

2022 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 030021

參展科別 化學

作品名稱 活化石海百合 *Comanthus parvicirrus* 所含化學
物質探討

得獎獎項

就讀學校 屏東縣立枋寮高級中學

指導教師 鍾旭銘、李承典

作者姓名 吳博晏、柯宗佑、陳俊文

關鍵詞 *Comanthus parvicirru*、海百合、抗發炎

作者簡介

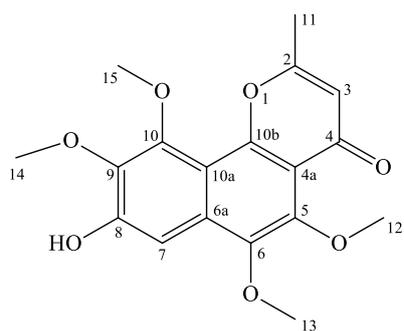


我們是來自屏東縣枋寮高中部二年級的柯宗佑、陳俊文、吳博晏，在剛升上高中因緣際會下進入了實驗室參與了研究，也把握了這樣的機會，一些之前從未接觸過的設備與實驗讓我們學到了很多化學相關的知識，也從一次次的失敗中，得到了經驗並成長，最後要感謝一年多以來一直辛苦的指導我們的教授和老師，給了我們在未來的道路上視野的增長。

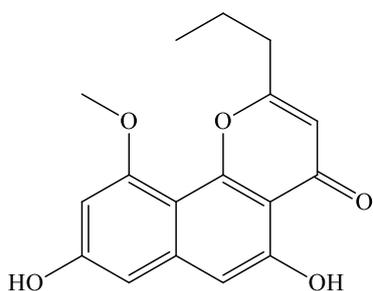
摘要

本研究針對臺灣恆春半島海域所採集的棘皮動物海百合小卷海齒花 *Comanthus parvicirrus* 進行天然物化合物之成分研究，分離獲得三個角型萘並吡喃酮類型天然化合物，包括一個新化合物 8-hydroxy-5,6,9,10-tetramethoxy-2-methyl-4*H*-benzo[*h*]chromen-4-one (1) 以及兩個已知化合物 comaparvin (2) 與 6-methoxycomaparvin-5-methyl ether (3)。上述化合物結構是由核磁共振儀、紅外線光譜儀、紫外光可見光譜儀、x-ray 光譜儀和質譜儀等數據，以及比對相關化合物的文獻來分析確認。

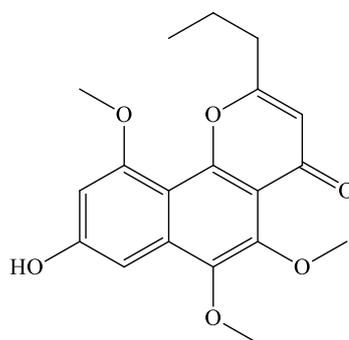
化合物 1-3 進行體外抗發炎活性測試，並且探討化合物對脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 誘發的小鼠巨噬細胞 (RAW264.7) 所產生的發炎性蛋白質一氧化氮合成酶 (iNOS) 以及第二型環氧化酶 (COX-2)。



1



2



3

Abstract

A chemical investigation was carried out on a crinoid *Comanthus parvicirrus* collected from Hengchun Peninsula in the waters of Southern Taiwan, which led to the isolation of three natural angular naphthopyrones (**1–3**), including one new compound, 8-hydroxy-5,6,9,10-tetramethoxy-2-methyl-4*H*-benzo[*h*]chromen-4-one (**1**), along with two known compounds, comaparvin (**2**) and 6-methoxycomaparvin-5-methyl ether (**3**). Their structures were assigned based on spectroscopic methods (including IR, UV, HRESIMS, X-ray, 1D- and 2D-NMR spectra), and by comparison with those previously reported in the literature.

The compounds **1–3** inhibit the expression of the pro-inflammatory iNOS (inducible nitric oxide synthase) and COX-2 (cyclooxygenase-2) proteins in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 macrophage cells were also evaluated.

壹、研究動機

海洋是一個複雜的水生生態系統，覆蓋了約 71% 的地球表面，大約是三億六千萬平方公里，最深的海溝可達一萬一千多公尺，共容納了十四億立方公里的水，海洋棲息地是陸地棲息地約 300 倍左右。因此，由地球上的生物分類來探討，目前已記錄 34 個動物門中，有 33 個動物門皆有物種生活在海洋，其中 16 動物門的物種僅生存於海洋，且其中有 15 個動物門的物種只能生活在海洋中，譬如棘皮、櫛板、腕足、毛顎與半索動物等，僅有有爪動物門物種只生存在陸域環境中，所以生物多樣性之比較可以看出海、陸域的明顯差距。

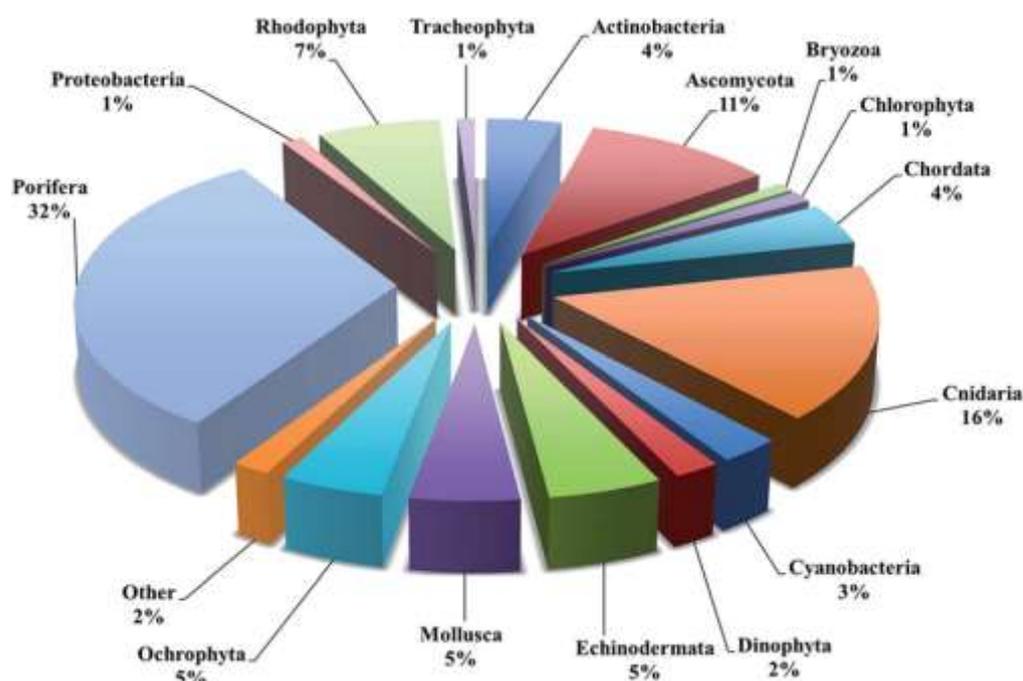
從過往研究到目前為止，針對海洋環境的研究少於陸域環境，但是考慮到兩處環境因子的光、溫度、壓力和鹽度的差異以及海洋的豐富生物多樣性，由此估計海洋生物的數量將增加來自海洋的新穎天然化合物加入抗癌臨床研究。

近年來海洋科學儀器及養殖設備開發和採樣技術提升，天然物學者發現海洋生物長期生存在高鹽、高壓、缺氧等特殊的海洋環境下，海洋生物為了適應環境或生存競爭，因此生成某些結構獨特，而具有藥理活性作用的二次代謝產物，這些活性二次代謝產物對人類多種疾病也具有明顯的療效。

臺灣海域處於南方黑潮(Kuroshio)與北方親潮(Oyashio)的交會處，而臺灣南端的恆春半島珊瑚礁生態圈屬印度-太平洋系統 (Indo-pacific System) 北端，以及與南鄰菲律賓北部、馬來半島及新幾內亞所組成的「東印度三角」(East Indies Triangle) 是全球海洋生物多樣性最高的海域，提供了豐富且多樣化的海洋生物研究材料之來源，而珊瑚礁各類生物在此區域內在種類及數量上均有相當多的分佈。而生物的多樣性則通常與化學的多樣性彼此間有著密切的關係，生物生存環境條件的不同也常使得這些海洋生物體內的天然化合物組成之成分具有其獨特性與變異性，但在臺灣地區相較對於陸地動、植物在此方面的研究已有非常豐富的成果，但有關於海洋天然化合物的研究仍有相當大的研究空間。

珊瑚礁生態研究發展方面，珊瑚礁自遠古就處於最多生物生存繁衍的環境，故歷經長時間演化發展出利用共生的方式與藻類相處共生，不但生殖內分泌系統

已相當完備，且還發展出特殊的生化代謝系統；¹一個 2017 年的研究指出，自 1971 至 2015 年間，最常被收集進行分離純化的 16 個門所分離出的化合物數量比例(圖一)。²圖中可以發現有孔動物門 (porifera) 及刺絲胞動物門 (cnidarians) 所分離出之化合物佔最大量，分別為 32%和 16%，而棘皮動物門僅佔 5%。雖然由棘皮動物中所分離出的新化合物數量不多，但早在明朝李時珍所編撰的「本草綱目」與清朝趙學敏所編撰的「本草綱目拾遺」兩本藥用書籍中，將棘皮動物編列為海洋藥用生物。因此棘皮動物的天然藥物開發前景仍是指日可待。小卷海齒花 *Comanthus parvicirrus* 屬於棘皮動物門海百合綱，因海百合綱目前存活種類不多，且經由數億年演化其特別的生理機制所產生之二次代謝物，極可能有其特殊性，寄望研究此一古老的棘皮動物，可獲得不同的研究成果。



圖一、1971-2015 年間最常被收集進行分離純化的 16 個門所分離出的化合物數量比例¹

貳、研究目的

從古自今用來治療疾病的藥物，主要是由自然環境中的微生物、真菌、植物與動物的細胞或組織中的天然化合物取得，此類化合物為生物體的二次代謝物，不是生物體繁殖與發育之生長必要營養素，但此二次代謝物可以增加生物體與其他物種的競爭與防禦，或是針對細菌、病毒與真菌入侵以及紫外線的保護；另外，生物體的二次代謝物也是協助適應光照、溫度、濕度、鹽度或是壓力等環境因子變化。因此，生物體為了生存與適應環境等因素，促進生物體其體內進行生物合成，生成高複雜度與差異性大的化合物，這些天然化合物具有形成藥物巨大潛力。海洋生態環境中，珊瑚礁環境中的生物多樣性非常高，造成生物之間的空間競爭與攝食壓力非常大；因此，生物體生成的二次代謝物具有毒性或是威懾作用較強的天然化合物。

近年來海洋科學儀器及養殖設備開發和採樣技術提升，天然物學者發現海洋生物長期生存在高鹽、高壓、缺氧等特殊的海洋環境下，海洋生物為了適應環境或生存競爭，因此生成某些結構獨特，而具有藥理活性作用的二次代謝產物，這些活性二次代謝產物對人類多種疾病也具有明顯的療效。於 1950 年代，由 Bergmann 等人從加勒比海採集的海綿 *Tethya crypta* 萃取純化出兩個核苷類 (nucleoside) 化合物 spongothymidine 和 spongouridine，分別在 1976 年及 1969 年合成衍生出 Ara-A 及 Ara-C，兩個成為抗病毒及治療白血病的有效藥物。³ 在 1976 年，Ruggirei 於 Science 首次提出『drugs from the sea』之概念，並將當時已發現具有顯著生物活性的海洋天然化合物以有系統的整理，促進早期海洋天然藥物研究發展。⁴ 所以海洋天然藥物在近數十年的發展，目前已超過 10 個已獲批准的海洋天然藥物(如表一所示)；此外，有多個海洋天然藥物已經通過初期臨床測試，目前已進入第三期的癌症臨床測試(如表二所示)。⁵

表一 2020 年 10 月前美國食品藥物管理局獲准的海洋天然藥物⁵

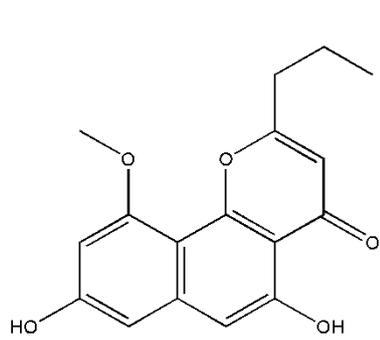
| Compound | Marine Organism | Chemical Classes | Therapeutic Use |
|-----------------------|-------------------------|----------------------|----------------------|
| Lurbinectedin | Tunicate | Alkaloid | Solid tumors |
| Trabectedin | Tunicate | Alkaloid | Solid tumors |
| Midostaurin | Tunicate/Actinobacteria | Indolocarbazole | Leukemias |
| Plitidepsin ^ | Tunicate | Peptide | Multiple myeloma |
| Belantamab mafodotin | Mollusk/Cyanobacteria | ADC/Peptide ** | Multiple myeloma |
| Enfortumab vedotin | Mollusk/Cyanobacteria | ADC/Peptide * | Solid tumors |
| Polatuzumab vedotin | Mollusk/Cyanobacteria | ADC/Peptide * | Lymphomas |
| Brentuximab vedotin | Mollusk/Cyanobacteria | ADC/Peptide * | Lymphomas |
| Eribulin mesylate | Sponge | Macrolide polyketide | Solid tumors |
| Fludarabine phosphate | Sponge | Nucleoside | Leukemias, lymphomas |
| Cytarabine | Sponge | Nucleoside | Leukemias, lymphomas |
| Nelarabine | Sponge | Nucleoside | Leukemias, lymphomas |

表二 2020 年 10 月前上在臨床測試海洋天然藥物⁵

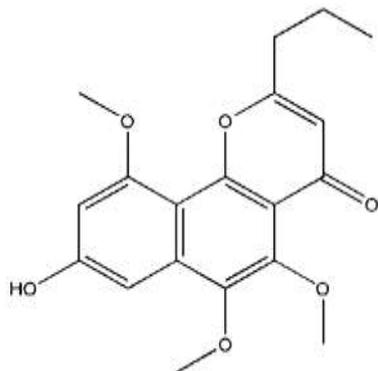
| Clinical Status | Compound | Target | Payload | Marine Organism | Therapeutic Use | FDA Orphan Drug Designation |
|-----------------|-------------------------|------------|---------|-----------------------|-------------------------|-----------------------------|
| Phase I | ALT-P7 | HER2 | MMAE | Mollusk/Cyanobacteria | Solid tumors | Gastric cancer |
| Phase I | RC88 | Mesothelin | MMAE | Mollusk/Cyanobacteria | Solid tumors | - |
| Phase I | SGN-CD228A | CD228 | MMAE | Mollusk/Cyanobacteria | Solid tumors | - |
| Phase II | CX-2029 | CD71 | MMAE | Mollusk/Cyanobacteria | Solid tumors, lymphomas | - |
| Phase II | Disitamab vedotin | HER2 | MMAE | Mollusk/Cyanobacteria | Solid tumors | Gastric cancer |
| Phase II | Enapotamab vedotin | AXL | MMAE | Mollusk/Cyanobacteria | Solid tumors | - |
| Phase II | Ladiratumab vedotin | LIV-1 A | MMAE | Mollusk/Cyanobacteria | Solid tumors | - |
| Phase II | Telisotuzumab vedotin | MET | MMAE | Mollusk/Cyanobacteria | Solid tumors | - |
| Phase II | Tisotumab vedotin | TF | MMAE | Mollusk/Cyanobacteria | Solid tumors | - |
| Phase I | FS-1502 | HER2 | MMAF | Mollusk/Cyanobacteria | Solid tumors | - |
| Phase II | AGS 16C3F | ENPP3 | MMAF | Mollusk/Cyanobacteria | Solid tumors | - |
| Phase III | Depatuxizumab mafodotin | EGFR | MMAF | Mollusk/Cyanobacteria | Solid tumors | Glioblastoma |

