

國立臺灣大學醫學院藥學研究所



碩士論文

Graduate Institute of Pharmacy

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

Alda-1 類似物之半合成、全合成及

其對 ALDH2 之活性促進研究

Semi-synthesis, total synthesis and

ALDH2 activating evaluations of Alda-1 analogs

羅暉智

Wei-Chih Lo

指導教授：張嘉銓 博士

Advisor: Chia-Chuan Chang, Ph.D.

中華民國 106 年 11 月

November, 2017



國立臺灣大學（碩）博士學位論文  
口試委員會審定書

中文題目：Alda-1 類似物之半合成、全合成及其對  
ALDH2 之活性促進研究

英文題目：Semi-synthesis, total synthesis and evaluations  
on the ALDH2 agonism of Alda-1 analogs

本論文係 羅暉智 君（學號 R04423030）在國立臺灣大學藥學  
所完成之碩（博）士學位論文，於民國 106 年 11 月 30 日承下列  
考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

張嘉鈺

（簽名）

（指導教授）

沈建昌

李水誌

系主任、所長

沈麗娟

（簽名）

# 致謝



首先要感謝我的指導教授 張嘉銓 老師，在這兩年半的碩班生涯中，老師總是耐心地與我討論實驗或學業上的問題及方向，幫助我迎擊眾多挑戰，而在最後修改論文時也給予了許多指點，使我能將這本論文完成。感謝 李水盛 老師，老師的學術淵博讓我得到許多豐富的知識，使我的視野更加開闊，可以用更多的角度來看待事物。感謝 沈建昌 口試委員給予的指正及建議，使這本論文可以更加完善。

感謝勝發學長、敬婷學姊、欣苜學姊、姿妘學姊、義力學長、智恆學長、致中學長，一步步帶領我從青澀的碩一學生，到成為小有成果的碩士。感謝書睿在我甫上來臺北未尋得住處時，提供我一個經濟又實惠的租屋訊息，並帶領我探索未知的臺北。感謝士翔、采馨，讓我能與你們在實驗與學業上一起互相砥礪。感謝婉婷、富鈞帶來的歡樂，使碩班生涯增添了一些樂趣。感謝名哲強大的能力，幫助我完成實驗最後的假說。

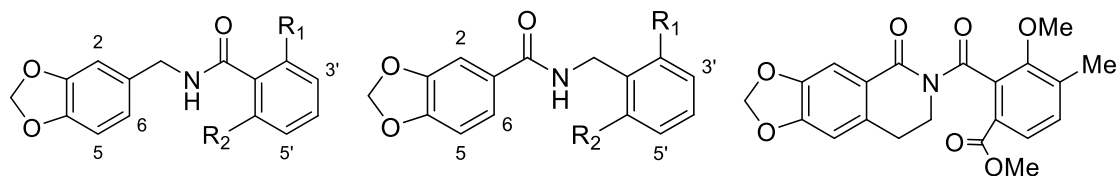
感謝家人的支持，使我能無後顧之憂的向前全力衝刺。最後要感謝穎晶，體諒我總是忙碌於實驗，鮮少有時間與妳一起同樂，也因為有妳的陪伴，讓我看得更清楚未來的方向。

# 中文摘要



粒線體醛去氫酶 2 (mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2, ALDH2) 為人體乙醇代謝途徑上重要的酵素之一。約 5.6 億東亞人(佔世界人口 8%) 有不具活性之 *ALDH2\*2* 對偶基因。近幾年的研究指出，此喪失活性之突變，除了使個體較容易被內生性或外源性醛類損害，也可能與心血管疾病、糖尿病、上呼吸消化道癌症等有關。粒線體醛去氫酶 2 活化劑最早於 2008 年以高通量篩選的方式篩選出來，其中以 Alda-1 具有最好的粒線體醛去氫酶 2 促進活性。


本實驗根據 Alda-1 之結構，製備出一系列類似物。以 EDC 偶合的方式，將 piperonylamine 與一系列的苯甲酸，或是 piperonylic acid 與一系列苯甲胺進行醯胺偶合反應，得到化合物 **3a-h** 及 **6a-e**。考量到人為設計化合物時，常一味追求更強之結合親和力(binding affinity)而忽略其毒性，所以除了合成 Alda-1 類似物之外，本實驗以小檗鹼為起始物，製備得到存在於臺灣黃柏根部之微量成分：methyl anhydroberberilate，其具有與 Alda-1 相似之 *N*-piperonylbenzamide 結構。而後藉由野生型粒線體醛去氫酶 2 活性促進試驗，觀察結構上的改變對促進活性有何影響。



