

PART I

3',6-Substituted 2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid 衍生物之合成及其抗癌、抗血小板凝集、抗發炎與抗過敏活性



第一章 緒論

本研究之標的化合物為 2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid 類緣化合物，評估之生理活性為微管蛋白聚合抑制、細胞致毒活性（抑制腫瘤細胞增殖）、細胞週期、抗血小板凝集、抗腫瘤壞死因子、抗發炎、抗過敏等，故著者在此先將 2-phenyl-4-quinolone 類緣化合物相關之研究概況及試驗活性標的物之生理功能加以敘述，作為本論文之研究背景。

第一節 2-Phenyl-4-quinolone 類化合物之研究概況

壹、天然植物中 2-phenyl-4-quinolone 類生物鹼成分的研究

自然界中 2-phenyl-4-quinolone 類生物鹼植物成分主要存在於芸香科(*Rutaceae*)的植物，最早在 1891 年 Beckurts 等學者從芸香科之芸香屬植物中單離出 graveoline¹ (Fig. 1)。

1943 年 Steldt 等學者由 *Lunasia quercifolia* 的樹皮單離出 lunamarine 的植物成分²，1959 年 Sidney Goodwin 等學者也由菲律賓產的 *Lunasia amara* 葉子中分離到此化合物³ (Fig. 1)。

爾後陸續有多位植物化學家又從芸香科等各屬植物中的葉子、樹皮單離出 2-phenyl-4-quinolone 類生物鹼，目前已發現之各成分之名稱、基原及化學結構歸納於 Table 1⁴。

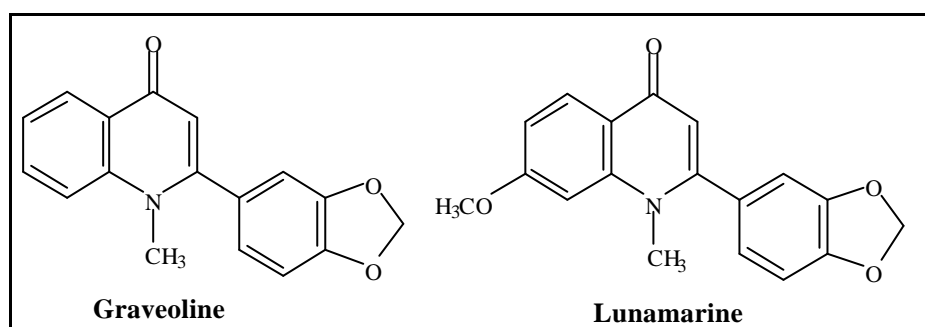
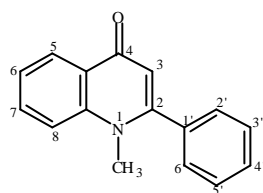


Fig. 1. Graveoline 及 lunamarine 的結構

Table 1. 由芸香科植物單離的 2-phenyl-4-quinolone 類生物鹼⁴

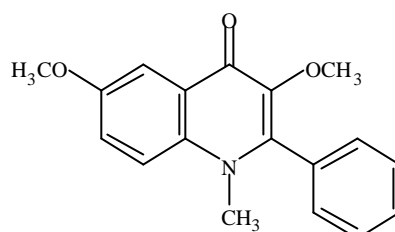
Alkaloid Name	Origin of Plants	Positions of Substituents							
		3	5	6	7	8	3'	4'	5'
Methyl-2-phenyl-4-quinolone	<i>Balfourodendron riedelianum</i> ^{4a}	H	H	H	H	H	H	H	H
	<i>Haplophyllum foliosum</i> ^{4b}								
	<i>Flindersia fournieri</i> (bark) ^{4c}								
	<i>Casimiroa edulis</i> (leaves & twigs) ^{4d}								
Edulein	<i>Casimiroa edulis</i> (bark) ^{4c}	H	H	H	OCH ₃	H	H	H	H
	<i>Casimiroa edulis</i> (leaves & twigs) ^{4d}								
	<i>Lunasia quercifolia</i> (bark) ^{4f}								
Edulin	<i>Casimiroa edulis</i> ^{4g}	H	H	OCH ₃	H	H	H	H	H
	<i>Skimmia japonica</i> (thumb) ^{4h}								
Japonine	<i>Orixa japonica</i> (leaves) ⁴ⁱ	OCH ₃	H	OCH ₃	H	H	H	H	H
	<i>Orixa japonica</i> (thumb) ^{4j, 5}								
5-Hydroxy-1-methyl-2-phenyl-4-quinolone	<i>Lunasia quercifolia</i> ^{4k}	H	OH	H	H	H	H	H	H
	<i>Casimiroa edulis</i> ⁶								
	<i>Skimmia japonica</i> ⁷								
Graveoline	<i>Ruta graveolens</i> ^{4l}	H	H	H	H	H	O-CH ₂ -O	H	
	<i>Ruta chalepensis</i> ^{6, 7}								
	<i>Ruta angustifolia</i> ⁸								
3-Hydroxy-graveoline	<i>Ruta graveolens</i> ^{4m}	OH	H	H	H	H	O-CH ₂ -O	H	
Lunamarine	<i>Lunasia amara</i> (leaves) ²	H	H	H	OCH ₃	H	O-CH ₂ -O	H	
Lunasia Base-1	<i>Lunasia amara</i> ^{2, 9}	H	H	OCH ₃	H	H	O-CH ₂ -O	H	
Reevesianine-A	<i>Skimmia reevesiana</i> (stem bark) ⁴ⁿ	H	H	H	H	H	H	OH	H
Reevesianine-B	<i>Skimmia reevesiana</i> (stem bark) ⁴ⁿ	H	H	OCH ₃	H	H	H	H	H
Folimidine	<i>Haplophyllum foliosum</i> ^{4b}	H	H	H	H	H	OCH ₃	OH	H
2-(4'-Hydroxy-6-methoxyphenyl)-1-methyl-4-quinolone	<i>Skimmia reevesiana</i> ⁴ⁿ	H	H	OCH ₃	H	H	H	OH	H
2-(3'-Methoxy-4',5'-methylenedioxyphenyl)-1-methyl-4-quinolone	<i>Esenbeckia almawillia</i> ¹⁰	H	H	H	H	H	OCH ₃	O-CH ₂ -O	
8-Methoxy-2-(3'-methoxy-4',5'-methylenedioxyphenyl)-1-methyl-4-quinolone	<i>Esenbeckia almawillia</i> ¹⁰	H	H	H	H	OCH ₃	OCH ₃	O-CH ₂ -O	

貳、天然 2-phenyl-4-quinolone 類生物鹼之生物活性

將有關 2-phenyl-4-quinolone 類生物鹼之生物活性列舉如下：

(一) 昆蟲抑食活性(feeding inhibitory)¹¹

以 *Orixa japonica* thumb 分離出的 japonine，化學結構為 3,6-dimethoxy-1-methyl-2-phenyl-4-quinolone，在測試 *larvae Spodoptera litura* 昆蟲(polyphagoeus pest insect)的抑食活性 (feeding inhibitory), japonine 呈現中等抑制強度，其 threshold 濃度為 300 ppm。



Japonine

(二) 腫瘤化學防禦活性(cancer chemopreventive activity)；突變抑制活性(antimutagenic activity)⁶

從 *Casimiroa edulis* 的種子所單離之 5-hydroxy-1-methy-2-phenyl-4-quinolone 在 *S. typhimurium* strain TM677 以 7, 12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA)誘發的突變抑制及從 Aroclor 1254 前處理之肝臟中取得的微小體來測試 ethoxyresorufin *O*-deethylase (EROD)的活性實驗中，皆呈現明顯之活性，IC₅₀ 分別為 10.5 μg/mL 及 16.3 μg/mL。但是以 mouse mammary organ culture (MMOC)來試驗由 DMBA 所誘發的腫瘤生成前的損害(preneoplastic lesions)試驗中卻幾無活性，於 10 μg/mL 的濃度只達抑制 36% (抑制活性必須 > 60 %才有意義)。

參、合成 2-phenyl-4-quinolone 類化合物之生物活性

(一) 抗癌活性

本實驗室對於 2-phenyl-4-quinolone 類緣化合物之抗微管聚合(inhibition of tubulin polymerization ; ITP)之研究已有多年，取代官能基的變化亦相當多，茲於此僅將 2-phenyl-4-quinolone 類緣化合物 (PQ, DHPQ, PN) 在微管聚合抑制之構效關係分別敘述如下：

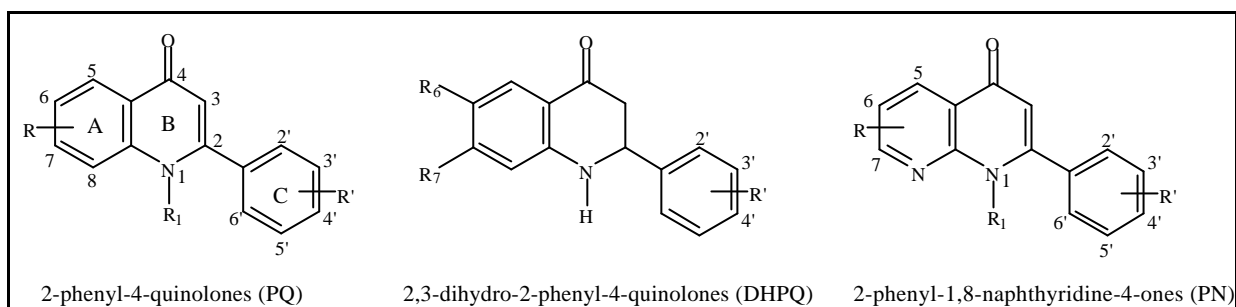


Fig. 2. 2-Phenyl-4-quinolones (PQ), 2,3-dihydro-2-phenyl-4-quinolones (DHPQ)及 2-phenyl-1,8-naphthyridin-4-ones (PN)的化學結構

(A) 2-Phenyl-4-quinolone 類衍生物(PQ, DHPQ)¹²⁻¹⁵ 之結構與抑制微管蛋白聚合活性的關係

近年來本實驗室設計並合成一系列 2-phenyl-4-quinolones 類緣化合物(Fig. 2), 以作為新穎之抗有絲分裂劑, 這系列化合物之細胞致毒活性(cytotoxicity)與抑制微管蛋白聚合作用活性有相對應之關係。這類 PQ 類緣化合物結構上都具有一個由 A 環和 C 環組成之 biaryl 系統, A、C 環之間的銜接是插入一個 B 環或有時是由一碳氫鍵橋連接在一起。

當 A 環的第 6 位置及 C 環的第 3'位置取代為含有未共用電子對的官能基取代時 (如-OCH₃、-OCH₂O-、-NRR'、-Cl、-F 等), 具有優越之細胞致毒活性。而且這兩個官能基間的距離約為 10-11Å, 這樣的結構特性可能是化合物藉由這些官能基與微管作用部位產生氫鍵鍵結, 故這些官能基在 PQ 類化合物之活性上具有顯著之貢獻。

在 2,3-dihydro-2-phenyl-4-quinolones (DHPQ)¹⁶⁻¹⁷ 系列中, 也有不少衍生物具有微管蛋白聚合抑制活性, 且對腫瘤細胞[例如迴盲腸癌(HCT-8)、乳癌(MCF-7)、肺癌(A-549)、鼻咽表皮樣癌(KB)、前列腺癌(PC-3)、人類卵巢癌(1A9)、骨癌(HOS)、神經膠母細胞癌(U-87-MG)、P-gp-表現之鼻咽表皮樣癌(KB-VIN)、黑色素瘤(SK-MEL-2)等]也具有 cytotoxicity。一旦改變第 6 位置及第 3'位置的取代, 則會和 PQ 系列一樣對其活性也有明顯之影響。這類結構第二位置上有一個 chiral center, 所以都有兩個 enantiomers。從藥理數據看來, optically pure (-) isomers 比 racemate 或(+) isomers 具有較強的 antitubulin 活性及 cytotoxicity。

(B) 2-Phenyl-1,8-naphthyridin-4-ones (PN)衍生物之結構與抑制微管蛋白聚合活性的關係¹⁸⁻²⁰

PN 類化合物也具有很強之 cytotoxicity，同時也都有相當強的微管蛋白聚合抑制活性。然而一旦第 3' 位置的取代被固定，如-OCH₃，則第 6 位置的取代基對活性之重要性似乎就不那麼明顯。以上的發現對 PN 衍生物而言是特有的，這和 PQ 及 DHPQ 系列不同。

(二) 抑制經由血清素(serotonin)誘發之內皮細胞的通透性²¹

serotonin 會引起老鼠心臟內皮細胞單層的外細胞(endothelial monolayer paracellular)的滲透性增加。在此試驗中 2-phenyl-4-quinolone 會經由影響 actin 及 myosin microfilaments 來防止因 serotonin 誘發的滲透性。所以當內皮細胞受到 serotonin 等血管活化劑 (vasoactive agents)的破壞時，2-phenyl-4-quinolone 會增強內皮細胞的防禦功能。

(三) 抑制老鼠中性白血球的呼吸爆發作用(respiratory burst)²²

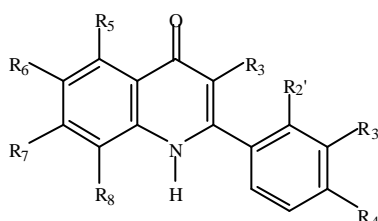
2-Phenyl-4-quinolone 會抑制老鼠中性白血球的 respiratory burst，其作用主要經由 fMLP (N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine)而非經由 PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate); 同時也會對 phosphodiesterase (PDE; 可能是 PDE₄)抑制而增加細胞內 cyclic AMP 的含量，卻不是直接活化 adenylate cyclase (AC)。換句話說，2-phenyl-4-quinolone 會活化 protein kinase A (PKA)而抑制受到 fMLP 活化之中性白血球所引起的 respiratory burst



(四) 抗血小板活性²³⁻²⁴

如 Table 2、3 所示，2-phenyl-4-quinolone 在抗血小板活性有很好的表現。2-phenyl-4-quinolone (PQ1)抑制 arachidonic acid (100 μM) 引發之血小板凝集活性強度為 aspirin 的 2.1 倍，而當第五位為 C₂H₅ 取代時，活性大增為 aspirin 的 133 倍，亦相當於 indomethacin 強度之 1.7 倍，是一個頗具開發潛力的先導化合物。

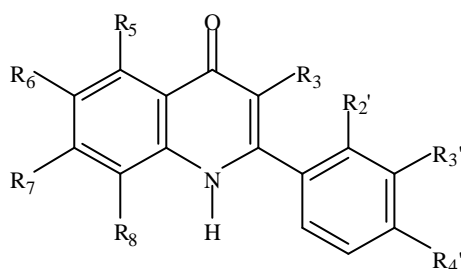
Table 2. The inhibitory effect of monosubstituted 2-phenyl-4-quinolone derivatives on platelet aggregation induced by arachidonic acid.



compound	R ₃	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R _{2'}	R _{3'}	R _{4'}	IC ₅₀ (μM)
PQ1	H	H	H	H	H	H	H	H	9.63
PQ 2	Cl	H	H	H	H	H	H	H	392.16
PQ 3	Br	H	H	H	H	H	H	H	41.43
PQ 4	H	F	H	H	H	H	H	H	15.82
PQ 5	H	CH₃	H	H	H	H	H	H	0.98
PQ 6	H	C₂H₅	H	H	H	H	H	H	0.15
PQ 7	H	H	F	H	H	H	H	H	9.07
PQ 8	H	H	Cl	H	H	H	H	H	20.20
PQ 9	H	H	OCH₃	H	H	H	H	H	5.84
PQ 10	H	H	OH	H	H	H	H	H	23.77
PQ 11	H	H	H	F	H	H	H	H	3.60
PQ 12	H	H	H	Cl	H	H	H	H	1.08
PQ 13	H	H	H	CH₃	H	H	H	H	27.58
PQ 14	H	H	H	OCH₃	H	H	H	H	23.35
PQ 15	H	H	H	H	F	H	H	H	169.18
PQ 16	H	H	H	H	Cl	H	H	H	39.50
PQ 17	H	H	H	H	CH₃	H	H	H	36.56
PQ 18	H	H	H	H	OCH₃	H	H	H	68.19
PQ 19	H	H	H	H	H	Cl	H	H	12.39
PQ 20	H	H	H	H	H	CH₃	H	H	34.68
PQ 21	H	H	H	H	H	OCH₃	H	H	20.08
PQ 22	H	H	H	H	H	H	OCH₃	H	7.90
PQ 23	H	H	H	H	H	H	H	Cl	12.39
PQ 24	H	H	H	H	H	H	H	CH₃	4.89
PQ 25	H	H	H	H	H	H	H	OCH₃	8.08
PQ 26	H	H	H	H	H	H	H	OH	17.95
aspirin									20.00
indomethacin									0.25

Platelets were incubated with a test sample or 0.5 % DMSO at 37 °C for 1 min, then arachidonic acid (100 μM) was added to trigger the aggregation. Aspirin is a positive control.

Table 3. The inhibitory effect of disubstituted 2-phenyl-4-quinolone derivatives on platelet aggregation induced by arachidonic acid.



compound	R ₃	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R _{2'}	R _{3'}	R _{4'}	IC ₅₀ (μM)
PQ27	Br	H	H	Cl	H	H	H	H	9.26
PQ28	Br	H	H	H	H	CH₃	H	H	137.08
PQ29	H	F	F	H	H	H	H	H	15.00
PQ30	H	F	H	F	H	H	H	H	389.11
PQ31	H	F	H	H	F	H	H	H	130.96
PQ32	H	F	H	H	CH₃	H	H	H	58.90
PQ33	H	Cl	H	Cl	H	H	H	H	3.55
PQ34	H	Cl	H	H	Cl	H	H	H	30.02
PQ35	H	Cl	H	H	CH₃	H	H	H	6.98
PQ36	H	CH₃	H	CH₃	H	H	H	H	1.03
PQ37	H	CH₃	H	H	F	H	H	H	16.11

PQ38	H	CH₃	H	H	Cl	H	H	H	13.65
PQ39	H	CH₃	H	H	CH₃	H	H	H	9.03
PQ40	H	CH₃	H	H	OCH₃	H	H	H	7.86
PQ41	H	OCH₃	H	OCH₃	H	H	H	H	38.77
PQ42	H	OCH₃	H	H	OCH₃	H	H	H	138.97
PQ43	H	OH	H	H	OH	H	H	H	395.26
PQ44	H	H	F	F	H	H	H	H	389.11
PQ45	H	H	H	Cl	Cl	H	H	H	24.41
PQ46	H	H	-OCH₂O-		H	H	H	H	7.40
Aspirin									20.00

Platelets were incubated with a test sample or 0.5 % DMSO at 37 °C for 1 min, then arachidonic acid (100 μM) was added to trigger the aggregation. Aspirin is a positive control.

肆、2-Phenyl-4-quinolone 類緣化合物相關之電腦分子模擬(molecular modeling)

微管是一種非常不穩定的蛋白質，所以很難利用 X-ray 結晶方式取得其蛋白質結晶結構，但近來已有學者利用 electron crystallography 方式將微管蛋白與 taxol 結合時的蛋白質結晶出來。已有數篇文獻運用電腦分子模擬來研究微管蛋白聚合作用抑制劑²⁵⁻³⁷。近年來本實驗室與李國雄教授合作所合成一系列之 PQ 衍生物，這類化合物對微管聚合作用有顯著且強效之結果，然而其作用於微管的位置仍未相當明確。因此著者欲藉由電腦分子模擬方法來設計更具潛力的化合物。

茲於此將較常用二套 3D QSAR (three-dimensional quantitative structure-activity relationships)電腦分子模擬軟體³⁸ 簡單介紹如下：

(一) Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA)

以 3D QSAR 分子模擬來設計 new lead compound 的領域中，CoMFA 是相當廣泛地使用的方法。CoMFA 的分析是以傳統分子模擬配合藥效基團接合(pharmacophore mapping)的分析來建立每個化合物的生物活性構型(bioactive conformation)及分子的模式，並提供每個分子之靜電力(electrostatic field)與立體結構的空間關係(steric field)。由生物活性的強弱及 electrostatic 及 steric field，經由 PLS (partial least square)³⁹ 的特殊多變異統計方式來評估構效間的關係。其中 PLS 的分析是採交叉印證(cross-validation) - 即每次將無法配合 model 之化合物數據排除在外，從 leave-n-out 的過程中被略去的化合物活性仍可被預估出來。

最後在每個晶格點(lattice point)中會呈現每個化合物所計算之能量大小及以 3D 方式勾畫出分子構型與受體間的輪廓，一來可幫助研究者易於評估構效間的關係是否合理，再者可進一步用來設計新型先導化合物(new lead compound)。

我們的共同研究者李國雄博士於 2000 年也以 CoMFA 及 CoMFA/q²-GRS 方法來探討 104 個作用於秋水仙素鍵結位置(colchicines-binding site)化合物的 3D QSAR³⁷，就 PQ 化合物而言，大部分之空間關係及靜電力繞著 PQ 的 C 環，顯示在 PQ 的 C 環基團在活性親和力上扮演極為重要的角色。

(二) Catalyst³⁸

Catalyst 是一套建構藥效基團(pharmacophore)的 3D QSAR 電腦分子模擬軟體，可經由輸入 2 D 分子結構，經程式運算將結構最適化(optimization)後產生分子所有可能之合理 3D 構型(conformation)，再配合選定的分子化學結構上基團的特性(features)，如氫鍵

提供者(hydrogen-bond donor)、氫鍵接受者(hydrogen-bond acceptor)、可離子化基團(ionizable group)、厭水性基團(hydrophobic group)等，依活性與結構的關係進行計算後可獲知化合物與受體間可能的作用力，最後結果以 3 D 方式之 Hypothesis 呈現出活性基團的空間位置及向量，可使研究者瞭解有效的作用分子所必須具備的官能基和官能基之間的距離、角度等。

最後可將較為合理之假設性活性藥效基團(Hypothesis)結合化學資料庫可進一步搜尋到可能有相同生物活性或活性更強且結構特異之新型先導化合物。

第二節 2-Phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid ethyl esters 衍生物之化學合成

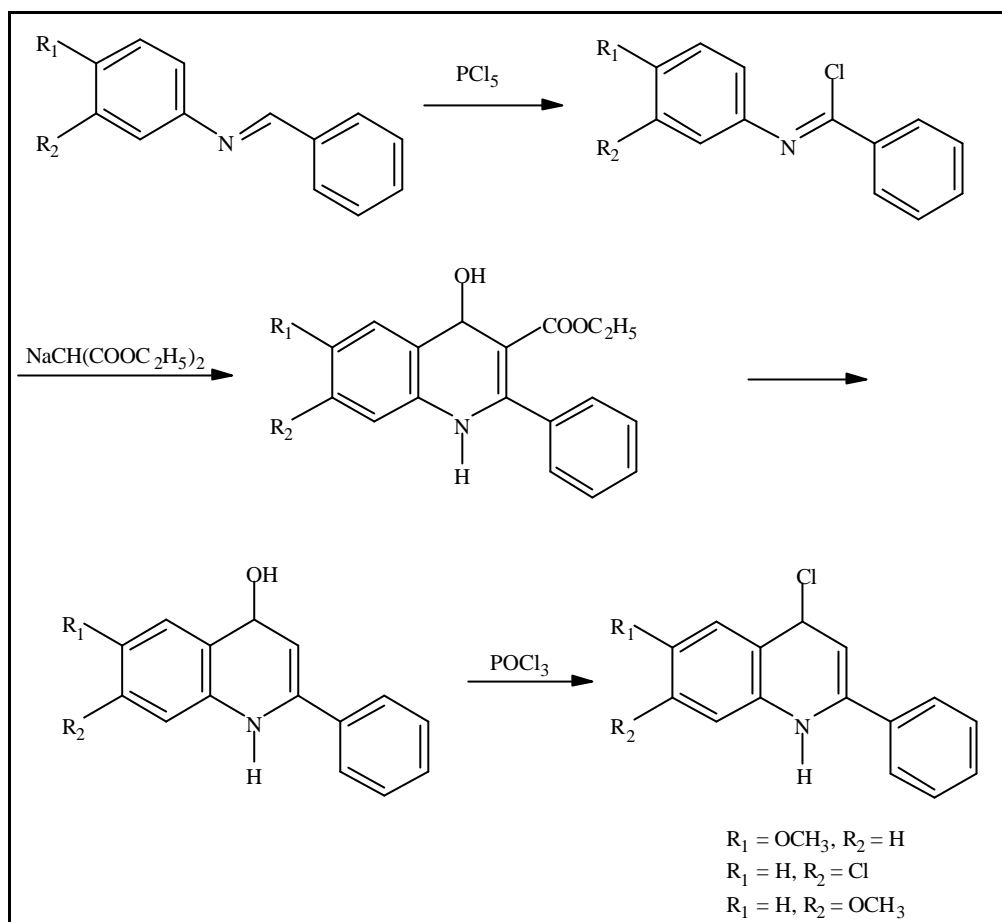
本研究之標的化合物為 2-phenyl-4-quinolones 之第 3 位導入一親水性基團(-COOH)，在此先將 2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid ethyl esters 衍生物其文獻上既有之合成方法介紹如下：

關於 3-substituted 2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid ethyl esters 之合成，早在 1946 年 Robert C. Elderfield 等學者以 benzo-*p*-anisidide 為起始原料與 PCl_5 氯化反應形成 iminochlorides 後，接著與 sodium diethyl malonate 反應及熱環化形成第 3 位 COOEt 取代之 2-phenyl-4-quinolones 衍生物(Scheme 1)⁴⁰。

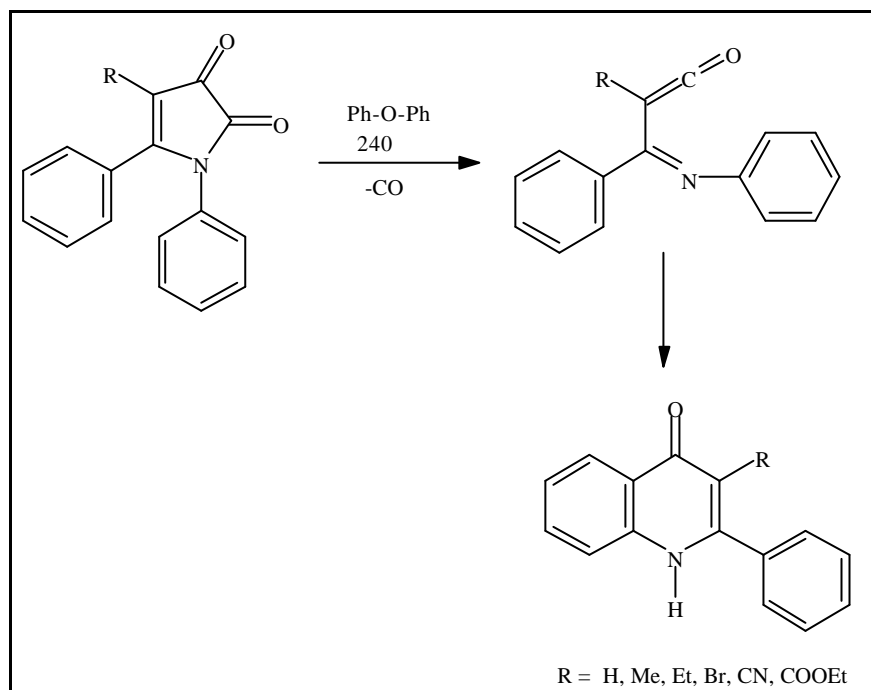
Oliver Kappe 等學者⁴¹於 1992 年 2,3-dihydropyrrole-2,3-diones 在 diphenyl ether 存在下，在 240 °C 加熱脫去 C = O 得到 imidoyl ketenes，再進行環化反應而得到相對應之 2-phenyl-4-quinolones。其中 3 位 COOEt 取代衍生物在反應速率及產率方面都相當不錯(Scheme 2, Table 3)。

接著 1997 年 El-Nabi H. A. 等學者⁴²提出與 Oliver 相似的合成方法，同樣以 2,3-dihydropyrrole-2,3-diones 為起始原料合成第 6 位 CH_3 、第 3 位 COOEt 取代之 2-phenyl-4-quinolones 衍生物。

2001 年韓國學者 Jae-Chul Jung 等學者⁴³以 3,4-difluorobenzoic acid 為起始原料，經硝化後再與 ethyl acetoacetate 反應得到 keto ester，接著在 palladium-on-charcoal (Pd/C) 催化下進行氫化反應形成 *N*-hydroxy-2-substituted quinolones，繼而將其氮上之 OH 還原，最後再以氫氧化鈉水溶液或氫氧化鋰的 THF 溶液水解，即得第 3' 位 COOH 取代之 2-phenyl-4-quinolone 衍生物。(Scheme 3, 4)



Scheme 1

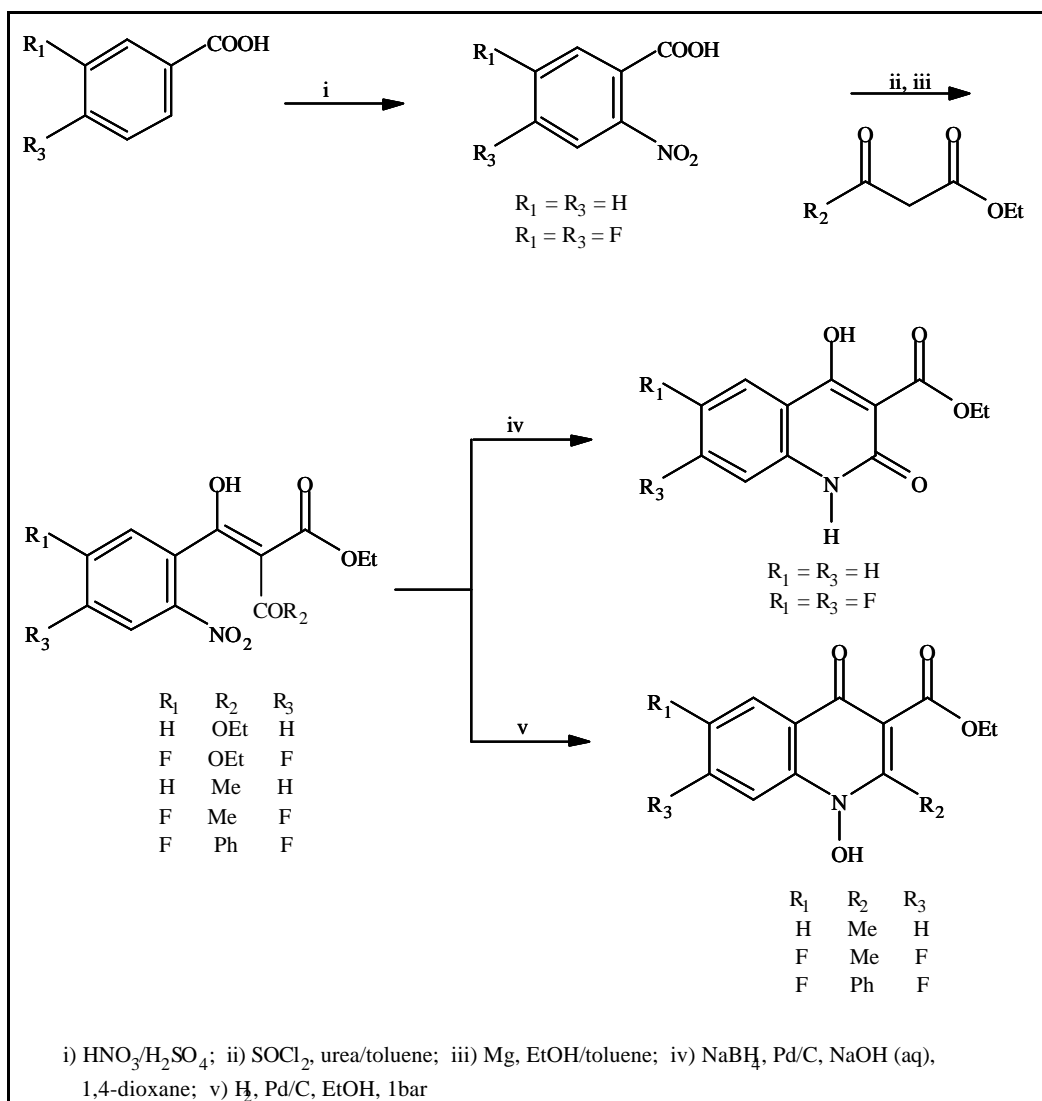


Scheme 2

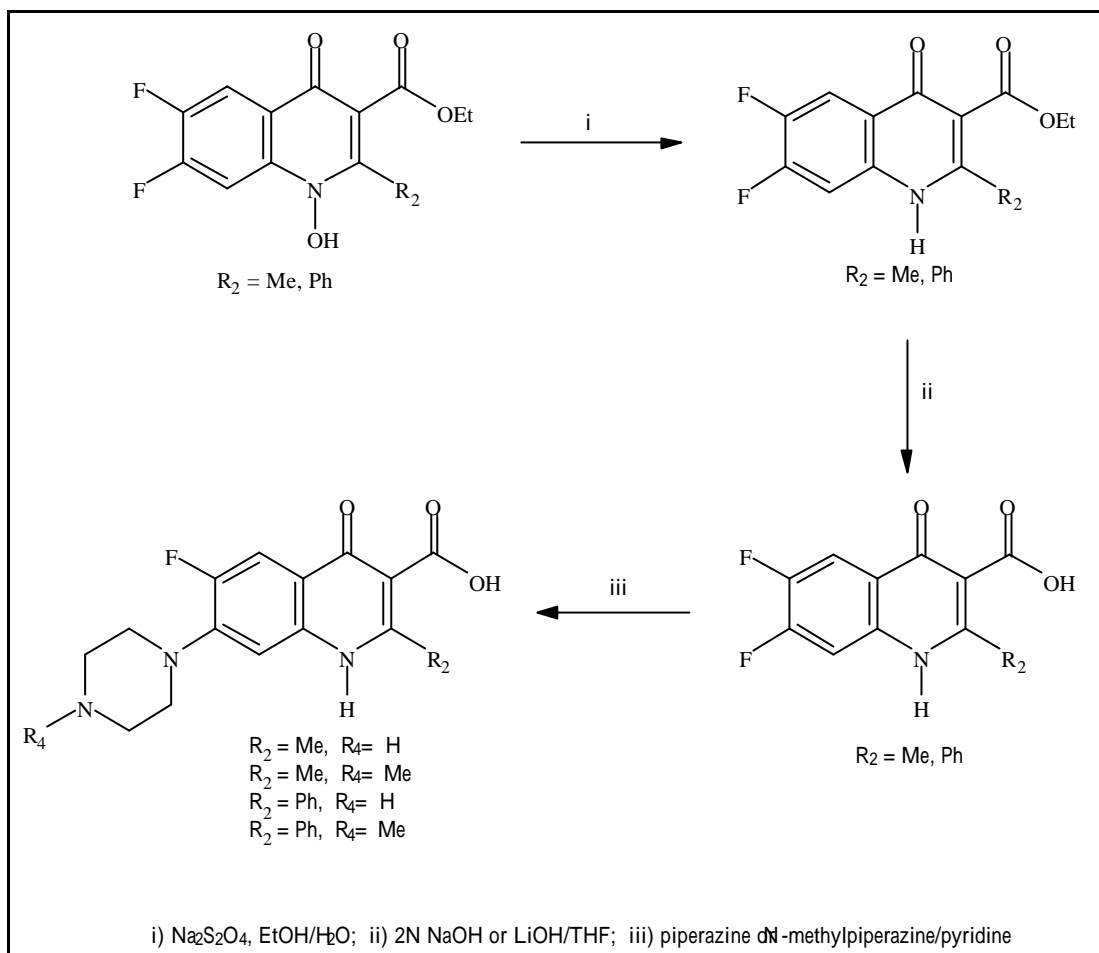
Table 3. The reaction time and yields of 3-substituted 2-phenyl-4-quinolones

R	Reaction time/h	Yield (%)
---	-----------------	-----------

H	3	94
Me	8	90
Et	8	92
Br	5	72
CN	0.5	83
COOEt	0.25	91



Scheme 3



Scheme 4

第三節 微管蛋白聚合抑制劑之概述⁴⁴

壹、微管的結構與功能

微管結構

微管是一中空的管狀結構，從橫切面可見，有 13 個原纖維 (protofilaments)，每一個原纖維是由管蛋白 (tubulin) 二聚體 和 微管蛋白組成。微管的外徑為 25 nm，內徑為 15 nm，壁厚為 10 nm。微管長度從 1 μm 至數 μm 不等。 及 單位的分子量約為 55000 道爾頓，所以微管蛋白的分子量為 110000 道爾頓。微管相關蛋白

(microtubule-associated proteins) 被稱為 MAP1、MAP2 及 Tau 蛋白，常伴隨著微管蛋白存在，能促進微管聚合。

微管蛋白具有兩個 GTP (guanosine triphosphate) 結合位點，一為 N 位點 (N-site)，另一個為 E 位點 (E-site)。N 位點結合一分子 GTP，在微管聚合過程中，不被水解，也不與游離的 GTP 進行交換 (Non-exchangeable)。E 位點結合一分子 GTP，可以與溶液中 GTP 進行交換。當微管蛋白結合到微管時，這 GTP 被水解為 GDP⁴⁵。(Fig. 3)

微管的主要功能^{46,47}

1. 微管構成了細胞的網架，維持細胞型態，固定與支持細胞器的位置。
2. 參與細胞的收縮與偽足運動，是纖毛與鞭毛等細胞運動器官的基本結構成分。
3. 參加細胞器的位移活動，尤其是染色體的分裂和位移需要在牽引絲 (微管) 的幫助下進行。
4. 參與細胞內物質運輸，微管在細胞內可能起著運輸大分子顆粒的作用，已證明病毒與色素顆粒可沿著微管移動，而且速度很快。
5. 微管與其他細胞器的關係密切：微管在核周圍特別密集，並由此向細胞質的外圍伸展，同時與核膜有接觸聯繫。核孔的生理功能與微管有關。微管在粒腺體的周圍常可見，並與粒腺體的長軸平行排列，有「橋」與粒腺體相連。有人還發現微管與高爾基體的小泡相連，並認為與物質運輸有關。當甲狀腺細胞微管破壞後，高基氏體也消失。

微管與細胞病理關係明顯，如老年性痴呆病人腦細胞微管呈彎曲狀態；微管做為細胞穩定性條件之一，它的功能損傷或控制失調與腫瘤發生可能存在關聯性，如腫瘤細胞或病毒轉化的細胞，微管相應發生改變。

貳、以微管為靶點的抗癌藥研究

多數抗微管類抗癌藥是從高等植物提取的天然產物及其衍生物。許多藥物與微管的特異結合在疾病治療中有著重要作用。當前臨床上常用的抗癌藥如秋水仙鹼，秋水仙醯胺，長春花生物鹼類等，均對微管有抑制作用，這說明微管是這類藥物的作用靶點。根據藥物與微管結合的位點不同，可將現有的抗微管化合物分為四類：

- (一) 在微管蛋白上有一個結合位點的藥物，包括秋水仙鹼(colchicine)，秋水仙醯胺(colcemid)、鬼臼毒素(podophyllotoxin)、五加前胡素(steganacin)及合成的nocodazole等。這些藥物或化合物均抑制微管聚合，並具有相同的結合位點。
- (二) 在微管蛋白上有兩個結合位點的藥物或化合物，包括長春新鹼(vincristine)、長春花鹼(vinblastine)、美登素(maytansine)等。在微管蛋白上有兩個結合位點，而且均與秋水仙鹼的結合位置不同，也是抑制微管聚合。
- (三) 紫杉醇(taxol; paclitaxel)類抗癌藥之作用機理與上述二類均不相同，為促進微管聚合、抑制微管解聚的抗微管物。
- (四) 5,6-diphenylpyridazin-3-one類衍生物，其抑制微管聚合，但結合位點與上述幾類抗微管物不同。

Fig. 4. 微管蛋白上各抗微管類抗癌藥之作用靶點⁴⁸。有兩個 GTP 結合位點，一為 N 位點 (GTP)，另一個為 E 位點 (GDP)。taxol 結合點位於 管蛋白；colchicine 結合點位於 管蛋白上，靠近 管蛋白處。

+end

GTP

TAXOL (binding site on b)

GDP

Colchicine (binding site on b)

下面介紹各類抗微管物與其靶點的相互作用：(Fig. 4)

1. 秋水仙鹼、鬼臼毒素：秋水仙鹼是一古老的抗癌藥，由於毒性大，臨床上已不用，但作為一個工具藥在細胞生物學研究中應用很多。它抑制微管聚合或裝配，使分裂細胞不能形成紡錘體而停止於分裂中期。用標記的秋水仙鹼證明，其在管蛋白二聚體上有一個高親和位點；實驗證明這個結合位點在 α -亞單位與 β -亞單位之間 (fig. 5)。Taylor 等曾計算當細胞內 3~5% 的管蛋白與秋水仙鹼結合成複合物時，細胞就被阻斷在分裂中期。

根據電子顯微鏡觀察及其他實驗結果，曾對秋水仙鹼抑制微管體外聚合的機理進行解釋。首先，秋水仙鹼分子與微管蛋白二聚體結合，形成秋水仙鹼 - 微管蛋白複合物 (CD, colchicine - tubulin dimer)，這複合物參入到正在延伸的微管末端，則微管進一步聚合作用被阻斷。Wilson 於 1978 年證明，達到穩態（動態平衡）的微管，其一端為淨聚合端，而另一端為淨解聚端。達到穩態時，聚合的速度與解聚的速度相等。這時如 CD 加到微管的淨聚合端，則阻斷了新的游離微管蛋白二聚體再加入到聚合端。但另外一端的淨解聚作用仍在進行，因此微管最終完全解聚。(Fig. 5)

秋水仙鹼胺是合成的秋水仙鹼衍生物，其作用機理與秋水仙鹼相同，但是毒性比秋水仙鹼低，臨床上對乳腺癌有效。鬼臼毒素 (podophyllotoxin) 本身有很強的微管抑制作用，同時對細胞核 DNA 轉運也有阻斷作用，但後者所需的藥物濃度比對微管的抑制要高很多倍。由於毒性大，鬼臼毒素的臨床應用受限制。

2. 長春花生物鹼和美登素，長春花生物鹼是唯一的使細胞內微管形成高度有組織的棒狀結晶的抗微管物。這種結晶呈短棒狀，橫切面似六角形結構。其中有許多沿長軸排列的微管形成的聚集體。體外實驗證明，低濃度時，長春花生物鹼對微管聚合有抑制作用，而高濃度時，引起聚集反應，濁度增加，從聚合曲線看好像增加了微管的聚合。

在細胞內，長春花生物鹼在低濃度時也引起解聚，高濃度時形成短棒狀微管結晶。這種結晶與細胞骨架連在一起，而且對鈣離子的解聚作用不敏感，說明鈣離子在微管蛋白上的結合位點或者被阻斷，或者是由於結晶形成使結合位點發生了變化。長春花生物鹼在微管蛋白上有兩個結合位點。美登素抑制微管聚合，但是它與微管蛋白結合不導致微管形成結晶。美登素使細胞分裂停止，有絲分裂指數明顯增加，當 P388 白血病細胞的有絲分裂指數 (MI) 為 1~2% 時，給藥組 P388 白血病細胞的 MI 可達 60%，並具有抗癌活性。

3. 紫杉醇(taxol)對微管的作用：taxol 是新的 diterpene 化合物，其結構新穎，作用

機理與已知抗微管物不同，是唯一能促進微管聚合的藥物⁴⁹。Taxol對微管作用的機理：taxol導致細胞內及細胞外形成結構和功能完全不同的微管，其機理十分複雜。報導指出，taxol的結合位點是在已成為聚合狀態的微管上，不是在游離的微管蛋白二聚體上。

Taxol對微管體外聚合的影響：它明顯地提高微管體外聚合的速度和產量；taxol雖能提高微管產量，但微管的長度變短。

關於 taxol 使細胞內微管形成短的微管束，DeBrabander 於 1981 年指出，隨著微管束的形成，伴隨行原來微管的解聚。後來 Horwitz 等報導，用 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 處理 J_{477.2} 細胞 1 小時，細胞內不形成微管束。但如果先用解聚藥 nocodazole 處理 1 小時，然後洗去藥物，再用 0.3 $\mu\text{mol/L}$ taxol 處理，則微管束很快形成。Breune 等用秋水仙鹼預先處理也得到類似的結果。上述結果說明 taxol 使胞漿內微管發生了重組。

4. 合成的 5,6-diphenyl-pyridazin-3-one (DPP) 類衍生物：DPP 類衍生物對動物高血壓有降壓作用，為研究其結構活性關係，合成了一系列衍生物，其中某些化合物經美國國立腫瘤研究所篩選，發現具有抗 L1210 和 P388 白血病的活性。Hamel 等進行了抗微管作用的研究，認為它是一類新的抗有絲分裂劑，它能與微管結合，且具有新的結合位點⁵⁰。中國大陸於 1990 年也合成了一系列 DPP 衍生物，並進行了抗微管抗腫瘤活性的研究⁵¹。某些化合物有較強的抗微管抗腫瘤作用，細胞週期動力學實驗表明，藥物作用後，G₁ 期細胞減少，G₂/M 期細胞明顯增加，細胞有絲分裂指數增加。

第四節 細胞週期(cell cycle)

由幹細胞(stem cell)分化到完整的細胞，真核細胞(eukaryotic cell)不是處於有絲分裂就是停止在休眠狀態。大致而言，我們可將複雜的細胞增殖現象分為三個時期：細胞生長期、DNA 複製期、細胞分裂期，這個過程稱為細胞週期(Fig. 7)。

細胞週期可分為 Interphase (G0, G1, S phase, G2)及 M phase⁵²。

Gap 0 (G0)：細胞處於休眠期，可能為暫時性或永久性的停止生長，若細胞已發展到最後階段便不再生長。(如神經細胞；neuron)

Gap 1 (G1)：此期之細胞開始生長，細胞大小增加，同時產生 RNA 及合成蛋白質，目的是為 DNA 複製做好準備。

Synthesis (S) phase：為了使分裂後的二個子細胞相似，DNA 必須複製使含量增加一倍。此期有許多作用於 DNA 的專一性藥物，如 5-Fu methotrexate 等。

Gap 2 (G2)：DNA 複製到有絲分裂的間期，細胞會持續生長並產生新的蛋白質。

Mitosis (M) phase：這個階段的細胞停止生長及蛋白質合成，所有細胞的能量集中在複雜而有規律性的細胞分裂以期得到兩個相似之子細胞。M phase 比 Interphase 作用時間短很多，大約 1-2 小時。本研究焦點即是尋找作用於 M phase 的新穎藥物，以期有效阻斷不正常癌細胞分裂。

如 Fig.7 及 Table 4 所示⁵³，調控細胞週期的因子主要是 cyclin 和 cyclin-dependent kinase (CDKs)，不同時期的細胞受到不同 cyclin 及 CDKs 所調控，然而當 CDK 過度活化時會受到 CDKI (cyclin-dependent kinase inhibitor)的抑制以維持正常之細胞週期，CDKI 分為 INK₄ (Inhibition kinase：p16^{ink}, p15^{ink}, p18^{ink}, *et al*) 和 CIP (p12,p27, *et al*)。INK₄ family 有 P16、P15、P18、P19 等，主要調控 CDK₄ 與 CDK₆ 之活性；CIP family 有 P21、P27 等，主要調控 CDK₂、CDK₄ 與 CDK₆ 之活性。例如在 G1 phase, CDK_{4,6}/cyclin D_{1,2,3} 被活化時，會促使 Rb (retinoblastoma protein)磷酸化而與 E₂F (E₂ factor；轉譯活化因子)分離，使 E₂F 可將訊息傳遞下去以利細胞進入 S phase。

合成之 2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid 類緣化合物在預期的生物活性主要是抑制微管蛋白聚合，因此對細胞週期的影響應呈現在 G2/M phase，故著者欲將細胞增殖抑制較顯著之化合物進行細胞週期的試驗，以期更確知這類衍生物在細胞週期的影響。

Table 4. 調控細胞週期的因子 cyclin 和 cyclin-dependent kinase (CDKs)

cyclin	cyclin-dependent kinase	process regulated
Cyclin D	Cdk4,6	G1-phase progression
Cyclin E	Cdk2	G1 to S-phase
Cyclin A	Cdk2	S-phase progression
Cyclin A	cdc2 (Cdk1)	S through G2
Cyclin B	cdc2	M-phase

第五節 腫瘤壞死因子(Tumor necrosis factor; TNF)

腫瘤壞死因子(TNF)的研究可追溯到十九世紀末，人們發現有些惡性腫瘤患者在伴有細菌感染時，可導致腫瘤的自發消退。1975年，Carswell等鑑於其主要生物活性是導致腫瘤出血壞死而正式提出用TNF來命名。TNF在生理、病理上扮演著重要角色，對有機體具有保護作用，包括細胞增殖、分化、凋亡、免疫反應的活化、調節發炎反應的凝血作用及殺傷腫瘤細胞等。

TNF對多數腫瘤細胞有細胞毒殺作用、細胞溶解和細胞抑制作用。其機轉涉及：(1)介導免疫反應；(2)對腫瘤細胞的直接殺傷作用。首先，免疫反應的介導主要是監視和殺滅腫瘤細胞。TNF不僅活化巨噬細胞而且能誘導多種免疫調節介質，如IL-1、IL-6、IL-8等參與各種免疫反應，亦能刺激T細胞、NK細胞活性，調節B細胞的分化和增殖，並抑制腫瘤血管形成，引起腫瘤組織微血管內皮細胞凋亡，繼而導致腫瘤組織出血壞死。TNF透過兩條途徑直接作用於腫瘤細胞：(i) TNF與靶細胞膜上特異接受器結合，並進入細胞中，作用於溶體，使溶體通透性增加並受損，溶體的擴散導致靶細胞病理性壞死，出現細胞腫脹、細胞膜破潰、細胞核及胞器溶解等病理變化。(ii) TNF與靶細胞接受器結合後，引起細胞內一連串訊號傳導而導致細胞凋亡，出現核固縮成顆粒狀凝集於核膜下、細胞膜氣泡化、在核小體連接處斷裂等病理型態或生化改變。

TNF可經由二種受器(TNFR₁ & TNFR₂)分別造成細胞凋亡、存活⁶⁸及慢性、急性發炎⁶⁹。在人類所有組織都有TNFR₁，其受質為TNF-a，會活化誘導細胞凋亡，也可經由另一途徑作用，活化NF- κ B，使基因表現讓細胞存活，但卻會加強發炎的效應。TNFR₂則大多分佈在免疫細胞（如單核細胞、淋巴細胞），其受質包括TNF-a及TNF- β ，與發炎有關。(Fig. 8)

TNF-a過度表現會造成老化、基因缺陷等與發炎相關的現象、Crohn's Disease。如類風濕性關節炎(rheumatoid arthritis)就是TNF-a誘發軟骨細胞(cartilage cells)凋亡所引起的疾病。治療Crohn's Disease作用機制為抑制PDE₄⁵⁶，使cAMP轉變為AMP的途徑受阻，因而使cAMP的濃度增加而活化PKA，進一步降低NF- κ B的轉譯，減少TNF-a的生成⁵⁷。

除上述疾病外，與TNF-a相關的尚有多發性硬化(multiple sclerosis)⁵⁸、阿茲海默症(Alzheimer's disease)⁵⁹等。

1997年Pruszanski提到微管蛋白聚合抑制劑(microtubule depolymerizing agents)可降低TNF-a細胞表面受器的表現⁶⁰；因為TNF-a與IL-1B的結合會增強基因表現及sPLA₂