過往在海百合進行活性天然物研究中，獲得的角型萘並吡喃酮類型天然化合物共有 12 個，分別是由 *Comantheria briareus* 與 *Comantheria rotula* 中分離獲得化合物 2、⁶*Comanthus parvicirrus* 與 *Capillaster multiradiatus* 分離獲得化合物 2-8、⁷*Comanthus parvicirrus timorensis* 分離獲得化合物 9-11、⁸*Colobometra perspinosa* 分離獲得化合物 12⁹ 與 *Comanthus bennetti* 分離獲得化合物 13。¹⁰

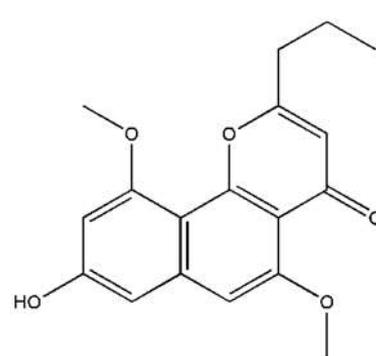
由過往研究得知，棘皮動物海百合所含天然物的研究不只具有化學研究上的價值，應該有機會找到更多新穎的化合物，並具有開發出抗癌、抗病毒或抗發炎等生物活性潛力的海洋天然物。



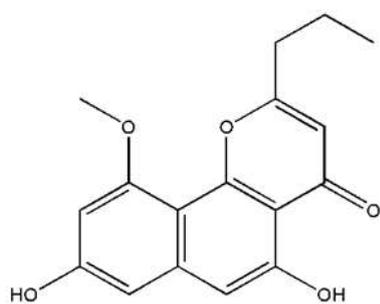
2



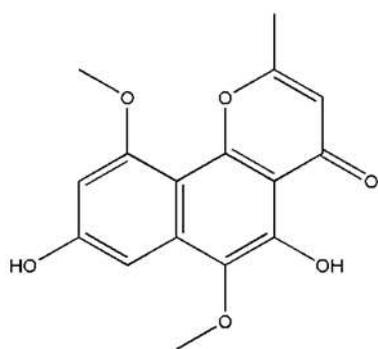
3



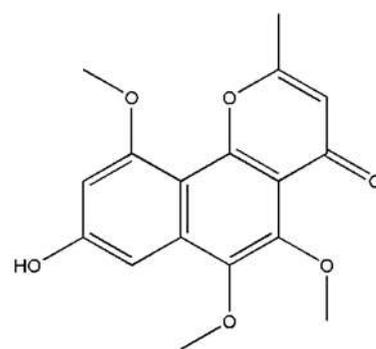
4



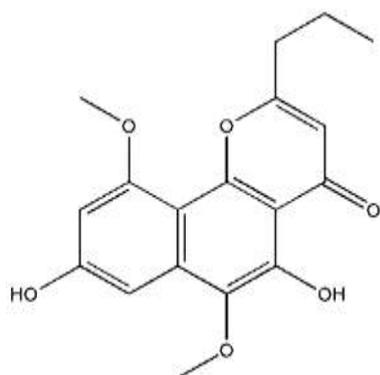
5



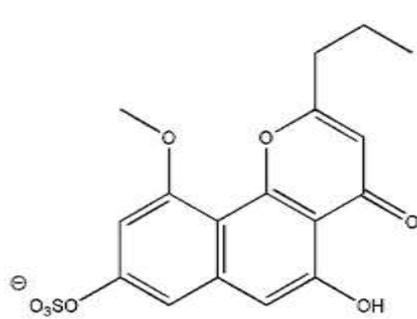
6



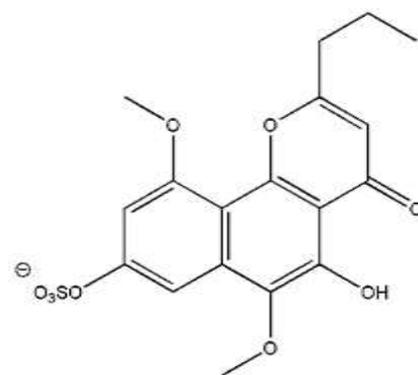
7



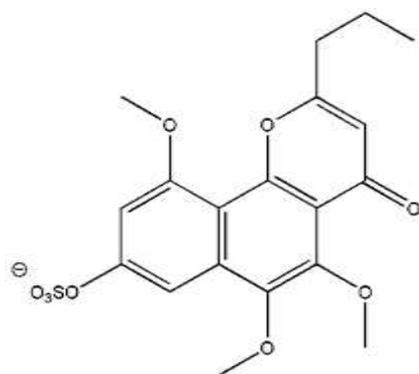
8



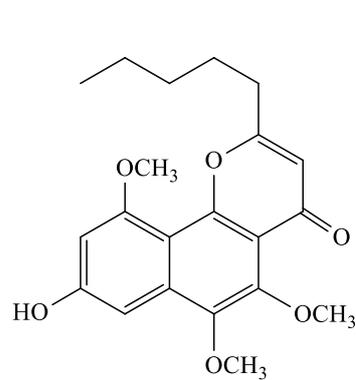
9



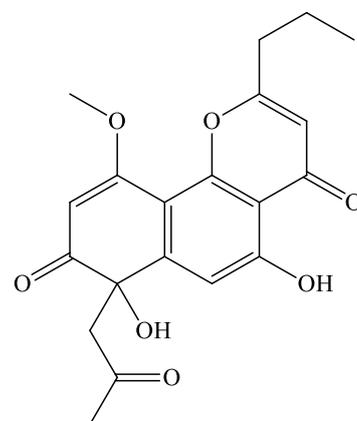
10



11



12



13

參、研究設備及器材

一、 生物樣品

在 2019 年 3 月 25 日，以水肺潛水方式至恆春半島車城鄉海口村海域進行樣品採集(圖二)，將生物樣品置於冰桶內保存運回實驗室，直接秤取濕重，保留少量部份樣品作為鑑定使用；其餘進行冷凍乾燥去除水份，再以研磨機將樣品打碎並秤重，接著準備進行萃取分離程序。



圖二、小卷海齒花 *Comanthus parvicirrus* 生態照

小卷海齒花 *Comanthus parvicirrus* 生物分類

| | |
|---------|--------------------------|
| Phylum | Echinodermata (棘皮動物門) |
| Class | Crinoidea (海百合綱) |
| Order | Comatulida (海羊齒目) |
| Family | Comasteridae (櫛羽星科) |
| Genus | <i>Comanthus</i> (海齒花屬) |
| Species | <i>parvicirrus</i> 小卷海齒花 |

二、 實驗試劑：

色層層析凝體

Merck,silica gel 60 (230-400 mesh ASTM)

薄層層析片

Si gel 60,F254,Merck

層析管柱

Ascentis® Si HPLC Column 250×21.2 mm,5 μm

VARIAN,Polans 5,C-18 250×10.0mm,5μm

TLC 顯色試劑

10%硫酸水溶液

溶劑

正己烷(n-Hexane)

TEDIA、Merck HPLC 級

乙酸乙酯(Ethyl acetate)

TEDIA、Merck HPLC 級

丙酮(Acetone)

TEDIA、Merck HPLC 級

二氯甲烷(Dichloromethane)

TEDIA、Merck HPLC 級

甲醇(Methanol)

TEDIA、Merck HPLC 級

氘代氯仿(Chloroform-d)

SIGMA-ALDRICH

三、 實驗設備：

冷凍乾燥機

LABCONCO FREEZONE 6

電子天平

METTLER TOLEDO AB104-S

減壓濃縮機

Evaporator ,Rotary System (PANCHUM SCIENTIFIC CORP.)

Process Cooling Unit (PANCHUM SCIENTIFIC CORP.)

EYELA N-100 , N-N series

分段收集器

FC-401/2000 PLUS

高效能液相層析儀

Hitachi, pump L-7100/L-7110

低溫超導核磁共振儀

Varian Mercury Plus FT-400

Varian UNITY INOVA-500 FT-NMR

紫外光燈

Model UVGL-25 Mineralight Lamp multiband UV 254/365 nm

紅外線光譜儀

Thermo Scientific Nicolet iS5 FT-IR spectrometer

旋光光度計

Jasco P-1010 digital polarimeter

質譜儀

Bruker 7 Tesla solariX FT-MS system

全功能快速純化層析系統

Ageka Technologies FS-9200S Medium pressure rapid purification system

肆、研究過程或方法

一、小卷海齒花 *Comanthus parvicirrus* 純化分離

小卷海齒花 *Comanthus parvicirrus* (3964.5 g, wet weight) 經冷凍乾燥後，獲得乾重 2571.5 g 的共肉組織，再以打碎機研磨成粉狀後，在室溫下將粉末浸泡在 EtOAc 中進行粗萃，經過多次浸泡萃取，直到溶液呈現無色透明為止。

將萃取之溶液減壓濃縮後，得到粗萃物，再以 EtOAc-H₂O (1:1) 進行分液分層(partition)，得到 EtOAc 層的粗萃物 (617.66 g)。獲得之初萃物利用 3 L 的分液漏斗進行液液萃取，將初萃物溶入 500 mL 的乙酸乙酯與 500 mL 的純水中(見圖三)，進行多次搖晃震動將兩液體混和後，靜置約 10 分鐘，取出上層液(乙酸乙酯溶液)後，再加入 500 mL 乙酸乙酯與下層液(水溶液)進行四次萃取後，將五次萃取出之上層液合併進行過濾與減壓濃縮獲得 94.74 公克之萃取物。



圖三、萃取物裝入濃縮瓶進行濃縮



圖四、有機溶劑取出分裝

將粗萃物利用管柱層析法 (column chromatography) 進行初步的分離，選用的填充劑為矽膠，以正己烷(*n*-hexane)/乙酸乙酯(ethyl acetate)/丙酮 (acetone) 的混合溶劑為沖提液進行梯度沖提(見圖五)，首先由 100% 正己烷 (*n*-hexane)，依序分別為 *n*-hexane/ethyl acetate(100:1)、(70:1)、(50:1)、(30:1)、(20:1)、(10:1)、(9:1)、(7:1)、(5:1)、(4:1)、(3:1)、(2:1)、(1:1)、(1:2)、(100% ethyl acetate)及 100% 丙酮 (acetone)，經初步分離得到 fractions 1-30。

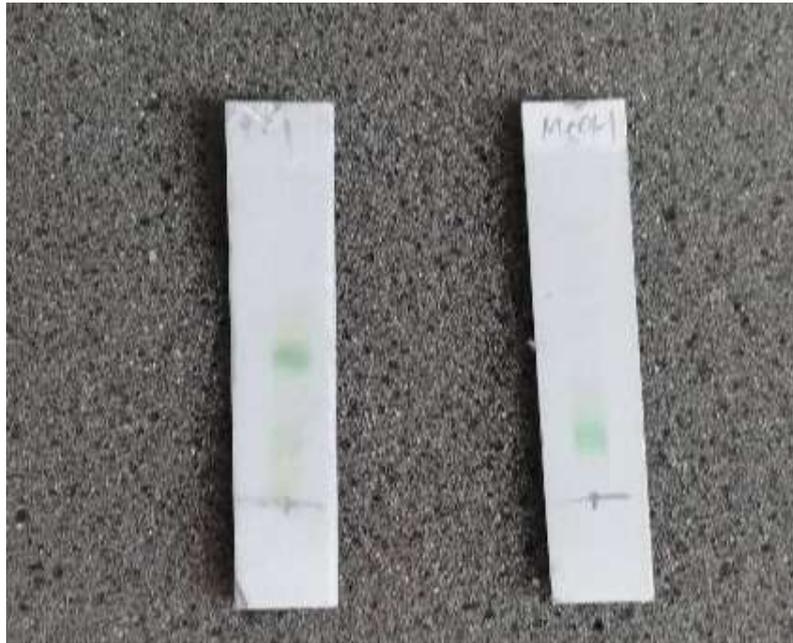
之後每一個 fractions 經過減壓濃縮後，利用核磁共振儀(NMR)來檢測(見圖六)，再依據 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz) 圖譜的訊號進一步選擇 fractions 去做進一步的分離純化。進行薄層分析(TLC)來選擇 fractions 適當的極性條件作為沖提液(見圖七)，利用全功能快速純化層析系統進行再一次的分離實驗(見圖八)。



