = 9.5Hz);

osthenol (2)¹⁵

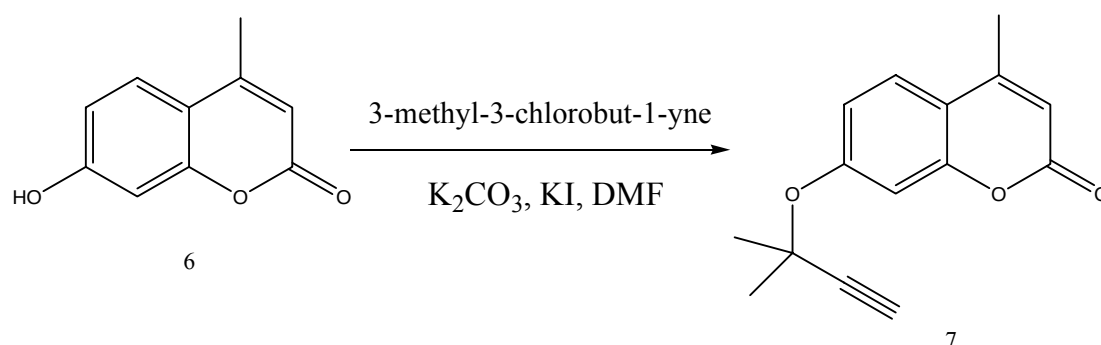


取 9.3mg (0.0404mmole) 化合物 (5) 溶於 DEA 中，氮氣下加熱至 150°C 攪拌 2 小時。將溫度回到室溫，用 3N H₂SO₄ 及飽和食鹽水洗有機層，用無水硫酸鎂乾燥，濃縮後得到褐色油狀物。經管柱層析純化，得到 4.7mg 白色油狀物 (2)，產率 50%。

化合物 2 的光譜資料如下：

¹H NMR (500MHz, CDCl₃) : δ 1.75(3H, s), 1.84(3H, s), 3.61(2H, d, *J* = 7Hz), 5.24~5.27(1H, m), 5.95(1H, s), 6.22(1H, d, *J* = 9.5Hz), 6.76(1H, d, *J* = 8.5Hz), 7.21(1H, d, *J* = 8.5Hz), 7.60(1H, d, *J* = 10Hz);

7-(2-methylbut-3-yn-2-yloxy)-2H-chromen-2-one (7)

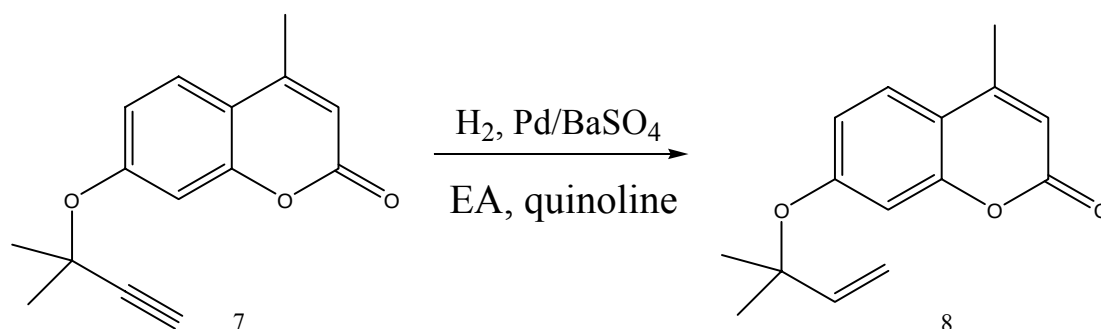


將 0.6g 4-Methyl Umbelliferone (0.3409mmole) (6) 及 0.1132g (0.0682mmole) KI 溶於 DMF 中，加入 0.64g (0.4631mmole) K_2CO_3 於室溫下攪拌 30 分鐘，加入 0.8ml (0.7121mmole) 3-methyl-3-chlorobut-1-yne 後氮氣下迴流 24 小時。將溫度回到室溫，過濾溶液，濃縮後的固體用 EA 溶解，用飽和 K_2CO_3 水溶液及飽和食鹽水洗有機層，用無水硫酸鎂乾燥，濃縮後得到褐色油狀物。經管柱層析純化，得到 0.4926g 白色固體 (7)，產率 60%。

化合物 7 的光譜資料如下：

1H NMR (500MHz, $CDCl_3$) : δ 1.69(6H, s), 2.38(3H, s), 2.63(1H, s), 6.13(1H, d, $J=$ 1Hz), 7.05(1H, dd, $J=9, 2$ Hz), 7.28(1H, d, $J=2$ Hz), 7.46(1H, d, $J=8.5$ Hz);

7-(2-methylbut-3-en-2-yloxy)-4-methyl-2H-chromen-2-one (8)

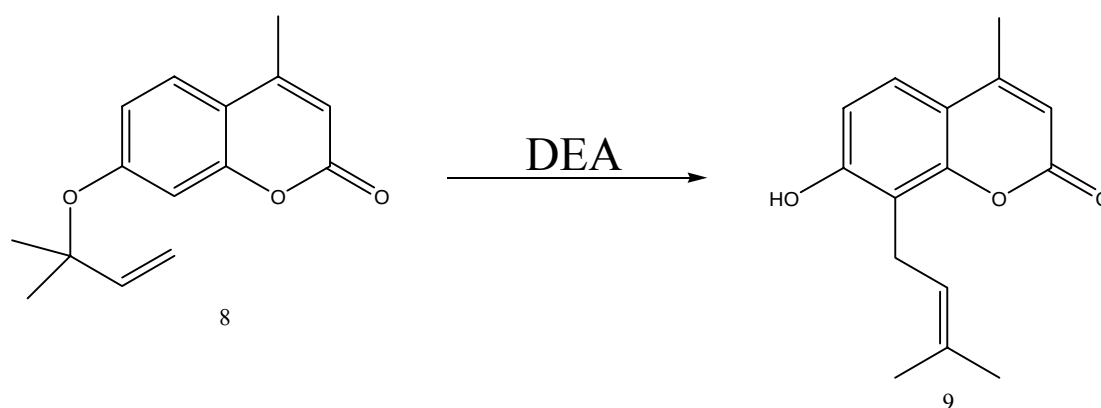


取 17.2mg (0.0711mmole) 化合物 (7) 及 8.5mg (50wt%) Pd/BaSO₄ 溶於 EA 中，加入 0.05ml quinoline，在氫氣下室溫攪拌 30 分鐘，用 Celite 過濾溶液，用 1MHCl 及飽和食鹽水洗有機層，用無水硫酸鎂乾燥，濃縮後得到淡黃色固體。經管柱層析純化，得到 16.8mg 白色固體 (8)，產率 97%。

化合物 8 的光譜資料如下：

¹H NMR (500MHz, CDCl₃) : δ 1.69(6H, s), 2.38(3H, s), 5.19(1H, d, *J* = 10.5Hz), 5.22(1H, d, *J* = 16.5Hz), 6.07~6.13(2H, m), 6.87(1H, dd, *J* = 11, 2Hz), 6.95(1H, d, *J* = 2.5Hz), 7.41(1H, d, *J* = 8.5Hz);

7-hydroxy-4-methyl-8-(3-methylbut-2-enyl)-2H-chromen-2-one (9)



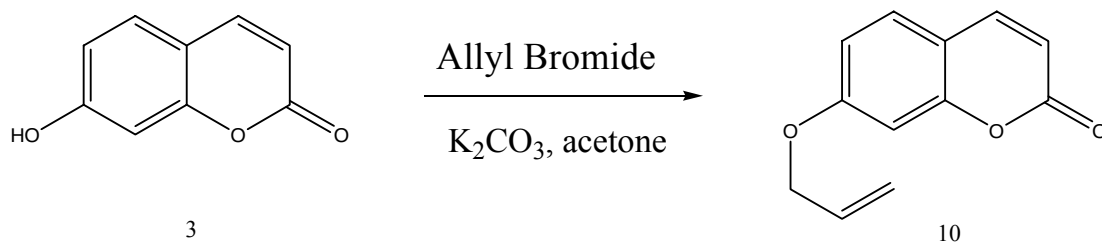
取 8.2mg (0.0336mmole) 化合物 (8) 溶於 DEA 中，氮氣下加熱至 150°C 攪拌 2 小時。將溫度回到室溫，用 3N H₂SO₄ 及飽和食鹽水洗有機層，用無水硫酸鎂乾燥，濃縮後得到褐色油狀物。經管柱層析純化，得到 3.5mg 白色油狀物 (9)，產率 42%。



化合物 9 的光譜資料如下：

¹H NMR (500MHz, CDCl₃) : δ 1.74(3H, s), 1.84(3H, s), 3.61(1H, d, $J=7$ Hz), 5.239~5.267(1H, m), 6.00(1H, s), 6.11(1H, s), 6.79(1H, d, $J=8.5$ Hz), 7.35(1H, d, $J=9$ Hz);

7-allyloxycoumarin (10) ³¹

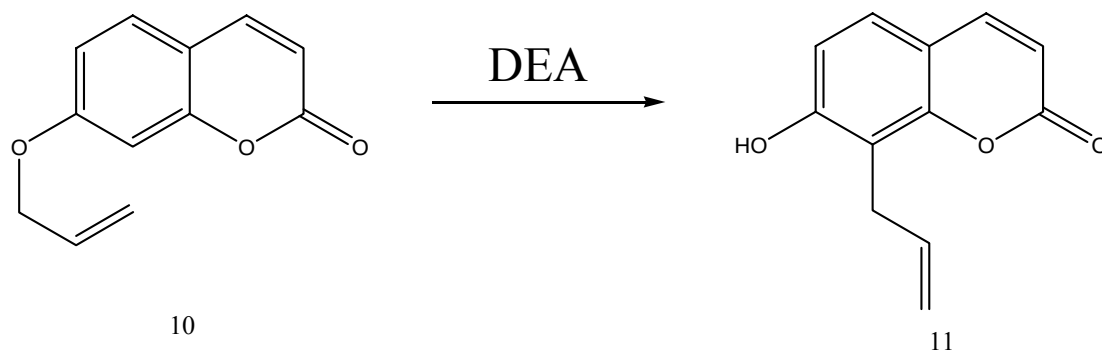


取 0.1021g (0.6302mmole) Umbelliferone (3) 溶於 acetone，加入 0.4976g (3.6003mmole) K_2CO_3 於室溫下攪拌 30 分鐘，加入 0.1ml (1.1556mmole) Allyl Bromide 後氮氣下迴流 5 小時。將溫度回到室溫，過濾溶液，濃縮後的固體用 EA 溶解，用飽和 K_2CO_3 水溶液及飽和食鹽水洗有機層，用無水硫酸鎂乾燥，濃縮後得到淡黃色固體。經管柱層析純化，得到 0.0829g 白色固體(10)，產率 65%。

化合物 10 的光譜資料如下：

$^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3): δ 4.58(2H, d, $J=5\text{Hz}$), 5.32(1H, d, $J=10.5\text{Hz}$), 5.42(1H, d, $J=16.5\text{Hz}$), 5.99~6.05(1H, m), 6.23(1H, d, $J=9.5\text{Hz}$), 6.81(1H, s), 6.84(1H, d, $J=8.5\text{Hz}$), 7.35(1H, d, $J=8.5\text{Hz}$), 7.61(1H, d, $J=9.5\text{Hz}$);

8-allyl-7-hydroxycoumarin (11) ³¹

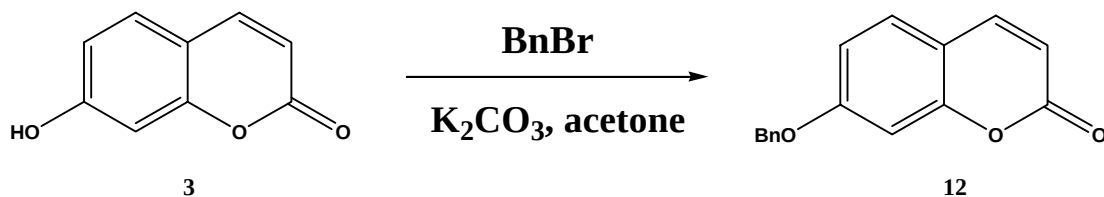


取 20mg (0.0990mmole) 化合物 (10) 溶於 DEA 中，氮氣下迴流 2 小時。將溫度回到室溫，用 3N H₂SO₄ 及飽和食鹽水洗有機層，用無水硫酸鎂乾燥，濃縮後得到褐色油狀物。經管柱層析純化，得到 7.6mg 白色油狀物 (11)，產率 38%。

化合物 11 的光譜資料如下：

¹H NMR (500MHz, CDCl₃): δ 3.65(2H, d, *J*=5.5Hz), 5.13~5.20(2H, m), 5.90(1H, s,), 5.95~6.01(1H, m), 6.23(1H, d, *J*=9.5Hz), 6.80(1H, d, *J*=9.5Hz), 7.25(1H, m), 7.61(1H, d, *J*=9.5Hz);

7-benzyloxycoumarin (12)^{29,30}



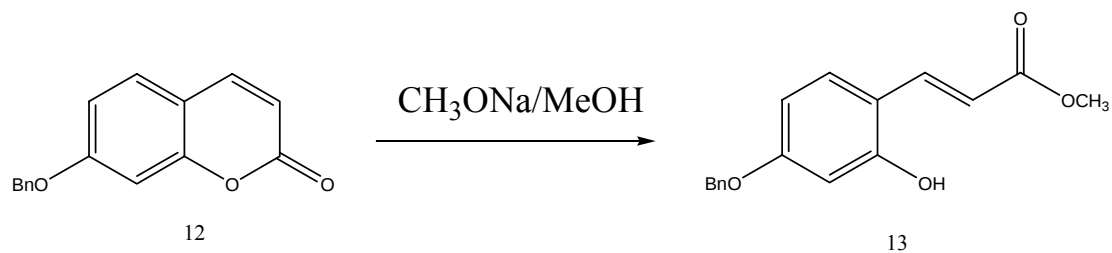
將 1g (6.1728mmole) Umbelliferone(3)溶於 acetone 中，加入 2.6g(0.0188mole) K₂CO₃於室溫下攪拌 30 分鐘，加入 1.2ml (0.0100mole) Benzyl bromide 通氮氣迴流 2 小時，將溫度回到室溫，過濾溶液，濃縮後的固體用 EA 溶解，用飽和 K₂CO₃ 水溶液及飽和食鹽水洗有機層，用無水硫酸鎂乾燥，濃縮後得到淡黃色固體。用 EA 做再結晶，得到 1.48g 白色固體 (12)，產率 95 %。

化合物 12 的光譜資料如下：

¹H NMR (500MHz, CDCl₃): δ 5.11(2H, s,), 6.23(1H, d, J=9Hz), 6.87~6.91(2H, m), 7.33~7.42(6H, m), 7.61(1H, d, J=9.5Hz);

IR (KBr): 1727, 1612, 1280, 1222, 1002 cm⁻¹;

Methyl 4'-benzyloxy-2'-hydroxycinnamate (13)^{29,30}

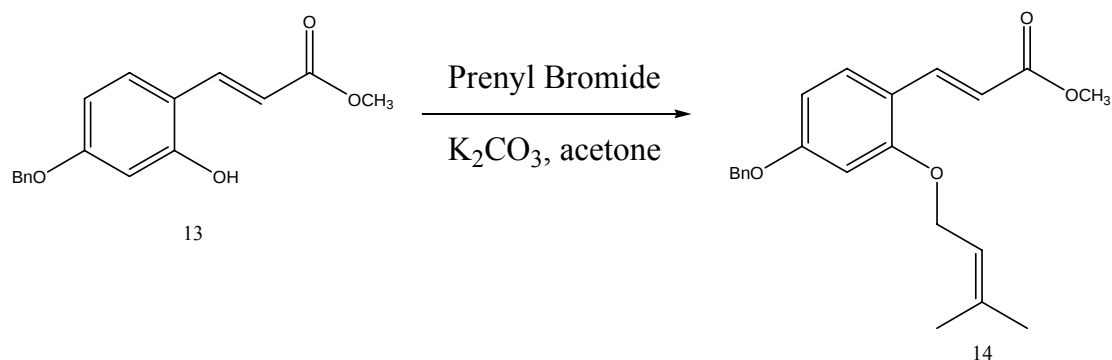


將 1.5g (0.0278mmole) NaOCH_3 溶於 MeOH 中，再把 0.7459g (2.960mmole) 的化合物 (12) 溶於 MeOH 並注入上述溶液中，氮氣下迴流 4 小時，將溫度降至 0 °C，用 2N HCl 中和溶液至中性，將溶劑抽乾，用 EA 溶解固體，用飽和食鹽水洗有機層，無水硫酸鎂乾燥濃縮後得到白色固體。用 EA 做再結晶得到 1.18g 白色固體 (13)，產率 70%。

化合物 13 的光譜資料如下：

$^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3): δ 1.77(3H, s), 5.05(2H, s), 5.46(1H, s), 6.40~6.45(2H, m), 6.57(1H, d, $J=8.5\text{Hz}$), 7.32~7.38(6H, m), 7.86(1H, d, $J=16\text{Hz}$);

Methyl 4'-Benzyloxy-2'- (3-methylbut-2-enyloxy) cinnamate (14)^{29,30}

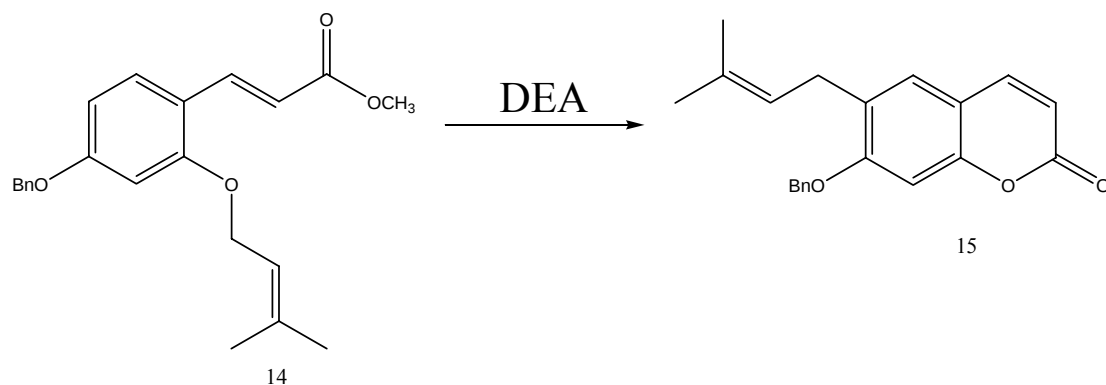


取 0.1g (0.0352mmole) 化合物(13) 溶於 acetone 中，加入 0.2812g (2.0346mmole) K_2CO_3 於室溫下攪拌 30 分鐘，加入 0.08ml (0.0682mmole) Prenyl bromide，氮氣下迴流 4 小時，將溫度回到室溫，過濾溶液，濃縮後的固體用 EA 溶解，用飽和 K_2CO_3 水溶液及飽和食鹽水洗有機層，用無水硫酸鎂乾燥，經管柱層析純化，得到 0.118g 淡黃色油狀物 (14)，產率 95%。

化合物 14 的光譜資料如下：

$^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3) : δ 1.71(3H, s), 1.77(3H, s), 3.76(3H, s), 4.52(2H, d, $J=6.5\text{Hz}$), 5.06(1H, s), 5.46~5.48(1H, m), 7.30~7.42(6H, m), 7.91(2H, d, $J=16\text{Hz}$);

7-benzyloxy-3-(3-methylbut-2-enyl) coumarin (15)^{29,30}

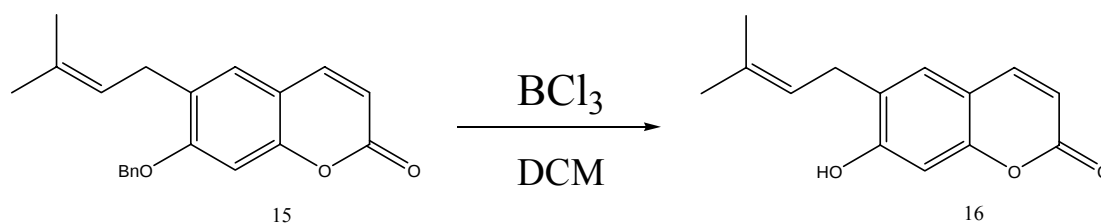


取 1.19g (3.3807mmole) 化合物 (14) 溶於 DEA 中，氮氣下迴流 3 小時。將溫度回到室溫，用 3N H₂SO₄ 及飽和食鹽水洗有機層，用無水硫酸鎂乾燥，濃縮後得到褐色油狀物。經管柱層析純化，得到 0.6275g 白色固體 (15)，產率 58%。

化合物 15 的光譜資料如下：

¹H NMR (500MHz, CDCl₃) : δ 1.64(3H, s), 1.74(3H, s), 3.35(2H, d, *J* = 7.5Hz), 5.13(2H, s), 5.26~5.29(1H, m), 6.20(1H, d, *J* = 9.5Hz), 6.81(1H, s), 7.18(1H, s), 7.23(1H, s), 7.32~7.58(6H, m), 7.59(1H, d, *J* = 9Hz);

demethylsuberosin (16)^{29,30}

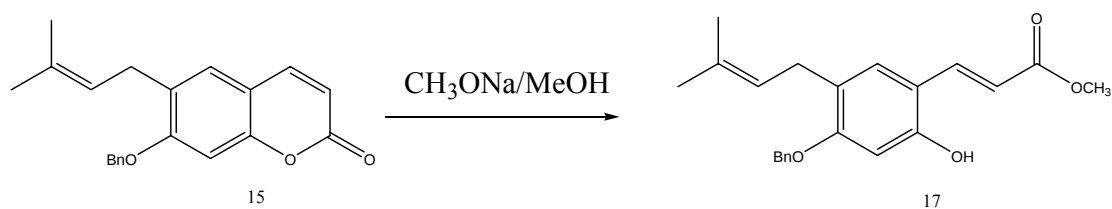


取 0.64g (2.7826mmole) 化合物 (15) 溶於 50ml DCM 中，0 °C 通氮氣下緩緩滴入 4ml (4mmole) 1M BCl_3 溶液，攪拌 3 小時，加入 35ml MeOH，將溶液倒入冰水中，用 EA 萃取水層，用飽和 K_2CO_3 水溶液及飽和食鹽水溶液洗有機層，無水硫酸鎂乾燥，濃縮後得到褐色油狀物，經管柱層析純化，得到 0.373g 白色油狀物 (16)，產率 79%。

化合物 16 的光譜資料如下：

$^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3) : δ 1.76(3H, s), 1.78(3H, s), 3.36(2H, d, $J=7.5\text{Hz}$), 5.27~5.31(1H, m), 5.31(1H, s), 6.10(2H, d, $J=10.5\text{Hz}$), 6.81(1H, s), 7.17(1H, s), 7.59(1H, d, $J=9.5\text{Hz}$);

Methyl 4'-Benzyloxy-2'-hydroxy-5'-(3-methylbut-2-enyl) cinnamate (17)^{29,30}



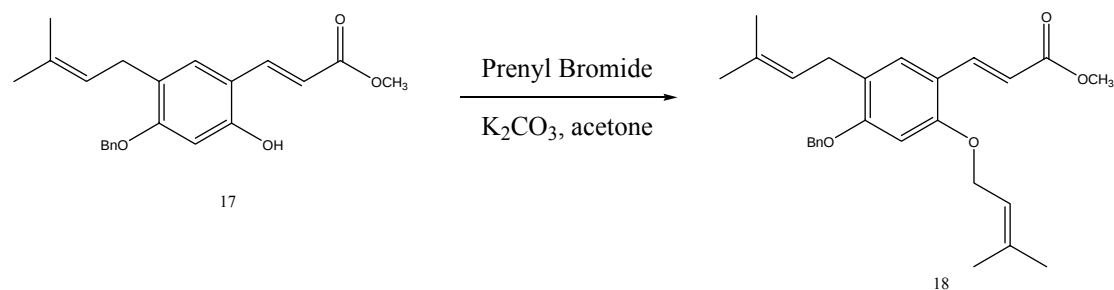
將 3.02g (0.0559mole) NaOCH₃ 溶於 MeOH 中，再把 1.5216g (6.6157mmole) 的化合物 (15) 溶於 MeOH 並滴入上述溶液中，氮氣下迴流 4 小時，將溫度降至 0 °C，用 2N HCl 中和溶液至中性，將溶劑抽乾，用 EA 溶解固體，用飽和食鹽水洗有機層，無水硫酸鎂乾燥、濃縮後得到白色固體。用 EA 做再結晶得到 0.7845g 白色固體 (17)，產率 70%。

化合物 17 的光譜資料如下：



Methyl 4'-Benzyloxy-5'-(3-methylbut-2-enyl) (3-methylbut-2-enyloxy) cinnamate

(18)^{29,30}

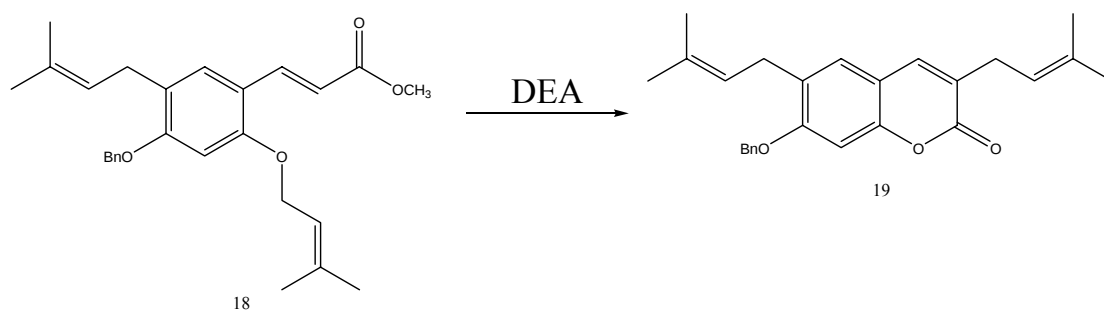


取 8.84g (0.0251mole) 化合物 (17) 溶於 acetone 中，加入 15.7g (0.1136mole) K_2CO_3 於室溫下攪拌 30 分鐘，加入 3ml (0.0256mole) Prenyl bromide，氮氣下迴流 4 小時，將溫度回到室溫，過濾溶液，濃縮後的固體用 EA 溶解，用飽和 K_2CO_3 水溶液及飽和食鹽水洗有機層，用無水硫酸鎂乾燥，經管柱層析純化，得到 9.3557g 淡黃色油狀物 (18)，產率 89%。

化合物 18 的光譜資料如下：

1H NMR (500MHz, $CDCl_3$): δ 1.71(3H, s), 1.77(3H, s), 1.79(3H, s), 1.83(3H, s), 3.34(2H, d, $J=7$ Hz), 3.83(3H, s), 4.57(1H, d, $J=6.5$ Hz), 5.16(2H, s), 5.32~5.35(1H, m), 5.49~5.51(1H, m), 6.45(1H, d, $J=16$ Hz), 6.52(1H, s), 7.33(1H, s), 7.38~7.48(5H, m), 7.98(1H, d, $J=16$ Hz);

7-benzyloxy-3,6-bis (3-methylbut-2-enyloxy) cinnamate (19)^{29,30}

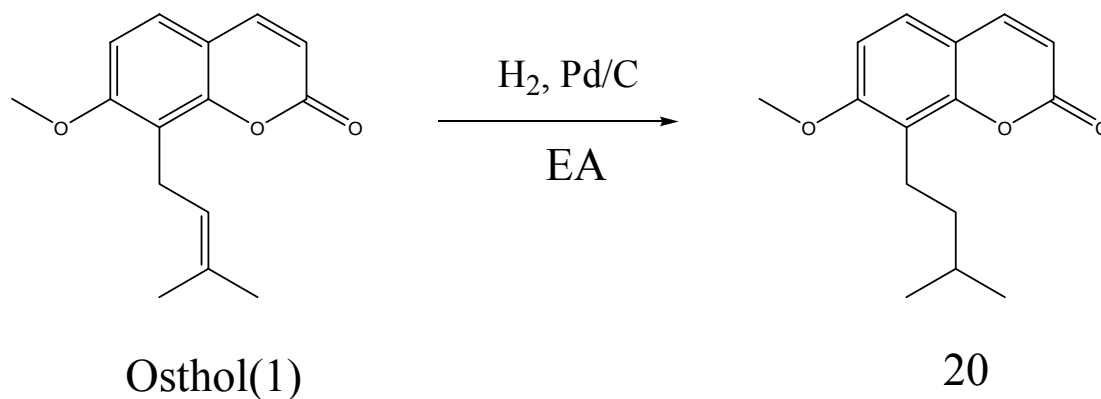


取 0.2852g (0.0679mmole) 化合物 (18) 溶於 DEA 中，氮氣下迴流 3 小時。將溫度回到室溫，用 3N H₂SO₄ 及飽和食鹽水洗有機層，用無水硫酸鎂乾燥，濃縮後得到褐色油狀物。經管柱層析純化，得到 0.1180g 白色固體 (19)，產率 45%。

化合物 19 的光譜資料如下：

¹H NMR (500MHz, CDCl₃) : δ 1.65(3H, s), 1.67(3H, s), 1.75(3H, s), 1.78(3H, s), 3.19(2H, d, J=7Hz), 3.35(2H, d, J=7.5Hz), 5.11(2H, s), 5.27~5.30(2H, m), 6.80(1H, s), 7.15(1H, s), 7.31~7.41(6H, m);

8-isopentyl-7-methoxy-2H-chromen-2-one (20) ⁵

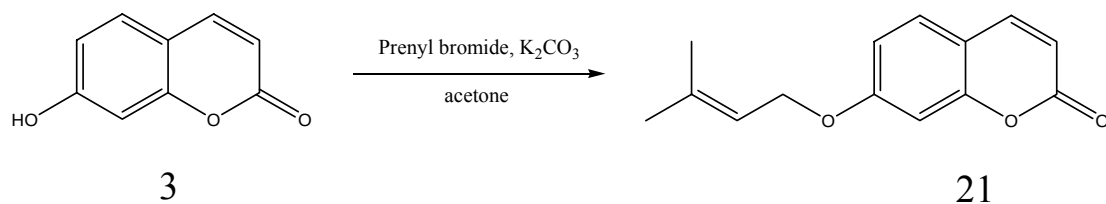


取 25mg (0.0102mmole) Osthol (1) 及 1mg (4wt%) Pd/C 溶於 MeOH 中，在氫氣下室溫攪拌 30 分鐘，用 Celite 過濾溶液，用飽和食鹽水洗有機層，用無水硫酸鎂乾燥，濃縮後得到 22.3mg 白色固體 (20)，產率 88.5%。