(proinflammatory secretory nonpancreatic phospholipase A2)的釋放而可選擇性抑制 sPLA2 的表現及釋放，並非作用於細胞表面的受器；所以微管在 sPLA2 的合成扮演重要的角色，可解釋微管蛋白聚合抑制劑在抗發炎活性上的影響。

本論文對所合成 2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid 類化合物主要針對抑制微管蛋白聚合作用，因此將此類化合物進行 TNF- α 活性抑制之篩選，以期對是否亦對 TNF- α 有調節作用做進一步了解。

第六節 肥胖細胞 (mast cells) 與嗜中性白血球 (neutrophils) 之生理功能

如 Fig. 9 所示，肥胖細胞在過敏反應 (anaphylaxis) 中扮演相當重要的角色，當肥胖細胞受到外來的刺激被活化後，會釋放出多種發炎誘導物質 (inflammatory mediators)⁶¹⁻⁶²，如 vasoactive mediators (如 histamine , kininogenase , PAF) 及 spasmogens (如 histamine , PGD₂ , LTC₄ , LTD₄)，這些物質分別會導致血管擴張、通透性增加，或引發支氣管平滑肌、黏膜水腫及分泌增加，造成過敏及氣喘的發生⁶³⁻⁶⁴。另外也會釋放出化學誘引劑 (chemoattractants)，例如過敏性嗜伊紅性血球化學趨化因子 (eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis; ECF-A) 及嗜中性白血球化學趨化因子 (neutrophil chemotactic factor; NCF)，這些化學媒介物會活化嗜中性白血球，當嗜中性白血球被活化後，會產生高反應性之超氧自由基 (superoxide anion O₂⁻)、羥基自由基 (hydroxy radical ; OH) 及過氧化氫 (hydrogen peroxide ; H₂O₂) 等具有細胞毒性的 oxygen species⁶⁵，而導致細胞損傷，這些細胞損傷包括老化 (aging)⁶⁶、缺血再灌注損傷 (ischemia-reperfusion injury)⁶⁷⁻⁶⁹、類風濕性關節炎 (rheumatoid arthritis)⁷⁰⁻⁷¹ 及腸炎 (inflammatory bowel disease)⁷²⁻⁷³；同時當嗜中性白血球被活化時，也會釋放大量的 lysosomal enzymes，這些酵素會對組織進行蛋白質分解⁷⁴，而導致肺氣腫 (pulmonary emphysema)、類風濕性關節炎、動脈硬化 (arteriosclerosis) 及腎小球腎炎 (glomerulonephritis) 等疾病的發生與惡化⁷⁵⁻⁷⁷。

控制嗜中性白血球活化的機制有很多種，當化學誘引劑活化細胞時這些機制同時也快速地啟動。反應的抑制包括接受體的敏感度降低、接受體回到細胞內被分解或化學誘引劑被代謝成無活性的物質。另外接受體的敏感度降低也包括細胞內 cAMP 增加，或 PKC 活化阻斷 PLC 與 G protein 間的結合，形成回饋抑制。而細胞內抑制性的訊息傳遞分子，PGE₁ (prostaglandin E₁)、histamine、adenosine 及刺激 β-adrenoceptor 的藥物，可經由與細胞表面的接受體以結合以及 G protein 的活化，來增加 cAMP，達到抑制呼吸爆發的作用 (respiratory burst)⁷⁸⁻⁸²。cAMP 對嗜中性白血球活化的早期及晚期有不同的調控，一般認為可抑制嗜中性白血球經化學誘引劑刺激所引起的 adhesion⁸³、migration⁸⁴、chemotaxis⁸⁵ 及超氧自由基的生成，對於抑制顆粒酵素的釋出與吞噬作用則較不明顯⁸⁶。

嗜中性白血球適量的生成超氧自由基有助於保護個體免於遭受感染或侵襲。但若產生超氧自由基不足，會使個體溶液受病菌感染；而過多的超氧自由基則會傷害鄰近的細胞或組織，產生疾病⁸⁷。藥物若能控制嗜中性白血球產生適量的超氧自由基，則有助於減少組織的傷害。

因此，若能研發出抑制肥胖細胞及活化嗜中性白血球之藥物，即可減緩發炎症狀之

痛苦，對過敏及發炎的預防與治療將有莫大的助益。

本論文亦將所合成之 2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid 衍生物，利用此模式篩選抗過敏及抗發炎物質，以 compound 48/80 (a polymer of *N*-(*p*-methoxyphenylethyl) methyl-amine with formaldehyde) 誘發肥大細胞釋放 β -glucuronidase 及 histamine，測試化合物抑制反應的程度。同時測試化合物對 fMLP (*N*-formylmethionyl-leucyl-phenyl alanine) 引起嗜中性白血球釋放 β -glucuronidase 及 lysozyme 反應之抑制作用。另外也測試化合物對因 fMLP 及 PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) 引起嗜中性白血球超氧自由基形成之抑制作用，其中 fMLP 與 PMA 是分別作用在細胞膜之接受體及細胞內之 protein kinase C (PKC) 上。

第七節 小神經膠質細胞 (microglial cells) 之生理

小神經膠質細胞是腦中的巨噬細胞 (macrophage) , 它對周圍的細胞有益處也有害處 , 而且與大部分的發炎、感染及中樞神經系統的退化性疾病有關⁸⁸⁻⁸⁹ , 其中中樞神經系統疾病會造成多發性硬化症 (multiple sclerosis)⁹⁰、阿茲海默症 (Alzheimer' s disease)⁹¹、巴金森氏症 (Parkinson' s disease)⁹² 及愛滋症所引起的癡呆症 (AIDS dementia)⁹³。

在小神經膠質細胞中 , 藉由誘導型一氧化氮合成酵素 (inducible nitric oxidase synthetase ; iNOS) 可將 L-阿金氨基酸(L-arginine) 轉換成一氧化氮及瓜氨酸(citrulline) , 所生成之一氧化氮可導致延遲性的神經毒性 , 或者可加強 *N*-甲基-*D*-天門冬酸 (*N*-methyl-*D*-aspartic acid) 所引起的神經傷亡。當小神經膠質細胞被細菌性內毒素脂多糖 (lipopolysaccharide ; LPS) 活化時 , 就會釋放出一氧化氮 (nitric oxide ; NO) 及腫瘤壞死因子等物質⁹⁴⁻⁹⁵ , 而這些物質在中樞神經系統中 , 可能對於小神經膠質細胞與其他細胞之間的交互作用扮演著決定性的角色。小神經膠質細胞產生的一氧化氮及活性的氮氧化物 (nitrogen oxides) , 在缺血性及神經退化性疾病中會造成神經元細胞的死亡⁹⁶ , 而在多發性硬化症中也會造成寡樹突膠質細胞 (oligodendrocyte) 的損傷⁹⁷。此外在神經元退化的病源中 , 活性的含氮中間體 (nitrogen intermediates) 及 TNF- α , 會造成老化及阿茲海默症⁹⁸。

綜合前述可知 , 抑制小神經膠質細胞產生一氧化氮及 TNF- α , 可當作治療各種中樞神經系統疾病的藥物。

第九節 抗血小板藥物之概述

近年來血栓栓塞疾病包括動脈硬化、心肌梗塞、腦中風與腎血管疾病，被列為世界十大死亡原因之一。而血小板在血栓之形成中扮演非常重要的角色，因此血栓栓塞疾病之預防與治療均需要利用抗血小板藥物，所以此類新藥之開發乃成為醫藥界重要的課題之一。而第一節曾述 2-phenyl-4-quinolone 衍生物對於 arachidonic acid 誘發血小板凝集有很好的抑制活性，著者也將所合成之 2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid 衍生物測試其抗血小板凝集活性，故茲於此將血小板相關之生理機制、活化途徑及抗血小板藥物分類等分述如下。

血小板之生理機制⁹⁹⁻¹⁰³

血小板在血液中扮演的角色主要是藉由修復受傷的血管內皮細胞，來維持血管的完整以抑制持續出血。正常情況下血小板在血液中是呈平圓型的，其細胞膜有許多受器與像受器的蛋白質。為維持血小板在正常生理狀態下不活化，體內也有抑制血小板活化之機制。血管內皮細胞(endothelial cell)不僅提供物理性屏障，以避免血小板附著到內皮下的基質外，也會分泌 prostaglandin (PG)、EDRF (endothelium-driven relaxing factor)及 nitric oxide (NO)，分別活化 adenylyate cyclase 與 soluble guanylate cyclase，來增加 cAMP 及 cGMP 濃度，抑制所有刺激引發血小板活化反應，使血小板不會與內皮細胞或其它血小板的作用，以避免血栓的形成。

血管受傷破裂後，血小板會開始修復受傷的血管，其過程可分為四個步驟¹⁰¹：(Fig. 10)

(一) 血小板的黏著：

內皮細胞受損或血管受傷破裂後，血管會先收縮，使內皮細胞底層的膠原纖維 (collagen fiber) 暴露出來接觸到血液時，會活化內在途徑的凝血因子，血小板會因而開始附著在血管壁。而血小板的附著是由 von Willebrand factor (vWF) 先與膠原纖維結合後，vWF 構型發生改變，此時 vWF 能夠結合在血小板細胞膜的 glycoprotein Ib (GPIb) 受器上，使血小板附著於血管壁。

(二) 血小板的變形及活化：

附著於膠原纖維的血小板會釋出 ADP、thromboxane A₂ (TXA₂) 等物質，這些物質能夠促使更多的血小板聚集過來。蛋白質及可溶性物質 (如 thrombin、ADP、

catecholamines、serotonin、TXA₂、PAF 等), 會作用在血小板表面的受器, 造成血小板的活化, 使原本平圓狀的血小板變成表面積較大的多刺狀, 如此可讓更多受器暴露出來。

(三) 組織血激素(Tissue thromboplastin)會活化外在途徑的凝血因子, 纖維蛋白原(fibrinogen)會結合在血小板的 Glycoprotein IIb/IIIa (GP IIb/IIIa)受器, 像膠水般把血小板黏在一起, 使大量血小板及 fibrin 累積在受傷部位的血管, 這過程即是血小板凝集。

(四) 纖維蛋白(fibrin)讓血小板增多, 以形成堅固的塊狀物(血栓)作為血管修補時的保護者。此時的血小板已是無內涵物的空帶狀胞器。

(五) 凝塊的收縮, 血小板中心嵌在 fibrin 束的節點上。

血小板內部的活化可分成數個途徑¹⁰² (Fig. 11)

(一) Phosphoinositide pathway:

Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂)會受到 phospholipase C (PLC)分解形成 inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃)及 1,2-diacylglycerol (DG), IP₃ 會使 Ca⁺² 增加, 而 DG 會活化 protein kinase C (PKC)。

(二) Eicosanoid pathway:

Phospholipid (磷脂質)受到 phospholipase A₂ (PLA₂)催化變成花生四烯酸(arachidonic acid; AA), 再由 cyclooxygenase (COX)的酵素作用下形成 PGG₂、PGH₂, PGH₂ 會再形成 Thromboxane A₂ (TXA₂), TXA₂ 被釋放到血液後會活化其它血小板。

(三) cAMP

ATP 受到 adenylate cyclase 催化形成 cAMP, cAMP 的濃度增加會使血小板內的 Ca⁺² 濃度由 0.05-0.1μM 增高到大於 1μM, 而血小板活化的最後關鍵者就是 Ca⁺² 濃度。Ca⁺² 增強 PKC 的活性活化 PLA₂, 使 cytoskeletal 活化及 granule 的釋出。會活化 adenylate cyclase 的物質有 PGE₁、adenosine 及 PGI₂。

另一方面, cAMP 會受到 phosphodiesterase 水解成 AMP, 如此一來 cAMP 的量受到抑制, 血小板的活化機能因此而降低。所以若能抑制 phosphodiesterase, 即可讓 cAMP 的濃度增加而活化血小板。可抑制 phosphodiesterase 的物質有 caffeine、theophylline 及 dipyridamole。

抗血小板藥物之分類¹⁰⁴⁻¹⁰⁵

理論上能抑制血小板活化的任一步驟均可作為研發抗血小板藥物之標的。目前抗血小板凝集的藥物依其作用機轉可分為下列幾類：(如 Fig. 12、Table 6)

- (一) 影響血管內皮細胞的功能(包括藉由抑制 phosphodiesterase 而阻斷 cAMP 轉變成 AMP 或增加 cAMP 的藥物)：phosphodiesterase inhibitors、PGs 與 NO 類似物、dipyridamole、caffeine。
- (二) 抑制血小板的黏著：GPIb/vWF antagonists。
- (三) 血小板的活化：
 - (A) 抑制 Thrombin：thrombin-receptor antagonists、hirudin、argatroban。
 - (B) 抑制 Serotonin：ketanserin。
 - (C) 抑制 ADP：Ticlopidine、clopidogrel、P_{2T}-receptor antagonists。
 - (D) 抑制 TXA₂ 受體：TXA₂ 受體拮抗劑 - 如 Ridogrel。
- (四) 干擾血小板的釋放：
 - (A) 抑制 TXA₂ 之合成酵素(synthase)：dazoxiban。
 - (B) 抑制 Cyclooxygenase 酵素：NSAIDs。
- (五) 抑制血小板凝集：Glycoprotein IIb/IIIa receptor blockers。

目前臨床上最常被使用的抗血小板藥物 aspirin 乃抑制血小板 cyclooxygenase 而阻斷 TXA₂ 之生成。另一個用於臨床的抗血小板藥物 ticlopidine 則可選擇性抑制 ADP 引起的血小板活化。然而 aspirin 對細胞作用之選擇性差，會抑制內皮細胞合成 prostacyclin。至於 ticlopidine 有藥效產生緩慢，且可能引起白血球缺乏之缺點。近年來亦有不少新型抗血小板活性之化合物其作用點在於抑制 TXA₂ synthetase 及其與 TXA₂ receptor 結合之拮抗，其中 oragrel sodium (xanbon, OKY-046) 已在日本被核准上市。然而到目前為止，aspirin 仍然被認為是臨床上最安全之少數抗血小板藥物之一⁹⁹，因此尋找更理想之抗血小板藥物仍是醫藥界急迫研發之方向。

Table 6. 調節血小板功能之物質¹⁰⁴

Pathways	Agents
<i>Platelet adhesion</i>	
? von Willebrand factor	Glycoprotein GPIb-receptor antibody Antibody to von Willebrand factor Inactive von Willebrand factor fragments

Platelet aggregation

? Cyclooxygenase pathways

Cyclooxygenase

Aspirin

Thromboxane A₂ synthase

Dazoxiban

Thromboxane A₂ receptor

Thromboxane A₂ receptor blocker

Thromboxane A₂ synthase & receptor

Ridogrel

? ADP

Ticlopidine, clopidogrel, P_{2T}-receptor antagonists

? Thrombin

Hirudin, hirulag, argatroban, small-molecule inhibitors, thrombin-receptor antagonists

? Serotonin

Ketanserin

? Platelet-activating factor

Platelet-activating factor antagonists

? Phosphodiesterase

Dipyridamole, caffeine

? Glycoprotein IIb/IIIa receptor

RGD-mimetics (intravenous & oral)

第十節 研究目的與動機

如第一節所述，2-phenyl-4-quinolones (PQ)化合物是一類新型抗有絲分裂抗癌物質 (novel antimetabolic agents)。過去本實驗室合成了數以百計之 PQ 類緣化合物並檢討其 inhibition of tubulin polymerization (ITP)及 cytotoxicity，由所建立的結構與活性關係 (structure-activity relationships) 得知其基本骨架 2-phenyl-4-quinolone 的第 6 位與 3'-位上若有帶未共用電子對官能基，例如 OCH₃、Cl、F 等官能基，則其 ITP 及 cytotoxicity 均會大幅加強。

然而過去文獻上所報導的 2-phenyl-4-quinolone 類 antimetabolic agents，其脂溶性偏高，不易溶解於生物體內之水溶液，難以到達標的細胞，故進行動物試驗及將來臨床應用上均有不便之處。所以本研究中著者也企圖將標的化合物之第三位引進-COOH 親水性官能基，期待能獲得更具開發潛力的水溶性新型 PQ 類 antimetabolic agents。

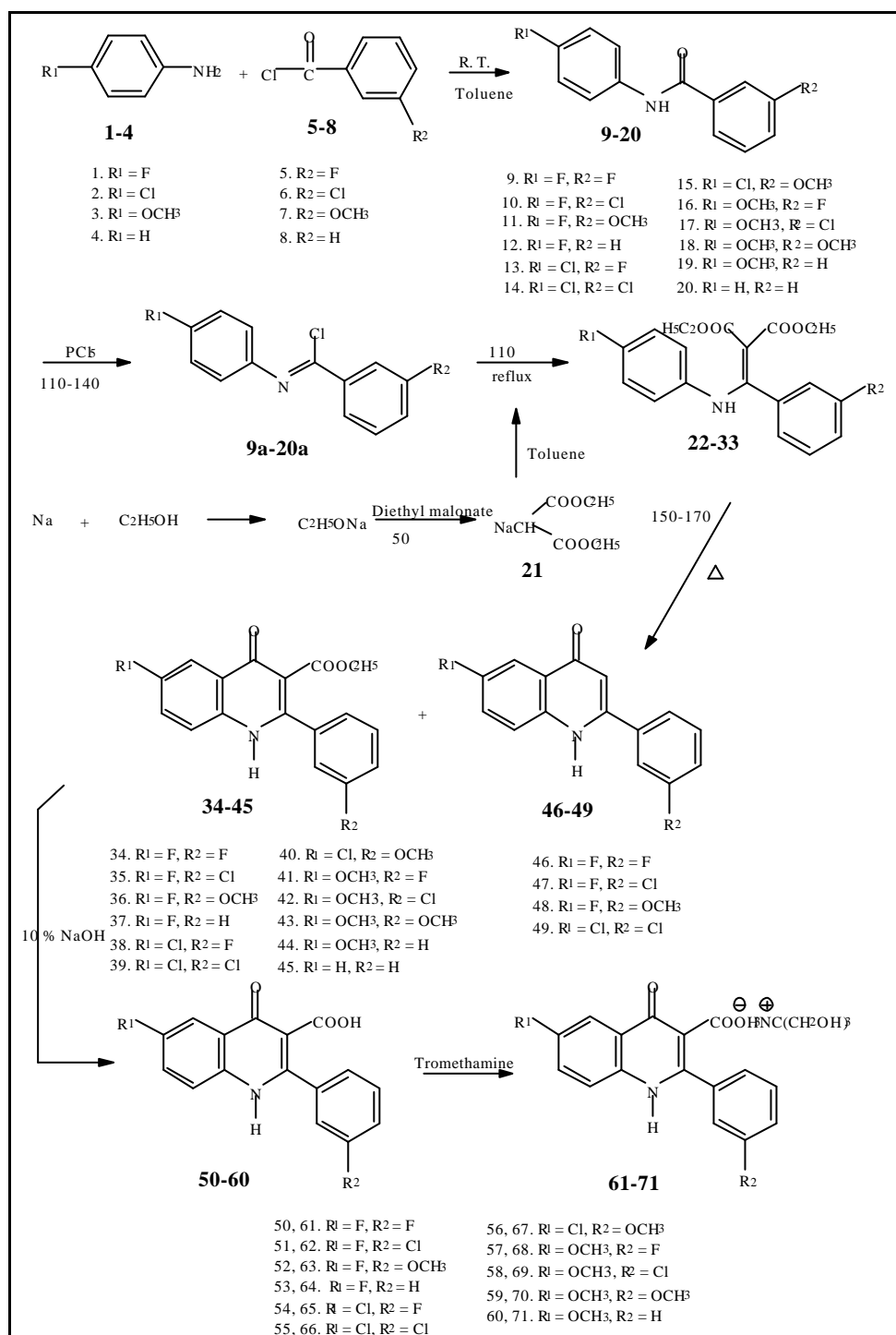
另一方面，這類化合物對微管聚合作用有顯著且強效之結果，然而其作用於微管的位置雖有文獻指出是與 colchicine 結合位置相同，但是真正的結合點仍未相當明確。因此著者欲藉由電腦分子模擬方法(Catalyst)來探討 2-phenyl-4-quinolone 類衍生物與微管蛋白結合時的 pharmacophore，進而設計更具潛力的抗微管聚合類的抗癌化合物。

另外亦將 2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid 類化合物提供抗發炎、抗過敏及抗血小板活性測試。

第二章 研究經過

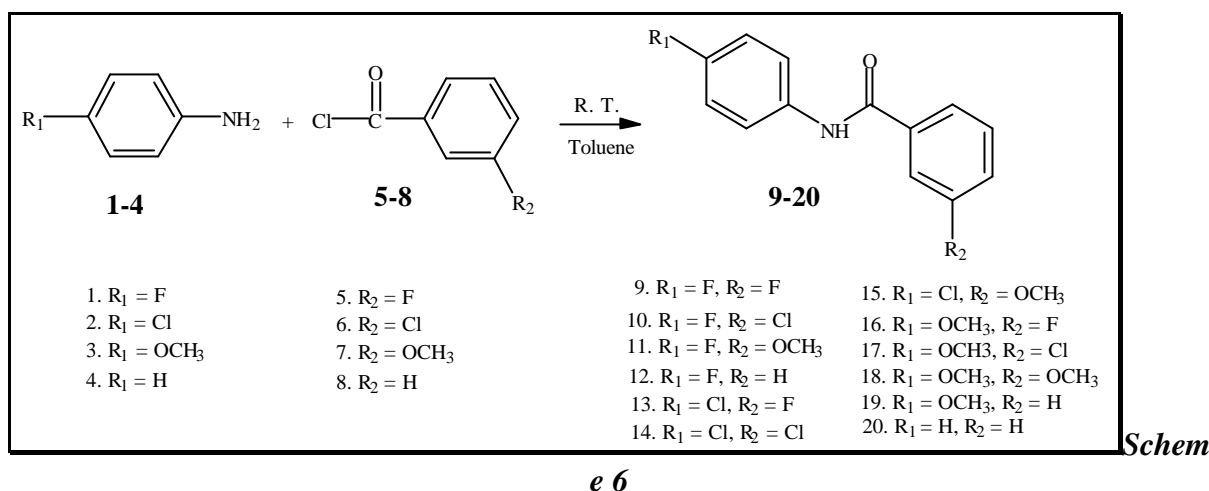
第一節 化學合成

為考量能在 3' 位及 6 位取代有較多之變化，因此本研究之標的化合物的合成途徑 (Scheme 5) 係參照 1946 年 R. C. Elderfield 等學者所提之方法⁴⁰ 而擬定，遂將各中間體及標的化合物之合成途徑及結構鑑定分述如下：



Scheme 5

(一) 3, 4'-Substituted *N*-phenylbenzamides (9-20)之合成



此類化合物之合成以 3-chloro-*N*-(4-methoxyphenyl)benzamide (17) 為例說明如下：

如 Scheme 6 所示，以 4-methoxyaniline (3) 為起始原料，甲苯為溶媒，滴加 3-chlorobenzoyl chloride (6) 進行 amide linkage，過濾後取濾液，濃縮濾液所得之粗產物經 95% 乙醇再結晶，即可得化合物 17 之白色固體。

化合物 17 之結構鑑定：

化合物 17 為針狀結晶，熔點為 146-148 。

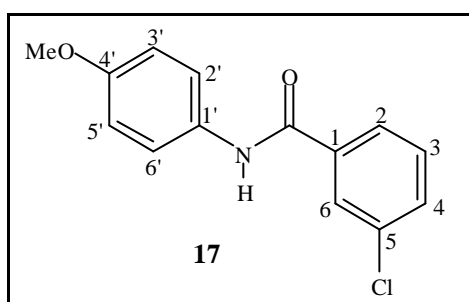
質譜(Chart 17-1)：MS 圖譜上有分子離子峰 261 (M⁺)、263 (M+2) 等峰線，亦可由峰線中發現有 CH₃OC₆H₄NH (*m/e* 122) 及 ClC₆H₄CO (*m/e* 139) 等斷裂，與預期相符。

IR 圖譜(Chart 17-2)：在波數 3345 cm⁻¹ 有二級醯胺官能基-NH 的伸展吸收，在 1650 cm⁻¹ 有二級醯胺官能基-C=O 的吸收。

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 200 MHz) (ppm)(Chart 17-3)：由積分值顯示此化合物有 12 個氫。從化學位移大致可確定化學位移 3.73 (3H, *s*) 為 4'-OCH₃，最低磁場 10.25 (1H, *br*) 為 NH 之訊號，在 6.90-8.03 為芳香環上的氫共 8 個。由訊號分裂模式、偶合常數及 H-H COSY 圖譜(Chart 17-5) 可看出 6.93 與 7.71 有 ³J_{HH} coupling correlation，因此再依誘導效應將 6.93 (2H, *d*, *J* = 9.0 Hz) 與 7.71 (2H, *d*, *J* = 9.0 Hz) 分別歸屬為 H-3'、H-5' 及 H-2'、H-6' 的訊號；7.51 分別與 7.60 7.93 皆有 J_{HH} coupling correlation 的關係，故 7.51 (1H, *t*, *J* = 7.5 Hz) 應為 H-5 之訊號，7.60 (1H, *d*, *J* = 6.5 Hz) 歸屬為 H-4 之訊號，而 7.93 (1H, *d*, *J* = 7.4 Hz) 的化學位移則屬於 H-6 的訊號，而最後將 8.02 (1H, *br-s*) 歸屬為

H-2 之訊號。

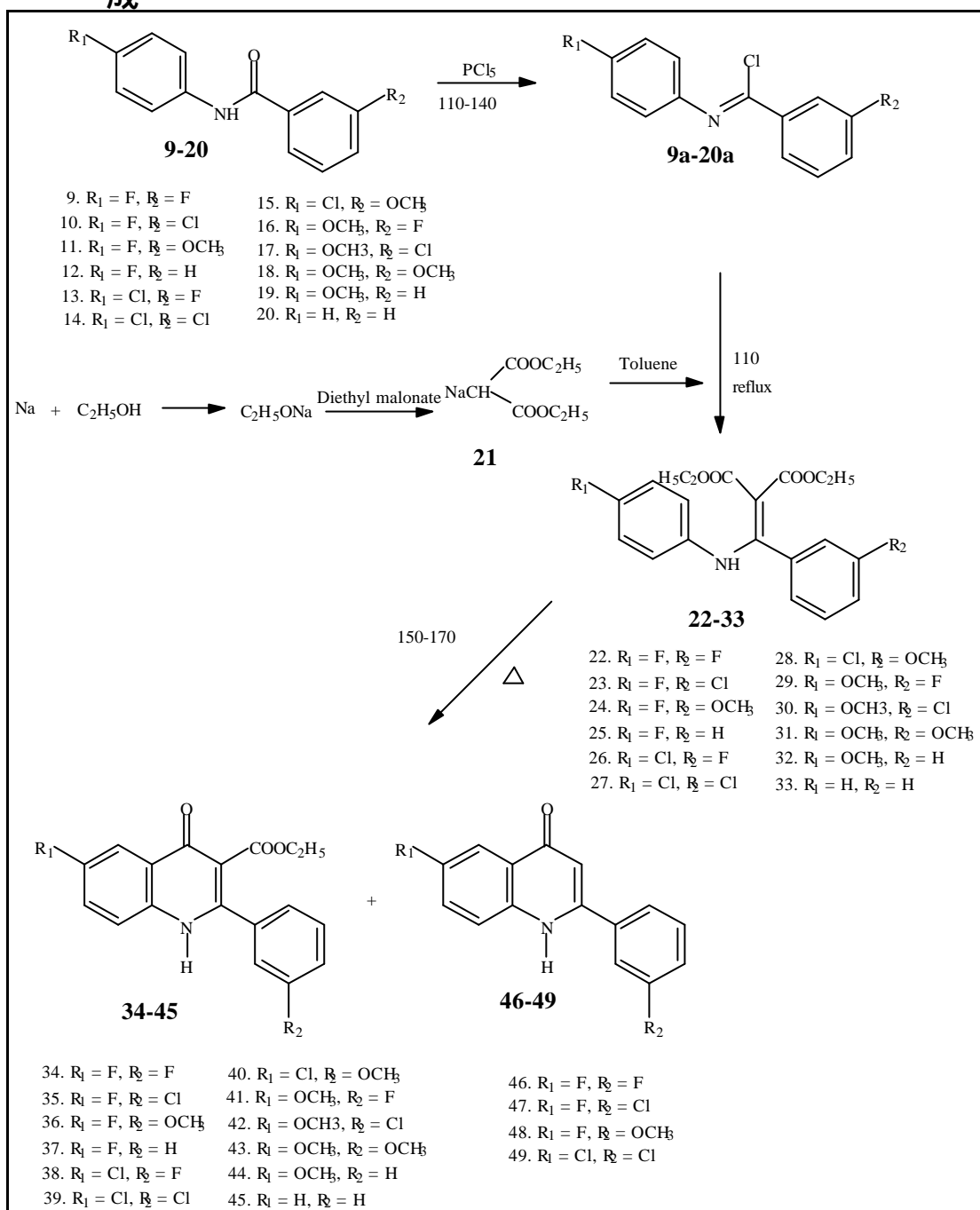
^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 50 MHz) (ppm) (Chart 17-4) : 顯示有 12 個碳原子訊號, 但由預期的分子式得知應有 14 個碳, 推測可能是結構上有二組對稱碳(C-3'、C-5' & C-2'、C-6')且由峰線訊號高度為一般訊號二倍, 因而在碳譜上顯現 12(= 14- 2) 個碳原子訊號。初步判斷 55.23 為 4'-OCH₃; 最低磁場的 163.73 來自 C=O 而 155.87 為 C-4' 的訊號; 芳香環上對稱的 C-3'、C-5' 及 C-2'、C-6' 因分別受到 4'-OCH₃ 及 NH 的誘導效應故依序歸屬為 113.84 及 122.23。再由 ^{13}C - ^1H COSY 圖譜(Chart 17-6)依循與氫譜之 $^1J_{\text{CH}}$ correlation 將化學位移 126.44、127.48、130.33、131.25 依序歸屬為 C-6、C-2、C-5、C-4 的訊號。由 HMBC 圖譜(Chart 17-7)可將與 6.93 (2H, *d*, H-3', H-5') 有 $^3J_{\text{CH}}$ coupling correlation 之 132.08 訊號歸屬為 C-1'; 133.37、137.13 皆與 7.51 (1H, *t*, H-5) 有 $^3J_{\text{CH}}$ coupling correlation, 因此 133.37、137.13 是屬於 C-3、C-1 的訊號, 但由以上圖譜仍無法確定 C-3 是否為 133.37; 155.87 與 7.71 (2H, *d*, H-2', H-6') 有 $^3J_{\text{CH}}$ coupling correlation, 故歸屬為 C-4'。綜合以上圖譜數據分析, 可以確定化合物 **17** 應為 3-chloro-*N*-(4-methoxyphenyl)benzamide。將其圖譜資料整理如下:



position		¹ H	¹³ C	¹ H- ¹ H COSY	HMBC
1	C		137.37		
2	CH	8.02 (m)	127.48		C-6 (³ J), C-1 (² J), C=O (³ J)
3	C		133.37		
4	CH	7.60 (d, 6.5)	132.08	H-5	
5	CH	7.51 (t, 7.5)	130.33	H-4, H-6	C-1 (³ J), C-3 (³ J)
6	CH	7.93 (d, 7.4)	126.44	H-5	C-2 (³ J), C-4 (³ J)
1'	C		131.25		
2'	CH	7.71 (d, 9.0)	122.23	H-3'	C-4' (³ J), C-6' (³ J), C-1' (² J)
3'	CH	6.93 (d, 9.0)	113.84	H-2'	C-1' (³ J), C-5' (³ J)
4'	C		155.87		
5'	CH	6.93 (d, 9.0)	113.84	H-6'	C-1' (³ J), C-3' (³ J)
6'	CH	7.71 (d, 9.0)	122.23	H-5'	C-4' (³ J), C-2' (³ J), C-1' (² J)
3'-OCH ₃	OCH ₃	3.73 (s)	55.23		
NH	NH	10.25 (br)			C=O (² J)
C=O	C=O		163.73		

其餘 3, 4'-substituted *N*-phenylbenzamides 類中間產物之合成方法均仿照化合物 17 , 其物理常數及光譜數據記於 Table 28。

(二) Ethyl 3',6-substitued-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylate (34-49)之合成



Scheme 7

如 **Scheme 7** 所示，此類化合物之合成以 ethyl 6-fluoro-3'-methoxy-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylate (**36**) 為例說明如下：

秤取**11**與 PCl_5 加熱迴流進行氯化反應，得到橙黃色液體carboximidoyl chloride (**11a**)。另外秤取金屬鈉溶於無水乙醇製備乙醇鈉，爾後再與diethyl malonate形成白色膠狀的sodium diethyl malonate (**21**)。

將化合物11a與21混合於無水甲苯中加熱迴流，得diethyl [[(4-fluorophenyl)amino]-(3-methoxyphenyl)methylene]malonate (24)深黃色液體。將未純化之粗產物24以加熱環化方式得到乳白色固體，經由管柱層析純化，依極性由小到大分別得二個白色固體化合物36、化合物48。

(壹) 化合物 36 之結構鑑定：

化合物 36 為白色綿絮狀晶形，熔點為 214-216 。

質譜(Char 36-1)：MS 圖譜上有分子離子峰 341 (M^+) 峰線，得知化合物 36 分子量與預期相符。

IR 圖譜(Char 36-2)：在波數 1711 cm^{-1} 有官能基-C=O 的吸收。

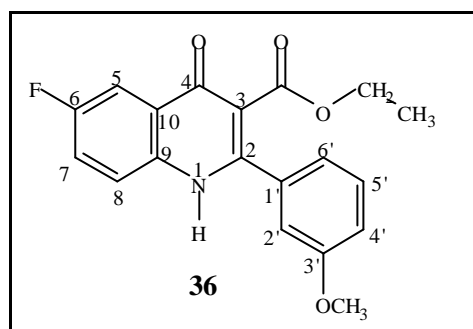
^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) (ppm) (Chart 36-3)：由積分值顯示此化合物有 16 個氫。由化學位移大致可確定在最高磁場的三個訊號中的 0.95 (3H, *t*, $J = 7.0\text{ Hz}$) 及 3.99 (2H, *q*, $J = 7.0\text{ Hz}$) 分別歸屬為 CH_3 及 CH_2 ，3.86 (3H, *s*) 為 3'- OCH_3 ，最低磁場的 12.20 (1H, *br*) 為 NH 。在 7.12-7.79 的訊號為芳香環上的氫共有 7 個。由訊號分裂模式、偶合常數、誘導效應及 ^1H - ^1H COSY 圖譜(Char 36-4, 36-5) 可看出 7.12-7.15 (3H, *m*) 為 H-2',4',6'，7.47 (1H, *dd*, $J = 9.1, 8.2\text{ Hz}$) 為 H-5'，7.63 (1H, *ddd*, $J = 8.8, 8.8, 3.1\text{ Hz}$) 為 H-7，7.75-7.79 (2H, *m*) 則為 H-5、H-8 之訊號。

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) (ppm) (Chart 36-6)：顯示有 24 個碳原子訊號，但由預期的分子式得知應有 19 個碳，推測可能是鄰近氟原子的五個碳原子與氟產生偶合，故在碳譜上顯現 24 ($= 19 + 5$) 個訊號。首先初步判斷最高磁場的 13.85、60.52 為 CH_3 及 CH_2 的訊號，55.61 為 3'- OCH_3 ，而最低磁場的 173.09 為 C=O (C-4) 的訊號。

HMQC 圖譜(Char 36-7)：依循與氫譜之相關性，推測 121.53 ($J = 25.5\text{ Hz}$) 為 C-7，130.17 為 C-5' 的訊號；而 120.61、116.17、113.97 由於受到 3'- OCH_3 的影響，依序歸屬為 C-6'、C-4' 及 C-2'。再者 109.29 ($J = 22.25\text{ Hz}$) 及 121.52 ($J = 8\text{ Hz}$)，分別受到氟原子之 $^2J_{\text{CF}}$ coupling 及 $^3J_{\text{CF}}$ coupling correlation，呈現 double split 的訊號，故此二支訊號依偶合常數大小分別歸屬為 C-5 及 C-8。

HMBC 圖譜(Char 36-8, 36-9)：用以推測其他三級碳與四級碳的碳訊號。首先，166.33

與-COOEt 之 CH₂ 有 $^3J_{CH}$ 遠程偶合關係 ($^3J_{CH}$ long-range coupling correlation), 故歸屬為-COOEt 之 C=O; 而 C-3'及 C-2 皆與 H-2' H-4'及 H-6' (7.12-7.15) 有 $^3J_{CH}$ correlation, 其中 C-2 又受到鄰近氮原子的影響會出現在較低磁場且 C-2 與 H-5' (7.47)亦有 $^3J_{CH}$ correlation, 所以分別將 159.56、149.46 歸屬為 C-2 及 C-3'。另外 135.04 與 H-5' (7.47)有 $^3J_{CH}$ correlation, 故歸屬為 C-1'之訊號。至於 4 個四級碳, 其中與 H-5、H-7 有 $^3J_{CH}$ correlation 的 136.51 為 C-9 的訊號; 而與 H-8 有 $^3J_{CH}$ correlation 且受到氟原子之 $^3J_{CF}$ coupling 而分裂為二支訊號的 126.06 ($J = 6.75$ Hz), 則歸屬為 C-10。其餘 2 個碳訊號中 C-6 因受到氟原子拉電子與 $^1J_{CF}$ coupling 效應, 偶合常數大至 241.6 Hz, 故 161.39 及 159.39 皆屬於 C-6 的訊號。最後剩餘的一個碳訊號 114.98 應歸屬為 C-3。綜合以上圖譜數據分析, 可以判定化合物 36 應為 ethyl 6-fluoro-3'-methoxy-2-phenyl-4-quinolone-3- carboxylate。將其圖譜資料整理如下:



,

position		^1H (400 MHz)	^{13}C (100 MHz)	^1H - ^1H COSY	HMBC
1	NH	12.02	-		
2	C	-	160.03		
3	C	-	115.63		
4	C	-	173.73		
5	CH	7.75-7.79 (<i>m</i>)	109.94 (<i>d</i> , $^2J_{\text{CF}} = 22.4$ Hz)	H-5	C-9 (3J), C-6 (2J), C-4 (3J)
6	C	-	159.63 (<i>d</i> , $^1J_{\text{CF}} = 241.7$ Hz)		C-9 (3J)
7	CH	7.63 (<i>ddd</i> , 8.8, 8.8, 3.1)	122.17 (<i>d</i> , $^2J_{\text{CF}} = 25.25$ Hz)	H-8, H-5	C-10 (3J)
8	CH	7.75-7.79 (<i>m</i>)	122.61 (<i>d</i> , $^3J_{\text{CF}} = 8.0$ Hz)	H-7	
9	C	-	137.15		
10	C	-	126.75 (<i>d</i> , $^3J_{\text{CF}} = 7.0$ Hz)		
1'	C	-	135.68		
2'	CH	7.12-7.15 (<i>m</i>)	114.61		C-4' (3J), C-6' (3J), C-2 (3J), C-3' (2J)
3'	C	-	150.11		
4'	CH	7.12-7.15 (<i>m</i>)	116.81	H-5'	C-2' (3J), C-6' (3J), C-3' (2J)
5'	CH	7.47 (<i>dd</i> , 9.2, 8.3)	130.82	H-4', H-6'	C-1' (3J)
6'	CH	7.12-7.15 (<i>m</i>)	121.26	H-5'	C-2' (3J), C-4' (3J), C-2 (3J)
3'-OCH ₃	OCH ₃	3.86 (<i>s</i>)	61.17		
CH ₂	CH ₂	3.99 (<i>m</i> , 7.2)	56.25	CH ₃	COO (3J)
CH ₃	CH ₃	0.95 (<i>m</i> , 7.2)	14.49	CH ₂	
COO	COO		166.96		CH ₂ (3J)

其餘 ethyl 3',6-substitued-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylate 化合物之合成方法均仿照化合物 36，其物理常數及光譜數據記於 Table 29。

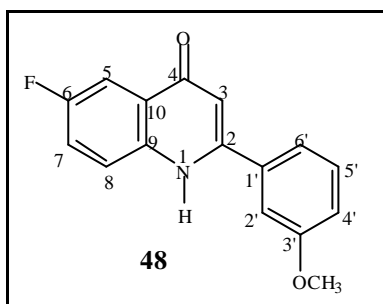
(貳) 化合物 48 之結構鑑定：

副產物化合物 48 為白色粉末，熔點為 236-238 (decomposition)。

質譜圖譜(Chart 48-1)：MS 圖譜上有分子離子峰 269 (M^+) 峰線。

IR 圖譜(Chart 48-2)：在波數 3455 cm^{-1} 有二級官能基-NH 的伸展吸收，在 1600 cm^{-1} 附近未觀察到官能基-C=O 的吸收，推測可能是第 4 位置-C=O 形成 enol form。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz) (ppm) (Chart 48-3)：由積分值顯示此化合物有 12 個氫。由化學位移大致可確定在高磁場的 3.86 (3H, *s*) 為 3'-OCH₃、11.84 為 NH (1H, *br*) 的訊號，而 6.40 (1H, *s*) 歸屬為 H-3 的訊號，在 7.16-7.83 則為芳香環上的氫共 7 個。與化合物 36 相較結果發現氫譜上已無 COOEt 之乙基訊號，且在多了一個 6.37(1H, *s*, H-3) 的訊號，故由以上圖譜數據分析，大致可以判定化合物 48 應為 6-fluoro-3'-methoxy-2-phenylquinolin-4-one。將其圖譜資料整理如下：

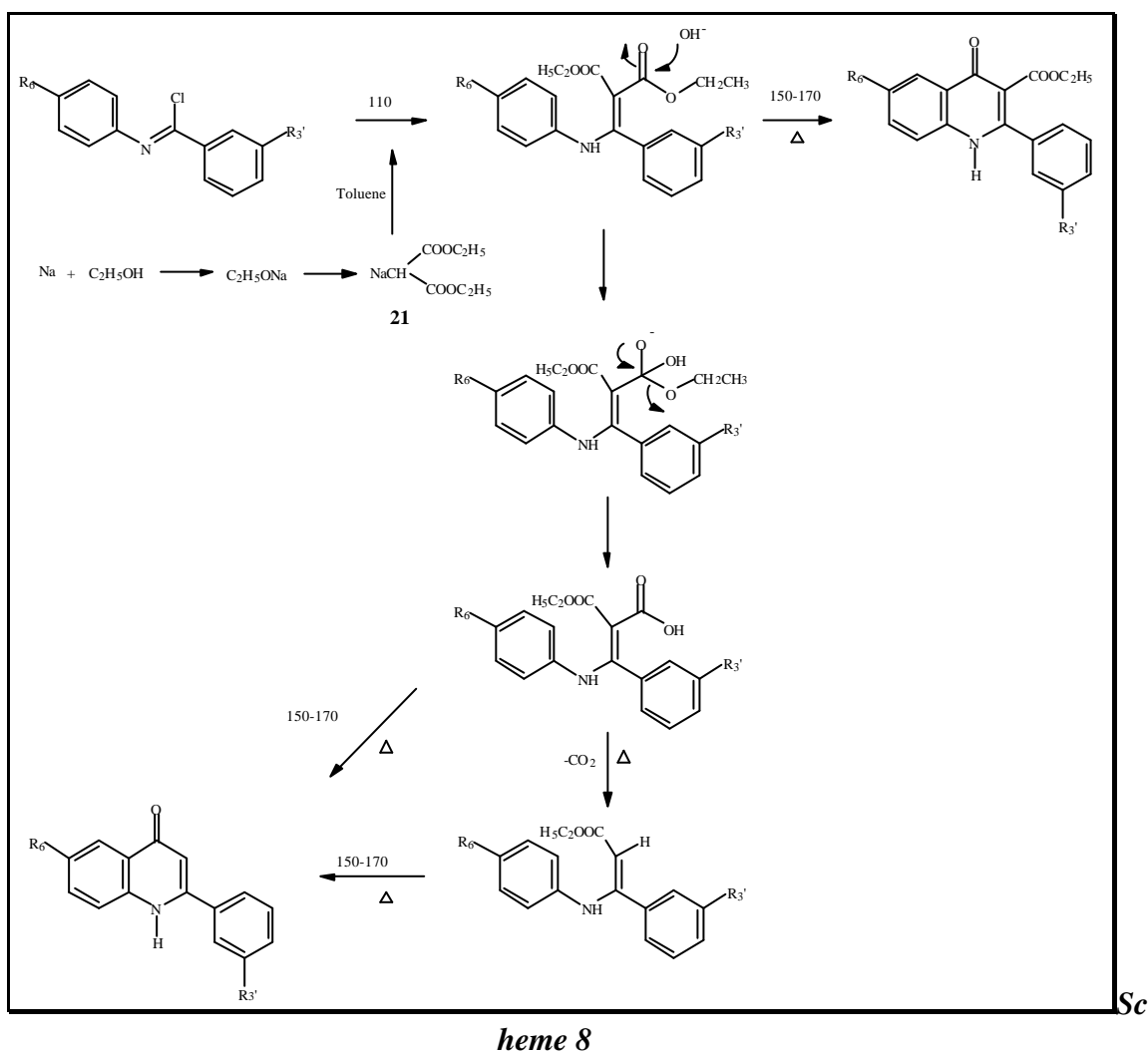


position		H (400 MHz)	H-H COSY
1	NH	11.84	
2	C		
3	CH	6.40	
4	C		
5	CH	7.73	H-5
6	C		
7	CH	7.59	H-8, H-5
8	CH	7.82	H-7
9	C		
10	C		
1'	C		
2'	CH	7.36-7.40	
3'	C		
4'	CH	7.36-7.40	H-5'
5'	CH	7.50	H-4', H-6'
6'	CH	7.16	H-5'
3'-OCH ₃	OCH ₃	3.86	

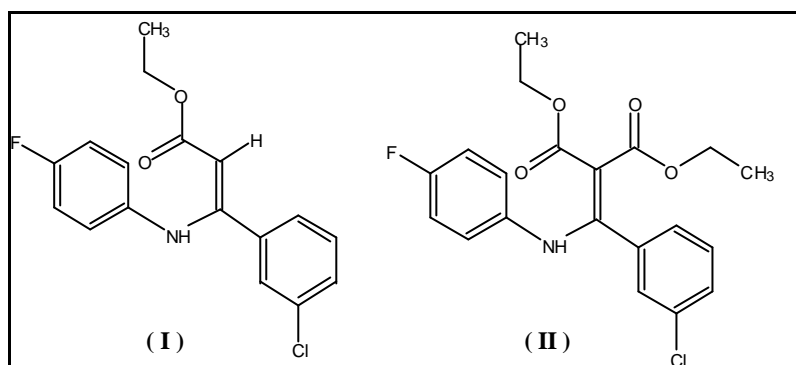
(參) 反應結果之檢討：

原本預期之產物為只有酯類化合物，但是在第 6 位如為 fluoro 或 chloro 取代，較容易有其他副產物（如 46-49）產生，將其可能之機轉闡述如下：

由於溶媒中的水分未完全去除，使殘留的水分在鹼性下形成氫氧根離子，部分酯官能基因而變成酸的官能基，加熱環化形成第三位是酸基的 2-phenyl-4-quinolone，而部分之 2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid 在高熱下脫去二氧化碳形成第三位沒有取代的 2-phenyl-4-quinolone。（Scheme 8）



為了證實我們的推想，著者將化合物 23 粗產物進行管柱層析法分離後，共獲得 2 個中間產物(I, II)，並初步以 ^1H 及 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY 確定其結構，分析結果如下：



(A) *N*-[(*E*)-1-(3-chlorophenyl)-2-ethoxycarbonylvinyl]-*N*-(4-fluorophenyl)amine (I)

^1H NMR 圖譜(Chart I-1)由積分值顯示化合物 I 含有 15 個氫，由化學位移大致可確定最高磁場的 1.31(3H, *t*, $J = 7.2$ Hz)為 CH_3 ，4.20 (2H, *t*, $J = 7.2$ Hz)為 CH_2 的訊號，4.99 (1H, *s*)為 H-2，位於最低磁場的 12.56 (1H, *s*)歸屬為 NH 的訊號，而在化學位移 6.64-7.36 附近為芳香環上的氫共 8 個。

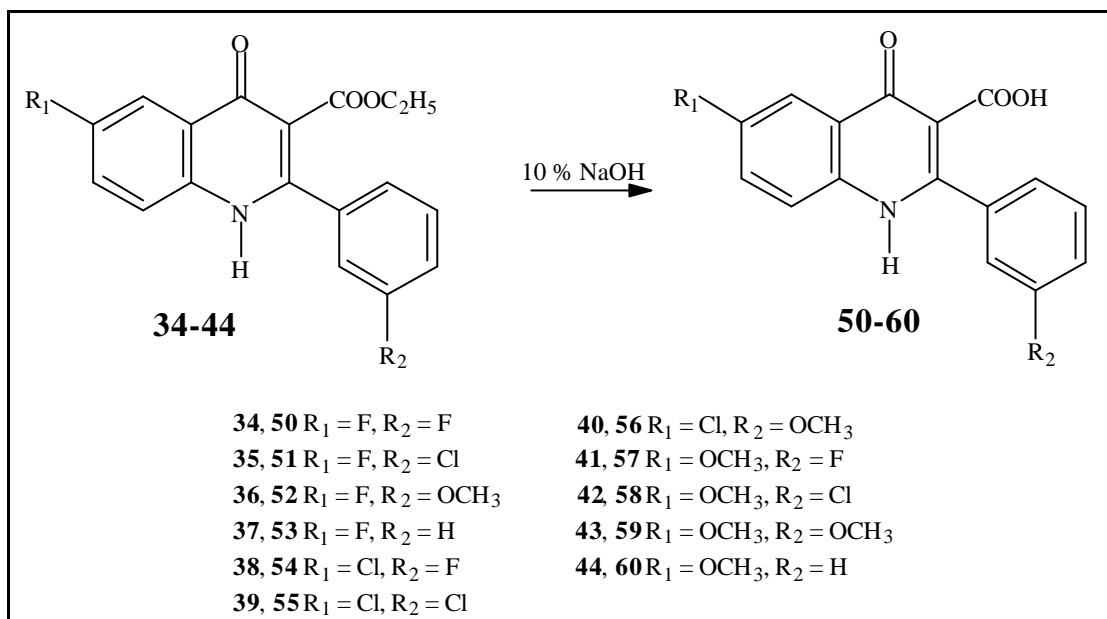
由於第 4'位為氟原子，而使得訊號分裂較為複雜難以觀察出偶合的情形，故再以 ^1H - ^1H COSY 圖譜(Chart I-2, I-3)輔助芳香環上氫的訊號歸屬。由 ^1H - ^1H COSY 可以看出 6.66 與 6.81 互相偶合，7.16 與 7.29 互相偶合，因此初步判斷 6.66 為 H-3', H-5' 的訊號，6.81 (2H, *m*)為 H-2', H-6' 的訊號，7.16-7.18 (2H, *m*)為 H-5, H-4 的訊號，而 7.27-7.30 (1H, *m*)則為 H-6 的訊號，最後將 H-2 歸屬為 7.36 (1H, *m*)。故化合物 I 之化學結構應為 *N*-[(*E*)-1-(3-chlorophenyl)-2-ethoxy-carbonylvinyl]-*N*-(4-fluorophenyl)amine。

(B) *N*-[1-(3-chlorophenyl)-2,2-diethoxycarbonylvinyl]-*N*-(4-fluorophenyl)amine (II ; 23)

^1H NMR 圖譜(Chart 23-1)由積分值顯示化合物 II 含有 19 個氫，與化合物 I 相較結果，多了一套 OCH_2CH_3 氫的訊號，而且屬於 H-2 的訊號 4.99 (1H, *s*) 在此並不復見。故化合物 II 之化學結構應為 *N*-[1-(3-chlorophenyl)-2,2-diethoxy carbonylvinyl]-*N*-(4-fluorophenyl)amine。

從上述結果可以得知在 *N*-phenylbenzamide 與 sodium diethyl malonate 反應為 diethyl [anilino(phenyl)methylene]malonates 時，易受到水解而有副產物的形成，而使產率降低。

(三) 3',6-Substitued-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acids (50-60)之合成



Scheme 9

此類化合物之合成以 6-fluoro-3'-methoxy-2-phenyl-4-quinolone-3- carboxylic acid (**52**) 為代表說明如下：

如 **Scheme 9** 所示，化合物 **36** 在 10% Sodium hydroxide 鹼性溶液催化下，將酯類水解成酸基後得化合物 **52**。

化合物 **52** 之結構鑑定：

化合物 **52** 為白色固體，熔點為 231-233 (decomposition)。

質譜：由分子離子峰 313 (M⁺) 峰線，得知化合物 **52** 分子量與預期相符。

IR 圖譜(Chart 52-1)：在波數 3450 cm⁻¹ 有二級胺官能基-NH 或 OH 的伸展吸收，在 1679, 1617 cm⁻¹ 有官能基-C=O 的吸收。

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) (ppm) (Chart 52-2)：由積分值顯示此化合物有 10 個氫。

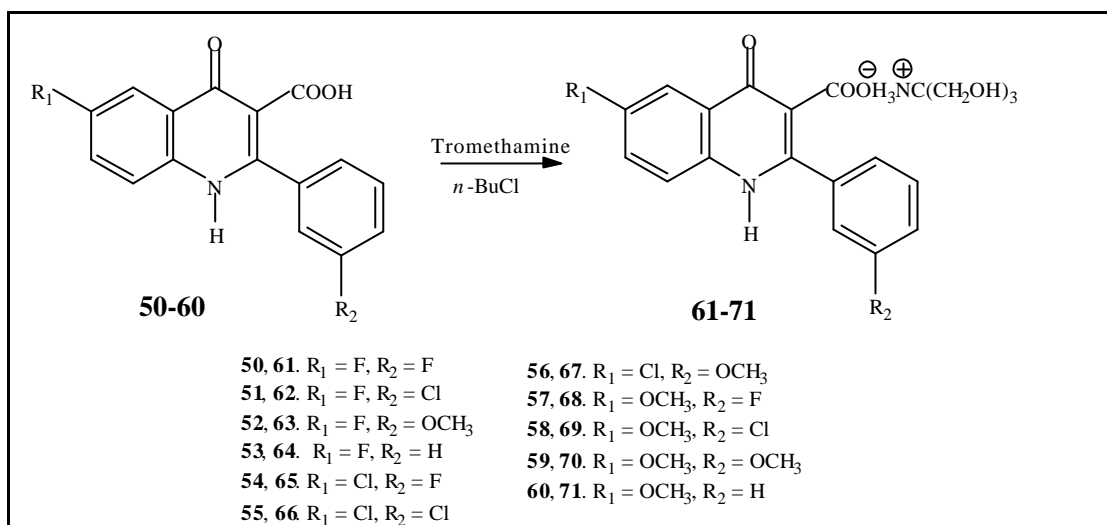
與化合物 **37** 之氫譜比對後，可明顯看出高磁場部分缺乏乙酯基團之 0.95 (3H, *t*, *J* = 7.0 Hz, CH₃)及 3.99 (2H, *q*, *J* = 7.0 Hz, CH₂)的訊號，其餘訊號分裂模式大致與化合物 **37** 相同，故可初步判斷 COOEt 應該已經水解。另外在 7.05-8.20 為芳香環上的 7 個氫中，H-5 及 H-8 的訊號解析度較佳，其中 H-8 因受到氟原子之 *meta* coupling 及 H-7 之 *ortho* coupling，而 H-5 受到氟原子之 *ortho* coupling 及 H-7 之 *meta* coupling，比較二者之偶合常數後，遂將偶合常數較大之 7.87 (1H, *dd*, *J* = 9.2, 4.8 Hz)歸屬為 H-8，而 7.87 (1H, *dd*, *J* = 9.0,

2.8 Hz)則屬於 H-5 之訊號。

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 50 MHz) (ppm) (Chart 52-3) : 顯示有 21 個碳原子訊號, 但由預期的分子式得知應有 17 個碳, 推測可能是鄰近氟原子的五個碳原子與氟產生偶合, 故在碳譜上顯現 21 (= 17 + 4) 個訊號。然而與化合物 **36** 之碳譜比對後, 可發現高磁場部分缺乏乙酯基團之 13.85 (CH₃)、60.52 (CH₂)及低磁場 166.33 (COOEt)的訊號, 其餘訊號以及在氟原子鄰近受到偶合而分裂的碳訊號, 大致與化合物 **36** 相同, 因而可確定-COOEt 已經水解完成。依據以上圖譜數據分析, 可以確定化合物 **52** 為 6-fluoro-3'-methoxy-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid。

其餘第三位為 COOH 衍生物之化學合成方法均仿照化合物 **52**, 其物理常數及光譜數據記於 Table 31。

(四) 3',6-disubstitued-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid tromethamine salts (61-71)之合成



Scheme 10

此類化合物之合成方法係參照 1985 年 B. D. Anderson 製備 NSAIDs 藥物之 tromethamine 鹽類的方法¹⁰⁵，茲於此以 6-fluoro-3'-methoxy-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid tromethamine salt (**63**)為例說明如下：

如 **Scheme 10** 所示，所示，化合物 **52** 滴加於 tromethamine 之 butyl chloride/methanol (4 : 1) 溶液中攪拌均勻後，過濾除去溶媒即得鹽類化合物 **63**。

化合物 **63** 之結構鑑定：

化合物 **63** 為片狀固體，熔點為 222-224 (decomposition)。

質譜：由於化合物 **63** 為鹽類，故無法由質譜判斷其分子量。

IR 圖譜(Chart 63-1)：在波數 3430 cm⁻¹ 有寬廣且 broad 的 NH 及 OH 的伸展吸收。

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) (ppm) (Chart 63-2)：由積分值顯示此化合物有 16 個氫，雖然應有 23 個氫，其中分別接在第一位氮、第三位酸基的氫及 tromethamine 上 amine 的二個氫共有 4 個氫未在氫譜上觀察到。而 5.13 (3H, *br*) 為 tromethamine 之 OH 的三個氫，3.74 (6H, *br*) 為 tromethamine 之 CH₂ 的六個氫。其餘的訊號均與化合物 **52** 相似。

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 50 MHz) (ppm) (Chart 63-3)：顯示有 21 支碳峰線訊號，與 013-3 碳譜比對後，在高磁場部分多了一支高度為其他峰線 3 倍的 59.87 及 60.79 的訊號，將其歸屬為 tromethamine 之 3 個 CH₂ 及四級碳。綜合以上圖譜數據分析，可以確定化合物 **63** 應為 6-fluoro-3'-

methoxy-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid tromethamine salt.

