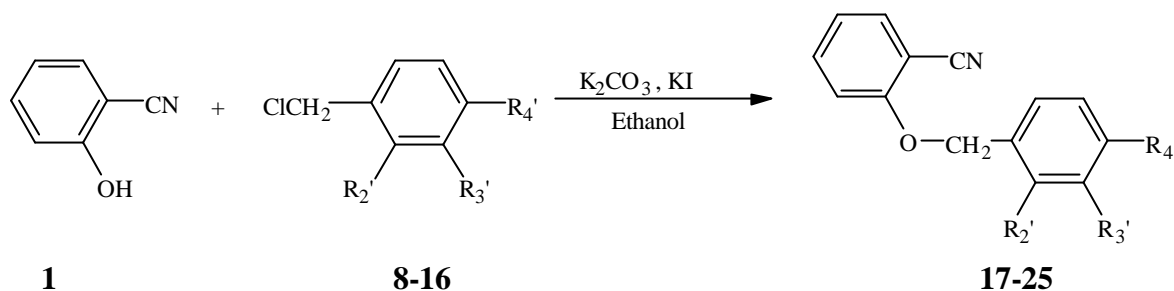


## 第二章 結果與討論

### 第一節 化學合成

#### 壹 . 2-Substituted benzyloxy benzonitriles (17-25)之合成

此類化合物之合成方法如 Scheme 2<sup>50</sup> 所示：



Scheme 2

No.	R <sub>2</sub> ?	R <sub>3</sub> ?	R <sub>4</sub> ?
8, 17 <sup>50</sup>	H	H	H
9, 18	Cl	H	H
10, 19	H	Cl	H
11, 20	H	H	Cl
12, 21	F	H	H
13, 22	H	F	H
14, 23	H	H	F
15, 24	H	OCH <sub>3</sub>	H
16, 25	H	H	OCH <sub>3</sub>

將 2-cyanophenol (1)分別與 substituted benzyl chloride (8-16)溶於乙醇中，在無水碘化鉀及無水碳酸鉀存在下進行反應，即可得到相對應之 2-substituted benzyloxy benzonitrile (17-25)

此類產物之構造決定，以 2-[(3-methoxybenzyl)oxy]benzonitrile (24)為代表說明如下：

化合物 24 為透明片狀結晶；熔點為 71.2-72.6

### 質譜(EIMS) (圖 24-1)：

由其分子離子峰 ( $m/z$  239,  $M^+$ )，及元素分析結果得知此化合物分子式為  $C_{15}H_{13}NO_2$ ，與預期相符。

### IR 圖譜(圖 24-2)：

在  $3016\text{ cm}^{-1}$  處有不飽和碳氫(=C-H)之吸收，在  $2955\text{ cm}^{-1}$  處有飽和碳氫(-C-H)之吸收， $2222\text{ cm}^{-1}$  為 C≡N 的吸收， $1597, 1491, 1466\text{ cm}^{-1}$  為芳香環的吸收帶。

UV：在  $283.4\text{ nm}$  處有最大吸收。

### $^1\text{H-NMR}$ 圖譜(圖 24-3)：

其積分值顯示此化合物有 13 個質子訊號。而由其化學位移、偶合情形及氫-氫相關譜(圖 24-4)，將各個質子訊號歸屬如下：在最高磁場的  $3.75$  (3H, *s*) 歸屬為  $-\text{OCH}_3$ ， $5.24$  (2H, *s*) 為  $-\text{OCH}_2-$  之訊號，由上資料，再配合 IR 上 C≡N 之吸收，足以表示 2-cyanophenol (1) 與 3-methoxybenzyl chloride (8) 有結合起來。其次，因受 C≡N 的影響，H-6 的位移往較低磁場移動，出現在  $7.72$  (1H, *dd*,  $J = 7.6, 1.6\text{ Hz}$ )，再依據氫-氫相關譜，進一步將  $7.03-7.11$ ,  $7.63$  (1H, *ddd*,  $J = 8.0, 8.0, 1.7\text{ Hz}$ )， $7.29$  (1H, *d*,  $J = 8.0\text{ Hz}$ ) 分別歸屬於 H-5, H-4, H-3 之訊號(Fig. 24-a)。

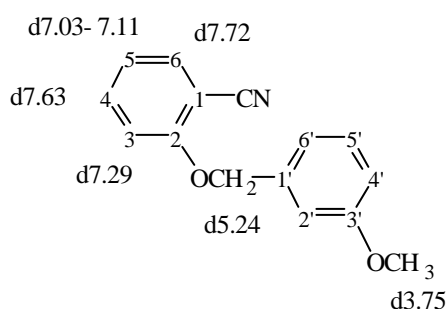


Fig. 24-a 質子訊號之歸屬

### $^{13}\text{C}$ -NMR 圖譜(圖 24-5) :

顯示有 15 支訊號，由分子式得知有 15 個碳，推測並無重疊的碳訊號，每個訊號皆代表一個碳。

### HMQC 圖譜(圖 24-6a, 24-6b) :

依據碳與氫之相關性，可將 55.20, 70.07, 113.72, 121.50, 133.90, 135.18 分別歸屬於  $-\text{OCH}_3$ ,  $-\text{OCH}_2-$ , C-3, C-5, C-6, C-4 之訊號(Fig. 24-b)，其餘的碳與氫之訊號需參照 HMBC 來做進一步的確認。

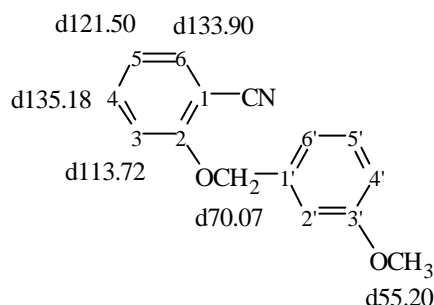


Fig. 24-b 碳訊號之歸屬

### HMBC 圖譜(圖 24-7a, 24-7b) :

由於  $-\text{OCH}_2-$  (5.24) 和 C-2, C-2', C-6' 有  $^3J$  correlation, 並且和 C-1' 有  $^2J$  correlation(Fig. 24-c), 故可將 113.22, 119.67, 137.84, 160.05 分別歸屬於 C-2', C-6', C-1', C-2 之訊號(Fig. 24-d)。

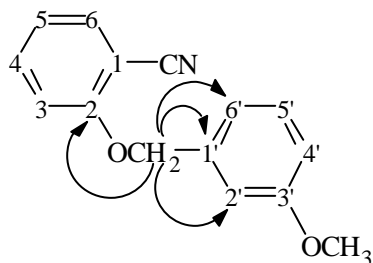


Fig. 24-c  $-\text{OCH}_2-$  與 C-2, C-2', C-6' 及 C-1' 之偶合關係

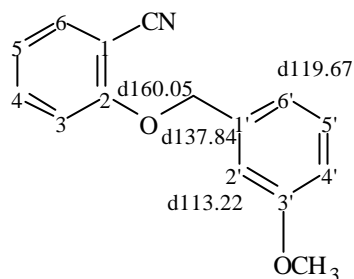


Fig. 24-d 碳訊號之歸屬

其他碳氫間的  $^3J$  correlation 則以 Fig. 24-e 及下表表示：

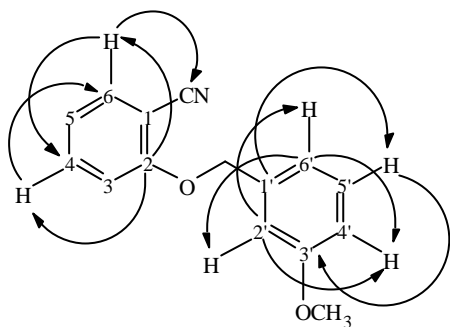


Fig. 24-e 碳氫間之遠程偶合關係

$^3J$ correlation		$^3J$ correlation
$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
2	4	6
	6	4, CN
1?	5?	3?
2?	4?, 6?	
6?	2?, 4?	

其中 C-2 和 C-6 同時與 H-4 有  $^3J$  correlation, 故可將 6.87-6.92 歸屬於 H-4 的訊號, 而 7.07 和 7.02-7.05 則分別為 H-2 及 H-6 的訊號; 另外, 7.31 (1H, *t*,  $J=8.1$  Hz), 歸屬於 H-5, 7.63 (1H, *ddd*,  $J=8.0, 8.0, 1.7$  Hz) 和 7.72 (1H, *dd*,  $J=7.6, 1.6$  Hz) 確定為 H-4 及 H-6 之訊號 (Fig. 24-f), 最後分別將 116.64, 159.62 歸屬於 C N, C-3 之訊號, 而 133.90, 135.18 則可確定為 C-6, C-4 之訊號, 另外由 H-3, 5 之遠程偶合關係, 可將 101.16 歸屬於 C-1 之訊號 (Fig. 24-g)。