化合物 20 的光譜資料如下：

¹H NMR (500MHz, CDCl₃) : δ 1.00(6H, s), 1.45~1.47(2H, m), 1.63~1.68(1H, m), 2.86~2.89(2H, m), 3.95(3H, s), 6.27(1H, d, $J=9\text{Hz}$), 6.86(1H, d, $J=8.5\text{Hz}$), 7.31(1H, d, $J=8.5\text{Hz}$), 7.50(1H, d, $J=9.5\text{Hz}$);

7-(3-methylbut-2-enyloxy)-2H-chromen-2-one (14)

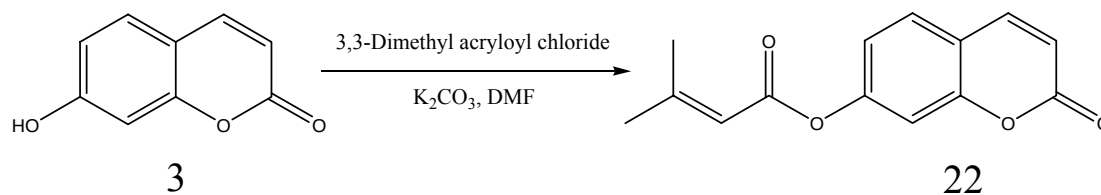


將 0.1231g (0.7599mmole) Umbelliferone (3) 溶於 acetone，加入 0.6g (4.341mmole) K_2CO_3 於室溫下攪拌 30 分鐘，加入 0.14ml (1.1930mmole) Prenyl bromide 後氮氣下迴流 4 小時。將溫度回到室溫，過濾溶液，濃縮後的固體用 EA 溶解，用飽和 K_2CO_3 水溶液及飽和食鹽水洗有機層，用無水硫酸鎂乾燥，濃縮後得到淡黃色固體。經管柱層析純化，得到 0.1678g 白色固體 (21)，產率 96%。

化合物 21 的光譜資料如下：

$^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3): δ 1.75(3H, s), 1.79(3H, s), 4.56(2H, d, $J=7\text{Hz}$), 5.44~5.47(1H, m), 6.22(1H, d, $J=9.5\text{Hz}$), 6.80~6.83(2H, m), 7.33(1H, d, $J=8.5\text{Hz}$), 7.60(1H, d, $J=9.5\text{Hz}$);

2-oxo-2H-chromen-7-yl 3-methylbut-2-enoate (15)

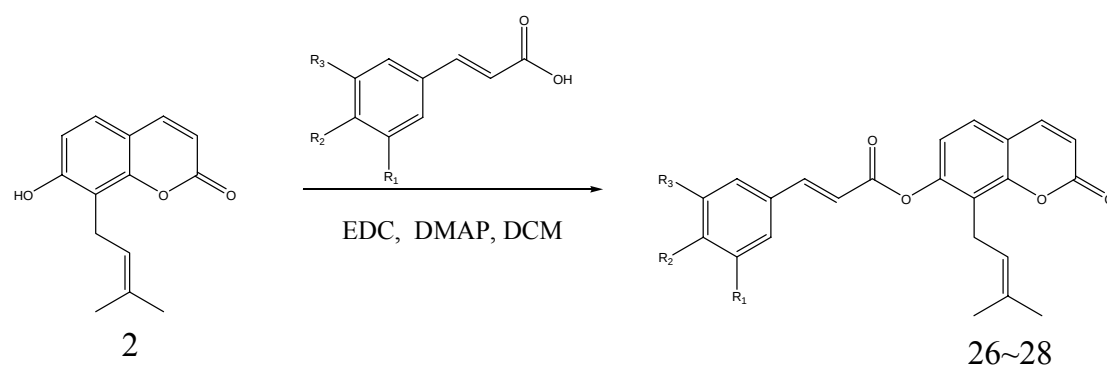


取 20mg (0.123mmole) Umbelliferone (3) 溶於 DMF，加入 34mg (0.246mmole) K_2CO_3 於冰浴下攪拌 30 分鐘，緩慢加入 0.017ml (0.1520mmole) 3,3-Dimethyl acryloyl chloride 後氮氣下攪拌 30 分鐘。將溫度回到室溫，過濾溶液，濃縮後的固體用 EA 溶解，用飽和 K_2CO_3 水溶液及飽和食鹽水洗有機層，用無水硫酸鎂乾燥，濃縮後得到淡黃色固體。經管柱層析純化，得到 20.5mg 白色固體 (22)，產率 72%。

化合物 22 的光譜資料如下：

1H NMR (500MHz, $CDCl_3$): δ 2.00(3H, s), 2.23(3H, s), 5.90(1H, s), 6.37(1H, d, $J=9.5$ Hz), 7.05(1H, d, $J=8.5$ Hz), 7.11(1H, s), 7.46(1H, d, $J=9.5$ Hz), 7.67(1H, d, $J=9.5$ Hz);

26~28 :



26 :

取 6mg (0.0261mmole) 化合物 (2)、10.1mg (0.0521mmole) ferulic acid、0.3mg (10%) DMAP、15mg (0.0782mmole) EDC 置於雙頸瓶中，加入 10ml DCM，通氮氣下室溫攪拌 30 分鐘，用水及飽和食鹽水洗有機層，無水硫酸鎂乾、濃縮，得黃色油狀物。經管柱層析純化，得到 4.1mg 白色油狀物 (26)，產率 39%。

27: 步驟同 26; 6mg (0.0261mmole) 化合物 (2)、11.7mg (0.0522mmole) Sinapic acid (24)、0.3mg (10%) DMAP、15.01mg (0.0783mmole) EDC。

28: 步驟同 Ga; 6mg (0.0261mmole) 化合物 (2)、10.8mg (0.0522mmole) 化合物 (25)、0.3mg (10%) DMAP、15.01mg (0.0783mmole) EDC。

	R ₁	R ₂	R ₃	產率 (%)	產物外觀
26	OCH ₃	OH	H	39	白色油狀物
27	OCH ₃	OH	OCH ₃	45	白色油狀物
28	OCH ₃	OCH ₃	H	52	白色油狀物

化合物 26 的光譜資料如下：

^1H NMR (500MHz, CDCl_3): δ 1.64(3H, s), 1.77(3H, s), 3.51(2H, d, $J=7\text{Hz}$), 3.94(6H, s), 5.15~5.17(1H, m), 5.84(1H, bs), 6.37(1H, d, $J=9.5\text{Hz}$), 6.48(1H, d, $J=16\text{Hz}$), 6.83(2H, s), 7.06(1H, d, $J=8\text{Hz}$), 7.35(1H, d, $J=8.5\text{Hz}$), 7.67(1H, d, $J=10\text{Hz}$), 7.79(1H, d, $J=15.5\text{Hz}$);

^{13}C NMR (125Mhz, CDCl_3): δ 18.0, 23.0, 25.7, 56.0, 109.7, 113.7, 114.9, 115.7, 116.8, 119.2, 120.3, 123.0, 123.6, 125.7, 126.6, 133.3, 134.4, 146.9, 147.6, 148.7, 151.8, 153.0, 160.5, 165.2

化合物 27 的光譜資料如下：



^1H NMR (500MHz, CDCl_3): δ 1.60(3H, s), 1.78(3H, s), 3.51(2H, d, $J=7.5\text{Hz}$), 3.95(3H, s), 5.15~5.18(1H, m), 6.??(1H, bs), 6.37(1H, d, $J=10\text{Hz}$), 6.47(1H, d, $J=16\text{Hz}$), 6.95(1H, d, $J=8\text{Hz}$), 7.06~7.10(2H, m), 7.14(1H, d, $J=8.5\text{Hz}$), 7.34(1H, d, $J=8.5\text{Hz}$), 7.66(1H, d, $J=9.5\text{Hz}$), 7.81(1H, d, $J=16\text{Hz}$);

^{13}C NMR (125Mhz, CDCl_3): δ 18.1, 23.0, 25.7, 56.4, 105.4, 114.0, 115.7, 116.8, 119.2, 120.2, 123.0, 125.4, 125.7, 133.3, 137.8, 143.4, 147.3, 147.8, 151.7, 153.0, 160.5, 165.1

HRMS Calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_7$: 436.1522, Found: 436.1522;

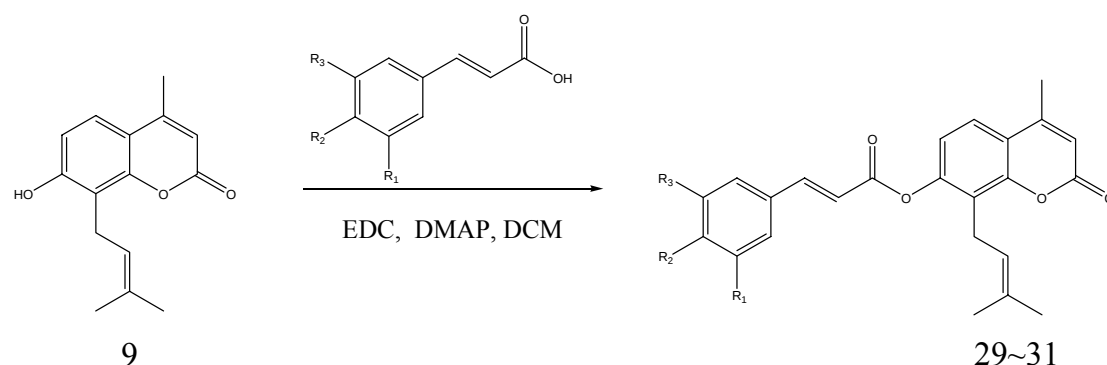
化合物 28 的光譜資料如下：

^1H NMR (500MHz, CDCl_3) : δ 1.64(3H, s), 1.76(3H, s), 3.52(2H, d, $J=6.5\text{Hz}$), 3.92~3.93(6H, m), 5.168(1H, m), 6.37(1H, d, $J=9.5\text{Hz}$), 6.49(1H, d, $J=15.5\text{Hz}$), 6.90(1H, d, $J=8\text{Hz}$), 7.07(1H, d, $J=8.5\text{Hz}$), 7.10(1H, d, $J=3.5\text{Hz}$), 7.162~7.186(1H, m), 7.34(1H, d, $J=8.5\text{Hz}$), 7.66(1H, d, $J=10.5\text{Hz}$), 7.83(1H, d, $J=16\text{Hz}$);

^{13}C NMR (125Mhz, CDCl_3) : δ 18.0, 22.9, 25.7, 55.9, 56.0, 109.9, 111.2, 113.9, 115.7, 116.8, 119.2, 120.3, 123.0, 123.2, 125.7, 126.9, 133.3, 143.4, 147.4, 149.4, 151.7, 151.8, 152.9, 160.5, 165.2



29~31：



29：

取 5mg (0.0205mmole) 化合物 (9)、8.5mg (0.041mmole) ferulic acid、0.25mg (10%) DMAP、11.7mg (0.0615mmole) EDC 置於雙頸瓶中，加入 10ml DCM，通氮氣下室溫攪拌 30 分鐘，用水及飽和食鹽水洗有機層，無水硫酸鎂乾、濃縮，得黃色油狀物。經管柱層析純化，得到 3.8mg 白色油狀物 (29)，產率 43%。

30：步驟同 29；5mg (0.0205mmole) 化合物 (9)、9.1mg (0.041mmole) Sinapic acid (24)、0.25mg (10%) DMAP、11.8mg (0.0615mmole) EDC。

31：步驟同 29；5mg (0.0205mmole) 化合物 (9)、8.536mg (0.041mmole) 化合物 (25)、0.25mg (10%) DMAP、11.8mg (0.0615mmole) EDC。

	R ₁	R ₂	R ₃	產率 (%)	產物外觀
29	OCH ₃	OH	H	43	白色油狀物
30	OCH ₃	OH	OCH ₃	30	白色油狀物
31	OCH ₃	OCH ₃	H	50.8	白色油狀物

化合物 29 的光譜資料如下：

$^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3) : δ 1.63(3H, s), 1.76(3H, s), 2.41(3H, s), 3.52(2H, d, $J=7\text{Hz}$), 3.95(3H, s), 5.15~5.16(1H, m), 5.91(1H, s), 6.25(1H, s), 6.47(1H, d, $J=16\text{Hz}$), 6.95(1H, d, $J=8\text{Hz}$), 7.08~7.10(2H, m), 7.14(1H, d, $J=7.5\text{Hz}$), 7.48(1H, d, $J=8.5\text{Hz}$), 7.82(1H, d, $J=16\text{Hz}$);

$^{13}\text{C NMR}$ (125Mhz, CDCl_3) : δ 18.0, 18.8, 23.1, 25.7, 56.0, 109.6, 113.7, 114.2, 114.9, 117.9, 118.8, 120.5, 122.4, 123.0, 123.6, 126.6, 133.1, 146.9, 147.5, 148.7, 151.6, 152.2, 152.5, 160.6, 165.2

化合物 30 的光譜資料如下：



$^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3) : δ 1.63(3H, s), 1.77(3H, s), 2.42(3H, s), 3.52(2H, d, $J=7\text{Hz}$), 3.45(6H, s), 5.15~5.16(1H, m), 5.82(1H, s), 6.26(1H, s), 6.49(1H, d, $J=16\text{Hz}$), 6.83(1H, s), 7.08(1H, d, $J=8.5\text{Hz}$), 7.48(1H, d, $J=8.5\text{Hz}$), 7.48(1H, d, $J=8.5\text{Hz}$), 7.80(1H, d, $J=15.5\text{Hz}$);

化合物 31 的光譜資料如下：

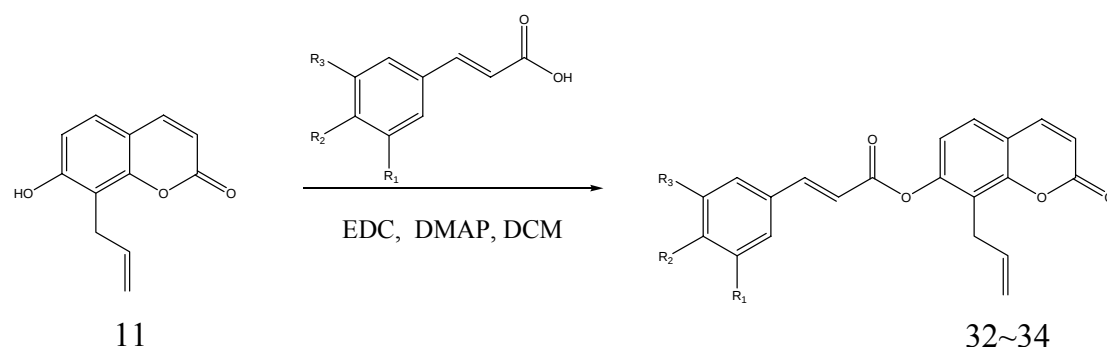
$^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3) : δ 1.63(3H, s), 1.77(3H, s), 2.42(3H, s), 3.52(2H, d, $J=6.5\text{Hz}$), 3.93(6H, s), 5.17(1H, m), 5.26(1H, s), 6.50(1H, d, $J=16\text{Hz}$), 6.90(1H, d, $J=8\text{Hz}$), 7.08~7.16(2H, m), 7.17(1H, d, $J=8\text{Hz}$), 7.48(1H, d, $J=8.5\text{Hz}$), 7.83(1H, d, $J=$

15.5Hz);

^{13}C NMR (125Mhz, CDCl_3) : δ 18.0, 18.6, 23.2, 25.7, 55.9, 56.0, 109.9, 111.2, 114.0, 114.3, 117.9, 118.8, 120.5, 122.4, 123.0, 123.2, 126.9, 133.1, 147.4, 149.4, 151.6, 151.8, 152.2, 152.5, 160.6, 165.2



32~34：



32：

取 4mg (0.0198mmole) 化合物 (11)、6.7mg (0.0396mmole) ferulic acid、0.21mg (10%) DMAP、10mg (0.0594mmole) EDC 置於雙頸瓶中，加入 10ml DCM，通氮氣下室溫攪拌 30 分鐘，用水及飽和食鹽水洗有機層，無水硫酸鎂乾、濃縮，得黃色油狀物。經管柱層析純化，得到 3.8mg 白色油狀物 (32)，產率 53%。

33：步驟同 32；4mg (0.0198mmole) 化合物 (11)、8.9mg (0.0396mmole) Sinapic acid (24)、0.21mg (10%) DMAP、10mg (0.0594mmole) EDC。

34：步驟同 32；4mg (0.0198mmole) 化合物 (11)、8.2mg (0.0396mmole) 化合物 (25)、0.21mg (10%) DMAP、10mg (0.0594mmole) EDC。

	R ₁	R ₂	R ₃	產率 (%)	產物外觀
32	OCH ₃	OH	H	53	白色油狀物
33	OCH ₃	OH	OCH ₃	26	白色油狀物
34	OCH ₃	OCH ₃	H	22	白色油狀物

化合物 32 的光譜資料如下：

^1H NMR (500MHz, CDCl_3) : δ 3.58(2H, d, $J=6.5\text{Hz}$), 3.94(6H, s), 5.00~5.08(2H, m), 5.83(1H, s), 5.89~5.94(1H, m), 6.38(1H, d, $J=9.5\text{Hz}$), 6.48(1H, d, $J=16\text{Hz}$), 6.83(1H, s), 7.09(1H, d, $J=8.5\text{Hz}$), 7.38(1H, d, $J=9\text{Hz}$), 7.68(1H, d, $J=9.5\text{Hz}$), 7.79(1H, d, $J=16\text{Hz}$);

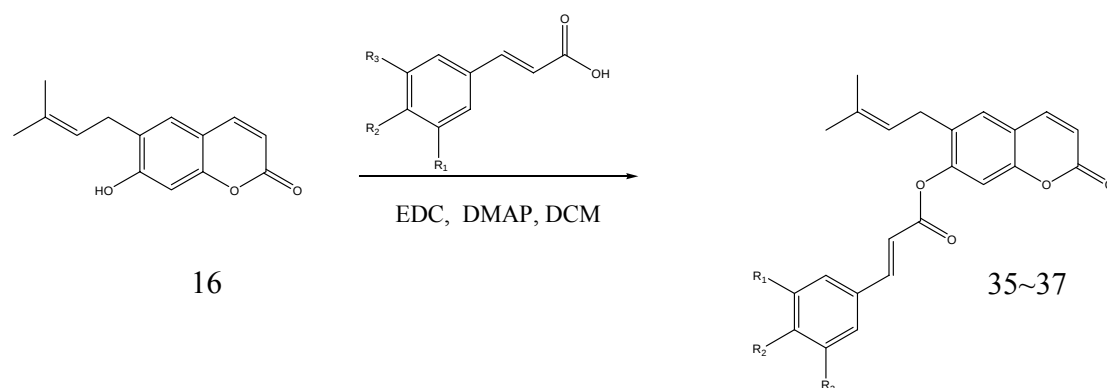
^{13}C NMR (125Mhz, d-DMSO) : δ 27.3, 55.8, 111.5, 112.6, 115.2, 115.6, 116.2, 116.6, 119.5, 119.8, 124.0, 125.3, 127.0, 134.3, 144.3, 147.8, 148.0, 150.0, 151.4, 152.3, 159.7, 164.9



化合物 34 的光譜資料如下：

^1H NMR (500MHz, CDCl_3) : δ 3.58(2H, d, $J=6\text{Hz}$), 3.93(6H, s), 5.00~5.08(2H, m), 5.87~5.95(1H, m), 6.38(1H, d, $J=9.5\text{Hz}$), 6.49(1H, d, $J=16\text{Hz}$), 6.89(1H, d, $J=8\text{Hz}$), 7.103~7.107(2H, m), 7.17(1H, d, $J=8\text{Hz}$), 7.38(1H, d, $J=8.5\text{Hz}$), 7.68(1H, d, $J=9.5\text{Hz}$), 7.83(1H, d, $J=16\text{Hz}$);

35~37 :



35 :

取 12mg (0.0523mmole) 化合物 (16)、20.2mg (0.104mmole) ferulic acid、0.6mg (10%) DMAP、30mg (0.1569mmole) EDC 置於雙頸瓶中，加入 10ml DCM，通氮氣下室溫攪拌 30 分鐘，用水及飽和食鹽水洗有機層，無水硫酸鎂乾、濃縮，得黃色油狀物。經管柱層析純化，得到 8.9mg 白色油狀物 (35)，產率 42%。

36: 步驟同 35; 12mg (0.0523mmole) 化合物 (16)、23.4mg (0.104mmole) Sinapic acid (24)、0.6mg (10%) DMAP、30mg (0.1569mmole) EDC。

37: 步驟同 35; 12mg (0.0523mmole) 化合物 (16)、21.6mg (0.104mmole) 化合物 (25)、0.6mg (10%) DMAP、30mg (0.1569mmole) EDC。

	R ₁	R ₂	R ₃	產率 (%)	產物外觀
35	OCH ₃	OH	H	42	白色油狀物
36	OCH ₃	OH	OCH ₃	40	白色油狀物
37	OCH ₃	OCH ₃	H	47	白色油狀物

化合物 35 的光譜資料如下：

$^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3): δ 1.66(3H, s), 1.74(3H, s), 3.29(2H, d, $J=7\text{Hz}$), 3.9(3H, s), 5.21~5.23(1H, m), 5.95(1H, s), 6.35(1H, d, $J=9\text{Hz}$), 6.46(1H, d, $J=16\text{Hz}$), 6.94(1H, d, $J=8\text{Hz}$), 7.07~7.13(3H, m), 7.31(1H, s), 7.64(1H, d, $J=9\text{Hz}$), 7.81(1H, d, $J=16\text{Hz}$);

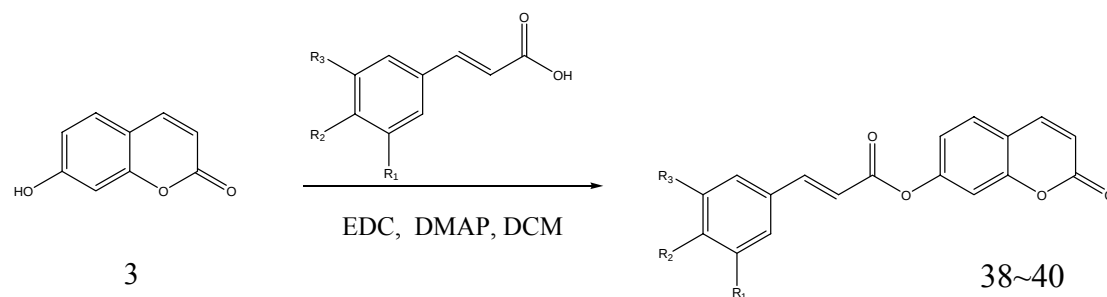
$^{13}\text{C NMR}$ (125Mhz, CDCl_3): δ 17.9, 25.7, 28.2, 56.0, 109.7, 111.1, 113.5, 114.9, 115.9, 116.8, 120.8, 123.6, 126.5, 128.4, 130.9, 134.3, 143.0, 146.9, 147.7, 148.7, 151.7, 152.9, 160.6, 164.9

化合物 37 的光譜資料如下：

$^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3): δ 1.66(3H, s), 1.73(3H, s), 3.29(2H, d, $J=7\text{Hz}$), 3.92~3.93(6H, m), 5.22~5.25(1H, m), 6.36(1H, d, $J=9.5\text{Hz}$), 6.48(1H, d, $J=15.5\text{Hz}$), 6.89(1H, d, $J=8\text{Hz}$), 7.10~7.12(2H, m), 7.17(1H, d, $J=8\text{Hz}$), 7.31(1H, s), 7.65(1H, d, $J=9.5\text{Hz}$), 7.83(1H, d, $J=16\text{Hz}$);



38~40 :



38 :

取 5mg (0.0309mmole) Umbelliferone (3)、12mg (0.0617mmole) ferulic acid、0.4mg (10%) DMAP、17.8mg (0.0926mmole) EDC 置於雙頸瓶中，加入 10ml DCM，通氮氣下室溫攪拌 30 分鐘，用水及飽和食鹽水洗有機層，無水硫酸鎂乾、濃縮，得黃色油狀物。經管柱層析純化，得到 3.9mg 白色油狀物 (38)，產率 37%。

39: 步驟同 38; 5mg (0.0309mmole) 化合物 (3)、13.9mg (0.0617mmole) Sinapic acid (24)、0.4mg (10%) DMAP、17.8mg (0.0926mmole) EDC。

40: 步驟同 38; 5mg (0.0309mmole) 化合物 (3)、12.8mg (0.0617mmole) 化合物 (25)、0.4mg (10%) DMAP、17.8mg (0.0926mmole) EDC。

	R ₁	R ₂	R ₃	產率 (%)	產物外觀
38	OCH ₃	OH	H	37	白色粉末
39	OCH ₃	OH	OCH ₃	41	白色粉末
40	OCH ₃	OCH ₃	H	67	白色粉末

化合物 38 的光譜資料如下：

$^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3) : δ 3.94(6H, s), 5.92(1H, s), 6.38(1H, d, $J=9.5\text{Hz}$), 6.45(1H, d, $J=16\text{Hz}$), 6.94(1H, d, $J=8.5\text{Hz}$), 7.08~7.18(4H, m), 7.49(1H, d, $J=8.5\text{Hz}$), 7.68(1H, d, $J=10\text{Hz}$), 7.81(1H, d, $J=16\text{Hz}$);

$^{13}\text{C NMR}$ (125Mhz, CDCl_3) : δ 56.0, 109.7, 110.5, 113.7, 114.9, 115.9, 116.5, 118.5, 123.7, 126.5, 128.5, 142.9, 146.9, 147.8, 148.7, 153.6, 154.8, 160.4, 164.9

HRMS Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{O}_6$: 338.079, Found: 338.0789;

化合物 39 的光譜資料如下：

$^1\text{H NMR}$ (500MHz, d-DMSO) : δ 3.82(6H, s), 6.47(1H, d, $J=9.5\text{Hz}$), 6.78(1H, d, $J=16\text{Hz}$), 7.14(2H, s), 7.23(1H, d, $J=8.5\text{Hz}$), 7.34(1H, s), 7.78(1H, s), 7.80(1H, d, $J=7.5\text{Hz}$), 8.08(1H, d, $J=9.5\text{Hz}$), 9.03(1H, s);

$^{13}\text{C NMR}$ (125Mhz, d-DMSO) : δ 56.11, 56.13, 106.8, 110.0, 113.2, 115.4, 116.5, 118.6, 124.1, 129.3, 139.0, 143.8, 148.5, 148.08, 153.1, 154.1, 159.7, 164.8

化合物 40 的光譜資料如下：

$^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3) : δ 3.92(6H, s), 6.38(1H, d, $J=9.5\text{Hz}$), 6.47(1H, d, $J=16\text{Hz}$), 6.89(1H, d, $J=8.5\text{Hz}$), 7.10~7.18(4H, m), 7.49(1H, d, $J=8\text{Hz}$), 7.68(1H, d, $J=9.5\text{Hz}$), 7.83(1H, d, $J=16\text{Hz}$);

^{13}C NMR (125Mhz, CDCl_3) : δ 55.9, 56.0, 109.9, 110.5, 111.2, 113.9, 115.9, 116.5,
118.5, 123.3, 126.9, 128.5, 142.8, 147.6, 149.4, 151.9, 153.5, 154.8, 160.4, 164.8



第四章 細胞毒性活性測試結果

4-1 細胞毒性實驗

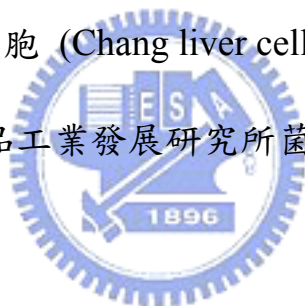
I. 實驗材料

1. 實驗細胞株及培養液

1-1. 細胞株

- (1) 人類腸腺癌細胞 (HT-29 cell line, ATCC HTB-38)
- (2) 人類胃癌細胞 (AGS cell line, ATCC CRL-1739)
- (3) 人類子宮頸癌細胞 (HeLa cell line, ATCC CCL-2)
- (4) 人類正常肝細胞 (Chang liver cell line, ATCC CCL-13)

上述細胞來源為食品工業發展研究所菌種中心



2. 實驗藥品與試劑

2-1. 一般化學試劑

- (1) NaCl, Na₂HPO₄, KCl, KH₂PO₄, HCl, KOH, NaHCO₃ (Merck, Germany)
- (2) Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Merck, Germany)
- (3) Methanol (Merck, Germany)
- (4) Isopropanol (Merck, Germany)

2-2. 染色劑

- (1) Trypan blue (Sigma, USA)
- (2) MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium

bromide) (Sigma, USA)

3.實驗儀器

- (1) 微量天平 (Shimadzu; Libror AEL-40SM, Japan)
- (2) 低溫離心機 (Centrifuge tube, Kubota 5700, Japan)
- (3) 低溫離心機 (Eppendorf, 5415C, Germany)
- (4) 倒立顯微鏡 (Olympus Ut50A, Japan)
- (5) 正向顯微鏡 (Olympus BH2, Japan)
- (6) 無菌操作台 (造鑫, Taiwan)
- (7) 振搖水浴機 (Yamato, Japan)
- (8) 血球計數器 (Hemocytometer; Bright-line, USA)
- (9) 組織培養皿 (Falcon, USA)
- (10) 96-well 組織培養盤 (Falcon, USA)
- (11) 24-well 組織培養盤 (Falcon, USA)
- (12) 純水製造機 (Millipore, Milli-RO 10, Milli-QRG, USA)
- (13) MicroELISA- spectrophotometer 分光光度計 (Dyn-EX MRX, USA)
- (14) 自動血球計數器 (Symex ; F-800, Japan)
- (15) 二氧化碳培養箱 (Espec BNA-211, Japan)
- (16) 高溫滅菌器 (廣水, Taiwan)

II. 實驗方法

1. 細胞株之繼代培養

(1) 試液配製：

A. 培養液 RPMI 1640 粉末 10.4 克加 2.2 克碳酸氫鈉溶於 1 公升二次蒸餾水中，攪拌均勻後，調整酸鹼值至 7.2-7.3，加入 10 mM Hepers，以 0.22 μ m 濾膜過濾分裝。使用前加入 FBS 10%、L-glutamine 1%、P/S 1%。

