

2023 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號	080001
參展科別	生物化學
作品名稱	不老化動物櫟葉指形軟珊瑚生成天然化合物解 析
得獎獎項	三等獎

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 蘇柏維、李侑緯、柯宗佑

關鍵詞 櫟葉指形軟珊瑚、菸草烷、抗發炎

作者簡介

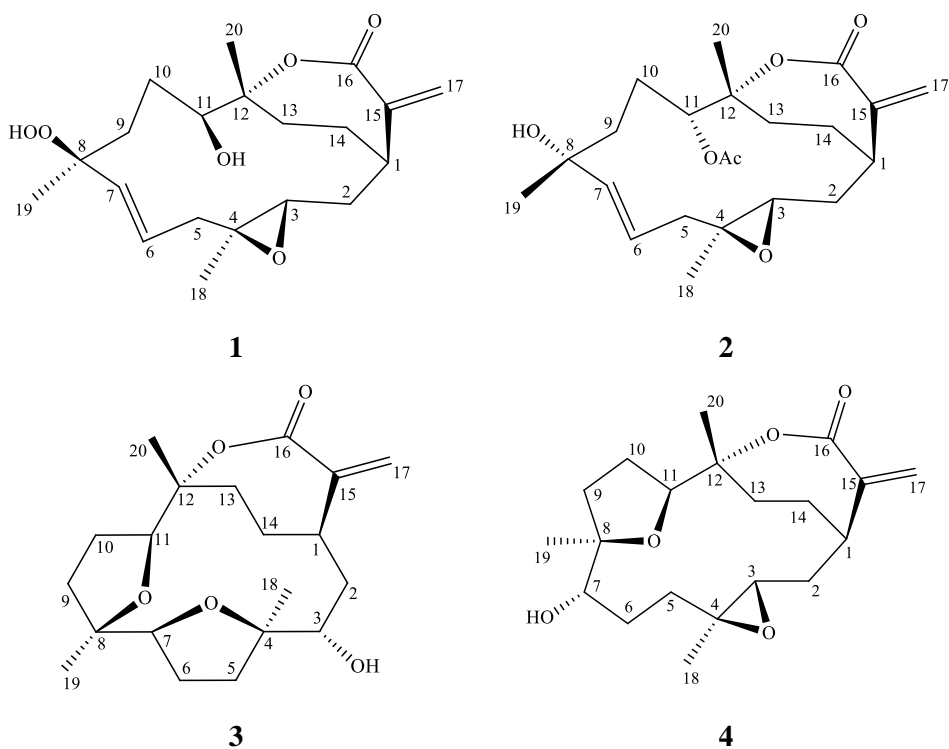


我們是來自屏東縣枋寮高中高中部三年級的柯宗佑、李侑緯、蘇柏維。在剛上高中時，有幸能夠進入實驗室參與研究，這個特別的經驗也加深了我們對於化學的興趣，雖然其中不乏挫折，但我們也從一次次的失敗中得到經驗並成長。非常感謝教授、老師和學長姐的指導，為我們提供了寶貴的建議，也收獲了一段美好的回憶。

摘要

本研究針對臺灣恆春半島海域所採集的櫟葉指形軟珊瑚 *Sinularla querciformis* 進行天然物化學成分研究，由此珊瑚中分離出兩個新型菸草烷類型天然化合物，分別是 Querciformolide G (1) 與 Querciformolide H (2)，以及兩個已知菸草烷類型天然化合物，分別是 Sinulaparvalide B (3) 與 3,4:8,11-Bisepoxy-7-hydroxycembra-15(17)-en-1,12-olide (4)。上述化合物的物理性質和化學結構皆是由核磁共振儀、紅外線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。

針對化合物 1-4 進行抗發炎測試，對超氧陰離子產生和人中性粒細胞彈性蛋白酶釋放的抑製作用，發現化合物 2 針對彈性蛋白酶，有顯著的抑制效果。



Abstract

Chemical composition of *Sinularia querciformis* also afforded two new cembranoids, querciformolide G (**1**), and H (**2**), along with two known cembranoids, sinularparvalide (**3**), and 3,4:8,11-bisepoxy-7-hydroxycembra-15(17)-en-1,12-olide (**4**), collected from Hengchun Peninsula in the waters of Southern Taiwan. The structure of these compounds were determined by extensive spectroscopic (IR, ESIMS, ¹H NMR, and ¹³C NMR) data analysis and by comparison with those previously reported in the literature.

Compounds **1–4** were evaluated in terms of their *in vitro* anti-inflammatory activity by examining their inhibitory effects on the generation of superoxide anions and the release of elastase by human neutrophils. Compound **2** displayed a strong inhibitory effect on the release of elastase.

壹、研究動機

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有關於臺灣海域軟珊瑚所含天然化合物的研究於1990年代，由國立中山大學杜昌益教授等人採集於屏東墾丁海域軟珊瑚 *Lobophytum michaelae* 開始，當時分離獲得一個新的 cembrane-type 化合物命名為 lobomichaolide，從此開啟臺灣海域軟珊瑚的研究大門，研究至今已獲得超過一千多個的海洋天然化合物，其中具生物活性的物質的比例相當高的。由過往研究得知，臺灣海域軟珊瑚所含天然物的研究不只具有學術研究上的價值，有機會找到更多具有開發出抗癌、抗病毒或抗發炎等生物活性潛力的海洋天然物。

貳、研究目的

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，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，這些天然化合物具有形成藥物巨大潛力。

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。² 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。³ 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)。⁴

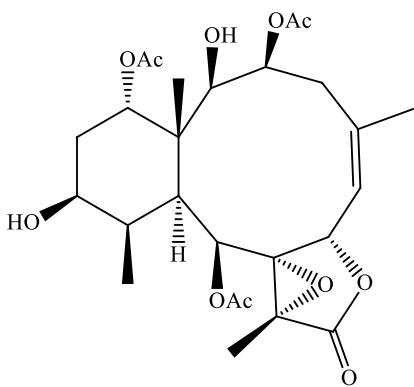
表一 2020 年 10 月前美國食品藥物管理局獲准的海洋天然藥物⁴

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

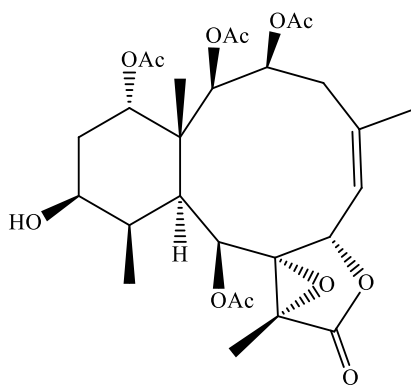
表二 2020 年 10 月前上在臨床測試海洋天然藥物⁴

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	Ladiratumzumab 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	Depatuzumab mafodotin	EGFR	MMAF	Mollusk/Cyanobacteria	Solid tumors	Glioblastoma

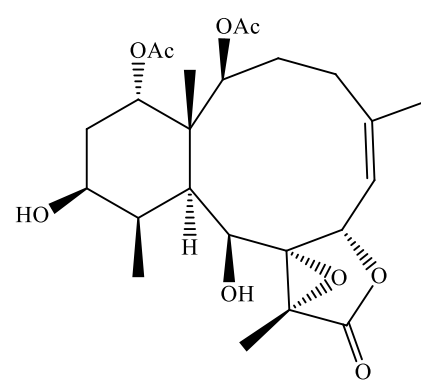
臺灣先前海洋生物進行活性天然物研究，以軟珊瑚獲得的新穎天然化合物數量最多，當中 *Briareum excavatum* 分離的化合物 5-9、⁵⁻⁶ *Pachyclavularia violacea* 分離的化合物 10-11、⁷ *Isis hippuris* 分離的化合物 12-14⁸ 與 *Clavularia viridis* 分離的化合物 15-17⁹ 皆具有顯著癌細胞毒殺活性；另外，*Sinularia grandilobata* 分離的化合物 18¹⁰ 與 *Lobophytum crassum* 分離的化合物 19-22¹¹ 具有抗發炎活性。



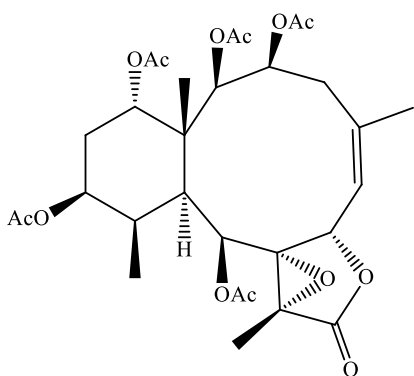
5



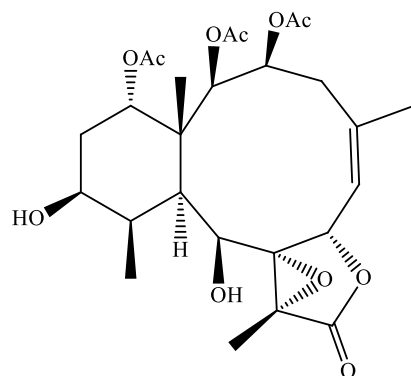
6



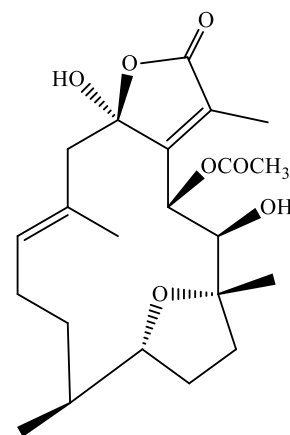
7



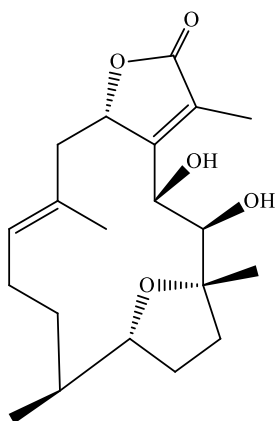
8



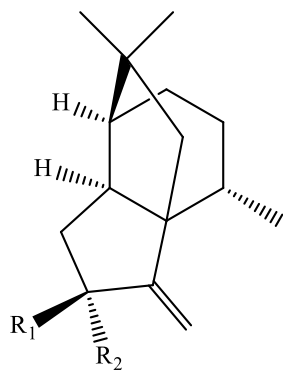
9



10



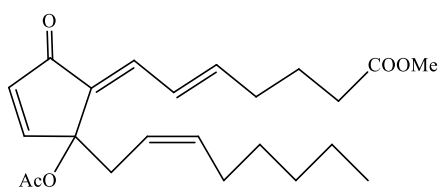
11



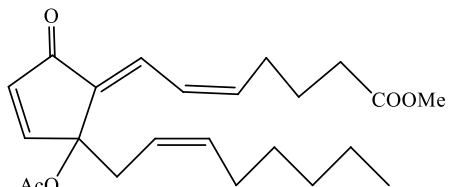
12 $R_1 = OH ; R_2 = H$

13 $R_1 = H ; R_2 = OH$

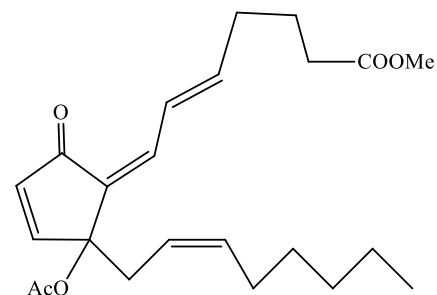
14 $R_1 = OAc ; R_2 = H$



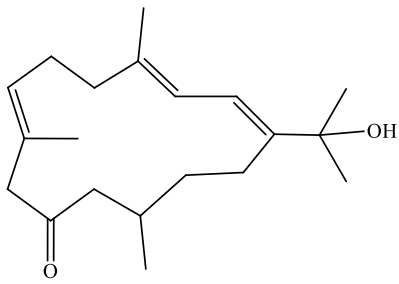
15



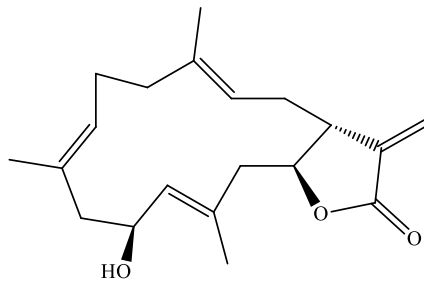
16



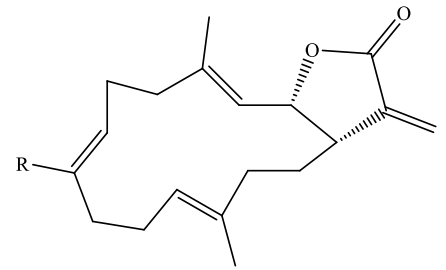
17



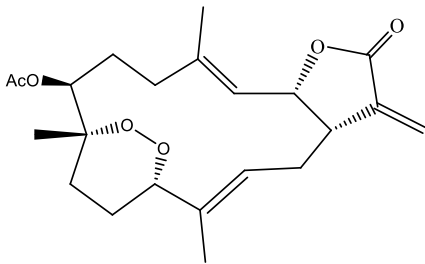
18



19



20 R = CH₂OH
21 R = COOMe



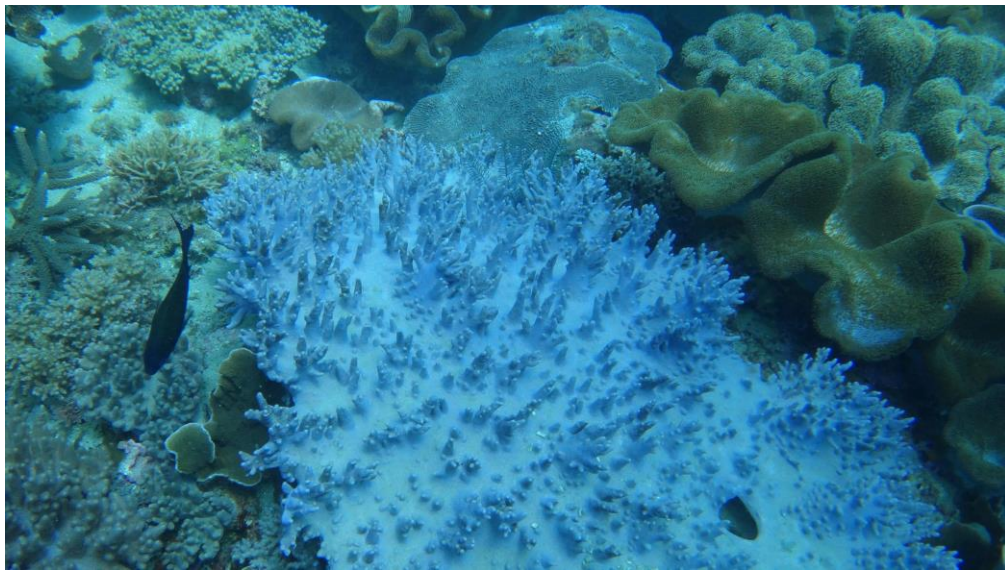
22

由過往研究得知，臺灣海域軟珊瑚所含天然物的研究不只具有學術研究上的價值，應該有機會找到更多具有開發出抗癌、抗病毒或抗發炎等生物活性潛力的海洋天然物。

參、研究設備及器材

一、 生物樣品

以水肺潛水方式至恆春半島墾丁海域進行樣品採集(圖一)，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種使用；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。