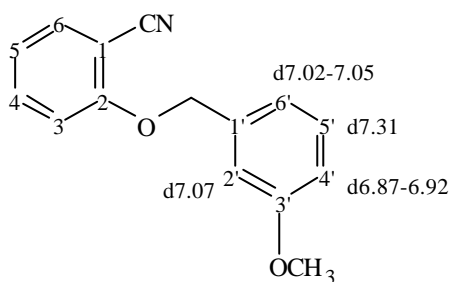


Fig. 24-f 質子訊號之歸屬

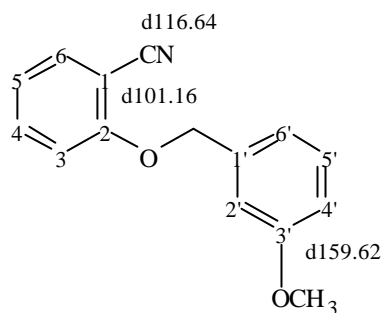


Fig. 24-g 碳訊號之歸屬

綜合上述光譜數據分析, 足以判定化合物 24 之結構為 2-[(3-methoxybenzyl)oxy]benzonitrile。

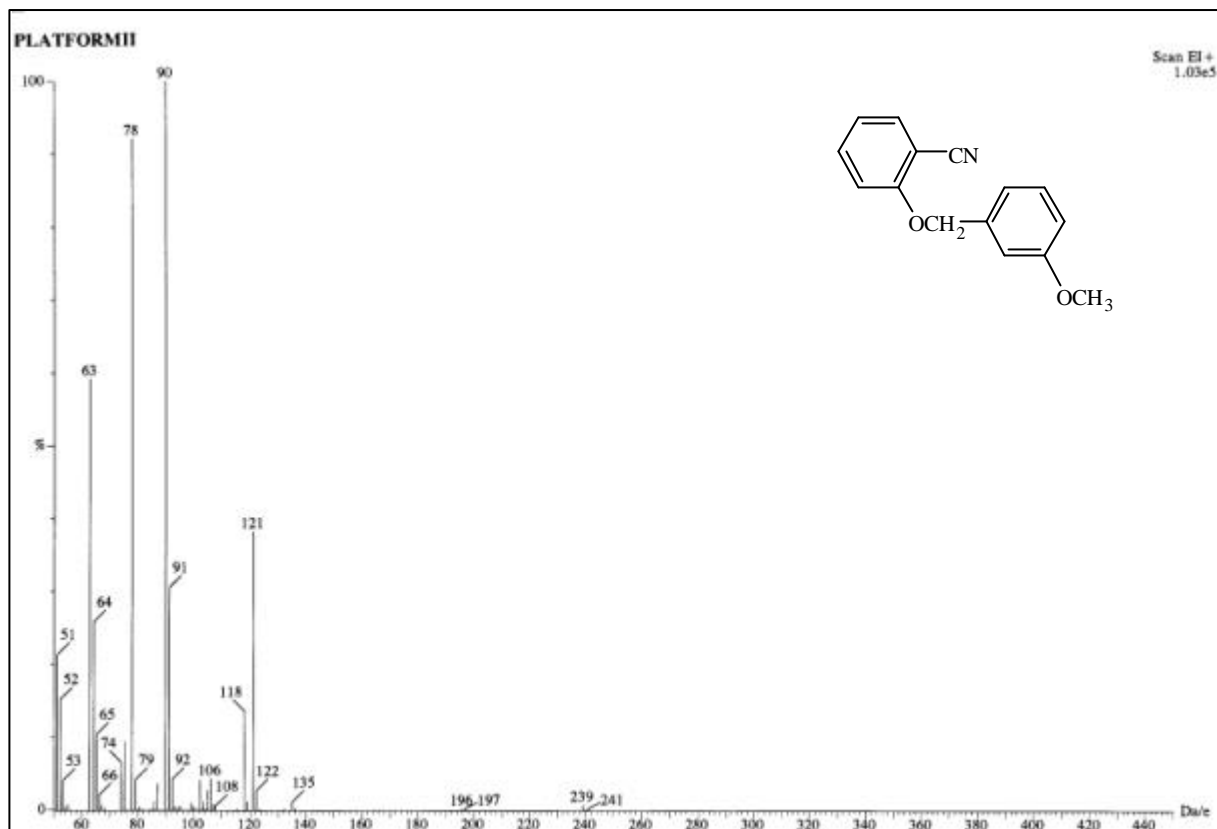


圖 24-1 MS spectrum of compound 24

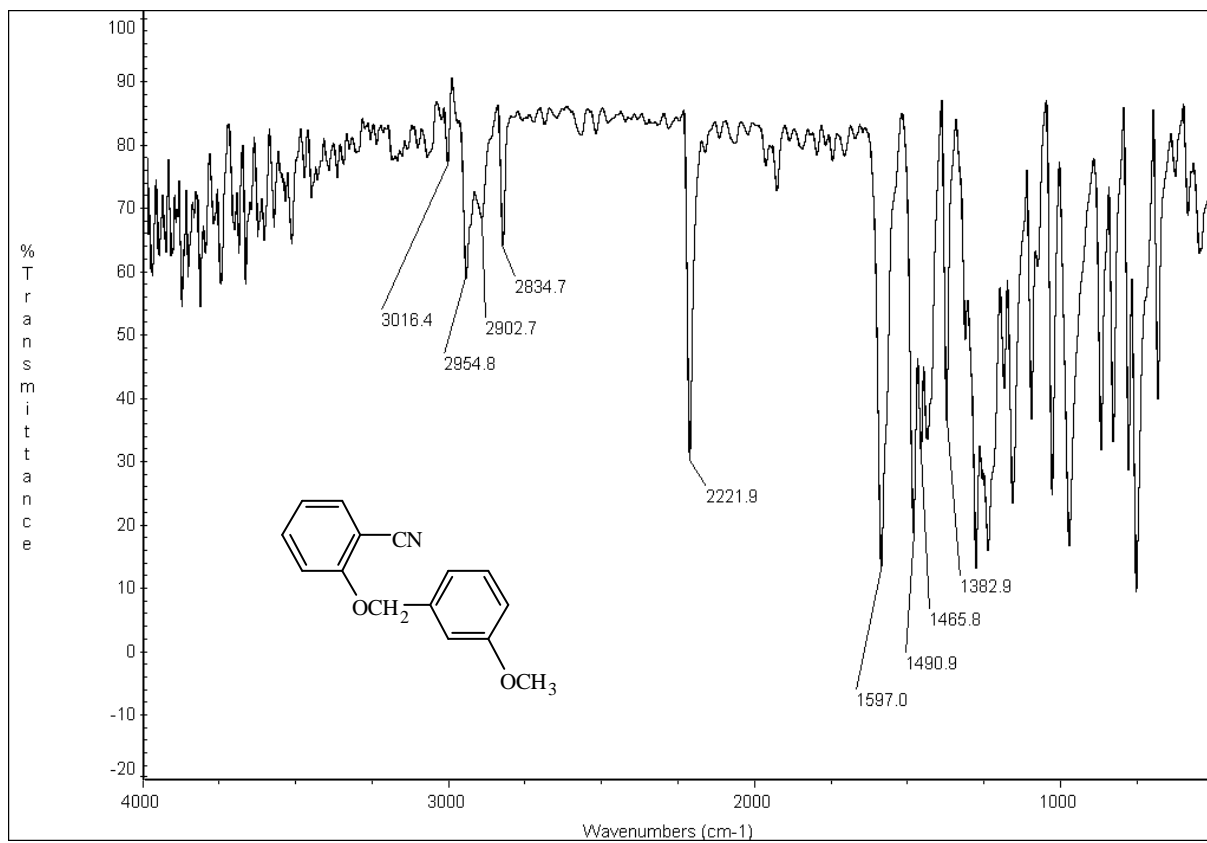


圖 24-2 IR (KBr) spectrum of compound 24

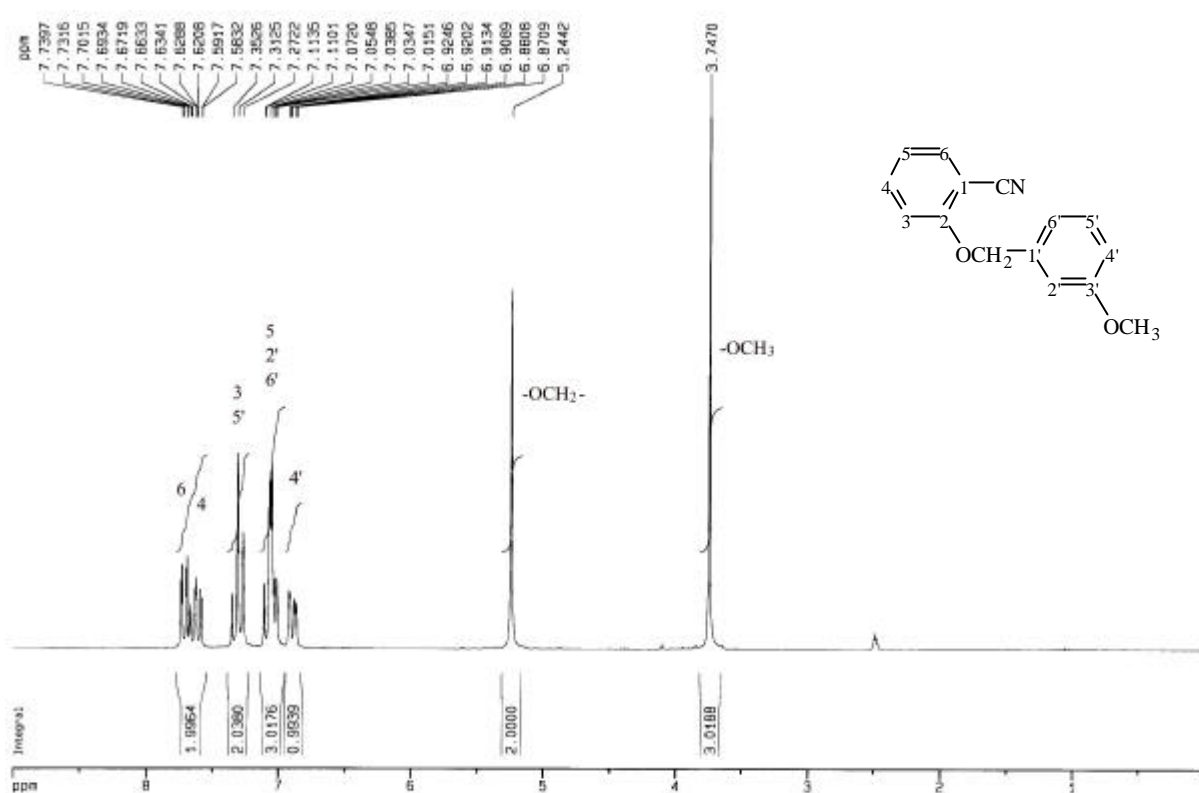


圖 24-3  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 200 MHz) spectrum of compound **24**

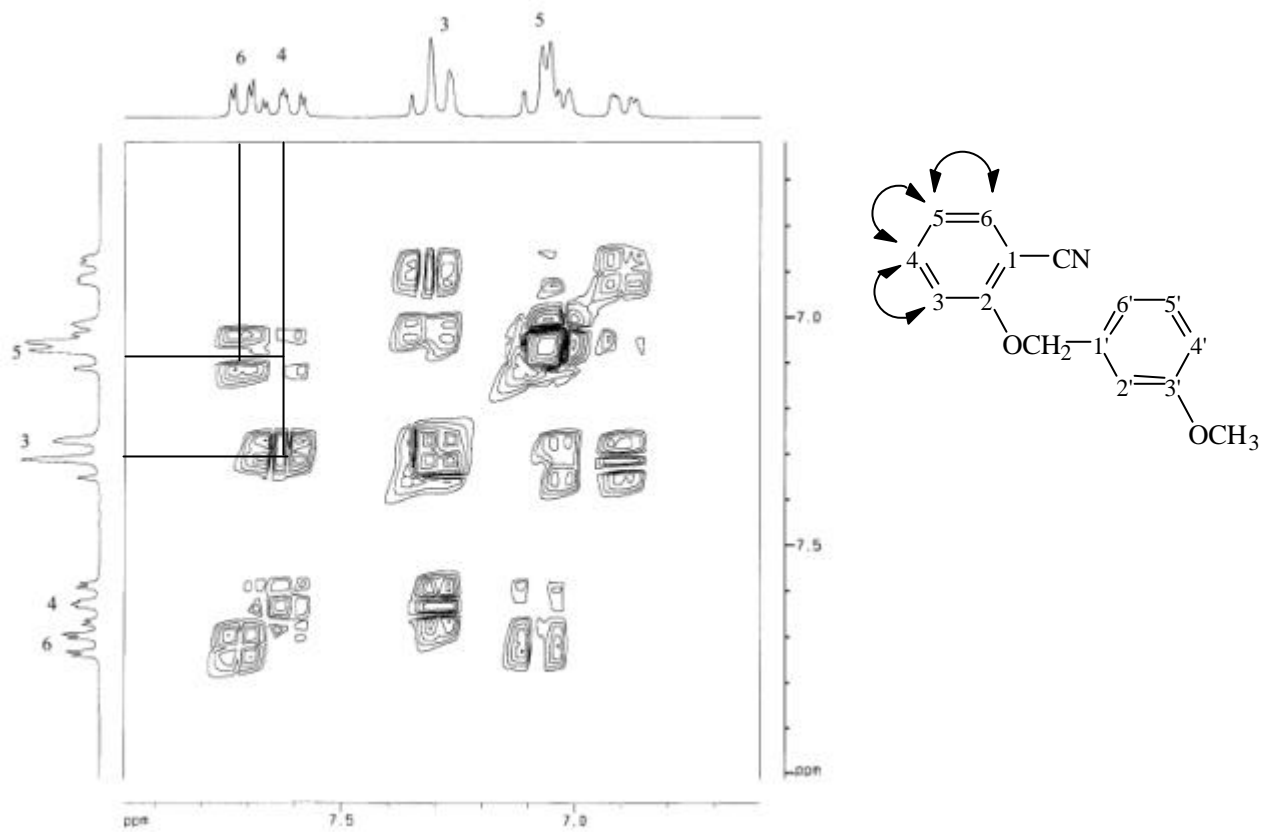


圖 24-4  $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 200 MHz) spectrum of compound **24**

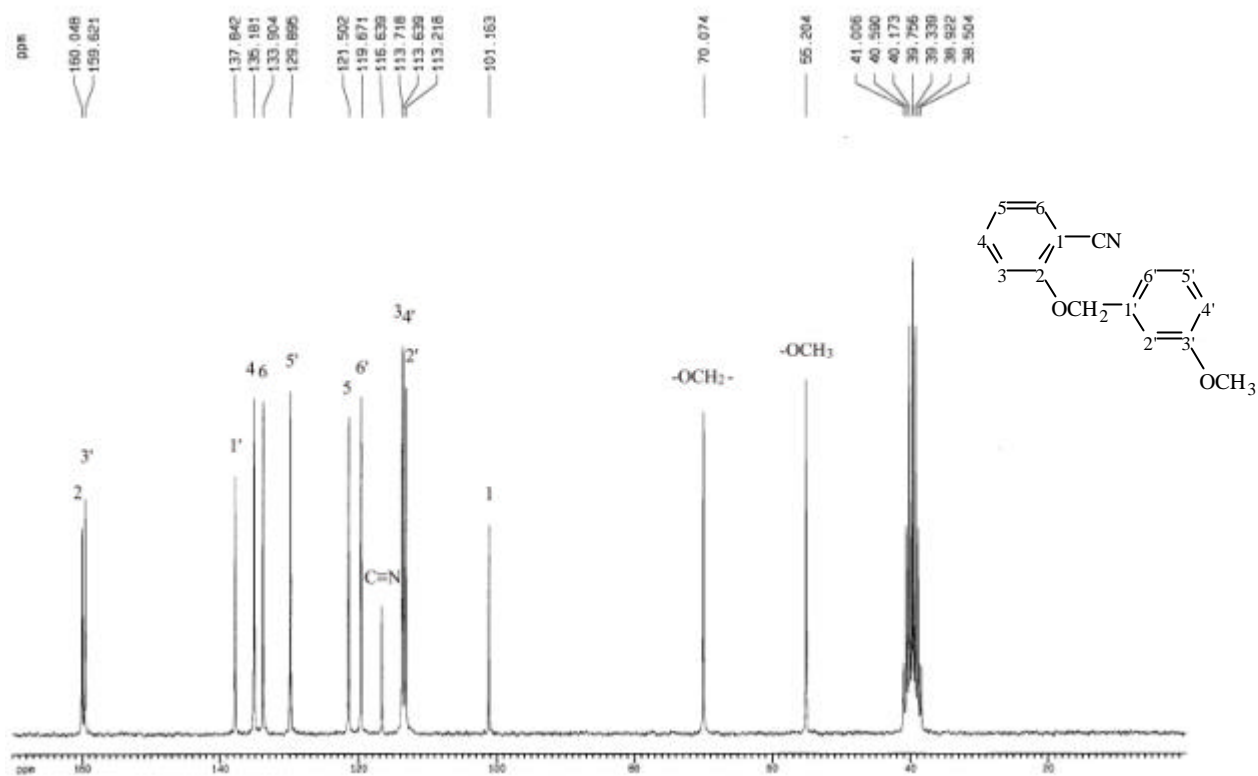


圖 24-5  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 50 MHz) spectrum of compound 24

