



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I526422 B

(45)公告日：中華民國 105 (2016) 年 03 月 21 日

(21)申請案號：102101197

(51)Int. Cl. : *C07C323/60 (2006.01)*
A61K31/16 (2006.01)
A61P29/00 (2006.01)
A61K36/19 (2006.01)

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 01 月 11 日

C07C317/44 (2006.01)
A61P35/00 (2006.01)
A61P37/02 (2006.01)
B01D11/02 (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：吳永昌 WU, YANG CHANG (TW)；張芳榮 CHANG, FANG RONG (TW)；劉黃惠珠 LIU HUANG, ROSA (TW)；杜英齊 DU, YING CHI (TW)；涂淑芬 TU, SHU FEN (TW)；楊顥丞 YANG, JUAN CHENG (TW)

(74)代理人：蔡清福

(56)參考文獻：

WO 2012/091685A1

Tuntiwachwuttikul P, "Sulfur-containing compounds from Clinacanthus siamensis.", Chem. Pharm. Bull., Vol.51, No. 12, pp. 1423-1425, 2003.

Tuntiwachwuttikul P, "Cerebrosides and a monoacylmonogalactosylglycerol from Clinacanthus nutans.", Chem. Pharm. Bull., Vol.52, No. 1, pp. 27-32, 2004.

Kazuo Yamasaki, " Sulfur-containing glucosides from Clinacanthus nutans", Phytochemistry, Vol.48, No. 5, pp. 831-835, 1988.

審查人員：簡正芳

申請專利範圍項數：8 項 圖式數：7 共 32 頁

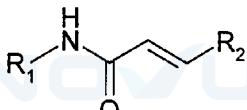
(54)名稱

毒殺癌細胞之檉藤醯胺類化合物及其製備方法

ENTADAMIDES FOR CYTOTOXICITY IN CANCER CELLS AND THE PREPARATION METHOD THEREFOR

(57)摘要

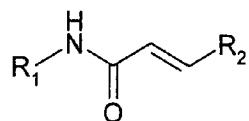
本發明涉及從青箭(也稱優遁草和沙巴蛇草)萃取的萃取物、檉藤醯胺類化合物以及式 I 化合物及其製備方法，其中該式 I 化合物之 R₁ 及 R₂ 基團如說明書所述。前述萃取物、檉藤醯胺類化合物或式 I 化合物具有毒殺癌細胞、抗發炎、調節免疫力之潛力。



(式 I)

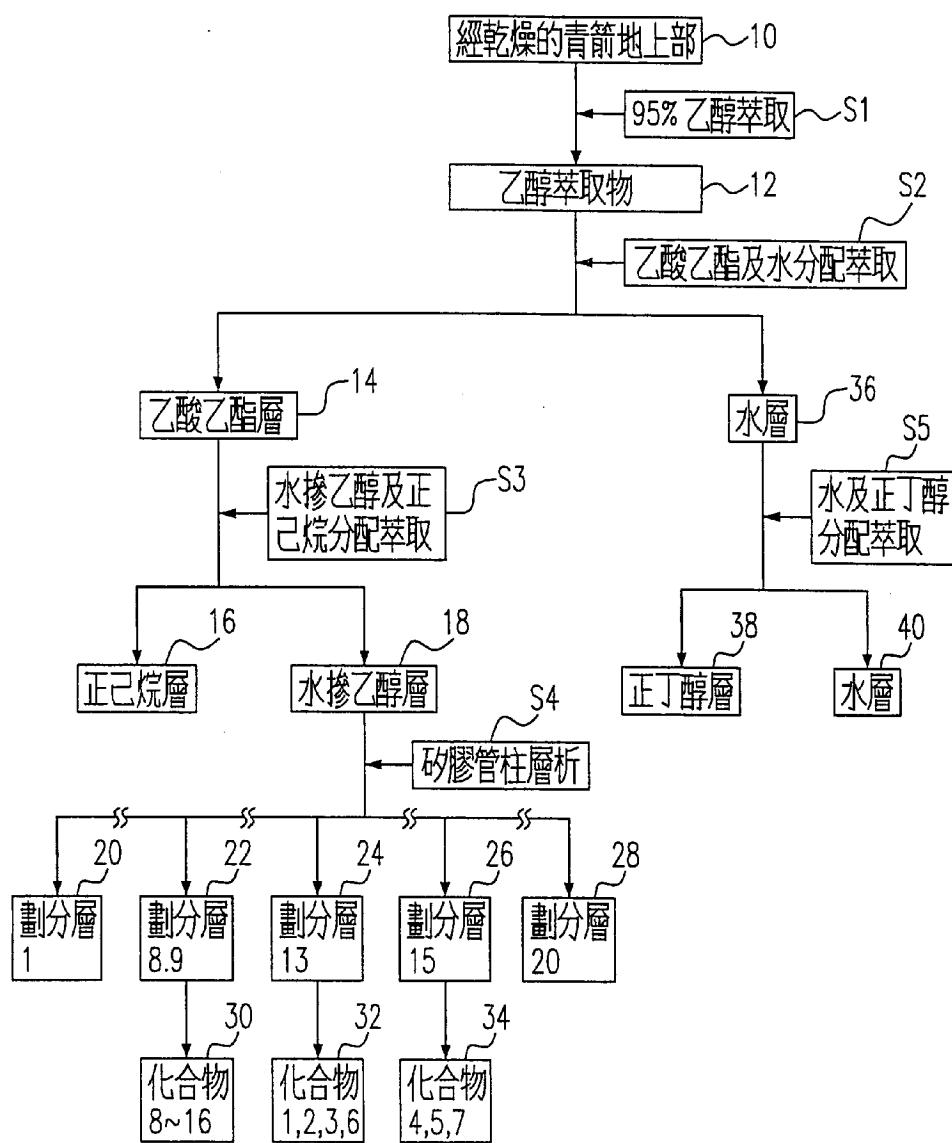
This invention relates to the extract extracted from Clinacanthus nutans, entadamides, and the compounds of formula (I), as well as the preparation method thereof, wherein the R₁ and R₂ groups of the

compounds of formula (I) are described as the specification. The aforementioned extract, entadamides or the compounds of formula (I) have the potential in antitoxicity in cancer cells, anti-inflammation and the regulations in immunity.



Formula (I)

指定代表圖：



符號簡單說明：

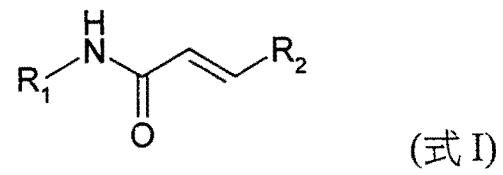
- 10 . . . 經乾燥的青箭地上部
- 12 . . . 乙醇萃取物
- 14 . . . 乙酸乙酯層
- 16 . . . 正己烷層
- 18 . . . 水摻乙醇層
- 20 . . . 劃分層 1
- 22 . . . 劃分層 8.9
- 24 . . . 劃分層 13
- 26 . . . 劃分層 15
- 28 . . . 劃分層 20
- 30 . . . 化合物 8~16
- 32 . . . 化合物 1、2、3、6
- 34 . . . 化合物 4、5、7
- 36 . . . 水層
- 38 . . . 正丁醇
- 40 . . . 水層
- S1 . . . 95% 乙醇萃取
- S2 . . . 乙酸乙酯及水分配萃取
- S3 . . . 水摻乙醇及正己烷分配萃取
- S4 . . . 矽膠管柱層析
- S5 . . . 水及正丁醇分配萃取

第 1 圖

特徵化學式：

I526422

TW I526422 B



公告本

發明摘要

※ 申請案號：102101197

※ 申請日：102.1.11

※ IPC 分類：

C07C 323/60 (2006.01)
 C07C 317/44 (2006.01)
 A61K 31/16 (2006.01)
 A61P 35/00 (2006.01)
 A61P 39/00 (2006.01)
 A61P 37/00 (2006.01)
 A61K 36/19 (2006.01)
 B01D 11/02 (2006.01)

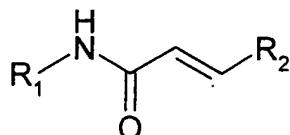
【發明名稱】(中文/英文)

毒殺癌細胞之檾藤醯胺類化合物及其製備方法

ENTADAMIDES FOR CYTOTOXICITY IN CANCER CELLS AND THE PREPARATION METHOD THEREFOR

【中文】

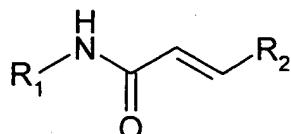
本發明涉及從青箭（也稱優遁草和沙巴蛇草）萃取的萃取物、檾藤醯胺類化合物以及式 I 化合物及其製備方法，其中該式 I 化合物之 R₁ 及 R₂ 基團如說明書所述。前述萃取物、檾藤醯胺類化合物或式 I 化合物具有毒殺癌細胞、抗發炎、調節免疫力之潛力。



(式 I)

【英文】

This invention relates to the extract extracted from *Clinacanthus nutans*, entadamides, and the compounds of formula (I), as well as the preparation method thereof, wherein the R₁ and R₂ groups of the compounds of formula (I) are described as the specification. The aforementioned extract, entadamides or the compounds of formula (I) have the potential in antitoxicity in cancer cells, anti-inflammation and the regulations in immunity.



Formula (I)

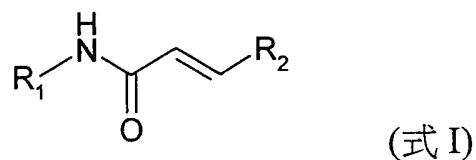
【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

10	經乾燥的青箭地上部	12	乙醇萃取物
14	乙酸乙酯層	16	正己烷層
18	水摻乙醇層	20	劃分層 1
22	劃分層 8.9	24	劃分層 13
26	劃分層 15	28	劃分層 20
30	化合物 8~16	32	化合物 1、2、3、6
34	化合物 4、5、7	36	水層
38	正丁醇	40	水層
S1	95%乙醇萃取	S2	乙酸乙酯及水分配萃取
S3	水摻乙醇及正己烷分配萃取	S4	矽膠管柱層析
S5	水及正丁醇分配萃取		

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

毒殺癌細胞之檾藤醯胺類化合物及其製備方法

ENTADAMIDES FOR CYTOTOXICITY IN CANCER CELLS AND THE
PREPARATION METHOD THEREFOR

【技術領域】

【0001】 本發明涉及從青箭 (*Clinacanthus nutans*) 萃取的檾藤醯胺類新穎化合物，式 I 化合物、包含該式 I 化合物的醫藥組合物以及使用該式 I 化合物及該醫藥組合來毒殺癌細胞之方法。

【先前技術】

【0002】 爵床科 (Acanthaceae) 植物，全世界約有 346 屬，4300 多種，主要分佈於世界溫暖地區。其中，鱷嘴花屬 (*Clinacanthus*) 植物長久以來在亞洲等地被用於傳統醫療，特別在泰國及中國大陸等地皆為常用的民間用藥，用於治療皮疹、昆蟲和蛇咬傷、單純皰疹病毒和水痘帶狀皰疹病毒。然而，該屬植物的植物化學與藥理學研究並未完善，僅青箭 (*Clinacanthus nutans*) 與泰國扭序花 (*C. siamensis*) 具活性與成分的文獻報導。