- 3a**,  $R_1=R_2=H$
- 3b**,  $R_1=Cl, R_2=H$
- 3c**,  $R_1=I, R_2=H$
- 3d**,  $R_1=CH_3, R_2=H$
- 3e**,  $R_1=R_2=F$
- 3f**,  $R_1=Cl, R_2=F$
- 3g**,  $R_1=Cl, R_2=CH_3$
- 3h**,  $R_1=R_2=Cl$

- 6a**,  $R_1=R_2=H$
- 6b**,  $R_1=Cl, R_2=F$
- 6c**,  $R_1=R_2=F$
- 6d**,  $R_1=Cl, R_2=F$
- 6e**,  $R_1=R_2=Cl$

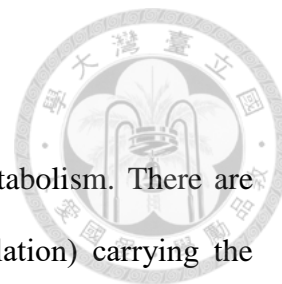
Methyl anhydroberberilate



結構-活性關係之探討發現羰基之位置對於促進活性可能有重要影響：當羰基位於甲苯基團之苄基位時(即化合物 **3b-h**)，促進活性較羰基位於 3,4-亞甲二氧苄基團之苄基位，最多增強約 51 倍。由電腦分子模擬結果推測影響活性之關鍵因素為「羰基位於甲苯基團或 3,4-亞甲二氧苄基團之苄基位時，化合物之醯胺基氮與 Asp457 主鏈羰基是否在可產生氫鍵之距離內」。其次，苯甲醯基 2'或 6'位置至少須存在一個取代基，使 Alda-1 類似物能與野生型粒線體醛去氫酶 2 以正確的方式作用，例如：化合物 **3a** 苯甲醯基 2'或 6'位置無任何取代基，不同於其它 Alda-1 類似物以 3,4-亞甲二氧苄基團插入野生型粒線體醛去氫酶 2 受質出入口，而是以苯甲醯基芳香環插入酵素受質出入口，使其醯胺基氮與 Asp457 主鏈羰基之距離大於氫鍵可作用距離。此外，若 2'或 6'位置上之取代基使苯甲醯基之芳香環較為疏水性，其與酵素受質出入口許多疏水性胺基酸會有較佳之疏水性作用力，且其造成之立體障礙越小越好。最後，3,4-亞甲二氧苄基基團之苯環須與 Phe459 支鏈芳香環平行以得到較佳之 $\pi$ - $\pi$ 交互作用。

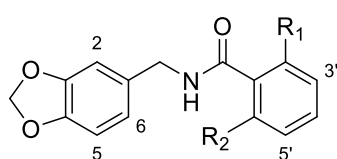
關鍵字：粒線體醛去氫酶 2、粒線體醛去氫酶 2 活化劑、Alda-1 類似物、臺灣黃柏、人體乙醇代謝

# Abstract

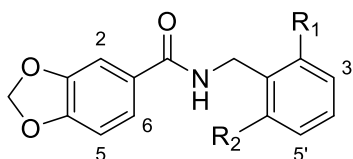


ALDH2 is one of the most important enzymes in ethanol metabolism. There are around 560 million East Asians (nearly 8% of the world's population) carrying the inactive *ALDH2\*2* allele. Recent studies indicated that *ALDH2\*2* would not protect individuals from the damages caused by endogenous or exogenous aldehydes, and it may relate to cardiovascular diseases and upper aerodigestive track cancers, *etc.* The earliest ALDH2 activators are discovered by high-throughput screening in 2008. Among these ALDH2 activators, Alda-1 has the best activating effects.

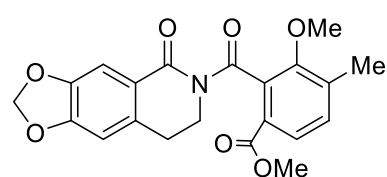
A series of Alda-1 analogs were prepared in the study. Compounds **3a–h** and **6a–e** were prepared from coupling piperonylamine or piperonylic acid with a series of benzoic acid or benzylamine by EDC. Considering compounds are often designed to pursue higher binding affinity but ignoring the toxicity, a minor constituent (methyl anhydroberberilate) in the roots of *Phellodendron amurense* var. *wilsonii*, which is similar to the *N*-piperonylbenzamide structure of Alda-1, was prepared from berberine. Through the wild-type ALDH2 activation assay, the structural impact on the activating ability was disclosed.