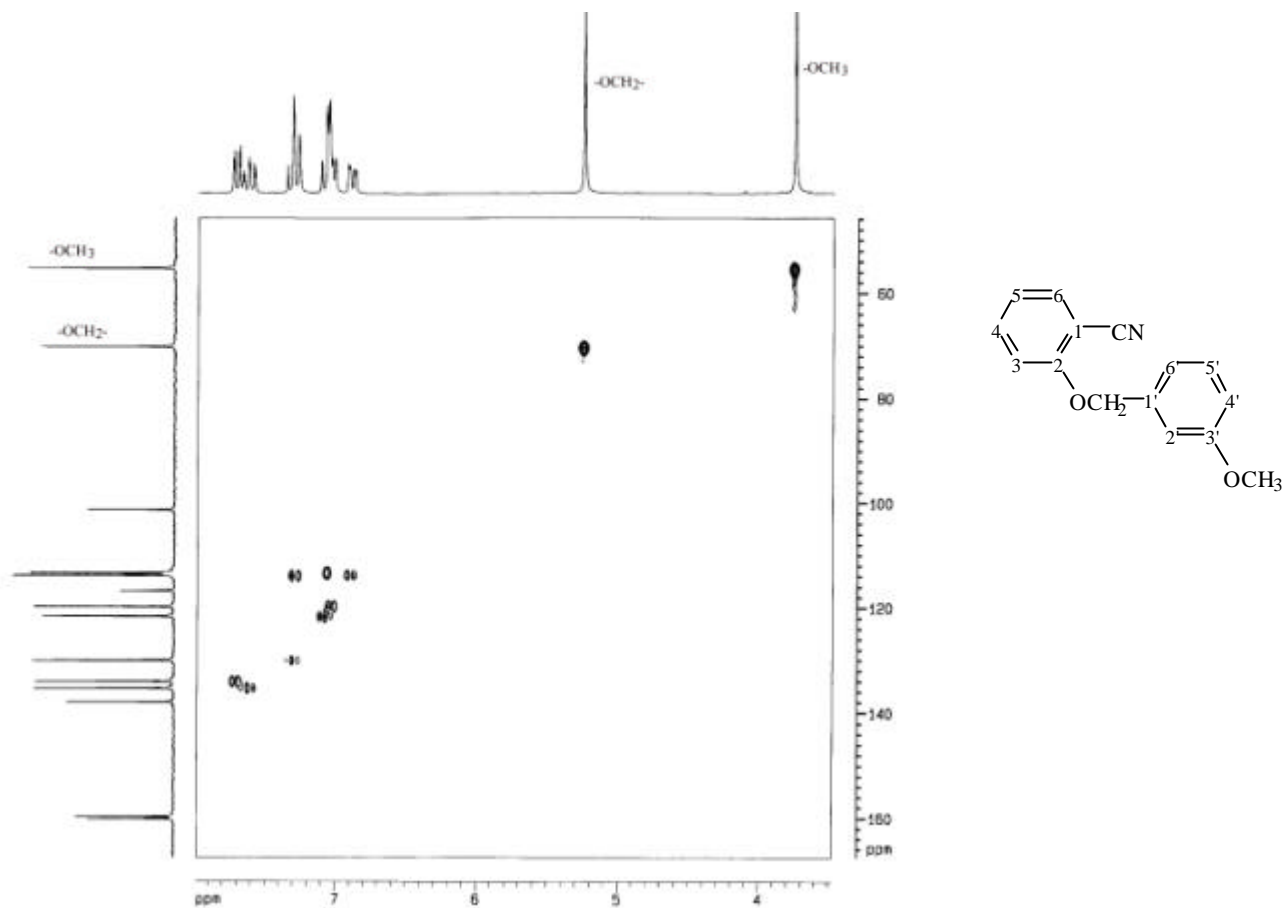


圖 24-6a HMQC (DMSO- $d_6$ ) spectrum of compound **24**

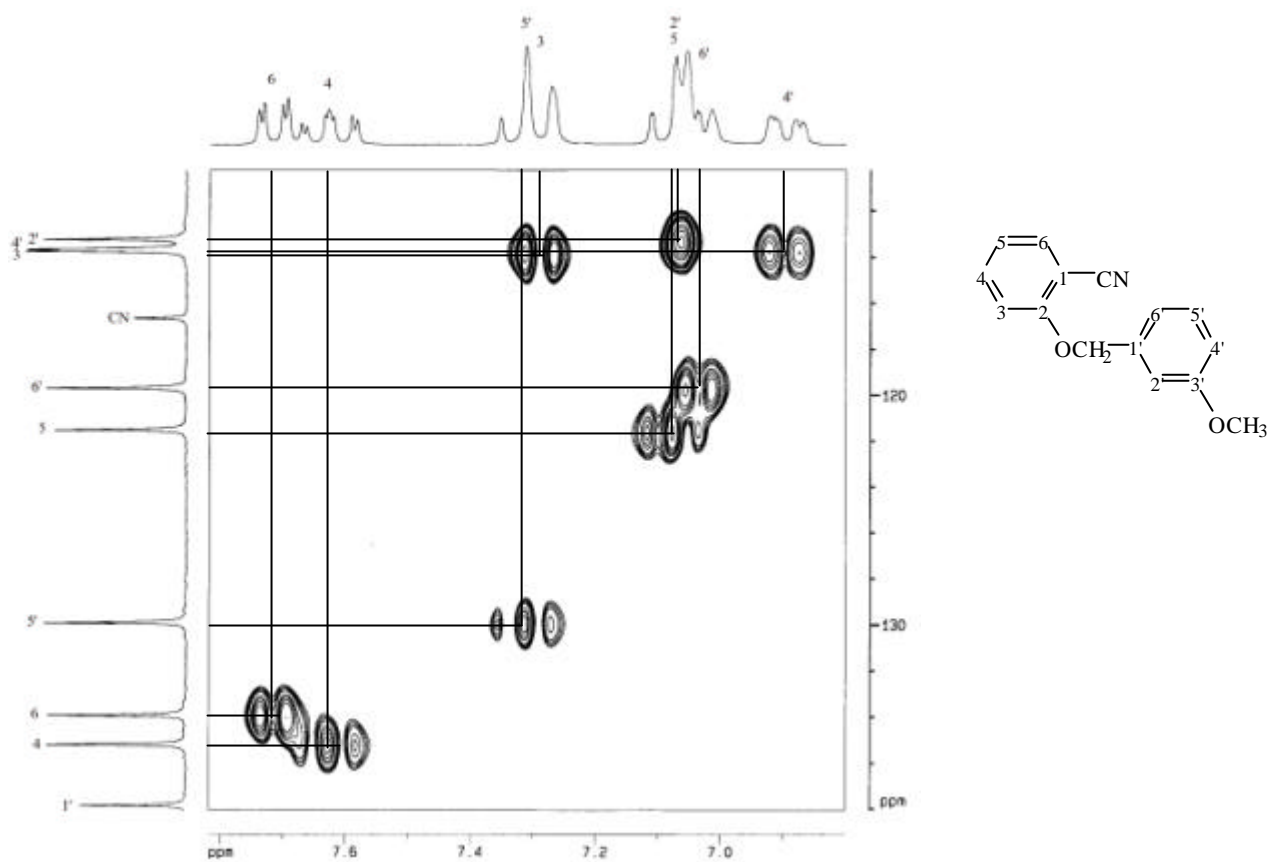


圖 24-6b HMQC (DMSO- $d_6$ ) spectrum of compound **24**



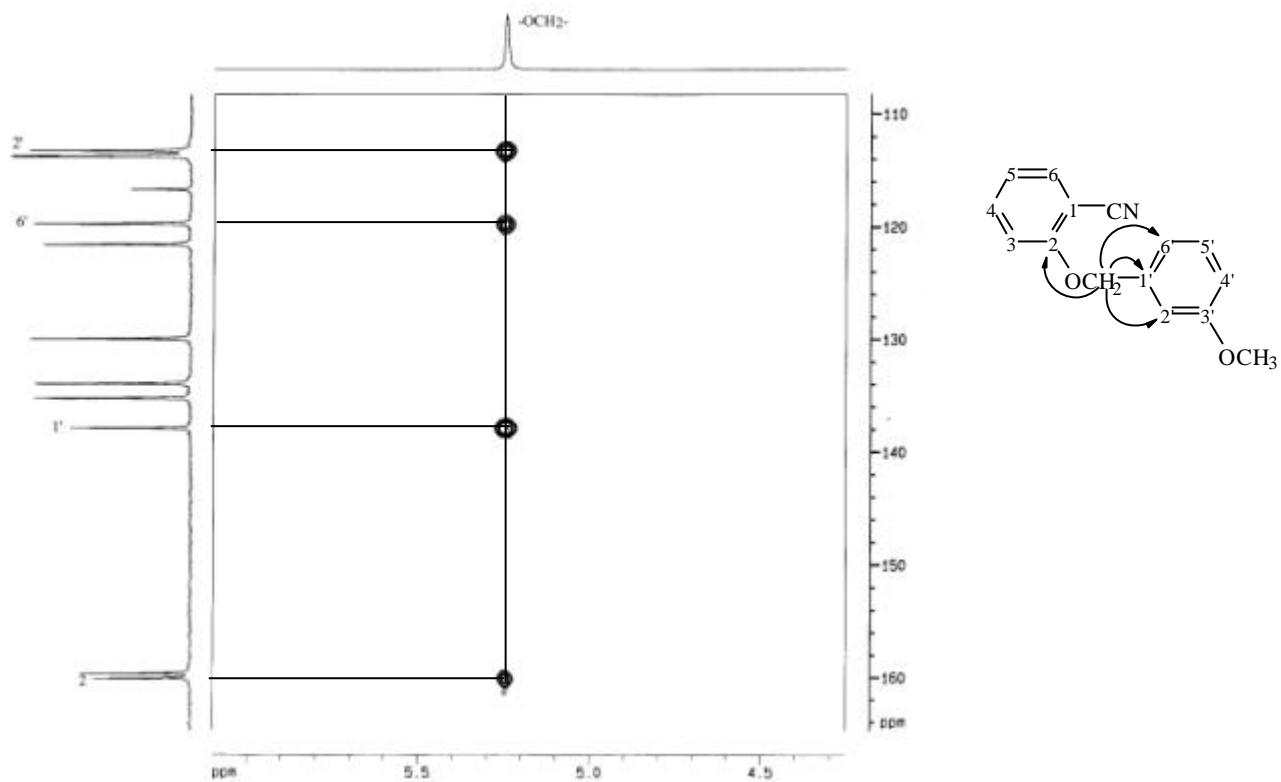


圖 24-7a HMBC (DMSO-*d*<sub>6</sub>) spectrum of compound 24

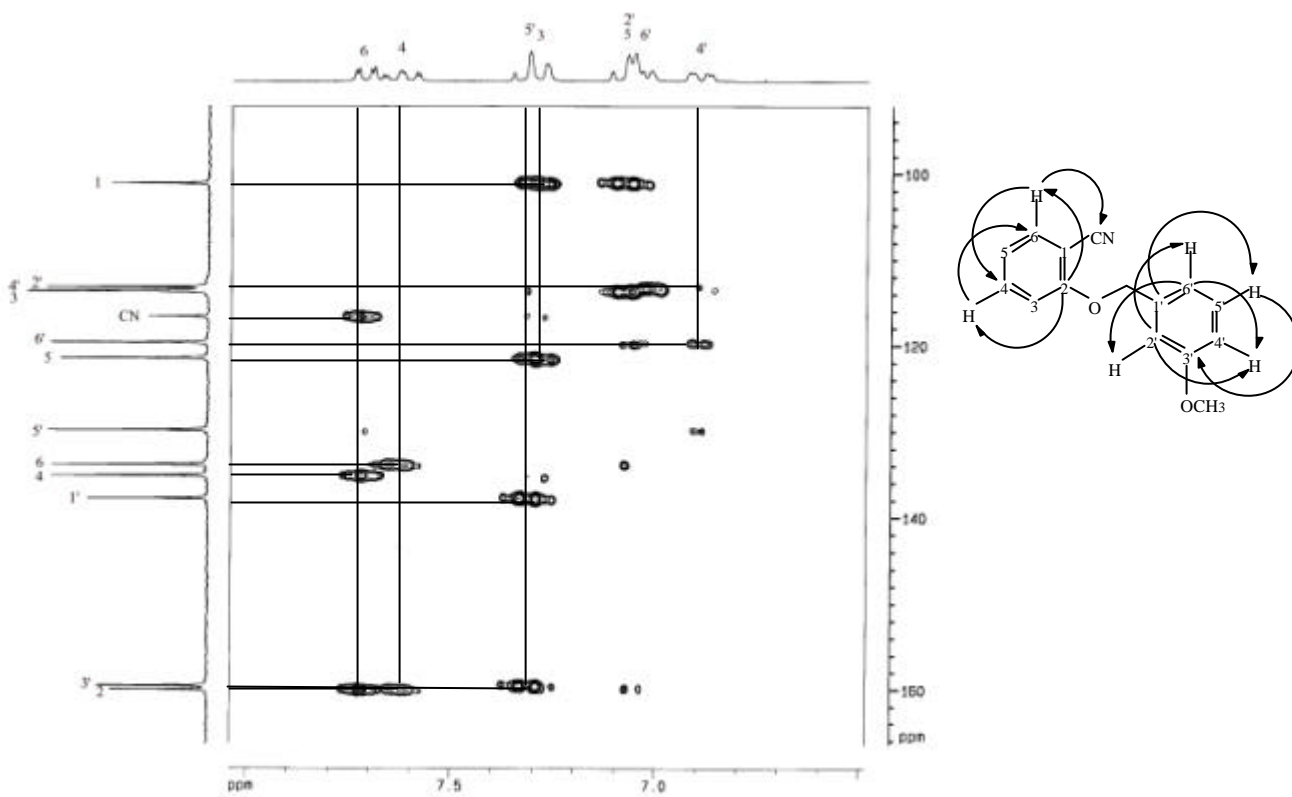


圖 24-7b HMBC (DMSO-*d*<sub>6</sub>) spectrum of compound 24

## 貳. 化合物 26-44 之合成

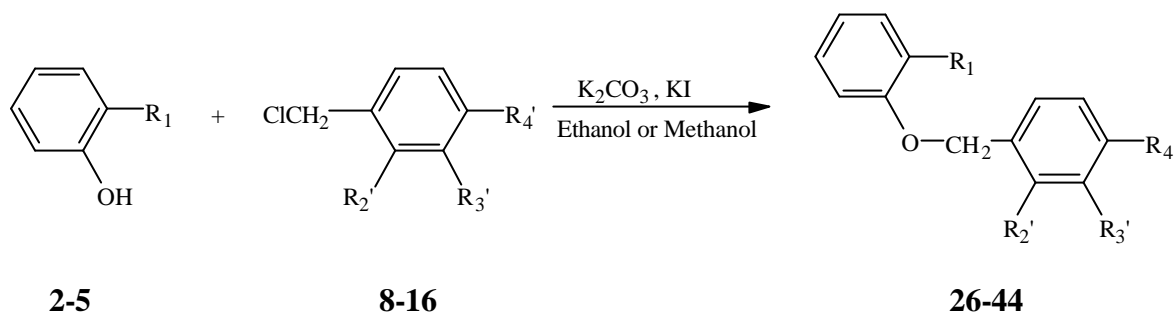
此類化合物可細分為下列四大類，其合成方法如 Scheme 3<sup>50</sup> 所示：