圖一、櫟葉指形軟珊瑚 *Sinularia querciformis* 生態照

櫟葉指形軟珊瑚 *Sinularia querciformis* 生物分類

Phylum	Cnidaria (刺絲胞動物門)
Class	Anthozoa (珊瑚蟲綱)
Subclass	Octocorallia (八放珊瑚亞綱)
Order	Alcyonacea (海雞頭目)
Family	Alcyoniidea (海雞頭科)
Genus	<i>Sinularia</i> (指形軟珊瑚屬)
Species	<i>querciformis</i> (Pratt, 1903)

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、櫟葉指形軟珊瑚 *Sinularla querciformis* 純化分離

櫟葉指形軟珊瑚 *Sinularla querciformis* (1168 g, wet weight) 經冷凍乾燥後，獲得乾重 247.86 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 (13.85 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，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 5.17 公克之萃取物。

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，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 1-15。

之後每一個 fractions 經過減壓濃縮後，利用核磁共振儀(NMR)來檢測(見圖二)，再依據 ¹H-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，利用全功能快速純化層析系統進行再一次的分離實驗(見圖三)。

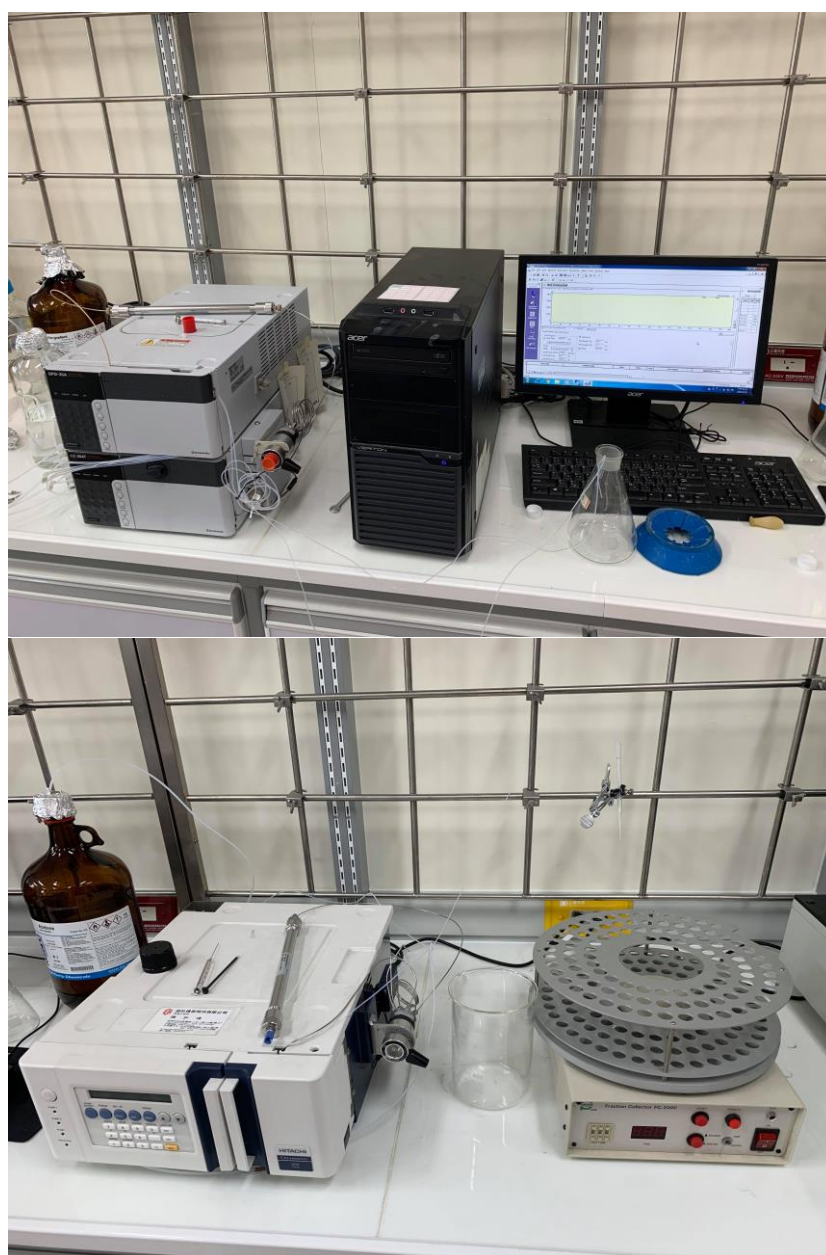


圖二、核磁共振儀(NMR)進行化合物結構測試

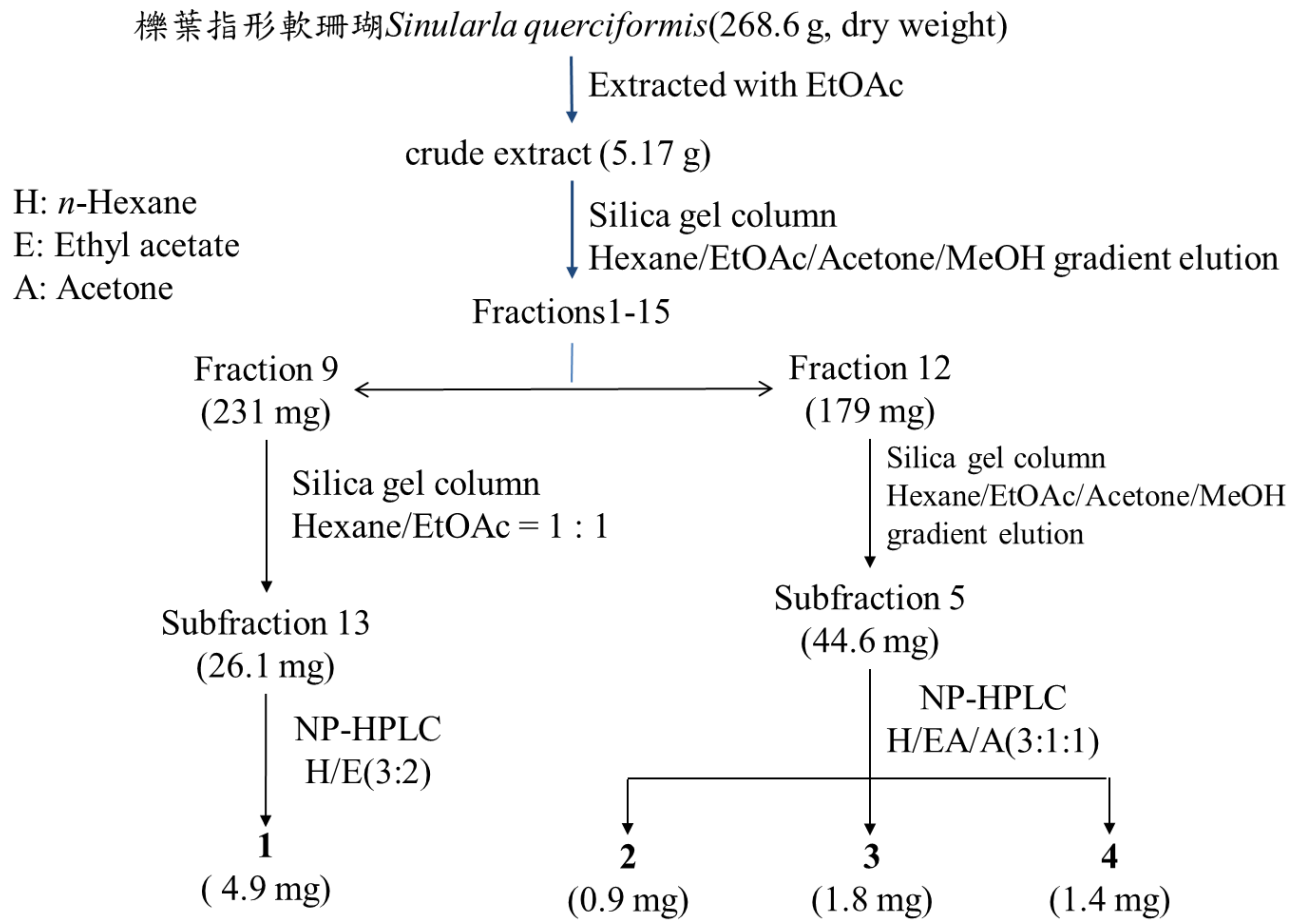


圖三、全功能快速純化層析系統進行分離實驗

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(見圖四)，分離後以試管裝填(見圖九)，在使用薄層分析將純化之化合物收集；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) 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(圖五)：



圖四、高效能液相層析儀(HPLC)進行純化分離



圖五、本研究之分離流程圖

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。

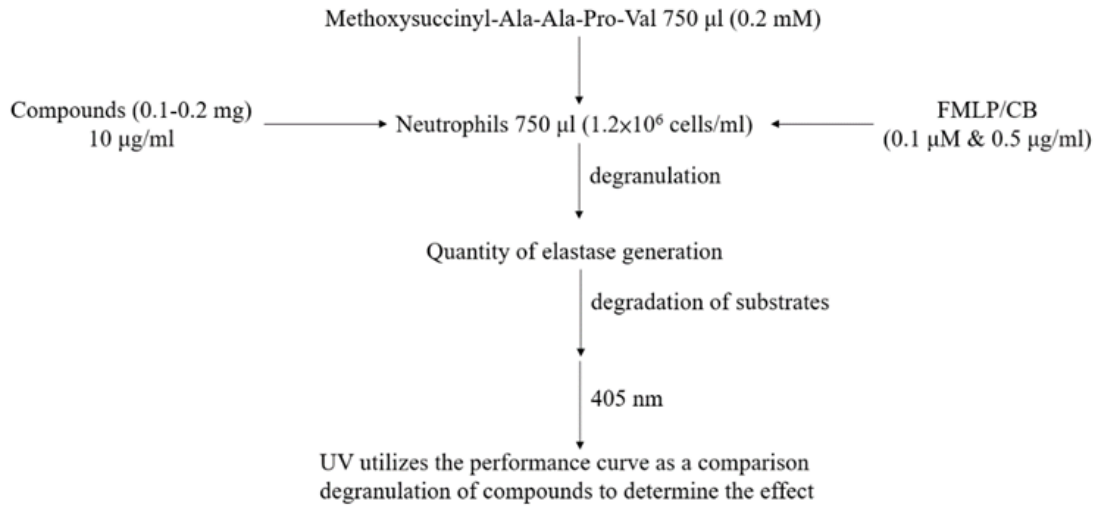
三、天然化合物活性測試

當外來致病原誘發免疫系統過程中，免疫反應起始於先天免疫反應，主要作用為清除大部分的外來致病原，使生物體恢復正常狀態。嗜中性白血球(neutrophils) 在免疫反應中扮演主要的角色，嗜中性白血球通常是人體受傷時最先被活化且先到達感染的區域，當嗜中性白血球在對抗病原菌時，會進行吞噬作用並分泌酵素和一些過氧化物。而發炎反應導致的超氧化離子(superoxide anion)被廣為研究。嗜中性白血球在發炎的過程中，除了產生超氧陰離子外，也會產生彈性蛋白酶(elastase)等酵素，嗜中性白血球所分泌的彈性蛋白酶，其主要功能是水解彈性纖維蛋白，協助分解受傷的細胞及入侵的病原菌，讓血管擴張及細胞通透性增加，協助中性白血球對抗病原菌，但是若過度活化反而會造成嚴重發炎反應。故天然藥物抑制嗜中性白血球產生的免疫反應，是評估天然藥物對抑制發炎反應的藥物篩選之一^{12, 13}。