圖五、進行管柱梯度沖提



圖六、核磁共振儀(NMR)進行化合物結構測試

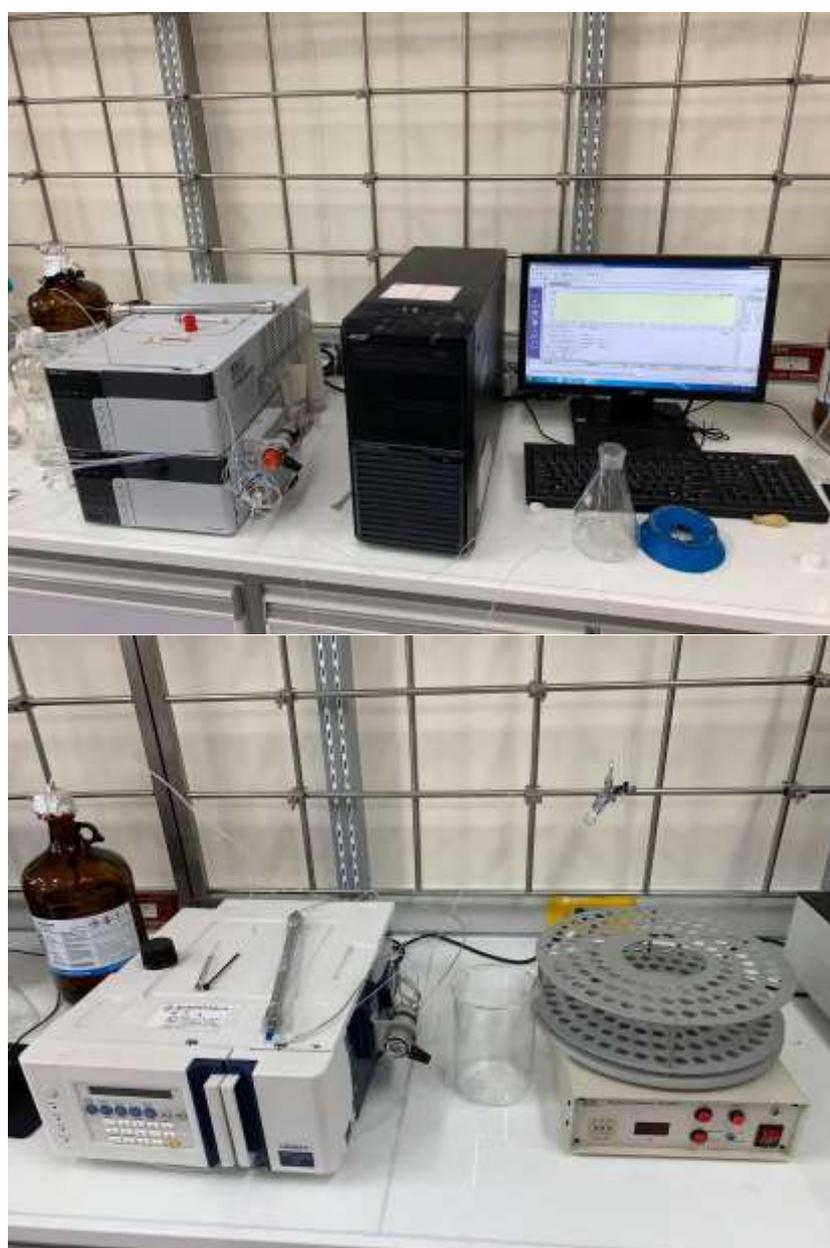


圖七、薄層分析(TLC)進行分離條件測試



圖八、全功能快速純化層析系統進行分離實驗

由全功能快速純化層析系統分離之 fractions，依據 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz) 圖譜的訊號進一步選擇 fractions 來進行薄層分析(TLC)選擇 fractions 適當的極性條件作為沖提液，並利用高效能液相層析儀(HPLC)進行純化實驗(見圖九)，分離後以試管裝填(見圖十)，在使用薄層分析將純化之化合物收集(見圖十一)；重複上述的純化步驟，直到純化出所含的天然化合物，之後進行物理性質的測定，如:NMR、旋光、紅外線光譜儀 (FT-IR)、傅立葉質譜儀 (FT-MS) 與 x-ray 光譜儀等檢測。因而鑑定出化合物的結構，最後再進行細胞毒性試驗與抗發炎等活性試驗，詳細分離流程如下(圖十二)：



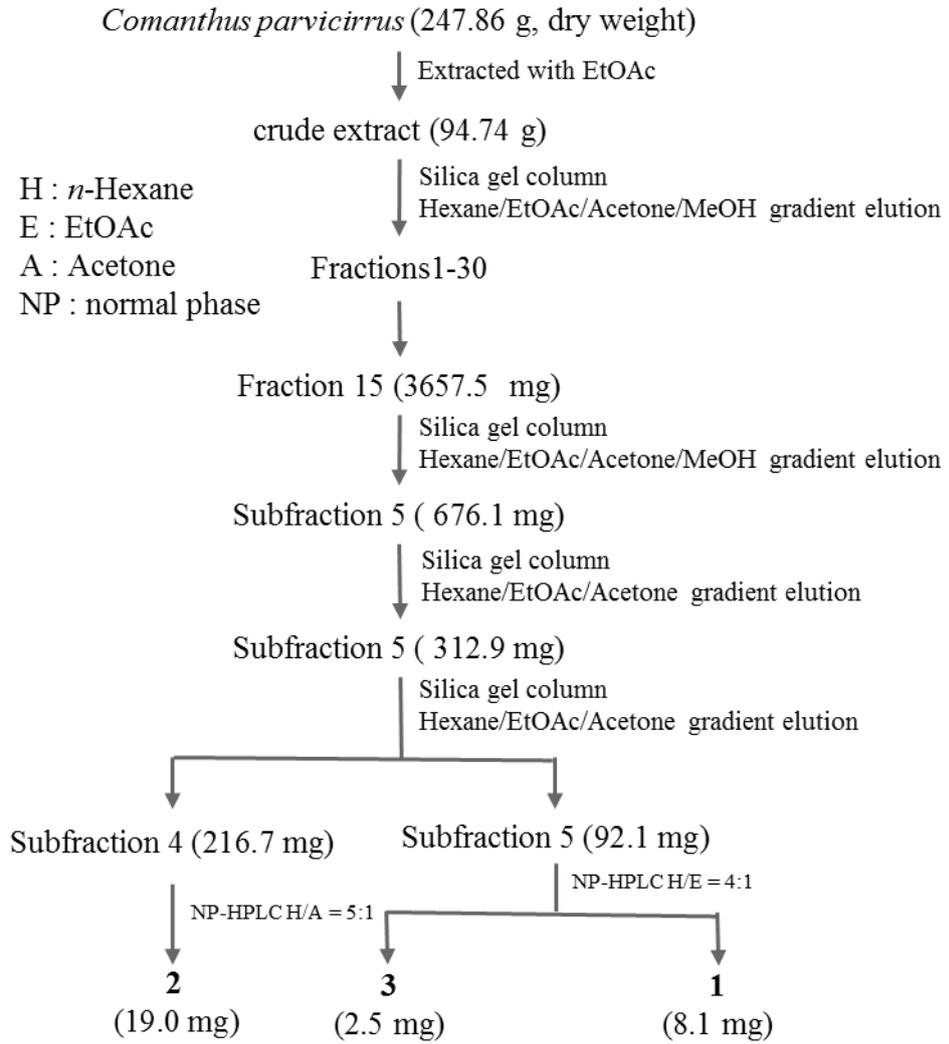
圖九、高效能液相層析儀(HPLC)進行純化分離



圖十、分離後之樣品



圖十一、利用薄層分析收集分離後之樣品



圖十二、小卷海齒花 *Comanthus parvicirrus* 之分離流程圖

二、天然化合物結構之鑑定

經由上述分離純化方式獲得天然化學物，再利用多種光譜方式進行結構鑑定，確認化合物的三維立體結構，使用下列光譜儀器進行：

- (1) 核磁共振儀 (NMR)：利用氫譜、碳譜及 DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) 等技術測試化合物中所含的 CH₃、CH₂、CH 及 C 的數目，並利用下列二維核磁共振技術，例如：COSY (Correlation Spectroscopy)、HMBC (Heteronuclear Multiple-Bond Connectivity)、NOESY (Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy) 及 HSQC (¹H-detected Heteronuclear Single-Quantum Coherence) 等相關圖譜，進行化合物結構解析。
- (2) 傅立葉轉換紅外光譜儀 (FT-IR)：確認化合物結構上的有機官能基形式。
- (3) 質譜儀 (MASS)：利用中低解析技術測定化合物分子量，高解析技術確認化合物分子式。
- (4) 紫外光/可見光光譜儀 (UV/VIS)：確認共振化合物之結構形式。
- (5) X-ray 光譜儀：確認化合物之絕對結構形式。

三、抗發炎試驗

發炎反應是指有害刺激或病原體進入生物體後所產生之一連串防禦性保護機制，屬於先天性免疫反應，體內的細胞免疫開始後，會促使作為分泌細胞的巨噬細胞 (macrophage) 分泌多種細胞激素，這些激素在免疫反應的調節扮演重要的角色。巨噬細胞所分泌的細胞激素包含 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等這些激素會進一步活化誘發型一氧化氮合酶 (iNOS) 和病態型環氧化酶 (COX-2) 等發炎蛋白的表現。由於 iNOS 不需要鈣和調鈣蛋白，所以常常一誘發就難以收拾，造成一氧化氮的過度製造，引起嚴重後果，而 COX-2 會產生大量的發炎因子 如:前列腺素，導致發炎現象的產生。

1. 實驗流程

使用從 ATCC 購買的小鼠巨噬細胞 (RAW264.7) 模擬生物體之發炎免疫反應。將細胞培養在含有 10 % 胎牛血清 (FBS) 的 DMEN 培養基內，並在培養基內加入抗生素 streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和 penicillin G (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，之後將培養基放置於 5 % CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 之恆溫培養箱內，於細胞生長到七至八分滿時利用 trypsin 進行繼代培養，經 36 小時的培養後，進行發炎試驗。把 RAW264.7 培養在 10 cm 的培養皿中，細胞數目皆控制在 3×10^6 cell/mL，在加入 lipopolysaccharide (LPS, 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$; sigma L2654) 16 小時後收集細胞。而抗發炎實驗組，則是於加入待測化合物 10 分鐘後再添加 LPS。

2. iNOS 和 COX-2 蛋白質表現量之分析 (western blot)

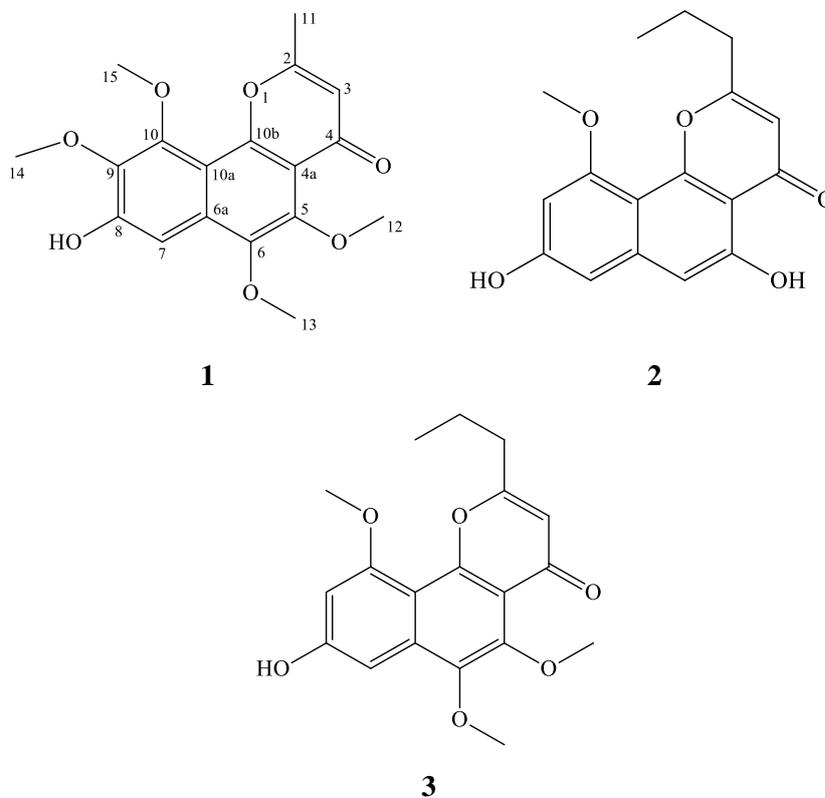
將收集的 RAW264.7 加入 200 μL lysis buffer (50 μM Tris [pH7.5]、1 % Triton X-100、150 μM NaCl、0.1 μM EGTA、0.1 μM EDTA、10 μg PMSF、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinin、0.2 μM Na_3VO_4 及 20 μM NaF)。經處理後的待測物在 4 $^\circ\text{C}$ 以 15000 g 離心 30 分鐘，收集上清液用 Bio-Rad DC protein assay kit 和 酶測讀機分析吸光值，來測待測物的蛋白質濃度。

選擇牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 作為標準品求得蛋白質標準濃度曲線，並使用此曲線計算待測物之蛋白質濃

度。在校正後曲等量的待測物蛋白質 (20 % SDS, sample buffer, 10 % glycerol, 10 % 2-mercaptoethanol, 0.1 % bromophenol blue 和 50 μ M Tris) 置於 10 % 的 SDS-polyacrylamide 膠體進行電泳分離, 隨後將膠體放置於 PVDF 膜 (0.45 μ m pore size, Immobilon-P, Millipore, Bedford, MA, USA), 再用含 5 % 脫脂奶粉的 TTBS (Tris-HCL 20mM、pH 7.4、NaCl 137 mM 和 Tween 20) 於室溫下 1 小時或是以 4 $^{\circ}$ C 隔夜進行中止反應, 與一級抗體 iNOS 或 COX-2 在室溫下處理 3 小時後以 TTBS 清洗 3 次, 再與 HRP-conjugated 之 anti-rabbit IgG 抗體 (1 : 2000) 在室溫下反應 3 小時後以 TTBS 清洗 3 次, 最後使用含有 3,3-diaminobenzodine (DAB) 的顯色液 (10 mL, 150 mM, NaCl, 5 mM Tris-HCl, pH 7.4, 含 4 μ L 130 % H_2O_2 (3.52 mM) 及 40 μ L DAB 25 mg/mL (0.277 mM)) 或者以 ECL 呈色, 並用 β -actin 作為 internal control。^{11,12,13}

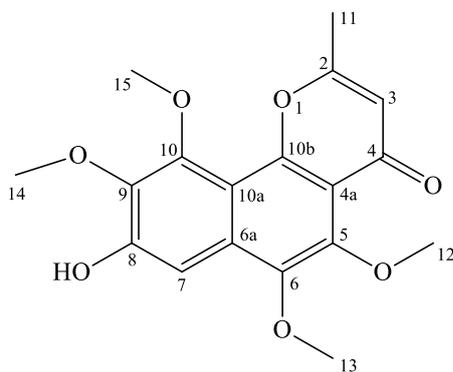
伍、研究結果及討論

本實驗針對臺灣恆春半島車城鄉海口村海域所採集的小卷海齒花 *Comanthus parvicirrus* 進行天然物化學成分研究，分離獲得三個萘並吡喃酮類型天然化合物，包括一個新化合物 8-hydroxy-5,6,9,10-tetramethoxy-2-methyl-4*H*-benzo[*h*]chromen-4-one (1) 以及兩個已知化合物 comaparvin (2) 與 6-methoxycomaparvin-5-methyl ether (3)，其化學結構與結構解析如下：



(一)、8-Hydroxy-5,6,9,10-tetramethoxy-2-methyl-4*H*-benzo[*h*]chromen-4-one (**1**)