A. 2-Substituted benzyloxy methylbenzenes (26-29)

B. 2-Substituted benzyloxy phenyl methanols (30-33)

C. 2-Substituted benzyloxy benzoates (34-41)

D. 2-Substituted benzyloxy benzamides (42-44)



**Scheme 3**

No.	R <sub>1</sub>	No.	R <sub>2</sub> ?	R <sub>3</sub> ?	R <sub>4</sub> ?
2	CH <sub>3</sub>	8	H	H	H
3	CH <sub>2</sub> OH	9	Cl	H	H
4	COOCH <sub>3</sub>	10	H	Cl	H
5	CONH <sub>2</sub>	11	H	H	Cl
		12	F	H	H
		13	H	F	H
		14	H	H	F
		15	H	OCH <sub>3</sub>	H
		16	H	H	OCH <sub>3</sub>

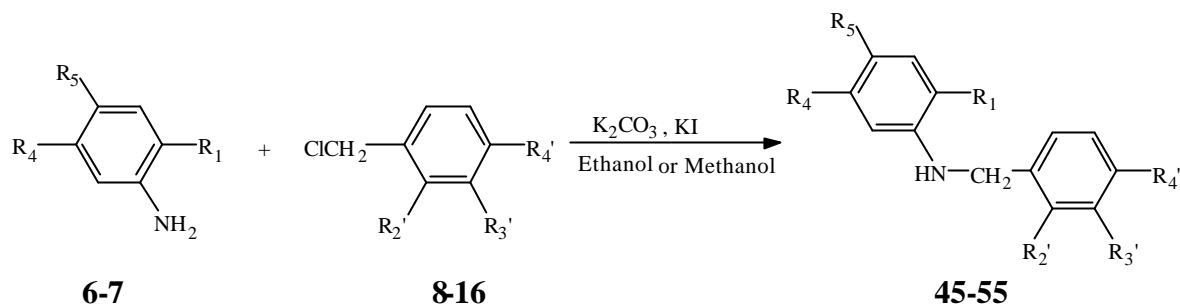
compound	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub> ?	R <sub>3</sub> ?	R <sub>4</sub> ?
26	CH <sub>3</sub>	H	H	H
27	CH <sub>3</sub>	Cl	H	H
28	CH <sub>3</sub>	H	Cl	H
29	CH <sub>3</sub>	H	H	Cl
30 <sup>50</sup>	CH <sub>2</sub> OH	H	H	H
31	CH <sub>2</sub> OH	Cl	H	H

compound	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub> ?	R <sub>3</sub> ?	R <sub>4</sub> ?
32	CH <sub>2</sub> OH	H	Cl	H
33	CH <sub>2</sub> OH	H	H	Cl
34 <sup>50</sup>	COOCH <sub>3</sub>	H	H	H
35	COOCH <sub>3</sub>	Cl	H	H
36	COOCH <sub>3</sub>	H	Cl	H
37	COOCH <sub>3</sub>	H	H	Cl
38	COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	H	H
39	COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Cl	H	H
40	COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	Cl	H
41	COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	H	Cl
42	CONH <sub>2</sub>	Cl	H	H
43	CONH <sub>2</sub>	H	Cl	H
44	CONH <sub>2</sub>	H	H	Cl

此類化合物之合成方法與 2-substituted benzyloxy benzonitrile 類(17-25, scheme 2)相似，當合成具有甲酯結構的化合物 34-37 時以甲醇為反應溶媒，以維持 methyl salicylate (4)甲酯的結構，相較於化合物 38-41 則是以乙醇為反應溶媒，因此會進行轉酯反應，將 methyl salicylate (4)的甲酯轉變為乙酯，因而得到乙酯的結構。

參. 2-Substituted benzylamino benzoates (45-55)之合成

此類化合物之合成方法如 Scheme 4<sup>50</sup> 所示



Scheme 4

No.	R <sub>1</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
6	COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	H
7	COOCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

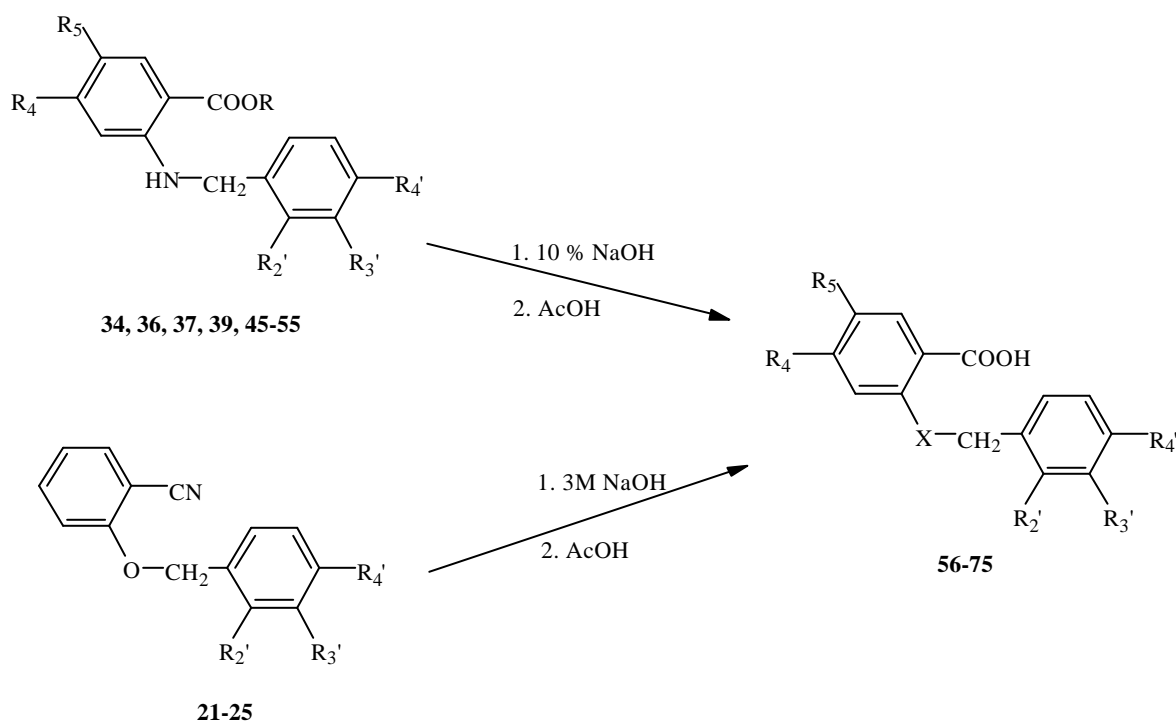
No.	R <sub>2</sub> ?	R <sub>3</sub> ?	R <sub>4</sub> ?
8	H	H	H
9	Cl	H	H
10	H	Cl	H
11	H	H	Cl
12	F	H	H
13	H	F	H
14	H	H	F
15	H	OCH <sub>3</sub>	H
16	H	H	OCH <sub>3</sub>

compound	R <sub>1</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>2</sub> ?	R <sub>3</sub> ?	R <sub>4</sub> ?
45	COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	H	H	H	H
46	COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	H	Cl	H	H
47	COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	H	H	Cl	H
48	COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	H	H	H	Cl
49	COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	H	F	H	H
50	COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	H	H	F	H
51	COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	H	H	H	F
52	COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
53	COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	H	H	H	OCH <sub>3</sub>
54	COOCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	H
55	COOCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>

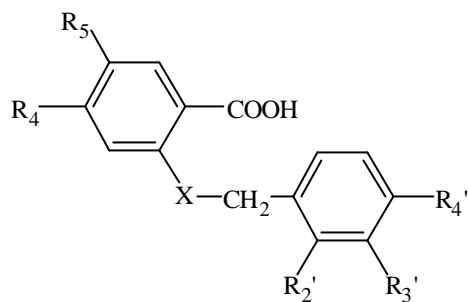
此類化合物之合成方法與 2-substituted benzyloxy benzonitrile 類 (17-25, Scheme 2)相似，其中化合物 54,55 以甲醇為反應溶媒，以維持 methyl 2-amino-4, 5-dimethoxybenzoate (7)甲酯的結構。

肆. 2-Substituted benzyloxy benzoic acids (56-64)及 2-substituted benzylamino benzoic acids (65-75)之合成

此類化合物之合成方法如 Scheme 5<sup>51,52</sup> 所示，取化合物 34,36-37,39, 45-55 為起始原料，以 10 %的 NaOH 進行水解反應，或以 21-25 為起始原料，以 3M 的 NaOH 進行水解反應，隨後以冰醋酸酸化即可得到相對應的化合物 56-75。



Scheme 5



56-75

compound	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>2</sub> ?	R <sub>3</sub> ?	R <sub>4</sub> ?	X
56	H	H	H	H	H	O
57	H	H	Cl	H	H	O
58	H	H	H	Cl	H	O
59	H	H	H	H	Cl	O
60	H	H	F	H	H	O
61	H	H	H	F	H	O
62	H	H	H	H	F	O
63	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	O
64	H	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	O
65	H	H	H	H	H	NH
66	H	H	Cl	H	H	NH
67	H	H	H	Cl	H	NH
68	H	H	H	H	Cl	NH
69	H	H	F	H	H	NH
70	H	H	H	F	H	NH
71	H	H	H	H	F	NH
72	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	NH
73	H	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	NH
74	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	H	NH
75	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	NH

此類化合物之構造決定，以 2-[(3-methoxybenzyl)oxy]benzoic acid (**63**) 為代表說明如下：

化合物 63 為白色棉絮狀結晶；熔點為 100.0-101.9

質譜(EIMS) (圖 63-1)：

由其分子離子峰 ( $m/z$  258,  $M^+$ ), 及元素分析結果得知此化合物分子式為  $C_{15}H_{14}O_4$ , 與預期相符。

IR 圖譜(圖 63-2)：

在  $3084\text{ cm}^{-1}$  處有不飽和碳氫( $=C-H$ )之吸收, 在  $2974, 2920\text{ cm}^{-1}$  處有飽和碳氫( $-C-H$ )之吸收, 而在  $3000\text{ cm}^{-1}$  附近的吸收峰底部一直延伸到  $2300\text{ cm}^{-1}$  附近, 這說明羥基( $-OH$ )的締合極為牢固, 這是典型的羧酸羥基的吸收峰形。另外,  $1701\text{ cm}^{-1}$  處為羧基之  $C=O$  的吸收,  $1599, 1493, 1441\text{ cm}^{-1}$  為芳香環的吸收帶, 與原料(化合物 24)比較, 多了羧酸羥基及  $C=O$  之吸收, 而  $C-N$  的吸收消失, 表示  $C-N$  已成功反應為  $-COOH$ 。

UV：在  $243.3\text{ nm}$  處有最大吸收。

$^1H$ -NMR 圖譜(圖 63-3)：

其積分值顯示此化合物有 14 個氫。初步判斷  $3.74$  ( $3H, s$ )為  $-OCH_3$  之訊號,  $5.16$  ( $2H, s$ )為  $-OCH_2-$  之訊號, 而  $12-14$  ( $1H, br$ )應為  $-COOH$  之訊號。另外, 與原料(化合物 24)比較(表 63-1), 由於其結構相近, 化學位移及訊號之形態亦相近, 故可直接將  $6.85$  ( $1H, dd, J=8.1, 2.4\text{ Hz}$ ),  $7.47$  ( $1H, ddd, J=7.9, 7.9, 1.7\text{ Hz}$ ),  $7.68$  ( $1H, dd, J=7.6, 1.7\text{ Hz}$ )分別歸屬為 H-4?, H-4 及 H-6 之訊號(Fig. 63-a)。

	化合物 24	化合物 63
$-OCH_3$	$3.75$ ( $3H, s$ )	$3.74$ ( $3H, s$ )
$-OCH_2-$	$5.24$ ( $2H, s$ )	$5.16$ ( $2H, s$ )
H-4?	$6.87-6.92$	$6.85$ ( $1H, dd, J=8.1, 2.4\text{ Hz}$ )
H-4	$7.63$ ( $1H, ddd, J= 8.0, 8.0, 1.7\text{ Hz}$ )	$7.47$ ( $1H, ddd, J=7.9, 7.9, 1.7\text{ Hz}$ )
H-6	$7.72$ ( $1H, dd, J= 7.6, 1.6\text{ Hz}$ )	$7.68$ ( $1H, dd, J=7.6, 1.7\text{ Hz}$ )

表 63-1 化合物 63 與化合物 24 質子訊號之比較

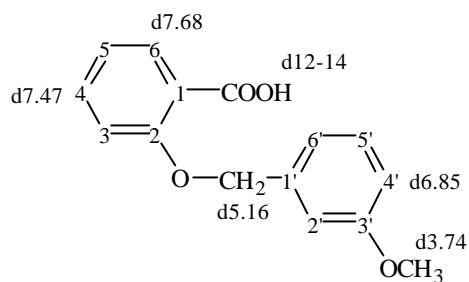


Fig. 63-a 質子訊號之歸屬

至此，可確定化合物 **63** 結構無誤，以下主要是進行其他碳氫訊號之歸屬。

由其偶合情形及氫-氫相關譜，可進一步將 6.96-7.05 (2H, *m*) 歸屬為 H-5 及 H-6 之訊號，7.28 (1H, *t*,  $J=7.9$  Hz) 歸屬為 H-5 之訊號，另外，7.14-7.18 (2H, *m*) 則為 H-3 之訊號，尚有 H-2 未定義，推測應與 H-3 在同一範圍內 (Fig. 63-b)。

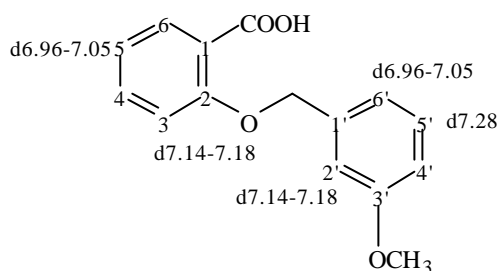


Fig. 63-b 質子訊號之歸屬

### $^{13}\text{C}$ -NMR 圖譜 (圖 63-5) :

顯示有 15 支訊號，由分子式得知有 15 個碳，推測並無重疊的碳訊號，每個訊號皆代表一個碳。初步推斷位於最低磁場的 167.73 應為  $-\text{COOH}$  之訊號。

