

國立台東大學生命科學研究所

碩士論文

指導教授：郭曜豪 教授

桃實百日青化學成分及
其生物活性之研究

Studies on the Chemical Constituents and Biological
Activities of *Podocarpus nakaii*

研究生：范龍雲 撰

中華民國九十五年六月

國立台東大學
學位論文考試委員審定書
系所別：生 科 所

本班	<u>范龍雲</u>	君
所提之論文	<u>桃實百日青化学成分及其生物活性</u>	
業經本委員會通過合於	☒ 碩士學位論文 ☐ 博士學位論文	條件
論文學位考試委員會：	<u>沈雅敬</u> (學位考試委員會主席)	
	<u>廖尉岑</u>	
	<u>郭曜豪</u> (指導教授)	
論文學位考試日期：	<u>95</u> 年 <u>6</u> 月 <u>26</u> 日	
國立台東大學		

附註：1. 本表一式二份經學位考試委員會簽後，送交系所辦公室及註冊組或進修部存查。

2. 本表為日夜學制通用，請依個人學制分送教務處或進修部辦理。

博碩士論文授權書

本授權書所授權之論文為本人在 國立臺東大學 生命科學 系(所)

組 95 學年度第 二 學期取得 碩 士學位之論文。

論文名稱：桃實百日青化學成分及其生物活性之研究

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予下列單位：

同意	不同意	單 位
☐	☒	國家圖書館
☐	☒	本人畢業學校圖書館

得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或其他各種數位化方式重製後散布發行或上載網站，藉由網路傳輸，提供讀者基於個人非營利性質之線上檢索、閱覽、下載或列印。

本論文為本人向經濟部智慧財產局申請專利(未申請者本條款請不予理會)的附件之一，申請文號為：_____，請將全文資料延後半年再公開。

公開時程

立即公開	一年後公開	二年後公開	三年後公開
☐	☐	☐	☐

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。上述同意與不同意之欄位若未鈎選，本人同意視同授權。

指導教授姓名：郭曜豪 (親筆簽名)

研究生簽名：范龍雲 (親筆正楷)

學 號：9300806 (務必填寫)

日 期：中華民國 95 年 7 月 28 日

1. 本授權書 (得自 <http://www.lib.nttu.edu.tw/theses/> 下載) 請以黑筆填寫並影印裝訂於書名頁之次頁。

2. 依據 91 學年度第一學期一次教務會議決議：研究生畢業論文「至少需授權學校圖書館數位化，並至遲於三年後上載網路供各界使用及校內瀏覽。」

致謝

時光飛逝，轉眼間又過了二個年頭，也即將完成碩士階段的歷練。首先由衷感謝恩師郭曜豪教授，對於學生在天然物研究上的啟發和教誨，更感謝老師提供舒適的實驗和生活環境，讓學生無後顧之憂在研究方面，學生在此至上最誠摯的敬意與感激。

此外，感謝口試委員國立中山大學洋海資源系沈雅敬教授與國立台東大學生命科學所廖尉岑博士對此論文細心審查，並提供寶貴的建議，使本論文更加完善。在實驗方面，感謝國立中國醫藥研究所楊麗明老師在生物活性檢測上的指導及幫助，以及感謝行政院農委會特有生物保育中心黃士元博士，提供本論文材料的寶貴資訊。最後感謝台東大學生科所彭仁君所長，對學生在外校做實驗的時間，給予最大的方便與照顧。

在研究期間特別感謝國立中國醫藥研究所提供良好的環境及實驗器材，使本實驗進行的如此順利。另外也要感謝學長姐和實驗室夥伴在各方面的指導及照顧，包含：家成、肇麟、麗杰、慧琪、雅雯、祐任、家慶、力川、萍君、羽涵、逸辰及其他學弟妹。另外感謝台東大學惠嵐、尚澄、宏彥、玉珊、玟伶等及在台北這段時間收留過我的大鈞和銘偉，當然還有 341 的兄弟們。

最後，感謝在背後永遠支持我的母親、哥哥及一路陪我走來的銓佩，和許多親戚朋友的鼓勵。這本論文沒有你們是完成不了的，再一次的由衷的感謝你們。還有要告訴老爸您擔心上不了成功嶺的弟弟研究所畢業了。

桃實百日青化學成分及生物活性之研究

范龍雲

國立台東大學生命科學研究所

中文摘要

桃實百日青(*Podocarpus nakaii* Hayata)屬於羅漢松科羅漢松屬的植物。進行一系列生物活性試驗篩選時，發現桃實百日青乙醇粗萃物對於人類口腔上皮癌細胞(KB)及子宮頸癌細胞(Hela)具有細胞毒殺作用，因此進行桃實百日青的莖皮部有效成分分離，從氯仿層中總共分得十四個化合物，其中包含二個二萜類化合物，分別為 lambertic acid (1) 和 4 β -carboxy-17-hydroxy-19-nortotarol (2)；二個 norditerpenes 類化合物，分別為 inumakilactones B (3)和 podolactone E (4)；四個苯環類化合物為 isovanillin (6)、4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde (7)、vanillin acid (8)、4-ethoxy-3-hydroxybenzoic acid (9)；二個固醇類化合物，分別為 β -sitosterol (10) 和 β -stirosteryl glucoside (11)；二個 chalcone 類化合物 4,4'-dihydroxychalcone (12)、podonakachalcone A (13)，以及 vomifoliol (5)和一個苯丙基類化合物 14。其中化合物 13 為新化合物。

在生物活性方面，化合物 3 和 4 具有相當的細胞毒殺效果，化合物 1、7、10、12、13 和 14 亦有微弱的細胞毒殺作用。在針對第一型拓撲異構酶(DNA Topoisomerase I)的抑制方面，發現化合物 2 和 12 有輕微的抑制效果。另外再進行抗氧化清除(DPPH)試驗，化合物 7、8、9 和 13 在濃度 200 μ g/ml 時對於 DPPH 都有達到 80%以上的有效清除率。

關鍵詞：桃實百日青、細胞毒殺、第一型拓撲異構酶、抗氧化

Studies on the chemical constituents and bioactivities of *Podocarpus nakaii*

Lung-Yun Fan

As a continuing search for bioactive agents from Taiwanese plants , we found that the EtOH extracts of *Podocarpus nakaii* Hayata showed the cytotoxicity against several human tumor cells *in vitro*. Using bioassay-directed fractionation from the chloroform layer of crude EtOH extracts, fourteen compounds including two diterpenes, lambertic acid (**1**) 4 β -carboxy-17-hydroxy-19-nortotarol (**2**), two norditerpene inumakilactones B (**3**), podolacton E (**4**), four benzenoid, isovanillin (**6**) 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde (**7**), vanillin acid (**8**), 4-ethoxy-3-hydroxybenzoic acid (**9**), two steroid, β -sitosterol (**10**) β -stiosteryl glucoside (**11**), two chalcone, 4,4'-dihydroxychalcone (**12**), podonaka A (**13**), as well as vomifoliol (**5**), and one phenylpranoid, compound **14**, were isolated. The structures of isolated compounds were elucidated by spectral analysis. Among them , compounds **13** were isolated for the first time from natural source .

Biological evaluation revealed that compounds **3** and **4** have strong cytotoxic effects, and compounds **1**, **7**, **10**, **12**, **13** and **14** have moderate cytotoxic effects, against Daoy, WiDr, KB and Hela tumor cells. Furthermore, compounds **2** and **12** were demonstrated to have the inhibitory effect against DNA topoisomerase I . Moreover, **7**, **8**, **9** and **13** have strong antioxidative effects assayed by DPPH.

Keyword: *Podocarpus nakaii*, cytotoxic, Topoisomerase I , DPPH .

目錄

	頁次
中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
目錄.....	III
圖表目錄.....	V
縮寫表.....	X
第一章 緒論.....	1
第一節 前言.....	1
第二節 研究目的.....	6
第三節 桃實百日青植物介紹.....	7
第二章 材料與方法.....	35
第一節 實驗儀器與藥品.....	35
第二節 桃實百日青化學成分之萃取與分離.....	37
第三章 結果與討論.....	40
第一節 結構解析.....	40
1-1 Lambertic acid (1)之結構解析.....	43
1-2 4 β -Carboxy-19-nortotarol (2)之結構解析.....	50
1-3 Inumakilactones B (3)之結構解析.....	57
1-4 Podolactone E (4)之結構解析.....	64
1-5 Vomifoliol (5)之結構解析.....	68
1-6 Isovanillin (6)之結構解析.....	74
1-7 4-Hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde (7)之結構解析.....	78

1-8	Vanillic acid (8)之結構解析.....	84
1-9	4-Ethoxy-3-hydroxybenzoic acid (9)之結構解析.....	88
1-10	β -Sitosterol (10)之結構解析.....	92
1-11	β -Stiosteryl glucoside (11)之結構解析.....	96
1-12	4,4'-Dihydroxychalcone (12)之結構解析.....	100
1-13	podonakachalcone A (13)之結構解析.....	106
1-14	化合物 14 之結構解析.....	113
第四章 生物活性試驗.....		120
第一節	癌細胞毒殺分析實驗.....	120
第二節	抑制 Topoisomerase I 催化活性試驗.....	123
第三節	細胞凋亡(Apoptosis)活性試驗.....	126
第四節	清除 DPPH 自由基能力之測定.....	129
第五章 結果.....		132
第六章 參考文獻.....		135

圖表目錄

圖之目錄	頁次
圖一、桃實百日青植物外觀及其果實.....	8
圖二、羅漢松(<i>Podocarpus</i>)屬植物化合物之化學結構.....	16
圖三、桃實百日青(<i>Podocarpus nakaii</i>)分離流程.....	39
圖 1-1. Lambertic acid (1)之 ^1H -NMR 圖譜.....	46
圖 1-2. Lambertic acid (1)之 ^{13}C -NMR 圖譜.....	46
圖 1-3. Lambertic acid (1)之 HMQC 圖譜.....	47
圖 1-4. Lambertic acid (1)之 HMBC 圖譜.....	47
圖 1-5. Lambertic acid (1)之 COSY 圖譜.....	48
圖 1-6. Lambertic acid (1)之 EI-MS 圖譜.....	48
圖 1-7. Lambertic acid (1)之 IR 圖譜.....	49
圖 2-1. 4 β -Carboxy-19-nortotarol (2)之 ^1H -NMR 圖譜.....	53
圖 2-2. 4 β -Carboxy-19-nortotarol (2)之 ^{13}C -NMR 圖譜.....	53
圖 2-3. 4 β -Carboxy-19-nortotarol (2)之 HMQC 圖譜.....	54
圖 2-4. 4 β -Carboxy-19-nortotarol (2)之 HMBC 圖譜.....	54
圖 2-5. 4 β -Carboxy-19-nortotarol (2)之 COSY 圖譜.....	55
圖 2-6. 4 β -Carboxy-19-nortotarol (2)之 EI-MS 圖譜.....	55
圖 2-7. 4 β -Carboxy-19-nortotarol (2)之 IR 圖譜.....	56
圖 3-1. Inumakilactones B (3)之 ^1H -NMR 圖譜.....	60
圖 3-2. Inumakilactones B (3)之 ^{13}C -NMR 圖譜.....	60
圖 3-3. Inumakilactones B (3)之 DEPT 圖譜.....	61
圖 3-4. Inumakilactones B (3)之 HMQC 圖譜.....	61
圖 3-5. Inumakilactones B (3)之 HMBC 圖譜.....	62
圖 3-6. Inumakilactones B (3)之 COSY 圖譜.....	62
圖 3-7. Inumakilactones B (3)之 ESI-MS 圖譜.....	63

圖 3-8. Inumakilactones B (3)之 IR 圖譜.....	63
圖 4-1. Podolactone E (4)之 ^1H -NMR 圖譜.....	66
圖 4-2. Podolactone E (4)之 ^{13}C -NMR 圖譜.....	66
圖 4-3. Podolactone E (4)之 ^{13}C -NMR 圖譜.....	67
圖 4-4. Podolactone E (4)之 IR 圖譜.....	67
圖 5-1. Vomifoliol (5)之 ^1H -NMR 圖譜.....	70
圖 5-2. Vomifoliol (5)之 ^{13}C -NMR 圖譜.....	70
圖 5-3. Vomifoliol (5)之 DEPT 圖譜.....	71
圖 5-4. Vomifoliol (5)之 HMQC 圖譜.....	71
圖 5-5. Vomifoliol (5)之 HMBC 圖譜.....	72
圖 5-6. Vomifoliol (5)之 COSY 圖譜.....	72
圖 5-7. Vomifoliol (5)之 ESI-MS 圖譜.....	73
圖 5-8. Vomifoliol (5)之 IR 圖譜.....	73
圖 6-1. Isovanillin (6)之 ^1H -NMR 圖譜.....	76
圖 6-2. Isovanillin (6)之 ^{13}C -NMR 圖譜.....	76
圖 6-3. Isovanillin (6)之 EI-MS 圖譜.....	77
圖 6-4. Isovanillin (6)之 IR 圖譜.....	77
圖 7-1. 4-Hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde (7)之 ^1H -NMR 圖譜.....	80
圖 7-2. 4-Hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde (7)之 ^{13}C -NMR 圖譜.....	80
圖 7-3. 4-Hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde (7)之 HMQC 圖譜.....	81
圖 7-4. 4-Hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde (7)之 HMBC 圖譜.....	81
圖 7-5. 4-Hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde (7)之 COSY 圖譜.....	82
圖 7-6. 4-Hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde (7)之 EI-MS 圖譜.....	82
圖 7-7. 4-Hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde (7)之 IR 圖譜.....	83
圖 8-1. Vanillic acid (8)之 ^1H -NMR 圖譜.....	86
圖 8-2. Vanillic acid (8)之 ^{13}C -NMR 圖譜.....	86

圖 8-2. Vanillic acid (8)之 EI-MS 圖譜.....	87
圖 8-2. Vanillic acid (8)之 IR 圖譜.....	87
圖 9-1. 4-Ethoxy-3-hydroxybenzoic acid (9)之 ^1H -NMR 圖譜.....	90
圖 9-2. 4-Ethoxy-3-hydroxybenzoic acid (9)之 ^{13}C -NMR 圖譜.....	90
圖 9-3. 4-Ethoxy-3-hydroxybenzoic acid (9)之 EI-MS 圖譜.....	91
圖 9-4. 4-Ethoxy-3-hydroxybenzoic acid (9)之 IR 圖譜.....	91
圖 10-1. β -Sitosterol (10)之 ^1H -NMR 圖譜.....	94
圖 10-2. β -Sitosterol (10)之 ^{13}C -NMR 圖譜.....	94
圖 10-3. β -Sitosterol (10)之 EI-MS 圖譜.....	95
圖 10-4. β -Sitosterol (10)之 IR 圖譜.....	95
圖 11-1. β -Stiosteryl glucoside (11)之 ^1H -NMR 圖譜.....	98
圖 11-2. β -Stiosteryl glucoside (11)之 ^{13}C -NMR 圖譜.....	98
圖 11-3. β -Stiosteryl glucoside (11)之 ESI-MS 圖譜.....	99
圖 11-4. β -Stiosteryl glucoside (11)之 IR 圖譜.....	99
圖 12-1. 4,4'-Dihydroxychalcone (12)之 ^1H -NMR 圖譜.....	102
圖 12-2. 4,4'-Dihydroxychalcone (12)之 ^{13}C -NMR 圖譜.....	102
圖 12-3. 4,4'-Dihydroxychalcone (12)之 DEPT 圖譜.....	103
圖 12-4. 4,4'-Dihydroxychalcone (12)之 HMQC 圖譜.....	103
圖 12-5. 4,4'-Dihydroxychalcone (12)之 HNBC 圖譜.....	104
圖 12-6. 4,4'-Dihydroxychalcone (12)之 COSY 圖譜.....	104
圖 12-7. 4,4'-Dihydroxychalcone (12)之 EI-MS 圖譜.....	105
圖 12-8. 4,4'-Dihydroxychalcone (12)之 IR 圖譜.....	105
圖 13-1. podonakachalcone A (13)之 ^1H -NMR 圖譜.....	109
圖 13-2. podonakachalcone A (13)之 ^{13}C -NMR 圖譜.....	109
圖 13-3. podonakachalcone A (13)之 DEPT 圖譜.....	110
圖 13-4. podonakachalcone A (13)之 HMQC 圖譜.....	110

圖 13-5. podonakachalcone A (13)之 HMBC 圖譜.....	111
圖 13-6. podonakachalcone A (13)之 COSY 圖譜.....	111
圖 13-7. podonakachalcone A (13)之 EI-MS 圖譜.....	112
圖 13-8. podonakachalcone A (13)之 IR 圖譜.....	112
圖 14-1. 化合物 14 之 ^1H -NMR 圖譜.....	116
圖 14-2. 化合物 14 之 ^{13}C -NMR 圖譜.....	116
圖 14-3. 化合物 14 之 HMQC 圖譜.....	117
圖 14-4. 化合物 14 之 HMBC 圖譜.....	117
圖 14-5. 化合物 14 之 COSY 圖譜.....	118
圖 14-6. 化合物 14 之 ESI-MS 圖譜.....	118
圖 14-7. 化合物 14 之 IR 圖譜.....	119
圖四、化合物 1、2、3、4、12 和 13 對於 topoisomerase I 的試驗電泳 圖.....	125
圖五、CPT 與化合物 1、2、3、4、12、13 對於 topoisomerase I 的抑 制百分率.....	125
圖六、ELISA-Enzyme-linked immunosorbent assay.....	128
圖七、1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl,DPPH 之化學結構式.....	129

表之目錄	頁次
表一、羅漢松(<i>Podocarpus</i>)屬植物化合物之化學研究.....	9
表 3-1 化合物(1) 之核磁共振圖譜數據整理.....	45
表 3-2 化合物(2) 之核磁共振圖譜數據整理.....	52
表 3-3 化合物(3) 之核磁共振圖譜數據整理.....	59
表 3-4 化合物(4) 之核磁共振圖譜數據整理.....	65
表 3-5 化合物(5) 之核磁共振圖譜數據整理.....	69
表 3-6 化合物(6) 之核磁共振圖譜數據整理.....	75
表 3-7 化合物(7)之核磁共振圖譜數據整理.....	79
表 3-8 化合物(8)之核磁共振圖譜數據整理.....	85
表 3-9 化合物(9)之核磁共振圖譜數據整理.....	89
表 3-10 化合物(10)之核磁共振圖譜數據整理.....	93
表 3-11 化合物(11)之核磁共振圖譜數據整理.....	97
表 3-12 化合物(12)之核磁共振圖譜數據整理.....	101
表 3-13 化合物(13)之核磁共振圖譜數據整理.....	108
表 3-14 化合物(14)之核磁共振圖譜數據整理.....	115
表二、Cytotoxicity data of compounds 1-14	122
表三、化合物 1-14 清除 DPPH 自由基能力之測定.....	131
表四、化合物 7、8、9 和 13 與抗氧化劑 Vitamin E 比較表.....	131

縮寫表

δ	Chemical shift (ppm)
COSY	Correlated spectroscopy
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EI-MS	Electron impact mass spectrum
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ESIMS	Electrospray ionization mass spectrum
FABMS	Fast atom bombardment mass spectrum
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	Heteronuclear multiple quantum coherence
HPLC	High performance liquid chromatography
Hz	Hertz
IR	Infrared
MS	Mass spectrum
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
NMR	Nuclear magnetic resonance
NOESY	Nuclear overhauser and exchange spectroscopy
PBS	Phosphate-buffered saline
PI	Propidium iodide
UV	Ultraviolet

第一章 緒論

第一節 前言

隨著時代的進步，為人類帶來了科技及生活上的便利，但隨著飲食及生活環境的改變，現今的文明病也越來越多，根據 2005 年衛生署公佈的十大死因中，癌症及老化疾病就佔了八成。其中癌症更是近二十多年來蟬聯十大死因的榜首。但高療效、副作用小及不產生交叉耐藥性的抗癌藥物仍然不多，而且目前的藥物在臨床上要達到根治的目標都還相差甚遠，所以從天然物去尋找新穎、有效和副作用小的新藥則仍是當務之急。

台灣位於北回歸線上，其地理位置涵蓋熱帶及亞熱帶，加上島中高山林立，蘊育了熱、暖、溫、寒等各帶的生態體系，加上台灣四面環海，並成為冰河時期植物的避難所，雖然台灣陸地面積不大，卻擁有極為豐富的植物種類。根據台灣植物誌第二版所述，¹目前台灣已知的維管束植物有四千零七十七種，其中特有種就高達一千零六十七種，所以針對台灣豐富的特有種中又不破壞生態下，去探討其化學成分及生物活性，應有其開發潛能。

目前天然物研究的方向初步會以一些試驗方法，作為篩選其植物是否有研究或開發新藥的潛能，細胞毒殺(MTT cytotoxicity assay)則是篩選是否對於癌細胞有所毒殺的效用的方法之一，這種方法是利用細胞的粒線體中含有的脫氫酵素(dehydrogenase)，此酵素與 MTT 反應，會將 MTT 之 tetrazolium 環切斷。此時，顏色由原有的淡黃轉為暗藍之 formazan。可以利用 ELISA reader 讀取波長 550 nm 之吸光度，並計算 ED₅₀ (μg/mL)來判斷是否有細胞毒殺作用。

癌細胞是一群生長不受控制的細胞，因其癌細胞本身的細胞凋亡的機制減緩或被抑制，導致原本在正常生理情況下預定走向死亡的細

胞沒走向細胞死亡的途徑。因此近年來研發治療癌症的新藥研究方向透過各種訊息傳遞調控並誘導癌細胞走向凋亡，達成消滅癌細胞功用。²一般生物體內，細胞死亡的方式主要經由兩種途徑：一為壞死(necrosis)，另一種為細胞凋亡(apoptosis)。當細胞遭受到外來刺激或壓力，如缺氧、缺血、化學毒等所引其的細胞死亡，其主要是經由壞死的路徑，造成細胞內胞器膜及細胞膜上負責調控水分、電解質運輸的蛋白質失去功能，引起細胞內水份不斷屯積，進而腫脹死亡；當細胞進行壞死時，會釋放發炎物質(inflammation factors)，造成發炎反應。²⁻⁴另一種發生在生物體內的細胞死亡方式，稱為細胞凋亡(apoptosis)，也可稱為程式性死亡(cell programmed death)，是一正常的細胞生理功能。在細胞型態學上(morphology)和壞死完全不同的死亡方式，細胞凋亡的生理特徵包括了細胞膜變化、凋亡蛋白酶家族(caspase family)的活化、與去氧核糖核酸的斷裂(DNA fragmentation)。細胞週期(cell cycle)是一連串有規律的細胞生理過程。細胞週期大致可分為兩個時期：間期(interphase)及細胞分裂期(mitosis phase)。間期有可分為三期：G0/G1、S、G2 phase。

一、 G0/G1：介於DNA合成(synthesis)前和細胞分裂之後。在此期細胞維持正常代謝並且繼續生長，進行mRNA轉錄及蛋白質的合成，但沒有DNA的合成，所以細胞大小增大，而DNA含量不變。在G1晚期有一個限制點(restriction point)，會檢查染色體(chromosome) DNA 是否受到破壞，以便進行修補(repair)的工作，此期約需 花十到十二小時。⁵⁻⁷

二、 S 期：這階段細胞週期主要是進行DNA複製(replication)工作。在這個時期，細胞大小固定，染色體由二倍體增加到四倍體，此時期會花到六到八小時來完成DNA replication。

二、 G2 期：在這個時期細胞具有4n 的染色體，細胞除了繼續生

長並且合成蛋白質之外，也會負責檢查染色體DNA的複製是否完整，以準備進入下一個時期。此期約需花 三到四小時。

四、 M 期：進入間期細胞會由一個母細胞分裂成兩個子細胞，已複製完整的染色體會各自分配到子細胞內，使得子細胞內的染色體與母細胞完全一樣，此時期大約一小時可完成。而哺乳類細胞在G0/G1 期、S期及G2/M期，各存有一個檢查點 (checkout point)，其中在G1和G2/M期兩個檢查點被研究的比較清楚。在G1期的檢查點可以適時的偵測到細胞生長的條件是否適合細胞增殖，來決定細胞進入S 期或停留在G1。而G2期檢查點則可以感應到DNA合成是否已完成，來決定細胞是否可進入M期。⁵⁻⁷

目前常見的細胞凋亡檢測方法有：電泳分析、Propidium Iodide Staining 和 ELISA-Enzyme-linked immunosorbent assay 等方式。Propidium Iodide Staining流式細胞儀以最不破壞細胞的方式，來觀察細胞內的各種生理變化的儀器，原理是以特定的螢光染劑接合細胞內的酵素、分子或核酸，當細胞流至檢測器時可檢測每顆細胞的螢光強度得知細胞內的變化。Elisa-based apoptotic assay 則是最快速且最省藥品的檢測方式，此方法可以檢測早期細胞凋亡的現象，來判斷此藥品是否使細胞走向necrosis或是apoptosis。

DNA拓樸異構酶 (DNA topoisomerase) 是細胞核內重要的蛋白質，當DNA複製、RNA轉錄和DNA重組的過中所產生的超螺旋結構的問題，都必須透過DNA拓樸異構酶來解決。而近年來以DNA topoisomerase 作用來篩選抗癌藥品，是生醫藥界的發展重點之一。因為以DNA topoisomerase 為drug target 的作用機轉與以前所知抗癌藥物作用機轉完全不同，而且藥品之間也沒有交互抗藥性 (cross resistance)，因此被科學家認為是很富潛力的新抗癌藥物作用途徑，

其中喜樹鹼(camptothecin)便是與第一型拓撲異構酶(DNA topoisomerase I)結合成複合體(complex)，使DNA topoisomerase I失去其活性，一旦喪失或受藥物抑制活性時，細胞則會受到嚴重的影響，使其無法複製，甚至造成細胞死亡，故被應用於癌症的治療上。⁸⁻¹¹ 癌細胞因需不斷進行複製，所以喜樹鹼可以有效的抑制癌細胞的生長，但一些分裂快速的細胞也對喜樹鹼較敏感，故可能引起一些副作用，比如說掉髮和口腔潰瘍。在本論文當中，針對具有細胞毒殺作用或細胞周期調控的化合物，進行拓撲異構酶活性抑制實驗，探討可能之誘導細胞死亡的原因，並期待能找到更具專一性之DNA topoisomerase I inhibitor。

近年來因飲食、生活習慣、工作壓力及環境等影響，身體的氧化壓力也逐漸增加，體內的抗氧化機制漸漸衰退，造成許多慢性病也提前發生，影響日後的生活品質。目前除了治療上的藥物外，對於預防老化的觀念越來越重視，所以對於一些可以抗氧化及預防心血管疾病的藥物或食品也逐漸的開發，因此在尋找減緩老化的化合物，也是現今科學家探討的重要課題之一。

近年來有許多的報告都顯示生物體過多的自由基(superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$)、hydroxyl radical ($\cdot OH$)、peroxyl radicals ($ROO^{\cdot}$)、Nitric oxide (NO)、Lipid radical 等)與導致發炎、癌症或退化性疾病有密切關係。¹²⁻¹⁵ 雖然生物體內有一套完整的防禦系統可以降低或消除氧化性傷害，例如:Glutathione、Ceruloplasmin、GSH-peroxidase 等，但是過量的氧化物質會產生不可逆的氧化傷害，因此攝取具有抗氧化或活化抗氧化酵素之物質，則可以延緩老化或減少氧化物質的發生。而 DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)則是一個含奇數電子之穩定型自由基，當其被抗氧化劑還原時，吸收會降低甚至消失，所以，則藉由清除 DPPH 的能力來初步判定受測物是否有抗氧化之功效。

過去本實驗室曾以體外培養癌細胞方式篩選出桃實百日青具抗癌活性，並初步研究桃實百日青之枝葉部分抗癌活性成分，^{16, 17} 其中所分離到的成分大多為 flavonoids、biflavonoids 或 steroid 類的化合物居多，其中 biflavonoids 中的 podocarpusflavone A 和 II-4",I-7-dimethoxyamentoflavone 類有對於人類第一型拓撲異構酶 (Topoisomerase I) 有抑制作用。由於以前分離出的化合物在羅漢松科植物中並非主要抗癌之成份，而為徹底了解本植物的化學與活性成分，因此，本論文進一步繼續探討桃實百日青莖皮部之化學成分及其生物活性，並希望將分離出的有效物質可以更進一步開發成為新的藥物。



第二節 研究目的

桃實百日青為台灣特有種，因此以本植物為研究題材，經酒精萃取，再利用管柱層析、薄層層析法和高效能液相層析等方法，試著從桃實百日青莖皮部中分離出具有生物活性之成分，並利用 NMR、MS、IR 等光譜分析或其他物理或化學方式，鑑定結構然後將純化鑑定之成分進行生物活性的探討，包含進行細胞毒殺(MTT cytotoxicity assay)、抗氧化清除 DPPH 活性測試、第一型拓撲異構酶 (DNA Topoisomerase I)和細胞凋亡(apoptosis)的抗癌機制探討。希望經由這一系列的 research 的有效物質可以進一步開發成為新藥。



第三節 桃實百日青植物介紹

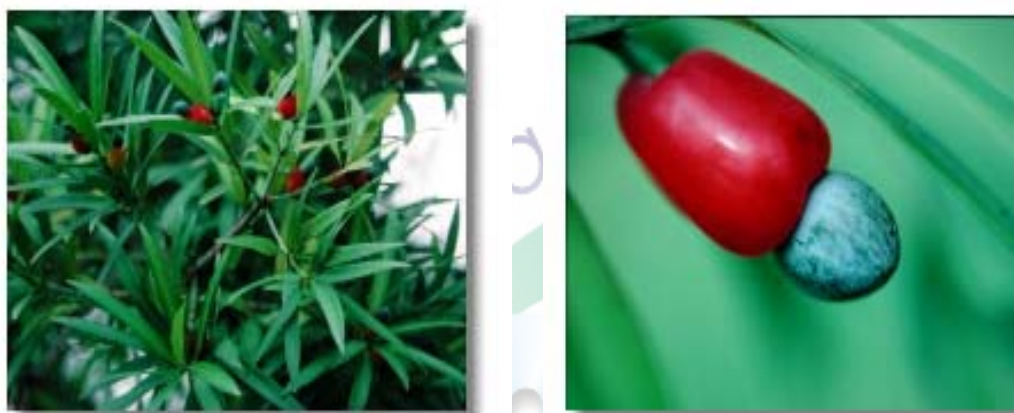
羅漢松科 (*Podocarpaceae*) 為常綠喬木或灌木。在全世界約有 20 屬，超過 120 種，分布於熱帶、亞熱帶和溫帶地區。主要以南半球為主，僅少許分布於北半球僅其中多分布在菲律賓、印尼、馬來西亞印度和中國大陸長江以南各省份。台灣地區本科原生種則有 2 屬共 7 種植物，依照 1994 年第二版台灣植物誌第一卷所述，¹ 分別隸屬於竹柏屬 (*Nageia Gaerth.*) 和羅漢松屬 (*Podocarpus L. H. erit ex Pers.*)。前者有長葉竹柏 (*N. fleuryi*) 及竹柏 (*N. nagi*) 2 種，而後者包含蘭嶼羅漢松 (*P. costalis*)、大葉羅漢松 (*P. macrophyllus* var. *macrophyllus*)、小葉羅漢松 (*P. macrophyllus* var. *maki*)、叢花百日青 (*P. fasciculus*) 和桃實百日青 (*P. nakaii*) 等 5 種。其中叢花百日青和桃實百日青為台灣特有種，所以在地理分布上有其特殊意義。

桃實百日青 (圖二)，主要分布在台灣中部中低海拔的闊葉林中¹⁸，所以有許多的俗名，例如：土杉仔、百日青仔、山相思仔、百日青、山相思樹、埔里羅漢松、埔里百日青及台灣羅漢松。桃實百日青為常綠喬木，樹幹挺直，樹高可達 15~20 餘公尺，樹幹直徑可達 60 公分，樹皮為灰紅褐色且有細長條的剝落，枝光滑，新芽略呈淡紅色，葉為互生、細長、短柄或無柄、葉緣光滑且無毛、中脈明顯無側脈、葉長披針型或寬線型約 5~10 公分，葉寬約 8~12 公厘。桃實為雌雄異株雄株約 1-3 個雄穗花簇生，雌株開花期主要在秋季，種子約在夏季成熟，先端的突起歪斜如桃子一般，種實球形，直徑約 8 mm，生於肥大之種托上。種托為倒錐狀圓柱形，長約 1.5 cm，成熟的種實，種子著生在紅色的肉質種托上且種子表面有白色粉狀物，成熟時呈紅色至紅紫色，種梗長約 5~11 mm。種子萌發後具子葉 2 枚。

桃實百日青在藥理方面，枝葉具有治療支氣管炎和關節炎¹⁹，另

外也有驅風、活血、解熱和解毒的功用。

另外，為了更了解本植物可能所含的化學成分，茲將本屬-羅漢松屬 (*Podocarpus*)植物之文獻研究整理如下表(見表一)所示。羅漢松科植物現有發現的化合物中，包含；Fatty acids、Aromatics、Monoterpene、Sesquiterpenoids、Diterpenoids、Podolactones、Flavonoids、Biflavonoids、Catechins、Steroids 和 Lignans 等不同骨架的化合物，其中具有抗氧化、抗蟲和抗癌等功效。



圖一、桃實百日青植物外觀及其果實(黃士元 攝)

表一、羅漢松 (*Podocarpus*) 屬植物化合物之化學研究

Compound 化合物名稱	Source 基源
A. Fatty acids	
Heptacosane (1)	<i>P. dacrydioides</i> ²⁰
Hentriacontane (2)	<i>P. saligna</i> ²¹
Nonacosane (3)	<i>P. dacrydioides</i> ²⁰
Eicosa-5c,11c,14c-trienoic acid (4)	<i>P. nagi</i> ²²
Triacontane (5)	<i>P. saligna</i> ²¹
Ditetradecyl-carbinol (6)	<i>P. ferrugineos</i> ²³
B. Aromatics	
Benzene-1,4-diol (7)	<i>P. saligna</i> ²¹
Coumaric acid (8)	<i>P. macrophylla</i> ²⁴
C. Monoterpene	
(+)-Limonen (9)	<i>P. spicata</i> ²⁵
D. Sesquiterpenoids	
Attractylon (10)	<i>P. spicatus</i> ²⁶
Curzerenone (11)	<i>P. spicatus</i> ²⁶
Longifolene (12)	<i>P. spicatus</i> ²⁶
γ -Muurolen (13)	<i>P. ferrugineus</i> ²⁷
Bicyclogermacren (14)	<i>P. ferrugineus</i> ²⁷
Selin-11-en-4 α -ol (15)	<i>P. ferrugineus</i> ²⁷
Selinadiene (16)	<i>P. spicatus</i> ²⁶
δ -Cadinene (17)	<i>P. spicatus</i> ²⁶
Germacren D (18)	<i>P. spicatus</i> ²⁶
δ -Elemen (19)	<i>P. spicatus</i> ²⁶
Podoandin (20)	<i>P. andina</i> ²⁸
α -Copaene (21)	<i>P. spicatus</i> ²⁶
Sclarene (22)	<i>P. spicatus</i> ²⁶
E. Diterpenoids	
5 β -Hydroxy-6-oxasugiyl methyl ether (23)	<i>P. ferrugineus</i> ²⁹
Pimaradiene (24)	<i>P. spicatus</i> ²⁶
(+)-Ferruginol (25)	<i>P. spicatus</i> ²⁶
2-Ketoferruginol (26)	<i>P. ferrugineus</i> ²⁹
Sugiol (27)	<i>P. andina</i> ²⁸
Sugiol methyl ether (28)	<i>P. ferrugineus</i> ²⁹
Xanthoperol (29)	<i>P. ferrugineus</i> ²⁹
Cryptojaponol (30)	<i>P. ferrugineus</i> ²⁹

表一、羅漢松 (*Podocarpus*) 屬植物化合物之化學研究(續)

Compound 化合物名稱	Source 基源
6-Dehydroroyleanon (31)	<i>P. ferrugineus</i> ²⁹
12-Acetoxyisugiyl methyl ether (32)	<i>P. gracilior</i> ³⁰
2 β -Acetoxyisugiyl methyl ether (33)	<i>P. ferrugineus</i> ²⁹
5-Dehydrosugiyl (34)	<i>P. ferrugineus</i> ²³
19-Oxototarol (35)	<i>P. nagi</i> ³¹
8(14)-Sandaracopimaren-2 α ,15 ξ ,16,18-tetrol (36)	<i>P. halli</i> ³²
Royleanon (37)	<i>P. ferrugineus</i> ²⁹
Abietatriene-(8.11.13) (38)	<i>P. ferrugineus</i> ²⁷
Rimuene (39)	<i>P. saligna</i> ²¹
Isopimaradiene (40)	<i>P. spicatus</i> ²⁶
17-Isophyllocladenol (41)	<i>P. lambertius</i> ³³
Totarol (42)	<i>P. totara</i> ³⁴
Hydroxytotarol (43)	<i>P. totara</i> ³⁴
19-Hydroxytotarol (44)	<i>P. nagi</i> ³¹
Phylloclad-15-ene (45)	<i>P. spicatus</i> ²⁶
Isopimarol (46)	<i>P. spicatus</i> ²⁶
Isopimaradiene (47)	<i>P. ferrugineus</i> ²⁹
19-Hydroxyferruginol (48)	<i>P. ferrugineus</i> ³⁵
Totaryl acetate (49)	<i>P. gracilior</i> ³⁰
Methyl podocarpate (50)	<i>P. totara</i> ³⁴
4 β -Carboxy-17-hydroxy-19-nortotarol (51)	<i>P. macrophyllus</i> ³⁶
Phyllocladen (52)	<i>P. spicatus</i> ²⁶
Isopimara-8,15-diene (53)	<i>P. spicatus</i> ²⁶
Pimara-8(14),15-diene (54)	<i>P. spicatus</i> ²⁶
3 β -Hydroxytotarol (55)	<i>P. nagi</i> ³¹
Podocarpic acid (56)	<i>P. lambertius</i> ³³
Lambertic acid (57)	<i>P. lambertius</i> ³³
Pododacric acid (58)	<i>P. lambertius</i> ³³
8,9-Abieten-15-ol (59)	<i>P. lambertius</i> ³³
Sempervirol (60)	<i>P. gracilior</i> ³⁰
8-Hydroxy-isopimarene (61)	<i>P. spicatus</i> ²⁶
Pimara-8,15-diene (62)	<i>P. spicatus</i> ²⁶
Peonidin-3-glucosid (63)	<i>P. spicatus</i> ²⁶
Kaurene (64)	<i>P. spicatus</i> ²⁶
Phyllocladene (65)	<i>P. ferruginea</i> ³⁷

表一、羅漢松 (*Podocarpus*) 屬植物化合物之化學研究(續)

Compound 化合物名稱	Source 基源
Totaral (66)	<i>P. nagi</i> ³⁸
16-Hydroxy-totarol (67)	<i>P. nagi</i> ³⁸
Abieta-6,8,11,13-tetraen-12-ol (68)	<i>P. dacrydioides</i> ²⁰
Cupressene (69)	<i>P. dacrydioides</i> ²⁰
Kaurane (70)	<i>P. macrophyllus</i> ³⁶
Phyllocladene (71)	<i>P. ferruginea</i> ³⁷
Isokaurene (72)	<i>P. spicatus</i> ²⁶
Rosadiene (73)	<i>P. spicatus</i> ²⁶
Sandaracopimaradienes (74)	<i>P. spicatus</i> ²⁶
Carnosol (75)	<i>P. ferrugineus</i> ³⁵
19-Acetate (76)	<i>P. ferrugineus</i> ³⁵
Totaradiol (77)	<i>P. nagi</i> ³⁸
4 β -Carboxy-19-nortotarol (78)	<i>P. macrophyllus</i> ³⁶
Macrophyllinoic acid (79)	<i>P. ferrugineus</i> ³⁵
F. Podolactones	
Inumakilactone (80)	<i>P. macrophyllus</i> ³⁹
Hallacton A (81)	<i>P. hallii</i> ⁴⁰
Nagilactone B (82)	<i>P. macrophyllus</i> ⁴¹
1-Deoxy-2,3-dehydronagilactone (83)	<i>P. nagi</i> ⁴²
Nagilacton A (84)	<i>P. nagi</i> ⁴³
Podolactone E (85)	<i>P. neriifolius</i> ⁴⁴
Nagilactone A (86)	<i>P. macrophyllus</i> ⁴¹
LactoneA (87)	<i>P. saligna</i> ⁴⁵
15-Methoxycarbonyl-Nagilactone D (88)	<i>P. nagi</i> ⁴⁶
Nubilacton A (89)	<i>P. nubigena</i> ⁴⁷
Nagilacton E (90)	<i>P. nagi</i> ⁴³
Nagilactone F (91)	<i>P. nagi</i> ⁴³
Nagilactone B (92)	<i>P. nagi</i> ⁴⁶
Nagilactone D (93)	<i>P. nagi</i> ⁴⁶
1-Deoxy-3 β -hydroxy-nagilactone B (94)	<i>P. macrophyllus</i> ⁴¹
17-Hydroxy-3-deoxy-2,3-didehydro-nagilactone E (95)	<i>P. nagi</i> ⁴⁶
Inumakilactone A (96)	<i>P. macrophyllus</i> ⁴¹
Hallacton A (97)	<i>P. hallii</i> ⁴⁰
3-Hydroxy-17-nor-nagilactone (98)	<i>P. nagi</i> ⁴⁶

表一、羅漢松 (*Podocarpus*) 屬植物化合物之化學研究(續)

Compound 化合物名稱	Source 基源
Podolacton A (99)	<i>P. neriifolius</i> ⁴⁸
Podolacton B (100)	<i>P. neriifolius</i> ⁴⁸
2 β ,3 β -Epoxy-podolid (101)	<i>P. neriifolius</i> ⁴⁸
Inumakilactone B (102)	<i>P. neriifolius</i> ⁴⁴
2,3-Dehydro-16-hydroxynagilactone F (103)	<i>P. nagi</i> ⁴⁹
16-Hydroxynagilactone E (104)	<i>P. nagi</i> ⁴⁹
Nagilactone I (105)	<i>P. nagi</i> ⁴⁹
Nagilactone A (106)	<i>P. nagi</i> ⁴⁹
Nagilactone C (107)	<i>P. nagi</i> ⁴⁹
3-Deoxy-2 α -hydroxynagilactone E (108)	<i>P. nagi</i> ⁴⁹
2 α -Hydroxynagilactone F (109)	<i>P. nagi</i> ⁴⁹
3-Epinagilactone C (110)	<i>P. nagi</i> ⁴⁹
Nagilactone J (111)	<i>P. nagi</i> ⁵⁰
Salignone H (112)	<i>P. saligna</i> ⁵¹
Salignone A (113)	<i>P. saligna</i> ⁵¹
α , β -Unsaturated δ -lactone (114)	<i>P. urbanii</i> ⁵²
Urbalactone (115)	<i>P. urbanii</i> ⁵²
Inumakilactone A (116)	<i>P. neriifolius</i> ⁴⁴
1-Deoxynagilactone A (117)	<i>P. nagi</i> ⁴²
2,3-Dehydronagilactone (118)	<i>P. nagi</i> ⁴²
Salignone M (119)	<i>P. saligna</i> ⁵³
Nagilactone (120)	<i>P. nagi</i> ⁴²
Salignone I (121)	<i>P. saligna</i> ⁵³
Salignone K (122)	<i>P. saligna</i> ⁵³
Salignone L (123)	<i>P. saligna</i> ⁵³
Salignone J (124)	<i>P. saligna</i> ⁵³
Salignone A (125)	<i>P. saligna</i> ⁵³
Inumakilactone D (126)	<i>P. saligna</i> ⁵³
Rakanmakilactone I (127)	<i>P. macrophyllus</i> ³⁶
Rakanmakilactone H (128)	<i>P. macrophyllus</i> ³⁶
Rakanmakilactone G (129)	<i>P. macrophyllus</i> ³⁶
Rakanmakilactone J (130)	<i>P. macrophyllus</i> ³⁶
Rakanmakilactone G-7 β -O- β -D-apiofuranoside (131)	<i>P. macrophyllus</i> ³⁶
Podolacton D (132)	<i>P. macrophyllus</i> ⁵⁴

表一、羅漢松 (*Podocarpus*) 屬植物化合物之化學研究(續)

Compound 化合物名稱	Source 基源
Podolacton C (133)	<i>P. macrophyllus</i> ⁵⁴
Hallacton B (134)	<i>P. hallii</i> ⁴⁰
Podolacton D (135)	<i>P. macrophyllus</i> ⁵⁴
Rakanmakilactone A (136)	<i>P. macrophyllus</i> ⁵⁴
Rakanmakilactone C (137)	<i>P. macrophyllus</i> ⁵⁴
Rakanmakilactone D (138)	<i>P. macrophyllus</i> ⁵⁴
Rakanmakilactone B (139)	<i>P. macrophyllus</i> ⁵⁴
Rakanmakilactone F (140)	<i>P. macrophyllus</i> ⁵⁴
Hallactone B (141)	<i>P. macrophyllus</i> ⁵⁴
Podolactone C (142)	<i>P. macrophyllus</i> ⁵⁴
Rakanmakilactone E (143)	<i>P. macrophyllus</i> ⁵⁴
G. Biflavonoids	
Hinokiflavone (144)	<i>P. elongata</i> ⁵⁵
Amentoflavone (145)	<i>P. macrophylla</i> ²⁴
Isoginkgetin (146)	<i>P. gracilior</i> ²⁴
4',4'',7,7''-Tetra-methylamentoflavone(147)	<i>P. urbanii</i> ⁵²
Amentoflavone hexa-acetate (148)	<i>P. urbanii</i> ⁵²
Hexa- <i>O</i> -methylcupressuflavone (149)	<i>P. elongatus</i> ⁵⁶
Ketoflavone (150)	<i>P. elongatus</i> ⁵⁷
Heveaflavone (151)	<i>P. taxifolia</i> ⁵⁸
Sotetsuflavone (152)	<i>P. elongatus</i> ⁵⁷
Podocarpus-flavon A (153)	<i>P. urbanii</i> ⁵²
II 4'-Methylamentoflavone (154)	<i>P. taxifolia</i> ⁵⁸
I 7, II 4'-Dimethylamentoflavone (155)	<i>P. taxifolia</i> ⁵⁸
Podocarpus flavone A (156)	<i>P. urbanii</i> ⁵²
Podocarpusflavanone (157)	<i>P. taxifolia</i> ⁵⁸
H. Flavonoids	
Katuranin (158)	<i>P. spicatus</i> ⁵⁹
Dihydroquercetin (159)	<i>P. spicatus</i> ⁶⁰
Apigenin (160)	<i>P. macrophylla</i> ²⁴
Kaempferol (161)	<i>P. spicatus</i> ⁵⁹
Quercetin (162)	<i>P. spicatus</i> ⁵⁹
Daidzein (163)	<i>P. spicatus</i> ⁶⁰
Genistein (164)	<i>P. spicatus</i> ⁶⁰

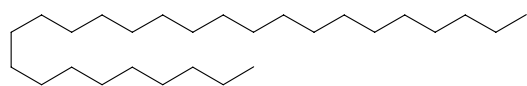
表一、羅漢松 (*Podocarpus*) 屬植物化合物之化學研究(續)

Compound 化合物名稱	Source 基源
Biochanin A (165)	<i>P. andina</i> ²⁸
Irisolidone (166)	<i>P. andina</i> ²⁸
Podospicatin (167)	<i>P. spicatus</i> ⁶⁰
Taxifolin 7- <i>O</i> - β -glucoside (168)	<i>P. nivalis</i> ⁶¹
Luteolin 3'- <i>O</i> - β -xyloside (169)	<i>P. nivalis</i> ⁶¹
Co-occurring glycoside (170)	<i>P. nivalis</i> ⁶¹
5- <i>O</i> - β -D-Glucopyranoside (171)	<i>P. nivalis</i> ⁶¹
Luteolin 7- <i>O</i> - β -glucoside-3'- <i>O</i> - β -xyloside(172)	<i>P. nivalis</i> ⁶¹
Orientin 2"- <i>O</i> - β -glucopyranoside (173)	<i>P. nivalis</i> ⁶¹
Vitexin-2"- <i>O</i> -glucoside (174)	<i>P. nivalis</i> ⁶¹
I. Catechins	
(-)-Epicatechin (175)	<i>P. nagi</i> ⁶²
Cyanidin-3-rutinosid (176)	<i>P. lawrencii</i> ⁶³
Peonidin-3,5-diglucosid (177)	<i>P. brevifolius</i> ⁶⁴
Cyanidin-3-glucosid (178)	<i>P. lawrencii</i> ⁶³
Peonidin-3-glucosid (179)	<i>P. brevifolius</i> ⁶⁴
Myrtillin (180)	<i>P. totara</i> ⁶⁵
Pelargonidin-3-glucosid-chlorid (181)	<i>P. brevifolius</i> ⁶⁴
Delphinidin-3-glucoside-chloride (182)	<i>P. brevifolius</i> ⁶⁴
Pelargonidin-3,5-diglucosid-chlorid (183)	<i>P. brevifolius</i> ⁶⁴
Delphinidin-3,5-diglucoside-chloride (184)	<i>P. brevifolius</i> ⁶⁴
Cyanidin-3-rutinoside (185)	<i>P. totara</i> ⁶⁵
Delphinidin-3-neohesperidoside (186)	<i>P. totara</i> ⁶⁵
Cyanidin 3-neohesperidoside (187)	<i>P. totara</i> ⁶⁵
J. Steroids	
β -Sitosterin (188)	<i>P. ferrugineos</i> ²³
Stigmasterol (189)	<i>P. pivalis</i> ⁶⁶
Clionasterol (190)	<i>P. totara</i> ³⁴
20-Hydroxy-ecdysone (191)	<i>P. macrophyllus</i> ⁶⁷
Ponasteron B (192)	<i>P. urbanii</i> ⁶⁸
Ponasteron C (193)	<i>P. urbanii</i> ⁶⁸
Podecdyson C (194)	<i>P. elatus</i> ⁶⁹
Ponasteron A (195)	<i>P. macrophyllus</i> ⁶⁷
Ethylcholest-5-en-3 β -ol (196)	<i>P. latifolius</i> ⁷⁰

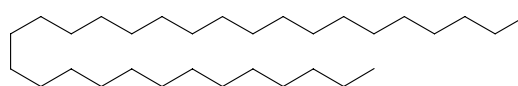
表一、羅漢松 (*Podocarpus*) 屬植物化合物之化學研究(續)

Compound 化合物名稱	Source 基源
Makisteron A (197)	<i>P. macrophyllus</i> ⁶⁷
3 β ,5 α -Dihydroxy-6-stigmastanone (198)	<i>P. lambertius</i> ³³
24(ξ)-Methyl-25(ξ)-cholest-5-ene-3b,26-diol (199)	<i>P. macrophylla</i> ²⁴
24(ξ)-Ethyl-25(ξ)-cholest-5-ene-3b,26-diol (200)	<i>P. macrophylla</i> ²⁴
Sitosterol-D-glucoside (201)	<i>P. latifolius</i> ⁷⁰
K. Lignans	
Matairesinol (202)	<i>P. spicatus</i> ⁷¹
Thujaplicatin methyl ether (203)	<i>P. spicatus</i> ⁷¹
L. Other	
Hallol (204)	<i>P. halli</i> ³²
Sequoyitol (205)	<i>P. sellowii</i> ⁷²
Blumenol C (206)	<i>P. blume</i> ⁷³
Blumenol B (207)	<i>P. blume</i> ⁷³
Lauren-1-ene (208)	<i>P. halli</i> ³²
Waihoensene (209)	<i>P. totara</i> ⁷⁴