實驗藉由 N-formyl-methionyl-leucylphenylalanine/cytochalasin B (fMLP/CB) 刺激嗜中性白血球產生彈性纖維蛋白酶以及超氧陰離子，進行兩者的測定，使用紫外光可見光譜儀，分別於波長 405 nm 和 550 nm 下測量其吸光值，因此可測試待測物對抗超氧化合物的能力。本實驗將純化得到的化合物委請長庚大學黃聰龍教授進行抗發炎活性實驗。

1. Degranulation 測定法

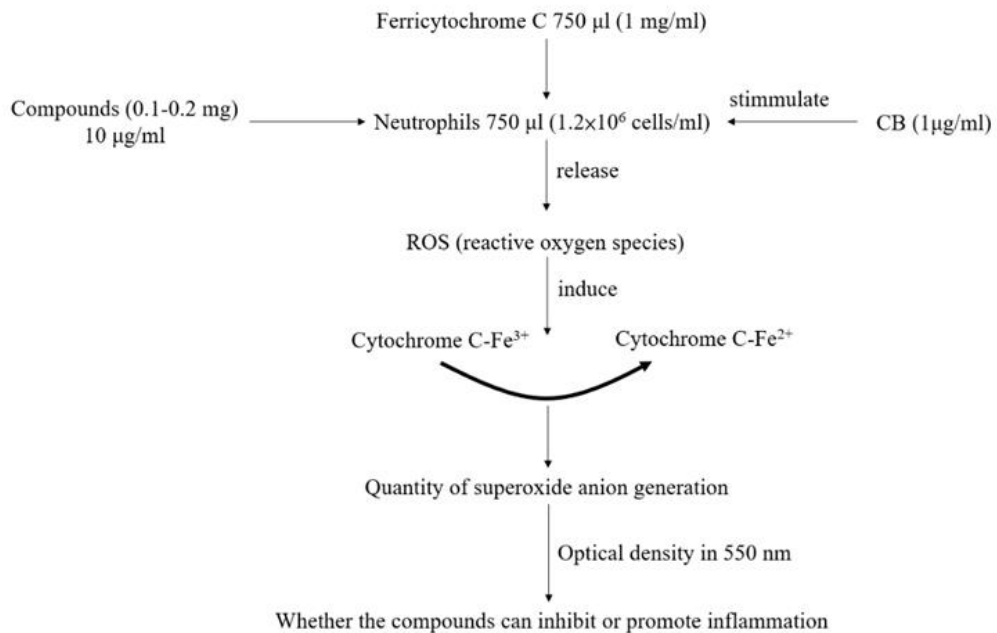
當嗜中性白血球受 N-formyl-methionyl-leucyl phenylalanine/cytochalasin (fMLP/CB) 刺激後會進行 degranulation 反應，其所釋放的酵素(elastase) 會分解 methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val (substrate)，而在 405 nm 吸收光的曲線便會上升。使用 cytochalasin B 以增強 fMLP 活化嗜中性白血球的反應表現。實驗測試的藥物若可抑制 degranulation 的表現，則 405 nm 吸收光的曲線上升的幅度便會減小，利用其曲線之相互表現作為比較，判斷實驗藥物對 degranulation 的影響(圖六)。



圖六、Degranulation 試驗之實驗流程圖

2. Superoxide 測定法

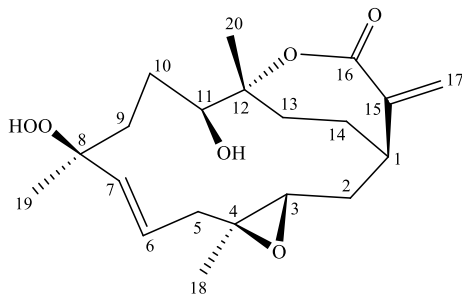
利用 fMLP (N-formyl-methionyl-leucyl phenylalanine) 刺激嗜中性白血球釋放 ROS (reactive oxygen species)，ROS 將 cytochrome C - Fe^{3+} 還原成 cytochrome C - Fe^{2+} ，並經由 cytochalasin B 將訊號放大，此時溶液會呈粉紅色，再以分光光譜儀於 550 nm 檢測其吸光值，並計算 superoxide 生成量，判斷化合物是否能抑制發炎反應 (圖七)。



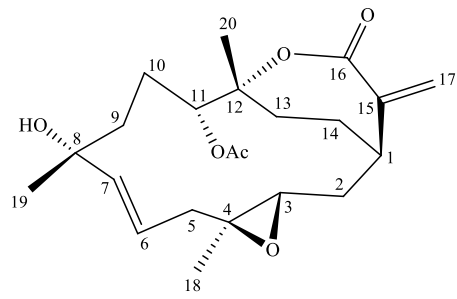
圖七、Superoxide anoin 試驗之實驗流程圖

伍、研究結果及討論

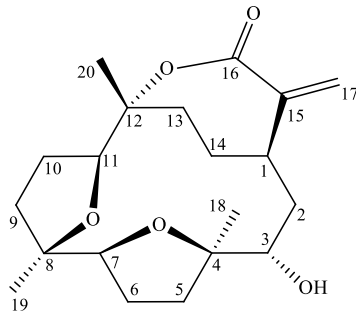
本科展針對臺灣恆春半島海域所採集的櫟葉指形軟珊瑚 *Sinularla querciformis* 進行天然物化學成分研究，由此珊瑚中分離出兩個新型菸草烷類型天然化合物，分別是 Querciformolide G (1)與 Querciformolide H (2)，以及兩個已知菸草烷類型天然化合物，分別是 Sinularparvalide B (3)與 3,4:8,11-Bisepoxy-7-hydroxycembra-15(17)-en-1,12-olide (4)，其化學結構與結構解析如下：



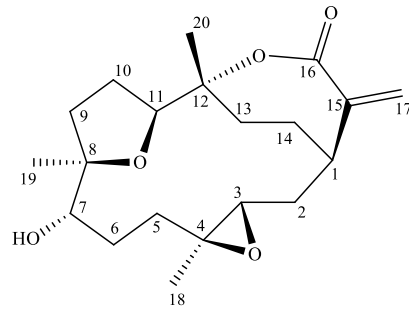
1



2

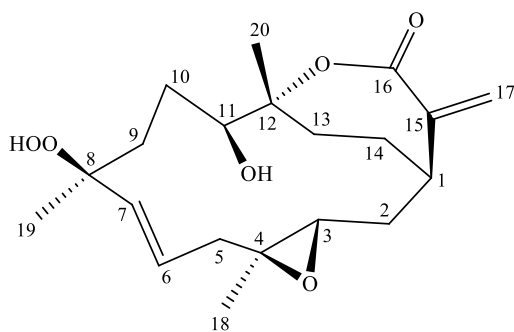


3



4

(一)、Querciformolide G (1) 化合物構造之解析

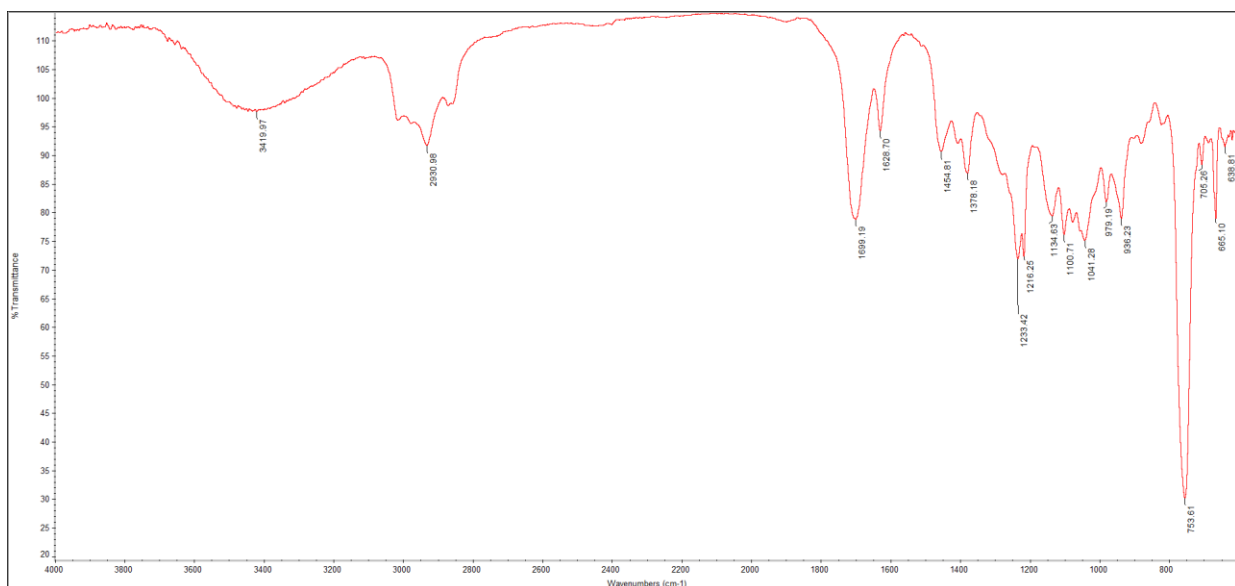


1. 分離條件：利用正相 HPLC 進行分離其沖提溶液比例為 *n*-hexane/Ethyl acetate (3:2)，分離後得到化合物 **1** (4.9 mg)。
2. 化合物性質：白色油狀物。
3. IR (neat, CHCl₃) (圖八)：3419 cm⁻¹ (hydroxyl group)、1699 cm⁻¹ (α,β -unsaturated carbonyl group)。
4. 質譜儀：高解析 HRESIMS (圖九)：實驗值 *m/z* 389.19342 [M+Na]⁺，定出其分子式為 C₂₀H₃₀O₆，具有 6 個不飽和度。
5. ¹H NMR 圖譜 (圖十) 及 HMQC (圖十三)：可發現有 1 個雙鍵次甲基(δ_{H} 5.73, ddd, *J*=16.0, 9.6, 6.0 Hz; δ_{H} 5.60, d, *J*=16.0 Hz)、4 個亞甲基(δ_{H} 6.30, s; δ_{H} 5.47, s; δ_{H} 2.74, dd, *J*=9.6, 8.8 Hz; δ_{H} 2.31, m; δ_{H} 2.17, m; δ_{H} 1.98, m; δ_{H} 1.88, m; δ_{H} 1.86, m; δ_{H} 1.81, m; δ_{H} 1.51, m; δ_{H} 1.40, m)、3 個次甲基(δ_{H} 3.62, d, *J*=10.4 Hz; δ_{H} 2.94, dd, *J*=10.8, 3.6 Hz; δ_{H} 2.59, m)、3 個甲基(δ_{H} 1.42, s; δ_{H} 1.40, s; δ_{H} 1.26, s)。
6. ¹³C-NMR (圖十一) 和 DEPT (圖十二) 圖譜：得知化合物 **1** 有 20 個碳，其中包含 3 個甲基 (methyl)、7 個亞甲基 (methylene，其中 1 個為雙鍵上的碳 δ_{C} 124.7)、5 個次甲基 (methine，其中有 2 個為帶有氧原子的碳 δ_{C} 75.4、61.3，以及 2 個雙鍵上的碳 δ_{C} 135.0、128.5) 及 5 個四級碳(quaternary carbon 包含 1 個雙鍵上的碳 δ_{C} 144.2、1 個 carbonyl group δ_{C} 169.3 和 3 個帶有氧原子的碳 δ_{C} 88.6、85.1、75.4)，藉由以上資訊可推測化合物 **1** 為一雙萜類。由 NMR 圖譜的訊號顯示在 δ_{C} 169.3、144.2、124.7、88.6、36.1、33.3 和 31.8 及 δ_{H} 6.30 (1H, s) 和 5.47 (1H, s) 推測化合物 **1** 具有一組 α -exomethylenic- ϵ -lactone ring。

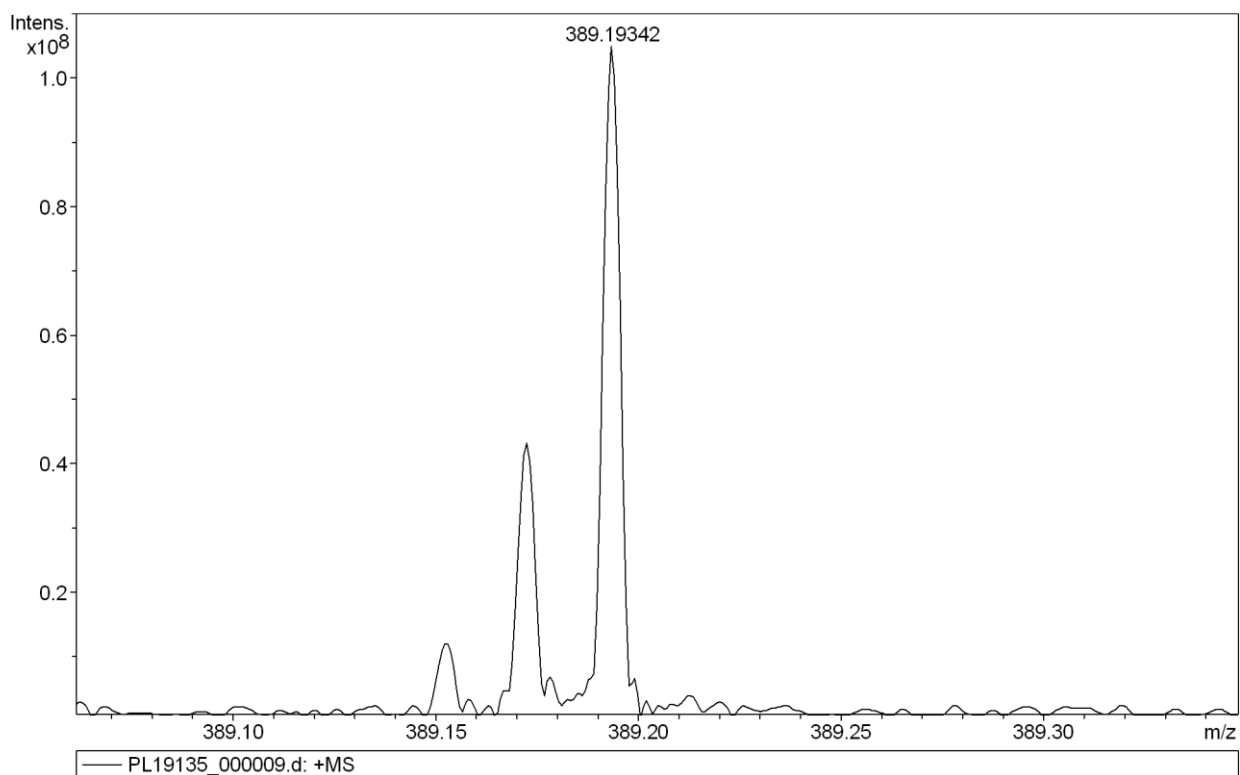
7. COSY 及 HMBC : ^1H - ^1H COSY (圖十四) 和 HMBC 圖譜 (圖一十五)中彼此之間的關聯。
8. NOESY 圖譜：藉由 NOESY 圖譜(圖一十六)之間的關聯確認化合物之立體位向。