### HMQC 圖譜 (圖 63-6a, 63-6b) :

依據碳與氫之相關性，可將碳原子訊號 (四級碳除外) 歸屬如 Fig. 63-c



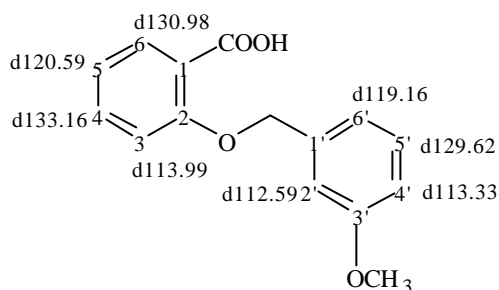


Fig. 63-c 碳訊號之歸屬

剩下四個四級碳，可由 HMBC 圖譜來做進一步的確認。

### HMBC 圖譜(圖 63-7a, 63-7b)：

由於 H-5'與 C-1', C-3'有遠程偶合關係(Fig. 63-d)，因此可將 138.90, 159.58 歸屬為 C-1'及 C-3'之訊號(Fig. 63-e)，另外，-OCH<sub>2</sub>-( 5.24)和 C-2, C-2', C-6'有 <sup>3</sup>J correlation，並且和 C-1'有 <sup>2</sup>J correlation，故可將 157.18 歸屬為 C-2'之訊號，同時將 112.59, 119.16, 138.90 分別確定為 C-2', C-6'及 C-1'之訊號，最後由於 H-3, H-5 同時與 C-1' 有遠程偶合關係，因此將 122.04 歸屬於 C-1' 之訊號。

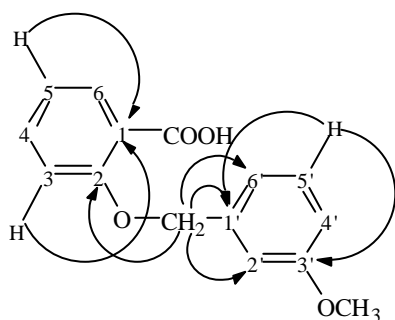


Fig. 63-d H-5', -OCH<sub>2</sub>-, H-3, H-5 與 碳原子之偶合關係。

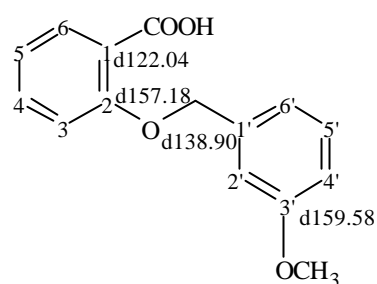


Fig. 63-e 碳訊號之歸屬

綜合上述光譜數據分析，足以判定化合物 **63** 之結構為 2-[(3-methoxybenzyl)oxy]benzoic acid。

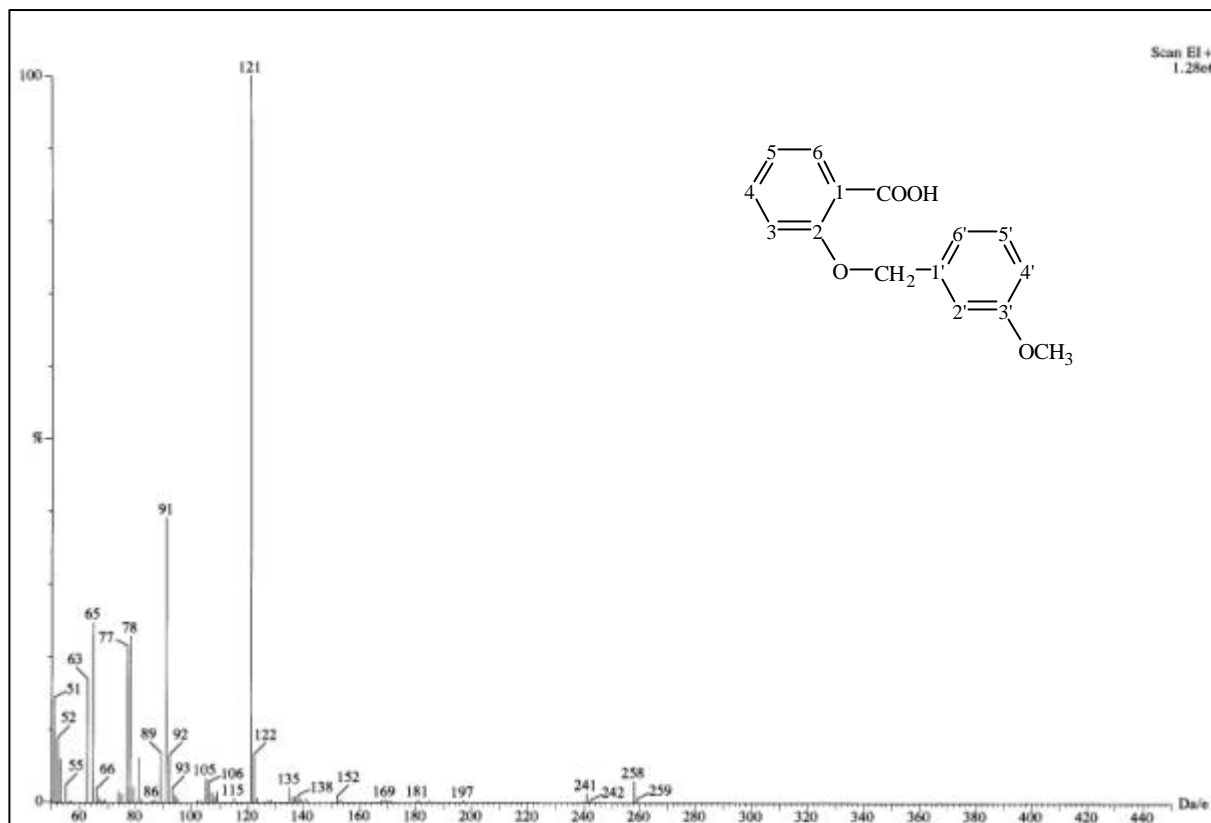


圖 63-1 MS spectrum of compound 63

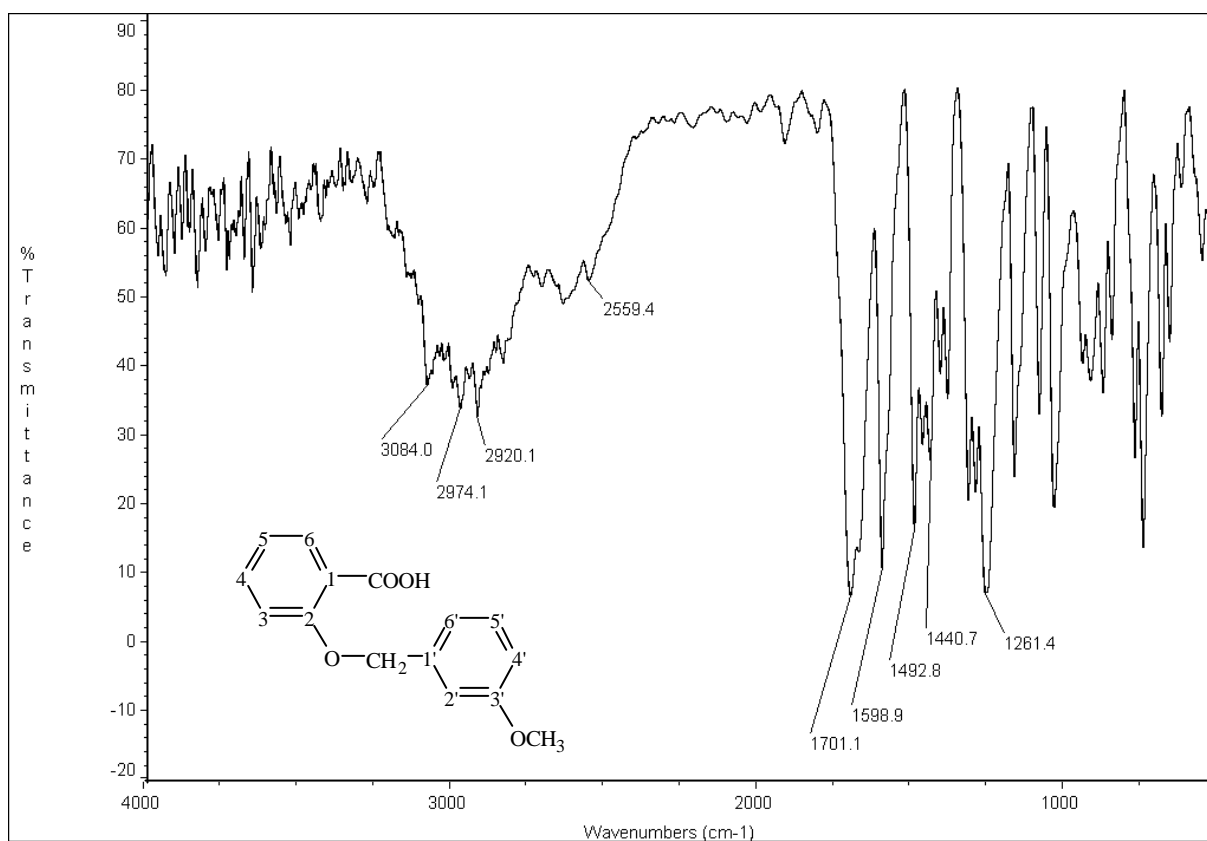


圖 63-2 IR (KBr) spectrum of compound 63

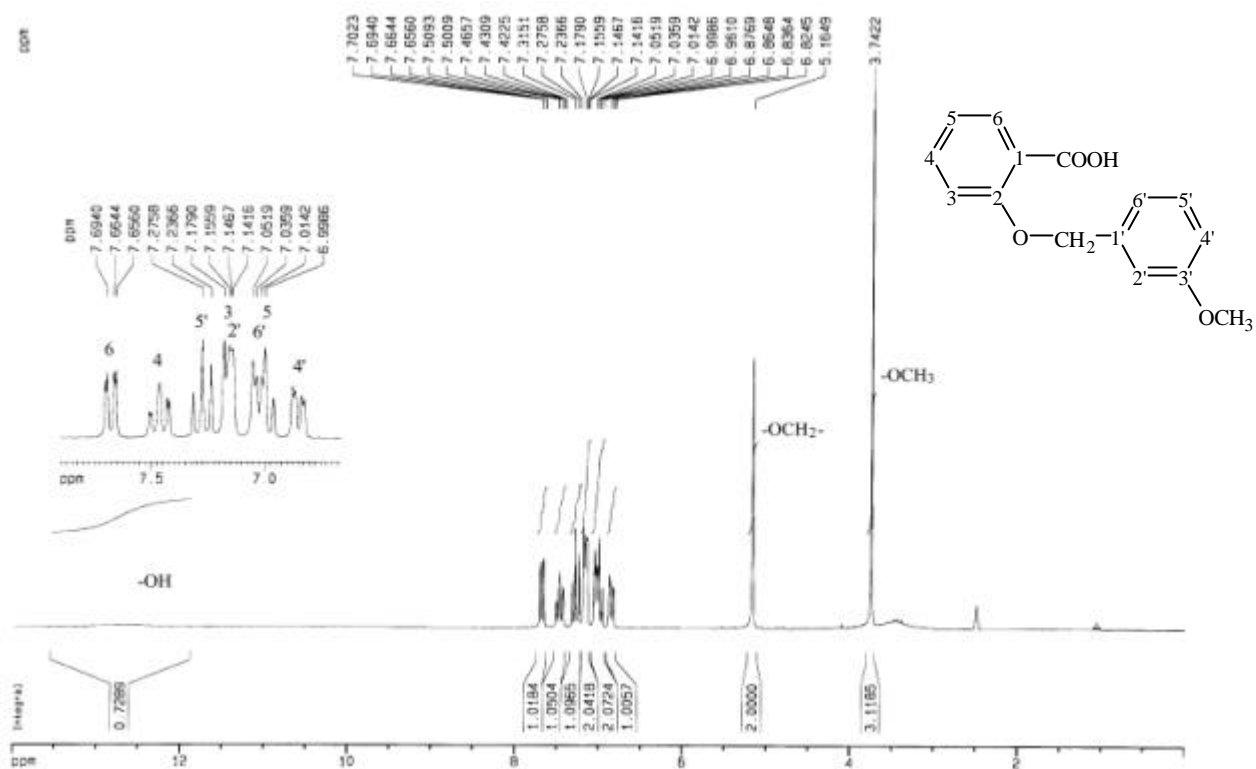


圖 63-3 <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 200 MHz) spectrum of compound **63**