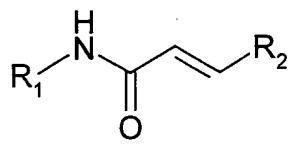
【0003】 青箭，也稱為優遁草和沙巴蛇草，係一種小灌木，原產於熱帶亞洲地區。傳統上，該植物被作為外用藥物，用於治療皮疹、昆蟲和蛇咬傷、單純皰疹病毒和水痘帶狀皰疹病毒。青箭粗萃物已被報導具抗單純皰疹病毒活性，且證實青箭粗萃物可用於治療生殖器皰疹和水痘帶狀皰疹。青箭粗萃物也具抗氧化活性，保護自由基誘導的氧化性溶血。青箭被報導所含的成分包括固醇類、葉綠素、醣原神經脂質 (glycosphingolipids)、碳水化合物、三萜類、單醯基單半乳糖苷基甘油 (monoacylmonogalactosylglycerol) 及黃酮類。

【0004】 過去青箭的醫藥研究，多依循鱷嘴花屬植物的傳統使用方法，鮮少有用於其他適應證的研究。青箭過去被報導的成分，也未能切確

代表其活性來源。本案申請人鑑於習知技術中的不足，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，能夠克服先前技術的不足，以下為本案之簡要說明。

【發明內容】

【0005】 本發明提供一種用於毒殺癌症細胞之如式 I 所示之檳榔醯胺類化合物：

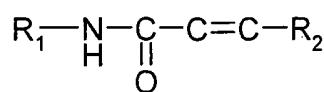


(式 I)，

其中 R_2 為 $-\text{SCH}_3$ 、 $-\text{SOCH}_3$ 或 $-\text{SOOCCH}_3$ ，當 R_2 為 $-\text{SCH}_3$ 時， R_1 為 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$ 或 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}(\text{SCH}_3)\text{HCH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})\text{H}$ ，當 R_2 為 $-\text{SOCH}_3$ 時， R_1 為 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$ 或 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}(\text{SCH}_3)\text{HCH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})\text{H}$ ，當 R_2 為 $-\text{SOOCCH}_3$ 時， R_1 為 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$ 或 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}(\text{SCH}_3)\text{HCH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})\text{H}$ 。

【0006】 此外，本發明進一步提供一種將上述檳榔醯胺類化合物製備用於抗癌、抗發炎或調節免疫力的藥物的用途。

【0007】 本發明進一步提供一種用於毒殺癌症細胞的青箭萃取物的製備方法，包括下列步驟：提供青箭的地上部；以乙醇溶液萃取該地上部，以獲得乙醇萃取物；以乙酸乙酯及水對乙醇萃取物進行第一分配萃取，以獲得乙酸乙酯層萃取物；以及以水摻乙醇及正己烷對該乙酸乙酯層萃取物進行第二分配萃取，獲得水摻乙醇層，作為該青箭萃取物。在上述製備方法中，水摻乙醇之水：乙醇體積比為 1：4，且水摻乙醇與正己烷之體積比為 1：1，亦即，水摻乙醇：乙醇：正己烷之體積比為 1：4：5。其中該青箭萃取物包含如式 I 所示的第一成分：



(式 I)，

當 R_2 為 $-\text{SCH}_3$ 時， R_1 為 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 或 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}(\text{SCH}_3)\text{HCH}_2$

$\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})\text{H}$ ，當 R_2 為 $-\text{SOCH}_3$ 時， R_1 為 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$ 或 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ，且當 R_2 為 $-\text{SOOCH}_3$ 時， R_1 為 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 。該第一成分亦為一含硫化合物，且是藉由將青箭萃取物進行一色層層析而獲得。

【0008】此外，青箭萃取物還包括第二成分，第二成分為含硫化合物、megastigmane 類化合物、苯類化合物及/或生物鹼。該含硫化合物可為反式-3-甲基亞硫醯基-2-丙烯醇。該 megastigmane 類化合物可為 3β -羥基- $5\alpha,6\alpha$ -環氧化-7-巨豆烯-9-酮、黑麥草內酯及/或 3α -羥基-4,7-巨豆二烯-9-酮。該苯類化合物可為反式-3-(4-羥苯基)-2-丙烯酸乙酯、順式-3-(4-羥苯基)-2-丙烯酸乙酯、4-羥基苯乙酮、4-羥基苯甲醛及/或 4-羥基苯甲酸。該生物鹼包括吲哚-3-甲醛。

【圖式簡單說明】

【0009】第 1 圖為本發明之青箭萃取物之製備流程圖。

【0010】第 2 圖為由劃分層 13 獲得化合物 1、2、3 及 6 之流程圖。

【0011】第 3 圖為由劃分層 15 獲得化合物 4、5 及 7 之流程圖。

【0012】第 4 圖為由劃分層 8.9 獲得化合物 8~16 之流程圖。

【0013】第 5 圖為式 I 化合物的化學反應機制合成路徑。

【0014】第 6 圖(a)為水摻乙醇層毒殺大腸癌細胞株 HCT116 活性結果。

【0015】第 6 圖(b)為水摻乙醇層毒殺前列腺癌細胞株 DU145 活性結果。

【0016】第 6 圖(c)為化合物 1 毒殺前列腺癌細胞株 DU145 活性結果。

【0017】第 7 圖為水摻乙醇層之免疫調節活性結果柱狀圖。

【實施方式】

【0018】本發明可由以下的實施例說明而得到，然而本發明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。

【0019】1. 本發明之青箭萃取物製備：

【0020】 請參閱第 1 圖，為本發明之青箭萃取物之製備流程圖。將 2.3 公斤之經乾燥的青箭 (*Clinacanthus nutans*) 地上部（方塊 10）在室溫下以 10 公升之 95% 乙醇連續抽取三次（步驟 S1），獲得的乙醇萃取物（方塊 12）經減壓濃縮後得到 283.28 公克。青箭為多年生草本植物，其乙醇萃取物為深墨綠色膏狀物，除了一般的青草味外，具有微微的有機硫化物的味道。由正相矽膠薄層色層分析法 (NP-TLC) 結果得知乙醇萃取物的成分極性由低至高分佈極廣，主量成分為高極性的醣類、低極性的葉綠素與脂肪酸。

【0021】 根據上述乙醇萃取物的物化特性，進一步再以水和乙酸乙酯對乙醇萃取物進行分配萃取（步驟 S2），分別收集到乙酸乙酯層（方塊 14）以及水層（方塊 36）。將乙酸乙酯層進行減壓濃縮，發現有機硫化物的味道存在於乙酸乙酯層。水層的外觀為棕褐色，且具有皂素易起泡的特性。

【0022】 由正相矽膠薄層色層分析法結果得知乙酸乙酯層的主量成分為葉綠素與脂肪酸，為了去除葉綠素與脂肪酸等一般常見成分，選擇符合食品法規的正己烷、乙醇和水為溶媒，進行分配萃取。經測試不同溶媒比例(正己烷：乙醇：水 = 10 : 8 : 2, 10 : 6 : 4, 10 : 4 : 6, 10 : 2 : 8)後，選擇以正己烷：乙醇：水 = 10:8:2 進行乙酸乙酯層的分配萃取（步驟 S3），得到正己烷層（方塊 16）以及水摻乙醇層（方塊 18），此分配萃取條件能將葉綠素與脂肪酸去除而集中在正己烷層，水摻乙醇層則具有強烈的有機硫化物味道。另外，以水及正丁醇對水層（方塊 36）進行分配萃取（步驟 S5），獲得到正丁醇層（方塊 38）及水層（方塊 40）。值得注意的是，熟習本技藝之人士能依照上述正己烷：乙醇：水的比例而任意地調整，但任意的正己烷：乙醇：水的比例均在本案請求的申請專利範圍之內。

【0023】 將正己烷層、水摻乙醇層、正丁醇層、水層進行毒殺癌細胞活性、抗發炎活性及免疫調節活性試驗，結果顯示水摻乙醇層皆具有較佳的活性，而與其他三層有所區別。

【0024】 2. 青箭萃取物的第一成分與第二成分製備：

【0025】 將水摻乙醇層進行減壓濃縮乾燥後得到 14.6 公克，利用本

領域的技術人士所熟習的管柱色層層析法（簡稱 C.C.法，矽膠，230~400 篩孔， $11\text{ cm} \times 29\text{ cm}$ ，步驟 S4），以梯度溶媒系統 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{MeOH}$) 進行沖提，並以正相矽膠薄層色層分析法判斷，分成 20 個劃分層，編號為劃分層 1、2、3、...、19 及 20。為了說明方便，第 1 圖僅示出劃分層 1、8.9、13、15 及 20（分別為方塊 20、22、24、26 及 28）。接著，由劃分層 8.9（方塊 22）獲得化合物 **8~16**，由劃分層 13（方塊 24）獲得化合物 **1、2、3** 及 **6**，由劃分層 15（方塊 24）獲得化合物 **4、5** 及 **7**（方塊 34）。下文將詳細說明獲得化合物 **1~16** 的實施方式。

【0026】 請參閱第 2 圖，其為由劃分層 13 獲得化合物 **1、2、3** 及 **6** 之流程圖。在第 2 圖中，利用薄層色層分析法 (TLC) 篩選出含有明顯主點且重量足夠之劃分層 13(方塊 24)進行分子篩管柱分離 (Sephadex® LH-20, $5\text{ cm} \times 55\text{ cm}$)，以 $\text{EtOAc} : \text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 1 : 1 : 6$ 作為沖提溶媒，細分為 9 個子劃分層 13-1、13-2、...及 13-9。為了說明方便，第 2 圖僅示出子劃分層 13-1、13-5 及 13-9。其中，子劃分層 13-5 經 TLC 法確認含有深黃色主點，再利用 C.C.法（矽膠，70~230 篩孔， $3\text{ cm} \times 25\text{ cm}$ ），以 $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 20 : 1$ 作為沖提溶媒，再細分得到 10 個子劃分層 13-5-1、13-5-2、...至 13-5-10。為了說明方便，第 2 圖僅示出子劃分層 13-5-1、13-5-4、13-5-8、13-5-9 及 13-5-10。其中，子劃分層 13-5-8 以及 13-5-9 經 TLC 法確認了其顯示出強紫外光吸收的無色主點，透過 NP-TLC 法確認此二個子劃分層 13-5-8 以及 13-5-9 為相同化合物。因此，將子劃分層 13-5-8 以及 13-5-9 合併並以 $20\text{ cm} \times 20\text{ cm}$ 製備型薄層層析片 (PTLC) 進行純化，以 $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 6 : 1$ 之混合溶媒作為展開液，獲得化合物 **6** (16.0 毫克)，其命名為檻藤醯胺 C (entadamide C)。

【0027】 接著，子劃分層 13-5-4 透過 TLC 法確認其含有深黃色主點，採用正相製備型薄層層析法 (NP-PTLC) 進行分離，以 $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 8 : 1$ 為展開液，將此子劃分層 13-5-4 分為 6 個子劃分層，依序編號為 13-5-4-1、13-5-4-2、13-5-4-3、...及 13-5-4-6。為了說明方便，第 2 圖僅示出子劃分層 13-5-4-1、13-5-4-2、13-5-4-3 及 13-5-4-6。其中子劃分層

13-5-4-2、13-5-4-3 具有深黃色主點。將子劃分層 13-5-4-2 及 13-5-4-3 分別以紫外線-高效能液相層析儀 (UV-HPLC, Shimadzu LC-10AT; 偵測器：SPD-M10A 二極體陣列，Waters 5C-18 250 mm×10 mm) 再純化。由子劃分層 13-5-4-2 獲得化合物 **3** (3.8 mg, 35% MeOH aq., 流速 2 mL/min, 延遲時間 $R_t = 11.5$ 分鐘)，其命名為反式-*N*-(2-(3-(2-羥乙基胺基)-1-(甲基硫代)-3-氧化丙基)乙基)-3-甲基硫丙烯胺 (*trans-N*-(2-(3-(2-hydroxyethylamino)-1-(methylthio)-3-oxopropoxy)ethyl)-3-methylthiopropenamide)。而由子劃分層 13-5-4-3 獲得化合物 **2** (6.8 mg, 40% MeOH aq., 流速 2 mL/min, 延遲時間 $R_t = 8$ 分鐘) 及化合物 **1** (99.9 mg, 40% MeOH aq., 流速 2 mL/min, 延遲時間 $R_t = 10$ 分鐘)。化合物 **2** 命名為 2-順式-檉藤醯胺 A (2-*cis*-entadamide A)，化合物 **1** 為檉藤醯胺 A (entadamide A)，為最主量成分。

