

## 第一章 緒論

本研究之標的化合物為 2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid 類衍生物，評估其生理活性為細胞致毒、抑制嗜中性白血球過氧化物形成、抑制嗜中性白血球去顆粒化、抑制肥胖細胞去顆粒化、抑制 TNF- $\alpha$  形成及抑制一氧化氮形成等活性。首先將 PQ (2-phenyl-4-quinolone)類緣化合物之研究概況、肥胖細胞與嗜中性白血球之生理功能、腫瘤壞死因子及小神經膠質細胞簡要敘述作為本論文之研究背景資料。

### 第一節 2-Phenyl-4-quinolone 類緣化合物之研究概況

早在 1986 年，Cheng 等學者提出三環化學結構模式(tricyclic chemical structural pattern)具有 antineoplastic activity，其結構為 naphthalene 母核的第 2 位置接上 phenyl ring (Fig.1, A)、或是由各式各樣的異環單元(heterocyclic units)組合而成<sup>1</sup>。此外，tricin 及 kaempferol 等天然植物取得的黃酮類(flavonoids) (Fig. 1, B)具有 antimutagenic<sup>2</sup>、antileukemic<sup>3,4</sup> 等活性，並於 1995 年得知這些活性與微管蛋白(microtubules)的相關性：天然物 3',5-dihydroxy-4',3,6,7,8-pentamethoxy flavone 具有很強之抑制 colchicine 與微管蛋白的結合作用(inhibition of colchicine binding; ICB)。

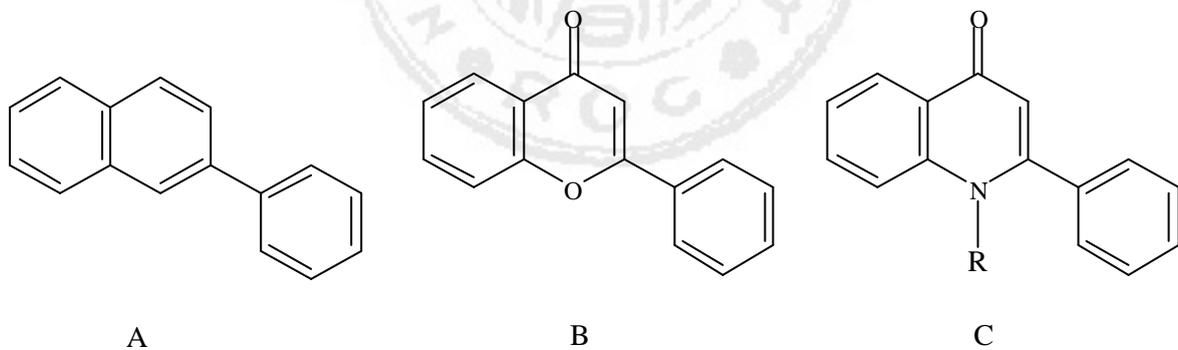
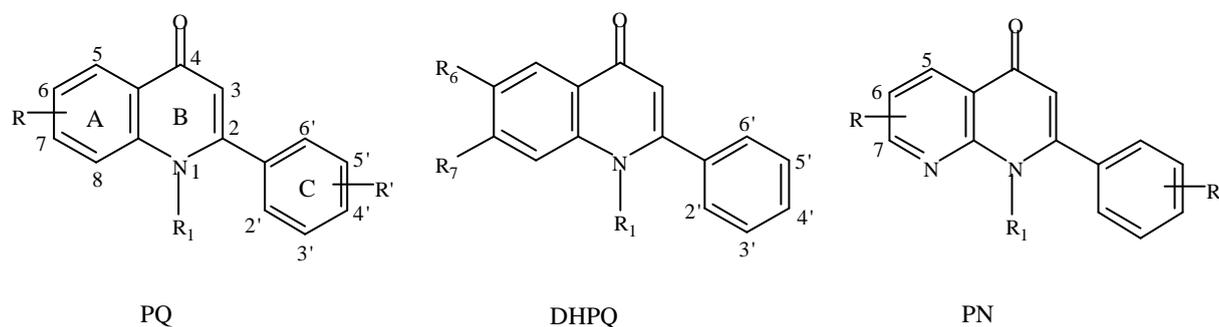