B. 培養液 DMEM 粉末 13.54 g 加 3.7 g 碳酸氫鈉溶於 1 公升二次蒸餾水中，攪拌均勻後，調整酸鹼值至 7.2-7.3，以 0.22 μ m 濾膜過濾分裝。使用前加入 FBS 10%、L-glutamine 1%、P/S 1%。

C. 磷酸緩衝液 Phosphate buffer saline，(PBS)

KCl	0.20	g
NaCl	8.00	g
Na ₂ HPO ₄	1.14	g
KH ₂ PO ₄	0.20	g

用二次蒸餾水配製成 1 公升 10 倍的 PBS 儲備溶液，使用

前以二次蒸餾水稀釋十倍，高壓滅菌後使用。

(2) 培養方法：

A. 細胞之解凍

將冷凍之細胞由-80°C 冰箱中取出，於 37°C 水浴下解凍，取出細胞液混合 5 ml 之培養液於 15 ml 離心管中，以 1200 rpm 離心 5 分鐘，吸去上清液，加 10 ml 培養液，將細胞移至 10 公分培養皿中，於 37°C，含 5% CO₂ 的培養箱中培養。

B.

a. 細胞之培養

以培養皿中的舊培養液將細胞沖下呈懸浮態，吸取懸浮液 1-2 ml 至新的 10 公分培養皿，加入新培養液調整細胞至適當濃度，再放回培養箱於 37°C、5% CO₂ 中培養。

C. 細胞數目的計算：

混合均勻之懸浮液後，取出 0.5 ml 置於微量離心管中，取出 15 µl 與等量的 Trypan blue 混合均勻，再吸出 15 µl 放入血球計數器上。用血球計數器記錄井字之四角各 25 小格之活細胞數。反覆三次，求平均值。

總細胞數 = (平均值 / 4) × 2 × 10⁴ 個 / ml。

2. 細胞存活性試驗

(1) MTT 分析之原理：

利用黃色 MTT 溶液被活細胞粒線體內的去氫酶間接還原成 formazan 呈紫黑色結晶(如圖 1)，以含 0.04 N 鹽酸之異丙醇將結晶溶解，在 600 nm 波長下測吸光度，計算細胞存活率。

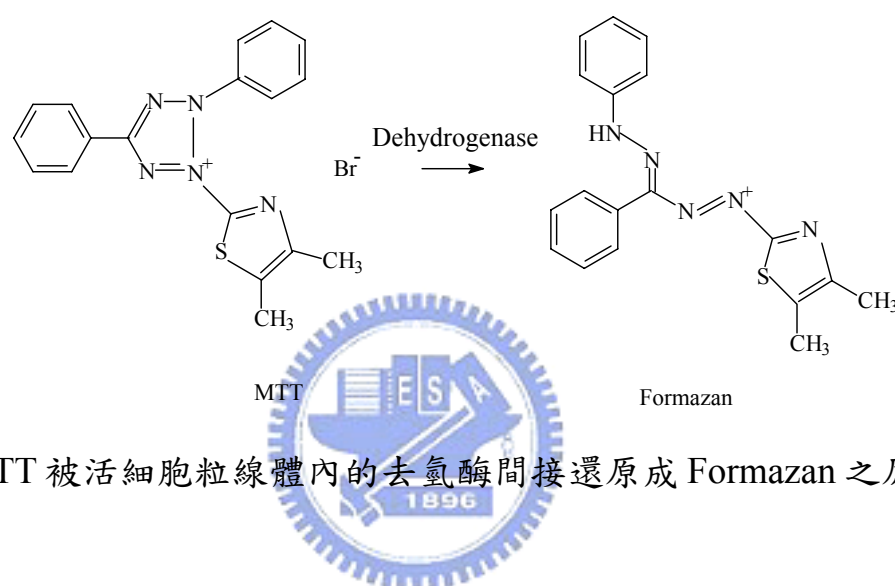


圖 16 MTT 被活細胞粒線體內的去氫酶間接還原成 Formazan 之原理。

(2) MTT 溶液的配製：

精秤 50 mg MTT，加入 10 ml 1% PBS 溶解後，以 0.22 μ m 濾膜過濾，避光儲存於 4°C 冰箱備用。

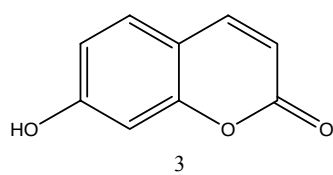
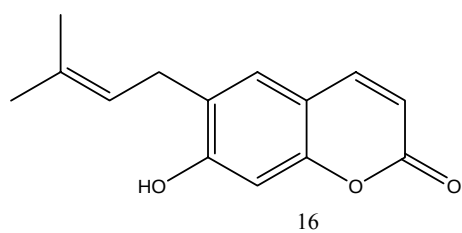
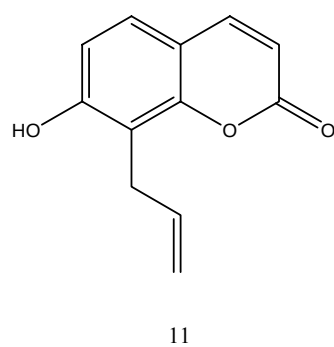
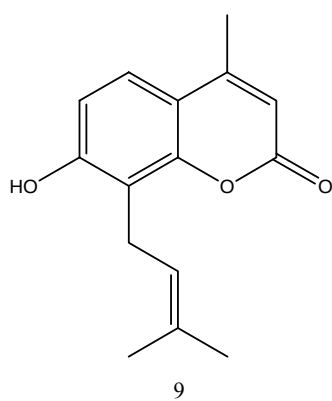
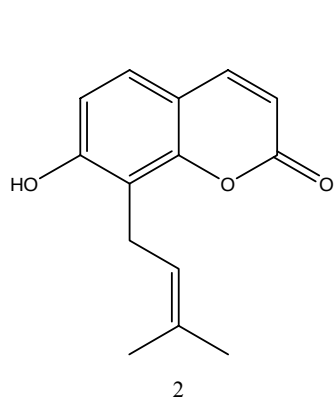
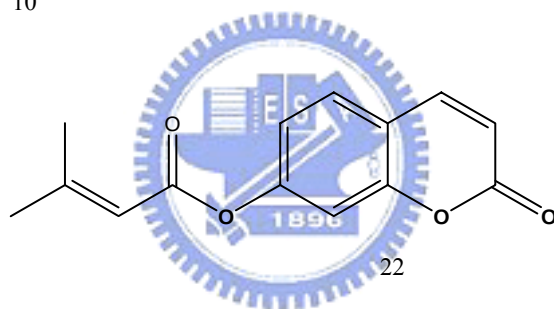
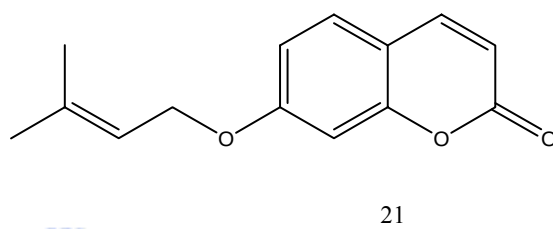
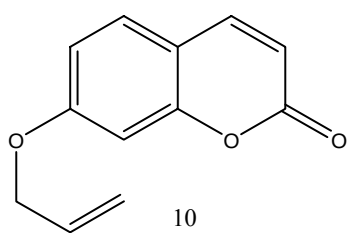
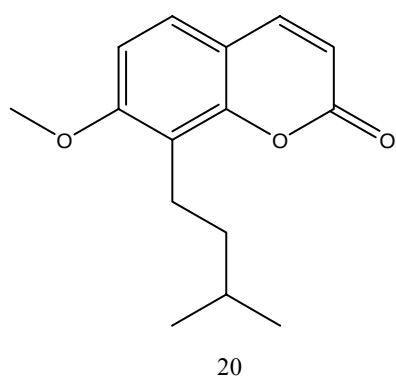
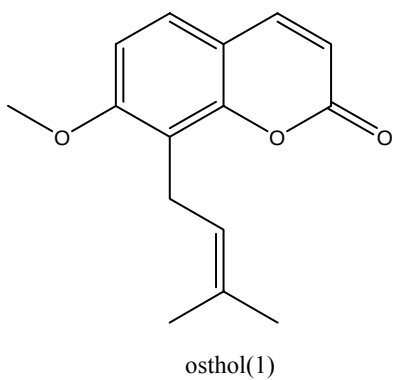
(3) 分析步驟：

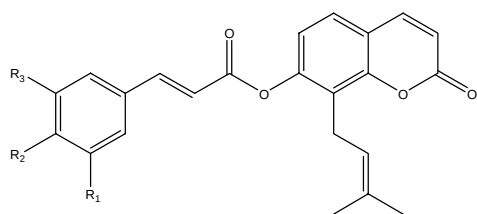
將脾細胞種至 24-well plate，細胞數 2×10^6 cells/well，加入 10 μ g/ml LPS 及不同濃度之待測藥物，置於 37°C、5% CO₂ 培養箱中 44 小時後，轉至 1.5 ml 小離心管，1200 rpm 離心 10 分鐘，去上清液，以 200 μ l PBS 清洗細胞，1200 rpm 離心 10 分鐘，倒掉上

清液，加入 180 μ l 培養液和 20 μ l MTT (5 mg/ml)，在 37°C、5% 二氧化碳培養箱下，培養 4 小時，使形成紫色結晶；離心後吸掉上清液 150 μ l，再加入 150 μ l 含 0.04 N 鹽酸之異丙醇將結晶溶解，離心後吸取上清液 150 μ l，以 microELISA- spectrophotometer 在波長 600 nm 下測其吸光度 (O.D.值)。



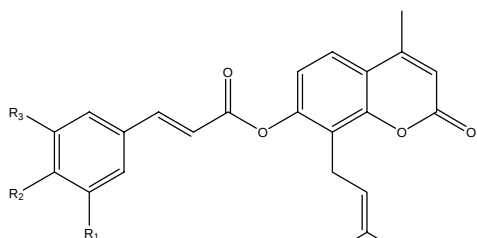
4-2 細胞毒性實驗結果





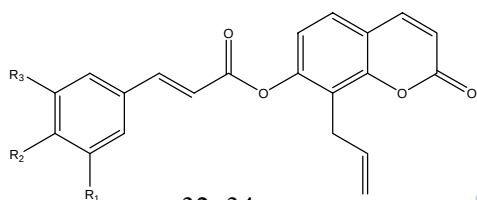
26~28

- 26: $R_1=\text{OCH}_3$, $R_2=\text{OH}$, $R_3=\text{H}$
 27: $R_1=\text{OCH}_3$, $R_2=\text{OH}$, $R_3=\text{OCH}_3$
 28: $R_1=\text{OCH}_3$, $R_2=\text{OCH}_3$, $R_3=\text{H}$



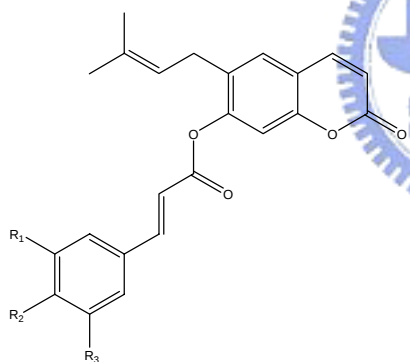
29~31

- 29: $R_1=\text{OCH}_3$, $R_2=\text{OH}$, $R_3=\text{H}$
 30: $R_1=\text{OCH}_3$, $R_2=\text{OH}$, $R_3=\text{OCH}_3$
 31: $R_1=\text{OCH}_3$, $R_2=\text{OCH}_3$, $R_3=\text{H}$



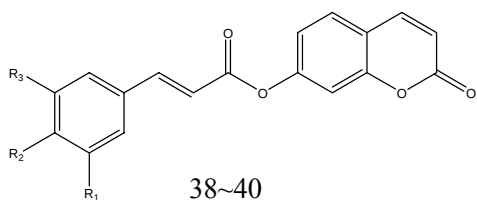
32~34

- 32: $R_1=\text{OCH}_3$, $R_2=\text{OH}$, $R_3=\text{H}$
 33: $R_1=\text{OCH}_3$, $R_2=\text{OH}$, $R_3=\text{OCH}_3$
 34: $R_1=\text{OCH}_3$, $R_2=\text{OCH}_3$, $R_3=\text{H}$



35~37

- 35: $R_1=\text{OCH}_3$, $R_2=\text{OH}$, $R_3=\text{H}$
 36: $R_1=\text{OCH}_3$, $R_2=\text{OH}$, $R_3=\text{OCH}_3$
 37: $R_1=\text{OCH}_3$, $R_2=\text{OCH}_3$, $R_3=\text{H}$



38~40

- 38: $R_1=\text{OCH}_3$, $R_2=\text{OH}$, $R_3=\text{H}$
 39: $R_1=\text{OCH}_3$, $R_2=\text{OH}$, $R_3=\text{OCH}_3$
 40: $R_1=\text{OCH}_3$, $R_2=\text{OCH}_3$, $R_3=\text{H}$

圖 17 結構 (一)

表 1 細胞毒性測試結果（一）

MTT assay 1

	HeLa	AGS	HT-29	HeLa	AGS	HT-29
osthol(1)	95.52	93.45	56.4	80.97	68.56	88.86
2	99.32	88.72	88.94	58.93	31.55	61
3	11.92	28.81	5.63	-	-	-
9	90.46	82.1	77.93	46.95	31.03	85.88
11	3.11	29.68	28.08	-	-	-
16	84.65	57	20.14	49.83	41.93	-
20	96.08	70.6	31.32	64.81	71.63	-
21	41.93	51.34	34.99	-	81.77	-

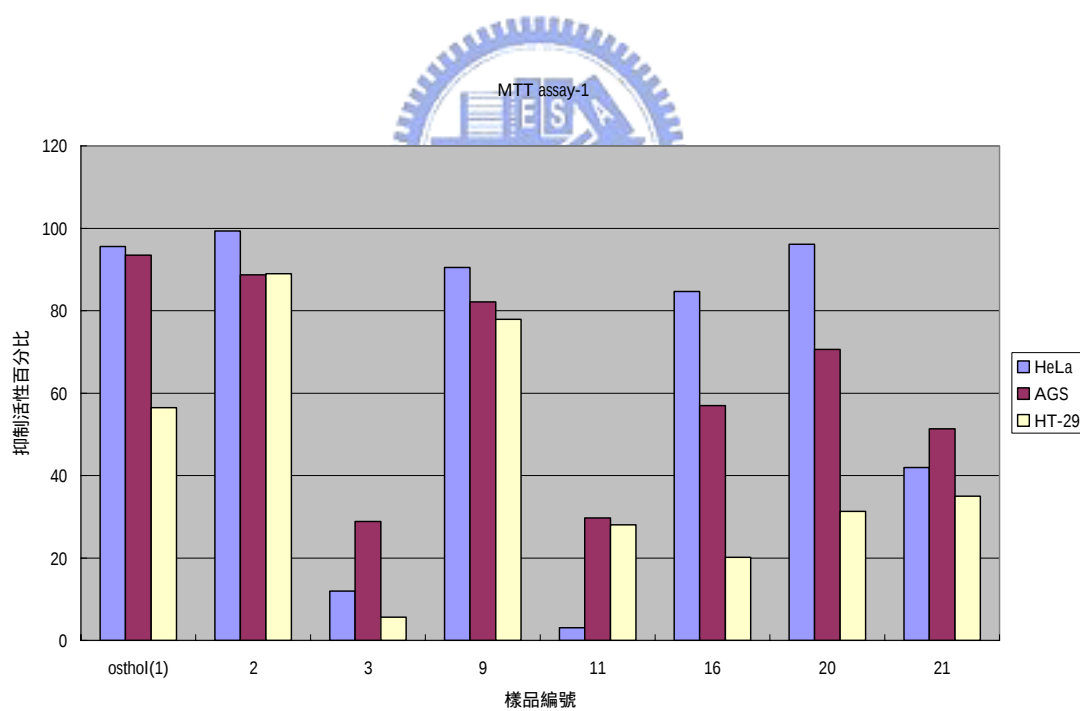


圖 18 測試結果（一）

表 2 細胞毒性測試結果（二）

MTT assay 2

	HeLa	AGS	HT-29	HeLa	AGS	HT-29
osthol(1)	95.52	93.45	56.4	80.97	68.56	88.86
2	99.32	88.72	88.94	58.93	31.55	61
3	11.92	28.81	5.63	-	-	-
9	90.46	82.1	77.93	46.95	31.03	85.88
11	3.11	29.68	28.08	-	-	-
16	84.65	57	20.14	49.83	41.93	-
26	89.54	99.38	92.04	40.99	41.97	68.6
29	24.08	60.4	59.94	-	51.26	75.37
32	1.63	58.67	38.82	-	-	-
35	93.54	97.39	90.86	23.38	31.81	77.49
38	10.5	48.13	31.79	-	-	-

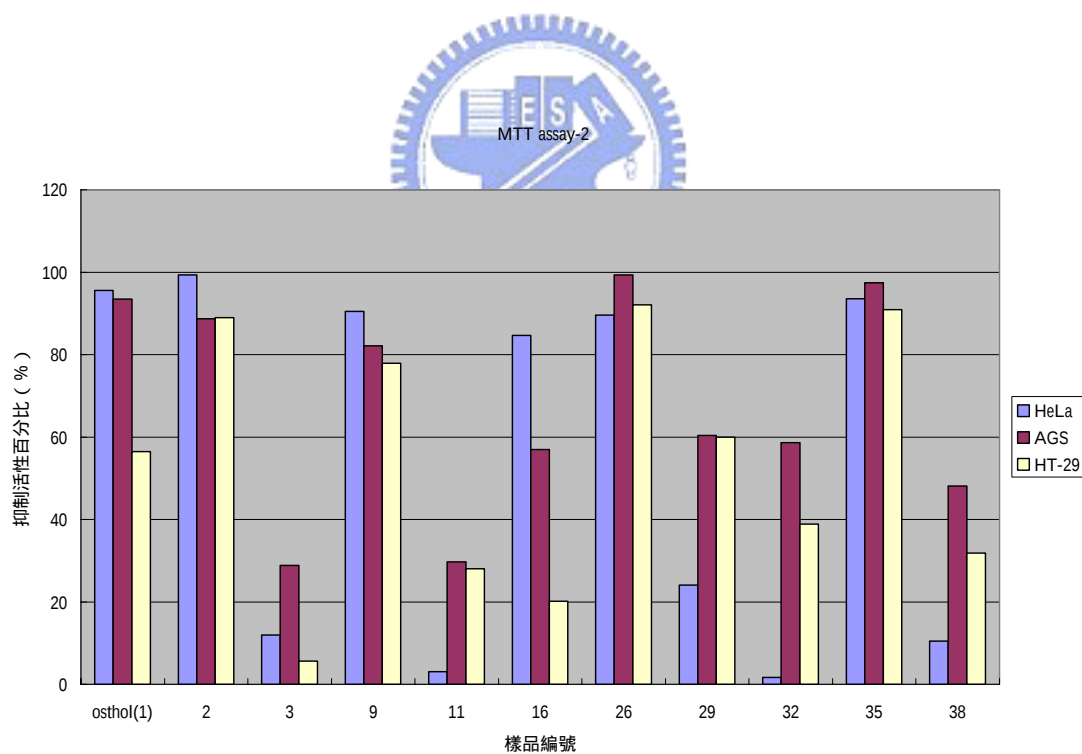


圖 19 測試結果（二）

表 3 細胞毒性測試結果（三）

MTT assay 3

	HeLa	AGS	HT-29	HeLa	AGS	HT-29
osthol(1)	95.52	93.45	56.4	80.97	68.56	88.86
26	89.54	99.38	92.04	40.99	41.97	68.6
27	12.73	51.21	33.71	-	86.19	-
28	10.27	54.35	18.64	-	91.37	-
29	24.08	60.4	59.94	-	51.26	75.37
30	10.76	49.02	57.29	-	52.26	
31	22.69	53.95	56.09	-	-	-
32	1.63	58.67	38.82	-	-	-
33	19.21	69.05	84.5	-	65.73	60.91
34	29.49	45.64	48.06	-	-	-
35	93.54	97.39	90.86	23.38	31.81	77.49
36	35.51	49.67	46.62	-	-	-
37	28.77	48.51	24.66	-	-	-
38	10.5	48.13	31.79	-	-	-
39	8.66	61.47	48.67	-	80.04	-
40	9.95	57.35	46.06	-	96.04	-

MTT assay-3

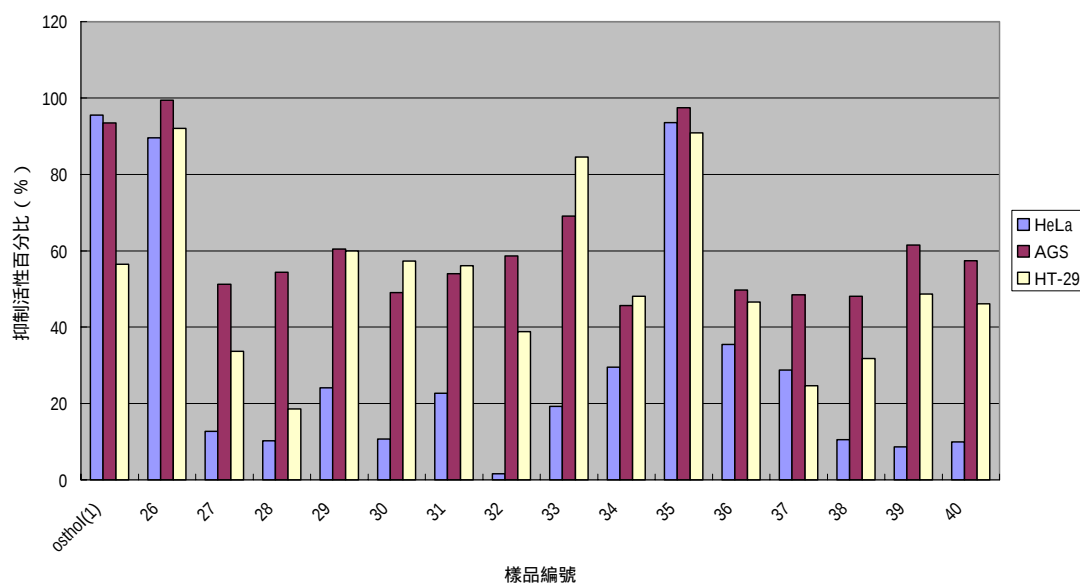


圖 20 測試結果（三）

表 4 細胞毒性測試結果（四）

MTT assay 4

	HeLa	AGS	HT-29	HeLa	AGS	HT-29
osthol(1)	95.52	93.45	56.4	80.97	68.56	88.86
3	11.92	28.81	5.63	-	-	-
10	0	29.14	45.79	-	-	-
21	29.25	52.75	39.88	-	85.49	-
22	6.6	37.66	46.35	-	-	-
38	47.02	41.08	29.61	-	-	-

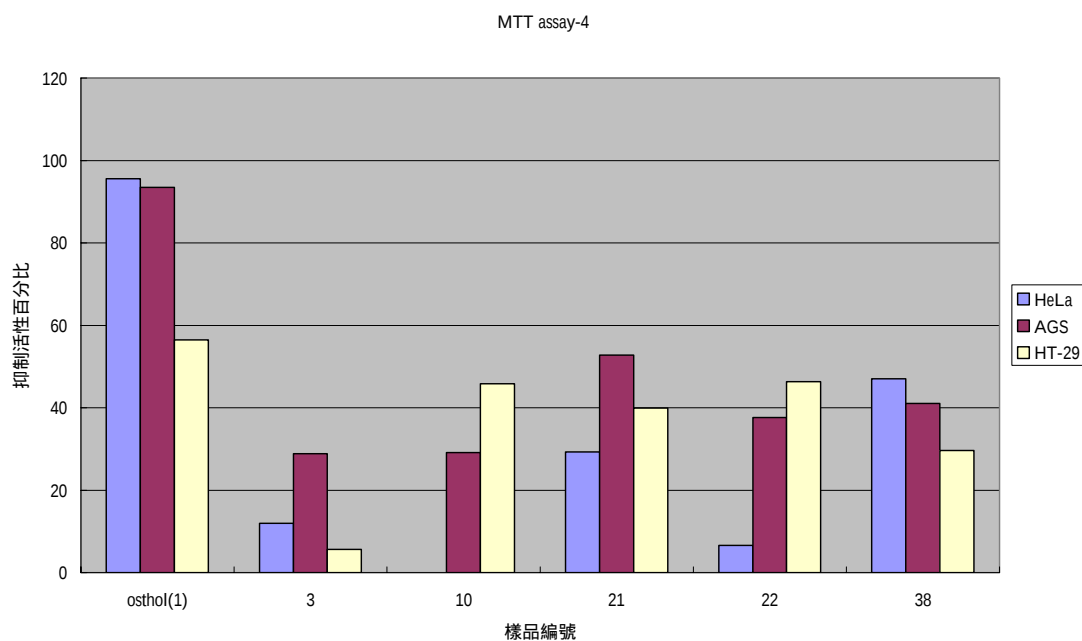


圖 21 測試結果（四）

第五章 結果與討論

首先，我們針對 Osthonol (2) 上的 isoprenyl 來進行討論，分別合成出化合物 (2)、(3)、(9)、(11)、(16) 及 (21) 來探討 SAR。可以發現當 osthonol (2) 上 C8 位置的 isoprenyl 分別被 H group (3) 或是 allyl group (11) 取代之後活性有非常明顯的下降。另外，將 osthonol (1) C8 位置上的 isoprenyl 氫化之後得到化合物 (20)，亦觀察到對於 AGS cells 及 HT-29 cells 的活性有明顯的下降趨勢，由此可得知 osthonol (1) C8 位置上的 isoprenyl group 對於細胞毒性具有相當重要的影響。

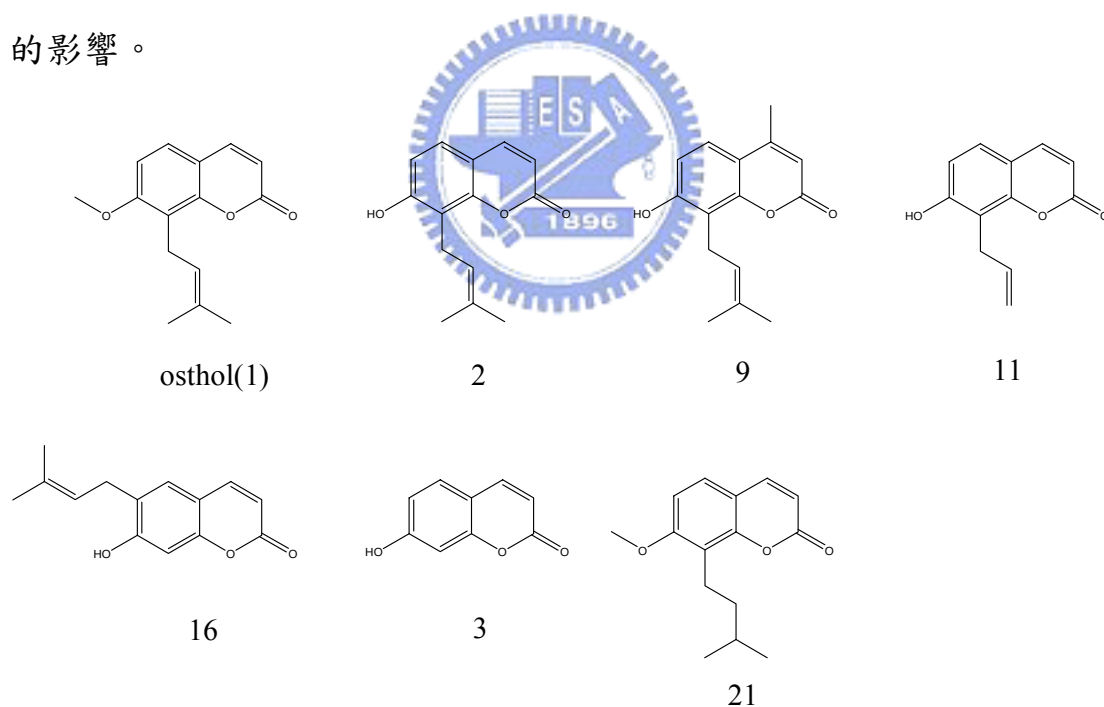


圖 22 結構 (二)

表 5 細胞毒性測試結果 (五)

	HeLa	AGS	HT-29
Osthol(1)	95.52	93.45	56.4
2	99.32	88.72	88.94
3	11.92	28.81	5.63
9	90.46	82.1	77.93
11	3.11	29.68	28.08
16	84.65	57	20.14
21	96.08	70.6	31.32

100 μ M/48hrs

此外，我們合成出 isoprenyl group 位於 C6 位置的化合物 demethylsuberosin (16)，與 osthenol (2) 比較後發現活性下降，尤其對於 HT-29 cells 的活性明顯降低，可知 isoprenyl group 位於 C8 的位置上具有較好的抗癌活性。

再來，我們利用化合物 (2)、(3)、(9)、(11)、(16) C7 位置上的 OH 基接上 ferulic acid (23) 來形成新的衍生物 (26)、(29)、(32)、(35)、(38)。經觀察發現除了化合物 (29) 之外，其餘的衍生物均明顯的增進癌細胞毒殺效果，所以我們可以往這個方向繼續更深入的探討。而相較於化合物 (2) 而言，化合物 (9) 僅在 C4 的位置上多了一個甲基，但是為甚麼形成衍生物 (29) 之後卻造成活性下降？必須經由更多的討論之後才有辦法作更進一步的解釋。

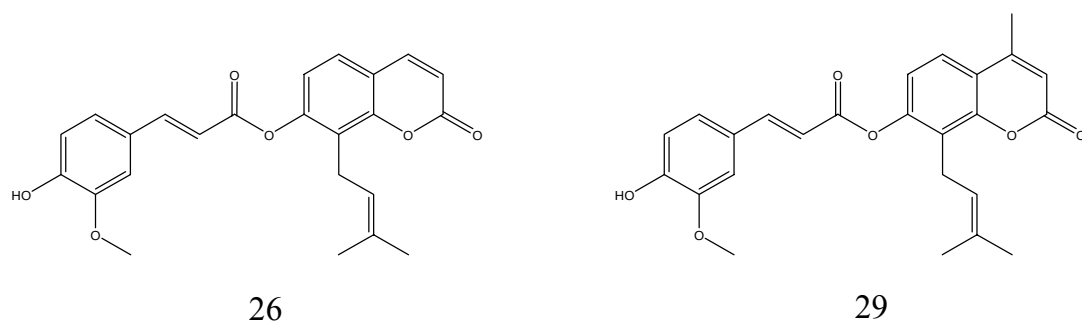


圖 23 結構 (三)