【0028】 請參閱第 3 圖，其為由劃分層 15 獲得化合物 **4**、**5** 及 **7** 之流程圖。在第 3 圖中，利用分子篩管柱 (Sephadex® LH-20, 5 cm×55 cm)，以 EtOAc : CH₂Cl₂ : MeOH = 1 : 1 : 6 作為沖提溶媒，將劃分層 15 (方塊 26) 細分為 9 個子劃分層 15-1、15-2、... 及 15-9。為了說明方便，第 3 圖僅示出子劃分層 15-1、15-5 及 15-9。經 ¹H 核磁共振 (¹H-NMR) 圖譜分析選擇出重量足夠的子劃分層 15-5 進行後續分離。將子劃分層 15-5 利用 C.C. 法 (矽膠，70~230 篩孔，3 cm×25 cm)，以 CH₂Cl₂ : MeOH = 30 : 1 作為沖提溶媒，細分得到 10 個子劃分層，依序編號為 15-5-1、15-5-2、... 及 15-5-10。為了說明方便，第 3 圖僅示出子劃分層 15-5-1、15-5-4、15-5-7 及 15-5-10。

【0029】 接著，利用 NP-PTLC 法及以 CH₂Cl₂ : MeOH = 10 : 1 為展開液，將子劃分層 15-5-4 分為 5 個子劃分層，依序編號為 15-5-4-1、15-5-4-2、... 及 15-5-4-5。為了說明方便，第 3 圖僅示出子劃分層 15-5-4-1 及 15-5-4-5。其中，子劃分層 15-5-4-5 再以 UV-HPLC 純化，獲得化合物 **5** (0.8 mg, 43% MeOH aq., 流速 2 mL/min, 延遲時間 $R_t = 7.5$ 分鐘)，其命名為反式-2-(3-(甲基亞硫醯基)丙烯胺)乙酸乙酯。

(*trans*-2-(3-(methylsulfinyl)acrylamido)ethyl acetate)。

【0030】再者，利用NP-PTLC法及以 $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 15 : 1$ 為展開液，將子劃分層15-5-7分為3個子劃分層，依序編號為15-5-7-1、15-5-7-2及15-5-7-3。其中，子劃分層15-5-7-1再以UV-HPLC純化，獲得化合物7(14.2 mg, 25% MeOH aq., 流速2 mL/min, 延遲時間 $R_t = 9$ 分鐘)，其命名為反式-3-甲基亞硫醯基-2-丙烯醇(*trans*-3-methylsulfinyl-2-propenol)。子劃分層15-5-7-2再以UV-HPLC純化，獲得化合物4(2.2 mg, 15% MeOH aq., 流速2 mL/min, 延遲時間 $R_t = 11$ 分鐘)，其命名為反式-*N*-(2-羥乙基)-3-甲基磺醯基丙烯胺(*trans*-*N*-(2-hydroxyethyl)-3-methylsulfonylpropenamide)。

【0031】請參閱第4圖，其為由劃分層8.9獲得化合物8~16之流程圖。在第4圖中，利用分子篩管柱(Sephadex® LH-20, 5 cm×55 cm)，以 $\text{EtOAc} : \text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 1 : 1 : 6$ 為沖提溶媒，將劃分層8.9細分為8個子劃分層，依序編號為8.9-1、8.9-2、...及8.9-8。其中，子劃分層8.9-4、8.9-7及8.9-8在NP-TLC法之分析得到明顯的主點且重量足夠(結果未示出)。為了說明方便，第4圖僅示出子劃分層8.9-1、8.9-4、8.9-7及8.9-8。

【0032】接著，將子劃分層8.9-4利用NP-PTLC法，以 $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 25 : 1$ 為展開液，細分為11個子劃分層，依序編號為8.9-4-1、8.9-4-2、...及8.9-4-11。為了說明方便，第4圖僅示出子劃分層8.9-4-1、8.9-4-5、8.9-4-7及8.9-4-11。其中子劃分層8.9-4-5再以UV-HPLC純化，獲得化合物10(2.1 mg, 70% MeOH aq., 流速2 mL/min, 延遲時間 $R_t = 10$ 分鐘)，其命名為3 α -羥基-4,7-巨豆二烯-9-酮(3 α -hydroxy-4,7-megastigmadien-9-one)。子劃分層8.9-4-7以UV-HPLC純化，獲得化合物9(3.4 mg, 55% MeOH aq., 流速2 mL/min, 延遲時間 $R_t = 11.5$ 分鐘)及另一化合物8(4.4 mg, 55% MeOH aq., 流速2 mL/min, 延遲時間 $R_t = 12.5$ 分鐘)。化合物9命名為黑麥草內酯(loliolide)，化合物8命名為3 β -羥基-5 α ,6 α -環氧基-7-巨豆烯-9-酮(3 β -hydroxy-5 α ,6 α -epoxy-7-megastimen-9-one)。

【0033】接著，利用C.C.法(矽膠，70~230篩孔，2 cm×20 cm)，

以 $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 50 : 1$ 作為沖提溶媒，將子劃分層 8.9-7 細分得到 6 個子劃分層，依序編號為 8.9-7-1、8.9-7-2、…及 8.9-7-6。為了說明方便，第 4 圖僅示出子劃分層 8.9-7-1、8.9-7-2、8.9-7-3 及 8.9-7-6。其中，將子劃分層 8.9-7-2 以及 8.9-7-3 合併並利用 NP-PTLC 法進行分離，以 $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 15 : 1$ 為展開液，將此合併的子劃分層分為 9 個子劃分層，依序編號為 8.9-7-2-1、8.9-7-2-2、…及 8.9-7-2-9。為了說明方便，第 4 圖僅示出子劃分層 8.9-7-2-1、8.9-7-2-5、8.9-7-2-6 及 8.9-7-2-9。

【0034】 接著，子劃分層 8.9-7-2-5 再以 UV-HPLC 純化，獲得化合物 15 (0.3 mg, 60% MeOH aq., 流速 2 mL/min, 延遲時間 $R_t = 13$ 分鐘) 以及化合物 11 及 12 (2.8 mg, 60% MeOH aq., 流速 2 mL/min, 延遲時間 $R_t = 17$ 分鐘)。化合物 15 命名為 4-羥基苯甲酸 (4-hydroxybenzoic acid)，化合物 11 命名為反式-3-(4-羥基苯基)-2-丙烯酸乙酯 (ethyl-trans-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoate)、順式-3-(4-羥基苯基)-2-丙烯酸乙酯 (ethyl-cis-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoate)。

【0035】 接著，子劃分層 8.9-7-2-6 再以 UV-HPLC 純化，獲得化合物 14 (1.0 mg, 40% MeOH aq., 流速 2 mL/min, 延遲時間 $R_t = 17$ 分鐘) 及化合物 13 (1.8 mg, 40% MeOH aq., 流速 2 mL/min, 延遲時間 $R_t = 19.5$ 分鐘)。化合物 14 命名為 4-羥基苯甲醛 (4-hydroxybenzaldehyde)，化合物 13 命名為 4-羥基苯乙酮 (4-hydroxyacetophenone)。

【0036】 接著，子劃分層 8.9-8 以 $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 20 : 1$ 為展開液於 NP-TLC 上展開，經噴酸呈色後顯現一粉紅色主點，加熱後主點由粉紅色轉為桃紅色，再利用 NP-PTLC 法進行分離，獲得化合物 16，其命名為吲哚-3-甲醛 (indole-3-aldehyde)。

【0037】 綜合上述，本發明由青箭之地上部分離純化得到 16 個化合物，依骨架分類為 7 種含硫化合物 (化合物 1~7)、3 種 megastigmanes (化合物 8~10)、5 種苯類化合物 (benzenoids, 化合物 11~15) 以及 1 種生物鹼 (alkaloid, 化合物 16)。其中化合物 2~5 為新穎化合物，化合物 2~5 及 7~16 為首次由鱷嘴花屬分離而得之化合物。綜合上述資訊，含硫化合

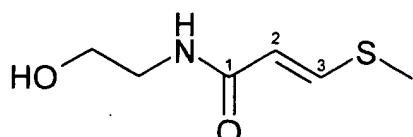
物 1~7 為青箭乙醇萃取物之有機硫化物的味道來源，且藉由毒殺癌細胞活性試驗結果確認為活性成分。

【0038】 雖然上述化合物 1~16 由水摻乙醇層以不同的層析法進行，並且由不同的劃分層、子劃分層加以分離，但熟習本技術領域之人士均可適當地調整劃分層、子劃分層之數量以及沖提溶媒或展開液之有機溶劑比例，而獲得本發明之化合物。

【0039】 3.青箭萃取物第一成分的物理化學資料：

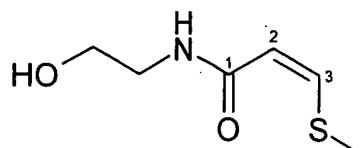
【0040】 所有分離出之化合物皆經由光譜分析及化學方法確認其結構，說明如下。

● 【0041】 一、化合物 1 (entadamide A) :



【0042】 化合物 1：淡黃色油狀物質。分子式 $C_6H_{11}NO_2S$ 。UV (MeOH) λ_{max} ($\log \varepsilon$): 227 (2.47), 269 (2.94) nm。IR (neat) ν_{max} : 3306 (-OH), 2924 (-NH), 1633 (NH-C=O), 1582, 1574 (C=C) cm^{-1} 。ESI-MS m/z 161 [$M]^+$ 。EI-MS m/z (%): 161 [$M]^+$ (3), 146 (14), 130 (2), 116 (5), 114 (53), 101 (100), 73 (31)。 1H NMR (CD₃OD, 200 MHz): δ_H 5.85 (1H, d, $J=14.8$ Hz, H-2), 7.56 (1H, d, $J=14.8$ Hz, H-3), 2.34 (3H, s, SCH₃), 3.36 (2H, dd, $J=5.9, 5.6$ Hz, NHCH₂), 3.62 (2H, dd, $J=5.9, 5.6$ Hz, CH₂OH)。 ^{13}C NMR (CD₃OD, 50 MHz): δ_C 167.5 (C-1), 116.6 (CH-2), 143.5 (CH-3), 14.3 (SCH₃), 42.9 (NHCH₂), 61.7 (CH₂OH)。

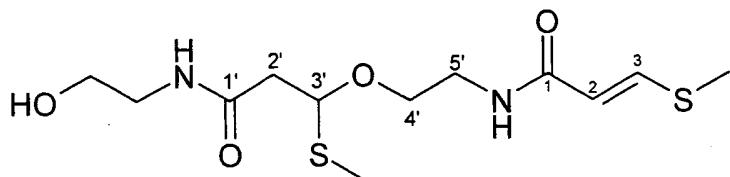
● 【0043】 二、化合物 2 (2-cis-entadamide A) :