其餘 3',6-disubstitued 2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid tromethamine salt 類化合物之合成方法均仿照化合物 **63**，其物理常數及光譜數據記於 Table 32。

第二節 2-Phenyl-4-quinolone 類衍生物之藥效基團(pharmacophore)的建構

研究背景

由於電腦分子模擬的技術日新月異，利用電腦來輔助藥物的設計與開發，儼然成為時代之趨勢，不但可節省新藥開發之龐大經費，更可縮減開發的時間，是一種研發藥物的利器之一。

將藥效基團 pharmacophore 的觀念應用於藥物開發之構想，最早為 Paul Ehrlich 為運用 chromophore 來發展染料¹⁰⁶，而意外地發現這些結構可用於治療因錐形蟲 (trypanosomones)所引起的非洲昏睡病(African sleeping sickness)。之後應用電腦分子模擬的技術來開發藥物的文獻¹⁰⁷如雨後春筍般地被陸續報導出來。由 MSI 公司發展的 CatalystTM 軟體(San Diego-based Accelry's program)已利用 ligand-base drug design 的方式¹⁰⁸⁻¹⁰⁹成功地建立 5-HT¹¹⁰、 α -adrenoceptor¹¹¹ 及 cyclooxygenase-2¹¹² 等藥物之 pharmacophore。

反觀抑制微管蛋白聚合的抗癌物中結合位置較為確定的有 colchicine、taxol、vinca alkaloid，然而從過去本實驗室的研究結果看來，雖然 2-phenyl-4-quinolone 類對微管聚合抑制 (ITP) 有很強的作用，但是從測試這類化合物競爭性抑制 colchicine 結合 (inhibition of colchicine binding; ICB) 的數據看來，著者認為 2-phenyl-4-quinolones 類之 ITP 與 ICB 並沒有明顯相互對應的關係，所以我們推測此類化合物作用於微管的結合位置可能與 colchicine 不同，而引發我們對 PQ 類緣化合物作用在微管蛋白的藥效集團 (pharmacophore) 很大之興趣，因此我們從數百個化合物中挑出十六個化合物作為試驗模組 (training set)，利用分子電腦模擬軟體 CatalystTM 來架構其作用的 pharmacophore。

藥效集團的建立¹¹³

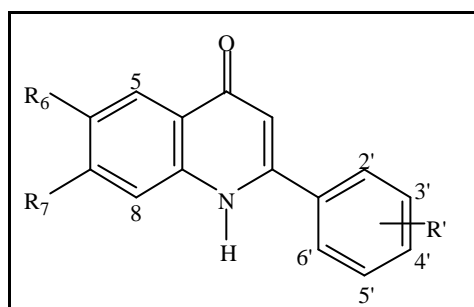
(一) Training set 之化合物的篩選

化合物的篩選相當重要，該如何選擇理想的 training set 之化合物有下列原則可以遵循：

1. 至少需要 14 個化合物以上才符合統計上的意義。選擇結構差異性大且具有活性的物質，或是抑制活性雖然不好但是結構特異具代表性的化合物。挑選出的每一個化合物結構應均能提供 Catalyst 最為新的資訊，故應避免重複無意義的物質，或是無法產生新的化學基團特性的化合物。
2. 化合物中活性最好與最差的大小數值要差距 4 個等級，也就是需差距 10^4 倍。而且每個等級的化合物至少要有 3 個代表性化合物。
3. 若兩個結構相近的化合物時，兩者活性差異必須要大些，否則只挑選兩者中活性表現好的。
4. 若兩個化合物的活性相近時，則兩者必須是結構差異大，否則只挑選兩者中活性表現好的。

在廣泛網羅作用在微管蛋白抑制的物質，經過不斷的 training set 的多種組合後，我們發現結果並不理想，因此我們修正 2-phenyl-4-quinolones 類 training set 之化合物的篩選原則中結構差異性大的原則，我們的考量有下列二點：

1. 正如背景所提，微管的結合點有至少 3 個，雖然過去研究較傾向將 2-phenyl-4-quinolones 歸類於作用在 colchicine 結合位置，但是觀察抑制 colchicine 結合百分比(ICB)的數據如 Table 7 所示，似乎作用位置與 colchicine 並不完全相同²⁷。故結構的選取未將 colchicine、podophyllotoxin 等作用在 colchicine binding site 的化合物列入考慮。
2. 文獻雖有許多結構相異卻同樣有抑制微管蛋白聚合作用的抑制劑，雖不是作用在已知的微管結合位置，但是其作用點亦不明確，故未將列入 training set。

Table 7. Antitubulin effects of 2-phenyl-4-quinolones²⁷

<i>Compd</i>	R ₆	R ₇	R _{2'}	R _{3'}	R _{4'}	R _{5'}	R _{6'}	ITP ^a		ICB ^b	
								IC ₅₀ (μM) ± SD	(% inhibition) ± SD		
Q-13	OCH ₂ O		H	H	H	H	H	0.63 ± 0.2		26 ± 10	
Q-14	OCH ₂ O		H	H	OCH ₃	H	H	> 40			
Q-15	OCH ₂ O		H	OCH ₃	H	H	H	0.57 ± 0.1		39 ± 8	
Q-16	OCH ₂ O		OCH ₃	H	H	H	H	14 ± 0.5			
Q-17	OCH ₂ O		H	H	OPh	H	H	> 40			
Q-18	OCH ₂ O		H	H	N(CH ₃) ₂	H	H	> 40			
Q-19	OCH ₂ O		H	N(CH ₃) ₂	H	H	H	0.7 ± 0.03		29 ± 7	
Q-20	OCH ₂ O		H	H	CH ₃	H	H	1.0 ± 0.2		12 ± 8	
Q-21	OCH ₂ O		H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	> 40			
Q-22	OCH ₂ O		H	OCH ₃	H	OCH ₃	H	0.62 ± 0.2		31 ± 2	
Q-23	OCH ₂ O		OCH ₃	H	OCH ₃	H	H	> 40			
Q-24	OCH ₂ O		OCH ₃	H	H	OCH ₃	H	5.5 ± 0.8			
Q-25	OCH ₂ O		H	OCH ₂ O	H	H	H	1.1 ± 0.2			
Q-28	OCH ₂ O		F	H	H	H	H	0.85 ± 1		37 ± 3	
Q-29	OCH ₂ O		Cl	H	H	H	H	0.89 ± 0.1		24 ± 4	
Q-30	H	H	H	N(CH ₃) ₂	H	H	H	1.5 ± 0.3			
Q-31	H	H	H	H	N(CH ₃) ₂	H	H	> 40			
Q-32	H	H	H	OCH ₃	H	H	H	1.4 ± 0.4			
Q-33	H	H	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	> 40			
Q-34	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	H	H	18 ± 1			
Q-35	OCH ₃	OCH ₃	H	N(CH ₃) ₂	H	H	H	15 ± 2			
Q-36	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	H	H	H	4.3 ± 1			
Q-39	OCH ₃	H	H	H	OH	H	H	5.6 ± 1			
Q-42	OCH ₃	H	H	N(CH ₃) ₂	H	H	H	0.84 ± 0.2		18 ± 6	
Q-43	OCH ₃	H	H	OCH ₃	H	H	H	0.74 ± 0.1		13 ± 2	
Colchicine								0.80 ± 0.07		86 ± 1	
Podophyllotoxin								0.46 ± 0.02		94 ± 2	
Combretastatin A-4								0.53 ± 0.05		65 ± 4	
Dihydro Combretastatin A-4								0.63 ± 0.03		65 ± 4	

^a ITP: inhibition of tubulin polymerization; ^b ICB: inhibition of colchicine binding site

依據以上二點，因此從過去本實驗室所合成的化合物中挑出適當的做為 training set 的候選化合物(candidates)。

(二) Hypothesis 之建立

將化合物在 View compound Workbench 的視窗下輸入 2D 結構，在經 2D beautify 3D beautify 及 3D minimization 後，初步得到能量最適化的 3D 立體結構。接著在 Generate conformation model 功能視窗下，設定每個化合物之構型能量變化在 20 Kcal mol⁻¹ 的範圍內，最大的構型數量為 250 個，以”best conformer generation”(最精確計算的模式)的功能，建立所有可能的分子構型(conformer)。再將所有已建立分子構型的化合物，在 Generate Hypothesis Workbench 將所有化合物之活性數據輸入如此即完成。

最後將 training set spreadsheet 的資料以”hypothesis generate”的功能，每個化合物結構間的相異度似乎差異不多，觀察選定的化合物有可能之作用官能基為氫鍵接受者(hydrogen bond acceptor; HBA) 氫鍵供給者(hydrogen bond donor; HBD) 芳香環(aromatic ring)、厭水性基團(hydrophobic group)等 4 個特徵(feature)。由選定不同的基團特徵，經過數次不同的組合檢討所得到的結果，著者發現氫鍵接受者是必須的基團，故設定 feature 中 HBA 的數量為 2 個而其餘的 HBD、hydrophobic group、aromatic ring 設定為 0-2 個，由電腦運算並選擇較佳的 feature 來建立 model。經由電腦軟體 Catalyst 統整、運算結果產生的假設性 pharmacophore 稱為 Hypothesis 最後結果得到 10 個 Hypothesis，其 Cost 值大小、方均根變異係數 (root-mean square deviation, RMS) correlation 及各個 Cost 的差異值如 Table 8 所示。

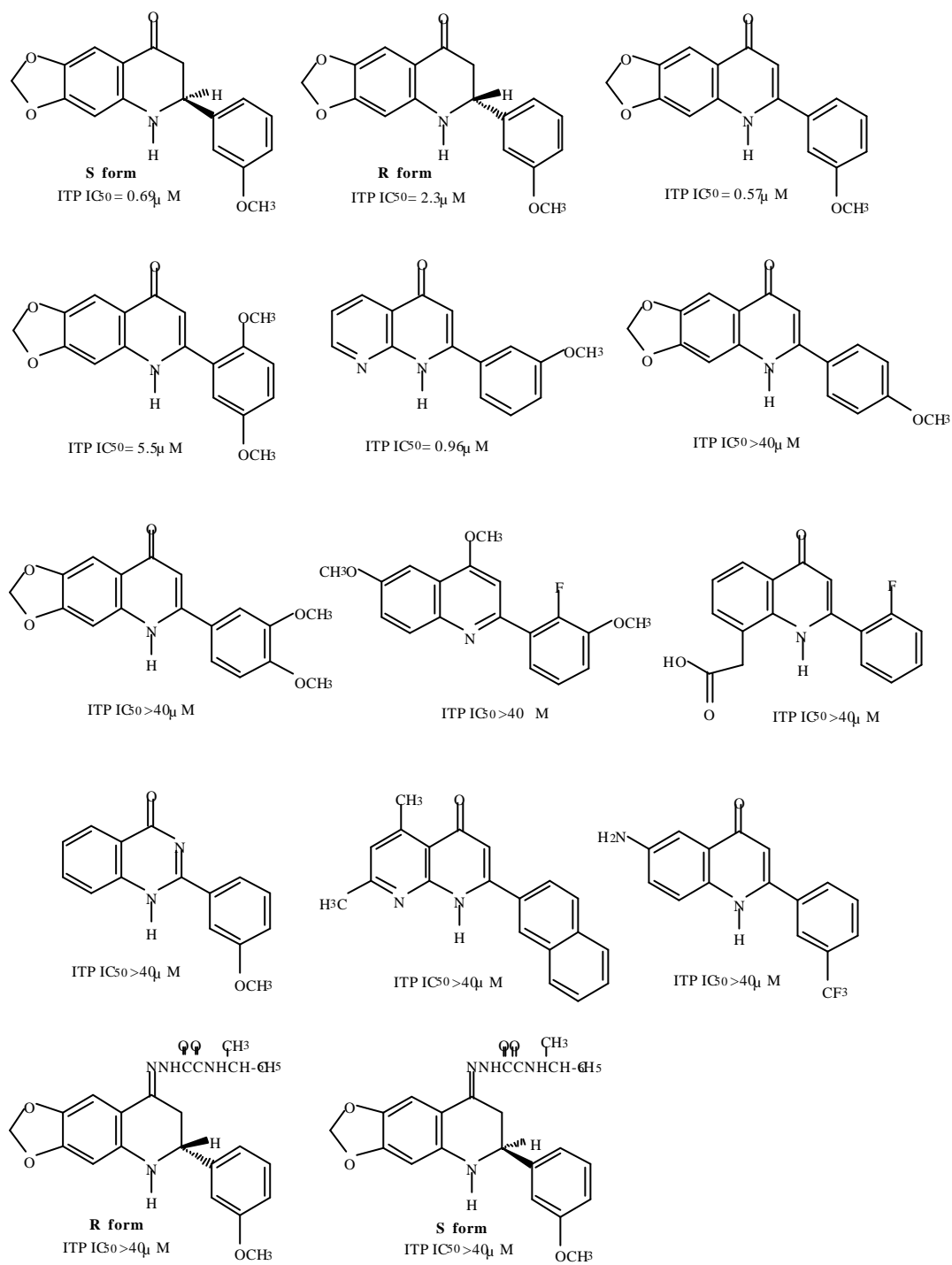


Fig. 13. 十四個作為電腦分子模擬 training set 的化合物

Hypothesis 之分析

所得的 Hypothesis 分析方式大致分為兩大方向，一為”Cost”值的評估，一為”Fit”值與視覺圖像的評估。

(一) ”Cost”值的評估

”Cost”值是在 Hypothesis 產生之際的相關數值，Catalyst 將處理 Hypothesis 之計算，會以”Cost”值來表示，Cost 值是三個數值的總和：Weight Cost、Error Cost 及 Configuration Cost，茲將這三個名詞的定義說明如下：

(A) Weight Cost: 理想值為 2。當 feature weight 偏離 model 時，此數值會以 gaussian 形式而增加。愈理想的 model 數值會愈趨近 2。

(B) Error Cost: 隨著由 training set 中分子活性之預估值(estimated value)與實際值(measured value)之 RMS 的差異愈大而跟著愈大，程式將此因子設計為愈有利(favor)之 Hypothesis，其估計值與實際值間的相關性(correlation)愈佳，相關係數 (correlation) 將趨近 1，或 RMS 趨近 1。

(C) Configuration Cost: 是一個固定值(fixed cost)，數值由最適化後的 Hypothesis 空間(optimized Hypothesis space)之複雜程度來決定，此數值亦相當於 Hypothesis space 的 Entropy。需符合小於 18 的要求。

三者中以 Error Cost 所佔整個 Cost 值佔最大部分。由電腦程式產生 Hypothesis 之際，Catalyst 會事先計算出理論性的兩個數值 (Hypothesis Cost): 一為 Error Cost 最大 (所有化合物會沿著斜率 = 1 的直線)，稱為 ideal Hypothesis Cost (= Fixed cost)，這個值會介於 70-100 bits 之間。另一個為 Error Cost 最小 (所有化合物會沿著斜率 = 0 的直線)，稱為 null Hypothesis Cost。上述之兩個 Cost 值是預估所獲得的實驗是否成功相當有利的方針。所有 models 會落於最高及最低的範圍，通常 null Hypothesis Cost 會大於 ideal Hypothesis Cost 的值。

這兩個 Cost 值的差異性相當重要，值相差愈大時愈有機會找到有用的 model。換句話說，若一個 Hypothesis 之 $\Delta = |\text{ideal} - \text{null}|$ 愈大，Hypothesis 愈有意義。

另一個有用的數值為 Hypothesis 空間的 Entropy。此數值在程式計算之初即被計算出來，會將此資料記錄於 .full 檔且數值大小接近 Fixed cost。假若此數值 < 18，所有的 model 皆會被完整的分析出來。但是當數值較高於 18，則 Catalyst 會將其刪除，因而有

些 model 並不列入考慮。此 Entropy 數值也與計算時間的多寡、使用的資料(used resource) 息息相關。例如 Entropy = 17 表示計算時間可能需花費數天且電腦記憶體可能超過 120 Mbytes。因此一般而言，假若 Entropy = 18，則必須慎重地將 training set 予以修正。

(二) "Fit"值與視覺圖像的評估

經 Catalyst 計算後會得到十個相異且 Cost 值最低的 Hypos，一般很難用簡單的統計方法來區別其中的不同，尤其是當 Cost 之間的差異相當小的情形下。因此研究者此時應轉而藉由 3D 空間的具體視覺呈現來評估結果。以下著者陳述簡易而有效的分析步驟：

- (1) 將 10 個 Hypos 同時全部呈現在 View Hypothesis Workbench 的環境下，可以一目了然地觀察出彼此之間的不同，進而可以有效地排除缺乏一些應具備但卻被遺漏之官能基特徵(feature)的 Hypo。
- (2) 接著可以直接從 Workbench 刪除不適宜的 Hypo，此階段或許有可能全部的 model 都不適用。
- (3) 將保留的 Hypos 在 Generate Hypothesis Workbench 的環境下進行評比及分析 training set spread sheet。由迴歸曲線通常可決定此 Hypo 與 training set 的資料是否有良好之相關性。
- (4) 使用 Compare 的功能來得知活性最佳之化合物其空間結構與 model 接合的情形，如此一來活性與化合物的結構相關性因此可以具體地描繪出來。為了有效地預估活性作用部位，選定的 Hypo 必須能充分解釋化合物結構與活性差異的合理性。然而，一些看似相同的 Hypo 也可能在此檢視的過程，會被發覺到彼此間卻有很大的差別。

Catalyst 將分析結果予以評等時，是使用一個數據化的 Fit 值，它不是實際值。在比對、計算的過程會受到分子構型的影響，故 Fit 值會因為選用"Best Fit"與選用"Fast Fit"而不同，選用"Best Fit"時的 Fit 值較令人滿意。假若使用自動接合的功能，電腦是以"Fast Fit"來進行，然而若是用"Best Fit"，則是以"Fast Fit"的結果為基礎，再進一步於合理之能量範圍內選擇最佳的分子構型來進行 3D 空間接合。如此不斷反覆地檢閱每個較合理的 Hypo 與每個 training set 分子後，尋找出可以解釋大部分 training set 的活性表現的 Hypo。

- (5) 最後再以未列入於 training set 的分子結構(test set)，來測試 Hypo 預估活性的結果是否準確。若 Hypo 可以預測出活性值與實際活性值相差在 10 倍以內的話，那這將是一個可以作為指引合成 new lead 化合物的成功 Hypo。

Pharmacophore 的確認

得到 10 個 Hypothesis，其 Cost 值大小、RMS、correlation 及各個 Cost 的差異值如 Table 8 所示。如同之前陳述的分析步驟對 10 個 Hypos 進行評估，結果以 Hypo 3 的結果較令人滿意。

Hypo 3 的 feature 組成共有 3 個：含有二個 Hydrogen Bond Acceptor (HBA1、HBA2) 及一個 Hydrophobic group (HYDROPHOBIC)。距離大小依序為 HBA1-HBA2：4.19-6.19 Å；HBA1-HYDROPHOBIC：7.74-9.74 Å (Fig. 14)；HBA2-HYDROPHOBIC：5.49-7.49 Å。而三個 feature 的角度依序為 HBA1-HBA2- HYDROPHOBIC：91.20-101.20°；HBA1-HYDROPHOBIC-HBA2：42.60-52.60°；HBA2-HBA1-HYDROPHOBIC：31.20-41.20° (Fig. 15)。

接著將 Hypo 3 與 test set 的化合物進行接合，作用活性不佳的化合物 155-19 其 ITP 活性實際值 $IC_{50} > 40000$ nM，由 Fig. 16 可看出 Hypo 3 與化合物 155-19 的 3D 空間接合情形，其中結構靠近 HBA1 部分的 feature 無法接合、而 Fit 值及活性預估值分別為 4.0599 32000 nM。另外 test set 的化合物中活性優越的化合物 155-9 (ITP 之 $IC_{50} = 650$ nM) 與 Hypo 3 接合情形如 Fig. 17 所示，化合物 155-9 的結構可以完全接合到每一個 feature，同時 Fit 值及活性預估值也較化合物 155-19 的結果更好。Fit 值 = 5.8398、活性預估值 (estimated) = 540 nM。

標的化合物 ITP 之預估與細胞致毒活性相對應性

如 Fig. 18 所示，將所得到的 Hypo 3 與標的化合物中的化合物 57 接合，結果預估的微管聚合抑制活性 IC_{50} 為 930 nM，所預估的抑制活性頗強。而與細胞致毒活性的表現相較後，化合物 57 實際之抑制活性也甚佳，因此由此 pharmacophore 的結果所預估標的化合物之 ITP 與細胞致毒活性有良好的相對應性，值得做更深入的探討及應用，如資料庫的搜尋，以開發更為結構特異且活性更優越的化合物。

第二節 藥理活性試驗結果

壹、細胞致毒活性

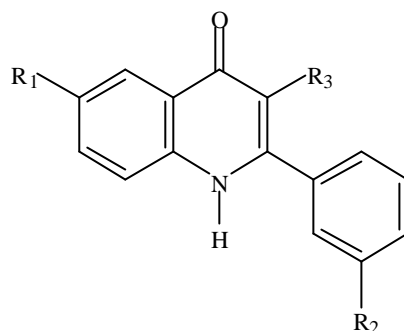
(一) 人類腫瘤細胞株之複製抑制活性(HTCL replication, human tumor cell lines replication)

著者將標的化合物 (54, 56-59) 及其酯類中間體 (38, 40-43) 在體外以人類腫瘤細胞株 (human tumor cell lines, HTCL) 測試其對 cancer cell lines U87-MG (brain cancer cell)、A549 (lung cancer cell)、HT-29 (colon cancer cell) 的 replication 抑制活性, 結果如 Table 9 所示, 所有的酯類中間體都不具活性。至於標的化合物中 2-phenyl group 之 *m*-位為 OCH₃ (59) 時亦不呈現活性, 只有 F 及 Cl 取代者 (57、58) 呈現明顯活性; 其中以 F 取代者 (57) 之活性最強。進而廣泛篩選對其他細胞株之抑制性, 結果如 Table 10 所示, 對 MCF7 (breast adenocarcinoma; 乳癌細胞)、CAKI (kidney carcinoma; 腎癌細胞)、HOS (bone osteosarcoma; 骨癌細胞)、KB (nasopharyngeal carcinoma; 鼻咽癌細胞)、KB-VIN (對 vincristine 產生抗藥性之鼻咽癌細胞)、SK-MEL-2 (skin malignant melanoma; 惡性黑色素瘤)、HCT-8 (ileocecal adenocarcinoma; 迴盲腸癌細胞)、PC-3 (prostate adenocarcinoma; 前列腺癌細胞) 及 IA9 (ovarian cancer; 卵巢癌細胞) 等細胞株都具有強力的抑制活性, 其中最值得一提的是不僅對 epidermoid carcinoma of nasopharynx (KB) 細胞株具有明顯抑制活性, 同時對 vincristine-resistant 之 KB 細胞株也維持相同的活性強度。另外對富含 glycoprotein 之 human ovarian cancer cell (IA9) 具極強的抑制活性, IC₅₀ 達到 0.03 μ M, 也就是對容易產生抗藥性的卵巢癌細胞也可能有很強的抑制活性。

另外由化學性質及結構的觀點來分析上述的生物活性, 我們將結構上同為 -COOH 的化合物 58、59 及 57 與過去本實驗發現抗微管蛋白聚合活性相當優越的化合物 A (ITP IC₅₀ = 0.57 μ M) 比較各化合物之間的 log *P* 值(如 Table 11 所示), 發現 log *P* 的大小與活性的差異相關性並不大。另一方面由化學立體結構上觀察, 我們發現若將 quinolone 的 A、B 環固定, 三個化合物重疊後所得的結果如 Fig. 19 所示, 三個化合物之第二位的苯環 (C 環) 彼此間與 quinolone 環相接的角度並不完全相同。再者我們將化合物 57、59 及 58 與抑制癌細胞活性頗強的化合物 A 做立體結構的重疊, 結果發現與化合物 57 與化合物 A 除 A、B 環外, 兩

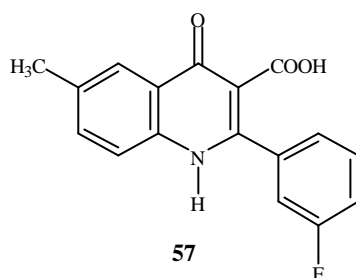
者之 C 環重疊度相當好，如 Fig. 20 所示，而化合物 58、59 的 C 環與化合物 A 的重疊度皆不如化合物 57 (Fig. 21, Fig. 22)。因此化合物 57、58 及 59 三者結構相當，活性差異卻大，故推測 C 環與 quinolone A、B 環相接的角度可能是影響化合物與受器結合時的重要關鍵。

Table 9. Activity of 3',6-disubstituted-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid derivatives against HTCL replication



Compound	R ₁	R ₂	R ₃	U87-MG ^a	A549 ^b	HT-29 ^c
38	Cl	F	COOC ₂ H ₅	NA	>20	ND
40	Cl	OCH ₃	COOC ₂ H ₅	>20	>20	ND
41	OCH ₃	F	COOC ₂ H ₅	NA	NA	ND
42	OCH ₃	Cl	COOC ₂ H ₅	>20	>20	ND
43	OCH ₃	OCH ₃	COOC ₂ H ₅	>20	>20	ND
54	Cl	F	COOH	2.0	<2	ND
56	Cl	OCH ₃	COOH	>20	>20	ND
57 ^d	OCH₃	F	COOH	1.50	0.19	ND
58	OCH₃	Cl	COOH	-	26	5.7
59	OCH₃	OCH ₃	COOH	>20	>20	ND

^a U87-MG: brain cancer cell; ^b A549: lung cancer cell; ^c HT-29: colon cancer cell; ^d 試驗細胞株的抑制活性，在此 HTCL replication 實驗進行中發現化合物 57 在溶解時有一半的量無法溶於 culture medium，但對所選擇的腫瘤細胞株卻依然有相當強之抑制活性。

Table 10. Activity of compound **57** against HTCL replication

<i>Tumor cell</i>	IC ₅₀ (μM)
MCF7 (breast adenocarcinoma)	0.14
CAKI (kidney carcinoma)	39.0
HOS (bone osteosarcoma)	0.14
KB-VIN (KB resistant to vincristine)	0.13
KB (nasopharyngeal carcinoma)	0.13
SK-MEL-2 (skin malignant melanoma)	0.16
HCT-8 (ileocecal adenocarcinoma)	0.14
IA9 (ovarian cancer)	0.03
PC-3 (prostate adenocarcinoma)	0.21

Table 11. 化合物 **34–44**、**50–60** 的 log P 計算值

Compound	Calculated log P ^a	Compound	Calculated log P ^a
34	5.21 ± 0.65	50	4.16 ± 1.00
35	5.75 ± 0.60	51	4.71 ± 1.00
36	6.15 ± 0.60	52	4.09 ± 1.00
38	5.75 ± 0.60	54	4.71 ± 1.00
39	6.30 ± 0.55	55	5.25 ± 1.00
40	5.68 ± 0.55	56	4.63 ± 1.00
41	4.76 ± 0.60	57	3.72 ± 1.00
42	5.31 ± 0.55	58	4.26 ± 1.00
43	4.69 ± 0.55	59	3.64 ± 1.00
44	4.71 ± 0.54	60	3.66 ± 1.00
		A	4.24 ± 0.75

^a Calculated log P by I-Lab Service: ACD/Log P v6. Experimental data not available

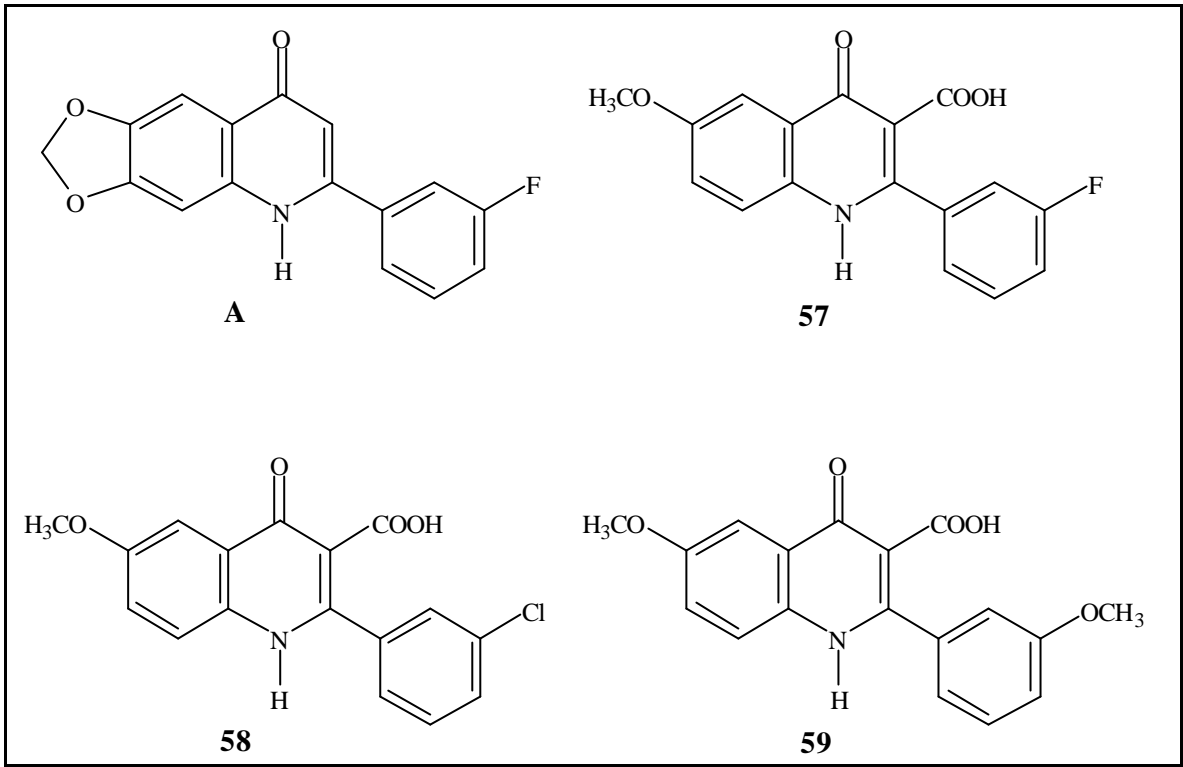


Fig. 18 化合物 57、58 及 59 的平面化學結構

(二) 利用人類癌細胞 (human cancer cell line panel) 評估化合物 57 之抗癌活性

由上述細胞致毒活性初步篩選結果得知，化合物 57 具有相當優越的活性，於是進而委託日本癌研究會癌化學療法中心，以 human cancer cell line panel (HCCP) 之篩選方法作進一步的探討。

遂將其結果敘述如下：

HCCP 所使用之癌細胞共有 39 種，包括乳癌 (breast cancer) 5 種、中樞神經系統癌 (CNS cancer) 6 種、大腸癌 (colon cancer) 6 種、肺癌 (lung cancer) 7 種、黑色素瘤 (melanoma) 1 種、卵巢癌 (ovarian cancer) 5 種、腎臟癌 (renal cancer) 2 種、胃癌 (stomach cancer) 6 種、前列腺癌 (prostate cancer) 2 種。將 39 種癌細胞混入 96 wells plate 中，翌日以 10^{-4} ~ 10^{-8} M 五種不同劑量之化合物 57 溶液加入，並培養 48 小時後，用 sulfo rhodamine 染色，以比色法定量。將結果輸入電腦處理後，作成劑量 - 反應曲線圖 (dose-response curves)，如 Fig. 23 所示。由這些曲線中得知 GI_{50} (50 % growth inhibition)、TGI (total growth inhibition) 及 LC_{50} (50 % lethal concentration) 等數據，然後將這些數據作成 mean graphs (Fig. 24-A, Fig. 24-B, Fig. 24-C)。Mean graph 是以化合物對 39 種細胞株抑制濃度 ($\log GI_{50}$ 、 $\log TGI$ 或 $\log LC_{50}$) 之平均值為中心，也就是 MG-MID (mean graph midpoint)；若對某一細胞株抑制活性較好時，所需的抑制濃度較低，柱狀圖會在右邊依數值大小凸起不同的高度，反之若對某一細胞株活性較差的柱狀圖會依數值大小往左邊凸起不同的高度，每個化合物所構成的 mean graph 其整體圖形都是相當獨特的，因此亦可將之稱為該化合物的 finger print。

從 Fig. 24-A 得知化合物 57 對大部分之 cancer cell lines 都具有相當強的抑制活性， $\log GI_{50}$ 之 MG-MID (mean graph midpoint) 為 -6.22 M，化合物 57 對 HGC2998 之 cell line 之抑制活性最強， $\log GI_{50}$ 為 -6.86 M；其次為 OVCAR-4 之 ovarian cancer cell line， $\log GI_{50}$ 為 -6.76 M。再以 $\log TGI$ 的尺度來衡量，如 Fig. 24-B 所示，化合物 57 之 MG-MID 為 -4.61 M，對 breast cancer 之 BSY-1、CNS cancer 之 SF-539、colon cancer 之 HGC2998、lung cancer 之 NCI-H552、Ovarian cancer 之 OVCAR-4 及 SK-OV-3、renal cancer 之 RXF-631L 以及 prostate cancer 之 DU-145 等癌細胞株都呈現很強之抑制活性。若以 $\log LC_{50}$ 之尺度加以衡量，則如 Fig. 24-C 所示，MG-MID 為 -4.05 M，而出現一個特殊現象

就是對 OVCAR-4 具有非常高的選擇性抑制活性，其 $\log LC_{50}$ 為 -6.02 M，與 MG-MID 相差 100 倍，頗具開發價值。因為一般而言，癌細胞之間的差異小於癌細胞與正常細胞，所以對某種癌細胞具有選擇性的化合物往往對正常細胞之傷害較少，可能是副作用較少之抗癌物質。

因為作用機轉相同的藥物都擁有相似之 finger print，在本測試模式中，將具有 DNA intercalation, tubulin inhibition, topoisomerase inhibition 等各種不同作用機轉的抗癌作用之 finger print 輸入電腦中以 COMPARE program 進行比對。

如 Fig. 25 所示，將化合物 57 之 finger print 輸入 database 中，經與已知抗癌藥物之 finger print 進行比對後，結果發現與三種 antimitotic agents 有類似性。與 navelbine 有些類似 ($r = 0.512$)，其次為 vindesine ($r = 0.461$) 及 taxol ($r = 0.452$)。

綜合以上篩選結果得知，化合物 57 在很低的濃度下就具有 significant differential growth inhibition。因為經 COMPARE program 比較結果發現化合物 57 與 navelbine 等 antimitotic agent 相比，接近 COMPARE negative ($r < 0.5$)。因此著者推測其作用機轉與 navelbine 有些類似但不盡相同，是屬於作用機轉新穎的抗癌物質，值得深入探討。

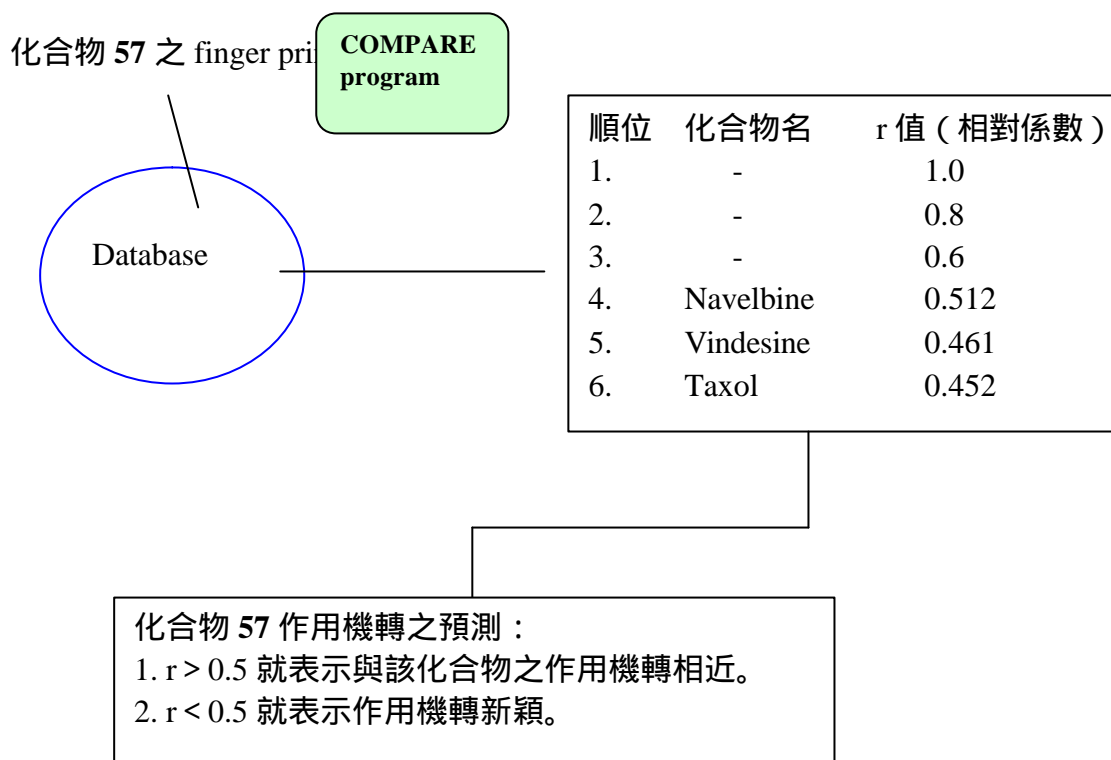


Fig. 25. 與化合物 57 finger print 類似之化合物及相對係數



(三) 利用人類癌細胞 (human cancer cell line panel) 評估化合物 68 之抗癌活性

從以上結果得知，化合物 57 是頗具開發潛能之抗癌物質，但是因為化合物 57 對水及 DMSO 等溶媒的溶解度都不佳，所以藥理活性乃至臨床應用上都有不便之處，於是著者將化合物 57 轉變成 tromethamine salt (化合物 68)，也仿照化合物 57 以 human cancer cell line panel 作篩選，其結果略述如下：

首先測試化合物 68 對 39 種人類癌細胞的增殖抑制活性，作成 dose-response curves，如 Fig. 26 所示。進而利用這些 curves 求出 GI_{50} 、TGI 及 LC_{50} 等數據，再將這些數據作成化合物 68 化合物之 mean graphs (Fig. 27-A, Fig. 27-B, Fig. 27-C)。

從 Fig. 27-A 得知 $\log GI_{50}$ 之 MG-MID 為 -5.48 M，此化合物對 HGC2998 之 colon cancer cell line 之抑制活性特別強； $\log GI_{50}$ 為 -7.23 M，相當於 MG-MID 之約 56 倍。其次為對 OVCAR-4 ovarian cancer cell line 之抑制活性， $\log GI_{50}$ 為 -6.55 M。另外以 $\log TGI$ 來評估，則如 Fig. 27-B 所示，仍然以對 HGC2998 及 OVCAR-4 之抑制活性最強。若以 $\log LC_{50}$ 之尺度來評估 (Fig. 27-C)，結果發現化合物 68 對 HGC2998 及 OVCAR-4 具有相當高之選擇性。兩者 $\log LC_{50}$ 分別為 -5.06 M 及 -5.17 M，相當於 MG-MID 之 10 倍左右。

再以化合物 68 之 finger print 輸入 data base 中與已知的抗癌藥以 COMPARE program 比較分析 (Fig. 28)，結果發現 COMPARE negative ($r < 0.5$)，且 r-value 最大的藥物 E7010，但是其 r-value 只有 0.445，相似性並不高。

總之，由以上篩選結果得知，化合物 68 是 significant differential growth inhibition 很強的化合物。因為是 COMPARE negative ($r < 0.5$)，所以推測它是一種作用機轉新穎的抗癌物質。

化合物 68 之 finger print

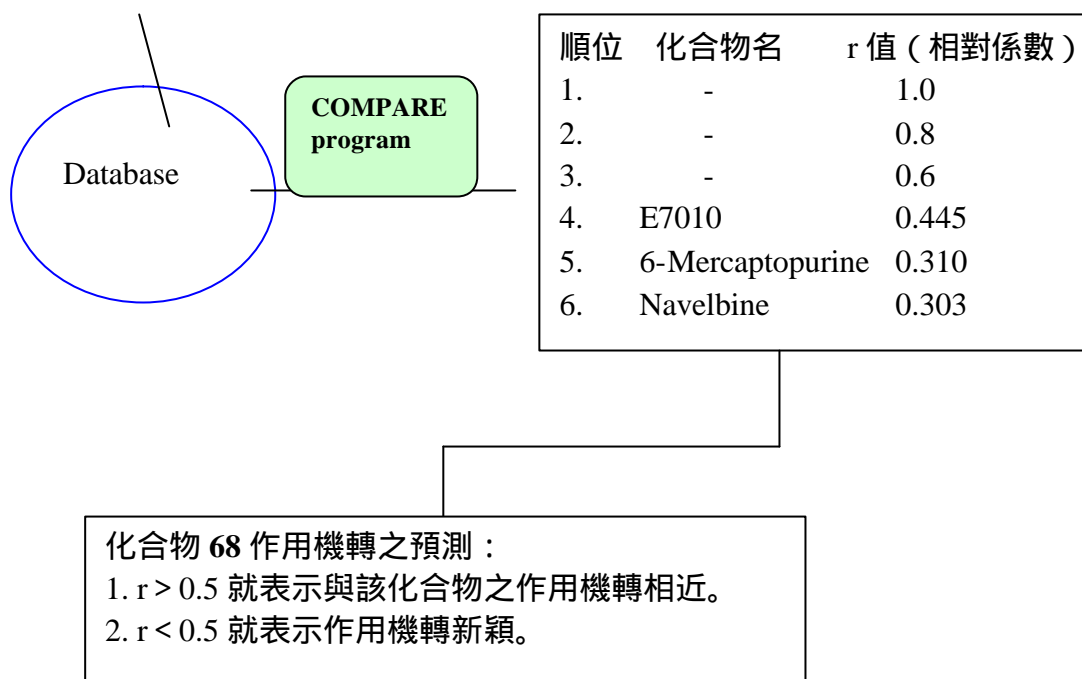


Fig. 28. 與化合物 68 finger print 類似之化合物及相對係數

(四) 與化合物 57 或 68 抗癌活性較為相近之五種抗癌藥物的概述

茲於此將與化合物 57 或 68 經 COMPARE program 比對抗癌活性後，對 39 種癌細胞抑制活性較為相近的五種抗癌藥物，包括 navelbine、vindesine、taxol、E7010、6-mercaptopurine 等做一概述，五種抗癌藥物之結構如 Fig. 29 所示。

Navelbine

Navelbine (vinorelbine, KW-2307) 為活性相當強之抗有絲分裂微管劑，屬於第二代 vinca 生物鹼衍生物，1990s 年代由法國學者 Potier 等以半合成方式得到。儘管同樣作用於微管，Navelbine 與第一代 vinca 生物鹼衍生物（如 vinblastine）相較後，二者之作用機制並盡不相同。Navelbine 主要是減慢微管聚合速率促使聚合時間延長及減少微管解聚的時間，而 vinblastine 對微管卻無上述之作用¹¹⁴⁻¹¹⁵；另一方面 navelbine 對於人體神經系統軸突之微小管次體之親合性較小，navelbine 須在較高的濃度下時才可能對神經細胞之軸突產生影響，因此臨床上 navelbine 較老一代的長春花生物鹼抗癌藥物具有較輕微的末梢神經毒性，這較輕微的末梢神經毒性正是 navelbine 之特點之一。

在臨床上，navelbine 對非小細胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 及乳癌已進入臨床試驗 phase II 階段；navelbine 作用於 NSCLC PC-9 細胞株的機制，由細胞周期的表現可觀察到主要是停留在 G2/M 期¹¹⁶。另一方面，在 nude mice xenografted human tumor models，navelbine 對 11 種癌細胞中的 8 種有明顯之抑制活性¹¹⁷，包括(non-small cell lung cancer: 4/4, breast cancer: 2/3, colon cancer: 0/2, stomach cancer: 2/2)，尤其在抑制 NSCLC 的表現，比臨床上曾為主要藥物的 vindesine 活性更佳、神經毒性更小。另外在乳癌的治療上，navelbine 則屬於第一線及第二線用藥。

Vindesine (Eldisine, Fildesin)

Vindesine 為 vinca 生物鹼衍生物，臨床上主要用來治療 melanoma、lung cancer，也可並用其它藥物用以治療 uterine cancer。Vindesine 的毒性與 vinblastine 相似。

Taxol (paclitaxel)

紫杉醇 (taxol) 抗癌藥為促進微管聚合、抑制微管解聚的抗微管物，結合在微管 subunit 上。目前主要用於治療乳癌及卵巢癌。詳細敘述見第一章第一節。

E7010

E7010 (*N*-[2-[(4-hydroxyphenyl)amino]-3-pyridinyl]-4-methoxybenzene sulfonamide)

是 sulfonamide 類抗微管聚合的抗癌物¹¹⁸⁻¹¹⁹，結合在微管 β -3 isotype 的 colchicine binding site 而抑制微管聚合，作用的模式與 vincristine、taxol 不同¹²⁰，並使細胞周期為停留在 M 期¹⁴³。對人類腫瘤細胞有很廣泛的抑制活性¹²¹，目前已在臨床實驗的 phase II。

6-Mercaptopurine

Mercaptopurine 屬於抗代謝類的抗癌劑，化學結構類似於身體內 purines、adenine 及 hypoxanthine。Mercaptopurine 在身體內會轉變為 ribonucleotide，形成 purine 的拮抗劑，使 DNA 與 RNA 的合成受到抑制。Mercaptopurine 也是作用甚強的免疫抑制劑，可抑制初期的免疫反應，具選擇性地抑制人類免疫作用。

化合物 57 經 COMPARE program 比對抗癌活性後，最為相近的抗癌藥物是 vinca 生物鹼的 navelbine，由 $r = 0.512$ 可發現兩者之相似程度雖不高，但 navelbine 也是抑制微管聚合的作用，相較於化合物 57 其結構較為複雜，然而兩者卻有相似的作用。化合物 57 的 tromethamine salt (68) 作用於細胞時的結構應是相同的，但經 COMPARE program 比對抗癌活性後，最為相近的抗癌藥物亦屬於抗微管聚合作用的 E7010，其結構較為簡單。因此經 COMPARE program 比對後，化合物 57、68 其個別相似的抗癌藥物(navelbine, E7010)不同且結構差異相當大，但同屬於抗微管聚合作用，故化合物 57、68 兩化合物之對 39 種細胞株的抑制作用似乎不全然相同，因此從結構的觀點頗值得再做進一步的探討與分析。

貳、對 PC-3、HL60 細胞週期的影響

(一) 化合物 57 對 PC-3 細胞週期的影響

著者另將化合物 57 委託台大藥理研究所鄧哲明教授代為測試 PC-3、CCRF-CEM、MDA-MB-231 細胞增殖抑制活性及細胞週期的影響，發現化合物 57 於 3-30 μ M 的濃度作用下，均能造成 PC-3、CCRF-CEM 細胞程度不一的細胞毒殺作用(如 Fig.30、Fig.31)，而化合物 57 於 1-30 μ M 的濃度作用下，亦能造成 MDA-MB-231 細胞程度不一的細胞毒殺作用(如 Fig.32)。

因為化合物 57 有明顯之細胞增殖抑制活性，因此進一步測試其對 LDH release assay 的影響。細胞死亡之機制分為細胞凋亡 (apoptosis) 和細胞壞死 (necrosis) 兩種。其中，necrosis 會引發發炎等不良反應；而 apoptosis 則為體內清除細胞的正常生理機制之一。是否有 lactate dehydrogenase (LDH) 的釋放，是細胞破裂壞死的特徵之一 (LDH 釋放愈多，細胞死亡愈有可能是 necrosis 造成)。由 Fig. 33 可發現在化合物 57 處理 24 小時的 PC-3 細胞與 MDA-MB-231 細胞，LDH 釋放並無明顯增加 (n = 1)，顯示其細胞毒殺作用有可能是經由細胞凋亡 (apoptosis) 而來，但仍須藉由其它 assay 作進一步確認。

此外，針對 PC-3 細胞週期試驗，在 flow cytometry 發現化合物 57 以 3×10^{-6} M 濃度處理 PC-3 細胞 48 小時 (10% FBS 存在) 後，其 sub-G1、G2/M phase 與 control 比分別由 7.4%、23.89% 增加為 24.9% 及 52.5% (n = 1)，是以化合物 57 會影響 PC-3 細胞週期的進行，造成 G2/M arrest，而此作用可能與其造成 PC-3 細胞死亡有關。

(二) 化合物 57、68 對 HL-60 細胞週期的影響

細胞的增殖作用主要受到細胞週期的調控，而腫瘤細胞的生成是因為細胞週期失去控制所致，因而導致細胞不斷地增殖未成熟之子細胞。而在細胞週期由 G2 phase 到 M phase，這段期間細胞是進行有絲分裂，在分裂過程中微管蛋白扮演極重要角色，因此若是化合物會干擾微管蛋白聚合作用，吾將觀察到細胞週期在 G2/M phase 會有明顯之改變。因此著者將細胞增殖抑制較顯著之化合物 57、68 進行細胞週期的試驗，結果如 Table 12 所示。化合物 68 在濃度 4 μ M 的情形下對 HL-60 細胞的影響，6 小時之際就發生 G2/M phase arrest，其百分比達 63.7%，可很明顯看出化合物 68 正如預期推測，其主要是干擾細胞週期的有絲分裂階段。

反觀化合物 57 在濃度 2 μ M 的情形下對 HL-60 細胞的影響，在 6 小時對 G2/M phase arrest 有明顯的影響，但 18 小時以後 G2/M phase arrest 影響降低，反而是對 S phase arrest 有作用。

由此現象不難發現化合物 57 與 68 在細胞週期的表現是不盡相同的，這是一個相當有趣的試驗結果，因為兩者結構相同，唯化合物 68 是化合物 57 的 tromethamine 鹽類，或許可能是因為化合物 *in vitro* 試驗時，在培養基的酸鹼環境造成兩者活性表現不同，或是兩者之 IC₅₀ 濃度不同而影響細胞週期測試的結果。而確實的影響仍須做更深入的機轉探討才可得知其差異的原因。

綜合以上之結果，化合物 57 與 68 對 PC-3、HL60 細胞週期的影響，皆主要是作用在 G2/M phase arrest。

Table 12. The cell cycle effect of HL-60 cell line

compounds	hr	Sub G1 phase	G0 / G1 phase	G2 / M phase	S phase
Control	06	4.9 ± 3.7	37.1 ± 1.2	10.8 ± 1.3	52.2 ± 2.5
	12	0.5 ± 0.7	37.0 ± 0.1	7.4 ± 0.9	55.7 ± 0.7
	18	4.0 ± 1.7	28.7 ± 1.0	10.8 ± 2.0	60.5 ± 3.0
	24	1.5 ± 1.0	36.9 ± 1.6	13.5 ± 0.3	49.7 ± 1.3
57 2 µM	06	3.2 ± 3.3	0.5 ± 0.5 ***	50.4 ± 1.3 ***	49.0 ± 1.5
	12	17.8 ± 2.0 **	12.4 ± 0.4 ***	35.5 ± 2.1 ***	49.8 ± 0.6 **
	18	25.4 ± 2.9 **	20.7 ± 5.0	19.1 ± 4.7	75.7 ± 4.2 *
	24	26.8 ± 6.8 *	7.5 ± 1.9 ***	22.2 ± 4.2	78.2 ± 6.6 *
68 4 µM	06	0.2 ± 0.4	0.2 ± 0.4 ***	63.7 ± 2.1 ***	36.1 ± 2.2 **
	12	2.0 ± 1.0	5.5 ± 0.8 ***	65.0 ± 0.3 ***	30.3 ± 1.7 ***
	18	13.7 ± 6.5	3.9 ± 2.7 ***	54.7 ± 4.9 **	42.3 ± 0.6 *
	24	24.9 ± 1.0 ***	9.4 ± 2.1 ***	56.8 ± 2.9 ***	32.8 ± 2.2 **

Leukemia cells (1.0×10^5) were incubated with IC₅₀ in 6, 12, 18 and 24 hrs.

