



(21)申請案號：100112521

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 04 月 11 日

(51)Int. Cl.: A61K31/585 (2006.01) A61K31/58 (2006.01)

(71)申請人：高雄醫學大學(中華民國) KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY (TW)

高雄市三民區十全一路 100 號

(72)發明人：陳益昇 CHEN, IH SHENG (TW)；張訓碩 CHANG, HSUN SHUO (TW)

(74)代理人：蔡清福

(56)參考文獻：

WO 2006/120472A2

WO 2010/068247A1

Chemical and Pharmaceutical Bulletin, vol.42(10), 1994, p2028-2031

Journal of Medicinal Chemistry, vol.7(6), 1964, p803-804

Journal of Natural Products, vol.66, 2003, p1427-1433

Journal of Natural Products, vol.73, 2010, p338-345

審查人員：張子威

申請專利範圍項數：5 項 圖式數：1 共 34 頁

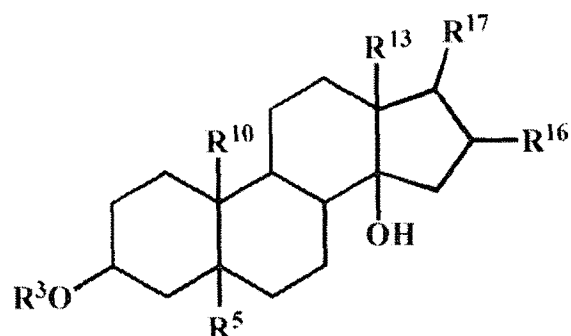
(54)名稱

臺灣梭羅木之生物活性組合物

BIOACTIVITY COMPOSITION OF REEVESIA FORMOSANA

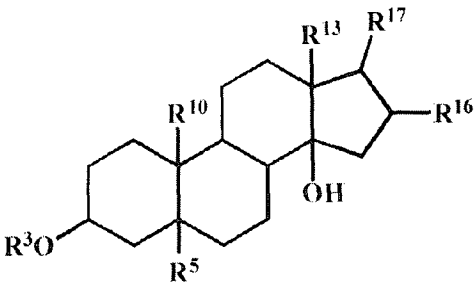
(57)摘要

本發明係提供從臺灣梭羅木(*Reevesia formosana*)之根部獲得如式(I)之強心甘系列衍生物，其中 R^3 、 R^5 、 R^{10} 、 R^{13} 、 R^{16} 、與 R^{17} 、如說明書中之定義。該化合物可與一醫藥可接受之載體，形成一醫藥組成物，以抑制腫瘤細胞之活性作用。



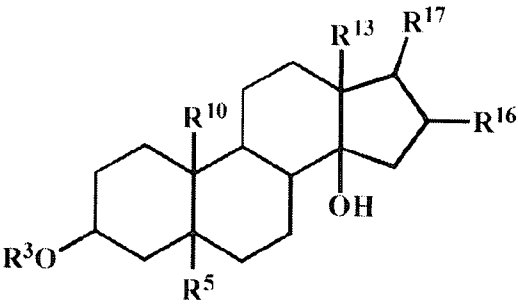
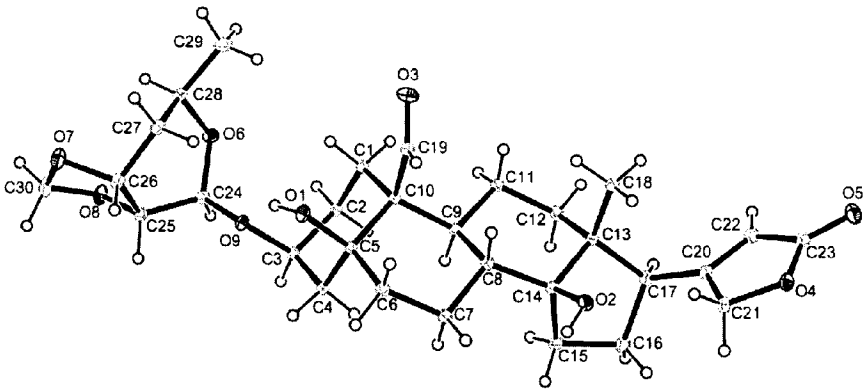
式 (I)

A series cardenolide derivatives including structure of formula I from root of *Reevesia formosana* have provided. In formula I, where R^3 , R^5 , R^{10} , R^{13} , R^{16} and R^{17} are as defined in the specification. The derivatives compounds showed potent cytotoxicity against MCF-7, NCI-H460, and HepG2 cancer cell lines.



formula I

第一圖



式 (I)

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：100 112521

※ 申請日：100. 4. 11

※IPC 分類：

A61K 31/585 (2006.01)

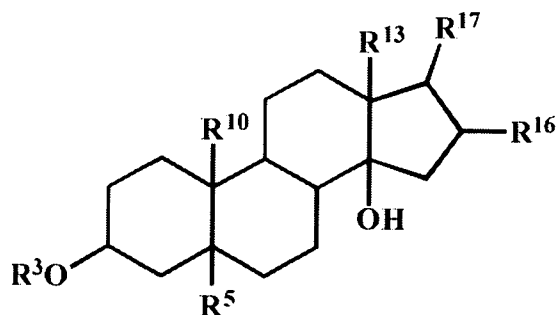
一、發明名稱：(中文/英文)

A61K 31/58 (2006.01)

臺灣梭羅木之生物活性組合物/Bioactivity composition of
Reevesia formosana

二、中文發明摘要：

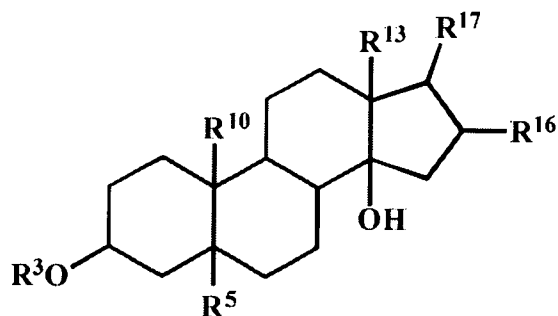
本發明係提供從臺灣梭羅木 (*Reevesia formosana*) 之根部獲得如式 (I) 之強心苷系列衍生物，其中 R^3 、 R^5 、 R^{10} 、 R^{13} 、 R^{16} 、與 R^{17} 、如說明書中之定義。該化合物可與一醫藥可接受之載體，形成一醫藥組成物，以抑制腫瘤細胞之活性作用。



式 (I)

三、英文發明摘要：

A series cardenolide derivatives including structure of formula I from root of *Reevesia formosana* have provided. In formula I, where R^3 , R^5 , R^{10} , R^{13} , R^{16} and R^{17} are as defined in the specification. The derivatives compounds showed potent cytotoxicity against MCF-7, NCI-H460, and HepG2 cancer cell lines.



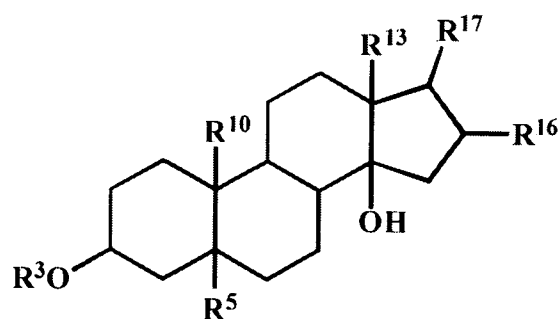
formula I

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(一)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



式 (I)

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於臺灣梭羅木 (*Reevesia formosana*) 之根部擁有抗腫瘤活性之強心苷 (cardenolide) 化合物。

【先前技術】

從微生物, 植物, 動物與礦物等天然資源, 運用各種分離技術獲得天然物不論是否已知, 可提供新穎之生物活性, 均可作為臨床藥物之重要資源。

梧桐科之臺灣梭羅木 (*Reevesia formosana* Sprague), 係生長於台灣南部之落葉植物。世界上梭羅樹屬 (*Reevesia*) 植物約 25 種, 主要集中於亞洲南部, 兩種分佈於美洲中部, 十四種生長於中國, 但臺灣僅有一種。2003 年朱慧等人於中草藥期刊, 揭示從長柄梭羅 (*R. longipetiolata*) 曾經分離五個已知化合物, 分別為 β -類固醇 (β -sitosterol)、胡蘿蔔苷 (daucosterol)、白樺脂酸 (betulinic acid), 羽扇豆醇 (lupeol) 和兒茶素 (catechin)。

早期之分離技術偏重於天然物之結構式、安定性以及定量, 因而分離純化之重心在於獲取精油 (volatile oil)、類黃酮 (flavonoids)、生物鹼 (alkaloid) 或皂素 (saponin) 等二次代謝產物 (secondary metabolism)。期間運用如濾紙層析 (paper chromatography)、薄膜層析 (thin layer chromatography)、管柱層析 (column chromatography)、氣相層析、高效率液相層析分析儀 (high performance liquid chromatography, HPLC)、氣相層析質譜分析 (GC MASS)、超臨界流體層析 (supercritical fluid chromatography, SFC) 等層析分離技術, 從天然物分離出植物成分或二次代謝產物。而經由各種生物活性之評估試驗, 分別確任所分離成分之生理活性。