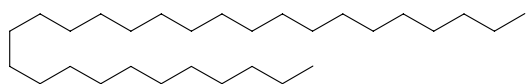
A. Fatty acids



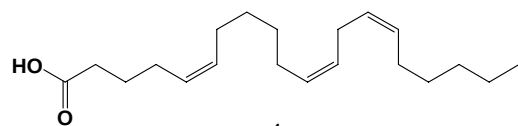
1



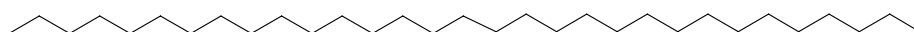
2



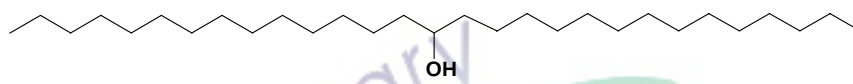
3



4

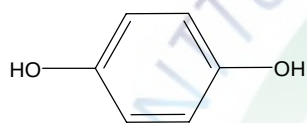


5

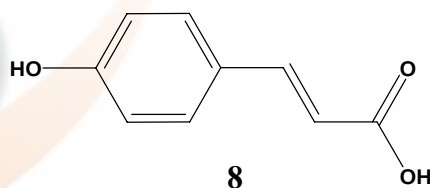


6

B. Aromatics

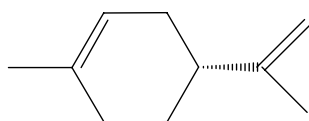


7



8

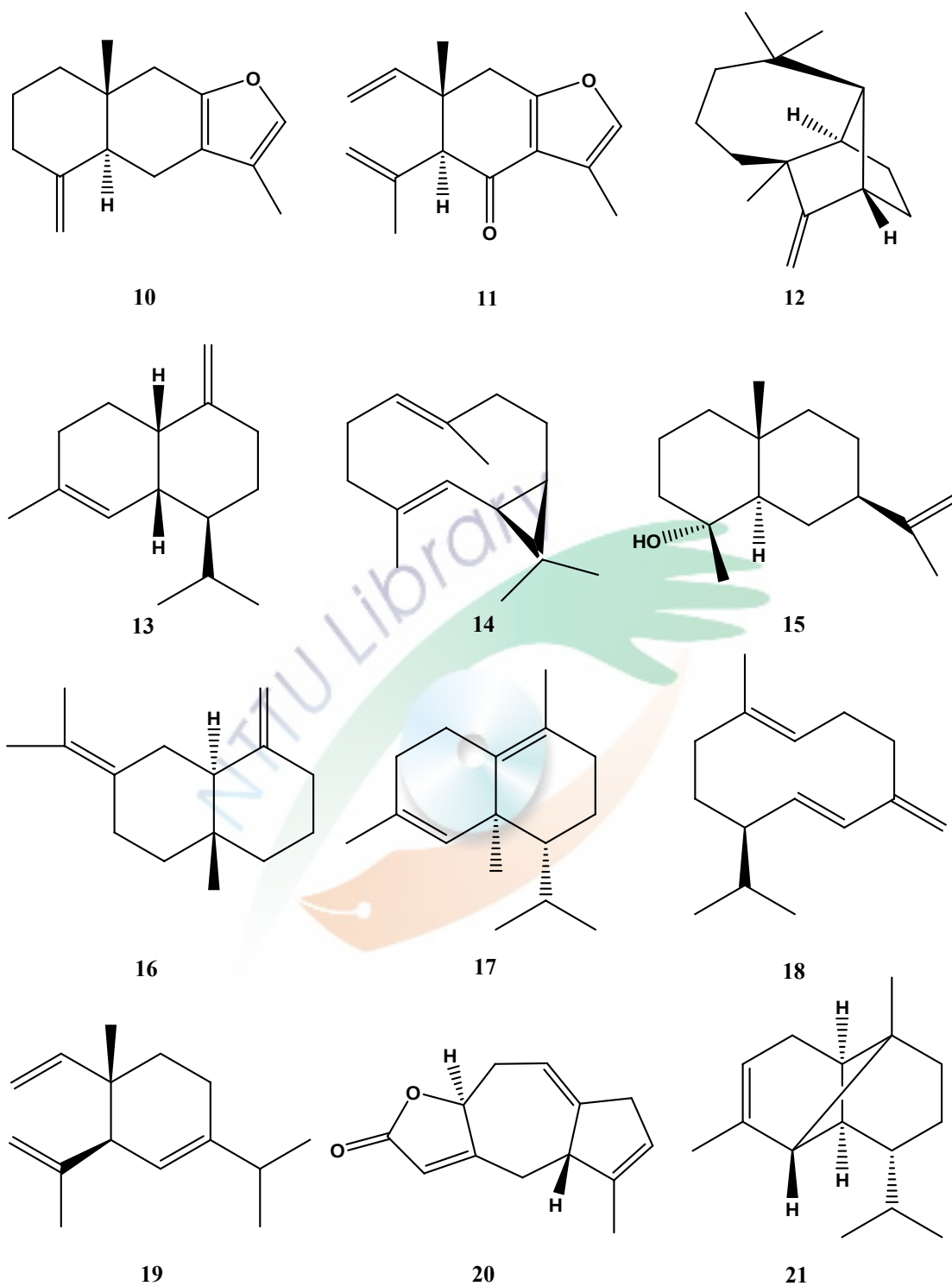
C. Monoterpene



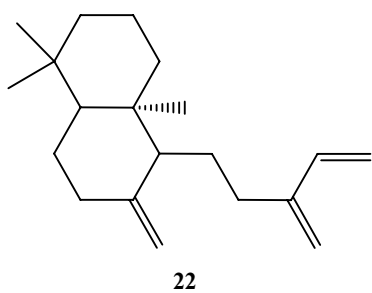
9

圖二、羅漢松(*Podocarpus*)屬植物化合物之化學結構

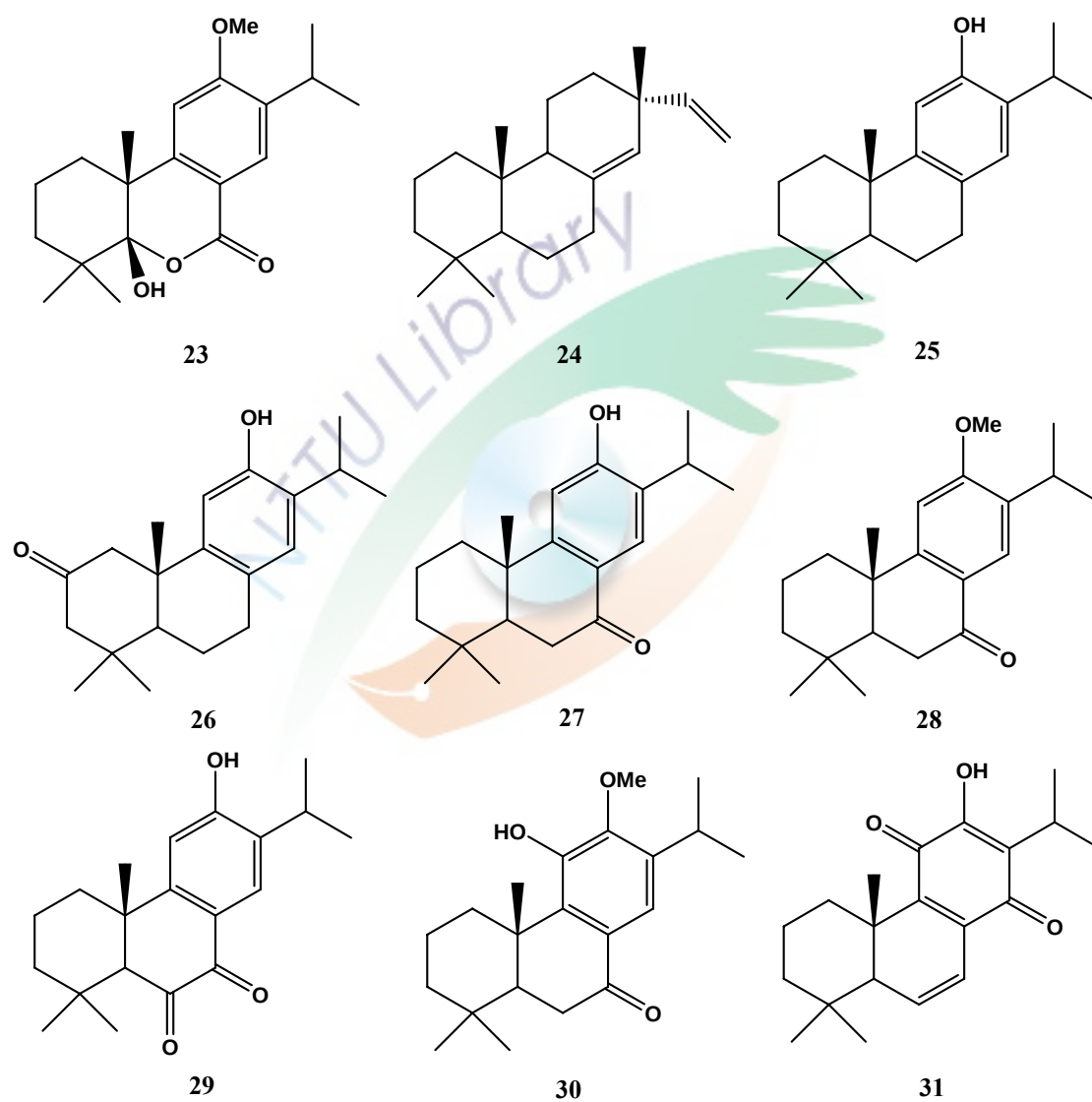
D. Sesquiterpenoids



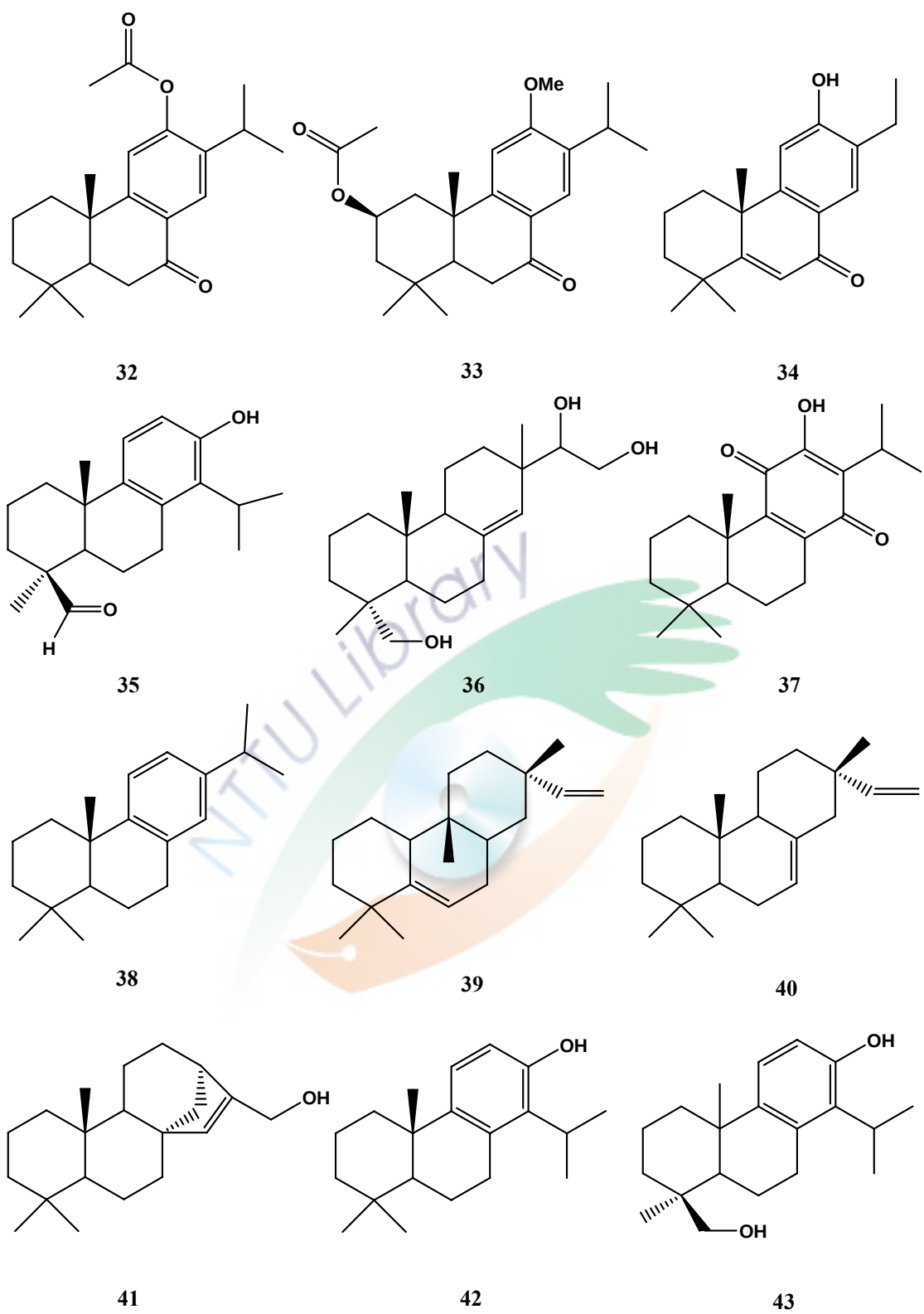
圖二、羅漢松(*Podocarpus*)屬植物化合物之化學結構(續)



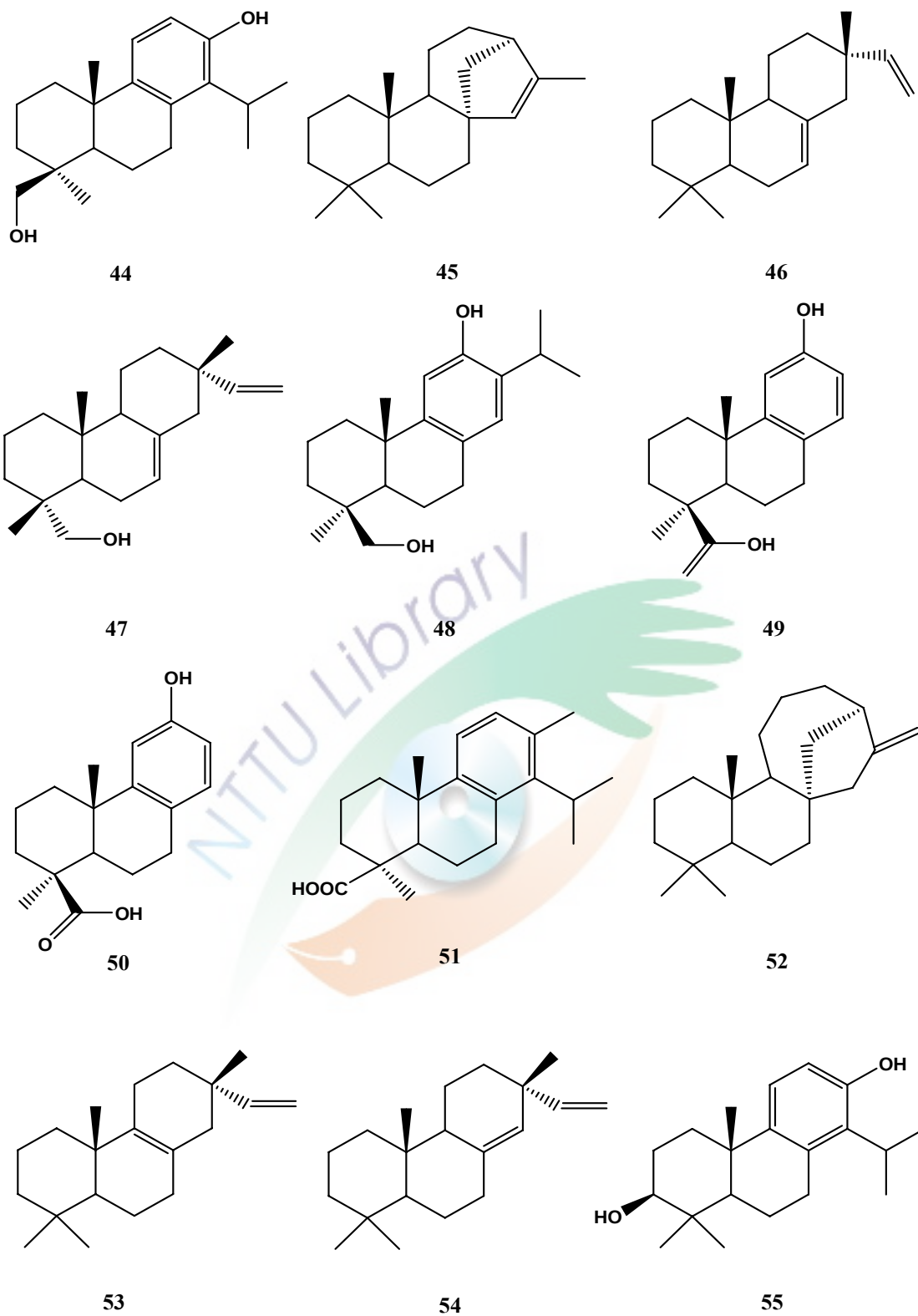
E. Diterpenoids



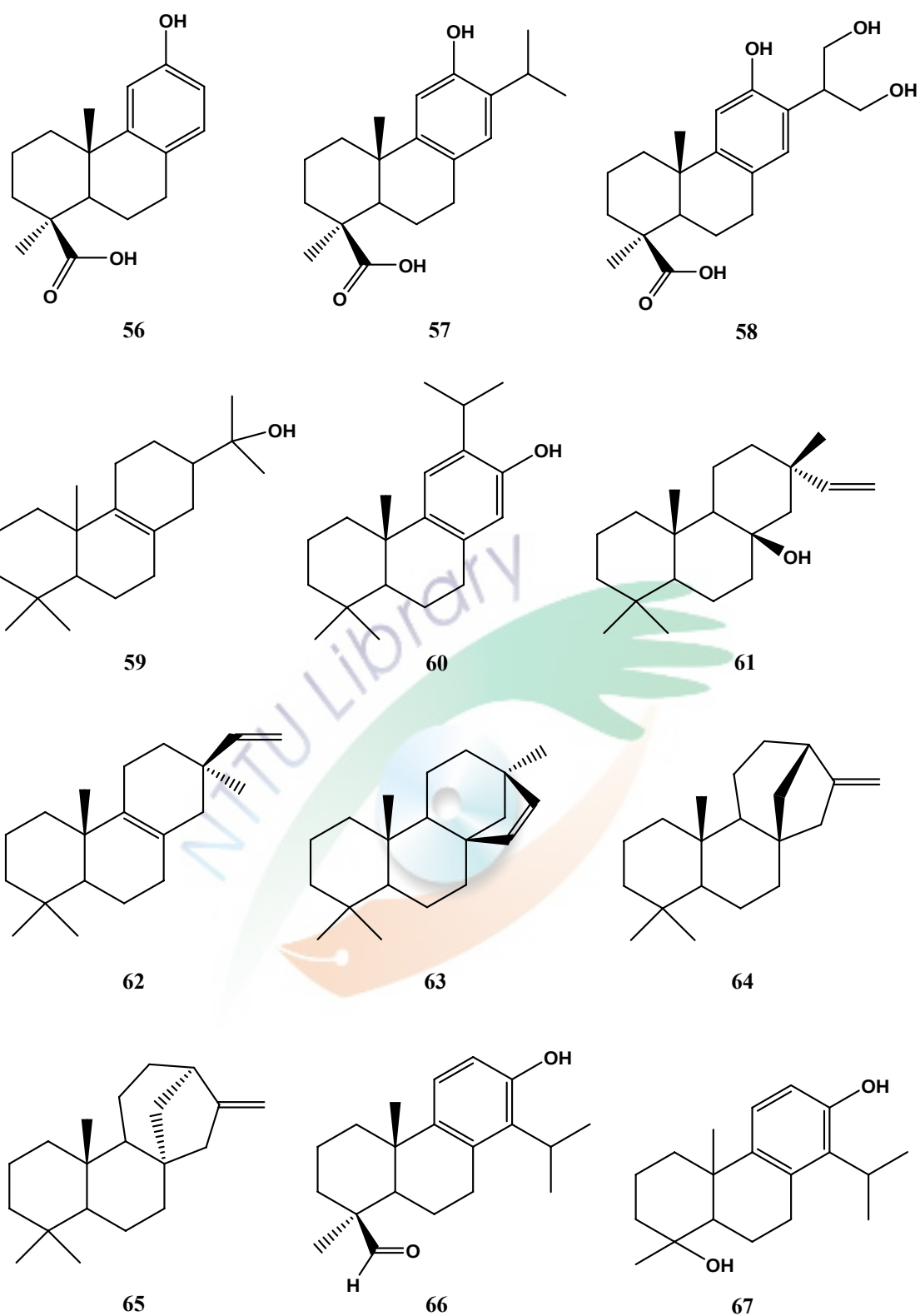
圖二、羅漢松(*Podocarpus*)屬植物化合物之化學結構(續)



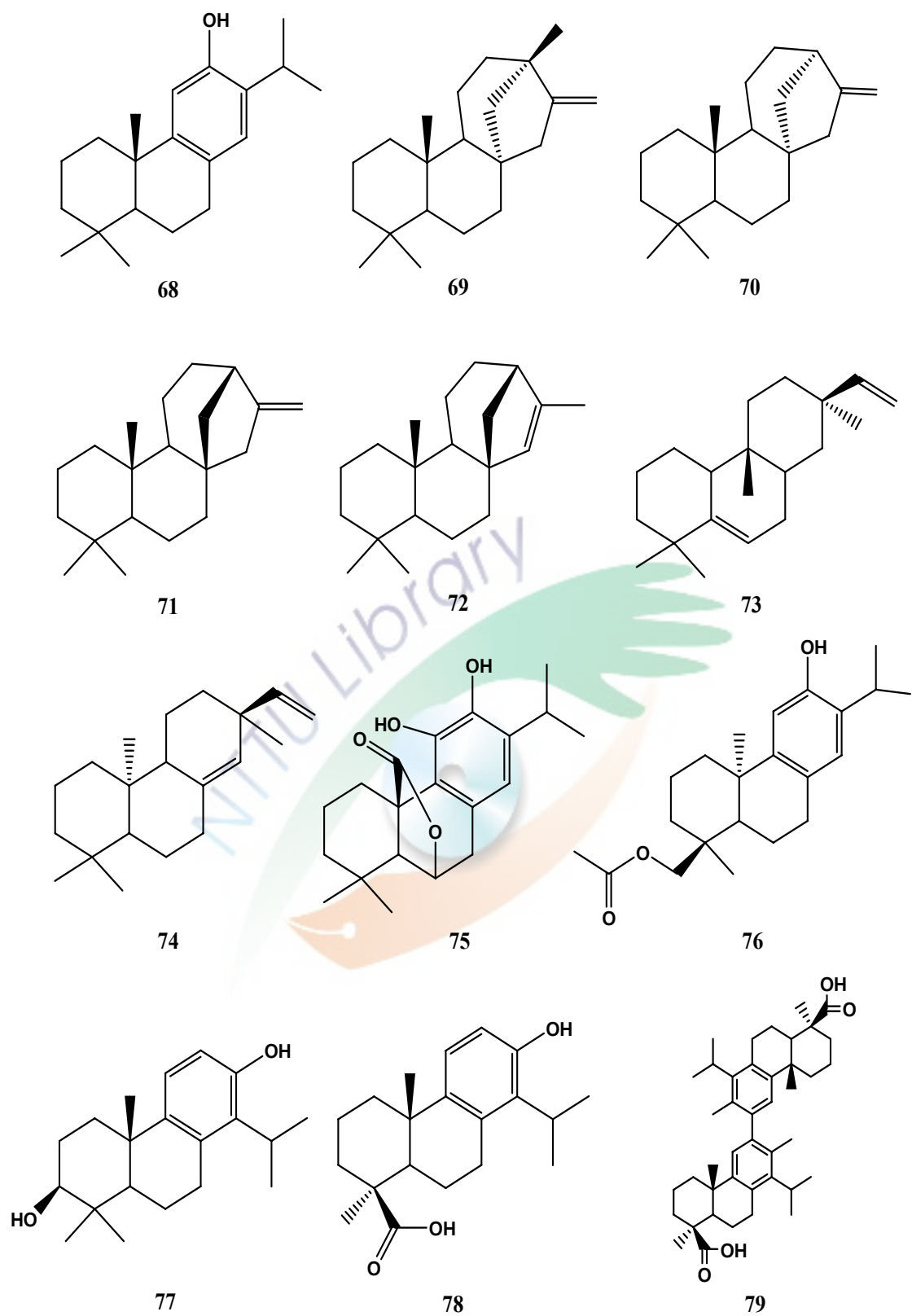
圖二、羅漢松(*Podocarpus*)屬植物化合物之化學結構(續)



圖二、羅漢松(*Podocarpus*)屬植物化合物之化學結構(續)

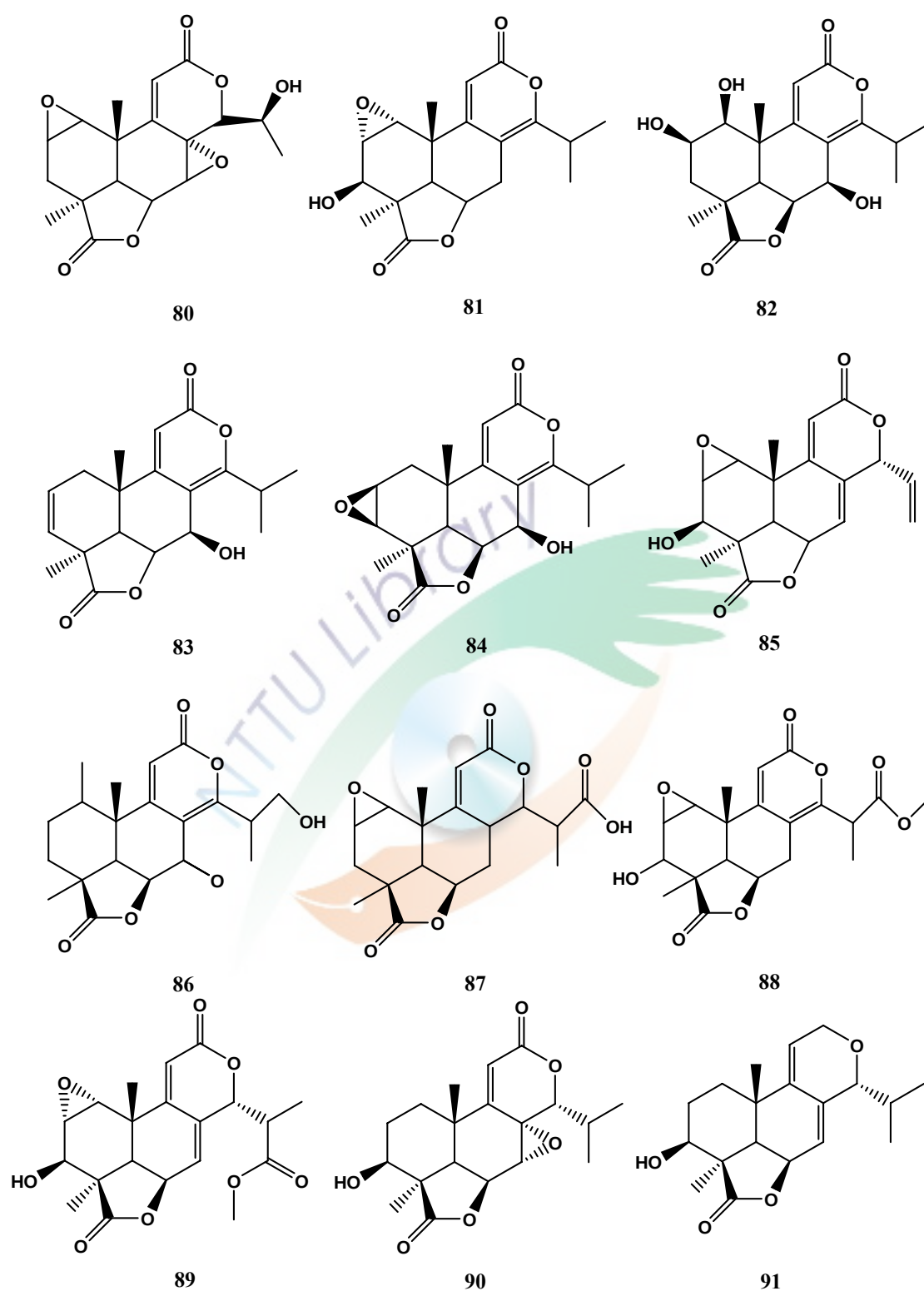


圖二、羅漢松(*Podocarpus*)屬植物化合物之化學結構(續)

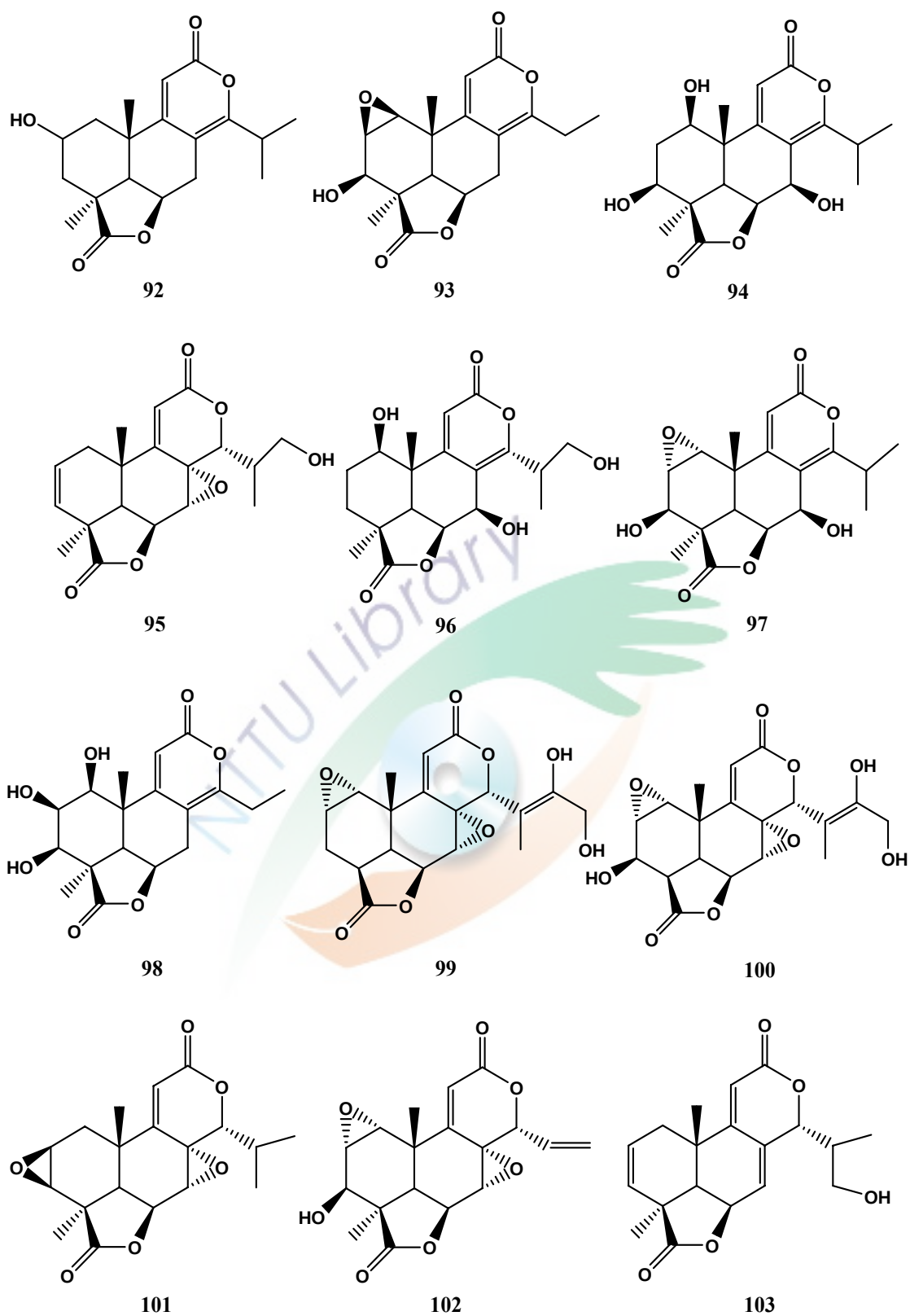


圖二、羅漢松(*Podocarpus*)屬植物化合物之化學結構(續)

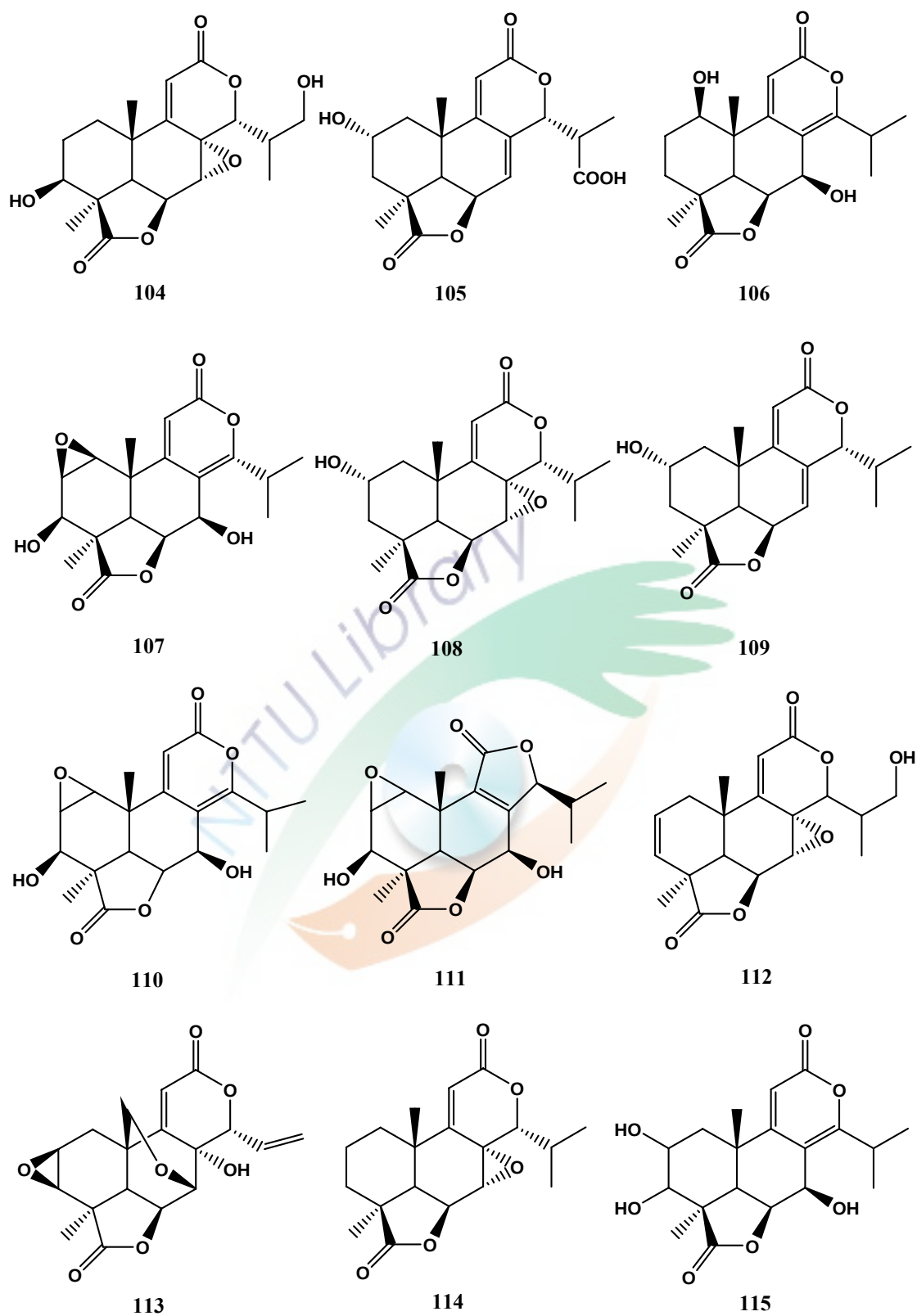
F. Podolactones



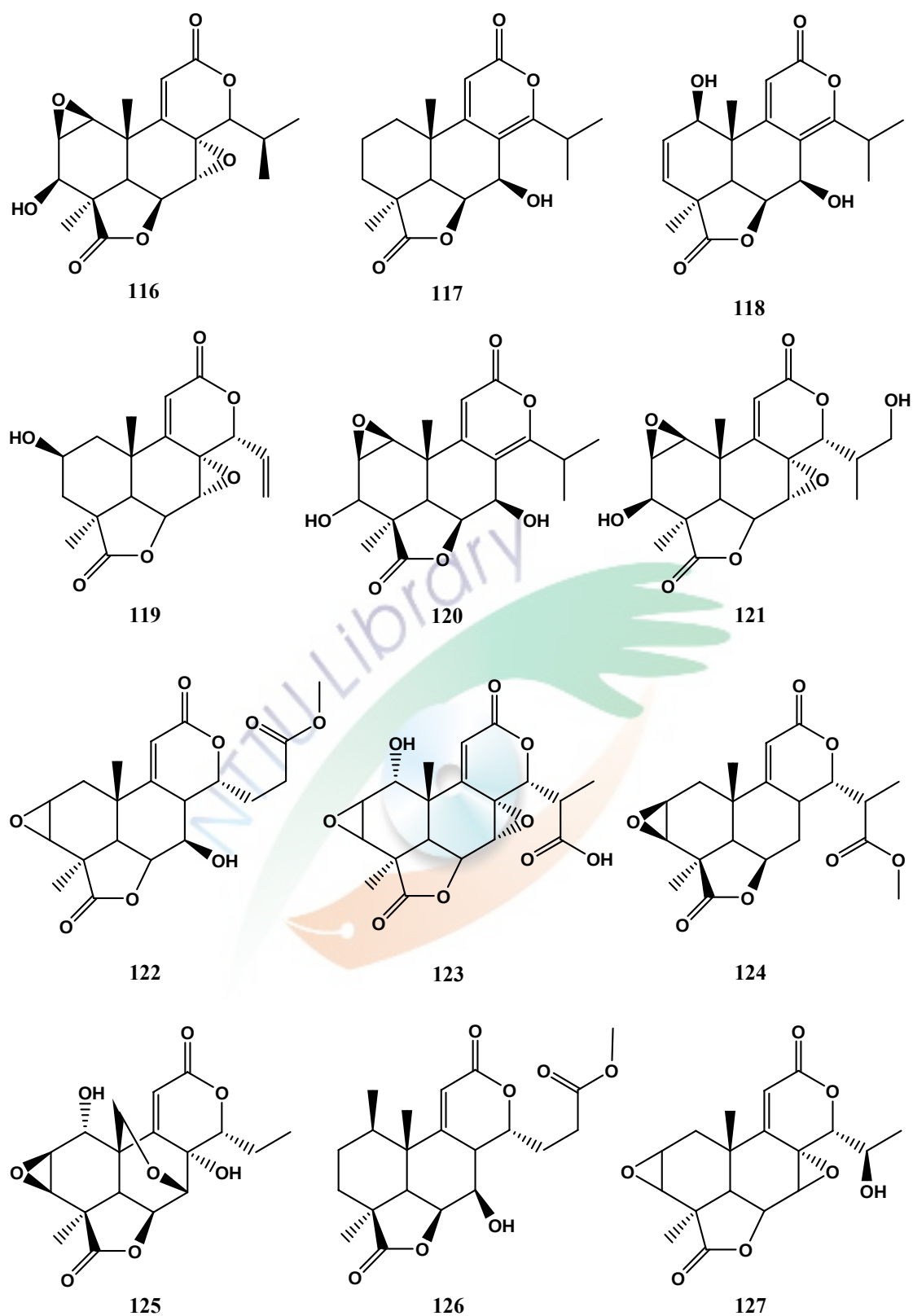
圖二、羅漢松(*Podocarpus*)屬植物化合物之化學結構(續)



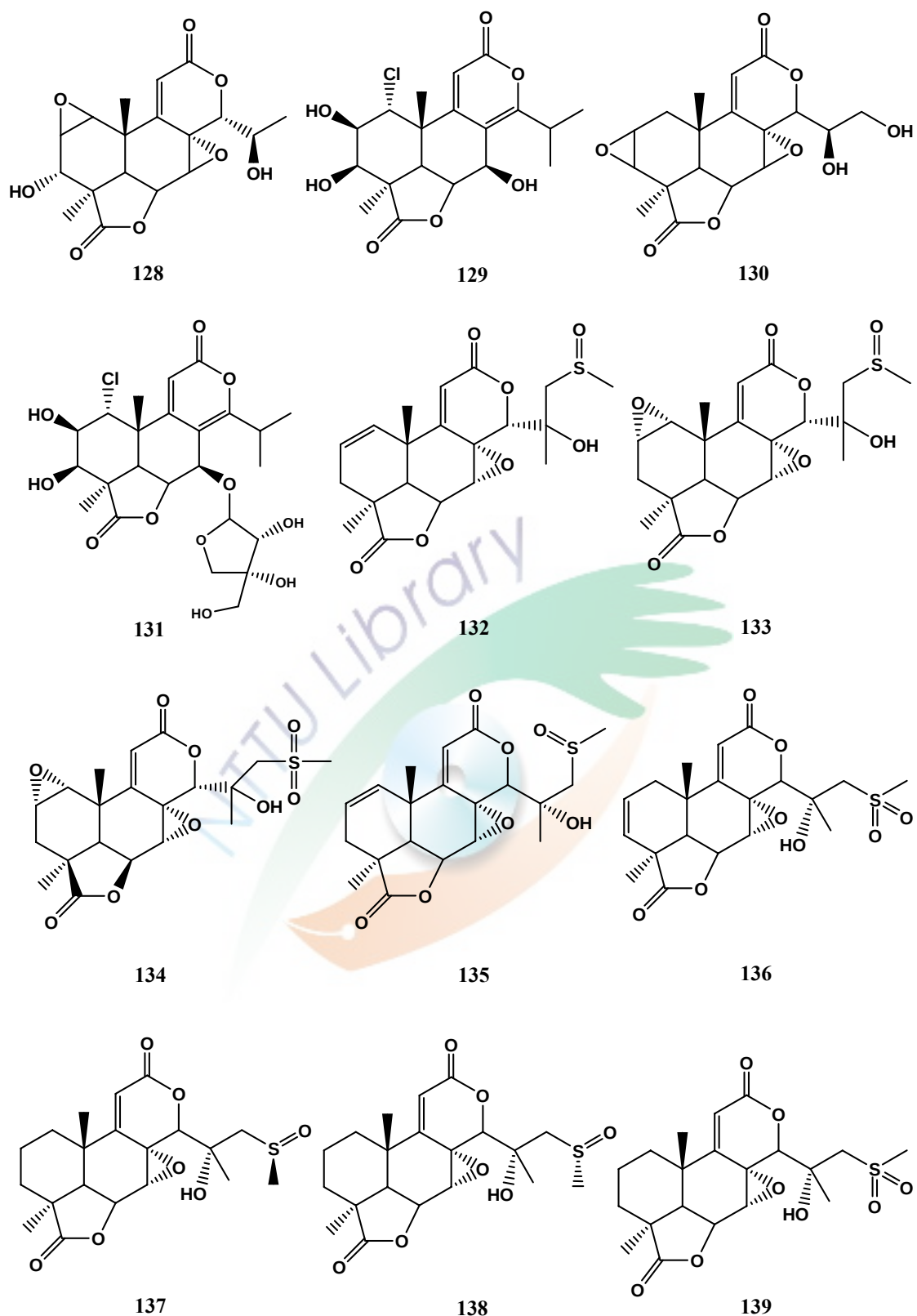
圖二、羅漢松(*Podocarpus*)屬植物化合物之化學結構(續)



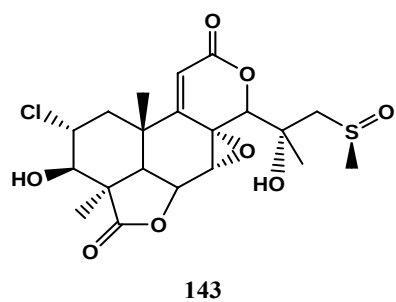
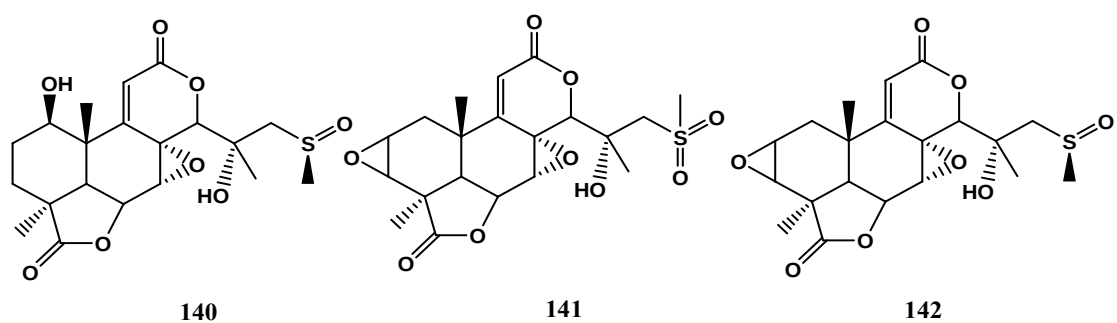
圖二、羅漢松(*Podocarpus*)屬植物化合物之化學結構(續)



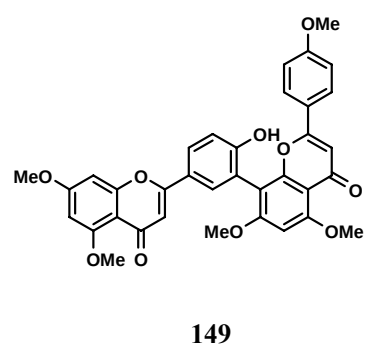
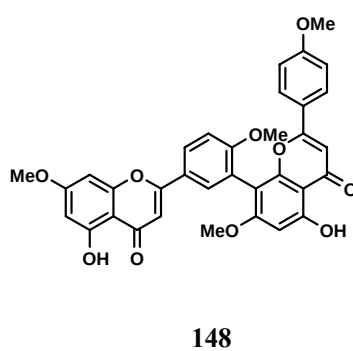
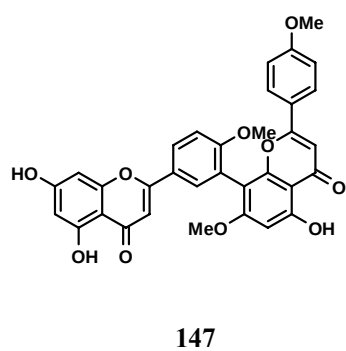
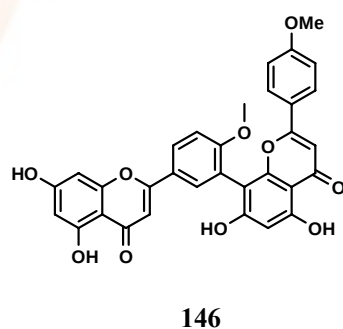
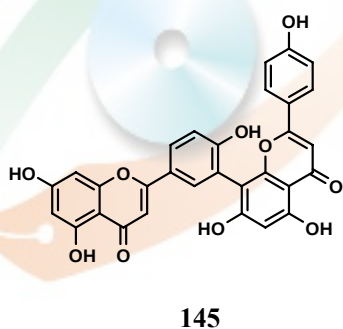
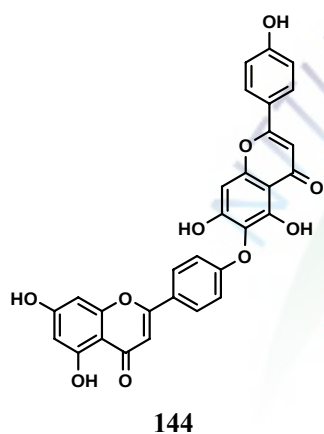
圖二、羅漢松(*Podocarpus*)屬植物化合物之化學結構(續)



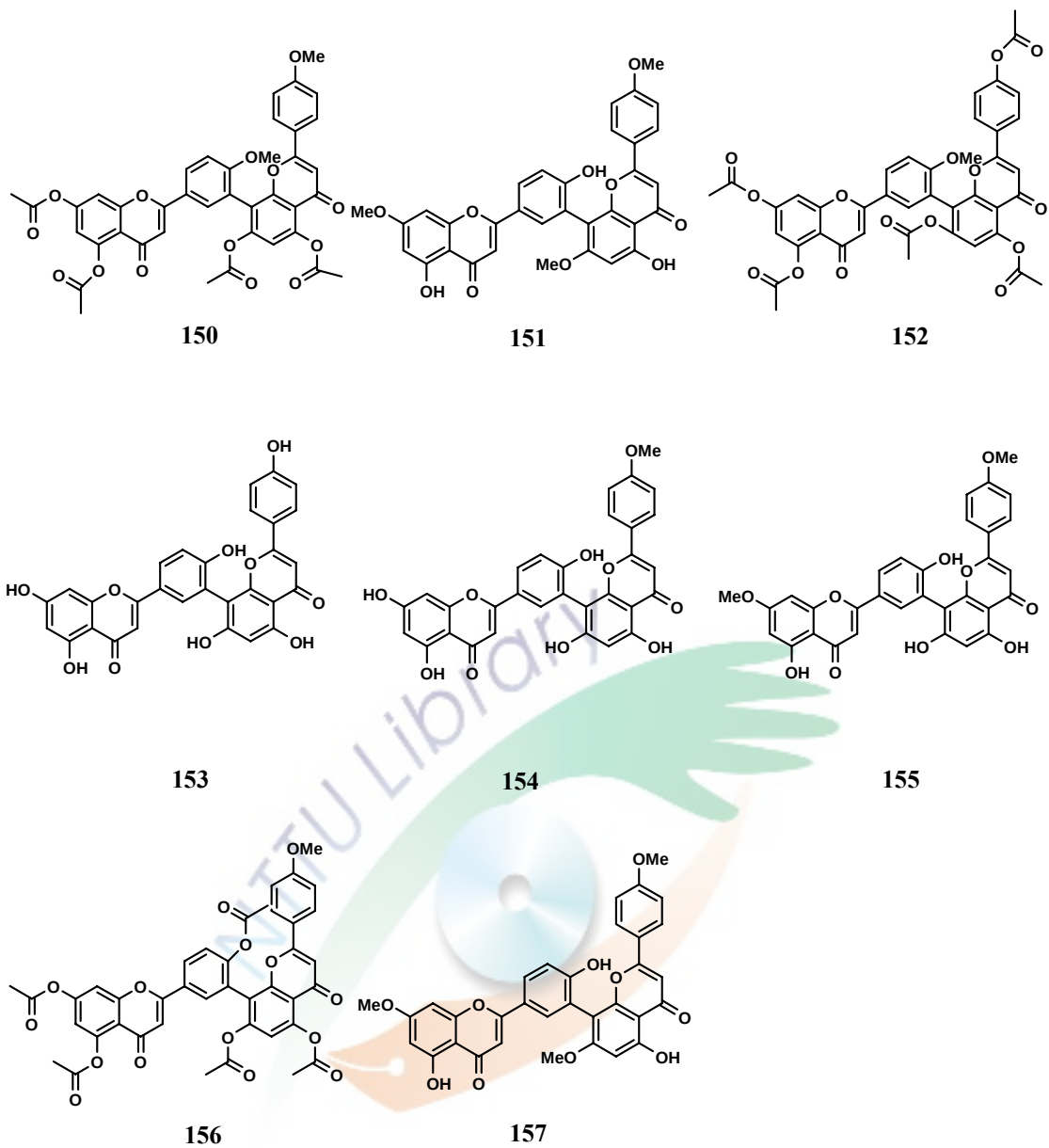
圖二、羅漢松(*Podocarpus*)屬植物化合物之化學結構(續)



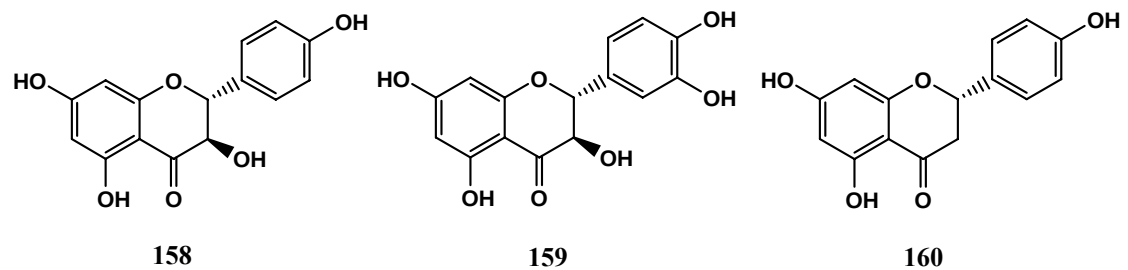
G. Biflavonoids



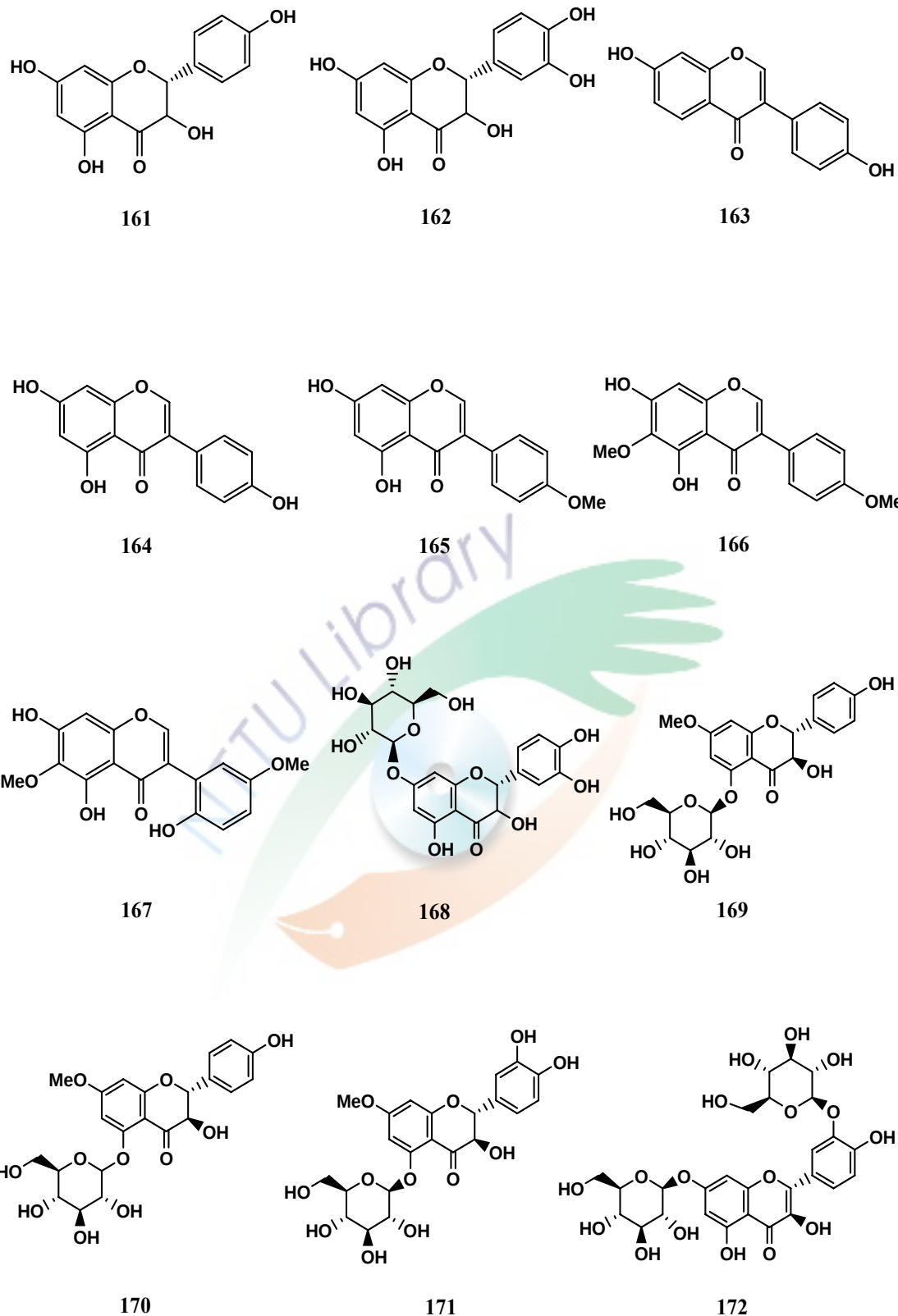
圖二、羅漢松(*Podocarpus*)屬植物化合物之化學結構(續)



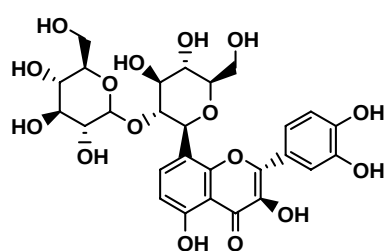
H. Flavonoids



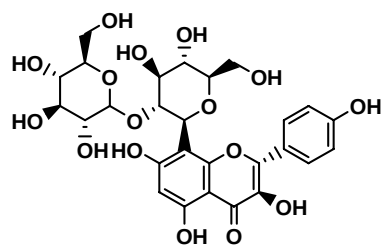
圖二、羅漢松(*Podocarpus*)屬植物化合物之化學結構(續)