Data was presented as mean ± SD from three separate experiments.

* p < 0.05 compared with control.

** p < 0.01 compared with control.

*** p < 0.001 compared with control.

參、嗜中性白血球超氧自由基形成之抑制活性

嗜中性白血球在個體防禦病菌感染時扮演重要的角色。在受到適當的刺激時會產生超氧自由基來殺死病原菌，但細胞過度活化會產生過量的超氧自由基，反而對周圍正常的組織細胞有損傷。這些細胞損傷可能與許多疾病的致病原有關，包括肺氣腫、急性呼吸困難、動脈硬化、類風濕性關節炎等疾病的發生與惡化。藥物若能抑制過多的超氧自由基產生，則有助於減少對組織的傷害。

如 Table 13-15 所示，對於 fMLP 誘導老鼠嗜中性白血球超氧自由基生成作用的抑制試驗中，2-phenyl-4-quinolone 類化合物中以第三位 COOEt 的水解為 COOH 後，酸基取代之化合物的抑制活性顯然較強，而酯類中間產物中唯有 35 與 36 有明顯之抑制，其 IC₅₀ 依序為 16.3 及 17.6 μM。

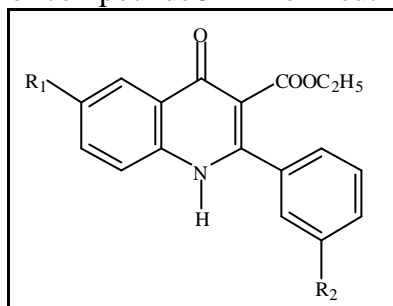
標的化合物中以化合物 57 對 fMLP 誘導老鼠嗜中性白血球過氧化物形成的抑制 (IC₅₀ = 8.1 μM) 最強，與 trifluoperazine (IC₅₀ = 6.2 μM) 的活性相當；化合物 51 (IC₅₀ = 10.8 μM)、52 (IC₅₀ = 20.9 μM)、54 (IC₅₀ = 18.9 μM)、55 (IC₅₀ = 17.2 μM)、56 (IC₅₀ = 18.9 μM)、58 (IC₅₀ = 13.9 μM) 對 fMLP 誘導老鼠嗜中性白血球超氧自由基形成的抑制活性也分別具有明顯之活性，其餘的化合物抑制活性皆不明顯。

在鹽類部分則以化合物 62 (IC₅₀ = 23.2 μM)、66 (IC₅₀ = 15.2 μM)、69 (IC₅₀ = 20.7 μM) 具有較明顯之活性。第 6 位是 F、第 3' 位為 OCH₃ 取代的酸基與 tromethamine 鹽類化合物(36, 52) 兩者皆對 fMLP 誘導老鼠嗜中性白血球超氧自由基形成的抑制有作用外，其餘的酸基取代與 tromethamine 鹽類活性大小的差異都較大，有些是酸基取代如化合物 52、54-56、58 有活性而 tromethamine 鹽類的化合物(63, 65-67, 69) 無活性；有些則是 tromethamine 鹽類如化合物 66、69 有活性而酸基取代的化合物(55, 58) 無活性。

綜合以上，對 fMLP 誘導老鼠嗜中性白血球超氧自由基形成的抑制結果可歸納下列三點：

- (一) 當 2-PQ 類化合物在第三位為酸基取代時抑制活性較酯類或 tromethamine 鹽類強。
- (二) 2-PQ 類化合物第三位酸基取代與 tromethamine 鹽類活性大小的差異都較大，所以這兩類化合物作用機制或許不同。
- (三) 當 2-PQ 類化合物在第三位為酸基取代時，以第 6 位是 methoxy、第 3' 位是 fluoro 取代時活性最強，效價與 trifluoperazine 相當。

Table 13. The inhibitory effects of compounds **34-44** on neutrophil superoxide formation (*in vitro*)



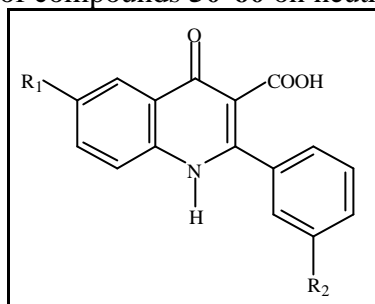
Animal: Rat (Sprague Dawley)

Inducer: fMLP (0.3 μ M) / cytochalasin B (5 μ g/ml)

Inducer: PMA (3 nM)

Drugs	R ₁	R ₂	Conc. (μ M)	Superoxide Formation (nmol/10 ⁶ cells/30 min)			
				fMLP	% inhibition	PMA	% inhibition
Control				5.84 \pm 0.18		4.93 \pm 0.19	
34	F	F	10	4.07 \pm 0.15	30.2 \pm 1.3**	4.47 \pm 0.38	9.2 \pm 7.2
			30	3.69 \pm 0.13	36.8 \pm 2.1**	3.14 \pm 0.38	35.8 \pm 9.5*
35	F	Cl	3	4.77 \pm 0.34	18.5 \pm 0.8	--	
			10	3.36 \pm 0.33	42.8 \pm 1.7**	3.47 \pm 0.15	29.0 \pm 5.7*
			30	2.34 \pm 0.26	60.1 \pm 2.1**	3.40 \pm 0.35	30.5 \pm 8.6*
IC ₅₀ (μ M)				16.3 \pm 0.9			
36	F	OCH ₃	3	4.67 \pm 0.36	20.3 \pm 1.1*	--	
			10	3.38 \pm 0.25	42.3 \pm 1.8**	3.82 \pm 0.29	22.7 \pm 3.0
			30	2.48 \pm 0.20	57.7 \pm 0.3**	4.93 \pm 0.27	0.01 \pm 4.0
IC ₅₀ (μ M)				17.6 \pm 0.6			
38	Cl	F	10	3.98 \pm 0.25	31.9 \pm 2.5**	4.39 \pm 0.24	10.9 \pm 3.9
			30	4.68 \pm 0.39	20.1 \pm 4.4*	4.92 \pm 0.39	0.3 \pm 6.5
39	Cl	Cl	10	3.95 \pm 0.23	32.3 \pm 3.1**	4.49 \pm 0.06	8.8 \pm 2.5
			30	3.12 \pm 0.18	46.4 \pm 3.9**	5.02 \pm 0.20	-2.0 \pm 5.1
40	Cl	OCH ₃	10	3.96 \pm 0.28	32.3 \pm 2.8**	3.77 \pm 0.10	23.4 \pm 1.5
			30	4.36 \pm 0.20	25.3 \pm 2.1**	4.04 \pm 0.22	17.6 \pm 6.6
41	OCH ₃	F	10	4.49 \pm 0.32	23.0 \pm 5.2**	4.24 \pm 0.09	13.7 \pm 2.0
			30	4.07 \pm 0.59	29.8 \pm 11.4**	4.04 \pm 0.43	17.1 \pm 11.7
42	OCH ₃	Cl	10	4.64 \pm 0.34	20.8 \pm 3.4*	4.02 \pm 0.20	18.4 \pm 2.6
			30	4.64 \pm 0.18	20.6 \pm 1.3**	5.40 \pm 0.49	-9.1 \pm 6.1
43	OCH ₃	OCH ₃	10	4.39 \pm 0.26	24.9 \pm 2.3**	4.12 \pm 0.44	15.6 \pm 11.7
			30	4.49 \pm 0.26	23.2 \pm 3.0**	3.75 \pm 0.30	23.3 \pm 8.7
44	OCH ₃	H	10	5.38 \pm 0.33	7.9 \pm 3.0	4.29 \pm 0.05	12.5 \pm 4.4
			30	5.48 \pm 0.56	6.5 \pm 7.5	4.26 \pm 0.34	13.2 \pm 7.3
TFP			3	4.41 \pm 0.08	24.3 \pm 1.9*	4.49 \pm 0.24	8.6 \pm 2.0
			10	1.14 \pm 0.17	78.1 \pm 5.4**	0.94 \pm 0.09	80.2 \pm 2.0**
			30	0.03 \pm 0.12	99.1 \pm 3.3**	0.39 \pm 0.03	90.9 \pm 0.4**
IC ₅₀ (μ M)				6.2 \pm 0.3		7.6 \pm 0.3	

Table 14. The inhibitory effects of compounds **50-60** on neutrophil superoxide formation (*in vitro*)



Animal: Rat (Sprague Dawley)

Inducer: fMLP (0.3 μ M) / cytochalasin B (5 μ g/ml)
Inducer: PMA (3 nM)

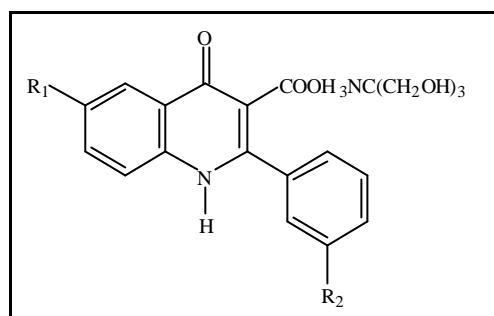
Drugs	R ₁	R ₂	Conc. (μ M)	Superoxide Formation (nmol/10 ⁶ cells/30 min)			
				fMLP	% inhibition	PMA	% inhibition
Control				44.0 \pm 0.7		68.1 \pm 2.2	
50	F	F	10	3.91 \pm 0.06	32.9 \pm 1.7**	4.19 \pm 0.55	14.5 \pm 12.7
			30	3.21 \pm 0.30	44.5 \pm 6.5**	3.95 \pm 0.12	19.4 \pm 5.4
51	F	Cl	3	4.68 \pm 0.44	20.3 \pm 1.4*	--	
			10	3.02 \pm 0.17	48.0 \pm 2.7**	4.36 \pm 0.14	11.5 \pm 1.0
			30	1.55 \pm 0.15	73.6 \pm 0.6**	4.45 \pm 0.28	9.6 \pm 6.0
IC ₅₀ (μ M)				10.8 \pm 0.4			
52	F	OCH ₃	3	5.21 \pm 0.43	11.0 \pm 2.0	--	
			10	3.60 \pm 0.32	38.6 \pm 1.0**	4.20 \pm 0.09	14.6 \pm 2.8
			30	2.60 \pm 0.27	55.7 \pm 1.7**	3.18 \pm 0.39	34.6 \pm 10.2*
IC ₅₀ (μ M)				20.9 \pm 1.9			
54	Cl	F	3	4.96 \pm 0.51	15.4 \pm 4.9	--	
			10	3.60 \pm 0.27	38.4 \pm 0.6**	3.74 \pm 0.25	24.2 \pm 2.1
			30	2.45 \pm 0.20	58.2 \pm 0.3**	4.13 \pm 0.18	15.6 \pm 6.9
IC ₅₀ (μ M)				18.9 \pm 0.2			
55	Cl	Cl	3	4.85 \pm 0.45	17.3 \pm 1.3	--	
			10	3.41 \pm 0.40	42.1 \pm 2.4**	3.72 \pm 0.40	23.8 \pm 10.5
			30	2.35 \pm 0.40	60.4 \pm 4.1**	3.97 \pm 0.44	18.6 \pm 11.8
IC ₅₀ (μ M)				17.2 \pm 2.9			
56	Cl	OCH ₃	3	4.46 \pm 0.27	23.6 \pm 1.6**	--	
			10	3.29 \pm 0.19	43.6 \pm 2.7**	4.21 \pm 0.20	14.1 \pm 6.6
			30	2.65 \pm 0.20	54.6 \pm 0.7**	7.04 \pm 0.42 *	-43.3 \pm 12.0
IC ₅₀ (μ M)				18.9 \pm 1.5			
57	OCH ₃	F	3	3.63 \pm 0.39	38.2 \pm 2.2**	--	
			10	2.72 \pm 0.22	53.4 \pm 1.3**	6.55 \pm 0.28	-32.8 \pm 4.9*
			30	2.09 \pm 0.24	64.4 \pm 1.6**	6.69 \pm 0.07	-35.9 \pm 3.7*
IC ₅₀ (μ M)				8.1 \pm 1.1			
58	OCH ₃	Cl	3	4.78 \pm 0.33	18.1 \pm 2.7	--	
			10	3.24 \pm 0.29	44.8 \pm 1.0**	3.66 \pm 0.38	24.9 \pm 9.7
			30	2.08 \pm 0.22	64.7 \pm 1.1**	4.71 \pm 0.57	3.4 \pm 14.3
IC ₅₀ (μ M)				13.9 \pm 0.3			
59	OCH ₃	OCH ₃	10	3.45 \pm 0.15	40.6 \pm 3.8**	5.52 \pm 0.41	-12.8 \pm 12.4
			30	3.04 \pm 0.27	47.9 \pm 4.8**	6.90 \pm 0.68	-40.1 \pm 14.2*
60	OCH ₃	H	10	3.74 \pm 0.31	36.1 \pm 3.7**	4.36 \pm 0.17	11.3 \pm 3.5

TFP	30	3.49±0.18	40.2±1.4**	3.40±0.42	30.0±10.9
	3	4.41±0.08	24.3±1.9*	4.49±0.24	8.6±2.0
	10	1.14±0.17	78.1±5.4**	0.94±0.09	80.2±2.0**
	30	0.03±0.12	99.1±3.3**	0.39±0.03	90.9±0.4**
IC ₅₀ (μM)			6.2±0.3	7.6±0.3	

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; N = 3;

Trifluoperazine (TFP): positive control

Table 15. The inhibitory effects of compounds **61-71** on neutrophil superoxide formation (*in vitro*)



Animal: Rat (Sprague Dawley) Inducer: fMLP (0.3 μM) / cytochalasin B (5 $\mu\text{g/ml}$)

Drugs	R ₁	R ₂	Conc. (μM)	Inducer: PMA (3 nM)			
				Superoxide Formation (nmol/10 ⁶ cells/30 min)			
				fMLP	% inhibition	PMA	% inhibition
Control				1.73 \pm 0.17		2.99 \pm 0.07	
61	F	F	10	1.15 \pm 0.11	33.6 \pm 0.3**	3.78 \pm 0.17	-26.7 \pm 9.0*
			30	1.05 \pm 0.17	39.6 \pm 4.8**	5.97 \pm 0.31	-99.3 \pm 6.6**
62	F	Cl	3	1.50 \pm 0.14	13.3 \pm 2.0	--	
			10	1.28 \pm 0.12	25.7 \pm 0.5*	2.37 \pm 0.21	21.0 \pm 5.3
			30	0.74 \pm 0.07	57.2 \pm 1.3**	2.87 \pm 0.06	3.8 \pm 4.6
			IC ₅₀ (μM)	23.2 \pm 1.4			
63	F	OCH ₃	10	1.34 \pm 0.13	22.3 \pm 0.5	2.75 \pm 0.31	8.4 \pm 8.2
			30	1.12 \pm 0.12	35.2 \pm 2.8**	2.30 \pm 0.31	23.3 \pm 8.5
65	Cl	F	10	1.09 \pm 0.21	37.4 \pm 10.0**	2.31 \pm 0.10	22.6 \pm 3.8
			30	0.92 \pm 0.05	46.0 \pm 2.7**	3.69 \pm 0.50	-22.7 \pm 13.7
66	Cl	Cl	3	1.47 \pm 0.12	14.7 \pm 2.3	--	
			10	1.17 \pm 0.10	32.3 \pm 4.0**	2.55 \pm 0.20	14.7 \pm 7.0
			30	0.52 \pm 0.02	69.3 \pm 2.9**	2.42 \pm 0.26	18.9 \pm 7.9
IC ₅₀ (μM)			15.2 \pm 1.3				
67	Cl	OCH ₃	10	1.48 \pm 0.22	14.4 \pm 9.9	2.68 \pm 0.08	10.4 \pm 0.4
			30	1.06 \pm 0.18	39.4 \pm 7.7**	2.57 \pm 0.05	14.1 \pm 1.9
68	OCH ₃	F	10	1.27 \pm 0.16	27.0 \pm 3.8**	3.42 \pm 0.08	-16.5 \pm 0.8
			30	1.01 \pm 0.12	41.9 \pm 2.3	5.20 \pm 0.08	-73.7 \pm 2.4**
69	OCH ₃	Cl	3	1.50 \pm 0.09	12.3 \pm 6.0	--	
			10	1.17 \pm 0.09	32.1 \pm 1.5**	2.31 \pm 0.42	23.3 \pm 12.3
			30	0.72 \pm 0.06	58.3 \pm 0.6**	2.96 \pm 0.25	1.3 \pm 6.1
IC ₅₀ (μM)			20.7 \pm 1.1				
70	OCH ₃	OCH ₃	10	1.03 \pm 0.26	41.8 \pm 11.9**	2.09 \pm 0.19	30.1 \pm 4.7*
			30	0.94 \pm 0.18	46.5 \pm 8.1**	2.13 \pm 0.23	28.1 \pm 9.6
71	OCH ₃	H	10	1.22 \pm 0.19	30.0 \pm 8.1**	2.55 \pm 0.08	14.5 \pm 3.3
			30	1.03 \pm 0.13	40.4 \pm 4.9**	2.22 \pm 0.33	26.0 \pm 10.0
TFP			3	1.31 \pm 0.04	24.3 \pm 1.9*	27.2 \pm 0.24	8.6 \pm 2.0
			10	0.36 \pm 0.08	78.1 \pm 5.4**	0.57 \pm 0.09	80.2 \pm 2.0**
			30	0.01 \pm 0.05	99.1 \pm 3.3**	0.24 \pm 0.03	90.9 \pm 0.4**
IC ₅₀ (μM)				6.2 \pm 0.3		7.6 \pm 0.3	

The neutrophil suspension was preincubated at 37 °C with 0.5 % DMSO or tested compound for 3 min. Fifteen minutes after the addition of PMA, the absorbance was determined at 550 nm. Values are presented as mean \pm S.E., n = 3, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ Trifluoperazine (TFP): positive control

肆、嗜中性白血球脫顆粒反應之抑制活性

2-phenyl-4-quinolone 類標的化合物對 fMLP 所誘發老鼠嗜中性白血球脫顆粒反應之抑制活性，如 Table 16-18 所示。此類化合物之 IC₅₀ 都大於 30 μ M，抑制活性相當弱。

伍、肥胖細胞脫顆粒反應之抑制活性

如 Table 19-21 所示，以 compound 48/80 誘發老鼠肥胖細胞脫顆粒反應之抑制試驗中，2-phenyl-4-quinolone 類化合物中只有第三位為酯基取代的化合物 **38**（第 6 位是 chloro，第 3' 位是 fluoro）與化合物 **35**（第 6 位是 fluoro，第 3' 位是 chloro）在濃度為 30 μ M 均有約 38% 的抑制活性外，其餘化合物無論是酯類、酸基或 tromethamine 鹽類取代之 IC₅₀ 都大於 30 μ M，抑制活性相當不明顯。

陸、一氧化氮蓄積之抑制活性

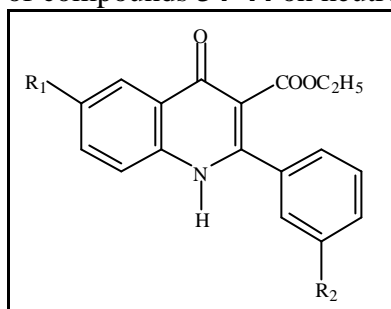
2-phenyl-4-quinolone 類化合物對於 RAW 264.7 細胞中一氧化氮蓄積與 LPS + IFN- γ 刺激 N9 細胞中一氧化氮蓄積之抑制活性，如 Table 22-24 所示。此類化合物之 IC₅₀ 都大於 30 μ M，抑制活性相當弱。

柒、TNF- α 形成之抑制活性

關於 2-phenyl-4-quinolone 類化合物對 LPS 刺激末梢巨噬細胞(peripheral macrophage, RW 264.7 cells) 及之抑制活性，如 Table 25-27 所示。化合物 **38**、**44**、**55** 在 30 μ M 濃度下對 LPS 刺激 RW 264.7 細胞中 TNF- α 形成，均有大於 30% 的抑制活性。化合物 **34**、**68** 在 30 μ M 濃度下，對 LPS + IFN- γ 刺激 N9 細胞中 TNF- α 形成呈現較明顯的抑制，抑制百分比分別為 39.3 % 及 32.7 %。

從 Table 25-27 也可明顯看出化合物 **35**、**36**、**39**、**43**、**56**、**57**、**59**、**61**、**66** 及 **68** 在 30 μ M 有細胞致毒活性，其中化合物 **57**、**59** 甚至在 10 μ M 的低濃度下仍具細胞致毒活性。

Table 16. The inhibitory effects of compounds **34-44** on neutrophil degranulation (*in vitro*)



Animal: Rat (Sprague Dawley)

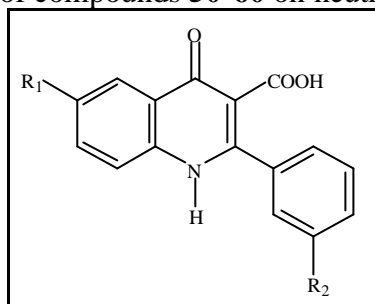
Inducer: fMLP (1 M)/ cytochalasin B (5 µg/ml)

Drugs	R ₁	R ₂	Conc. (µM)	Percent Release			
				? -Glucuronidase	% inhibition	Lysozyme	% inhibition
Control				44.0±0.7		68.1±2.2	
34	F	F	10	41.3±1.6	6.1±2.3	68.6±1.6	-0.8±5.0
			30	36.0±0.9	18.1±1.9	65.8±2.0	3.0±5.9
35	F	Cl	10	34.6±1.7	21.3±2.8*	62.5±2.4	7.9±5.2
			30	35.3±1.6	19.7±2.5	57.8±0.8	14.9±2.8
36	F	OCH ₃	10	34.3±0.6	22.0±0.3*	61.3±3.3	10.1±2.5
			30	31.7±0.9	7.9±1.2**	65.0±0.7	4.3±3.4
38	Cl	F	10	33.6±0.8	23.6±1.9**	61.2±4.5	10.3±3.8
			30	32.9±0.5	25.1±1.3**	62.0±3.7	9.0±2.5
39	Cl	Cl	10	29.0±1.4	34.0±2.3**	57.7±7.6	15.9±8.6
			30	31.0±1.3	29.6±1.9**	56.7±5.8	17.1±6.0
40	Cl	OCH ₃	10	35.8±0.7	18.6±1.5	61.8±4.4	9.5±3.5
			30	33.8±1.2	23.2±2.4**	61.3±3.7	10.2±2.5
41	OCH ₃	F	10	46.6±2.4	-5.7±4.4	66.6±4.2	2.4±3.4
			30	44.2±2.1	-0.4±3.2	69.2±2.5	-1.5±0.3
42	OCH ₃	Cl	10	34.5±1.8	21.6±3.1*	64.5±3.8	5.5±2.5
			30	42.8±1.4	2.7±2.4	65.5±3.2	4.0±1.6
43	OCH ₃	OCH ₃	10	36.5±0.6	16.9±1.1	65.0±3.7	4.6±2.3
			30	34.4±1.6	21.9±2.7*	64.3±4.0	5.8±3.2
44	OCH ₃	H	10	42.6±0.9	3.1±1.1	68.2±3.0	-0.1±2.1
			30	43.7±0.4	0.6±1.4	70.9±1.9	-4.1±1.0
TFP			3	45.7±1.9	-3.4±2.1	86.7±3.7	-27.0±4.1
			10	21.2±0.3	38.3±2.7**	48.4±0.4	27.5±5.8*
			30	6.0±0.6	87.1±2.7**	3.2±0.9	94.3±2.1**
IC ₅₀ (µM)				12.2±0.3		13.2±0.7	

The neutrophil suspension was preincubated at 37 °C with 0.5 % DMSO or tested compound for 3 min in the presence of cytochalasin B 5 µg/ml. Forty-five minutes after the addition of fMLP (1µM), β-glucuronidase and lysozyme in the supernatant was determined. Values are presented as mean ± S.E., n = 3, * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01

TFP (Trifluoperazine): positive control

Table 17. The inhibitory effects of compounds **50-60** on neutrophil degranulation (*in vitro*)



Animal: Rat (Sprague Dawley)

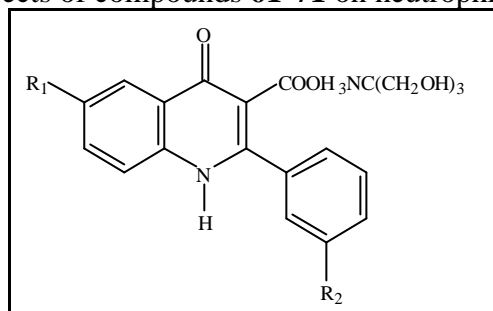
Inducer: fMLP (1 μ M)/ cytochalasin B (5 μ g/ml)

Drugs	R ₁	R ₂	Conc. (μ M)	Percent Release			
				β -Glucuronidase	% inhibition	Lysozyme	% inhibition
Control				44.0 \pm 0.7		68.1 \pm 2.2	
50	F	F	10	48.0 \pm 2.0	-9.0 \pm 3.9	70.4 \pm 2.5	-3.7 \pm 6.9
			30	43.1 \pm 0.9	1.9 \pm 1.4	68.7 \pm 2.1	-1.1 \pm 5.9
51	F	Cl	10	38.1 \pm 1.2	13.4 \pm 1.6	70.1 \pm 1.1	-3.1 \pm 5.0
			30	35.5 \pm 2.9	19.4 \pm 5.3	63.7 \pm 2.4	6.4 \pm 1.7
52	F	OCH ₃	10	36.3 \pm 1.1	17.4 \pm 2.0	66.7 \pm 2.0	1.7 \pm 6.3
			30	35.2 \pm 1.2	19.8 \pm 3.4*	61.8 \pm 2.2	9.2 \pm 3.1
54	Cl	F	10	36.1 \pm 1.0	17.9 \pm 1.6	64.7 \pm 4.6	5.2 \pm 3.7
			30	34.2 \pm 0.7	22.3 \pm 2.1*	63.0 \pm 3.6	7.7 \pm 2.4
55	Cl	Cl	10	38.8 \pm 1.0	11.9 \pm 1.9	66.9 \pm 4.8	2.0 \pm 4.4
			30	33.8 \pm 0.6	23.2 \pm 0.6**	63.3 \pm 4.9	7.3 \pm 4.3
56	Cl	OCH ₃	10	33.9 \pm 0.2	23.0 \pm 1.8**	63.1 \pm 3.5	7.4 \pm 2.2
			30	35.1 \pm 1.0	20.2 \pm 1.5*	60.9 \pm 4.3	10.8 \pm 3.4
57	OCH ₃	F	10	36.3 \pm 0.8	17.5 \pm 1.3	66.8 \pm 4.2	2.1 \pm 3.1
			30	43.0 \pm 0.9	2.1 \pm 0.8	64.9 \pm 1.0	4.5 \pm 3.5
58	OCH ₃	Cl	10	35.6 \pm 1.3	19.1 \pm 3.1*	65.4 \pm 3.1	4.1 \pm 1.4
			30	32.9 \pm 1.1	25.2 \pm 1.6**	60.2 \pm 3.3	11.6 \pm 2.3
59	OCH ₃	OCH ₃	10	39.4 \pm 1.4	10.3 \pm 3.0	63.9 \pm 2.1	6.1 \pm 1.1
			30	34.9 \pm 0.2	20.7 \pm 1.5*	63.2 \pm 0.5	7.0 \pm 2.4
60	OCH ₃	H	10	46.6 \pm 1.9	-5.8 \pm 3.6	67.9 \pm 3.0	0.4 \pm 1.1
			30	41.7 \pm 1.6	5.2 \pm 2.1	66.0 \pm 4.0	3.3 \pm 2.9
TFP			3	45.7 \pm 1.9	-3.4 \pm 2.1	86.7 \pm 3.7	-27.0 \pm 4.1
			10	21.2 \pm 0.3	38.3 \pm 2.7**	48.4 \pm 0.4	27.5 \pm 5.8*
			30	6.0 \pm 0.6	87.1 \pm 2.7**	3.2 \pm 0.9	94.3 \pm 2.1**
IC ₅₀ (μ M)				12.2 \pm 0.3		13.2 \pm 0.7	

The neutrophil suspension was preincubated at 37 °C with 0.5 % DMSO or tested compound for 3 min in the presence of cytochalasin B 5 μ g/ml. Forty-five minutes after the addition of fMLP (1 μ M), β -glucuronidase and lysozyme in the supernatant was determined. Values are presented as mean \pm S.E., n = 3, * P < 0.05, ** P < 0.01

TFP (Trifluoperazine): positive control

Table 18. The inhibitory effects of compounds **61-71** on neutrophil degranulation (*in vitro*)



Animal: Rat (Sprague Dawley)

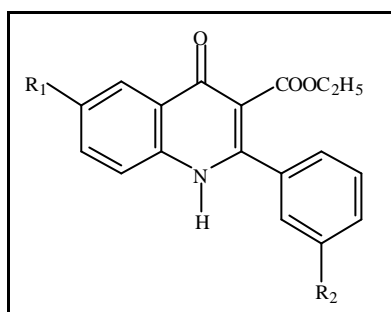
Inducer: fMLP (1 μ M)/ cytochalasin B (5 μ g/ml)

Drugs	R ₁	R ₂	Conc. (μ M)	Percent Release			
				β -Glucuronidase	% inhibition	Lysozyme	% inhibition
Control				27.1 \pm 0.5		64.6 \pm 1.2	
61	F	F	10	27.8 \pm 0.1	-2.7 \pm 1.9	64.1 \pm 1.5	0.8 \pm 2.1
			30	24.2 \pm 0.5	10.4 \pm 3.5	62.4 \pm 0.9	3.4 \pm 0.8
62	F	Cl	10	26.8 \pm 1.3	0.8 \pm 6.9	67.8 \pm 1.3	-4.8 \pm 1.4
			30	24.0 \pm 0.4	11.3 \pm 3.4	60.2 \pm 0.8	6.8 \pm 1.7
63	F	OCH ₃	10	26.4 \pm 0.5	2.6 \pm 3.9	68.3 \pm 1.6	-5.6 \pm 2.0
			30	23.1 \pm 0.5	14.5 \pm 3.6	64.3 \pm 1.2	0.5 \pm 1.5
65	Cl	F	10	25.6 \pm 0.4	5.4 \pm 2.2	64.7 \pm 0.9	-0.1 \pm 2.0
			30	22.2 \pm 0.8	18.0 \pm 2.8	57.2 \pm 1.5	11.4 \pm 1.7
66	Cl	Cl	10	24.5 \pm 0.4	9.5 \pm 0.2	63.1 \pm 0.5	2.2 \pm 0.8
			30	23.2 \pm 0.4	14.2 \pm 2.1	56.6 \pm 0.8	12.4 \pm 1.8
67	Cl	OCH ₃	10	24.5 \pm 0.3	9.5 \pm 1.6	63.3 \pm 0.5	2.0 \pm 0.6
			30	23.5 \pm 0.2	13.3 \pm 2.2	61.4 \pm 2.4	5.0 \pm 3.2
68	OCH ₃	F	10	23.8 \pm 0.7	12.1 \pm 3.9	58.0 \pm 3.3	10.0 \pm 5.6
			30	22.1 \pm 0.3	18.4 \pm 2.5	59.2 \pm 2.1	8.4 \pm 3.6
69	OCH ₃	Cl	10	25.6 \pm 1.3	5.6 \pm 3.9	64.2 \pm 3.7	0.6 \pm 5.8
			30	24.2 \pm 0.4	10.5 \pm 3.1	59.7 \pm 0.7	7.6 \pm 1.5
70	OCH ₃	OCH ₃	10	26.1 \pm 1.4	3.7 \pm 3.6	68.6 \pm 4.5	-5.9 \pm 6.3
			30	24.0 \pm 0.7	11.3 \pm 1.1	62.3 \pm 1.1	3.6 \pm 2.0
71	OCH ₃	H	10	25.5 \pm 0.4	5.7 \pm 3.5	64.9 \pm 2.4	-0.3 \pm 3.6
			30	24.7 \pm 1.2	8.5 \pm 4.8	64.6 \pm 0.1	0.1 \pm 0.4
TFP			3	28.1 \pm 1.9	-3.4 \pm 2.1	80.2 \pm 0.8	-27.0 \pm 4.1
			10	13.0 \pm 0.3	38.3 \pm 2.7**	45.0 \pm 0.1	27.5 \pm 5.8*
			30	3.6 \pm 0.6	87.1 \pm 2.7**	3.0 \pm 0.2	94.3 \pm 2.1**
IC ₅₀ (μ M)				12.2 \pm 0.3		13.2 \pm 0.7	

The neutrophil suspension was preincubated at 37 with 0.5 % DMSO or tested compound for 3 min in the presence of cytochalasin B 5 μ g/ml. Forty-five minutes after the addition of fMLP (1 μ M), β -glucuronidase and lysozyme in the supernatant was determined. Values are presented as mean \pm S.E., n = 3, * P < 0.05, ** P < 0.01

TFP (Trifluoperazine): positive control

Table 19. The inhibitory effects of compounds **34-44** on mast cell degranulation (*in vitro*)



Animal: Rat (Sprague Dawley)
 $\mu\text{g/ml}$)

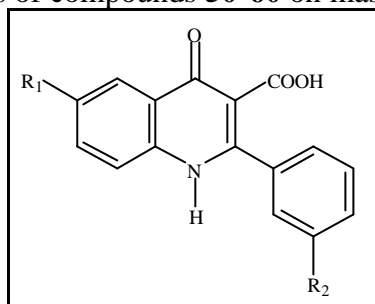
Inducer: Compound 48/80 (10

Drugs	R ₁	R ₂	Conc. (μM)	Percent Release			
				β -Glucuronidase	% inhibition	Histamine	% inhibition
Control				76.5 \pm 0.7		73.6 \pm 1.4	
34	F	F	10	69.6 \pm 0.7	9.0 \pm 0.4	66.0 \pm 1.8	10.2 \pm 1.6
			30	64.6 \pm 2.6	15.4 \pm 3.9	68.5 \pm 3.4	6.9 \pm 4.4
35	F	Cl	10	58.2 \pm 1.4	23.8 \pm 2.1*	65.4 \pm 1.4	11.0 \pm 2.6
			30	47.5 \pm 1.6	37.8 \pm 2.6**	46.1 \pm 1.3	37.1 \pm 2.7**
36	F	OCH ₃	10	63.9 \pm 1.4	16.3 \pm 1.8	69.0 \pm 2.7	6.2 \pm 3.2
			30	54.9 \pm 2.0	28.2 \pm 2.7**	64.7 \pm 2.5	12.2 \pm 2.2
38	Cl	F	10	66.6 \pm 0.2	12.8 \pm 1.1	70.7 \pm 1.6	3.8 \pm 2.1
			30	46.8 \pm 2.5	38.7 \pm 3.6**	56.5 \pm 1.4	23.1 \pm 1.6*
39	Cl	Cl	10	57.4 \pm 3.0	24.3 \pm 5.8**	73.0 \pm 1.7	1.0 \pm 1.3
			30	54.2 \pm 5.5	28.5 \pm 9.1**	70.5 \pm 1.5	4.4 \pm 1.5
40	Cl	OCH ₃	10	67.8 \pm 1.8	11.2 \pm 3.0	66.7 \pm 1.1	9.3 \pm 2.3
			30	66.9 \pm 1.2	12.4 \pm 2.1	68.0 \pm 0.8	7.5 \pm 2.3
41	OCH ₃	F	10	78.1 \pm 1.1	-2.1 \pm 2.1	73.7 \pm 1.6	-0.1 \pm 0.2
			30	77.8 \pm 1.3	-1.6 \pm 2.0	74.6 \pm 2.0	-1.3 \pm 0.8
42	OCH ₃	Cl	10	63.8 \pm 2.0	16.4 \pm 3.1	70.3 \pm 1.4	4.4 \pm 1.2
			30	75.1 \pm 0.3	1.8 \pm 0.4	69.7 \pm 2.0	5.3 \pm 2.8
43	OCH ₃	OCH ₃	10	67.3 \pm 1.8	11.9 \pm 2.8	72.0 \pm 3.5	2.2 \pm 3.3
			30	65.3 \pm 1.0	14.6 \pm 1.4	72.5 \pm 1.8	1.5 \pm 0.6
44	OCH ₃	H	10	70.5 \pm 1.3	7.8 \pm 2.0	72.2 \pm 0.9	1.9 \pm 1.2
			30	70.0 \pm 1.0	8.4 \pm 1.9	74.7 \pm 2.9	-1.3 \pm 2.1
Mepacrine			10	50.9 \pm 2.1	33.2 \pm 2.2**	61.2 \pm 1.9	17.0 \pm 2.3
			30	32.7 \pm 0.8	57.0 \pm 2.0**	53.9 \pm 2.1	26.9 \pm 2.9**
			300	7.6 \pm 1.2	90.1 \pm 1.4**	22.3 \pm 2.2	69.8 \pm 2.6**
IC ₅₀ (μM)				20.6 \pm 1.2		50.1 \pm 4.1	

The mast cell suspension was preincubated at 37 with 0.5 % DMSO or tested compound for 3 min. Fifteen minutes after the addition of compound 48/80 (10 $\mu\text{g/ml}$), β -glucuronidase and histamine in the supernatant was determined. Values are presented as mean \pm S.E., n = 3, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Mepacrine: positive control

Table 20. The inhibitory effects of compounds **50-60** on mast cell degranulation (*in vitro*)



Animal: Rat (Sprague Dawley)

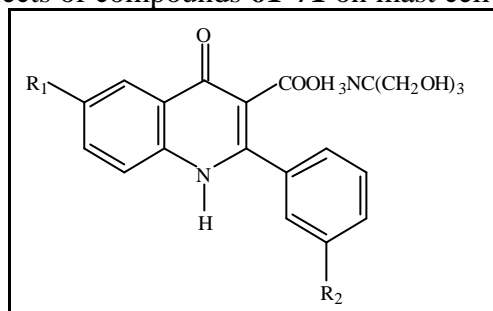
Inducer: Compound 48/80 (10 μ g/ml)

Drugs	R ₁	R ₂	Conc. (μ M)	Percent Release			
				β -Glucuronidase % inhibition		Histamine % inhibition	
Control				76.5 \pm 0.7		73.6 \pm 1.4	
50	F	F	10	82.7 \pm 1.5	-8.0 \pm 2.9	69.5 \pm 2.7	5.6 \pm 3.1
			30	74.0 \pm 1.1	3.3 \pm 0.8	67.8 \pm 3.8	8.0 \pm 3.7
51	F	Cl	10	68.9 \pm 1.5	9.8 \pm 2.0	68.1 \pm 4.4	7.4 \pm 5.7
			30	64.2 \pm 1.2	16.0 \pm 1.8	67.9 \pm 1.0	7.7 \pm 2.2
52	F	OCH ₃	10	70.9 \pm 1.0	7.2 \pm 1.9	71.8 \pm 1.7	2.5 \pm 1.3
			30	64.5 \pm 1.9	15.6 \pm 3.0	68.2 \pm 1.4	7.2 \pm 2.2
54	Cl	F	10	77.1 \pm 4.1	-0.8 \pm 5.9	74.3 \pm 5.2	-0.7 \pm 5.2
			30	69.5 \pm 3.1	9.0 \pm 4.9	73.0 \pm 3.4	0.8 \pm 2.7
55	Cl	Cl	10	74.3 \pm 3.3	2.8 \pm 5.0	70.6 \pm 3.4	4.2 \pm 2.7
			30	67.6 \pm 0.5	11.5 \pm 0.9	66.2 \pm 2.4	10.0 \pm 2.7
56	Cl	OCH ₃	10	66.1 \pm 1.9	13.5 \pm 3.1	65.0 \pm 3.2	11.7 \pm 2.9
			30	64.2 \pm 2.8	16.0 \pm 4.4	63.6 \pm 2.5	13.6 \pm 2.4
57	OCH ₃	F	10	65.8 \pm 1.4	14.0 \pm 1.5	73.5 \pm 2.6	0.06 \pm 3.9
			30	71.1 \pm 1.8	7.0 \pm 3.1	90.1 \pm 3.5	-22.3 \pm 3.8
58	OCH ₃	Cl	10	71.9 \pm 1.1	5.9 \pm 2.0	69.7 \pm 4.7	5.3 \pm 4.9
			30	71.6 \pm 0.5	6.3 \pm 1.5	71.1 \pm 3.3	3.5 \pm 2.6
59	OCH ₃	OCH ₃	10	69.4 \pm 1.3	9.1 \pm 2.3	77.6 \pm 3.4	-5.2 \pm 3.1
			30	65.9 \pm 2.6	13.7 \pm 4.2	85.0 \pm 3.2	-15.4 \pm 2.2
60	OCH ₃	H	10	78.1 \pm 1.1	-2.1 \pm 2.3	72.0 \pm 2.5	2.1 \pm 3.4
			30	76.6 \pm 0.1	-0.1 \pm 1.0	78.1 \pm 3.0	-6.0 \pm 2.3
Mepacrine			10	50.9 \pm 2.1	33.2 \pm 2.2**	61.2 \pm 1.9	17.0 \pm 2.3
			30	32.7 \pm 0.8	57.0 \pm 2.0**	53.9 \pm 2.1	26.9 \pm 2.9**
			300	7.6 \pm 1.2	90.1 \pm 1.4**	22.3 \pm 2.2	69.8 \pm 2.6**
IC ₅₀ (μ M)				20.6 \pm 1.2		50.1 \pm 4.1	

The mast cell suspension was preincubated at 37 with 0.5 % DMSO or tested compound for 3 min. Fifteen minutes after the addition of compound 48/80 (10 μ g/ml), β -glucuronidase and histamine in the supernatant was determined. Values are presented as mean \pm S.E., n = 3, * P < 0.05, ** P < 0.01

Mepacrine: positive control

Table 21. The inhibitory effects of compounds **61-71** on mast cell degranulation (*in vitro*)



Animal: Rat (Sprague Dawley)

Inducer: Compound 48/80 (10

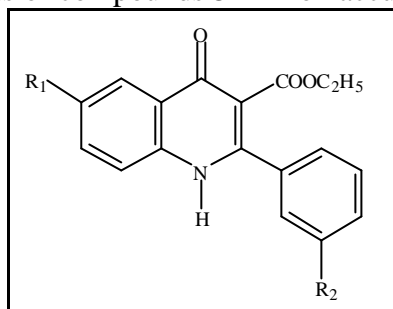
µg/ml)

Drugs	R ₁	R ₂	Conc. (µM)	Percent Release			
				β-Glucuronidase	% inhibition	Histamine	% inhibition
Control				61.6±1.2		65.8±0.7	
61	F	F	10	56.2±3.9	8.9±4.4	65.3±3.6	0.8±5.3
			30	56.3±4.1	8.7±5.1	61.2±3.0	7.0±3.7
62	F	Cl	10	51.7±1.3	16.0±2.6	63.6±4.1	3.4±5.6
			30	53.7±3.7	12.9±4.4	62.3±2.1	5.3±2.1
63	F	OCH ₃	10	58.6±3.0	4.8±4.2	66.8±3.3	-1.7±5.4
			30	54.0±5.5	12.4±8.2	60.6±2.7	8.0±3.0
65	Cl	F	10	57.0±2.9	7.4±5.6	64.7±2.2	1.7±2.3
			30	52.6±2.5	14.5±5.2	68.1±4.8	-3.4±6.0
66	Cl	Cl	10	56.6±2.0	8.1±4.2	61.8±1.6	6.0±1.4
			30	59.5±2.6	3.3±6.2	63.1±1.2	4.0±2.4
67	Cl	OCH ₃	10	55.2±1.8	10.3±3.1	64.8±2.1	1.5±2.0
			30	52.3±1.5	14.9±4.0	60.7±1.7	7.8±1.5
68	OCH ₃	F	10	58.8±1.2	4.6±1.0	70.9±0.1	-7.8±1.2
			30	51.9±3.3	15.9±3.7	77.5±1.4	-17.7±1.2
69	OCH ₃	Cl	10	59.5±2.3	3.4±2.5	64.0±3.0	2.8±3.4
			30	51.5±3.0	16.3±4.4	61.4±1.8	6.8±1.9
70	OCH ₃	OCH ₃	10	61.2±3.3	0.6±4.7	65.0±2.7	1.2±2.9
			30	58.8±3.1	4.6±3.1	61.5±1.9	6.5±1.8
71	OCH ₃	H	10	54.9±1.4	10.8±1.8	64.7±1.0	1.6±0.6
			30	52.6±1.9	14.8±1.9	64.6±1.8	1.8±2.1
Mepacrine			10	46.3±1.1	24.6±0.7**	50.9±2.0	22.5±1.8**
			30	28.2±0.5	54.0±0.5**	35.3±1.4	45.4±1.2**
			300	8.9±0.8	85.4±1.7**	13.1±0.5	79.7±0.5**
IC ₅₀ (µM)				25.7±0.6		31.6±1.0	