表一、化合物 1 的 ^1H 與 ^{13}C NMR 數據

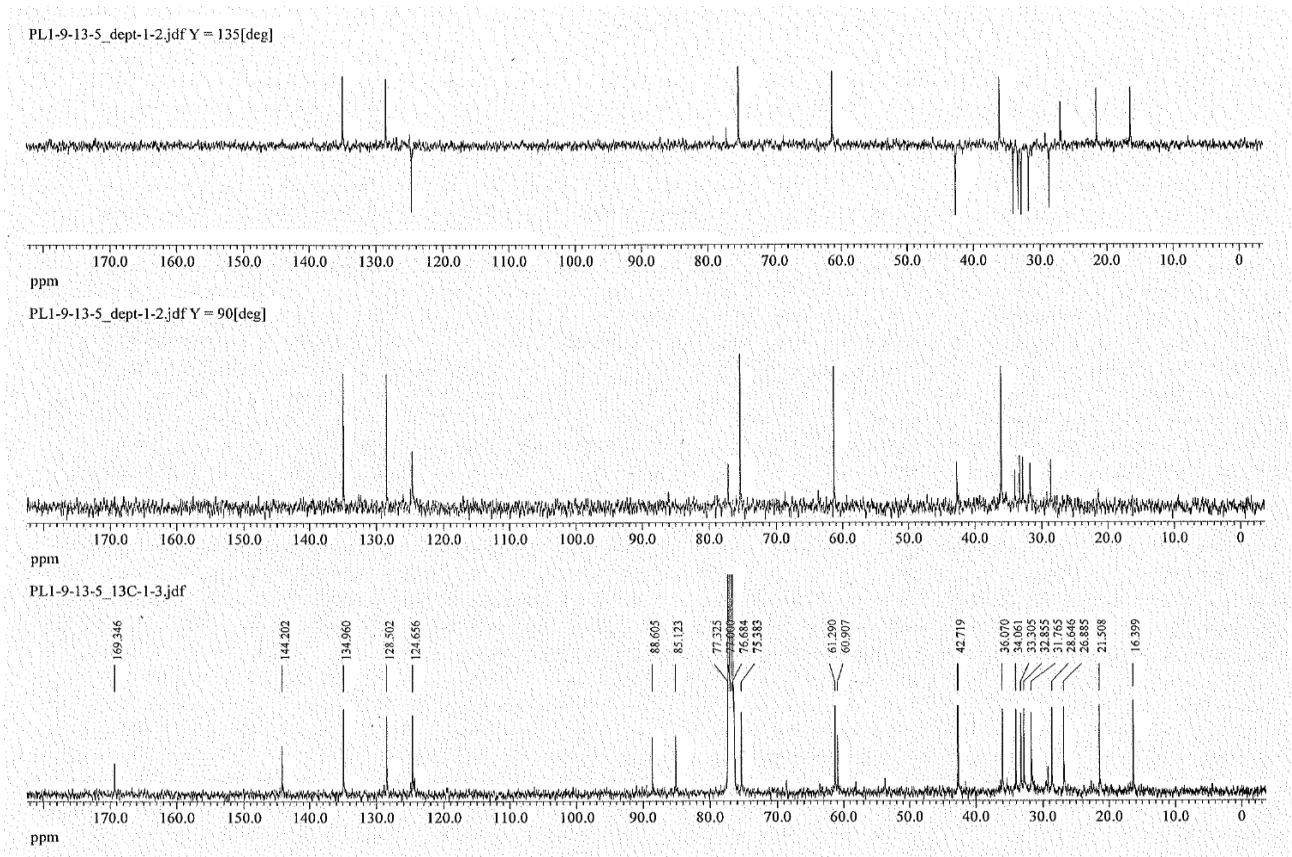
position	^1H	^{13}C
1	2.59 m	36.1 (CH)
2	1.40 m	32.9 (CH ₂)
3	2.94 dd (10.8, 3.6)	61.3 (CH)
4		60.9 (C)
5	α :1.81 m; β :2.73 dd (9.6, 8.8)	42.7 (CH ₂)
6	5.73 ddd (16.0, 9.6, 6.0)	128.5 (CH)
7	5.60 d (16.0)	135.0 (CH)
8		85.1 (C)
9	1.88 m	34.1 (CH ₂)
10	a:1.51 m; b:1.86 m	28.6 (CH ₂)
11	3.62 d (10.4)	75.4 (CH)
12		88.6 (C)
13	α :2.43 dd (15.0, 6.5); β :1.82 m	33.3 (CH ₂)
14	α :2.06 m; β :1.04 ddd (12.0, 12.0, 6.5)	31.8 (CH ₂)
15		144.2 (C)
16		169.3 (C)
17	6.34 s; 5.49 s	124.7 (CH ₂)
18	1.13 s	16.4 (CH ₃)
19	1.25 s	21.5 (CH ₃)
20	1.46 s	26.9 (CH ₃)