Fig. 1 Tricyclic chemical structural pattern

因此我們將 flavonoid 環上的氧原子替換成氮原子, 即 azaflavone (Fig. 1, C), 以此為基本骨架設計並合成了一系列 PQ analogus (2-phenyl-4-quinolone 類緣化合物), 並與北卡李國雄教授及 E. Hamel 等學者合作測試其細胞致毒活性(cytotoxicity)及抑制微管蛋白聚合活性(inhibition of tubulin polymerization; ITP), 進而委託美國 NCI 以 patterns of differential cytotoxicity toward human tumor cell lines 方式確認這類衍生物之作用模式與 colchicine 相似, 但其 ITP 及 ICB 並未呈現相對應之關係, 推測是一類化學結構模式新穎的抗有絲分裂劑(antimitotic agents)。

以下將本實驗室研究之 PQ 類緣化合物[PQ (2-phenyl-4-quinolones), DHPQ (2,3-dihydro-2-phenyl-4-quinolones), PN (2-phenyl-1,8-naphthyridin-4-ones)]<sup>5-8</sup> (Fig. 2)在微管聚合抑制之構效關係分別簡述如下：



**Fig. 2 2-Phenyl-4-quinolone analogus**

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

近年來研究室設計並合成一系列 2-phenyl-4-quinolone 類緣化合物, 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：-OCH<sub>3</sub>、-OCH<sub>2</sub>O-、-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-quinolone (DHPQ)<sup>9, 10</sup> 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[例如迴盲腸細胞(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(U87-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-one (PN)<sup>11-13</sup> 衍生物之結構與抑制微管蛋白聚合活性的關係：

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：-OCH<sub>3</sub>，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。

## 第二節 肥胖細胞與嗜中性白血球之生理功能

如 Fig. 3 所示，肥胖細胞(mast cells)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，會釋放出下列多種發炎誘導物質(inflammatory mediators)：

(A) Vasoactive mediators (如 histamine, kininogenase, PAF)及 spasmogens (如 histamine, PGD<sub>2</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>)：

這些物質會導致血管擴張、通透性增加，以及引發支氣管平滑肌收縮、黏膜水腫及分泌增加，而造成過敏及氣喘的發生<sup>14-15</sup>。

(B) 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(neutrophils)。

當嗜中性白血球被活化會產生高反應性之超氧自由基(superoxide anion; O<sub>2</sub><sup>-</sup>)、羥基自由基(hydroxy radical; OH)及過氧化氫(hydrogen peroxide; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)等具有細胞毒性的 oxygen species<sup>16</sup>，而導致細胞損傷，這些細胞損傷包括老化(aging)<sup>17</sup>、缺血再灌注損傷(ischemia-reperfusion)、類風濕性關節炎(rheumatoid arthritis)<sup>18, 19</sup>及腸炎(inflammatory bowel disease)；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<sup>20</sup>，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)<sup>21-23</sup>等疾病的發生與惡化。

控制嗜中性白血球活化的機制有很多種，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， $\text{PGE}_1$  (prostaglandin  $\text{E}_1$ )、histamine、adenosine 及刺激  $\beta$ -adrenoceptor 的藥物，可經由與細胞表面的接受體結合以及 G protein 的活化，來增加 cAMP 達到抑制呼吸爆發的作用(respiratory burst)<sup>24-25</sup>。

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，會使個體容易受病菌感染；過多的超氧自由基則會傷害鄰近的細胞或組織，產生疾病<sup>26</sup>，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，若能研發出抑制肥大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活性，以 compound 48/80 (a polymer of *N*-(*p*-methoxyphenylethyl)methylamine with formaldehyde)誘發肥大細胞釋放  $\beta$ -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-phenylalanine)引起嗜中性白血球釋放  $\beta$ -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 protein kinase C (PKC)上。