The mast cell suspension was preincubated at 37 °C with 0.5 % DMSO or tested compound for 3 min. Fifteen minutes after the addition of compound 48/80 (10 µg/ml), β-glucuronidase and histamine in the supernatant was determined. Values are presented as mean ± S.E., n = 3, * P < 0.05, ** P < 0.01

Mepacrine: positive control

Table 22. The inhibitory effects of compounds **34-44** on accumulation of nitrite in medium



Cell line: RAW 264.7 cells

Inducer: LPS (1 μ g/ml)

Cell line: N9 cells

Inducer: LPS (10 ng/ml)+ IFN- γ (10

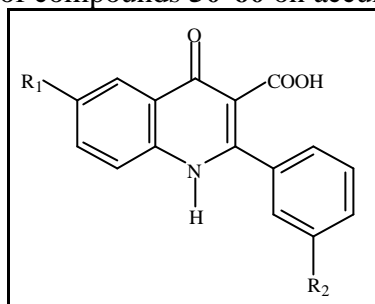
U/ml)

Drugs	R ₁	R ₂	Conc. (μ M)	Nitrite accumulation (μ M)			
				RAW	% inhibition	N9	% inhibition
Control				55.8 \pm 0.2		47.0 \pm 0.3	
34	F	F	10	56.2 \pm 0.4	-0.6 \pm 1.2	46.5 \pm 0.3	0.9 \pm 1.5
			30	55.1 \pm 0.5	1.4 \pm 1.3	45.1 \pm 0.3	3.8 \pm 0.6
35	F	Cl	3	--		48.7 \pm 0.4	-3.7 \pm 1.6
			10	55.1 \pm 0.6	1.4 \pm 0.8	50.8 \pm 1.2	55.1 \pm 0.6
			30	53.8 \pm 0.2	3.7 \pm 0.4		Cytotoxic
36	F	OCH ₃	3	--		51.2 \pm 0.2	-8.9 \pm 0.5
			10	56.2 \pm 0.2	-0.5 \pm 0.5	48.4 \pm 1.0	56.2 \pm 0.2
			30	52.3 \pm 0.5	6.3 \pm 1.2		Cytotoxic
38	Cl	F	10	53.1 \pm 3.1	4.9 \pm 5.2	50.6 \pm 0.9	-7.7 \pm 2.2
			30	53.2 \pm 0.4	4.8 \pm 0.4	39.6 \pm 1.1	15.7 \pm 2.5**
39	Cl	Cl	3	--		50.6 \pm 0.8	-7.6 \pm 1.1
			10	56.6 \pm 0.6	-1.3 \pm 0.8	46.6 \pm 0.9	0.8 \pm 1.6
			30	49.6 \pm 0.7	11.2 \pm 0.9		Cytotoxic
40	Cl	OCH ₃	10	55.8 \pm 0.6	0.1 \pm 0.8	46.1 \pm 0.7	1.7 \pm 1.8
			30	52.1 \pm 1.0	6.8 \pm 2.2	42.4 \pm 0.6	9.6 \pm 0.7
41	OCH ₃	F	10	54.1 \pm 0.3	3.2 \pm 0.3	46.1 \pm 0.1	1.8 \pm 0.7
			30	52.6 \pm 0.5	5.8 \pm 1.2	43.5 \pm 1.1	7.4 \pm 3.1
42	OCH ₃	Cl	10	52.8 \pm 0.4	5.6 \pm 0.6	48.0 \pm 1.0	-2.1 \pm 2.1
			30	52.0 \pm 0.3	6.8 \pm 0.9	37.2 \pm 1.3	20.7 \pm 2.8**
43	OCH ₃	OCH ₃	3	--		52.1 \pm 1.6	-10.9 \pm 3.2
			10	54.9 \pm 0.1	1.7 \pm 0.5	49.8 \pm 0.9	-6.1 \pm 2.4
			30	53.9 \pm 1.3	3.4 \pm 2.7		Cytotoxic
44	OCH ₃	H	10	53.6 \pm 0.3	4.1 \pm 0.8	46.0 \pm 0.5	2.1 \pm 0.7
			30	51.8 \pm 0.1	7.2 \pm 0.3	39.8 \pm 1.0	15.2 \pm 2.0**
1400W			(0.1)	51.3 \pm 0.1	8.0 \pm 0.4	40.3 \pm 0.3	14.1 \pm 1.3*
			(1)	35.2 \pm 0.3	36.9 \pm 0.5**	29.1 \pm 0.5	37.9 \pm 0.8**
			10	19.5 \pm 0.1	64.9 \pm 0.2**	12.1 \pm 0.2	74.2 \pm 0.6**
IC ₅₀ (μ M)					2.9 \pm 0.1		1.8 \pm 0.1

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; N = 3; —, not determined

1400W: *N*-(3-Aminomethyl)benzylacetamide as positive control

Table 23. The inhibitory effects of compounds **50-60** on accumulation of nitrite in medium



Cell line: RAW 264.7 cells
 Cell line: N9 cells
 U/ml)

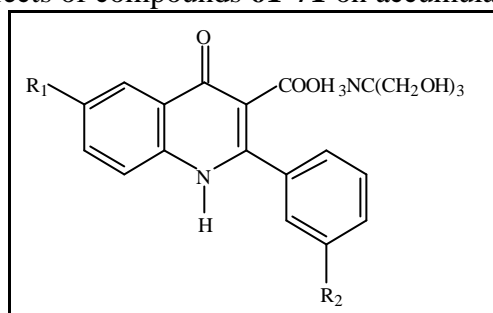
Inducer: LPS (1 µg/ml)
 Inducer: LPS (10 ng/ml)+ IFN-γ (10

Drugs	R ₁	R ₂	Conc. (µM)	Nitrite accumulation (µM)			
				RAW	% inhibition	N9	% inhibition
Control				55.8±0.2		47.0±0.3	
50	F	F	10	55.1±1.0	1.3±1.4	42.1±0.9	10.2±1.9
			30	52.8±0.1	5.3±0.2	40.5±0.6	13.8±0.7*
51	F	Cl	10	54.3±0.2	2.7±0.6	44.7±0.9	4.7±1.7
			30	53.4±0.5	4.3±0.9	43.7±0.6	7.0±1.3
52	F	OCH ₃	10	56.6±0.4	-1.2±0.5	45.9±0.3	2.3±1.3
			30	53.6±0.4	4.1±1.1	37.2±0.4	20.7±0.8**
54	Cl	F	10	56.5±0.2	-1.0±0.8	48.0±0.1	-2.2±0.6
			30	56.8±0.6	-1.6±1.3	46.8±0.2	0.4±1.2
55	Cl	Cl	10	57.6±0.1	-3.2±0.1	48.9±0.8	-4.1±1.1
			30	57.8±0.8	-3.4±1.3	52.4±0.2	-11.5±1.2
56	Cl	OCH ₃	3	--	--	46.0±0.3	2.1±0.6
			10	53.6±0.2	53.6±0.2	36.6±1.0	22.1±2.2**
			30	53.7±0.3	53.7±0.3		Cytotoxic
57	OCH ₃	F	3	--		37.1±0.2	20.9±0.1**
			10	54.2±0.1	3.0±0.4		Cytotoxic
			30	50.8±0.6	9.1±1.5		Cytotoxic
58	OCH ₃	Cl	10	56.1±0.2	-0.4±0.7	46.6±0.2	0.8±1.2
			30	55.3±0.4	0.9±0.5	50.1±0.1	-6.6±0.7
59	OCH ₃	OCH ₃	3	--		44.8±0.6	4.6±1.6
			10	54.9±0.1	1.7±0.5		Cytotoxic
			30	53.9±1.3	3.4±2.7		Cytotoxic
60	OCH ₃	H	10	54.6±0.2	2.1±0.6	44.7±0.4	4.8±1.0
			30	53.5±0.2	4.2±0.8	42.9±0.7	8.7±1.2
1400W			0.1	51.3±0.1	8.0±0.4	40.3±0.3	14.1±1.3*
			1	35.2±0.3	36.9±0.5**	29.1±0.5	37.9±0.8**
			10	19.5±0.1	64.9±0.2**	12.1±0.2	74.2±0.6**
IC ₅₀ (µM)				2.9±0.1		1.8±0.1	

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; N = 3; —, not determined

1400W: N-(3-Aminomethyl)benzylacetamide as positive control

Table 24. The inhibitory effects of compounds **61-71** on accumulation of nitrite in medium



Cell line: RAW 264.7 cells

Inducer: LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)

Cell line: N9 cells

Inducer: LPS (10 ng/ml)+ IFN- γ (10

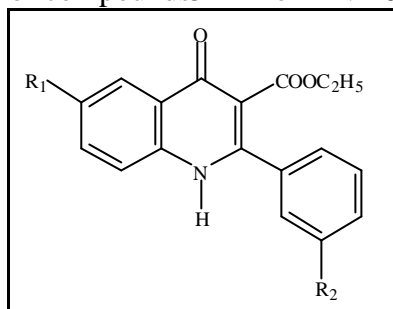
U/ml)

Drugs	R ₁	R ₂	Conc. (μM)	Nitrite accumulation (μM)			
				RAW	% inhibition	N9	% inhibition
Control				55.8 \pm 0.2		47.0 \pm 0.3	
61	F	F	3	--		46.0 \pm 0.3	2.0 \pm 1.5
			10	51.6 \pm 0.2	7.6 \pm 0.3	44.2 \pm 1.2	5.8 \pm 2.9
			30	53.5 \pm 0.3	4.2 \pm 1.0		Cytotoxic
62	F	Cl	10	53.4 \pm 0.5	4.4 \pm 0.8	45.2 \pm 0.1	3.8 \pm 0.5
			30	52.8 \pm 0.5	5.5 \pm 0.6	45.6 \pm 0.7	2.9 \pm 1.9
63	F	OCH ₃	10	54.7 \pm 0.9	2.1 \pm 1.2	42.6 \pm 0.8	9.3 \pm 1.8
			30	53.3 \pm 0.3	4.5 \pm 0.4	42.0 \pm 0.2	10.5 \pm 0.7
65	Cl	F	10	55.5 \pm 0.9	0.6 \pm 2.0	46.0 \pm 0.1	2.0 \pm 0.8
			30	54.4 \pm 0.3	2.6 \pm 0.9	42.4 \pm 0.2	9.7 \pm 0.5
66	Cl	Cl	3	--		49.4 \pm 1.3	-5.1 \pm 2.6
			10	54.5 \pm 2.6	2.4 \pm 5.1	50.1 \pm 1.2	-6.6 \pm 2.3
			30	56.9 \pm 0.1	-1.8 \pm 0.6		Cytotoxic
67	Cl	OCH ₃	10	56.3 \pm 0.4	-0.8 \pm 1.1	46.4 \pm 0.3	1.1 \pm 1.4
			30	54.8 \pm 0.1	1.8 \pm 0.5	46.0 \pm 0.2	2.0 \pm 0.4
68	OCH ₃	F	3	--		39.1 \pm 0.3	16.7 \pm 0.3**
			10	52.7 \pm 0.6	5.7 \pm 1.4	35.4 \pm 0.8	24.6 \pm 2.2**
			30	55.5 \pm 0.3	0.6 \pm 0.3		Cytotoxic
69	OCH ₃	Cl	10	57.3 \pm 0.2	-2.5 \pm 0.2	49.4 \pm 0.8	-5.2 \pm 1.0
			30	56.4 \pm 0.7	-1.1 \pm 1.4	49.1 \pm 0.6	-4.6 \pm 1.4
70	OCH ₃	OCH ₃	10	58.2 \pm 0.2	-4.2 \pm 0.7	48.0 \pm 0.3	-2.2 \pm 0.4
			30	56.4 \pm 0.7	-1.1 \pm 1.7	46.6 \pm 0.5	0.8 \pm 0.4
71	OCH ₃	H	10	53.2 \pm 0.5	4.7 \pm 1.2	45.5 \pm 0.1	3.1 \pm 0.8
			30	53.1 \pm 0.7	4.9 \pm 1.6	46.1 \pm 0.7	1.7 \pm 1.2
1400W			0.1	51.3 \pm 0.1	8.0 \pm 0.4	40.3 \pm 0.3	14.1 \pm 1.3*
			1	35.2 \pm 0.3	36.9 \pm 0.5**	29.1 \pm 0.5	37.9 \pm 0.8**
			10	19.5 \pm 0.1	64.9 \pm 0.2**	12.1 \pm 0.2	74.2 \pm 0.6**
IC ₅₀ (μM)				2.9 \pm 0.1		1.8 \pm 0.1	

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; N = 3; —, not determined

1400W: *N*-(3-Aminomethyl)benzylacetamide as positive control

Table 25. The inhibitory effects of compounds **34-44** on TNF- α formation in medium



Cell line: Raw 264.7 cells

Inducer: LPS (1 μ g/ml)

Cell line: N9 cells

Inducer: LPS (10 ng/ml)+ IFN- γ (10

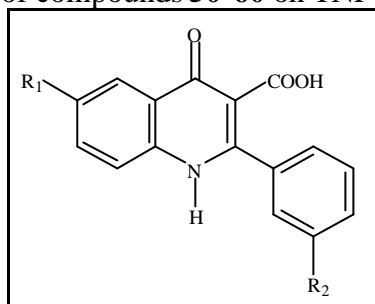
U/ml)

Drugs	R ₁	R ₂	Conc. (μ M)	TNF- α formation (ng/ml)			
				RAW	% inhibition	N9	% inhibition
Control				75.1 \pm 4.9		2.65 \pm 0.05	
34	F	F	30	60.1 \pm 9.1	19.6 \pm 12.5	1.78 \pm 0.05	32.7 \pm 2.9*
35	F	Cl	10	--		2.60 \pm 0.09	1.9 \pm 2.7
			30	57.1 \pm 2.8	22.9 \pm 8.2		Cytotoxic
36	F	OCH ₃	10	--		2.44 \pm 0.12	7.8 \pm 3.0
			30	66.4 \pm 6.3	10.9 \pm 10.0		Cytotoxic
38	Cl	F	30	44.0 \pm 9.3	42.5 \pm 8.4**	2.13 \pm 0.25	19.9 \pm 8.3
39	Cl	Cl	10	--		3.02 \pm 0.04	-14.2 \pm 2.6
			30	58.1 \pm 9.2	23.5 \pm 6.9		Cytotoxic
40	Cl	OCH ₃	30	53.7 \pm 6.6	31.9 \pm 3.1*	1.98 \pm 0.06	24.9 \pm 2.3
41	OCH ₃	F	30	66.2 \pm 2.3	10.9 \pm 7.2	2.14 \pm 0.17	19.2 \pm 5.5
42	OCH ₃	Cl	30	82.0 \pm 5.0	-10.3 \pm 10.6	2.37 \pm 0.25	10.6 \pm 7.7
43	OCH ₃	OCH ₃	10	--		3.01 \pm 0.15	-13.4 \pm 4.4
			30	79.6 \pm 4.1	-7.0 \pm 9.7		Cytotoxic
44	OCH ₃	H	30	46.4 \pm 8.9	39.2 \pm 7.4**	2.48 \pm 0.16	6.5 \pm 4.2
Dexamethasone			0.01	58.1 \pm 3.9	22.4 \pm 4.8	1.82 \pm 0.01	31.1 \pm 0.9*
			0.1	41.8 \pm 2.9	42.5 \pm 2.0**	1.12 \pm 0.04	55.6 \pm 2.4**
			1	33.6 \pm 6.0	55.4 \pm 9.5**	0.69 \pm 0.02	72.9 \pm 0.9**
IC ₅₀ (μ M)				0.42 \pm 0.12		0.074 \pm 0.01	

N = 3; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; --, not determined

Dexamethasone: positive control

Table 26. The inhibitory effects of compounds **50-60** on TNF- α formation in medium



Cell line: Raw 264.7 cells

Inducer: LPS (1 μ g/ml)

Cell line: N9 cells

Inducer: LPS (10 ng/ml)+ IFN- γ (10

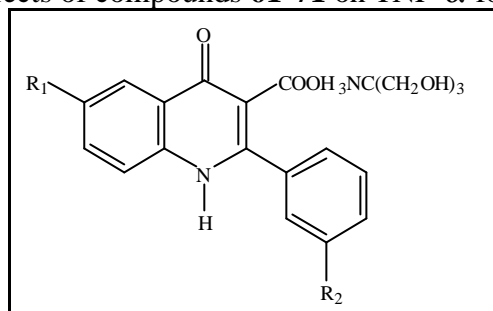
U/ml)

Drugs	R ₁	R ₂	Conc. (μ M)	TNF- α formation (ng/ml)			
				RAW	% inhibition	N9	% inhibition
Control				75.1 \pm 4.9		2.65 \pm 0.05	
50	F	F	30	58.9 \pm 4.3	21.2 \pm 6.3	2.05 \pm 0.12	22.6 \pm 3.4
51	F	Cl	30	77.4 \pm 3.7	-3.8 \pm 8.1	2.48 \pm 0.05	6.4 \pm 0.1
52	F	OCH ₃	30	65.0 \pm 9.0	15.1 \pm 2.6	1.92 \pm 0.15	27.4 \pm 6.4
54	Cl	F	30	56.1 \pm 13.7	26.9 \pm 13.9	3.38 \pm 0.08	-27.5 \pm 1.0
55	Cl	Cl	30	48.2 \pm 9.2	36.7 \pm 7.8*	3.61 \pm 0.15	-36.2 \pm 5.9
56	Cl	OCH ₃	10	--		2.84 \pm 0.32	-6.7 \pm 8.5
			30	73.8 \pm 14.4	7.0 \pm 11.1		Cytotoxic
57	OCH ₃	F	3	--		2.26 \pm 0.08	15.2 \pm 7.8
			10	--			Cytotoxic
			30	80.7 \pm 1.4	-8.1 \pm 5.0		Cytotoxic
58	OCH ₃	Cl	30	87.1 \pm 10.4	-15.7 \pm 11.7	3.10 \pm 0.11	-16.9 \pm 2.7
59	OCH ₃	OCH ₃	3	--		2.74 \pm 0.20	-3.1 \pm 6.6
			10	--			Cytotoxic
			30	86.6 \pm 7.5	-15.0 \pm 4.4		Cytotoxic
60	OCH ₃	H	30	76.6 \pm 2.4	-3.1 \pm 8.0	2.67 \pm 0.06	-0.8 \pm 1.5
Dexamethasone			0.01	58.1 \pm 3.9	22.4 \pm 4.8	1.82 \pm 0.01	31.1 \pm 0.9*
			0.1	41.8 \pm 2.9	42.5 \pm 2.0**	1.12 \pm 0.04	55.6 \pm 2.4**
			1	33.6 \pm 6.0	55.4 \pm 9.5**	0.69 \pm 0.02	72.9 \pm 0.9**
IC ₅₀ (μ M)				0.42 \pm 0.12		0.074 \pm 0.01	

N = 3; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; --, not determined

Dexamethasone: positive control

Table 27. The inhibitory effects of compounds **61-71** on TNF- α formation in medium



Cell line: Raw 264.7 cells
 Cell line: N9 cells
 U/ml)

Inducer: LPS (1 μ g/ml)
 Inducer: LPS (10 ng/ml)+ IFN- γ (10 U/ml)

Drugs	R ₁	R ₂	Conc. (μ M)	TNF- α formation (ng/ml)			
				RAW	% inhibition	N9	% inhibition
Control				91.8 \pm 0.8		3.02 \pm 0.03	
61	F	F	10	--		2.87 \pm 0.07	4.3 \pm 5.1
			30	95.2 \pm 7.2	-3.7 \pm 8.6		Cytotoxic
62	F	Cl	30	87.5 \pm 4.8	4.5 \pm 6.2	3.11 \pm 0.11	-2.8 \pm 2.9
63	F	OCH ₃	30	88.8 \pm 4.8	3.2 \pm 5.0	2.81 \pm 0.08	7.0 \pm 3.3
65	Cl	F	30	99.7 \pm 2.0	-8.6 \pm 3.1	2.77 \pm 0.12	8.3 \pm 4.9
66	Cl	Cl	10	--		3.40 \pm 0.12	-12.2 \pm 3.3
			30	104.9 \pm 5.9	-14.2 \pm 6.3		Cytotoxic
67	Cl	OCH ₃	30	102.7 \pm 8.3	-12.0 \pm 10.0	3.04 \pm 0.14	-0.4 \pm 5.7
68	OCH ₃	F	10	--		1.83 \pm 0.03	39.3 \pm 0.8*
			30	90.7 \pm 10.4	1.3 \pm 10.6		Cytotoxic
69	OCH ₃	Cl	30	96.9 \pm 5.8	-5.5 \pm 6.3	3.67 \pm 0.30	-21.5 \pm 11.0
70	OCH ₃	OCH ₃	30	113.3 \pm 4.5	-23.5 \pm 5.9	3.37 \pm 0.15	-11.3 \pm 4.5
71	OCH ₃	H	30	98.1 \pm 0.8	-6.8 \pm 1.7	2.80 \pm 0.08	7.3 \pm 3.4
Dexamethasone			0.01	71.4 \pm 2.1	22.4 \pm 4.8	2.07 \pm 0.01	31.1 \pm 0.9*
			0.1	51.2 \pm 2.0	42.5 \pm 2.0**	1.28 \pm 0.04	55.6 \pm 2.4**
			1	41.1 \pm 2.9	55.4 \pm 9.5**	0.79 \pm 0.02	72.9 \pm 0.9**
IC ₅₀ (μ M)				0.42 \pm 0.12		0.074 \pm 0.01	

N = 3; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; --, not determined

Dexamethasone: positive control

第三章 結論

著者為改善抗微管物質2-phenyl-4-quinolone類化合物之理化性質，設計了一系列帶有親水性基團-COOH之2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid衍生物作為標的化合物，參照1946年R. C. Elderfield等學者所提之方法，成功地合成這些標的化合物及其鹽類。

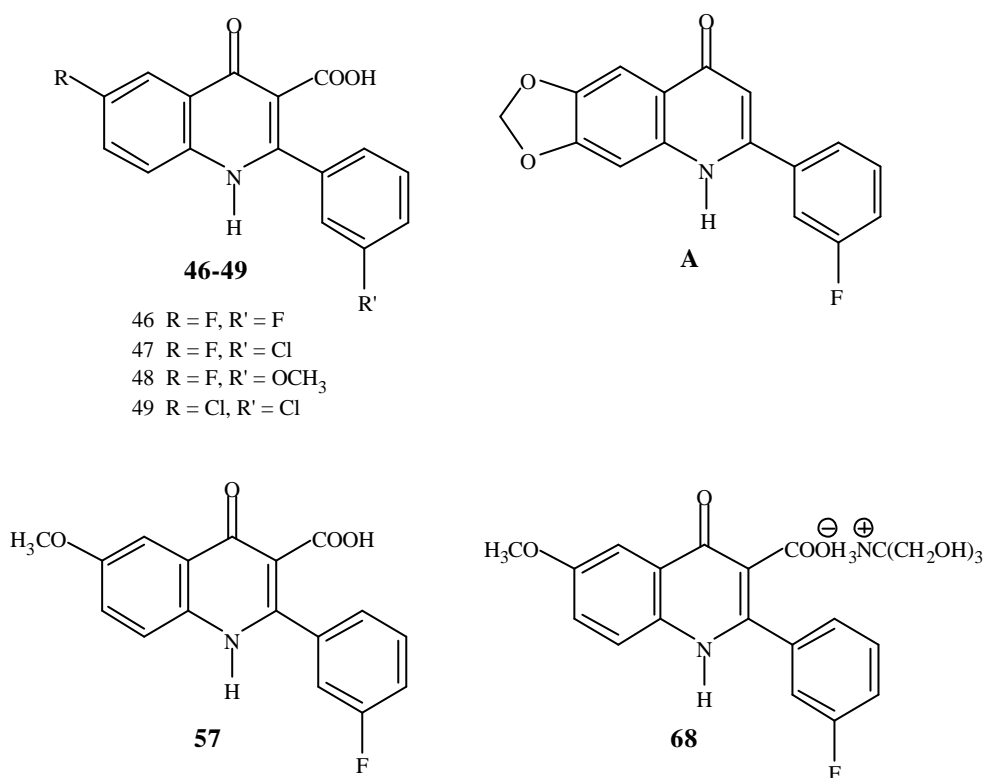
在合成標的化合物的過程中，除了獲得中間產物酯類之化合物外，在第6位置為F、Cl取代時，同時也分別得到4個比例相當的de-carboxylate的副產物3',6-difluoro-2-phenyl-4-quinolone (46)、3'-chloro-6-fluoro-2-phenyl-4-quinolone (47)、6-fluoro-3'-methoxy-2-phenyl-4-quinolone (48)、3',6-dichloro-2-phenyl-4-quinolone (49)，而致使產率偏低。經由中間產物(I)(II)的分離而得知副產物產生的原因。因第6位置取代基若為F或Cl時，較容易造成未預期的副產物比例頗高的現象，值得做深一層之研究與分析。

將所合成的標的化合物測試了MCF、HOS、KB、KB-VIN、SK-ME-L、HCT-8、PC-3、IA9、HT-29等細胞株，由癌細胞增殖抑制活性的結果初步建立了結構與活性的關係(SAR)，其中以第6位為-OCH₃且第3位為F取代之3'-fluoro-6-methoxy-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid (57)作用活性最顯著，此化合物與已知強效抗有絲分裂劑6,7-methylenedioxy-2-(3'-fluorophenyl)-4-quinolone (A)經電腦superimpose後，其重疊性甚佳，因此結構最適化後兩者在第二位置苯環(C環)空間立體構型相同，可初步解釋化合物57活性表現較優越的原因。

著者再將化合物57、68提供日本癌研究會癌化學療法中心以39種human cancer cell line進行體外試驗，評估結果發現此化合物對卵巢癌細胞之OVCAR-4具高度選擇性之抑制活性，另一方面由所得到的Finger print之表現，經比對後得知化合物57與已知之抗癌藥navelbine抑制癌細胞增殖的作用模式略為相近，唯相對係數不高(R = 0.512)，故作用機轉仍不盡相同。另外化合物57的tromethamine鹽類(68)對OVCAR-4及HGC2998也具相當高之選擇性。再者試驗化合物57、68分別對PC-3、HL-60細胞週期的影響，所得的結果皆為G2/M phase arrest。就上述結果推測化合物57、68是作用機轉特異且具高度選擇性的新型抗有絲分裂劑，頗具開發的潛力。目前這兩個化合物均正在進行動物體內試驗及抗微管聚合活性篩選。

在抗發炎及抗過敏試驗中，則以嗜中性白血球過氧化物形成之抑制活性較為明顯，其中仍然以化合物57、68抑制活性最強。

另一方面，運用電腦分子模擬軟體來建構藥效基團(pharmacophore)的實驗中，利用 ligand-based drug design 的方式，著者初步建立了 2-phenyl-4-quinolone 類衍生物與微管蛋白作用之 pharmacophore，此作用部分包括二個 hydrogen bond acceptor 及一個 hydrophobic group。此 model 與已知活性之化合物接合後，能夠準確地預測真正的微管聚合抑制活性值，且與化合物 57 接合的結果，亦預測出此化合物有相當強之抑制活性表現，故此由電腦分子模擬所得到的藥效集團具有相當之可信度，值得做更深入之探討。



第四章 實驗部分

第一節 試藥、溶媒及材料

(一) 試藥

1. 購自德國 Merck 公司者

Diethyl malonate
4-Fluoroaniline
4-Chloroaniline
4-Methoxyaniline
Glacial acetic acid
Hydrochloric acid
Sodium hydroxide

2. 購自比利時 Acros 公司者

m-Anisoyl chloride
3-Chlorobenzoyl chloride
3-Fluorobenzoyl chloride

3. 購自日本 Osaka 公司者

Hydrochloric acid

(二) 溶媒

1. 購自德國 Merck 公司者

Acetone
Benzene
Chloroform
Chloroform-*d*
Dimethylsulfoxide-*d*₆
Ethyl acetate
Methanol

2. 購自台灣省菸酒公賣局者

95 % Ethanol

第二節 重要儀器

(一) 融點測定

融點測定係採用 Yanaco MP-500D 融點測定器測定，可測定範圍在25-500℃，溫度未經校正。

(二) 紫外線光譜分析

紫外線光譜分析係採用 Shimadzu UV-160A UV-visible Recording Spectrophotometer測定，使用甲醇為溶媒。

(三) 紅外線光譜分析

紅外線光譜分析係採用 Nicolet Impact 400 FT-IR Spectrophotometer 或 Spectrum One FT-IR Spectrometer 測定，以溴化鉀(KBr)粉末作為打錠稀釋劑，利用聚苯乙烯(polystyrene)薄膜校正，光譜單位為波數(cm^{-1})。

(四) 質譜分析

EIMS以VG Platform GC-MS instrument測定離子化，電壓為70 eV，單位為 m/z 。FAB使用JEOL SX/SX 102A Tandem Mass Spectrometer測定。

(五) 核磁共振光譜分析

氫及碳13核磁共振光譜係採用Bruker DPX-200 FT-或Bruker Avance 400 NMR Spectrometer測定，以 (ppm值)表示其化學位移值(chemical shift)。偶合常數(coupling constant)以 J 表示，單位為Hz。以 s 表單峰 (singlet)， d 表二重峰 (doublet)， t 表三重峰 (triplet)， q 表四重峰 (quartet)， m 表多峰(multiplet)， br 表寬峰 (broad)， dd 表雙二重峰(double doublet)， ddd 表參二重峰(double double doublet)。

(六) 元素分析

元素分析採用 Heraeus CHN-OS RAPID 元素分析儀 (國科會中部貴重儀器使用中心) 測定，分析值與理論值相差均在 $\pm 0.4\%$ 。

(七) 薄層色層分析

以德國 E. Merck 公司出品之 TLC Aluminium Sheets Silica gel 60 F₂₅₄ plate pre-coated 25 sheets 20 cm \times 20 cm，layer thickness 0.2 mm測定。

(八) 管柱色層分析

以德國 E. Merck 公司出品之 Silica gel 60 (70-230 mesh)當充填劑。

(九) 紫外光燈

使用的紫外燈備有 254 nm 及 366 nm 之光源。

(十) 電腦分子模擬儀器及設備：

電腦硬體設備

主機：Workstation (Silicon Graphics, USA)

螢幕：GDM-17E21 (Silicon Graphics, USA)

CPU: R5000 (Silicon Graphics, USA)

電腦軟體程式

(1) Catalyst 4.0 (Polygen I Molecular Simulations Inc., USA)

(2) Insight II 97.0(Polygen / Molecular Simulations Inc., USA)

第三節 化合物之製備

壹、3-Substituted-*N*-(4-Substituted phenyl)benzamide (9-20)之合成

3-Fluorophenyl-*N*-(4-fluorophenyl)benzamide (9)之合成

秤取 4-fluoroaniline (11.11 克, 0.1 莫耳)置於 1000 毫升茄形瓶中, 用甲苯加以溶解, 接著滴加 3-fluorobenzoyl chloride (7.93 克, 0.05 莫耳), 於室溫下攪拌 3 小時後, 濾除白色沉澱, 濾液經濃縮後之粗產物以乙醇再結晶純化, 得化合物 9 之針狀晶體 (9.32 克, 產率 80%)。

3-Chlorophenyl-*N*-(4-fluorophenyl)benzamide (10)之合成

秤取 4-fluoroaniline (11.11 克, 0.1 莫耳)及 3-chlorobenzoyl chloride (8.81 克, 0.05 莫耳)為起始原料, 比照化合物 9 相同合成方法之反應條件及處理, 得化合物 10 之針狀晶體 (9.59 克, 產率 77%)。

3-Methoxyphenyl-*N*-(4-fluorophenyl)formamide (11)之合成

秤取 4-fluoroaniline (11.11 克, 0.1 莫耳)及 3-methoxybenzoyl chloride (8.53 克, 0.05 莫耳)為起始原料, 比照化合物 9 相同合成方法之反應條件及處理, 得化合物 11 之針狀晶體 (7.19 克, 產率 75%)。

N-(4-Fluorophenyl)benzamide (12)之合成

秤取 4-fluoroaniline (11.11 克, 0.1 莫耳)及 benzoyl chloride (7.03 克, 0.05 莫耳)為起始原料, 比照化合物 9 相同合成方法之反應條件及處理, 得化合物 12 之針狀晶體 (8.28 克, 產率 77%)。

3-Fluorophenyl-*N*-(4-chlorophenyl)benzamide (13)之合成

秤取 4-chloroaniline (12.70 克, 0.1 莫耳)及 3-fluorobenzoyl chloride (7.93 克, 0.05 莫耳)為起始原料, 比照化合物 9 相同合成方法之反應條件及處理, 得化合物 13 之針狀晶體 (10.21 克, 產率 82%)。

3-Chloro-*N*-(4-chlorophenyl)benzamide (14)之合成

秤取 4-chloroaniline (12.71 克, 0.1 莫耳)及 3-chlorobenzoyl chloride (8.82 克, 0.05 莫耳)為起始原料, 比照化合物 9 相同合成方法之反應條件及處理, 得化合物 14 之針狀晶體 (10.64 克, 產率 80%)。

3-Methoxyphenyl-*N*-(4-chlorophenyl)benzamide (15)之合成

秤取 4-chloroaniline (12.72 克, 0.1 莫耳)及 3-methoxybenzoyl chloride (8.53 克, 0.05 莫耳)為起始原料, 比照化合物 9 相同合成方法之反應條件及處理, 得化合物 15 之針狀晶體 (9.92 克, 產率 76%)。

3-Fluorophenyl-*N*-(4-methoxyphenyl)benzamide (16)之合成

秤取 *p*-anisidine (12.3 克, 0.1 莫耳)及 3-fluorobenzoyl chloride (7.93 克, 0.05 莫

耳) 為起始原料, 比照化合物 9 相同合成方法之反應條件及處理, 得化合物 16 之針狀晶體 (10.78 克, 產率 88%)。

3-Chlorophenyl-*N*-(4-methoxyphenyl)benzamide (17)之合成

秤取 *p*-anisidine (12.3 克, 0.1 莫耳) 及 3-chlorobenzoyl chloride (8.82 克, 0.05 莫耳) 為起始原料, 比照化合物 9 相同合成方法之反應條件及處理, 得化合物 17 之針狀晶體 (10.57 克, 產率 81%)。

3-Methoxyphenyl-*N*-(4-methoxyphenyl)benzamide (18)之合成

秤取 *p*-anisidine (12.3 克, 0.1 莫耳) 置於 1000 毫升茄形瓶中, 用加以溶解, 接著滴加 3-methoxybenzoyl chloride (8.53 克, 0.05 莫耳) 為起始原料, 比照化合物 9 相同合成方法之反應條件及處理, 得化合物 18 之針狀晶體 (10.02 克, 產率 78%)。

***N*-(4-Methoxyphenyl)benzamide (19)之合成**

秤取 *p*-anisidine (12.3 克, 0.1 莫耳) 及 benzoyl chloride (7.03 克, 0.05 莫耳) 為起始原料, 比照化合物 9 相同合成方法之反應條件及處理, 得化合物 19 之針狀晶體 (9.65 克, 產率 85%)。

***N*-Phenylbenzamide (20)之合成**

秤取 aniline (9.23 克, 0.1 莫耳) 及 benzoyl chloride (7.03 克, 0.05 莫耳) 為起始原料, 比照化合物 9 相同合成方法之反應條件及處理, 得化合物 20 之針狀晶體 (8.13 克, 產率 82%)。

貳、 Ethyl 3',6-substitued-2-phenyl-4-quinolone-carboxylates (34-45)之合成

Ethyl 3',6-difluoro-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylate (34)及 3',6-difluoro-2-phenyl-4-quinolone (46)之合成

秤取化合物 9 (2.33 克, 0.01 莫耳) PCl_5 (2.24 克, 0.01 莫耳), 置於反應瓶中, 徐徐加熱至約 70-80 時混合的固體會慢慢形成液狀, 繼續加熱至產生迴流溫度約 110 左右, 持續加熱反應一小時後, 經油浴 110 加熱減壓濃縮去除 POCl_3 後, 得到橙黃色液體 carboximidoyl chloride (9a)。另外秤取金屬鈉 (2.11 克, 0.09 莫耳), 將其加入無水乙醇 50 毫升中, 待金屬鈉完全溶於無水乙醇後, 慢慢滴加 diethyl malonate (4.80 克, 0.03 莫耳) 於反應液中並且加熱至 50 繼續攪拌 1 小時, 得到白色的懸浮物, 減壓濃縮去除乙醇, 得到白色的膠狀物 sodium diethyl malonate (21)。將無水甲苯加入化合物 21 後, 再將此反應液倒入化合物 9a 中, 隨之加熱至迴流溫度 110 反應持續 4 小時, 得深黃色溶液, 將其抽氣過濾取濾液並減壓濃縮, 加入乙醚與水進行萃取, 取乙醚層, 再減壓濃縮後得到黃褐色液體 (22)。將未純化之液體 22 置於茄形瓶中直接加熱至 150-170 進行環化反應, 加熱約 2 小時後, 褐色黏稠液狀會慢慢固化, 甚至使磁石無法轉動, 繼續加熱 2 小時使反應完全。隨後降溫加入乙醇即可得到乳白色固體, 經由管柱層析 ($\text{CHCl}_3 : \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} = 400 : 7$) 純化先得極性較低的化合物 34 白色固體 (1.25 克, 產率 38%), 再得到的另一個極性較高的化合物 46 白色固體 (0.54 克, 產率 21%)。

Ethyl 3'-chloro-6-fluoro-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylate (35)及 3'-chloro-6-fluoro-2-phenyl-4-quinolinone (47)之合成

秤取取合物 10 (2.50 克, 0.01 莫耳) PCl_5 (2.24 克, 0.01 莫耳), 比照化合物 34 相同合成方法之反應條件及處理, 所得之粗產物以管柱層析法 ($\text{CHCl}_3 : \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} = 100 : 1$) 分離純化, 先得到極性較低的化合物 35 之白色固體 (1.21 克, 產率 35%), 再得到的另一個極性較高的化合物 47 白色固體 (0.82 克, 產率 30%)。

Ethyl 6-fluoro-3'-methoxy-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylate (36)及 6-fluoro-3'-methoxy-2-phenyl-4-quinolone (48)之合成

秤取合物 11 (2.45 克, 0.01 莫耳) PCl_5 (2.24 克, 0.01 莫耳), 比照化合物 34 相同合成方法之反應條件及處理, 所得之粗產物以管柱層析法 ($\text{CHCl}_3 : \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} = 200 : 1$) 分離純化, 先得到極性較低的化合物 36 之白色固體 (1.09 克, 產率 32%), 再得到的另一個極性較高的化合物 48 白色固體 (0.67 克, 產率 25%)。

Ethyl 6-fluoro-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylate (37)之合成

秤取合物 12 (6.45 克, 0.03 莫耳) PCl_5 (6.35 克, 0.03 莫耳), 比照化合物 34 相同合成方法之反應條件及處理, 所得之粗產物以管柱層析法 ($\text{CHCl}_3 : \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} = 200 : 1$) 分離純化, 得化合物 37 之白色固體 (4.29 克, 產率 46%)。

Ethyl 6-chloro-3'-fluoro-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylate (38)之合成

秤取合物 13 (7.49 克, 0.03 莫耳) PCl_5 (6.35 克, 0.03 莫耳), 比照化合物 34 相

同合成方法之反應條件及處理，所得之粗產物以管柱層析法($\text{CHCl}_3 : \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} = 100 : 1$)分離純化，得化合物 38 之白色固體 (5.91 克，產率 57 %)。

Ethyl 3', 6-dichloro-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylate (39)及 3',6-dichloro-2-phenyl-4-quinolone (49)之合成

秤取化合物 14 (8.12 克，0.03 莫耳) PCl_5 (6.35 克，0.03 莫耳)，比照化合物 34 相同合成方法之反應條件及處理，所得之粗產物以管柱層析法($\text{CHCl}_3 : \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} = 400 : 7$)分離純化，先得到極性較低的化合物 39 之白色固體 (4.89 克，產率 45 %)，再得到另一個極性較高的化合物 49 白色固體 (0.87 克，產率 30 %)。

Ethyl 6-chloro-3'-methoxy-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylate (40)之合成

秤取化合物 11 (7.85 克，0.03 莫耳) PCl_5 (6.35 克，0.03 莫耳)，比照化合物 34 相同合成方法之反應條件及處理，所得之粗產物以管柱層析法($\text{CHCl}_3 : \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} = 400 : 7$)分離純化，得化合物 40 之白色固體 (5.80 克，產率 54 %)。

Ethyl 3'-fluoro-6-methoxy-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylate (41)之合成

秤取化合物 16 (10.55 克，0.04 莫耳) PCl_5 (8.96 克，0.04 莫耳)，比照化合物 34 相同合成方法之反應條件及處理，所得之粗產物以管柱層析法($\text{CHCl}_3 : \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} = 80 : 1$)分離純化，得化合物 41 之白色固體 (0.86 克，產率 63 %)。

Ethyl 3'-chloro-6-methoxy-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylate (42)之合成

秤取化合物 17 (7.85 克，0.03 莫耳) PCl_5 (6.35 克，0.03 莫耳)，比照化合物 34 相同合成方法之反應條件及處理，所得之粗產物以管柱層析法($\text{CHCl}_3 : \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} = 80 : 1$)分離純化，得化合物 42 之白色固體 (6.65 克，產率 62 %)。

Ethyl 3',6-dimethoxy-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylate (43)之合成

秤取化合物 18 (7.72 克，0.03 莫耳) PCl_5 (6.35 克，0.03 莫耳)，比照化合物 34 相同合成方法之反應條件及處理，所得之粗產物以管柱層析法($\text{CHCl}_3 : \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} = 100 : 1$)分離純化，得化合物 43 之白色固體 (6.25 克，產率 59 %)。

Ethyl 6-methoxy-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylate (44)之合成

秤取化合物 19 (6.82 克，0.03 莫耳) PCl_5 (6.35 克，0.03 莫耳)，比照化合物 34 相同合成方法之反應條件及處理，所得之粗產物以管柱層析法($\text{CHCl}_3 : \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} = 100 : 1$)分離純化，得化合物 44 之白色固體 (5.72 克，產率 59 %)。

Ethyl 2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylate (45)之合成

秤取化合物 20 (5.92 克，0.03 莫耳) PCl_5 (6.35 克，0.03 莫耳)，比照化合物 34 相同合成方法之反應條件及處理，所得之粗產物以管柱層析法($\text{CHCl}_3 : \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} = 100 : 13$)分離純化，得化合物 45 之白色固體 (4.22 克，產率 48 %)。

參、3',6-Substitued-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acids (50-60)之合成 3',6-Difluoro-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid (50)之合成

秤取化合物 34 (0.99 克, 0.003 莫耳) 在 100 毫升的 10% Sodium hydroxide 鹼性溶液催化下, 進行酯類水解反應, 至反應液澄清後, 以少許反應液酸化後以 TLC 檢測反應完全後, 再以冰醋酸酸化反應液至中性時沈澱析出, 過濾後取得沈澱物, 並以大量的水沖洗, 乾燥沈澱物即得化合物 50 之白色固體 (0.78 克, 產率 86%)。

3'-Fluoro-6-chloro-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid (51)之合成

秤取化合物 35 (1.04 克, 0.003 莫耳) 在 100 毫升的 10% Sodium hydroxide 鹼性溶液催化下, 比照化合物 50 相同合成方法之反應條件及處理, 得化合物 51 之白色固體 (0.86 克, 產率 90%)。

6-Fluoro-3'-methoxy-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid (52)之合成

秤取化合物 36 (1.02 克, 0.003 莫耳) 在 100 毫升的 10% Sodium hydroxide 鹼性溶液催化下, 比照化合物 50 相同合成方法之反應條件及處理, 得化合物 52 之白色固體 (0.84 克, 產率 89%)。

6-Fluoro-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid ethyl ester (53)之合成

秤取化合物 37 (0.93 克, 0.003 莫耳) 在 100 毫升的 10% Sodium hydroxide 鹼性溶液催化下, 比照化合物 50 相同合成方法之反應條件及處理, 得化合物 53 之白色固體 (0.76 克, 產率 89%)。

6-Chloro-3'-fluoro-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid (54)之合成

秤取化合物 38 (1.73 克, 0.005 莫耳) 在 100 毫升的 10% Sodium hydroxide 鹼性溶液催化下, 比照化合物 50 相同合成方法之反應條件及處理, 得化合物 54 之白色固體 (1.40 克, 產率 88%)。

6-Chloro-3'-chloro-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid (55)之合成

秤取化合物 39 (1.81 克, 0.005 莫耳) 在 100 毫升的 10% Sodium hydroxide 鹼性溶液催化下, 比照化合物 50 相同合成方法之反應條件及處理, 得化合物 55 之白色固體 (1.52 克, 產率 91%)。

6-Chloro-3'-methoxy-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid (56)之合成

秤取化合物 40 (1.79 克, 0.005 莫耳) 在 100 毫升的 10% Sodium hydroxide 鹼性溶液催化下, 比照化合物 50 相同合成方法之反應條件及處理, 得化合物 56 之白色固體 (1.46 克, 產率 89%)。

3'-Fluoro-6-methoxy-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid (57)之合成

秤取化合物 41 (1.71 克, 0.005 莫耳) 在 100 毫升的 10% Sodium hydroxide 鹼性溶液催化下, 比照化合物 50 相同合成方法之反應條件及處理, 得化合物 57 之白色固體 (1.46 克, 產率 93%)。

3'-Chloro-6-methoxy-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid (58)之合成

秤取化合物 42 (1.79 克, 0.005 莫耳) 在 100 毫升的 10% Sodium hydroxide 鹼性溶液催化下, 比照化合物 50 相同合成方法之反應條件及處理, 得化合物 58 之白色固體 (1.48 克, 產率 90 %)。

3', 6-Dimethoxy-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid (59)之合成

秤取化合物 43 (1.63 克, 0.005 莫耳) 在 100 毫升的 10% Sodium hydroxide 鹼性溶液催化下, 比照化合物 50 相同合成方法之反應條件及處理, 得化合物 59 之白色固體 (1.50 克, 產率 92 %)。

6-Methoxy-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid (60)之合成

秤取化合物 44 (1.62 克, 0.005 莫耳) 在 100 毫升的 10% Sodium hydroxide 鹼性溶液催化下, 比照化合物 50 相同合成方法之反應條件及處理, 得化合物 60 之白色固體 (1.26 克, 產率 85 %)。

伍、3',6-Substitued-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid tromethamine salts (61-71)之合成

3',6-Difluoro-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid tromethamine salt (61)之合成

秤取化合物 50 (0.30 克, 0.001 莫耳) 以 *n*-BuCl 為溶媒、慢慢分次滴加 tromethamine (0.12 克, 0.001 莫耳) 之 butyl chloride/methanol (4 : 1) 溶液, 攪拌均勻後, 過濾除去溶媒即得化合物 61 之白色固體 (0.40 克, 產率 94 %)。

3'-Fluoro-6-chloro-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid tromethamine salt (62)之合成

秤取化合物 51 (0.32 克, 0.001 莫耳), 比照化合物 61 相同合成方法處理, 得化合物 62 之白色固體 (0.41 克, 產率 93 %)。

6-Fluoro-3'-methoxy-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid tromethamine salt (63)之合成

秤取化合物 52 (0.31 克, 0.001 莫耳), 比照化合物 61 相同合成方法處理, 得化合物 63 之白色固體 (0.40 克, 產率 93 %)。

6-Fluoro-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid ethyl ester tromethamine salt (64)之合成

秤取化合物 53 (0.28 克, 0.001 莫耳), 比照化合物 61 相同合成方法處理, 得化合物 64 之白色固體 (0.36 克, 產率 89%)。

6-Chloro-3'-fluoro-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid tromethamine salt (65)之合成

秤取化合物 54 (0.32 克, 0.001 莫耳), 比照化合物 61 相同合成方法處理, 得化合物 65 之白色固體 (0.41 克, 產率 93 %)。

6-Chloro-3'-chloro-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid tromethamine salt (66)之合成

秤取化合物 55 (0.33 克, 0.001 莫耳), 比照化合物 61 相同合成方法處理, 得化合物 66 之白色固體(0.43 克, 產率 94 %)。

6-Chloro-3'-methoxy-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid tromethamine salt (67)之合成

秤取化合物 56 (0.33 克, 0.001 莫耳), 比照化合物 61 相同合成方法處理, 得化合物 67 之白色固體 (0.41 克, 產率 92 %)。

3'-Fluoro-6-methoxy-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid tromethamine salt (68)之

合成

秤取化合物 **57** (1.57 克, 0.005 莫耳), 比照化合物 **61** 相同合成方法處理, 得化合物 **68** 之白色固體 (2.04 克), 產率 94%。

3'-Chloro-6-methoxy-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid tromethamine salt (69)之合成

秤取化合物 **58** (0.33 克, 0.001 莫耳), 比照化合物 **61** 相同合成方法處理, 得化合物 **69** 之白色固體 (0.42 克, 產率 94 %)。

3', 6-Dimethoxy-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid tromethamine salt (70)之合成

秤取化合物 **59** (0.33 克, 0.001 莫耳), 比照化合物 **61** 相同合成方法處理, 得化合物 **70** 之白色固體 (0.42 克, 產率 93 %)。

6-Methoxy-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid tromethamine salt (71)之合成

秤取化合物 **60** (0.30 克, 0.001 莫耳), 比照化合物 **61** 相同合成方法處理, 得化合物 **71** 之白色固體 (0.39 克), 產率 93 %。

第四節藥理實驗簡介

壹、細胞致毒活性

一 美國國立癌症中心 (NCI) 之細胞致毒活性篩選

抗腫瘤藥物的體外篩選方法極多，美國國立腫瘤研究所(National Cancer Institute, NCI)在總結過去經驗的基礎上建立了高流量(high flux)的人體腫瘤細胞體外微量篩選方法。他們利用多種來源清楚、病理分型明確的人體腫瘤細胞株進行抗腫瘤的大規模篩選。由於這些細胞株可在裸鼠中移植成功，一旦發現對某一種瘤株有效，即可過渡到異種移植的體內試驗作進一步觀察。目前常用幾種腫瘤有幾十種不同細胞株，如肺癌、結腸癌、黑色素癌、腎癌、卵巢癌及白血病等。他們用三種方法觀察細胞生長及增殖情形。兩種是代謝試驗，即 MTT 試驗與 XTT 試驗；一種是蛋白質染色法，即 Sulforhodamine B 試驗。代謝實驗時利用活細胞可將無色的 tetrazolium salt (如 MTT¹²² 或 XTT) 轉變成 formazan 衍生物。後者與活的細胞數成正比，故可利用自動比色計測定。Sulforhodamine B 試驗也是一種比色法，其原理是蛋白質的著色強度與活細胞數成正比。本實驗即利用上述方法進行化合物細胞致毒活性之篩選。