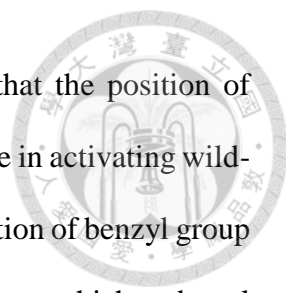
- 3a**, R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=H
- 3b**, R<sub>1</sub>=Cl, R<sub>2</sub>=H
- 3c**, R<sub>1</sub>=I, R<sub>2</sub>=H
- 3d**, R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=H
- 3e**, R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=F
- 3f**, R<sub>1</sub>=Cl, R<sub>2</sub>=F
- 3g**, R<sub>1</sub>=Cl, R<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub>
- 3h**, R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=Cl



- 6a**, R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=H
- 6b**, R<sub>1</sub>=Cl, R<sub>2</sub>=F
- 6c**, R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=F
- 6d**, R<sub>1</sub>=Cl, R<sub>2</sub>=F
- 6e**, R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=Cl



Methyl anhydroberberilate



Investigation on the structure-activity relationship suggested that the position of carbonyl group in these compounds might play the most important role in activating wild-type ALDH2: when carbonyl groups were located at the benzylic position of benzyl group of these compounds (**3b–h**), the activating abilities were better than those which carbonyl groups were located at the benzylic position of piperonyl group up to 51-fold. The computational molecular modeling results point out the most important role in activating wild-type ALDH2 is the capability of forming hydrogen bonds between amide hydrogen of the compounds and the main chain carbonyl group of Asp457 of the wild-type ALDH2. Secondly, there must exist at least one substitution group on either 2' or 6' position on the benzoyl group to make the Alda-1 analogs interact with wild-type ALDH2 correctly; e.g., there are not any substitution group at the 2' or 6' position on the benzoyl group of compound **3a**, and it inserts into the substrate exit of wild-type ALDH2 by the benzoyl group instead of piperonyl group which makes the distance between amide hydrogen of **3a** and the main chain carbonyl group of Asp457 beyond the hydrogen-bondable distance. In addition, if the 2' or 6' substitution groups make the aromatic ring of benzoyl group more hydrophobic, it would have better hydrophobic interaction with the many hydrophobic amino acids around the substrate exit of the enzyme. Moreover, the smaller steric interactions caused by the 2' or 6' substitution groups, the better the activity achieved. Finally, the aromatic ring of piperonyl group should be parallel to the aromatic side chain of Phe459 to get a proper  $\pi$ - $\pi$  interaction.

Key words: ALDH2, ALDH2 activator, Alda-1 analogs, *Phellodendron amurense* var. *wilsonii*, metabolism of ethanol

# 總目錄 (Contents)



中文摘要 .....	I
Abstract.....	III
總目錄 (Contents) .....	V
圖目錄 (List of figures) .....	VII
表目錄 (List of table) .....	VIII
流程圖目錄 (List of schemes) .....	VIII
附圖目錄 (List of supporting figures) .....	IX
1. 緒論 .....	1
1.1. 粒線體醛去氫酶 2 (mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2, ALDH2)1	
1.2. 野生型及亞洲變異型粒線體醛去氫酶 2 .....	7
1.3. 粒線體醛去氫酶 2 活化劑 .....	10
1.4. Methyl anhydroberberilate .....	13
1.5. 研究目的 .....	13
2. 結果與討論 .....	14
2.1. Alda-1 analogs-1 (3a-h)與 analogs-2 (6a-e)之製備.....	14
2.2. Methyl anhydroberberilate (10)之製備.....	23
2.3. 體外野生型粒線體醛去氫酶 2 促進活性結果.....	26
3. 實驗方法 .....	32
3.1. 儀器與材料 .....	32
3.1.1. 理化性質測定儀器 .....	32
3.1.2. cLogP 預測軟體 .....	32
3.1.3. 電腦分子模擬計算軟體.....	32
3.1.4. 分子模擬結果成像軟體.....	32
3.1.5. 化合物核磁共振圖譜預測.....	33