表 6 細胞毒性測試結果 (六)

	HeLa	AGS	HT-29
2	99.32	88.72	88.94
9	90.46	82.1	77.93
26	89.54	93.72	73.46
29	24.08	60.4	59.94

100μM/48hrs

接著我們分別合成新的衍生物 27~40 來和化合物 (26)、(29)、(32)、(35)、(38) 做活性上的比較。可得知當 ferulic ester 中 benzene ring 上的 OH 基被保護起來時 (形成 OCH₃)，其活性趨勢是下降的，由此可了解 OH 基對於癌細胞毒殺具有相當重要的作用，而當 benzene group 上多出一個 OCH₃ 時，其活性趨勢亦是下降的。推論其原因或許當衍生物的疏水性上升時，對於癌細胞的毒殺效果會造成下降的趨勢。

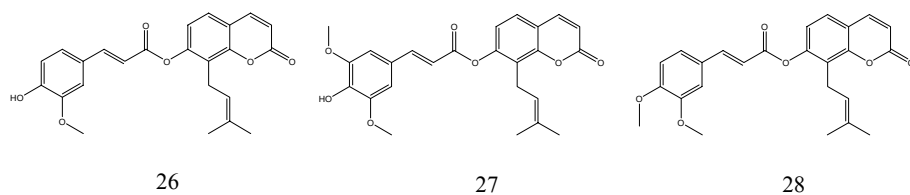


圖 24 結構 (四)

表 7 細胞毒性測試結果（七）

	HeLa	AGS	HT-29
26	89.54	99.38	92.04
27	12.73	51.21	33.71
28	10.27	54.35	18.64

100 μ M/48hrs

另外，化合物（33）及化合物(34)對於化合物(32)的活性測試結果卻是上升的趨勢，這是唯一與其他系列衍生物的活性趨勢相反的系列，但是無法解釋為何有這樣的結果。

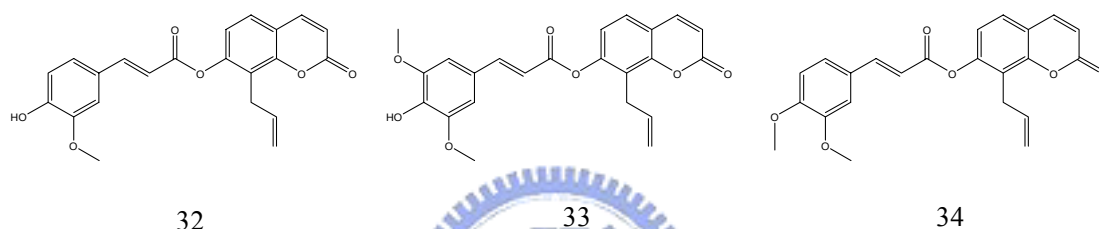


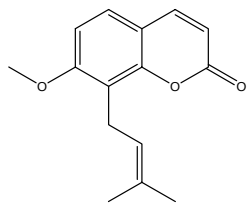
圖 25 結構（五）

表 8 細胞毒性測試結果（八）

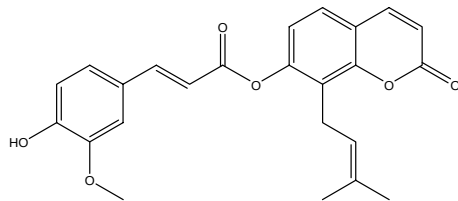
	HeLa	AGS	HT-29
32	1.63	58.67	38.82
33	19.21	69.05	84.5
34	29.49	45.64	48.06

100 μ M/48hrs

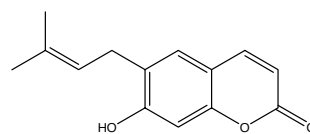
最後我們根據細胞毒性測試有不錯表現的化合物更進一步的做 IC₅₀ 的細胞活性測試，發現到雖然從 MTT assay 的數據來看，化合物（26）與化合物（35）和 osthol（1）比較起來雖然表現都很不錯，但是從 IC₅₀ 來看，化合物（26）與化合物（35）的數據要比 osthol（1）低上許多，所以我們可以利用化合物（26）與（35）做為先導藥物更進一步發展出新的抗癌藥物。



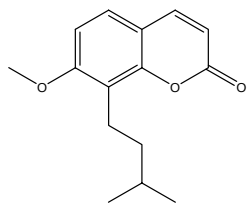
osthol(1)



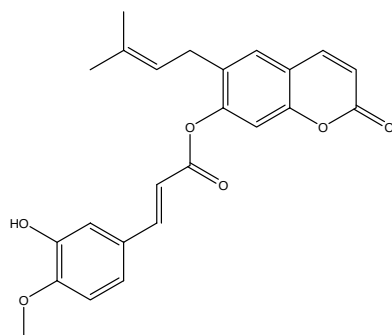
26



16



20



35

圖 26 結構 (六)

表 9 IC₅₀

IC₅₀ (μM)

	HeLa	AGS	HT-29
osthol (1)	80.97	68.56	88.86
16	49.83	41.93	-
20	64.81	71.63	-
21	>100	>100	-
26	40.99	41.97	68.60
35	23.38	31.81	77.49

第六章 結論

本實驗合成出一系列的 osthol (1) 衍生物經由細胞毒性測試實驗後探討其結構與活性間的關係 (SAR)。有以下幾點發現：

1. osthol (1) 上的 isoprenyl group 對於抗癌活性有重要的影響。
2. Isoprenyl group 位於 osthol (1) C8 上的位置比位於 C6 的位置具有更好的活性表現。
3. osthol (1) 上的 3,4-olefinic bond 對抗癌活性有影響，但作用機制不明，可更進一步研究探討。
4. 衍生物上的 OH 基對於毒殺癌細胞具有相當重要的作用。
5. 當化合物 osthenol (2)、demethylsuberosin (9) 接上 ferulic acid (23) 形成衍生物 (26)、(35) 後，抗癌活性上升，且 IC_{50} 的值明顯的下降。

最後，因為薑黃素 (curcumin) 不僅在抗癌方面表現優異，對於抗發炎亦有不錯的表現，因此我們相信取其部分結構形成的化合物 ferulic acid (23) 做為取代基所合成出來的一系列衍生物 (26~40) 對於抗發炎也會有不錯的結果。

參考文獻

1. 蔡金娜，張亮，王崢濤，徐珞珊，杜芳，徐國鈞；藥學學報 (Acta Pharmaceutica Sinica)，**1999**, 34, 767-771.
2. 王明傑，私立台北醫學大學，碩士論文，**2002**
3. L. L. Yang, M. C. Wang, L.G. Chen, and C. C. Wang. *Plant Med*, **2003**, 69, 1091-1095.
4. 謝佳玲，中國醫藥學院，博士論文，**2003**
5. Y. Hitotsuyanagi, H. Kojima, H. Ikuta, K. Takeya, and Itokawa. *Bioorganic & Medicinal chemistry Letters*, **1996**, 6, 1791-1794.
6. S. Kawaii, Y. Tomono, K. Ogawa, M. Sugiura, M. Yano, Y. Yashizawa, C. Ito, and H. Furukawa. *Anticancer Research*, **2001**, 21, 1905.
7. A. Gawron, and K. Gtowniak. *Planta Medica*, **1987**, 48, 526.
8. R. L. Huang, C. C. Chen, Y. L. Huang, D. J. Hsien, C. P. Hu, C. F. Chen, and C. M. Chang. *Hepatology*, **1996**, 24, 508.
9. T. Okamoto, S. Yoshida, T. Kobayashi, and S. Okabe. *Jpn. J. Pharmacol*, **2001**, 85, 95.
10. T. Okamoto, T. Kawasaki, and O. Hino. *Biochemical Pharmacology*, **2003**, 65, 677.
11. I. S. Chen, H. F. Chen, M. J. Cheng, Y. L. Chang, C. M. Teng, I.

- Tsutomu, J. J. Chen, and I. L. Tsai. *J. Nat. Prod.* **2001**, 64, 1143.
- 12.X. X. Li, I. Hara, and T. Matsumiya. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, 25, 738.
- 13.A. Murakami, G. Gao, O. K. Kim, M. Omura, M. Yano, C. Ito, H. Furukawa, S. Jiwajinda, K. Koshimizu, and H. Ohigashi. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 333.
- 14.M. M. Ballantyne, P. H. McCabe, and R. D. H. Murry. *Tetrahedron*, **1971**, 27, 871.
- 15.R. D. H. Murray, M.M.Ballantyne, and K.P. Mathai. *Tetrahedron*, **1971**, 27, 1247.
- 16.R. D. H. Murrey, M. Sutcliffe, and P. H. McCabe. *Tetrahedron*, **1971**, 27, 4901.
- 17.R. D. H. Murray, M. M. Ballantyne, T. C. Hogg, and P. H. McCabe. *Tetrahedron*, **1975**, 31, 2960.
- 18.D. S. Karanewsky, and Y. Kishi. *J. Org. Chem.* **1976**, 41, 3026.
- 19.G. M. Massanet, E. Pando, F. R. Luis, and J. Salva. *Heterocycles*, **1987**, 26, 1541.
- 20.K. H. Glusenkamp, and G. Buchi. *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 4481.
- 21.G. Gopalakrishnan, V. Kasinath, N. D. P. Sing, R. Thirumurugan, S. S. S. Raj, and G. Shanmugam. *Molecules*, **2000**, 5, 880.

- 22.R. H. Galan, G. M. Massanet, E. Pando, F. R. Luis, and J. Salva.
Heterocycles, **1989**, 29, 297.
- 23.J. Salva, F. R. Luis, E. Pando, G. M. Massanet, and R. H. Galan.
Heterocycles, **1990**, 31, 255.
- 24.黃俊銘，私立中國醫藥大學，碩士論文，**2002**
- 25.MC Jinag, YHF Yang, JI Yen, and IK Lin. *Nutr Cancer*, **1996**, 26, 111.
- 26.H Chen, ZS Zhang, YL Zhang, and DY Zhou. *Anticancer Research*,
1999, 19, 3675.
- 27.ML Kuo, TS Huang, JK Lin. *Biochim Biohys Acta*. **1996**, 1317, 95.
- 28.SM Plummer, KA Holloway, MM Manson, RJ Munks, A Kaptein, S
Farrow, and L Howells. *Oncogene*, **1999**, 18, 6013.
- 29.P. W. Austin, and T. R. Seshadri. *Indian Journal of Chemistry*, **1968**, 6,
412.
- 30.N. Cairns, L. M. Harwood, and D. P. Astles. *J. Chem. Soc. Perkin*.
Trans. 1, **1994**, 21, 3101.
- 31.N. Cairns, L. M. Harwood, D. P. Astles, and A. Orr. *J. Chem. Soc.*,
Chem. Commun. **1986**, 182-183.