目前天然物之研發, 普遍將分離之策略則偏重於活性成

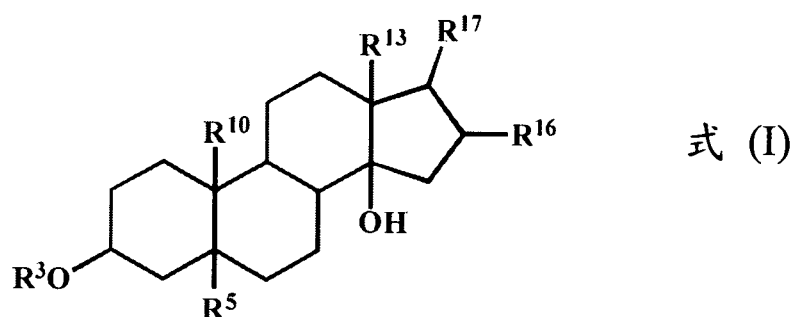
分。將採集之天然物利用酒精或含水酒精萃取，粗萃取物則依照不同極性溶媒分配 (partition) 後獲得劃分區 (fraction)，讓各種生物活性試驗進行各劃分區活性之評估，所篩選具活性之劃分區再運用分離純化技術獲得成分之生理活性。此類結合化學成份與活性分析模式，泛稱為生物活性導向之分離技術 (Bioassay-guided fractionation)。

發明人鑑於臺灣梭羅木 (*Reevesia formosana* Sprague) 植物之活性化學成分尚未被研究，經過悉心試驗與研究，並一本鍥而不捨之精神，終構思出本案「臺灣梭羅木之生物活性組合物」，獲得抗腫瘤活性之強心苷 (cardenolide) 化合物，以下為本案之簡要說明。

【發明內容】

本發明之一目的在於提供具有抗癌活性之化合物及其醫藥組合物。

根據本發明之構想，係提供一種強心苷衍生物，其結構係以式 (I) 化合物為其基本架構，



其中該 R^3 取代基可為氫基或糖基；

R^5 可為氫基或氫氧基；

R^{10} 可選自以下群組之一，

氫基、氫氧基、甲烷基、甲醛基或甲酸基；

R^{16} 可為氫基或乙酸基；

R^{17} 可為含酮基之環氧五員環，或亦可與 R^{13} 共同形成含環氧化合物之螺雙環。

根據上述構想，本發明係從臺灣梭羅木 (*Reevesia formosana*) 之根部獲得如式 (I) 之強心苷系列衍生物，該化合物可與一醫藥可接受之載體，形成一醫藥組成物，以抑制腫瘤細胞之活性作用。

根據上述構想，將採集之臺灣梭羅木根經風乾後細切成薄片，於室溫下以冷卻之甲醇萃取，經揮除溶劑後，甲醇粗萃取物則以乙酸乙酯(EtOAc) 和水分配 (partition)，分別乙酸乙酯可溶性劃分區 (fraction) 及水可溶性劃分區。其中乙酸乙酯可溶性劃分區充填於矽膠管柱，運用正己烷-乙酸乙酯梯度溶媒沖提，獲得劃分區 1 至 12，以及最後以甲醇沖提共形成 13 劃分區。該乙酸乙酯及水可溶性劃分區兩部分分別進行活性分析，顯示對人類乳癌細胞株(MCF-7)、人類大細胞肺癌細胞株 (NCI-H460) 和人類肝癌細胞株 (HepG2) 腫瘤細胞均具備殺傷作用。請參考表一，顯示 9 至 13 劃分區對 MCF-7、NCI-H460 和 HepG2 腫瘤細胞均具備較強之殺傷作用。

表一 乙酸乙酯可溶性劃分區 9~13 之活性

| 細胞株\劃分區 | | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
|----------|--------------|-----|----|-----|-----|-----|
| MCF-7 | 150 (μg/ ml) | 9% | 4% | 8% | 8% | 8% |
| | 30 (μg/ ml) | 38% | 5% | 6% | 6% | 5% |
| NCI-H460 | 150 (μg/ ml) | 8% | 5% | 91% | 10% | 12% |
| | 30 (μg/ ml) | 44% | 9% | 10% | 10% | 9% |
| HepG2 | 150 (μg/ ml) | 4% | 2% | 2% | 2% | 3% |
| | 30 (μg/ ml) | 2% | 1% | 1% | 1% | 1% |

根據上述構想，乃選用矽膠、Sephadex LH-20、RP-C₁₈ 矽膠等材質之管柱，經由二氯甲烷 (CH₂Cl₂)、乙酸乙酯 (EtOAc)、正己烷 (*n*-hexane)、甲醇 (MeOH)、丙酮 (acetone)、水等溶媒或該等溶媒之混合進行後續之沖提與純化，請參考表二共 J 種模式。其中劃分區 10 充填於 Sephadex LH-20 管柱

以 100% 之甲醇沖提，獲得劃分區 10-1 至 10-13 之 13 劃分區。劃分區 10-3 充填於 RP-C₁₈ 管柱以甲醇:水 (3:2) 混合溶媒沖提，獲得劃分區 10-3-1 至 10-3-12。

劃分區 10-3-6 充填於矽膠管柱，以二氯甲烷-丙酮 (3:1) 混合溶媒沖提，獲得劃分區 10-3-6-1 至 10-3-6-7 共 7 劃分區。劃分區 10-3-10 充填於矽膠管柱、以二氯甲烷-丙酮 (3: 1) 混合溶媒沖提，獲得劃分區 10-3-10-1 至 10-3-10-5 共 5 劃分區。劃分區 11 充填於 Sephadex LH-20 管柱，以 100% 之甲醇沖提，獲得劃分區 11-1 至 11-9 之 9 劃分區。劃分區 11-2 充填於 RP-C₁₈ 管柱以甲醇-水 (1:1) 混合溶媒沖提，獲得 14 劃分區 (劃分區 11-2-1 至 11-2-14)。劃分區 11-2-8 充填於矽膠管柱以二氯甲烷-丙酮 (3: 1) 混合溶媒沖提，獲得劃分區 11-2-8-1 至 11-2-8-9 之 9 劃分區。

另外分別於劃分區 10-3-8 分離出化合物 1 (460 毫克)，以正己烷-乙酸乙酯混合溶媒從劃分區 10-3-5，獲得化合物 8 和 9 結晶之混合物 (10.0 毫克)。將濾除結晶之母液，充填於矽膠管柱，以二氯甲烷-丙酮 (5:1) 混合溶媒沖提，獲得劃分區 10-3-5-1 至 10-3-5-7 共 7 劃分區。劃分區 10-3-6-2 以 RP-18 之製備型薄層層析板進一步以丙酮-水 (1:1) 混合溶媒純化，獲得化合物 2 (2.0 毫克)。劃分區 11-2-8-7 和劃分區 11-2-8-8 以製備薄膜層析法經由正己烷-二氯甲烷-丙酮 (1: 1: 2) 純化，獲得化合物 3 (9.0 毫克)、4 (14.0 毫克)、5 (2.8 毫克)。劃分區 10-3-10-3 和 10-3-10-4 分別含有化合物 7 (63 毫克) 及 6 (11 毫克)。劃分區 10-3-5-2 含有化合物 12 和 13 (1.7 毫克) 之混合物，劃分區 10-3-5-5 含有化合物 10 和 11 (7.0 毫克) 之混合物。

表二 乙酸乙酯可溶性劃分區之分離狀態

| | | | |
|---|------------------------------------|---|------------------------------|
| A | 乙酸乙酯可溶性劃分區充填於矽膠管柱 | | |
| | 溶 媒 | 正己烷 | 劃分區 1 |
| | | 正己烷/乙酸乙酯 (90:10~ 85:15~80:20~70:30~50: 50) | 劃分區 2~9 |
| | | 乙酸乙酯 | 劃分區 10~12 |
| | | 甲醇 | 劃分區 13 |
| B | 劃分區 10 充填於 Sephadex LH-20 管柱 | | |
| | 溶 媒 | 甲醇 | 劃分區 10-1 至 10-13 |
| C | 劃分區 10-3 充填於 RP-C ₁₈ 管柱 | | |
| | 溶 媒 | 甲醇: 水 (3:2) | 劃分區 10-3-1 至 10-3-12 |
| D | 濾除化合物 8 和 9 結晶之混合物, 將母液充填於 矽膠管柱 | | |
| | 溶 媒 | 二氯甲烷-丙酮 (5:1) | 劃分區 10-3-5-1 至 10-3-5-7 |
| E | 劃分區 10-3-6 充填於矽膠管柱 | | |
| | 溶 媒 | 二氯甲烷-丙酮 (3:1) | 劃分區 10-3-6-1 至 10-3-6-7 |
| F | 劃分區 10-3-6-2 以 RP-18 之製備型薄層層析板 | | |
| | 溶 媒 | 丙酮-水 (1:1) | |
| G | 劃分區 10-3-10 (100 毫克) 充填於矽膠管柱 | | |
| | 溶 媒 | 二氯甲烷-丙酮 (3: 1) | 劃分區 10-3-10-1 至 10-3-10-5 |
| H | 劃分區 11 充填於 Sephadex LH-20 管柱 | | |
| | 溶 媒 | 甲醇 | 劃分區 11-1 至 11-9 |
| I | 劃分區 11-2 充填於 RP-C ₁₈ 管柱 | | |
| | 溶 媒 | 甲醇: 水 (1 : 1) | 劃分區 11-2-1 至 11-2-14 |