3.1.6.	化合物合成、純化使用之材料、溶劑與試藥 .....	33
3.1.6.1.	化合物純化所使用之材料 .....	33
3.1.6.2.	溶劑 .....	33
3.1.6.3.	試藥 .....	33
3.1.7.	粒線體醛去氫酶 2 促進活性試驗所用試劑與儀器 .....	35
3.2.	化合物之製備 .....	36
3.2.1.	Alda-1 analogs-1 ( <b>3a-h</b> )之製備 .....	36
3.2.2.	Alda-1 analogs-2 ( <b>6a-e</b> )之製備 .....	45
3.2.3.	Methyl anhydroberberilate ( <b>10</b> )之製備 .....	51
3.2.3.1.	Oxyberberine ( <b>8</b> )之製備 .....	51
3.2.3.2.	13-Acetoxyoxoberberine ( <b>9</b> )之製備 .....	52
3.2.3.3.	Methyl anhydroberberilate ( <b>10</b> )之製備 .....	53
3.3.	粒線體醛去氫酶 2 促進活性試驗 .....	54
3.3.1.	原理 .....	54
3.3.2.	實驗方法 .....	54
3.3.2.1.	試劑配製 .....	54
3.3.2.2.	實驗步驟 .....	55
參考文獻	.....	57

# 圖目錄 (List of figures)



<b>Figure 1.</b> 粒線體醛去氫酶 2 示意圖 .....	2
<b>Figure 2.</b> 粒線體醛去氫酶 2 之單體及其部分二級結構 .....	2
<b>Figure 3.</b> 粒線體醛去氫酶 2 四級結構 .....	3
<b>Figure 4.</b> 介面示意圖 .....	3
<b>Figure 5.</b> The metabolic mechanism of ALDH2 .....	4
<b>Figure 6.</b> Nicotinamide adenine dinucleotide .....	5
<b>Figure 7.</b> Interactions of the cofactor with surrounding residues .....	6
<b>Figure 8.</b> Close contacts made by the nicotinamide ribose and ring .....	6
<b>Figure 9.</b> Stereoviews of cofactor binding .....	8
<b>Figure 10.</b> An alignment of ALDH2*2 subunits A and B to wild-type ALDH2 .....	9
<b>Figure 11.</b> ALDH2 與 Alda-1、daidzin 之結晶結構重疊 .....	11
<b>Figure 12.</b> Alda-1 促進 ALDH2 之可能機轉 .....	11
<b>Figure 13.</b> (A) wild-type ALDH2 結晶結構 (B) ALDH2*2 結晶結構 (C) ALDH2*2 與 Alda-1 共結晶結構 .....	12
<b>Figure 14.</b> 以 ChemBio 3D 計算化合物 <b>9</b> 之能量最小立體結構 .....	24
<b>Figure 15.</b> Activation (%) of ALDH2 by compounds <b>3a-h</b> 、 <b>6a-e</b> 及 <b>10</b> .....	26
<b>Figure 16.</b> 化合物 <b>3h</b> 及 <b>6e</b> 與野生型粒線體醛去氫酶 2 鍵結之電腦分子模擬結果 .....	28
<b>Figure 17.</b> 化合物 <b>3a</b> 與野生型粒線體醛去氫酶 2 鍵結之電腦分子模擬結果 .....	28
<b>Figure 18.</b> 化合物 <b>3a</b> 與野生型粒線體醛去氫酶 2 鍵結之另一種電腦分子模擬結果 .....	29
<b>Figure 19.</b> 化合物 <b>3e</b> 與野生型粒線體醛去氫酶 2 鍵結之電腦分子模擬結果 .....	30
<b>Figure 20.</b> 化合物 <b>3f</b> 與野生型粒線體醛去氫酶 2 鍵結之電腦分子模擬結果 .....	30

Figure 21. 影響 Alda analogs 促進活性之可能基團(紅色部分)..... 31

Figure 21. 96 孔微量測試盤樣品添加方式..... 55



## 表目錄 (List of table)

Table 1. $^1\text{H}$ (400 MHz) and $^{13}\text{C}$ (50 MHz) NMR data of <b>3a–c</b> in $\text{CDCl}_3$ .....	17
Table 2. $^1\text{H}$ (400 MHz) and $^{13}\text{C}$ (50 MHz) NMR data of <b>3d</b> , <b>3g</b> in $\text{CDCl}_3$ .....	18
Table 3. $^1\text{H}$ (400 MHz) and $^{13}\text{C}$ (BBD, 50 MHz) NMR data of <b>3e</b> and <b>3f</b> in $\text{CDCl}_3$ .....	19
Table 4. $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ NMR, HSQC and HMBC data of <b>3h</b> in $\text{CD}_3\text{OD}$ (600 MHz).....	20
Table 5. $^1\text{H}$ (400 MHz) or $^{13}\text{C}$ (50 MHz) NMR data of <b>6a</b> , <b>6b</b> and <b>6e</b> in $\text{CD}_3\text{OD}$ or $\text{CDCl}_3$ , respectively .....	21
Table 6. $^1\text{H}$ (400 MHz) or $^{13}\text{C}$ (BBD, 50 MHz) NMR data of <b>6c</b> and <b>6d</b> in $\text{CD}_3\text{OD}$ or $\text{CDCl}_3$ , respectively .....	22
Table 7. 化合物 <b>3a–h</b> 、 <b>6a–e</b> 及 <b>10</b> 於 15 g/mL 與莫耳濃度之換算表 .....	26
Table 8. 化合物 <b>3a–h</b> 、 <b>6a–e</b> 及 <b>10</b> 之分子量、 $\text{clog } P$ 、氫鍵給予者數量與氫鍵接受者數量 .....	27