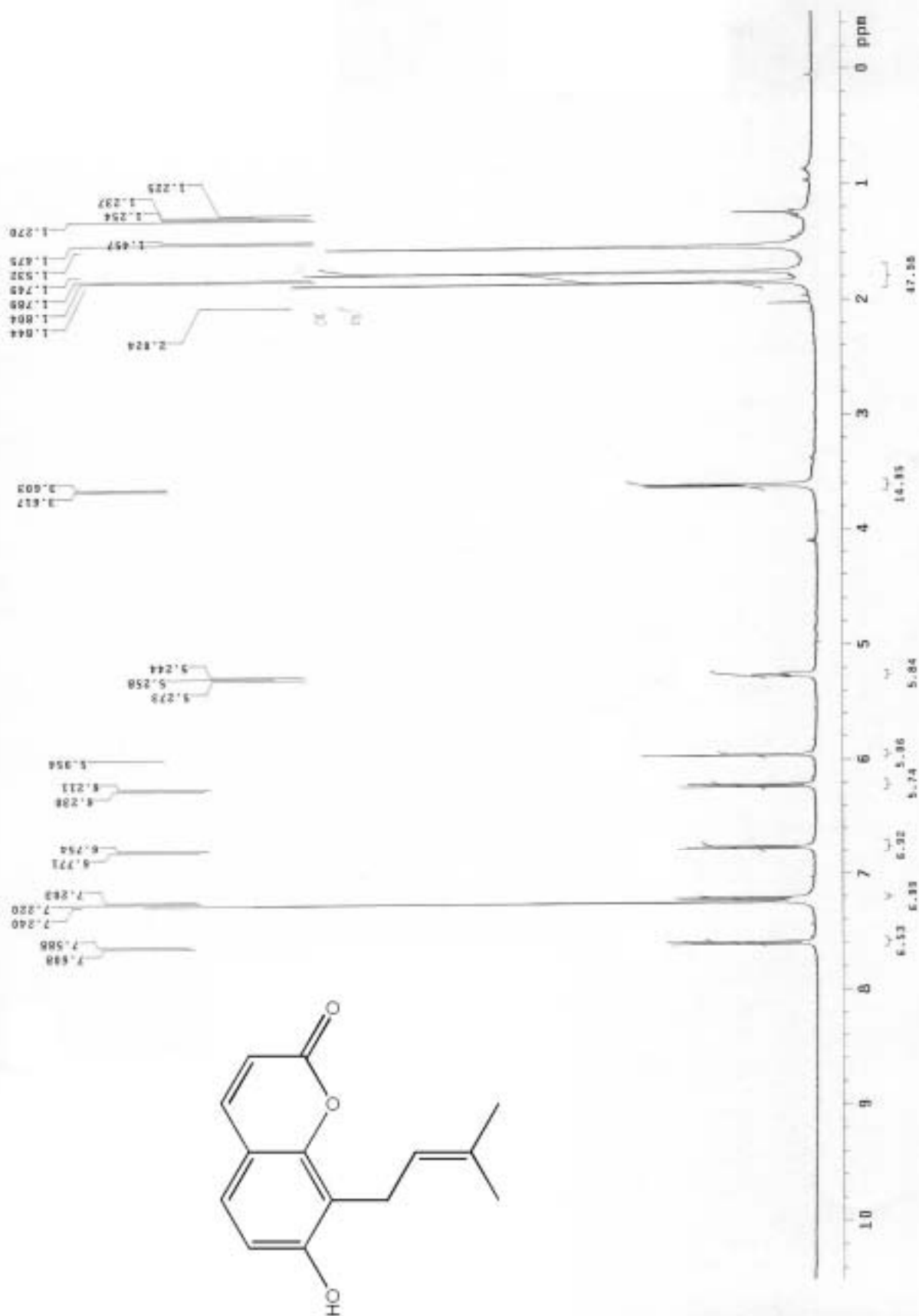


圖 27 化合物(1)之¹H NMR光譜圖



圖 29 化合物(5)之¹H NMR光譜圖

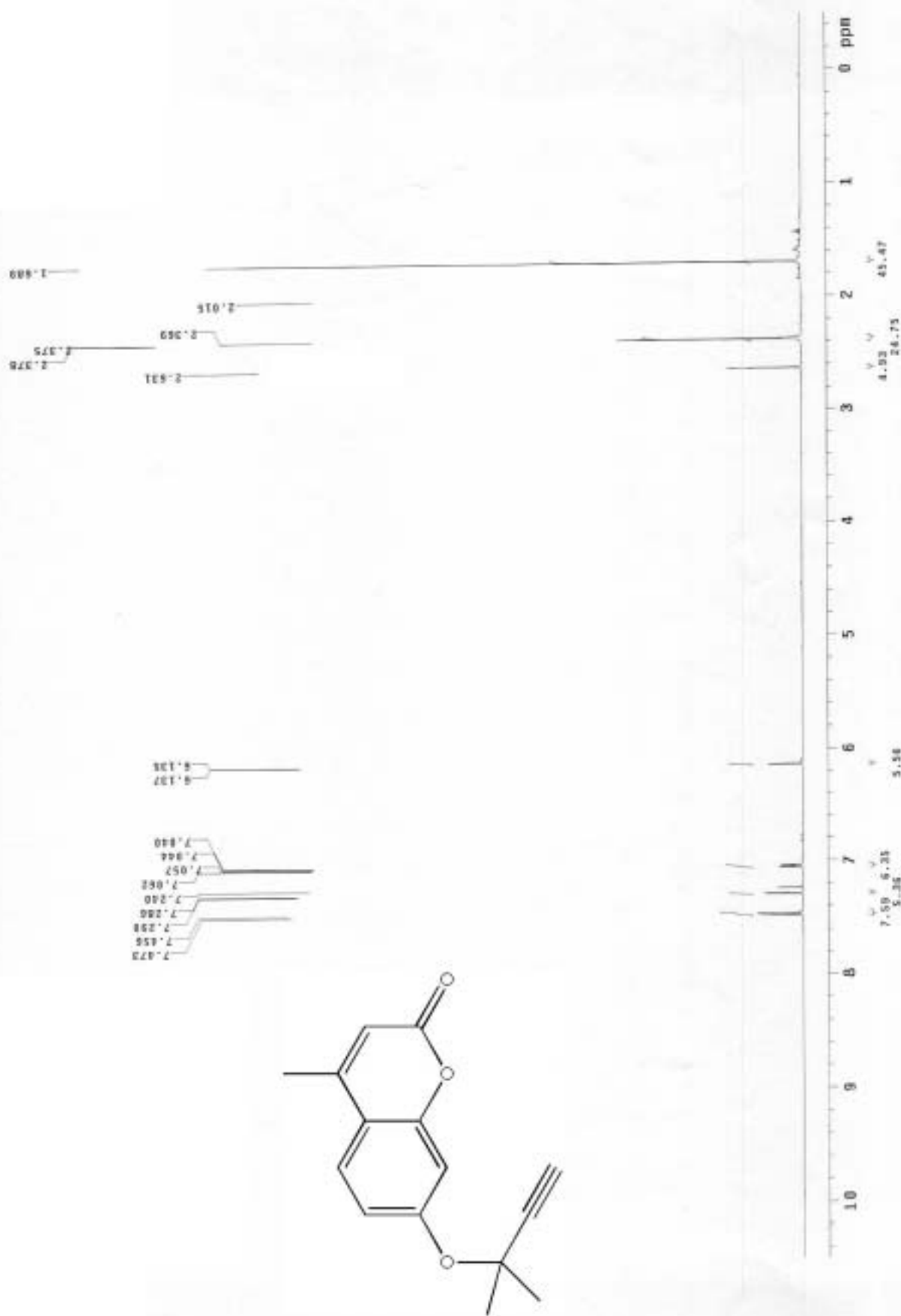


圖 30 化合物(7)之¹H NMR光譜圖

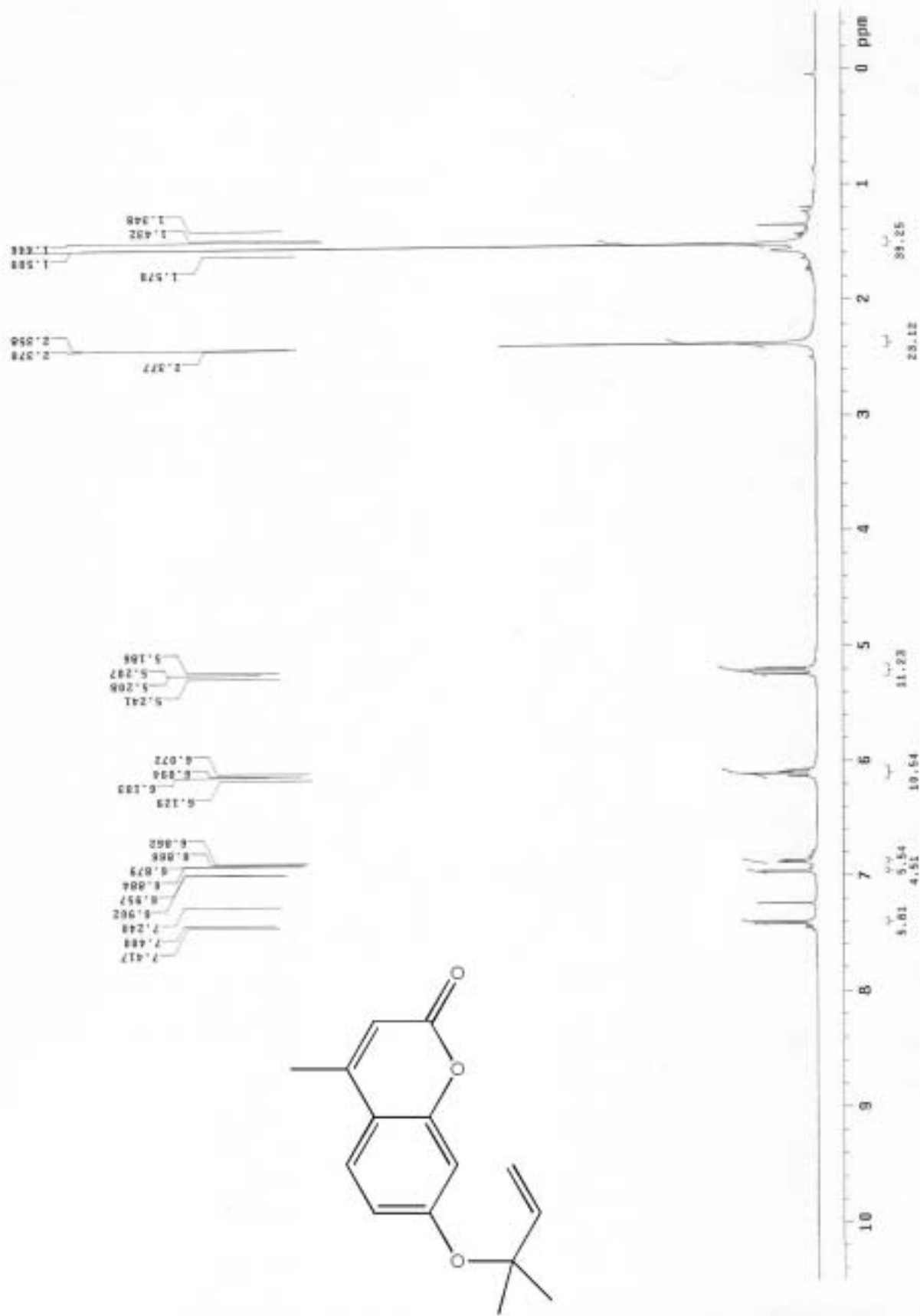


圖 31 化合物(8)之¹H NMR光譜圖

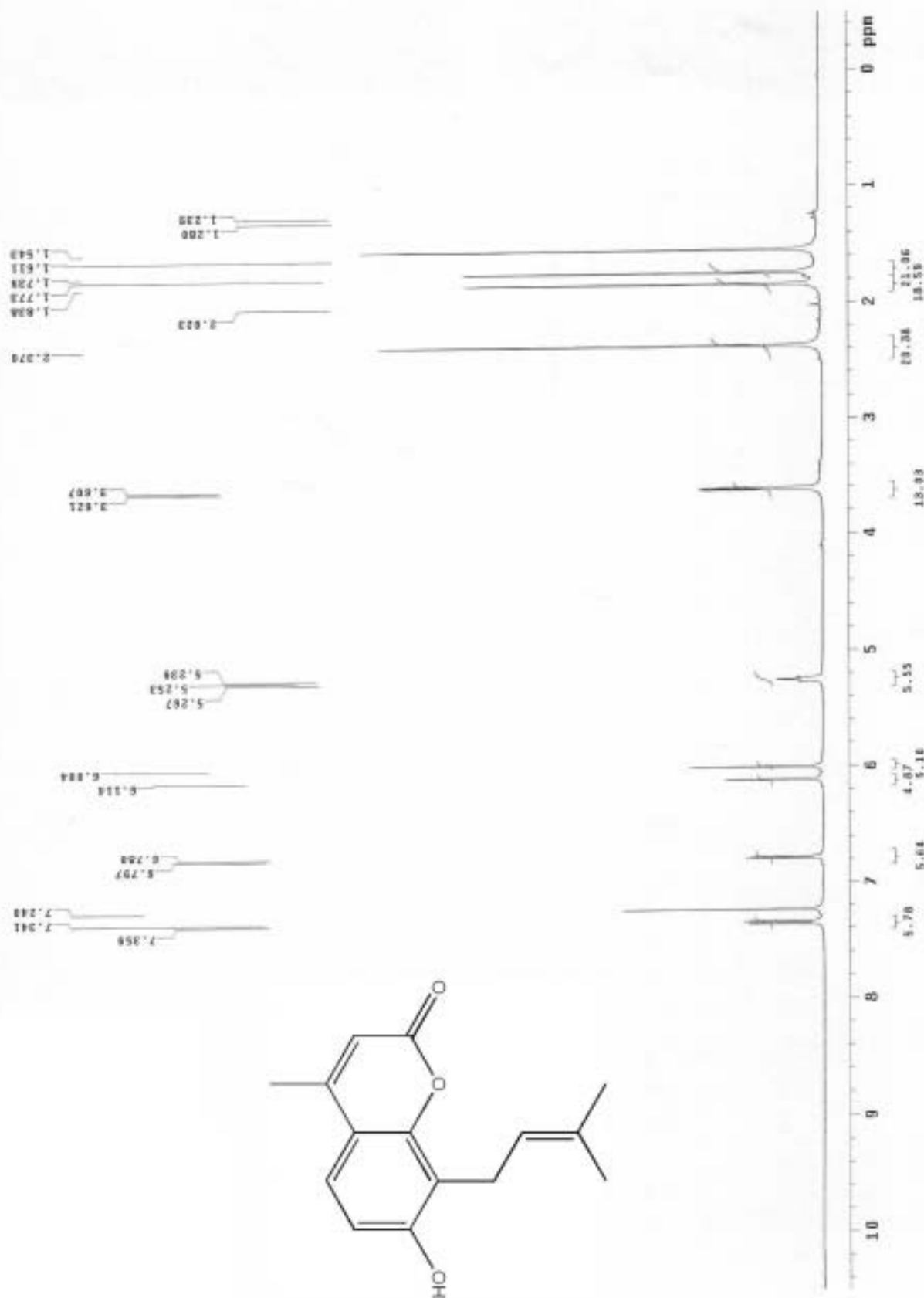


圖 32 化合物(9)之¹H NMR光譜圖

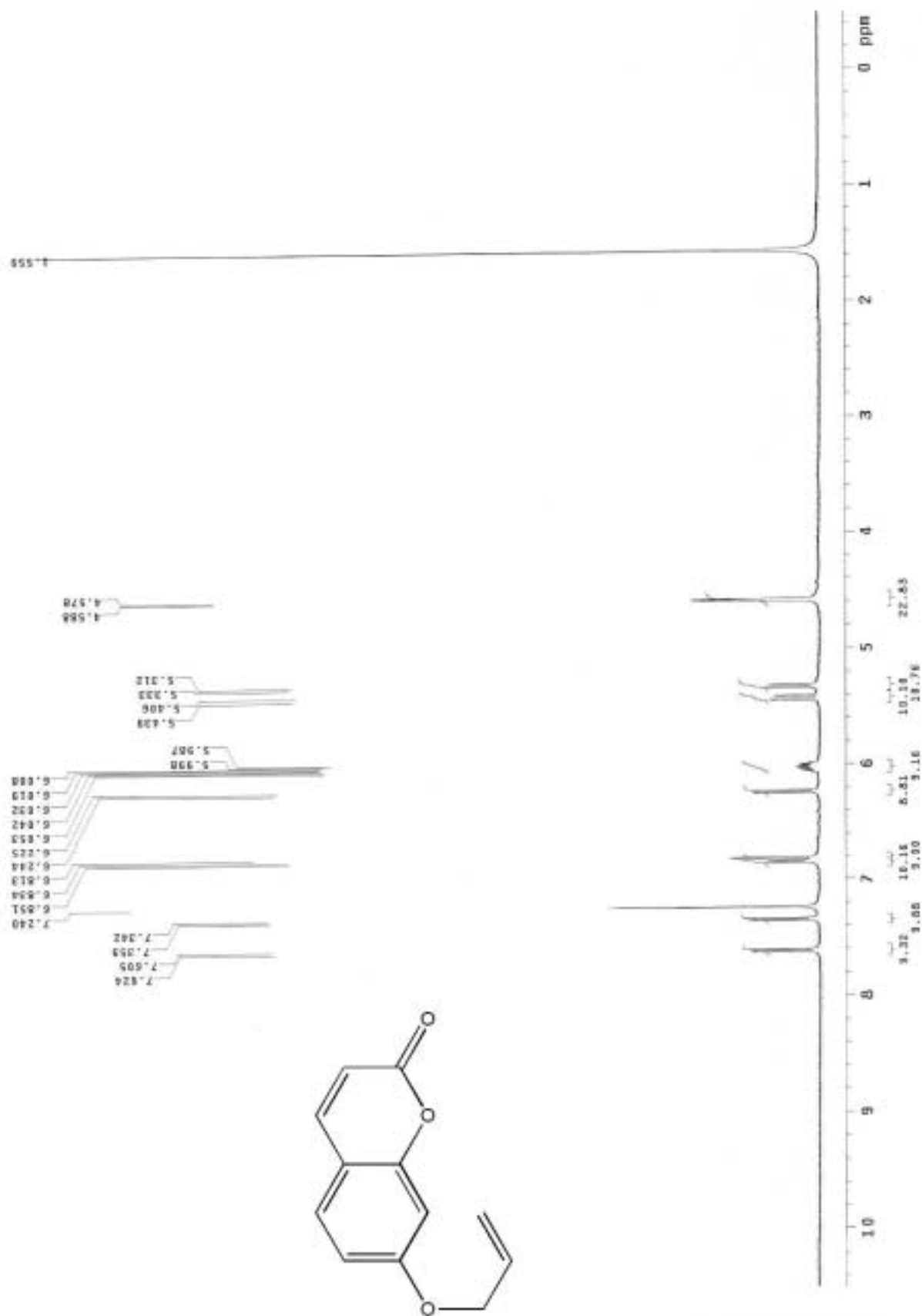


圖 33 化合物(10)之¹H NMR光譜圖

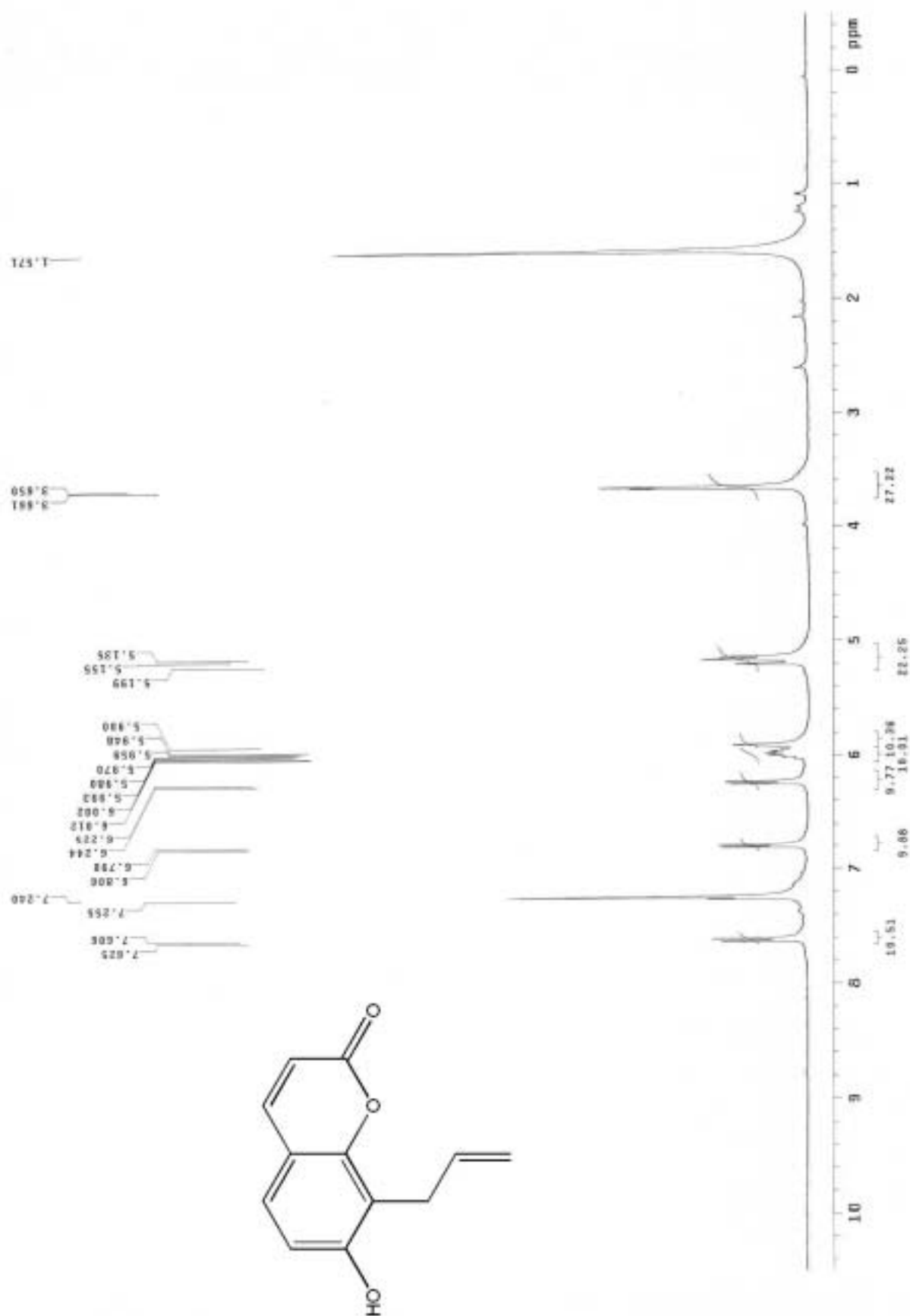


圖 34 化合物(11)之¹H NMR光譜圖

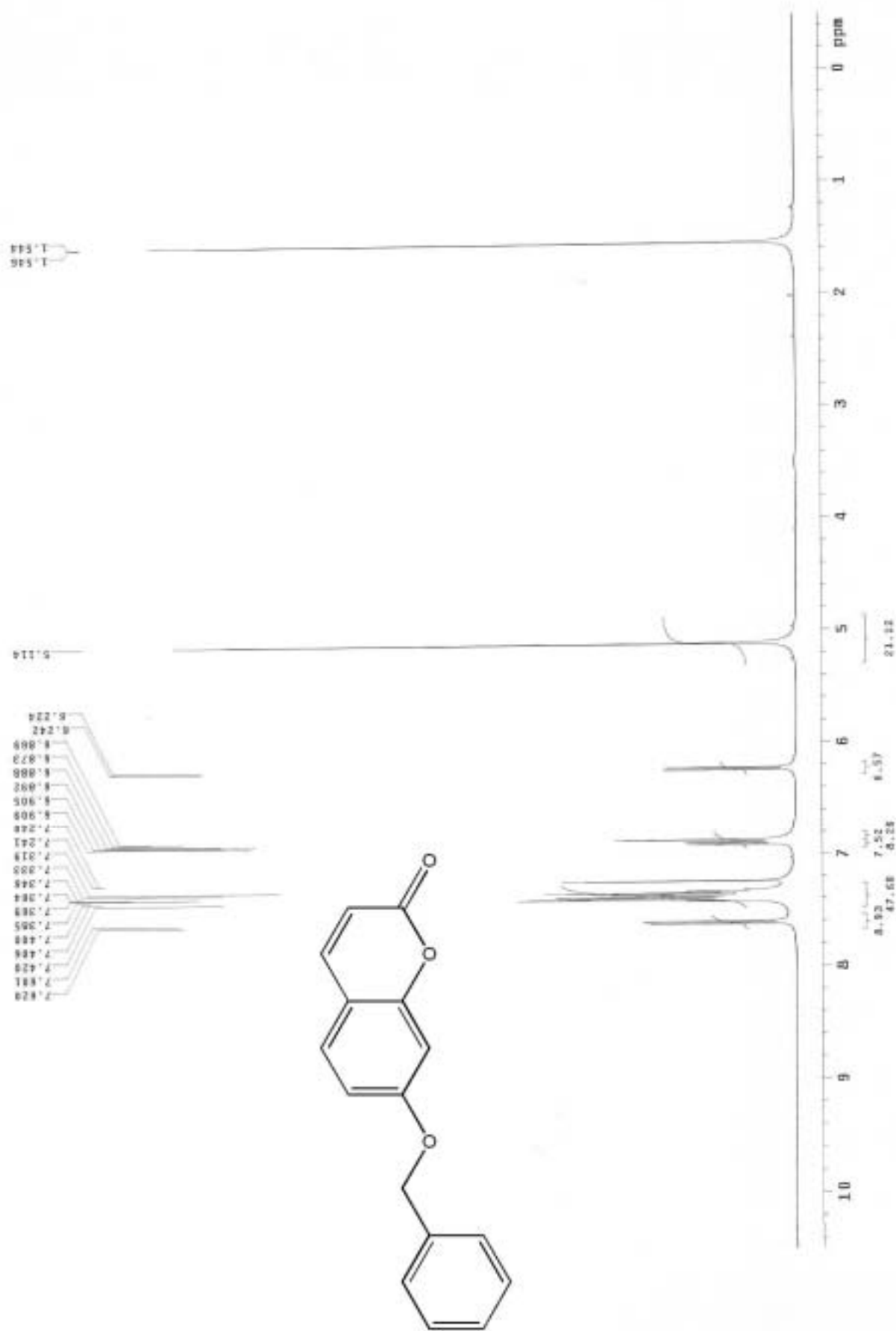


圖 35 化合物(12)之¹H NMR光譜圖

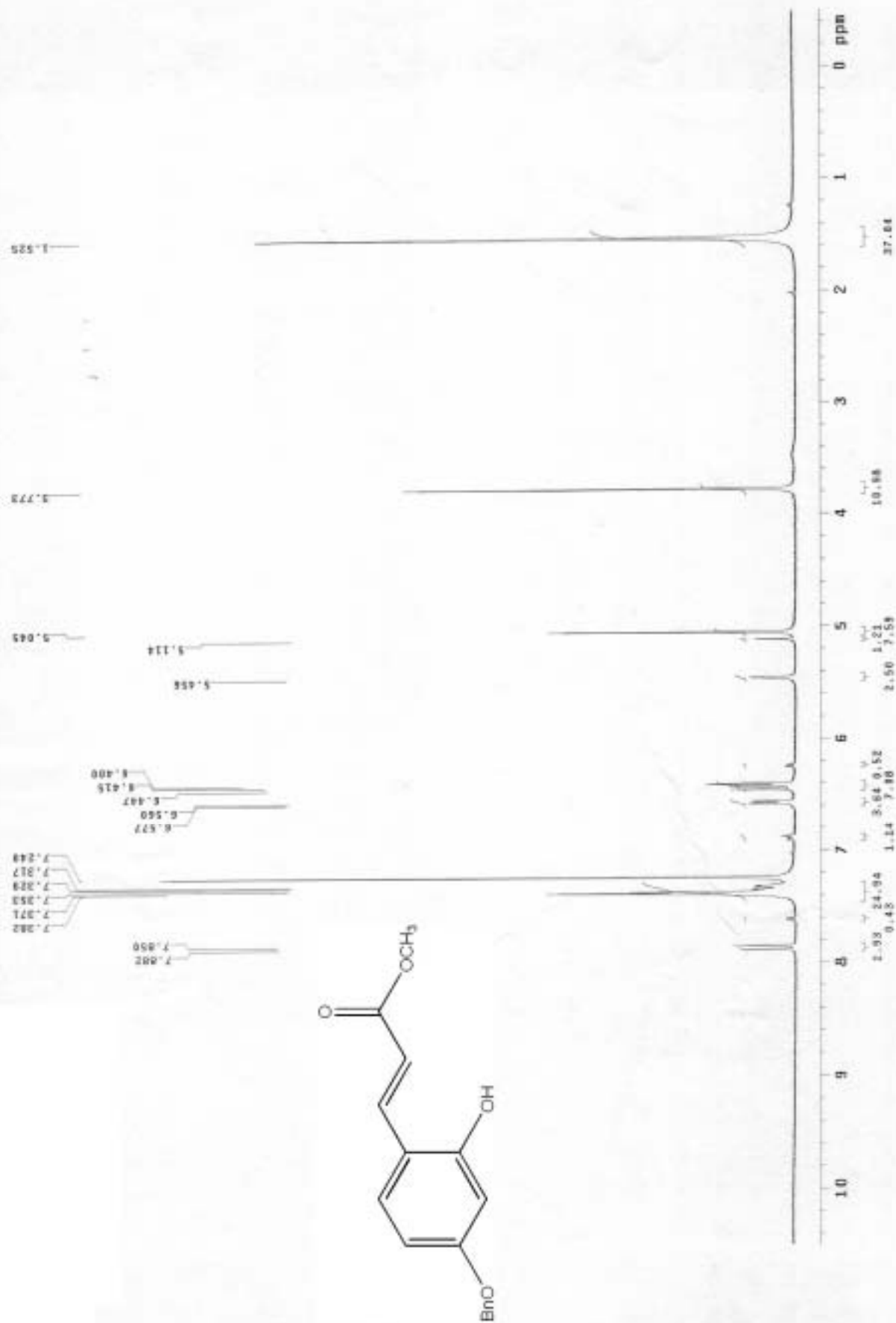


圖 36 化合物(13)之¹H NMR光譜圖

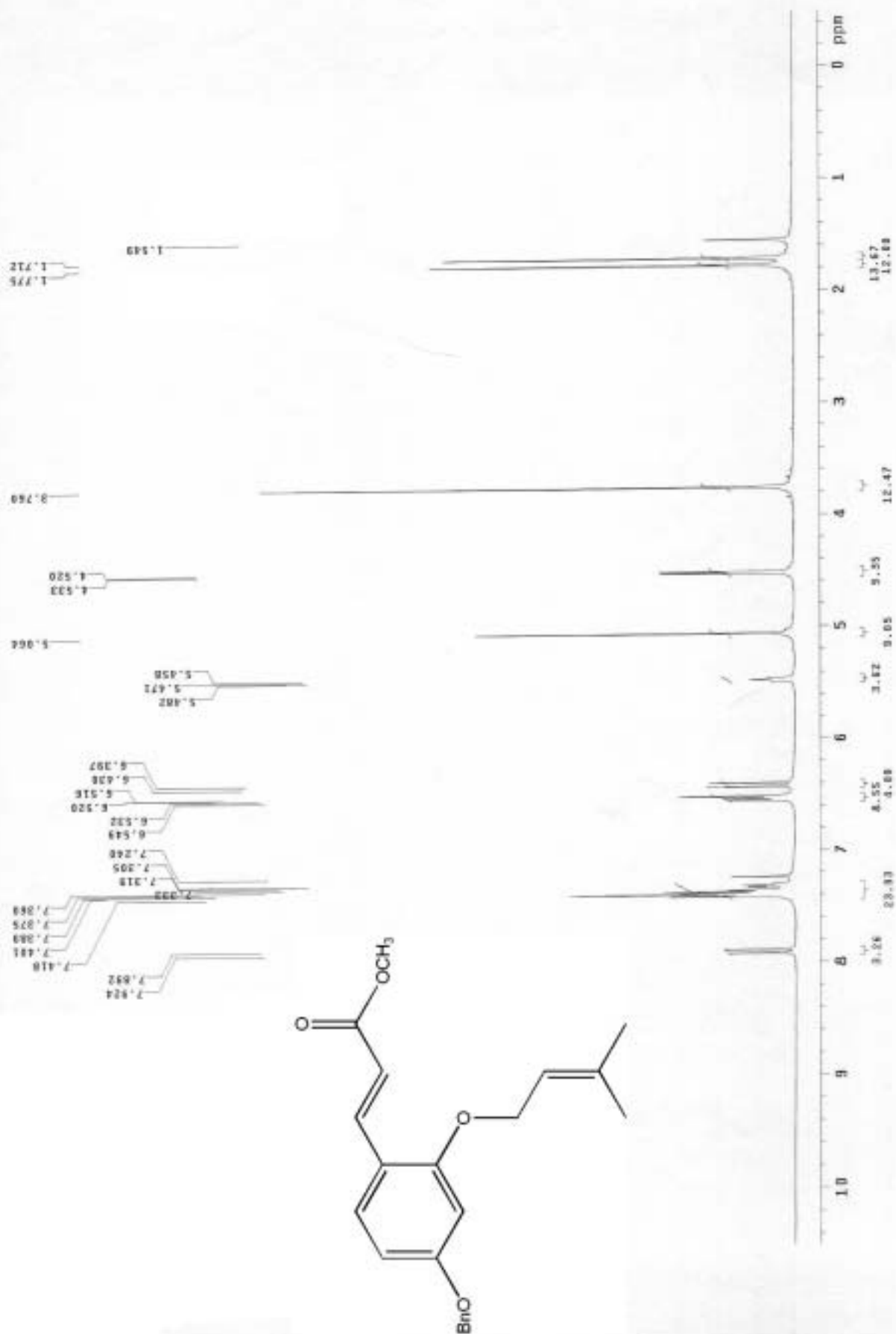