二、日本癌研究會癌化學療法基礎研究部

在篩選細胞株之細胞毒性試驗，日本癌研究會癌化學療法基礎研究部所使用的方法類似美國國立癌症中心 (NCI)，他們亦利用多種來源清楚、病理分型明確的人體腫瘤細胞株進行抗腫瘤的大規模篩選。並使用單一藥物對 39 種細胞株的試驗，將所得之抑制的模式以 COMPARE 程式加以比對，以期初步得知已知抗癌試劑作用模式與該化合物相近者，而推測該化合物之機轉。同樣地一旦發現對某一種瘤株有效，即可過渡到異種移植的裸鼠體內試驗作進一步觀察。

三、PC-3、CCRF-CEM、MDA-MB-231 細胞致毒活性篩選

細胞株：PC-3、CCRF-CEM、MDA-MB-231

本實驗所用之細胞株 PC-3 為一男性賀爾蒙非依賴型人類前列腺癌細胞株。

CCRF-CEM 為急性白血病細胞株。MDA-MB-231 為高轉移性乳癌細胞株。

MTT assay : (用以量測細胞存活比例)

在有或沒有 serum 存在下，給予化合物 57 分別處理 24 小時後，改換為 100 μ l 含有 0.5 mg/ml MTT solution 的 culture medium，於 37 °C 的細胞培養恆溫箱中作用 1 小時。然後以 DMSO 於室溫下作用 10 分鐘，使用 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader 讀取波長 550 nm 吸光值之變化。其吸光值的數據依據細胞數標準曲線 (standard curve) 求出細胞存活數目。與對照組 (DMSO 0.1%) 比較之百分比即為細胞存活率。

LDH release assay : (用以辨別細胞壞死)

細胞死亡之機制分為細胞凋亡 (apoptosis) 和細胞壞死 (necrosis) 兩種。其中，necrosis 會引發發炎等不良反應。而 apoptosis 則為體內清除細胞的正常生理機制之一。是否有 lactate dehydrogenase (LDH) 的釋放，是細胞破裂壞死的特徵之一 (LDH 釋放愈多，細胞死亡愈有可能是 necrosis 造成)。

流式細胞儀 (flow cytometry) 測定細胞凋亡與細胞週期

細胞以化合物 57 處理後，將收集的細胞以冰的 70% v/v ethanol 再懸浮 (resuspension) 後放置於 -20 °C，30 分鐘以上。細胞在室溫下加入 0.2 ml DNA 染色液 - propidium iodide staining buffer，室溫避光下染色 30 分鐘。將細胞過濾後以流式細胞儀 FAC Scan 和 Cell Quest program (Becton Dickinson) 分析細胞週期。同時，分析 DNA 含量低於 G₀/G₁ peak (2N) 的區域 (即 sub-G₁)，代表細胞凋亡所造成的 DNA 斷裂。每個樣品皆收集 10,000 個細胞來分析結果。

貳、人類前骨髓性血癌 HL-60 細胞週期 (cell cycle) 實驗¹²³

HL-60 cells (1×10^5 /mL) 培養於 24-well 之培養皿中使總體積為 1 mL/well；並加入各種不同濃度之 2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid 類緣化合物於溫度 37 °C、溼度 95 %、5 % CO₂ 之培養相中培養固定時間之後，分別取出作 cell cycle 實驗。

首先自每個 well 中取出 800 μ L 細胞液離心 (1200 r.p.m., 5 min) 後去除上清液；再用 200 μ L

HBSS (Hanks' balanced salt solution) (含有 10 mM *N*-[2-hydroxy ethyl]piperazine-*N'*-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES), pH 7.4 NaHCO₃) 洗之, 接著再次離心(1200 r.p.m., 5 min) 去除上清液。將細胞團塊彈散後, 再慢慢加入 70 % EtOH 固定之; 最後於-20 °C 冰箱中放置隔夜。第二天自冰箱取出後離心(1200 r.p.m., 5 min) 去除上清液; 再用 200 μL HBSS 洗之, 接著再次離心(1200 r.p.m., 5 min) 去除上清液; 加入 cell cycle reaction stain solution 在暗室中室溫下反應 30 分鐘。最後以流式細胞儀 (FAC Scan) 收集細胞並分析之; 細胞週期之統計則利用 ModFit 軟體處理¹²⁴。

參、抗發炎活性試驗方法

1. 嗜中性白血球懸浮液之製備

大白鼠 (Sprague Dawley, 300-350 g) 以 pentobarbital (60 mg/kg) 腹腔注射麻醉後, 從腹腔中動脈抽取血液 (以 100 mM EDTA 當抗凝劑), 與 dextran 混合後在試管中靜置使紅血球沈澱。取上清液離心 (400 g) 10 分鐘, 丟棄大部份上清液, 將沈澱細胞懸浮液輕輕加至含有 Ficoll-Hypaque 的試管中, 離心 (500 g) 30 分鐘¹²⁵。將沈澱細胞懸浮液離心 (700 g) 10 分鐘, 並以低張 NaCl solution (0.05%) 使沈澱細胞中剩餘的紅血球破裂, 以去除紅血球¹²⁶⁻¹²⁷; 再用含有 0.25% bovine serum albumin (BSA) 之高張 NaCl solution (1.75%) 清洗並調整至等張, 使細胞懸浮於 HBSS 中 (1×10^7 cells/ml), 即可製備純度及存活力均大於 95% 的嗜中性白血球懸浮液。

2. 實驗方法

(A) Neutrophil degranulation method

(1) β -Glucuronidase 釋放反應之測定¹²⁸

將嗜中性白血球細胞懸浮液分別與 DMSO 或檢品溶液於 37 °C 培養三分鐘後, 個別加入 fMLP (1 μM) 與之作用, 經 45 分鐘後, 加入冰浴過之 Tyrode's solution 中止反應, 混合液經離心 (1000 g) 十分鐘後取出上清液, 利用上清液中之 β -glucuronidase 與 phenolphthalein- β -D-glucuronide 反應後, 經由分光光度計在 550 nm 測量其中所含的 β -glucuronidase。

(2) Lysozyme 釋放反應之測定¹²⁹

同 β -glucuronidase 釋放反應之處理後, 將所得含 lysozyme 之上清液, 利用 *Micrococcus lysodeikticus* 細胞作為受質, 在分光光度計 450nm 下測量。

β -glucuronidase 及 lysozyme 的釋放表示如下:

$$\text{release\%} = \frac{(\text{release elicited by secretagogue-spontaneous release})}{\text{total content}} \times 100 \%$$

(total content 是將細胞懸浮於 Triton X-100 後所測量之值)

(B) Superoxide formation method

(1) Superoxide anion 釋放反應之測定

將含嗜中性白血球之細胞懸浮液(2×10^6 cells/ml)以及 ferricytochrome *c* (0.5 mg/ml) 的比色槽，置於 37 °C 恆溫的雙光束分光光譜儀中預熱 3 分鐘，再將 fMLP (0.3 μ M) 加入此檢品溶液中 30 分鐘，對照組比色槽另外含有 6.6 μ g/ml 的 superoxide dismutase (SOD)。加入測試之化合物後，在 550 nm 下測定 SOD 可抑制的 ferricytochrome *c* 吸光值之變化¹³⁰。在 dihydroxyfumaric acid (DHF) 自發氧化反應之測量，比色槽中含 0.891 mM DHF 及 0.274 mM nitroblue tetrazolium (NBT)，對照組比色槽另外含有 6.6 μ g/ml 的 SOD。加入測試之化合物後，在 560 nm 下測定 SOD 可抑制的 NBT 吸光值之變化¹³¹。

(三)抗過敏活性試驗方法

1. 肥胖細胞懸浮液之製備

大鼠經頸部放血後 (exsanguinated rats ; Sprague-Dawley , 250~300 g)，將 10ml 含肝素之 Tyrode's solution A 注入鼠腹腔內，按摩 1~2 分鐘並取出腹腔溶液，經 38% 牛血清蛋白溶液離心，沉澱細胞經清洗後，以 Tyrode's solution B 懸浮成每毫升 $1 \sim 1.5 \times 10^6$ 個細胞¹³²⁻¹³³，並測定細胞存活率¹³⁴。

2. 實驗方法

(A) Mast cell degranulation method

(1) 組織胺 (Histamine) 釋放反應之測定¹³⁵

將此肥大細胞懸浮液分別與 DMSO 或檢品溶液於 37 °C 培養 3 分鐘，個別加入 compound 48/80 (10 mg/ml) 與之作用，經 15 分鐘後，加入冰溶過之 Tyrode's solution 中止反應，混合液經離心 (1000 g) 十分鐘後取出上清液，利用上清液中所含之組織胺與 *O*-phthaldehyde 聚合後以螢光分光光度計在 350/450 nm 處測量組織胺含量。

*Compound 48/80 : a polymer of *N*-(*p*-methoxyphenylethyl)methylamine with formaldehyde

(2) β -Glucuronidase 釋放反應之測定¹²⁸

同 histamine 釋放反應，將所得含 β -glucuronidase 之上清液，利用

phenolphthalein- β -D-glucuronidase 作為受質，以分光光度計在 550 nm 下測量所含之 β -glucuronidase。

Histamine 及 β -glucuronidase 的釋放表示如下：

Release% = (release elicited by secretagogue-spontaneous release) / total content \times 100
(total content 是將細胞懸浮於 Triton X-100 後所測量之值)

(四) NO (nitric oxide) 及 TNF- α 實驗方法

1. 材料

- (1) Iscove' s Modified Dulbecco' s Medium 與牛胚胎血清 (fetal bovine serum, FBS): 購自 Gibco BRL (Gaithersburg)
- (2) TNF- α 酵素免疫分析 (enzyme immunoassay , EIA) kit : 購自 Genzyme Co. (MA)
- (3) 老鼠干擾素- (mouse interferon- , IFN-): 購自 R&D Systems (MN)
- (4) RAW 264.7 mouse macrophage-like cell line : 購自 American Type Culture Collection , MD.
- (5) Dulbecco' s Modified Eagle Medium (DMEM) 與犢胚胎血清 (fetal calf serum): 購自 Gibco BRL (Gaithersburg)
- (6) 其餘試藥皆購自 Sigma (St. Louis, MO.)

2. 細胞培養與前處理¹³⁶

Murine microglial cell lines N9 係以含有 2% FBS 與抗生素之 Iscove' s Modified Dulbecco' s Medium 培養；在前處理的部分，首先將細胞與代測藥物於 37 混合一小時，之後再以 100 ng/ml 的 LPS (*Escherichia coli*, serotype 0111 : B4)加 100U/ml INF-? 刺激 24 小時，最後保存於-70 下，需要時才取出。

3. NO 之測定¹³⁷

依序將 40 μ l , 5 mM 的 sulfanilamide、10 μ l , 2 M HCl 及 20 μ l , 40 mM naphthylethylenediamine 加入 150 μ l 培養基中，於室溫下混合 10 分鐘後，以 microplate 計數器在 550 nm 下測其吸光度。一氧化氮標準曲線則以 NaNO₂ 於相同條件下所求得。

4. TNF- α 之測定

培養基中的 TNF- α 測定係使用 TNF- α enzyme immunoassay (EIA) kit 進行測定。

伍、抗血小板活性試驗

(一) 抗血小板凝集作用

如本章第九節所述，血小板在血液凝集過程中擔當相當重要之角色，當血管壁受損時，會促使血小板活化而釋放出ADP、serotonin及collagen等物質，以幫助血小板凝集。

Thrombin、collagen、ADP、platelet-activating factor (PAF) 及thromboxane A_2 等作用劑與血小板細胞膜上之特異性接受體結合後，再經由GTP-binding protein (G protein) 把訊息傳送出去，經由G protein而活化了phospholipase C (PLC)，引起inositol phospholipids的水解，而增加細胞內傳訊者 (intracellular messengers)，如inositol-1,4,5-triphosphate (IP_3)， Ca^{2+} 和1,2-diaclycerol (DG) 的含量； IP_3 會使 Ca^{2+} 從血小板的dense tubular及membrane vesicle釋放出來，而細胞內 Ca^{2+} 濃度的增加則可進一步活化phospholipase A_2 ，以使得phospholipid分解釋放出arachidonic acid (AA) 及PAF。AA會經由cyclooxygenase的作用轉化成prostaglandin endoperoxides，再經thromboxane synthetase 的作用轉化成TXA $_2$ ，而促進血小板的凝集與釋放反應。(Fig. 11)

本實驗即應用上述原理，分別以thrombin、AA、collagen及PAF為凝集引發劑，以測試化合物抑制血小板凝集之相對能力。

(二) 血小板凝集引發劑之製備：

- (1) Collage (bovin tendon) 溶於 15 mM 醋酸水溶液中，於 4℃ 下研磨成均勻的懸浮液後，以 1 mg /毫升的濃度分裝，存於-70℃ 下，使用前再解凍研磨均勻。
- (2) PAF 溶於 CCl_4 中，貯於-20℃ 下，使用前再以去離子水稀釋。
- (3) ADP (adenosine diphosphate)及 sodium arachidonate 以去離子水溶解備用。

(三) 血小板懸浮液 (Platelet suspension) 之製備

根據文獻 Maitou *et al* 之方法¹³⁸，用 100 mM 之 EDTA 與兔耳靜脈抽出血以 1 : 14 (v/v)

之比例混合，在室溫下立即以 $120 \times g$ 離心 10 分鐘。取出上層富含血小板之血漿，再以 $500 \times g$ 離心 10 分鐘，除去血漿後，將下層血小板以含有 EDTA 及 bovin serum albumin (3.5 mg/毫升) 的 Tyrode 溶液懸浮之，在相同轉速下離心 10 分鐘，所得之血小板以不含有 EDTA 之 Tyrode 溶液懸浮之，並以 Coulter counter (Model ZM) 計數，調整血小板計數約為 4.5×10^8 個/毫升，最後加入 1 毫升 Ca^{2+} 靜置 30 分鐘後，進行實驗。

Tyrode 溶液除含 bovin serum albumin 外，其他組成如下 (mM)：NaCl (136.9)，KCl (2.7)， $MgCl_2$ (2.1)， NaH_2PO_4 (0.4)， $NaHCO_3$ (11.9)，glucose (11.1)。

(四) 血小板凝集與 ATP 釋放反應之試驗

根據文獻 Born and Cross (1963)¹³⁹ 之混合物測定方法，以 Lumi-aggregometer (Model 1020, Payton, Cadana) 測定。將血小板懸浮液 0.4 毫升加入經 Silicone 包衣的小玻璃管中，並以小磁棒做每分鐘 900 轉的攪拌，若為特別說明，均在加入凝集引發劑前 3 分鐘添加拮抗劑，全部反應過程皆在 $37^\circ C$ 下進行，凝集程度的表示方法如下：

$$\text{凝集(\%)} = \frac{\text{加凝集引發劑前的吸光度} - \text{加凝集引發劑後的吸光度}}{\text{加凝集引發劑前的吸光度} - \text{Tyrode 溶液的吸光度}} \times 100 \%$$

在某些實驗中，加入 Luciferase-luciferin 混合液 25 毫升，利用其與 ATP 反應所產生之螢光，來測定血小板釋放反應的大小程度以相對值表示之。

PART II

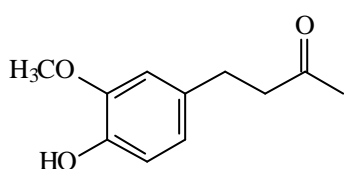
生薑成分Gingerdione及Ferulamide衍生物之抗癌活性與抗
幽門桿菌活性

第一章 緒論

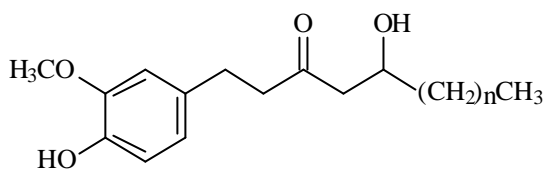
第一節 薑科植物薑 (*Zingiber officinale*) 的研究概況及藥理活性

壹、中藥薑的化學成分：

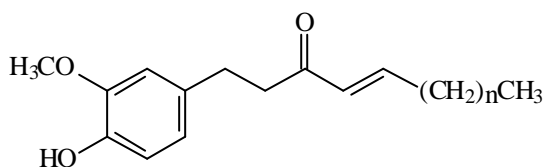
Thresh在1879年首先以現代化學方法研究薑(*Zingiber officinale* Roscoe)¹。在1917~1918年間Nomura和Nelson由薑的根部分離出zingerone, gingerols, shogaols等化合物, 並進行化學反應鑑定其結構²⁻³。關於薑的化學成分研究至今已鑑定出一百多種化合物, 其中薑之辛辣成分以zingerones、gingerols、shaogaols和gingerdiones等四大類為最重要, 其生理活性之研究報告最多⁴⁻⁵。



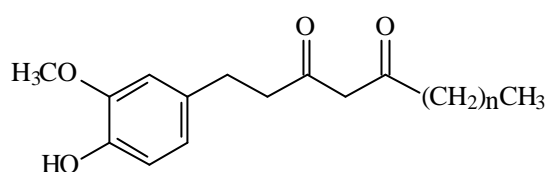
Zingerone



Gingerol



Shaogaol

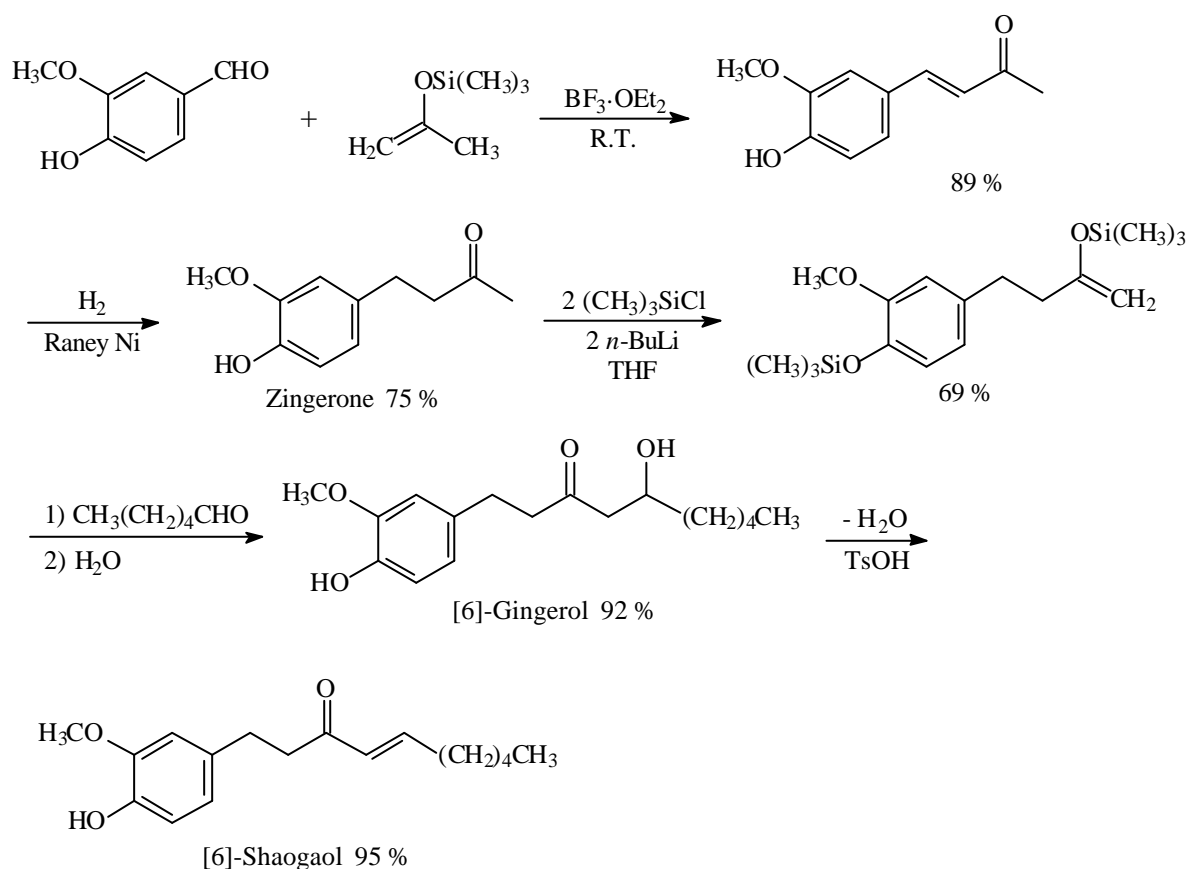


Gingerdione

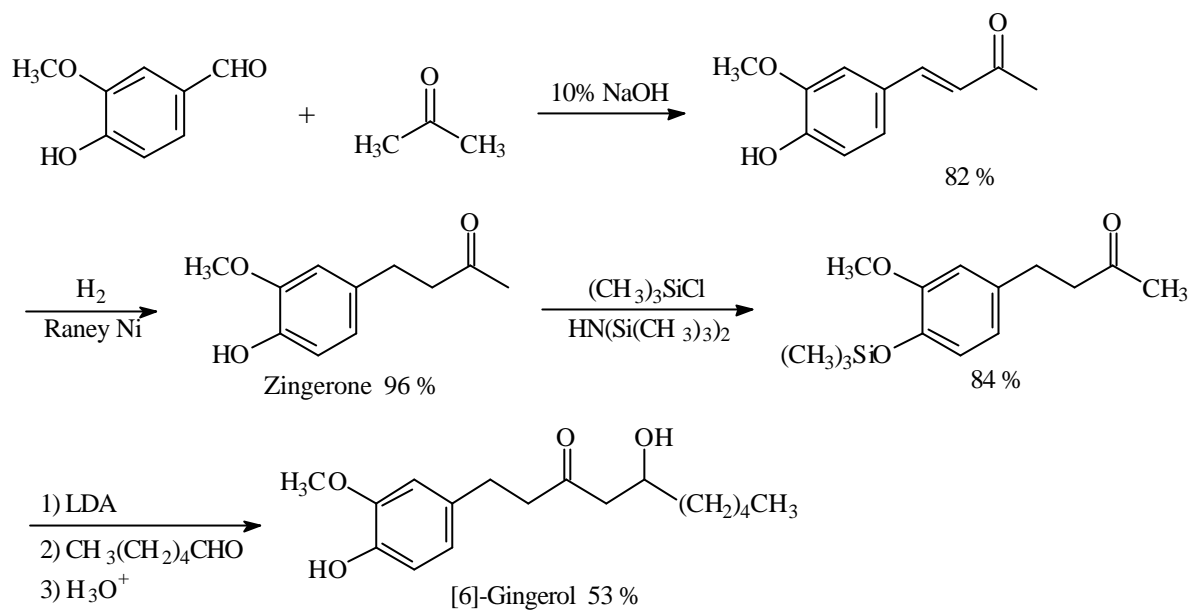
貳、薑中化學成分之合成：

一、Zingerone、gingerol和shogaol之合成方法：

薑中之芳香刺激性成分—zingerone、gingerols、shaogaols在1917~1918年被Nomura及Nelson分離並確認結構後，Nomura、Lapworth和K. Banno等即開始合成上述化合物，陸續有更多的學者嘗試以不同方法合成此類化合物⁶⁻¹³。1979年D. Enders等學者合成具光學活性之gingerol¹⁴後有更多不同合成光學活性方法被探索著¹⁵⁻¹⁹。在這些方法中，以Banno和Whiting得到較好之結果^{9, 11}。兩者均以vanillin和acetone為起始物，但Banno先將acetone轉換成較具活性之silyl enol以進行反應（**Scheme 1**）；而Whiting則在鹼性條件下進行傳統之Aldol condensation（**Scheme 2**）。Banno得到較好之產率，但其反應條件較難控制且再現性差。Whiting的方法產率雖不高，但操作簡便。Zingerone、gingerol和shogaol合成反應如下：



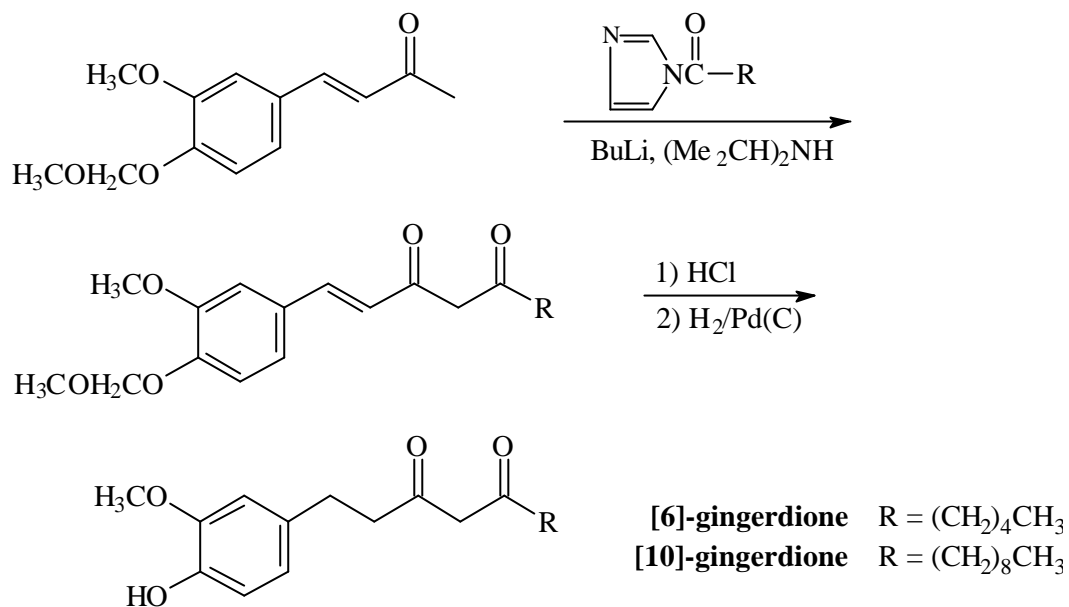
Scheme 1



Scheme 2

二、Gingerdione 之合成方法:

1976年P. Denniff及D.A. Whiting合成[6]-gingerdione¹⁰，1991年I. Kazuhito及O. Hiroyuki等，合成天然物中既有之[10]-gingerdione¹³，其皆利用ketone與imidazolamide反應而得，合成反應如下：



Scheme 3

參、薑主成分之生理作用

薑(*Zingiber officinale* Roscoe)的根，在中國傳統藥材上常被使用。其主要用途為健胃、抗嘔吐、抗痢疾、抗氣喘、化痰、消炎、祛瘀等方面。亦可用於治療與胃腸、呼吸相關之疾病²¹。

薑主成分zingerone、gingerol、shaogaol和gingerdione之重要的生理作用列舉如下：

- 一、對消化系統之作用：[6]-shaogaol與[6]-gingerol具有胃黏膜細胞保護作用及抑制胃收縮²²；[6]-gingesulfonic acid也有抗胃潰瘍作用²³。
- 二、保肝、利膽作用：[6]-shaogaol、[10]-shaogaol對四氯化碳和半乳糖胺所致的肝損害有抑制作用，且有利膽之作用²⁴⁻²⁶。
- 三、鎮吐作用：gingerdione、gingerenone有末梢性鎮吐作用²⁷⁻²⁸，galanolactone為5HT₃的拮抗劑⁵。
- 四、對中樞神經系統作用：[6]-shaogaol、[6]-gingerol對中樞神經有抑制作用²⁹，能抑制小鼠自發運動，延長pentobarbital所誘導的睡眠時間³⁰。
- 五、發汗及抗下痢的作用：[6]-shagaol可抑制因5-HT所造成之體溫過低作用。
[6]-shaogaol、[6]-dehydrogingerdione和gingerols具有抗下痢作用³¹。
- 六、對心臟的作用：gingerols可活化骨骼肌及心肌肌漿膜的Ca²⁺-pumping ATPase，故有明顯的強心作用³²⁻³³。
- 七、抗菌、抗原蟲作用：zingerone、gingerenone對金黃色葡萄球菌、傷寒桿菌、痢疾桿菌、綠膿桿菌有明顯的抑菌作用³⁴⁻³⁵，gingerols、shaogaols具有殺死軟體動物和血吸蟲的作用³⁶。
- 八、抗血小板凝集作用：如Table 1所示，shaogaols，gingerols及isodehydrogingerdione對花生四烯酸（以下簡稱AA）引起之血小板凝集具有明顯之抑制活性。

Table 1. Antiplatelet activities isolated from *Zingiber officinale*.

Compound	AA (100 μ M)
[6]-shaogaol	80.6 ± 16.8 % (0.5 μ g/ml)
[8]-shaogaol	98.4 ± 1.4 % (0.5 μ g/ml)
[6]-gingerol	60.8 ± 22.2 % (0.2 μ g/ml)
[8]-gingerol	78.9 ± 4.4 % (1 μ g/ml)
[10]-gingerol	96.8 ± 26.8 % (1 μ g/ml)
[6]-isodehydrogingerdione	79.5 ± 14.5 % (0.5 μ g/ml)
[10]-isodehydrogingerdione	100.0 ± 0.0 % (1 μ g/ml)

九、對PG生合成之抑制活性：如Table 2所示，gingerdiones及dehydrogingerdiones對PG生合成之抑制活性比indomethacin更強³⁷。

Table 2. PG biosynthetase inhibition from *Zingiber officinale*³⁷.

Compound	IC ₅₀ (μM)
[6]-gingerol	5.5
[6]-gingerdione	1.6
[10]-gingerdione	1.0
[6]-dehydrogingerdione	1.0
[10]-dehydrogingerdione	2.3
indomethacin	4.9

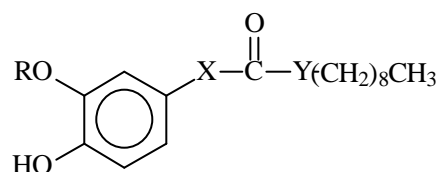
十、其他作用：shaogaols可促使神經末稍釋放出活性物質²⁶。

肆、Gingerol衍生物之生理活性：

一、對活性氧形成之抑制活性：

如Table 3所示，gingerol衍生物對active oxygen formation之抑制活性相當明顯。

Table 3. Active oxygen formation inhibited by gingerol derivatives¹³.



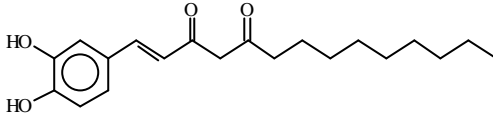
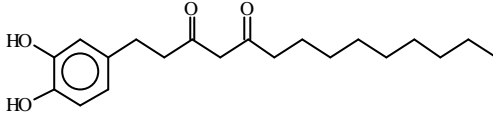
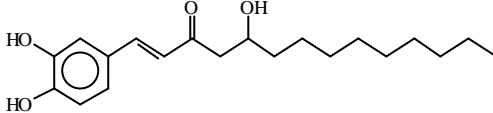
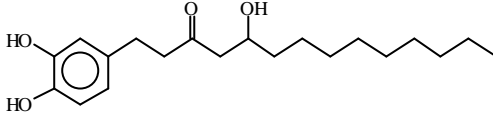
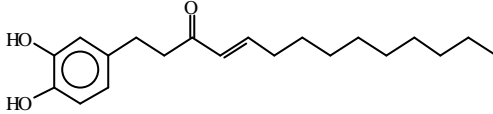
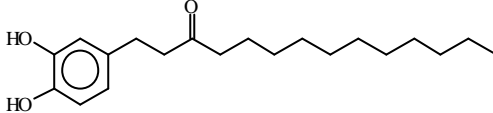
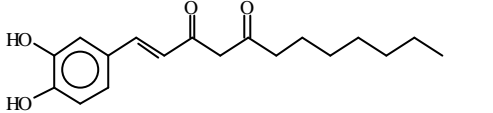
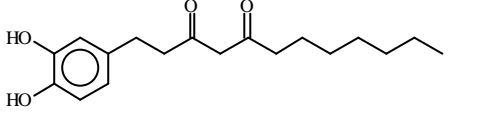
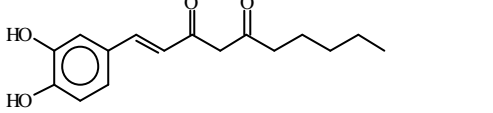
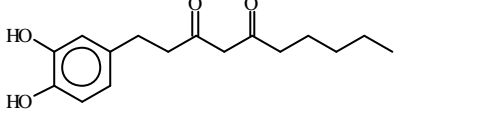
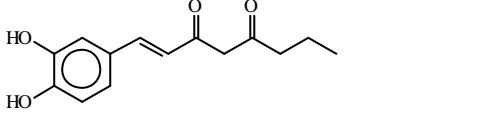
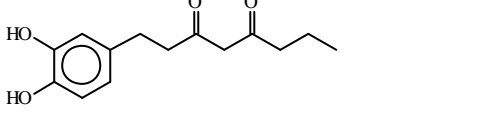
	R	X	Y	Z	IC ₅₀ (μM)
A1	CH ₃ -	-CH ₂ -CH ₂ -	-CH ₂ -Z-	CHOH	2.0
A2	CH ₃ -	-CH=CH-	-CH ₂ -Z-	CHOH	1.0
A3	CH ₃ -	-CH ₂ -CH ₂ -	-CH ₂ -Z-	C=O	3.0
A4	H	-CH ₂ -CH ₂ -	-CH ₂ -Z-	C=O	0.2
A5	CH ₃ -	-CH ₂ -CH ₂ -	-CH=CH-		3.0
A6	H	-CH=CH-	-CH ₂ -Z-	CHOH	0.3
A7	H	-CH ₂ -CH ₂ -	-CH ₂ -Z-	CHOH	0.09
A8	H	-CH ₂ -CH ₂ -	-CH=CH-		0.4

二、對5-lipoxygenase之抑制活性：

如Table 4所示，gingerdione之catechol衍生物對5-lipoxygenase之抑制活性甚強。

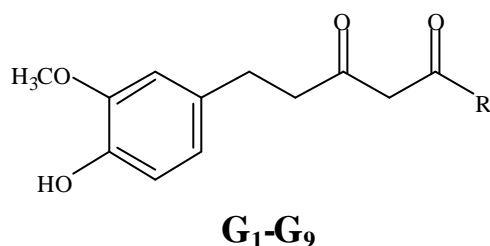
Table 4. 5-Lipoxygenase inhibition from catechol derivatives²⁰.

Structure	IC ₅₀ (μM)
-----------	-----------------------

	0.33
	0.45
	0.42
	0.33
	0.32
	0.16
	0.12
	0.20
	0.62
	0.17
	0.19
	0.38

三、最近著者等合成一系列的gingerdiones (G₁-G₉)³⁸及ferulamide衍生物 (F₁-F₁₆)³⁹，發現這些化合物具有相當強之抑制血小板凝集作用。如Table 5及Table 6所示，化合物G₄的活性與indomethacin相當，是抑制活性中最強的化合物；而其他化合物G₂、G₃等抑制活性也頗為顯著，大致而言，此類化合物之抑制血小板凝集作用均為asiprin的6倍以上。至於ferulamide衍生物中，化合物F₁₂之IC₅₀也只是aspirin的1/17而已，其他化合物之抗血小板凝集強度也大多與aspirin相當。故這類結構的物質具有很強之抗血小板活性。

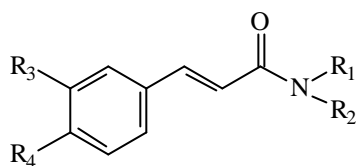
Table 5. The inhibitory effect of gingerdione derivatives (G₁-G₉) on platelet aggregation induced by arachidonic acid (*in vitro*)^a



Compound	R	IC ₅₀ (μM)
G₁	CH ₃	2.37
G₂	CH ₂ CH ₃	0.92
G₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	0.72
G₄	CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃	0.22
G₅	CH ₂ (CH ₂) ₃ CH ₃	3.80
G₆	CH ₂ (CH ₂) ₄ CH ₃	2.35
G₇	CH ₂ (CH ₂) ₅ CH ₃	3.63
G₈	CH ₂ (CH ₂) ₆ CH ₃	1.74
G₉	CH ₂ (CH ₂) ₇ CH ₃	2.76
Aspirin		20.00
Indomethacin		0.25

^a Platelets were incubated with a tested sample or 0.5% DMSO at 37 °C for 1 min, then AA (100 μM) was added to trigger aggregation. Aspirin and indomethacin are positive controls. Values are expressed as mean ± SE, n = 3-7.

Table 6. The inhibitory effects of ferulamide derivatives (**F₁-F₁₆**) on platelet aggregation induced by arachidonic Acid (*in vitro*).



F₁-F₁₆

	R ₄	R ₃	R ₂	R ₁	IC ₅₀ (μM)
F₁	OH	OCH ₃	H	H	28.86
F₂	OH	OCH ₃	H	CH ₃	26.57
F₃	OH	OCH ₃	H	CH ₂ CH ₃	22.62
F₄	OH	OCH ₃	H	CH ₂ CH ₂ CH ₃	12.77
F₅	OH	OCH ₃	H	CH ₂ (CH ₃) ₂	42.55
F₆	OH	OCH ₃	H	CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃	4.03
F₇	OH	OCH ₃	H	CH ₂ (CH ₂) ₃ CH ₃	2.47
F₈	OH	OCH ₃	H	CH ₂ C ₅ H ₆	>353.36
F₉	OH	OCH ₃	CH ₃	CH ₃	13.39
F₁₀	OH	OCH ₃	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	7.99
F₁₁	OH	OCH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	2.02
F₁₂	OH	OCH ₃	CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃	CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃	1.15
F₁₃	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₂ CH ₂ CH ₃	24.42
F₁₄	OH	OH	H	CH ₂ CH ₂ CH ₃	10.23
F₁₅	OH	H	H	CH ₂ CH ₂ CH ₃	32.24
F₁₆	H	H	H	CH ₂ CH ₂ CH ₃	47.09
Aspirin					20.00

Platelet were incubated with a test sample or 0.5% DMSO at 37 °C for 1 min, then AA (100 μM) was added to trigger the aggregation. Aspirin is a positive control. Values are expressed as mean ±S.E. from 4 to 6 separate experiments.

四、此兩類 Gingerdione 與 ferulamide 衍生物之抗血小板凝集活性與 indomethacin 或 aspirin 相類似，但因其結構差異甚多，作用機轉可能不同，於是測試了這兩類化合物對 cyclooxygenase-1 (COX-1) 及 cyclooxygenase-2 (COX-2) 之抑制活性。如 Table 7 及 Table 8 所示，此類化合物對 COX-1 及 COX-2 之抑制活性相當弱，其 IC₅₀ 均在 300 μM 以上。顯然其抗血小板凝集之作用機轉與 aspirin 不同，此結果對新型抗血小板藥物之開發而言是相當值得參考之資訊。

Table 7. The inhibitory effects of compounds **G₁**, **G₂**, and **G₄** on COX-1 and COX-2 (*in vitro*).

Compound	IC ₅₀ (μM)	
	COX-1 ^a	COX-2 ^a
Indomethacin	1.7	2.4
G₁	>300	>300
G₂	>300	>300
G₄	>300	>300

^a Cyclooxygenase activity was determined by reading absorbance at 530 nm. Compounds were screened at 300 μM.

Table 8. The inhibitory effects of ferulamides derivatives (**F₁**-**F₁₆**) on cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2.

Compound	IC ₅₀ (μM)	
	COX-1	COX-2

F ₁	>300	>300
F ₂	>300	>300
F ₃	>300	>300
F ₄	>300	>300
F ₅	>300	>300
F ₆	>300	>300
F ₇	>300	>300
F ₈	>300	>300
F ₉	>300	>300
F ₁₀	>300	>300
F ₁₁	>300	>300
F ₁₂	>300	>300
F ₁₃	>300	>300
F ₁₄	>300	>300
F ₁₅	>300	>300
F ₁₆	>300	>300
Aspirin	1.7	2.4

第二節 幽門桿菌 *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)⁴⁰

自從 1983 年兩位澳洲醫師 Barry Marshall 和 Robin Warren 首度發現幽門桿菌以來，幽門桿菌在消化性潰瘍所扮演的角色已愈來愈明確，現已證實該菌是引起胃黏膜內層發炎(俗稱胃炎)和十二指腸或胃潰瘍之主要原因；除此之外，該菌也在形成胃癌的過程中扮演相當重要之角色。幽門桿菌主要經口傳染，大多數在孩童早期就得到感染。開發中國家的孩童比已開發的國家罹病的年齡來的早且盛行率也較高。隨著年齡增加罹病的機會也較高。

幽門桿菌是一種寄生在胃黏膜的細菌(Fig. 1)，能耐強酸存活生長在胃黏膜內深層，不像其他細菌會被胃酸殺死，它能利用其尿素 將尿素轉換成阿摩尼亞和二氧化碳，提供具保護作用的鹼性生活環境，以降低胃酸濃度，使幽門桿菌不被胃酸摧毀，同時也會釋出一些物質破壞胃黏膜，對胃壁造成局部的發炎反應。目前已清楚這幽門桿菌感染也在發展成胃癌扮演一角色，並非所有均是幽門桿菌感染所引起，但相信 40-60 %

胃癌幽門桿菌感染與胃癌相關，更多關於幽門桿菌感染和胃癌相關性的持續研究報告也越來越多，因此世界衛生組織已宣言幽門桿菌感染是第壹級致癌物。

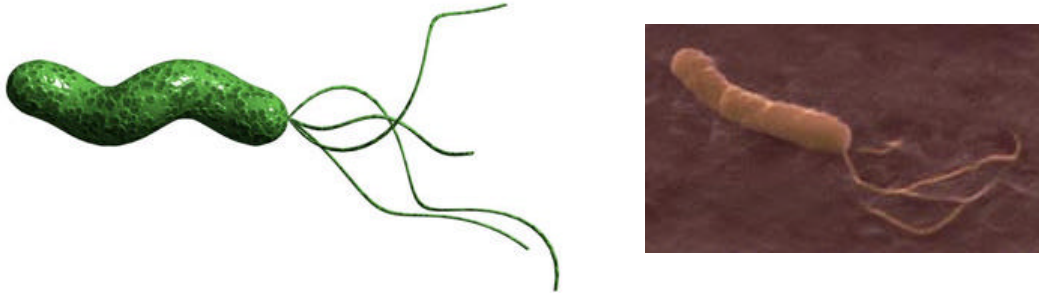


Fig. 1.幽門桿菌的電腦合成圖及電子顯微鏡放大圖。

(<http://www.micro.unsw.edu.au!/THEHELI.COP/helihome.html>)

幽門桿菌潰瘍的治療:

(一) 用來治療幽門桿菌性潰瘍的藥有抗生素，抑制胃酸藥及胃黏膜保護劑。

1997 年亞太幽門螺旋桿菌處理之共識會議建議三合一療法(如兩種抗生素加胃酸抑制劑或胃黏膜保護劑)⁴¹。第一線用藥如下:

1. 氫離子幫浦抑制劑或rantidine bismuth citrate (二選一)

(a) omeprazole 20 mg bid、 lansoprazole 30 mg bid、 pantoprazole 40 mg bid

或rabeprazole 20 mg bid

(b) ranitidine bismuth citrate 400 mg bid

2. clarithromycin 500 mg bid

3. amoxicillin或metronidazole (二選一)

(a) amoxicillin 1000 mg bid

(b) metronidazole 400 mg bid

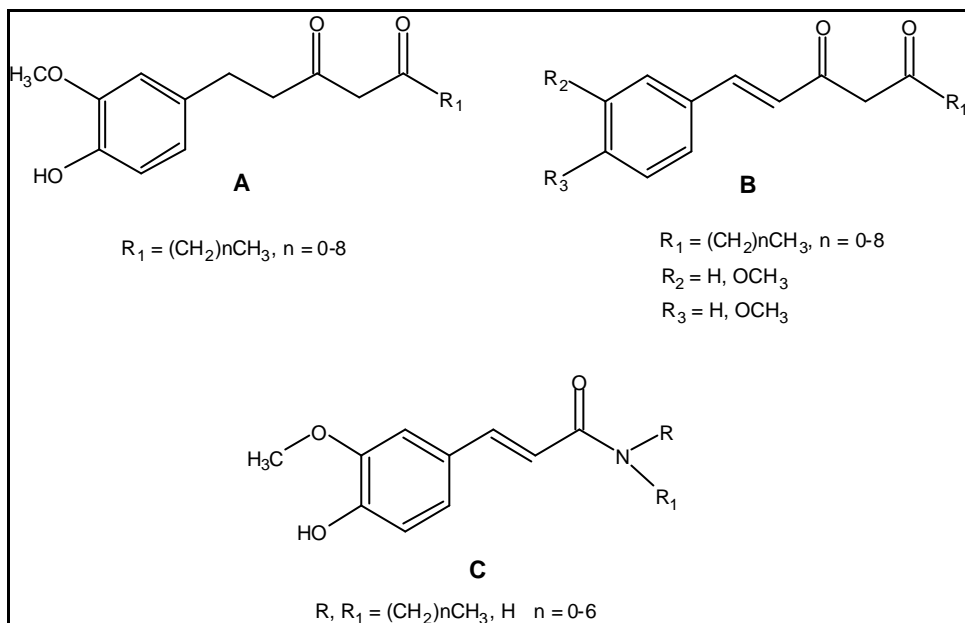
(二) 免疫蛋黃體 (幽門桿菌殺手)⁴²

國內近年發表了一種免疫蛋黃體，對於幽門桿菌有相當的好的殺菌效果⁴³。該免疫蛋黃體是從帶有抗體的雞蛋的卵黃所精練純化出來的，對於殺死胃中的幽門螺旋桿菌有相當的幫助。但仍在試驗階段，故有臨床醫生仍對此持保留的態度。

第三節 研究動機與目的

首先 Nogales 等學者在 Nature 雜誌中提出提出微管蛋白質結構有一個富含 leucine 及 isoleucine 的特殊厭水性區⁴³，這個位於 微管蛋白 S9-S10 或 微管蛋白的紫杉醇結合位附近之脂溶性的長條形區域，可以容下 12 個碳長鏈，如 Fig. 2 所示。接著 Fatih M. Uckun 等學者於 2000 年由此結果再利用分子電腦模擬接合此區域內特殊蛋白質序列的相關化學分子如圖所示並著手設計並合成含有長鏈結構的化合物 WHI-261⁴⁴、COBRA-1⁴⁵，獲得的結果證明有碳氫長鏈的 WHI-261、 COBRA-1 均有抑制微管蛋白聚合的作用。因上述結果的啟示，回顧本實驗室過去所合成過的 gingerdione 類緣化合物的側鏈有一碳氫飽和的長鏈部分，故合成一系列之 gingerdione 類緣化合物，以初步提供作為抑制細胞增殖活性之篩選，再將抑制活性優異之化合物進一步測試微管聚合抑制活性，藉以尋找新穎之特異結構的抗癌劑。

另一方面，gingerol 成分對幽門桿菌具有相當強之抑制活性，而母核結構與 gingerol 類似之 gingerdiones 與 ferulamides 類成分對幽門桿菌(*Helicobacter pylori*)抑制活性之報告仍未見諸於文獻，故著者仿照過去之合成方法，合成一系列之 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3, 5-alkanedione 類緣化合物(A) 2, 3-unsaturated gingerdione 類緣化合物(B)及 ferulamides 類緣化合物(C)，並提供化合物作為抗幽門桿菌活性之篩選，藉以尋求新型之抗幽門桿菌活性物質。



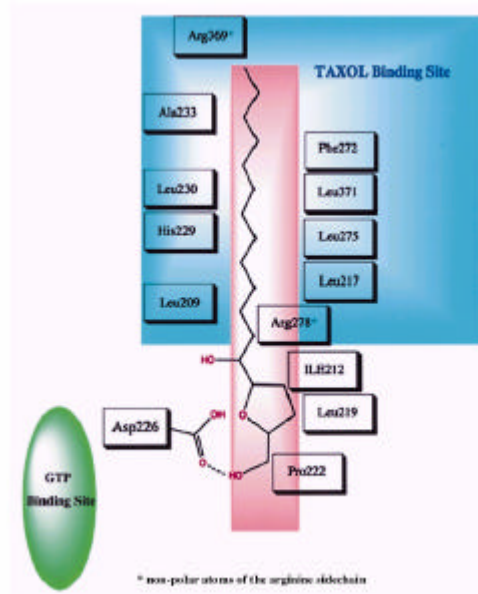
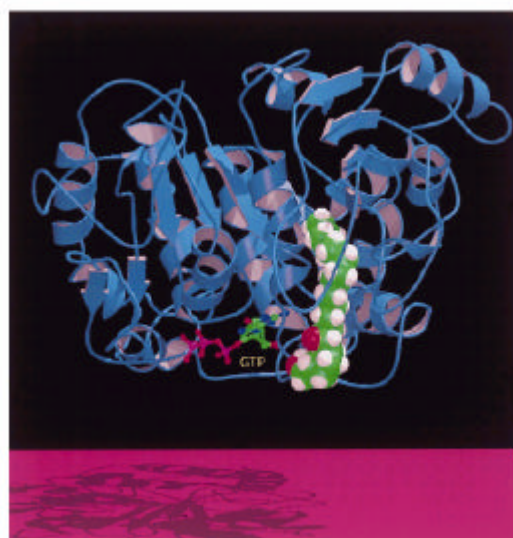


Fig. 2. (a) A ribbon representation of β tubulin structure and a space-filling model of the compound WHI-261 which was docked into the tubulin binding site. The compound WHI-261 forms extensive interactions with the leucine-rich region located in and extending beyond the taxol binding site on β tubulin, and also with the same location of a tubulin. (b) A schematic drawing of WHI-261 interaction with the protein residues in the vicinity of binding site on β tubulin.⁴⁴