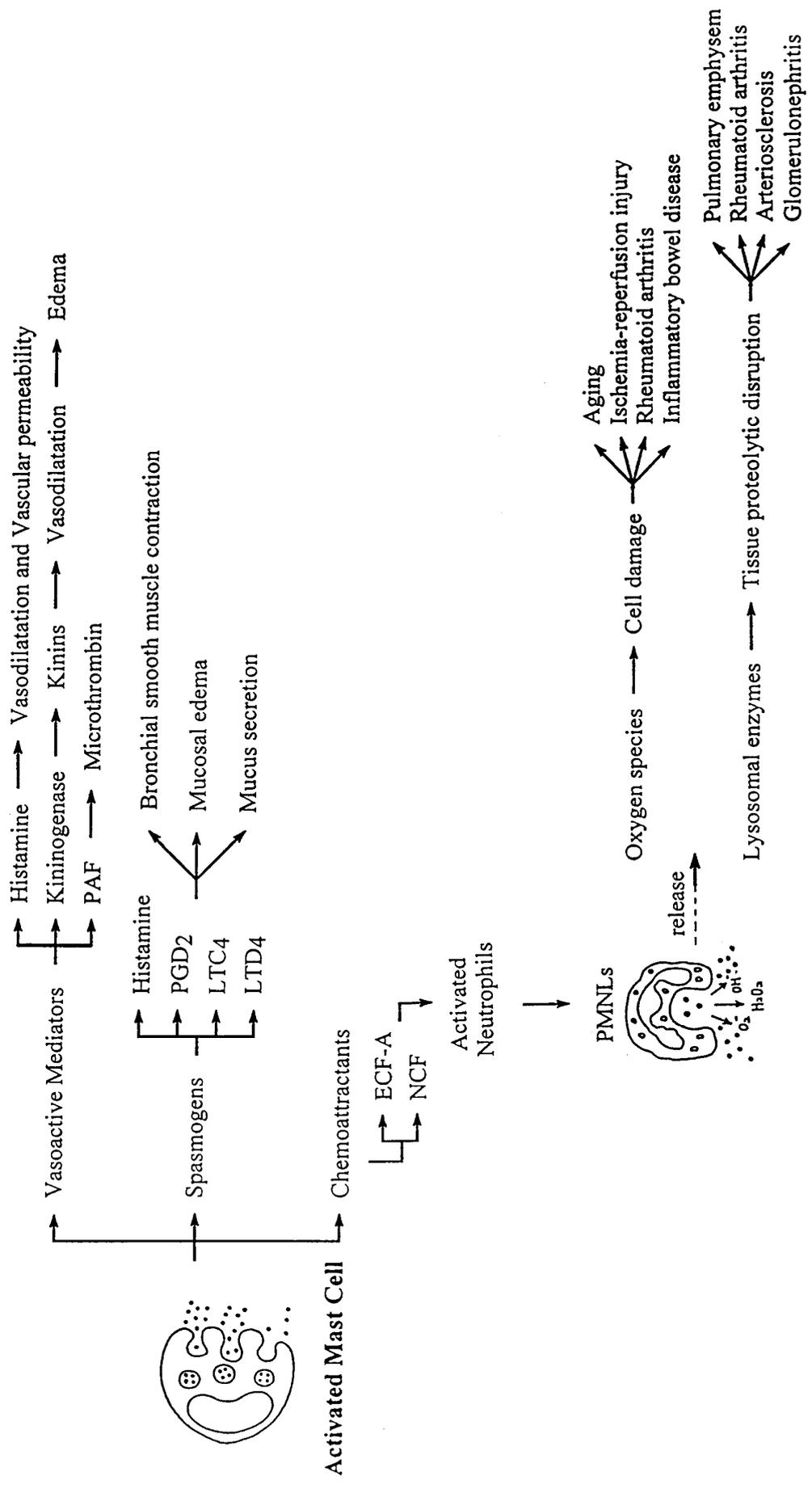


Fig. 3 The physiologic reactions of mast cells and neutrophils

### 第三節 腫瘤壞死因子

腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor; TNF)的研究可追溯到十九世末，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 等鑒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 在生理及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。其機轉涉及介導免疫反應及對腫瘤細胞的直接殺傷作用，分述如下：

#### (A) 介導免疫反應：

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，引起腫瘤組織血管內皮細胞凋亡，繼而導致腫瘤組織出血壞死。

#### (B) 對腫瘤細胞的直接殺傷作用：

TNF 透過兩條途徑直接作用於腫瘤細胞：

- (1) TNF 與靶細胞膜上特異接受器結合，並進入細胞中，作用於溶酶體，使溶酶體通透性增加並受損，溶酶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。
- (2) 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(TNFR<sub>1</sub> & TNFR<sub>2</sub>)造成細胞凋亡、存活<sup>27</sup>及慢性、

急性發炎<sup>28</sup>。在人類所有組織都有 TNFR<sub>1</sub>，其受質為 TNF- $\alpha$ ，會活化誘導細胞凋亡，也可經由另一途徑作用，活化 NF- $\kappa$ B，使基因表現讓細胞存活，但卻會加強發炎的效應；TNFR<sub>2</sub>則大多分佈在在免疫細胞(如單核細胞、淋巴細胞)，其受質包括 TNF- $\alpha$  及 TNF- $\beta$ ，與發炎有關。

TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  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 PDE<sub>4</sub><sup>29</sup>，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- $\kappa$ B 的轉譯，減少 TNF- $\alpha$  的生成。除上述疾病外，與 TNF- $\alpha$  相關的尚有多發性硬化(multiple sclerosis)<sup>30</sup>、阿茲海默症(Alzheimer's disease)<sup>31</sup> 等。

本論文對所合成 2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acids 進行 TNF- $\alpha$  活性抑制之篩選，以期是否亦對 TNF- $\alpha$  有調節作用做進一步了解。

## 第四節 小神經膠質細胞

小神經膠質細胞(microglial cells)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<sup>32,33</sup>，其中中樞神經系統疾病會造成多發性硬化症(multiple sclerosis)、阿茲海默症(Alzheimer's disease)、巴金森氏症(Parkinson's disease)及愛滋症所引起的痴呆症(AIDS dementia)。

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醣(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<sup>34,35</sup>，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<sup>36</sup>，而在多發性硬化症中也會造成寡樹突膠質細胞(oligodendrocyte)的損傷<sup>37</sup>。此外在神經元退化的病源中，活性的含氮中間體(nitrogen intermediators)及 TNF- $\alpha$ ，會造成老化及阿茲海默症<sup>38</sup>。

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

## 第五節 研究動機與目的

如第一節所述，過去本研究室合成了數以百計的 PQ 類緣化合物，並檢討其 ITP (inhibition of tubulin polymerization)及 cytotoxicity，發現其中有不少化合物在 *in vitro* 及 *in vivo* 試驗中呈現相當強的抗腫瘤活性，可以說是一類新型抗有絲分裂抗癌物質(novel antimetabolic agents)。

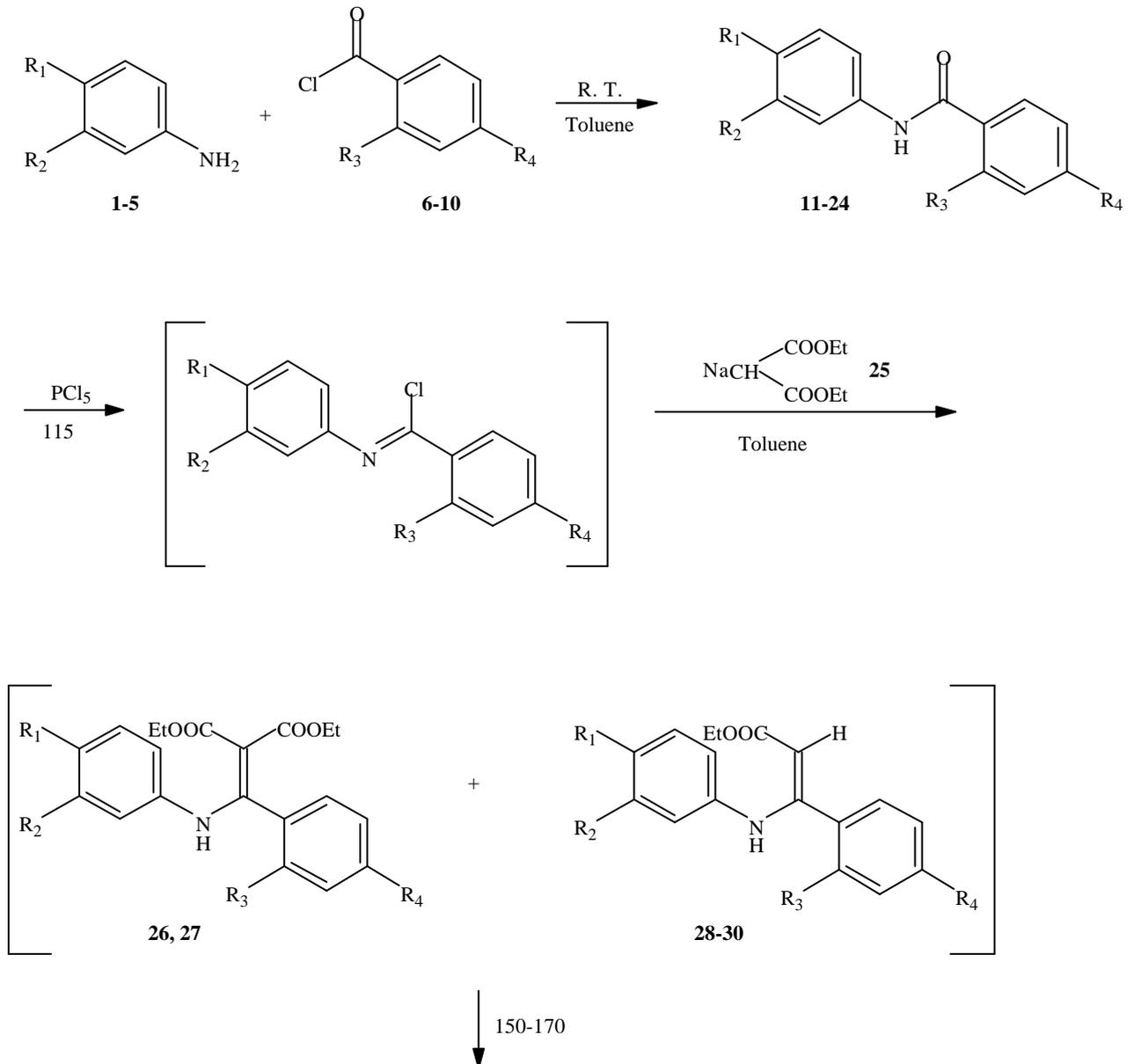
然而過去文獻上所報導的 2-phenyl-4-quinolone 類抗有絲分裂物質，其脂溶性偏高，不易溶解於生物體液，未來在體內動物實驗乃至於臨床運用上均有不便之處，於是本研究室繼續研發可形成鹽類的衍生物，為酸性的 2-phenyl-4-quinolone-carboxylic acids。