圖 37 化合物(14)之¹H NMR光譜圖

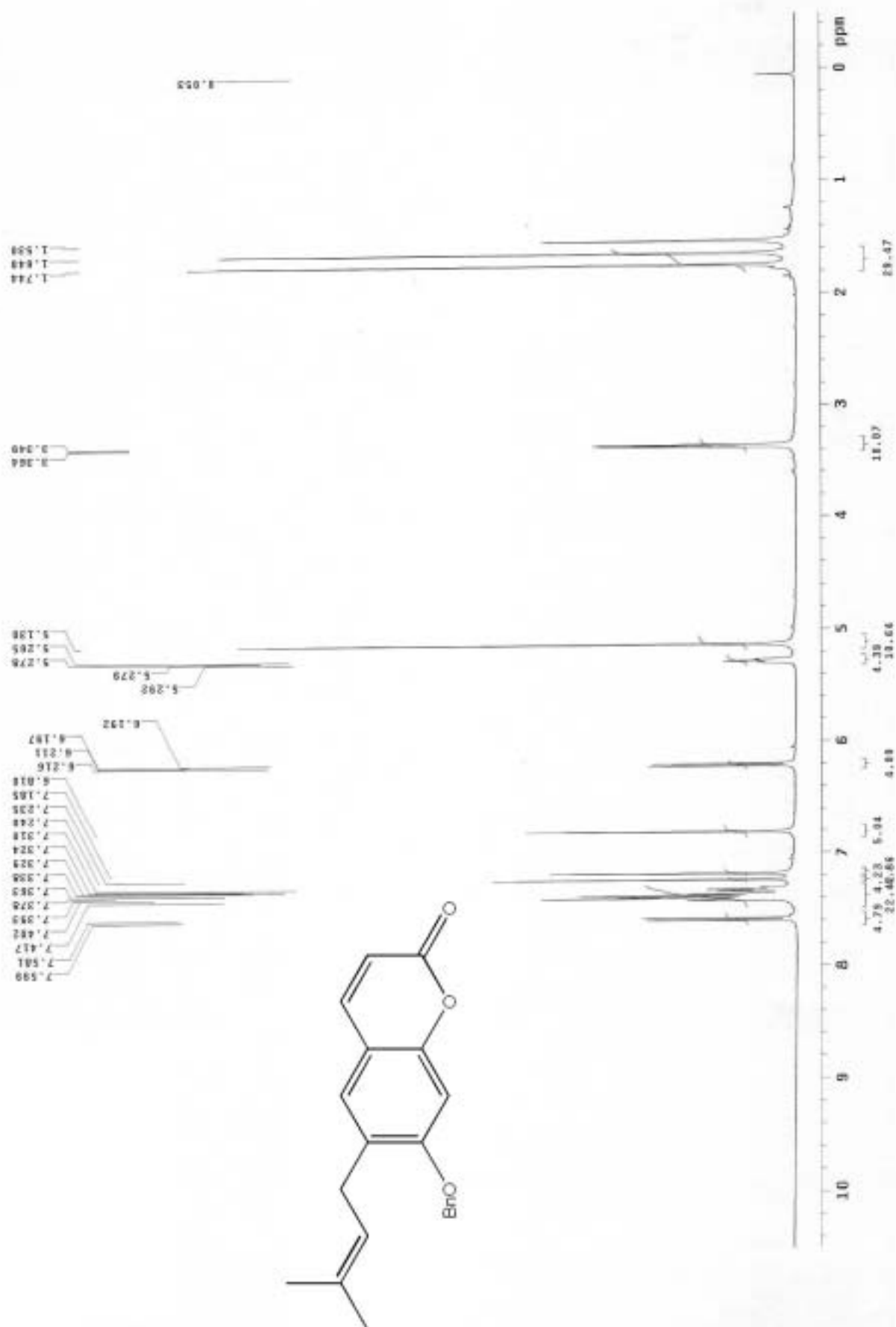


圖 38 化合物(15)之¹H NMR光譜圖

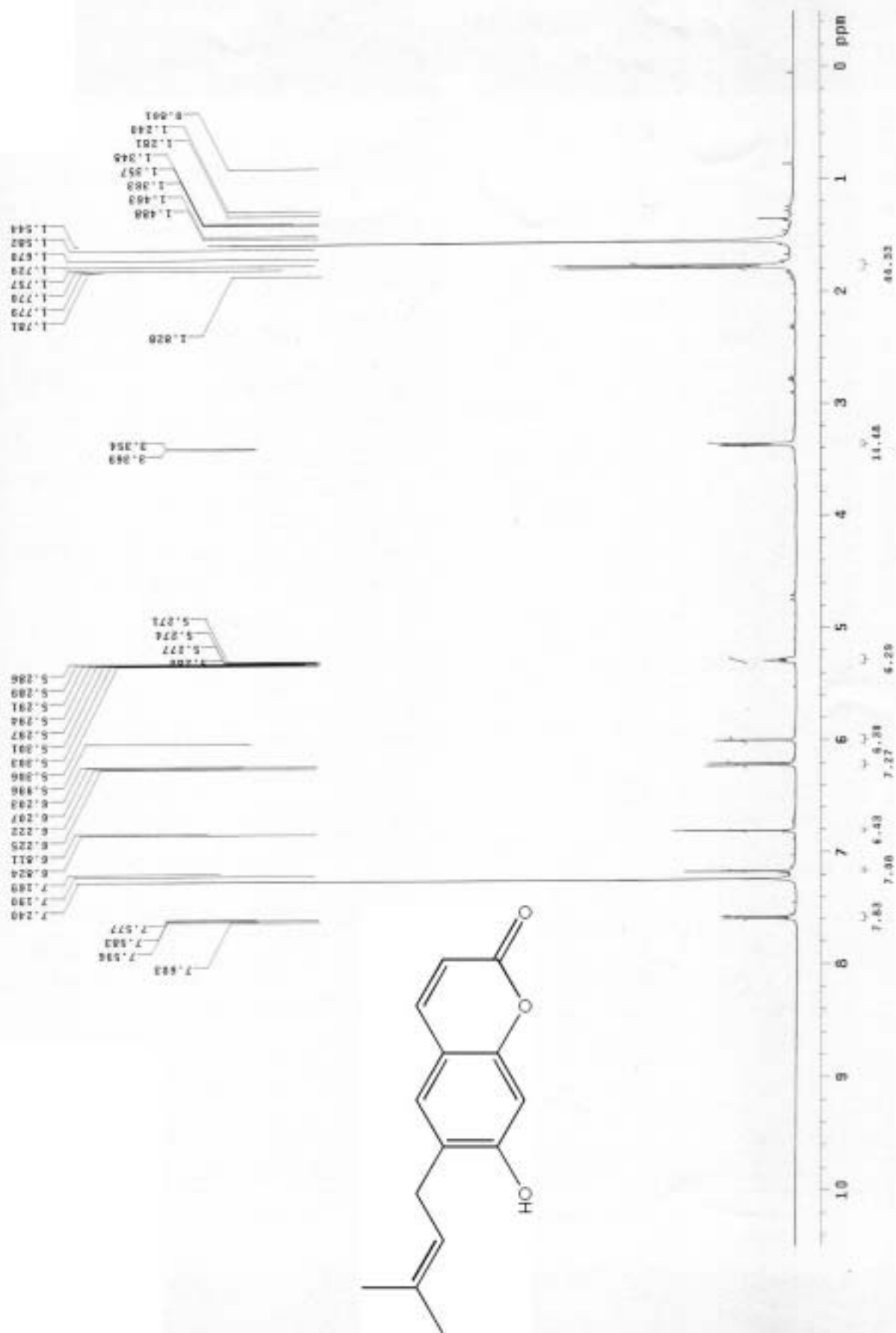


圖 39 化合物(16)之¹H NMR光譜圖

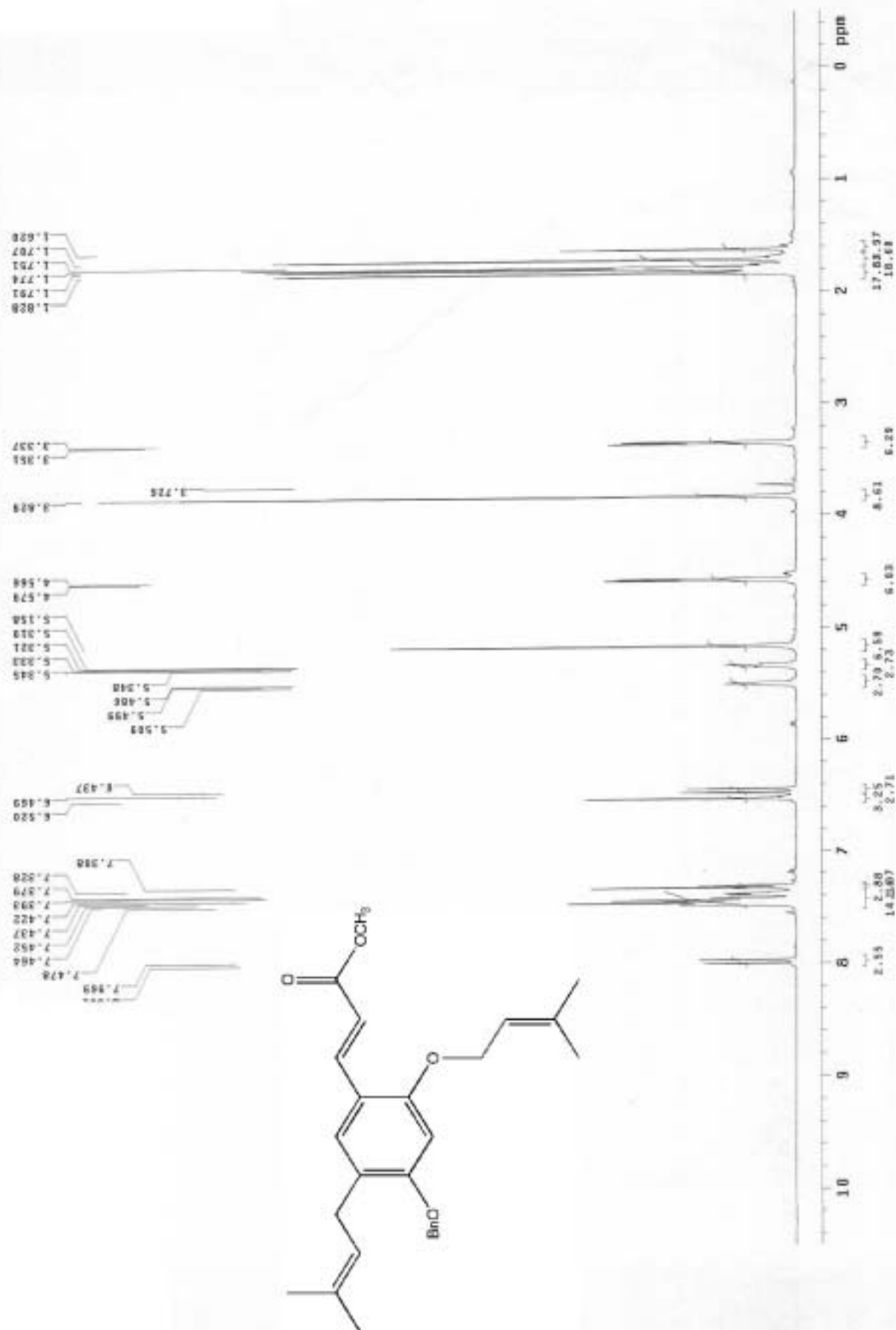


圖 40 化合物(18)之¹H NMR光譜圖

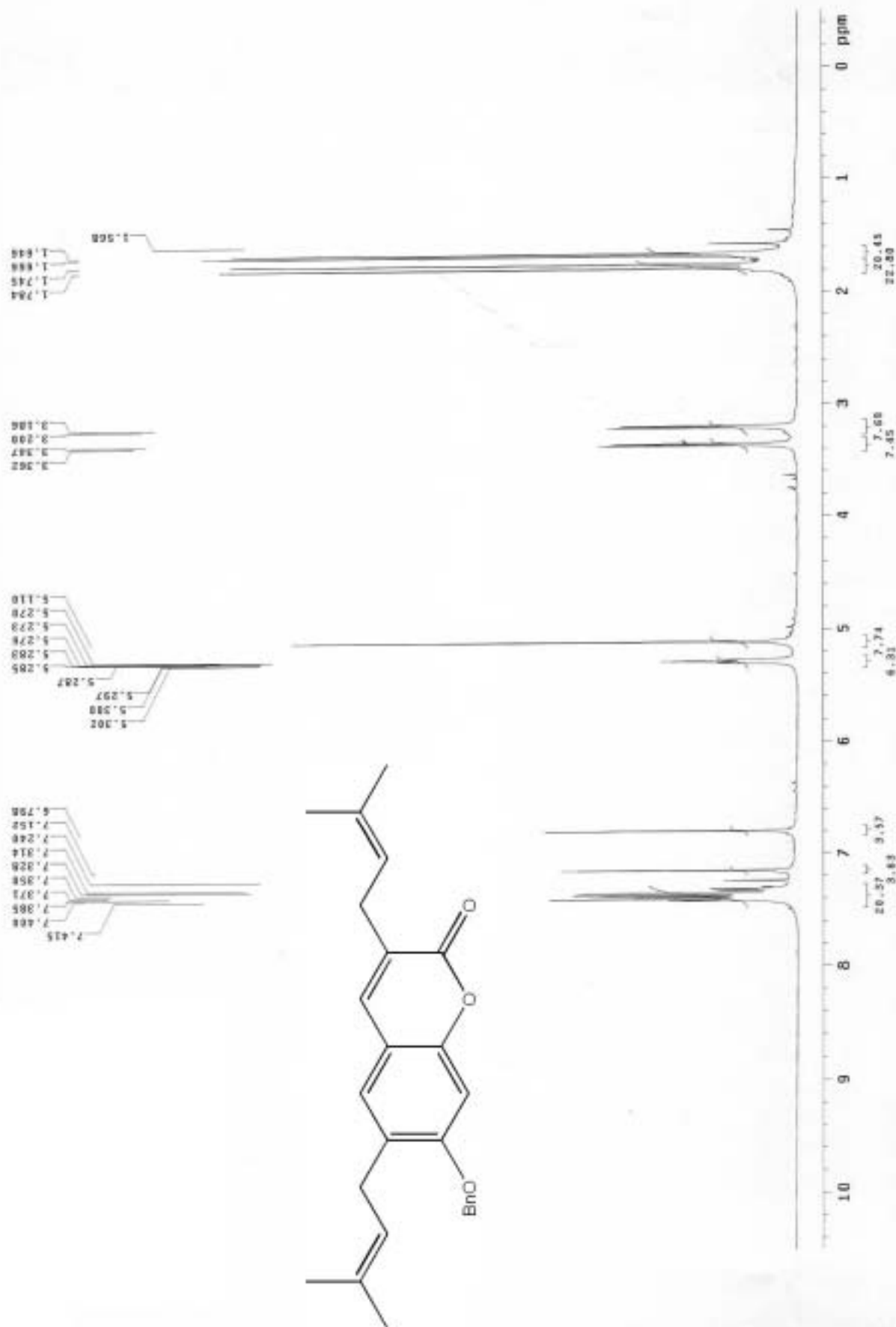


圖 41 化合物(19)之¹H NMR光譜圖

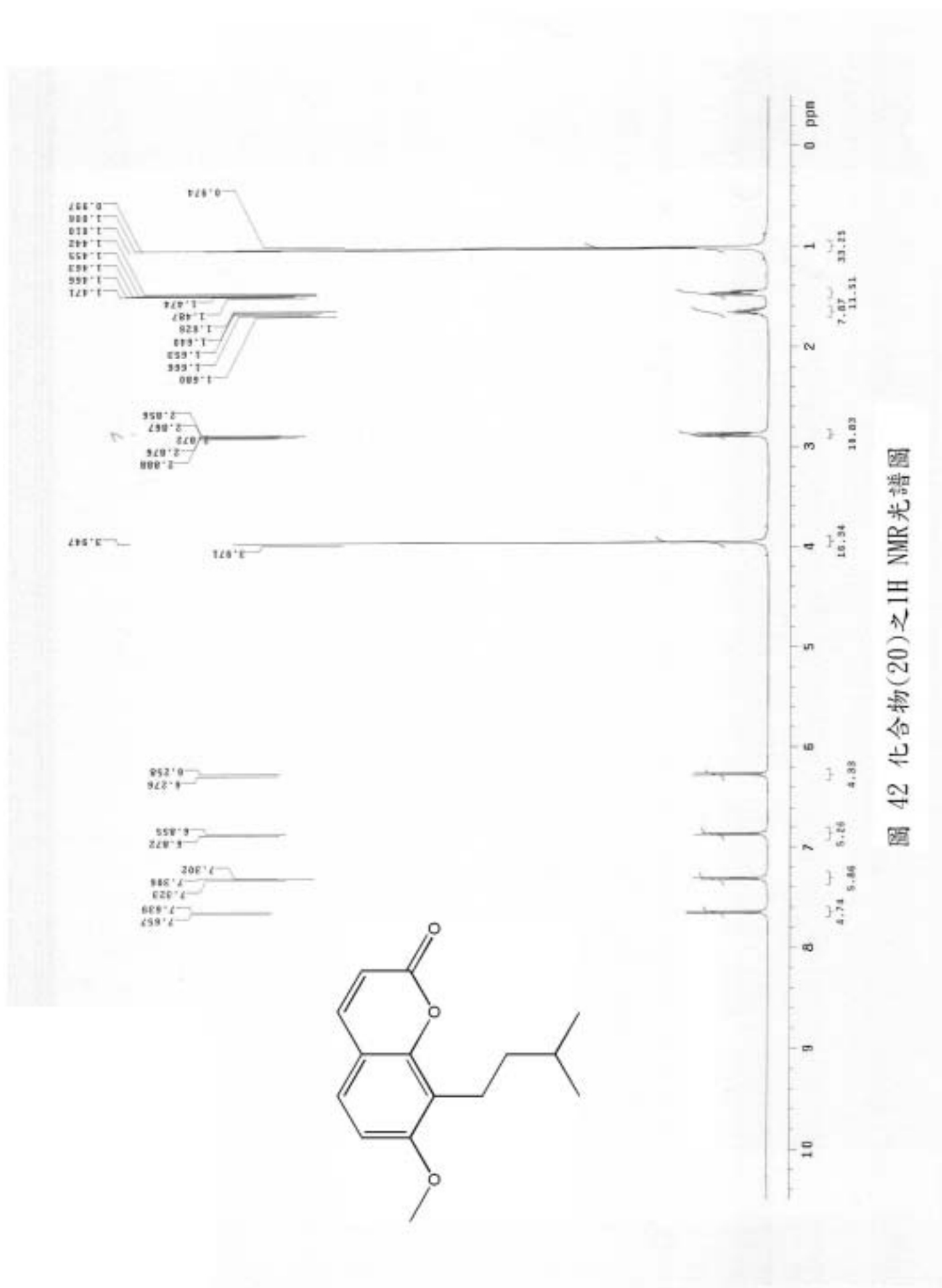


圖 42 化合物(20)之¹H NMR光譜圖

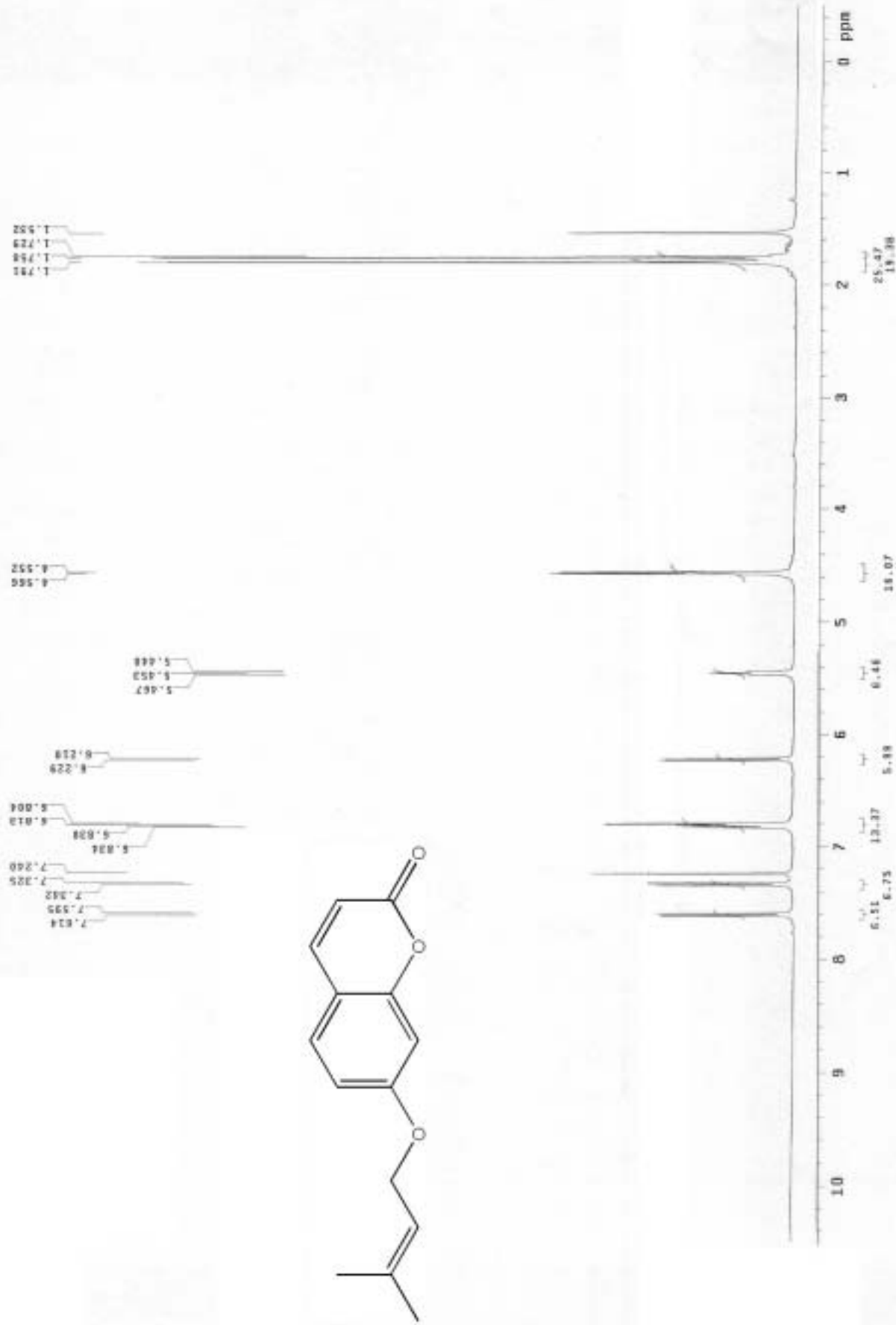


圖 43 化合物(21)之¹H NMR光譜圖

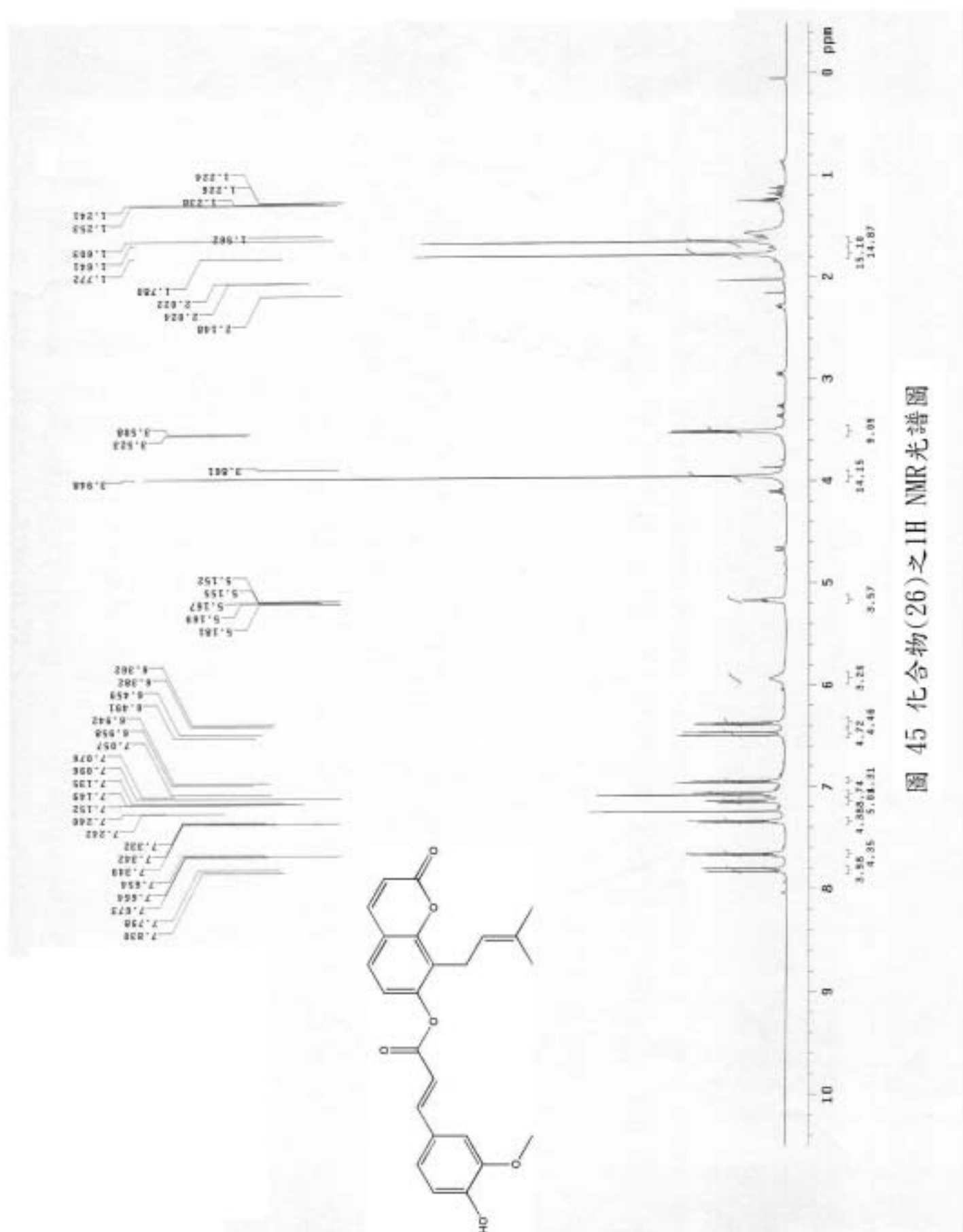


圖 45 化合物(26)之¹H NMR光譜圖

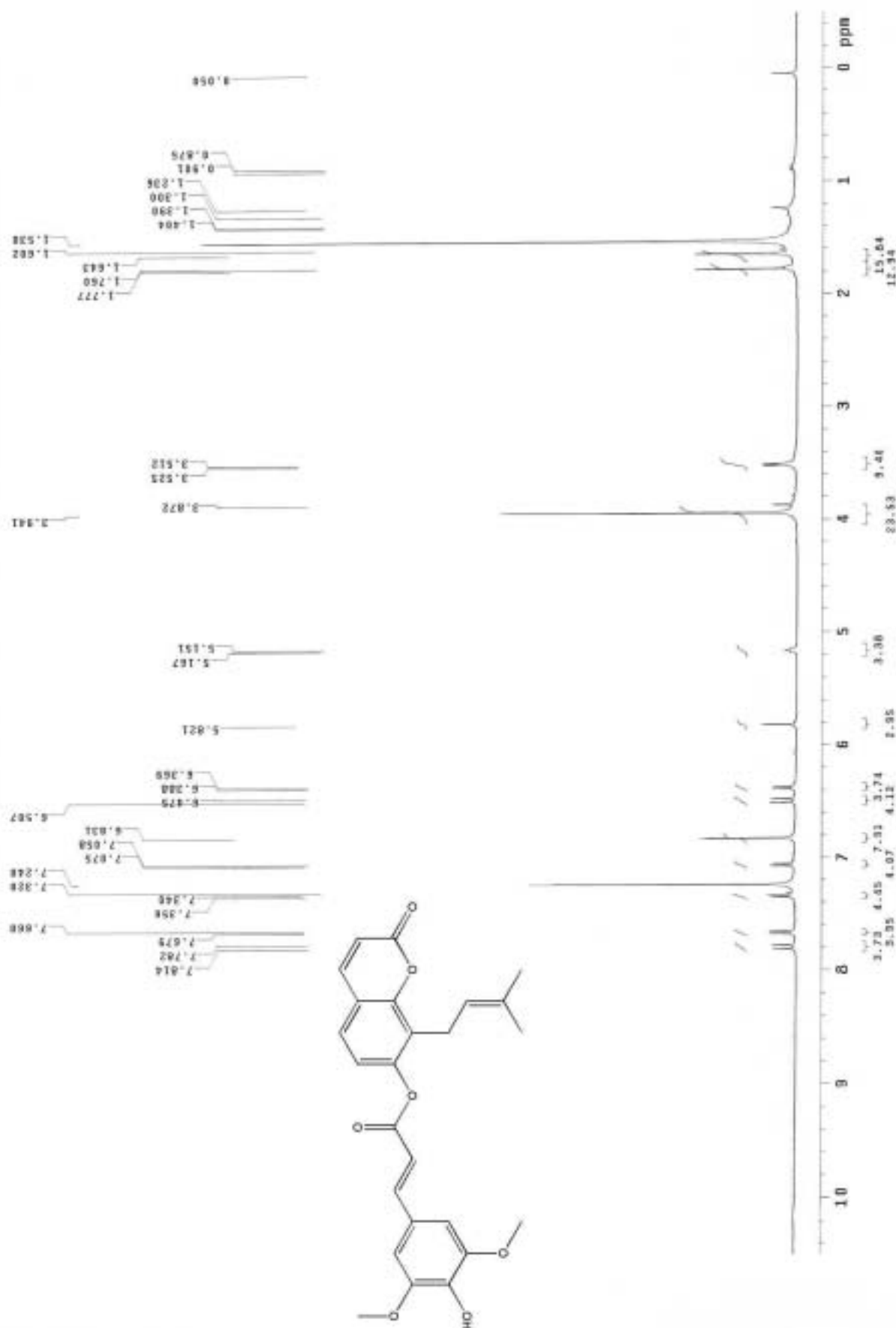


圖 46 化合物(27)之¹H NMR光譜圖

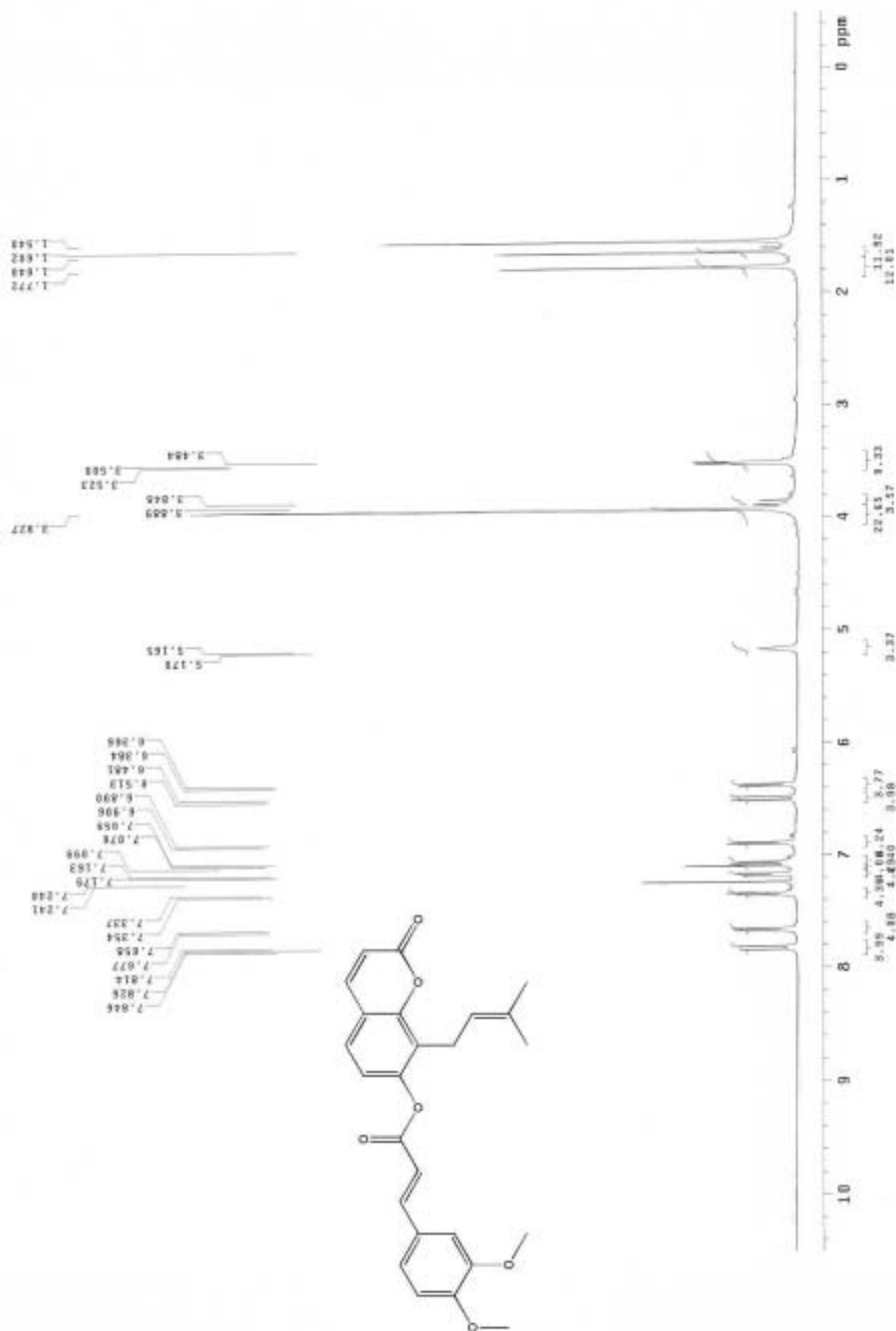