【0044】 化合物 2：淡黃色油狀物質。分子式 $C_6H_{11}NO_2S$ 。UV (MeOH) λ_{max} ($\log \varepsilon$): 225 (1.55), 280 (2.08) nm。IR (neat) ν_{max} : 3306 (-OH), 2924 (-NH), 1644 (NH-C=O), 1583 (C=C) cm^{-1} 。ESI-MS m/z 161 [$M]^+$ 。 1H NMR (CDCl₃,

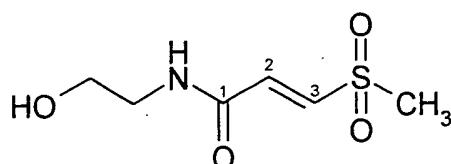
200 MHz): δ_{H} 5.80 (1H, d, $J=10.0$ Hz, **H-2**), 6.83 (1H, d, $J=10.0$ Hz, **H-3**), 2.35 (3H, s, **SCH₃**), 3.46 (2H, dd, $J=5.2$, 4.8 Hz, **NHCH₂**), 3.73 (2H, dd, $J=5.2$, 4.8 Hz, **CH₂OH**)。¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ_{C} 167.4 (**C-1**), 114.9 (**CH-2**), 147.8 (**CH-3**), 19.4 (**SCH₃**), 42.3 (**NHCH₂**), 62.4 (**CH₂OH**)。

【0045】三、化合物 **3** (*trans*-N-(2-hydroxyethyl)-3-methylsulfonylpropenamide) :



【0046】化合物 **3**: 淡黃色油狀物質。分子式 C₁₂H₂₂N₂O₄S₂Na。[α]_D^{28.8} -10.7° (c 1.0, MeOH)。UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 228 (1.37), 270 (1.70) nm。IR (neat) ν_{max} : 3296 (-OH), 2924 (-NH), 1644 (NH-C=O), 1582 (C=C) cm⁻¹。HRESI-MS *m/z* 345.0903 [M + Na]⁺。ESI-MS *m/z* 345 [M + Na]⁺。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ_{H} 5.78 (1H, d, $J=14.8$ Hz, **H-2**), 7.62 (1H, d, $J=14.8$ Hz, **H-3**), 2.33 (3H, s, **3-SCH₃**), 2.70 (1H, dd, $J=15.0$, 3.2 Hz, **H-2'**), 2.80 (1H, dd, $J=15.0$, 9.8 Hz, **H-2'**), 4.87 (1H, dd, $J=9.8$, 3.2 Hz, **H-3'**), 3.52 (1H, m, **H-4'**), 3.88 (1H, m, **H-4'**), 3.38 (1H, m, **H-5'**), 3.65 (1H, m, **H-5'**), 2.06 (3H, s, **3'-SCH₃**), 3.38 (1H, m, **NHCH₂**), 3.52 (1H, m, **NHCH₂**), 3.74 (2H, m, **CH₂OH**)。¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ_{C} 165.1 (**C-1**), 115.9 (**CH-2**), 142.6 (**CH-3**), 14.5 (**3-SCH₃**), 171.0 (**C-1'**), 43.3 (**CH₂-2'**), 81.4 (**CH-3'**), 67.5 (**CH₂-4'**), 38.9 (**CH₂-5'**), 10.2 (**3'-SCH₃**), 42.2 (**NHCH₂**), 62.1 (**CH₂OH**)。

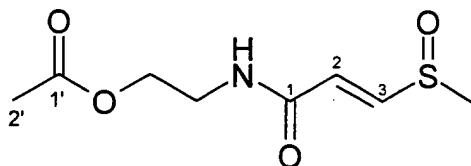
【0047】四、化合物 **4** (*trans*-N-(2-hydroxyethyl)-3-methylsulfonylpropenamide) :



【0048】化合物 **4**: 淡黃色油狀物質。分子式 C₆H₁₁NO₄SNa。IR (neat) ν_{max} : 3380 (-OH), 2927 (-NH), 1668 (NH-C=O), 1555 (C=C), 1302, 1135 (SO₂)

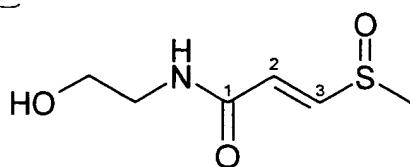
cm^{-1} 。HRESI-MS m/z 216.0308 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 。ESI-MS m/z 216 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 。 ^1H NMR (CD_3OD , 600 MHz): δ_{H} 7.01 (1H, d, $J=15.0$ Hz, **H-2**), 7.43 (1H, d, $J=15.0$ Hz, **H-3**), 3.08 (3H, s, **SOOCH₃**), 3.41 (2H, dd, $J=6.0, 5.4$ Hz, **NHCH₂**), 3.65 (2H, dd, $J=6.0, 5.4$ Hz, **CH₂OH**)。 ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz): δ_{C} 164.6 (**C-1**), 136.3 (**CH-2**), 140.1 (**CH-3**), 42.4 (**SOOCH₃**), 43.4 (**NHCH₂**), 61.2 (**CH₂OH**)。

【0049】五、化合物 **5** (*trans*-2-(3-(methylsulfinyl)acrylamido)ethyl acetate)：



【0050】化合物 **5**：白色非晶相粉末。分子式 $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{SNa}$ 。UV (MeOH) λ_{max} ($\log \varepsilon$): 247 (1.49) nm。IR (neat) ν_{max} : 2918 (-NH), 1732 (C=O), 1031 (S=O) cm^{-1} 。HRESI-MS m/z 242.0461 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 。ESI-MS m/z 242 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 。 ^1H NMR (CD_3OD , 600 MHz): δ_{H} 6.68 (1H, d, $J=15.0$ Hz, **H-2**), 7.63 (1H, d, $J=15.0$ Hz, **H-3**), 2.76 (3H, s, **SOCH₃**), 2.05 (3H, s, **H-2'**), 3.54 (2H, td, $J=6.0, 4.8$ Hz, **NHCH₂**), 4.17 (2H, t, $J=5.4$ Hz, **OCH₂**)。 ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz): δ_{C} 165.2 (**C-1**), 129.0 (**CH-2**), 147.9 (**CH-3**), 39.9 (**SOCH₃**), 172.7 (**C-1'**), 20.7 (**CH₃-2'**), 39.8 (**NHCH₂**), 63.8 (**OCH₂**)。

【0051】六、化合物 **6** (entadamide C)：

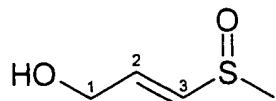


【0052】化合物 **6**：白色非晶相粉末。分子式 $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_3\text{S}$ 。UV (MeOH) λ_{max} ($\log \varepsilon$): 251 (1.56) nm。IR (neat) ν_{max} : 3521 (-OH), 2833 (-NH), 1650 (NH-C=O), 1614 (C=C), 1018 (S=O) cm^{-1} 。ESI-MS m/z 177 $[\text{M}]^+$ 。 ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz): δ_{H} 6.71 (1H, d, $J=14.8$ Hz, **H-2**), 7.62 (1H, d, $J=14.8$ Hz, **H-3**), 2.80 (3H, s, **SOCH₃**), 3.40 (2H, dd, $J=6.0, 5.6$ Hz, **NHCH₂**), 3.65 (2H, dd, $J=6.0, 5.6$ Hz, **CH₂OH**)。 ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz): δ_{C} 165.2 (**C-1**), 129.3

(CH-2), 147.5 (CH-3), 39.9 (SOCH₃), 43.3 (NHCH₂), 61.3 (CH₂OH)。

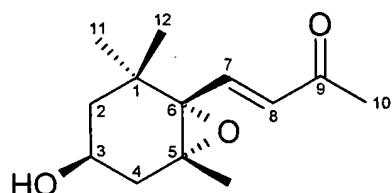
【0053】 4.青箭萃取物第二成分的物理化學資料：

【0054】 七、化合物 7 (*trans*-3-methylsulfinyl-2-propenol)：



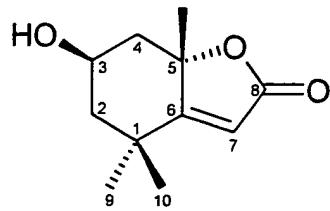
【0055】 化合物 7：淡黃色油狀物質。分子式 C₄H₈O₂S。UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 225 (1.48) nm。IR (neat) ν_{max} : 3152 (-OH), 1667 (C=C), 1000 (S=O) cm⁻¹。ESI-MS *m/z* 121 [M + H]⁺。¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ_H 4.28 (2H, dd, *J*=3.6, 2.0 Hz, H-1), 6.58 (1H, dt, *J*=15.0, 3.6 Hz, H-2), 6.69 (1H, dt, *J*= 15.0, 2.0 Hz, H-3), 2.67 (3H, s, SOCH₃)。¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz): δ_C 61.9 (CH₂-1), 141.1 (CH-2), 133.4 (CH-3), 40.5 (SOCH₃)。

【0056】 八、化合物 8 (3β-hydroxy-5α,6α-epoxy-7-megastimen-9-one)：



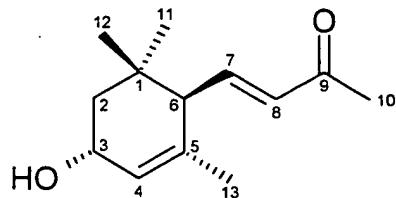
【0057】 化合物 8：淡黃色油狀物質。分子式 C₁₃H₂₀O₃。[α]^{28.8}_D -95.1° (c 1.1, MeOH)。UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 232 (2.26) nm。IR (neat) ν_{max} : 3440 (-OH), 1678 (C=O) cm⁻¹。ESI-MS *m/z* 225 [M + H]⁺。¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ_H 1.27 (1H, dd, *J*=12.0, 11.2 Hz, H-2β), 1.58 (1H, dq, *J*=12.0, 1.6 Hz, H-2α), 3.76 (1H, m, H-3), 1.66 (1H, dd, *J*=12.0, 9.2 Hz, H-4), 2.30 (1H, m, H-4), 7.17 (1H, d, *J*=15.8 Hz, H-7), 6.18 (1H, d, *J*=15.8 Hz, H-8), 2.29 (3H, s, H-10), 0.96 (3H, s, H-11), 1.18 (3H, s, H-12), 1.19 (3H, s, H-13)。¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz): δ_C 36.1 (C-1), 47.6 (CH₂-2), 64.4 (CH-3), 41.3 (CH₂-4), 68.8 (C-5), 70.8 (C-6), 145.4 (CH-7), 133.8 (CH-8), 200.2 (C-9), 27.4 (CH₃-10), 25.1 (CH₃-11), 29.8 (CH₃-12), 20.0 (CH₃-13)。

【0058】 九、化合物 9 (loliolide)：



【0059】 化合物 9：白色非晶相粉末。分子式 $C_{11}H_{16}O_3$ 。 $[\alpha]^{28.8}_D -21.1^\circ$ (c 0.9, MeOH)。UV (MeOH) λ_{max} ($\log \varepsilon$): 214 (1.84) nm。IR (neat) ν_{max} : 3435 (-OH), 1731 (C=O) cm^{-1} 。ESI-MS m/z 197 [M + H] $^+$ 。 ^1H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ_H 1.53 (1H, dd, $J=14.4, 3.6$ Hz, **H-2 α**), 1.99 (1H, m, **H-2 β**), 4.22 (1H, m, **H-3**), 2.42 (1H, dt, $J=13.6, 3.6$ Hz, **H-4**), 1.75 (1H, m, **H-4**), 5.75 (1H, s, **H-7**), 1.28 (3H, s, **H-9**), 1.47 (3H, s, **H-10**), 1.76 (3H, s, **H-11**)。 ^{13}C NMR (CD₃OD, 100 MHz): δ_C 37.2 (**C-1**), 48.0 (**CH₂-2**), 67.2 (**CH-3**), 46.4 (**CH₂-4**), 89.0 (**C-5**), 185.7 (**C-6**), 113.3 (**CH-7**), 174.4 (**C-8**), 31.0 (**CH₃-9**), 27.0 (**CH₃-10**), 27.4 (**CH₃-11**)。