## 流程圖目錄 (List of schemes)

Scheme 1. Preparation of compounds <b>3a–h</b> .....	14
Scheme 2. Preparation of compounds <b>6a–e</b> .....	14
Scheme 3. Amide generation by EDC coupling reaction.....	15
Scheme 4. Preparation of Alda-1 by addition-elimination of 2,6-dichlorobenzoyl chloride and piperonylamine <sup>1</sup> .....	15
Scheme 5. Preparation of methyl anhydroberberilate ( <b>10</b> ) .....	23
Scheme 6. Proposed mechanism of the C ring opening of <b>9</b> .....	25

## 附圖目錄 (List of supporting figures)

<b>Figure S1.</b> $^1\text{H}$ NMR spectrum of <b>3a</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	60
<b>Figure S2.</b> $^{13}\text{C}$ NMR spectrum (DEPT-90, top; DEPT-135, middle; BBD, bottom) of <b>3a</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).....	61
<b>Figure S3.</b> $^1\text{H}$ NMR spectrum of <b>3b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	62
<b>Figure S4.</b> $^{13}\text{C}$ NMR spectrum (DEPT-90, top; DEPT-135, middle; BBD, bottom) of <b>3b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).....	63
<b>Figure S5.</b> $^1\text{H}$ NMR spectrum of <b>3c</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	64
<b>Figure S6.</b> $^{13}\text{C}$ NMR spectrum (DEPT-90, top; DEPT-135, middle; BBD, bottom) of <b>3c</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).....	65
<b>Figure S7.</b> $^1\text{H}$ NMR spectrum of <b>3d</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	66
<b>Figure S8.</b> $^{13}\text{C}$ NMR spectrum (DEPT-90, top; DEPT-135, middle; BBD, bot) of <b>3d</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).....	67
<b>Figure S9.</b> $^1\text{H}$ NMR spectrum of <b>3e</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	68
<b>Figure S10.</b> $^{13}\text{C}$ NMR spectrum (DEPT-90, top; DEPT-135, middle; BBD, bottom) of <b>3e</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).....	69
<b>Figure S11.</b> $^1\text{H}$ NMR spectrum of <b>3f</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	70
<b>Figure S12.</b> $^{13}\text{C}$ NMR spectrum (DEPT-90, top; DEPT-135, middle; BBD, bottom) of <b>3f</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).....	71
<b>Figure S13.</b> $^1\text{H}$ NMR spectrum of <b>3g</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	72
<b>Figure S14.</b> $^{13}\text{C}$ NMR spectrum (DEPT-90, top; DEPT-135, middle; BBD, bottom) of <b>3g</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).....	73
<b>Figure S15.</b> $^1\text{H}$ NMR spectrum of <b>3h</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	74
<b>Figure S16.</b> $^1\text{H}$ NMR spectrum of <b>3h</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz).....	75