表二(續) 乙酸乙酯可溶性劃分區之分離狀態

| | | | |
|---|--------------------|----------------|-------------------------|
| J | 劃分區 11-2-8 充填於矽膠管柱 | | |
| | 溶媒 | 二氯甲烷-丙酮 (3: 1) | 劃分區 11-2-8-1 至 11-2-8-9 |

所分離純化之化合物分別以 Yanaco 顯微熔點測定儀 (micromelting) ，以及相關設備檢測紫外光譜 (UV) 、紅外光譜 (KBr) 、氫 (¹H) 和碳 (¹³C) 之核磁共振光譜與單晶 x 射線繞射分析 (Single-Crystal X-ray Crystallography) 等數據以確認化合物之結構。如第一圖所示，化合物 1 之單晶 x 射線繞射分析圖。

化合物 10 和 11 之氫 (¹H) 和 碳 (¹³C) 之核磁共振光譜均與化合物 8 和 9 頗相似，化合物 8 和 9 之 δ_H 10.05 (1 Hs, H-19) ， δ_c 207.9 (C-19) 呈現乙醛基；而 δ_c 176.0 (C-19) 於化合物 10 和 11 呈現羧酸基。

強心苷 (cardenolides) 亦稱為強心類固醇，曾被發現於夾竹桃科、蘿藦科、菊科、十字花科、大戟科、百合科、桑科、毛茛科、玄參科等之植物。所採集之臺灣梭羅木根部，運用生物活性導向之分離技術，證實乙酸乙酯及水可溶性劃分區兩部分均對於人類乳癌細胞株(human breast adenocarcinoma, MCF-7)、人類大細胞肺癌細胞株(non-small-cell lung cancer, NCI-H460) 和人類肝癌細胞株(liver hepatocellular cells, HepG2) 等腫瘤細胞均具備殺傷作用。經分離純化所獲得之式 (I) 強心苷系列衍生物，綜合物性與相關化性數據 (表四~八) ，確認可區分為如式 (II) 或式 (III) 所示之化合物。其中化合物 8 與 9 係以 6:5 之比例混合，化合物 10 與 11 以及化合物 12 與 13 均係以 3:2 之比例混合。如表三所示，該等強心苷衍生物均對於 MCF-7、NCI-H460 和 HepG2 等腫瘤細胞具殺傷作用。

表三 十三種強心苷衍生物之 IC₅₀ 值

| Compounds | | IC ₅₀ (nM) | | |
|--------------------|---------|-----------------------|------------|------------|
| | | MCF-7 | NCI-H460 | HepG2 |
| reevesioside | A (1) | 63.2±2.1 | 19.3±0.5 | 367.6±29.9 |
| reevesioside | B (2) | 3524.3± | 431.1± | 4755.3± |
| | | 72.0 | 45.1 | 202.5 |
| reevesioside | C (3) | 2036.2± | 207.9± | 3738.4± |
| | | 172.8 | 15.6 | 261.1 |
| reevesioside | D (4) | 36427.0± | 3904.4± | >500000 |
| | | 2577.5 | 316.2 | |
| reevesioside | E (5) | 11764.2± | 1769.6± | 40491.5± |
| | | 2239.4 | 35.4 | 6425.4 |
| reevesioside | F (6) | 72.0±8.1 | 20.3±0.4 | 836.2±33.2 |
| epi-reevesioside | F (7) | 34.1±5.5 | 10.4±0.5 | 995.5±92.6 |
| reevesioside | G(8) 混合 | 2070.8± | 485.6± | 8903.9± |
| epi-reevesioside | G (9) | 52.6 | 29.3 | 790.7 |
| reevesioside | H(10) | 36194.2± | 3665.3± | >500000 |
| 混合epi-reevesioside | H | | | |
| | (11) | 4128.6 | 182.5 | |
| reevesioside | I (12) | 9352.9± | 1090.8± | 22739.3± |
| 混合epi-reevesioside | I | | | |
| | (13) | 962.9 | 207.0 | 3489.7 |
| tylophorine* | | 236.0±11.0 | 233.0±24.0 | 215±14.0 |

*對照組

於式 (II) 化合物其中該 R³ 取代基可為氫基或糖基; R⁵ 可為氫基或氫氧基;

R¹⁰ 可選自以下群組之一，

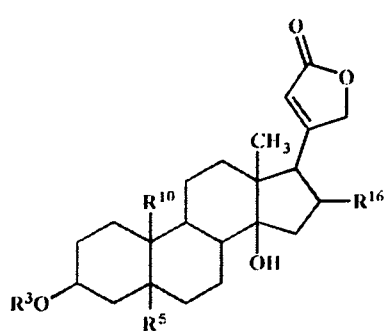
氫基、氫氧基、甲烷基、甲醛基或甲酸基;

R¹⁶ 可為氫基或乙醯基。

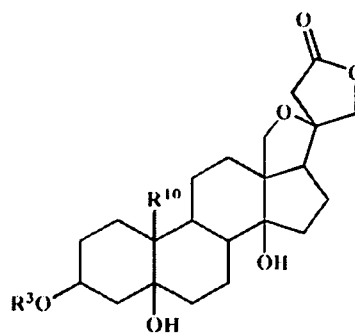
於式 (III) 化合物其中該 R³ 取代基可為氫基或糖基;

R¹⁰ 可選自以下群組之一，

氨基、氫氧基、甲醛基或甲羧基。

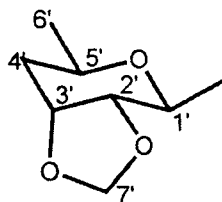


式 (II)

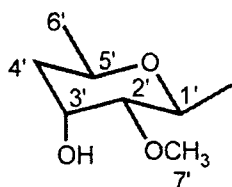


式 (III)

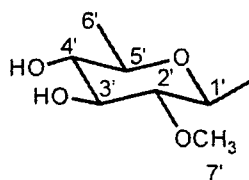
R^3 取代基係特殊之糖基，分別為 reevesiose、6-脫氧-2-*O*-甲基- β -D-葡萄糖 (6-deoxy-2-*O*-methyl- β -D-glucose)、4,6-雙脫氧-2-*O*-甲基- β -D-阿洛糖 (4,6-dideoxy-2-*O*-methyl- β -D-allose, b) 和 6-脫氧-2-*O*-甲基- β -D-阿洛糖 (6-deoxy-2-*O*-methyl- β -D-allose)。



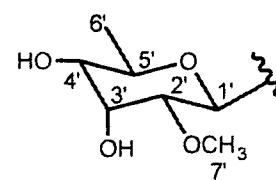
a



b



c



d

臺灣梭羅木根部獲得十三種強心苷系列衍生物，化合物 reevesiosides A-I 編碼為 1-6、8、10、12 以及 *epi*-reevesioside F-I 編碼為 7、9、11、13。化合物 reevesiosides A-F 與化合物 *epi*-reevesioside F 共 7 種化合物之基本結構隸屬於式 (II)，而化合物 Reevesioside G-I 與化合物 *epi*-Reevesioside G-I 共 6 種化合物之基本結構隸屬於式 (III)。

| 式 (II) | 取 代 基 | | | |
|--------------------------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| | R ³ | R ⁵ | R ¹⁰ | R ¹⁶ |
| reevesioside A (1) | a | OH | CHO | H |
| reevesioside B (2) | a | OH | CHO | OAc |
| reevesioside C (3) | b | OH | CHO | H |
| reevesioside D (4) | b | OH | COOH | H |
| reevesioside E (5) | b | OH | OH | H |
| reevesioside F (6) | c | H | CH ₃ | H |
| <i>epi</i> -reevesioside F (7) | d | H | CH ₃ | H |

| 式 (III) | 取 代 基 | |
|---------------------------------|----------------|-----------------|
| | R ³ | R ¹⁰ |
| Reevesioside G (8) | a (20S) | CHO |
| <i>epi</i> -Reevesioside G (9) | a (20R) | CHO |
| Reevesioside H (10) | a (20S) | COOH |
| <i>epi</i> -Reevesioside H (11) | a (20R) | COOH |
| Reevesioside I (12) | a (20S) | OH |
| <i>epi</i> -Reevesioside I (13) | a (20R) | OH |