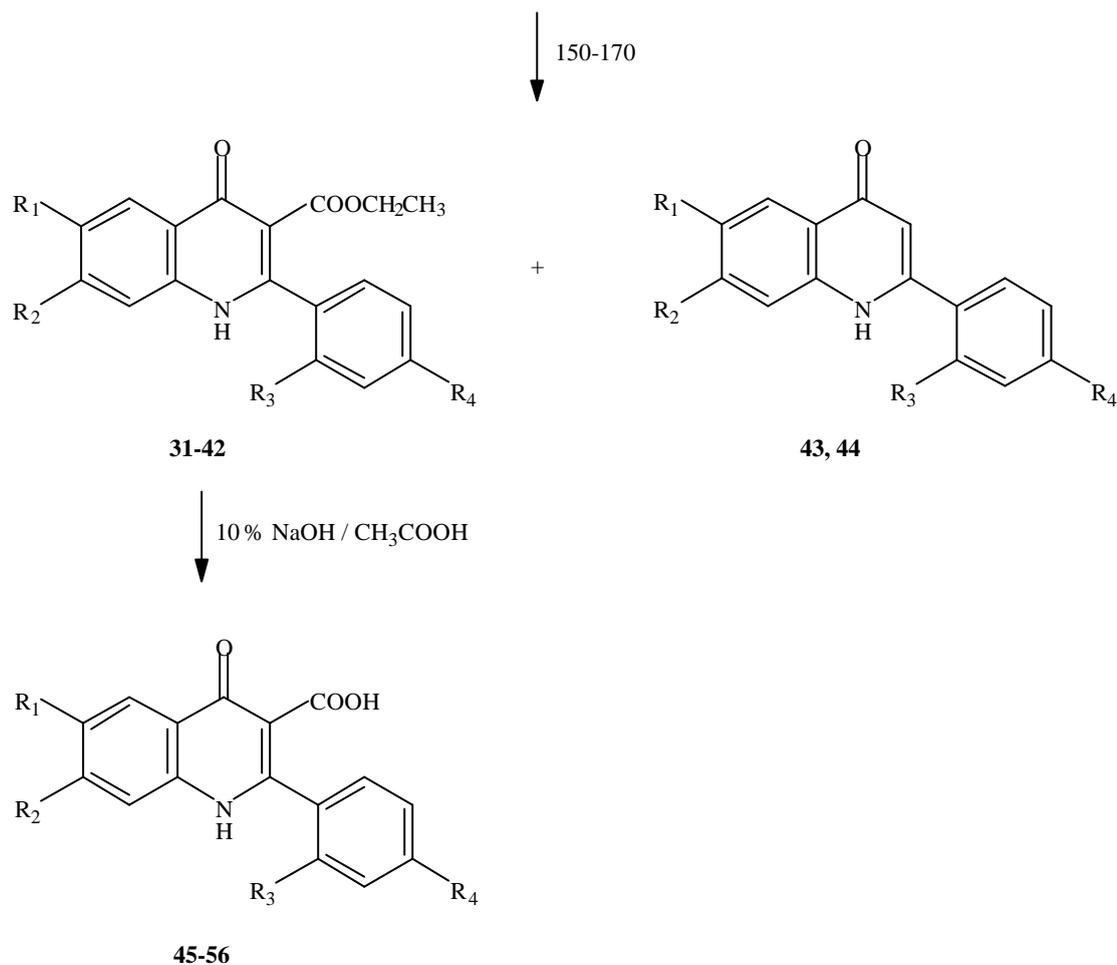
結果選擇在第 3 位置套上酸基，而合成一系列 2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid 衍生物。本研究室已合成出此系列衍生物第 3'、6 位置取代基團為 F、Cl、OCH<sub>3</sub>，並發現不少化合物抗腫瘤活性優越，為了進一步建構更完整的結構與活性關係及尋找更佳活性物質，著者則繼續從事第 2'、6 位置取代基團為 F、Cl、OCH<sub>3</sub> 衍生物之合成；且合成 2-phenyl 環上未取代，第 6 位為 F、Cl、OCH<sub>3</sub> 取代及第 6、7 位為 methylenedioxy 取代之化合物，評估第 6、7 位置取代基團對於活性的影響；且鑒於 3'-fluoro-6-methoxy-2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid 具強效細胞致毒活性，亦合成第 4'位為 F 取代、第 6 位為 OCH<sub>3</sub> 取代之化合物，來比較第 2'、3'、4'位置小原子基團(fluoro)取代對於活性的影響。