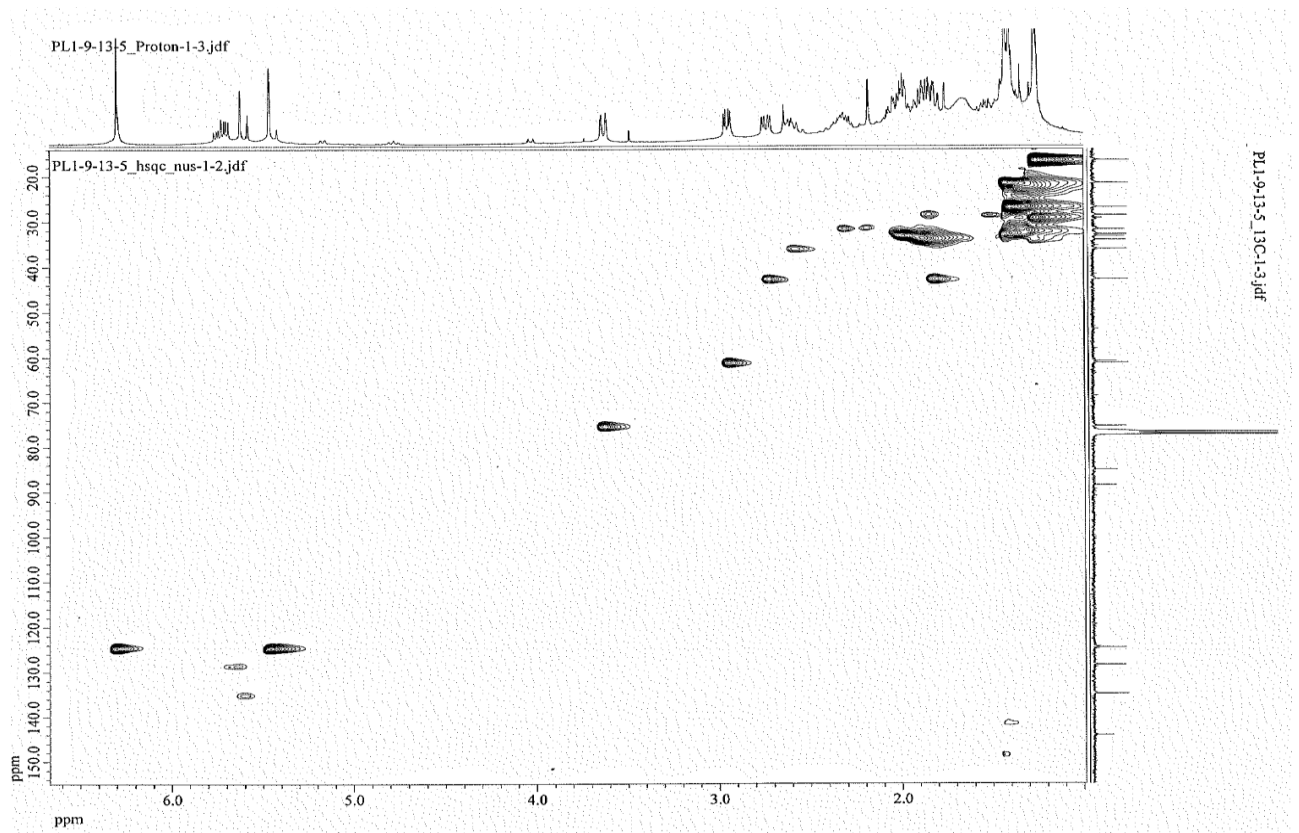
圖八、化合物 1 之紅外線圖譜



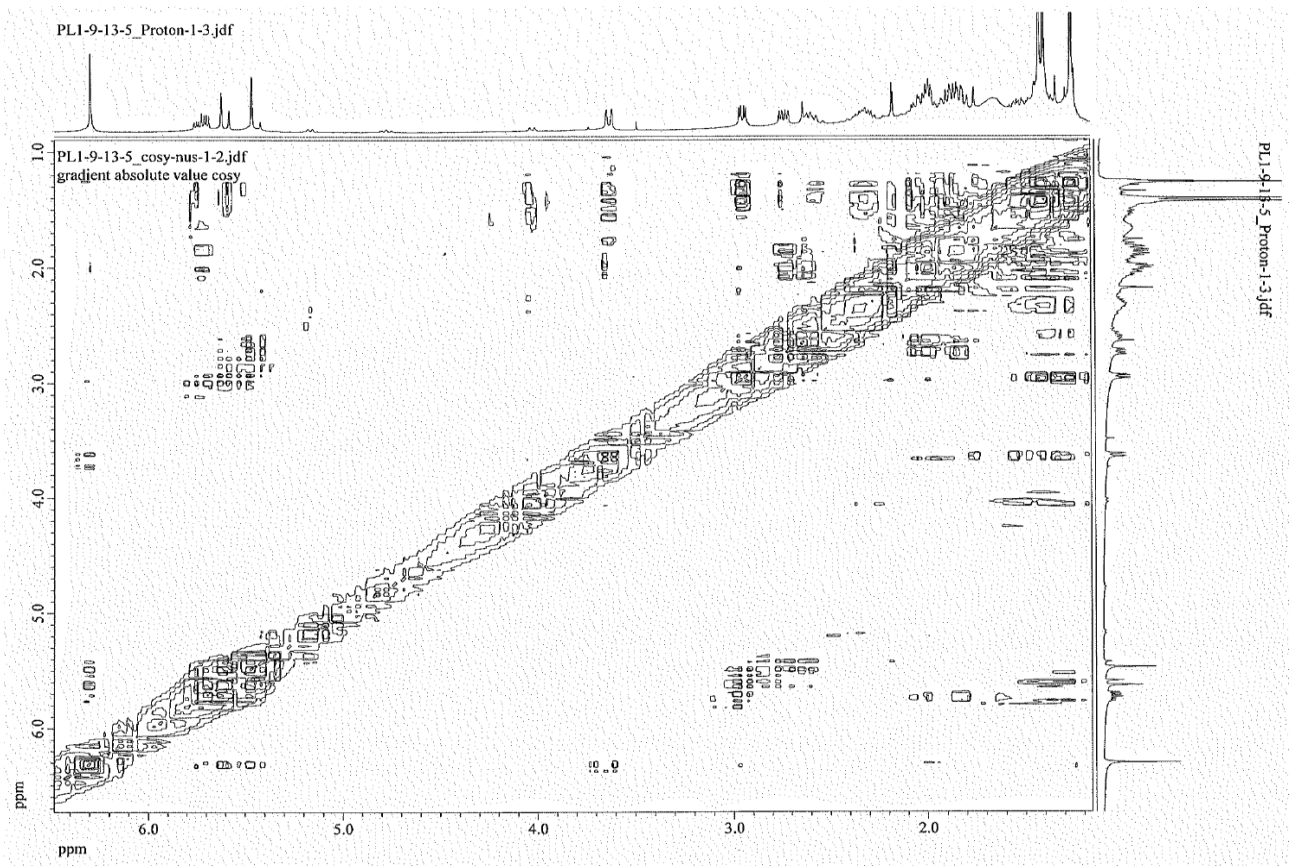
圖九、化合物 1 之高解析質譜圖譜



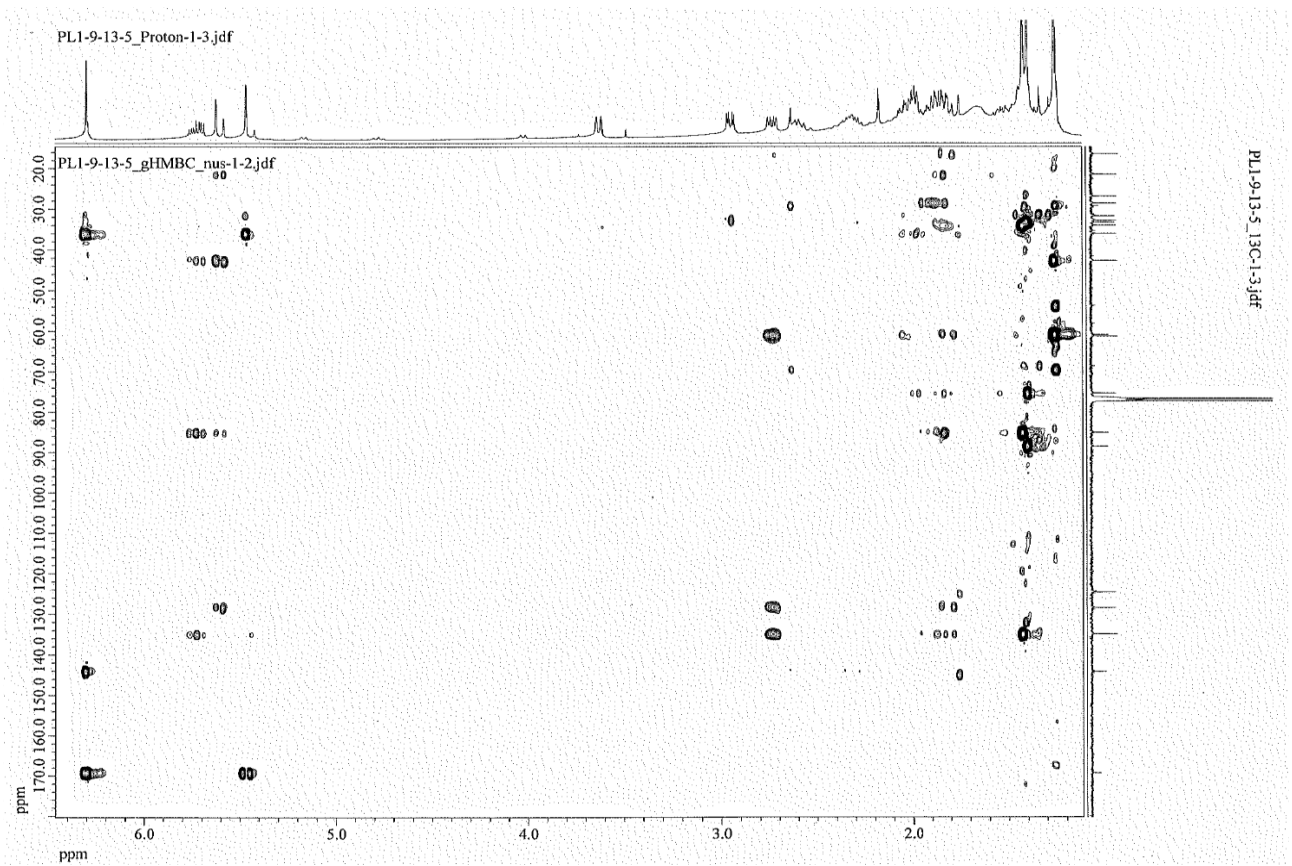
圖十二、化合物 1 之 DEPT 圖譜



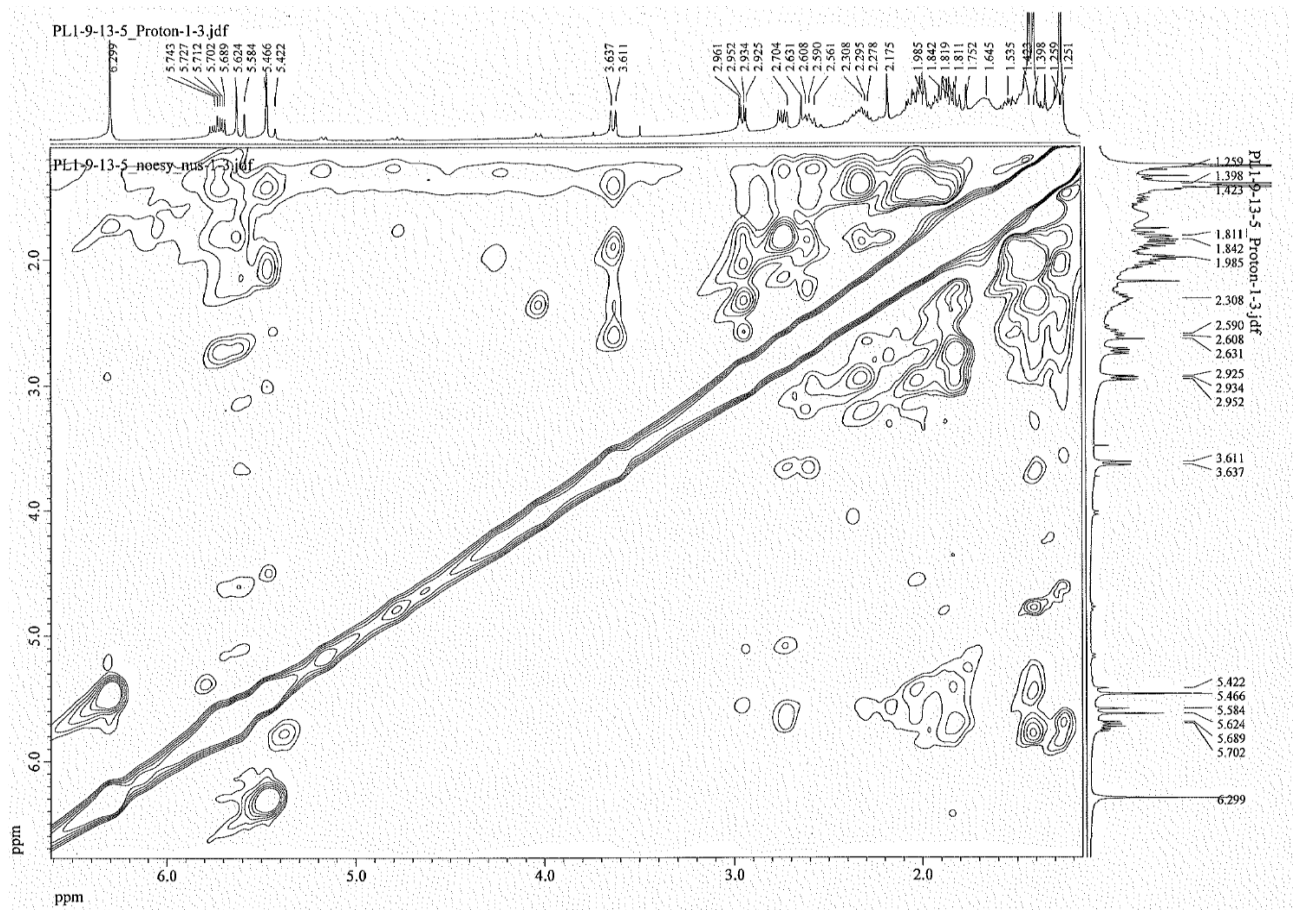
圖十三、化合物 1 之 HSQC 圖譜



圖一十四、化合物 1 之 COSY 圖譜

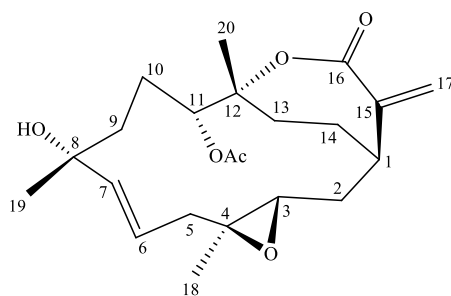


圖一十五、化合物 1 之 HMBC 圖譜



圖一十六、化合物 1 之 NOESY 圖譜

(二)、Querciformolide H (2) 化合物構造之解析

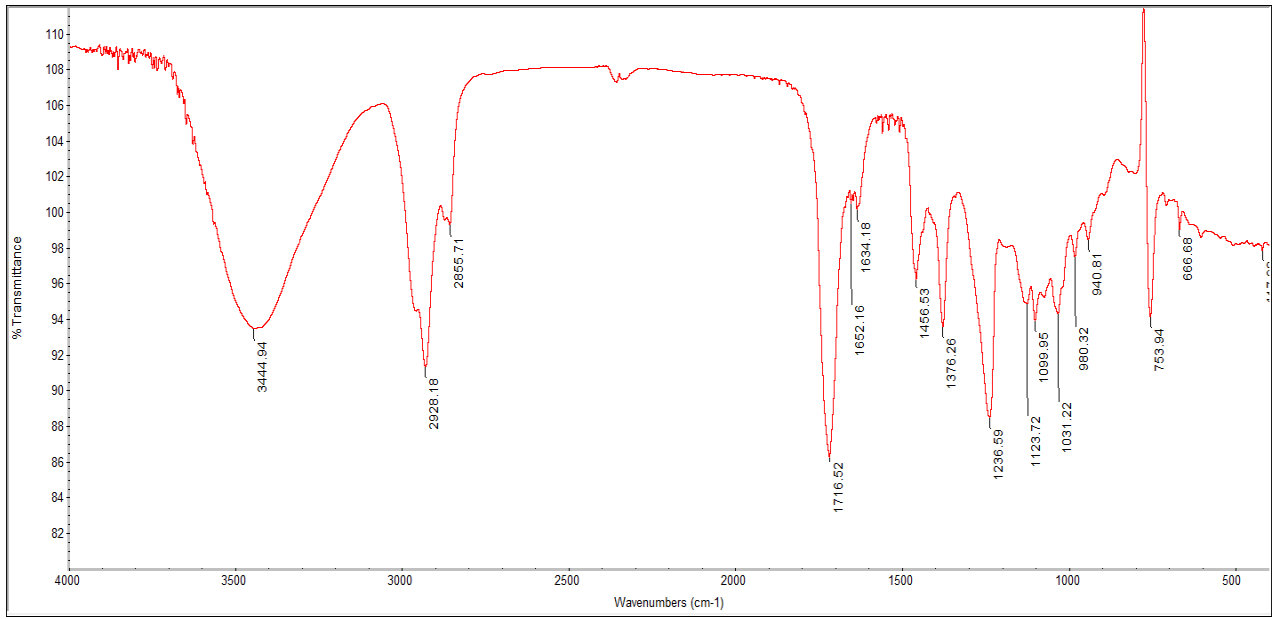


1. 分離條件：利用正相 HPLC 進行分離其沖提溶液比例為 *n*-hexane/Ethyl acetate/Acetone (3:1:1)，分離後得到化合物 **2** (0.9 mg)。
2. 化合物性質：白色油狀物。
3. IR (neat, CHCl₃) (圖一十七)：3444 cm⁻¹ (hydroxyl group)、1716 cm⁻¹ (α,β-unsaturated carbonyl group)。
4. 質譜儀：高解析 HRESIMS (圖一十八): 實驗值 *m/z* 415.20931 [M+Na]⁺，定出其分子式為 C₂₂H₃₂O₆，具有 7 個不飽和度。
5. ¹H NMR 圖譜 (圖一十九) 及 HMQC (圖二十一)：可發現有 1 個雙鍵次甲基 (δ_H 5.68, ddd, *J*=16.2, 9.6, 6.0 Hz; δ_H 5.61, d, *J*=16.2 Hz)、4 個亞甲基 (δ_H 6.32, s; δ_H 5.48, s; δ_H 2.68, dd, *J*=6.6, 6.0 Hz; δ_H 2.36, m; δ_H 2.05, m; δ_H 2.03, m; δ_H 1.94, m; δ_H 1.81, m; δ_H 1.81, m; δ_H 1.79, m; δ_H 1.63, m; δ_H 1.54, m; δ_H 1.42, m)、3 個次甲基 (δ_H 5.15, dd, *J*=9.6, 3.0 Hz; δ_H 2.96, dd, *J*=10.8, 3.6 Hz; δ_H 2.60, m)、4 個甲基 (δ_H 2.14, s; δ_H 1.34, s; δ_H 1.31, s; δ_H 1.27, s)。
6. ¹³C-NMR (圖二十) 圖譜：得知化合物 **2** 有 22 個碳，其中包含 4 個甲基 (methyl)、7 個亞甲基 (methylene，其中 1 個為雙鍵上的碳 δ_C 124.9)、5 個次甲基 (methine，其中有 2 個為帶有氧原子的碳 δ_C 76.7、60.8，以及 2 個雙鍵上的碳 δ_C 138.8、125.3) 及 5 個四級碳 (quaternary carbon 包含 1 個雙鍵上的碳 δ_C 143.8、1 個 carbonyl group δ_C 169.8 和 3 個帶有氧原子的碳 δ_C 86.8、73.1、60.8)，藉由以上資訊可推測化合物 **2** 為一雙萜類。由 NMR 圖譜的訊號顯示在 δ_C 169.8、143.8、124.9、86.8、35.9、34.4 和 31.1 及 δ_H 6.32 (1H, s) 和 5.48 (1H, s) 推測化合物 **2** 具有一組 α-exomethylene-ε-lactone ring。