綜上所述經由生物活性導向之分離技術，甲醇粗萃取物再進行之乙酸乙酯可溶性劃分區（表一）以及表三所示上述十三種強心苷系列衍生物均對於 MCF-7、NCI -H460 和 HepG2 腫瘤細胞具備殺傷作用。

上述賦形劑或稱為『藥學上可接受之載體或賦形劑』、『生物可利用之載體或賦形劑』，係包括溶媒、分散劑、包衣、抗菌或抗真菌劑，保存或延緩吸收劑等任何習知用於製備成劑型之適當化合物。通常此類載體或賦形劑，本身不具備治療疾病之活性，且將本發明所揭示之衍生物，搭配藥學上可接受之載

體或賦形劑，製備之各劑型，投與動物或人類不致於造成不良反應、過敏或其他不適當反應。因而本發明所揭示之衍生物，搭配藥學上可接受之載體或賦形劑，係適用於臨床及人類。運用本發明化合物之劑型經由靜脈、口服、吸入或經由鼻、直腸、陰道等局部或舌下等方式投藥，可達到治療效果。

該載體隨各劑型而不同，無菌注射之組成物可將溶液或懸浮於無毒之靜脈注射稀釋液或溶劑中，此類溶劑如 1,3-丁二醇。其間可接受之載體可為甘露醇 (Mannitol) 或水。此外固定油或以合成之單或雙甘油酯懸浮介質，係一般習用之溶劑。脂肪酸，如油酸 (Oleic acid)、橄欖油或蓖麻油等與其甘油酯衍生物，尤其經多氧乙基化之型態皆可作為製備注射劑並為天然醫藥可接受之油類。此等油類溶液或懸浮液可包含長鏈酒精稀釋液或分散劑、羧甲基纖維素或類似之分散劑。其他一般使用之介面活性劑如 Tween、Spans 或其他相似之乳化劑或是一般醫藥製造業所使用於醫藥可接受之固態、液態或其他可用於劑型開發之生物可利用增強劑。

用於口服投藥之組合物則係採用任何一種口服可接受之劑型，其型式包括膠囊、錠劑、片劑、乳化劑、液狀懸浮液、分散劑、溶劑。口服劑型一般所使用之載體，以錠劑為例可為乳糖、玉米澱粉、潤滑劑，如硬脂酸鎂為基本添加物。而膠囊使用之稀釋液包括乳糖與乾燥玉米澱粉。製成液狀懸浮液或乳化劑劑型，係將活性物質懸浮或溶解於結合乳化劑或懸浮劑之油狀介面，視需要添加適度之甜味劑，風味劑或是色素。

鼻用氣化噴霧劑或吸入劑組成物，可根據已知之製劑技術進行製備。例如，將組成物溶於生理食鹽水中，添加苯甲醇或其他適合之防腐劑，或促吸收劑以增強生物可利用性。本發明化合物之組合物亦可製成栓劑，進行經直腸或陰道之投藥方式。

本發明化合物亦可運用『靜脈投藥』，其係包括經由皮下、

腹腔、靜脈、肌肉，或關節腔內、顱內、關節液內、脊髓內注射，主動脈注射，胸腔注射，疾病部位內注射，或其他適合之投藥技術。對於不同病症之患者，約每日投與 0.1mg 至 0.2 mg 之活性成份。

【實施方式】

本案所提出之「臺灣梭羅木之生物活性組合物」將可由以下的實施例說明而得到充分瞭解，使得熟習本技藝之人士可以據以完成之，然而本案之實施並非可由下列實施例而被限制其實施型態，熟習本技藝之人士仍可依據除既揭露之實施例的精神推演出其他實施例，該等實施例皆當屬於本發明之範圍。

實驗材料及方法：

活性實驗：

於 37 °C 含 5 % CO₂ 空氣之培養箱將 MCF-7 (human breast adenocarcinoma)、NCI-H460 (non-small-cell lung cancer) 與 HepG2 (liver hepatocellular cells) 培養於修改之 Dulbecco's Eagle's 培養基，其中添加 10%胎牛血清和非必需之氨基酸 (Life Technologies, Inc.)。人類癌細胞株係接種於 96 孔微孔板，MCF-7 與 NCI-H460 每孔洞 100 μ l 之培養基分別培養細胞數量為 6500、2500 和 7500。經過夜之適應期後，細胞株至少投與 8 個不同濃度之測試化合物，於二氧化碳培養箱培養 72 小時。依照 1995 年 Gieni 等人之 MTS 減少試驗(MTS reduction assay)，運用 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazoyl)-3-(4-sulfophenyl) tetrazolium salt (MTS) 化合物，估計存活之細胞數目。該實驗並以二甲基亞砷 (DMSO) (Promega, Madison, WI, USA) 最後濃度 0.1%作為對照組。由於二甲基亞砷控制一個百分比之結果，檢測結果可作為 IC₅₀ 值之確定濃度反應 (dose-response) 曲線。當 IC₅₀ 值為 $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ 認為屬於顯著之細胞毒性作用。每個 IC₅₀ 值係樣本三次重複之試驗平均值。於 96 孔微孔板 HepG2 接種培養

細胞數量為 10000 細胞/孔，進行相同之實驗。

萃取與分離實施例

臺灣梭羅木根經風乾後 6.5 公斤細切成薄片，於室溫下以冷卻之 30 L 甲醇萃取三次，經真空揮除溶劑。甲醇粗萃取物 (150 克) 則以乙酸乙酯 (EtOAc) 和水分配 (partition)，獲得 45g 乙酸乙酯可溶性劃分區 (fraction) 及 100 克水可溶性劃分區。此兩部分可溶性劃分區分別進行存活分析，顯示對 MCF-7、NCI-H460 和 HepG2 腫瘤細胞均具備殺傷作用。

乙酸乙酯可溶性劃分區 (45g) 充填於矽膠管柱 (70-230 篩，1.5 公斤)，運用正己烷-乙酸乙酯梯度溶媒沖提，獲得劃分區 1 至 12，以及最後以甲醇沖提共為 13 劃分區。劃分區 9-13 顯示對以上三種腫瘤細胞之殺傷作用較強。

劃分區 10 (2.4g) 充填於 Sephadex LH-20 管柱以 100% 之甲醇沖提，獲得劃分區 10-1 至 10-13 之 13 劃分區。劃分區 10-3 (0.87 g) 充填於 RP-C₁₈ 管柱 (20-40 μ m 矽膠) 以甲醇: 水 (3:2) 混合溶媒沖提，獲得劃分區 10-3-1 至 10-3-12。劃分區 10-3-8 含有化合物 1 (460 mg)，以正己烷-乙酸乙酯從劃分區 10-3-5 (144 毫克)，獲得化合物 8 和 9 結晶之混合物 (10.0 毫克)。將濾除結晶之母液，充填於矽膠管柱，以二氯甲烷-丙酮 (5:1) 混合溶媒沖提，獲得劃分區 10-3-5-1-10-3-5-7 共 7 劃分區。

劃分區 10-3-5-2 含有化合物 12 和 13 (1.7 毫克) 之混合物，劃分區 10-3-5-5 含有化合物 10 和 11 (7.0 毫克) 之混合物。劃分區 10-3-6 (14.3 毫克) 充填於矽膠管柱 (15-35 μ m 矽膠)，以二氯甲烷-丙酮 (3:1) 混合溶媒沖提，獲得劃分區 10-3-6-1 至 10-3-6-7 共 7 劃分區。劃分區 10-3-6-2 充填於 RP-18 薄層進一步以丙酮-水 (1:1) 混合溶媒純化，得到化合物 2 (2 毫克)。劃分區 10-3-10 (100 毫克) 充填於矽膠管柱 (15-35 μ m 矽膠)、以二氯甲烷-丙酮 (3: 1) 混合溶媒沖

提，獲得 5 劃分區 (劃分區 10-3-10-1 至 10-3-10-5)，劃分區 10-3-10-3 和 10-3-10-4 分別含有化合物 7 (63 毫克) 及 6 (11 毫克)。劃分區 11 (9 g) 充填於 Sephadex LH-20 管柱，以 100% 之甲醇沖提，獲得 9 劃分區 (劃分區-11-1 至 11-9)。劃分區 11-2 (0.74 g) 充填於 RP-C₁₈ 管柱 (20-40 μ m 矽膠) 以甲醇:水 (1:1) 混合溶媒沖提，獲得 14 劃分區 (劃分區 11-2-1 至 11-2-14)。劃分區 11-2-8 (149 毫克) 充填於矽膠管柱 (15-35 μ m 矽膠) 以二氯甲烷-丙酮 (3:1) 混合溶媒沖提，獲得 9 劃分區 (劃分區 11-2-8-1 至 11-2-8-9)。

劃分區 11-2-8-7 和劃分區 11-2-8-8 以製備薄層矽膠色譜法經由正己烷-二氯甲烷-丙酮 (1:1:2) 純化，獲得化合物 3 (9 毫克)、4 (14 毫克)、5 (2.8 毫克)。