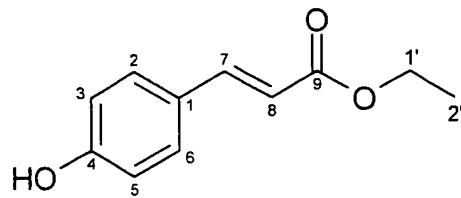
【0060】 十、化合物 10 (3 α -hydroxy-4,7-megastigmadien-9-one)：



【0061】 化合物 10：淡黃色油狀物質。分子式 $C_{13}H_{20}O_2$ 。 $[\alpha]^{28.8}_D +123.5^\circ$ (c 0.5, MeOH)。UV (MeOH) λ_{max} ($\log \varepsilon$): 227 (1.08) nm。IR (neat) ν_{max} : 1673 (C=O) cm^{-1} 。ESI-MS m/z 209 [M + H] $^+$ 。 ^1H NMR (CD₃OD, 600MHz): δ_H 1.39 (1H, dd, $J=18.0, 7.2$ Hz, **H-2 α**), 1.81 (1H, dd, $J=12.0, 7.2$ Hz, **H-2 β**), 4.22 (1H, br m, **H-3**), 5.60 (1H, br m, **H-4**), 2.59 (1H, dt, $J=12.0, 0.6$ Hz, **H-6**), 6.67 (1H, dd, $J=15.9, 12.0$ Hz, **H-7**), 6.14 (1H, dd, $J=15.9, 0.6$ Hz, **H-8**), 2.27 (3H, s, **H-10**), 1.01 (3H, s, **H-11**), 0.90 (3H, s, **H-12**), 1.63 (3H, s, **H-13**)。 ^{13}C NMR (CD₃OD, 150 MHz): δ_C 35.0 (**C-1**), 45.0 (**CH₂-2**), 65.9 (**CH-3**), 127.3 (**CH-4**), 135.9 (**C-5**), 55.6 (**CH-6**), 149.8 (**CH-7**), 134.7 (**CH-8**), 200.8 (**C-9**), 27.1 (**CH₃-10**), 29.8 (**CH₃-11**), 24.5 (**CH₃-12**), 22.8 (**CH₃-13**)。

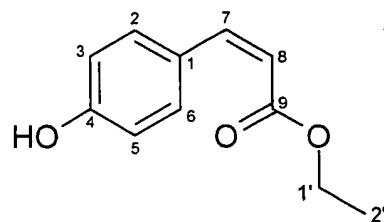
【0062】 十一、化合物 11 (ethyl-*trans*-3-(4-hydroxyphenyl)-prop-2-

enoate) :



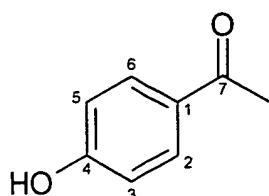
【0063】 化合物 11：白色非晶相粉末。分子式 $C_{11}H_{12}O_3$ 。UV (MeOH) λ_{\max} ($\log \varepsilon$): 227 (2.31), 311 (2.57) nm。IR (neat) ν_{\max} : 3324 (-OH), 1693 (C=O), 1605, 1515 (芳香環 C=C 鍵結) cm^{-1} 。 ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz): δ_{H} 7.46 (1H, d, $J=8.8$ Hz, **H-2 H-6**), 6.80 (1H, d, $J=8.8$ Hz, **H-3 H-5**), 7.61 (1H, d, $J=15.8$ Hz, **H-7**), 6.32 (1H, d, $J=15.8$ Hz, **H-8**), 4.19 (2H, m, **H-1'**), 1.31 (3H, t, $J=7.2, 6.8$ Hz, **H, H-2'**)。

【0064】 十二、化合物 12 (ethyl-*cis*-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoate) :



【0065】 化合物 12：白色非晶相粉末。分子式 $C_{11}H_{12}O_3$ 。UV (MeOH) λ_{\max} ($\log \varepsilon$): 227 (2.31), 311 (2.57) nm。IR (neat) ν_{\max} : 3324 (-OH), 1693 (C=O), 1605, 1515 (芳香環 C=C 鍵結) cm^{-1} 。 ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz): δ_{H} 7.61 (1H, d, $J=8.8$ Hz, **H-2 H-6**), 6.75 (1H, d, $J=8.8$ Hz, **H-3 H-5**), 6.85 (1H, d, $J=12.8$ Hz, **H-7**), 5.76 (1H, d, $J=12.8$ Hz, **H-8**), 4.19 (2H, m, **H-1'**), 1.26 (3H, t, $J=7.6, 6.8$ Hz, **H, H-2'**)。

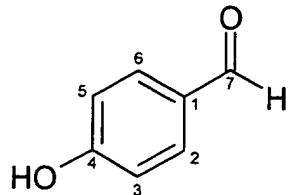
【0066】 十三、化合物 13 (4-hydroxyacetophenone) :



【0067】 化合物 13：白色非晶相粉末。分子式 $C_8H_8O_2$ 。UV (MeOH)

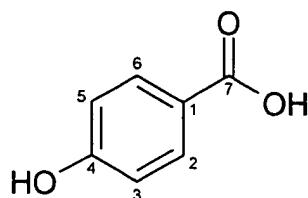
λ_{\max} ($\log \varepsilon$): 219 (2.24), 275 (2.38) nm。IR (neat) ν_{\max} : 3167 (-OH), 1661 (C=O), 1604, 1514 (芳香環 C=C 鍵結) cm^{-1} 。 ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz): δ_{H} 7.89 (1H, d, $J=8.8$ Hz, **H-2 H-6**), 6.84 (1H, d, $J=8.8$ Hz, **H-3 H-5**), 2.52 (3H, s, **7-CH₃**)。

【0068】 十四、化合物 **14** (4-hydroxybenzaldehyde) :



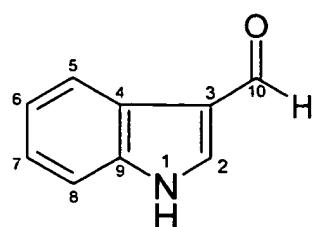
● 【0069】 化合物 **14** : 白色非晶相粉末。分子式 $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$ 。UV (MeOH) λ_{\max} ($\log \varepsilon$): 220 (2.32), 282 (2.42) nm。IR (neat) ν_{\max} : 3169 (-OH), 1676 (C=O) cm^{-1} 。 ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz): δ_{H} 7.77 (1H, d, $J=8.4$ Hz, **H-2 H-6**), 6.91 (1H, d, $J=8.4$ Hz, **H-3 H-5**), 9.76 (1H, s)。

【0070】 十五、化合物 **15** (4-hydroxybenzoic acid) :



● 【0071】 化合物 **15** : 白色非晶相粉末。分子式 $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$ 。UV (MeOH) λ_{\max} ($\log \varepsilon$): 224 (1.68), 311 (1.71) nm。IR (neat) ν_{\max} : 3440 (-OH), 1668 (C=O) cm^{-1} 。 ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz): δ_{H} 8.05 (1H, d, $J=9.2$ Hz, **H-2 H-6**), 6.70 (1H, d, $J=9.2$ Hz, **H-3 H-5**)。

【0072】 十六、化合物 **16** (indole-3-aldehyde) :



【0073】 化合物 **16** : 淡黃色油狀物質。分子式 $\text{C}_9\text{H}_7\text{NO}$ 。UV (MeOH) λ_{\max} ($\log \varepsilon$): 242 (1.98), 259 (1.92), 295 (1.95) nm。IR (neat) ν_{\max} : 2925 (-NH), 1644 (C=O) cm^{-1} 。 ^1H NMR (CD_3OD , 600 MHz): δ_{H} 8.10 (1H, s, **H-2**), 8.16 (1H,

dt, $J=7.8, 1.2$ Hz, **H-5**), 7.24 (1H, td, $J=7.8, 1.2$ Hz, **H-6**), 7.28 (1H, td, $J=7.8, 1.2$ Hz, **H-7**), 7.48 (1H, dt, $J=7.8, 1.2$ Hz, **H-8**), 9.89 (H, s)。 ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz): δ_{C} 139.7 (**CH-2**), 120.1 (**C-3**), 122.4 (**C-4**), 123.6 (**CH-5**), 125.0 (**CH-6**), 113.1 (**CH-7**), 125.7 (**CH-8**), 138.9 (**C-9**), 187.4 (**C-10**)。

【0074】 5.檍藤醯胺類化合物的化學合成製備：

【0075】 根據本發明，式 I 化合物可透過以下的反應機制合成產生，請參閱第 5 圖。當起始物丙炔酸 (propionic acid) 加入 R_2SH 後加熱至 100°C 反應 12 小時，之後再加入鹽酸，產生 $\text{R}_2\text{SCHCHCOOH}$ 順式和反式異構物。而順式異構物可藉由加入二甲苯 (xylene) 做迴流反應轉換為反式異構物。之後反式的 $\text{R}_2\text{SCHCHCOOH}$ 加入 R_1NH_2 、 HONSu 和 DCC 反應，即產生 $\text{R}_1\text{NHCOCCHCSR}_2$ 。此外， $\text{R}_1\text{NHCOCCHCSR}_2$ 可藉由方法 A~F 產生 $\text{R}_1\text{NHCOCCHSOR}_2$ 。 $\text{R}_1\text{NHCOCCHSOR}_2$ 可藉由方法 G~M 產生 $\text{R}_1\text{NHCOCCHSOOR}_2$ 。 $\text{R}_1\text{NHCOCCHSOOR}_2$ 可藉由加入 H_2O_2 和 TAPC，產生 $\text{R}_1\text{NHCOCCHSOOR}_2$ 。

【0076】 6.生物活性試驗：

【0077】 毒殺癌細胞試驗：

【0078】 將青箭乙醇萃取物、正己烷層、水摻乙醇層、正丁醇層、水層及化合物 1、化合物 6、化合物 7 加入經培養的癌細胞，以本領域技術人士所熟知的-MTT 檢測法試驗其毒殺癌細胞活性。本發明所使用的癌細胞包括前列腺癌 (DU145 細胞株)、肺癌 (A549 細胞株)、大腸癌 (HCT116 細胞株)、膀胱癌 (T24 細胞株)、肝癌 (HepG2、Hep3B 細胞株)、乳癌 (MCF-7、MDA-MB-231 細胞株)。

【0079】 請參閱第 6 圖(a)，毒殺大腸癌細胞株 HCT116 活性結果顯示，水摻乙醇層的活性最佳，給藥濃度 $200 \mu\text{g/ml}$ ，投藥三天後，癌細胞存活率在 38.70%，其他試驗樣品癌細胞存活率大於 80%。請參閱第 6 圖(b)和(c)，毒殺前列腺癌細胞株 DU145 活性結果顯示，水摻乙醇層的活性最佳，給藥濃度 $200 \mu\text{g/ml}$ ，投藥三天後，癌細胞存活率在 69.26%。此外，化合物 1 在給藥濃度 $200 \mu\text{M}$ ，投藥三天後，癌細胞存活率在 54.56%。毒殺肺癌細

103年7月18日修正(文)正替換頁

103年7月18日修正替換頁

胞株 A549 活性結果顯示，水摻乙醇層的活性最佳，給藥濃度 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，投藥三天後，癌細胞存活率在 50.43%，其他試驗樣品癌細胞存活率大於 80%。