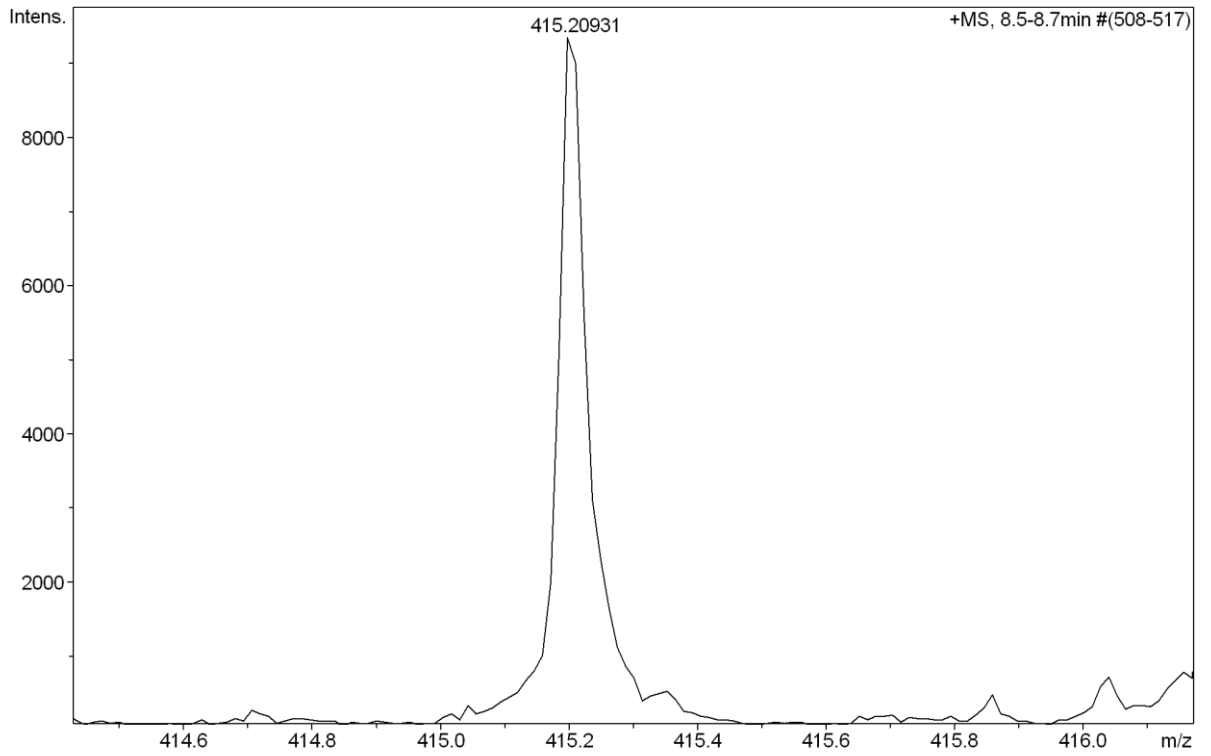
7. COSY 及 HMBC : ^1H - ^1H COSY (圖二十二) 和 HMBC 圖譜 (圖二十三)中彼此之間的關聯。
8. NOESY 圖譜：藉由 NOESY 圖譜(圖二十四)之間的關聯確認化合物之立體位向。

表二、化合物 2 的 ^1H 與 ^{13}C NMR 數據

position	^1H	^{13}C
1	2.60 m	35.9 (CH)
2	2.05 m; 1.42 m	32.9 (CH ₂)
3	2.96 dd (10.8, 3.6)	60.8 (CH)
4		60.8 (C)
5	2.68 dd (6.6, 6.0); 1.81 m	42.4 (CH ₂)
6	5.68 ddd (16.2, 9.6, 6.0)	125.3 (CH)
7	5.61 d (16.2)	138.8 (CH)
8		73.1 (C)
9	1.63 m; 1.63 m	38.2 (CH ₂)
10	1.79 m	26.6 (CH ₂)
11	5.16 dd (9.6, 3.0)	76.7 (CH)
12		86.8 (C)
13	2.03 m; 1.94 m	34.4 (CH ₂)
14	2.36 m; 1.39 m	31.1 (CH ₂)
15		143.8 (C)
16		169.8 (C)
17	6.32 s; 5.48 s	124.9 (CH ₂)
18	1.27 s	16.4 (CH ₃)
19	1.34 s	30.9 (CH ₃)
20	1.31 s	26.8 (CH ₃)
OAc	2.14 s	20.9 (CH ₃) 170.9 (C)