實施例 製備注射劑之組合物

依量秤取成分，溶於注射用液體，製備成注射劑。

| | |
|-----------------|----------------------|
| reevesiosides A | 0.135mg/vial (1.1mL) |
| 注射用液體 | qs |

表四 化合物 1-13 之融點等物性數據

| |
|--|
| Reevesioside A (1) : colorless prisms mp 231-232 °C; [α] ²⁶ _D -28.7 (c 0.80, MeOH); IR (KBr) ν_{\max} 3518 (OH), 1780, 1744, 1621 (butenolactone ring), 1715 (CHO) cm ⁻¹ ; ESIMS <i>m/z</i> 569 [M+Na] ⁺ ; HRESIMS <i>m/z</i> 569.2729 (calcd for C ₃₀ H ₄₂ O ₉ Na, 569.2726). |
| Reevesioside B (2) : colorless syrup [α] ²⁶ _D -18.7 (c 0.07, MeOH); IR (KBr) ν_{\max} 3511 (OH), 1775, 1741, 1628 (butenolactone ring) |

表四(續)

| |
|---|
| cm^{-1} ; ESIMS m/z 627 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HRESIMS m/z 627.2777 (calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{O}_{11}\text{Na}$, 627.2781) . |
| Reevesioside C (3) : colorless needles mp 140-142 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{26}$ -20.7 (c 0.08, MeOH) ; IR (KBr) ν_{max} 3498 (OH) , 1779, 1744, 1621 (butenolactone ring) , 1712 (CHO) cm^{-1} ; ESIMS m/z 571 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HRESIMS m/z 571.2281 (calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_9\text{Na}$, 571.2883). |
| Reevesioside D (4) : colorless needles mp 160-162 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{26}$ -14.1 (c 0.12, MeOH) ; IR (KBr) ν_{max} 3499 (OH) , 1780, 1746, 1621 (butenolactone ring) , 2500-3300, 1730 (COOH) cm^{-1} ; ESIMS m/z 587 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HRESIMS m/z 587.2836 (calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_{10}\text{Na}$, 587.2832). |
| Reevesioside E (5) : colorless needles mp 228-229 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{26}$ -10.3 (c 0.04, MeOH) ; IR (KBr) ν_{max} 3479 (OH) , 1779, 1745, 1620 (butenolactone ring) cm^{-1} ; ESIMS m/z 559 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HRESIMS m/z 559.2886 (calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{O}_9\text{Na}$, 559.2883). |
| Reevesioside F (6) : colorless needles mp 241-242 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{26}$ -17.6 (c 0.08, MeOH) ; IR (KBr) ν_{max} 3442 (OH) , 1779, 1742, 1622 (butenolactone ring) cm^{-1} ; ESIMS m/z 557 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HRESIMS m/z 557.3088 (calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_8\text{Na}$, 557.3090) . |

表四(續)

| |
|--|
| <p><i>epi</i>-Reevesioside F (7) : colorless needles mp 216-217 °C; $[\alpha]_D^{26}$ -16.9 (c 1.20; MeOH) ; IR (KBr) ν_{\max} 3458 (OH) , 1780, 1741, 1621 (butenolactone ring) cm^{-1}; ESIMS m/z 557 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HRESIMS m/z 557.3094 (calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_8\text{Na}$, 557.3090) .</p> |
| <p>混合 Reevesioside G (8) 與 <i>epi</i>-Reevesioside G (9) : colorless syrup $[\alpha]_D^{26}$ -46.7 (c 0.12, MeOH) ; IR (KBr) ν_{\max} 3524 (OH) , 1780 (lactone ring) , 1712 (CHO) cm^{-1}; ESIMS m/z 585 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HRESIMS m/z 585.2672 (calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{O}_{10}\text{Na}$, 585.2676) .</p> |
| <p>混合 Reevesioside H (10) 與 <i>epi</i>-Reevesioside H (11) : colorless syrup $[\alpha]_D^{26}$ -13.3 (c 0.20, MeOH) ; IR (KBr) ν_{\max} 3521 (OH) , 1780 (lactone ring) , 2500-3300, 1727, (COOH) cm^{-1}; ESIMS m/z 601 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HRESIMS m/z 601.2621 (calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{O}_{11}\text{Na}$, 601.2625) .</p> |
| <p>混合 Reevesioside I (12) 與 <i>epi</i>-Reevesioside I (13) : colorless syrup $[\alpha]_D^{26}$ -27.1 (c 0.10, MeOH) ; IR (KBr) ν_{\max} 3520 (OH) , 1781 (lactone ring) cm^{-1}; ESIMS m/z 573 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HRESIMS m/z 573.2679 (calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{42}\text{O}_{10}\text{Na}$, 573.2676).</p> |

表五 化合物 1-5^a 之氫 (¹H) 核磁共振光譜

| position | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|----------|--|--|--|--|--|
| 1a/b | 2.22, m/ 1.69, m | 2.30, m/ 1.71, m | 2.23, m/ 1.72, m | 2.36, m/ 1.46, m | 1.89, m/ 1.49, m |
| 2a/b | 1.91, m/ 1.51, m | 1.98, m/ 1.52, m | 1.93, m/ 1.54, m | 1.94, m/ 1.59, m | 1.81, m/ 1.74, m |
| 3 | 4.18, br s | 4.21, br t (2.7) | 4.22, br s | 4.25, br s | 4.17, br t, (2.7) |
| 4a/b | 1.97, m/ 1.68, m | 1.96, m/ 1.72, m | 1.94, m/ 1.72, m | 2.08, m/ 1.79, m | 1.88, m/ 1.45, m |
| 6a/b | 2.06, m/ 1.68, m | 2.04, m/ 1.71, m | 2.07, m/ 1.72, m | 1.77, m/ 1.69, m | 1.86, m/ 1.45, m |
| 7a/b | 2.08, m/ 1.23, m | 2.08, m/ 1.18, m | 2.09, m/ 1.25, m | 2.04, m/ 1.15, m | 1.87, m/ 1.06, m |
| 8 | 1.91, m | 1.97, m | 1.92, m | 1.98, m | 1.81, m |
| 9 | 1.51, m | 1.43, m | 1.52, m | 1.52, m | 1.43, m |
| 11a/b | 1.50, m/ 1.30, m | 1.51, m/ 1.38, m | 1.54, m/ 1.31, m | 2.26, m/ 1.86, m | 1.58, m |
| 12a/b | 1.51, m/ 1.32, m | 1.57, m/ 1.22, m | 1.52, m/ 1.33, m | 1.52, m/ 1.35, m | 1.56, m/ 1.43, m |
| 15a/b | 2.00, m/ 1.66, m | 2.63, dd (15.9, 9.6) / 1.76, dd (15.9, 2.7) | 2.01, m/ 1.68, m | 1.93, m/ 1.72, m | 2.00, m/ 1.68, m |
| 16a/b | 2.14, m/ 1.86, m | 5.45, ddd (9.6, 8.6, 2.7) | 2.17, m/ 1.85, m | 2.12, m/ 1.88, m | 2.15, m/ 1.86, m |
| 17 | 2.75, dd (9.8, 5.4) | 3.18, d (8.6) | 2.75, dd (9.6, 5.2) | 2.76, dd (9.2, 4.8) | 2.77, dd (9.6, 5.4) |
| 18 | 0.85, s | 0.94, s | 0.86, s | 0.97, s | 0.92, s |
| 19 | 10.0, s | 10.0, d (0.8) | 10.05, s | | |
| 21a/b | 4.95, dd (18.0, 1.6) / 4.79, dd (18.0, 1.6) | 4.95, dd (18.3, 1.8) / 4.85, dd (18.3, 1.8) | 4.95, dd (18.2, 1.6) / 4.79, dd (18.2, 1.6) | 4.98, dd (18.2, 1.4) / 4.81, dd (18.2, 1.4) | 4.96, dd (18.0, 1.5) / 4.81, dd (18.0, 1.5) |

表五(續)

| position | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 22 | 5.86, s | 6.00, s | 5.88, s | 5.88, s | 5.88, s |
| 25 | | 1.98, s | | | |
| 1' | 4.46, d (6.8) | 4.47, d (6.9) | 4.74, d (7.9) | 4.73, d (7.9) | 4.74, d (8.0) |
| 2' | 3.79, dd (6.8, 5.4) | 3.82, dd (6.9, 5.4) | 3.01, dd (7.9, 3.0) | 3.03, dd (7.9, 3.0) | 3.02, dd (8.0, 3.3) |
| 3' | 4.13, ddd (5.4, 4.0, 1.8) | 4.14, ddd (5.4, 4.2, 1.8) | 4.27, m | 4.30, m | 4.28, m |
| 4'a/b | 2.12, m/ 1.76, m | 2.15, m/ 1.72, m | 1.92, m/ 1.49, m | 1.95, m/ 1.49, m | 1.93, m/ 1.47, m |
| 5' | 3.79, m | 3.83, m | 3.98, m | 3.99, m | 3.99, m |
| 6' | 1.22, d (6.4) | 1.25, d (6.0) | 1.19, d (6.0) | 1.19, d (6.0) | 1.20, d (6.6) |
| 7'a/b | 5.21, s /4.88, s | 5.23, s /4.90, s | 3.43, s | 3.44, s | 3.47, s |
| OH-5 ^b | 4.25, s | 4.30, s | 4.49, s | | 4.39, s |