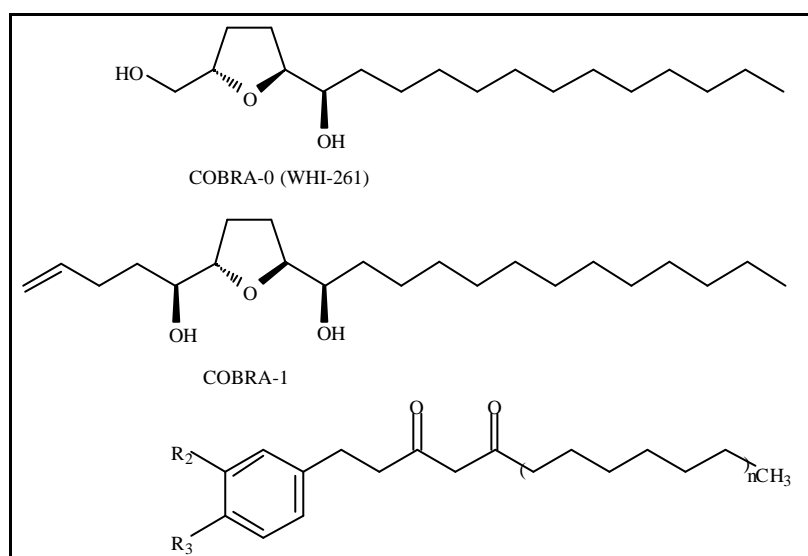
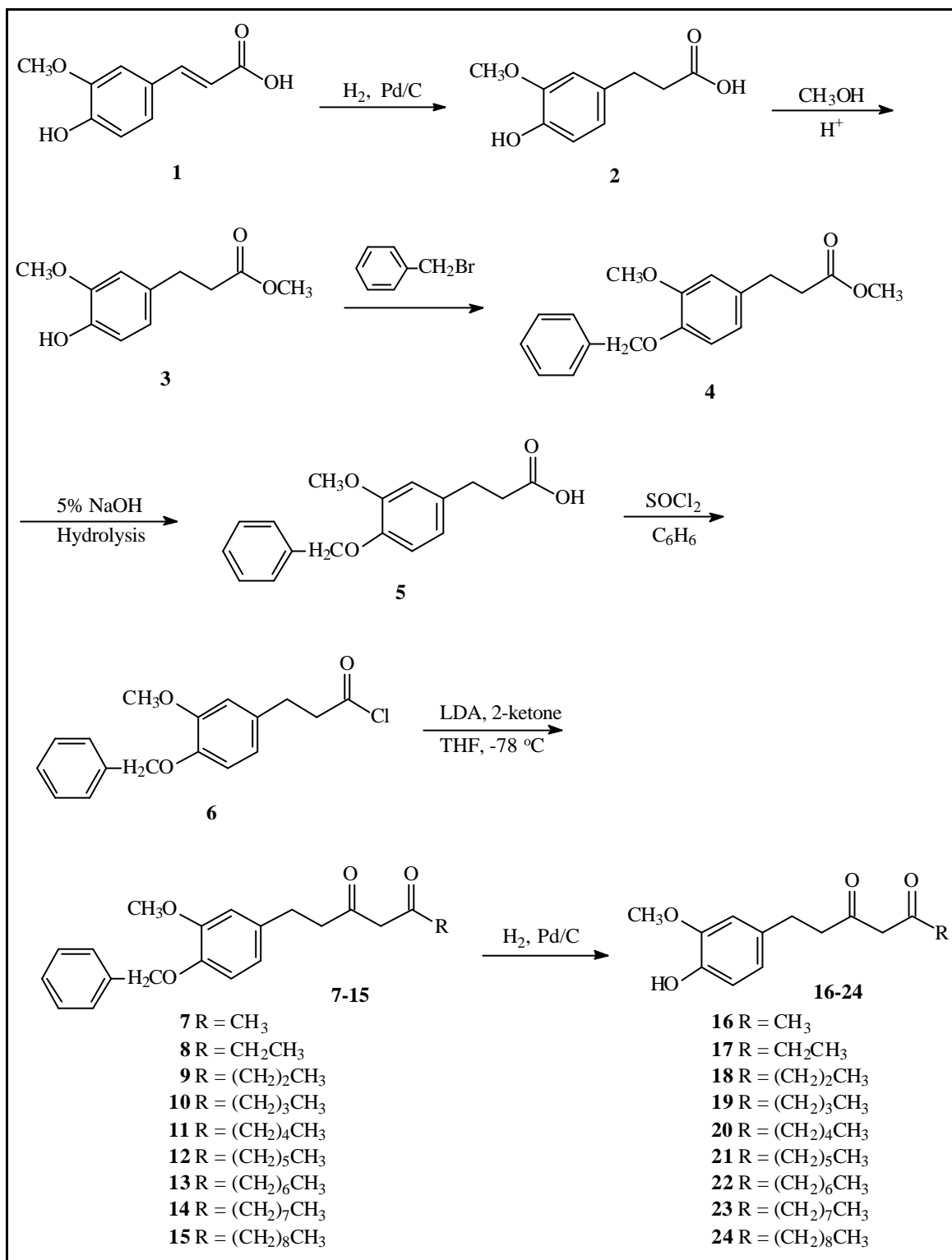


Fig. 3. COBRA-0 (WHI-261)、COBRA-1 及 gingerdione 衍生物之結構

第二章 研究經過

第一節 Gingerdione 類緣化合物(16-24)之合成

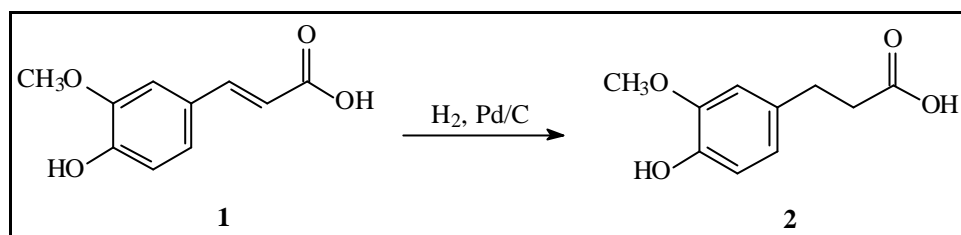
如前所述，P. Denniff (1976)及 I. Kazuhito (1991)等學者均發表了有關 gingerdione 之合成方法^{10,13}；隨後，G. Solladie 等也在 1993 年發表 gingerol 之合成方法，其產率較佳，處理方法簡易¹⁹。故著者應用在 gingerdione 類緣化合物之合成，此方法略加修飾後，其合成途徑如 Scheme 4 所示。



Scheme 4

現將此類化合物之合成及結構鑑定分述如下：

3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)propionic acid (2)之合成



Scheme 5

以 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid (1) 為起始原料，在 5 % NaOH 水溶液中，Pd / C 的催化下，以氫氣進行 catalytic hydrogenation，即可得到還原產物 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propionic acid (2)。

化合物 2 為白色針狀晶體，熔點為 96.2-97.4 。

質譜 (EIMS) (圖 2-1)：由其分子離子峰 (m/z 196)，及元素分析結果得知此化合物之分子式為 C₁₀H₁₂O₄，與預期相符。

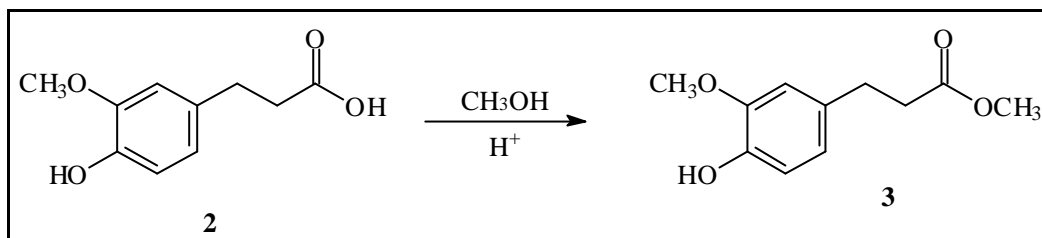
IR 圖譜 (圖 2-2)：3422 cm⁻¹ 處有 -OH cm⁻¹ 顯示有寬且淺的 O-H stretching vibration 吸收帶，1701 cm⁻¹ 處有 C=O 吸收訊號，1612、1435 cm⁻¹ 為芳香環骨架振動之吸收帶。

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) (圖 2-3)：圖譜分析結果得知其積分值顯示有 12 個氫。 8.77 (1H, *br*) 為 -OH 之訊號，3.71 (3H, *s*) 為 -OCH₃ 之訊號。2.69 及 2.45 為 aliphatic alkyl group 之訊號，H-2 因受到苯環之誘導效應而位於較低磁場，所以歸屬為 2.69 (2H, *t*, $J = 7.6$ Hz)；2.45 (2H, *t*, $J = 7.5$ Hz) 則為 carbonyl 旁的 H-1 之訊號。此外由 HMBC 圖譜更可確認 H-1、H-2 之歸屬結果。6.58- 6.76 (3H, *m*) 屬於苯環上 3 個氫的訊號，依環上共振效應、吸收峰裂解方式、偶合常數，可定出 6.76 (1H, *dd*, $J =$

8.0, 1.0 Hz) 為H-5'之訊號； 6.63 (1H, *d*, *J* = 8.0 Hz) 為H-2'之訊號；
6.55 (1H, *dd*, *J* = 8, 1.0 Hz) 為H-6'之訊號。

所得到的光譜數據與過去所合成者完全一致，故化合物 2 應為 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propionic acid，其相關之光譜數據整理於 Table 11。

Methyl 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propionate (3)之合成



Scheme 6

將化合物 2 溶於甲醇中，以 H₂SO₄ 為催化劑，進行 esterification，即可得 methyl 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propionate (3)。

化合物 3 為褐色液體。

質譜 (EIMS) (圖 3-1)：分子離子峰 (*m/z* 210) 及元素分析結果得知此化合物之分子式為 C₁₁H₁₄O₄ 與預期相符。

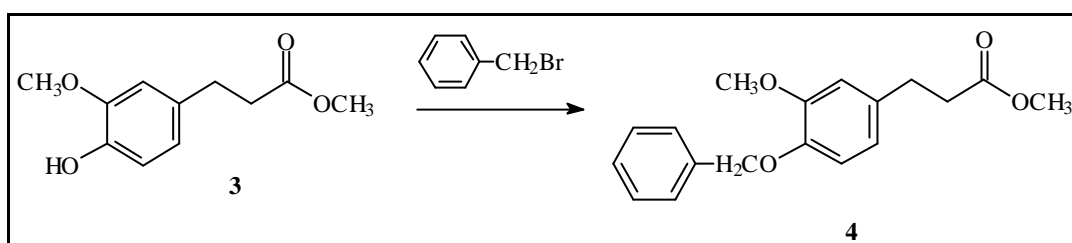
IR 圖譜 (圖 3-2)：推測 3000-2500 cm⁻¹ 區為寬且淺的 O-H 伸展吸收訊號，1732 cm⁻¹ 處為 methyl ester 的 C=O 伸展振動吸收，1604、1512、1454、1424 cm⁻¹ 為芳香環骨架振動之吸收帶。

¹H-NMR (CDCl₃) 圖譜(圖 3-3)：分析結果得知其積分值顯示有 14 個氫。與化合物 2 不同的是—多一個 3.58 (3H, *s*) 訊號並少了 8.76 (1H, *br*, -OH)訊號。
3.64 (3H, *s*)、 3.78 (3H, *s*) 為 2 個-OCH₃ 之訊號，位於較高磁場的 3.64 (3H, *s*)屬於 ester 吸收訊號； 3.78 (3H, *s*)為苯環第三位之 methoxy 之訊號。比照化合物 2 2.85 (2H, *t*, *J* = 8.0 Hz)為 H-2 之訊號； 2.57 (2H, *t*, *J* =

8.0 Hz) 為 H-1 之訊號； 6.61-6.83 屬於苯環上 3 個氫的訊號，依環上共振效應、吸收峰裂解方式、偶合常數，可定出 6.62 (1H, *dd*, $J = 8.0, 1.9$ Hz) 為 H-6' 之訊號；6.67 (1H, *d*, $J = 1.9$ Hz) 為 H-2' 之訊號， 6.81 (1H, *d*, $J = 8.0$ Hz) 為 H-5' 之訊號。

所得到的光譜數據與過去所合成者完全一致，故化合物 3 應為 methyl 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propionate，其相關之光譜數據整理於 Table 11。

Methyl 3-(4-benzyloxy-3-methoxyphenyl)propionate (4) 之合成



Scheme 7

將 methyl 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propionate (3) 溶於 THF 溶液中，在 0 °C 下以 sodium hydride 處理後，與 benzyl bromide 反應，進行 benzylation reaction，即可得到 methyl 3-(4-benzyloxy-3-methoxyphenyl)propionate (4)。

化合物 4 為白色針狀晶體，熔點為 48.6-49.8 °C。

質譜 (EIMS)：由其分子離子峰 (m/z 300) 及元素分析結果得知此化合物之分子式為 $C_{18}H_{20}O_4$ ，與預期相符。

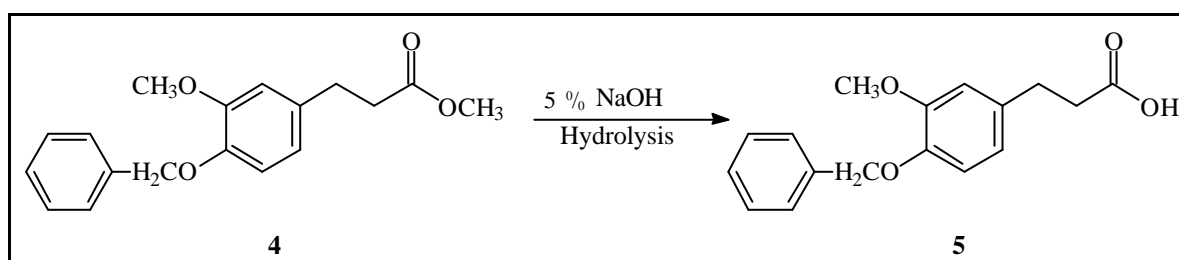
IR 圖譜：3000-2500 cm^{-1} 區為寬且淺的 O-H 伸展吸收，3032、2966、2943 cm^{-1} 處有芳香環或烯類不飽和碳氫=C-H stretching vibration 之吸收，1736 cm^{-1} 處有 C=O 吸收訊號，因受酯類氧的拉電子效應在較高頻率吸收，1589、1516、1420 cm^{-1} 為芳香環骨架振動之吸收帶，1265、1226、1033 cm^{-1} 為芳香醚 C-O-C 的不對稱及對稱伸縮振動吸收帶，1200、1138 cm^{-1} 為寬且強的飽和酯 C=O

stretching vibration 之吸收帶。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 圖譜(圖 4-1): 分析結果得知其積分值顯示有 20 個氫。 5.04 (2H, *s*) 屬於 phenyl 旁的 $-\text{OCH}_2$ 之訊號, 為化合物 3 所缺少之訊號, 位於最低磁場的五個氫 7.19-7.37 (5H, *m*) 初步判斷為保護基上 phenyl H-2'、H-3'、H-4'、H-5'、H-6' 之訊號。其餘 13 個氫經比對化合物 3 後, 3.59 (3H, *s*), 3.80 (3H, *s*) 為 2 個 $-\text{OCH}_3$ 之訊號, (前者屬於 ester; 後者為苯環第三位之 methoxy), 2.82 (2H, *t*, $J = 8.0 \text{ Hz}$) 為 phenyl 旁的 H-2; 2.53 (2H, *t*, $J = 7.3 \text{ Hz}$) 歸屬於 carbonyl 旁的 H-1; 6.56- 6.75 屬於苯環上 3 個氫的訊號, 依環上共振效應、吸收峰裂解方式、偶合常數, 可定出 6.73 (1H, *d*, $J = 8.1 \text{ Hz}$) 為 H-5' 之訊號; 6.67 (1H, *d*, $J = 1.9 \text{ Hz}$) 為 H-2' 之訊號; 6.59 (1H, *dd*, $J = 8.1, 1.9 \text{ Hz}$) 為 H-6' 之訊號。

所得到的光譜數據與過去所合成者完全一致, 故化合物 4 應為 methyl 3-(4-benzyloxy-3-methoxyphenyl)propionate, 其相關之光譜數據整理於 Table 11。

1-(4-Benzyloxy-3-methoxyphenyl)propionic acid (5) 之合成



Scheme 8

將化合物 4 溶於氫氧化鈉溶液中, 加熱迴流攪拌 1 小時後, 以濃硫酸酸化, 即可得到 1-(4-benzyloxy-3-methoxyphenyl)propionic acid (5)。

化合物 5 為白色片狀晶體, 熔點為 99.5-101.2 。

質譜 (EIMS): 由其分子離子峰 (m/z 286) 及元素分析結果得知此化合物之分子式為

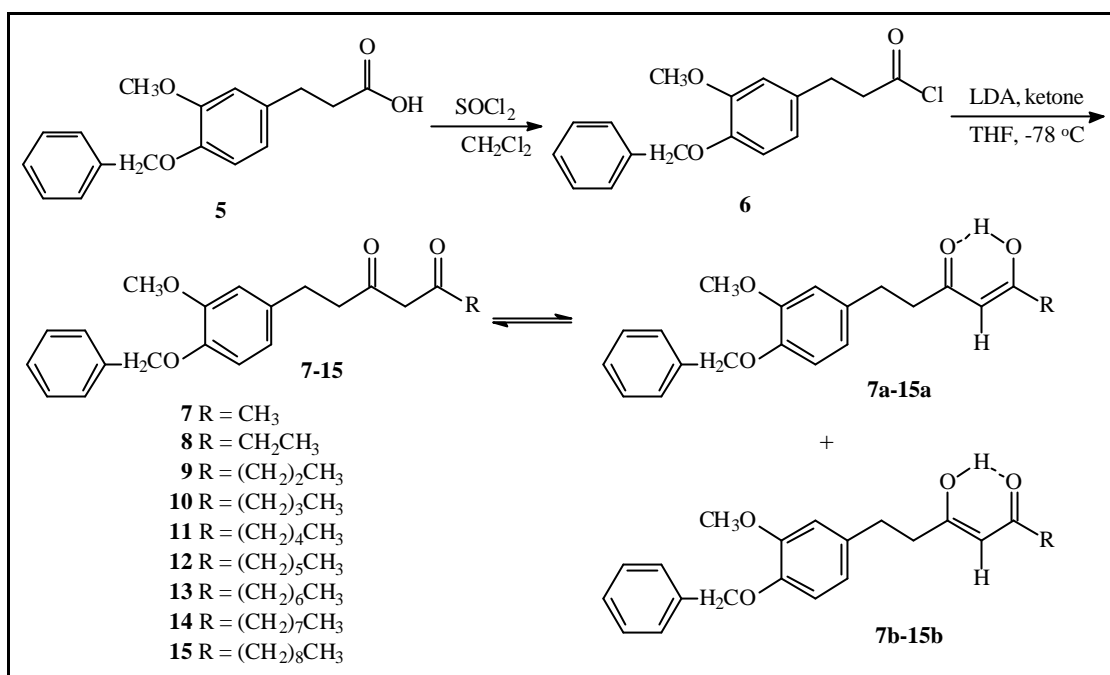
$C_{17}H_{18}O_4$ ，與預期相符。

IR 圖譜：化合物 5 為酯類水解成酸的產物，所以較化合物 4 多一個 carboxylic acid，因此在此在 $3000-2500\text{ cm}^{-1}$ 區有一寬且較深的 O-H 伸展吸收， 1701 cm^{-1} 處有 C=O 伸展振動之吸收， 1589 、 1516 、 1420 cm^{-1} 為芳香環骨架振動之吸收帶， 1254 、 1231 、 1030 cm^{-1} 為芳香醚 C-O-C 的不對稱及對稱伸縮振動吸收帶。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3)圖譜(圖 5-1)：分析結果得知其積分值顯示有 18 個氫。初步判斷， 3.79 ($3\text{H}, s$) 為 $-\text{OCH}_3$ 之訊號； 3.59 ($3\text{H}, s$) 之 COOCH_3 訊號已經消失； 5.04 ($2\text{H}, s$) 為 $-\text{OCH}_2$ 之訊號；最低磁場的 11.91 ($1\text{H}, br$) 為 $-\text{OH}$ 之訊號。其餘訊號經比對化合物 4 後， 2.82 ($2\text{H}, t, J = 7.8\text{ Hz}$) 為 H-2， 2.57 ($2\text{H}, t, J = 7.8\text{ Hz}$) 為 H-1 之訊號； $6.57-6.75$ 屬於苯環上 3 個氫的訊號，依環上共振效應、吸收峰裂解方式、偶合常數，可定出 6.73 ($1\text{H}, d, J = 8.0\text{ Hz}$) 為 H-5' 之訊號； 6.68 ($1\text{H}, d, J = 2.0\text{ Hz}$) 為 H-2' 之訊號； 6.67 ($1\text{H}, dd, J = 8.0, 2.0\text{ Hz}$) 為 H-6' 之訊號，位於最低磁場的五個氫 $7.18-7.37$ ($5\text{H}, m$) 為保護基上 phenyl H-2''、H-3''、H-4''、H-5''、H-6'' 之訊號。

所得到的光譜數據與過去所合成者完全一致，故化合物 5 應為 1-(4-benzyloxy-3-methoxy-phenyl)propionic acid，其相關之光譜數據整理於 Table 11。

1-(4-Benzyloxy-3-methoxyphenyl)-3,5-alkanediones (7-15)之合成：



Scheme 9

將化合物 **5** 溶於二氯甲烷溶液中與 SOCl_2 進行 chlorination 反應，可得到化合物 **6**。隨即在低溫下(-78 °C)分別與 2-ketone 及 lithium diisopropylamide (以下簡稱 LDA)進行反應，即可得 1-(4-benzyloxy-3-methoxyphenyl)-3,5-alkanediones (**7-15**)。

這些產物均具 β -dicarbonyl compound 之結構，在溶液中可同時以 enol form 及 keto form 之互變體(tautomer)存在。實際上，從這些產物之 IR、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 圖譜均可以發現有兩種 form 存在。以化合物 **11** 為例，將其結構鑑定敘述如下：

1-(4-Benzyloxy-3-methoxyphenyl)-3,5-decanedione (**11**)

取化合物 **5** 溶於二氯甲烷溶液中與 SOCl_2 進行氯化反應，可得到化合物 **6**。在低溫之下與 2-heptanone 及 LDA 進行反應，即可得 1-(4-benzyloxy-3-methoxyphenyl)-3,5-decanedione (**11**)。

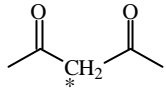
化合物 **11** 為黃棕色液體。

質譜(EIMS) (圖 11-1)：由其分子離子峰 (m/z 382)及元素分析結果得知此化合物之分

子式為 $C_{24}H_{30}O_4$ ，與預期相符。

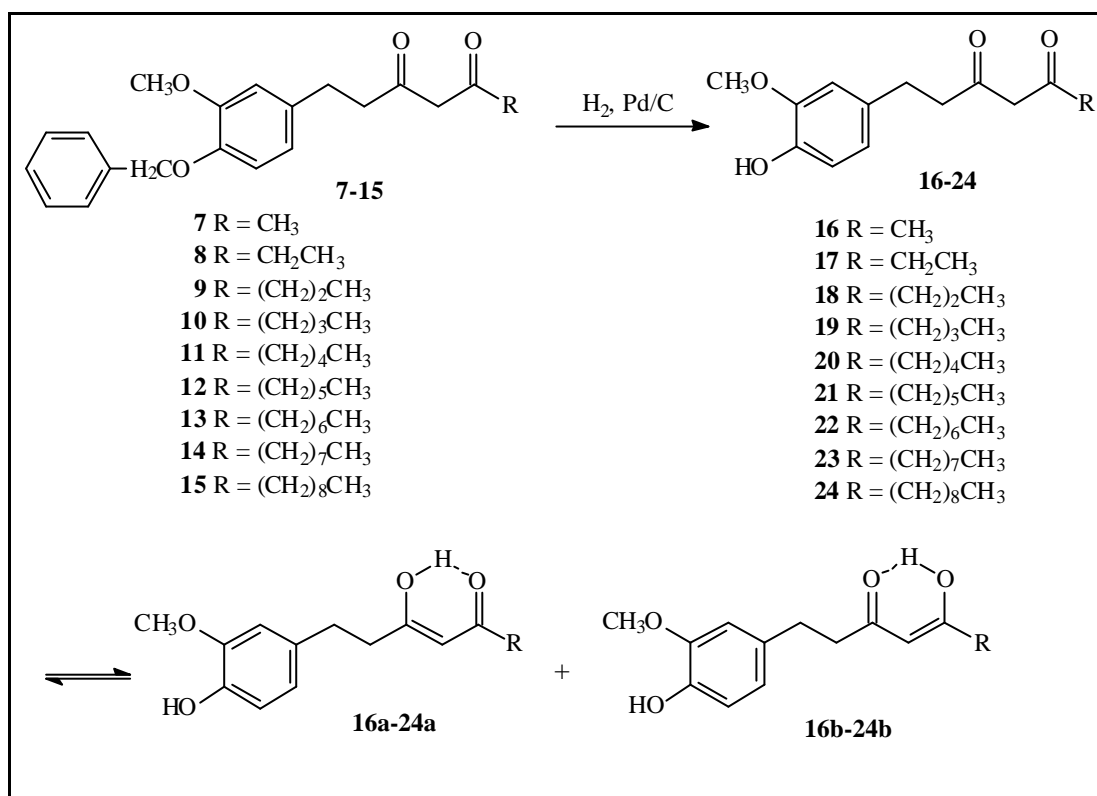
IR 圖譜(圖 11-2)：3200-2700 cm^{-1} 顯示有寬且深的 O-H stretching vibration 吸收帶，1706, 1613 cm^{-1} 處為 C=O 之伸展訊號，因 β -dicarbonyl compound 因環境因素溫度或處於溶液中易形成 keto form 與 enol form 之混合物，而 enol form 因形成分子內氫鍵，吸收訊號在 1613 cm^{-1} ，而 1705 cm^{-1} 為 keto form 的吸收訊號。

1H -NMR ($CDCl_3$)圖譜(圖 11-3)：分析結果得知其積分值顯示有 30 個氫。初步判斷，在 15.44 (1H, *br*) 出現 enol form OH 之訊號，在 5.36 (s) 處出現 enol form 第 4 位之訊號，同時在 3.43 (s) 處出現 keto form 第 4 位之訊號，且由積分值推測兩者之在 $CDCl_3$ 溶媒中的比例約為 8 : 3。最高磁場 0.82 為 CH_3 之吸收訊號，3.77 (3H, *s*) 為 $-OCH_3$ 之訊號，1.18~ 1.26 為二個 CH_2 H-1、H-2、H-6 受到 carbonyl group 的影響往高磁場移動，H-1、H-2、H-6 因周圍環境且與化合物 5 比對後，較低化學位移 H-6 應為 2.18，2.79 (2H, *t*, $J = 7.7$ Hz) 為 H-1，2.47 (2H, *t*, $J = 7.7$ Hz) 為 H-2 之訊號。6.55-6.73 屬於苯環上 3 個氫的訊號 H-2'、H-5'、H-6'。7.19-7.36 為保護基上 phenyl 之訊號。

^{13}C -NMR ($CDCl_3$) (圖 11-5)圖譜顯示有 22 支吸收訊號，由分子式得知有 24 個碳，因此含有 2 組對稱且重疊的碳。初步判斷，於最低磁場 193.42, 194.14 為 C-5, C-3 的訊號。觀察 C-4 之訊號出現在 99.31 處，顯然其化合物以 enol form 為主要結構。至於 55 附近之 keto form  之 methylene carbon 之訊號觀察不出，可能與 55.87 之 OCH_3 訊號重疊。最高磁場 13.82 為 $-CH_3$ (C-10) 的訊號；化學位移 31.13 25.32 22.30 分別歸屬為 C-7, C-8, C-9 的訊號；71.08 的訊號為 $-OCH_2$ 。

所得到的光譜數據與過去所合成者完全一致，故化合物 **11** 應為 1-(4-benzyloxy-3-methoxyphenyl)-3,5-decanedione，其光譜數據整理於 Table 11。

1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-3,5-alkanedione (gingerdiones) (**16-24**)之合成



Scheme 10

將化合物 **7-15** 分別在 MeOH 中，Pd / C 催化下，以 H_2 進行 debenzylaton 反應，即可得到相對應之標的化合物 gingerdiones (**16-24**)。

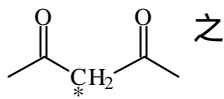
這些產物均具 -dicarbonyl compound 之結構，在溶液中可同時以 enol form 及 keto form 之互變體(tautomer)存在。實際上，從這些產物之 IR、¹H-NMR、¹³C-NMR 圖譜均可以發現有兩種 form 存在。以 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3,5-decanedione (**20**)為例，將其結構鑑定敘述如下：

化合物 **20** 為黃色液體。

質譜(EIMS) (圖 20-1) : 由其分子離子峰 (m/z 292) 及元素分析結果得知此化合物之分子式為 $C_{17}H_{24}O_4$, 與預期相符。

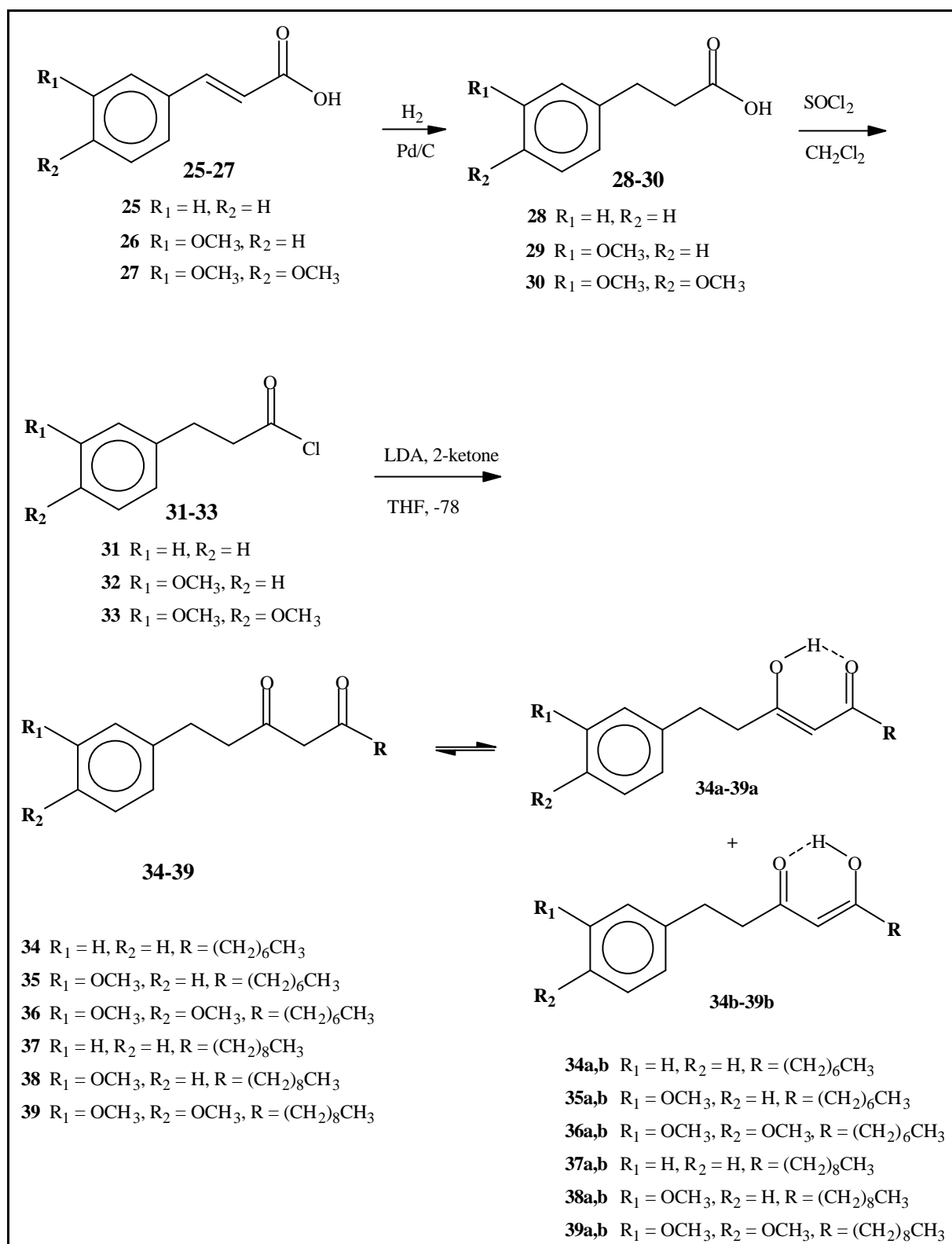
IR 圖譜(圖 20-2) : 3450 cm^{-1} 附近顯示有寬且強的 O-H stretching vibration 吸收帶推測為 -dicarbonyl compound 之 enol form 具有分子內氫鍵之緣故, $2933\text{ } 2863\text{ cm}^{-1}$ C-H 處有飽和碳氫 C-H stretching vibration 之吸收, $1705, 1613\text{ cm}^{-1}$ 處有 C=O 伸展吸收訊號。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3)圖譜(圖 20-3): 分析結果得知其積分值顯示有 20 個氫。判斷 15.44 (1H, *br*) 為 enol form-OH 之訊號; 3.38 (3H, *s*) 為 -OCH₃ 之訊號。 3.80 為 keto form 時 H-4 的訊號, 5.38 為 enol form 時 H-4 的訊號, 且由積分值推測兩者之在 CDCl_3 溶媒中的比例約為 3 : 8。與化合物 **11** 比對後, 5.03 (2H, *s*)與 $7.19\text{-}7.36$ (5H, *m*)之 benzyloxy group 訊號則完全消失, 顯示將已保護基水解。

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) (圖 20-4)圖譜 : 顯示有 16 支吸收訊號, 由分子式得知有 15 個碳, 所以推測有 1 組碳訊號重疊。初步判斷, 於最低磁場 $194.30, 193.47$ 為 C-3、C-5 的訊號。觀察 C-4 之訊號出現在 99.41 處, 顯然其化合物以 enol form 為主要結構。至於 55 附近之 keto form  之 methylene carbon 之訊號觀察不出, 可能與 55.82 之 OCH₃ 訊號重疊。於較高磁場 13.86 為 -CH₃ (C-10) 的訊號; 而 C-1"~C-6"與 -OCH₂ 的訊號已經消失也顯示出 benzyloxy group 的水解完成, 重疊的二支訊號依化學位移及結構上的關係推測為 C-1 與 C-7。

所得到的光譜數據與過去所合成者完全一致, 故化合物 **20** 應為 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3,5-decanedione, 其光譜數據整理於 Table 11。

第二節 1-(3,4-Substituted phenyl)-3,5-alkanediones (34-39)之合成



Scheme 11

3, 4-Substituted dihydrocinnamic acid (28-30)之合成

3, 4-Substituted dihydrocinnamic acid 類化合物之合成以 3-(3-methoxyphenyl)propionic acid (**29**)為例說明如下：

以化合物 **26** 為起始原料於 5 % NaOH 水溶液中，Pd/C 為催化劑，進行 catalytic hydrogenation，即可還原得到 3-(3-methoxyphenyl)propionic acid (**29**)，將其結構鑑定敘述如下：

化合物 29 為米黃色針狀晶體，熔點為 43.3-45.5 。

其質譜(EIMS)(圖 29-1)：由其分子離子峰 (m/z 180) 及元素分析結果得知此化合物之分子式為 $C_{10}H_{12}O_3$ ，與預期相符。

IR 圖譜(圖 29-2)：3000-2500 cm^{-1} 處有-OH 顯示有寬且淺的 O-H stretching vibration 吸收帶，2943、2920、2839 cm^{-1} 處有飽和碳氫 C-H stretching vibration 之吸收，1709 cm^{-1} 處有 C=O 伸展吸收訊號，1493、1439 cm^{-1} 為芳香環骨架振動之吸收帶，1211、1041 cm^{-1} 為芳香醚 C-O-C 的不對稱及對稱伸縮振動吸收帶。

1H -NMR ($CDCl_3$)圖譜(圖 29-3)：分析結果得知其積分值顯示有 12 個氫化學位移 11.76 (1H, *br*) 為-OH 之訊號； 3.69 (3H, *s*) 為-OCH₃ 之訊號， 2.84 (2H, *t*, $J = 8.0$ Hz) 歸屬於 phenyl 旁的 H-1 之訊號； 2.58 (2H, *t*, $J = 8.0$ Hz) 歸屬於 carbonyl 旁的 H-2 之訊號。 6.65-7.16 屬於苯環上 4 個氫的訊號，依環上共振效應、吸收峰裂解方式，由於 H-5'位於 OCH₃ 之 *meta* 位，電子密度較其他位置者少，故可定出 7.08-7.16 (1H, *m*) 為 H-5'-之訊號； 6.65-6.72 (3H, *m*) 為 H-2'、H-4'、H-6'-之訊號。

所得到的光譜數據與過去所合成者完全一致，故化合物 **29** 應為 3-(3-methoxy-phenyl)

propionic acid, 其相關之光譜數據整理於 Table 12。

1-(3,4-Substituted phenyl)-3,5-alkanedione (34-39)之合成

1-(3,4-Substituted phenyl)-3,5-alkanedione 類化合物之合成以 1-(3-methoxyphenyl)-3,5-dodecanedione (35) 為例說明如下：

以化合物 29 為起始原料，先以 SOCl_2 進行 chlorination 後，繼而在 THF 溶液中，低溫、LDA 存在下與 2-nonanone 進行 condensation，可得相對應之 1-(3-methoxyphenyl)-3,5-dodecanedione (35)。

化合物 35 為淡黃色液體。

質譜(EIMS) (圖 35-1)：由其分子離子峰 (m/z 304) 及元素分析結果得知此化合物之分子式為 $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_2$ ，與預期相符。

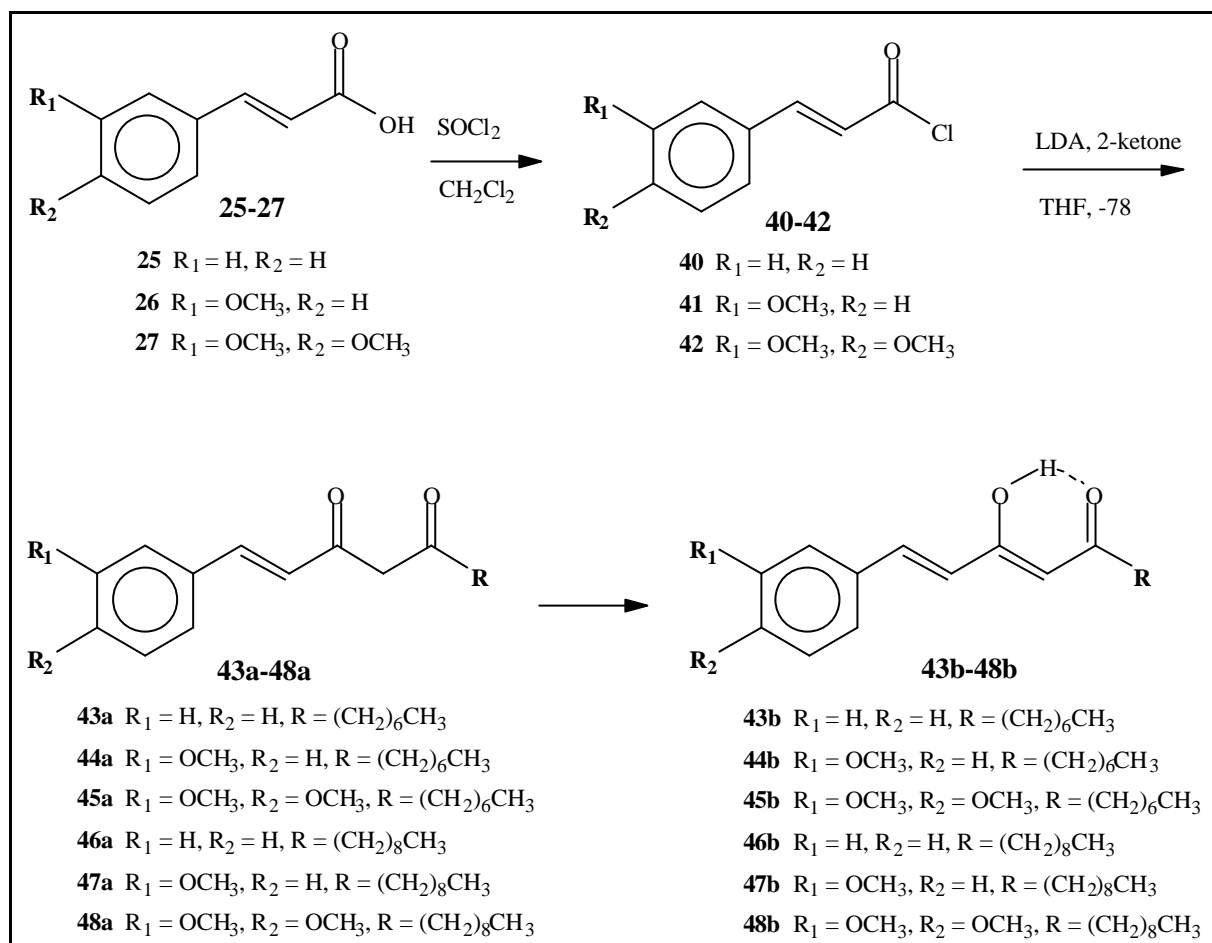
IR 圖譜(圖 35-2)：3000-2700 cm^{-1} 顯示有強的 O-H stretching vibration 吸收帶，2932、2855 cm^{-1} 處有飽和碳氫 C-H stretching vibration 之吸收，1705、1605 cm^{-1} 處有 C=O 伸展吸收訊號，1489、1439 cm^{-1} 為芳香環骨架振動之吸收帶，1253、1049 cm^{-1} 為芳香醚 C-O-C 的不對稱及對稱伸縮振動吸收帶。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3)圖譜(圖 35-3)：分析結果得知其積分值顯示有 26 個氫，由分子式得知有 28 個氫，其中有二個氫的訊號與水之訊號重疊，推測 H-7 為 1.49 (2H, *m*)。 15.42 (1H, *br*)為 enol form-OH 之訊號； 3.69 (3H, *s*)為 $-\text{OCH}_3$ 之訊號， 3.43 為 keto form 時 H-4 的訊號； 5.37 (1H, *s*)為 enol form H-4

之訊號。

所得到的光譜數據與過去所合成者完全一致，故化合物**35**應為 1-(3-methoxyphenyl)-3,5-dodecanedione，其相關之光譜數據整理於 Table 12。

第三節 1-(3,4-Substituted phenyl)-3,5-alkenediones (43-48)之化學合成



Scheme 12

1-(3,4-Substituted phenyl)-3,5-alkenediones 類化合物之合成以 1-(3-methoxyphenyl)-3,5-tetradecenedione (**47**) 為例說明如下：

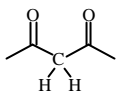
以化合物 **26** 為起始原料，在二氯甲烷溶液中，與 SOCl_2 進行 chlorination 反應，可得到化合物 **41**。隨即在低溫 lithium diisopropylamide (LDA) 存在下，與 2-undecanone 進行反應，即可得 1-(3-methoxyphenyl)-3,5-tetradecenedione (**47**)。

化合物 **47** 為白色片狀晶體，熔點為 44.0-46.1。

質譜(EIMS)：由其分子離子峰 (m/z 300) 及元素分析結果得知此化合物之分子式為

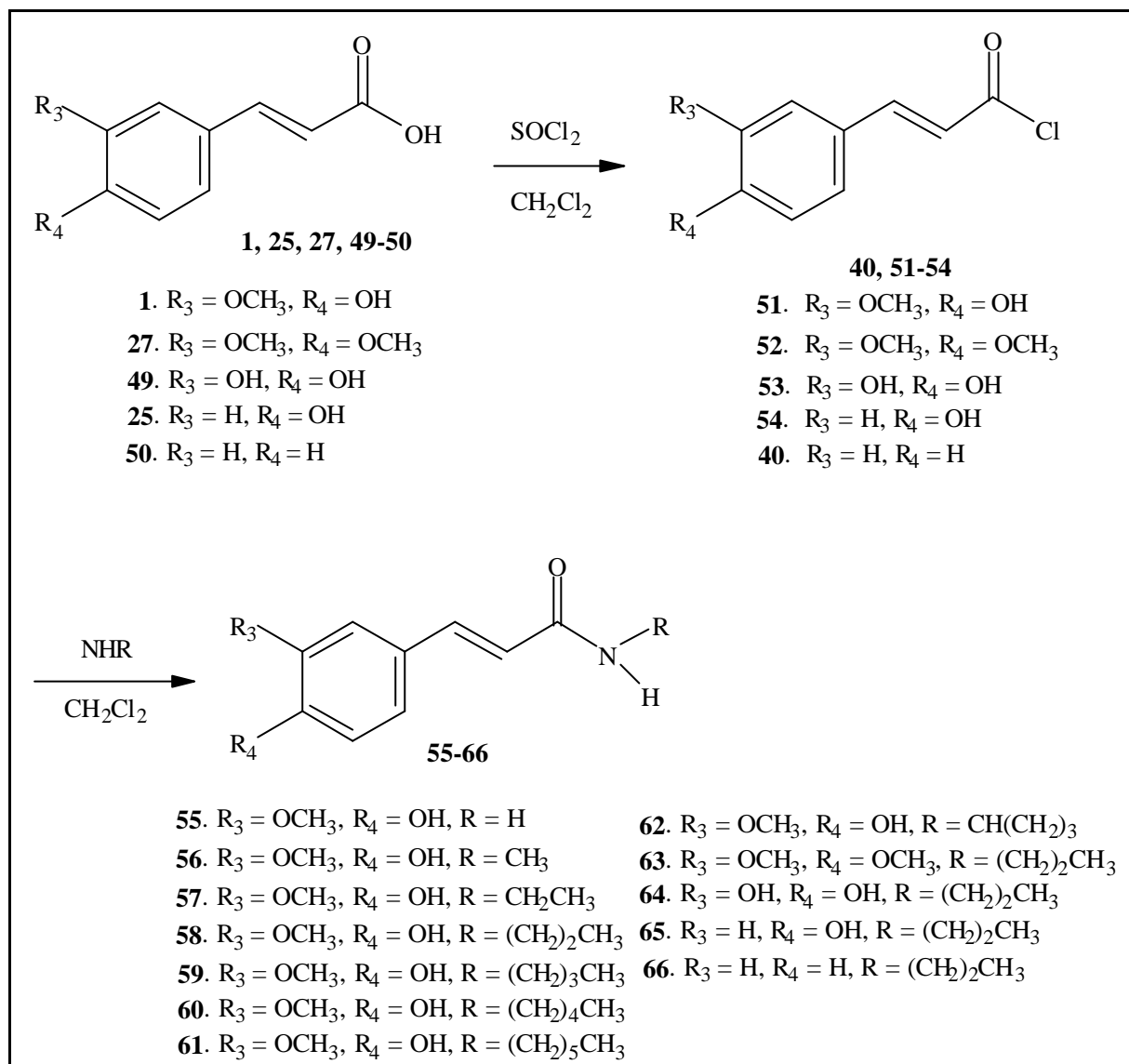
$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_3$ ，與預期相符。

IR 圖譜 : 3010 cm^{-1} 處有芳香環或烯類不飽和碳氫=C-H stretching vibration 之吸收, 2925、2848 cm^{-1} 處有飽和碳氫 C-H stretching vibration 之吸收, 1636、1590 cm^{-1} 處有兩個強的吸收訊號, 比一般 C=O 在較低波數吸收, 推測為 C=O 與 C=C 鍵共軛造成二未飽和基之 電子定域化作用, 使碳與氧間之雙鍵特性降低之結果。1427 cm^{-1} 為芳香環骨架振動之吸收帶, 1273、1049 cm^{-1} 為芳香醚 C-O-C 的不對稱及對稱伸縮振動吸收帶。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 圖譜(圖 47-1): 分析結果得知其積分值顯示有 28 個氫, 由分子式得知有 30 個氫, 其中有二個氫的訊號與水之訊號重疊, 1.60-1.68 (2H, *m*)推測為 H-7。化學位移 3.82 (3H, *s*) 為-OCH₃ 之訊號, 在 5.64 (*s*) 處出現 enol form 第 4 位上 1H 之訊號, 在圖譜上看不出 keto form 3.60 附近之  之訊號。因此著者推測此產物幾乎完全變成穩定之 enol form (**47b**)。7.55 (1H, *d*, *J* = 15.9 Hz) 歸屬於 phenyl 旁的 H-1 之訊號, 6.45 (1H, *d*, *J* = 15.9 Hz) 歸屬於 carbonyl 旁的 H-2 之訊號, 由偶合常數得知兩者呈 trans form。化學位移 6.90-7.30 屬於苯環上 4 個氫的訊號。

所得到的光譜數據與過去所合成者完全一致, 故化合物 **47** 應為 1-(3-methoxyphenyl)-3, 5-tetradecenedione, 其相關之光譜數據整理於 Table 13。

第四節 Mono-substituted ferulamides之合成(55-66)



Scheme 13

Mono-substituted ferulamide 類化合物之合成以 ferulamide (55) 為例說明如下：

以 ferulic acid (1) 為起始原料，依 Scheme 13 的方法在二氯甲烷中與 thionyl chloride 進行氯化反應後，得到 feruloyl chloride (51) 繼而在二氯甲烷中與過量的 ammonia water 反應即可得到 ferulamide (55)。將其結構鑑定敘述如下：

化合物 55 為乳白色粉末，熔點為 147-148 。

質譜(EIMS)(圖 55-1): 由其分子離子峰 (m/z 193), 與預期相符。

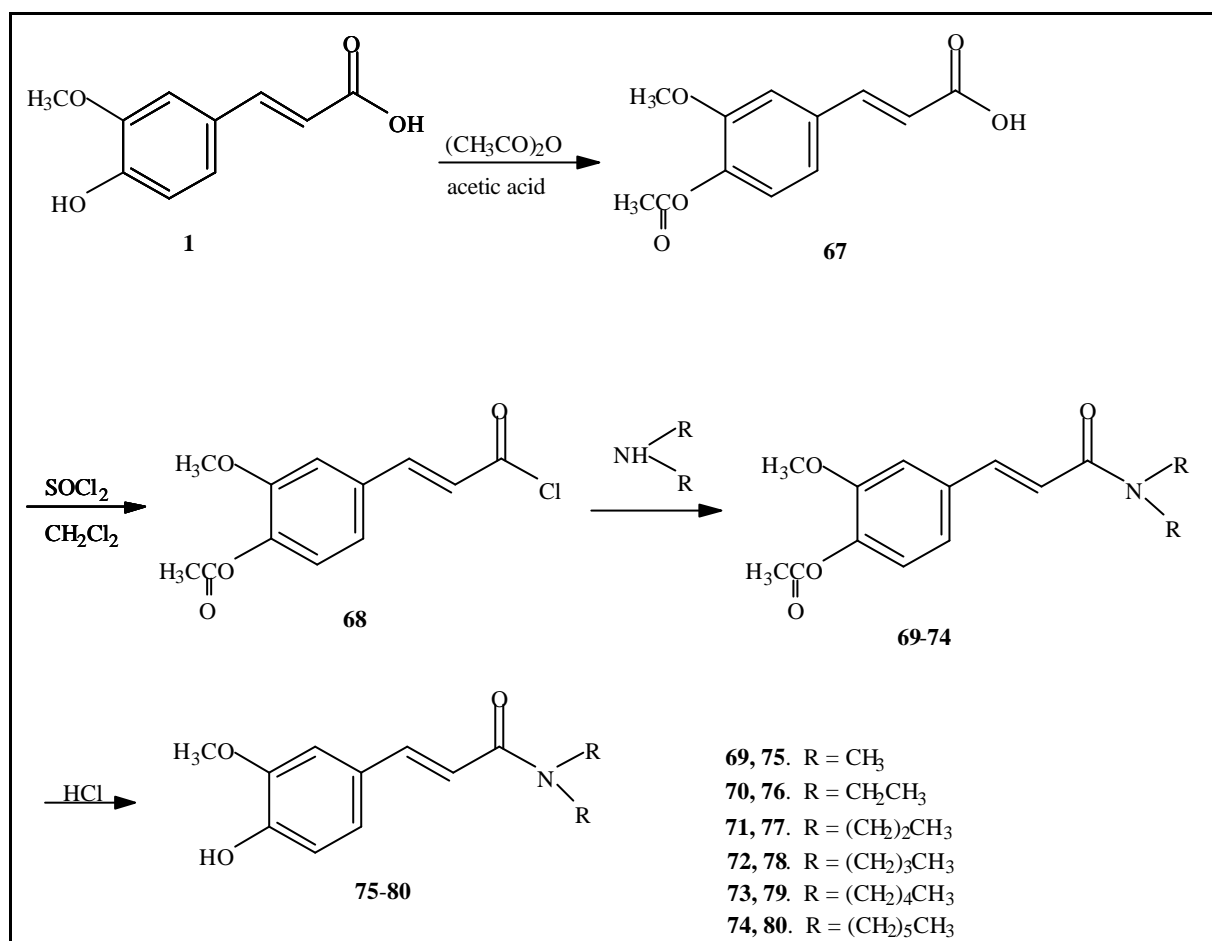
IR 圖譜(圖 55-2): 3460、3344 cm^{-1} 處有 N-H 吸收訊號; 1655 cm^{-1} 處有 C=O 吸收訊號。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6)(圖 55-3): 其積分值顯示此化合物有 11 個氫。圖譜分析結果得知,

9.43 (1H, *br*) 為-OH 之訊號, 3.78 (3H, *s*) 為-OCH₃ 之訊號, 位於-NH₂ 上的氫由於 2 個氫的化學環境不同, 使得 2 個氫各有不同的化學位移 7.39 及 6.95。7.10 (1H, *s*) 為 H-2 的吸收訊號, 依共振效應、吸收峰裂解方式、偶合常數, 比較低磁場的 7.30 (1H, *d*, $J = 15.8$ Hz) 判斷為 H-7 之吸收訊號, 化學位移 6.41 (1H, *d*, $J = 15.8$ Hz) 為 H-8 之吸收訊號, 6.95 (2H, *d*, $J = 8.0$ Hz) 為 H-6 之吸收訊號與-NH 訊號重疊, 較高磁場的 6.77 (1H, *d*, $J = 8.0$ Hz) 為 H-5 之吸收訊號。

所得到的光譜數據與過去所合成者完全一致, 故化合物 55 應為 ferulamide, 其相關之光譜數據整理於 Table 14。

第五節 Di-substituted ferulamides之合成(75-80)



Scheme 14

本研究之目標化合物的合成途徑如 **Scheme 14** 所示，係參照 1987 年 Shaku 氏及 Masao 氏等所提 ferulamides 之合成法而擬定者⁴⁶。以 ferulic acid 為起始原料，先將苯環上的 hydroxyl group 行 acetylation 保護起來後，與 thionyl chloride 進行氯化反應，形成相對應之 ferulyl chloride，再與各種胺類反應，最後以鹽酸去保護集團即可得相對應之標的化合物。Di-substituted ferulamide 類化合物之合成以 *N, N*-dimethylferulamide (**75**) 為例說明如下：

以 ferulic acid (**1**) 為起始原料和 acetic anhydride 在硫酸催化下，進行 acetylation 得化合物 **67**，經氯化後與 *N, N*-dimethylamine 反應得 4-[(1*E*)-3-(dimethylamino)-3-oxopropyl-enyl]-2-methoxyphenyl acetate (**69**)，最後經鹽酸水解可得 *N, N*-dimethylferulamide (**75**)。將其結

構鑑定敘述如下：

化合物 75 為白色晶體，熔點為 104~105 。

質譜(EIMS)(圖 75-1)：分子離子峰(m/z 221)，與預期相符。

IR 圖譜(圖 75-2)：3425 cm^{-1} 處有 N-H 吸收；1643 cm^{-1} 處有 C=O 吸收。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3-d_1)(圖 75-3)：其積分值顯示此化合物有 15 個氫。圖譜分析結果得知，

6.10 (1H, *br*) 為-OH 之訊號， 3.92 (3H, *s*) 為-OCH₃ 之訊號，化學位移
3.17 (3H, *s*) 3.06 (3H, *s*) 為接在 N 上之-CH₃，位於較低磁場的化學位移
7.60(1H, *d*, $J = 15.4 \text{ Hz}$) 7.10(1H, *dd*, $J = 8.2, 1.9 \text{ Hz}$) 6.98(1H, *d*, $J = 1.9$
Hz) 6.91 (1H, *d*, $J = 8.2 \text{ Hz}$) 6.73 (1H, *d*, $J = 15.4 \text{ Hz}$)，依共振效應、
吸收峰裂解方式、偶合常數，分別歸屬於 H-7、H-6、H-2、H-5、H-8 之訊號。

所得到的光譜數據與過去所合成者完全一致，故化合物 75 應為 *N,N*-dimethylferulamide，其相關之光譜數據整理於 Table 14。

第三章 藥理活性試驗結果

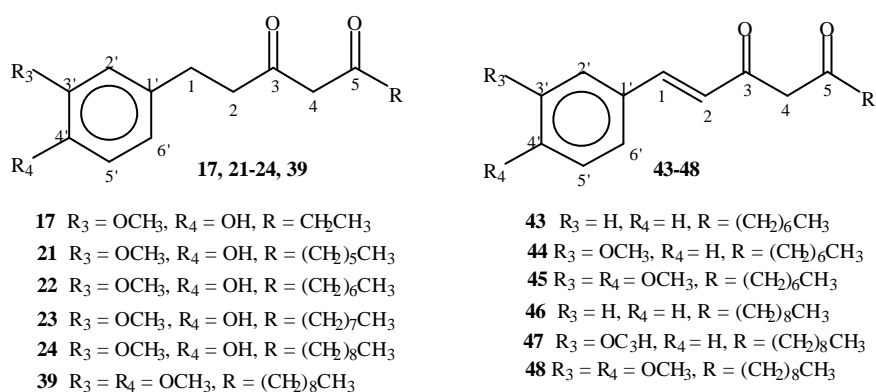
壹、細胞致毒活性

(一) Gingerdione 類緣化合物對 K562、HL60、U937 cells 之細胞增殖抑制活性

著者將標的化合物 Gingerdione 類緣化合物 17, 20-24, 39, 43-48 測試其對 K-562、HL60、U937 cells 之細胞增殖抑制活性，結果如 Table 9 所示，大部分化合物對 HL60、U937 細胞之感受性比 K562 細胞好。所有測試的化合物中以苯環上第 3 位及第 4 位皆為 methoxy 取代時，較為抑制活性明顯；其中化合物 48 對 HL60 細胞的抑制強度 IC_{50} 為 18.8 μ M；而化合物 45 雖然側鏈較少了 2 個碳鏈，但對 HL60 細胞仍具明顯的活性(IC_{50} = 17.9 μ M)，所以由上述結果可能是苯環的第 3 位、第 4 位同時為 methoxy 取代時是活性作用的重要部位。

目前化合物 45、48 之細胞週期與微管聚合抑制活性試驗正在進行中。待測試結果出爐可提供更詳細的機轉探討。

Table 9. Effects of gingerdione derivatives (17, 20-24, 39, 43-48) on proliferation of K562, HL60, U937 cells (*in vitro*).