## 第二章 結果與討論

### 第一節 化學合成

本研究標的化合物之合成途徑係參考 1946 年 R.C.Elderfield 等學者所提的方法<sup>39</sup>而擬定，可以在 2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid 母核上有不同位置、多樣性的取代，如 **Scheme 1** 所示。而各中間產物及標的化合物分別以化合物 **13**、**26**、**29**、**33** 及 **47** 為例，說明其合成方法及結構解析、鑑定。





1. R<sub>1</sub> = Cl, R<sub>2</sub> = H

2. R<sub>1</sub> = F, R<sub>2</sub> = H

3. R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = H

4. R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = H

5. R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = -OCH<sub>2</sub>O-

6. R<sub>3</sub> = F, R<sub>4</sub> = H

7. R<sub>3</sub> = Cl, R<sub>4</sub> = H

8. R<sub>3</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> = H

9. R<sub>3</sub> = H, R<sub>4</sub> = F

10. R<sub>3</sub> = H, R<sub>4</sub> = H

11, 26, 31, 45. R<sub>1</sub> = Cl, R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> = F, R<sub>4</sub> = H

12, 32, 46. R<sub>1</sub> = Cl, R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> = Cl, R<sub>4</sub> = H

13, 33, 47. R<sub>1</sub> = Cl, R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> = H

14, 34, 48. R<sub>1</sub> = Cl, R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> = H, R<sub>4</sub> = H

15, 27, 35, 43, 49. R<sub>1</sub> = F, R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> = F, R<sub>4</sub> = H

16, 28, 36, 50. R<sub>1</sub> = F, R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> = Cl, R<sub>4</sub> = H

17, 37, 51. R<sub>1</sub> = F, R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> = H

18, 38, 52. R<sub>1</sub> = F, R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> = H, R<sub>4</sub> = H

19, 29, 39, 53. R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> = F, R<sub>4</sub> = H

20, 40, 44, 54. R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> = Cl, R<sub>4</sub> = H

21. R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> = H

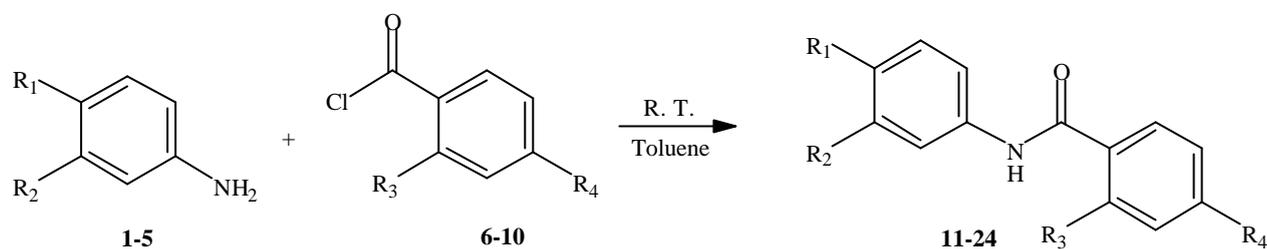
22, 41, 55. R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> = H, R<sub>4</sub> = F