^a ¹H NMR data (δ) were measured in CDCl₃ at 400 MHz for 1, 3, and 4, at 600 MHz for 2 and 5. ^b D₂O exchangeable

表六 化合物 1-7^a之碳 (¹³C) 核磁共振光譜

| position | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|----------|------|------|------|------|--------------------|------|------|
| 1 | 17.8 | 18.0 | 17.9 | 21.3 | 28.6 | 30.3 | 30.2 |
| 2 | 25.3 | 25.3 | 25.4 | 25.7 | 26.1 | 26.6 | 26.6 |
| 3 | 73.0 | 73.1 | 72.0 | 72.2 | 72.4 | 73.2 | 73.1 |
| 4 | 34.5 | 34.4 | 34.0 | 33.2 | 34.3 | 29.5 | 29.5 |
| 5 | 73.4 | 73.2 | 73.1 | 74.6 | 73.71 ^b | 36.4 | 36.3 |
| 6 | 36.3 | 36.3 | 36.5 | 36.5 | 34.5 | 26.6 | 26.6 |
| 7 | 24.1 | 23.7 | 24.2 | 23.9 | 23.5 | 21.4 | 21.3 |
| 8 | 41.6 | 41.5 | 41.7 | 40.7 | 40.5 | 41.8 | 41.7 |
| 9 | 39.3 | 39.1 | 39.3 | 39.4 | 39.8 | 35.8 | 35.7 |
| 10 | 54.6 | 54.3 | 54.6 | 53.3 | 73.74 ^b | 35.2 | 35.1 |

表六(續)

| position | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|----------|--------------------|-------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| 11 | 21.9 | 21.4 | 21.9 | 21.8 | 21.0 | 21.1 | 21.1 |
| 12 | 39.7 | 39.0 | 39.7 | 40.0 | 40.0 | 40.0 | 39.9 |
| 13 | 49.4 | 49.8 | 49.4 | 49.8 | 49.5 | 49.6 | 49.6 |
| 14 | 85.1 | 84.0 | 85.2 | 85.3 | 85.2 | 85.6 | 85.5 |
| 15 | 31.9 | 40.1 | 32.0 | 32.3 | 32.6 | 33.1 | 33.0 |
| 16 | 26.8 | 73.7 | 26.8 | 26.8 | 26.9 | 26.9 | 26.8 |
| 17 | 50.4 | 55.6 | 50.4 | 50.4 | 50.6 | 50.9 | 50.8 |
| 18 | 15.5 | 15.8 | 15.6 | 15.7 | 15.7 | 15.7 | 15.7 |
| 19 | 208.2 | 208.1 | 208.3 | 176.6 | | 23.8 | 23.8 |
| 20 | 174.5 ^b | 167.2 | 174.4 ^b | 174.7 ^b | 174.44 ^c | 174.54 ^b | 174.8 ^b |
| 21 | 73.3 | 75.5 | 73.4 | 73.6 | 73.4 | 73.4 | 73.5 |
| 22 | 117.7 | 121.6 | 117.9 | 117.6 | 117.7 | 117.7 | 117.5 |
| 23 | 174.3 ^b | 173.9 | 174.1 ^b | 174.6 ^b | 174.38 ^c | 174.53 ^b | 174.7 ^b |
| 24 | | 170.5 | | | | | |
| 25 | | 21.1 | | | | | |
| 1' | 99.1 | 99.3 | 96.5 | 96.5 | 96.5 | 100.6 | 97.8 |
| 2' | 73.7 | 73.8 | 80.7 | 80.5 | 80.7 | 83.3 | 80.2 |
| 3' | 74.5 | 74.6 | 64.6 | 64.3 | 64.6 | 76.3 | 69.9 |
| 4' | 34.3 | 34.3 | 38.1 | 38.1 | 38.1 | 75.2 | 72.8 |
| 5' | 67.0 | 67.1 | 66.5 | 66.7 | 66.5 | 71.4 | 69.5 |
| 6' | 20.9 | 20.9 | 20.6 | 20.6 | 20.6 | 17.6 | 17.7 |
| 7' | 95.4 | 95.4 | 57.6 | 57.3 | 57.6 | 60.8 | 59.4 |

^a ¹³C NMR data (δ) were measured in CDCl₃ at 100 MHz for 1, 3, 4, 6, and 7, at 150 MHz for 2 and 5.

^{b,c} Interchangeable within the same column.

表七 合物 6-9^a 之氫 (¹H) 核磁共振光譜

| Position | 6 | 7 | 8 | 9 |
|----------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 1a/b | 1.50, m | 1.48, m | 2.13, m/ 1.67, m | 2.13, m/ 1.67, m |
| 2a/b | 1.69, m/ 1.52, m | 1.66, m/ 1.48, m | 1.92, m/ 1.48, m | 1.92, m/ 1.48, m |
| 3 | 4.08, br s | 4.03, br s | 4.17, br s | 4.17, br s |
| 4a/b | 1.70, m/ 1.23, m | 1.69, m/ 1.23, m | 1.95, m/ 1.67, m | 1.95, m/ 1.67, m |

| | 1.23, m | 1.23, m | 1.67, m | 1.67, m |
|----------|---------------|------------------|----------------|----------------|
| 表七(續) | | | | |
| Position | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 5 | 1.72, m | 1.69, m | | |
| 6a/b | 1.88, m/ | 1.84, m/ | 2.18, m/ | 2.18, m/ |
| | 1.28, m | 1.26, m | 1.67, m | 1.67, m |
| 7a/b | 1.69, m/ | 1.67, m/ | 2.19, m/ | 2.19, m/ |
| | 1.26, m | 1.18, m | 1.26, m | 1.26, m |
| 8 | 1.56, m | 1.53, m | 1.90, m | 1.90, m |
| 9 | 1.61, m | 1.59, m | 1.38, m | 1.38, m |
| 11a/b | 1.44, m/ | 1.38, m/ | 1.61, m/ | 1.61, m/ |
| | 1.26, m | 1.18, m | 0.83, m | 0.83, m |
| 12a/b | 1.52, m/ | 1.51, m/ | 1.67, m/ | 1.67, m/ |
| | 1.39, m | 1.40, m | 1.42, m | 1.42, m |
| 15a/b | 2.13, m/ | 2.11, m/ | 1.79, m/ | 1.79, m/ |
| | 1.69, m | 1.68, m | 1.67, m | 1.67, m |
| 16a/b | 2.16, m/ | 2.14, m/ | 1.93, m/ | 1.92, m/ |
| | 1.88, m | 1.84, m/ | 1.68, m | 1.61, m |
| 17 | 2.78, dd | 2.76, dd | | 2.30, dd |
| | (8.8, 5.2) | (9.2, 4.8) | 2.10, m | (9.2, 8.0) |
| 18a/b | 0.87, s | 0.85, s | 4.13, d (10) / | 4.15, d (10) / |
| | | | 3.40, d (10) | 3.36, d (10) |
| 19 | 0.93, s | 0.91, s | 10.05, s | 10.05, s |
| | 4.99, dd | 4.98, dd | | |
| 21a/b | (18.1, 1.7) / | (18.0, 1.6) / | 4.31, dd | |
| | 4.81, dd | 4.79, dd | (10, 0.8) / | 4.34, s |
| | (18.1, 1.7) | (18.0, 1.6) | 3.97, d (10) | |
| 22a/b | | | 2.64, d (17.4) | 2.71, d (17.4) |
| | | | / | / |
| | 5.88, s | 5.85, s | 2.57, dd | 2.48, d (17.4) |
| | | | (17.4, 0.8) | |
| 1' | 4.34, d (7.7) | 4.64, d (7.8) | 4.45, d (6.6) | 4.45, d (6.6) |
| 2' | 2.97, dd | 3.02, dd (7.8, | 3.79, dd | 3.79, dd (6.6, |
| | (9.3, 7.7) | 3.0) | (6.6, 5.6) | 5.6) |
| 3' | 3.42, dd | 4.18, br t (3.0) | 4.12, m | 4.12, m |
| | (9.3, 8.6) | | | |
| 4'a/b | 3.26, dd | 3.23, ddd | 2.11, m/ | 2.11, m/ |
| | (9.3, 8.6) | (9.6, 9.2, 3.0) | 1.71, m | 1.71, m |

| | | | | |
|----|------------------------|------------------------|---------|---------|
| 5' | 3.30, dq (9.3, 6.2) | 3.61, dq (9.6, 6.4) | 3.79, m | 3.79, m |
|----|------------------------|------------------------|---------|---------|

表七(續)

| Position | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---------------------|---------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 6' | 1.31, d (6.2) | 1.25, d (6.4) | 1.21, d (6.0) | 1.21, d (6.0) |
| 7'a/b | 3.62, s | 3.54, s | 5.20, s/ 4.87, s | 5.20, s/ 4.87, s |
| OH-3' ^b | | 2.90, s | | |
| OH-4' ^b | | 2.62, br d (9.2) | | |
| OH-5' ^b | | | 4.24, s | 4.24, s |
| OH-14' ^b | | | 4.69, br s | 4.69, br s |

^a ¹H NMR data (δ) were measured in CDCl₃ at 400 MHz for 6-9.