<b>Figure S17.</b> $^{13}\text{C}$ NMR spectrum (DEPT-90, top; DEPT-135, middle; BBD, bottom) of <b>3h</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) .....	76
<b>Figure S18.</b> $^1\text{H}$ NMR spectrum of <b>3h</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz), top; $^{13}\text{C}$ NMR spectrum (BBD) of <b>3h</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz), bot. ....	77
<b>Figure S19.</b> HSQC spectrum of <b>3h</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) (I) .....	78
<b>Figure S20.</b> HSQC spectrum of <b>3h</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) (II) .....	79
<b>Figure S21.</b> HMBC spectrum of <b>3h</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) (I) .....	80
<b>Figure S22.</b> HMBC spectrum of <b>3h</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) (II) .....	81
<b>Figure S23.</b> HMBC spectrum of <b>3h</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) (III) .....	82
<b>Figure S24.</b> $^1\text{H}$ NMR spectrum of <b>6a</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) .....	83
<b>Figure S25.</b> $^1\text{H}$ NMR spectrum of <b>6a</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz) .....	84
<b>Figure S26.</b> $^{13}\text{C}$ NMR spectrum (DEPT-90, top; DEPT-135, middle; BBD, bottom) of <b>6a</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) .....	85
<b>Figure S27.</b> $^1\text{H}$ NMR spectrum of <b>6b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) .....	86
<b>Figure S28.</b> $^1\text{H}$ NMR spectrum of <b>6b</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz) .....	87
<b>Figure S29.</b> $^{13}\text{C}$ NMR spectrum (DEPT-90, top; DEPT-135, middle; BBD, bottom) of <b>6b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) .....	88
<b>Figure S30.</b> $^1\text{H}$ NMR spectrum of <b>6c</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) .....	89
<b>Figure S31.</b> $^1\text{H}$ NMR spectrum of <b>6c</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz) .....	90
<b>Figure S32.</b> $^{13}\text{C}$ NMR spectrum (DEPT-90, top; DEPT-135, middle; BBD, bottom) of <b>6c</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) .....	91
<b>Figure S33.</b> $^1\text{H}$ NMR spectrum of <b>6d</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) .....	92
<b>Figure S34.</b> $^1\text{H}$ NMR spectrum of <b>6d</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz) .....	93
<b>Figure S35.</b> $^{13}\text{C}$ NMR spectrum (DEPT-90, top; DEPT-135, middle; BBD, bottom) of <b>6d</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) .....	94

<b>Figure S36.</b> $^1\text{H}$ NMR spectrum of <b>6e</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	95
<b>Figure S37.</b> $^1\text{H}$ NMR spectrum of <b>6e</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz).....	96
<b>Figure S38.</b> Supporting $^1\text{H}$ NMR spectrum of <b>6e</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz).....	97
<b>Figure S39.</b> $^{13}\text{C}$ NMR spectrum (DEPT-90, top; DEPT-135, middle; BBD, bottom) of <b>6e</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).....	98
<b>Figure S40.</b> $^1\text{H}$ NMR spectrum of <b>7</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	99
<b>Figure S41.</b> $^1\text{H}$ NMR spectrum of <b>8</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	100
<b>Figure S42.</b> $^{13}\text{C}$ NMR spectrum (DEPT-90, top; DEPT-135, middle; BBD, bottom) of <b>8</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).....	101
<b>Figure S43.</b> $^1\text{H}$ NMR spectrum of <b>9</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	102
<b>Figure S44.</b> $^{13}\text{C}$ NMR spectrum (DEPT-90, top; DEPT-135, middle; BBD, bottom) of <b>9</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).....	103
<b>Figure S45.</b> $^1\text{H}$ NMR spectrum of <b>10</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).....	104
<b>Figure S46.</b> $^{13}\text{C}$ NMR spectrum (DEPT-90, top; DEPT-135, middle; BBD, bottom) of <b>10</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).....	105



# 1. 緒論

## 1.1. 粒線體醛去氫酶 2 (mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2, ALDH2)

粒線體醛去氫酶 2 為人體乙醇代謝途徑上重要的酵素之一。乙醇經醇去氫酶 (alcohol dehydrogenase, ADH) 代謝為乙醛 (acetaldehyde) 再經由粒線體醛去氫酶 2 代謝為乙酸 (acetic acid)，此二酵素皆需要  $\text{NAD}^+$  幫助代謝反應進行<sup>1</sup>。粒線體醛去氫酶 2 也負責氧化脂質過氧化 (lipid peroxidation) 之內生性醛類產物，如：4-羥基壬烯醛 (4-hydroxy-2-nonenal, 4-HNE)、環境中存在之醛類，如：丙烯醛 (acrolein)；以及代謝 nitroglycerin (NTG) 生成可擴張血管之 nitric oxide (NO)。粒線體醛去氫酶 2 遍布於所有組織裡，在肝臟內含量最豐富，在像是心臟、腦部等這些需要高粒線體氧化磷酸化能力 (high mitochondrial oxidative phosphorylation) 之器官內含量也很高<sup>2</sup>。