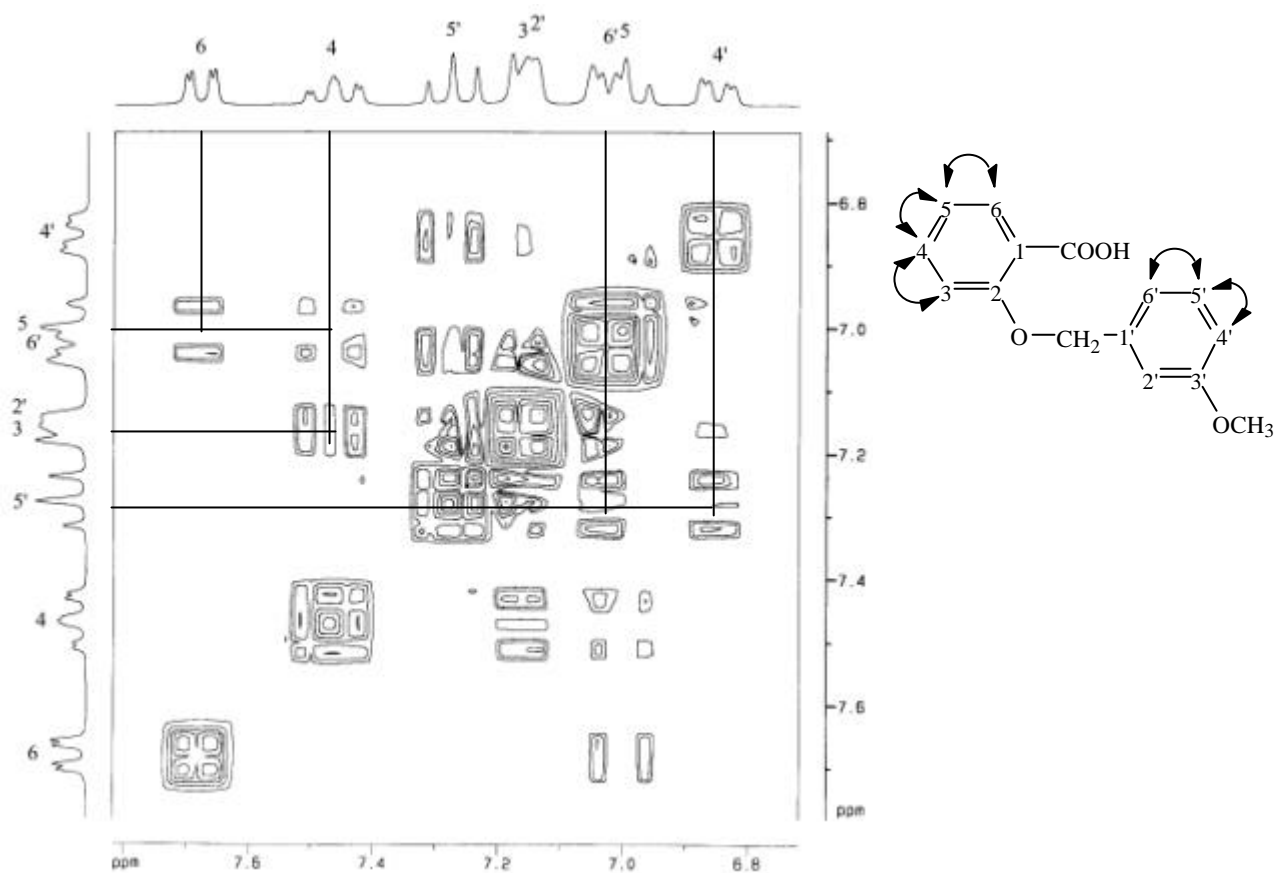


圖 63-4 <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 200 MHz) spectrum of compound **63**

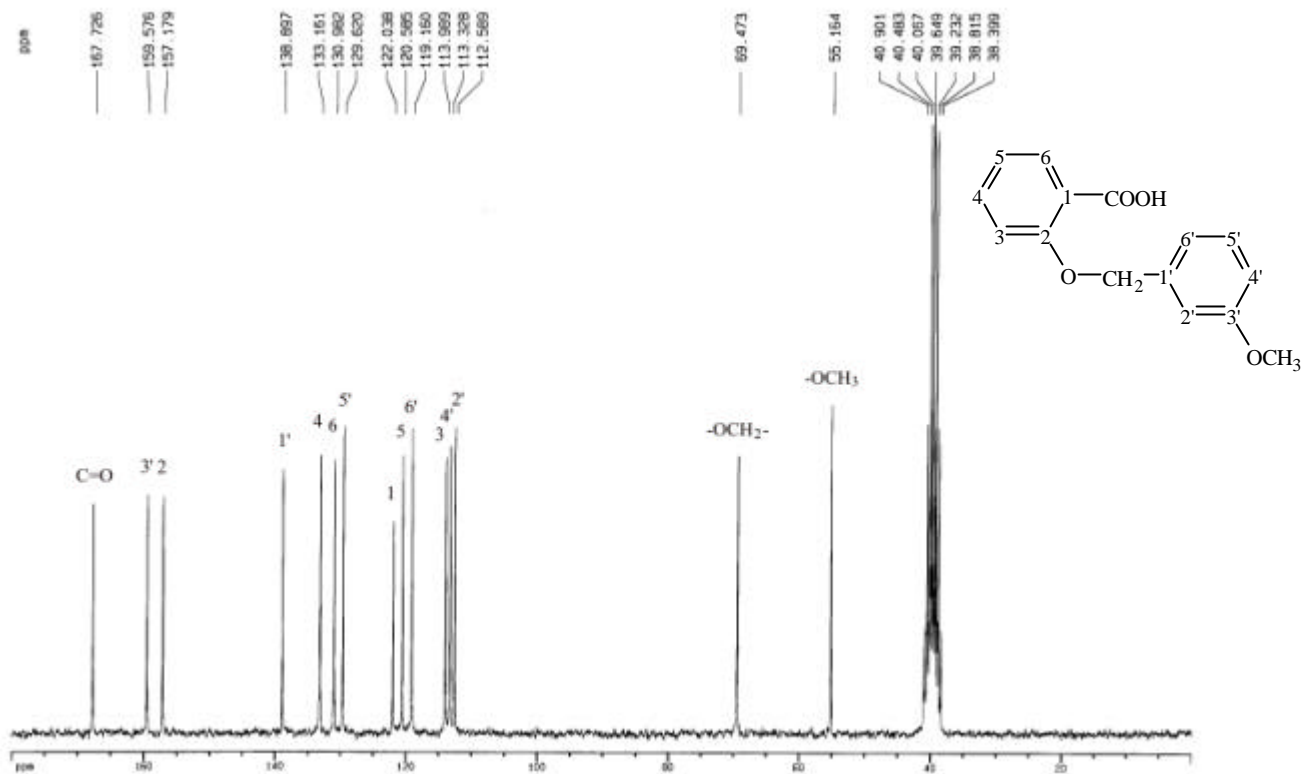


图 63-5  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 50 MHz) spectrum of compound **63**