圖 47 化合物(28)之¹H NMR光譜圖

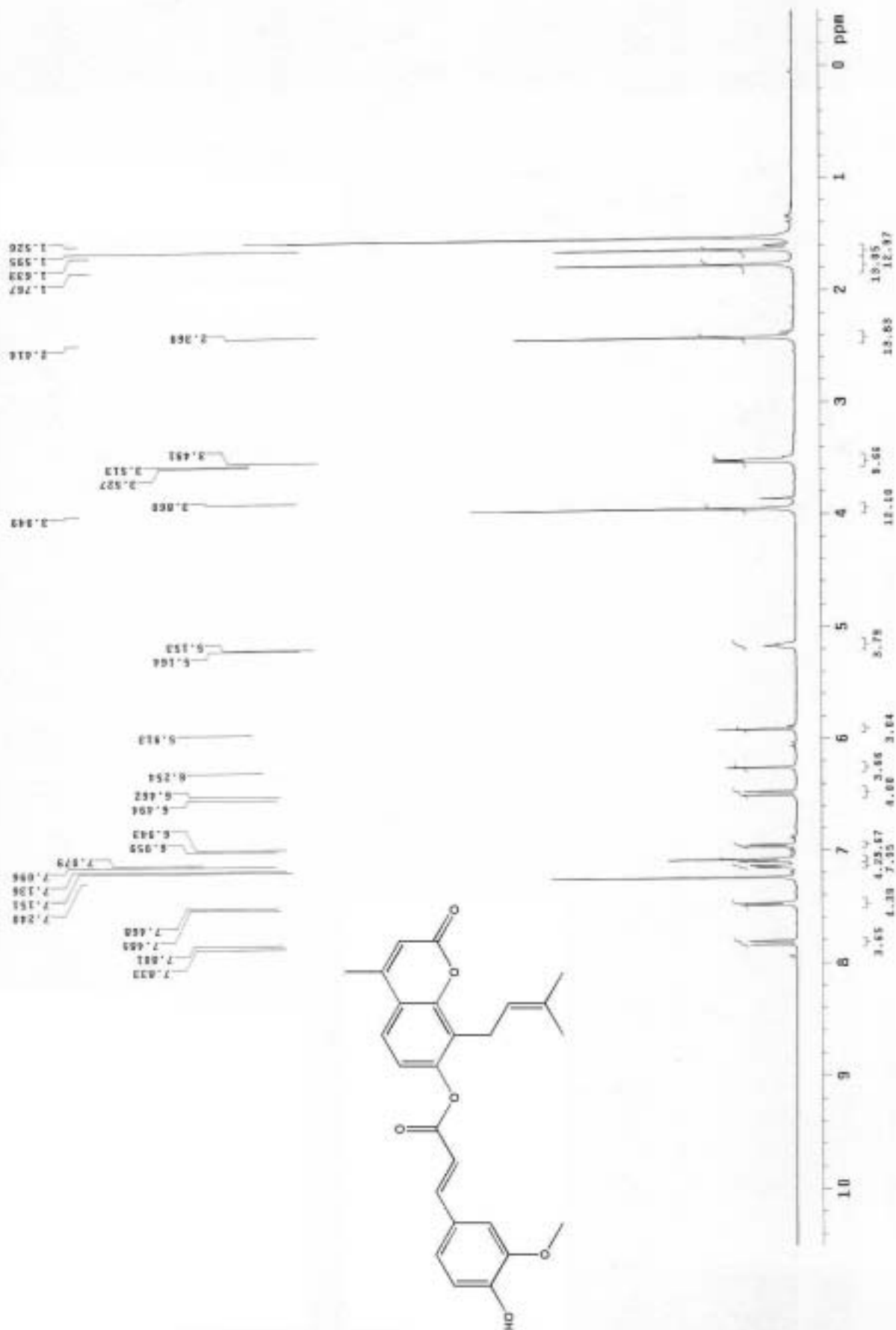


圖 48 化合物(29)之 ^1H NMR光譜圖

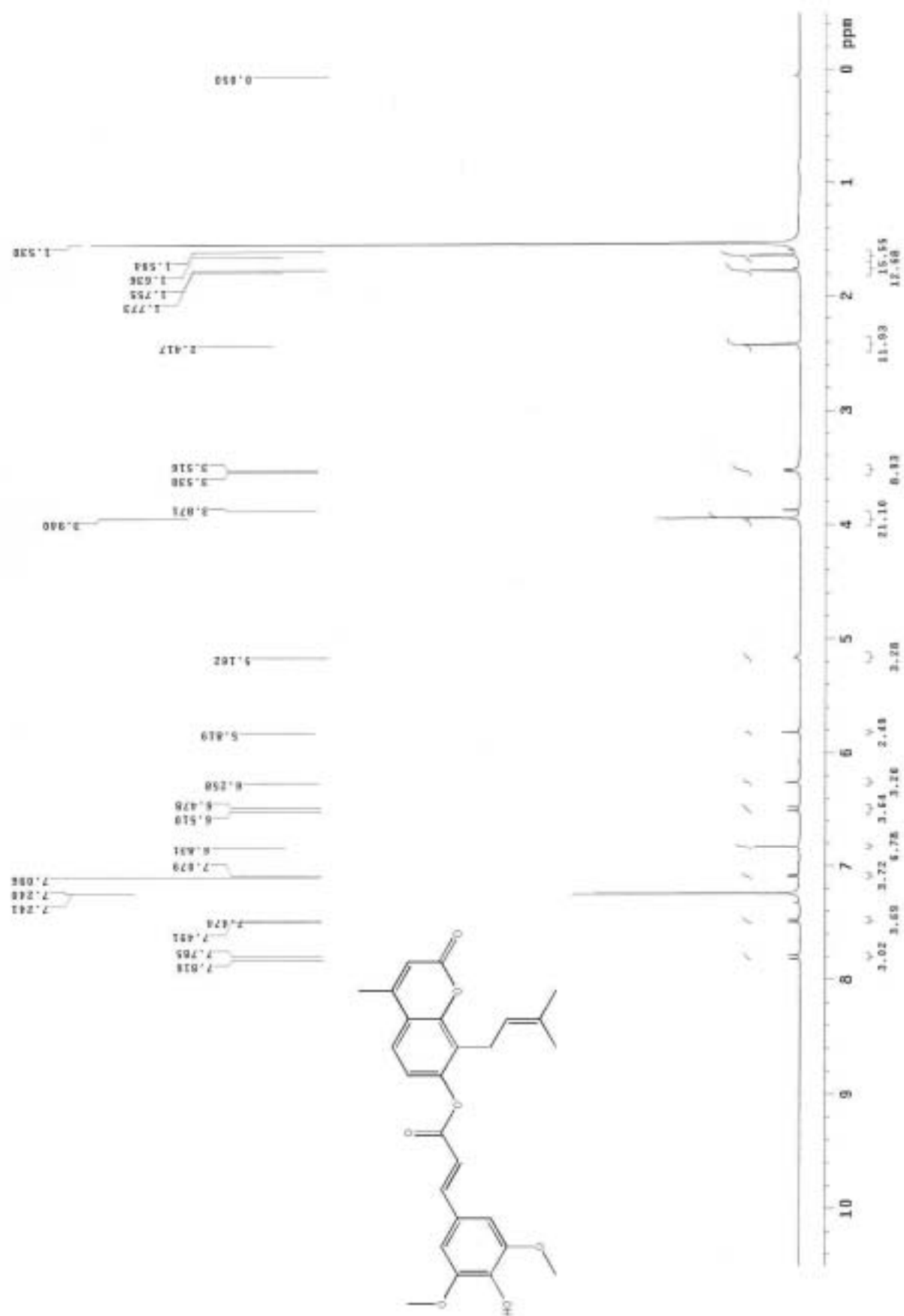


圖 49 化合物(30)之¹H NMR光譜圖

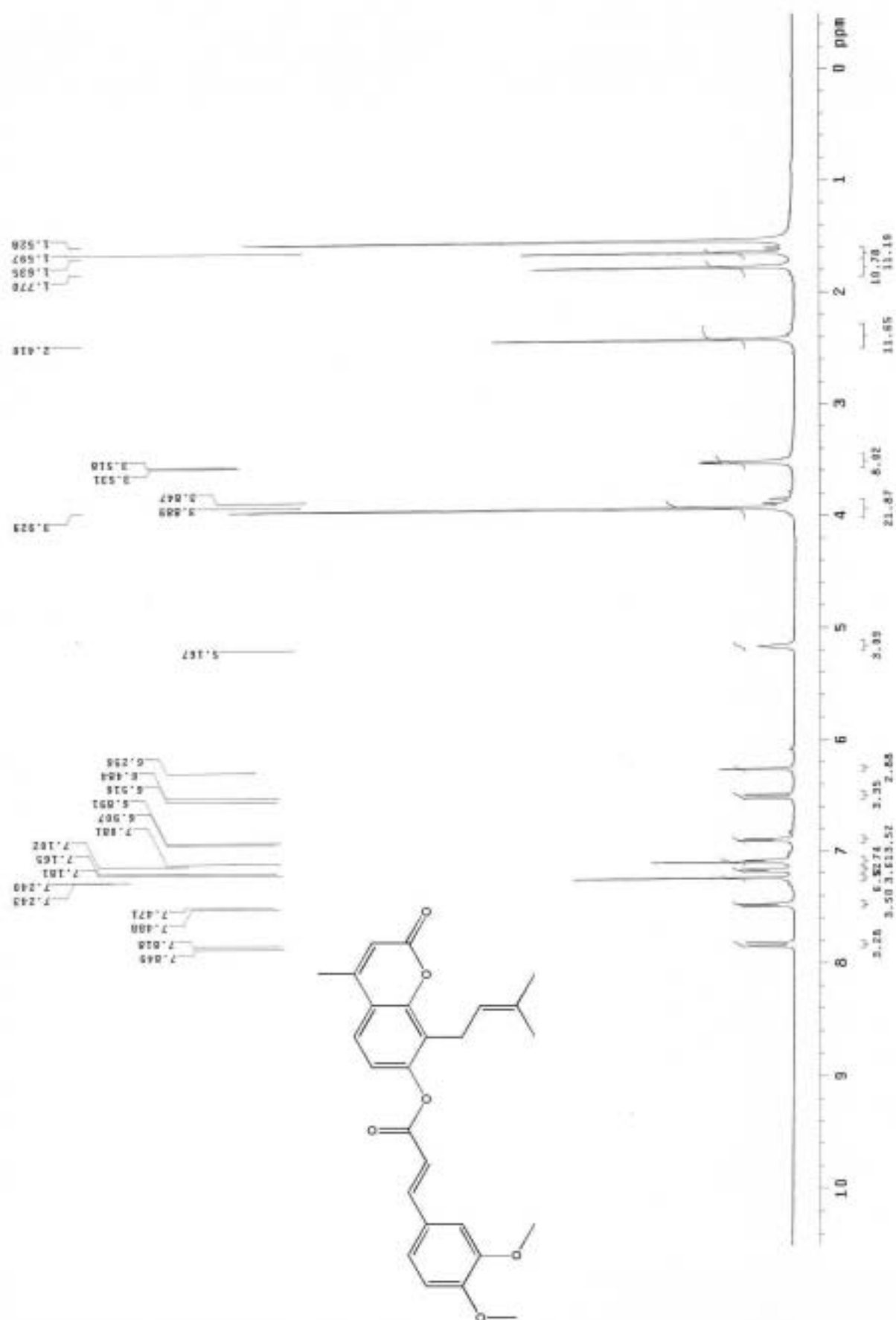


圖 50 化合物(31)之¹H NMR光譜圖

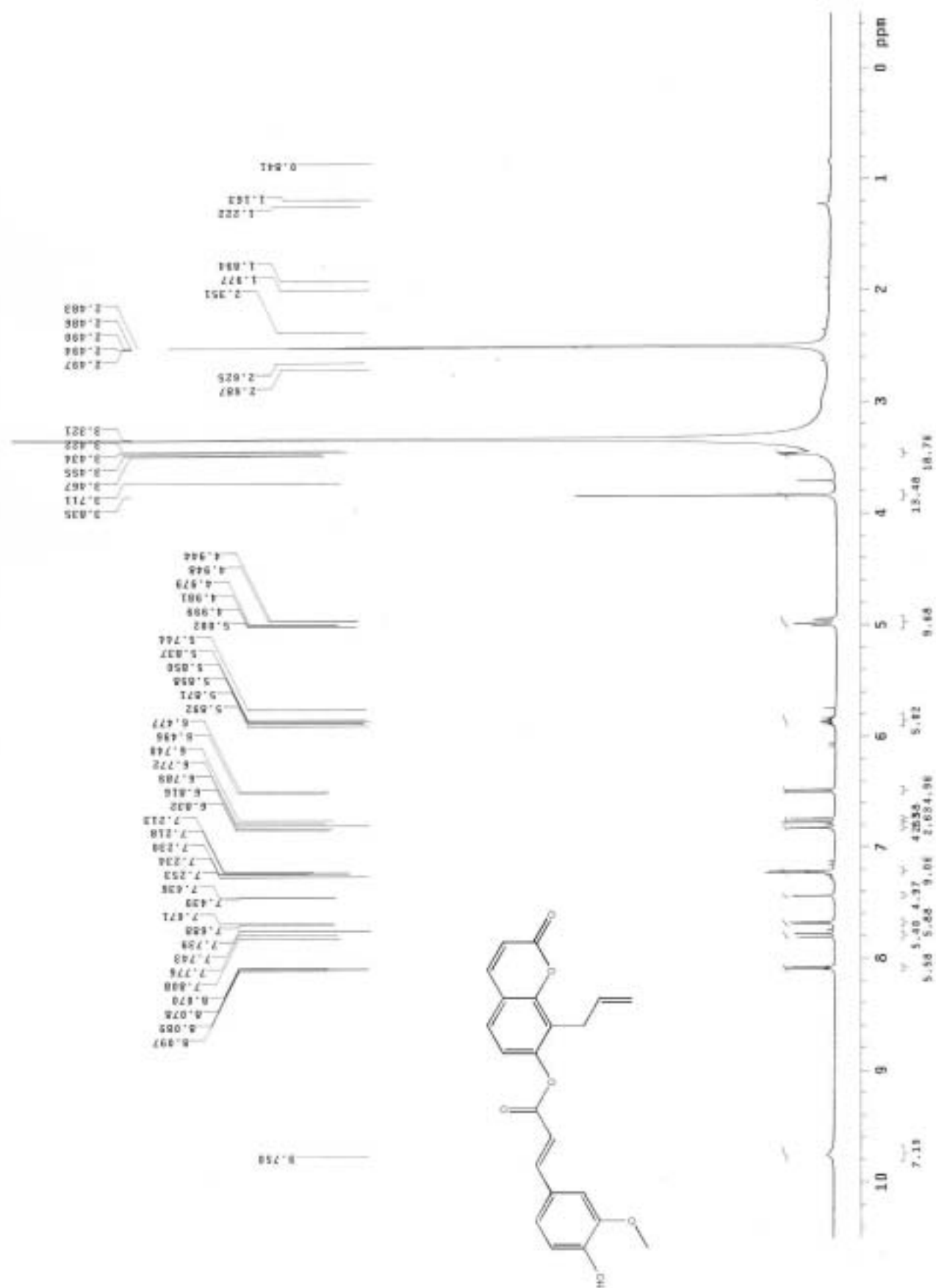


圖 51 化合物(32)之¹H NMR光譜圖

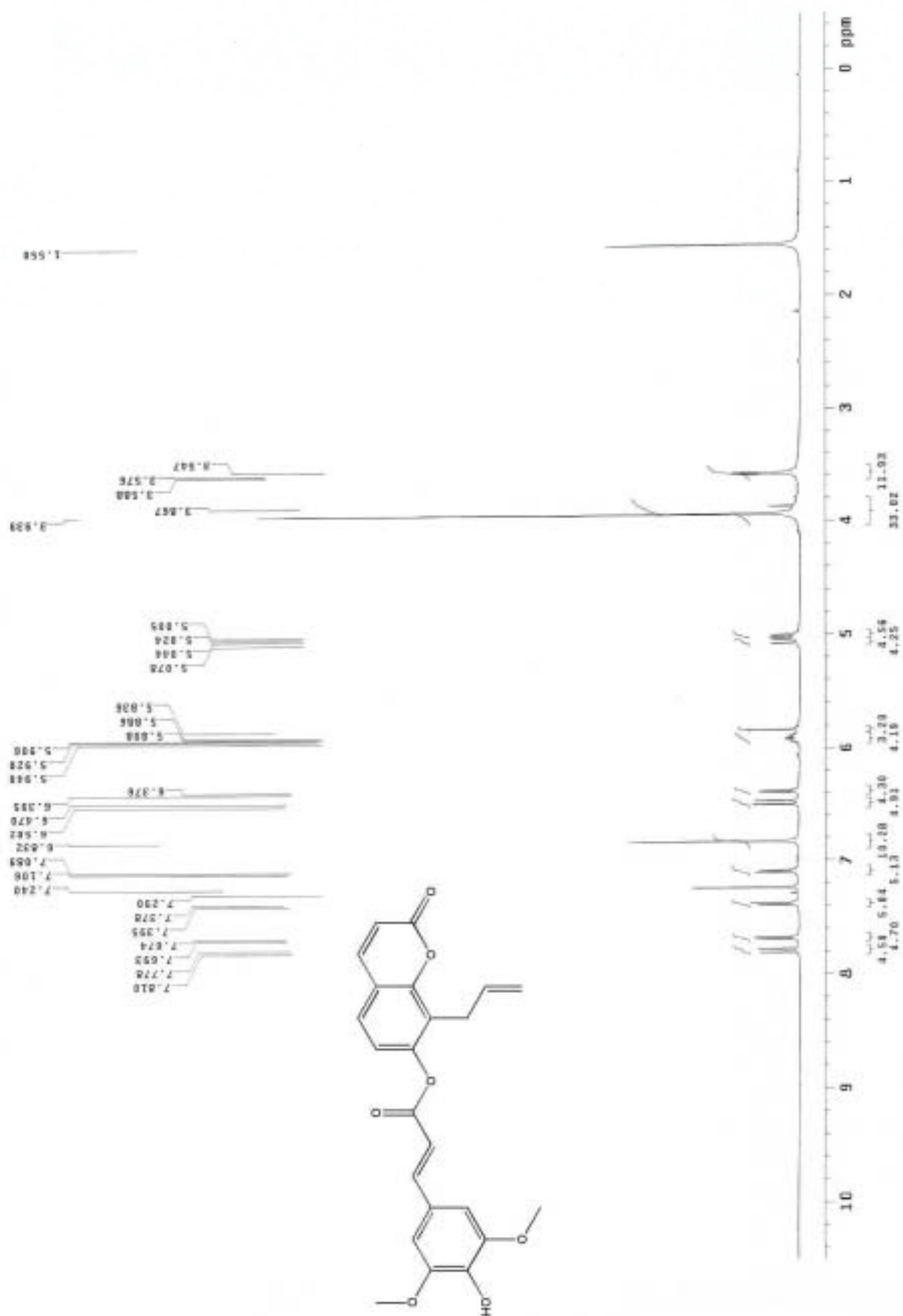


圖 52 化合物(33)之 ^1H NMR光譜圖

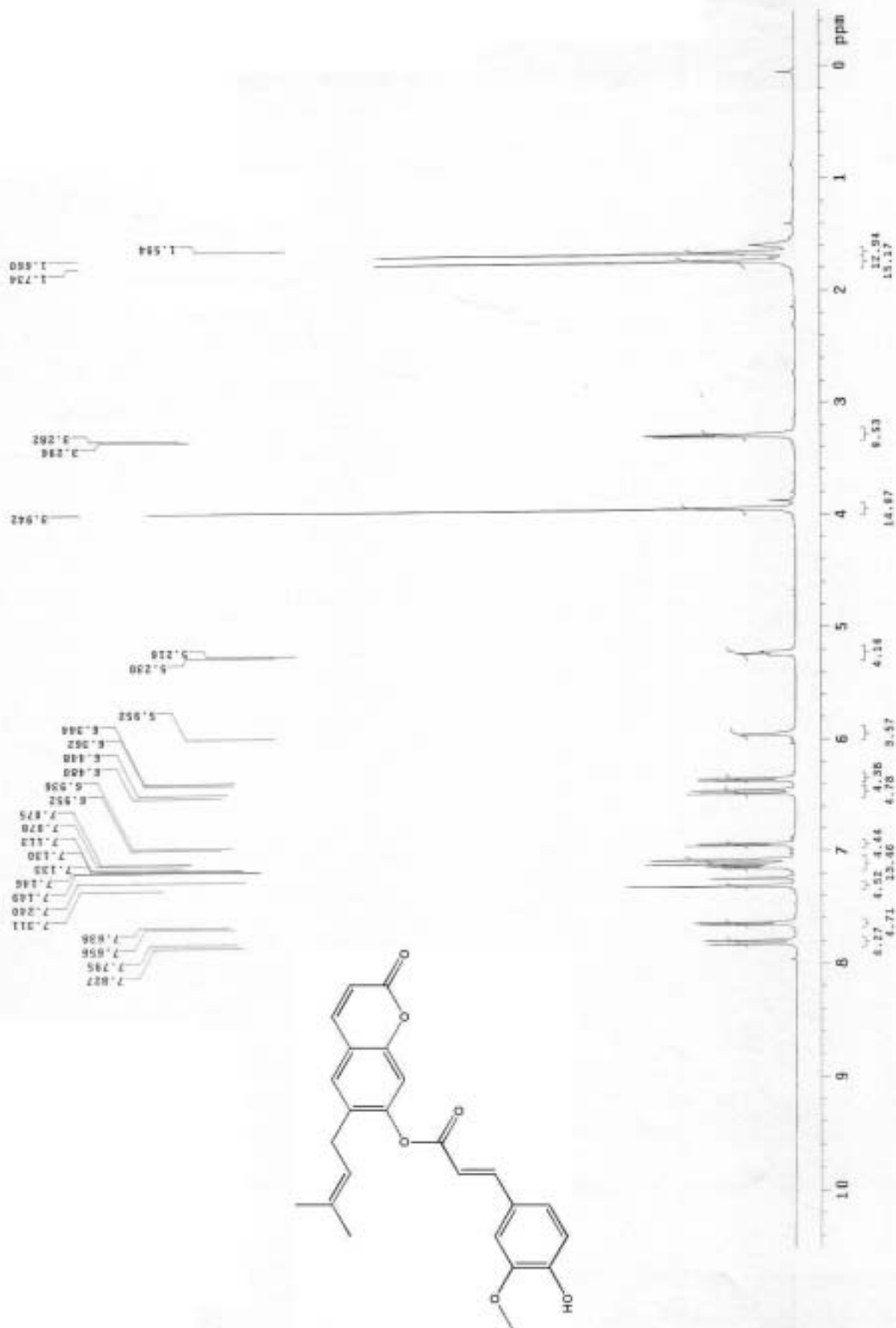


圖 54 化合物(35)之¹H NMR光譜圖

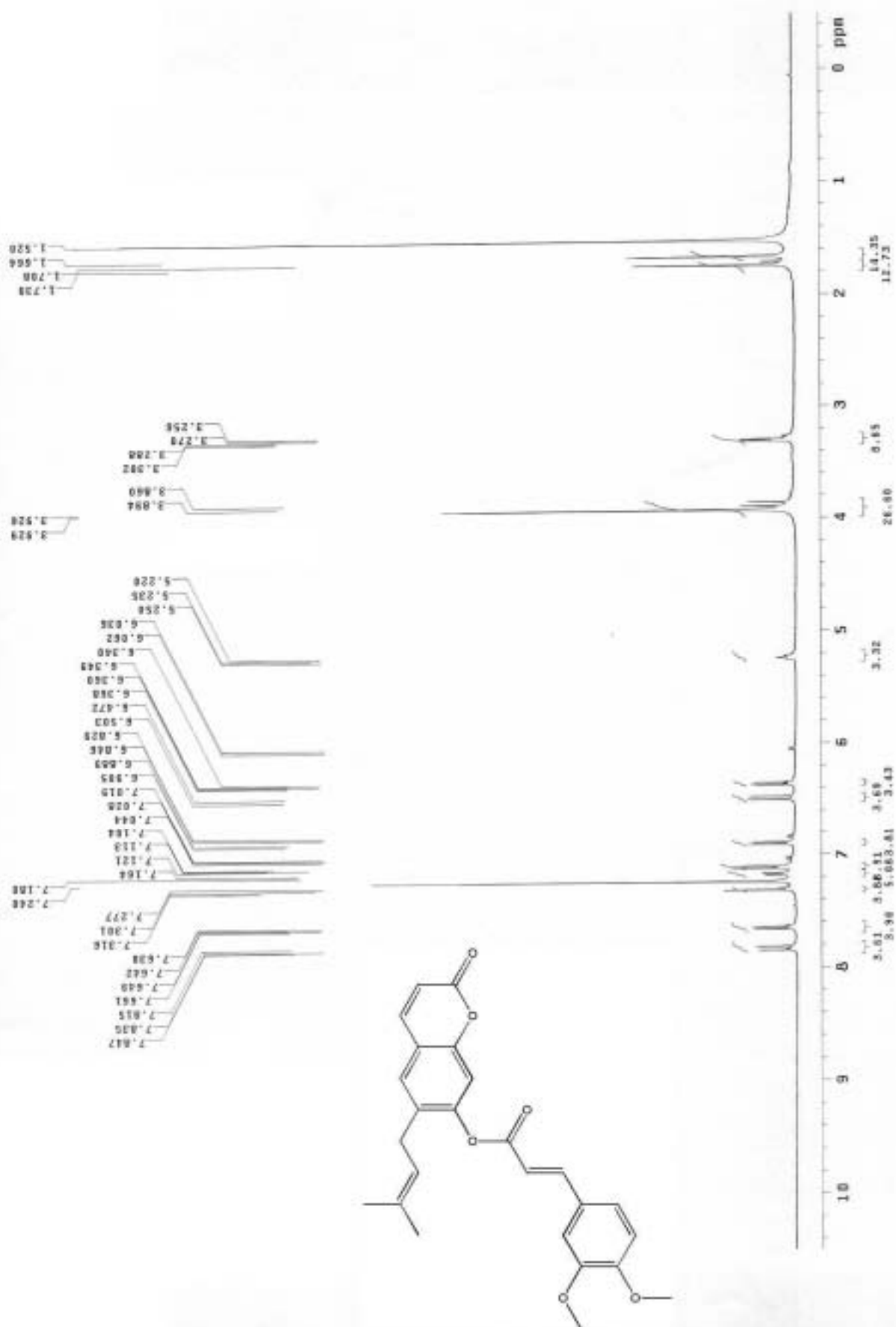


圖 55 化合物(37)之¹H NMR光譜圖

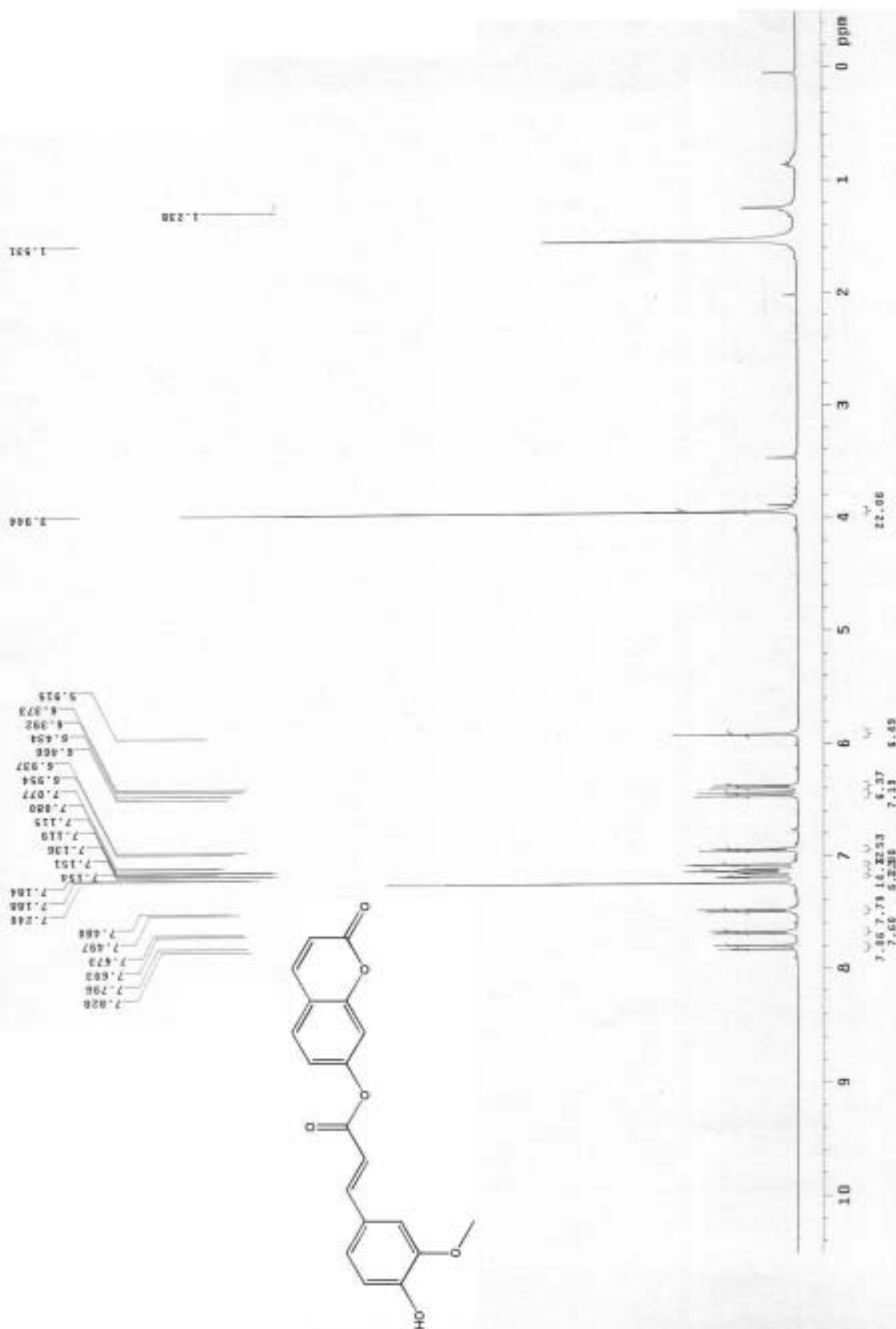
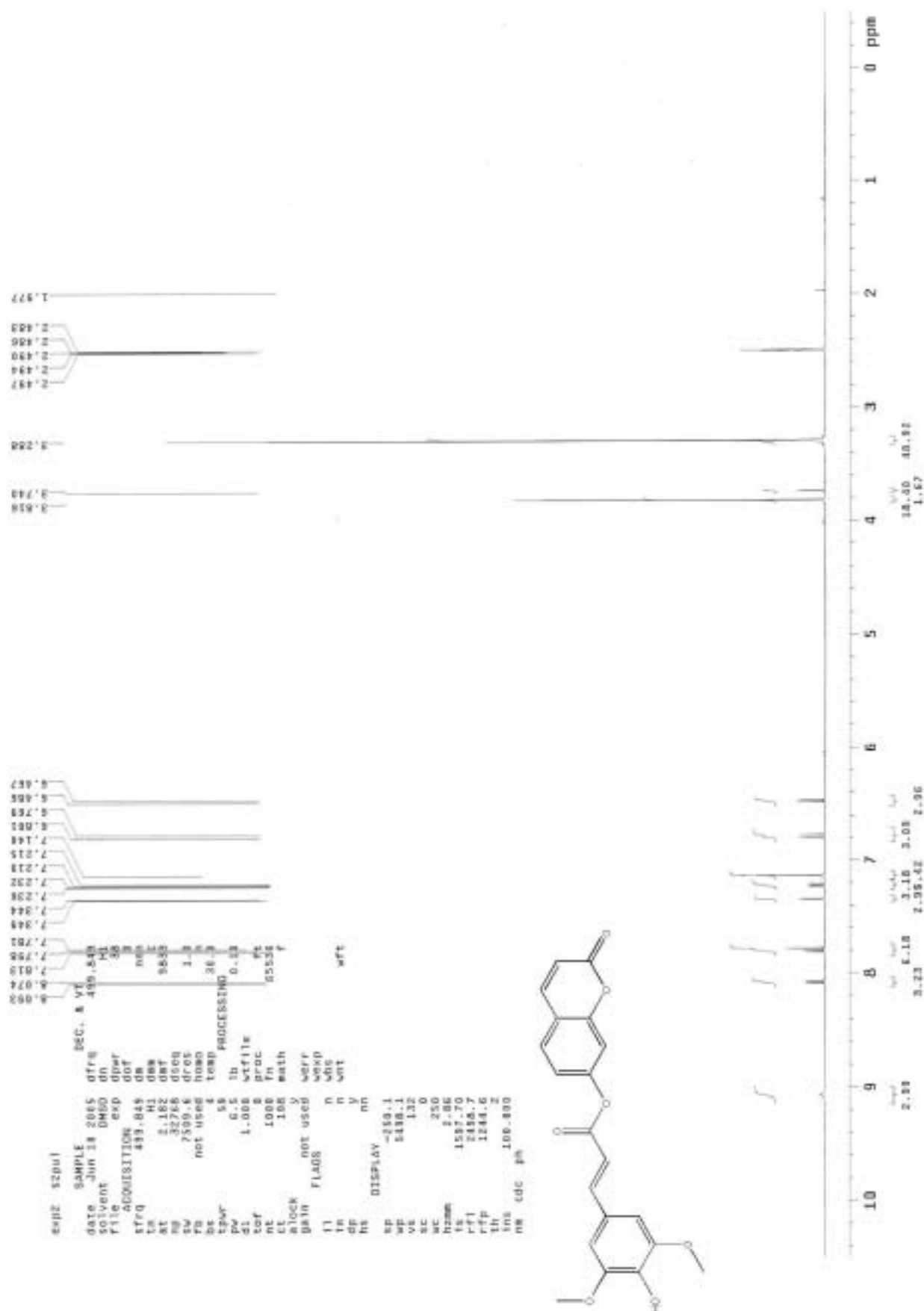