圖二、羅漢松(*Podocarpus*)屬植物化合物之化學結構(續)

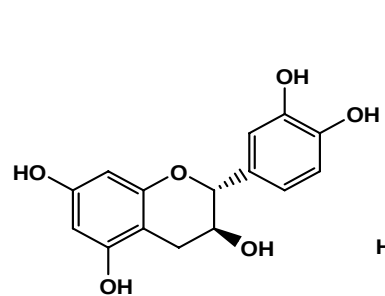


173

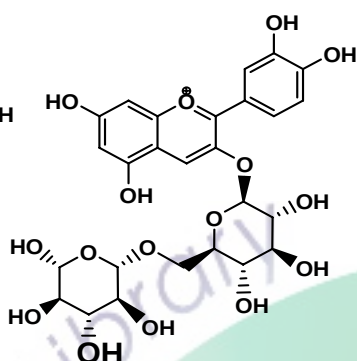


174

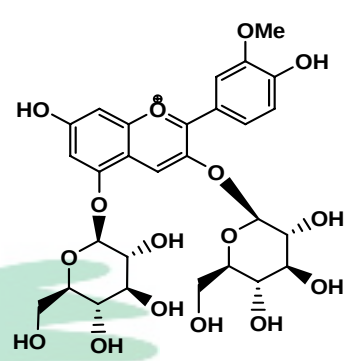
I. Catechins



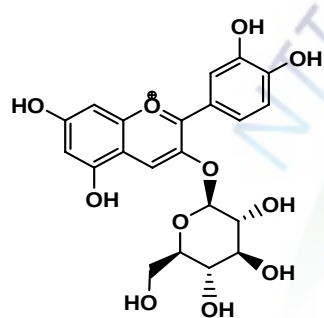
175



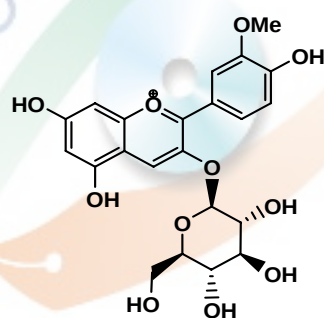
176



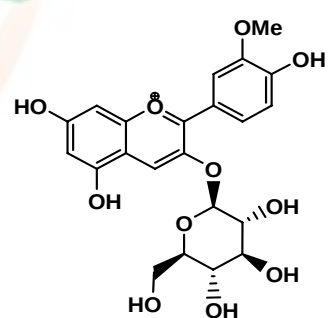
177



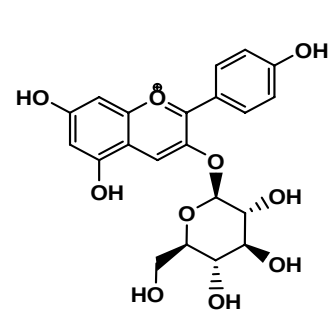
178



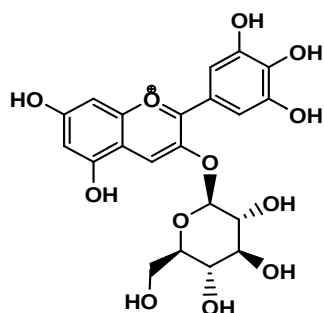
179



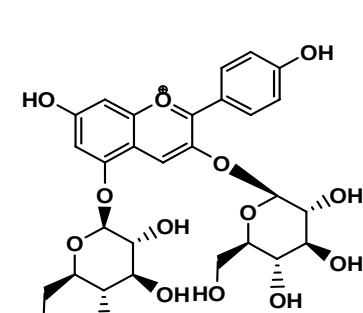
180



181

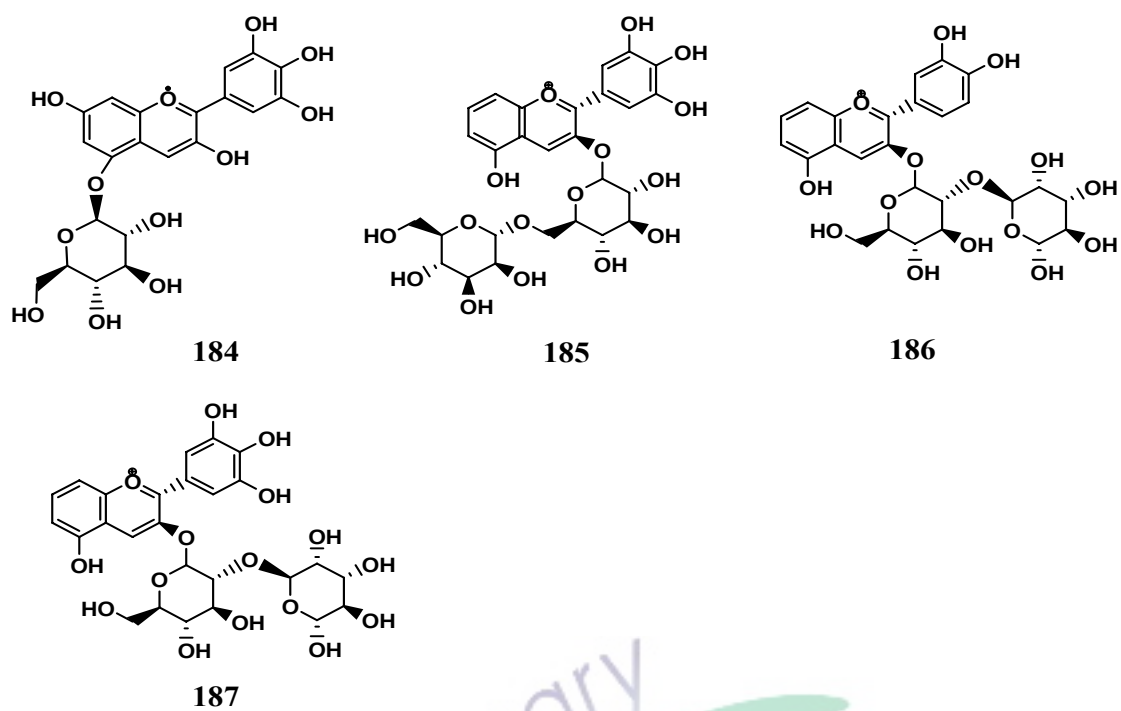


182

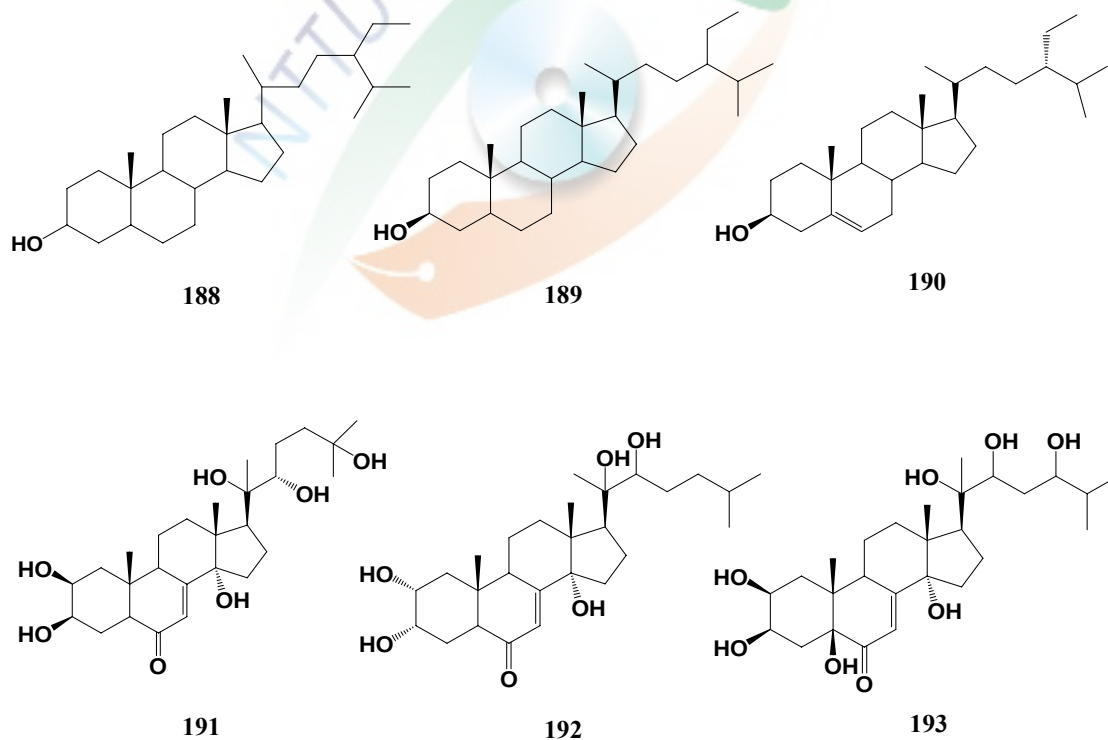


183

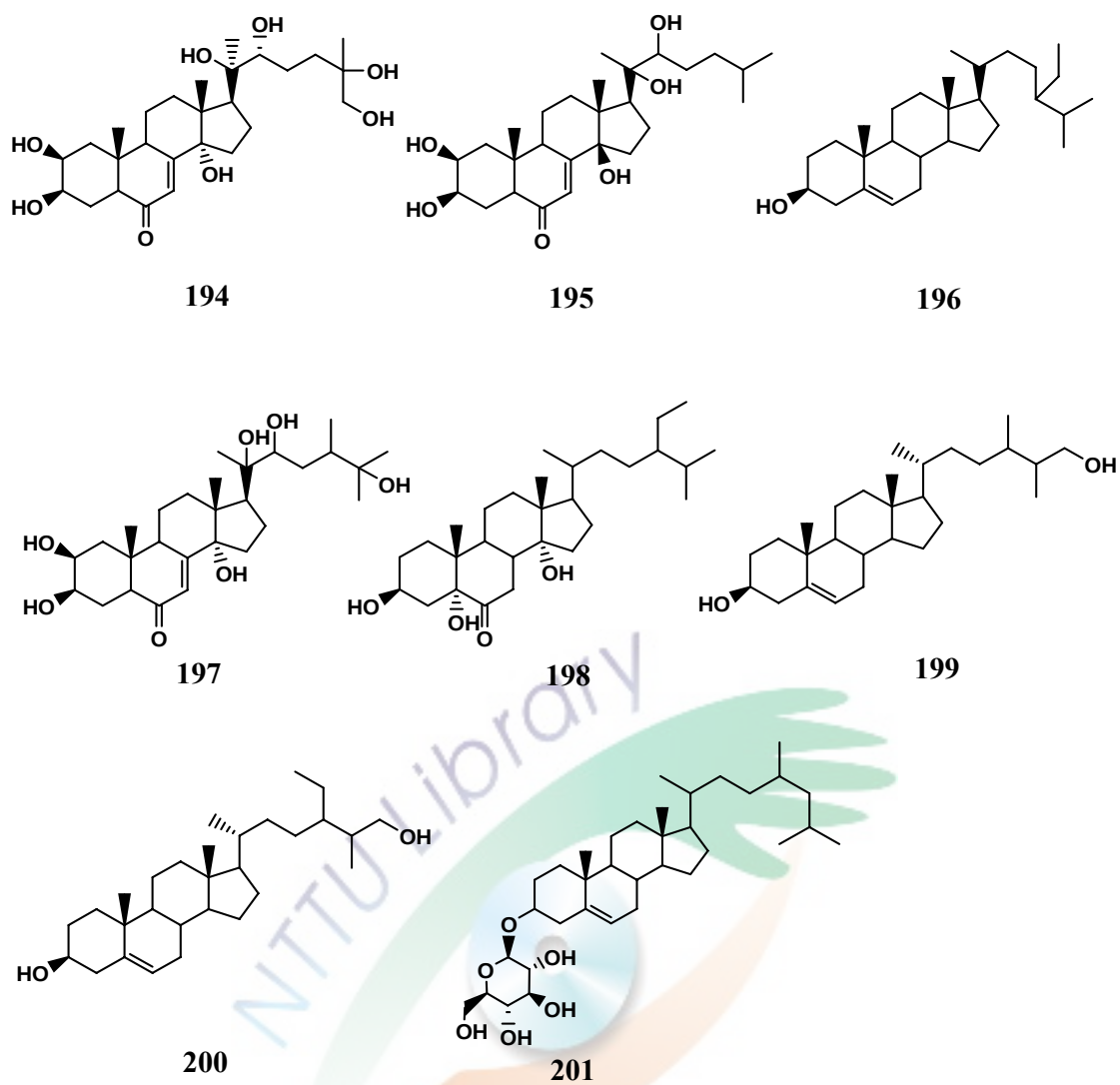
圖二、羅漢松(*Podocarpus*)屬植物化合物之化學結構(續)



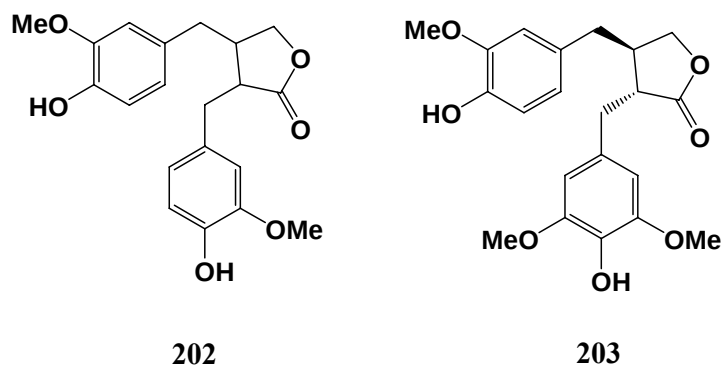
J. Steroids



圖二、羅漢松(*Podocarpus*)屬植物化合物之化學結構(續)

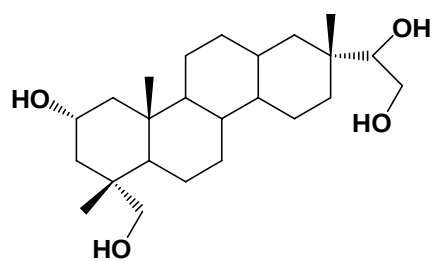


K. Lignans

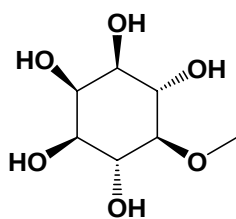


圖二、羅漢松(*Podocarpus*)屬植物化合物之化學結構(續)

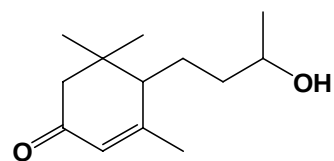
L. Other



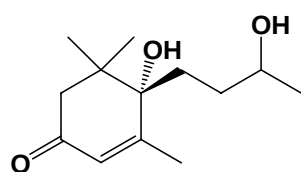
204



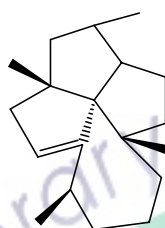
205



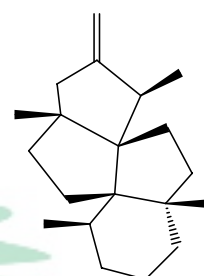
206



207



208



209

圖二、羅漢松(*Podocarpus*)屬植物化合物之化學結構(續)

第二章 材料與方法

第一節 實驗儀器與藥品

一. 層析儀器 (Chromatography)

(一). 管柱層析 (Column Chromatography)

1. 管柱：不同口徑長度之玻璃管柱
2. 填充物：E. Merck silica gel 60 F₂₅₄，70-230 mesh
E. Merck silica gel 60 F₂₅₄，230-460 mesh

(二). 薄層層析 (Thin-layer Chromatography)

1. 分析型：E. Merck Kieselgel 60 F₂₅₄ silica gel，
pre-coated aluminum plate or glass plate，0.2 mm
2. 製備型：E. Merck Kieselgel 60 F₂₅₄ silica gel，pre-coated
glass plate，1 mm

(三). 高壓液相層析儀(High-Performance Liquid Chromatography)

1. 幫浦(pump): Shimadzu LC-6AD Liquid Chromatograph
Dynamax model SD-200 solvent delivery system
2. 層析管柱(Column): E. Merck Li Chrosorb Si 60 (7 μm)
Water RP-18 (5 μm)，10×250 nm
3. 檢測器：Shimadzu SPD-6AV UV-VIS Spectrophotometric
detector
Dynamax model UV-1 adsorbance detector

二. 光譜分析儀器：

(一)紅外線光譜儀(Infrared spectra IR): Avatar 320 FT-IR

(二)核磁共振光譜儀(Nuclear Magnetic Resonance Spectra,NMR):

1. Varian Gemini (200 MHz) FT-NMR
2. Bruker AC-400 (400 MHz) FT-NMR

3. Varian Gemini (500 MHz) FT-NMR

三. 質譜儀器: (Mass Spectra, MS)

Joel JMS-HX 110 Mass Spectrophotometer (國立中國醫藥研究所)

Joel SX-102A Mass Spectrophotometer (中部貴儀中心, 中興大學)

四. 熔點測定儀(Melting Point): Yanaco micro melting point apparatus

五. TLC spot 之檢出器及反應試劑:

(一) UV(長波 365 nm, 短波 254 nm)

(二) 5% 硫酸溶液、Anisaldehyde-sulphuric(茴香醛)溶液

六. 濃縮機:

(一) Buchi B-480 Waterbath

(二) Buchi R-114 Rotavapor

(三) Buchi B-720 vacuum controller

七. 溶劑:

正己烷 *n*-Hexane

二氯甲烷 Dichloromethane

氯仿 Chloroform

乙酸乙酯 Ethyl acetate

甲醇 Methanol

丙酮 Acetone

乙醇 Ethanol 95%

第二節 桃實百日青化學成分之萃取與分離

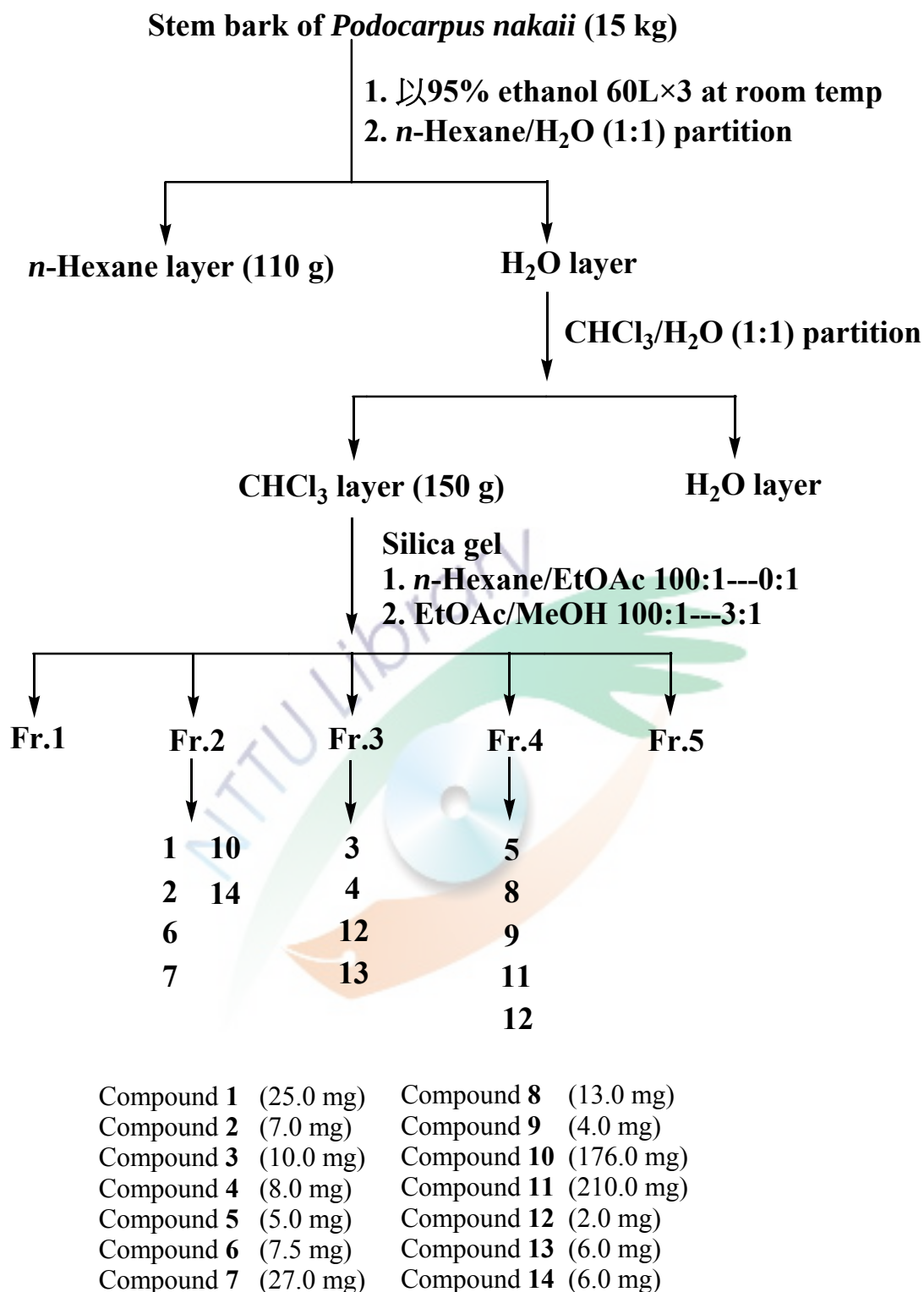
採自南投山區的桃實百日青(經由高木村 老師鑑定)，其莖皮部重約 15 公斤，以粉碎機磨碎，依所示之流程圖(圖三)，利用甲醇(MeOH) 60 公升在室溫中浸泡萃取三次，以紗布過濾，濃縮得到棕黑色之油狀物。再以水及正己烷(*n*-Hexane)進行液相液相分配萃取，得到 *n*-Hexane 層及水層(H₂O layer)，將水層和氯仿(CHCl₃)再進行一次液液分配萃取，得到氯仿層和水層，氯仿層經濃縮後得到約重 150 克的粗萃物。將氯仿層以矽膠管柱層析法(Silica gel, 70-230 mesh, 8×45 cm)，利用正己烷/乙酸乙酯(EtOAc)以 100:1 到 0:1 的比例進行梯度沖提，再以乙酸乙酯/甲醇以 100:1 到 3:1 的比例進行梯度沖提。最後以薄層色層分析(TLC)片判斷將其合併，共分得 5 各部份(Fr. 1-5)。

第二個部份(Fr. 2)利用矽膠管柱層析法以正己烷/乙酸乙酯/甲醇以 50:1:1 到 2:2:1 的比例進行梯度沖提得到 5 個部份(2-A~2-E)。取 Fr.2-B 使用 Sephadex LH-20 色層分析以甲醇(MeOH)/二氯甲烷(CH₂Cl₂) 1:1 做沖提溶液，以薄層色層分析(TLC)片判斷將其合併，共分得 7 個部份(2-B-1~2-B-7)，Fr.2-B-3 利用在結晶方式得到化合物 **10** (176.0 mg)。取 Fr.2-B-7 利用正向高效能液相色層分析儀(HPLC)，以正己烷/乙酸乙酯(6:1)做沖提液分離，分別得到化合物 **1** (25 mg) 和 **2** (7.0 mg)。取 Fr.2-D 以 Sephadex LH-20 色層分析以甲醇(MeOH)/二氯甲烷(CH₂Cl₂) 1:1 做沖提溶液，得到 5 個部份(2-D-1~2-D-5)，取 2-D-2 利用正向高效能液相色層分析儀(HPLC)，以正己烷/乙酸乙酯(8:1)做沖提液分離，得到化合物 **7** (27.0 mg)、化合物 **14** (6.0 mg)。2-D-4 再以結晶方式得到化合物 **6** (7.5 mg)。

第三個部份(Fr. 3) 利用矽膠管柱層析法以二氯甲烷/甲醇以 100:1 到 4:1 的比例進行梯度沖提得到 5 個部份(3-A~2-E)，取 3-B 利

用 Sephadex LH-20 色層分析以甲醇(MeOH)/氯仿 1:1 做沖提溶液得到 3 個部份(3-B-1~3-B-3)，取 Fr. 3-B-2 利用再結晶方式得到化合物 **3** (10.0 mg)和化合物 **4** (8.0 mg)，再利用 Fr.3-B-2 洗出部分，以正向高效能液相色層分析儀(HPLC)，以正己烷/乙酸乙酯/甲醇(25:10:1)做沖提液分離，得到化合物 **13** (6.0 mg)。取 Fr. 3-B-3，以正向高效能液相色層分析儀(HPLC)，以正己烷/乙酸乙酯/甲醇(20:10:1)做沖提液分離，得到化合物 **12** (2.0 mg)。取 Fr.3-D 使用 Sephadex LH-20 色層分析以甲醇(MeOH)/氯仿 3:1 做沖提溶液得到 3 個部(3-D-1~3-D-3)，取 Fr. 3-D-2 利用矽膠管柱層析法以二氯甲烷/甲醇以 50:1 到 4:1 的比例進行梯度沖提得到 5 個部份(3-D-2-A~3-D-2-E)，取 Fr. 3-D-2-B 以正向高效能液相色層分析儀(HPLC)，以正己烷/乙酸乙酯/甲醇(20:10:1)做沖提液分離，得到化合物 **5** (5.0mg)。取 Fr. 3-D-2-D 以再結晶方式得到化合物 **11** (210.0 mg)。

第四個部份(Fr. 4)，利用 Sephadex LH-20 色層分析以甲醇/氯仿 3:1 做沖提溶液得到 5 個部份(4-A~4-E)取 Fr.4-D 利用矽膠管柱層析法以二氯甲烷/甲醇以 50:1 到 4:1 的比例進行梯度沖提得到 4 個部份(4-C-1~4-C-3)，使用製備型薄層色層分析板，以正己烷/乙酸乙酯/甲醇(3:3:1)做展開液展開，得到化合物 **8** (13.0 mg)、化合物 **9** (4.0 mg)。



圖三、桃實百日青(*Podocarpus nakaii*)分離流程

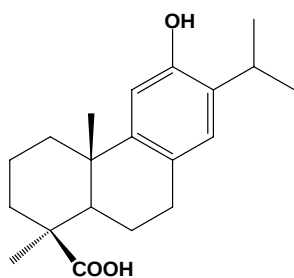
第三章 結果與討論

第一節 結構解析

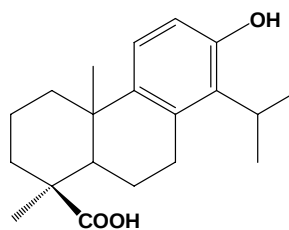
利用核磁共振儀(NMR)測定化合物，利用其氫譜(^1H -NMR)、碳譜(^{13}C -NMR)、DEPT 及二維圖譜如：HMQC、HMBC、 ^1H - ^1H COSY 及 NOESY 等，以及利用低解析質譜儀器(EI-MS)與電灑游離法質譜(ESI-MS) 測量化合物的分子量或分子式，及其他物理資料和文獻比對，來確定其結構。

經以上各種物理資料和文獻比對，從氣仿層中分離得到十四個化合物，包含一個新化合物為 podonakachalcone A (**13**)，以及十三個已知化合物分別為；lambertic acid (**1**)、4 β -carboxy-17-hydroxy-19-nortotarol (**2**)、inumakilactones B (**3**)、podolacton E (**4**)、vomifoliol (**5**)、isovanillin (**6**)、4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde (**7**)、vanillin acid (**8**)、4-ethoxy-3-hydroxybenzoic acid (**9**)、 β -sitosterol (**10**)、 β -stiosteryl glucoside (**11**)、4,4'-dihydroxychalcone (**12**)，一個苯丙基類化合物 **14** 其中化合物 **9** 為首次在天然物中發現。

Diterpenoids

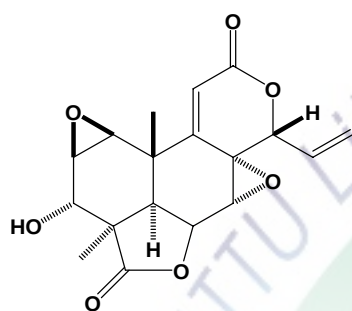


Lambertic acid (1)

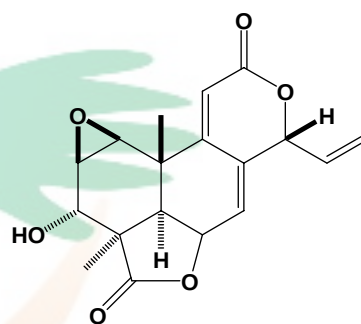


4β-Carboxy-17-hydroxy-
19-nortotarol (2)

Norditerpenoids

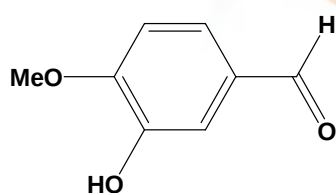


Inumakilactones B (3)

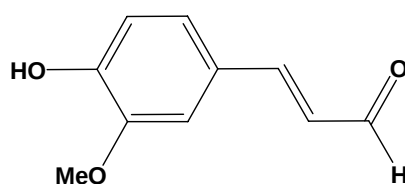


Podolacton E (4)

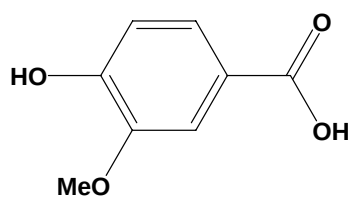
Benzenoids



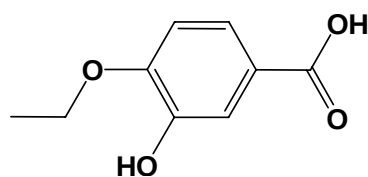
Isovanillin (6)



4-hydroxy-3-methoxy-
cinnamaldehyde (7)

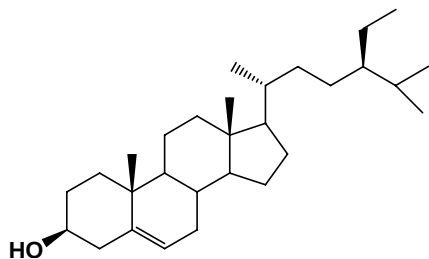


Vanillin acid (8)

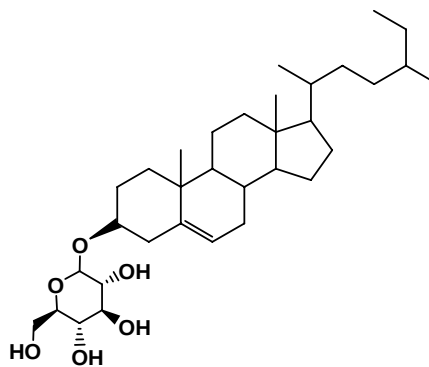


4-Ethoxy-3-hydroxy-benzoic acid (9)**

Steroids

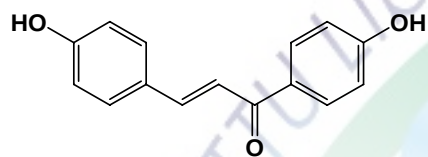


β -sitosterol (10)

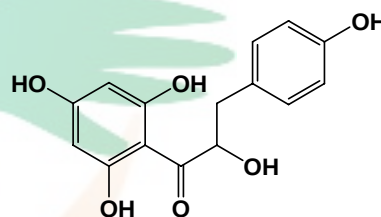


β -Stiosteryl glucoside (11)

Chalcone

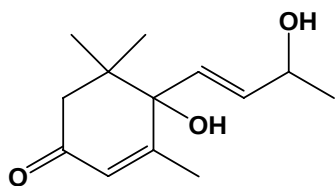


4,4'-Dihydroxychalcone (12)

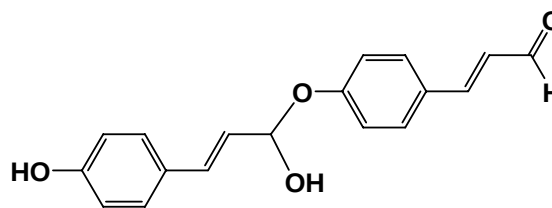


Podonaka A (13)*

Other



Vomifoliol (5)

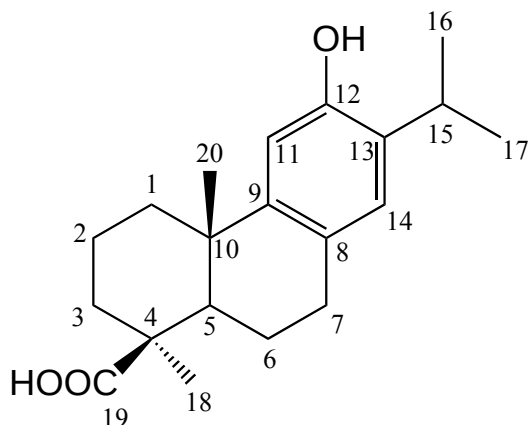


化合物 14

*: 為首次發現之化合物

** : 為天然物首次發現之化合物

一、(1) Lambertic acid 之結構解析



化合物(1)為黃色塊狀結晶，熔點為 267~269 °C；由電子游離質譜 (EI-MS) 分析顯示 (圖 1-6) 其分子離子峰 $[M]^+$ 為 m/z 316，推算其分子式為 $C_{20}H_{28}O_3$ 。紅外線吸收光譜 (IR) (圖 1-7) 在 3426 cm^{-1} ，有羥基 (OH) 訊號吸收； 1693 cm^{-1} 有羰基 (CO) 的吸收訊號。

由 $^1\text{H-NMR}$ (圖 1-1) 在芳香質子區域 $\delta_{\text{H}} 6.75$ (1H, *s*, H-11)、 $\delta_{\text{H}} 6.78$ (1H, *s*, H-14) 和 $^{13}\text{C-NMR}$ (圖 1-2) 顯示有一組對位偶合的芳香環訊號和有六個不飽和度，判斷為一個三環之化合物。在 $\delta_{\text{C}} 126.0$ (C-8)、 $\delta_{\text{C}} 146.4$ (C-9)、 $\delta_{\text{C}} 111.6$ (C-11)、 $\delta_{\text{C}} 152.5$ (C-12)、 $\delta_{\text{C}} 132.2$ (C-13)、 $\delta_{\text{C}} 126.5$ (C-14) 顯示有一個芳香環；在 C-12 上顯示該位有羥基取代。有兩支單峰甲基 $\delta_{\text{H}} 1.13$ (H-18)、 $\delta_{\text{H}} 1.32$ (H-20) 及苯環上接在羥基旁的異丙基 $\delta_{\text{H}} 1.19$ (6H, *t*, $J=4.0\text{ Hz}$, H-16, H-17) 及 $\delta_{\text{H}} 3.20$ (1H, *m*, H-15)，另外 $\delta_{\text{C}} 178.3$ (C-19) 則有一酸基的訊號。

在 COSY 圖譜顯示 (圖 1-5)，(H-1, H-2, H-3)、(H-6, H-7) 和 (H-15, H-16, H-17) 有偶合的關係。另外配合 HMBC (圖 1-4) $\delta_{\text{C}} 178.3$ (C-19) 和 $\delta_{\text{H}} 1.10$ (H-3 $_{\alpha}$)、 1.54 (H-5) 及 1.13 (H-18) 有偶合可確定酸基 (COOH) 連接的位置。 $\delta_{\text{C}} 38.3$ (C-10) 和 $\delta_{\text{H}} 2.16$ (H-1 $_{\beta}$)、 1.54 (H-5)、 2.21 (H-6) 及

1.32 (H-20)有偶合。 δ_C 132.2 (C-13) 和 δ_H 1.19 (H-16,17)及 3.20 (H-15) 有偶合可確定異丙基和羥基在方香環上的位置。

根據以上資料，本化合物含有一個異丙基、羥基和酸基，再配合 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、HMQC、HMBC、DEPT 等圖譜，確定此化合物結構後，再比對文獻資料，^{30,31} 確定此化合物為 Lambertic acid。



表 3-1 化合物 **1** 之核磁共振圖譜數據整理

Lambertic acid (500Hz) CDCl ₃		
Position	¹ H	¹³ C
1	1.35 (<i>ddd</i> , 13.0, 13.0, 3.5) 2.16 (<i>br,d</i> , 13.0)	39.7
2	1.57 (<i>dt</i> , 14.5, 3.5) 2.01 (<i>ddd</i> , 13.0, 13.0, 5.0)	20.2
3	1.10 (<i>ddd</i> , 13.0, 13.0, 4.0) 2.22 (<i>br,d</i> , 13.0)	37.8
4		43.6
5	1.54 (<i>d</i> , 12.0)	52.9
6	2.20 (<i>dd</i> , 17.0, 5.0)(2H)	21.6
7	2.96 (<i>ddd</i> , 16.5,13.0,5.0) 2.77 (<i>dd</i> , 16.5, 8.0)	31.4
8		126.5
9		146.4
10		38.4
11	6.75 (<i>s</i>)	111.6
12		152.5
13		132.2
14	6.80 (<i>s</i>)	126.5
15	3.20 (<i>m</i>)	26.8
16	1.19 (<i>t</i> , 4.0)	22.3
17	1.19 (<i>t</i> , 4.0)	22.4
18	1.13 (<i>s</i>)	28.4
19		178.3
20	1.32 (<i>s</i>)	23.0

J values in Hz

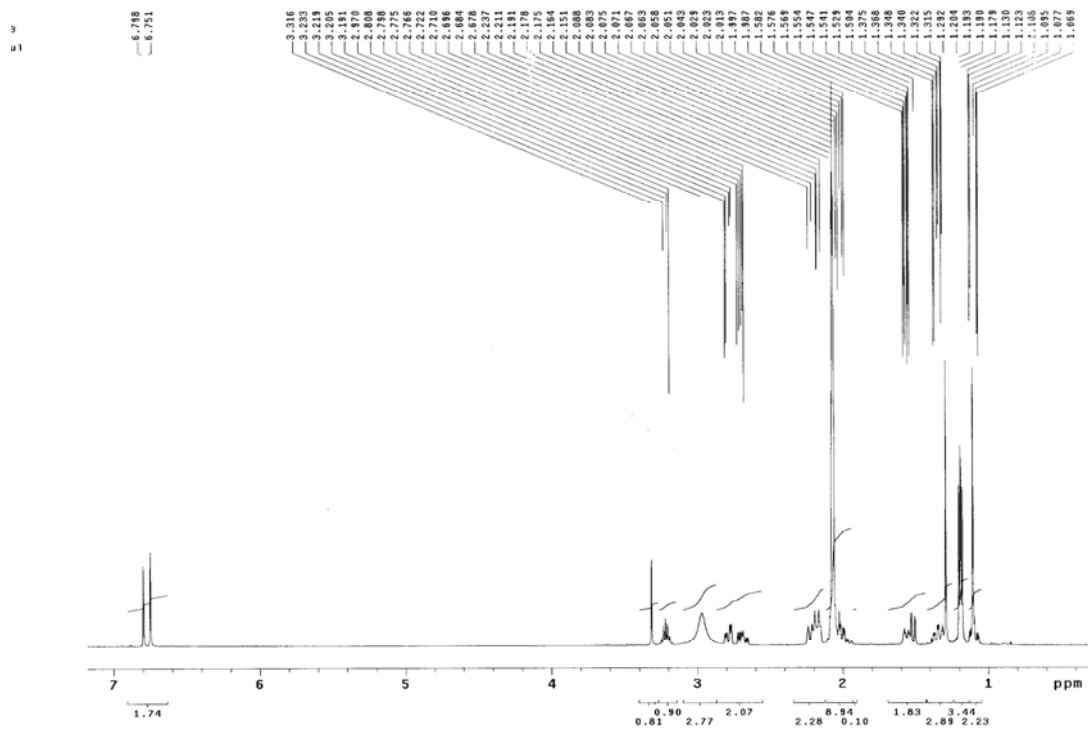


圖 1-1. Lambertic acid (1)之 ^1H -NMR 圖譜

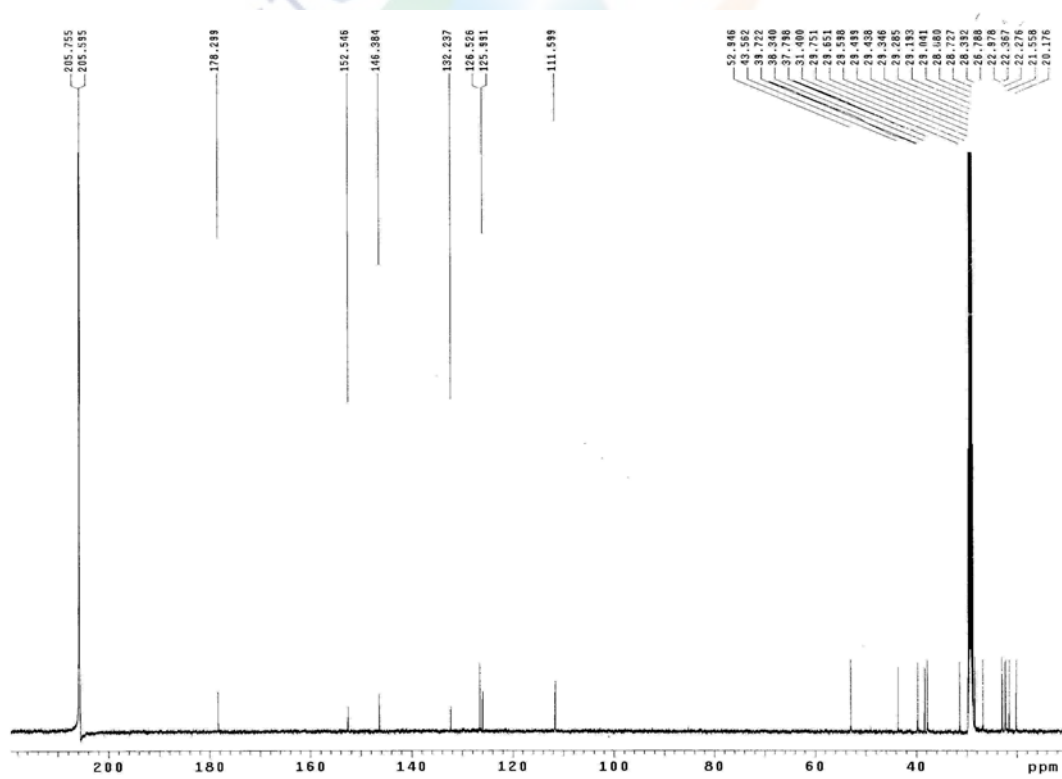


圖 1-2. Lambertic acid (1)之 ^{13}C -NMR 圖譜

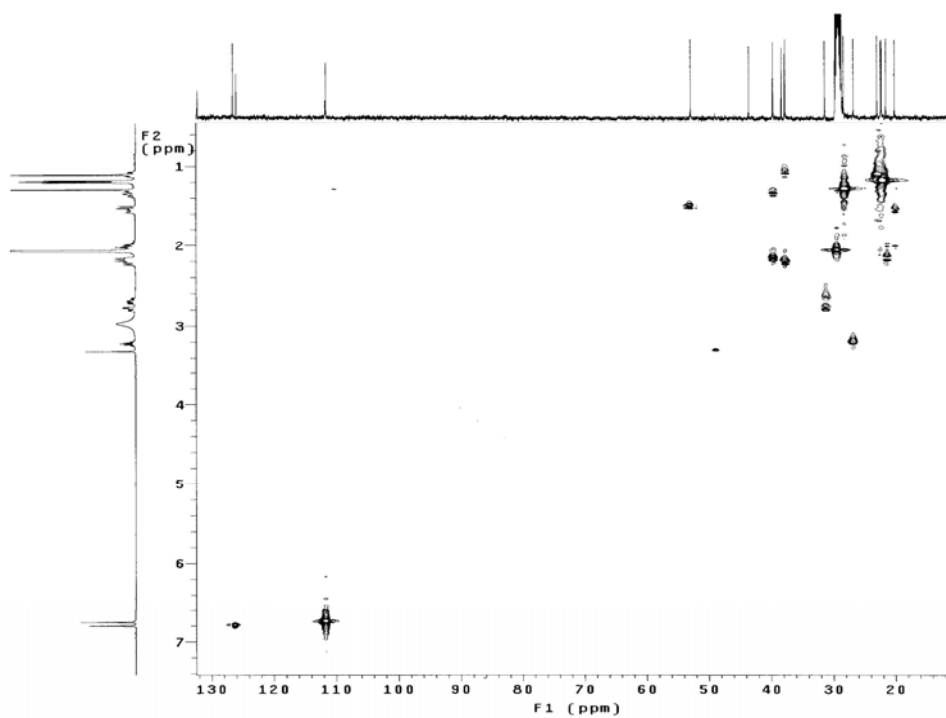


圖 1-3. Lambertic acid (1)之 HMQC 圖譜

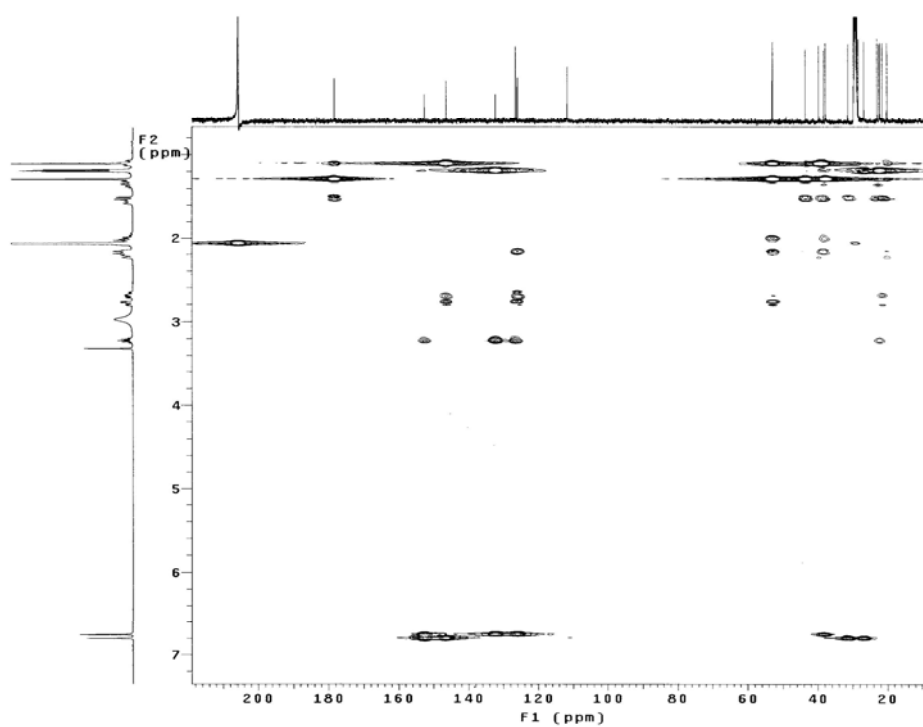


圖 1-4. Lambertic acid (1)之 HMBC 圖譜

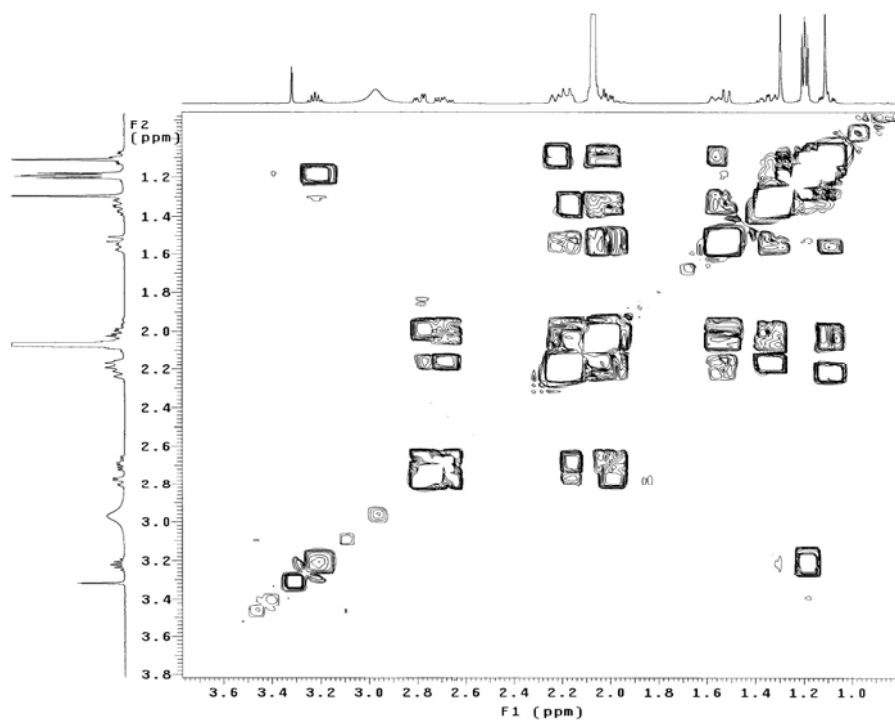


圖 1-5. Lambertic acid (1)之 COSY 圖譜

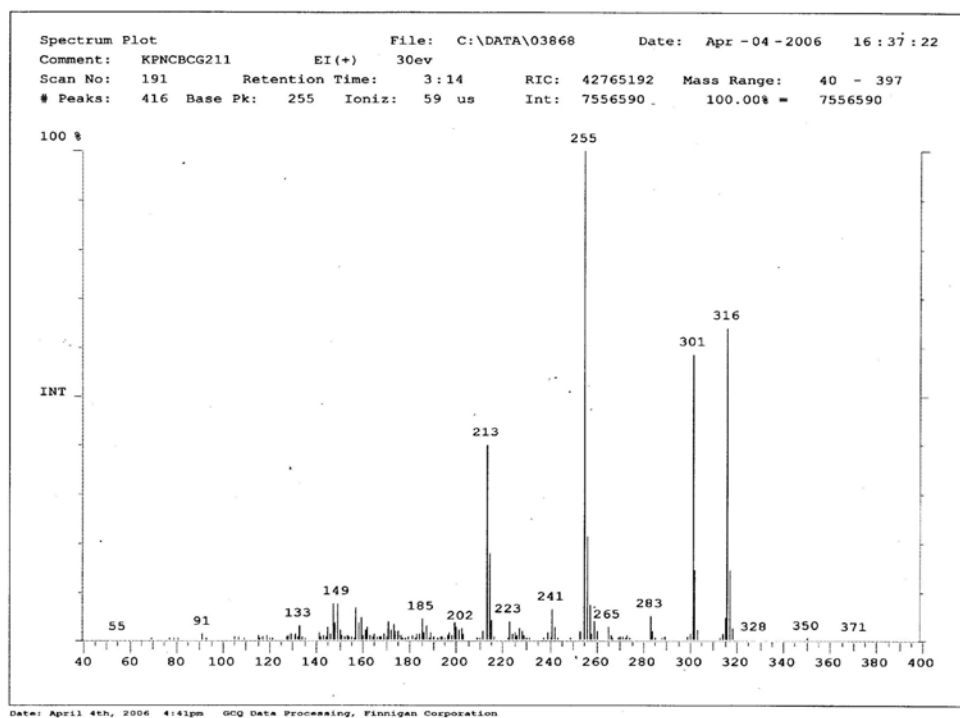


圖 1-6. Lambertic acid (1)之 EI-MS 圖譜

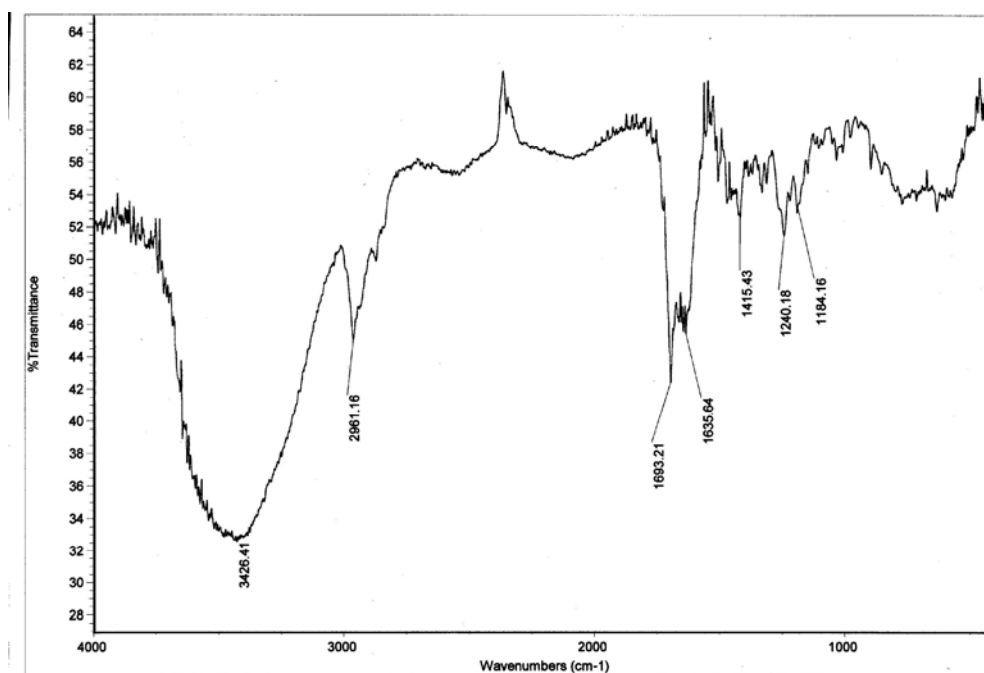
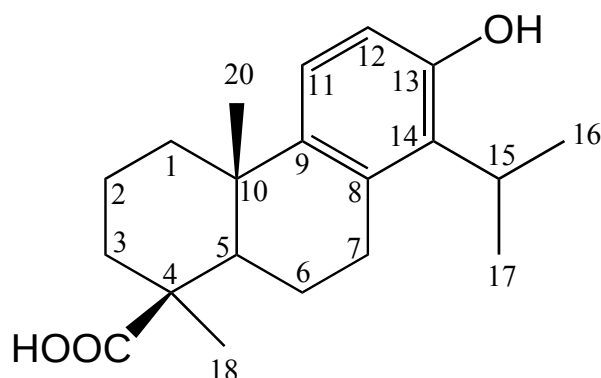