粒線體醛去氫酶 2 是一個由四個相同單體 (monomer, Figures 1 and 2) 組合而成之四聚體 (tetramer, Figure 3)，每一個單體含有 500 個胺基酸。每個單體由三個主要的域 (domain, Figures 1 and 2) 組成：催化域 (catalytic domain)、輔酶結合域 (coenzyme or  $\text{NAD}^+$ -binding domain)、寡聚合域 (oligomerization domain)<sup>3</sup>。其中兩個單體透過各自之  $\alpha\text{G}$  (殘基 247–259) 彼此接觸、一個單體之  $\beta 18$  與另一單體之  $\beta 19$  互相作用組成一個有 10 個  $\beta$  strand 之  $\beta$  摺疊 (ten-stranded  $\beta$ -sheet) 結構，最終組成一個雙聚體 (dimer)，其雙聚介面 (interface of dimer) 延伸範圍較廣，從催化域延伸至寡聚合域，而對酵素雙聚介面有重要影響之三個殘基：Arg264、Arg475 及 Glu487，分別位在  $\beta 11$ 、loop2 及寡聚合域 (Figure 2)。而四聚體由兩個雙聚體之  $\beta 5$  以彼此反向平行之  $\beta$ -stranded 作用力 (antiparallel  $\beta$ -stranded interactions) 組成 (Figure 4)，其介面不同於雙聚體組成之介面，所以整個四聚體可被視為一個雙聚之雙聚體 (dimer of dimers)<sup>3-4</sup>。

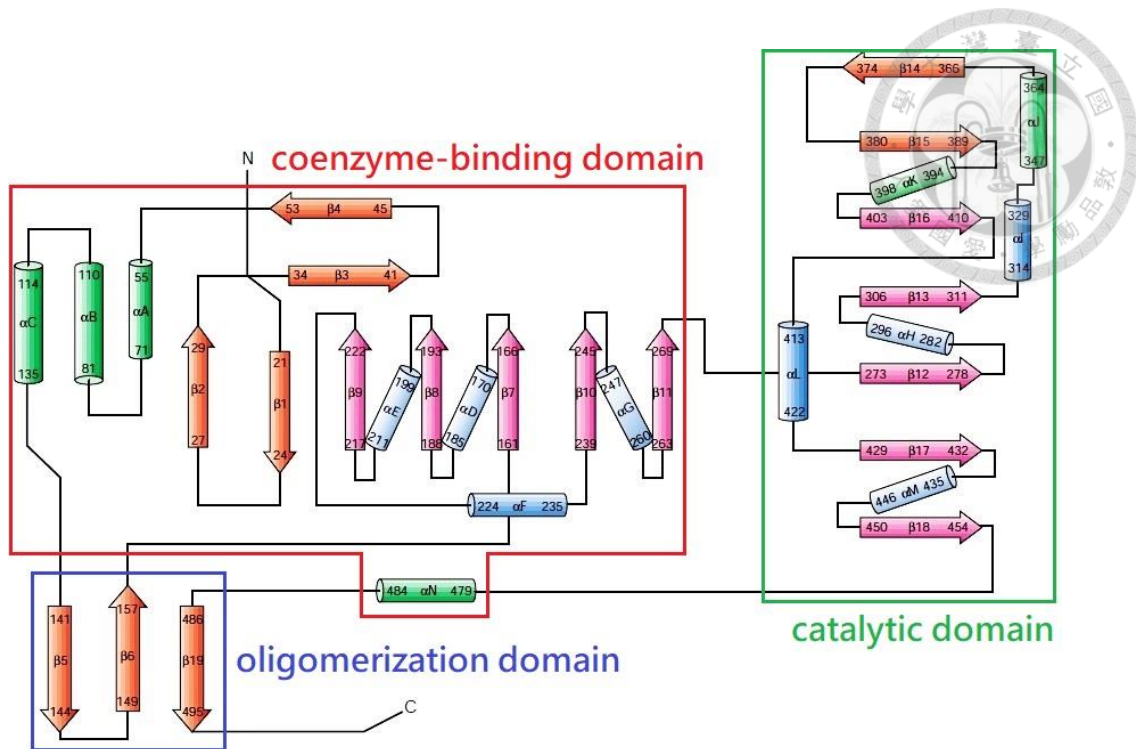


Figure 1. 粒線體醛去氫酶 2 示意圖。箭頭代表  $\beta$  strands、圓柱體代表  $\alpha$  helices<sup>4</sup>。