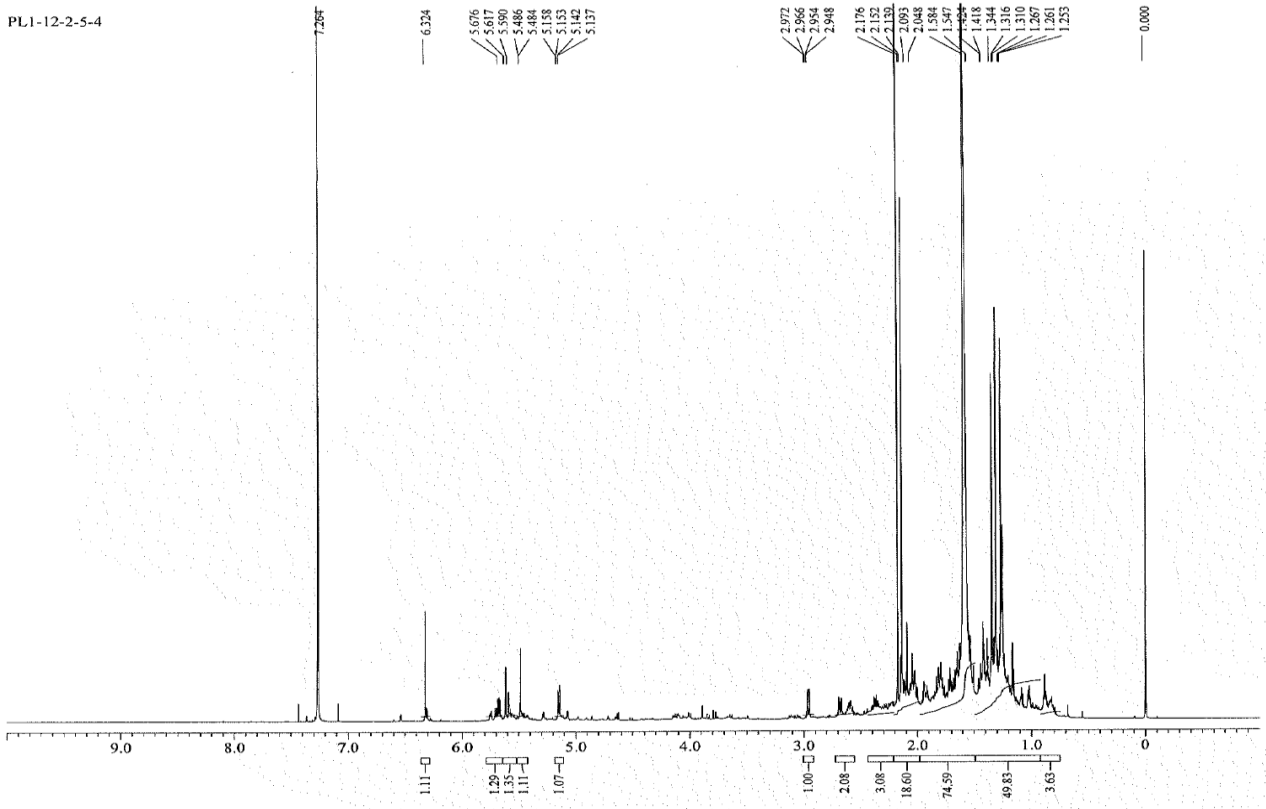


圖一十七、化合物 2 之紅外線圖譜



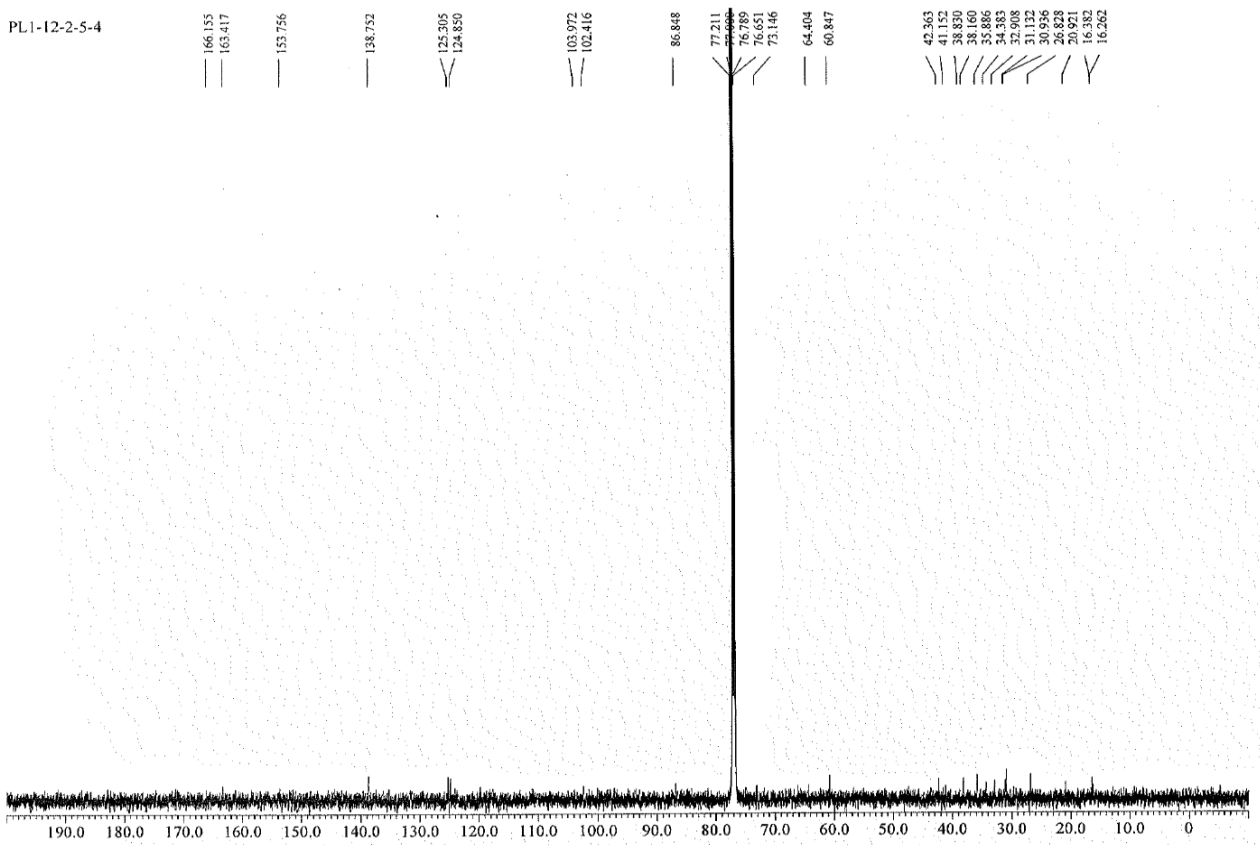
圖一十八、化合物 2 之高解析質譜圖譜

PL1-12-2-5-4

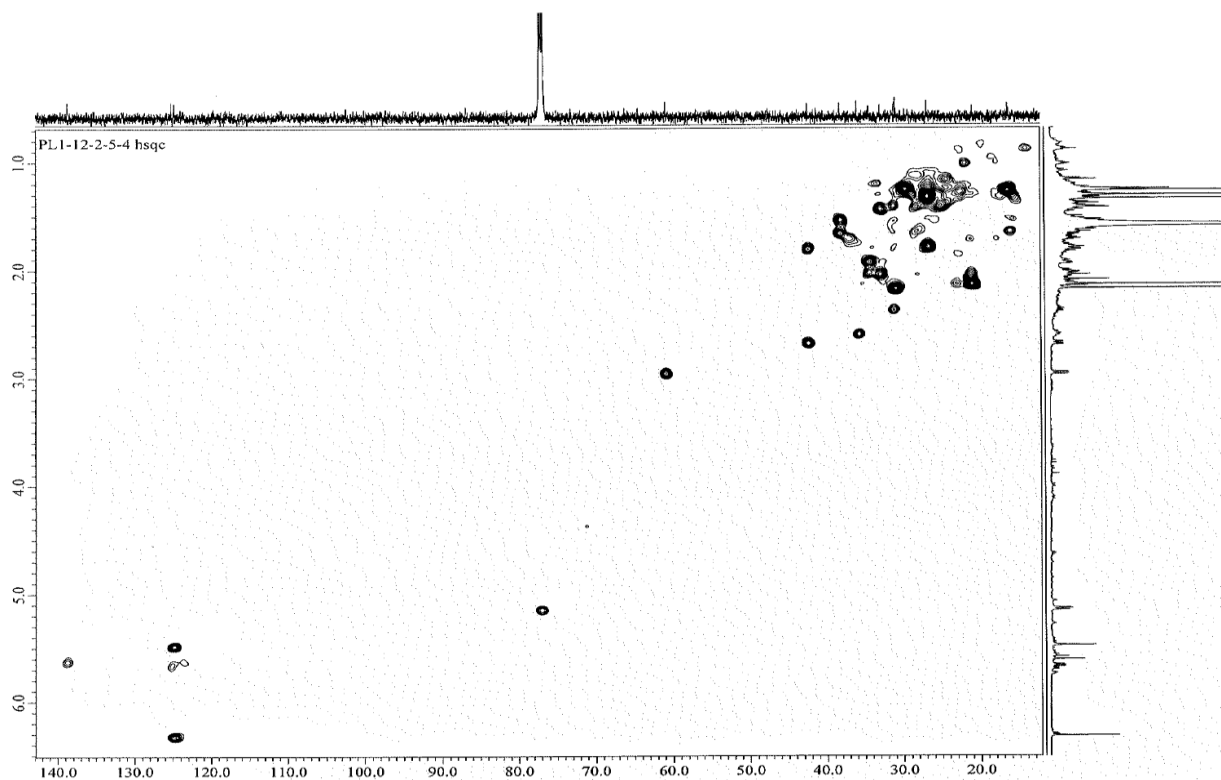


圖一十九、化合物 2^1H-NMR 圖譜

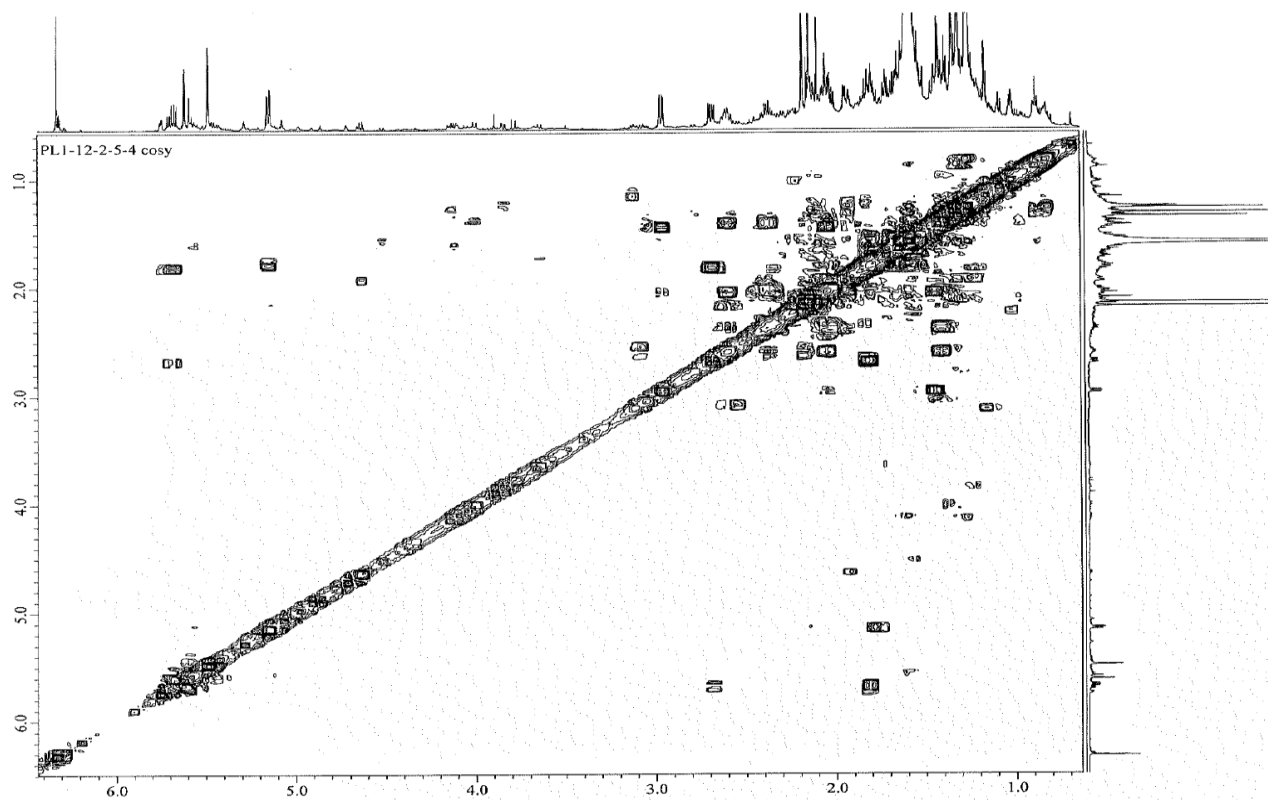
PL1-12-2-5-4



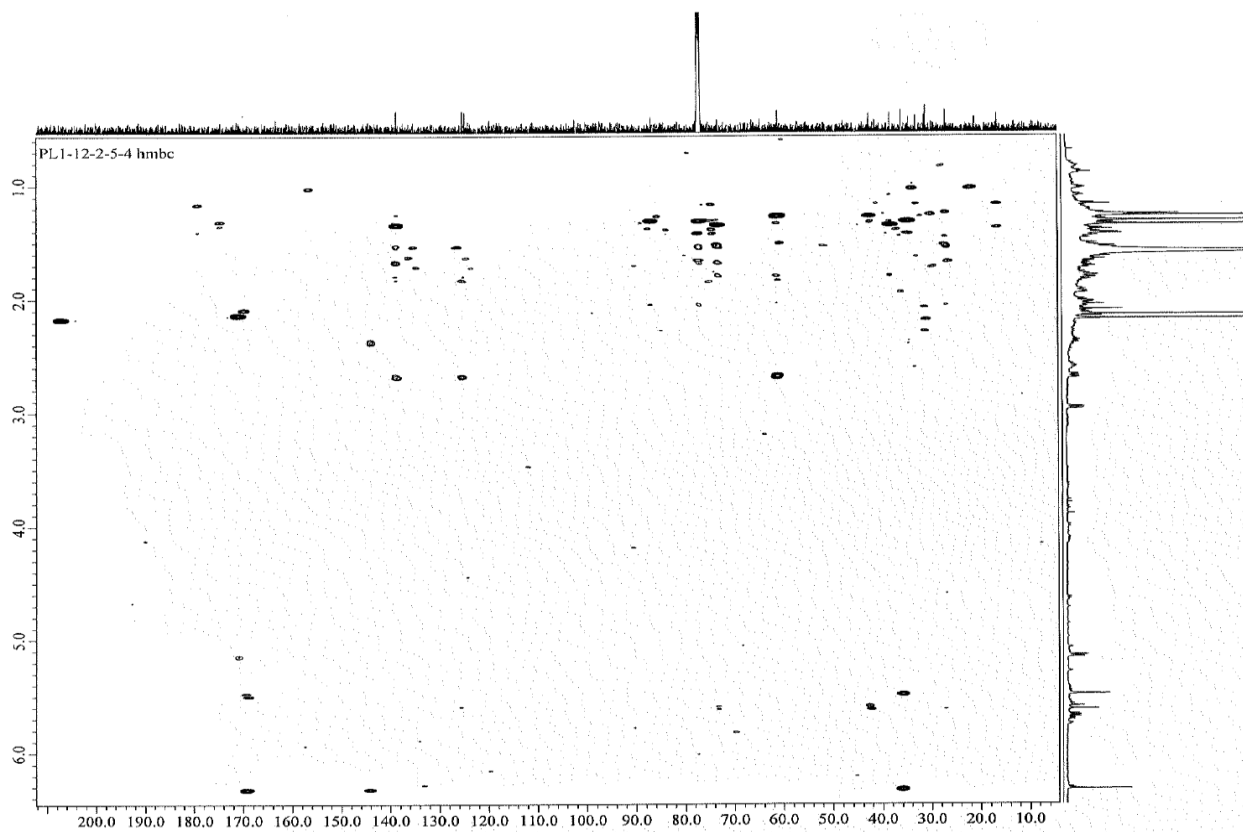
圖二十、化合物 2^{13}C-NMR 圖譜



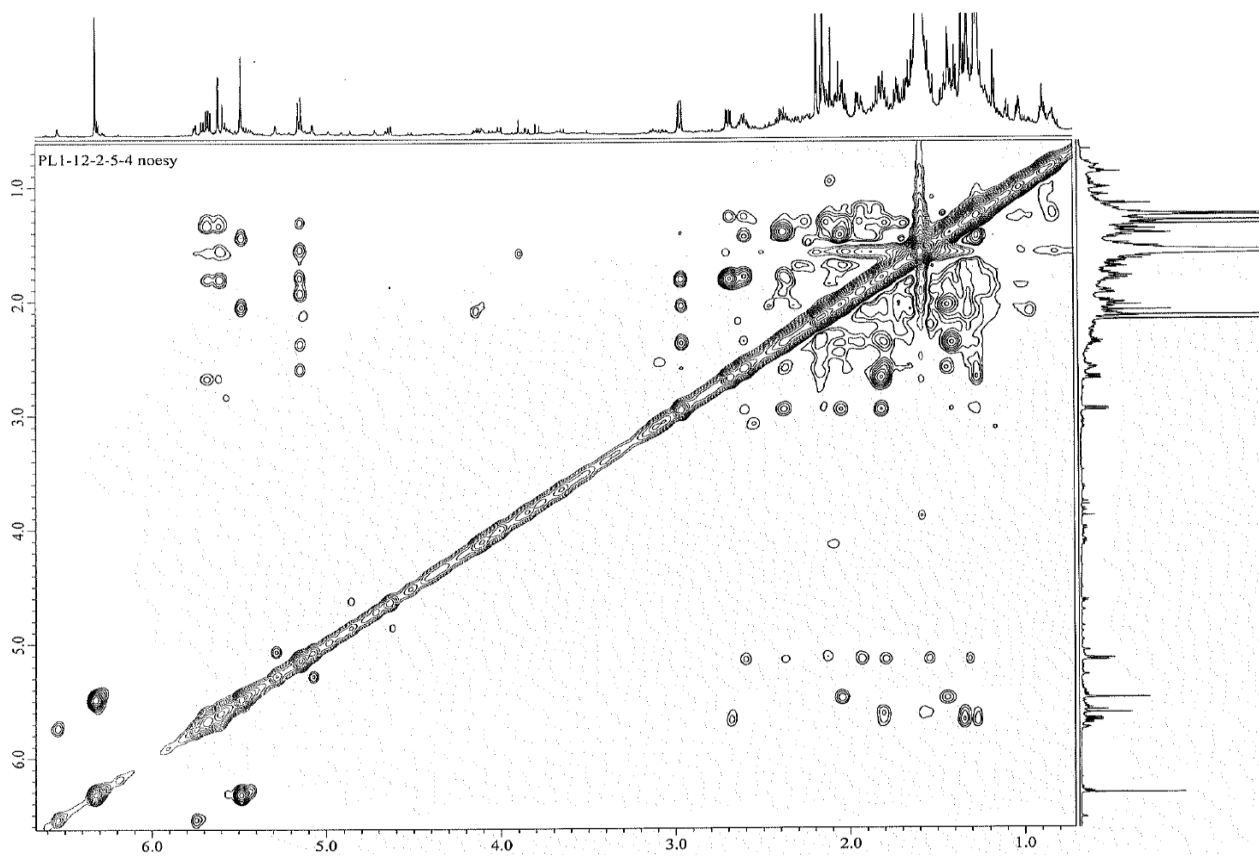
圖二十一、化合物 2 之 HSQC 圖譜



圖二十二、化合物 2 之 COSY 圖譜

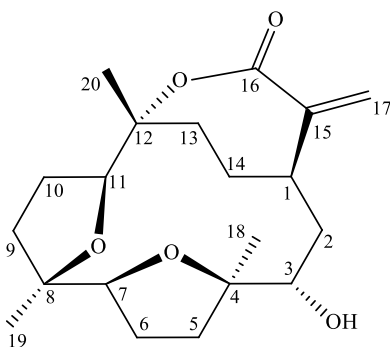


圖二十三、化合物 2 之 HMBC 圖譜



圖二十四、化合物 2 之 NOESY 圖譜

(三)、Sinularparvalide B (3) 化合物構造之解析

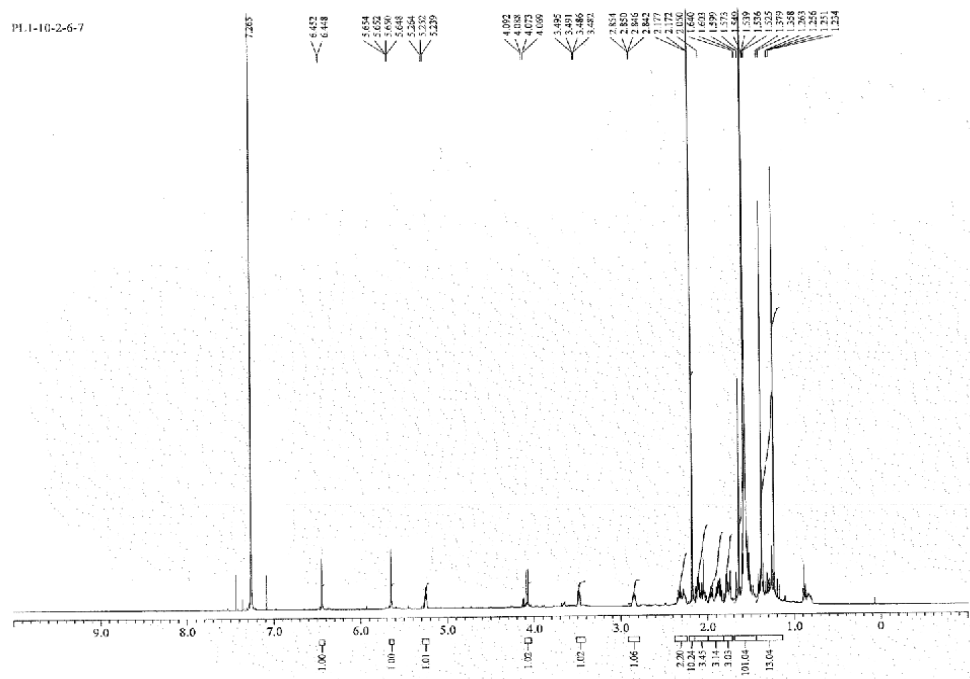


1. 分離條件：利用正相 HPLC 進行分離其沖提溶液比例為 *n*-hexane/Ethyl acetate/Acetone (3:1:1)，分離後得到化合物 **3** (1.8 mg)。
2. 化合物性質：白色油狀物。
3. ^1H NMR 圖譜(圖二十五)：可發現有 4 個次甲基、3 個甲基、8 個亞甲基、1 個甲基。
4. 化合物 **3** 的 ^1H NMR 圖譜經由比對後發現化合物 **3** 和 2009 年由 Li 等人發表在 *Helv. Chim. Acta* 的化合物 sinularparvalide B 有相同的氫值，因此確定化合物 **3** 為已知化合物 sinularparvalide B¹⁴。