圖 1-7. Lambertic acid (1)之 IR 圖譜

二、4 β -Carboxy-19-nortotarol (2)之結構解析



化合物 **2** 為淺黃色粉末，熔點為 183~185°C；由電子游離質譜 (EI-MS) 分析顯示 (圖 2-6) 其分子離子峰[M]⁺ 為 m/z 316，推算其分子式為 C₂₀H₂₈O₃。紅外線吸收光譜(IR) (圖 2-7) 在 3394 cm⁻¹，有羥基 (OH) 訊號吸收；1693 cm⁻¹ 有羰基 (CO) 的吸收訊號和 1586 cm⁻¹、1453 cm⁻¹、1358 cm⁻¹ 有苯環上雙鍵的吸收訊號。

由 ¹H-NMR (圖 2-1) 在芳香質子區域 δ_H 6.95 (1H, *d*, $J = 8.4$ Hz, H-11)、 δ_H 6.50 (1H, *d*, $J = 8.4$ Hz, H-12) 顯示有一組鄰位耦合的芳香環訊號和有六個不飽和度，判斷為一個三環之化合物。¹³C-NMR (圖 2-2)； δ_C 134.3 (C-8)、 δ_C 141.0 (C-9)、 δ_C 124.1 (C-11)、 δ_C 114.5 (C-12)、 δ_C 152.0 (C-13)、 δ_C 130.8 (C-14) 顯示有一個芳香環；在 C-13 上表示該位有拉電子羥基取代。有兩支單峰甲基 δ_H 1.33 (H-18)、 δ_H 1.10 (H-20) 及苯環上接在羥基旁的異丙基 δ_H 1.31 (6H, *d*, $J = 7.2$ Hz, H-16, H-17)、 δ_H 3.25 (1H, *m*, H-15)，另外 δ_C 183.7 (C-19) 則有一酸基(COOH) 的訊號。

在 COSY 圖譜顯示 (圖 2-5)，(H-1, H-2, H-3)、(H-5, H-18)、(H-6, H-7) 和 (H-15, H-16, H-17) 有耦合關係。另外配合 HMBC (圖 2-4) δ_C 183.7 (C-19) 和 δ_H 1.33 (H-18) 及 1.46 (H-5) 有耦合，可確認 COOH 連接位置。 δ_C 152.0 (C-13) 可之羥基所接位置， δ_C 130.8 (C-14) 和 δ_H 3.25 (H-15)、 δ_H

1.31 (H-16,17) 有相連關係，可確定異丙基在方香環上的位置。

根據以上資料，本化合物各有一個異丙基、羥基和酸基，再配合¹H-NMR、¹³C-NMR、HMQC、HMBC、DEPT 等圖譜，確定此化合物結構後，再比對文獻資料，^{30, 31, 35} 確定此化合物為 4β-carboxy-19-nortotarol。



表 3-2 化合物 **2** 之核磁共振圖譜數據整理

4 β -carboxy-19-nortotal (500Hz) CDCl ₃		
Position	¹ H	¹³ C
1	1.24 (<i>ddd</i> , 14.0, 14.0, 3.2) 2.21 (<i>br,d</i> , 14.0)	40.1
2	1.58 (<i>br,d</i> , 14.0)(2H)	20.0
3	1.03 (<i>ddd</i> , 13.6, 13.6, 4.4) 2.01 (<i>br</i> , 14.0)	37.2
4		43.7
5	1.46 (<i>d</i> , 12.8)	52.0
6	2.0 (<i>m</i>) 2.23 (<i>br d</i> , 14.0)	21.1
7	2.63 (<i>ddd</i> , 16.4, 12.8, 6.0) 2.95 (<i>dd</i> , 16.4, 4.4)	30.9
8		134.3
9		141.0
10		38.5
11	6.95 (<i>d</i> , 8.4)	124.1
12	6.50 (<i>d</i> , 8.4)	114.5
13		152.0
14		130.8
15	3.25 (<i>m</i>)	27.2
16	1.31 (<i>d</i> , 7.2)	20.4
17	1.31 (<i>d</i> , 7.2)	20.3
18	1.33 (<i>s</i>)	30.0
19		183.7
20	1.10 (<i>s</i>)	23.2

J values in Hz

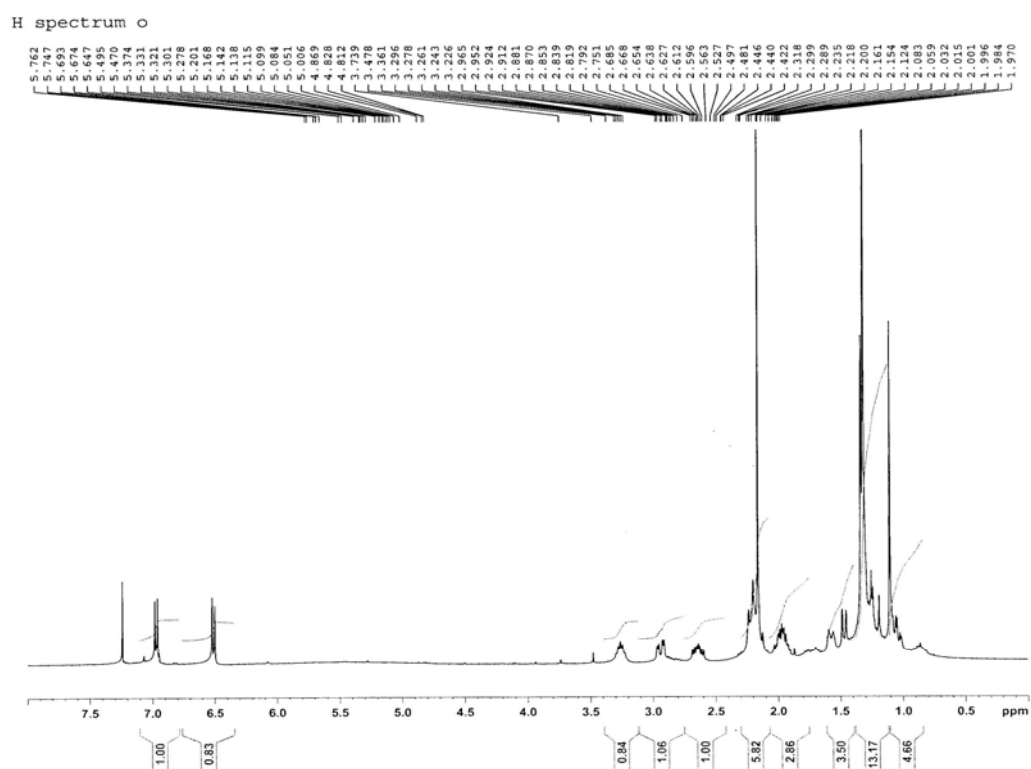


圖 2-1. 4β-Carboxy-19-nortotarol (2)之 ^1H -NMR 圖譜

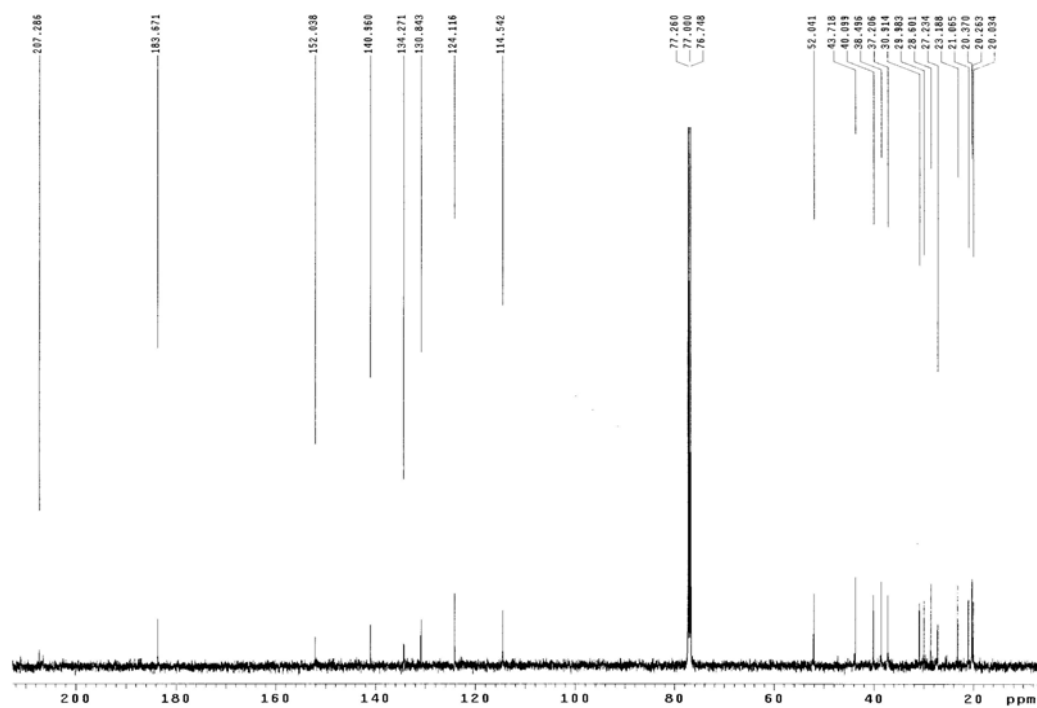


圖 2-2. 4β-Carboxy-19-nortotarol (2)之 ^{13}C -NMR 圖譜

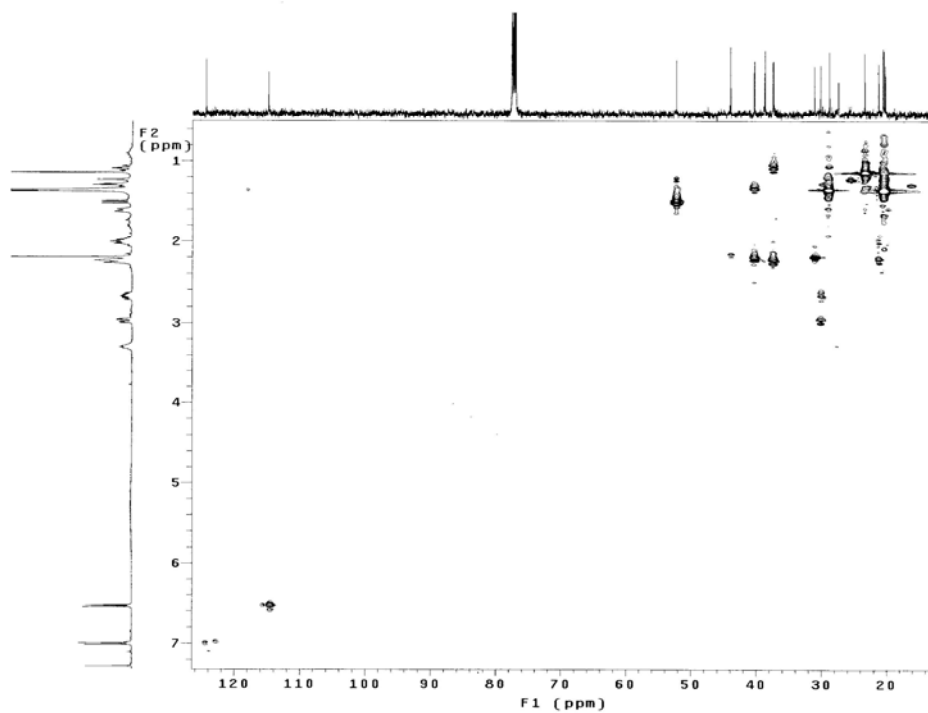


圖 2-3. 4 β -Carboxy-19-nortotarol (2)之 HMQC 圖譜

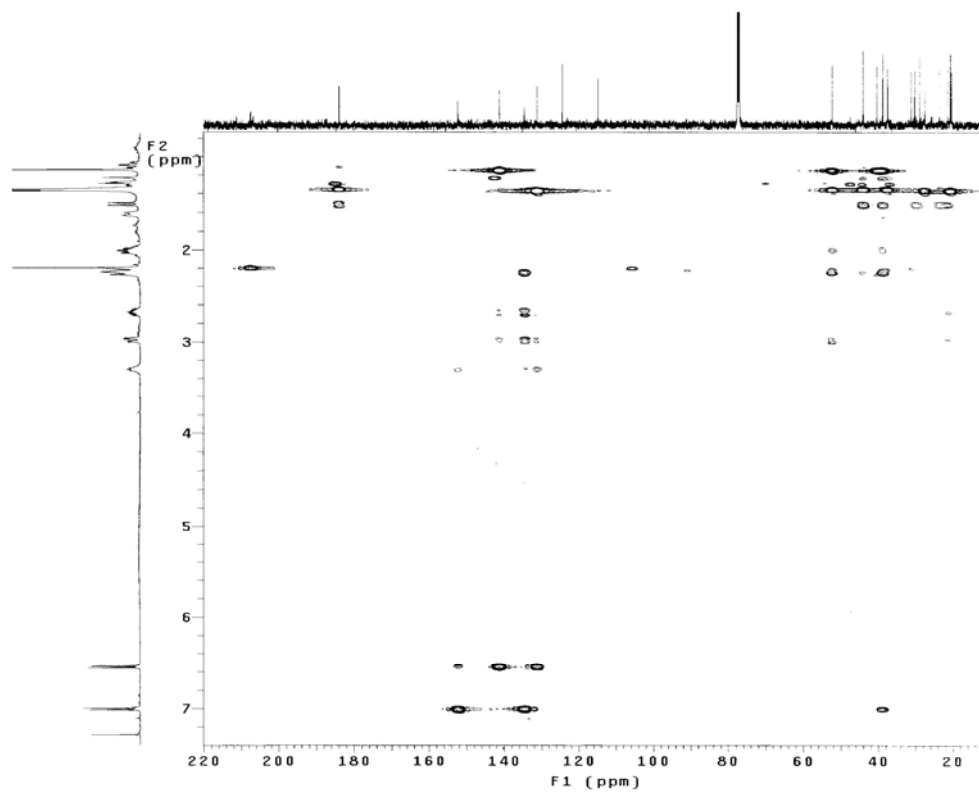


圖 2-4. 4 β -Carboxy-19-nortotarol (2)之 HMBC 圖譜

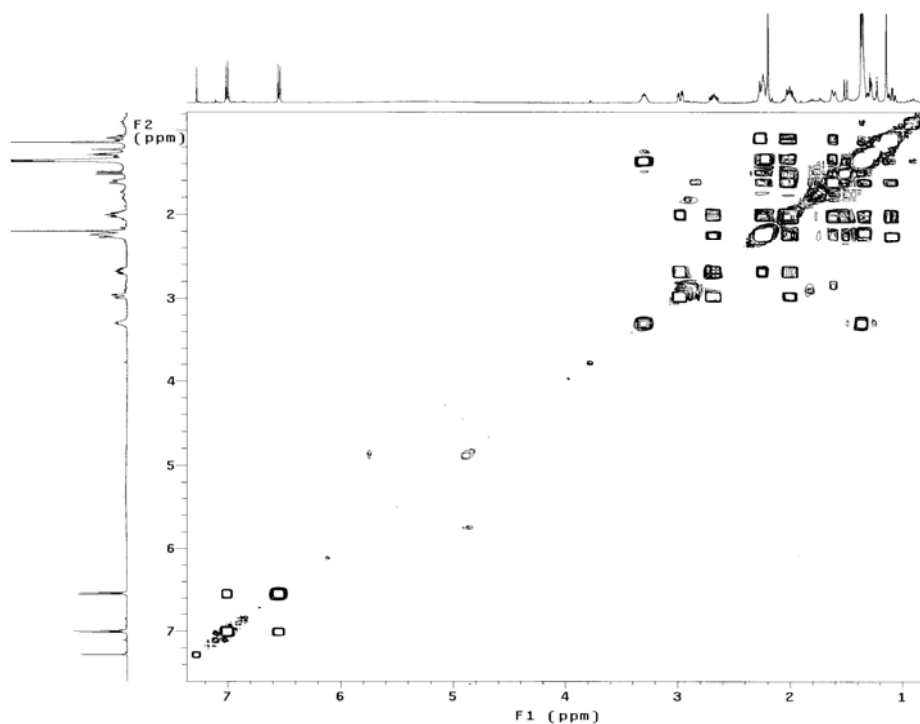


圖 2-5. 4 β -Carboxy-19-nortotarol (2)之 COSY 圖譜

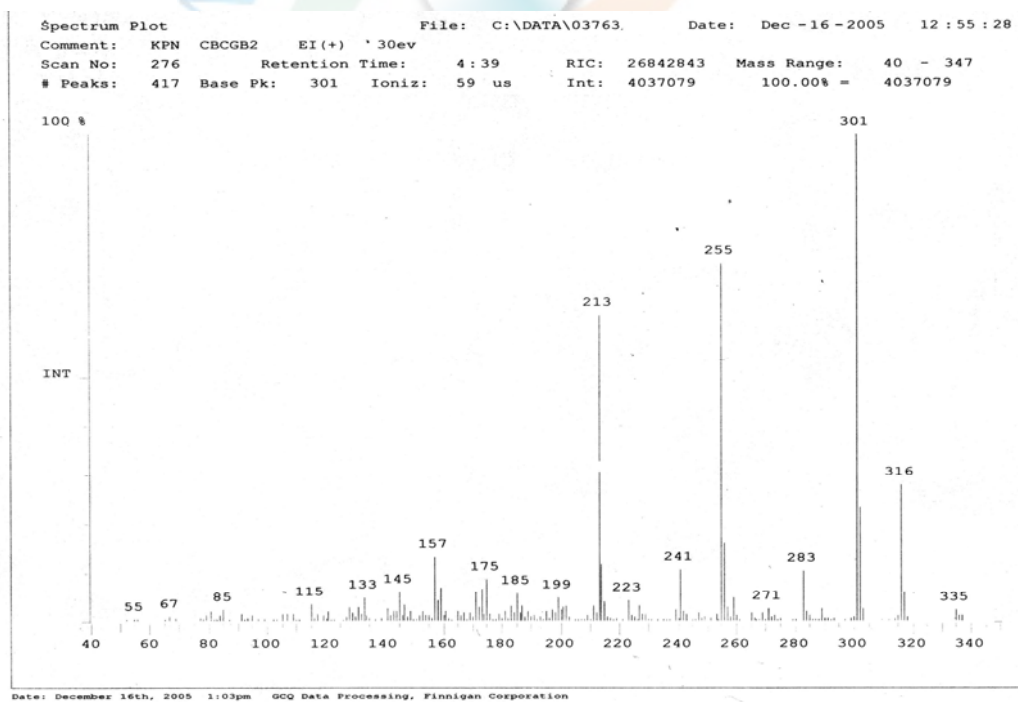


圖 2-6. 4 β -Carboxy-19-nortotarol (2)之 EI-MS 圖譜

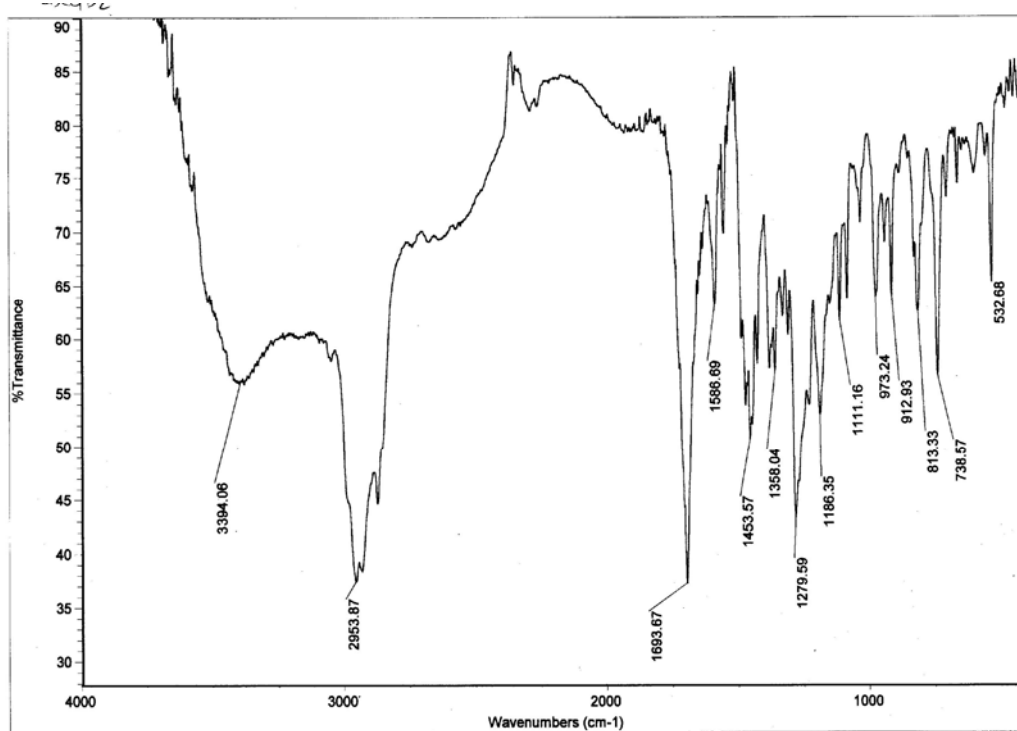
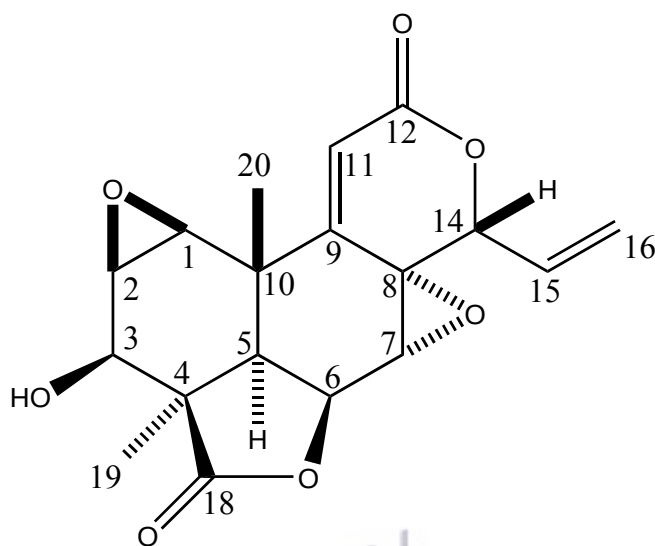


圖 2-7. 4β-Carboxy-19-nortotarol (2)之 IR 圖譜

三、Inumakilactones B (3)之結構解析



化合物 **3** 為無色塊狀結晶，熔點為 258~261 °C；由電灑游離法質譜 (ESI-MS)，分析顯示(圖 3-7)其分子離子峰 $[2M+Na]^+$ 為 m/z 715.8，推算其分子式為 $C_{18}H_{18}O_7$ 。紅外線吸收光譜(IR) (圖 3-8)在 3427 cm^{-1} 有羥基(OH)訊號吸收，在 1766 cm^{-1} 有內酯環(lacton)的吸收訊號， 1710 cm^{-1} 、 1655 cm^{-1} 有共軛內酯環的吸收訊號。

由 $^1\text{H-NMR}$ (圖 3-1)和 $^{13}\text{C-NMR}$ (圖 3-2)的訊號可知在高磁場區域 δ_{H} 1.33 (3H, s, H-19)、 δ_{H} 1.32 (3H, s, H-20)和 δ_{C} 24.9 (C-19)、 δ_{C} 20.8 (C-20)顯示有兩根甲基訊號。在 70.9 (C-6)、176.0 (C-18) 和 162.2 (C-12)、80.8 (C-14)顯示有兩組環內酯(lactone)訊號及氫譜顯示有八個不飽和度，推測為本屬常見 Podolacton 的骨架結構。另外在 δ_{C} 55.5 (C-1)、 δ_{C} 50.4 (C-2)、 δ_{C} 53.1 (C-7)、 δ_{C} 56.3 (C-8) 單獨接含有氧的碳訊號較少在高磁場的位置出現因而判斷有二個環氧基(epoxide)訊號。 δ_{C} 67.7 (C-3)顯示有羥基的訊號及 δ_{C} 156.5 (C-9)、 δ_{C} 119.2 (C-11)、 δ_{C} 128.4 (C-15)、 δ_{C} 123.6 (C-16)有二組雙鍵訊號。再從 DEPT 圖譜(圖 3-3)中顯示 C-16 為亞甲基而且 δ_{H} 5.80 (dt, $J=18.0, 9.0$ Hz, H-15)、 δ_{H} 5.45 (dd, $J=18.0, 9.0$ Hz, H-16)有耦合的關係且為末端雙鍵。C-9 為四級碳與 C-11 則為環內雙鍵。

在 COSY 圖譜顯示(圖 3-6)·(H-2, H-3)·(H-5, H-6)·和(H-15, H-16)有偶合的關係。另外配合 HMBC (圖 3-5) δ_C 128.4 (C-15)和 δ_H 5.13 (H-14)及 5.45 (H-16)有偶合關係，顯示 C-14 為末端雙鍵連接處。

根據上述資料，得知本化合物有二個甲基峰訊號、一個雙鍵亞甲基、一個羥基、二個環氧基和兩個環內酯鍵，再配合 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、HMQC、HMBC、DEPT 等圖譜，確定此化合物結構後，再比對文獻資料，⁴⁴ 確定此化合物為 Inumakilactones B。



表 3-3 化合物 **3** 之核磁共振圖譜數據整理

Lnumakilacton B (500Hz) <i>d</i> -pyridine		
Position	¹ H	¹³ C
1	3.42 (<i>d</i> , 4.0)	55.5
2	3.38 (<i>dd</i> , 7.5, 4.5)	50.4
3	4.48 (<i>d</i> , 4.5)	67.7
4		48.2
5	2.02 (<i>d</i> , 5.0)	45.3
6	4.86 (<i>d</i> , 5.0)	70.9
7	3.73 (<i>s</i>)	53.1
8		56.3
9		156.5
10		37.3
11	6.45 (<i>s</i>)	119.2
12		162.2
13		
14	5.13 (<i>d</i> , 9.0)	80.8
15	5.80 (<i>dt</i> , 18.0, 9.0)	128.4
16	5.45 (<i>dd</i> , 18.0, 9.0)	123.6
17		
18		176.0
19	1.33 (<i>s</i>)	24.9
20	1.32 (<i>s</i>)	20.8
OH	7.63 (<i>s</i>)	

J values in Hz

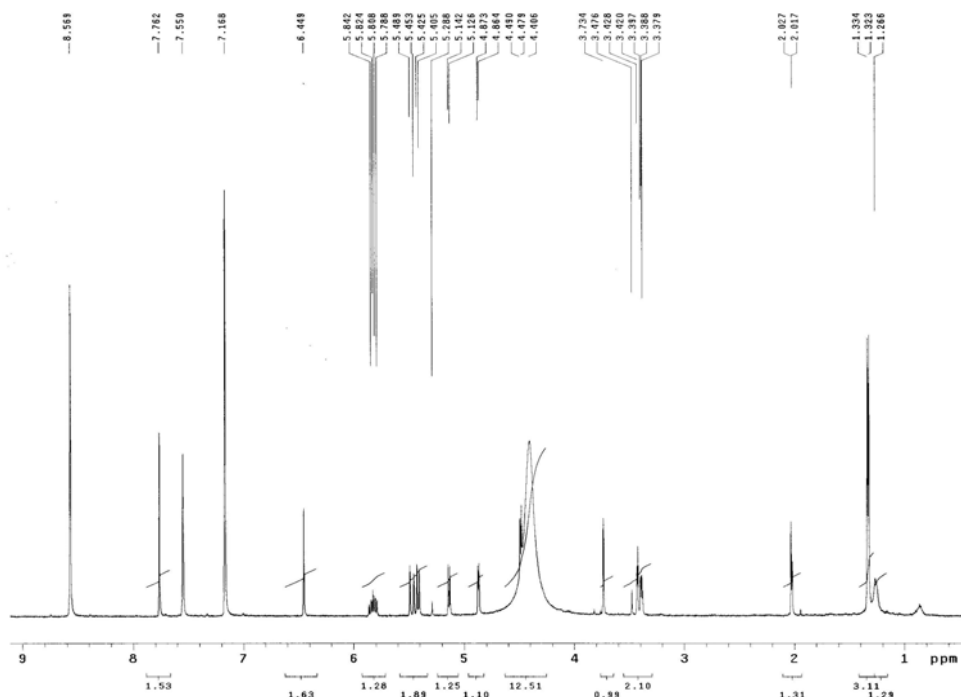


圖 3-1. Inumakilactones B (3)之 ^1H -NMR 圖譜

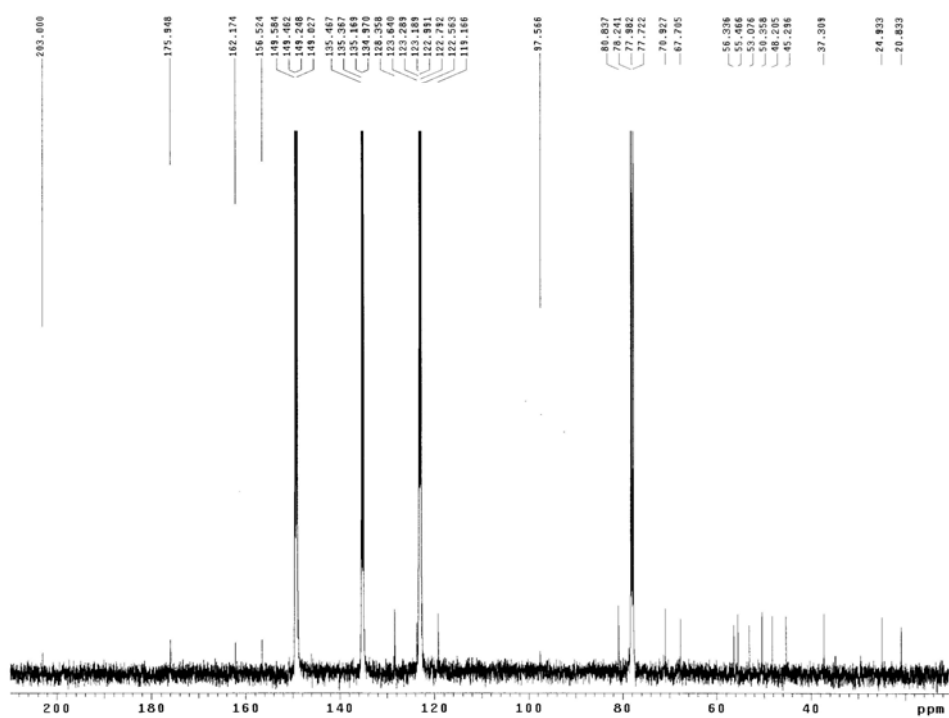


圖 3-2. Inumakilactones B (3)之 ^{13}C -NMR 圖譜

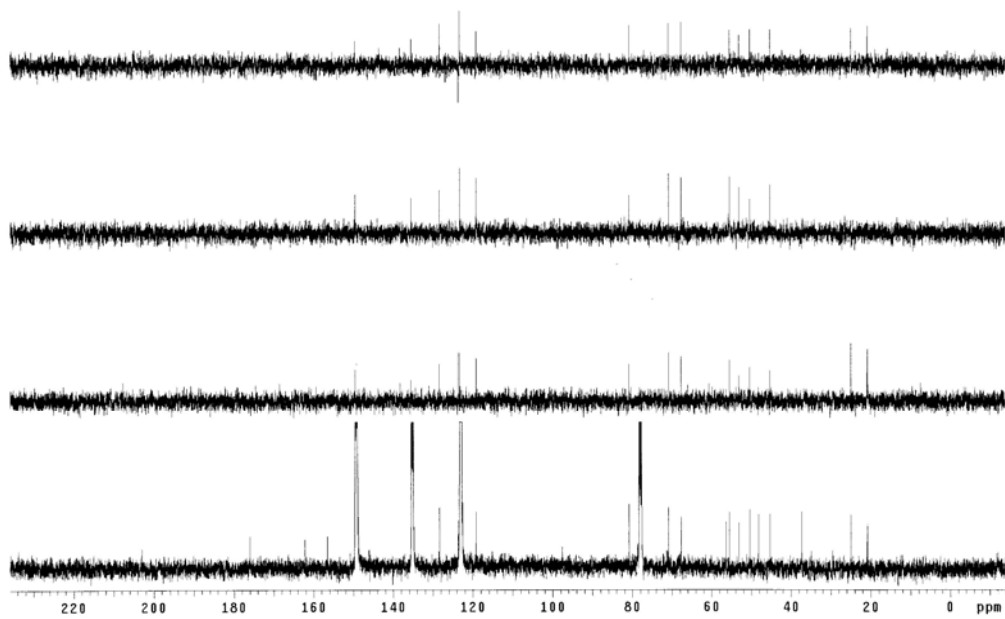


圖 3-3. Inumakilactones B (3)之 DEPT 圖譜

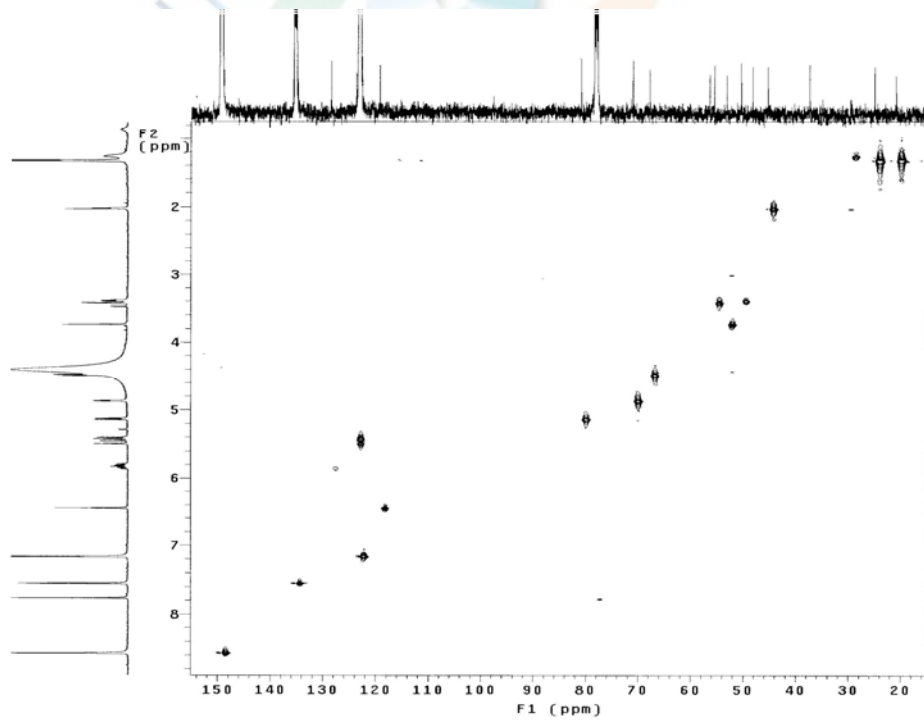


圖 3-4. Inumakilactones B (3)之 HMQC 圖譜

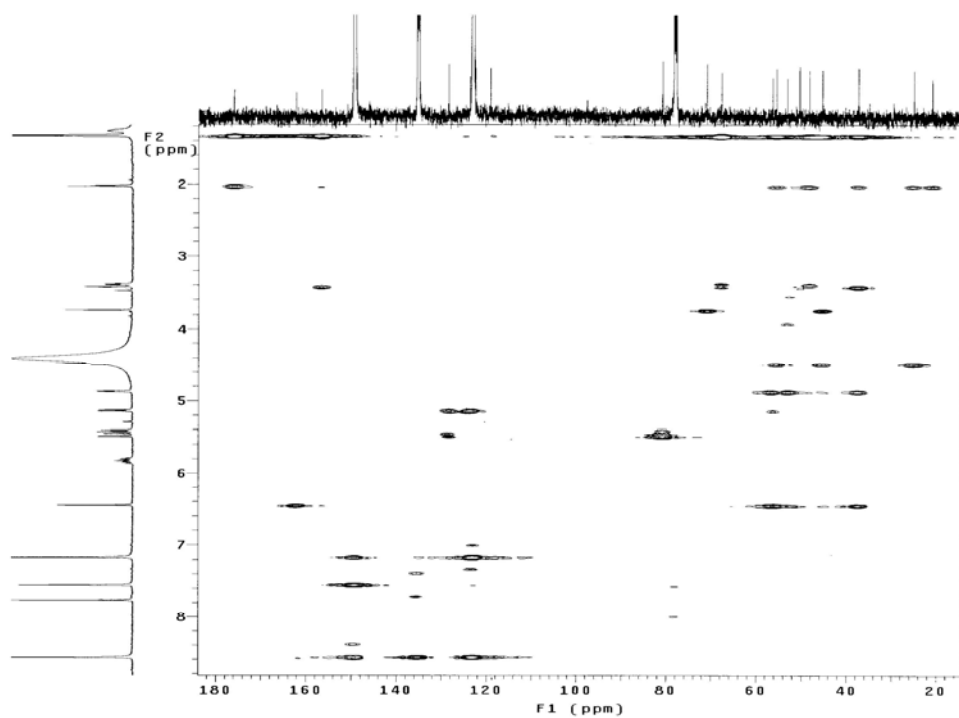


圖 3-5. Inumakilactones B (3)之 HMBC 圖譜

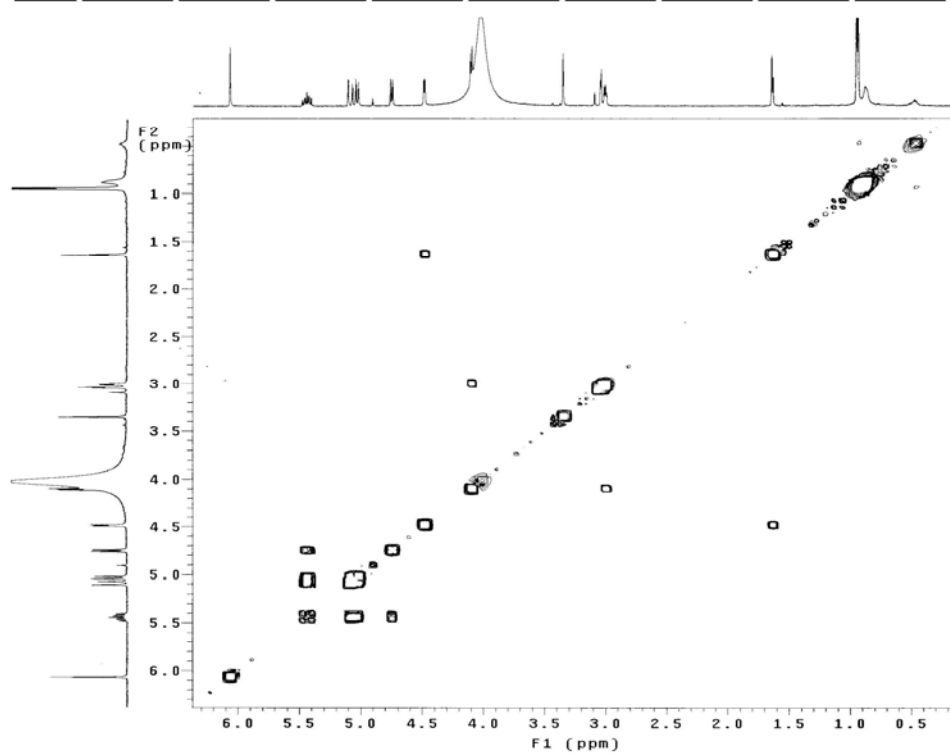


圖 3-6. Inumakilactones B (3)之 COSY 圖譜

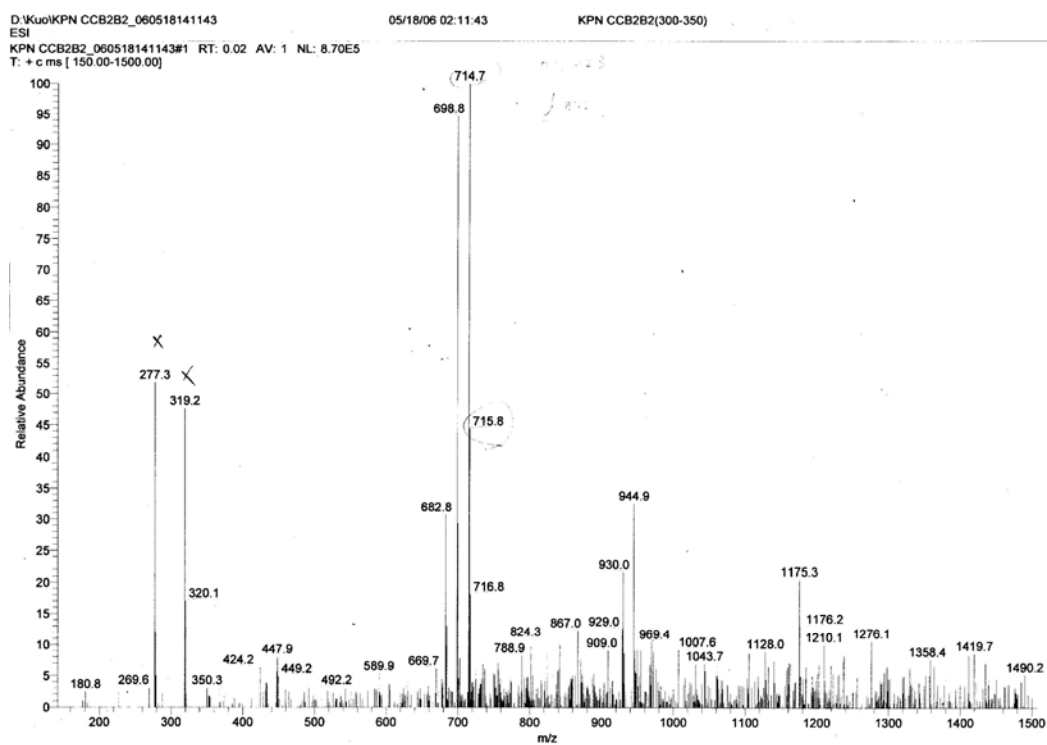


圖 3-7. Inumakilactones B (3)之 ESI-MS 圖譜

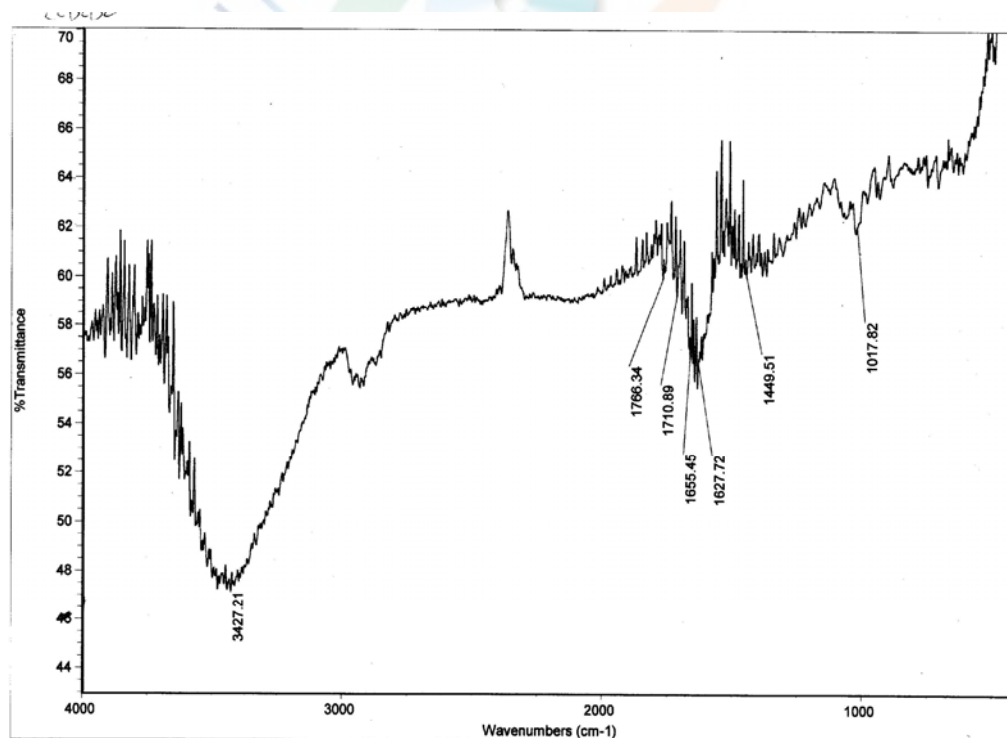
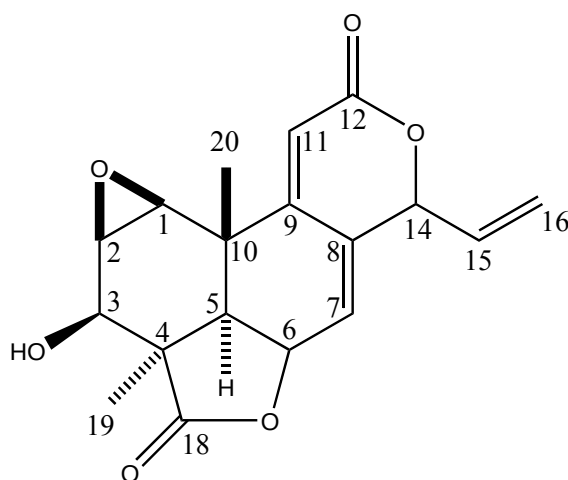


圖 3-8. Inumakilactones B (3)之 IR 圖譜

四、Podolacton E (4)之結構解析



本化合物 **4** 為針狀結晶，熔點為 271~273 °C；由電灑游離法質譜 (ESI-MS)，分析顯示(圖 4-3)其分子離子峰 $[M+Na]^+$ 為 m/z 353，推算其分子式為 $C_{18}H_{18}O_6$ 。紅外線吸收光譜(IR) (圖 4-4) 在 3270 cm^{-1} ，有羥基 (OH)訊號吸收； 1750 cm^{-1} 有內酯環 (lactone)的吸收訊號。另外在 1706 cm^{-1} 、 1598 cm^{-1} 有共軛內環酯的訊號。

由 $^1\text{H-NMR}$ (圖 4-1)和 $^{13}\text{C-NMR}$ (圖 4-2)的訊號可知在高磁場區域 $\delta_{\text{H}} 1.23$ (3H, *s*, H-20)、 $\delta_{\text{H}} 1.45$ (3H, *s*, H-19)顯示有兩根甲基訊號。在 71.2 (C-6)、177.9 (C-18) 和 162.8 (C-12)、80.6 (C-14)顯示有兩組環內酯(lacton)訊號及氫譜顯示有八個不飽和度，推測為本屬常見 Podolacton 的骨架結構。另外在 $\delta_{\text{C}} 55.5$ (C-1)、 $\delta_{\text{C}} 50.1$ (C-2)單獨接含有氧的碳訊號較少在高磁場的位置出現，因而判斷有一組環氧基(epoxide)訊號。 $\delta_{\text{C}} 68.1$ (C-3)顯示有羥基的訊號及 $\delta_{\text{C}} 156.5$ (C-9)、 $\delta_{\text{C}} 119.2$ (C-11)、 $\delta_{\text{C}} 122.6$ (C-7)、 $\delta_{\text{C}} 134.9$ (C-8)、 $\delta_{\text{C}} 128.4$ (C-15)、 $\delta_{\text{C}} 123.6$ (C-16)有三組雙鍵訊號。另外在 $\delta_{\text{H}} 5.93$ (*dt*, $J=16.4, 9.2\text{ Hz}$, H-15)、 $\delta_{\text{H}} 5.55$ (*dd*, $J=16.4, 9.2\text{ Hz}$, H-16)有偶合的關係且為末端反式雙鍵。

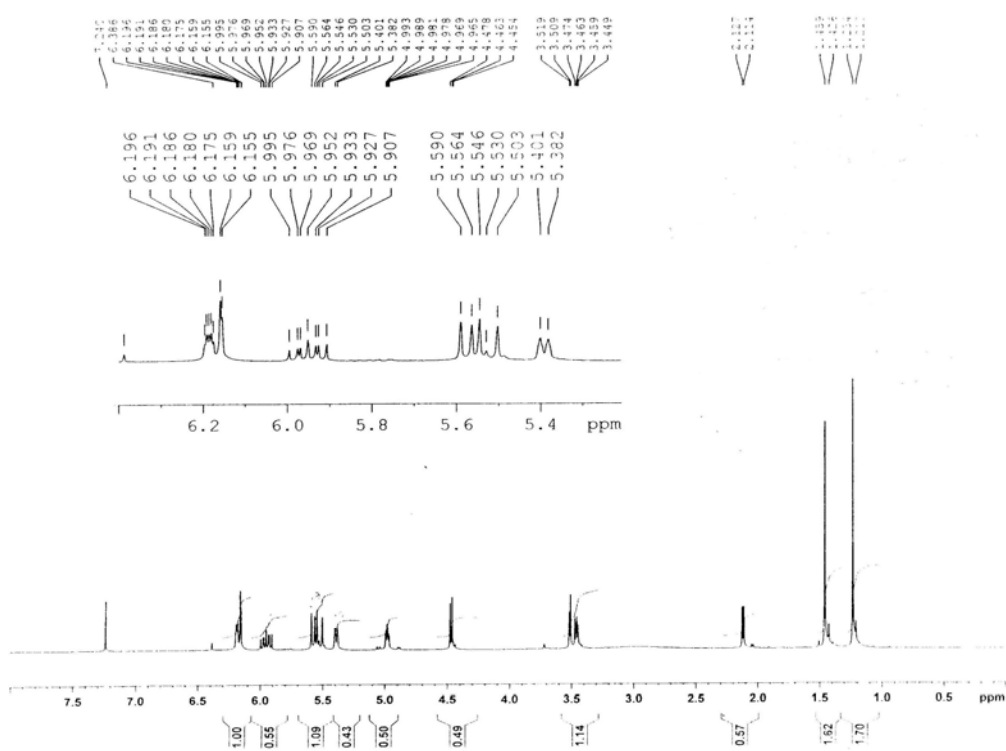
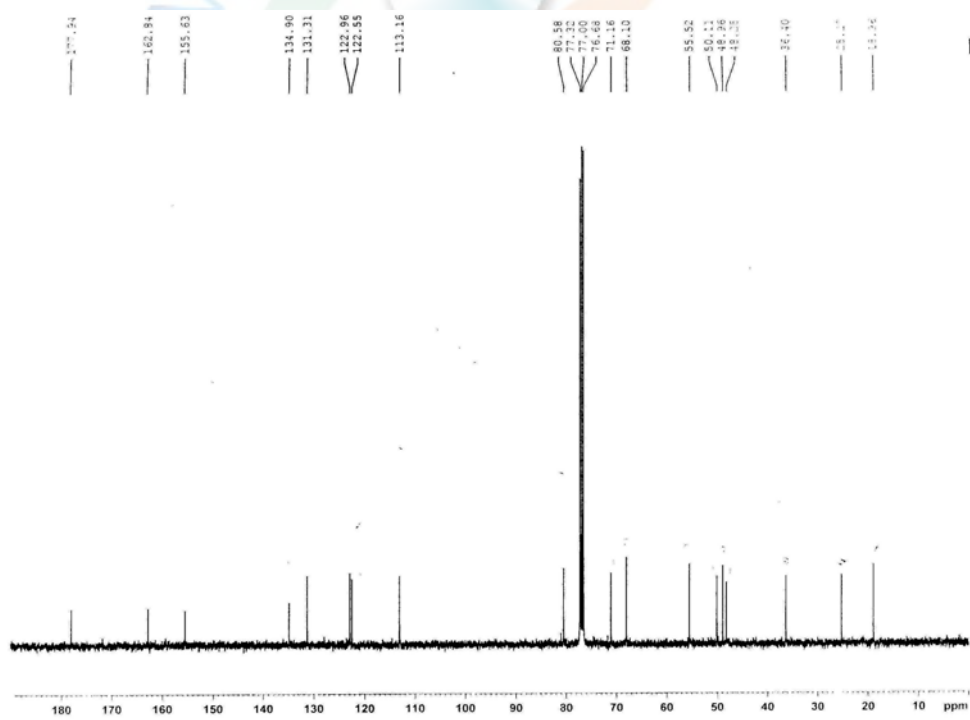
根據上述資料，與化合物(3)相似，比較化合物(3)的 $^1\text{H-NMR}$ 、

^{13}C -NMR、HMQC、HMBC、DEPT 等圖譜，確定 7 和 8 號位置為雙鍵，配合 ESI-MASS 數據符合確定此化合物結構後，而知化合物 **3** 的環氧位置被一雙鍵取代再比對文獻資料，⁴⁴ 確定此化合物為 Podolacton E。

表 3-4 化合物 **4** 之核磁共振圖譜數據整理

Podolacton E (400Hz) CDCl_3		
Position	^1H	^{13}C
1	3.51 (<i>d</i> , 4.0)	55.5
2	3.46 (<i>dd</i> , 6.0, 4.0)	50.1
3	4.46 (<i>d</i> , 6.0)	68.1
4		48.9
5	2.12 (<i>d</i> , 5.2)	48.5
6	4.97 (<i>t</i> , 4.8)	71.2
7	6.18 (<i>dd</i> , 2.0, 4.8)	122.6
8		134.9
9		155.6
10		36.4
11	6.15 (<i>s</i>)	113.2
12		162.8
13		
14	5.40 (<i>d</i> , 7.6)	80.6
15	5.93 (<i>m</i>)	131.3
16	5.55 (<i>dt</i> , 16.4, 9.2)	123.0
17		
18		177.9
19	1.45 (<i>s</i>)	25.3
20	1.23 (<i>s</i>)	19.0