【0080】 抗發炎活性試驗：

【0081】 將青箭乙酸乙酯層、正己烷層、水摻乙醇層及正丁醇層加入人類嗜中性白血球(Human neutrophil)，再以 fMLP (0.1 μm)/cytochalasin B (CB, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)反應，於波長 405 nm 之下，測量吸光值變化。結果顯示，水摻乙醇層能有效抑制彈性蛋白酶(elastase)釋出，給藥濃度 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，抑制彈性蛋白酶釋出的百分比為 68.33%。

表 1、分配萃取後四個分配層之抗發炎活性結果

粗萃取物	超氧自由基陰離子		彈性蛋白酶釋出	
	抑制百分比(%)		抑制百分比(%)	
水摻乙醇層	(28.52±2.55)	**	(68.33±5.49)	**
正丁醇層	(3.53±0.57)	*	(38.59±5.82)	*
乙酸乙酯層	(8.58±0.33)	**	(60.53±9.06)	*
正己烷層	(13.40±0.29)	***	(17.71±7.54)	

結果以mean ± S.E.M. (n = 2)表示。

與控制組數值相比： $* P < 0.05$ ， $** P < 0.01$ ， $*** P < 0.001$ 。

【0082】 免疫調節活性試驗：

【0083】 將青箭乙醇萃取物、正己烷層、水摻乙醇層、正丁醇層、水層加入經培養的脾臟細胞培養 24 小時後，離心 10 分鐘收集培養液，用酵素免疫分析法(ELISA)進行 IFN- γ 的含量分析。請參閱第 7 圖，水摻乙醇層在低劑量(例如 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)時可增加 IFN- γ 的含量，而在高劑量(例如 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)時可降低 IFN- γ 的含量。由於本發明之化合物係由水摻乙醇層萃取得到，表示水摻乙醇層的免疫調節活性係由本發明之化合物所調控。

【0084】 綜合上述，本發明揭示了由青箭地上部萃取得到的水摻乙醇

103年7月18日
修正
補充

103 年 7 月 18 日修正替換頁

層，以及由水摻乙醇層進一步層析得到化合物 1~16。此外，由上述實驗證實，本發明的水摻乙醇層能抑制癌細胞生長，且具有免疫系統的抗發炎活性及免疫調節活性。研究已發現免疫系統中的免疫細胞及調節分子在抑制癌細胞發展中扮演重要的調控角色 (Shiao et al., Genes Dev. 2011. 25(24): 2559-2572)，因此本發明的青箭水摻乙醇層及從中萃取的化合物能具有免疫系統的抗發炎活性及免疫調節活性，進而有效抑制癌細胞進展、生長、促進細胞凋亡，且能以化學合成方法進行製備。

【0085】 本發明實屬難能的創新發明，深具產業價值，援依法提出申請。此外，本發明可以由本領域技術人員做任何修改，但不脫離如所附權利要求所要保護的範圍。

【符號說明】

【0086】

10	經乾燥的青箭地上部	12	乙醇萃取物
14	乙酸乙酯層	16	正己烷層
18	水摻乙醇層	20	劃分層 1
22	劃分層 8.9	24	劃分層 13
26	劃分層 15	28	劃分層 20
30	化合物 8~16	32	化合物 1、2、3、6
34	化合物 4、5、7	36	水層
38	正丁醇	40	水層
S1	95%乙醇萃取	S2	乙酸乙酯及水分配萃取
S3	水摻乙醇及正己烷分配萃取	S4	矽膠管柱層析
S5	水及正丁醇分配萃取		

105年1月18日
修正
~~補充~~

公告本

105年1月18日替換頁

申請專利範圍

1. 一種用於毒殺癌症細胞、抗發炎及調節免疫力至少其中之一的青箭萃取物的製備方法，包括下列步驟：

提供青箭 (*Clinacanthus nutans*) 的一地上部；

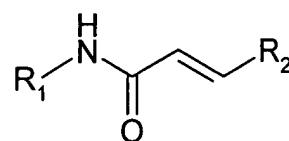
以 95% 乙醇溶液萃取該地上部，以獲得一乙醇萃取物；

以乙酸乙酯及水對該乙醇萃取物進行第一分配萃取，以獲得一乙酸乙酯層萃取物；以及

以一水摻乙醇及正己烷對該乙酸乙酯層萃取物進行第二分配萃取，獲得一水摻乙醇層，作為該青箭萃取物，其中該水摻乙醇是由乙醇及水混合而得，該正己烷及水摻乙醇中的正己烷：乙醇：水體積比為選自 10：8：2、10：6：4、10：4：6 及 10：2：8 所組成的群組其中之一。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述的製備方法，其中該水摻乙醇與該正己烷之體積比為 1：1。

3. 如申請專利範圍第 1 項所述的製備方法，其中該水摻乙醇層包含如式 I 所示之一第一成分：



式 I ,

當 R_2 為 $-\text{SCH}_3$ 時， R_1 為 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 及 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}(\text{SCH}_3)\text{HCH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})\text{H}$ 其中之一，當 R_2 為 $-\text{SOCH}_3$ 時， R_1 為 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$ 及 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 其中之一，且當 R_2 為 $-\text{SOOCH}_3$ 時， R_1 為 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ，以及該第一成分係藉由將該水摻乙醇層進行一色層層析而獲得。

4. 如申請專利範圍第 1 項所述的製備方法，其中該水摻乙醇層還包括一第二成分，該第二成分係選自由一含硫化合物、一

megastigmane 類化合物、一苯類化合物及一生物鹼所組成的群組其中之一。

5.如申請專利範圍第 4 項所述的製備方法，其中該含硫化合物為反式-3-甲基亞硫醯基-2-丙烯醇。

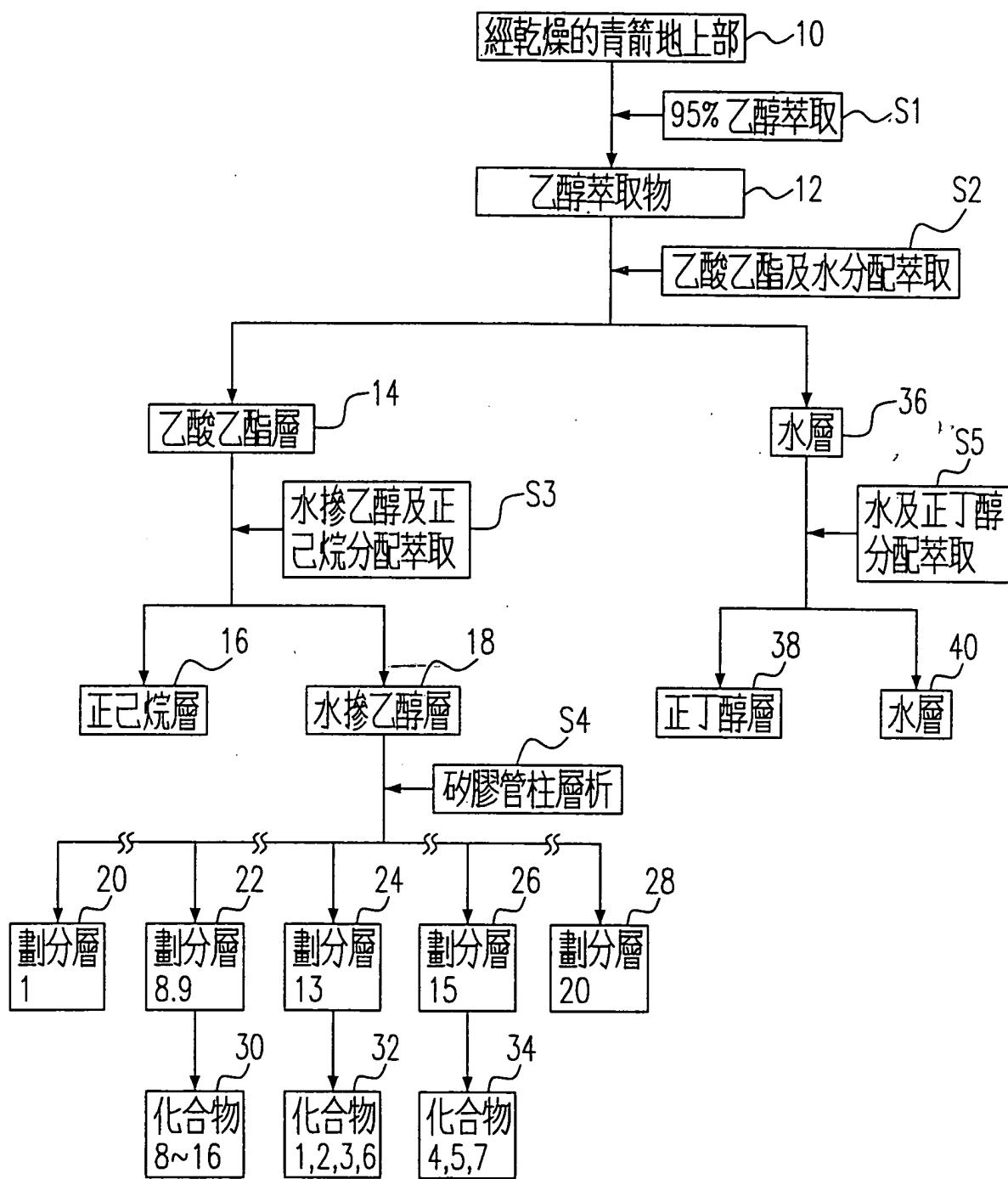
6.如申請專利範圍第 4 項所述的製備方法，其中該 megastigmane 類化合物係選自由 3β -羥基- $5\alpha,6\alpha$ -環氧化-7-巨豆烯-9-酮 (3β -hydroxy- $5\alpha,6\alpha$ -epoxy-7-megastimen-9-one)、黑麥草內酯 (loliolide) 及 3α -羥基-4,7-巨豆二烯-9-酮 (3α -hydroxy-4,7-megastigmadien-9-one) 所組成的群組至少其中之一。

7.如申請專利範圍第 4 項所述的製備方法，其中該苯類化合物係選自由反式-3-(4-羥苯基)-2-丙烯酸乙酯、順式-3-(4-羥苯基)-2-丙烯酸乙酯、4-羥基苯乙酮、4-羥基苯甲醛及 4-羥基苯甲酸所組成的群組至少其中之一。