^b D₂O exchangeable

表八 化合物 8-13^a 之碳 (¹³C)核磁共振光譜

| position | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------------------|-------------------|
| 1 | 17.8 | 17.8 | 21.8 | 21.8 | 28.6 | 28.6 |
| 2 | 25.4 | 25.4 | 25.6 | 25.6 | 26.1 | 26.1 |
| 3 | 72.9 | 72.9 | 73.4 | 73.4 | 73.3 | 73.3 |
| 4 | 34.5 | 34.5 | 33.9 | 33.9 | 34.3 | 34.3 |
| 5 | 73.1 | 73.1 | 74.6 | 74.6 | 73.6 ^b | 73.6 ^b |
| 6 | 36.2 | 36.2 | 36.2 | 36.2 | 34.7 | 34.7 |
| 7 | 24.5 | 24.5 | 24.3 | 24.3 | 23.8 | 23.8 |
| 8 | 43.7 | 43.8 | 42.1 | 42.1 | 42.0 | 42.1 |
| 9 | 39.5 | 39.4 | 39.62 | 39.57 | 39.69 | 39.66 |
| 10 | 54.6 | 54.6 | 53.3 | 53.3 | 73.9 ^b | 73.9 ^b |
| 11 | 24.5 | 24.5 | 23.6 | 23.6 | 23.5 | 23.5 |
| 12 | 36.3 | 36.4 | 36.5 | 36.7 | 36.6 | 36.7 |
| 13 | 58.7 | 58.8 | 59.0 | 58.8 | 58.8 | 58.9 |
| 14 | 83.6 | 83.6 | 83.8 | 83.8 | 83.7 | 83.7 |
| 15 | 34.3 | 34.2 | 35.0 | 34.8 | 35.0 | 34.8 |
| 16 | 25.3 | 23.7 | 25.2 | 23.6 | 25.4 | 23.5 |
| 17 | 54.9 | 57.0 | 54.9 | 57.0 | 55.1 | 57.2 |
| 18 | 71.3 | 71.5 | 71.5 | 71.7 | 71.6 | 71.8 |
| 19 | 207.9 | 207.9 | 176.0 | 176.0 | | |

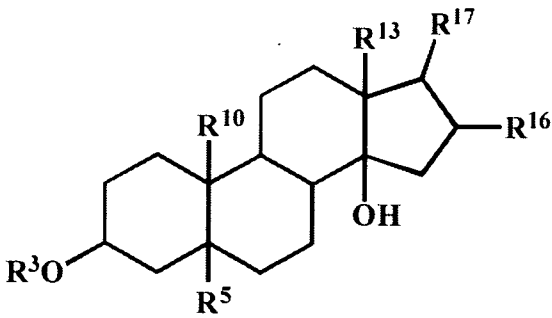
| | | | | | | |
|----|------|------|------|------|------|------|
| 20 | 88.5 | 86.9 | 88.6 | 87.0 | 88.5 | 86.9 |
|----|------|------|------|------|------|------|

| 表八(續) | | | | | | |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| position | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
| 21 | 75.7 | 74.1 | 76.0 | 74.3 | 75.9 | 74.3 |
| 22 | 37.1 | 40.7 | 37.2 | 41.0 | 37.2 | 40.9 |
| 23 | 174.9 | 174.8 | 175.1 | 174.9 | 174.8 | 174.8 |
| 1' | 99.1 | 99.1 | 99.7 | 99.7 | 99.1 | 99.1 |
| 2' | 73.7 | 73.7 | 73.6 | 73.6 | 73.8 | 73.8 |
| 3' | 74.4 | 74.4 | 74.6 | 74.6 | 74.6 | 74.6 |
| 4' | 34.3 | 34.3 | 34.2 | 34.2 | 34.3 | 34.3 |
| 5' | 67.0 | 67.0 | 67.3 | 67.3 | 67.1 | 67.1 |
| 6' | 20.8 | 20.8 | 20.8 | 20.8 | 20.9 | 20.9 |
| 7' | 95.4 | 95.4 | 95.5 | 95.5 | 95.5 | 95.5 |

^a ¹³C NMR data (δ) were measured in CDCl₃ at 100 MHz for 8-11, at 150 MHz for 12 and 13. ^b Interchangeable within the same column.

實施例

1. 一種醫藥組合物，係包含：
藥學上可接受之載體；以及
一有效量之式 (I) 化合物，



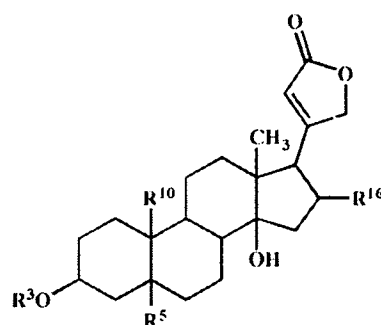
式 (I)

其中該 R³ 取代基可為氫基或糖基；
R⁵ 可為氫基或氫氧基；
R¹⁰ 可選自以下群組之一，
氫基、氫氧基、甲烷基、甲醛基或甲酸基；

R^{16} 可為氫基或乙醯基;

R^{17} 可為含酮基之環氧五員環，或亦可與 R^{13} 共同形成含環氧化合物之螺雙環。

2. 一種醫藥組合物，係包含：
藥學上可接受之載體；以及
一有效量之式 (II) 化合物，



式 (II)

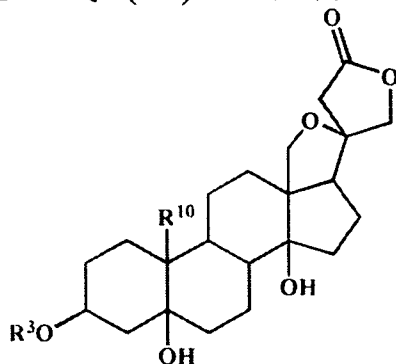
其中該 R^3 取代基可為氫基或糖基; R^5 可為氫基或氫氧基;

R^{10} 可選自以下群組之一，

氫基、氫氧基、甲烷基、甲醛基或甲羧基;

R^{16} 可為氫基或乙醯基。

3. 一種醫藥組合物，係包含：
藥學上可接受之載體；以及
一有效量之式 (III) 化合物，



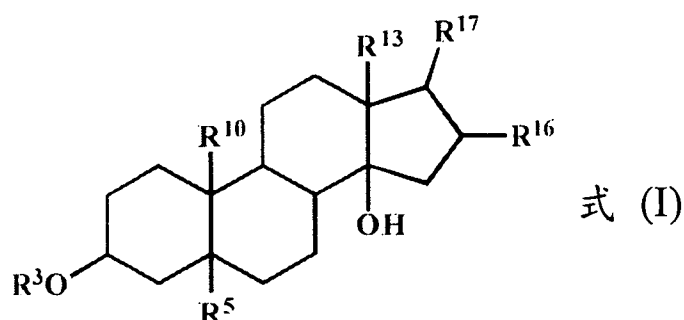
式 (III)

其中該 R^3 取代基可為氫基或糖基;

R^{10} 可選自以下群組之一，

氫基、氫氧基、甲醛基或甲酸基。

4. 一種強心苷化合物，具有如式 (I) 所示之結構，



其中該 R^3 取代基可為氫基或糖基；

R^5 可為氫基或氫氧基；

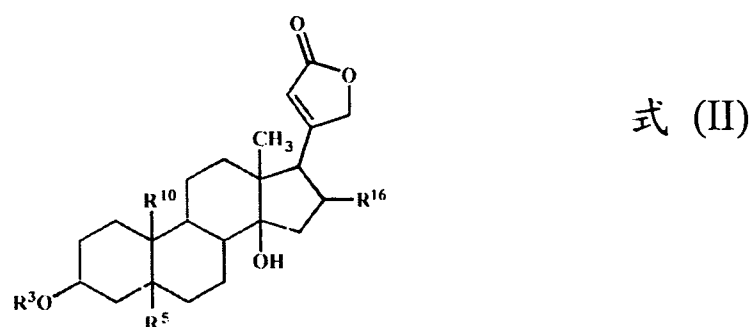
R^{10} 可選自以下群組之一，

氫基、氫氧基、甲烷基、甲醛基或甲酸基；

R^{16} 可為氫基或乙酸基；

R^{17} 可為含酮基之環氧五員環，或亦可與 R^{13} 共同形成含環氧化合物之螺雙環。

5. 一種強心苷化合物，具有如式 (II) 所示之結構，

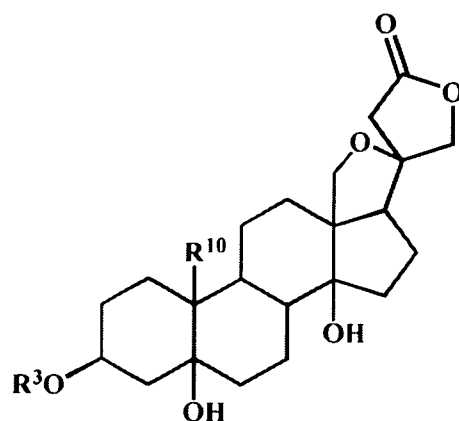


其中該 R^3 取代基可為氫基或糖基； R^5 可為氫基或氫氧基；

R^{10} 可選自以下群組之一，

氫基、氫氧基、甲烷基、甲醛基或甲酸基；
 R^{16} 可為氫基或乙酸基。

6. 一種強心甘化合物，具有如式 (III) 所示之結構，



式 (III)