J values in Hz

圖 4-1. Podolacton E (4)之 ¹H-NMR 圖譜圖 4-2. Podolacton E (4)之 ¹³C-NMR 圖譜

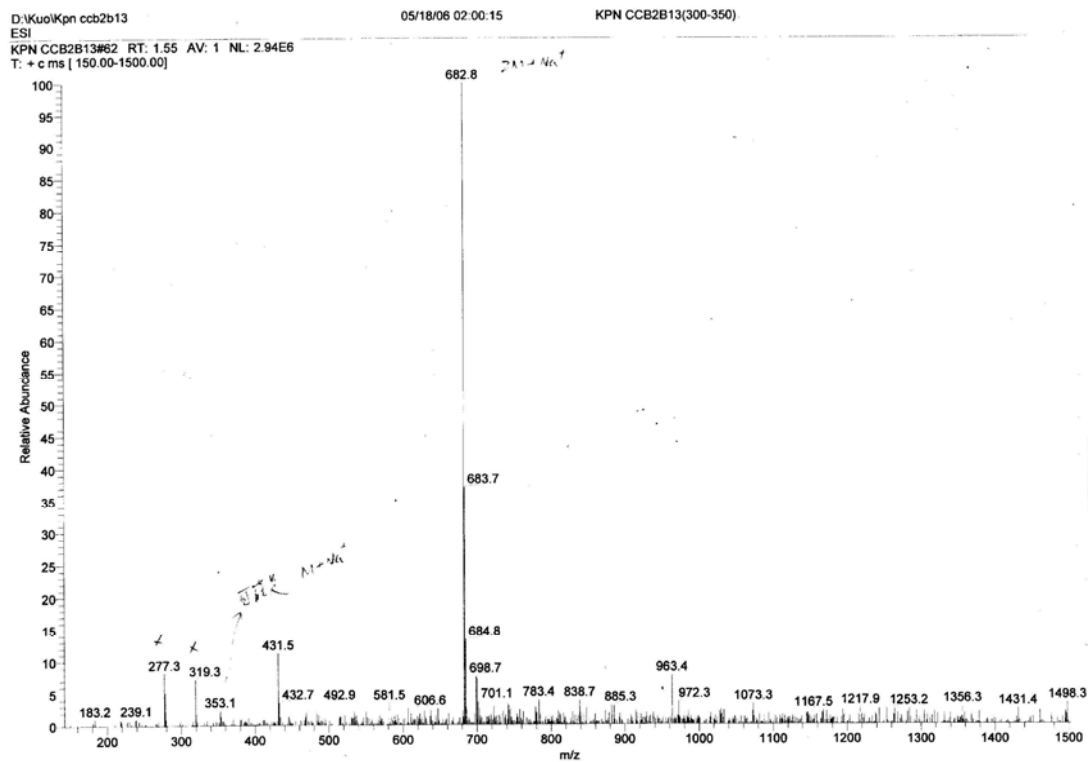


圖 4-3. Podolacton E (4)之 ^{13}C -NMR 圖譜

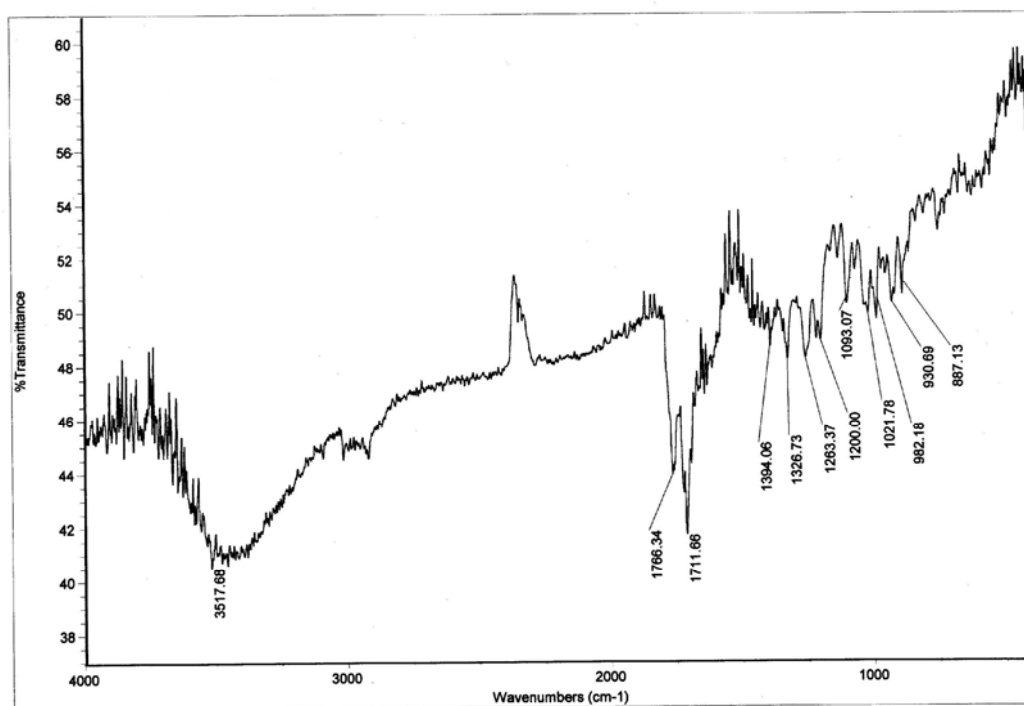
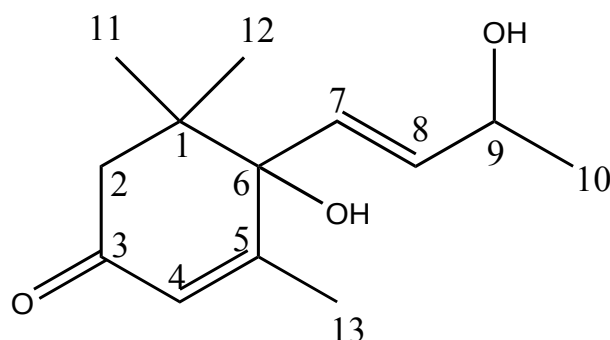


圖 4-4. Podolacton E (4)之 IR 圖譜

五、Vomifoliol (5)之結構解析



本化合物 **5** 為白色針狀物，熔點為 102~105°C；由電灑游離法質譜 (ESI-MS)，分析顯示 (圖 5-7) 其分子離子峰 $[2M+Na]^+$ 為 m/z 470.9，推算其分子式為 $C_{13}H_{20}O_3$ 。紅外線吸收光譜 (IR) (圖 5-8) 在 3434 cm^{-1} ，有羥基 (OH) 訊號吸， 1657 cm^{-1} 有羰基 (C=O) 的吸收訊號。

由 $^1\text{H-NMR}$ (圖 5-1) 和 $^{13}\text{C-NMR}$ (圖 5-2) 的訊號可知在高磁場區域 $\delta_{\text{H}} 1.31$ (3H, *d*, $J = 6.5\text{ Hz}$, H-10)、 $\delta_{\text{H}} 1.10$ (3H, *s*, H-11)、 $\delta_{\text{H}} 1.01$ (3H, *s*, H-12) 和 $\delta_{\text{H}} 1.91$ (3H, *d*, $J = 3.0\text{ Hz}$, H-13) 顯示有四根甲基訊號。另外在 $\delta_{\text{H}} 5.81$ (1H, *d*, $J = 16.0\text{ Hz}$, H-7) 和 $\delta_{\text{H}} 5.85$ (1H, *dd*, $J = 16.0, 6.5\text{ Hz}$, H-8) 由偶合常數知道有一組反式雙鍵的訊號。在 $\delta_{\text{C}} 127.1$ (C-4)、 $\delta_{\text{C}} 163.9$ (C-5) 有一環內雙鍵之訊號，二個含氧的碳的訊號分別為 $\delta_{\text{C}} 79.3$ (C-6)、 $\delta_{\text{C}} 68.2$ (C-9) 和一個酮基 (C=O) 訊號為 $\delta_{\text{C}} 198.3$ (C-3)。

在 COSY 圖譜顯示 (圖 5-6)，(H-8, H-9, H-10) 有偶合的關係。配合 HMBC (圖 5-5) $\delta_{\text{C}} 41.4$ (C-1) 和 $\delta_{\text{H}} 1.01$ (H-11)、 $\delta_{\text{H}} 1.10$ (H-12) 有相聯關係， $\delta_{\text{C}} 163.9$ (C-5) 和 $\delta_{\text{H}} 1.91$ (H-13) 有相連關係，此外 $\delta_{\text{C}} 68.2$ (C-9) 和 $\delta_{\text{H}} 1.31$ (H-10) 亦有相連關係，而確認上述四支甲基位置。在 $\delta_{\text{C}} 79.3$ (C-6) 除了與羥基相連外，也與 $\delta_{\text{H}} 5.81$ (H-7) 有相關連接，因而提供側鏈的正確相連位置。

根據上述資料，得知本化合物有四個甲基峰訊號、一個酮基、二個羥基、一組反式雙鍵，再配合 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR、HMQC、HMBC、DEPT 等圖譜，來確定此化合物結構；最後比對文獻資料，⁸⁰ 而確認此化合物為 Vomifoliol。

表 3-5 化合物 **5** 之核磁共振圖譜數據整理

Vomifoliol (500Hz) CDCl_3		
Position	^1H	^{13}C
1		41.4
2	2.45 (1H, <i>dd</i> , 17.0, 3.0) 2.25 (1H, <i>d</i> , 17.0)	49.9
3		198.3
4	5.91 (1H, <i>s</i>)	127.1
5		163.9
6		79.3
7	5.81 (1H, 16.0)	129.2
8	5.85 (1H, <i>dd</i> , 16.0, 6.5)	136.0
9	4.42 (1H, <i>t</i> , 6.0)	68.2
10	1.31 (3H, <i>d</i> , 6.5)	24.0
11	1.10(3H, <i>s</i>)	24.3
12	1.01(3H, <i>d</i> , 5.5)	24.0
13	1.91 (3H, <i>s</i>)	19.2

J values in Hz

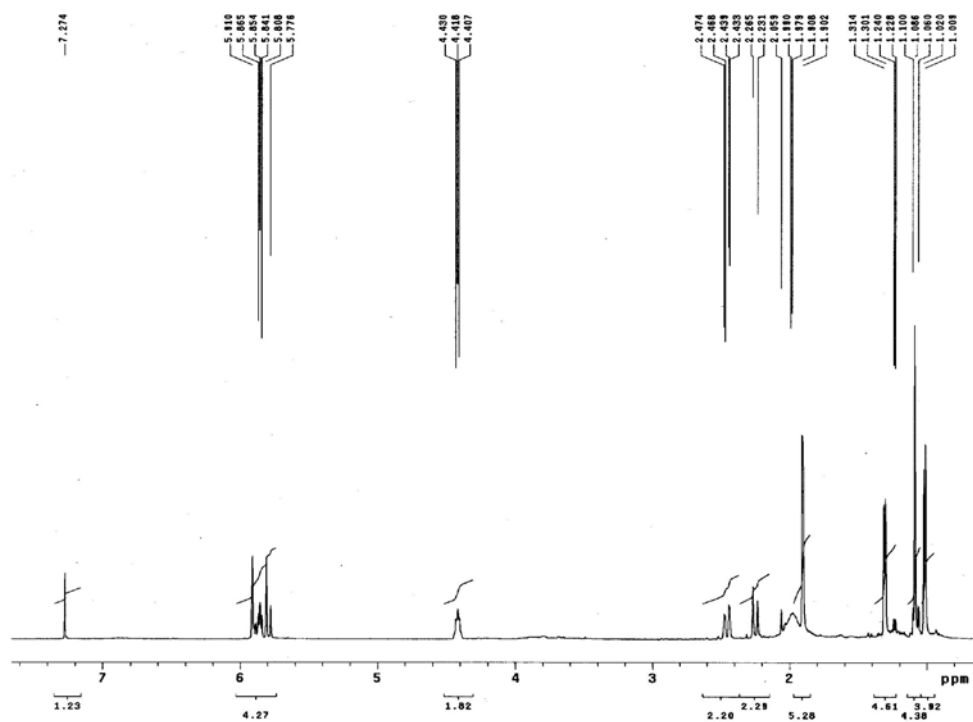


圖 5-1. Vomifoliol (5)之 ¹H-NMR 圖譜

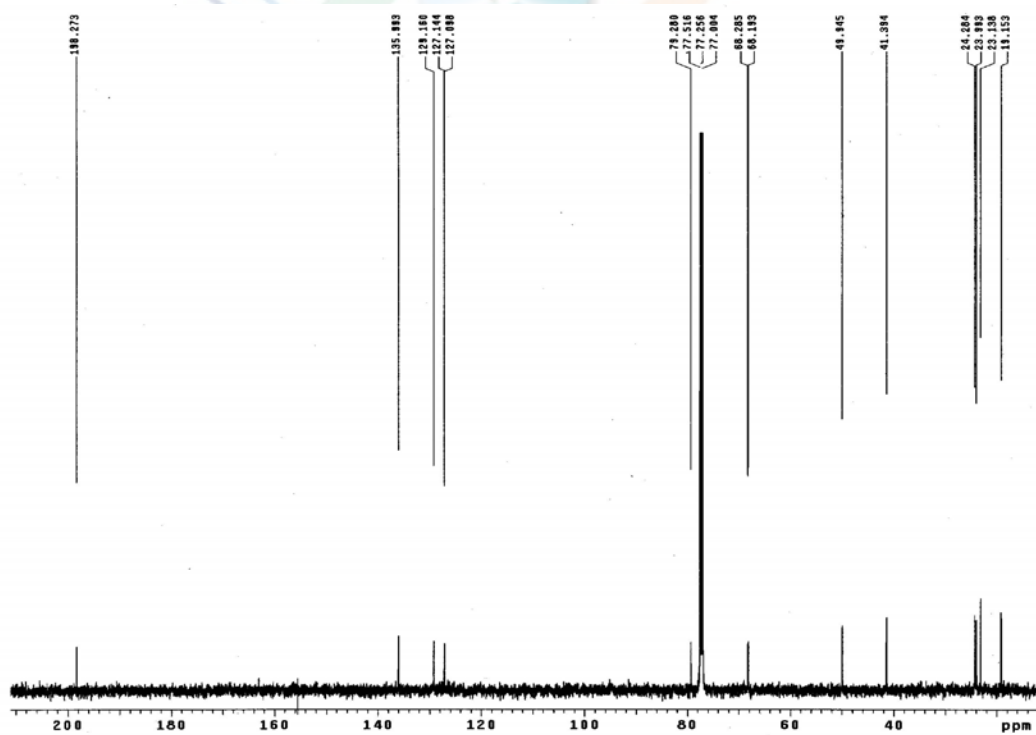


圖 5-2. Vomifoliol (5)之 ¹³C-NMR 圖譜

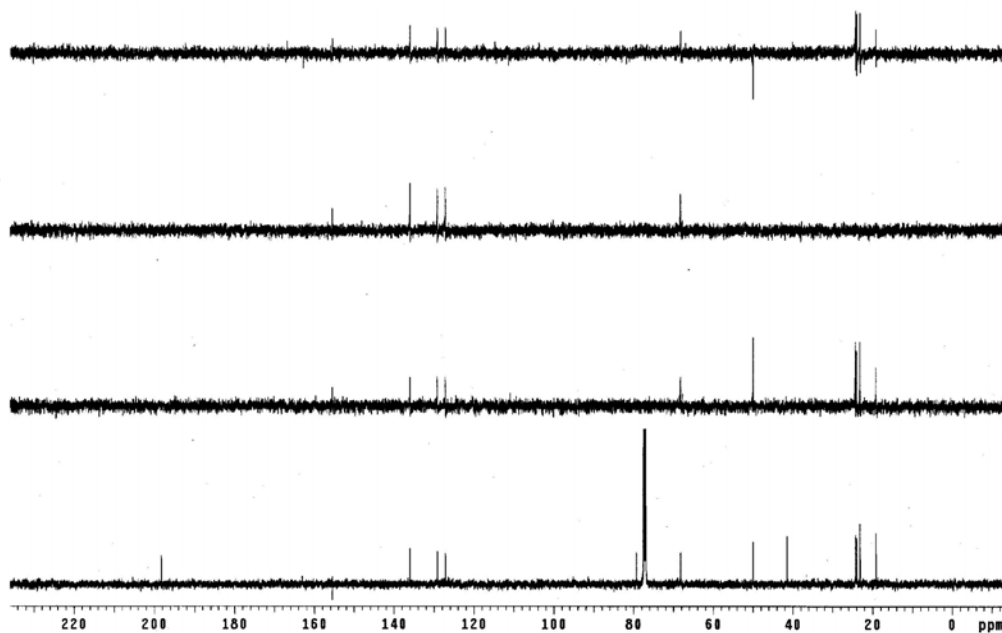


圖 5-3. Vomifoliol (5)之 DEPT 圖譜

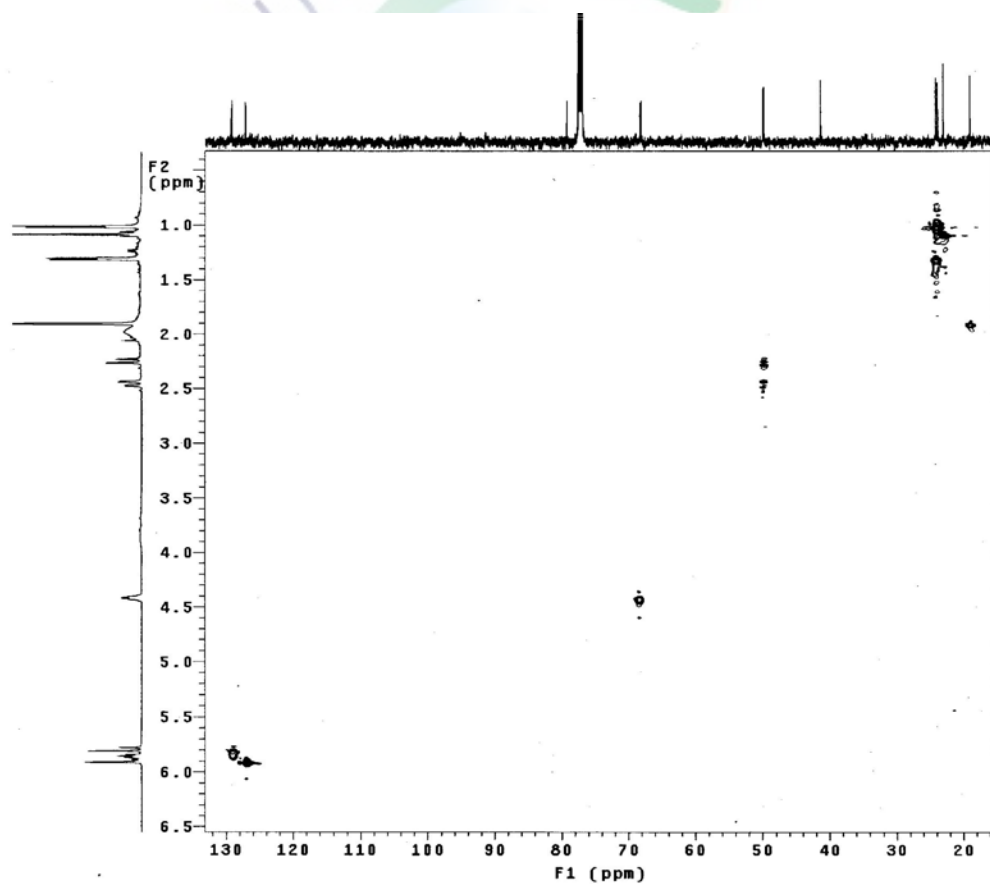


圖 5-4. Vomifoliol (5)之 HMQC 圖譜

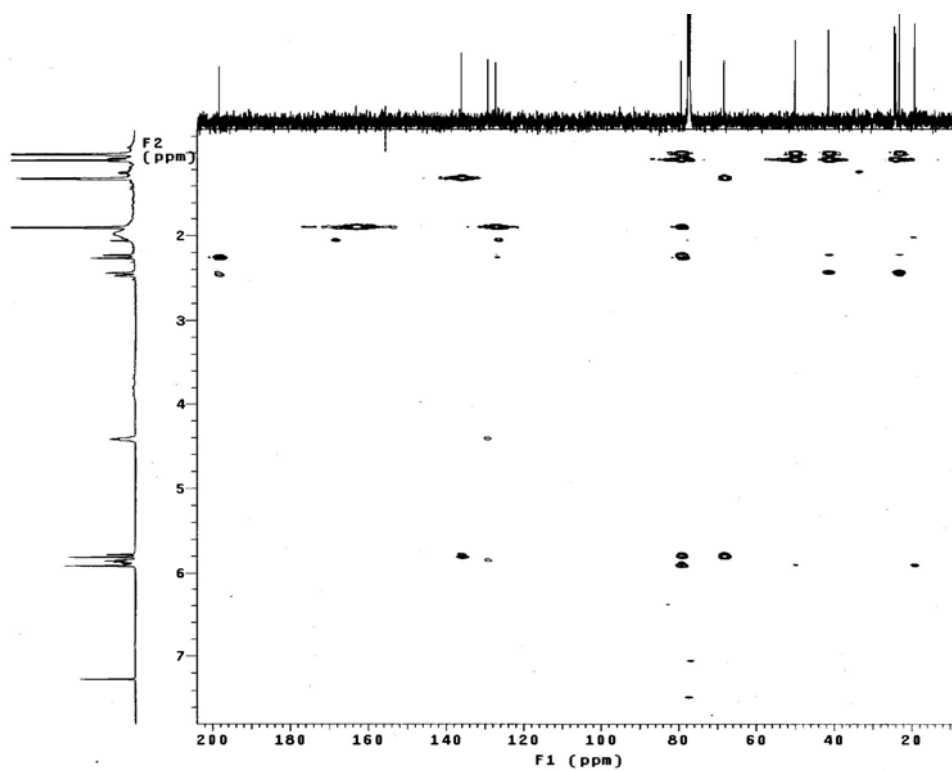


圖 5-5. Vomifoliol (5)之 HMBC 圖譜

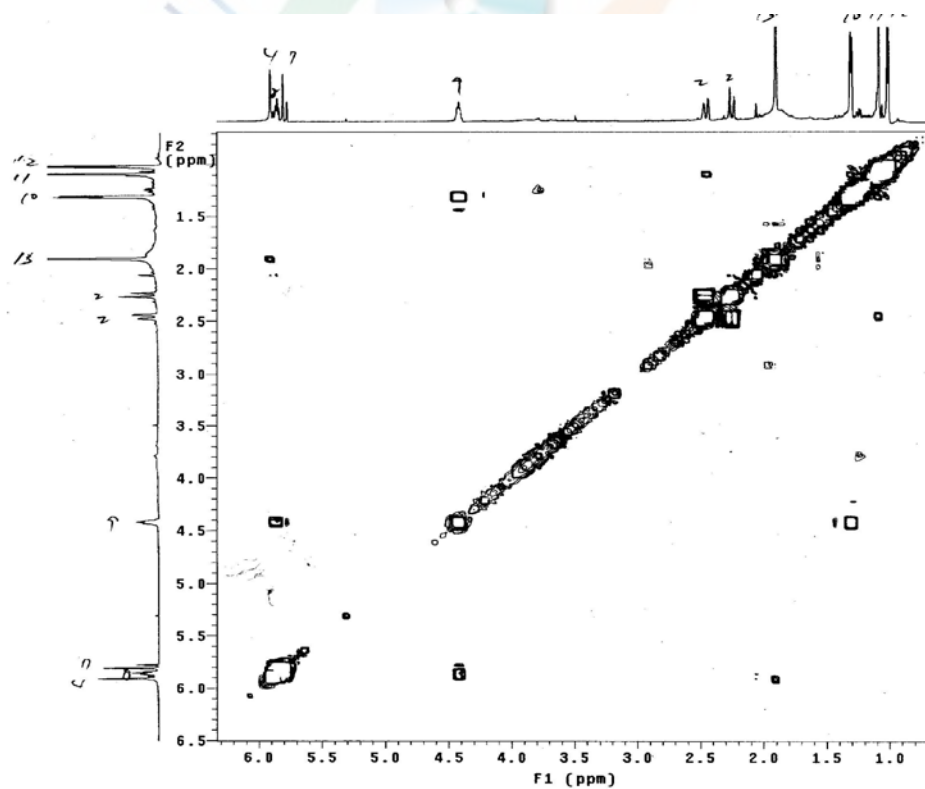


圖 5-6. Vomifoliol (5)之 COSY 圖譜

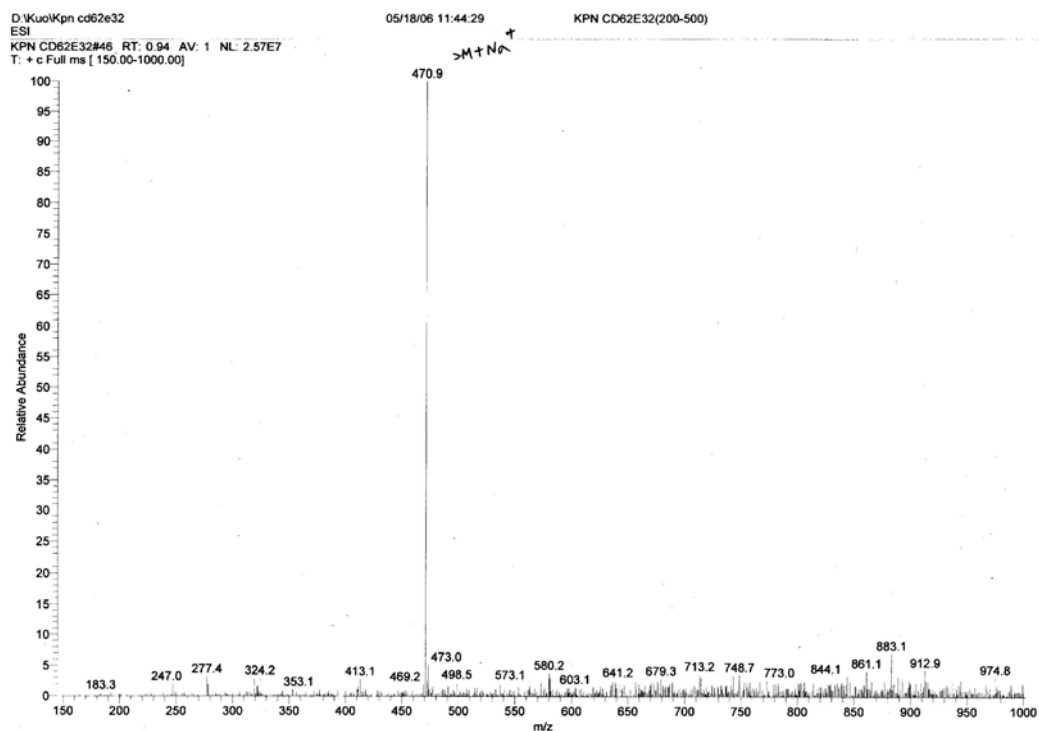


圖 5-7. Vomifoliol (5)之 ESI-MS 圖譜

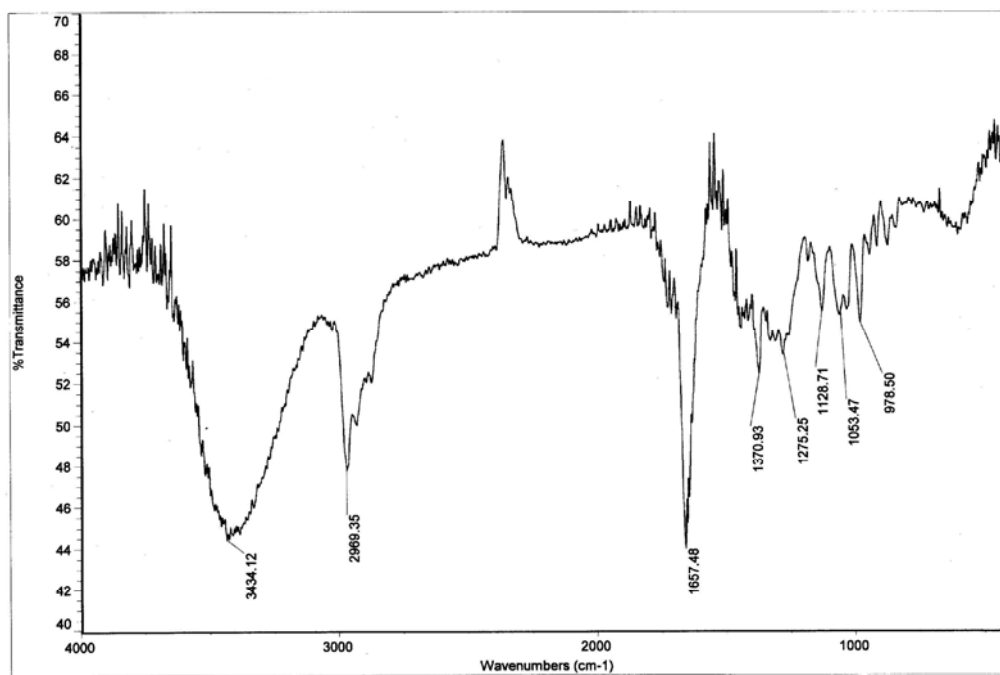
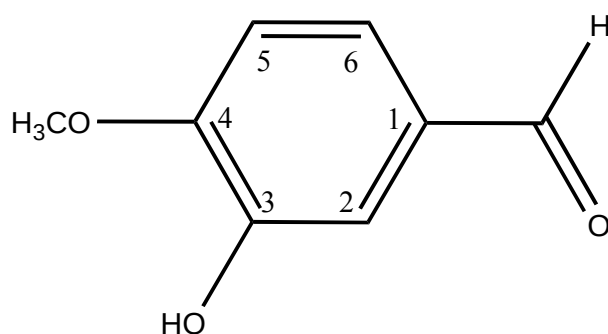


圖 5-8. Vomifoliol (5)之 IR 圖譜

六、Isovanillin (6)之結構解析



本化合物 **6** 為無色結晶，熔點為 84~86°C；由電子游離質譜 (EI-MS) 分析顯示(圖 6-3)其分子離子峰[M]⁺為 m/z 151，推算其分子式為 C₈H₈O₃。紅外線吸收光譜 (IR) (圖 6-4) 在 3209cm⁻¹，有羥基(OH)訊號吸收。

由 ¹H-NMR 光譜(圖 6-1)在芳香質子區域 δ_{H} 7.43 (1H, *d*, $J = 1.0$ Hz, H-2)、 δ_{H} 7.04 (1H, *d*, $J = 8.0$ Hz, H-5)、 δ_{H} 7.44 (1H, *dd*, $J = 1.0, 8.0$ Hz, H-6)，出現一組 ABX 型的質子吸收訊號， δ_{H} 3.97 (3H, *s*)有一甲氧基訊號。¹³C-NMR 光譜 (圖 6-2)中於 δ_{C} 130.1 (C-1)、 δ_{C} 114.7 (C-2)、 δ_{C} 141.4 (C-3)、 δ_{C} 152.0 (C-4)、 δ_{C} 109.1 (C-5)、 δ_{C} 127.8 (C-6)為芳香環吸收訊號，其中 C-3、C-4 為雙鍵上有含氧拉電子基訊號。 δ_{C} 191.2 有一醛基(CHO)訊號。

根據以上資料，確定本化合物有一個 ABX 型的芳香環、一個羥基、一個醛基(CHO)，再比對文獻資料，⁷⁸ 證實為以知化合物 Isovanillin。

表 3-6 化合物 **6** 之核磁共振圖譜數據整理

Isovanillin (500Hz) CDCl ₃		
Position	¹ H	¹³ C
1		130.1
2	7.43 (1H, <i>d</i> , 1.0)	114.7
3		141.4
4		152.0
5	7.04 (1H, <i>d</i> , 8.0)	109.1
6	7.44 (1H, <i>dd</i> , 1.0, 8.0)	127.8
CHO	9.83(1H, <i>s</i>)	191.2
OCH ₃	3.97 (3H, <i>s</i>)	56.4

J values in Hz



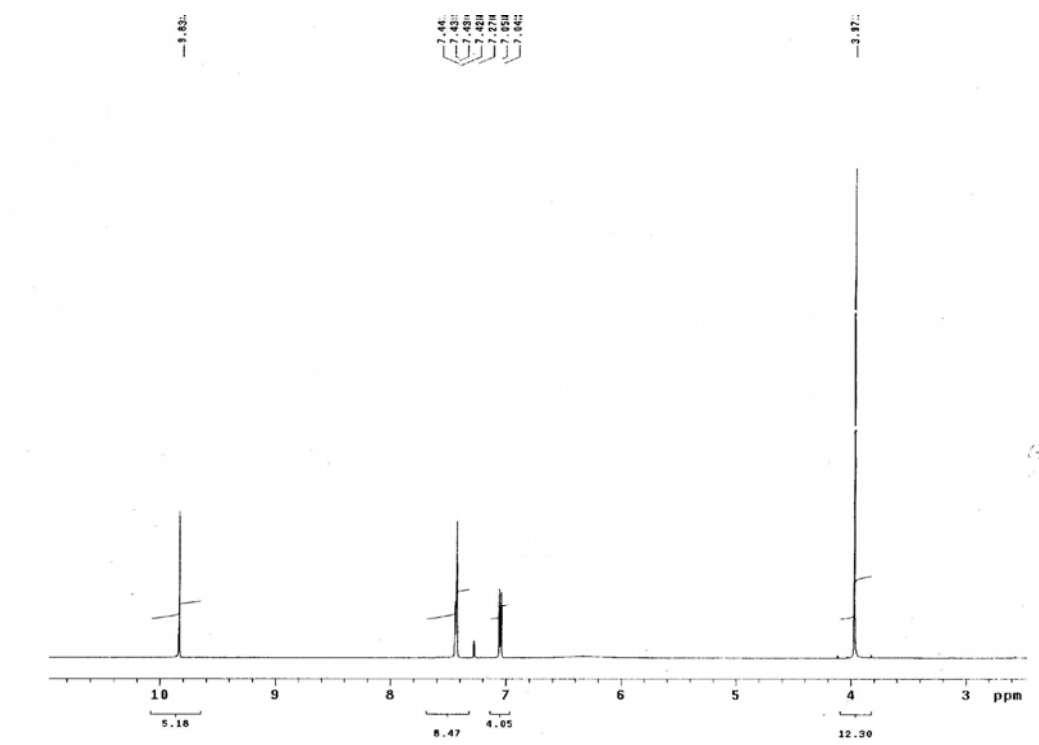


圖 6-1. Iovanillin (6)之 ^1H -NMR 圖譜

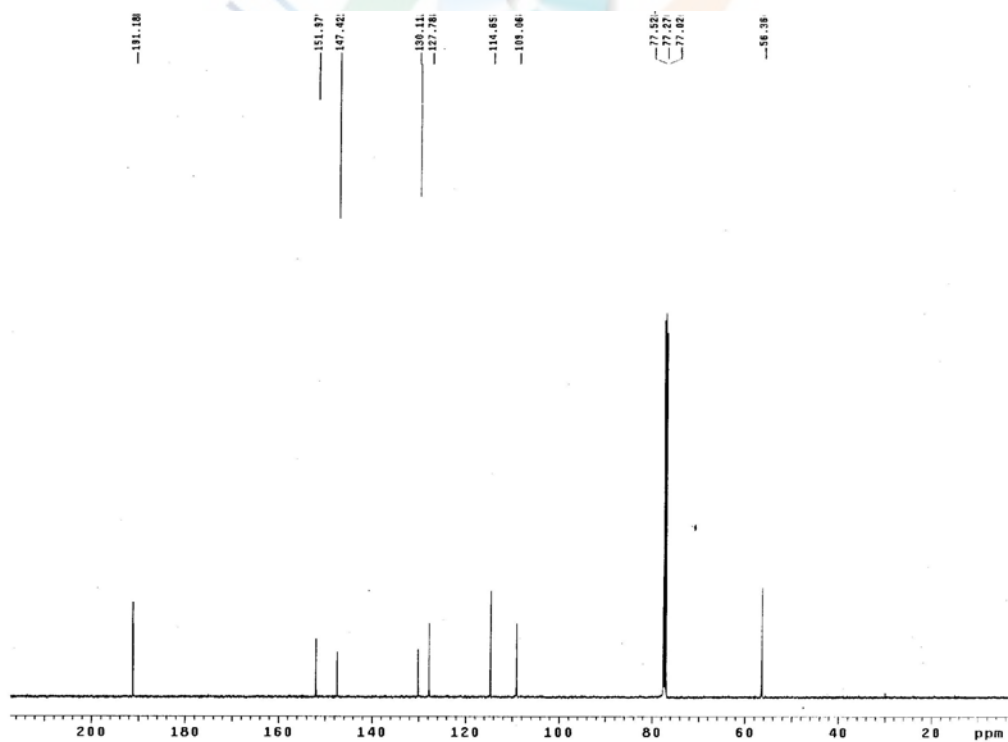


圖 6-2. Iovanillin (6)之 ^{13}C -NMR 圖譜

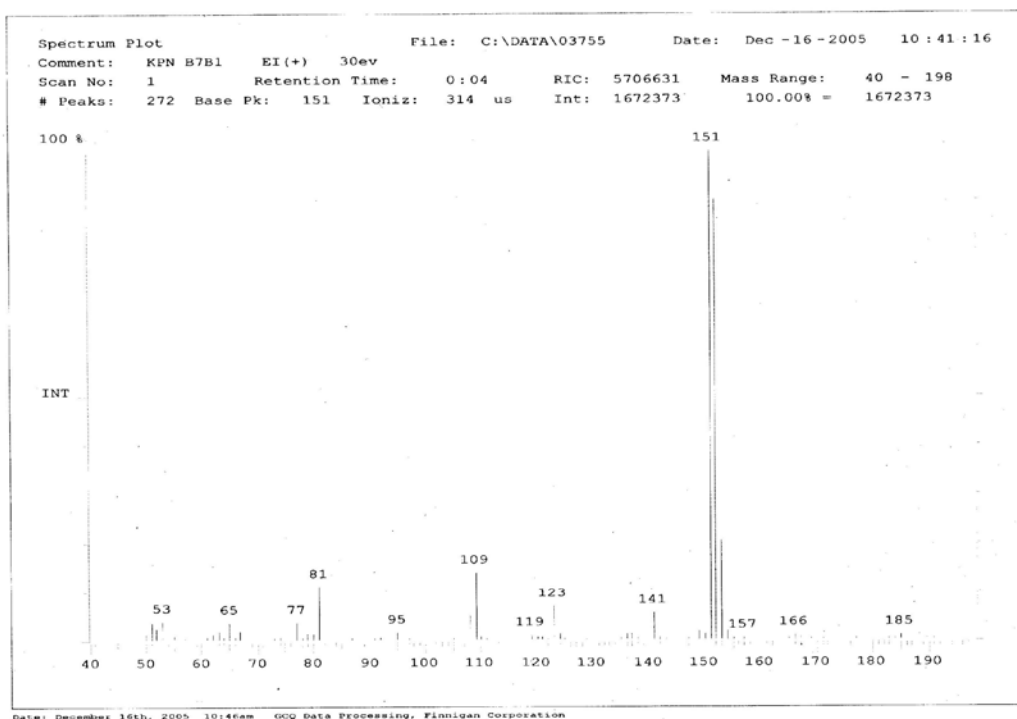


圖 6-3. Isovanillin (6)之 EI-MS 圖譜

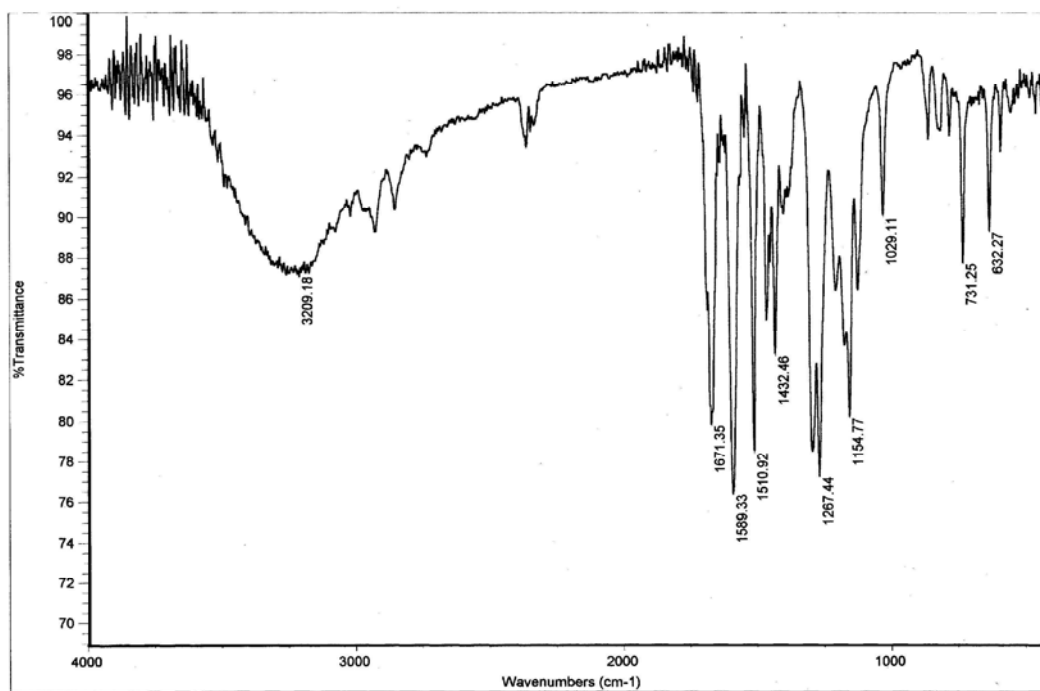
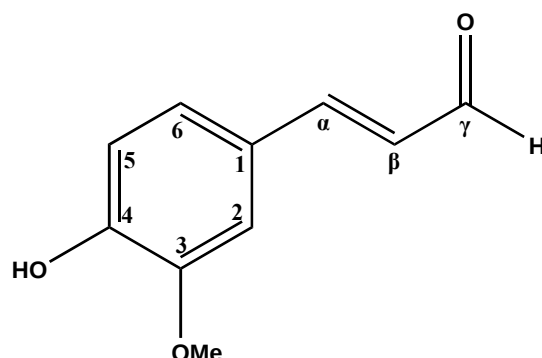


圖 6-4. Isovanillin (6)之 IR 圖譜

七、4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde (7)之結構解析



本化合物 7 為黃色針狀結晶，熔點為 76~78°C；由電子游離質譜 (EI-MS) 分析顯示 (圖 7-6) 其分子離子峰 $[M]^+$ 為 m/z 178，推算其分子式為 $C_{10}H_{10}O_3$ 。紅外線吸收光譜 (IR) (圖 7-7) 在 3313 cm^{-1} ，有羥基 (OH) 訊號吸收，在 1658 cm^{-1} 有羰基 (CO) 吸收訊號。

由 $^1\text{H-NMR}$ 光譜 (圖 7-1) 在芳香質子區域 δ_{H} 6.95 (1H, *d*, $J = 8.0\text{ Hz}$, H-2)、 δ_{H} 7.13 (1H, *dd*, $J = 8.0, 2.0\text{ Hz}$, H-5)、 δ_{H} 7.08 (1H, *d*, $J = 2.0\text{ Hz}$, H-6)，出現一組 ABX 型的質子吸收訊號。在 δ_{H} 6.60 (1H, *d*, $J = 16.0\text{ Hz}$, H- α)、 δ_{H} 6.60 (1H, *dd*, $J = 7.6, 16.0\text{ Hz}$, H- β) 其偶合常數顯示有一組反式 (trans) 雙鍵的質子吸收訊號。 δ_{H} 3.96 (3H, *s*, H-3) 有一甲氧基訊號。 $^{13}\text{C-NMR}$ 光譜 (圖 7-2) 中於 δ_{C} 146.9 (C-3)、 δ_{C} 148.9 (C-4) 為雙鍵上皆有含拉電子基氧的吸收訊號。 δ_{C} 193.5 (C- γ) 有醛基 (CHO) 的吸收訊號。

在 COSY 圖譜顯示 (圖 7-5)，(H- α , H- β , H- γ) 有相互偶合的關係。另外配合 HMBC (圖 7-4) H-2 與 C-1、C-3 有相連關係以及 H-6 與 C-4、C-5、C- α 有相連關係可確認芳香環上的相關位置。另外 H- α 與 C-5、C-6 有相連關係，H- β 與 C-1 有相連關係，可確認 C-1 為芳香環上連接側鏈之位置。

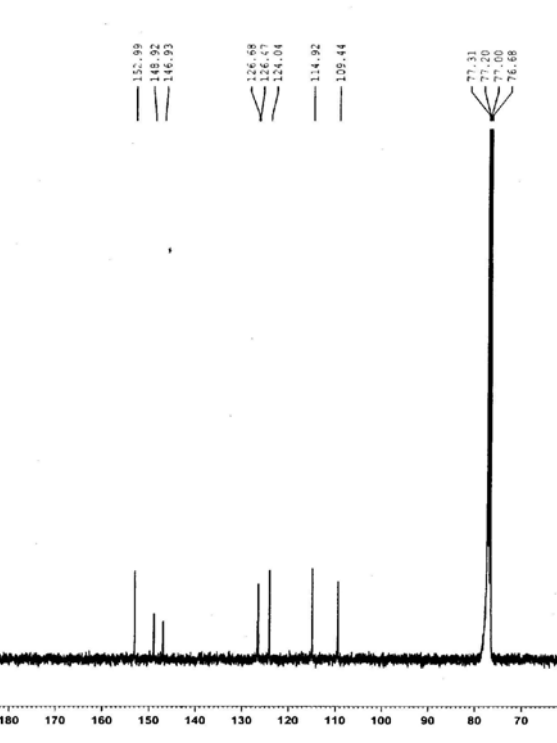
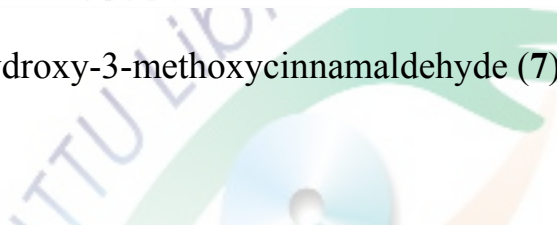
根據上述資料，得知本化合物有一個 ABX 型芳香環訊號、一個

甲氧基、一個羥基、一個醛基(CHO)和一組反式雙鍵 (trans)，再配合 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR、HMQC、HMBC、DEPT 等圖譜，進一步確定此化合物結構後，參考文獻資料，^{83,84} 而證明此化合物為 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde。

表 3-7 化合物 7 之核磁共振圖譜數據整理

4-Hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde (400Hz) CDCl_3		
Position	^1H	^{13}C
1		126.7 (s)
2	6.95 (d, 8.0)	114.9 (d)
3		146.9 (s)
4		148.9 (s)
5	7.13 (dd, 8.0, 2.0)	124.0 (d)
6	7.08 (d, 2.0)	109.4(d)
α	7.41 (d, 16.0)	152.1(d)
β	6.60 (dd, 16.0, 7.6)	126.5 (t)
γ	9.66 (d, 7.6)	193.5(q)
OMe	3.96 (s)	56.0 (d)

J values in Hz



droxy-3-methoxycinnamaldehyde (7)

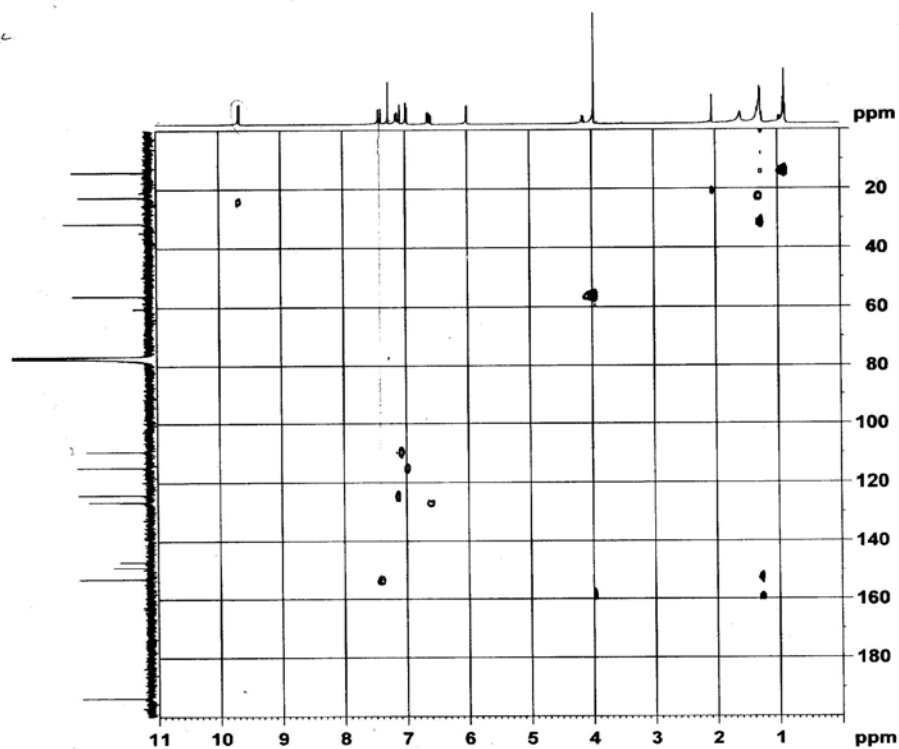


圖 7-3. 4-Hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde (7)之 HMQC 圖譜

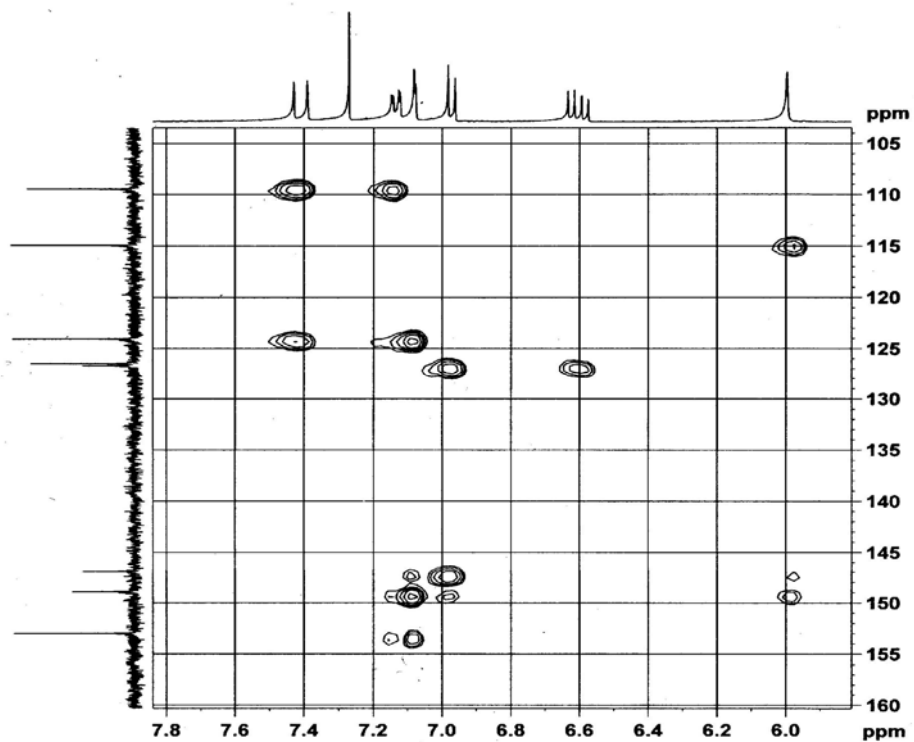


圖 7-4. 4-Hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde (7)之 HMBC 圖譜

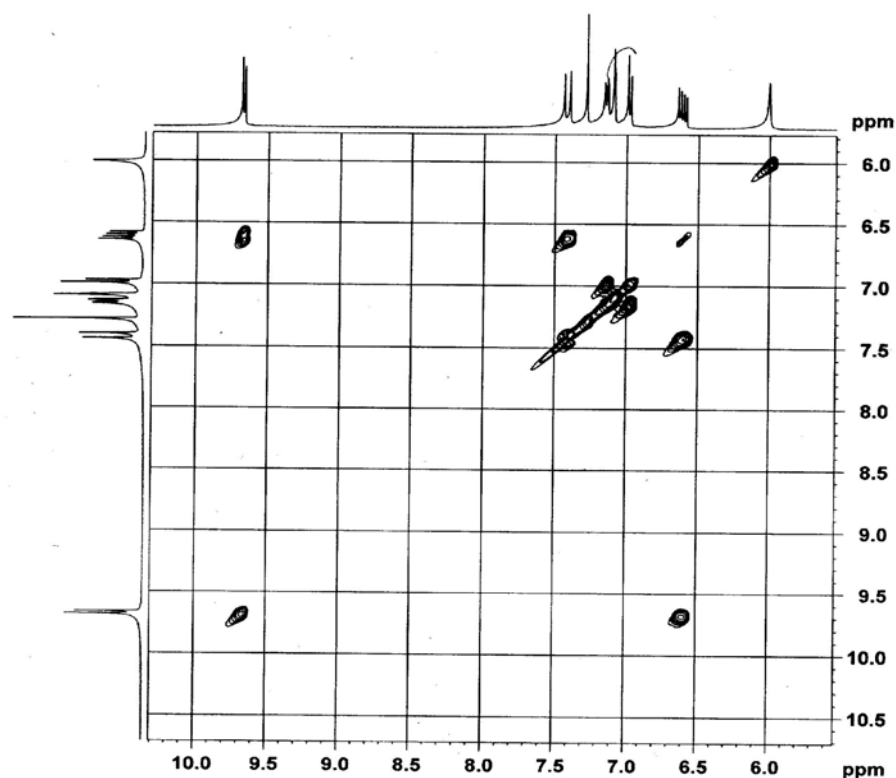


圖 7-5. 4-Hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde (7)之 COSY 圖譜

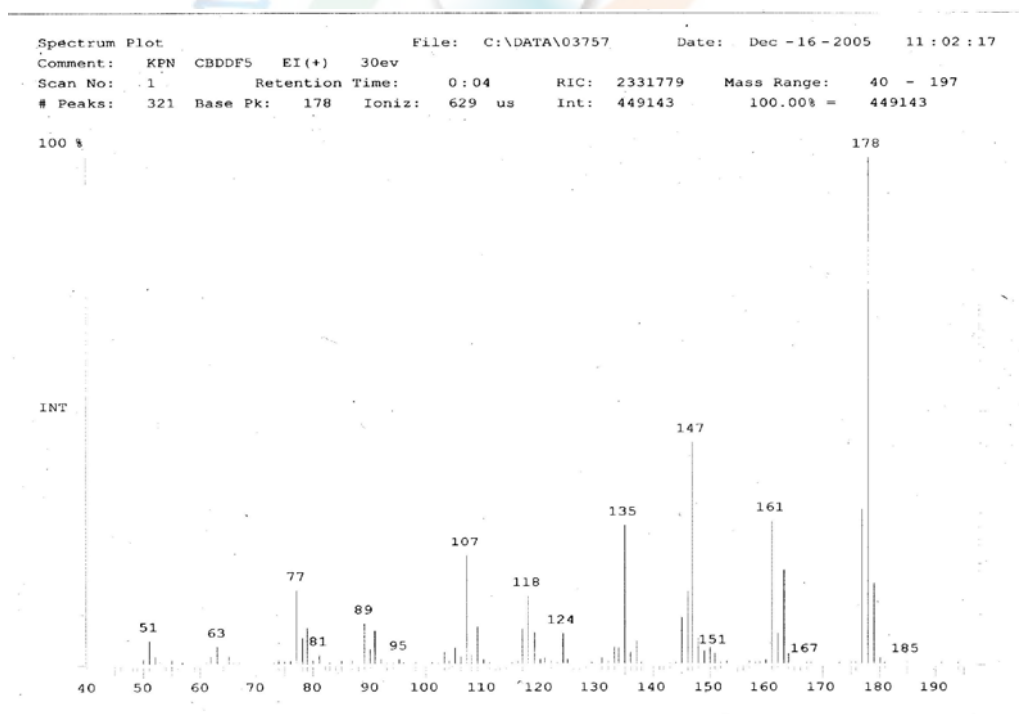


圖 7-6. 4-Hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde (7)之 EI-MS 圖譜

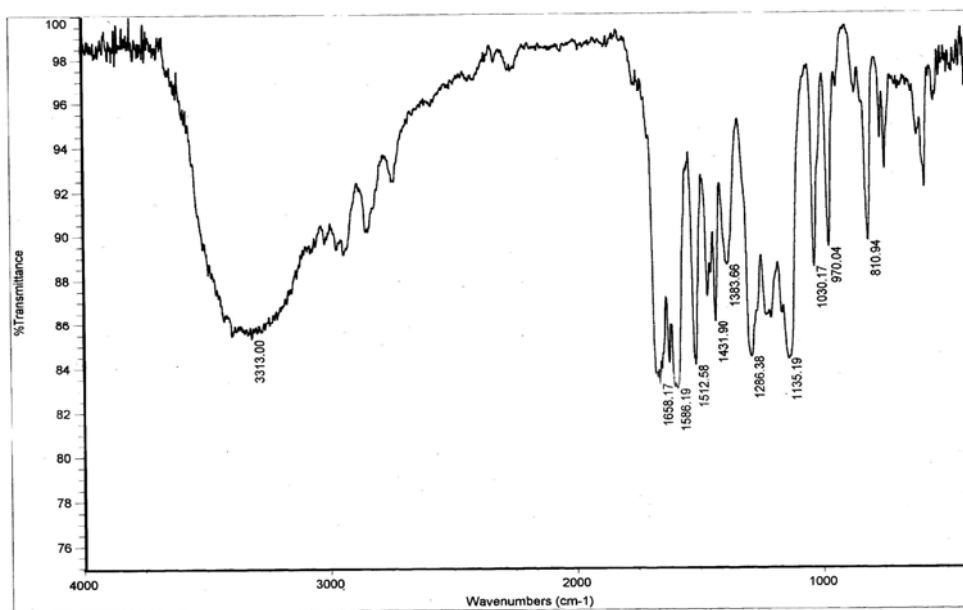
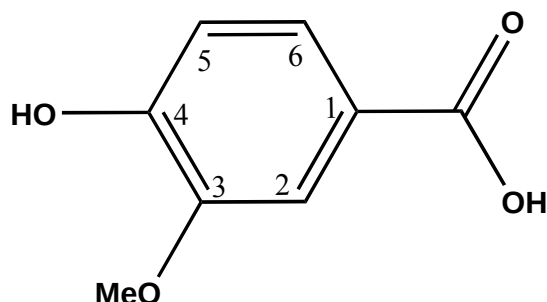