Comp'd	Conc. (μ M)	K562	HL60	U937
		MTT- proliferation (%)	MTT- proliferation (%)	MTT- proliferation (%)
Control	0.0	100.0 \pm 4.4	100.0 \pm 2.4	100.0 \pm 3.0

17	25.0	87.2 ± 2.6 *	77.2 ± 2.5 ***	100.0 ± 4.0
	50.0	77.2 ± 5.0 **	76.8 ± 3.5 ***	82.5 ± 1.1 *
	100.0	75.9 ± 2.0 **	76.8 ± 4.0 ***	69.8 ± 0.0 **
22	25.0	101.9 ± 0.4	88.4 ± 1.3 **	78.9 ± 3.4 ***
	50.0	81.6 ± 4.5 *	75.7 ± 2.5 ***	59.6 ± 8.0 ***
	100.0	53.4 ± 5.8 **	46.2 ± 3.6 ***	11.2 ± 3.8 ***
	IC₅₀ (μM)	99.2	93.8	57.8
23	25.0	98.2 ± 1.3	88.2 ± 0.5 **	80.9 ± 3.0 ***
	50.0	88.8 ± 5.4	79.8 ± 0.8 ***	55.1 ± 1.0 ***
	100.0	31.3 ± 0.5 ***	48.2 ± 0.5 ***	7.3 ± 2.1 ***
	IC₅₀ (μM)	82.8	98.7	55.3
24	25.0	117.9 ± 2.9 **	81.4 ± 4.5 ***	66.2 ± 1.4 ***
	50.0	72.1 ± 2.7 **	77.0 ± 0.8 ***	40.2 ± 5.2 ***
	100.0	15.7 ± 1.6 ***	36.2 ± 4.2 ***	2.0 ± 1.8 ***
	IC₅₀ (μM)	72.3	83.1	41.9
39	25.0	88.9 ± 3.5 *	122.7 ± 4.5 ***	93.3 ± 4.6 *
	50.0	90.8 ± 2.5 *	123.3 ± 6.9 ***	84.0 ± 4.9 **
	100.0	99.3 ± 2.7	106.0 ± 7.7	72.5 ± 1.2 ***
43	25.0	103.1 ± 1.3	98.9 ± 4.1	91.6 ± 2.7 **
	50.0	85.6 ± 4.9	92.0 ± 1.5 **	65.0 ± 3.8 ***
	100.0	55.7 ± 3.2 **	55.7 ± 4.1 ***	24.7 ± 0.7 ***
44	25.0	100.0 ± 1.0	96.8 ± 1.2	87.3 ± 3.1 ***
	50.0	75.5 ± 3.5 **	67.4 ± 4.3 ***	51.4 ± 2.8 ***
	100.0	47.2 ± 3.2 **	27.6 ± 2.4 ***	17.6 ± 3.4 ***
	IC₅₀ (μM)	93.8	73.7	63.2
45	12.5	99.5 ± 5.5	69.0 ± 0.5 ***	86.0 ± 6.3 **
	25.0	109.4 ± 6.0	25.2 ± 0.5 ***	78.3 ± 5.9 ***
	50.0	39.2 ± 3.5 ***	22.9 ± 2.4 ***	42.8 ± 7.6 ***
	IC₅₀ (μM)	86.6	17.9	87.5
46	12.5	-----	113.2 ± 2.4 **	80.6 ± 3.5 ***
	25.0	96.4 ± 5.9	99.4 ± 2.4	84.5 ± 4.3 ***
	50.0	103.1 ± 7.0	83.9 ± 0.8 ***	77.4 ± 2.4 ***
47	25.0	103.1 ± 4.3	107.2 ± 2.8 *	88.8 ± 4.8 **
	50.0	82.2 ± 2.1 **	109.5 ± 0.4 **	71.2 ± 0.7 ***
	100.0	68.3 ± 1.3 ***	86.5 ± 2.0 ***	54.4 ± 3.5 ***
48	12.5	105.1 ± 0.5 **	87.1 ± 3.2 ***	93.9 ± 6.5
	25.0	82.2 ± 1.9 **	14.0 ± 1.5 ***	57.5 ± 0.6 **
	50.0	33.8 ± 2.0 ***	11.6 ± 1.3 ***	43.3 ± 1.7 **
	IC₅₀ (μM)	41.6	18.8	45.4

Leukemia cells (1.0×10^5 cells/ml) were incubated with different concentration in 24 hrs.

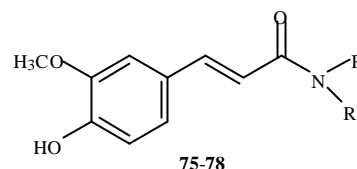
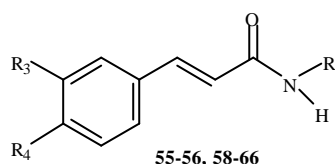
Data was presented as mean \pm SD from three separate experiments. * $p < 0.05$ compared with control. ** $p < 0.01$ compared with control. *** $p < 0.001$ compared with control.

(二) Ferulamide 類緣化合物對 HL60、U937 cells 之細胞增殖抑制活性

標的化合物 (55-66、75-80) 中氮上之單取代或雙取代抑制活性，結果如 Table 9 所示，單取代的 ferulamide 只有 ferulic acid amide 時 (化合物 55) 呈現微弱抑制活性，對 HL60、U937 細胞的 IC₅₀ 依序為 91.4 μM、73.8 μM。

氮上若為雙取代時，其中以 methyl 取代者 (化合物 75) 之活性最強。同時對兩株細胞皆有明顯的活性；另外，化合物 78 對 U937 細胞株也有抑制活性，結果如 Table 10 所示。

Table 10. Effects of ferulamide derivatives (55-56, 58-60, 62-66, 75-78) on proliferation of K562、HL60、U937 cells (*in vitro*).



- | | |
|--|---|
| 55. R ₃ = OCH ₃ , R ₄ = OH, R = H | 62. R ₃ = OCH ₃ , R ₄ = OH, R = CH(CH ₃) ₂ |
| 56. R ₃ = OCH ₃ , R ₄ = OH, R = CH ₃ | 63. R ₃ = OCH ₃ , R ₄ = OCH ₃ , R = (CH ₂) ₂ CH ₃ |
| 58. R ₃ = OCH ₃ , R ₄ = OH, R = (CH ₂) ₂ CH ₃ | 64. R ₃ = OH, R ₄ = OH, R = (CH ₂) ₂ CH ₃ |
| 59. R ₃ = OCH ₃ , R ₄ = OH, R = (CH ₂) ₃ CH ₃ | 65. R ₃ = H, R ₄ = OH, R = (CH ₂) ₂ CH ₃ |
| 60. R ₃ = OCH ₃ , R ₄ = OH, R = (CH ₂) ₄ CH ₃ | 66. R ₃ = H, R ₄ = H, R = (CH ₂) ₂ CH ₃ |
| | 75. R = CH ₃ |
| | 76. R = CH ₂ CH ₃ |
| | 77. R = (CH ₂) ₂ CH ₃ |
| | 78. R = (CH ₂) ₃ CH ₃ |

Compound	Conc. (μM)	HL-60	U937
		MTT- proliferation (%)	MTT- proliferation (%)
55	50.0	86.0 ± 5.9 ***	65.4 ± 4.2 ***
	100.0	42.5 ± 3.3 ***	32.5 ± 3.4 ***
	200.0	12.4 ± 1.7 ***	34.4 ± 3.8 ***
	IC₅₀ (μM)	91.4	73.8
56	25.0	--	--
	50.0	--	--
	100.0	123.7 ± 4.7 ***	99.2 ± 4.5
58	25.0	130.1 ± 2.2 ***	--
	50.0	112.4 ± 2.1 ***	--
	100.0	111.7 ± 0.4 ***	85.4 ± 5.6 ***
59	25.0	--	--
	50.0	--	--
	100.0	147.3 ± 3.5 ***	96.1 ± 3.6

60	25.0	92.7 ± 3.0 **	--
	50.0	96.7 ± 0.5	--
	100.0	85.4 ± 1.4 ***	98.4 ± 4.1
62	25.0	122.8 ± 0.7 ***	--
	50.0	121.1 ± 2.4 ***	--
	100.0	117.3 ± 7.9 ***	92.1 ± 6.7
63	25.0	--	--
	50.0	--	--
	100.0	118.1 ± 4.6 ***	85.5 ± 4.8 ***
64	25.0	104.9 ± 1.8	--
	50.0	109.0 ± 3.4 ***	--
	100.0	108.2 ± 1.1	96.7 ± 4.1
65	50.0	70.4 ± 4.7 ***	--
	100.0	71.6 ± 5.6 ***	--
	200.0	57.8 ± 1.3 ***	87.7 ± 5.1 **
66	25.0	--	--
	50.0	--	--
	100.0	115.4 ± 5.9 **	103.0 ± 9.4
75	1.0	100.3 ± 3.0	88.4 ± 2.9 **
	5.0	34.0 ± 3.0 ***	37.6 ± 4.8 ***
	10.0	26.2 ± 4.9 ***	22.2 ± 0.1 ***
	IC₅₀ (μM)	6.1	6.6
76	25.0	--	--
	50.0	--	--
	100.0	94.7±22.5	93.3 ± 4.1
77	25	--	--
	50	113.6 ± 7.4	--
	100	105.4 ± 2.8	83.0 ± 4.1 **
78	5.0	--	67.3 ± 4.8 ***
	25.0	96.7 ± 4.4	20.5 ± 2.0 ***
	50.0	93.9 ± 1.7	27.3 ± 1.4 ***
	100.0	85.5 ± 4.4 ***	13.1 ± 0.7 ***
IC₅₀ (μM)		14.3	

Cells (1.0×10^5 cells/ml) were incubated with different concentration in 24 hrs.

Data was presented as mean ± SD from three separate experiments.

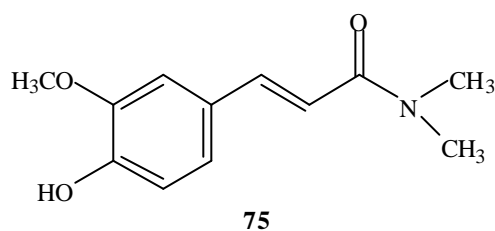
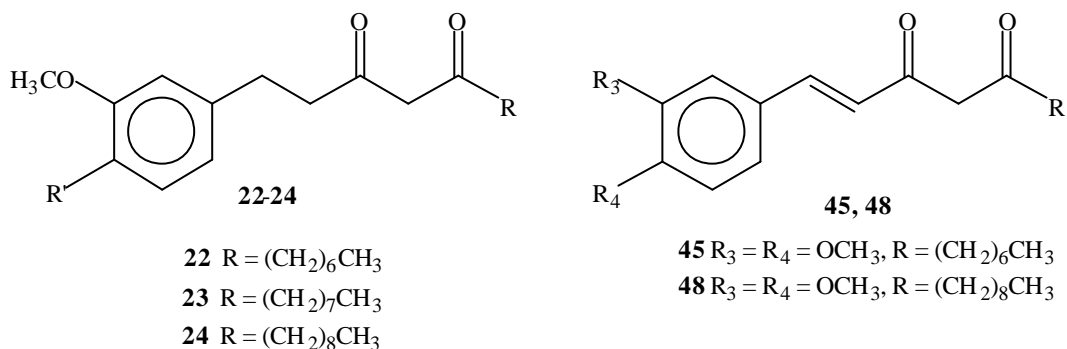
* p < 0.05 compared with control. ** p < 0.01 compared with control.

*** p < 0.001 compared with control.

第四章 結論

從文獻之 microtubule molecular modeling 中得知 gingerdione 可能具抗有絲分裂之抗微管聚合的活性，而從 gingerol 抗幽門桿菌的報告推測結構與 gingerol 相近的 gingerdione 有可能具有類似之活性。於是從事一系列之 gingerdione 類緣化合物及 ferulamide 之合成。經活性篩選結果得知化合物 45、化合物 48 對 HL-60 細胞具有明顯的抑制活性，而化合物 22、23、24 對 U937 細胞具有明顯的抑制活性。另一方面，在 ferulamide 類緣化合物中，則只有化合物 75 對 HL-60 及 U937 細胞都具有明顯的抑制活性。

至於這兩類生物之抗幽門桿菌的活性目前仍在評估之中。



第五章 實驗部分

第一節 試藥

(一) 購自德國E. Merck公司者

Ammonium chloride

Acetone dried

Ammonia solution 32 %

Butylamine

Benzene dried

Benzyl bromide

2-Butanone

Chloroform-*d*₁

Cinnamic acid

2-Decanone

Dibutylamine

Diethylamine

3, 4-Dimethoxycinnamic acid

Dimethylamine

Dimethylsulfoxid-*d*₆

Dipropylamine

Ethylacetate dried

Ethylamine (solution 70 % in water)

Ferulic acid

2-Heptanone

2-Hexanone

4-Hydroxycinnamic acid



iso-Propylamine

Methanol dried

3-Methoxycinnamic acid

Methylamine (solution 40 % in water)

N, N'-dicyclohexylcarbodiimide

2-Nonanone

2-Octanone

10% Palladium / active charcoal

2-Pentanone

Propylamine

Tetrabutyl ammonium iodide

Tetrahydrofuran

Thionyl chloride

Sodium hydride

2-Undecanone

(二) 購自美國Aldrich者

Lithium diisopropylamide

3,4-Dihydroxycinnamic acid

3,4-Dimethoxycinnamic acid

(三) 購自瑞士Fluka者

Ferulic acid

2-Butanone

2-Pentanone

(四) 購自日本和光純藥工業公司者

Magnesium sulfate anhydrous

Sodium carbonate

(五) 購自日本林純藥工業株式會社者

Hydroxylamine Hydrochloride

(六) 購自日本東京化成工業株式會社者

Amylamine

(七) 購自日本三德藥品株式會社者

Sodium hydroxide

(八) 購自臺灣省菸酒公賣局者

95% Ethanol

(九) 購自皓峰企業股份有限公司者

Acetic acid

Benzene

Chloroform

Ethyl acetate

n-Hexane

Methyl alcohol

(十) 購自中華民國聯工化學廠者

Hydrochloric acid

(十一) 購自和春化工股份有限公司者

H₂

第二節 重要儀器

(一) 融點測定

融點測定係採用 Yanaco MP-500D 融點測定器測定，測定範圍在25-500，溫度未經校正。

(二) 紫外線光譜分析

紫外線光譜分析係採用 Shimadzu UV-160A UV-Visible Recording Spectrophotometer測定，使用甲醇為溶媒。

(三) 紅外線光譜分析

紅外線光譜分析係採用 Nicolet Impact 400 FT-IR Spectrophotometer 測定，以溴化鉀(KBr)粉末作為打錠稀釋劑，利用聚苯乙烯(polystyrene)薄膜校正，光譜單位為波數(cm^{-1})。

(四) 質譜分析

EIMS以VG Platform GC-MS instrument測定離子化，電壓為70ev，單位為 m/z 。FAB使用JEOL SX/SX 102A Tandem Mass Spectrometer測定。

(五) 核磁共振光譜分析

氫及碳13核磁共振光譜係採用Bruker DPX-200 FT-或Bruker Avance 400 NMR Spectrometer測定，以 (ppm 值) 表示其化學位移值(chemical shift)。偶合常數(coupling constant)以 J 表示，單位為Hz。以 s 表單峰 (singlet)， d 表二重峰 (doublet)， t 表三重峰 (triplet)， q 表四重峰 (quartet)， m 表多峰(multiplet)， br 表寬峰 (broad)， dd 表雙二重峰， ddd 表參二重峰。

(六) 元素分析

元素分析採用 Heraeus CHN-OS RAPID 元素分析儀 (國科會中部貴重儀器使用中心) 測定, 分析值與理論值相差均在 $\pm 0.4\%$ 。

(七) 薄層色層分析

以德國 E. Merck 公司出品之 TLC Aluminium Sheets Silica gel 60 F₂₅₄ plate pre-coated 25 sheets 20 × 20, layer thickness 0.2mm 測定。以德國 E. Merck 公司出品之 RP-8 F₂₅₄ plate 測定。

(八) 管柱色層分析

以德國 E. Merck 公司出品之 Silica gel 60 (70-230 mesh) 當充填劑。

(九) 紫外光燈

使用的紫外燈備有 254 nm 及 366 nm 之光源。

第三節 化合物之製備

壹、Gingerdiones 類緣化合物

一、Gingerdiones 之合成

3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)propionic acid (2)之合成

秤取ferulic acid (1)(5克, 26毫莫耳)溶於5 %氫氧化鈉水溶液50毫升中, 加入0.1克10% Pd/C, 通入氫氣 (壓力= 1atm)振盪反應12小時, 反應過程中吸取少量反應液以濃硫酸酸化, 乙酸乙酯萃取, 以RP-18之TLC片偵測氫化過程 [$R_f = 0.52$ (MeOH : H₂O = 1 : 1)]。過濾分離除去Pd/C, 濾液以濃硫酸酸化至pH = 2, 以乙酸乙酯萃取 (3 × 100毫升), 取乙酸乙酯層利用無水硫酸鎂乾燥後, 減壓濃縮蒸除溶媒, 得白色固體(4.84克, 24.7毫莫耳, 產率95%), 以ethanol再結晶後, 可得白色針狀結晶化合物2。

Methyl 3-(hydroxy-3-methoxyphenyl)propionate (3)之合成

秤取化合物2 (5克, 25.5毫莫耳)溶於50毫升無水甲醇中, 滴加3滴濃硫酸催化反應, 加熱迴流攪拌過夜後, 以減壓濃縮蒸除甲醇, 加入水50毫升以氯仿 (3 × 100毫升)進行抽取, 氯仿層再以飽和食鹽水洗淨, 取氯仿層用無水硫酸鎂乾燥後, 減壓濃縮蒸除溶媒, 得褐色液狀化合物 3 (5.25克, 25.00毫莫耳)。

Methyl 1-(4-benzyloxy-3-methoxyphenyl)propionate (4)之合成

秤取化合物 3 (1克, 4.76毫莫耳)溶於20毫升THF中, 在0 °C下滴加到NaH (0.18克, 7.61毫莫耳)於40毫升THF中, 攪拌30分鐘後, 在同樣0 °C條件下加入 benzyl bromide (0.98克, 5.73毫莫耳)及tetrabutylammonium iodide (0.21克, 0.58毫莫耳), 攪拌至室溫,

繼續攪拌13小時後減壓濃縮蒸除THF，加入飽和的氯化銨水溶液，以5%的硫酸溶液酸化至pH = 3-4，以乙醚(2 × 100毫升)進行抽取，乙醚層再以飽和食鹽水洗淨，取乙醚層用無水硫酸鎂乾燥後，減壓濃縮蒸除溶媒，以ethanol: H₂O = 3 : 1再結晶，得白色片狀結晶化合物4 (1.14克，3.81 mmol)。

3-(4-Benzyloxy-3-methoxyphenyl)propionic acid (5)之合成

稱取化合物 4 (1克，3.33毫莫耳)溶於50毫升5%的氫氧化鈉溶液中，加熱迴流攪拌1小時後，以濃硫酸酸化，過濾收集白色沉澱物 5 (0.88克，3.06毫莫耳)。

1-(4-Benzyloxy-3-methoxyphenyl)-3,5-hexanedione (7)之合成

稱取化合物 5 (0.95克，3.3毫莫耳)溶於50毫升二氯甲烷中，加入二氯亞硫酸 (1.24克，10.4毫莫耳)，進行氯化反應，加熱迴流攪拌，反應過程中吸取少量反應液，加入無水甲醇以TLC偵測氯化過程 [酯的R_f為0.55 (EtOAc)]，加熱迴流攪拌8小時後，以減壓濃縮去除過量的二氯亞硫酸，再加入二氯甲烷減壓濃縮去除之，如此重複多次操作，以完全去除二氯亞硫酸，得氯化產物 6，另外稱取lithium diisopropylamide (3.56克，33毫莫耳)溶於20毫升THF中，在 -78 °C 下滴加acetone (0.19克，3.3毫莫耳)，隨即滴加溶於10毫升THF中的氯化產物攪拌至室溫，減壓濃縮蒸除THF，加入飽和的氯化銨水溶液，以5%的硫酸溶液酸化至pH = 2，以乙酸乙酯 (3 × 100毫升)進行抽取，乙酸乙酯層再以飽和食鹽水洗淨，取乙酸乙酯層用無水硫酸鎂乾燥後，減壓濃縮蒸除溶媒，粗產物以管柱層析法 (正己烷 : 乙酸乙酯 = 2 : 1/矽膠)分離純化，可得液狀化合物 7 (0.75克，2.31毫莫耳)。

1-(4-Benzyloxy-3-methoxyphenyl)-3,5-heptanedione (8)之合成

比照化合物 7 相同之條件下進行反應及處理，在-78 下滴加2-butanone (0.24 克，3.3毫莫耳)，所得之粗產物以管柱層析法 (正己烷：乙酸乙酯 = 3：1/矽膠)分離純化得液狀化合物 8 (0.88克，2.57毫莫耳)。

1-(4-Benzyloxy-3-methoxyphenyl)-3,5-octanedione (9)之合成

同化合物 7 相同之條件下進行反應及處理，在-78 下滴加2-pentanone (0.28克，3.3毫莫耳)，所得之粗產物以管柱層析法 (正己烷：乙酸乙酯 = 3：1/矽膠)分離純化得液狀化合物 9 (0.98克，2.77毫莫耳)。

1-(4-Benzyloxy-3-methoxyphenyl)-3,5-nonanedione (10)之合成

同化合物 7 相同之條件下進行反應及處理，在-78 下滴加2-hexanone (0.33克，3.3毫莫耳)，所得之粗產物以管柱層析法 (正己烷：乙酸乙酯 = 3：1/矽膠)分離純化得液狀化合物 10 (0.94克，2.54毫莫耳)。

1-(4-Benzyloxy-3-methoxyphenyl)-3,5-decanedione (11) 之合成

同化合物7相同之條件下進行反應及處理，在-78 下滴加2-heptanone (0.38克，3.3毫莫耳)，所得之粗產物以管柱層析法 (正己烷：乙酸乙酯 = 30：1/矽膠)分離純化得液狀化合物 11 (1.05克，2.64毫莫耳)。

1-(4-Benzyloxy-3-methoxyphenyl)-3,5-undecanedione (12) 之合成

同化合物 7 相同之條件下進行反應及處理，在-78 下滴加2-octanone (0.42克，3.3毫莫耳)，所得之粗產物以管柱層析法（正己烷：乙酸乙酯 = 30：1/矽膠）分離純化得黃白色固體化合物 12 (1.05克，2.64毫莫耳)，以ethanol再結晶後，可得黃白色針狀結晶。

1-(4-Benzyloxy-3-methoxyphenyl)-3,5-dodecanedione (13)之合成

同化合物 7 相同之條件下進行反應及處理，在-78 下滴加2-nonanone (0.47克，3.3毫莫耳)，所得之粗產物以管柱層析法分離純化(正己烷：乙酸乙酯 = 30：1/矽膠)得黃白色固體化合物 13 (1.06克，2.57毫莫耳)，以ethanol再結晶後，可得黃白色針狀結晶。

1-(4-Benzyloxy-3-methoxyphenyl)-3,5-tridecanedione (14)之合成

同化合物 7 相同之條件下進行反應及處理，在-78 下滴加2-decanone (0.52克，3.3毫莫耳)，所得之粗產物以管柱層析法(正己烷：乙酸乙酯 = 30：1/矽膠)分離純化得黃白色固體化合物 14 (1.06克，2.51毫莫耳)，以ethanol再結晶後，可得黃白色針狀結晶。

1-(4-Benzyloxy-3-methoxyphenyl)-3,5-tetradecanedione (15)之合成

同化合物 7 相同之條件下進行反應及處理，在-78 下滴加2-undecanone (0.56克，3.3毫莫耳)，所得之粗產物以管柱層析法(正己烷：乙酸乙酯 = 32：1/矽膠)分離純化得黃白色固體化合物 15 (1.13克，2.57毫莫耳)，以ethanol再結晶後，可得黃白色針狀結晶。

1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-3,5-hexanedione (16)之合成 ([2]-gingerdione)

將化合物 7 (0.77克, 2.35毫莫耳)溶於25毫升乙醇中, 加入0.1克10 % Pd/C, 通入氫氣 (壓力=1atm)振盪反應1小時, 過濾, 減壓濃縮蒸除溶媒, 所得之粗產物以管柱層析法 (正己烷:乙酸乙酯 = 2:1/矽膠)分離純化可得液狀化合物 16 (0.40克, 1.69毫莫耳)。

1-(4-Hydroxyl-3-methoxyphenyl)-3,5-heptanedione (17)之合成 ([3]-gingerdione)

將化合物 8 (0.80克, 2.35毫莫耳)溶於25毫升乙醇中, 加入0.1克10 % Pd/C, 通入氫氣 (壓力= 1atm)振盪反應1小時, 過濾, 減壓濃縮蒸除溶媒, 所得之粗產物以管柱層析法 (正己烷 : 乙酸乙酯 = 3 : 1/矽膠)分離純化可得液狀化合物 17 (0.44克, 1.76毫莫耳)。

1-(4-Hydroxyl-3-methoxyphenyl)-3,5-octanedione (18)之合成 ([4]-gingerdione)

將化合物 9 (0.83克, 2.35毫莫耳)溶於25毫升乙醇中, 加入0.1克10 % Pd/C, 通入氫氣 (壓力=1atm)振盪反應1小時, 過濾, 減壓濃縮蒸除溶媒, 所得之粗產物以管柱層析法 (正己烷 : 乙酸乙酯 = 3 : 1/矽膠)分離純化可得液狀化合物 18 (0.48克, 1.82毫莫耳)。

1-(4-Hydroxyl-3-methoxyphenyl)-3,5-nonanedione (19)之合成 [5]-gingerdione)

將化合物 10 (0.86克, 2.34毫莫耳)溶於25毫升乙醇中, 加入0.1克10 % Pd/C, 通入氫氣 (壓力= 1atm)振盪反應1小時, 過濾, 減壓濃縮蒸除溶媒, 所得之粗產物以管柱層析法 (正己烷 : 乙酸乙酯 = 15 : 1/矽膠)分離純化可得液狀化合物 19 (0.48克, 1.73毫莫耳)。

1-(4-Hydroxyl-3-methoxyphenyl)-3,5-decanedione (20)之合成 ([6]-gingerdione)

將化合物 11 (0.90克, 2.35毫莫耳)溶於25毫升乙醇中, 加入0.1克10 % Pd/C, 通入氫氣 (壓力= 1atm)振盪反應1小時, 過濾, 減壓濃縮蒸除溶媒, 所得之粗產物以管柱層析法 (正己烷 : 乙酸乙酯 = 15 : 1矽膠)分離純化可得液狀化合物 20 (0.50克, 1.71毫莫耳)。

1-(4-Hydroxyl-3-methoxyphenyl)-3,5-undecanedione (21)之合成 ([7]-gingerdione)

將化合物 12 (0.75克, 1.89毫莫耳) 溶於25毫升乙醇中, 加入0.1克10 % Pd/C, 通入氫氣 (壓力= 1atm)振盪反應1小時, 過濾, 減壓濃縮蒸除溶媒, 所得之粗產物以管柱層析法(正己烷 : 乙酸乙酯 = 16 : 1矽膠)分離純化, 可得液狀化合物 21 (0.48克, 1.57毫莫耳)。

1-(4-Hydroxyl-3-methoxyphenyl)-3,5-dodecanedione (22)之合成 ([8]-gingerdione)

將化合物 13 (1克, 2.44毫莫耳) 溶於25毫升乙醇中, 加入0.1克10 % Pd/C, 通入氫氣 (壓力= 1atm)振盪反應1小時, 過濾, 減壓濃縮蒸除溶媒, 所得之粗產物以管柱層析法(正己烷 : 乙酸乙酯 = 16 : 1矽膠)分離純化, 可得液狀化合物 22 (0.62克, 1.93毫莫耳)。

1-(4-Hydroxyl-3-methoxyphenyl)-3,5-tridecanedione (23)之合成 ([9]-gingerdione)

將化合物 14 (1克, 2.36毫莫耳) 溶於25毫升乙醇中, 加入0.1克10 % Pd/C, 通入氫氣 (壓力= 1atm)振盪反應1小時, 過濾, 減壓濃縮蒸除溶媒, 所得之粗產物以管柱層

析法(正己烷 : 乙酸乙酯 = 20 : 1/矽膠)分離純化, 可得液狀化合物 **23** (0.64克, 1.92毫莫耳)。

1-(4-Hydroxyl-3-methoxyphenyl)-3,5-tetradecanedione (24)之合成 ([10]-gingerdione)

將化合物 **15** (1克, 2.28毫莫耳) 溶於25毫升乙醇中, 加入0.1克10 % Pd/C, 通入氫氣 (壓力= 1atm)振盪反應1小時, 過濾, 減壓濃縮蒸除溶媒, 所得之粗產物以管柱層析法分離純化(正己烷 : 乙酸乙酯 = 20 : 1/矽膠), 可得液狀化合物 **24** (0.63克, 1.80毫莫耳)。

二、1-(3, 4-Substituted phenyl)-3,5-dodecanedione (34-36)及 1-(3, 4-Substituted phenyl)-3,5-tetradecanedione (37-39)之合成

Dihydrocinnamic acid (28)之合成

秤取cinnamic acid (5克, 33.78mole)溶於5 %氫氧化鈉水溶液50毫升中, 加入0.1克10 % Pd/C, 通入氫氣 (壓力= 1atm)振盪反應12小時。過濾後濾液以濃硫酸酸化至pH = 2, 以乙酸乙酯萃取 (3 x 100毫升), 取乙酸乙酯層利用無水硫酸鎂乾燥後, 減壓濃縮蒸除溶媒, 以 ethanol : H₂O = 5 : 1再結晶純化, 可得白色方形結晶化合物 **28** (4.76克, 31.75毫莫耳)。

3-(3-Methoxyphenyl)propionic acid (29) 之合成

比照化合物 **28** 相同之條件下進行反應及處理, 以3-methoxycinnamic acid (4.05克, 25毫莫耳)為起始原料通入氫氣振盪反應, 氫化後以ethanol再結晶, 得到為米黃白色針狀化合物 **29** (4.14克, 23毫莫耳)。

3-(3,4-Dimethoxyl phenyl)propionic acid (30)之合成

比照化合物 28 相同之條件下進行反應及處理，以3,4-dimethoxycinnamic acid (4.4克，25毫莫耳) 為起始原料通入氫氣振盪反應，氫化後以ethanol再結晶，得到為米黃色針狀化合物 30 (4.78克，22.75毫莫耳)。

1-Phenyl-3,5-dodecanedione (34)之合成

秤取化合物 28 (2.50克，16.67毫莫耳)溶於100毫升二氯甲烷中，加入二氯亞硫醯 (3.96克，33.34毫莫耳)，進行氯化反應，加熱迴流攪拌，加熱迴流攪拌8小時後，以減壓濃縮去除過量的二氯亞硫醯，再加入二氯甲烷減壓濃縮去除之，如此重複多次操作，以完全去除二氯亞硫醯，得氯化產物 31，另外秤取lithium diisopropylamide (3.56克，33毫莫耳)溶於40毫升THF中，在 -78°C 下滴加2-nonanone (2.37克，16.67毫莫耳)，隨即滴加溶於50毫升THF中的氯化產物攪拌至室溫，減壓濃縮蒸除THF，加入飽和的氯化銨水溶液，以5%的硫酸溶液酸化至 $\text{pH} = 2$ ，以乙酸乙酯 (3 \times 300毫升)進行抽取，乙酸乙酯層再以飽和食鹽水洗淨，取乙酸乙酯層用無水硫酸鎂乾燥後，減壓濃縮蒸除溶媒，所得之粗產物均以管柱層析法(正己烷 : 乙酸乙酯 = 80 : 1/矽膠)分離純化，得到液狀化合物 34 (3.56克，13.0毫莫耳)。

1- (3-Methoxyphenyl)-3,5-dodecanedione (35)之合成

以化合物 29 (1.06克，6.0毫莫耳)為起始原料，再比照化合物 34 相同之條件下進行反應及處理方式得氯化物，最後在 -78°C 下滴加2-nonanone (0.85克，6.0毫莫耳)，所得之對應粗產物以管柱層析法(正己烷 : 乙酸乙酯 = 4 : 1/矽膠)分離純化，得到黃色液狀化合物 35 (1.39克，4.56毫莫耳)。

1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-3,5-dodecanedione (36) 之合成

以化合物 30 (1.26克, 6.0毫莫耳)為起始原料, 再比照化合物 34 相同之條件下進行反應及處理方式得氯化物, 最後在-78 下滴加2-nonanone (0.85克, 6.0毫莫耳), 所得之相對粗產物以管柱層析法(正己烷 : 乙酸乙酯 = 30 : 1/矽膠)分離純化, 得到液狀化合物 36 (1.56克, 4.68毫莫耳), 以ethanol再結晶後, 得白色針狀結晶。

1-Phenyl-3,5-tetradecanedione (37)之合成

以化合物28 (2.50克, 16.67毫莫耳)為起始原料, 再比照化合物 34 相同之條件下進行反應及處理方式得氯化物, 最後在-78 下滴加2-undecanone (2.84克, 16.67毫莫耳), 所得之粗產物均以管柱層析法(正己烷 : 乙酸乙酯 = 80 : 1/矽膠)分離純化得到液狀化合物 37 (3.72克 ; 12.33毫莫耳)。

1- (3-Methoxyphenyl)-3,5-tetradecanedione (38)之合成

以化合物 29 (1.06克, 6.0毫莫耳)為起始原料, 再比照化合物 34 相同之條件下進行反應及處理方式得氯化物, 最後在-78 下滴加2-undecanone (0.85克, 6.0毫莫耳), 所得之對應粗產物以管柱層析法(正己烷 : 乙酸乙酯 = 4 : 1/矽膠)分離純化, 得到液狀化合物 38 (1.47克, 4.44毫莫耳)。

1-(3, 4-dimethoxyphenyl)-3,5-tetradecanedione (39)之合成

以化合物 30 (1.26 克, 6.0 毫莫耳)為起始原料, 再比照化合物 34 相同之條件下進行反應及處理方式得氯化物, 最後在-78 下滴加 2- undecanone (0.85 克, 6.0 毫莫耳), 所得之相對粗產物以管柱層析法(正己烷 : 乙酸乙酯 = 30 : 1/矽膠)分離純化, 得到固體

化合物 39 (1.63 克 4.5 毫莫耳), 以 ethanol 再結晶後, 得白色針狀結晶。

三、1-Phenyl-3,5-alkenedione (43, 46)及 1-(3, 4-Substituted phenyl)-3,5-alkenedione (44, 45, 47, 48)之合成

1-Phenyl-3,5-dodecenedione (43)之合成

以化合物 25 (2.01 克, 13.50 毫莫耳)為起始原料, 再比照化合物 34 相同之條件下進行反應及處理方式得氯化物, 最後在-78 下滴加 2-nonanone (1.92 克, 13.50 毫莫耳)所得之對應粗產物以管柱層析法(正己烷 : 氯仿 = 6 : 1/矽膠)分離純化, 可得象牙白色化合物 43 (2.50 克, 9.2 毫莫耳), 以 ethanol 再結晶後, 可得針狀結晶。

1-(3-Methoxyphenyl)-3,5-dodecenedione (44) 之合成

以化合物 26 (0.97 克, 6.0 毫莫耳)為起始原料, 再比照化合物 34 相同之條件下進行反應及處理方式得氯化物, 最後在-78 下滴加 2-nonanone (0.85 克, 6.0 毫莫耳)所得之對應粗產物均以管柱層析法(正己烷 : 二氯甲烷 = 1 : 1/矽膠)分離純化, 再以 ethanol 再結晶後, 得到淡黃色晶體化合物 44 (1.38 克, 4.56 毫莫耳)。

1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-3,5-dodecenedione (45) 之合成

以化合物 45 (1.06 克, 6.0 毫莫耳)為起始原料, 再比照化合物 34 相同之條件下進行反應及處理方式得氯化物, 最後在-78 下滴加 2-nonanone (0.85 克, 6.0 毫莫耳)所得之對應粗產物以管柱層析法(正己烷 : 氯仿 = 1 : 3/矽膠)分離純化, 再以 ethanol 結晶後, 得到橙黃色針狀化合物 45 (1.43 克, 4.32 毫莫耳)。

1-Phenyl-3,5-tetradecenedione (46)之合成

以化合物 25 (2.01克, 13.50毫莫耳)為起始原料, 再比照化合物 34 相同之條件下進行反應及處理方式得氯化物, 最後在-78 下滴加2-undecanone (2.30克, 13.50毫莫耳), 所得之粗產物以管柱層析法(正己烷 : 氯仿 = 6 : 1/矽膠)分離純化得黃白色固體化合物 46 (3.08克, 10.26毫莫耳)。

1-(3-methoxyphenyl)-3,5-tetradecenedione (47)之合成

以化合物 26 (0.97克, 6.0毫莫耳)為起始原料, 再比照化合物 34 相同之條件下進行反應及處理方式得氯化物, 最後在-78 下滴加2-undecanone (1.02克, 6.0毫莫耳), 所得之對應粗產物均以管柱層析法(正己烷 : 二氯甲烷 = 1 : 1/矽膠)分離純化, 再以 ethanol再結晶後, 得到白色片狀結晶化合物 47 (1.56克, 4.74毫莫耳)。

1-(3, 4-dimethoxyphenyl)-3,5-tetradecenedione (48)之合成

以化合物 27 (1.06 克, 6.0 毫莫耳)為起始原料, 再比照化合物 34 相同之條件下進行反應及處理方式得氯化物, 最後在-78 下滴加 2-undecanone (1.02 克, 6.0 毫莫耳), 所得之對應粗產物以管柱層析法(正己烷 : 氯仿 = 1 : 3/矽膠)分離純化, 再以 ethanol 結晶後, 得到橙黃色針狀化合物 48 (1.60 克, 4.44 毫莫耳)。

貳、Ferulamide類緣化合物之合成

一、Monosubstituted ferulamides之合成

Ferulamide (55) 之合成

秤取ferulic acid 1克(5.2 mmole)溶於50毫升二氯甲烷中，加入二氯亞硫醯 1.24克(10.4 mmole)，進行氯化反應，加熱迴流攪拌，反應過程中吸取少量反應液，加入無水甲醇以TLC偵測氯化過程[酯的Rf為0.55(EtOAc)]，加熱迴流攪拌8小時後，以減壓濃縮去除過量的二氯亞硫醯，再加入二氯甲烷減壓濃縮去除之，如此重複多次操作，以完全去除二氯亞硫醯，得ferulyl chloride，再溶於50毫升二氯甲烷中通入過量NH₃氣體，於室溫下反應2小時，減壓濃縮蒸除二氯甲烷，將濃縮物倒入水中，以氯仿進行萃取，取有機溶媒層，以無水硫酸鎂脫水過濾後，濾液減壓濃縮蒸除溶媒，所得之粗產物以管柱層析法(氯仿:甲醇 = 10:1/矽膠)分離純化，可得白色粉末之化合物，產率42 %。

N-Methylferulamide (56) 之合成

比照化合物55相同之條件下進行反應及處理，通入過量methylamine，粗產物以管柱層析法(二氯甲烷:甲醇 = 12:1/矽膠)分離純化，可得白色片狀結晶化合物，產率48 %。

N-Ethylferulamide (57) 之合成

比照化合物55相同之條件下進行反應及處理，通入過量ethylamine，粗產物以管柱層析法(二氯甲烷:甲醇 = 15:1/矽膠)分離純化可得白色片狀結晶化合物，產率30 %。

N-Propylferulamide (58) 之合成

比照化合物55相同之條件下進行反應及處理,逐滴加入0.92克(15.6 mmole) propylamine , 粗產物以管柱層析法(二氯甲烷:甲醇 = 16:1/矽膠)分離純化可得白色片狀結晶化合物, 產率72 %。

***N*-Butylferulamide (59) 之合成**

比照化合物55相同之條件下進行反應及處理,逐滴加入1.14克(15.6 mmole) butylamine , 粗產物以管柱層析法(氯仿:甲醇 = 20:1/矽膠)分離純化可得白色粉末狀化合物, 產率43 %。

***N*-Amylferulamide (60) 之合成**

比照化合物55相同之條件下進行反應及處理,逐滴加入1.36克(15.6 mmole) amylamine , 粗產物以管柱層析法(氯仿:甲醇 = 15:1/矽膠)分離純化可得白色粉末狀化合物, 產率64 %。

***N*-Hexylferulamide (61) 之合成**

比照化合物55相同之條件下進行反應及處理,逐滴加入1.67克(15.6 mmole) hexylamine , 粗產物以管柱層析法(二氯甲烷:甲醇 = 16:1/矽膠)分離純化可得白色片狀結晶化合物, 產率41 %。

***N*-Isopropylferulamide (62) 之合成**

比照化合物55相同之條件下進行反應及處理,逐滴加入0.92克(15.6 mmole) isopropyl amine , 粗產物以管柱層析法(二氯甲烷:甲醇 = 16:1/矽膠)分離純化可得白色片狀結晶化合物 , 產率51 %。

***N*-Propyl-3,4-dimethoxy cinnamamide (63) 之合成**

比照化合物55相同之條件下進行反應及處理,逐滴加入0.92克(15.6 mmole) propylamine , 粗產物以管柱層析法(氯仿:甲醇 = 20:1/矽膠)分離純化可得白色粉末狀化合物 , 產率76 %。

***N*-Propyl-3,4-dihydroxycinnamamide (64) 之合成**

比照化合物55相同之條件下進行反應及處理,逐滴加入0.92克(15.6 mmole) propylamine , 粗產物以管柱層析法(氯仿:甲醇 = 15:1/矽膠)分離純化可得白色粉末狀化合物 , 產率54 %。

***N*-Propyl-4-hydroxycinnamamide (65) 之合成**

同化合物55相同之條件下進行反應及處理,逐滴加入0.92克(15.6 mmole) propylamine , 粗產物以管柱層析法(氯仿:甲醇 = 15:1/矽膠)分離純化可得白色粉末狀化合物 , 產率66 %。

***N*-Propylcinnamamide (66) 之合成**

比照化合物55相同之條件下進行反應及處理,逐滴加入0.92克(15.6 mmole) propylamine, 粗產物以管柱層析法(氯仿/矽膠)分離純化可得白色粉末狀化合物, 產率89 %。

二、 Disubstituted ferulamides之合成

N,N-Dimethylferulamide (75) 之合成

(a) Acetylation of ferulic acid

秤取ferulic acid 1克(5.2 mmole)溶於冰醋酸5毫升中, 滴加0.58克(5.72 mmole)醋酸酐及1滴硫酸催化, 微微加熱(45 °C)1小時後, 加冰水100毫升過濾沈澱, 收集沈澱乾燥。可得白色粉末狀化合物67, 產率90 %。

(b) Formation of amide

秤取67化合物1克(4.24 mmole), 同化合物55相同之條件下進行反應及處理, 通入過量dimethylamine。減壓濃縮蒸除溶媒, 所得之粗產物69進行下一步deacetylation。

(c) Deacetylation

將69的粗產物溶於少量的氯仿中, 加入數滴飽和鹽酸甲醇溶液後, 靜置3天減壓濃縮蒸除溶媒, 粗產物以管柱層析法(氯仿:甲醇20:1/矽膠)分離純化可得白色粉末狀化合物75, 產率56 %。

N,N-Diethylferulamide (76) 之合成

比照化合物75相同之條件下進行反應及處理,逐滴加入0.93克(12.7 mmole) diethylamine , 粗產物以管柱層析法(氯仿:甲醇 = 20:1/矽膠)分離純化可得膠狀化合物 , 產率32 %。

***N,N*-Dipropylferulamide (77) 之合成**

比照化合物75相同之條件下進行反應及處理,逐滴加入1.3克(12.7 mmole) dipropylamine , 粗產物以管柱層析法(氯仿:甲醇 = 20:1/矽膠)分離純化可得黃白色固體化合物 , 產率34 %。

***N,N*-Dibutylferulamide (78) 之合成**

比照化合物75相同之條件下進行反應及處理,逐滴加入1.6克(12.7 mmole) dibutylamine , 粗產物以管柱層析法(氯仿:甲醇 = 20:1/矽膠)分離純化可得白色結晶狀化合物 , 產率44 %。

***N,N*-dipentylferulamide (79) 之合成**

比照化合物75相同之條件下進行反應及處理,逐滴加入2.0克(12.7 mmole) dipentylamine , 粗產物以管柱層析法(氯仿:甲醇 = 20:1/矽膠)分離純化可得膠狀化合物 , 產率52 %。

***N,N*-Dihexylferulamide (80) 之合成**

比照化合物75相同之條件下進行反應及處理,逐滴加入2.4克(12.7 mmole) dihexylamine , 粗產物以管柱層析法(氯仿:甲醇 = 20:1/矽膠)分離純化可得膠狀化合物 , 產率47 %。

第二節藥理實驗模式

壹、細胞致毒活性

人類前骨髓性血癌細胞(HL-60、U937、K562 cells)增殖作用(proliferation)實驗

Gingerdione、ferulamide 類化合物用 DMSO 溶解；並將一系列不同濃度之化合物儲放於-20 冰箱，待加藥時再解凍 DMSO 之最後濃度需控制在 0.1 % 以下，以避免 DMSO 本身對 HL-60、U937、K562 cells 之影響⁴⁷。

HL-60、U937、K562 cells (1×10^5 /mL)培養於 24-well 之培養皿中使總體積為 1mL/well；並加入各種不同濃度之 Gingerdione、Ferulamide 類衍化合物於溫度 37 °C、溼度 95 %、5 %CO₂ 之培養相中培養固定時間之後，分別取出作 MTT-proliferation assay 實驗。

首先自每個 well 取出已去培養基之 50 μ L 細胞培養液置入 96-well plate 中，加入 10 μ L MTT solution 於 37 °C 培養箱培養 4 小時；取出後再使用 DMSO (150 μ L/well) 溶解細胞之紫黑色顆粒，最後以 ELISA reader 於波長 570 nm 之條件測得 OD₅₇₀ 值^{48,49}。

$$\text{Proliferation (\%)} = (\text{Sample OD}_{570} / \text{Cont. OD}_{570}) \times 100\%$$