其中該 R^3 取代基可為氫基或糖基；

R^{10} 可選自以下群組之一，

氫基、氫氧基、甲醛基或甲酸基。

7. 一種製備臺灣梭羅木根部萃取物之方法，其係將採集之臺灣梭羅木根部，以溶媒萃取，萃取物經分配 (partition)，再分離。
8. 一種醫藥組合物，係包含：
 藥學上可接受之載體；以及
 一有效量之 reevesioside A 化合物。
9. 一種醫藥組合物，係包含：
 藥學上可接受之載體；以及
 一有效量之 reevesioside B 化合物。
10. 一種醫藥組合物，係包含：
 藥學上可接受之載體；以及
 一有效量之 reevesioside C 化合物。
11. 一種醫藥組合物，係包含：
 藥學上可接受之載體；以及
 一有效量之 reevesioside D 化合物。

12. 一種醫藥組合物，係包含：
藥學上可接受之載體；以及
一有效量之reevesioside E 化合物。
13. 一種醫藥組合物，係包含：
藥學上可接受之載體；以及
一有效量之reevesioside F 化合物。
14. 一種醫藥組合物，係包含：
藥學上可接受之載體；以及
一有效量之*epi*-reevesioside F 化合物。
15. 一種醫藥組合物，係包含：
藥學上可接受之載體；以及
一有效量之Reevesioside G 化合物。
16. 一種醫藥組合物，係包含：
藥學上可接受之載體；以及
一有效量之*epi*-Reevesioside G 化合物。
17. 一種醫藥組合物，係包含：
藥學上可接受之載體；以及
一有效量之Reevesioside H 化合物。
18. 一種醫藥組合物，係包含：
藥學上可接受之載體；以及
一有效量之*epi*-Reevesioside H 化合物。
19. 一種醫藥組合物，係包含：
藥學上可接受之載體；以及
一有效量之Reevesioside I 化合物。
20. 一種醫藥組合物，係包含：
藥學上可接受之載體；以及
一有效量之*epi*-Reevesioside I 化合物。
21. 一種強心苷化合物，係為reevesioside B 化合物。
22. 一種強心苷化合物，係為reevesioside C 化合物。

23. 一種強心苷化合物，係為reevesioside D 化合物。
24. 一種強心苷化合物，係為reevesioside E 化合物。
25. 一種強心苷化合物，係為reevesioside F 化合物。
26. 一種強心苷化合物，係為*epi*-reevesioside F 化合物。
27. 一種強心苷化合物，係為Reevesioside G 化合物。
28. 一種強心苷化合物，係為*epi*-Reevesioside G 化合物。
29. 一種強心苷化合物，係為Reevesioside H 化合物。
30. 一種強心苷化合物，係為*epi*-Reevesioside H 化合物。
31. 一種強心苷化合物，係為Reevesioside I 化合物。
32. 一種強心苷化合物，係為*epi*-Reevesioside I 化合物。
33. 一種強心苷化合物，係為reevesioside A 化合物。
34. 一種製備臺灣梭羅木根部萃取物之方法，其係將採集之臺灣梭羅木根部，以含醇溶媒萃取，粗萃取物則經分配(partition)，運用管柱分離。

雖然本發明已以較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明之範圍，任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作各種更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

參考文獻

朱慧等人, 中草藥, 2003 年第 34 卷第 11 期第 976~978 頁
長柄梭羅細胞毒活性部位的化學成分研究。

【圖式簡單說明】

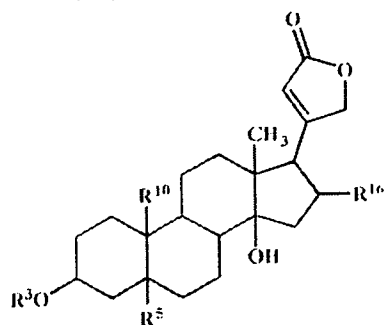
第一圖 化合物 1 之單晶 x 射線繞射分析圖

【主要元件符號說明】

無

七、申請專利範圍：

1. 一種醫藥組合物，係包含：
藥學上可接受之載體；以及
一有效量之式 (II) 化合物，



式 (II)

其中該 R^3 取代基可選自 4,6-雙脫氧-2-*O*-甲基- β -D-阿洛糖和 6-脫氧-2-*O*-甲基- β -D-阿洛糖糖基之一；

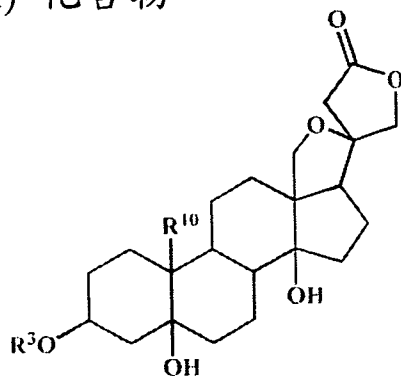
R^5 可為氫基或氫氧基；

R^{10} 可選自以下群組之一，

氫基、氫氧基、甲烷基、甲醛基或甲酸基；

R^{16} 可為氫基或乙酸基。

2. 一種醫藥組合物，係包含：
藥學上可接受之載體；以及
一有效量之式 (III) 化合物，



式 (III)

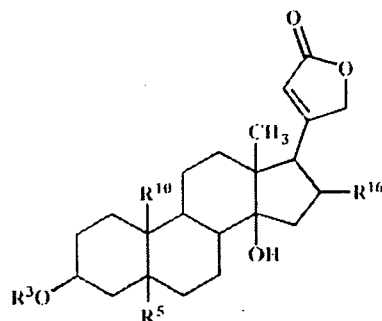
其中該 R^3 取代基可選自 4,6-雙脫氧-2-*O*-甲基- β -D-阿洛糖和 6-脫氧-2-*O*-甲基- β -D-阿洛糖糖基之一；

| | |
|-----------------|-------|
| 2014 年 9 月 22 日 | 第 二 頁 |
| 午 月 日 | |
| 補充 | |

R^{10} 可選自以下群組之一，

氫基、氫氧基、甲醛基或甲酸基。

3. 一種強心苷化合物，具有如式 (II) 所示之結構，



式 (II)

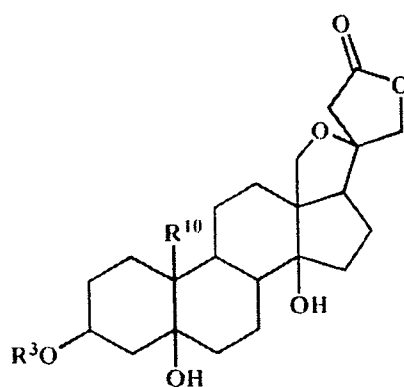
其中該 R^3 取代基可選自 4,6-雙脫氧-2-*O*-甲基- β -D-阿洛糖和 6-脫氧-2-*O*-甲基- β -D-阿洛糖糖基之一;; R^5 可為氫基或氫氧基;

R^{10} 可選自以下群組之一，

氫基、氫氧基、甲烷基、甲醛基或甲酸基;

R^{16} 可為氫基或乙烷基。

4. 一種強心苷化合物，具有如式 (III) 所示之結構，



式 (III)

其中該 R^3 取代基可選自 4,6-雙脫氧-2-*O*-甲基- β -D-阿洛糖和 6-脫氧-2-*O*-甲基- β -D-阿洛糖糖基之一;

R^{10} 可選自以下群組之一，

氫基、氫氧基、甲醛基或甲酸基。

2014 年 9 月 23 日

修正頁
補充

附件5.1

5. 一種製備臺灣梭羅木根部萃取物之方法，其係將採集之臺灣梭羅木根部經風乾後細切成薄片，於室溫下以冷卻之甲醇萃取，經揮除溶劑後，甲醇粗萃取物則以乙酸乙酯 (EtOAc) 和水分配 (partition)，分別乙酸乙酯可溶性劃分區 (fraction) 及水可溶性劃分區；其中乙酸乙酯可溶性劃分區充填於矽膠管柱，運用正己烷-乙酸乙酯梯度溶媒沖提，最後以甲醇沖提。

八、圖式：

第一圖