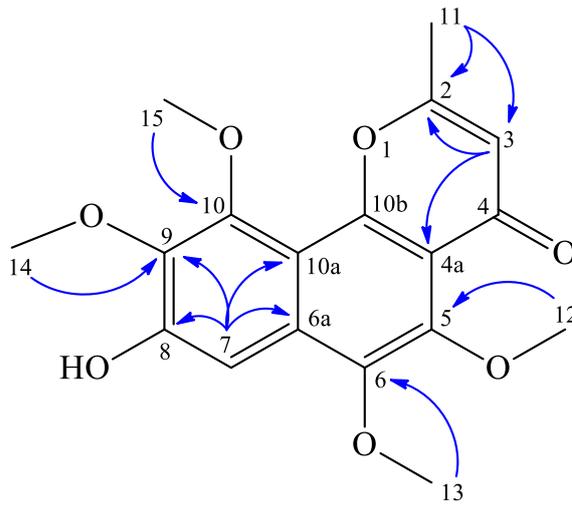
化合物構造之解析



化合物 **1** 為黃色晶體(8.1 mg)，以正相 HPLC 分離之沖提溶液為 *n*-hexane/Ethyl acetate (4:1)。IR 光譜(圖十六)可觀察到 3456 cm^{-1} (hydroxyl group)、 1715 cm^{-1} (α,β -unsaturated carbonyl group) 的吸收，其低解析 ESIMS 圖譜(圖十七)的主要片段為 369 [M + Na]^+ ，高解析 HRESIMS (圖十八):實驗值 $m/z\ 369.09466\text{ [M+Na]}^+$ (計算值 $m/z\ 369.09447\text{ [M+Na]}^+$)，定出其分子式為 $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_7$ ，具有 10 個不飽和度。藉由 ^{13}C -NMR (圖二十與表二) 和 DEPT (圖二十一) 圖譜得知化合物 **1** 有 18 個碳，其中包含 5 個甲基 (methyl 包含 4 個帶氧甲基)、2 個次甲基(methine)及 11 個四級碳(quaternary carbon 包含 1 個 ketone group $\delta_c\ 177.6$)，藉由以上資訊可推測化合物 **1** 為萘並吡喃酮類。

化合物 **1** 的結構主要是藉由 2D NMR 圖譜的解析來建立。經由 HMQC (圖二十二)及 HMBC(圖二十三)的輔助，由以下關聯訊號: $\text{H}_3\text{-11/C-2}$ 和 C-3 ，以及 $\text{H}_3\text{-12/C-5}$ 、 $\text{H}_3\text{-13/C-6}$ 、 $\text{H}_3\text{-14/C-9}$ 與 $\text{H}_3\text{-15/C-10}$ 確定甲基連接萘並吡喃酮骨架位置；另外， H-3/C-2 和 C-4a ， H-7/C-6a 、 C-8 、 C-9 和 C-10a 確定次甲基連接萘並吡喃酮骨架位置。再利用 UV 光譜數據確認線型或角型萘並吡喃酮類化合物，化合物 **1** 之 UV 吸收值為 250、288 與 354 nm，確認此結構為角型萘並吡喃酮類化合物。

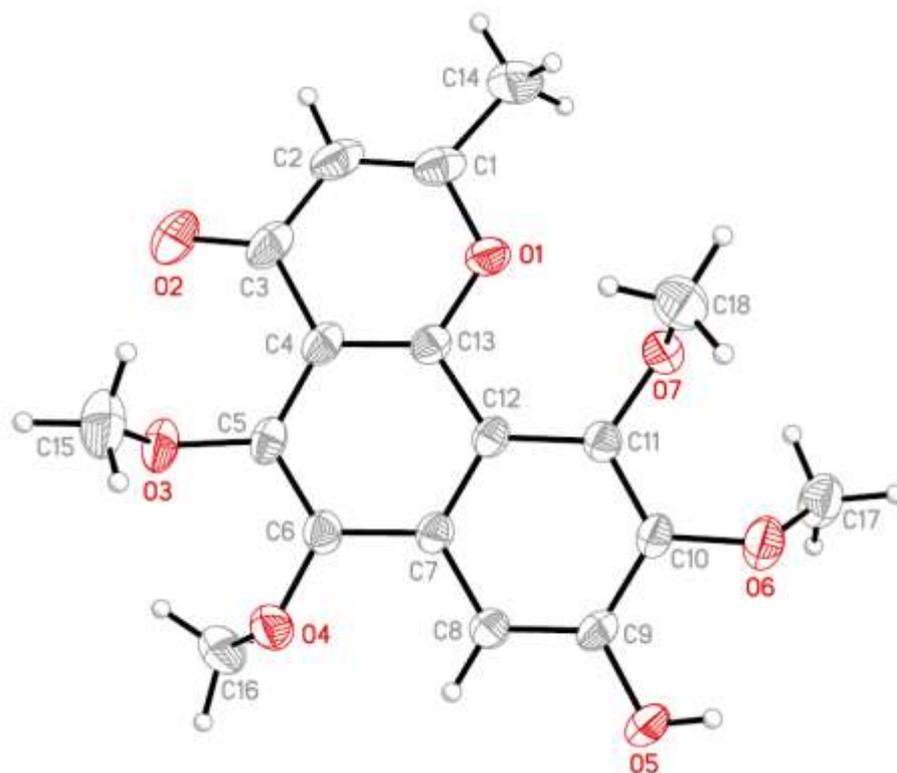
本實驗利用乙酸乙酯成功養出化合物單晶晶體(圖十四)，再將此晶體進行 X-ray 繞射實驗(圖十五)，確定此化合物結構，經文獻比對確定為新化合物，並命名為 8-Hydroxy-5,6,9,10-tetramethoxy-2-methyl-4*H*-benzo[*h*]chromen-4-one。



圖十三、化合物 1 之 HMBC 連接圖



圖十四、化合物 1 之晶體



圖十五、化合物 1 之 X-ray 結構解析圖

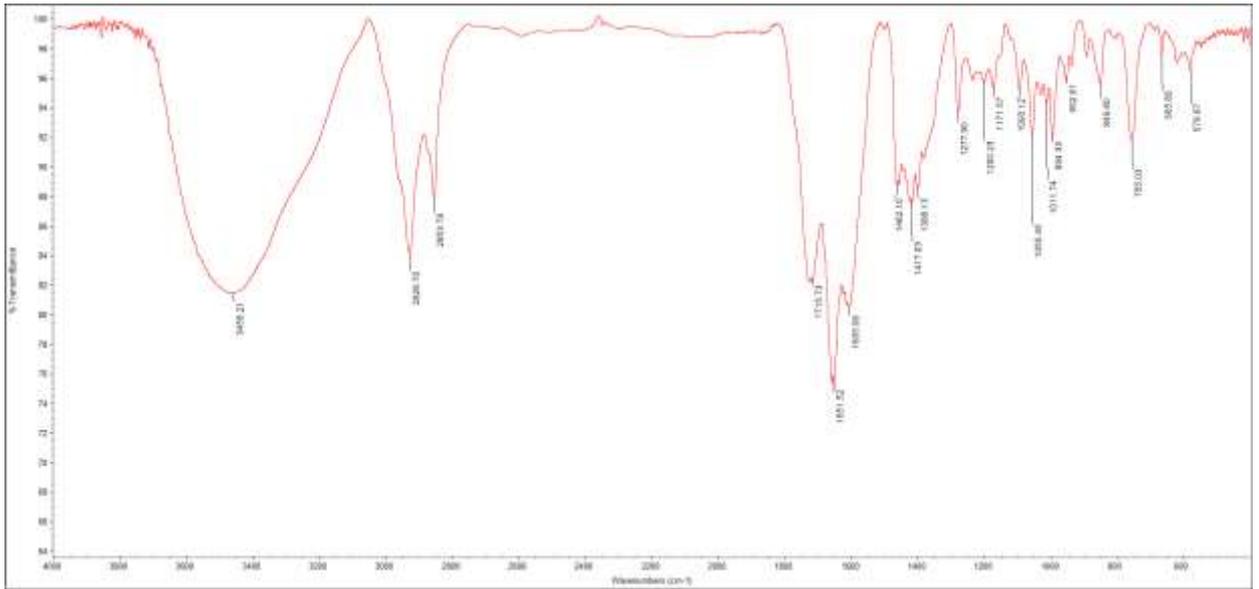
表三、化合物 1 的 ^1H 與 ^{13}C NMR 數據

| Position | $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ | $\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ type ^c |
|----------|--------------------------------|--|
| 2 | | 163.2, C |
| 3 | 6.25 s | 112.5, CH |
| 4 | | 177.6, C |
| 4a | | 115.4, C |
| 5 | | 145.6, C |
| 6 | | 143.9, C |
| 6a | | 129.9, C |
| 7 | 7.49 s | 101.2, CH |
| 8 | | 111.7, C |
| 9 | | 141.1, C |
| 10 | | 149.2, C |
| 10a | | 151.5, C |
| 10b | | 151.8, C |
| 11 | 2.47 s | 19.9, CH ₃ |
| 12 | 3.95 s | 61.8, CH ₃ |
| 13 | 4.00 s | 61.3, CH ₃ |
| 14 | 4.09 s | 61.2, CH ₃ |
| 15 | 3.99 s | 61.4, CH ₃ |

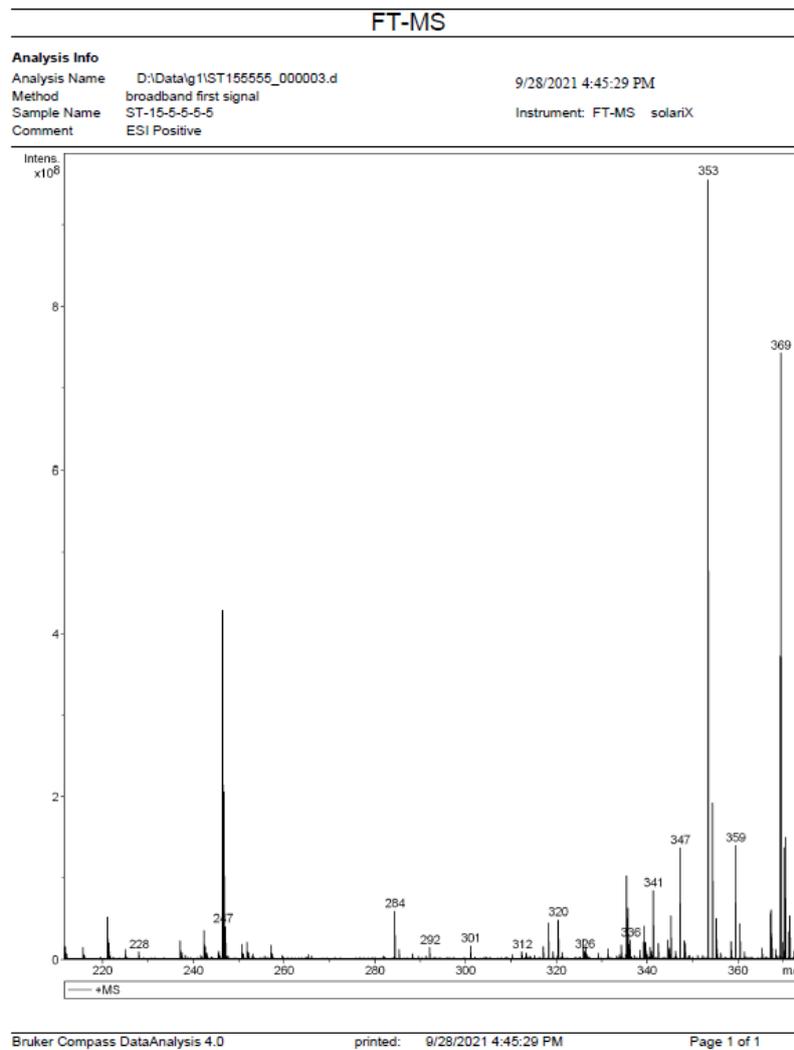
^aSpectra recorded at 400 MHz in CDCl₃ at 25 °C.

^bSpectra recorded at 100 MHz in CDCl₃ at 25 °C.

^cMultiplicity deduced by DEPT spectra.



圖十六、化合物 1 之紅外線圖譜



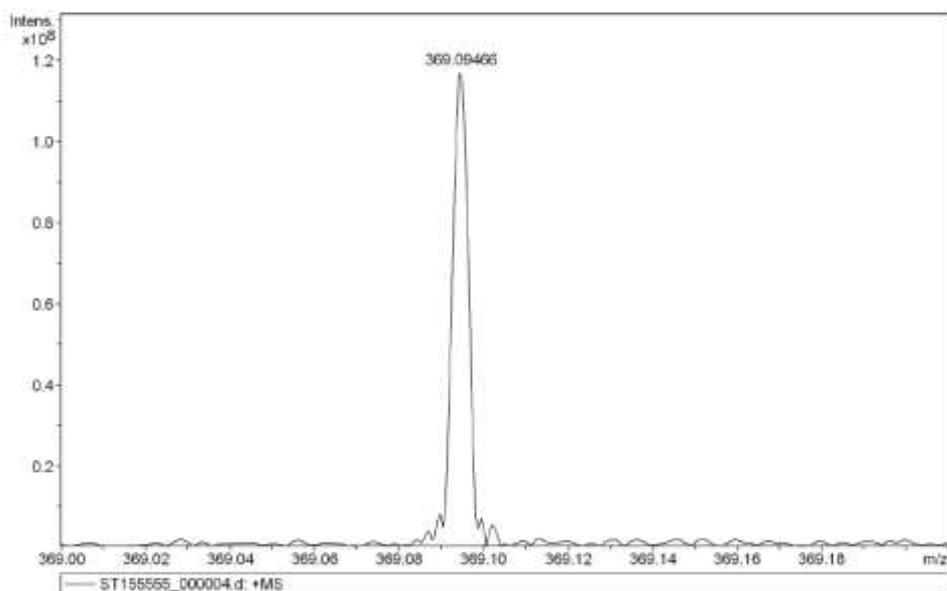
圖十七、化合物 1 之低解質譜圖譜

Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info

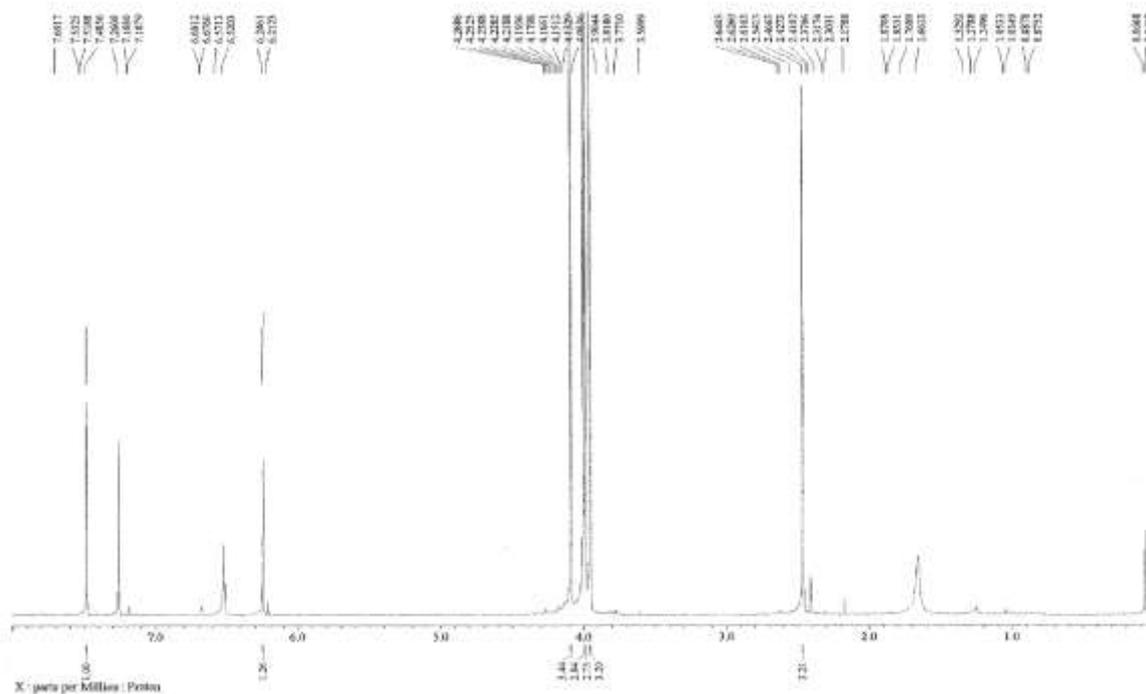
Analysis Name: D:\Data\g1\ST155555_000004.d
 Method: broadband first signal
 Sample Name: ST-15-5-5-5
 Comment: ESI Positive