圖 7-7. 4-Hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde (7)之 IR 圖譜

八、Vanillin acid (8)之結構解析



本化合物 **8** 為無色結晶，熔點為 173~175°C；由電子游離質譜 (EI-MS) 分析顯示(圖 8-3)其分子離子峰 168[M]⁺ 為 m/z ，推算其分子式為 C₈H₈O₄。紅外線吸收光譜(IR)(圖 8-4)在 3427cm⁻¹，有羥基(OH)訊號吸收。

由 ¹H-NMR 光譜(圖 8-1)在芳香質子區域 δ_H 7.54 (2H, *d*, *J* = 2.8, 4.4 Hz, H-5,H-6)、δ_H 6.82 (1H, *d*, *J* = 8.8 Hz H-2)，出現一組 ABX 型的質子吸收訊號。δ_H 3.88 (3H, *s*)有一甲氧基訊號。在 ¹³C-NMR 光譜 (圖 8-2)中於 δ_C 123.9 (C-1)、δ_C 114.4 (C-2)、δ_C 1151.2 (C-3)、δ_C 147.2 (C-4)、δ_C 112.4 (C-5)、δ_C 121.6 (C-6)為芳香環吸收訊號，其中 C-3、C-4 為雙鍵上有含氧拉電子基訊號。δ_C 168.0 有一酸基(COOH)訊號。

根據以上資料，本化合物包含一個 ABX 型的芳香環、一個羥基、一個酸基(COOH)，經比對文獻資料，⁷⁸ 確定此化合物為 Vanillic acid。

表 3-8 化合物 **8** 之核磁共振圖譜數據整理

Vanillic acid (200Hz) CD ₃ OD		
Position	¹ H	¹³ C
1		123.9
2	6.82 (1H, <i>d</i> , 8.8)	114.4
3		151.2
4		147.2
5	7.54 (2H, <i>d</i> , 2.8, 4.4)	112.4
6	7.54 (2H, <i>d</i> , 2.8, 4.4)	121.6
COOH		168.7
OCH ₃	3.88 (3H, <i>s</i>)	55.0

J values in Hz



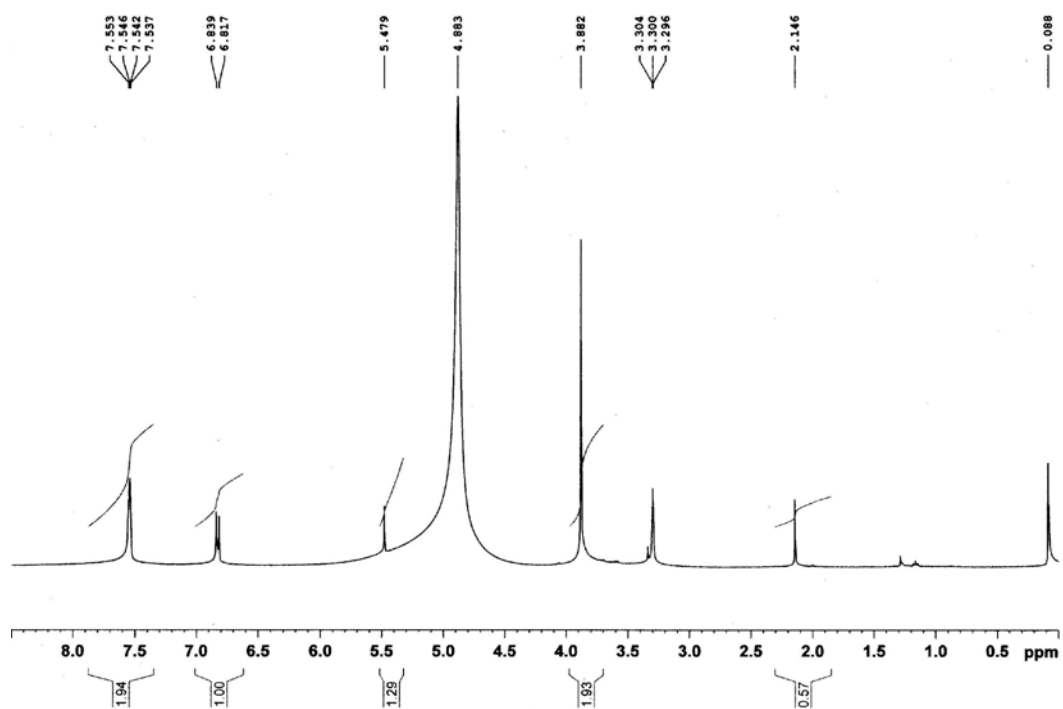


圖 8-1. Vanillic acid (8)之 ¹H-NMR 圖譜

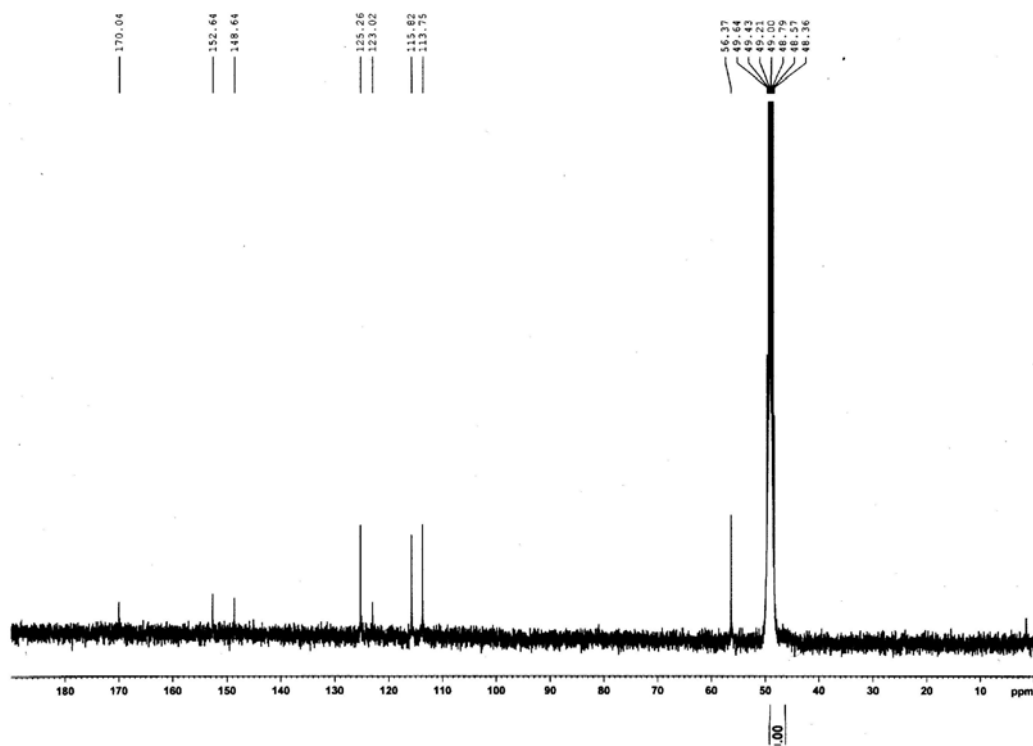


圖 8-2. Vanillic acid (8)之 ¹³C-NMR 圖譜

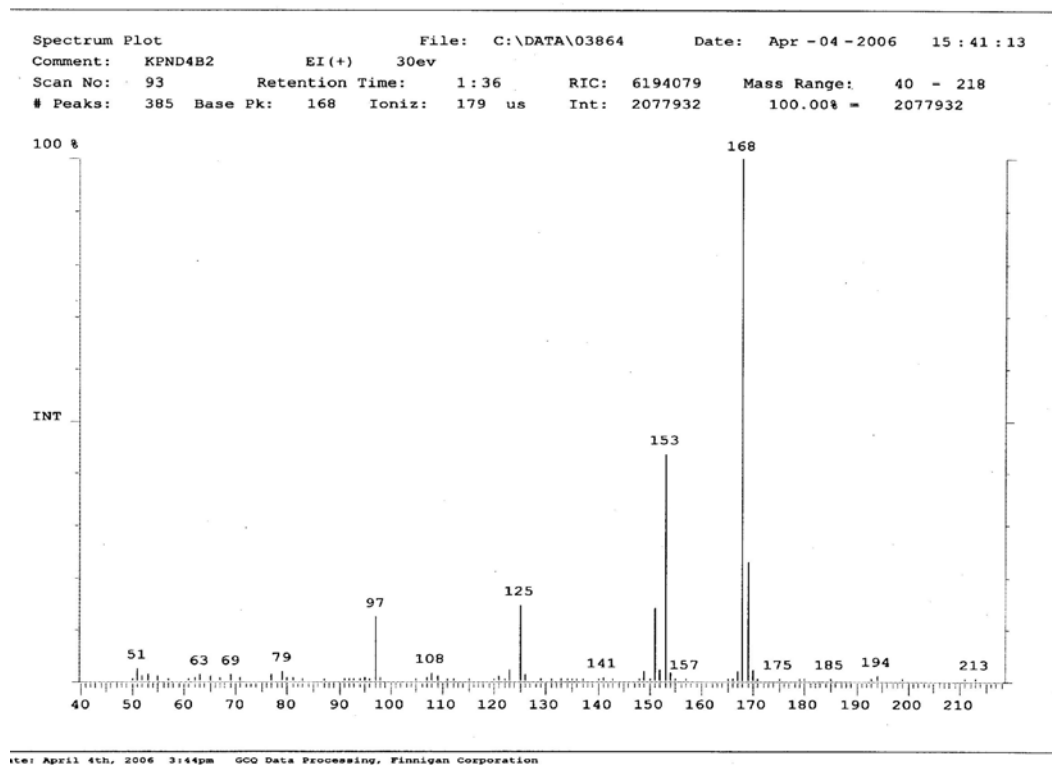


圖 8-2. Vanillic acid (8)之 EI-MS 圖譜

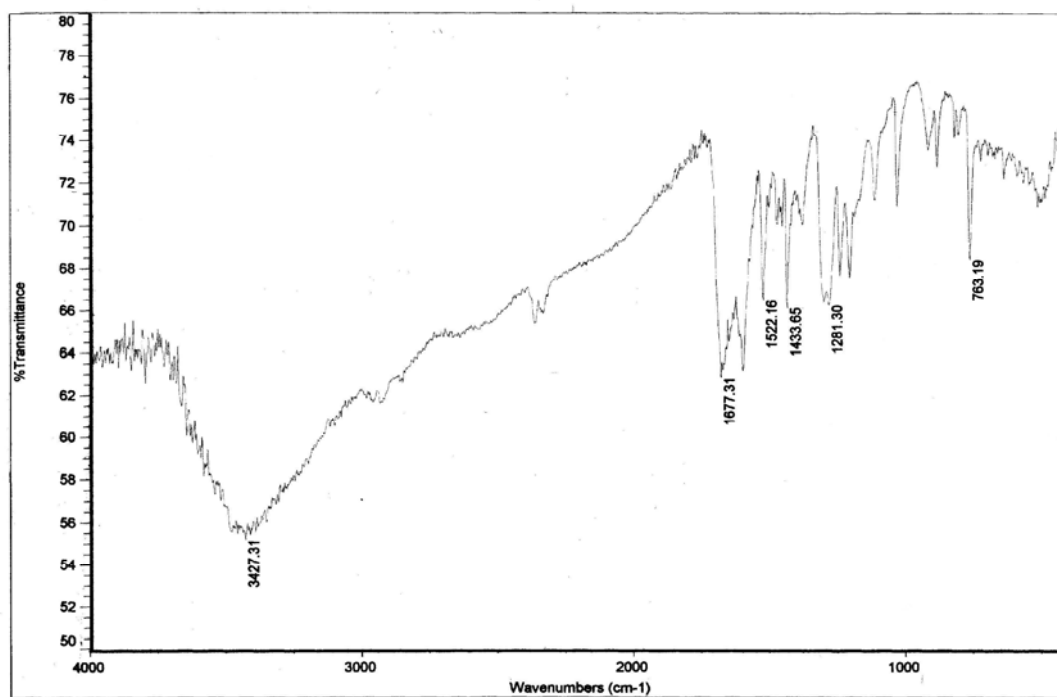
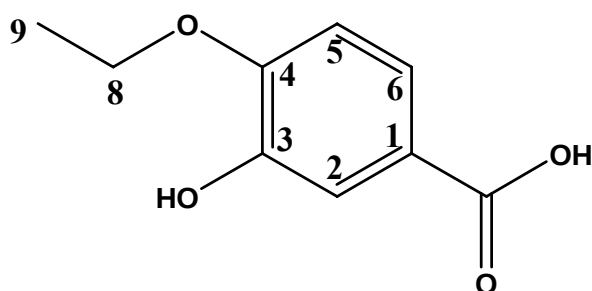


圖 8-2. Vanillic acid (8)之 IR 圖譜

九、4-Ethoxy-3-hydroxybenzoic acid (9)之結構解析



本化合物 **9** 為無色針狀結晶，熔點為 130~133℃；由電子游離質譜(EI-MS)分析顯示(圖 9-3)其分子離子峰 $[M]^+$ 為 m/z 182，推算其分子式為 $C_9H_{10}O_4$ 。紅外線吸收光譜(IR)(圖 9-4)在 3274 cm^{-1} ，有羥基(OH)訊號吸收。

由 $^1\text{H-NMR}$ 光譜(圖 9-1)在芳香質子區域 δ_H 7.49 (1H, *s*, H-2)、 δ_H 6.85 (1H, *d*, $J = 8.8\text{ Hz}$ H-5)、 δ_H 7.52 (1H, *dd*, $J = 8.8, 1.0\text{ Hz}$ H-6)，出現一組 ABX 型的質子吸收訊號。 δ_H 4.30 (2H, *q*, $J = 7.2\text{ Hz}$ H-8)、 δ_H 1.35 (3H, *t*, $J = 7.2\text{ Hz}$ H-9)有相連偶合關係， $^{13}\text{C-NMR}$ 光譜 (圖 9-2)中於 δ_C 123.2 (C-1)、 δ_C 114.4 (C-2)、 δ_C 143.6 (C-3)、 δ_C 149.0 (C-4)、 δ_C 116.1 (C-5)、 δ_C 122.5 (C-6)為芳香環吸收訊號，其中 C-3、C-4 為雙鍵上皆有含拉電子基羥基的吸收訊號，因 C-4 位受到醚(-O-)的陰電性沒有 C-3 上的羥基(OH)來的強，因而確認 C-8, C-9 連接於四號位上的醚上。另外 δ_C 167.0 有酸基(COOH)的吸收訊號。

綜合以上資料所述，本化合物含有一個 ABX 型的芳香環、一個羥基、一個 ethoxy，再比對文獻資料，⁷⁹ 確定此化合物為 4-Ethoxy-3-hydroxybenzoic acid。此化合物為過去文獻中僅在於合成，無任何天然物發現的資料，因此本化合物為天然物中第一次發現。

表 3-9 化合物 **9** 之核磁共振圖譜數據整理

4-Ethoxy-3-hydroxy-benzoic acid (200Hz) CDCl ₃		
Position	¹ H	¹³ C
1		123.2
2	7.49 (s)	114.4
3		143.6
4		149.0
5	6.85 (d, 8.8)	116.1
6	7.52 (dd, 8.8, 1.0)	122.5
7		
8	4.30 (q, 7.2)	60.8
9	1.35 (t, 7.2)	14.3
COOH		167.0

J values in Hz



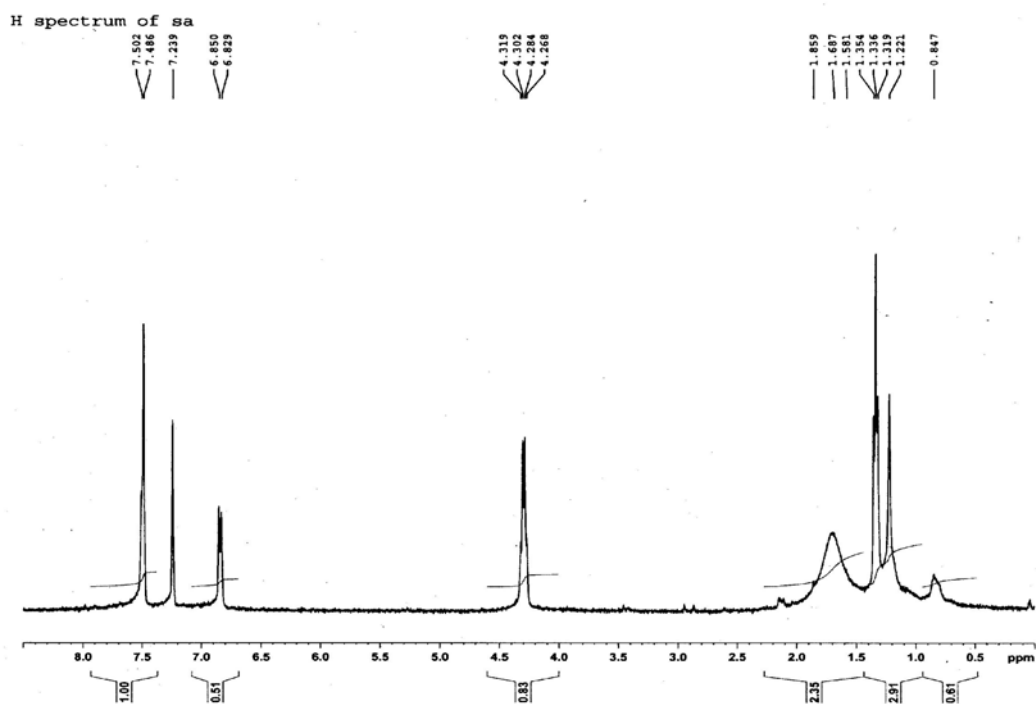


圖 9-1. 4-Ethoxy-3-hydroxybenzoic acid (9)之 ^1H -NMR 圖譜

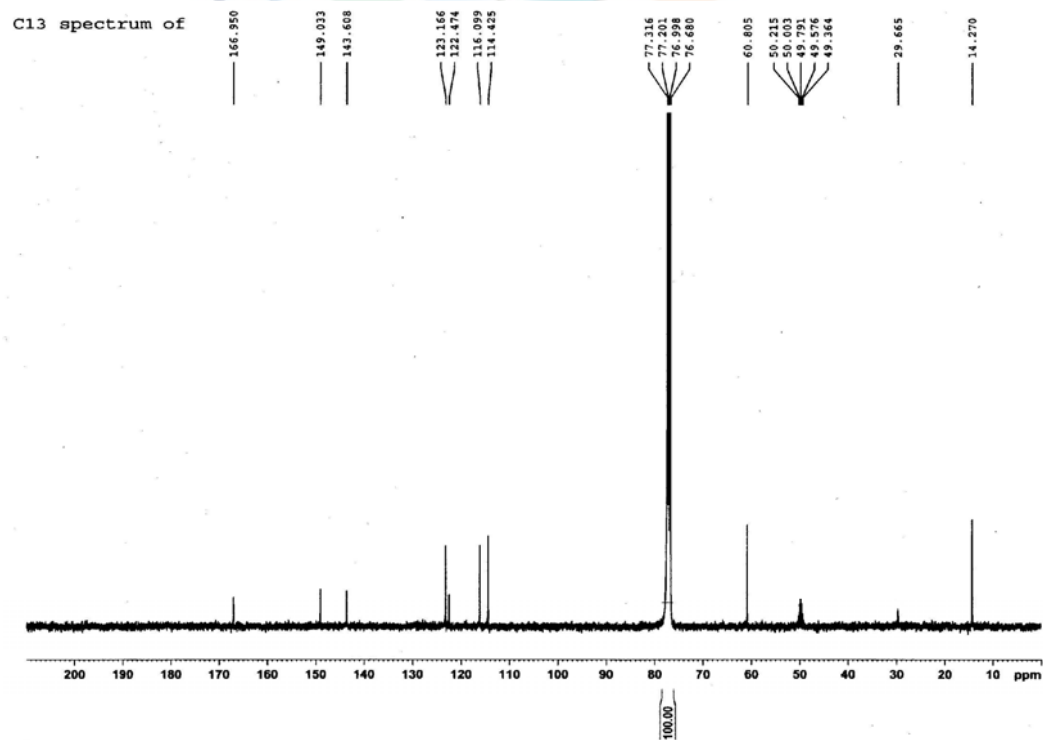


圖 9-2. 4-Ethoxy-3-hydroxybenzoic acid (9)之 ^{13}C -NMR 圖譜

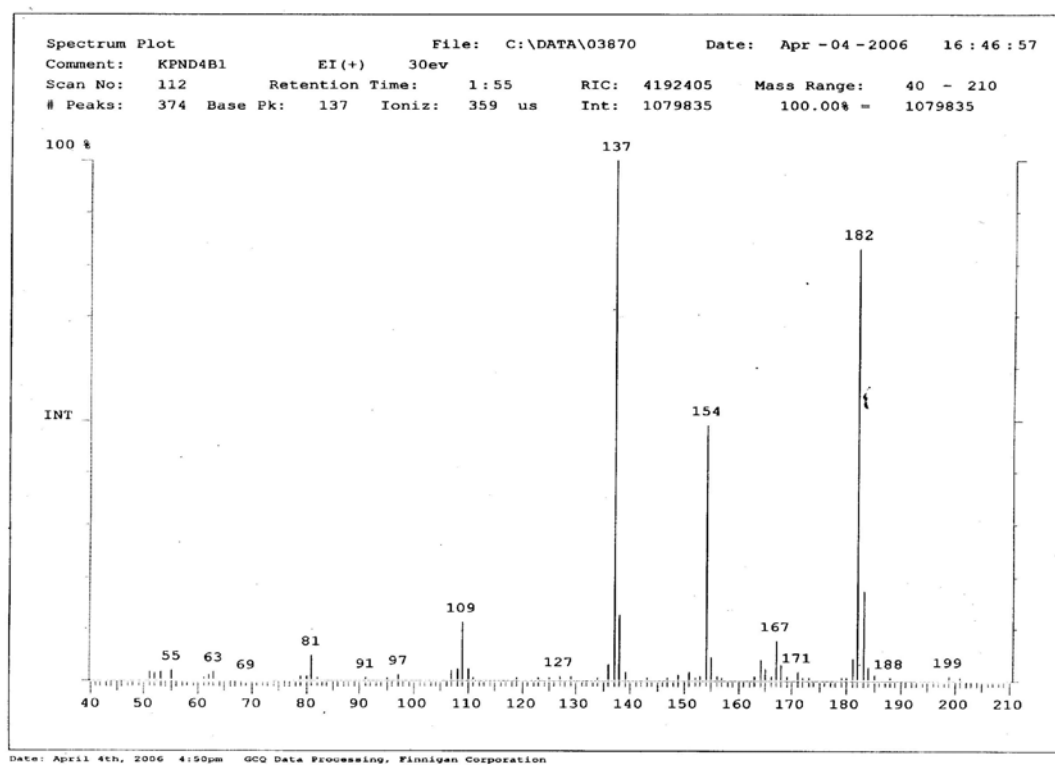


圖 9-3. 4-Ethoxy-3-hydroxybenzoic acid (9)之 EI-MS 圖譜

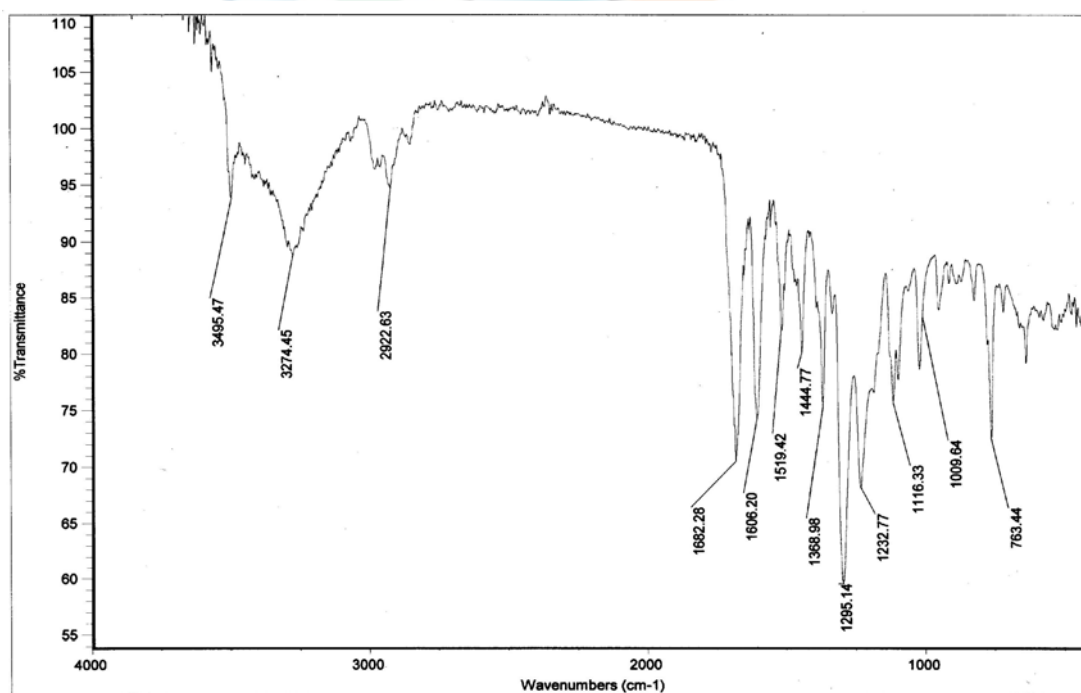
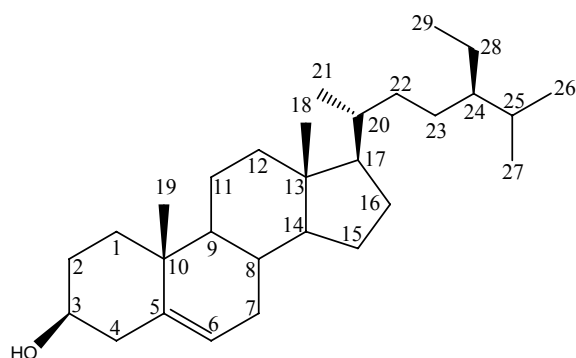


圖 9-4. 4-Ethoxy-3-hydroxybenzoic acid (9)之 IR 圖譜

十、 β -Sitosterol (10)之結構解析



本化合物 **10** 為無色針狀結晶，熔點為 128~130°C；於 TLC 展開後，以 5% H_2SO_4 浸潤，加熱後呈紅紫色，由電子游離質譜(EI-MS)分析顯示(圖 10-3)其分子離子峰 $[\text{M}]^+$ 為 m/z 414，推算其分子式為 $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$ 。UV 無明顯吸收，紅外線吸收光譜(IR)(圖 10-4)；3379 cm^{-1} 有羥基(OH)的吸收訊號。推測此化合物為固醇類的基本骨架。

由 $^1\text{H-NMR}$ (圖 10-1)的訊號可知在高磁場區域分別出現 δ_{H} 0.68 (3H, *s*, CH_3 -18)、 δ_{H} 1.01 (3H, *s*, CH_3 -19)，有三支 doublet 出現再 δ_{H} 0.92 (3H, *d*, $J = 6.8$ Hz, CH_3 -21)、 δ_{H} 0.93 (3H, *d*, $J = 6.8$ Hz, CH_3 -26)、 δ_{H} 0.81 (3H, *d*, $J = 6.4$ Hz, CH_3 -27)，另一支 triplet 出現在 δ_{H} 0.85 (3H, *t*, $J = 7.2$ Hz, CH_3 -29)。由 $^{13}\text{C-NMR}$ (圖 10-2)顯示 δ_{C} 71.8 (C-3)有一羥基訊號，而 δ_{C} 140.7 (C-5)、 δ_{C} 121.7 (C-6)為雙鍵訊號。

根據上述資料，而判定此化合物為植物中廣泛存在的 β -sitosterol，經比對文獻資料的 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、ESI-MS 等各數據後，⁸² 最後確認其結構。

表 3-10 化合物 **10** 之核磁共振圖譜數據整理

β -sitosterol (400 Hz) CDCl ₃		
Position	¹ H	¹³ C
1		37.2 (t)
2		31.6 (t)
3	3.52 (<i>m</i>)	71.8 (d)
4		42.3 (t)
5		140.7 (s)
6	5.33 (<i>m</i>)	121.7 (d)
7		31.9 (t)
8		30.9 (d)
9		50.1 (d)
10		36.5 (s)
11		21.1 (t)
12		39.8 (t)
13		42.3 (s)
14		56.7 (d)
15		24.3 (t)
16		28.2 (t)
17		56.0 (d)
18	0.68 (<i>s</i>)	12.0 (q)
19	1.01 (<i>s</i>)	19.0 (q)
20		36.1 (d)
21	0.92 (<i>d</i> , <i>J</i> =6.8)	18.8 (q)
22		33.9 (t)
23		26.0 (t)
24		45.8 (d)
25		29.1 (d)
26	0.93 (<i>d</i> , <i>J</i> =6.8)	19.8 (q)
27	0.81 (<i>d</i> , <i>J</i> =6.4)	19.4 (q)
28		23.0 (t)
29	0.85 (<i>t</i> , <i>J</i> =7.2)	11.9 (q)

J values in Hz

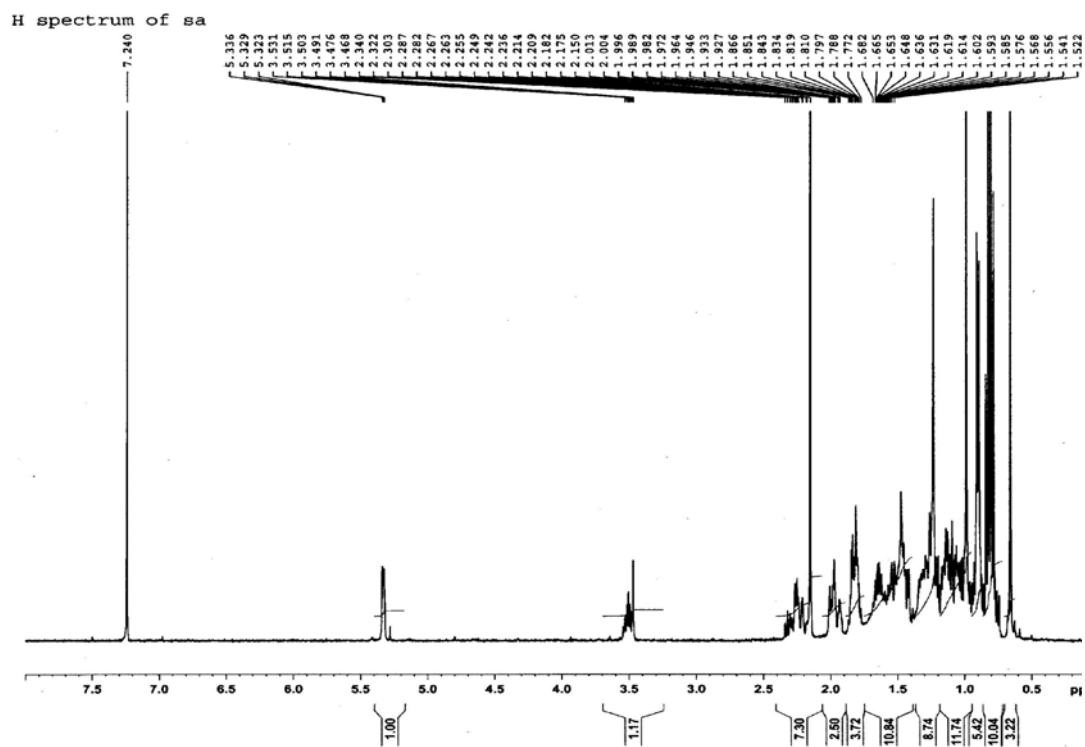


圖 10-1. β -Sitosterol (10)之 ^1H -NMR 圖譜

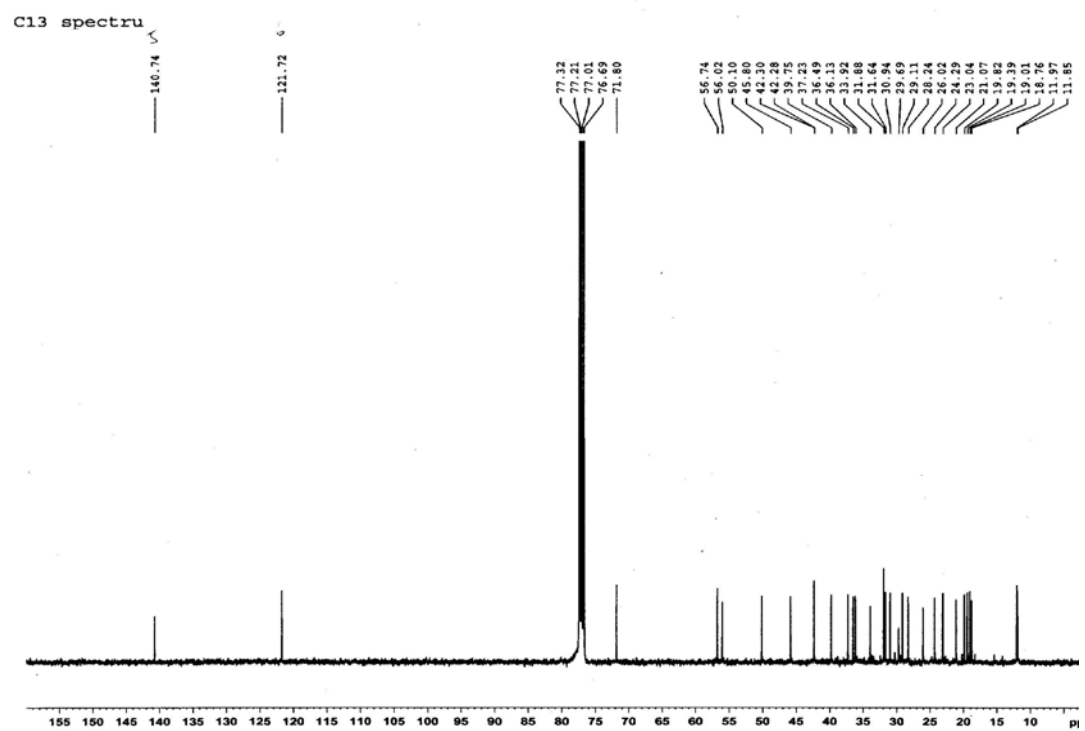


圖 10-2. β -Sitosterol (10)之 ^{13}C -NMR 圖譜

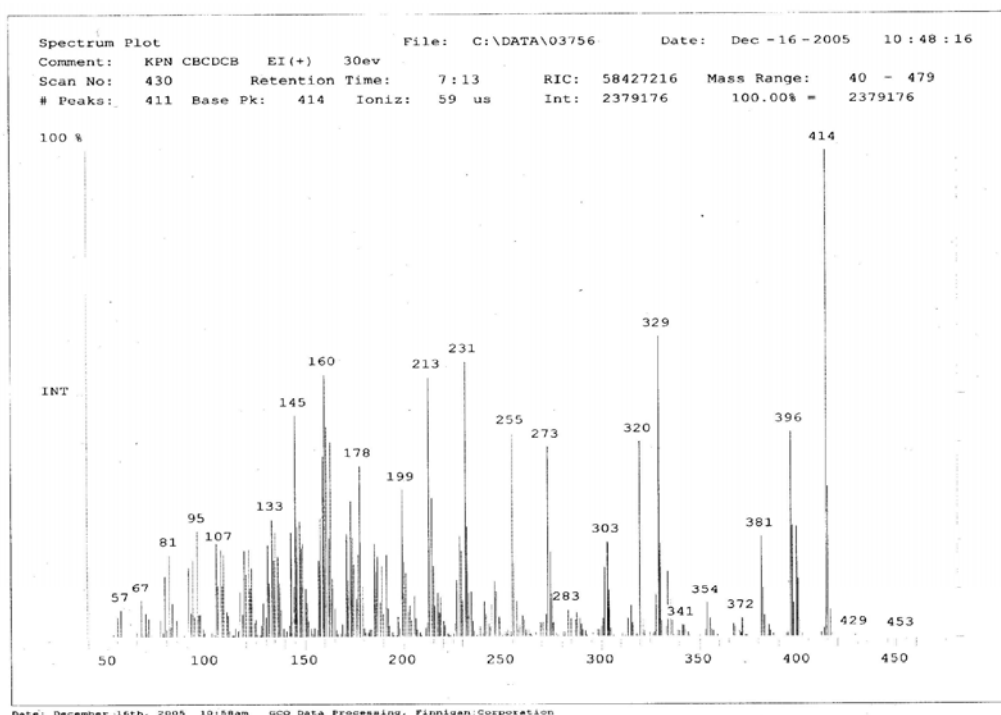


圖 10-3. β -Sitosterol (10)之 EI-MS 圖譜

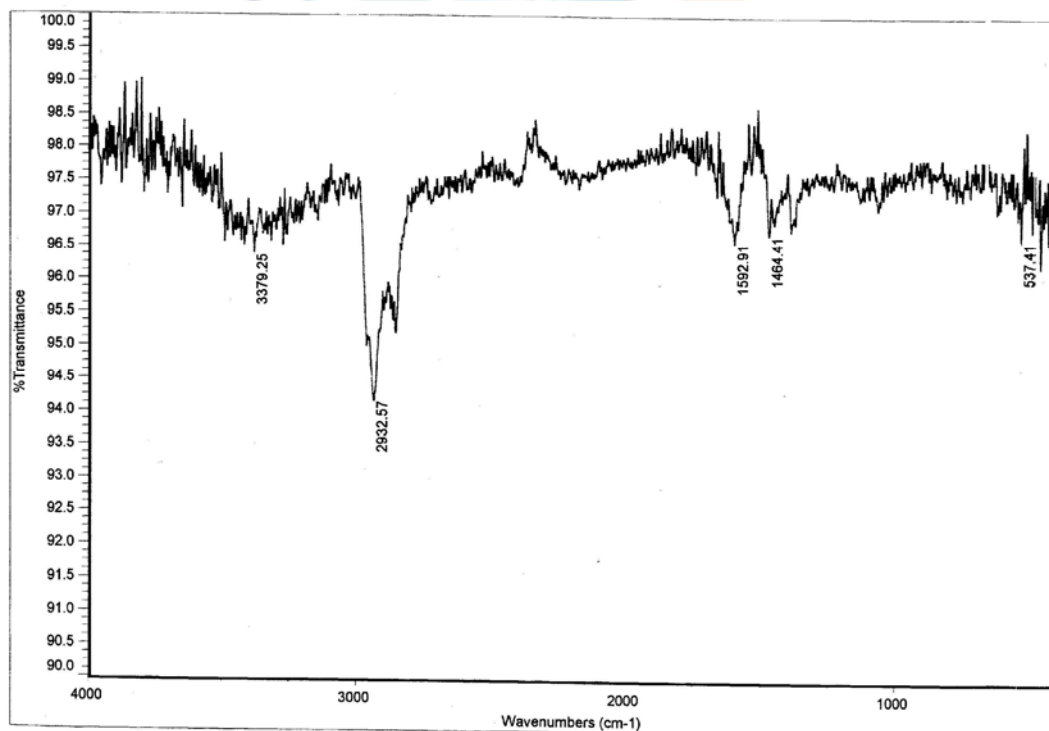
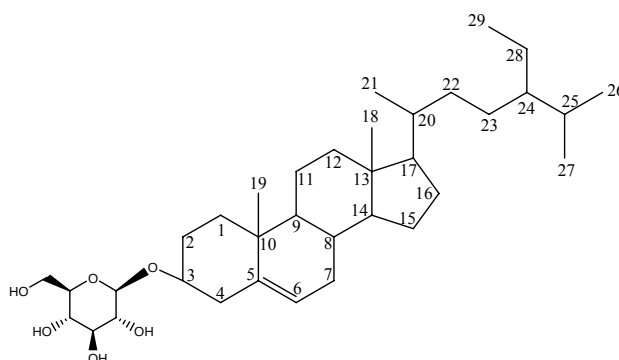


圖 10-4. β -Sitosterol (10)之 IR 圖譜

十一、 β -Stiosteryl glucoside (11)之結構解析



本化合物 **11** 為白色粉狀物，熔點 $>280^{\circ}\text{C}$ ；於 TLC 展開後，以 5 % H_2SO_4 浸潤，加熱後呈紅灰色，由電灑游離法質譜(ESI-MS)分析顯示(圖 11-3)其分子離子峰 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 為 m/z 599.3，推算其分子式為 $\text{C}_{35}\text{H}_{60}\text{O}_6$ ，推測此化合物為固醇類。紅外線吸收光譜(IR)(圖 11-4); 3394 cm^{-1} 有羥基(OH)的吸收訊號。

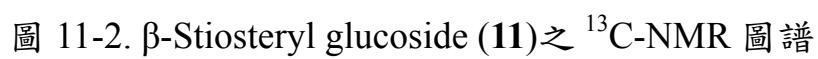
由 $^1\text{H-NMR}$ (圖 11-1) 和 $^{13}\text{C-NMR}$ (圖 11-2)顯示的訊號可知在高磁場區域分別出現 $\delta_{\text{H}} 0.64$ (3H, *s*, CH_3 -18)、 $\delta_{\text{H}} 0.96$ (3H, *s*, CH_3 -19)，有三支 doublet 出現再 $\delta_{\text{H}} 1.05$ (3H, *d*, $J = 6.8\text{ Hz}$, CH_3 -21)、 $\delta_{\text{H}} 0.76$ (3H, *d*, $J = 6.8\text{ Hz}$, CH_3 -26)、 $\delta_{\text{H}} 0.78$ (3H, *d*, $J = 6.8\text{ Hz}$, CH_3 -27)，另一支 triplet 出現在 $\delta_{\text{H}} 0.85$ (3H, *t*, $J = 7.2\text{ Hz}$, CH_3 -29)。在 $\delta_{\text{H}} 3.21\sim\delta_{\text{H}} 4.37$ 則有糖基的訊號。 $\delta_{\text{C}} 78.4$ (C-3)有接氧的訊號，判斷為糖基連接之位置。在 $\delta_{\text{C}} 140.8$ (C-5) 和 $\delta_{\text{C}} 121.9$ (C-6)有一組雙鍵訊號。另外在 $\delta_{\text{H}} 4.35$ (*d*, $J = 8.0\text{ Hz}$, g-1)得知其偶合常數為 β 組態。

根據上述資料，得知本化合物有六個甲基峰訊號、一個雙鍵訊號、一個糖基，而判定此化合物為植物中廣泛存在的 β -Stiosteryl glucoside，經文獻資料比對和 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、MS 等各數據後，⁸² 結果一致而確認其結構。

表 3-11 化合物 **11** 之核磁共振圖譜數據整理

β-Stiosteryl glucoside (400 Hz) CDCl ₃						
Position	¹ H	¹³ C		Position	¹ H	¹³ C
1		37.4		19	0.96 (3H, s)	12.1
2		28.5		20		34.2
3		78.4		21	1.05 (3H, <i>d</i> , 6.6)	19.2
4		39.9		22		19.9
5		140.8		23		36.9
6	5.32 (1H, br, <i>s</i>)	121.9		24		46.0
7		32.0		25		30.2
8		32.1		26	0.76 (3H, <i>d</i> , 6.6)	19.0
9		50.3		27	0.78 (3H, <i>d</i> , 6.6)	19.4
10		36.4		28		23.3
11		21.2		29	0.85 (3H, <i>d</i> , 6.6)	12.2
12		39.3		Glucose δ _H 3.2~4.3		
13		42.4		g-1	4.35 (1H, <i>d</i> , 8.0)	102.5
14		56.8		g-2		75.3
15		24.5		g-3		78.0
16		29.4		g-4		71.6
17		56.2		g-5		78.6
18	0.64 (3H, <i>s</i>)	11.9		g-6		62.8

J values in Hz



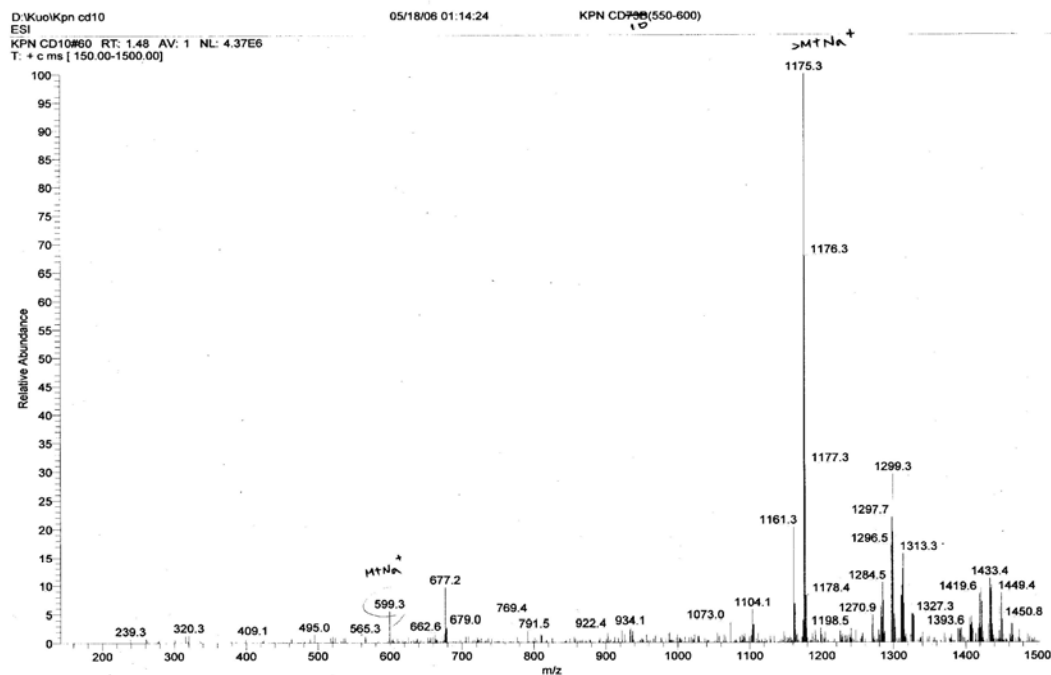


圖 11-3. β -Stiosteryl glucoside (11)之 ESI-MS 圖譜

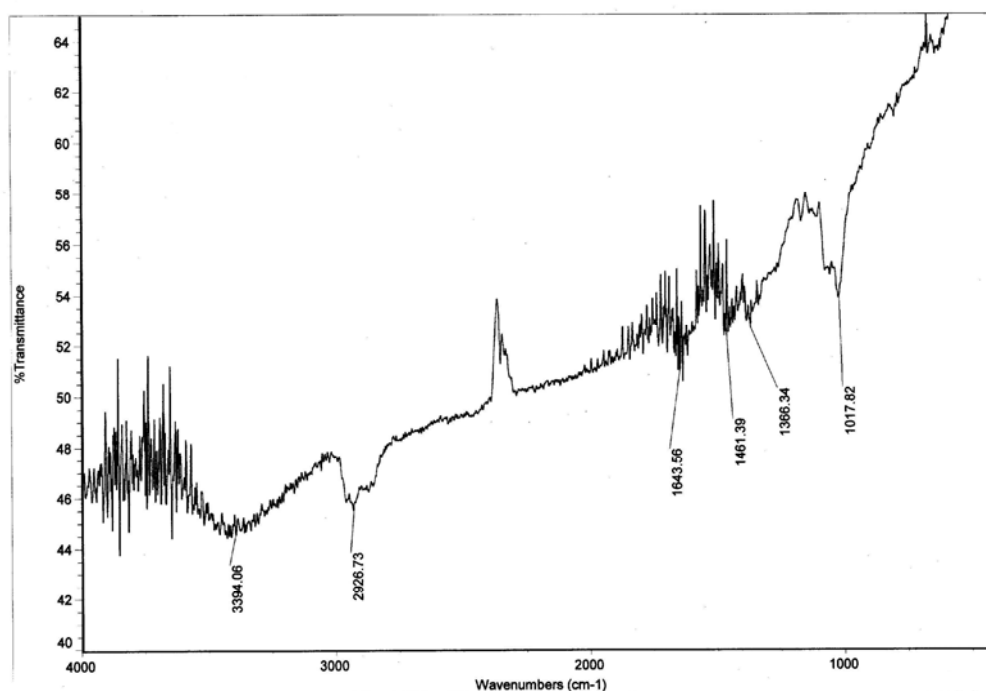
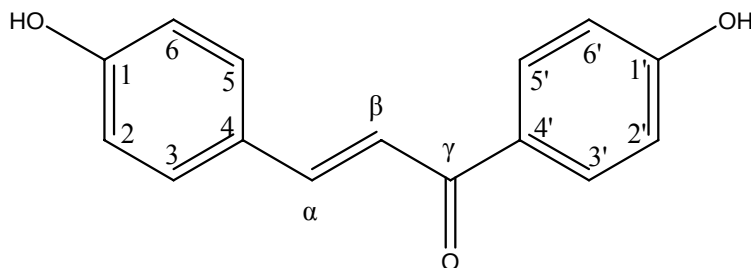


圖 11-4. β -Stiosteryl glucoside (11)之 IR 圖譜

十二、4,4'-Dihydroxyxhalcone (12)之結構解析



本化合物 **12** 為黃色粉末，熔點為 201~203°C；由電子游離質譜 (EI-MS) 分析顯示(圖 12-5)其分子離子峰 $[M]^+$ 為 m/z 240，推算其分子式為 $C_{15}H_{12}O_3$ 。紅外線吸收光譜(IR)(圖 12-6)在 3210 cm^{-1} ，有羥基(OH)訊號吸收； 1589 cm^{-1} 、 1508 cm^{-1} 、 1439 cm^{-1} 有苯環上雙鍵的吸收訊號。

由 $^1\text{H-NMR}$ 光譜(圖 12-1)在芳香質子區域 δ_{H} 8.0 (2H, d , $J = 9.0\text{ Hz}$, H-3', H-5')、 δ_{H} 7.62 (2H, d , $J = 8.5\text{ Hz}$, H-3, H-5)、 δ_{H} 6.85 (2H, d , $J = 8.5\text{ Hz}$, H-2', H-6')及 δ_{H} 6.89 (2H, d , $J = 8.5\text{ Hz}$, H-2, H-6)，出現兩個 A_2B_2 對位型的質子吸收訊號，推測本化合物具有兩個對位取代基的芳香環。此外在 δ_{H} 7.72 (1H, d , $J = 15.5\text{ Hz}$, H- α)及 δ_{H} 7.60 (1H, d , $J = 15.5\text{ Hz}$, H- β)，由偶合常數得知有一組反式(trans)雙鍵的質子吸收訊號。 $^{13}\text{C-NMR}$ 光譜(圖 12-2)中於 δ_{C} 161.5 (C-1)、 δ_{C} 163.9 (C-1')為雙鍵上皆有含拉電子基羥基的吸收訊號； δ_{C} 190.2 (C- γ)有酮基(C=O)的吸收訊號。

在 COSY 圖譜(圖 12-5)中顯示，(H-3, H-5)和(H-2, H-6)有偶合的關係；(H-3', H-5')和(H-2', H-6')有偶合的關係以及 H- α 和 H- β 有偶合的關係。另外配合 HMBC 圖譜(圖 12-4)， δ_{C} 127.9 (C-4')和 δ_{H} 6.85 (H-2', H-6')有 3J 偶合、 δ_{C} 131.1 (C-4)和 δ_{H} 6.89 (H-2, H-6) 有偶合關係，另外在 δ_{H} 8.0(H-3', H-5')和 δ_{C} 190.2 (C- γ)也有偶合關係，因而確認(H-3',

H-5')和(C- γ)的相關位置。

根據以上資料，本化合物各有兩個對位取代基的芳香環、兩個羥基和一組反式雙鍵，再對照 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR、HMQC、HMBC、DEPT 等圖譜，推斷此化合物結構後，再比對文獻資料，⁷⁷ 確定此化合物為 4,4'-dihydroxychalcone。