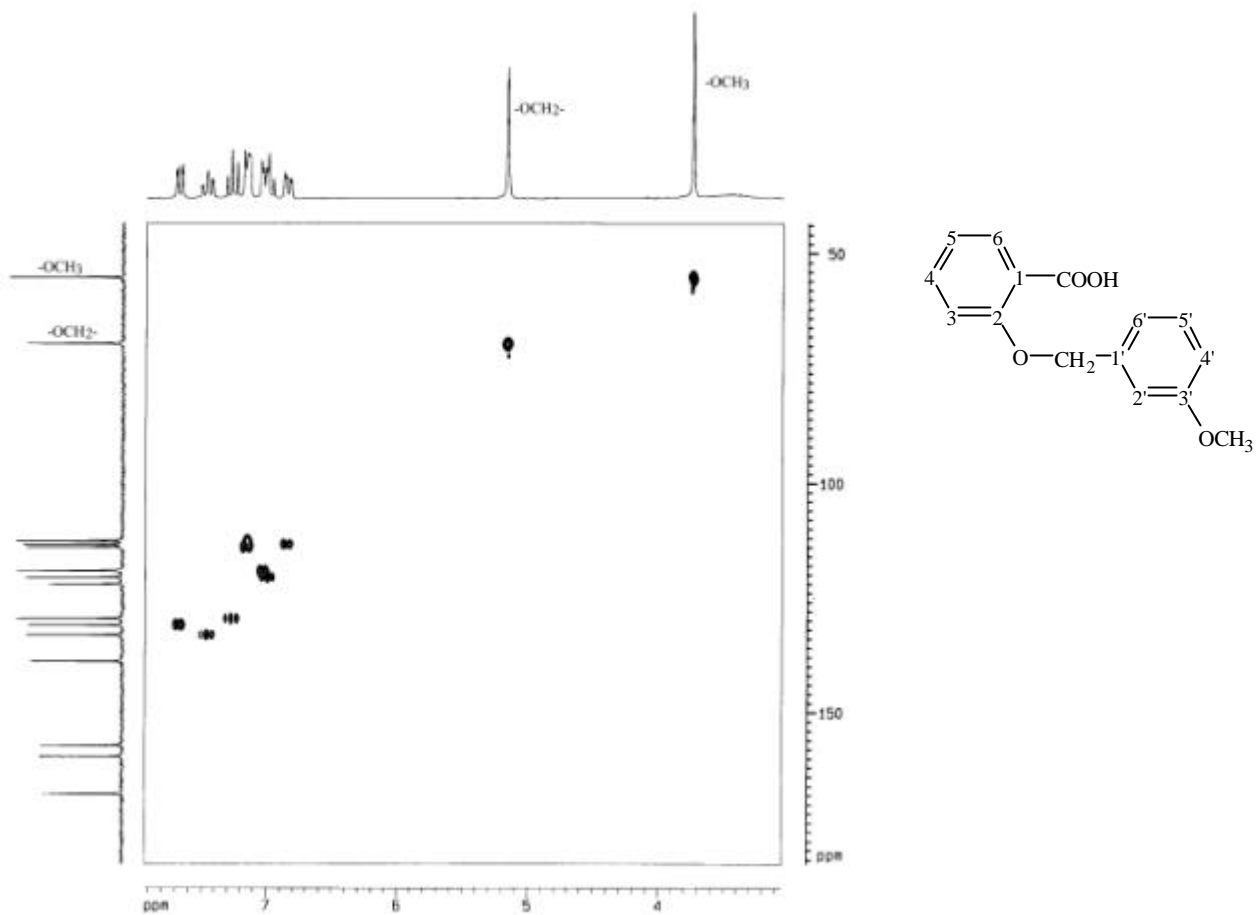


圖 63-6a HMQC (DMSO- $d_6$ ) spectrum of compound **63**

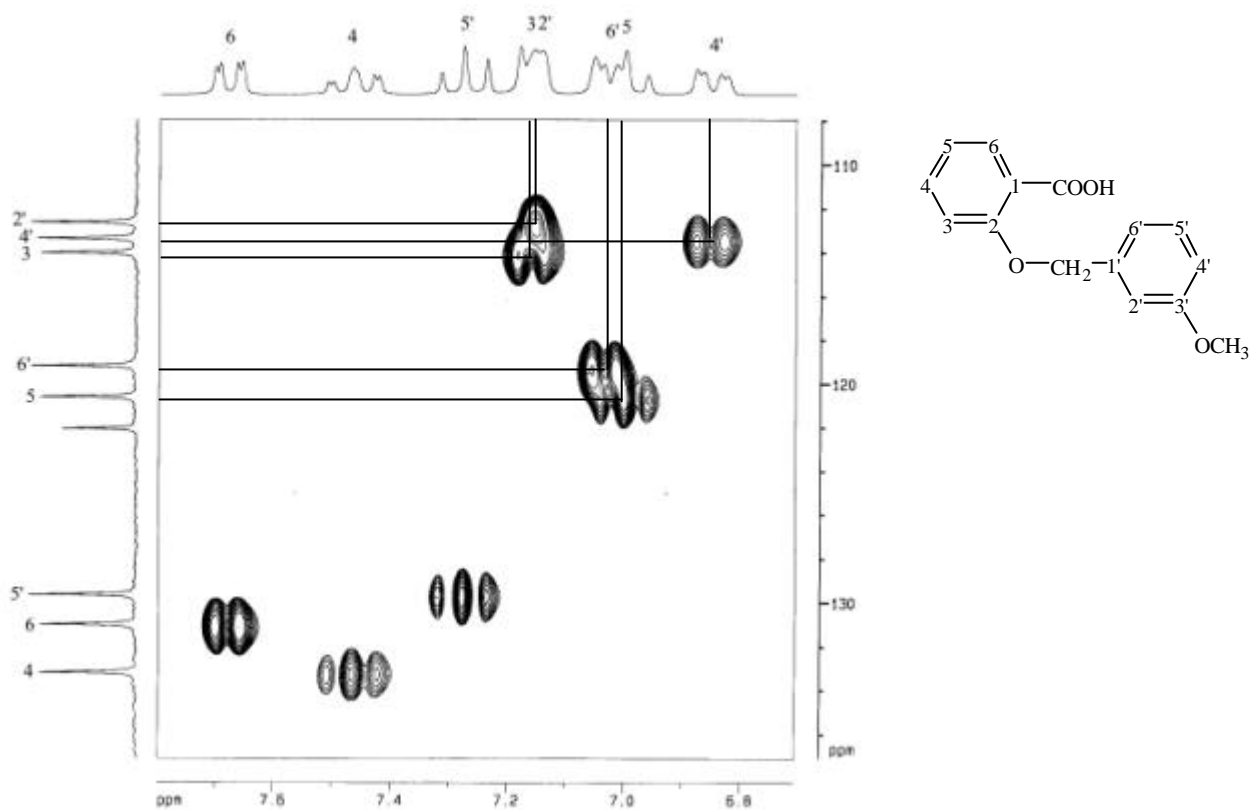


圖 63-6b HMQC (DMSO- $d_6$ ) spectrum of compound **63**

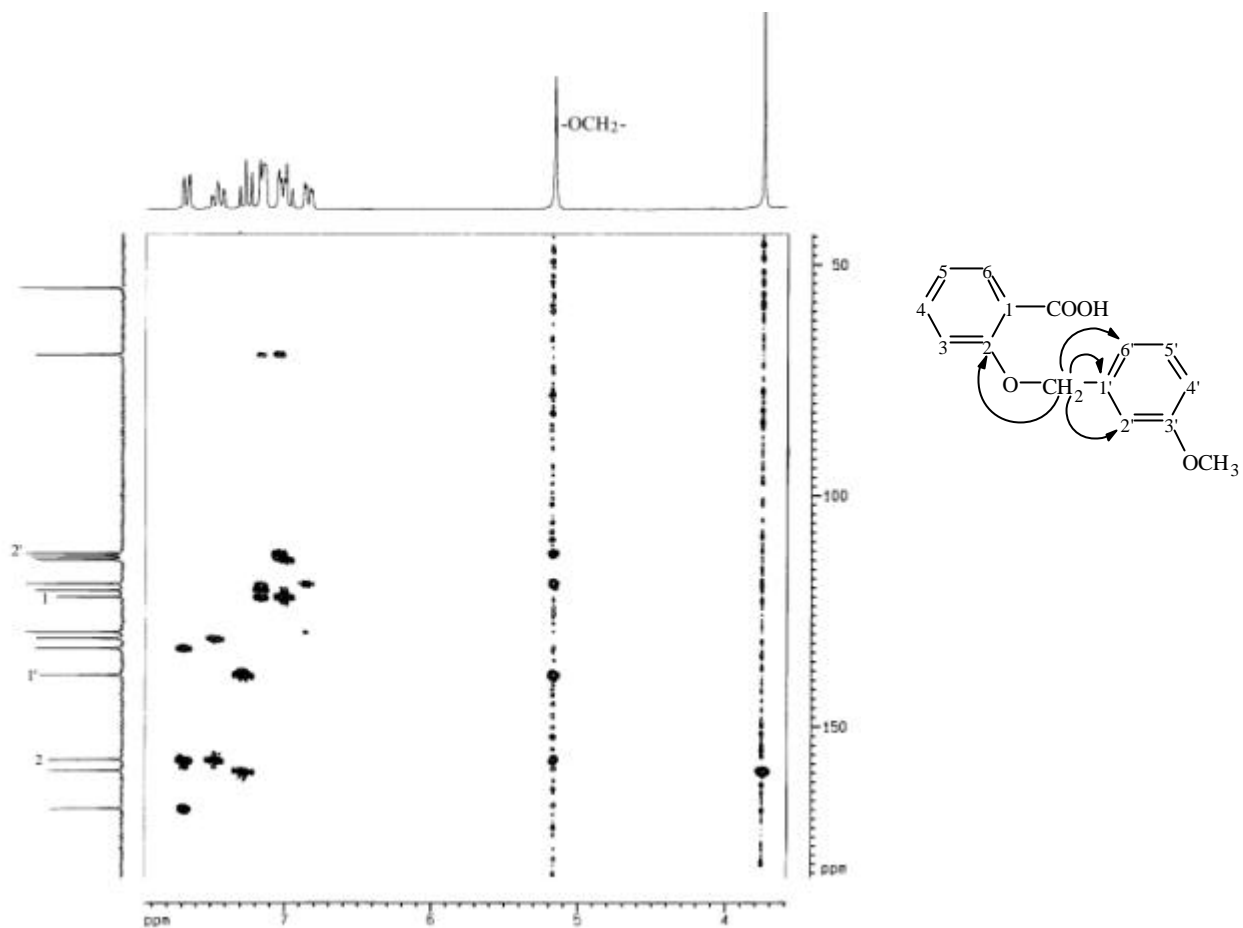


圖 63-7a HMBC (DMSO- $d_6$ ) spectrum of compound **63**

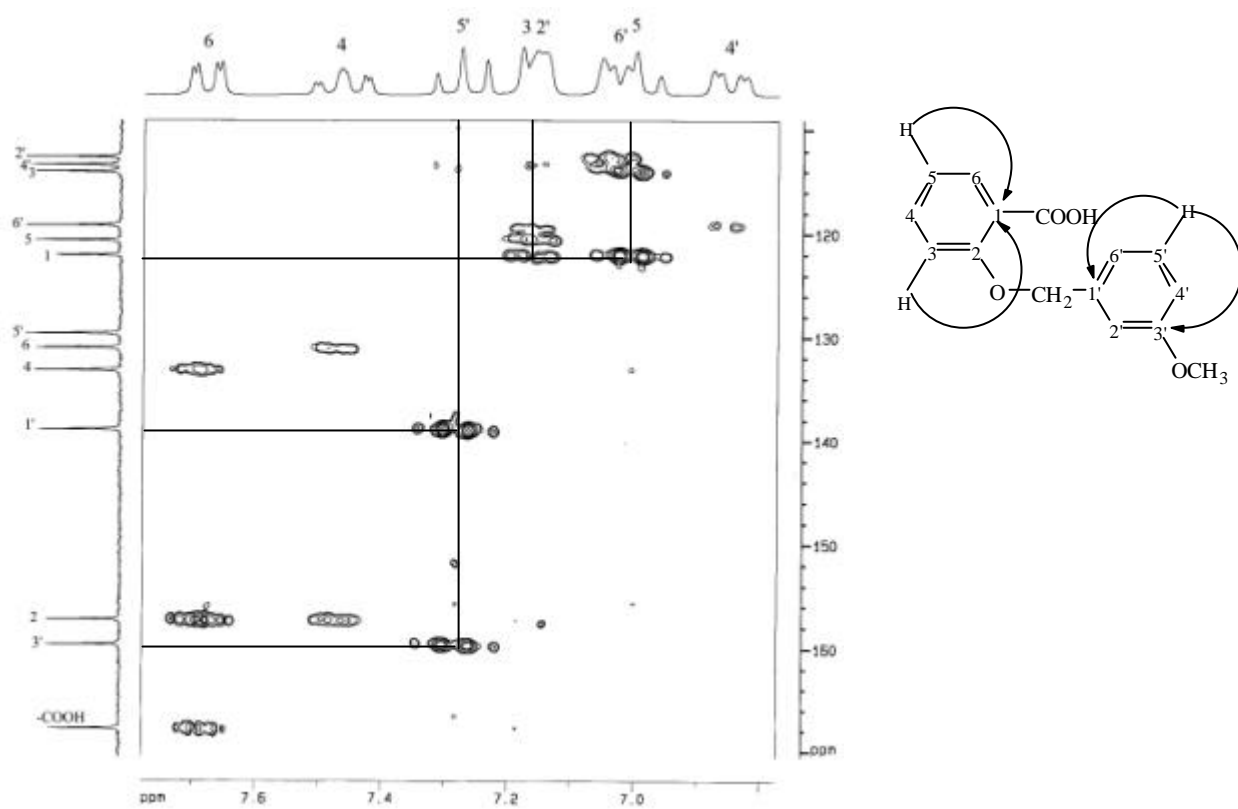


圖 63-7b HMBC (DMSO- $d_6$ ) spectrum of compound **63**

## 第二節 藥理活性試驗結果

### 壹、 抗細菌性下痢之活性

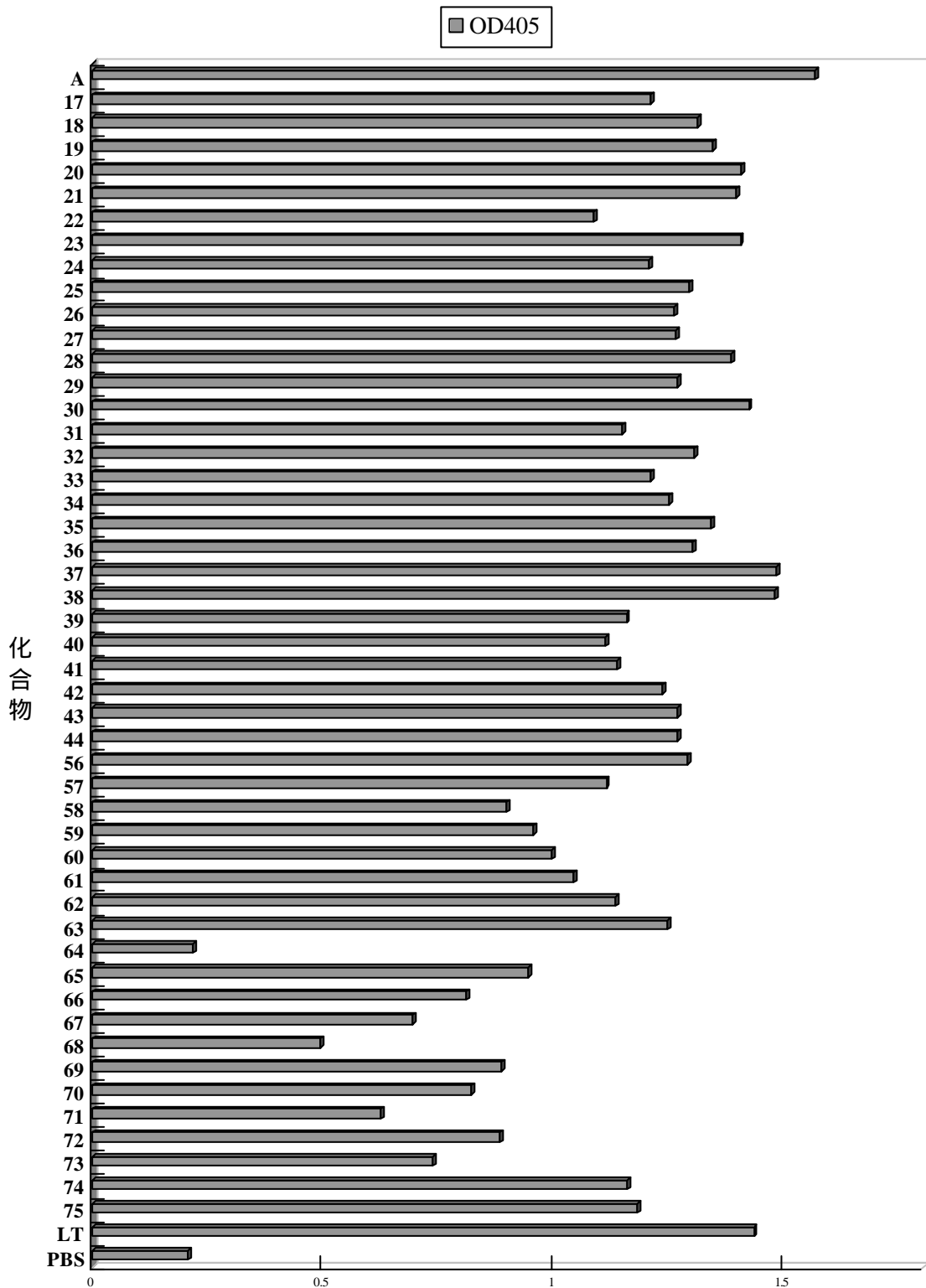
#### 壹-1. 抑制 LTB 與 GM1-receptor 結合之活性

為了瞭解對於細菌性下痢是否有抑制效果，著者將所合成之化合物 17-44, 56-75 委託本校中國醫學研究所侯庭鏞教授測試其對大腸桿菌忌熱型腸毒素 B 次單元(LTB)與 GM1-receptor 結合之抑制活性。由於 LTB 會結合腸上皮的 GM1-receptor，因此利用 competitive GM1 ELISA，測定化合物對於 LTB 與 GM1-receptor 結合的抑制程度。

結果如 Fig. 5 所示，顯示 lead compound (A)並不具抗下痢活性；而在 2.5  $\mu$ g/ml 的濃度下，本研究所合成的標的化合物中，有部分化合物具有明顯的抑制活性，進而以抑制率來表示化合物的抑制活性，結果如 Table 1 所示。

$$\text{抑制率 (\%)} = \frac{\text{LTB}_{\text{OD405}} - \text{化合物}_{\text{OD405}}}{\text{LTB}_{\text{OD405}} - \text{PBS}_{\text{OD405}}}$$

Fig. 5 以 OD405 表現化合物 17-44, 56-75 對 LTB 結合到 GM1-receptor 的抑制效果：



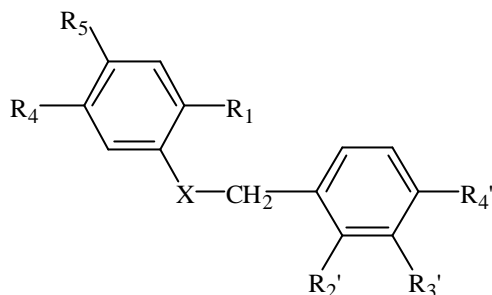
化合物濃度：2.5  $\mu$ g/ml

LTB 量：0.016  $\mu$ g/well

PBS: phosphate buffered saline 作為 mock 組。



**Table 1. Inhibition of toxin binding to GM1-coated microtiter plates by compound 17-44, 56-75 (*in vitro*)**



No.	R <sub>1</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>2</sub> '	R <sub>3</sub> '	R <sub>4</sub> '	X	OD405	Inhibition %
A	CHO	H	H	H	H	H	O	1.566	-3.5
17	C N	H	H	H	H	H	O	1.21	18.2
18	C N	H	H	Cl	H	H	O	1.31	10
19	C N	H	H	H	Cl	H	O	1.344	7.3
20	C N	H	H	H	H	Cl	O	1.406	2.2
21	C N	H	H	F	H	H	O	1.3945	3.1
22	C N	H	H	H	F	H	O	1.086	28.3
23	C N	H	H	H	H	F	O	1.404	2.4
24	C N	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	O	1.208	18.4
25	C N	H	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	O	1.2935	11.4
26	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	H	O	1.26	14.1
27	CH <sub>3</sub>	H	H	Cl	H	H	O	1.264	13.8
28	CH <sub>3</sub>	H	H	H	Cl	H	O	1.3835	4
29	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	Cl	O	1.2675	13.5
30	CH <sub>2</sub> OH	H	H	H	H	H	O	1.4225	0.9
31	CH <sub>2</sub> OH	H	H	Cl	H	H	O	1.147	23.4
32	CH <sub>2</sub> OH	H	H	H	Cl	H	O	1.306	10.4
33	CH <sub>2</sub> OH	H	H	H	H	Cl	O	1.2095	18.3
34	COOCH <sub>3</sub>	H	H	H	H	H	O	1.2505	14.9
35	COOCH <sub>3</sub>	H	H	Cl	H	H	O	1.3415	7.5
36	COOCH <sub>3</sub>	H	H	H	Cl	H	O	1.2995	10.9
37	COOCH <sub>3</sub>	H	H	H	H	Cl	O	1.484	-4.2
38	COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	H	H	H	H	O	1.4785	-3.7
39	COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	H	Cl	H	H	O	1.1575	22.5
40	COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	H	H	Cl	H	O	1.113	26.1
41	COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	H	H	H	Cl	O	1.138	24.5