9/28/2021 4:48:14 PM
 Operator: YU HSIAO-CHING
 Instrument: BRUKER FT-MS solarix

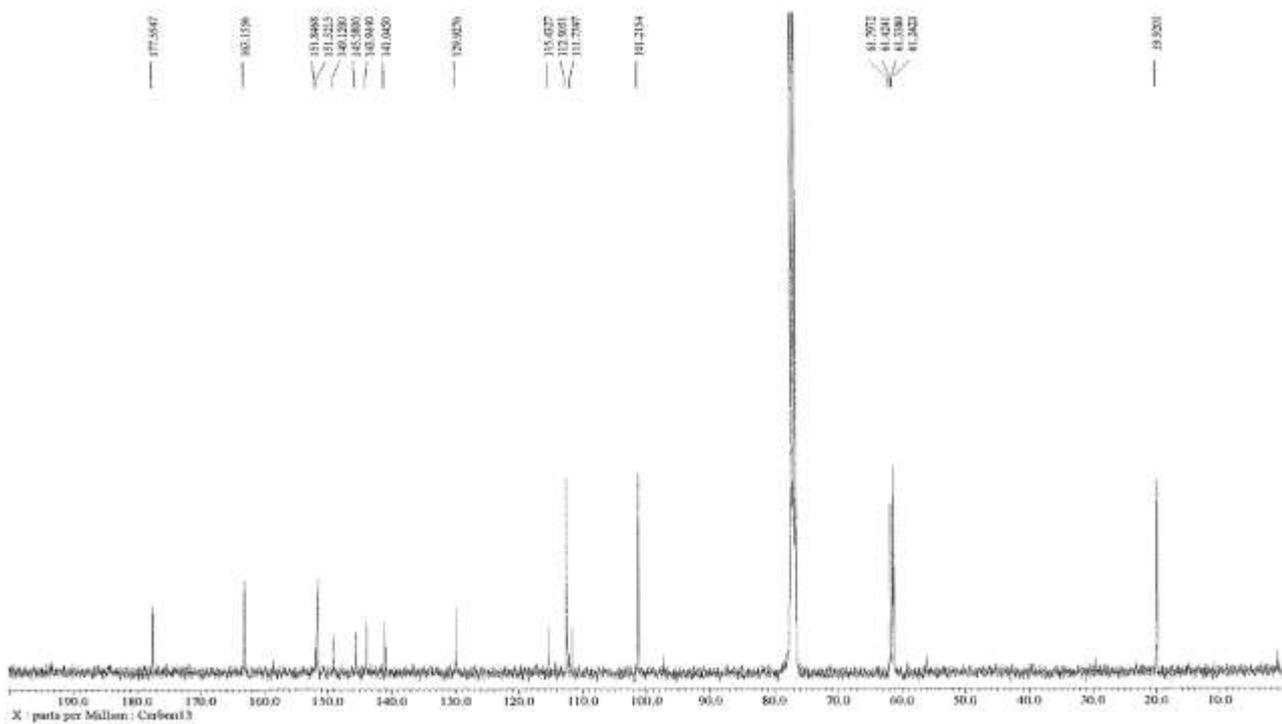


| Meas. m/z | # | Formula | Score | m/z | err [mDa] | err [ppm] | mSigma | rdb | e | Conf | N-Rule |
|-----------|---|------------------|--------|-----------|-----------|-----------|--------|-----|------|------|--------|
| 369.09466 | 1 | C 18 H 18 Na O 7 | 100.00 | 369.09447 | -0.19 | -0.51 | 34.6 | 9.5 | even | | ok |

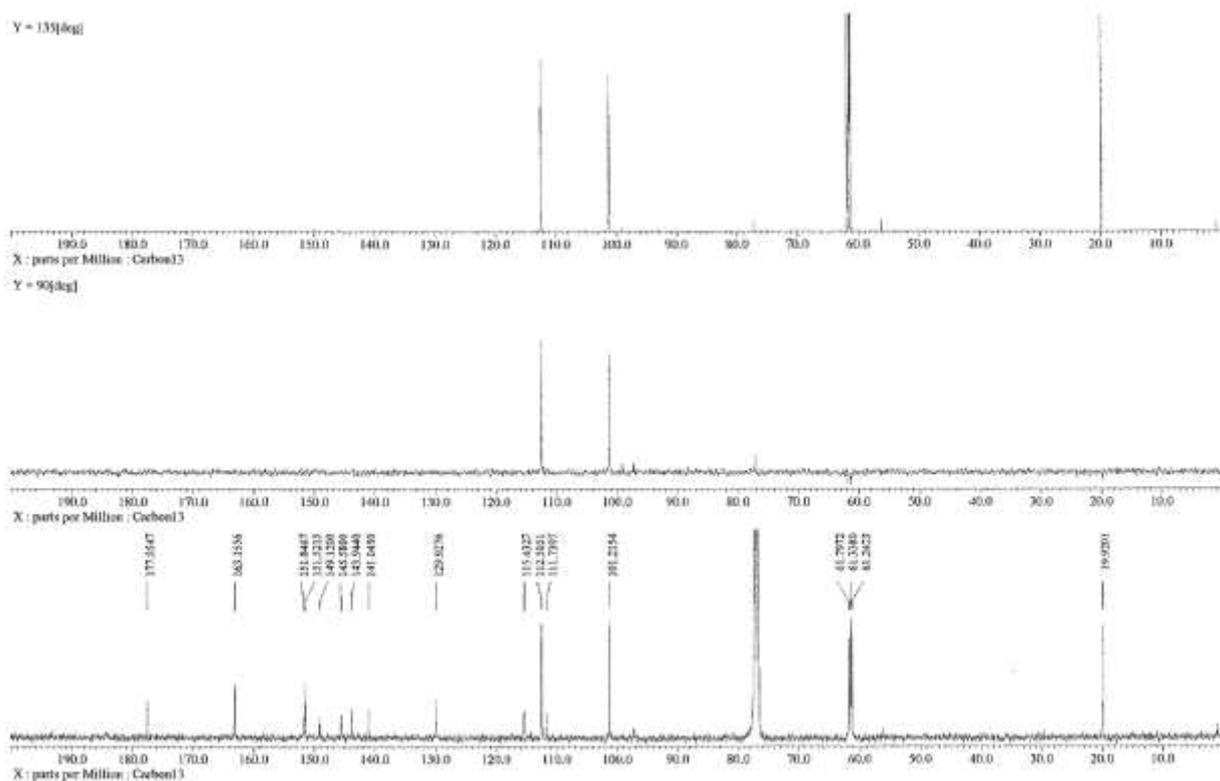
圖十八、化合物 1 之高解質譜圖譜



圖十九、化合物 1¹H-NMR 圖譜

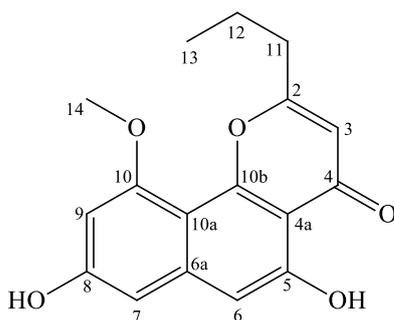


圖二十、化合物 1¹³C-NMR 圖譜



圖二十一、化合物 1 之 DEPT 圖譜

(二)、Comaparvin (2) 化合物構造之解析



化合物 2 為黃色油狀物(19.0 mg)，以正向 HPLC 分離之沖提溶液為 *n*-hexane/Acetone (5:1)。由低解析 ESIMS 圖譜的主要片段為 $323[M + Na]^+$ (圖二十四)。藉由 ^{13}C -NMR(圖二十六與表四)圖譜得知化合物 2 有 17 個碳，其中包含 2 個甲基(包含 1 個帶氧甲基)、2 個亞甲基、4 個次甲基及 9 個四級碳，由以上資訊可推測化合物 2 為萘並吡喃酮類。

化合物 2 的結構主要是藉由 2D NMR 圖譜的解析來建立。經由 HMQC (圖二十七)及 HMBC(圖二十九)的輔助，由以下關聯訊號: $\text{H}_2\text{-11/C-2}$ 和 C-3 ，以及 $\text{H}_3\text{-14/C-10}$ 確定甲基與丙基連接萘並吡喃酮骨架位置。再根據文獻資料比對，可以定出化合物 2 的結構為 comaparvin。⁶

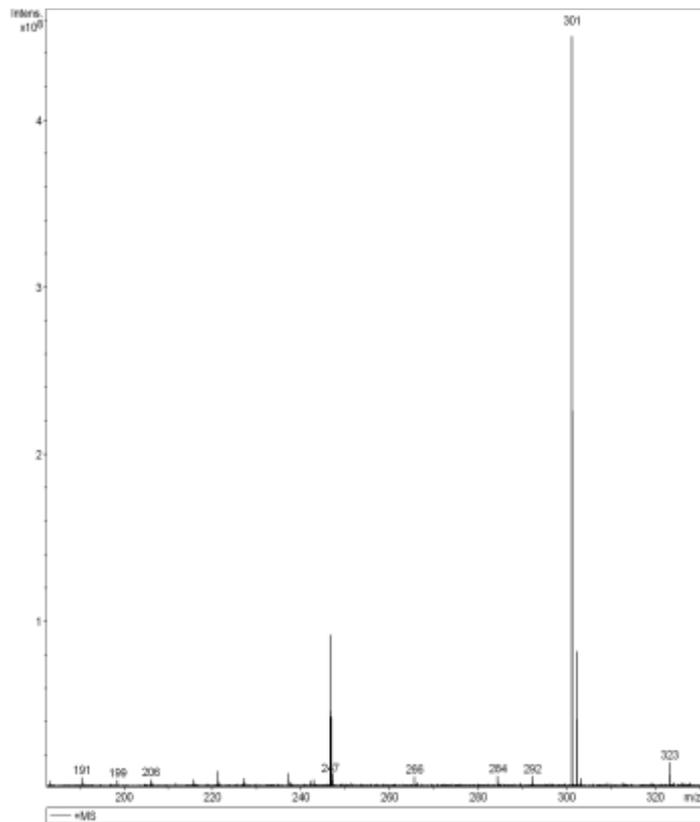
表四、化合物 2 的 ^1H 與 ^{13}C NMR 數據

| Position | δ_{H} ^a | δ_{C} , ^b type ^c |
|----------|----------------------------------|--|
| 2 | | 169.9, C |
| 3 | 6.29 s | 109.8, CH |
| 4 | | 182.9, C |
| 4a | | 157.5, C |
| 5 | | 109.0, C |
| 6 | 6.80 s | 105.0, CH |
| 6a | | 156.7, C |
| 7 | 6.59 d (2.4) | 96.1, CH |
| 8 | | 104.9, C |
| 9 | 6.41 d (2.4) | 101.5, CH |
| 10 | | 159.8, C |
| 10a | | 141.0, C |
| 10b | | 156.1, C |
| 11 | 2.73 t (7.2) | 36.3, CH ₂ |
| 12 | 1.90 m | 19.8, CH ₂ |
| 13 | 1.06 t (7.2) | 13.5, CH ₃ |
| 14 | 3.99 s | 55.9, CH ₃ |
| 5-OH | 12.82 s | |

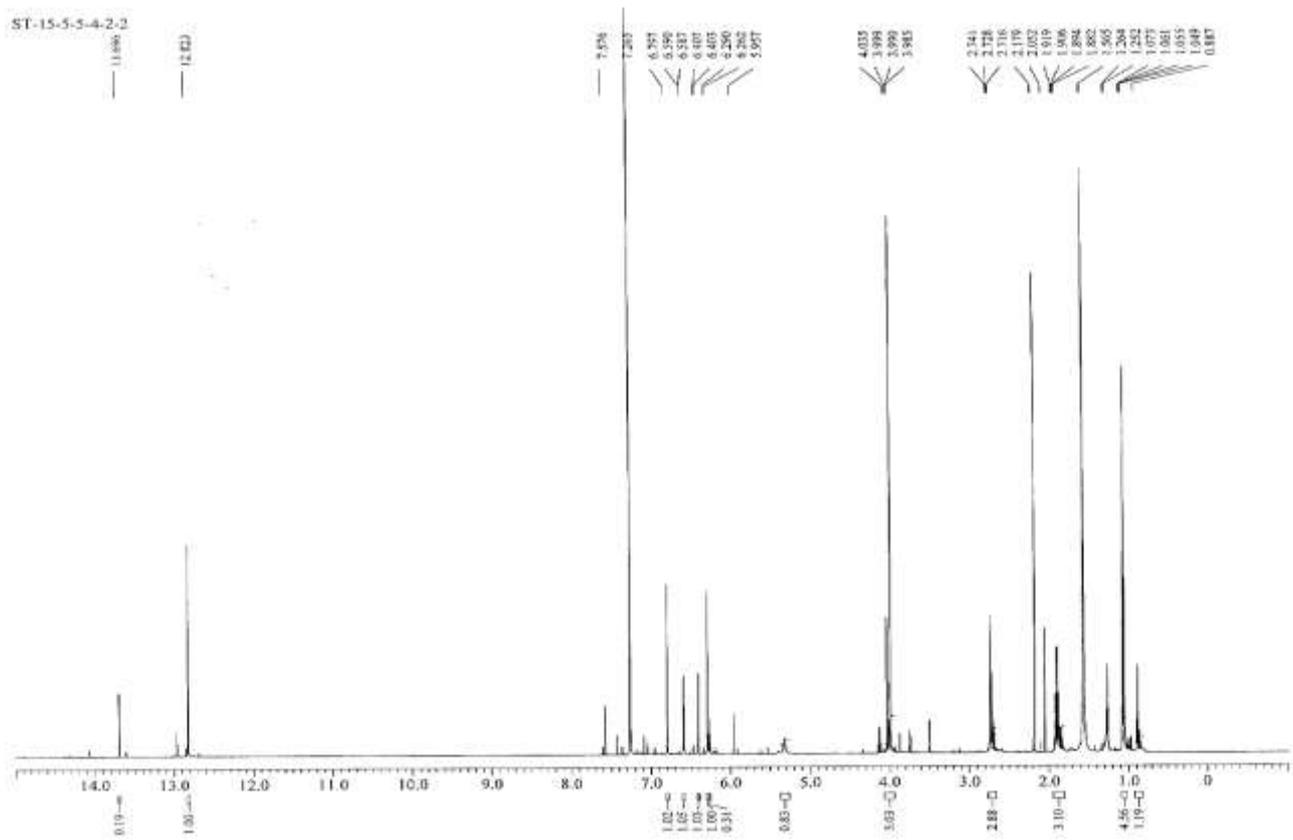
^aSpectra recorded at 600 MHz in CDCl₃ at 25 °C.