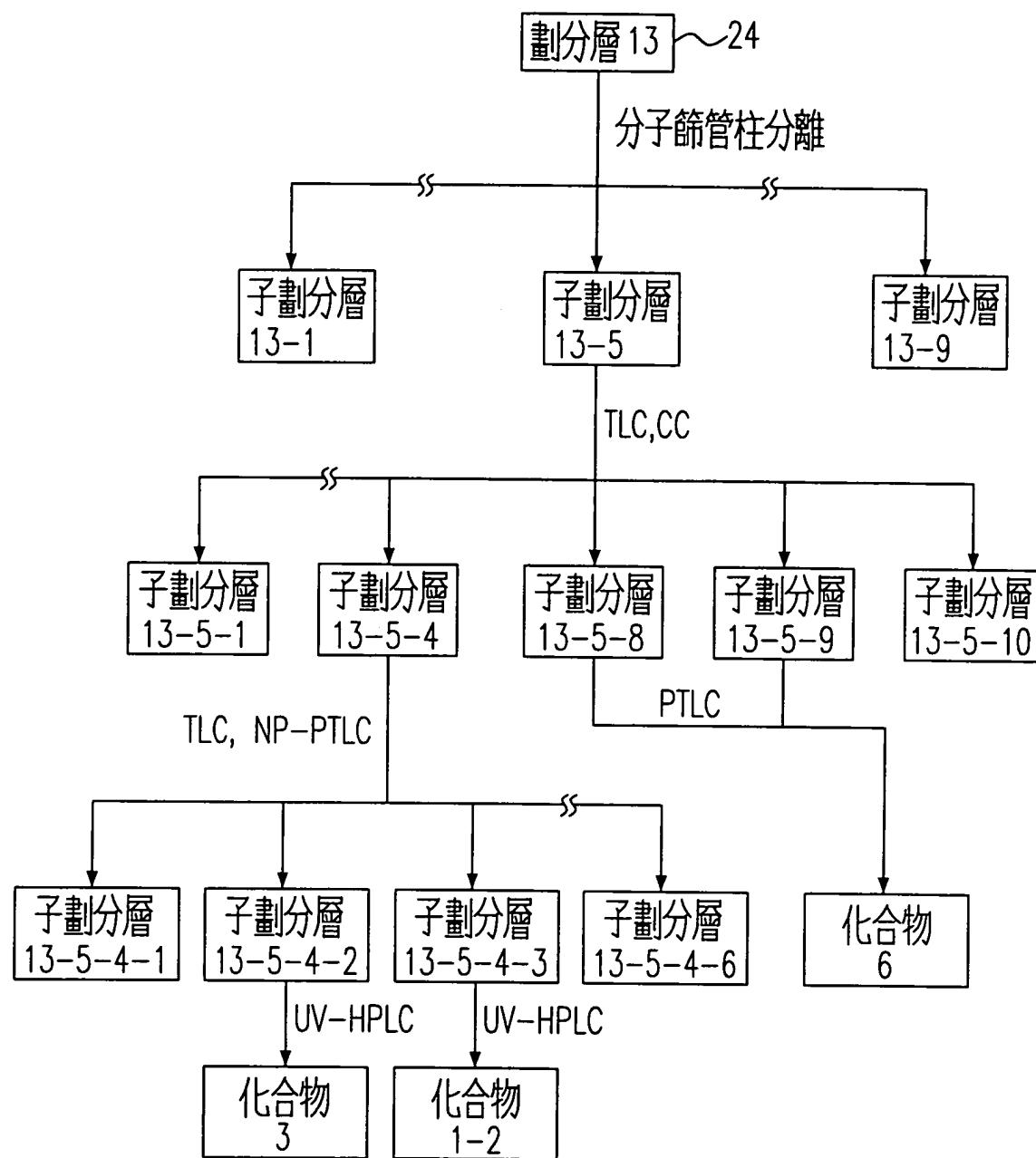
8.如申請專利範圍第 4 項所述的製備方法，其中該生物鹼包括呡哚-3-甲醛。

圖式

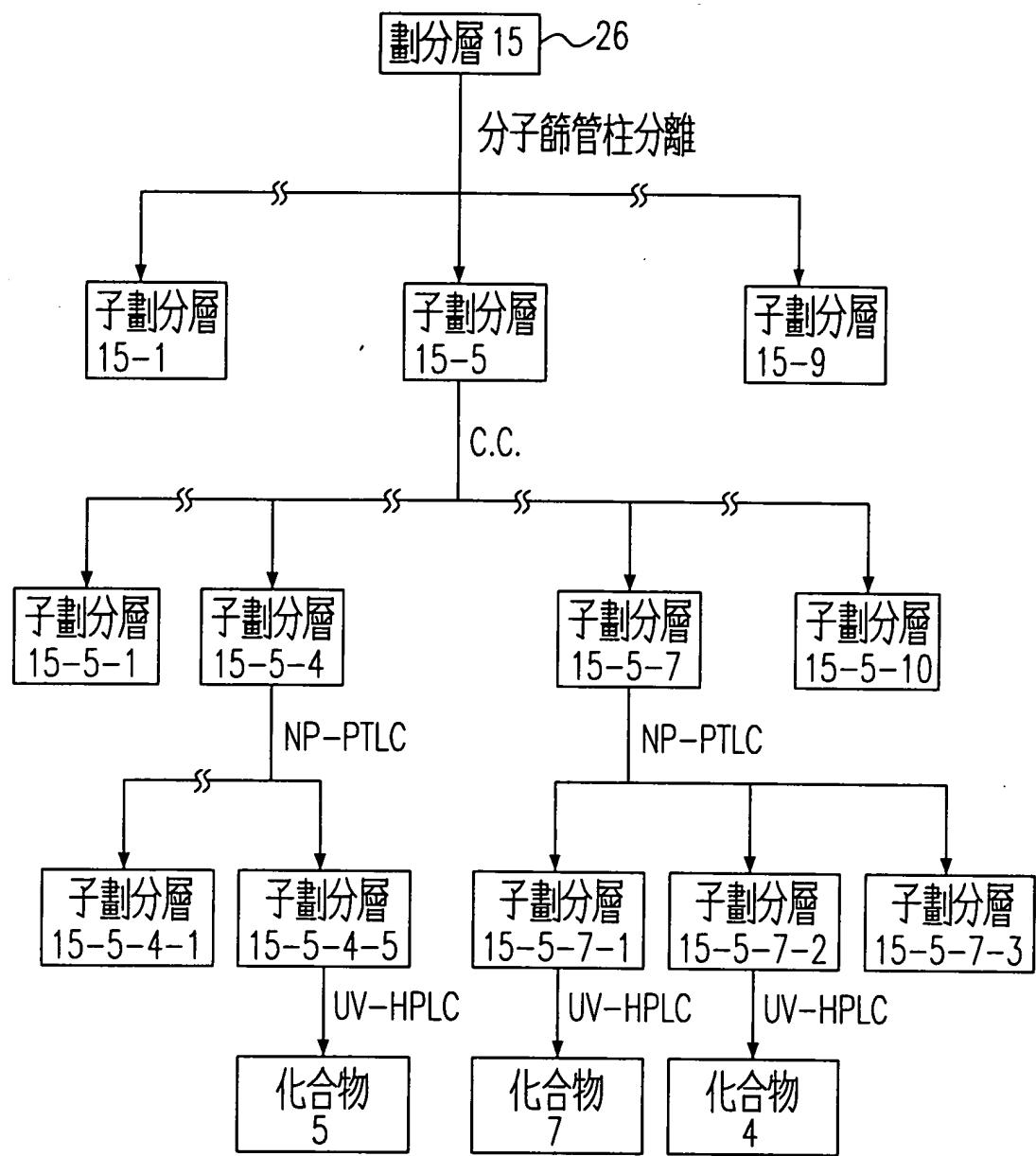
公告本



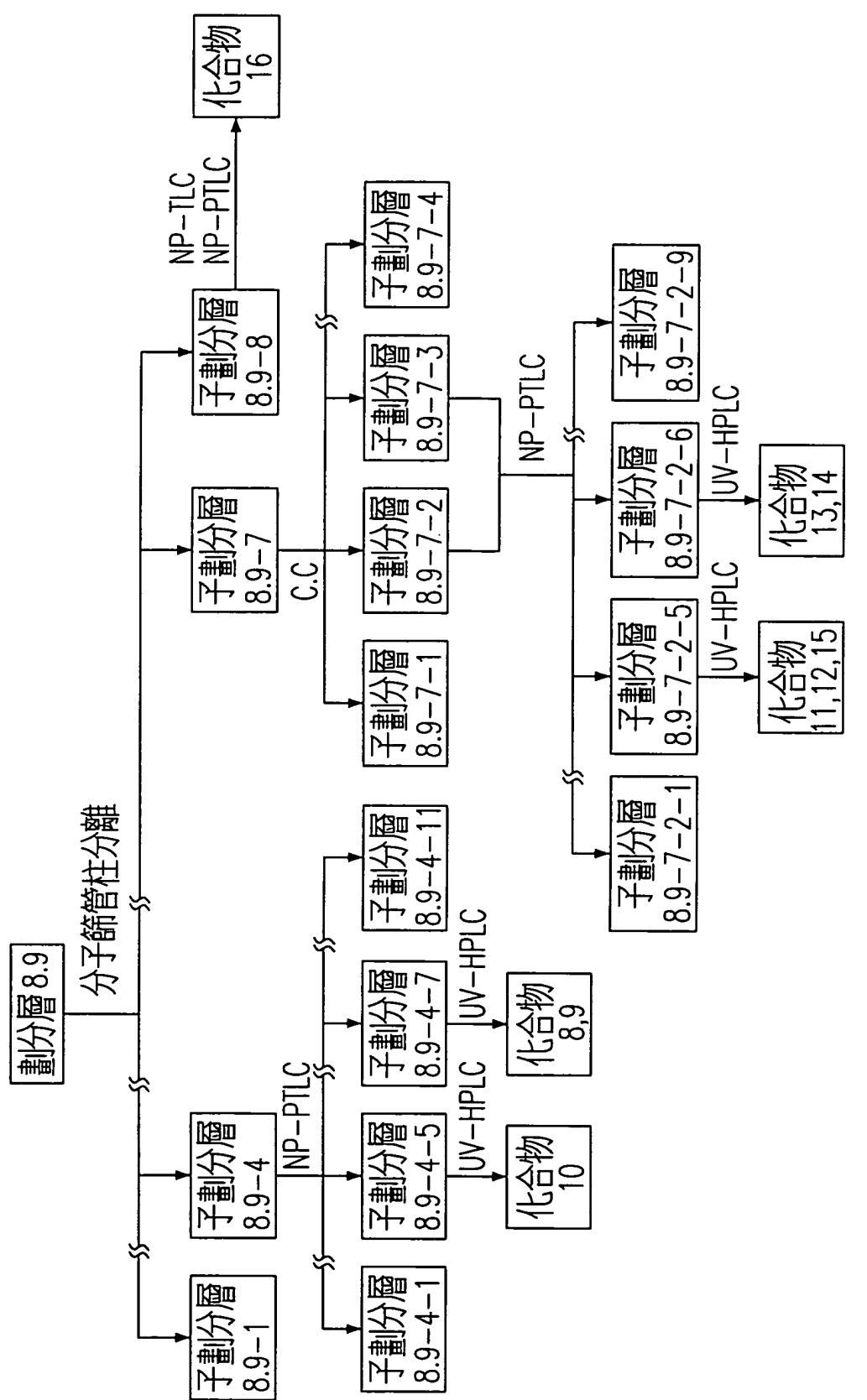
第 1 圖



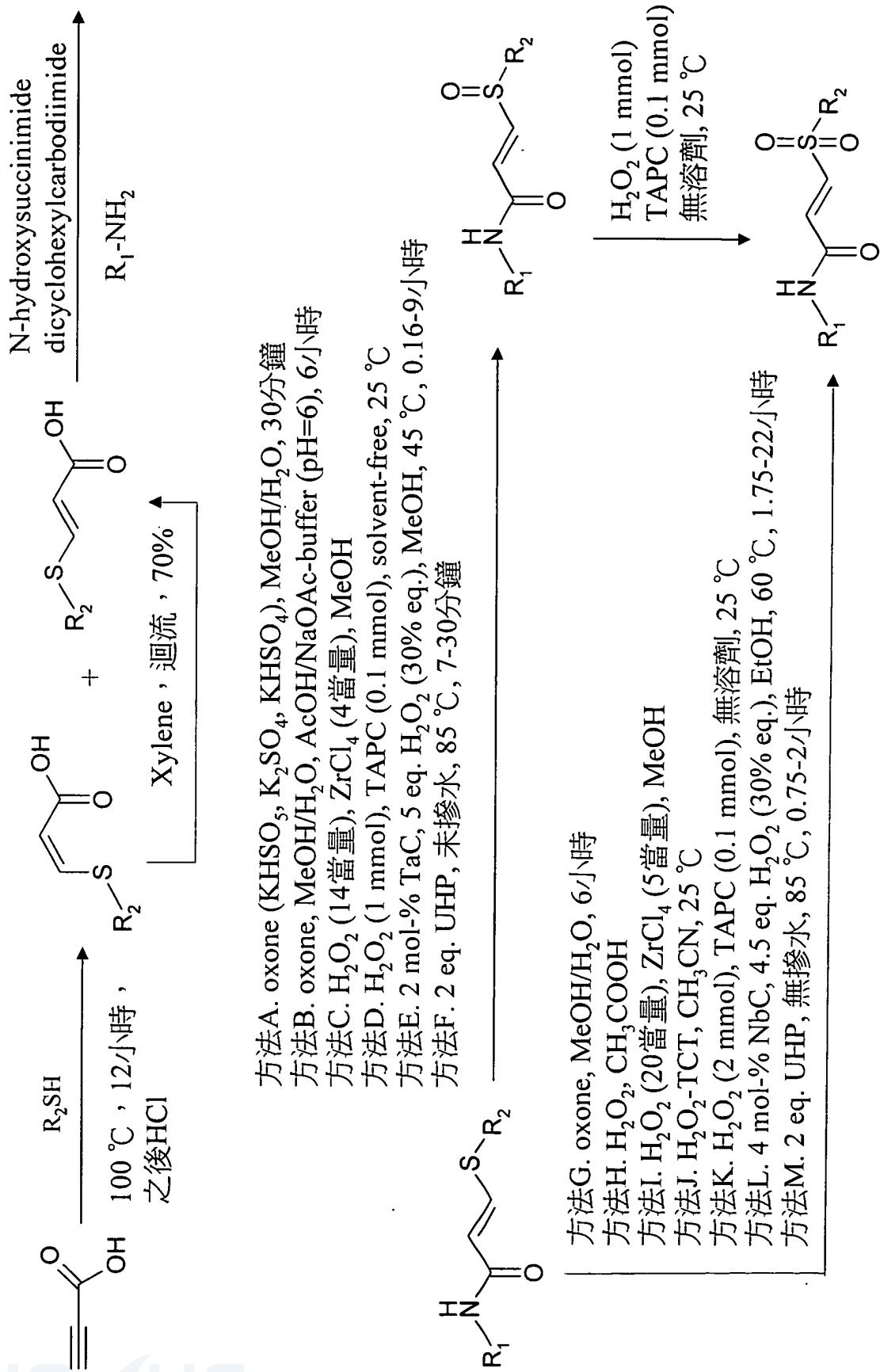