表 3-12 化合物 **12** 之核磁共振圖譜數據整理

4,4'-Dihydroxychalcone (500Hz) CD ₃ OD		
Position	^1H	^{13}C
1		161.5
2	6.89 (d, 8.5)	116.9
3	7.61 (d, 9.0)	131.7
4		131.1
5	7.61 (d, 9.0)	131.7
6	6.89 (d, 8.5)	116.9
α	7.72 (d, 15.5)	145.7
β	7.60 (d, 15.5)	119.6
γ		190.2
1'		163.9
2'	6.85 (d, 8.5)	116.4
3'	8.00 (d, 8.0)	132.2
4'		127.9
5'	8.00 (d, 8.0)	132.2
6'	6.85 (d, 8.5)	116.4

J. values in Hz

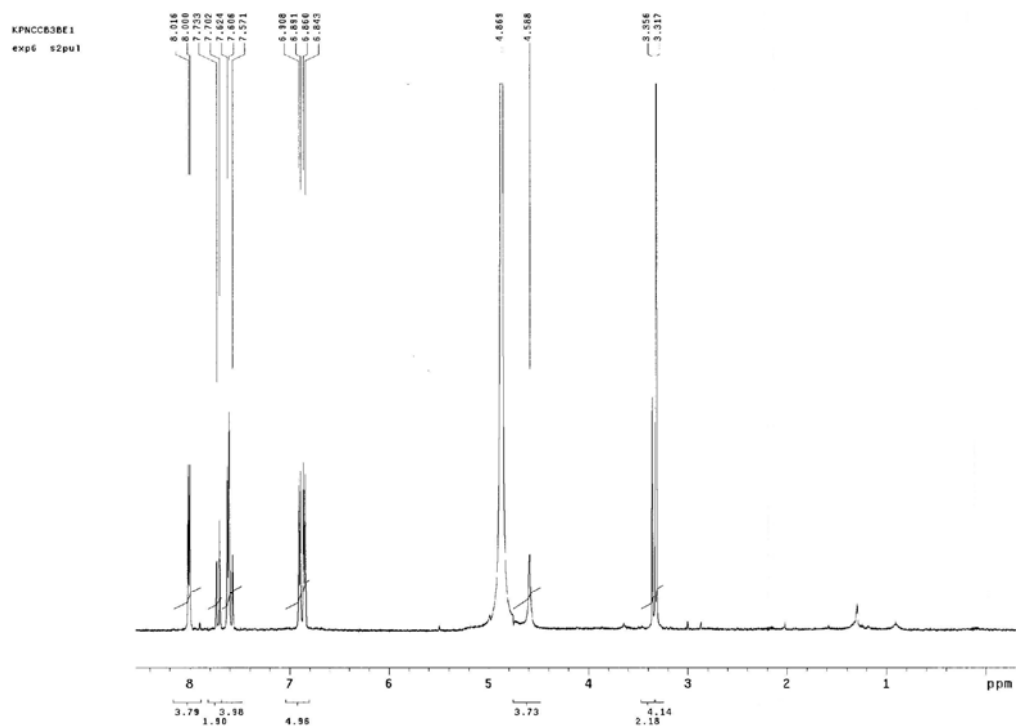


圖 12-1. 4,4'-Dihydroxychalcone (**12**)之 ^1H -NMR 圖譜

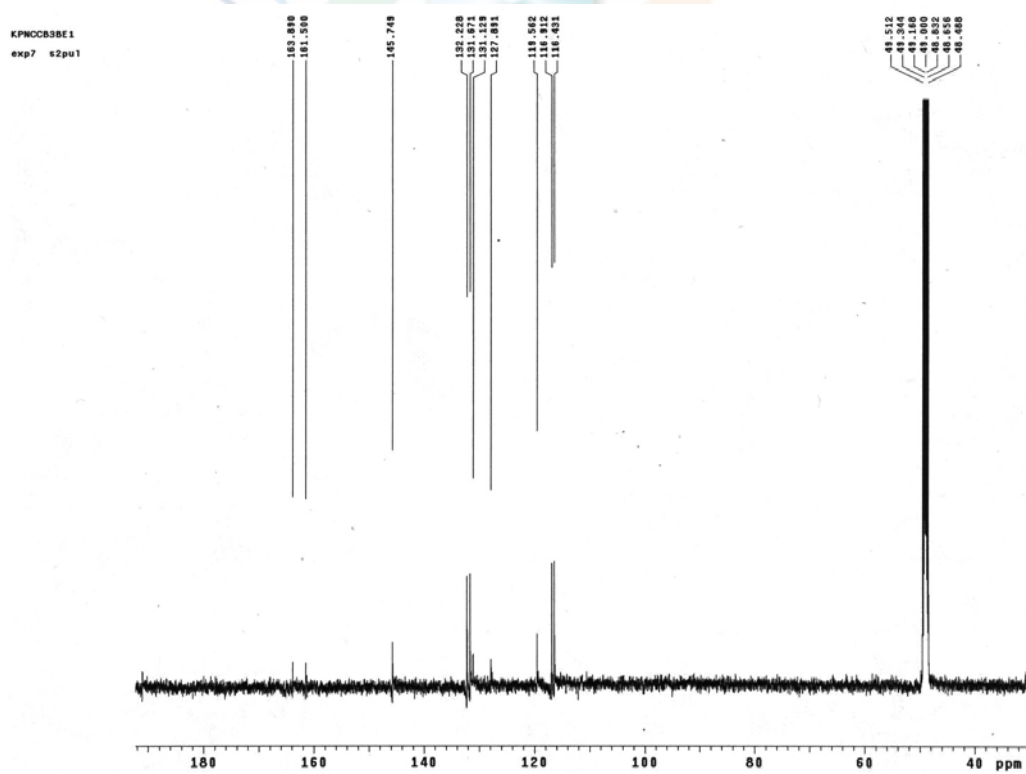


圖 12-2. 4,4'-Dihydroxychalcone (**12**)之 ^{13}C -NMR 圖譜

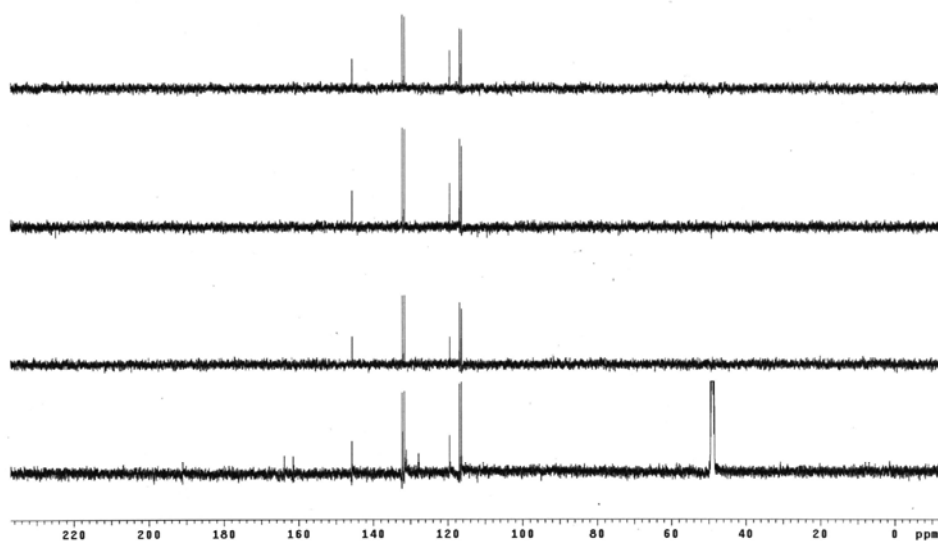


圖 12-3. 4,4'-Dihydroxychalcone (12)之 DEPT 圖譜

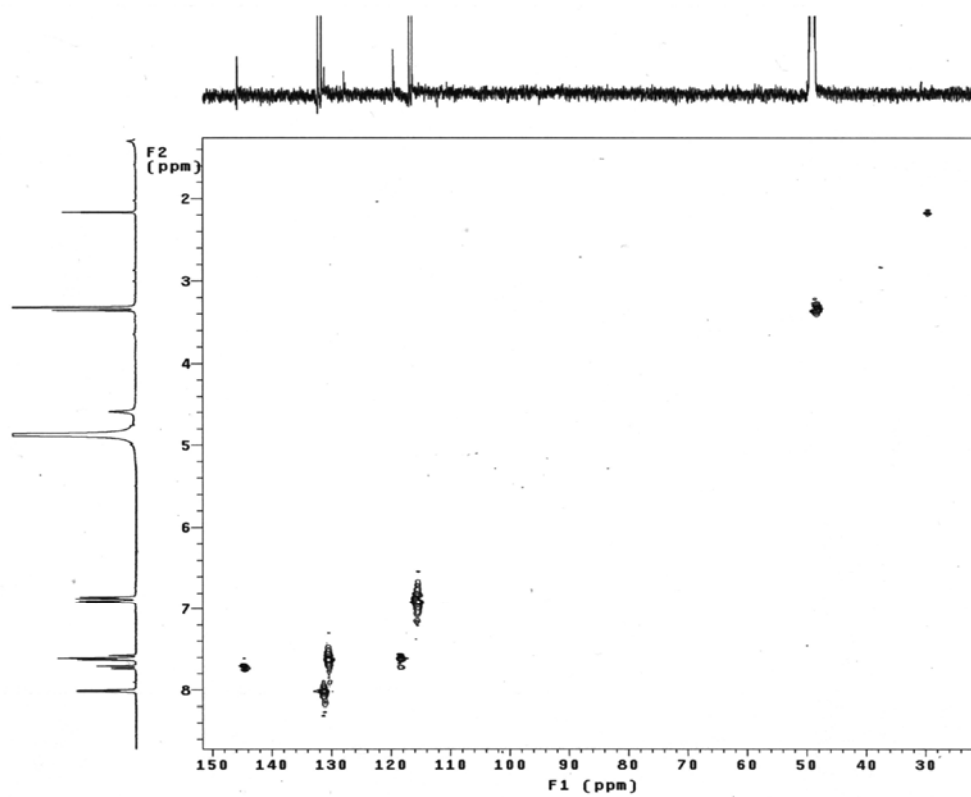


圖 12-4. 4,4'-Dihydroxychalcone (12)之 HMQC 圖譜

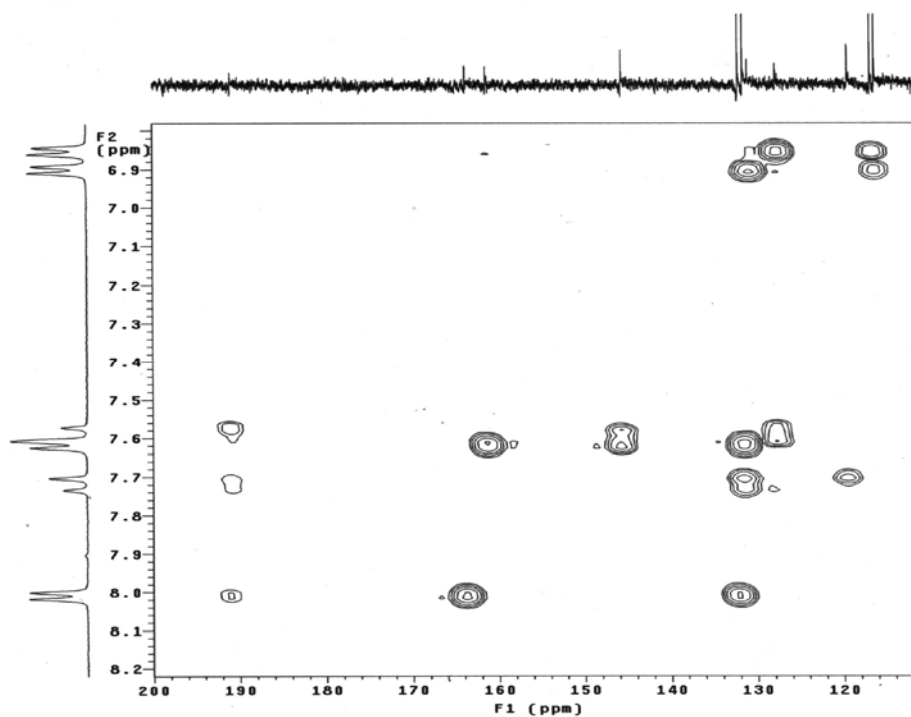


圖 12-5. 4,4'-Dihydroxychalcone (12)之 HNBC 圖譜

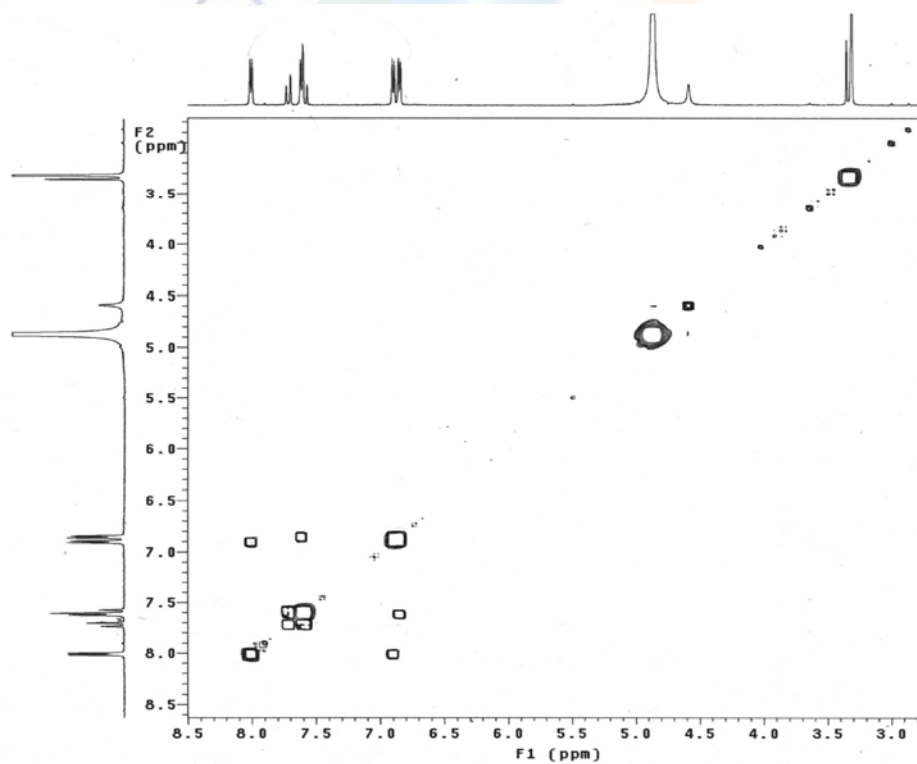


圖 12-6. 4,4'-Dihydroxychalcone (12)之 COSY 圖譜

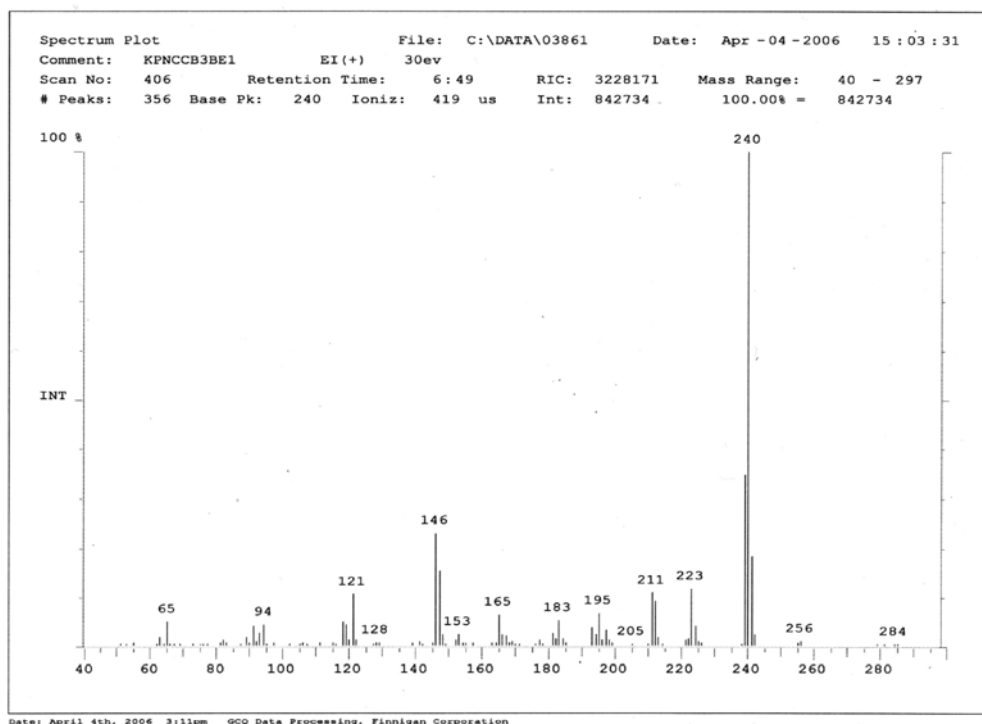


圖 12-7. 4,4'-Dihydroxychalcone (12)之 EI-MS 圖譜

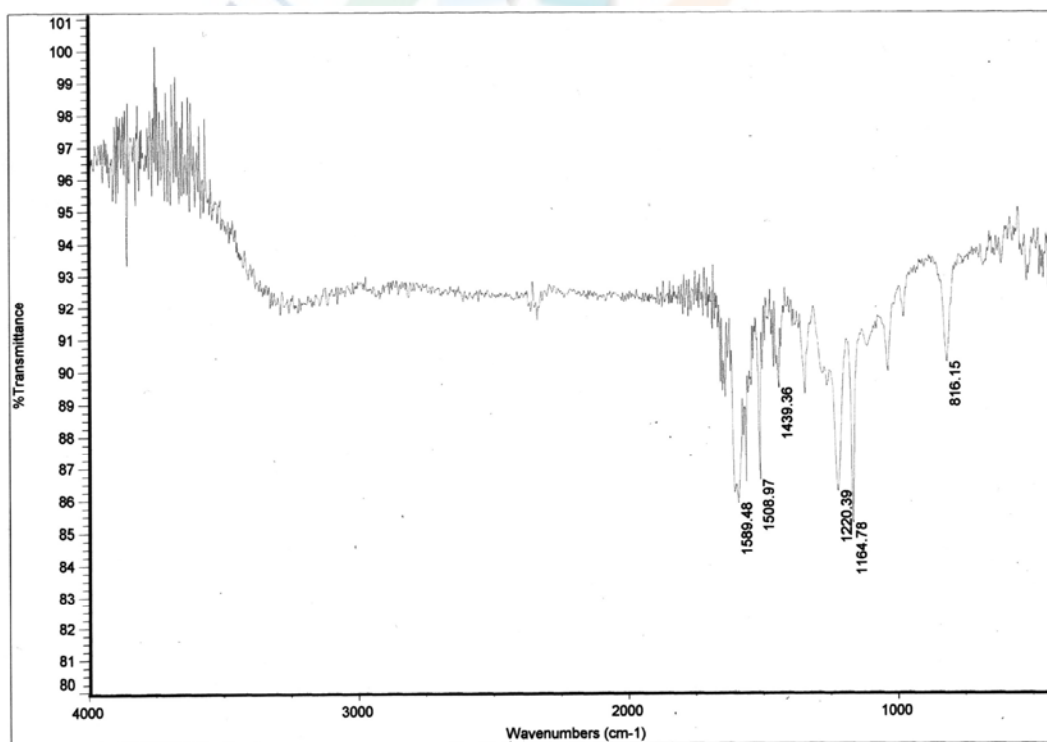
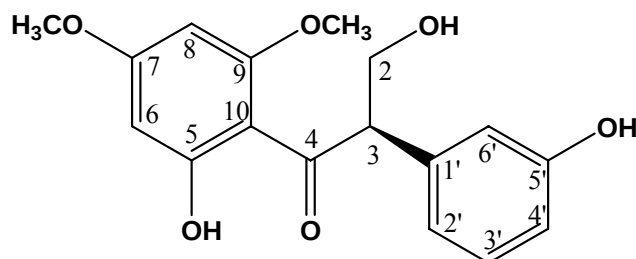


圖 12-8. 4,4'-Dihydroxychalcone (12)之 IR 圖譜

十三、podonakachalcone A (13)之結構解析



化合物 **13** 為黃色固體，熔點為 75-78°C；由電子游離質譜(EI-MS)分析顯示(圖 13-7)其分子離子峰 $[M]^+$ 為 m/z 318，推算其分子式為 $C_{17}H_{18}O_6$ 。紅外線吸收光譜(IR)(圖 13-8)在 3388 cm^{-1} ，有羥基(OH)訊號吸收； 1591 cm^{-1} 、 1517 cm^{-1} 、 1427 cm^{-1} 、 1275 cm^{-1} 有苯環上雙鍵的吸收訊號。

由 $^1\text{H-NMR}$ 光譜(圖 13-1)在芳香質子區域 δ_{H} 6.60 (1H, *t*, $J = 8.5$ Hz, H-3)、 δ_{H} 6.85 (2H, *m*, H-6, H-8)、 δ_{H} 6.80 (1H, *dd*, $J = 1.5, 7.5$ Hz, H-2')及 δ_{H} 7.53 (2H, *dt*, $J = 1.5, 3.0$ Hz, H-3', H-4')、 δ_{H} 6.72 (1H, *s*, H-6')和 $^{13}\text{C-NMR}$ (圖 13-2) δ_{C} 150.8 (C-5)、 δ_{C} 115.2 (C-6)、 δ_{C} 146.8 (C-7)、 δ_{C} 114.2 (C-8)、 δ_{C} 147.2 (C-9)、 δ_{C} 128.7 (C-10)、 δ_{C} 129.4 (C-1')、 δ_{C} 121.8 (C-2')、 δ_{C} 124.7 (C-3')、 δ_{C} 110.9 (C-5')、 δ_{C} 110.4 (C-6')其中 C-5、C-7、C-9、C-5' 上皆有含氧的官能基。在 δ_{H} 3.89 (3H, *s*, 7-OMe)、 δ_{H} 3.82 (3H, *s*, 9-OMe)有兩個甲氧基訊號， δ_{C} 198.8 (C-4)有一酮基訊號， δ_{C} 65.6(C-2)有一羥基訊號。在 DEPT(圖 13-3)上，得知 C-2 為亞甲基，也得知 C-4、C-5、C-7、C-9、C-10、C-1'、C-5'為四級碳，扣除含氧訊號部分 C-5、C-7、C-9、C-5'及含酮基 C-4 部分，得知 C-10、C-1'可能為二個芳香環外接相連之位置。另外比對文獻⁸⁶，經由偶合常數的確認碳上第 3 號與 1'位置為 β 位相。

由 COSY 圖譜 (圖 13-6)，顯示(H-2, H-3)、(H-2', H-3')偶合關係。

另外配合 HMBC(圖 13-5)，C-1'和 H-3 及 C-3 與 H-2、H-2'、H-6'有關聯，因而確認 C-1'為 B 芳香環，C-10 為 A 芳香環相連側鏈之位置。另外在 C-5、C-9、C-10 都與 H-6、H-8，有相連關係，C-1'與 H-3、H-4 有關聯，C-5'與 H-2'、H-6'有相關連接，分別得知兩個芳香環上的相關位置，再由 C-4 與 H-2、H-3 的相連關係得知二個芳香環中間相連位置。

根據以上資料，本化合物有二個芳香環，一個酮基，二個甲氧基，一個亞甲氧基和二個苯環上的羥基，再詳照 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、HMQC、HMBC、DEPT 等圖譜，確定此化合物結構。經文獻查閱未記載此化合物，因此此化合物係首次發現，暫將此化合物命名為 podonakachalcone A。

表 3-13 化合物 **13** 之核磁共振圖譜數據整理 (500Hz) CDCl₃

Position	¹ H	¹³ C	HMBC
2	3.87 (<i>dt</i> , 2.0, 9.0) 4.23 (<i>dt</i> , 2.0, 9.0)	65.6	H-3
3	4.66 (<i>t</i> , 8.5)	55.8	H-2, H-6', H-2'
4		198.8	H-2, H-3
5		150.8	H-6
6	6.85 (<i>m</i>)	115.2	
7		146.8	
8	6.85 (<i>m</i>)	114.2	
9		147.2	H-8
10		128.7	H-6, H-8
1'		129.4	H-3'
2'	6.80 (<i>dd</i> , 1.5, 7.5)	121.8	H-6', H-3
3'	7.53 (<i>dt</i> , 1.5, 3.0)	124.7	H-4'
4'	7.53 (<i>dt</i> , 1.5, 3.0)	110.9	
5'		145.4	H-2'
6'	6.72 (<i>s</i>)	110.4	H-3
7-OMe	3.89 (<i>s</i>)	55.8	
9-OMe	3.82 (<i>s</i>)	56.2	

J values in Hz

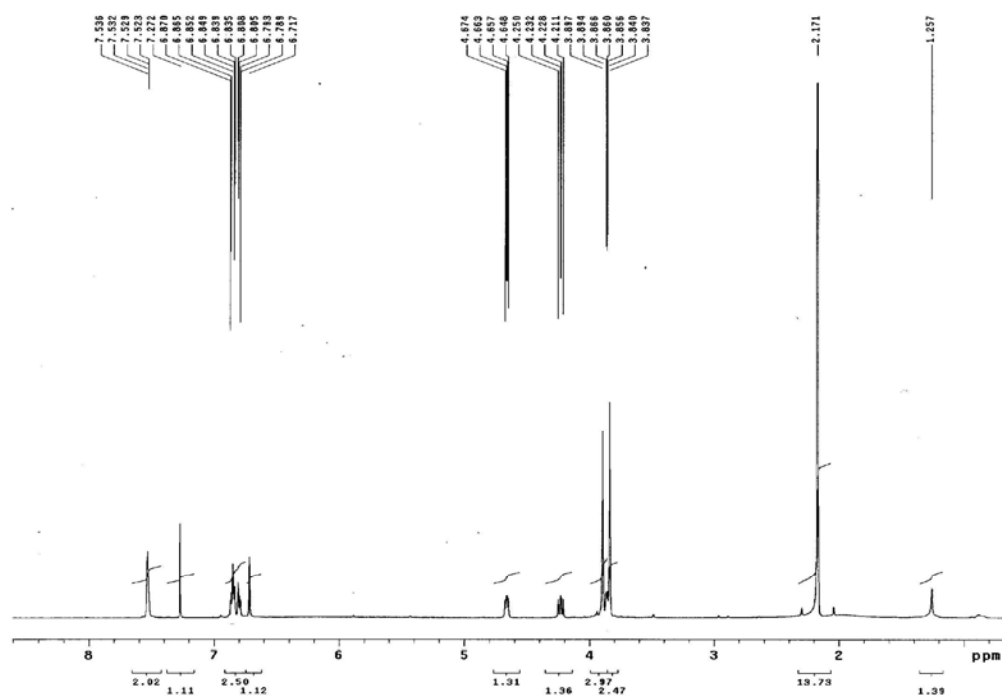


圖 13-1. podonakachalcone A (13)之 ¹H-NMR 圖譜

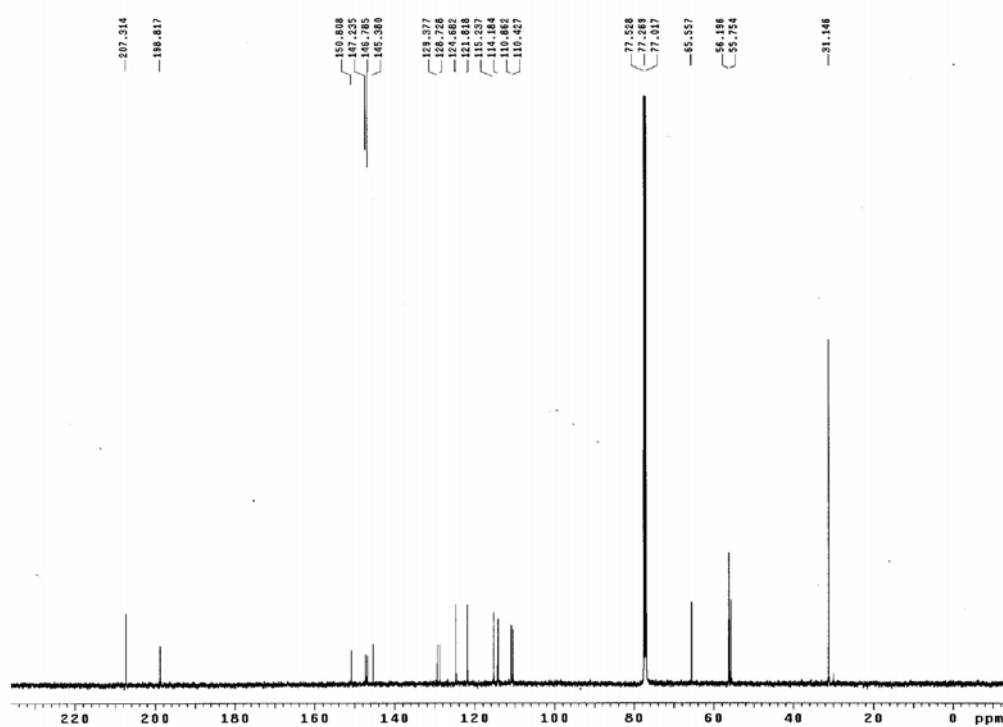


圖 13-2. podonakachalcone A (13)之 ¹³C-NMR 圖譜

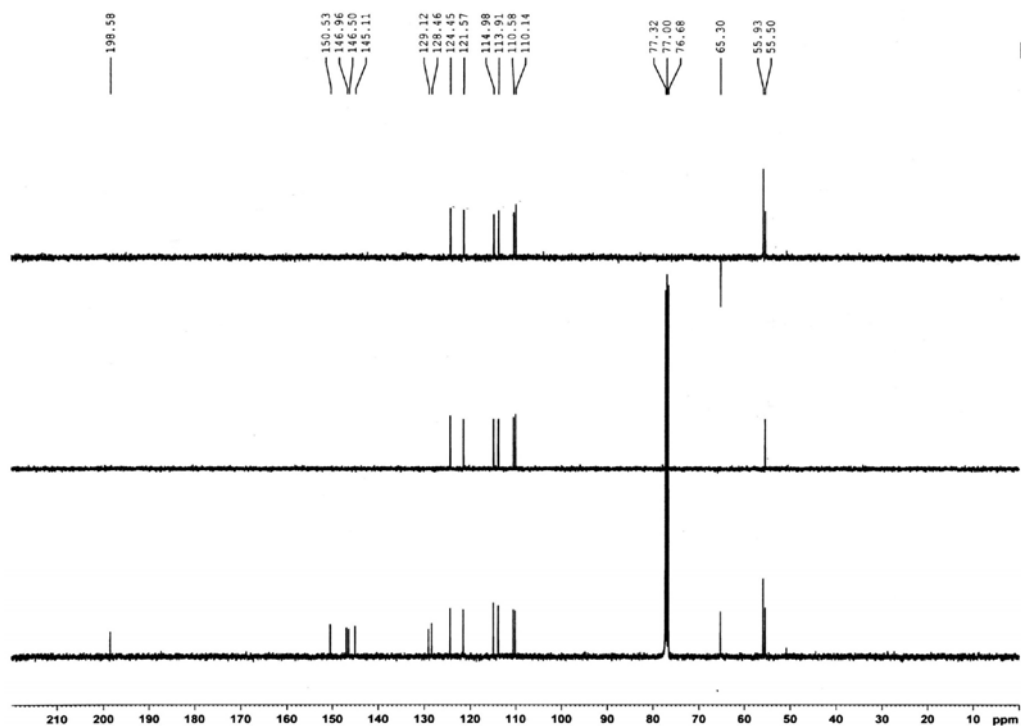


圖 13-3. podonakachalcone A (13)之 DEPT 圖譜

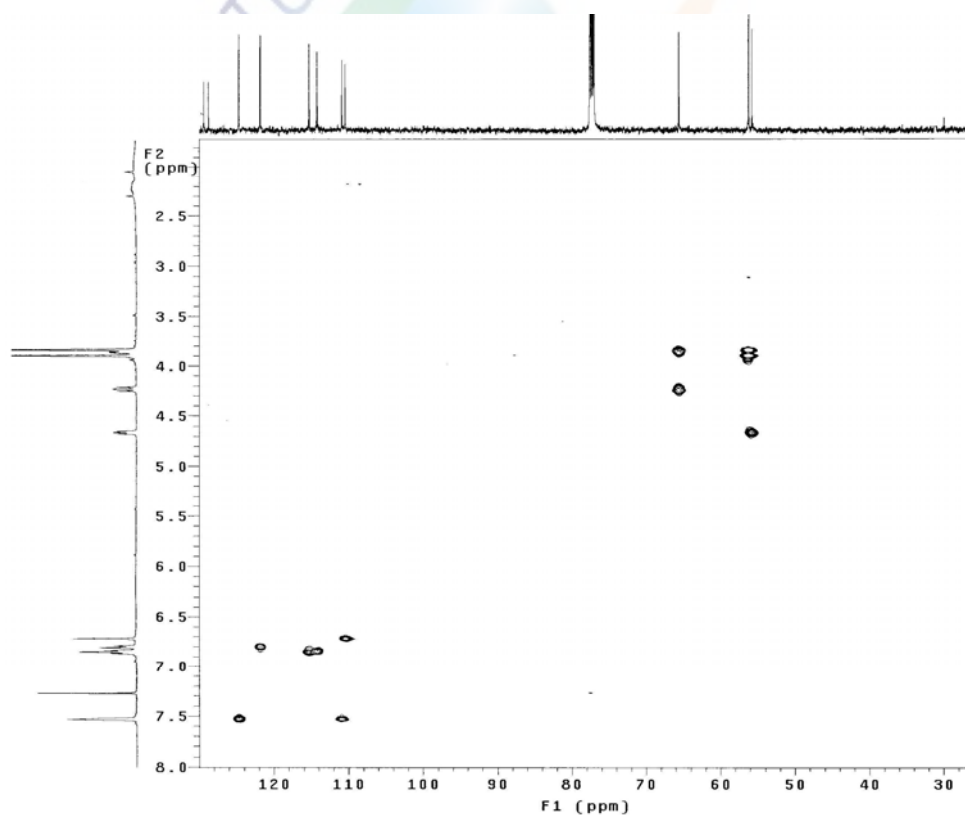


圖 13-4. podonakachalcone A (13)之 HMQC 圖譜

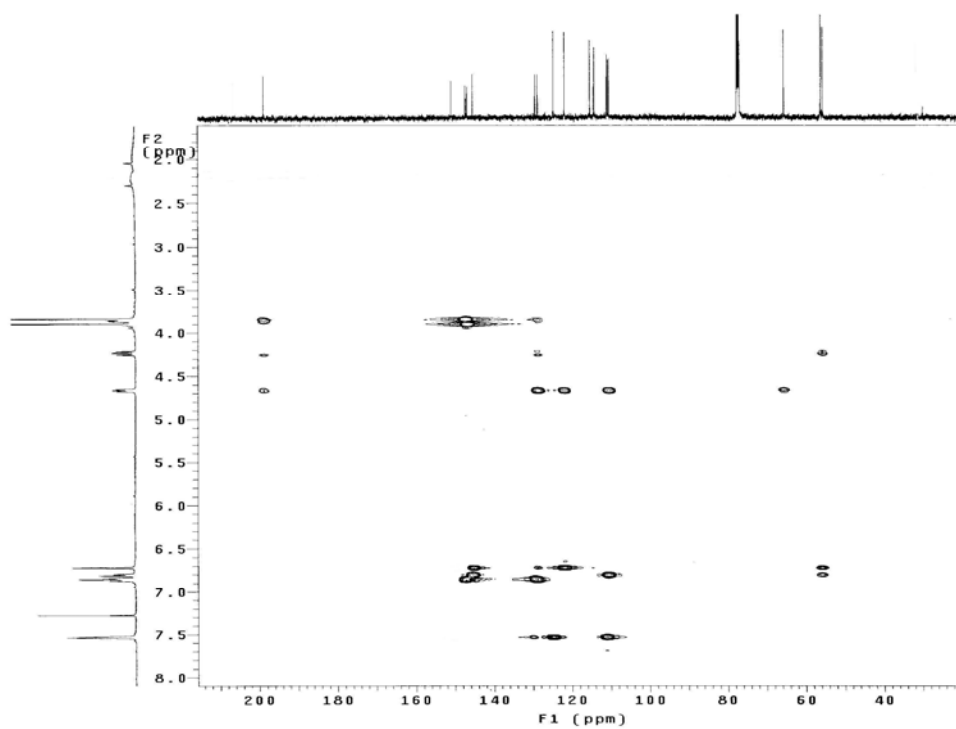


圖 13-5. podonakachalcone A (13)之 HMBC 圖譜

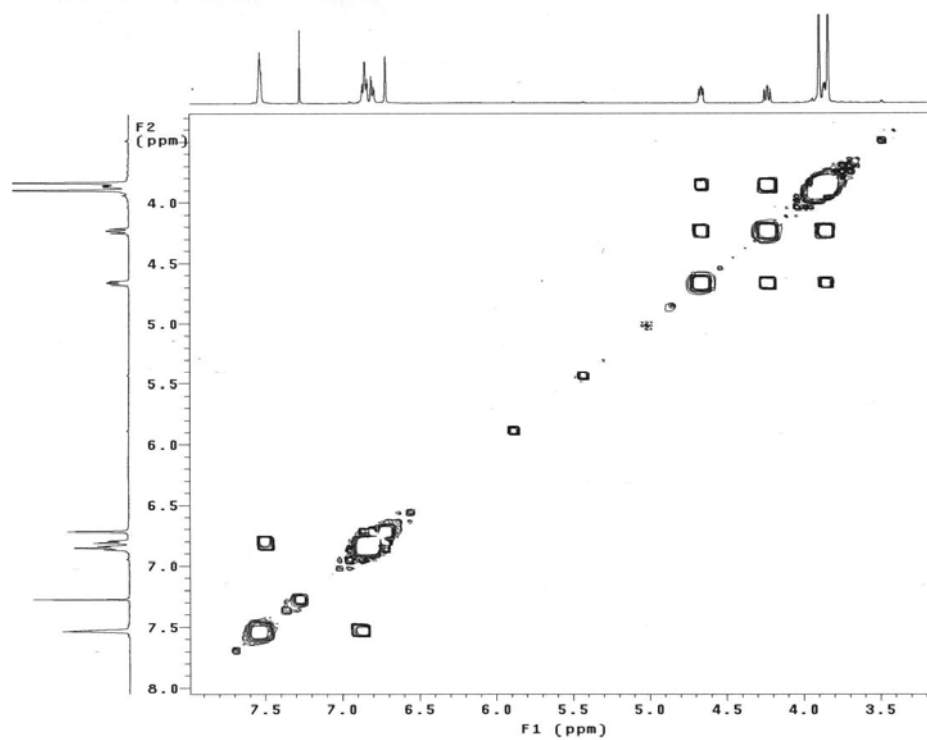


圖 13-6. podonakachalcone A (13)之 COSY 圖譜

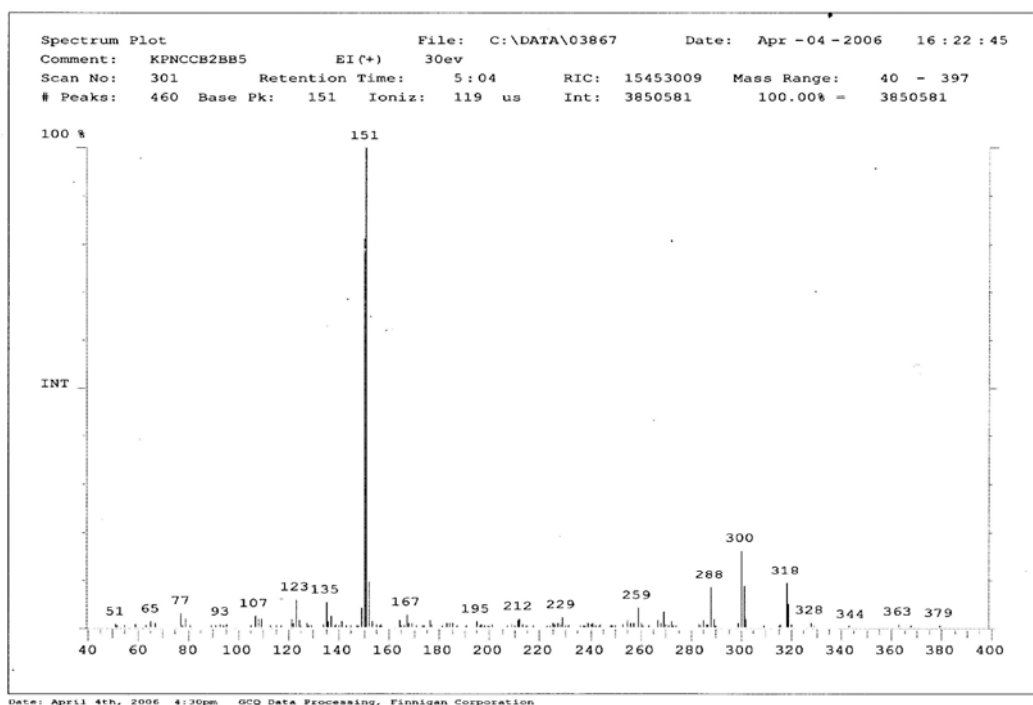


圖 13-7. podonakachalcone A (13)之 EI-MS 圖譜

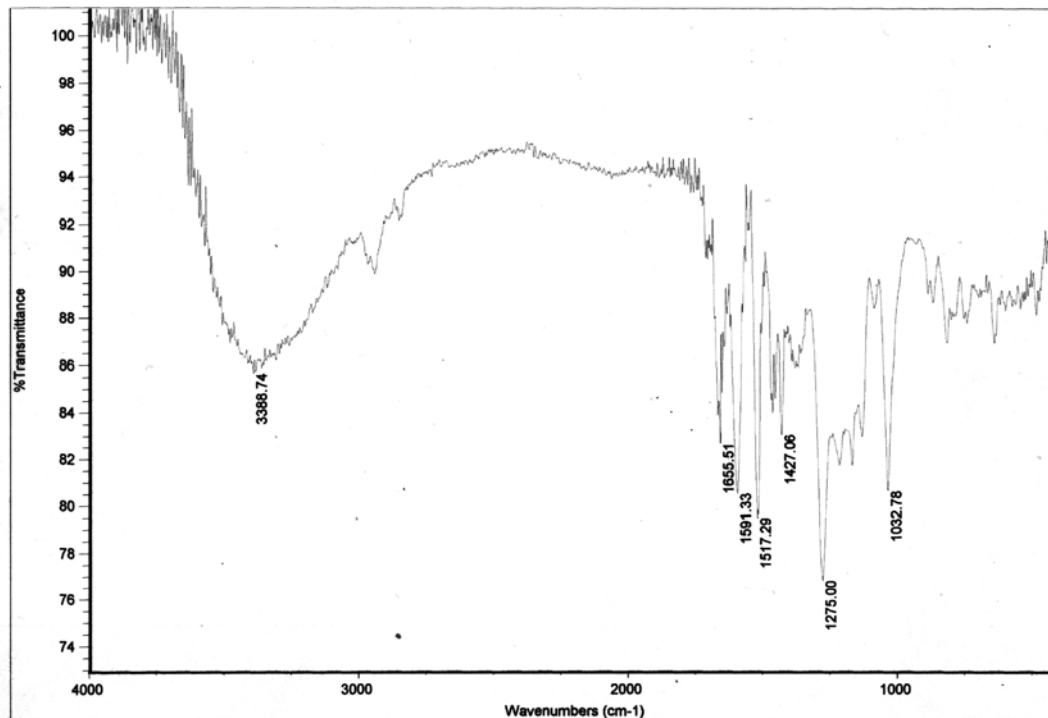
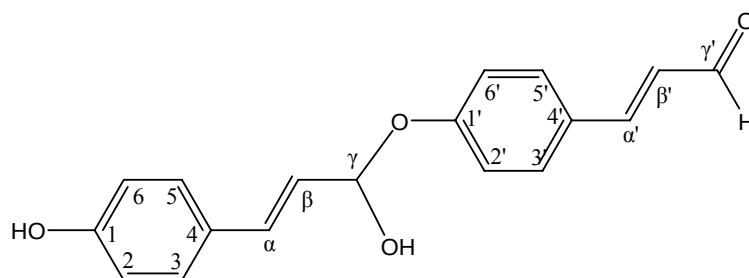


圖 13-8. podonakachalcone A (13)之 IR 圖譜

十四、化合物 14 之結構解析



化合物 (14) 為黃色真狀結晶，熔點為 131~134°C；由電灑游離法質譜 (ESI-MS)，分析顯示 (圖 14-6) 其分子離子峰 $[M-H]^-$ 為 m/z 294.6，推算其分子式為 $C_{18}H_{16}O_4$ 。

由 1H -NMR 光譜 (圖 14-1) 在芳香質子區域 δ_H 7.55 (2H, *d*, $J = 8.5$ Hz, H-3', H-5')、 δ_H 7.27 (2H, *d*, $J = 9.0$ Hz, H-3, H-5)、 δ_H 6.85 (2H, *d*, $J = 8.5$ Hz, H-2', H-6') 及 δ_H 6.75 (2H, *d*, $J = 8.5$ Hz, H-2, H-6)，出現兩個 A_2B_2 對位型的質子吸收訊號，推測本化合物具有兩個對位取代基的芳香環。在 δ_H 6.64 (1H, *d*, $J = 16.0$ Hz, H- α)、 δ_H 5.96 (1H, *dd*, $J = 5.2, 15.6$ Hz, H- β) 和 δ_H 7.60 (1H, *d*, $J = 16.0$ Hz, H- α')、 δ_H 6.62 (1H, *d*, $J = 16.0$ Hz, H- β')，顯示有二組反式(*trans*)雙鍵的質子吸收訊號。在 δ_H 9.57 (1H, *d*, $J = 7.5$ Hz, H- γ') 有一醛基訊號。

^{13}C -NMR 光譜 (圖 14-2) 中於 δ_C 158.9 (C-1)、 δ_C 162.3 (C-1') 為雙鍵上皆有含拉電子基氧的吸收訊號， δ_C 196.2 (C- γ') 有醛基(CHO)的吸收訊號。在 δ_C 105.1 (C- γ) 因受到 C- γ 本身的二個羥基的拉電子基的影響，因而往低磁場位移。另外在雙鍵 δ_C 156.0 C (α') 因醛基上 C=O 雙鍵和芳香環共振的因素，會往低磁場的方向位移動，反觀 δ_C 134.7 (C- α)，只受到芳香環共振影響，所以影響幅度沒有 C- α' 位置來的大，因此 α' 上的 C 於較低的磁場。

在 COSY 圖譜 (圖 14-5) 中，各點包含顯示 (H-2, H-3)、(H-5,

H-6)、(H- α , H- β , H- γ)、(H-2', H-3')、(H-5', H-6')、(H- α' , H- β' , H- γ')各有偶合的關係。另外檢查 HNBC(圖 14-4)上的 C-1 與 δ_{H} (H-2, H-6)和 (H-3, H-5)有相連關係，由此可確認此芳香環上的相關位置及其官能基相連位置。在另一芳香環上 C-1'與 H-2', H-6' H-3', H-5'有偶合關係，C-3', C-5'與 C- α' 有相關聯，C- β' 與 H- α' , H- γ' 有相連關係。亦可確認其相關連接位置。

綜合以上推斷，本化合物含有兩個 A₂B₂ 對位型取代基的芳香環、兩個羥基和二組反式雙鍵和一醛基，再配合 ¹H-NMR、¹³C-NMR、HMQC、HMBC、DEPT 等圖譜之推論，在暫定此化合物結構，經文獻查閱未記載此，因此化合物 **14** 可能為第一次分離之化合物。



表 3-14 化合物 **14** 之核磁共振圖譜數據整理

Podocarna A (500Hz) CD ₃ OD				
Position	¹ H	¹³ C	HMBC	COSY
1		158.9	H-2, H-3, H-5, H-6	
2	6.75 (1H, <i>d</i> , 8.5)	116.4	H-6	H-3
3	7.26 (1H, <i>d</i> , 9.0)	129.1	H-2, H-3, H-6	H-2
4		129.0	H-3, H-5 H- α , H- β	
5	7.27 (1H, <i>d</i> , 9.0)	129.1	H-3, H-6	H-6
6	6.75 (1H, <i>d</i> , 8.5)	116.4	H-2	H-5
α	6.64 (1H, <i>d</i> , 16.0)	134.7	H-3, H-5, H- γ	H- β
β	5.96 (1H, <i>dd</i> , 5.5, 16.0)	123.5	H- α	H- γ
γ	4.88 (1H, <i>d</i> , 5.5)	105.1	H- α	H- β
1'		162.3	H-2', H-3', H-5' H-6'	
2'	6.75 (1H, <i>d</i> , 8.5)	117.0	H-6'	H-3'
3'	7.55 (1H, <i>d</i> , 8.5)	132.0	H-5', H- α '	H-2'
4'		127.1	H-2', H-6'	
5'	7.55 (1H, <i>d</i> , 8.5)	132.0	H-3', H- α '	H-6'
6'	6.75 (1H, <i>d</i> , 8.5)	117.0	H-2'	H-5'
α '	7.60 (1H, <i>d</i> , 16.0)	156.0	H-3', H-5'	H- β '
β '	6.62 (1H, <i>d</i> , 16.0)	126.4	H- γ '	H- α ' H- γ '
γ '	9.55 (1H, <i>d</i> , 7.5)	196.2	H- α ', H- β '	H- β '