No.	R <sub>1</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>2</sub> '	R <sub>3</sub> '	R <sub>4</sub> '	X	OD405	Inhibition %
42	CONH <sub>2</sub>	H	H	Cl	H	H	O	1.2345	42 16.2
43	CONH <sub>2</sub>	H	H	H	Cl	H	O	1.2695	43 13.4
44	CONH <sub>2</sub>	H	H	H	H	Cl	O	1.268	44 13.5
56	COOH	H	H	H	H	H	O	1.29	56 11.7
57	COOH	H	H	Cl	H	H	O	1.1135	57 26.1
58	COOH	H	H	H	Cl	H	O	0.897	58 43.8
59	COOH	H	H	H	H	Cl	O	0.9555	59 39
60	COOH	H	H	F	H	H	O	0.9955	60 35.7
61	COOH	H	H	H	F	H	O	1.0436	61 31.8
62	COOH	H	H	H	H	F	O	1.1325	62 24.5
63	COOH	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	O	1.245	63 15.4
64	COOH	H	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	O	0.217	64 99.3
65	COOH	H	H	H	H	H	NH	0.944	65 39.9
66	COOH	H	H	Cl	H	H	NH	0.8097	66 50.9
67	COOH	H	H	H	Cl	H	NH	0.693	67 60.4
68	COOH	H	H	H	H	Cl	NH	0.495	68 76.6
69	COOH	H	H	F	H	H	NH	0.8856	69 44.7
70	COOH	H	H	H	F	H	NH	0.8208	70 50
71	COOH	H	H	H	H	F	NH	0.6248	71 66
72	COOH	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	NH	0.882	72 45
73	COOH	H	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	NH	0.7387	73 56.7
74	COOH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	H	NH	1.1605	74 22.25
75	COOH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	NH	1.1815	75 20.54
MNPG									100
LTB								1.433	
PBS								0.2085	

MNPG: *m*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside

化合物濃度為 2.5  $\mu$ g/ml; MNPG 為 20 mM。

PBS: phosphate buffered saline 作為 mock 組。

抑制率愈高表示抑制效果愈好，若為負值則表示誘發 LTB 結合 GM1。

茲將各類化合物之抗下痢活性試驗結果分別討論如下：

### A. 2-Substituted benzyloxy benzonitriles (17-25)

由 Table 1-1 可知，nitriles 類化合物之活性並不明顯，但是 R<sub>3</sub>' 為 F 取代之化合物 22，具有較明顯之抑制活性，其抑制率為 28.3 %。

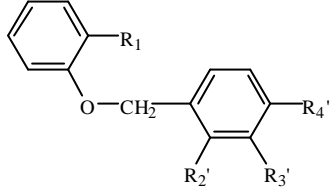
	compound	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub> '	R <sub>3</sub> '	R <sub>4</sub> '	Conc. (µg/ml)	inh. %
	<b>17</b>	C N	H	H	H	2.5	18.2
<b>18</b>	C N	Cl	H	H	2.5	10	
<b>19</b>	C N	H	Cl	H	2.5	7.3	
<b>20</b>	C N	H	H	Cl	2.5	2.2	
<b>21</b>	C N	F	H	H	2.5	3.1	
<b>22</b>	C N	H	F	H	2.5	28.3	
<b>23</b>	C N	H	H	F	2.5	2.4	
<b>24</b>	C N	H	OCH <sub>3</sub>	H	2.5	18.4	
<b>25</b>	C N	H	H	OCH <sub>3</sub>	2.5	11.4	

Table 1-1. Inhibition of toxin binding to GM1-coated microtiter plates by compound 17-25  
(*in vitro*)

### B. 2-Substituted benzyloxy methylbenzenes (26-29)

由 Table 1-2 可看出，toluenes 類化合物之活性不明顯，其中在 R<sub>3</sub>' 有氯原子取代的化合物 28 活性最低。

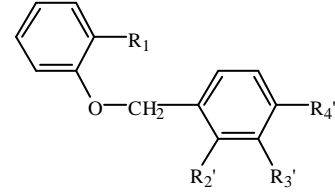
	compound	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub> '	R <sub>3</sub> '	R <sub>4</sub> '	Conc. (µg/ml)	inh. %
	<b>26</b>	CH <sub>3</sub>	H	H	H	2.5	14.1
<b>27</b>	CH <sub>3</sub>	Cl	H	H	2.5	13.8	
<b>28</b>	CH <sub>3</sub>	H	Cl	H	2.5	4	
<b>29</b>	CH <sub>3</sub>	H	H	Cl	2.5	13.5	

Table 1-2. Inhibition of toxin binding to GM1-coated microtiter plates by compound 26-29  
(*in vitro*)

### C. 2-Substituted benzyloxy phenyl methanols (**30-33**)

由 Table 1-3 可看出，alcohols 類化合物之活性均偏低，活性較明顯的為化合物 **31**。

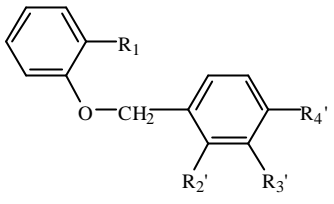
	compound	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub> '	R <sub>3</sub> '	R <sub>4</sub> '	Conc. (µg/ml)	inh. %
	<b>30</b>	CH <sub>2</sub> OH	H	H	H	H	2.5
<b>31</b>	CH <sub>2</sub> OH	Cl	H	H	H	2.5	23.4
<b>32</b>	CH <sub>2</sub> OH	H	Cl	H	H	2.5	10.4
<b>33</b>	CH <sub>2</sub> OH	H	H	H	Cl	2.5	18.3

Table 1-3. Inhibition of toxin binding to GM1-coated microtiter plates by compound **30-33**  
(*in vitro*)

### D. 2-Substituted benzyloxy benzoates (**34-41**)

由 Table 1-4 可看出，esters 類化合物之活性均偏低，大體上可明顯看出，若將 R<sub>1</sub> 上的甲酯取代置換成乙酯取代，除化合物 **38** 外，活性略為提高，如：化合物 **39-41**。

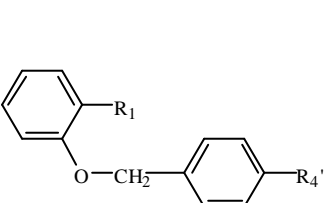
	compound	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub> '	R <sub>3</sub> '	R <sub>4</sub> '	Conc. (µg/ml)	inh. %
	<b>34</b>	COOCH <sub>3</sub>	H	H	H	H	2.5
<b>35</b>	COOCH <sub>3</sub>	Cl	H	H	H	2.5	7.5
<b>36</b>	COOCH <sub>3</sub>	H	Cl	H	H	2.5	10.9
<b>37</b>	COOCH <sub>3</sub>	H	H	Cl	H	2.5	-4.2
<b>38</b>	COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	H	H	H	2.5	-3.7
<b>39</b>	COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Cl	H	H	H	2.5	22.5
<b>40</b>	COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	Cl	H	H	2.5	26.1
<b>41</b>	COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	H	Cl	H	2.5	24.5

Table 1-4. Inhibition of toxin binding to GM1-coated microtiter plates by compound **34-41**  
(*in vitro*)

### E. 2-Substituted benzyloxy benzamides (42-44)

由 Table 1-5 可看出，amides 類化合物之活性亦不明顯，。

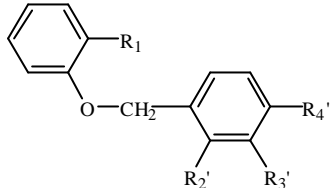
	compound	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub> '	R <sub>3</sub> '	R <sub>4</sub> '	Conc. (µg/ml)	inh. %
	<b>42</b>	CONH <sub>2</sub>	Cl	H	H	H	2.5
<b>43</b>	CONH <sub>2</sub>	H	Cl	H	H	2.5	13.4
<b>44</b>	CONH <sub>2</sub>	H	H	H	Cl	2.5	13.5

Table 1-5. Inhibition of toxin binding to GM1-coated microtiter plates by compound **42-44**  
(*in vitro*)

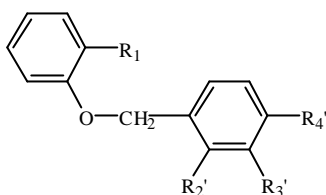
### F. 2-Substituted benzyloxy benzoic acids (56-64)

由 Table 1-6 可知，此類化合物 R<sub>1</sub> 為-COOH 取代，與上述各類化合物在其他取代均相同的條件下做比較，如：化合物 **58** 與其他類化合物在 R<sub>3</sub>' 位置上同為氯原子取代的化合物 **19, 28, 32, 36, 40, 43** 相較，可發現化合物 **58** 之抑制活性明顯提高，大致上都有兩倍以上的活性成長，由此可知，R<sub>1</sub> 上的羧酸基團對於抑制 LTB 與 GM1-receptor 結合之活性而言，是一個關鍵性的基團。

另外，化合物 **64** 展現了明顯的抑制活性，在濃度為 9.7 mM (2.5 µg/ml) 的條件下有高達 99.3 % 的抑制率，文獻<sup>1</sup>中記載 *m*-nitrophenyl-D-galactopyranoside (MNPG) 在 20 mM (6 µg/ml) 的濃度下有 100 % 的抑制率，值得討論的是，本實驗所用的濃度只有文獻值的一半，但卻能達到相當的抑制率，可以肯定的，化合物 **64** 有與 MNPG 相當，甚至高於 MNPG 的抑制活性。

Table 1-6. Inhibition of toxin binding to GM1-coated microtiter plates by compound **56-64**,

**19, 28, 32, 36, 40, 43** (*in vitro*)



compound	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub> '	R <sub>3</sub> '	R <sub>4</sub> '	Conc. (µg/ml)	inh. %
A	CHO	H	H	H	2.5	-3.5
56	COOH	H	H	H	2.5	11.7
57	COOH	Cl	H	H	2.5	26.1
58	COOH	H	Cl	H	2.5	43.8
59	COOH	H	H	Cl	2.5	39
60	COOH	F	H	H	2.5	35.7
61	COOH	H	F	H	2.5	31.8
62	COOH	H	H	F	2.5	24.5
63	COOH	H	OCH <sub>3</sub>	H	2.5	15.4
64	COOH	H	H	OCH <sub>3</sub>	2.5	99.3
19	C N	H	Cl	H	2.5	7.3
28	CH <sub>3</sub>	H	Cl	H	2.5	4
32	CH <sub>2</sub> OH	H	Cl	H	2.5	10.4
36	COOCH <sub>3</sub>	H	Cl	H	2.5	10.9
40	COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	Cl	H	2.5	26.1
43	CONH <sub>2</sub>	H	Cl	H	2.5	13.4
MNPG					6	100

#### G. 2-Substituted benzylamino benzoic acids (**65-75**)

由 Table 1-7 可知此類 benzylamino derivatives 普遍具有活性，但若在 R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> 有甲氧基取代，則活性明顯下降。

另外，當此類化合物與 2-substituted benzyloxy benzoic acid (**56-64**)類相對應的化合物做比較時(如：化合物 **65** 與化合物 **56** 比較)，可發現此類化合物更具抑制活性(但化合物 **73** 例外)，由此可知此類化合物結構中仲胺 (-NH-) 的部分對於抑制 LTB 與 GM1-receptor 結合之活性而言，亦具有相

當程度的影響力。

其次，由  $R_2$ ?,  $R_3$ ?,  $R_4$ ?位置上不同的取代情形可發現以下兩個規則：

(1)不同取代基所造成的抑制活性：



(2)不同取代位置所造成的抑制活性：

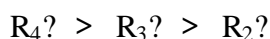
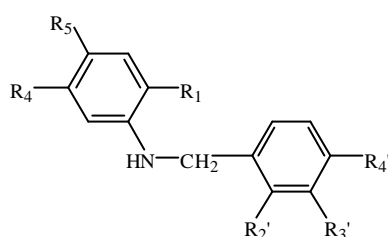


Table 1-7. Inhibition of toxin binding to GM1-coated microtiter plates by compound **65-75**,

(*in vitro*)



compound	$R_1$	$R_4$	$R_5$	$R_2'$	$R_3'$	$R_4'$	Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	inh. %
A	CHO	H	H	H	H	H	2.5	-3.5
65	COOH	H	H	H	H	H	2.5	39.9
66	COOH	H	H	Cl	H	H	2.5	50.9
67	COOH	H	H	H	Cl	H	2.5	60.4
68	COOH	H	H	H	H	Cl	2.5	76.6
69	COOH	H	H	F	H	H	2.5	44.7
70	COOH	H	H	H	F	H	2.5	50
71	COOH	H	H	H	H	F	2.5	66
72	COOH	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	2.5	45
73	COOH	H	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	2.5	56.7
74	COOH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	H	2.5	22.3
75	COOH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	2.5	20.5

綜合上述，可歸納出以下幾個要點：

1. lead compound (A)不具抗下痢活性。
2.  $R_1$ 上的羧基取代是一個增強活性的官能基。
3. 針對化合物 **64** 而言，若將其苯環上對位取代的甲氧基改為間位取代，或置換為其他原子取代(氟原子或氯原子)，則活明顯降低，這說明此結

構在苯環上有對位甲氧基取代的重要性。

4. 結構中有羧基取代，若再配合上仲胺(-NH-)的結構，會形成普遍具有活性的化合物，如：化合物 65-73，但無法形成最具活性的化合物，也就是說當 R<sub>1</sub> 具有-COOH 取代，而 R<sub>4</sub> 為-OCH<sub>3</sub> 時，若再以-NH- 將-O- 取代，並不會再提升其活性，如：化合物 73 活性小於化合物 64。
5. 可將化合物 64 作為一個 core structure，並進一步合成對於抑制 LTB 與 GM1-receptor 結合更具活性的化合物。

## 壹-2. 大腸桿菌忌熱性腸毒素誘發腸液堆積之抑制活性

經由抗下痢活性快速篩選平台 GM1-ELISA，挑選出具有較高抗下痢活性的化合物 64 及化合物 68，再進一步進到動物試驗，測試化合物在動物體內是否依然具有活性，此部分實驗尚在進行中，無法提供參考數據。