^bSpectra recorded at 150 MHz in CDCl₃ at 25 °C.

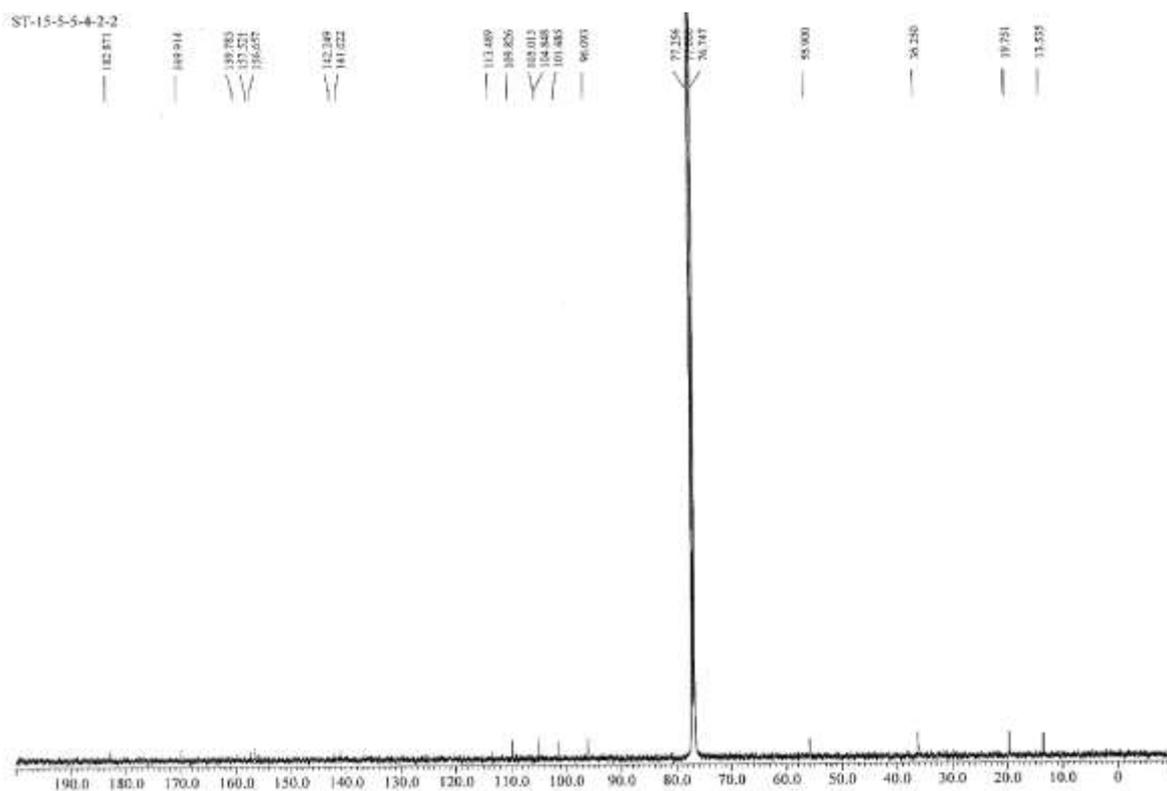
^cMultiplicity deduced by DEPT spectra.



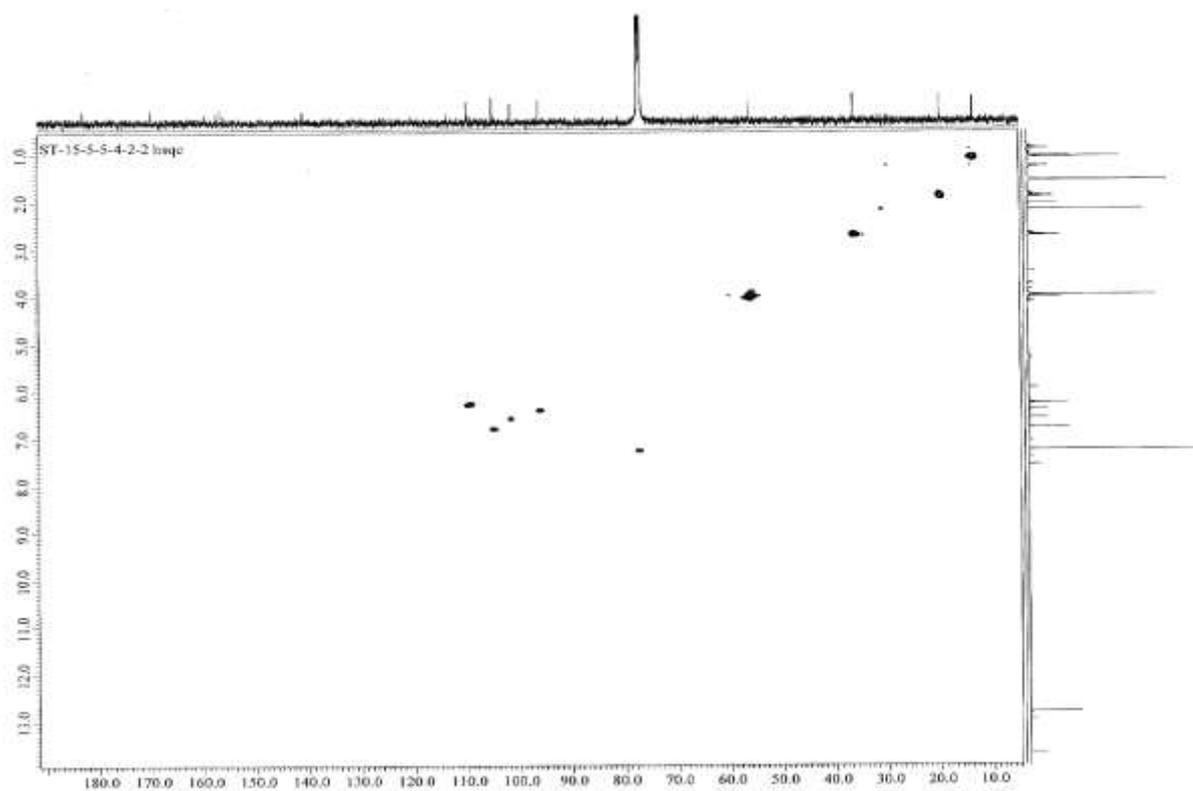
圖二十四、化合物 2 之質譜圖譜



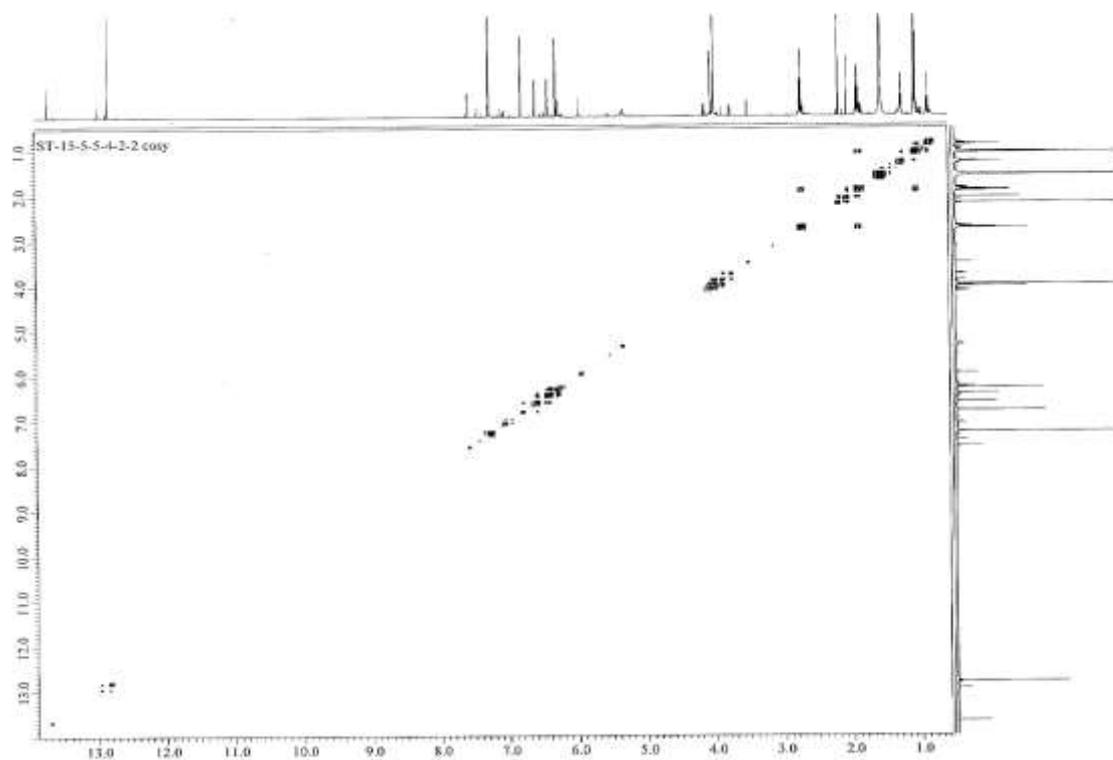
圖二十五、化合物 2 之 $^1\text{H-NMR}$ 圖譜



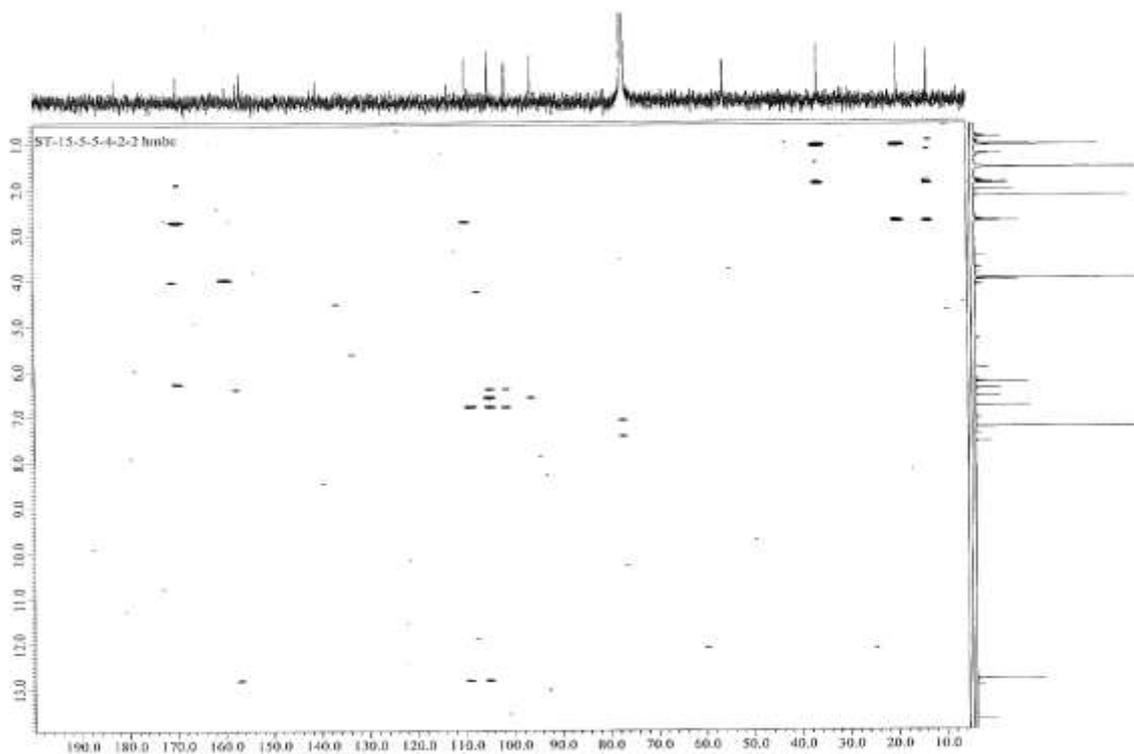
圖二十六、化合物 2 之 ^{13}C -NMR 圖譜



圖二十七、化合物 2 之 HMQC 圖譜

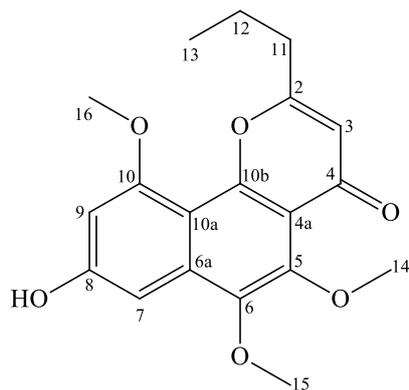


圖二十八、化合物 2 之 COSY 圖譜



圖二十九、化合物 2 之 HMBC 圖譜

(三)、 6-Methoxycomaparvin-5-methyl ether (3) 化合物構造之解析



化合物 **3** 為黃色油狀物(2.5 mg)，以正相 HPLC 分離之沖提溶液為 *n*-hexane/Ethyl acetate (4:1)。由低解析 ESIMS 圖譜的主要片段為 367[M + Na]⁺ (圖三十)。藉由 ¹³C-NMR(圖三十二與表五)圖譜得知化合物 **3** 有 19 個碳，其中包含 4 個甲基(包含 3 個帶氧甲基)、2 個亞甲基、3 個次甲基及 10 個四級碳，由以上資訊可推測化合物 **3** 為茶並吡喃酮類。

化合物 **3** 的結構主要是藉由 2D NMR 圖譜的解析來建立，經由 HMQC (圖三十四)及 HMBC(圖三十六)的輔助，由以下關聯訊號:H₂-11/C-2 和 C-3，H₃-14/C-5、H₃-15/C-6 以及 H₃-16/C-10 確定甲基與丙基連接茶並吡喃酮骨架位置。再根據文獻資料比對，可以定出化合物 **3** 的結構為 6-methoxycomaparvin-5-methyl ether。⁷