23, 30. R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> = Cl, R<sub>4</sub> = H

24, 42, 56. R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = -OCH<sub>2</sub>O-, R<sub>3</sub> = H, R<sub>4</sub> = H

## Scheme 1

(一) 2,4-Substituted-*N*-(3,4-substituted phenyl)benzamides (11-24)之合成



1. R<sub>1</sub> = Cl, R<sub>2</sub> = H

2. R<sub>1</sub> = F, R<sub>2</sub> = H

3. R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = H

4. R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = H

5. R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = -OCH<sub>2</sub>O-

6. R<sub>3</sub> = F, R<sub>4</sub> = H

7. R<sub>3</sub> = Cl, R<sub>4</sub> = H

8. R<sub>3</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> = H

9. R<sub>3</sub> = H, R<sub>4</sub> = F

10. R<sub>3</sub> = H, R<sub>4</sub> = H

11. R<sub>1</sub> = Cl, R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> = F, R<sub>4</sub> = H

12. R<sub>1</sub> = Cl, R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> = Cl, R<sub>4</sub> = H

13. R<sub>1</sub> = Cl, R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> = H

14. R<sub>1</sub> = Cl, R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> = H, R<sub>4</sub> = H

15. R<sub>1</sub> = F, R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> = F, R<sub>4</sub> = H

16. R<sub>1</sub> = F, R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> = Cl, R<sub>4</sub> = H

17. R<sub>1</sub> = F, R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> = H

18. R<sub>1</sub> = F, R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> = H, R<sub>4</sub> = H

19. R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> = F, R<sub>4</sub> = H

20. R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> = Cl, R<sub>4</sub> = H

21. R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> = H

22. R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> = H, R<sub>4</sub> = F

23. R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> = Cl, R<sub>4</sub> = H

24. R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = -OCH<sub>2</sub>O-, R<sub>3</sub> = H, R<sub>4</sub> = H

**Scheme 2**

此類化合物之合成以化合物 13 為例(如 Scheme 2 所示)簡扼說明, 詳細合成方法請參閱第四章第三節。首先以 4-chloroaniline (1) 2-methoxybenzoyl chloride (8)為起始原料, 甲苯為溶媒, 由於反應性甚佳, 於室溫下攪拌即可得高產率的 amide linkage 產物, 為 *N*-(4-chlorophenyl)-2-methoxybenzamide (13)。

**化合物 13 之結構鑑定：**

化合物 13 為白色針狀結晶，熔點 56.1-58.7 。

**質譜(EIMS) (圖 13-1)：**由分子離子峰( $m/z$  261)及元素分析結果得知此化合物分子式為  $C_{14}H_{12}ClNO_2$ ，與預期相符。

**IR 圖譜(圖 13-2)：**在波數  $3344\text{ cm}^{-1}$  處有二級醯胺基伸縮振動之吸收峰；在波數  $1651\text{ cm}^{-1}$  處有 C=O 伸縮振動之吸收峰。

**UV 圖譜：**在 270.0 nm 處有最大吸收。

**$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 200 MHz) (圖 13-3)：**

積分值顯示此化合物有 12 個氫。初步判斷最高磁場處的 d 3.89 (3H, s) 歸屬於 2-OCH<sub>3</sub> 之訊號，最低磁場處的 d 10.27 (1H, s) 歸屬於 NH 之訊號，其餘為 8 個芳香氫。

由於 2-methoxybenzamide 受到 2-OCH<sub>3</sub> 誘導效應之影響，所以 H-3 及 H-5 之訊號往較高磁場移動，再依訊號分裂模式、偶合情形及氫-氫相關譜 (DMSO- $d_6$ , 200 MHz) (圖 13-4) 可判斷：d 7.06 (1H, *dd*,  $J = 7.5, 7.5\text{ Hz}$ ) 歸屬於 H-5 之訊號，d 7.14 (1H, *d*,  $J = 8.4\text{ Hz}$ ) 歸屬於 H-3 之訊號，d 7.49 (1H, *dd*,  $J = 8.4, 7.5\text{ Hz}$ ) 歸屬於 H-4 之訊號，d 7.67 (1H, *d*,  $J = 7.5\text{ Hz}$ ) 歸屬於 H-6 之訊號。剩下兩組質子訊號 d 7.39 (2H, *d*,  $J = 8.7\text{ Hz}$ ) 及 d 7.83 (2H, *d*,  $J = 8.7\text{ Hz}$ ) 仍待確認。