J. values in Hz

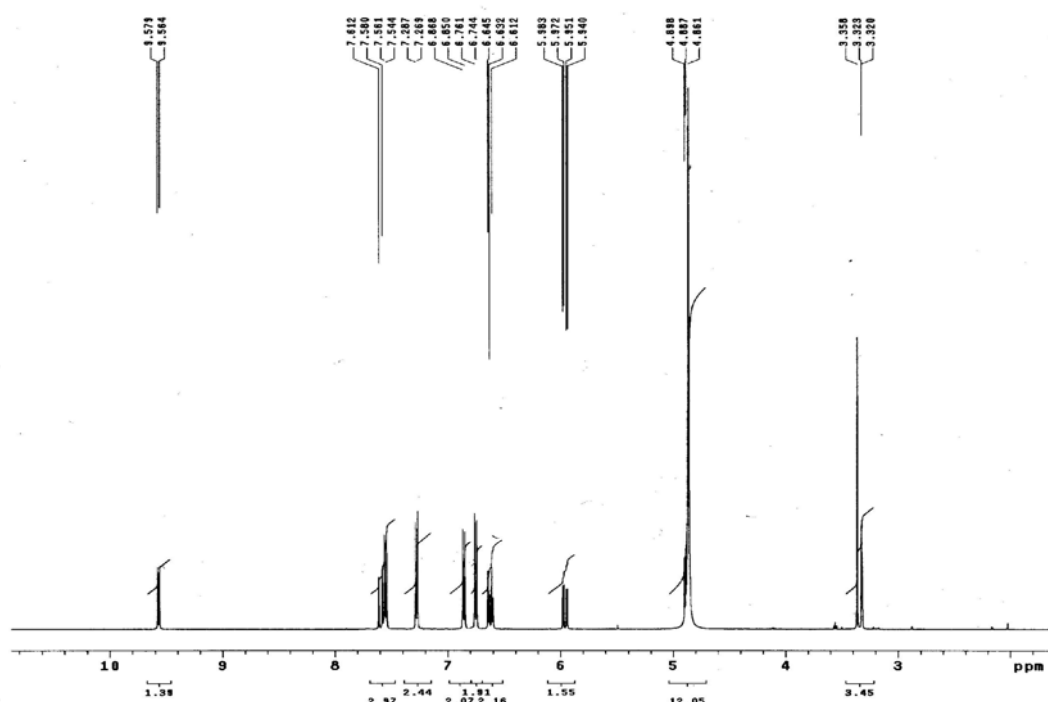


圖 14-1. 化合物 14 之 ¹H-NMR 圖譜

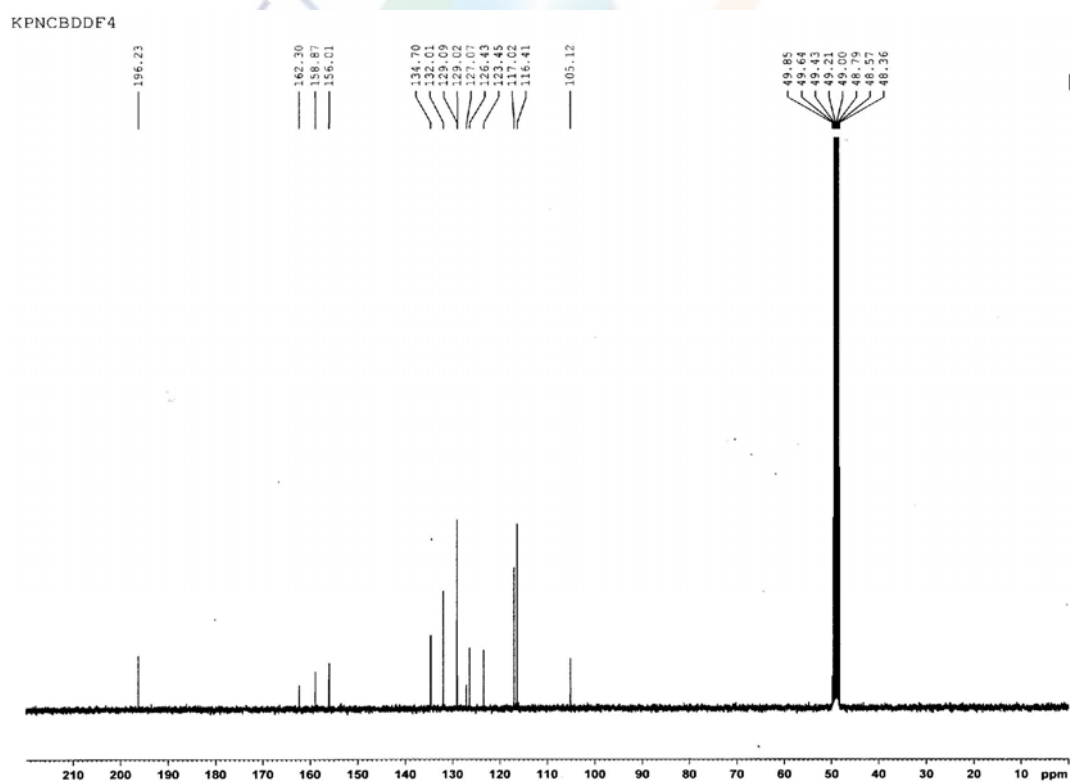


圖 14-2. 化合物 14 之 ¹³C-NMR 圖譜

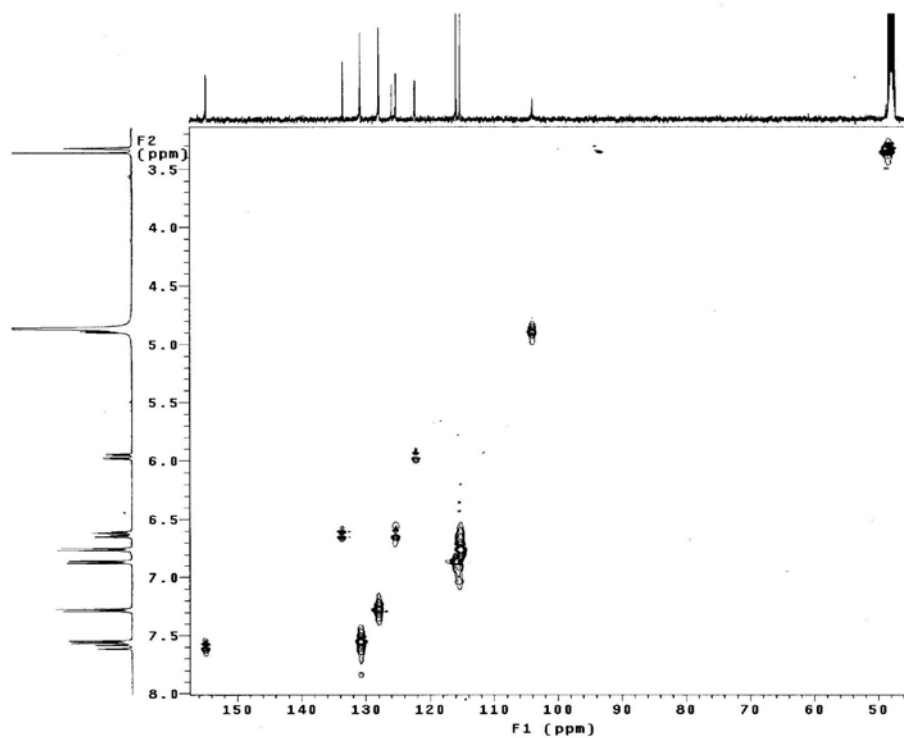


圖 14-3. 化合物 14 之 HMQC 圖譜

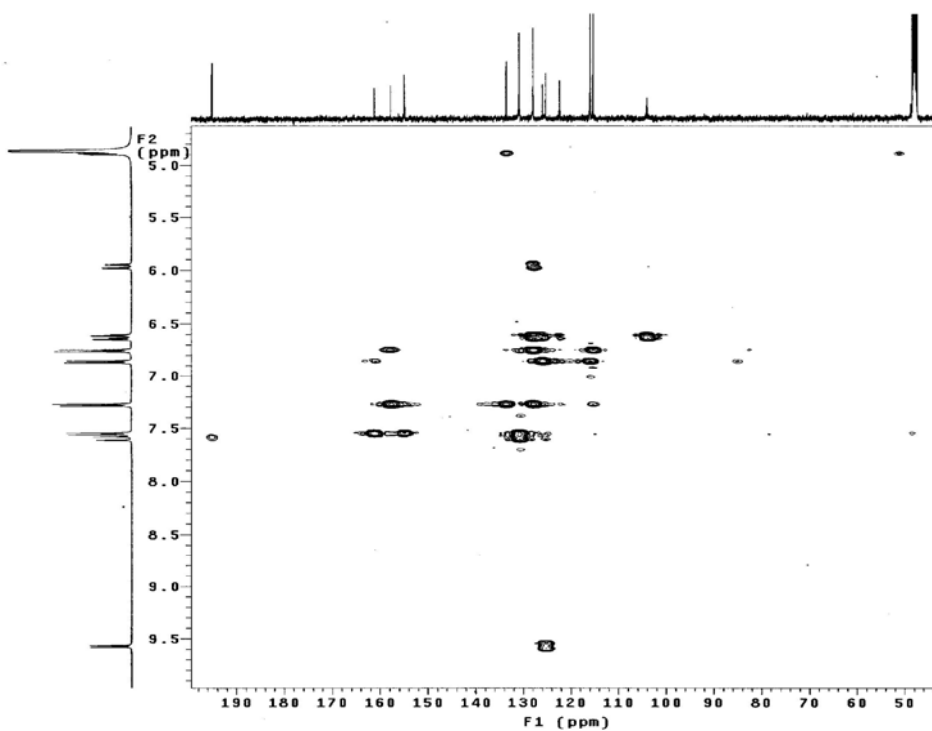


圖 14-4. 化合物 14 之 HMBC 圖譜

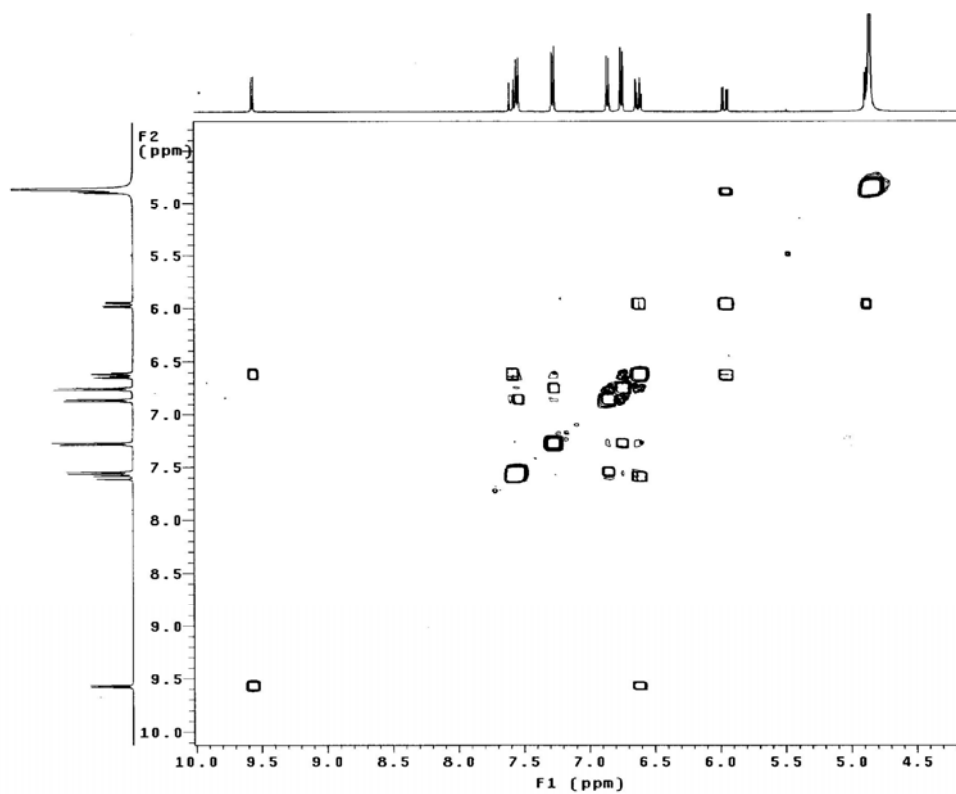


圖 14-5. 化合物 14 之 COSY 圖譜

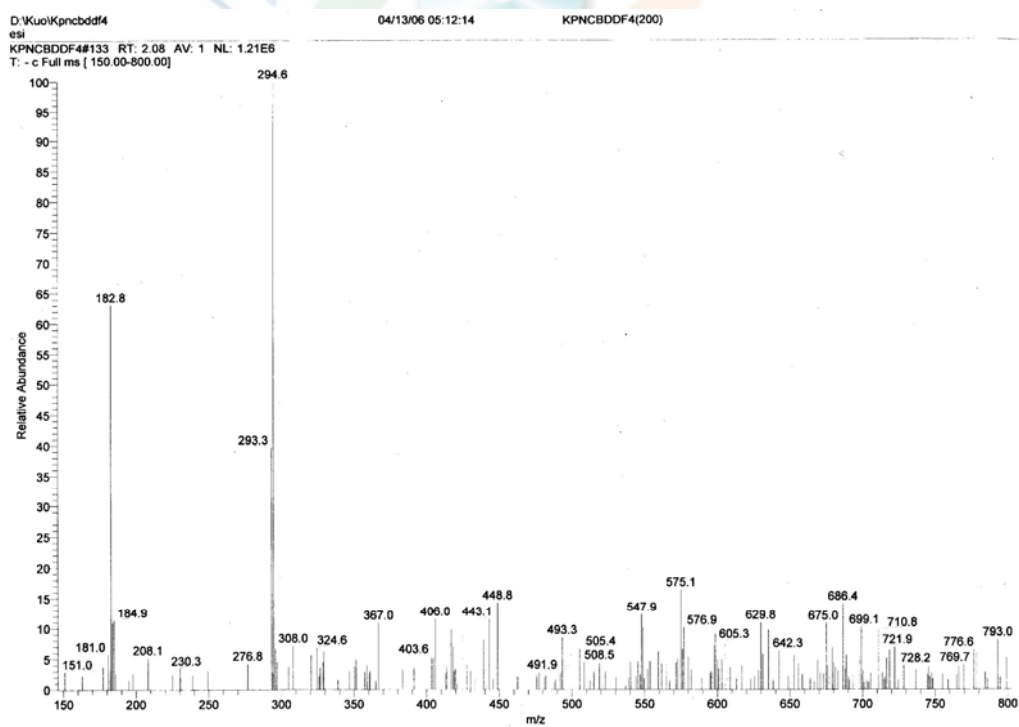


圖 14-6. 化合物 14 之 ESI-MS 圖譜

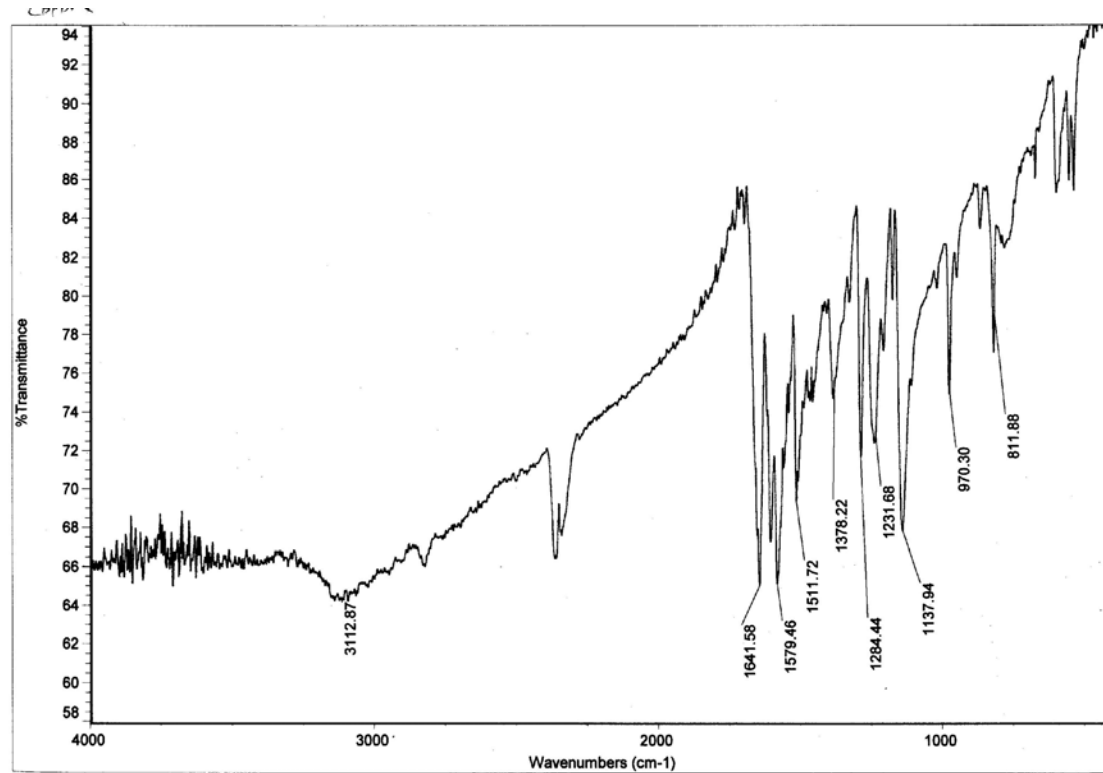


圖 14-7. 化合物 14 之 IR 圖譜

第四章 生物活性試驗

第一節 癌細胞毒殺分析實驗

本實驗利用 colorimetric MTT assay 之方法來評估樣品之細胞毒殺作用。活細胞的粒線體(mitochondria)含有各種的脫氫酵素(dehydrogenase)，此酵素與 MTT 反應，會將 MTT 之 tetrazolium 環切斷。此時，顏色由原有的淡黃轉為暗藍之 formazan。可以利用 ELISA reader 讀取波長 550 nm 之吸光度，並計算 ED_{50} ($\mu\text{g/mL}$)。

一、細胞種類

Daoy: Human medulloblastoma (人類髓母細胞瘤)

HeLa : Human cervical epitheloid carcinoma (人類子宮頸癌)

WiDr : Human colon adenocarcinoma (人類結腸癌)

KB : Human oral epidermoid carcinoma (人類口腔癌)

二、細胞之培養

將 Med 癌細胞培養在含 10 %胎牛血清、100 units/mL penicillin 和 100 units/mL streptomycin 的 RPMI-1640 培養基，放置於 5 % CO_2 、37°C 之恆溫培養箱中培養。將 Hepa59T/VGH 癌細胞培養在含 10 %胎牛血清、100 units / mL penicillin 和 100 units / mL streptomycin 的 DMEM 培養基，放置於 5 % CO_2 、37°C 之恆溫培養箱中培養。將 Daoy、WiDr 癌細胞培養在含 10 %胎牛血清、100 units/mL penicillin 和 100 units/mL streptomycin 的 MEM 培養基，放置於 5 % CO_2 、37°C 之恆溫培養箱中培養。

三、測試樣品之配置：

稱取 2.0 mg 樣品以 100 % DMSO 溶解成 20 g/L，再以 1 x PBS

作序列稀釋成 400、200、100、10 mg/L 之稀釋樣品。

四、MTT 染色檢定

當癌細胞生長至單層長滿時，以 trypsin 處理並收集細胞，經染劑(trypan blue)染色並置於顯微鏡下計算細胞數目。以每個孔洞 3×10^3 cells、180 μ L 培養基的條件將細胞植於 96 孔培養盤上，待 4 小時後添加樣品。添加樣品 72 小時後，在每個孔洞加入 20 μ L MTT (1 mg/mL)，移入恆溫培養箱 4 小時，再移除上清液。於每個孔洞加入 20 μ L 的 DMSO，待 formazan 結晶溶解後，再以 ELISA reader 測定波長 550 nm 之吸收值，並計算 ED₅₀。

五、結果

本實驗將桃實百日青分離出的十四個化合物，對本實驗室所培養之各類癌細胞株，做一系列細胞毒殺測試，評估各化合物對癌細胞的毒性大小；若檢測純化合物 ED₅₀ 大於 20 μ g/mL 則以(-)表示。表四列出所分離出十四個化合物細胞毒殺的結果：化合物 1、7、10、12、13 和 14 分別對於人類子宮頸癌細胞(Hela)、人類口腔上皮癌(KB)、人類腸癌(WiDr)和人類髓母細胞瘤(Daoy)有中度或微弱的細胞毒殺作用。化合物 3 和 4 對 KB、WiDr 和 Daoy 則有強烈的細胞毒殺作用，其中化合物 4 對 KB (0.07 μ g/mL)甚至優於用於臨床抗癌藥物 Mitomycin C (0.10 μ g/mL)的毒殺效果。

表二、Cytotoxicity data of compounds 1-14

No.	樣品名稱	IC ₅₀ (μg/ml)			
		Hela	KB	WiDr	Daoy
1	Lambertic acid (1)	19.00	N.T	(-)	(-)
2	4 β-carboxy -19-nortotarol (2)	N.T	(-)	(-)	N.T
3	Inumakilactones B (3)	N.T	3.01	N.T	3.18
4	Podolacton E (4)	N.T	0.07	1.54	1.51
5	Isovanillin (5)	(-)	N.T	(-)	(-)
6	Vomifoliol (6)	N.T	(-)	N.T	(-)
7	4-hydroxy-3-methoxy-cinnamaldehyde (7)	(-)	N.T	13.98	8.45
8	Vanillin acid (8)	N.T	(-)	N.T	(-)
9	4-ethoxy-3-hydroxy-benzoic acid (9)	N.T	(-)	N.T	(-)
10	β-sitosterol (10)	8.74	8.32	9.92	(-)
11	β-Stiosteryl glucoside (11)	(-)	(-)	N.T	N.T
12	4,4'-dihydroxyxhalcone (12)	N.T	28.21	N.T	17.19
13	podonakachalcone A (13)	N.T	(-)	N.T	8.38
14	化合物 14	11.18	N.T	13.69	11.01
15	Mitomycin C	N.T	0.10	0.22	N.T

(a)Hela : Human cervical epitheloid carcinoma (人類子宮頸癌)

(b)KB : Human oral epidermoid carcinoma (人類口腔上皮癌)

(c)WiDr: Human colon adenocarcinoma (人類大腸直腸癌)

(d)Daoy : Human medulloblastoma (人類髓母細胞瘤)

細胞毒性評估：

(-) : IC₅₀ > 20 μg/mL

N.T : No test

註：IC₅₀：(50% Inhibition concentration) 代表藥物能抑制 50%癌細胞生長之毒殺濃度。

第二節 抑制 Topoisomerase I 催化活性試驗

一、原理

DNA 拓樸異構酶(DNA Topoisomerase I)是細胞核內重要的蛋白質，在 DNA 複製、RNA 轉錄及 DNA 重組時所產生超螺旋的結構問題，均需要 DNA 拓樸異構酶來做切割解螺旋及 DNA 接合等重要步驟，以釋放超螺旋的扭力來恢復 DNA 原本的構形，以利於下次的複製。本實驗即利用分離出的化合物來抑制 DNA Topoisomerase I 的活性，以了解化合物是否對酵素有所抑制。

二、實驗材料：

- (一) pBR322(MBI Fermentas)：E.coli 的 supercoil DNA (0.5 mg DNA/mL)
- (二) DNA topoisomerase I (Topo I) of calf thymus gland (MBI Fermentas)：20U/ μ L
- (三) 10X assay buffer：
 - 1. 100 mM Tris-HCl (pH = 7.9)
 - 2. 10 mM EDTA (pH = 7.0)
 - 3. 1.5 M NaCl
 - 4. 1.0 % BSA
 - 5. 1 M Spermidine
 - 6. 50 % glycerol

三、實驗方法：

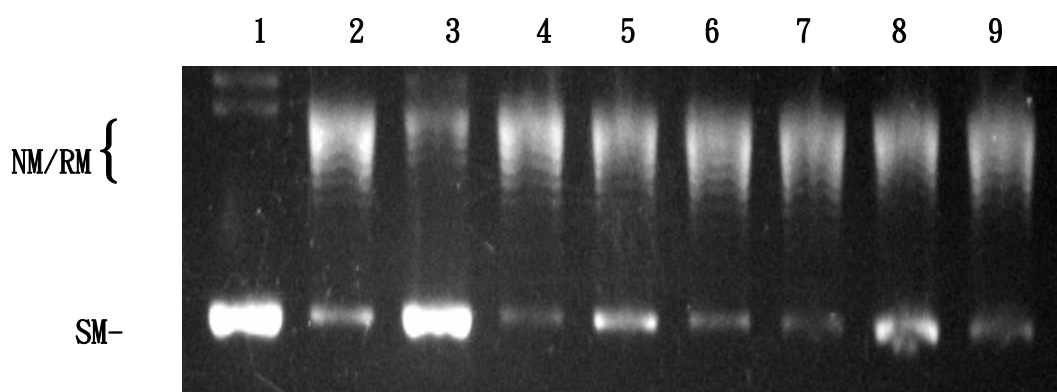
先取二次蒸餾水 (14.8 μ l)、10X assay buffer (2.0 μ l)和 Topoisomerase I (0.05 μ l)預先混合，之後加入 pBR322 supercoil DNA (1.0 μ l)於蓋頂，

沿管壁加入 10X drug (2.0 μ L)，接著於離心機進行離心混合，再置於 37°C 水浴槽中反應 30 分鐘使 Topoisomerase I、pBR322 supercoil DNA 和 drug 充分作用。接著加入 10% SDS (1.0 μ L)及 Proteinase K 於 37°C 水浴槽中反應 15 分鐘使其反應終止，最後利用 1% agarose 凝膠電泳分析(50V 跑 10 分鐘再用 100V 跑 40 分鐘)，再置入染缸以 EtBr(Ethidium bromide)中約 10 分鐘，取出 gel 以蒸餾水清洗兩次，之後照像並用電腦軟體計算各 band 之大小，來分析 supercoil DNA、relaxed DNA 和 nicked DNA 含量相對百分比，及計算其抑制百分比(%)。

四、結果

(一) 本實驗室抗癌藥物篩選之酵素模式是以真核細胞 DNA topoisomerase I 為藥物作用標的，因此我們挑選diterpenes、podolacton和chalcone三類骨架各二個化合物，分別為化合物 1、2、3、4、12和13來做催化DNA topoisomerase I 抑制試驗(catalytic topoisomerase I inhibition assay)，NM 代表有缺口之超螺旋 (Nicked supercoil DNA)；RM 代表鬆馳超螺旋DNA (Random supercoil DNA)；SM 代表原始超螺旋DNA(supercoil DNA)。因此在topoisomerase I 作用於DNA 時，若藥物對topoisomerase I 具抑制作用，則在UV 燈顯影下會只在SM處看到較明顯DNA band，若無抑制效果NM/RM處則也會有明顯的DNA band。各化合物試驗結果如圖四。由圖四；我們發現 100 μ g/ml時化合物2與化合物12有些許的抑制DNA topoisomerase I的活性，而化合物1、3、4與13則沒有對DNA topoisomerase I 的催化活性產生抑制。進一步計算其抑制百分比，如圖五發現化合物2和化合物12抑制DNA topoisomerase I

百分比分別為28.43 % 和 30.45 %。

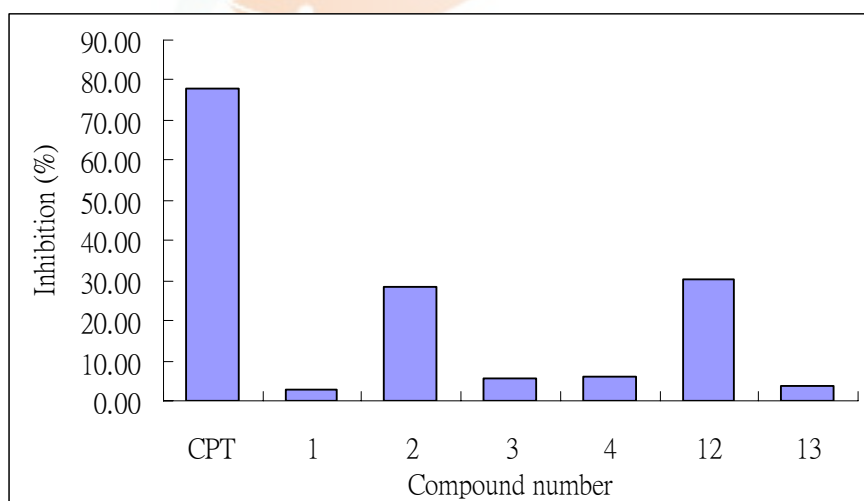


圖四、化合物 1、2、3、4、12、13 對於 DNA topoisomerase I 的試驗電泳圖
Lane 1: 只有 DNA，Lane 2: DNA 加 Top I，Lane 3: DNA 加 Top I 加 camptothecin，Lane 4-7: DNA 加 Top I 加 Compounds 1-4，Lane 8-9: DNA 加 Top I 加 Compound 12 和 13。

SM: supercoil material.

RM: random material.

NM: nicked material DNA.



圖五、CPT 與化合物 1、2、3、4、12、13 對於 topoisomerase I 的抑制百分率。
CPT: camptothecin

第三節 細胞凋亡(Apoptosis)活性試驗

一、 原理

細胞凋亡(apoptosis)是一種細胞受環境等影響刺激後，在基因調控之下所產生的自然死亡的現象，也稱為細胞計畫性死亡，與細胞壞死(necrosis)有所區別。細胞壞死則是受到物理性質傷害的惡性死亡，則會造成胞器及細胞膜喪失完整性，而這些現象並不是在基因調控之下所產生的。而發生細胞凋亡的細胞中，初期可發現 chromatin loop 之後細胞質產生囊泡，染色質濃縮及 DNA 斷裂等現象。而兩者最大的不同點，細胞凋亡不會造成發炎反應，是一種對周圍細胞及組織傷害最小的細胞自殺性死亡。本實驗這種分析方式是針對細胞凋亡早期在細胞核內出現 chromatin loop 時的變化而設計，因此可以鑑別藥物所造成的影響是細胞凋亡或壞死的路徑。

二、 細胞凋亡的分析方法:

ELISA-based apoptotic assay :

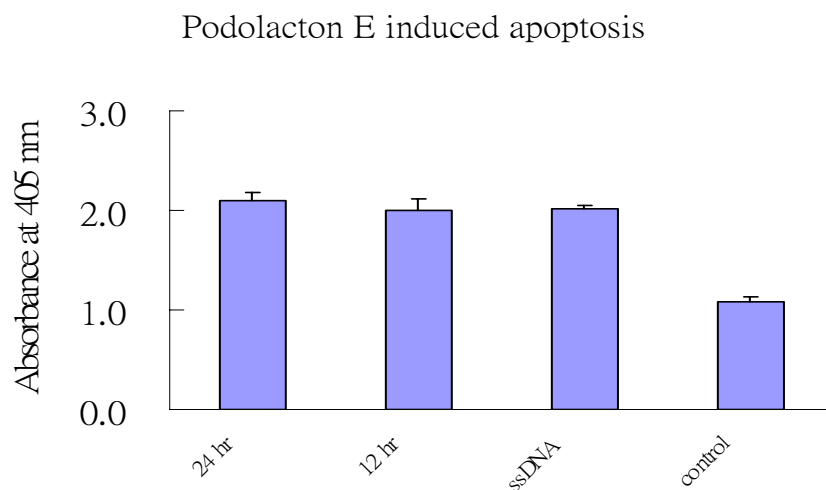
1. 固定細胞後，於 culture hood 中晾乾 plate。
2. 每個 well 先以 PBS 清洗，再加入 formamide 50 μ L，靜置於室溫反應 10 分鐘。
3. 以 75°C 循環水浴 10 分鐘後，移至冰箱 5 分鐘，再移除 formamide。
4. As negative control：加入 S1 nuclease 100 μ L (100 units/mL) 後，在 37°C 反應 30 分鐘
5. As positive control：在每個 well 加入 ssDNA 100 μ L，並於 culture hood 中晾乾 plate。
6. 每個 well 先以 PBS 清洗三次，再加入 3% 脫脂牛奶 200 μ L (in

distilled water w/v)。

7. 在 37°C 反應一小時 (to block non-specific binding sites)。
8. 移除牛奶，並在每個 well 加入 antibody mixture 100 μ L，靜置於室溫反應 10 分鐘。
9. 每個 well 使用 1X wash buffer 250 μ L 沖洗三次，再加入 ABTS solution 100 μ L 反應 15-60 分鐘。
10. 每個 well 加入 stop solution 100 μ L 終止反應，再以 standard microplate reader 測量 405 nm 的吸收值。

三、 結果

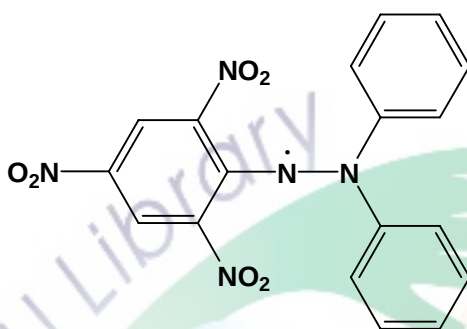
ELISA-based apoptotic assay 這種分析方式是針對細胞凋亡早期在細胞核內出現 chromatin loop 時的變化而設計，其中加入 formamide 是為了方便打開 chromatin loop 的雙股 DNA，此時加入 ssDNA 是為了與單股 DNA 結合，之後加入 antibody mixture，最後以 Elisa reader 測量 405 nm 的吸收值。這裡我們取針對 MTT assay 結果中，毒殺效果最好的化合物 **4** 來作為此試驗法的藥品，而加藥後十二小時就有 apoptosis 現象產生，可以發現在十二或二十四小時與 control 組有顯著差異，因而證實化合物 **4** 是使癌細胞走向細胞凋亡這途徑。



圖六、ELISA-Enzyme-linked immunosorbent assay:探討化合物 **4** 是否走向細胞凋亡之途徑；取化合物 **4** 來作為此試驗法的藥品，而加藥後十二小時就有 apoptosis 現象產生，可以發現在 12 或 24 小時與 control 組均有顯著差異，因而證實化合物 **4** 是使癌細胞走向細胞凋亡途徑。

第四節 清除 DPPH 自由基能力之測定

DPPH 全名為 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (圖七)，是一個含奇數電子之穩定型自由基，可溶於甲醇或乙醇會於波長 517 nm 下有強吸收光值，當其被抗氧化劑還原時，吸收會降低甚至消失，所以藉由 517 nm 之吸光值來判斷化合物是否具有提供氫原子以捕捉 DPPH 自由基之能力。



圖七、1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH 之化學結構式

一、實驗方法

- (一) 以甲醇配製 DPPH 溶液，濃度為 0.5mM
- (二) 將待測之化合物以甲醇分別稀釋成下列不同濃度：
 1. 100 $\mu\text{g/mL}$
 2. 50 $\mu\text{g/mL}$
 3. 25 $\mu\text{g/mL}$
 4. 12.5 $\mu\text{g/mL}$
- (三) 取 80 μL 樣品，依次序加入 96-well plate，注入 20 μL DPPH。
- (四) 於避光的狀況下，於 shaker 上搖晃反應 30 分鐘。
- (五) 以 ELISA reader 測量於波長 517nm 之吸收值，吸光值越低表示清除 DPPH 能力越強

(六) 計算自由基清除率(%)：

$$\text{清除率(\%)} = [1 - (\text{樣品吸光值} / \text{未加樣品之對照組吸光值})] \times 100$$

二、結果

(一) DPPH 為一穩定型自由基，可溶於甲醇或乙醇會於波長 517 nm 下有強吸收光值，當其被藥品或抗氧化劑還原時，吸收會降低甚至消失，而藉由 517 nm 之吸光值來判斷化合物是否具有提供氫原子來捕捉 DPPH 自由基之能力。發現化合物 1、2、5、12 和 14 在 200 µg/mL 有輕度到中度的清除效用，化合物 7、8、9 和 13 在 200 µg/mL 都可以達到 80% 以上的清除能力。

(二) 再取其中清除 DPPH 效果最好的化合物 7、8、9 和 13 做 ED₅₀ 值，分別為 13.11、103.26、0.62 和 19.37 µg/mL，化合物 7 和 13 與抗氧化劑的效果相當，而化合物 9 的抗氧化能力更優於 Vitamin E 近 20 倍的效果。

表三、化合物 1-14 清除 DPPH 自由基能力之測定

NO.	Effect of removal (%)	NO.	Effect of removal (%)
1	45.87	8	81.13
2	42.23	9	95.93
3	1.94	10	2.99
4	1.90	11	1.29
5	23.84	12	18.98
6	7.28	13	100
7	90.21	14	23.87

sample 濃度 200 µg/mL

清除率(%)= [1- (樣品吸光值/未加樣品之對照組吸光值)] ×100

1. methanol 或 ethanol +DPPH 之吸光值為對照組
2. 對照組之吸光值須控制在 1.00 左右
3. DPPH 溶液需震盪或攪拌 20~30 分鐘使其完全溶解
4. 樣品吸光值須扣除以 methanol 或 ethanol 取代 DPPH 時之樣品本身於 517 nm 時之吸光值

表四、化合物 7、8、9 和 13 與抗氧化劑 Vitamin E 比較表

No.	ED ₅₀ (µg/ml)
7	13.11
8	103.26
9	0.62
13	19.37
Vitamin E	12.15

第五章 結果與討論

- 一、本實驗由桃實百日青(*Podocarpus nakaii* Hayata) 的莖皮部，氯仿層中共分得十四個化合物，其中包含二個二萜類化合物，分別為 lambertic acid (1) 和 4 β -carboxy-17-hydroxy-19-nortotarol (2)；二個 norditerpenes 類化合物，分別為 inumakilactones B (3)和 podolacton E (4)；四個本環類化合物為 isovanillin (6)、4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde (7)、vanillin acid (8)、4-ethoxy-3-hydroxy benzoic acid (9)；二個固醇類化合物，分別為 β -sitosterol (10) 和 β -stiosteryl glucoside (11)；二個 chalcone 類化合物 4,4'-dihydroxychalcone (12)、podonakachalcone A (13)，以及 vomifoliol (5)和一個苯丙基類化合物 14。其中化合物 13 為新化合物。
- 二、將離出的十四個化合物，做一系列細胞毒殺的結果，化合物 1、7、10、12、13 和 14 分別對於人類子宮頸癌細胞(Hela)、人類口腔上皮癌(KB)、人類腸癌(WiDr)和人類胸線纖維母細胞瘤(Daoy)有中度或微弱的細胞毒殺作用。化合物 3 和 4 對 KB、WiDr 和 Daoy 則有強烈的細胞毒殺作用，其中化合物 4 對 KB (0.07 μ g/mL) 甚至優於用於臨床抗癌藥物 Mitomycin C (0.10 μ g/mL)的毒殺效果。在過去的文獻中，對於 podolactone 這類骨架的化合物都針對抑制植物生長和細胞毒殺(cytotoxic)^{41,46,54}的生物活性探討，其中在抗癌的活性報告中這類化合物在碳上第七、八號位置和九、十一號位置為雙鍵取代則毒殺效果會更強，化合物 4 也符合這樣的特性。
- 三、在 Topoisomerase I 催化活性試驗，挑選 diterpenes、podolacton E

和 chalcone 三類骨架各二個化合物，分別為化合物來做催化 DNA topoisomerase I 抑制試驗，經計算其抑制百分比發現化合物 **2** 與化合物 **12** 能抑制 DNA topoisomerase I 的百分比分別為 28.43 % 和 30.45 %，雖然與臨床藥物 camptothecin 抑制百分比(78.0 %) 有些許差距，但未來可針對這 diterpenoid 和 chalcone 這二類的化合物做化學修飾來進一步研究這方面 SAR 的結構探討。

四、在抗氧化清除 DPPH 方面發現化合物 **1**、**2**、**5**、**12** 和 **14** 在 200 $\mu\text{g/mL}$ 有輕度到中度的清除效用，化合物 **7**、**8**、**9** 和 **13** 在 200 $\mu\text{g/mL}$ 都可以達到 80% 以上的清除能力。7、8 和 9 和 13 ED_{50} 值分別為 13.11、103.26、0.62 和 19.37 $\mu\text{g/mL}$ ，化合物 7 和 13 與抗氧化劑 Vitamin E 的效果相當。化合物 7、8 和 9 為酚類化合物，因為帶有羥基(OH)和芳香環上雙鍵的共振，使其容易提供電子，達到清除 DPPH 的效果。化合物 13 也為多酚類化合物，所以對於清除 DPPH 也有顯著的效果。由於化合物 13 和 14 是首次發現的化合物，而且對於 Daoy 癌細胞有中度的抑制活性，更對於清除 DPPH，在濃度 200 $\mu\text{g/mL}$ 時達到 100% 的清除能力。其中化合物 9 雖然是已知化合物，但為首次在天然物中發現，在濃度 200 $\mu\text{g/mL}$ 可達到 95% 的清除能力，在 ED_{50} 方面 0.62 $\mu\text{g/mL}$ ，更優於 Vitamin E 的 12.15 $\mu\text{g/mL}$ 近 20 倍，與化合物 7 和 8 同為酚類化合物，而其清除效果卻優於其他文獻上的分類化合物，其關鍵可能在於 ethoxy 的側鏈上，在未來可針對這方面進一步的做探討。

五、由於化合物 **4** (podolactone E) 具有相當強的細胞毒殺作用 [$\text{ED}_{50}=0.07\mu\text{g/mL}$]，因此進一步的探討其是否有 apoptosis 現象，

當加藥後十二小時就有 apoptosis 現象產生，可以發現在十二或二十四小時與 control 組有顯著差異，因而證實化合物 **4** 是使癌細胞走向細胞凋亡這途徑。也確認如此強的細胞毒殺的化合物，並不會使其周邊組織產生對個體不好的發炎反應，未來可以更進一步探討其他抗癌作用機制，達到開發新的抗癌藥物的目的。



第六章 參考文獻

1. F. Chang, S. M. Chaw and J. C. Wang, In *Compositw: Flora of Taiwan*, Volumn 1. The Republic of Taiwan, **1994**, 577.
2. 陳嘉芬，細胞生物學，藝軒圖書出版社 2002，pp 350-374
3. J. Searle. , F. J. Kerr and C. J. Bishop, Necrosis and Apoptosis: Distinct Modes of Cell Death with Fundamentally Different Significance, *Pathol. Annu.* **1982**, 17, 229-259.
4. P. Nicotera, M. Leisr and E. Ferrando, Apoptosis and Necrosis: Differentexecution of the Same Death, *Biochem. Soc. Symp.* **1999**, 66, 69-73.
5. R. H. Garret and C. M. Grisham, *Biochemistry*, Saunders College. secondedition. **1999**, 1003-1004
6. H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore and J. E. Darnell, *Molecular Cell Biology*,. W. H. Freeman and Company. fourth edition. **2001**, p496; pp514-518; pp526-531; pp1057-1058.
7. 陳嘉芬，細胞生物學，藝軒圖書出版社，2002，pp 25-30
8. 何子樂，化學花絮，眾光文化事業有限公司，2002，第一版 pp 143-165
9. Y. Pommier, Diversity of DNA Topoisomerase I and Inhibitors, *Biochimie.* **1998**, 88, 255-270. 36.
10. J. E., Kerrigan and D. S. Pilch, A Structural Model for Ternary Cleavable Complex Formed Between Human Topoisomerase I, DNA, and Camptothecin, *Biochemistry*, **2001**, 40, 9792-9798.
11. J. Fan, J. N. Weinstein, K. W. Kohn, L. M. Shi and Y. Pommier, Molecular Modeling Studies of the DNA Topoisomerase I Ternary Cleavable Complex with Camptothecin, *J. Med. Chem.* **1998**, 41,

- 2216-2226.
12. P. M. Reilly, H. J. Schiller, and G. B. Bulkley, Pharmacologic Approach to Tissue Injury Mediated by Free Radicals and Other Reactive Oxygen Metabolites, *Am. J. Surg*, **1991**, 161, 488-903
 13. P. A. Cerutti, Prooxidant States and Tumor Promotion, *Science*, **1985**, 277, 375-381.
 14. R. S. Poggetti, E. E. Moore, K. Koeike and A. Banerjee, Simultaneous Liver and Lung Injury Following Gut Ischemia is Mediated by Xanthin Oxidase, *J. Trauma-Injury Infec. Critic. Care*. **1992**, 32, 723-728.
 15. R. Shimoda, M. Nagashima, M. Sakamoto, N. Yamaguchi, S. Hirohashi, J. Yokota and H. Kasai, Increased Formation of Oxidative DNA Damage 8-hydroxydeoxyguanosine in Human Livers with Chronic Hepatitis, *Cancer. Res.* **1994**, 54, 3171-3172
 16. 余玉滿，山白蘭與桃實百日青之化學成分及其生物活性之研究，中國文化大學應用化學研究所碩士論文，**2001**，pp 41-44。
 17. 謝昀達，桃實百日青成分 Flavonoids 的分離及其抗癌機制的研究，國立陽明大學藥理研究所碩士論文，**2003**，pp 68-93。
 18. 黃士元、郭曜豪、劉如章、廖天賜，行政院農委會特有生物研究保育中心，自然保育季刊，**2002**，第 37 期，pp 37-42。
 19. 邱年永、張光雄；原色台灣要用圖鑑 (I)，南天書局，**1986**，第 14 頁。
 20. L. H. Briggs, R. C. Cambie and J. L. Hoare, A New Lignan,

- Seco-Isolariciresinol and Further Constituents of the Heartwood of *Podocarpus Spicatus*, *Tetrahedron*, **1959**, 7, 262-269.
21. S. A. Matlin, M. A. Prazeres, M. Bittner and M. Silva, Norditerpene Dilactones from *Podocarpus Saligna*, *Phytochemistry*, **1984**, 23, 2863-2866.
22. S. Nakane, T. Tanaka, K. Satouchi, Y. Kobayashi, K. Waku and R. Sugiura, Occurrence of a novel cannabimimetic molecule 2-sciadonoylglycerol (2-eicosa-5',11',14'-trienoylglycerol) in the umbrella pine *sciadopitys verticillata* seeds, *Biol. Pharm. Bull.* **2000**, 23, 758-761.
23. R. C. Cambie, R. J. Madden and J. C. Parnell, XXVIII. Constituents of Some *Podocarpus* and Other Species, *Aust. J. Chem.* **1971**, 24, 217-219.
24. T. Ohmoto and O. Yoshida, Constituents of Pollen. VIII. Constituents of *Podocarpus Macrophylla* D. Don, *Chem. Pharm. Bull.* **1980**, 28, 1894-1899.
25. P. Monika, S. Kriistina, K. Anna, N. Torbjorn and E. Ixger, Relative Amounts and Enantiomeric Compositions of Monoterpene Hydrocarbons in Xylem and Needles of *Picea Abies*, *Phytochemistry*, **1996**, 42, 1289-1298.
26. S. D. Lorimer and R.T. Weavers, Foliage Sesquiterpenes and Diterpenes of *Podocarpus Spicatus*, *Phytochemistry*, **1987**, 26, 3207-3215.
27. S. A. Ampofo, V. Roussis and D.F. Wiemer, New Prenylated Phenolics from *Piper Auritum*, *Phytochemistry*, **1987**, 26, 2367-2370.

28. I. Kubo, B. P. Ying, M. Castillo, L. S. Brinen and J. Clardy, Podoandin, a Molluscicidal Sesquiterpene Lactone from *Podocarpus Andina*, *Phytochemistry*, **1992**, 45, 387-390.
29. E. Wenkert, J. D. P. Campello, J. D. Mcchesney and D. J. Watts, Diterpenes of *Podocarpus Ferrugineus* Bark, *Phytochemistry*, **1974**, 13, 2545-2549.
30. R. C. Cambie, R. E. Cox, K. D. Croft and D. Sidwell, Phenolic Diterpenoids of Some *Podocarps*, *Phytochemistry*, **1983**, 22, 1163-1166.
31. B. P. Ying and I. Kubo, Complete ^1H and ^{13}C NMR Assignments of Totarol and Its Derivatives, *Phytochemistry*, **1991**, 30, 1951-1955.
32. R. C. Cambie, The Structure of *Halloi*, *J. Org. Chem.* **1975**, 40, 3789-3791.
33. J. D. P. Campello and S. F. Fonseca, Terpenes of *Podocarpus Lambertius*, *Phytochemistry*, **1975**, 14, 243-248.
34. R. C. Cambie and L. N. Mander, Constituents of the Heartwood of *Posocarpus Totara* G. Benn, *Tetrahedron*, **1962**, 18, 465-475.
35. R. C. Cambie, R. E. Cox and D. Sidwell, Phenolic Diterpenoids of *Podocarpus Ferrugineus* and Other *Podocarps*, *Phytochemistry*, **1984**, 23, 333-336.
36. H. S. Park, N. Kai, H. Fukaya, Y. Aoyagi and K. Takeya, New Cytotoxic Norditerpene Dilactones from Leaves of *Podocarpus Macrophyllus* var. *Maki*, *Heterocycles*, **2004**, 63, 347-358.
37. L. H. Briggs, B. F. Cain, R. C. Cambie, B. R. Davis, P. S. Rutledge and J. K. Wilmshurst, Diterpenes. Part VII. Kaurene, *J. Chem. Soc.* **1963**, 1345-1350.

38. H. Haraguchi, H. Ishikawa and I. Kubo, Antioxdative Action of Diterpenoids from *Podocarpus Nagi*, *Planta Med.* **1997**, 63, 213-215.
39. J. E. Godfrey and J. M. Waters, The Crystal and Molecular Structure of the Bisnorditerpenoid, Inumakilactone, *Aust. J. Chem.* **1975**, 28, 745-753.
40. G. B. Russell, P. G. Fenemore and P. Singh, Structures of Hallactones A and B, Insect Toxins from *Podocarpus Hallii*, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1973**, 166-168.
41. T. Hayashi, H. Kakisawa, S. Itô, Y. P. Chen and H. Y. Hsü, Inumakilactone a Glucoside, a Plant Growth Inhibitor and Inumakilactone E, *Tetrahedron Lett.* **1972**, 33, 3385-3388.
42. B. P. Ying and I. Kubo, Norditerpene Dilactones from *Podocarpus Nagi*, *Phytochemistry*, **1993**, 34, 1107-1110.
43. Y. Hayashi, T. Matsumoto and T. Sakan, New Congeners of Cytotoxic Nor-Diterpenoid Dilactones in *Podocarpus Nagi*: C₁₉ Lactones of an α -Pyrone Type and a 7:8, 9:11-Dienolide Type, *Heterocycles*, **1978**, 10, 123-129.
44. M. N. Galbraith, D. H. S. Horn and M. Jenneth, Plant Growth Inhibitory Lactones from *Podocarpus Neriifolius*: Structure of Podolactone E, *Experientia*, **1972**, 28, 253-254.
45. M. Silva, M. Hoeneisen and P. G. Sammes, Some Constituents of *Podocarpus Saligna*, *Phytochemistry*, **1972**, 11, 433-434.
46. Y. Hayashi, Y. I. Yuki and T. Matsumoto, New Congeners of Cytotoxic Nor-Diterpenoid Dilactones in *Podocarpus Nagi*: Two C₁₉ Lactones from Seed Extract, *Tetrahedron Lett.* **1977**, 41,

3637-3640.

47. M. Silva, M. Bittner and P. G. Sammes, Diterpenoids of *Podocarpus Nubigena*, *Phytochemistry*, **1973**, 12, 883-886.
48. G. Avitabile, P. Ganis and E. Martuscelli, The Crystal Structure of β -Phenylglutaric Acid, a Model Compound of Polystyrene, *Chemical Communications*, **1970**, 1362-1363.
49. B. P. Ying, I. Kubo, Chairul, T. Matsumoto and Y. Hayashi, Congeners of Norditerpene Dilactones from *Podocarpus Nagi*, *Phytochemistry*, **1990**, 29, 3953-3955.
50. I. Kubo and B. P. Ying, A Bisnorditerpene Dilactone from *Podocarpus Nagi*, *Phytochemistry*, **1991**, 30, 3476-3477.
51. W. H. Watson and V. Zabel, Salignone-A and Salignone-H, Two Diterpene Dilactones, *Acta. Crysta.* **1982**, B38, 588-592.
52. B. Dasgupta, B. A. Burke and K.L. Stuart, Biflavanoids, Norditerpenes and A Nortriterpene from *Podocarpus Urbanii*, *Phytochemistry*, **1981**, 20, 153-156.
53. S. A. Matlin, M. Bittner and M. Silva, Lignan and Norditerpene Dilactone Constituents of *Podocarpus Saligna*, *Phytochemistry*, **1984**, 23, 2863-2866.
54. H. S. Park, N. Yoda, H. Fukaya, Y. Aoyagi and K. Takeya, Rakanmakilactones A-F, New Cytotoxic Sulfur-Containing Norditerpene dilactones from Leaves of *Podocarpus Macrophyllus* var. Maki, *Tetrahedron*, **2004**, 60, 171-177.
55. C. A. Williams, J. B. Harboren and F. A. Tomas-Barberan, Biflavonoids in the Primitive Monocots *Isophysis Tasmanica* and *Xerophyta Plicata*, *Phytochemistry*, **1987**, 26, 2553-2555.

56. M. Okigawa, N. Kawano, W. Rahman and M. M. Dhar, Paramagnetic Induced Shifts in the NMR Spectra of Flavone Compounds by $\text{Eu}(\text{FOD})_3$, *Tetrahedron Lett.* **1972**, 40, 4125-4128.
57. W. Baker, A. C. M. Finch, W. D. Ollis and K.W. Robinson, The Structures of the Naturally Occurring Biflavonyls, *J. Chem. Soc.* **1963**, 1477-1486.
58. S. K. Roy, M. A. Qasim, M. Kamil and M. Ilyas, Biflavones from the Genus *Podocarpus*, *Phytochemistry*, **1987**, 26, 1985-1987.
59. V. Dellus, I. Mila, A. Scalbert, C. Menard and L. M. Catherine, Douglas-fir Polyphenols and Heartwood Formation. *Phytochemistry*, **1997**, 45, 1573-1578.
60. T. Tanaka, M. Inuma, F. Asai, M. Ohyama and C. Burandt, Flavonoids from the Root and Stem of *Sophora Tomentosa*, *Phytochemistry*, **1997**, 46, 1431-1438.
61. K. R. Markham, R. F. Webby and C. Vilain, 7-O-Methyl-(2R:3R)-Dihydroquercetin 5-O- β -D-Glucoside and Other Flavonoids from *Podocarpus Nivalis*, *Phytochemistry*, **1984**, 23, 2049-2052.
62. B. Beate and W. Peter. Isolation and Characterization. of Novel Benzoates, Cinnamates, Flavonoids, and Lignans from Riesling Wine and Screening for Antioxidant Activity, *J. Agric. Food. Chem.* **2001**, 49, 2788-2798.
63. R. K. Crowden and M. J. Grubb, Anthocyanins from Five Species of the Podocarpaceae, *Phytochemistry*, **1971**, 10, 2821-2822.
64. J. B. Lowry, Anthocyanins of the Podocarpaceae, *Phytochemistry*, **1972**, 11, 725-731.
65. M. Andersen, Delphinidin-3-Neohesperidoside and Cyanidin-3-

- Eohesperidoside from Receptacles of *Podocarpus* Species, *Phytochemistry*, **1989**, 28, 495-497.
66. C. R. Bennett and R. C. Cambie, Constituents of the Heartwoods of *Podocarpus Nivalis* Hook, and *Podocarpus Acutifolius* Kirk, *Phytochemistry*, **1967**, 6, 883-887.
 67. S. Imai, M. Hori, S. Fujioka, E. Murata, M. Goto and K. Nakanishi, Isolation of Four New Phytoecdysones, Makisterone A, B, C, D, and the Structure of Makisterone A, A C₂₈ Steroid, *Tetrahedron Lett.* **1968**, 36, 3883-3886.
 68. M. Koreeda and K. Nakanishi, 5 β -Hydroxy-Ecdysones and a Revision of the Structure of Ponasterone C, *Chemical Communications*, **1970**, 351- 352
 69. M. N. Galbraith, D. H. S. Horn, E. J. Middleton, J. N. Kaplanis and M. J. Thompson, Structure of Podecdysone C, a Steroid with MoultingHormone Activity from the Bark of *Podocarpus Elatus* R. Br., *Experientia*, **1973**, 782-782.
 70. B. I. Fozdar, S. A. Khan and K. M. Shamsuddin, Norditerpene Dilactones, Macrophyllic Acid and Biflavones from *Podocarpus Latifolius*, *J. Indian Chem. Soc.* **1989**, 66, 423-424.
 71. A. K. Tiwari, P. V. Srinivas, S. P.Kumar and J. M. Rao, Free Radical Scavenging Active Components from *Cedrus deodara*, *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 4642- 4645.
 72. E. Deslandes, J. Y. Floch and C. Bodeau-Bellion, Evidence for Kappa Carrageenan in *Halarachnion Ligulatum*, *Phytochemistry*, **1988**, 27, 278-279.
 73. M. N. Galbraith and D. H. S. Horn, Structures of the Natural

- Products Blumenols A, B, and C, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1972**, 113-114.
74. D. B. Clarke, S. F. R. Hinkley and R. T. weavers, Waihoensene. A New Laurenene Related Diterpene from *Podocarpus Totara var waihoensis*, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 4297-4300.
75. A. Bianco, P. Passacantilli, S. Santini, M. Nicoletti and J. A., Two Iridoid Glycosides from *Campsidium Valdivianum*, *Phytochemistry*, **1987**, 26, 1839-1840.
76. H. Ohashi, S. Kawai, Y. Sakurai and M. Yasue, Norlignan from the Knot Resin of *Araucaria Angustifolia*, *Phytochemistry*, **1992**, 31, 1371-1373.
77. H. Ohashi, Y. Ido, T. Imai, K. Yoshida and M. Yasue, 4,4'-Dihydroxychalcone from the Heartwood of *Chamaecyparis Obtusa*, *Phytochemistry*, **1988**, 27, 3993-3994.
78. C. Y. Chen, F. R. Chang, C. M. Teng and Y. C. Wu, Cheritamine, A New *N*-Fatty Acyl Tryptamine and Other Constituents from the Stems of *Annona cherimola*, *J. Chinese. Chem. Soc. (Taipei)*, **1999**, 4, 77-86.
79. S. Donald and J. Lloyd, Studies of Configuration. XI. A New Method for the Evaluation of Conformational Free Energy Differences, *J. Org. Chem.* **1961**, 24, 3619-3626.
80. Y. Yumiko and I. Masayoshi, Synthesis of optically Active Vomifoliol and Roeoside Stereoisomers, *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, 53, 541-546
81. F. Guido, A. Elena and M. Ivano,. Two flavonoids and other compounds from the aerial parts of *Centaurea bracteata* from Italy. *Phytochemistry*, **2001**, 57, 559 - 564.

82. M. D. Greca, P. Monaco and L. previtera. Stigmasterols from *Typha Latifolia*. *J. Nat. Prod.* **1990**, 53, 1430-1435.
83. M. Miyazawa and M. Hisana, Antimutagenic Activity of Phenylpropanoids from Clove (*Syzygium aromaticum*), *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 6413-6422.
84. C. Carpinella, M. Giorda, G. Ferroyoll and M. Palacios, Antifungal Effects of Different Organic Extracts from *Melia azedarach* L. on Phytopathogenic Fungi and Their Isolated Active Components. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 2506-2511.
85. S. O. Frankfurt and A. Krishan Identification of Apoptotic Cells by Formamide-Induced DNA Denaturation in Condensed Chromatin. *J. Histochem. Cytochem.* **2001**, 49, 369-378.
86. G. Bojase, W. W. C. Cornelius and M. T. R. Runner. Flavonoids from the Stem Bark of *Bolusanthus speciosus*. *Phytochemistry*, **2001**, 56, 837 - 841.