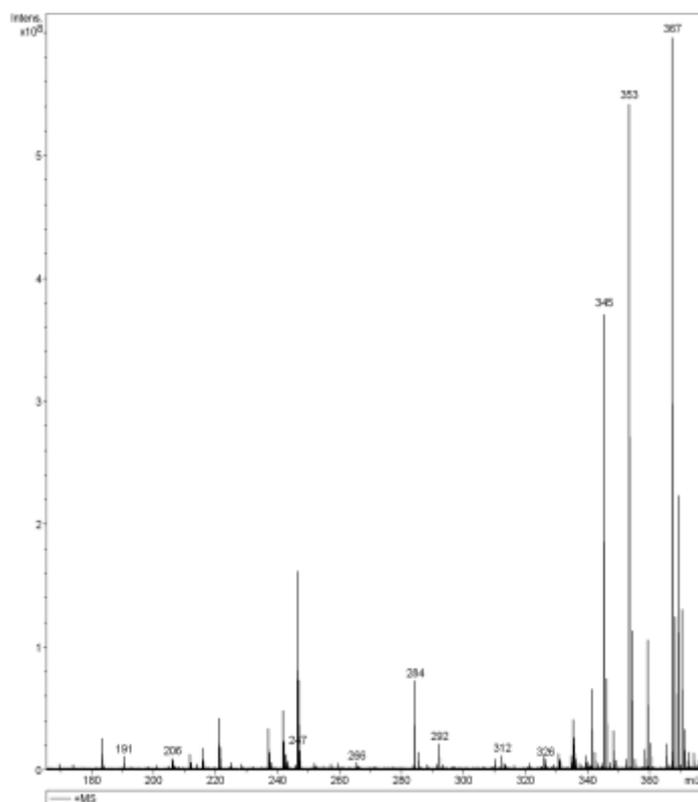
表五、化合物 **3** 的 ^1H 與 ^{13}C NMR 數據

| Position | δ_{H} ^a | δ_{C} , ^b type ^c |
|----------|----------------------------------|--|
| 2 | | 167.0, C |
| 3 | 6.26 s | 111.4, CH |
| 4 | | 178.3, C |
| 4a | | 114.1, C |
| 5 | | 146.5, C |
| 6 | | 143.5, C |
| 6a | | 135.1, C |
| 7 | 7.18 d (2.4) | 97.3, CH |
| 8 | | 107.9, C |
| 9 | 6.67 d (2.4) | 99.1, CH |
| 10 | | 159.8, C |
| 10a | | 158.8, C |
| 10b | | 153.7, C |
| 11 | 2.65 t (7.2) | 35.8, CH ₂ |
| 12 | 1.85 m | 19.7, CH ₂ |
| 13 | 1.03 t (7.2) | 13.6, CH ₃ |
| 14 | 3.97 s | 56.0, CH ₃ |
| 15 | 3.95 s | 61.2, CH ₃ |
| 16 | 3.98 s | 61.8, CH ₃ |

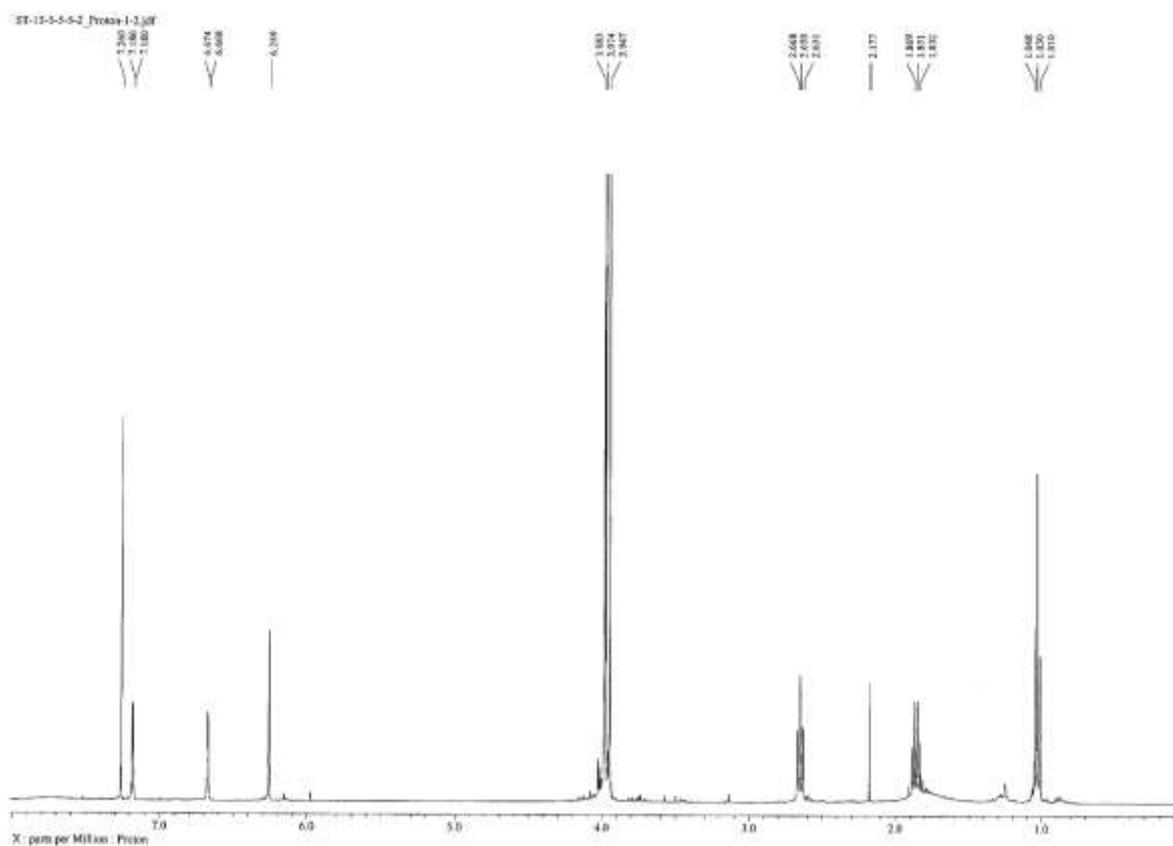
^aSpectra recorded at 600 MHz in CDCl₃ at 25 °C.

^bSpectra recorded at 150 MHz in CDCl₃ at 25 °C.

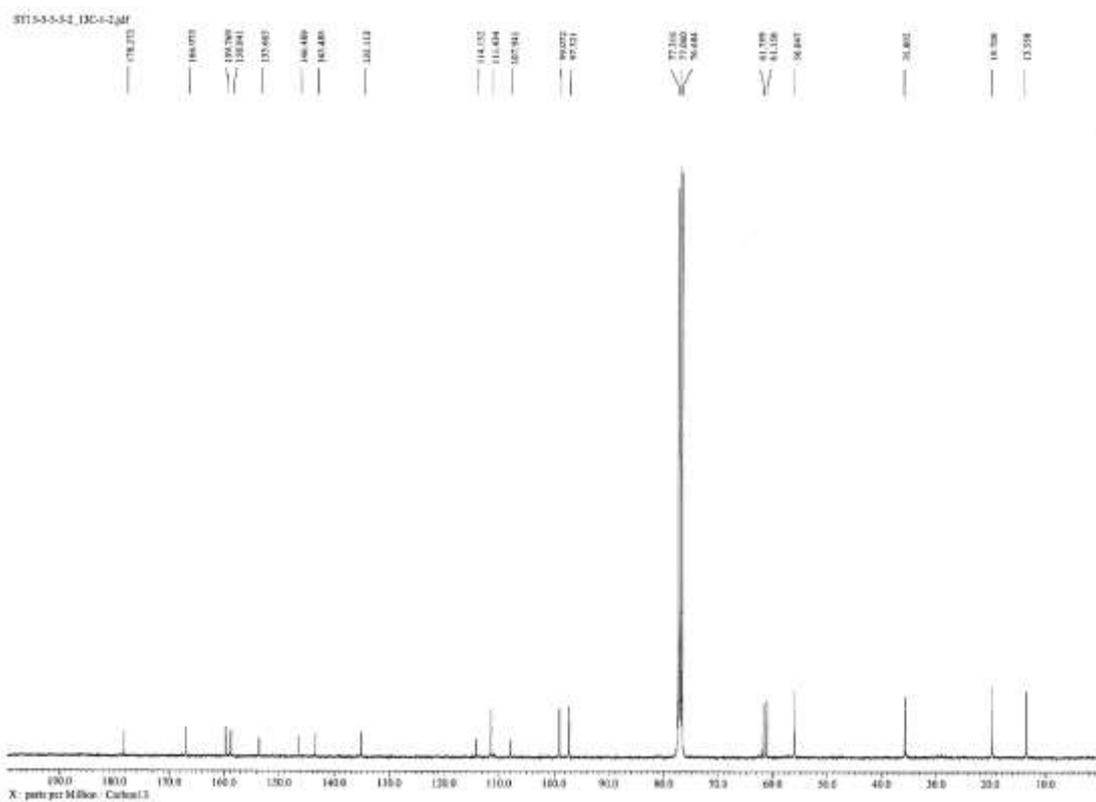
^cMultiplicity deduced by DEPT spectra.