**$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 50 MHz) (圖 13-5)：**

顯示有 12 個碳原子訊號，但由分子式得知有 14 個碳，推測可能是兩組結構對稱的碳訊號(C-2', C-6' 與 C-3', C-5') 重疊所致。初步判斷最高磁場處的 d 55.84 歸屬於 2-OCH<sub>3</sub> 之訊號，最低磁場處的 d 164.66 歸屬於 C=O 之訊號。

**HMQC (DMSO- $d_6$ , 200 MHz) (圖 13-6) :**

依循碳與氫之相關性，分別將  $\delta$  111.92、 $\delta$  120.49、 $\delta$  129.73 及  $\delta$  132.15 歸屬於 C-3、C-5、C-6 及 C-4 之訊號；而 C-2',C-6'與 C-3',C-5'兩組碳訊號則由 HMBC 來判定。

**HMBC (DMSO- $d_6$ , 200 MHz) (圖 13-7、圖 13-8) :**

$\delta$  121.26 與 NH 有  $^3J_{\text{CH}}$  coupling correlation 而歸屬於 C-2', C-6'之訊號，於是  $\delta$  128.59 歸屬於 C-3', C-5'之訊號，再配合 HMQC 得知  $\delta$  7.39 (2H,  $d$ ,  $J = 8.7$  Hz)及  $\delta$  7.83 (2H,  $d$ ,  $J = 8.7$  Hz)分別歸屬於 H-3', H-5'及 H-2', H-6'之訊號

其餘 4 個四級碳歸屬如下： $\delta$  124.73 與 H-3 及 H-5 有  $^3J_{\text{CH}}$  coupling correlation 而歸屬於 C-1 之訊號； $\delta$  156.50 與  $\delta$  3.89 (3H,  $s$ , OCH<sub>3</sub>)、H-4 及 H-6 有  $^3J_{\text{CH}}$  coupling correlation 而歸屬於 C-2 之訊號；C-1'與 C-4'透過 HMBC 獲得的資訊相同，所以從偶合圈數大小判斷，圖譜上  $\delta$  138.06 與 H-3', H-5' 及 H-2', H-6'有遠程偶合關係，且與 H-3', H-5'之偶合圈數較多，故將  $\delta$  138.06 歸屬於 C-1'之訊號，則剩餘一支碳訊號  $\delta$  127.14 歸屬於 C-4'之訊號。

**Table 1. NMR spectral data for compound 13**

Position	H	C	HMBC
1	--	124.73	
2	--	156.50	
3	7.14 ( <i>d</i> , 8.4 Hz)	111.92	C-1 ( $^3J$ ), C-5 ( $^3J$ )
4	7.49 ( <i>dd</i> , 8.4, 7.5 Hz)	132.15	C-2 ( $^3J$ ), C-6 ( $^3J$ )
5	7.06 ( <i>dd</i> , 7.5, 7.5 Hz)	120.49	C-1 ( $^3J$ ), C-3 ( $^3J$ )
6	7.67 ( <i>d</i> , 7.5 Hz)	129.73	C-2 ( $^3J$ ), C-4 ( $^3J$ ), C=O ( $^3J$ )
1'	--	138.06	
2', 6'	7.83 ( <i>d</i> , 8.7 Hz)	121.26	C-1' ( $^2J$ ), C-6', 2' ( $^3J$ ), C-3', 5' ( $^2J$ ), C-4' ( $^3J$ )
3', 5'	7.39 ( <i>d</i> , 8.7 Hz)	128.59	C-1' ( $^3J$ ), C-2', 6' ( $^2J$ ), C-5', 3' ( $^3J$ ), C-4' ( $^2J$ )
4'	--	127.14	
2-OCH <sub>3</sub>	3.89 ( <i>s</i> )	55.84	C-2 ( $^3J$ )
NH	10.27 ( <i>s</i> )	--	C-2', 6' ( $^3J$ ), C=O ( $^2J$ )
C=O	--	164.66	

綜合上述圖譜數據分析，可以確定化合物 13 為 *N*-(4-chlorophenyl)-2-methoxybenzamide。