表三、化合物 3 的 ^1H 與 ^{13}C NMR 數據

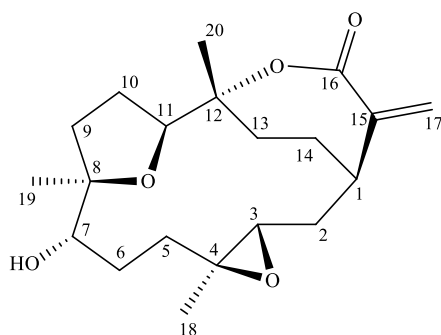
position	^1H	^{13}C
1	4.81 m	31.5 (CH)
2	1.50 m; 2.02 m	37.2 (CH ₂)
3	3.70 dd (10.0, 2.4)	74.9 (CH)
4		85.5 (C)
5	1.87 m; 2.12 m	38.1 (CH ₂)
6	1.75 m; 2.03 m	28.1 (CH ₂)
7	4.05 t (6.6)	82.7 (CH)
8		84.1 (C)
9	1.65 m; 1.96 m	33.1 (CH ₂)
10	1.75 m; 2.15 m	27.0 (CH ₂)
11	4.24 d (6.6)	81.2 (CH)
12		87.1 (C)
13	1.95 m; 2.022 m	32.1 (CH ₂)
14	1.12 m; 2.15 m	31.9 (CH ₂)
15		146.1 (C)
16		170.0 (C)
17	6.22 s; 5.40 s	122.4 (CH ₂)
18	1.21 s	20.8 (CH ₃)
19	1.21 s	25.6 (CH ₃)
20	1.32 s	31.2 (CH ₃)

PI.1-10-2-6-7



圖二十五、化合物 3 之 $^1\text{H-NMR}$ 圖譜

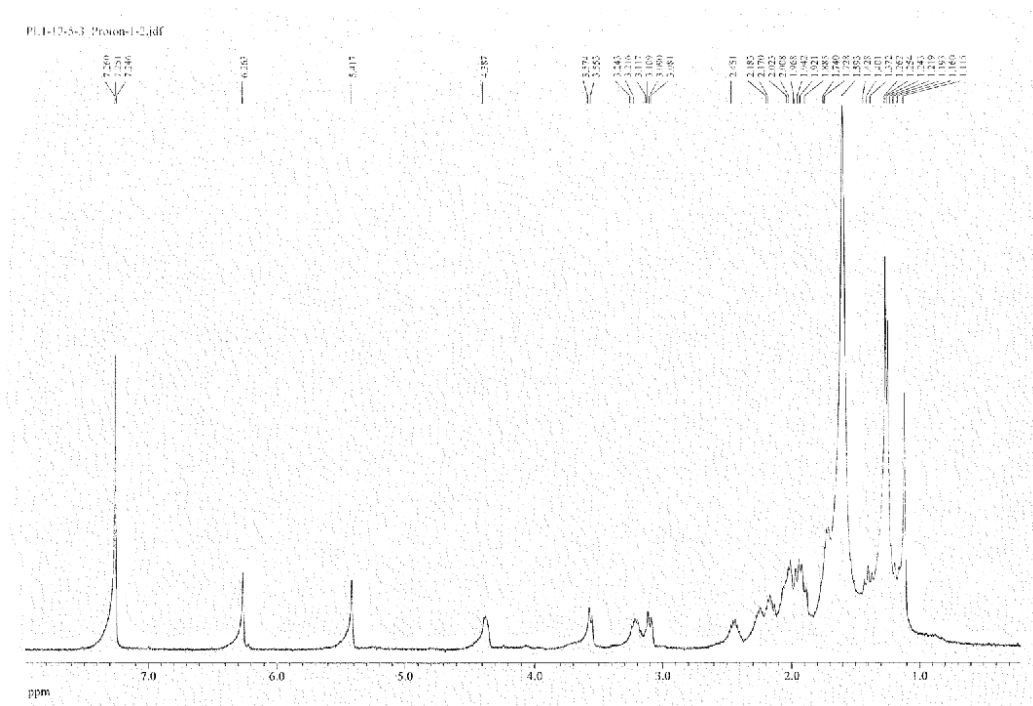
(四)、3,4:8,11-Bisepoxy-7-hydroxycembra-15(17)-en-1,12-olide (**4**)化合物構造之解析



1. 分離條件：利用正相 HPLC 進行分離其沖提溶液比例為 *n*-hexane/Ethyl acetate/Acetone (3:1:1)，分離後得到化合物 **4** (1.4 mg)。
2. 化合物性質：白色油狀物。
3. ^1H NMR 圖譜(圖二十六)：可發現有 4 個次甲基、3 個甲基、8 個亞甲基、1 個甲基。
4. 化合物 **4** 的 ^1H NMR 圖譜經由比對後發現化合物 **4** 和 2009 年由 Li 等人發表在 Nat. Prod. Res. 的化合物 3,4:8,11-bisepoxy-7-hydroxycembra-15(17)-en-1,12-olide 有相同的氫值，因此確定化合物 **4** 為已知化合物 3,4:8,11-bisepoxy-7-hydroxycembra-15(17)-en-1,12-olide¹⁵。

表四、化合物 4 的 ^1H 與 ^{13}C NMR 數據

position	^1H	^{13}C
1	2.97 m	34.9 (CH)
2	1.50 m; 2.02 m	29.8 (CH ₂)
3	3.05 dd (10.4, 3.2)	60.8 (CH)
4		59.9 (C)
5	1.87 m; 2.12 m	35.7 (CH ₂)
6	1.75 m; 2.03 m	27.3 (CH ₂)
7	3.56 d (6.6)	77.9 (CH)
8		85.4 (C)
9	1.65 m; 1.96 m	34.3 (CH ₂)
10	1.75 m; 2.15 m	26.8 (CH ₂)
11	4.34 d (8.0)	83.5 (CH)
12		88.2 (C)
13	1.95 m; 2.022 m	33.6 (CH ₂)
14	1.12 m; 2.15 m	33.2 (CH ₂)
15		145.6 (C)
16		169.6 (C)
17	6.22 s; 5.40 s	123.6 (CH ₂)
18	1.26 s	17.0 (CH ₃)
19	1.30 s	29.3 (CH ₃)
20	1.14 s	16.4 (CH ₃)



圖二十六、化合物 4 之 $^1\text{H-NMR}$ 圖譜

(五)、抗發炎活性試驗

將櫟葉指形軟珊瑚 *Sinularla querciformis* 分離純化得到的化合物 1-4，進行因受到 fMLP/cytochalastin B 刺激人類嗜中性白血球而產生超氧離子(superoxide anion) 與彈性蛋白酶(elastase) 的抗發炎活性試驗。實驗結果發現化合物 2 對彈性蛋白酶有顯著抑制活性，如下表所示：

表五、Effects of pure compounds on superoxide anion generation and elastase release in fMLF/CB-induced human neutrophils.

compounds	superoxide anion	Elastase release	
	Inh %	IC ₅₀ (μM)	Inh %
1	11.24 ± 3.15		14.02 ± 1.87
2	43.40 ± 5.50	8.09 ± 0.96	
3	10.91 ± 3.40		13.27 ± 2.69
4	9.68 ± 2.21		6.50 ± 0.84

Percentage of inhibition (Inh %) at 1 μM. Results are presented as mean ± S.E.M. (n = 3). ** P < 0.01 compared with the control (DMSO).

陸、結論

- 一、櫟葉指形軟珊瑚 *Sinularla querciformis* 進行天然物化學成分研究，由此珊瑚中分離出四個萜草烷類型天然化合物，分別是兩個新型天然化合物 Querciformolide G (1)與 Querciformolide H (2)，以及兩個已知天然化合物，分別是 Sinularparvalide B (3)與 3,4:8,11-Bisepoxy-7-hydroxycembra-15(17)-en-1,12-olide (4)。
- 二、將分離純化得到的化合物 1-4，分別對細胞產生超氧離子(superoxide anion) 與彈性蛋白酶(elastase) 的抗發炎活性試驗。發現化合物 2 對彈性蛋白酶有顯著抑制活性(IC₅₀ 8.09 ± 0.96 μM)。
- 三、臺灣在過去 30 年針對 *Sinularla* 屬軟珊瑚研究有相當豐碩的成果，本次實驗針對櫟葉指形軟珊瑚 *Sinularla querciformis* 進行分析，雖然只發現四個天然化合物，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、櫟葉指形軟珊瑚 *Sinularla querciformis* 過往之研究相當稀少，本實驗期望可持續針對櫟葉指形軟珊瑚，其代謝化合物結構研究分析。
- 二、發現化合物 2 對彈性蛋白酶有顯著抑制活性(IC₅₀ 8.09 ± 0.96 μM)，目前有針對此化合物進行更深入的結構與生物活性關係之研究，並提供有機合成實驗室進行相關衍生化合物合成之素材，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. Kijjoa, A.; Sawangwong, P. *Mar. Drugs* **2004**, *2*, 73–82.
3. Ruggieri, G. D. *Science* **1976**, *194*, 491–497.
4. <http://adisinsight.springer.com/>
5. Sheu, J.-H.; Sung, P.-J.; Cheng, M.-C.; Liu, H.-Y.; Fang, L.-S.; Duh, C.-Y.; Chiang, M. Y. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 602–608.
6. Sung, P.-J.; Su, J.-H.; Wang, G.-H.; Lin, S.-F.; Duh, C.-Y.; Sheu, J.-H. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 457–463.
7. Sheu, J.-H.; Wang, G.-H.; Sung, P.-J.; Duh, C.-Y.; Chiang, M. Y. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 7639–7648.
8. Sheu, J.-H.; Hung, K.-C.; Wang, G.-H.; Duh, C.-Y. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1603–1607.
9. Duh, C.-Y.; El-Gamal, A. A. H.; Chu, C.-J.; Wang, S.-K.; Dai, C.-F. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1535–1539.
10. Ahmed A. F.; Tai, S.-H.; Wen, Z.-H.; Su, J.-H.; Wu, Y.-C.; Hu, W.-P.; Sheu, J.-H. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 946–951.
11. Chao, C.-H.; Wen, Z.-H.; Wu, Y.-C.; Yeh, H.-C.; Sheu, J.-H. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1819–1824.
12. Hwang, T.-L.; Leu, Y.-L.; Kao, S.-H.; Tang, M.-C.; Chang, H.-L. *Free Radic. Biol. Med.*, **2006**, *41*, 1433–1441.
13. Hwang, T.-L.; Su, Y.-C.; Chang, H.-L.; Leu, Y.-L.; Chung, P.-J.; Kuo, L.-M.; Chang, Y.-J. *J. Lipid Res.*, **2009**, *50*, 1395–1408.
14. Li, Y.; Gao, A.-H.; Huang, H.; Li, J.; Mollo, E.; Gavagnin, M.; Cimino, G.; Gu, Y.-C.; Guo, Y.-C. *Helv. Chim. Acta* **2009**, *92*, 1341–1348.
15. Hsieh, P.-W.; Chang, F.-R.; McPhail, A. T.; Lee, K.-H.; Wu, Y.-C. *Nat. Prod. Res.* **2003**, *17*, 409–418.

【評語】 080001

本研究能自海域中採集櫟葉指形軟珊瑚，並分離出四種化合物，並鑑定出化合物的結構，同時進行初步抗發炎生物活性分析，對高中生而言實屬不容易，研究頗為完整，有分離鑑定化合物結構。

建議：

1. 科學論文成果的呈現，作者尚未證實所採物種是否為櫟葉指形軟珊瑚，必須有更仔細的對照組及求證。
2. 四種化合物鑑定的方法所提供之圖譜不一致，圖說不夠清楚，致難以確認結果，應有相對應的對照組證明，才具有說服力。
3. 抗發炎活性實驗若是交由大學研究室他人進行，則不應列入實驗成果中。
4. 只有列出 2D 圖譜，並無列出如何依圖譜決定立體結構。例如列出 COSY 及 HMBC: 1H-1H COSY 和 HMBC 圖譜，以及 NOESY 圖譜，但無說明如何藉圖譜之間的關聯以確認化合物之 3D 立體位向。
5. 在進行因受到 fMLP/cytochalastin B 刺激人類嗜中性白血球而產生超氧離子 (superoxide anion) 與彈性蛋白酶

(elastase) 的抗發炎活性試驗，並無 negative (溶劑) 及 positive (已知的抑制劑) controls 以供比較。又表五所列數字是化合物 2 對彈性蛋白酶的抑制 IC50 及在 1 μ M 濃度其他化合物抑制的%，應該也要列化合物 2 對彈性蛋白酶在 1 μ M 濃度抑制的%，或其他化合物的 IC50，以便做比較，才能說化合物 2 的抑制強度最佳。

6. 對抑制超氧離子的產生，化合物 2 是最好的，請問是如何抑制超氧離子的產生？和抑制彈性蛋白酶有何相關聯？需要解釋清楚。