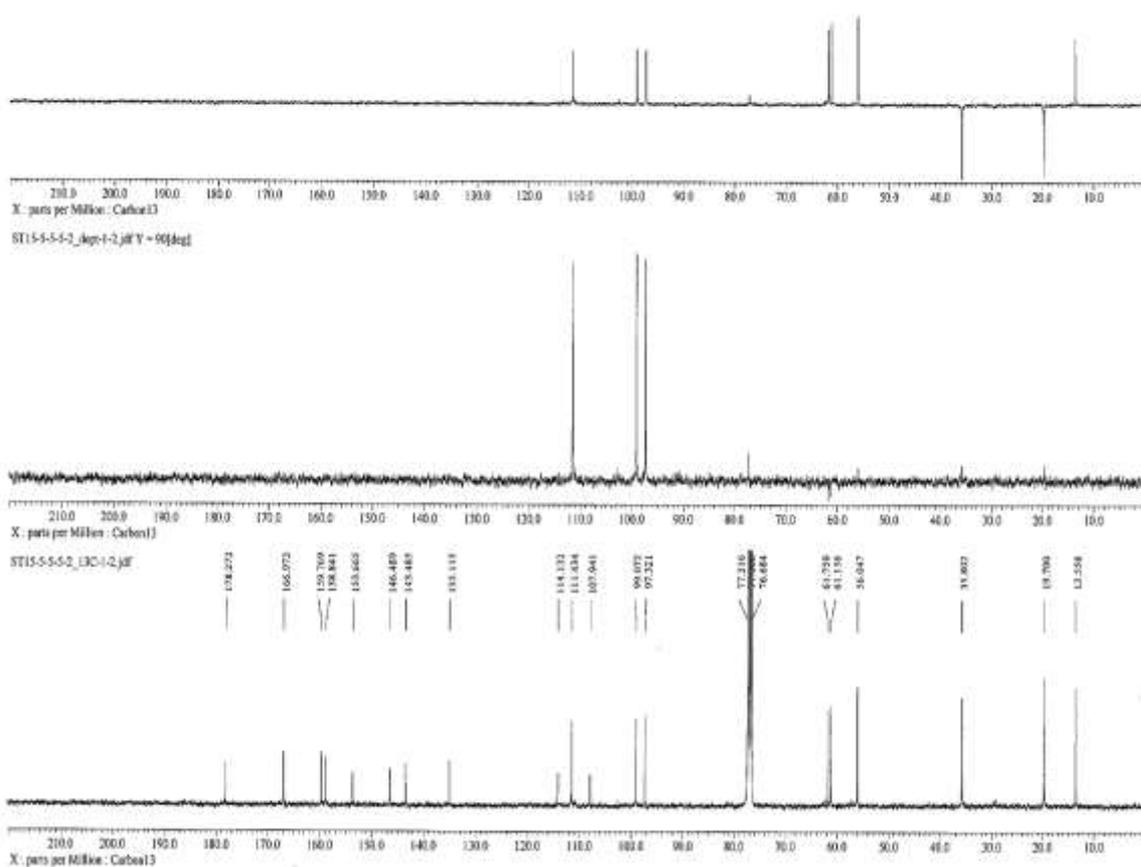
圖三十、化合物 3 之質譜圖譜



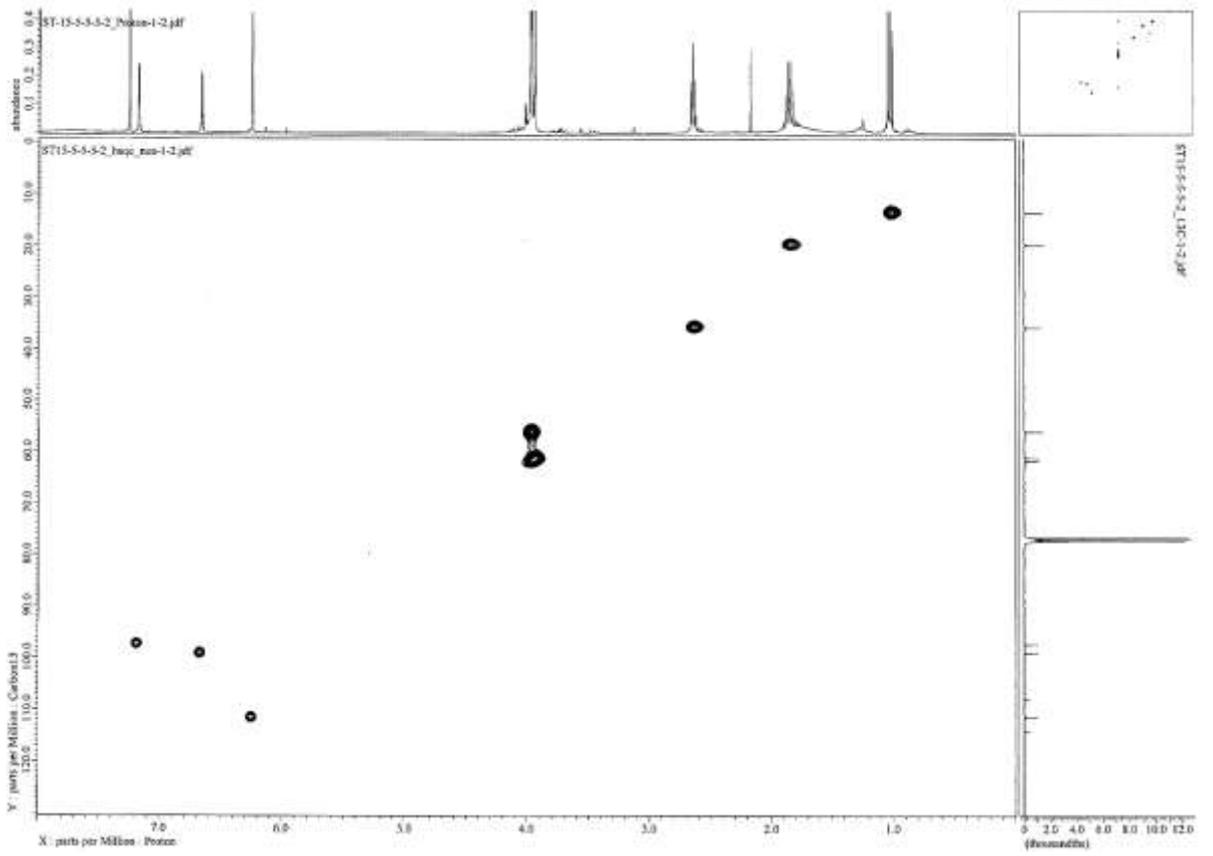
圖三十一、化合物 3 之 ¹H-NMR 圖譜



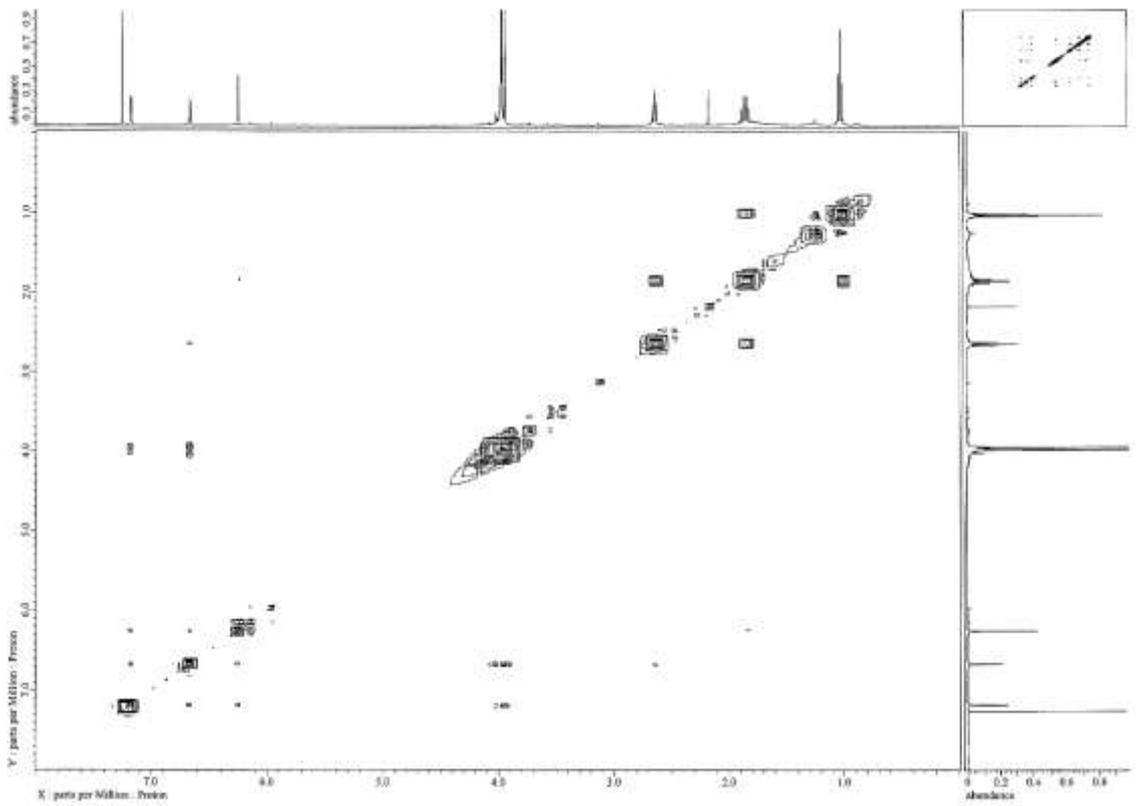
圖三十二、化合物 3 之 ^{13}C -NMR 圖譜



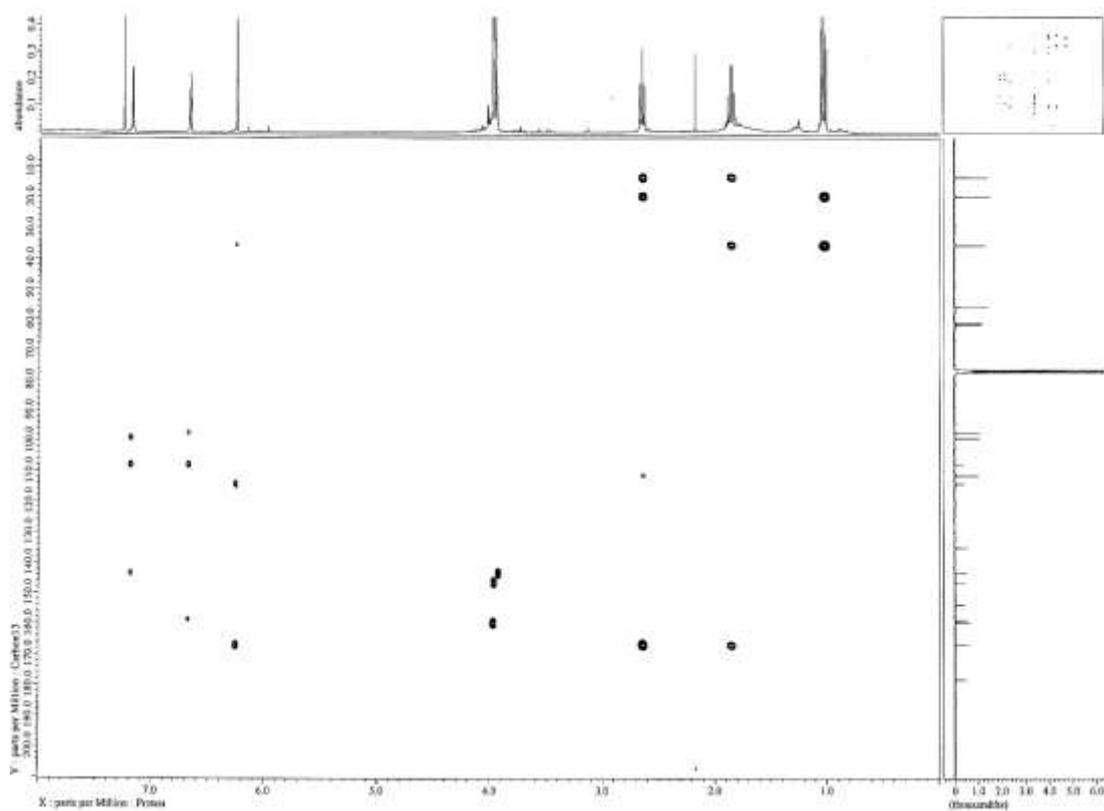
圖三十三、化合物 3 之 DEPT 圖譜



圖三十四、化合物 3 之 HMQC 圖譜



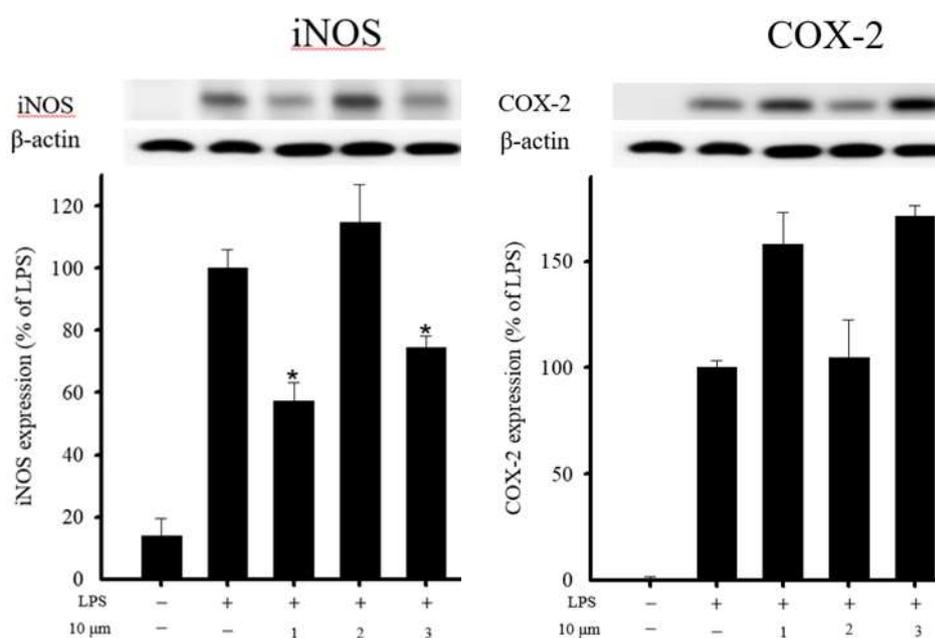
圖三十五、化合物 3 之 COSY 圖譜



圖三十六、化合物 3 之 HMBC 圖譜

(四) 生物活性試驗結果

將小卷海齒花 *Comanthus parvicirrus* 分離純化得到的化合物 **1-3**，進行體外抗發炎活性測試，並且探討化合物對脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 誘發的小鼠巨噬細胞 (RAW264.7) 所產生的發炎性蛋白質一氧化氮合成酶 (iNOS) 以及第二型環氧化酶 (COX-2)。化合物 **1** 與 **3** 對 iNOS 具有微弱的抑制活性，化合物 **1-3** 皆對 COX-2 沒有抑制效果 (圖三十七)。實驗結果如下表所示: (表六)



圖三十七 化合物 **1-3** 對 iNOS 與 COX-2 之抑制效果

表六、化合物 **1-3** 對 iNOS 與 COX-2 之抑制數據

| Compounds | iNOS (nitric oxide synthase) | | COX-2 (cyclooxygenase-2) | |
|-----------|------------------------------|----------------|--------------------------|----------------|
| | LPS | 10 μM | LPS | 10 μM |
| - | - | 13.96 ± 5.76 | - | 1.06 ± 1.16 |
| - | + | 100 ± 6.09 | + | 100 ± 5.86 |
| 1 | + | 57.26 ± 6.14 | + | 158.19 ± 26.29 |
| 2 | + | 114.87 ± 11.95 | + | 104.80 ± 31.14 |
| 3 | + | 74.59 ± 3.68 | + | 171.37 ± 8.76 |

陸、結論

- 一、由棘皮動物小卷海齒花 *Comanthus parvicirrus* 進行天然物化學成分研究，分離獲得三個角型萘並吡喃酮類型天然化合物，包括一個新化合物 8-hydroxy-5,6,9,10-tetramethoxy-2-methyl-4*H*-benzo[*h*]chromen-4-one (1) 以及兩個已知化合物 comaparvin (2) 與 6-methoxycomaparvin-5-methyl ether (3)，當中化合物 1 獲得單晶晶體，經由 X-ray 繞射測試獲得其化合物結構。
- 二、生物活性測試方面，針對化合物 1-3 進行體外抗發炎活性測試，並且探討化合物對脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 誘發的小鼠巨噬細胞 (RAW264.7) 所產生的發炎性蛋白質一氧化氮合成酶 (iNOS) 以及第二型環氧化酶 (COX-2)。化合物 1 對 iNOS 具有抑制發炎活性(57%)，但對 COX-2 卻發生促進發炎現象 (158%)，此現象相當特殊，可以針對此結構抗發炎活性再進一步研究。
- 三、過去 50 年針對棘皮動物海百合天然物研究相當少，本次實驗針對小卷海齒花 *Comanthus parvicirrus* 進行分析，日前已發現三個天然化合物，並獲得一個新穎化合物，未來持續進行研究分析，假以時日應可獲得更多新穎化合物。

柒、未來展望

- 一、小卷海齒花 *Comanthus parvicirrus* 過往之研究相當稀少，本實驗期望可持續針對棘皮動物海百合，其代謝化合物結構研究分析。
- 二、冀望延續實驗後，可開發出具有潛力天然化合物，並且嘗試製備相關衍生物，比較在反應前後化合物所顯示的生物活性上的差異，以達成藥物開發之目的。
- 三、此項研究將對於臺灣屏東恆春半島海域中，所蘊藏豐富天然藥物資源開發與利用將有所幫助，同時也提供化學家、生技學家與藥理學家豐富研究題材；從長期目標而言，希望本實驗進行能開發出臺灣本土的海洋抗癌藥物。

捌、參考資料及其他

1. 方力行“珊瑚學”教育部大學聯合出版委員會，1989，pp 36–37.
2. Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Keyzers, R. A.; Munro, M. H. G.; Prinsep, M. R. *Nat. Prod. Rep.* **2017**, *34*, 235–294.
3. Kijjoa, A.; Sawangwong, P. *Mar. Durgs* **2004**, *2*, 73–82.
4. Ruggieri, G. D. *Science* **1976**, *194*, 491–497.
5. <http://adisinsight.springer.com/>
6. Francesconi, K. A. *Aust. J. Chem.* **1980**, *33*, 2781–2784.
7. Bokesch, H. R.; Cartner, L. K.; Fuller, R. W.; Wilson, J. A.; Henrich, C. J.; Kelley, J. A.; McKee, T. C. *Bioorganic Med. Chem. Let.* **2010**, *20*, 3848–3850.
8. Rideout, J.; Smith, N. B.; Sutherland, M. *Experientia*, **1979**, *35*, 1273–1274.
9. Chung, H.-M.; Hsiao, L.-T.; Li, Z.-Y.; Wen, Z.-H. *Rec. Nat. Prod.* **2021**, *15*, 213–218.
10. Lin, T.-C.; Lin, Y.-Y.; Wu, Y.-J.; Wen, Z.-H.; Su, J.-H. *Chem. Nat. Compd.* **2021**, *57*, 91–93.
11. Huang, S.-Y.; Chen, N.-F.; Chen, W.-F.; Hung, H.-C.; Lee, H.-P.; Lin, Y.-Y.; Wen, Z.-H. *Mar. Drugs* **2012**, *10*, 1899–1919.
12. Jean, Y.-H.; Chen, W.-F.; Sung, C.-S.; Duh, C.-Y.; Huang, S.-Y.; Lin, C.-S.; Wen, Z.-H. *Br. J. pharmacol.* **2009**, *158*, 713–725.
13. Jean, Y.-H.; Chen, W.-F.; Duh, C.-Y.; Huang, S.-Y.; Hsu, C.-H.; Lin, C.-S.; Wen, Z.-H. *EuR. J. pharmacol.* **2008**, *578*, 323–331.

【評語】 030021

本研究針對海百合小卷海齒花進行天然物化合物之成分研究，分離獲得三個角型萘並吡喃酮類型天然化合物，包括一個新化合物。作者進行了天然物的分離，以及對分離產物做詳盡的光譜分析，實驗數據完整，解析正確，超過大學生的水準。可惜沒有新的化學或生物研究的突破。