圖 56 化合物(38)之¹H NMR光譜圖



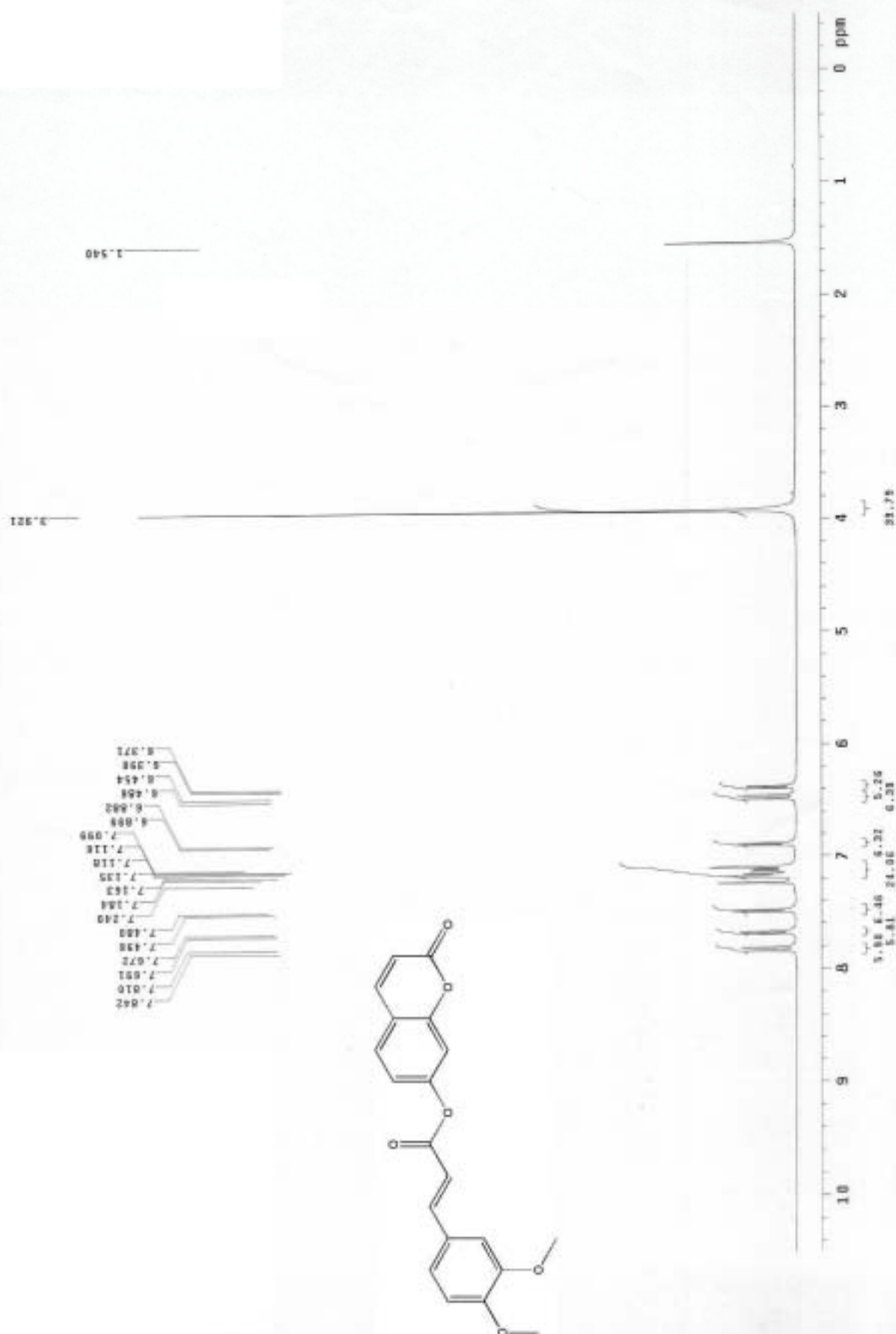


圖 58 化合物(40)之¹H NMR光譜圖

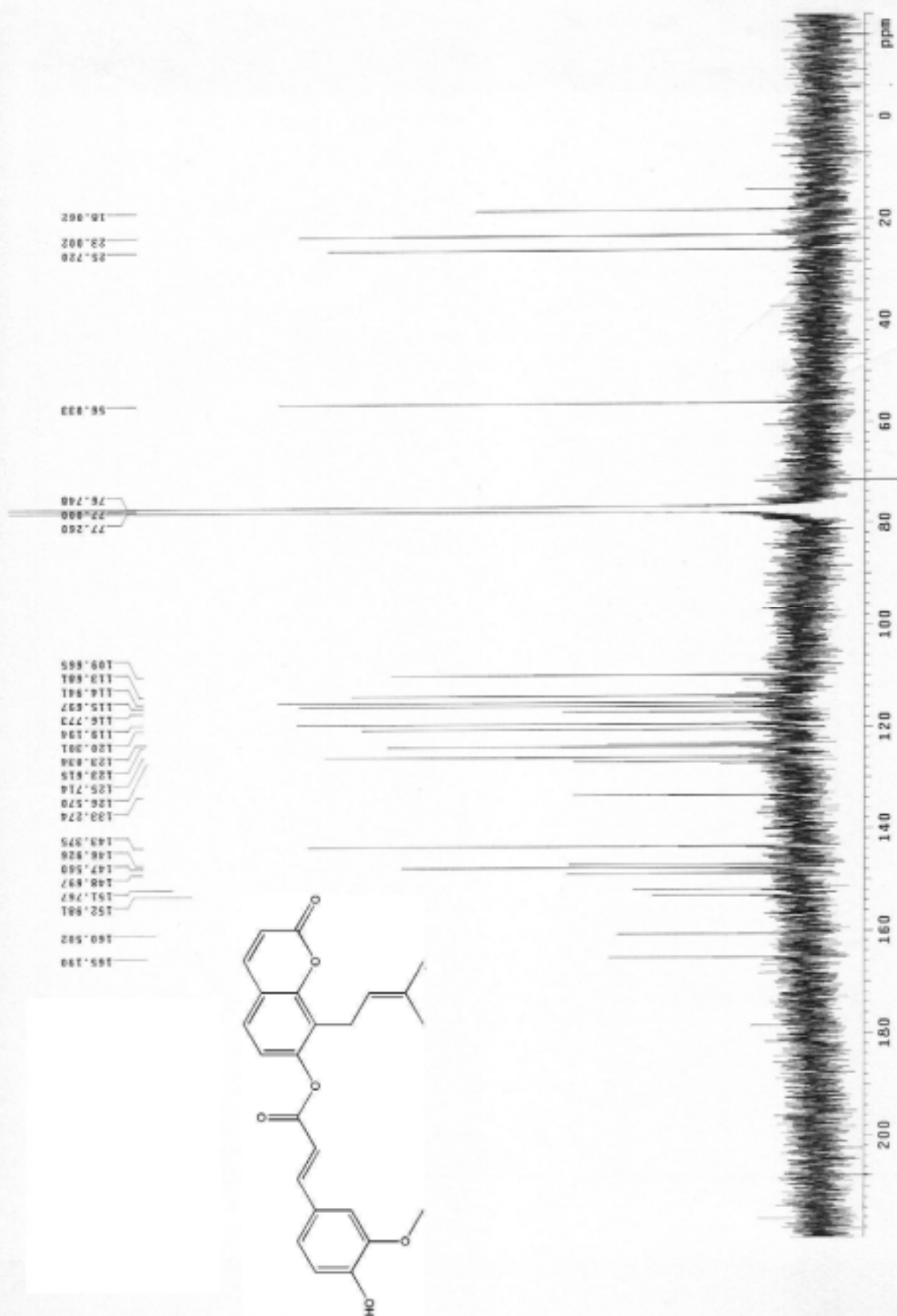


圖 59 化合物(26)之¹³C NMR光譜圖

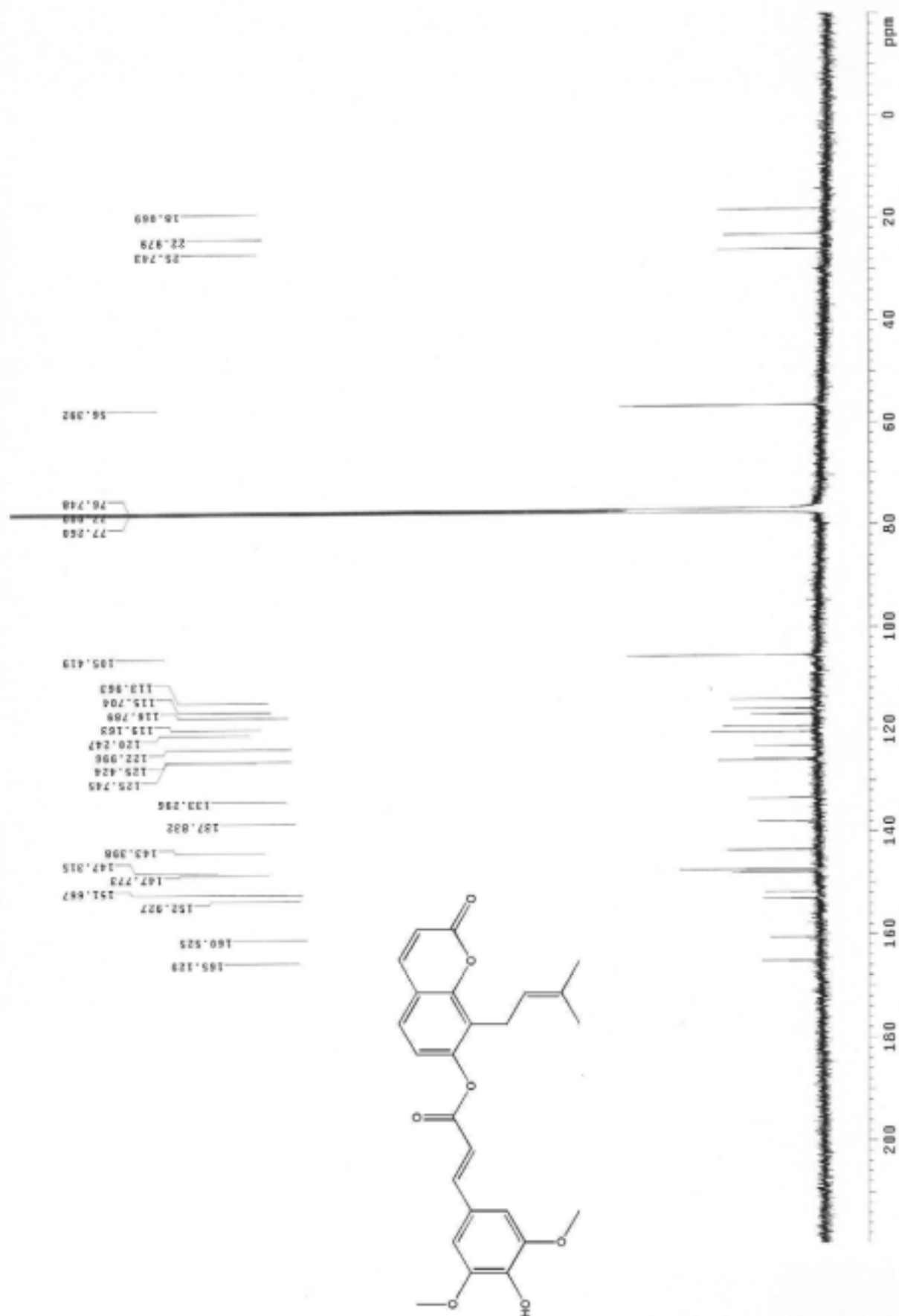


圖 60 化合物(27)之 ^{13}C NMR光譜圖

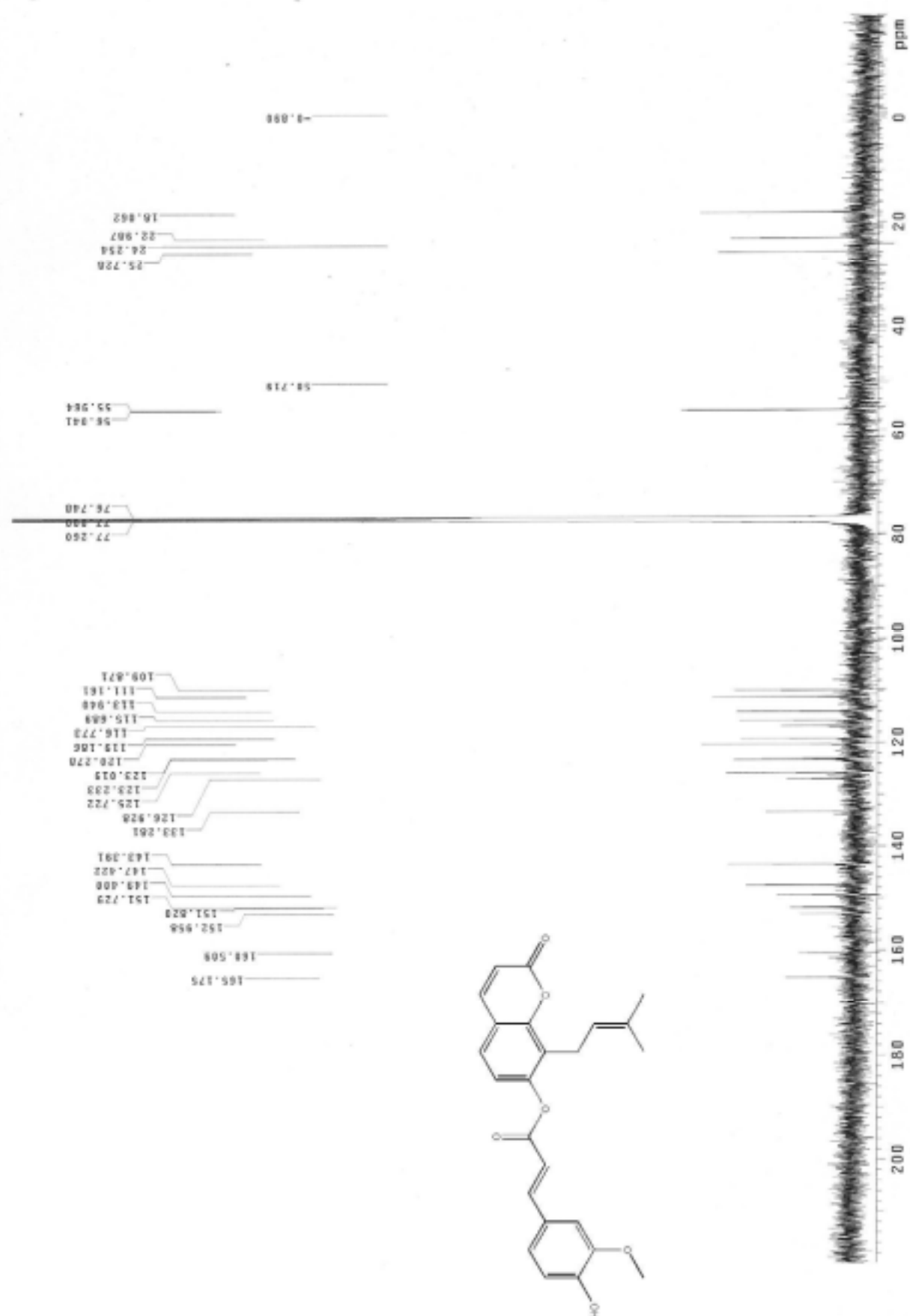


圖 61 化合物(28)之 ^{13}C NMR光譜圖

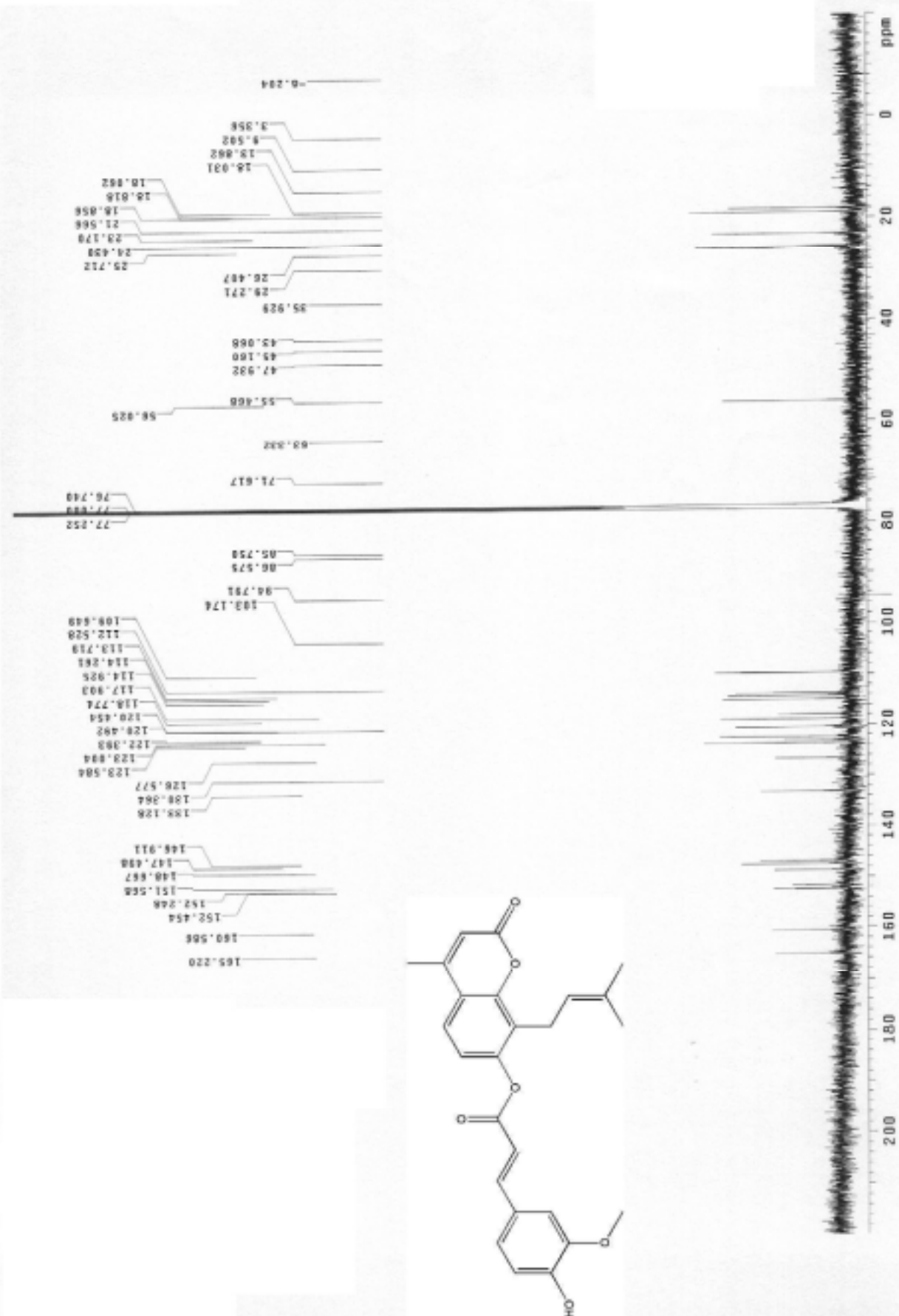


圖 62 化合物(29)之 ^{13}C NMR光譜圖

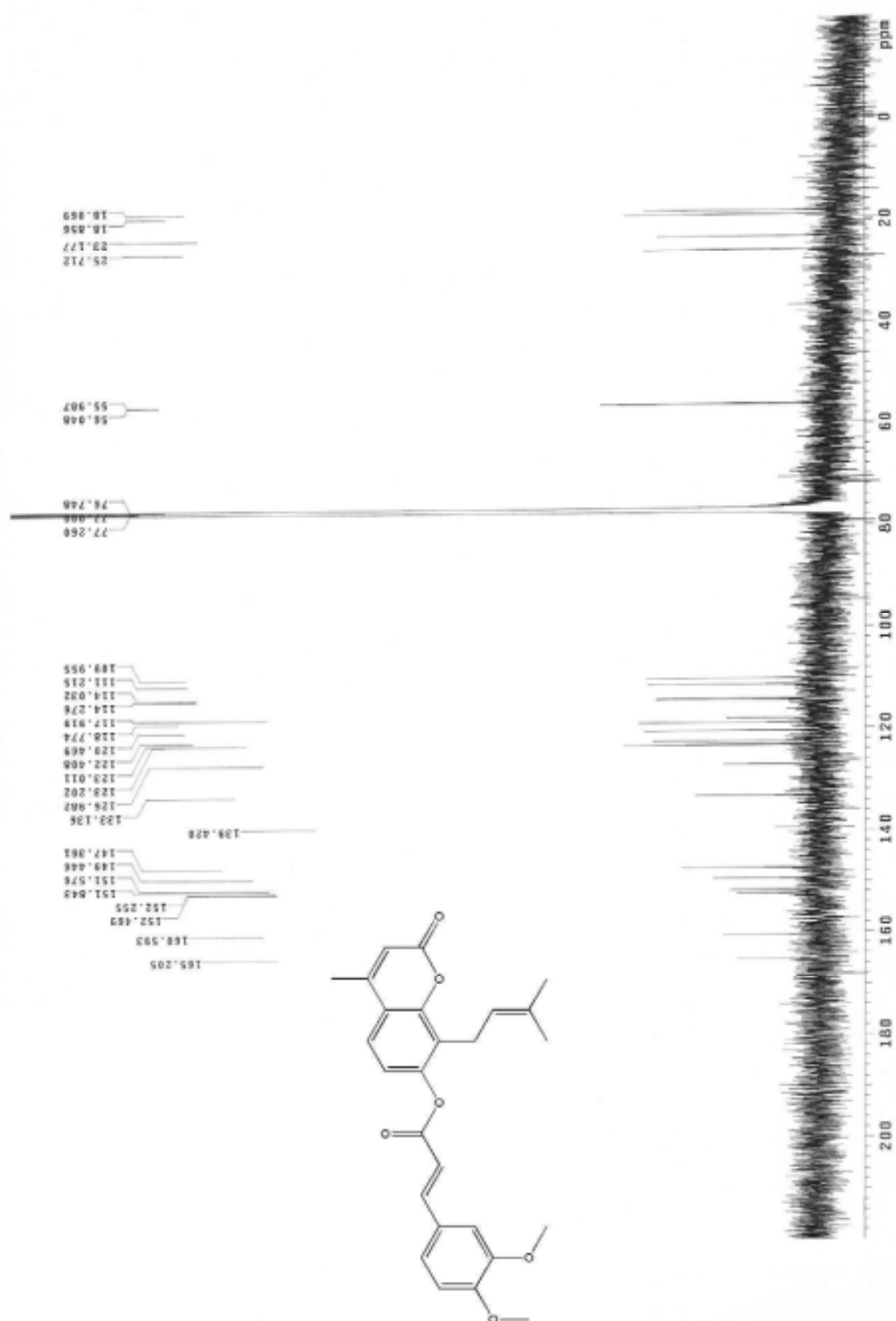


圖 63 化合物(31)之¹³C NMR光譜圖

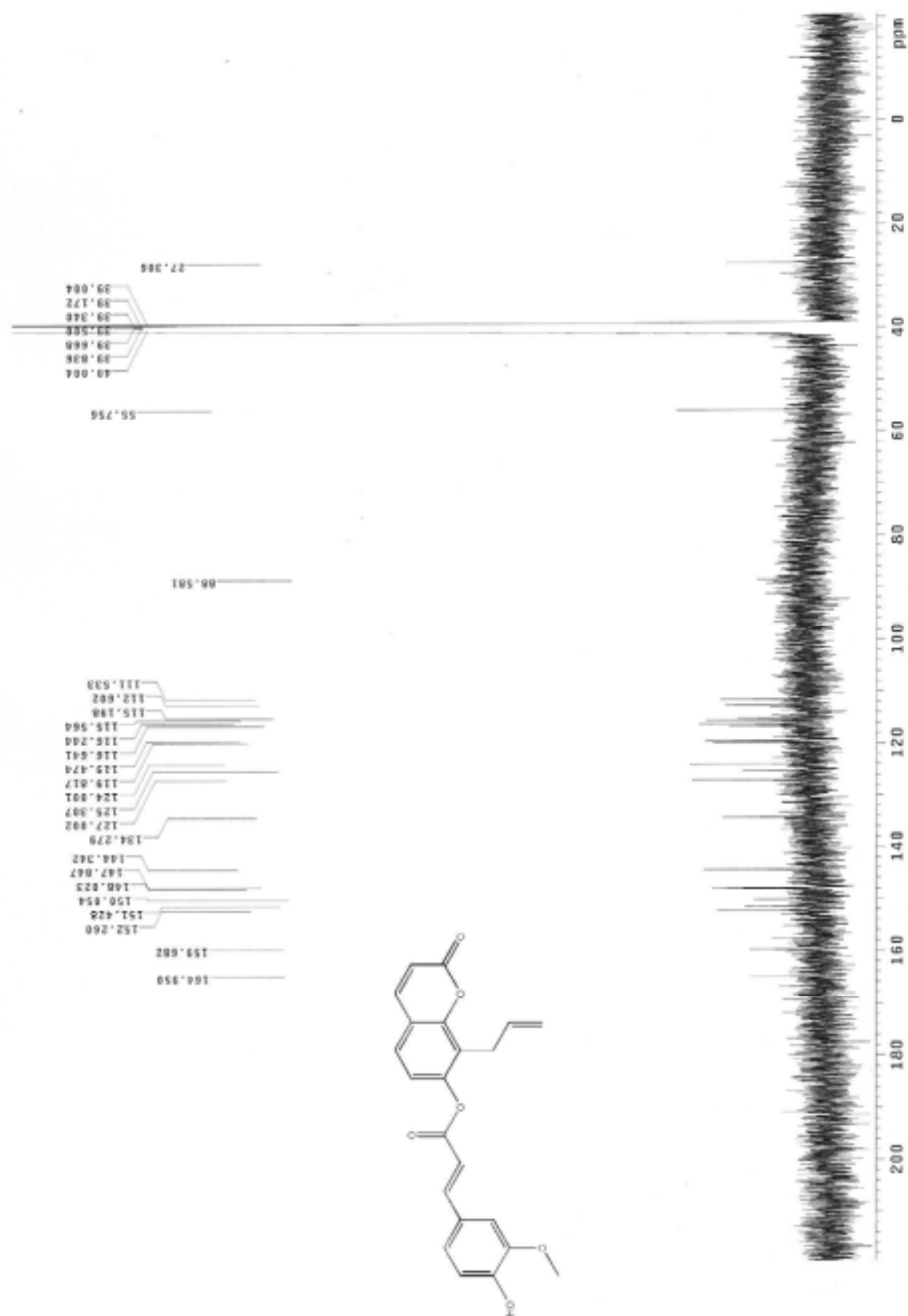


圖 64 化合物(32)之 ^{13}C NMR光譜圖



圖 65 化合物(35)之¹³C NMR光譜圖

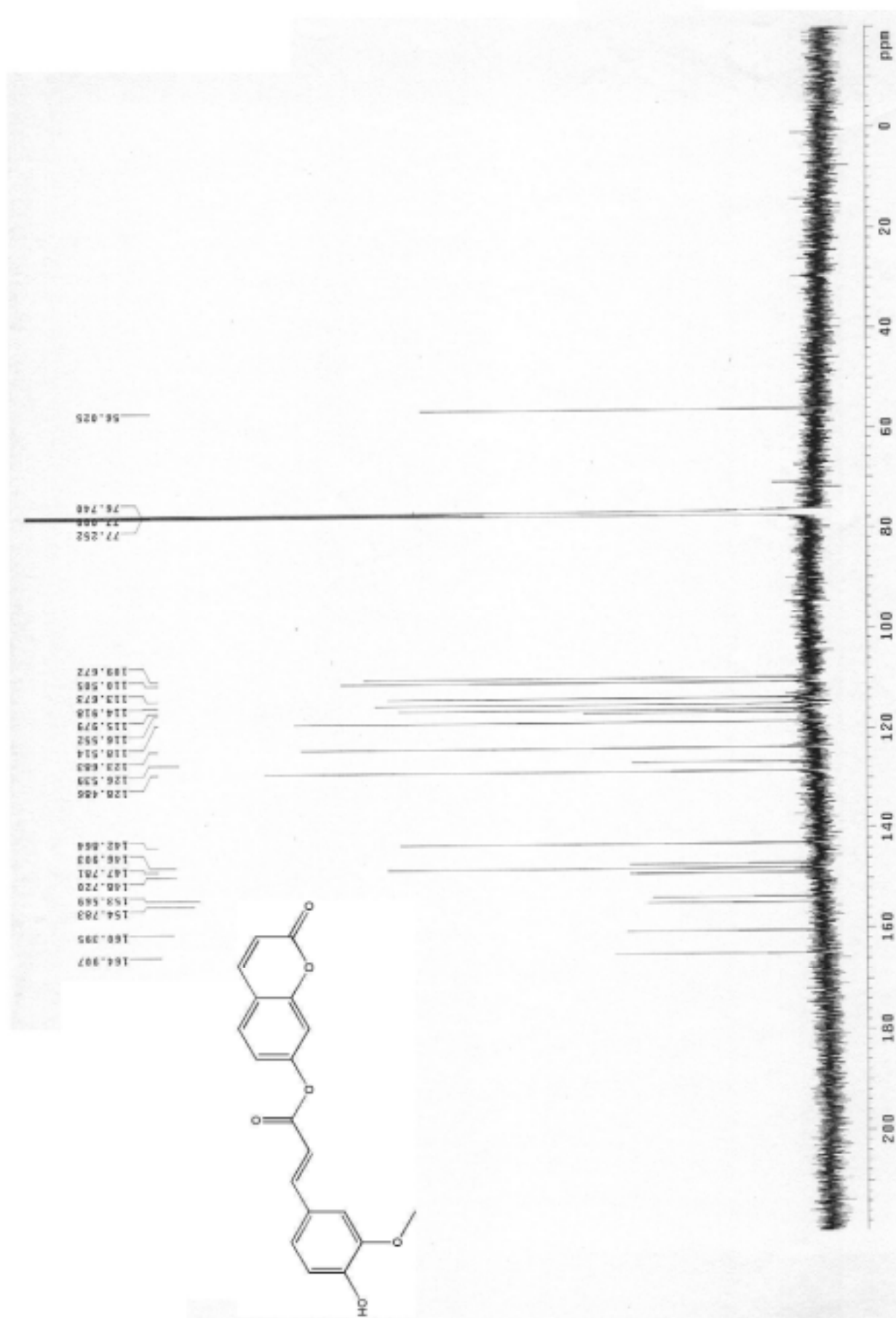
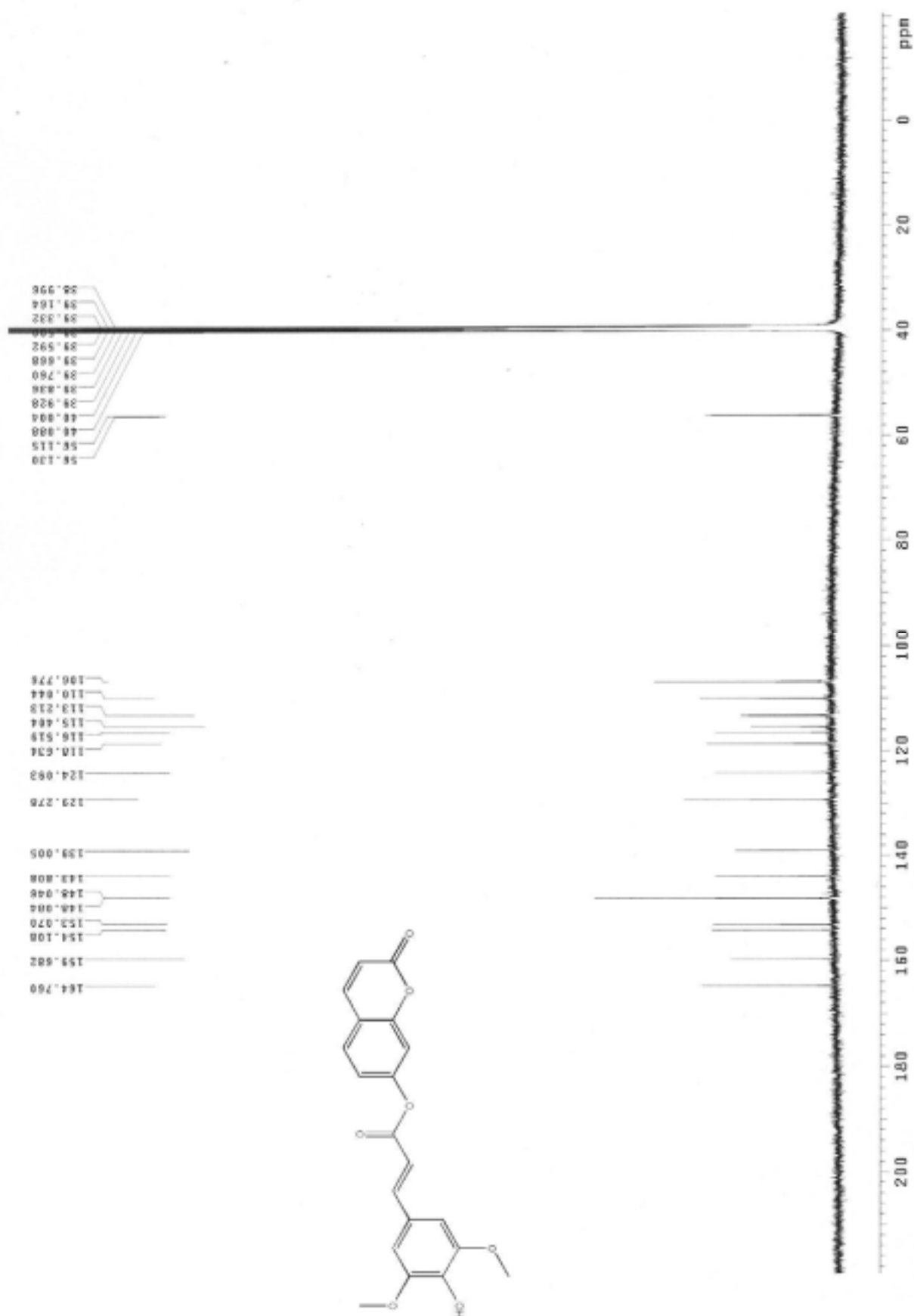


圖 66 化合物(38)之¹³C NMR光譜圖

圖 67 化合物(39)之¹³C NMR光譜圖



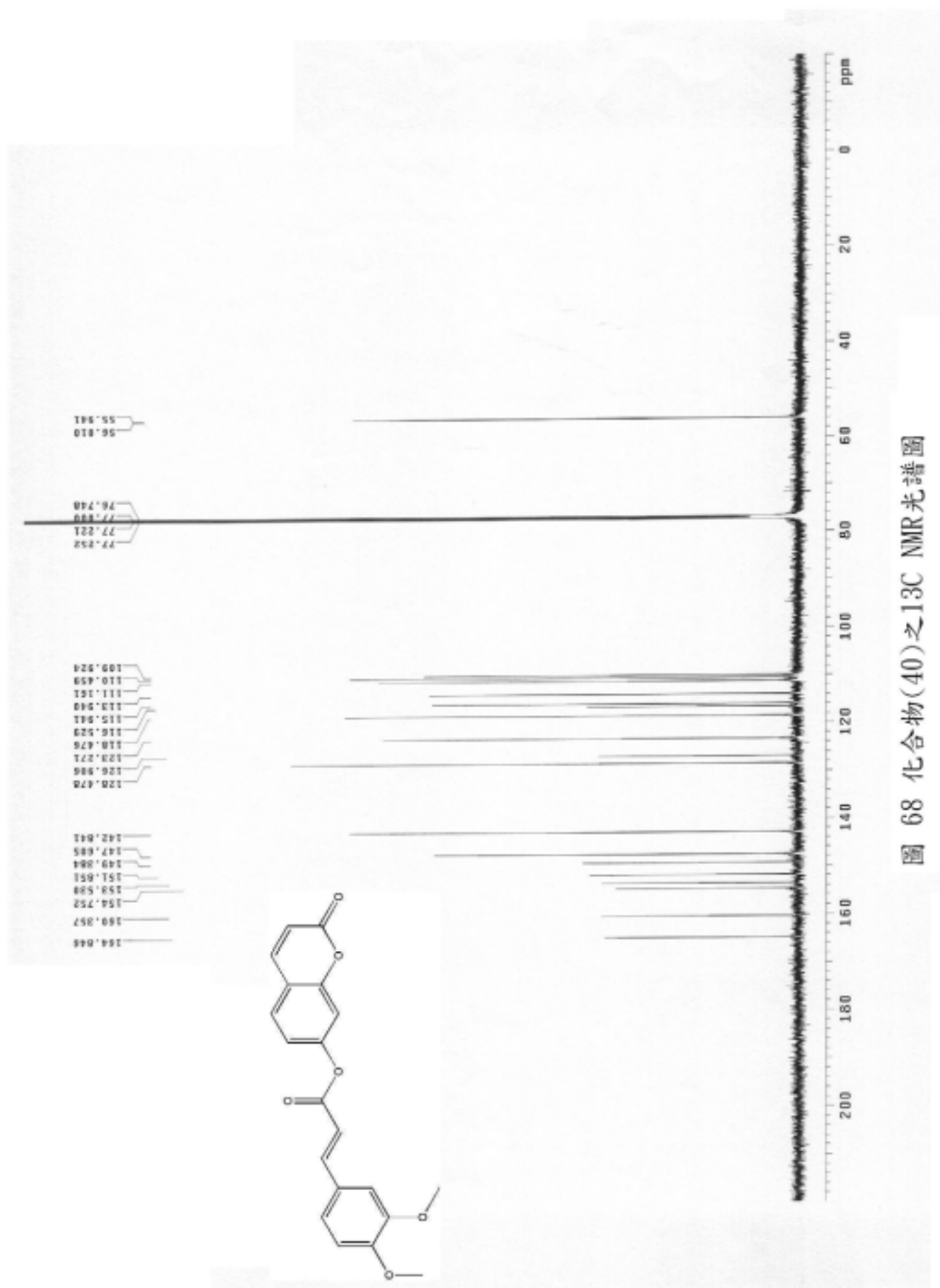


圖 68 化合物(40)之 ^{13}C NMR光譜圖