第2圖

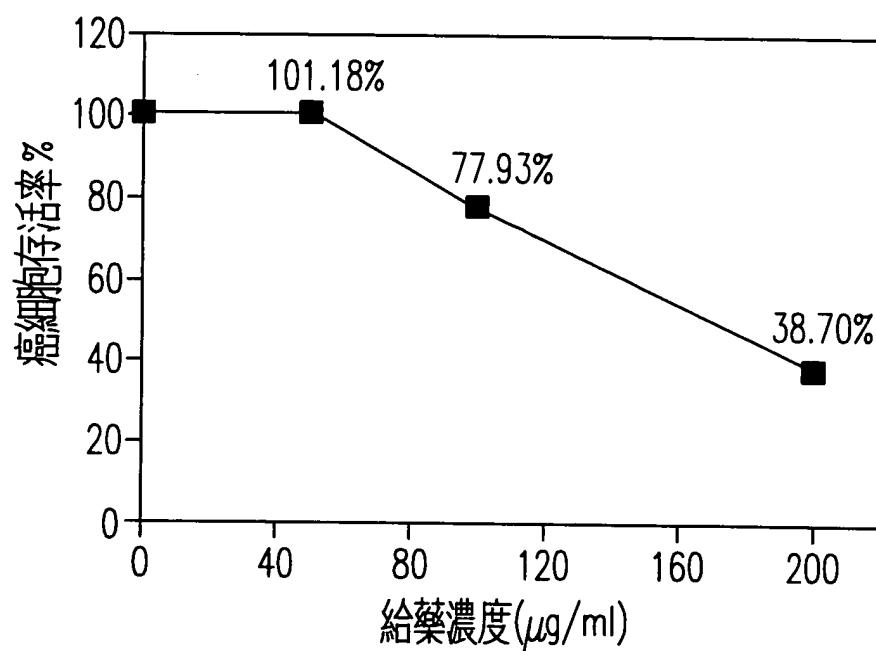


第3圖

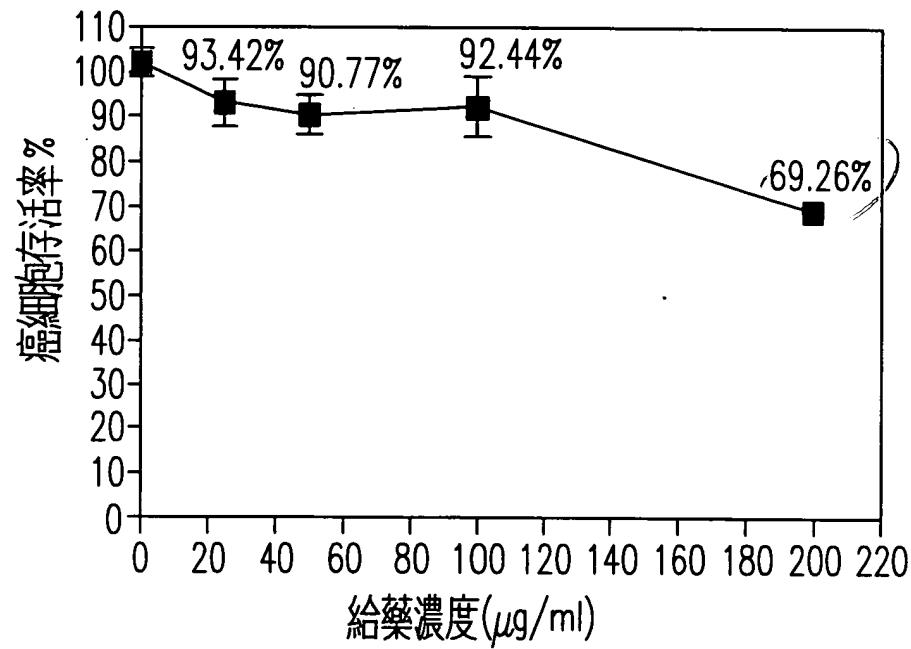


第4圖

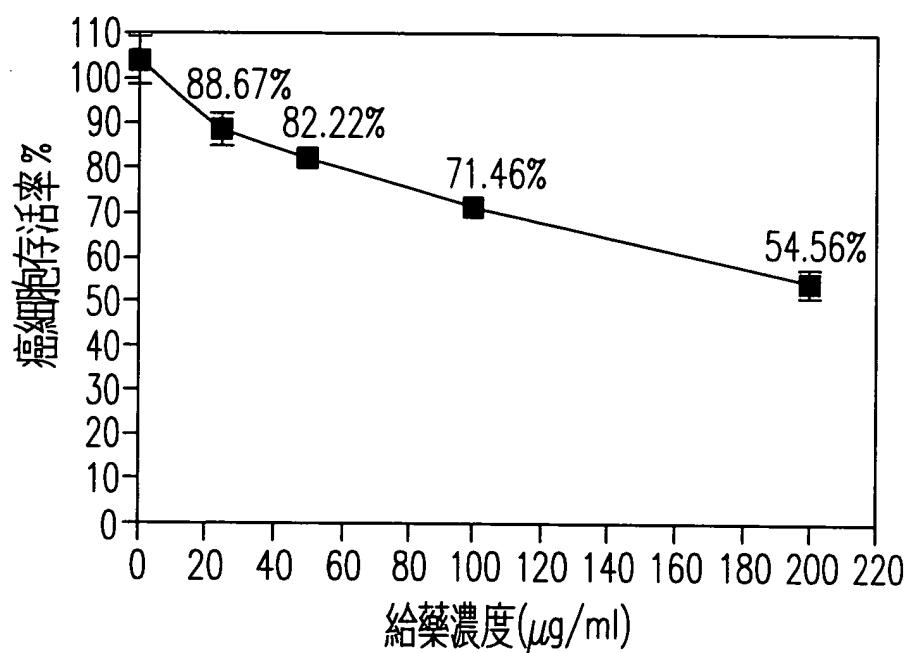




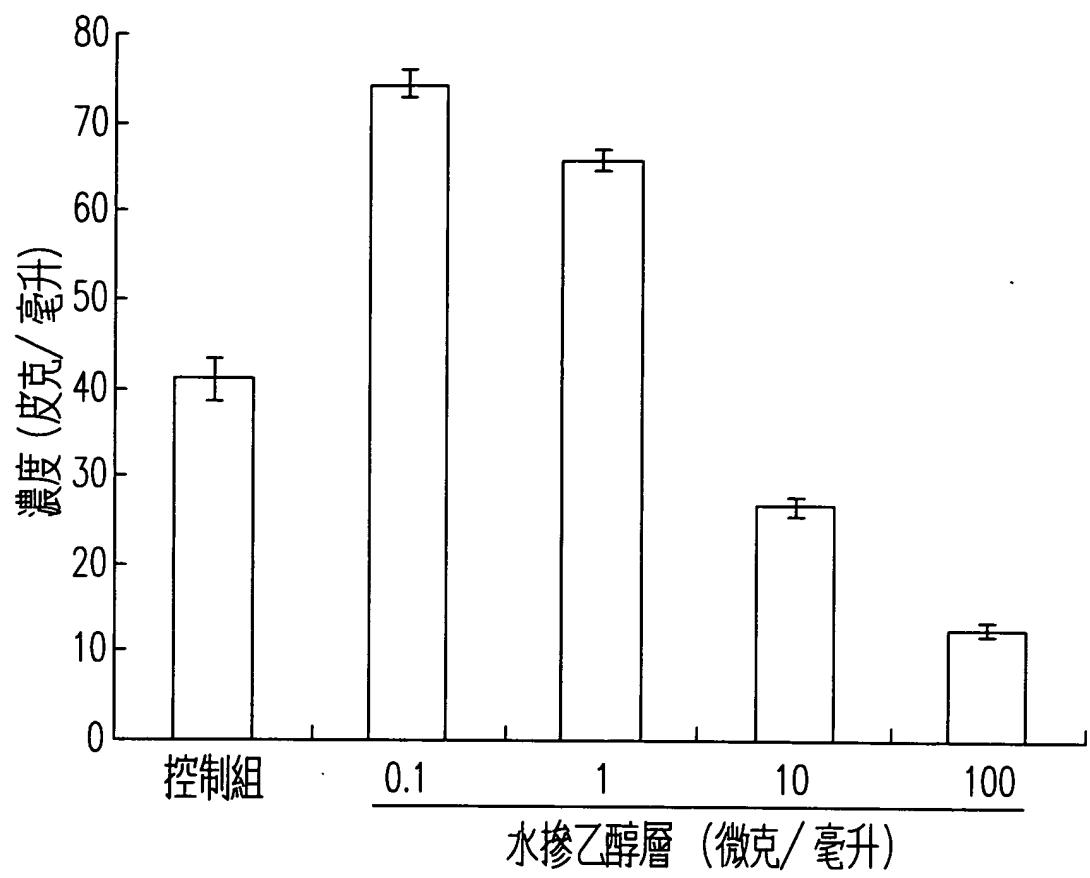
第 6 圖(a)



第 6 圖(b)



第 6 圖(c)



第 7 圖