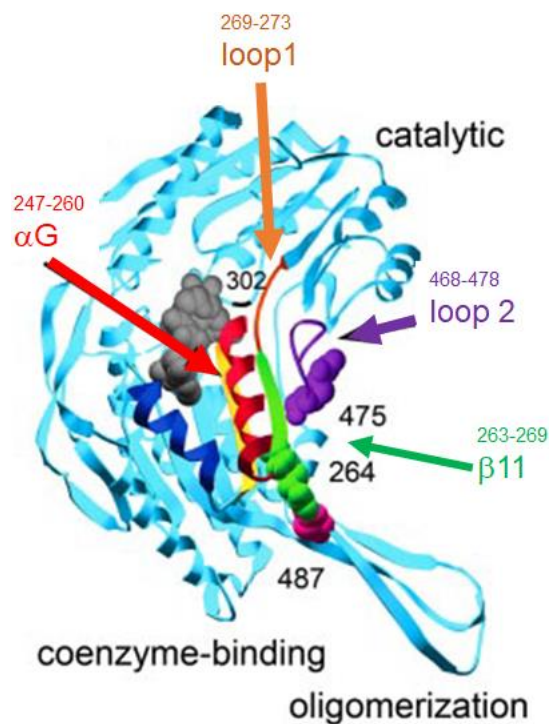
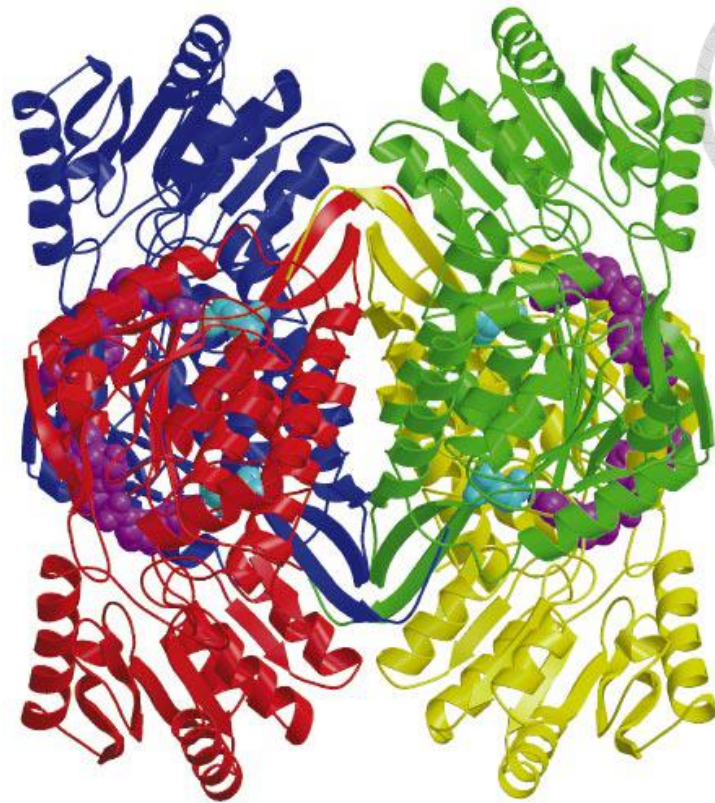
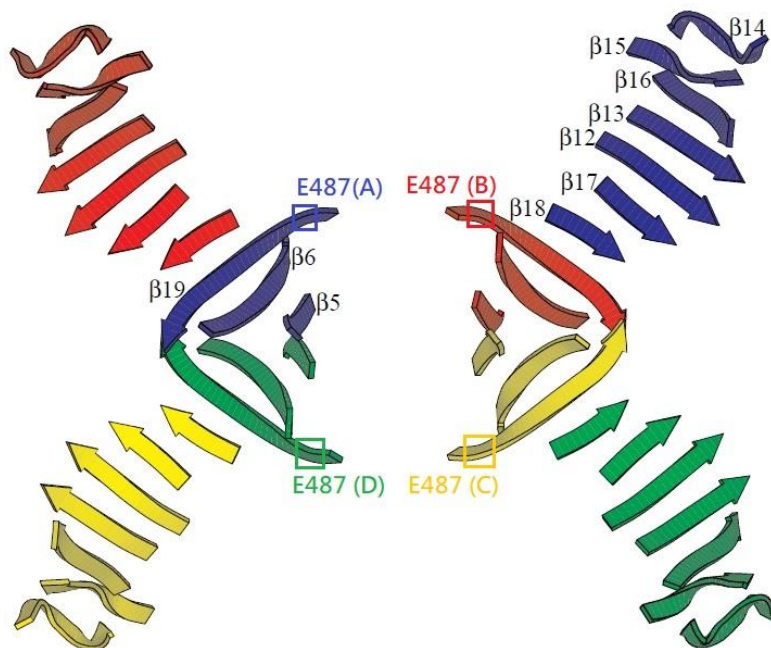


Figure 2. 粒線體醛去氫酶2之單體及其部分二級結構。 $\alpha$ F(深藍)、 $\beta$ 10(黃)、 $\alpha$ G(紅)、 $\beta$ 11(綠)、loop1(橘)、loop2(紫)。與雙聚介面有關之重要殘基以球形表示：264(綠)、487(粉紅)、475(紫)。黑色線條為負責催化之Cys302<sup>3</sup>。



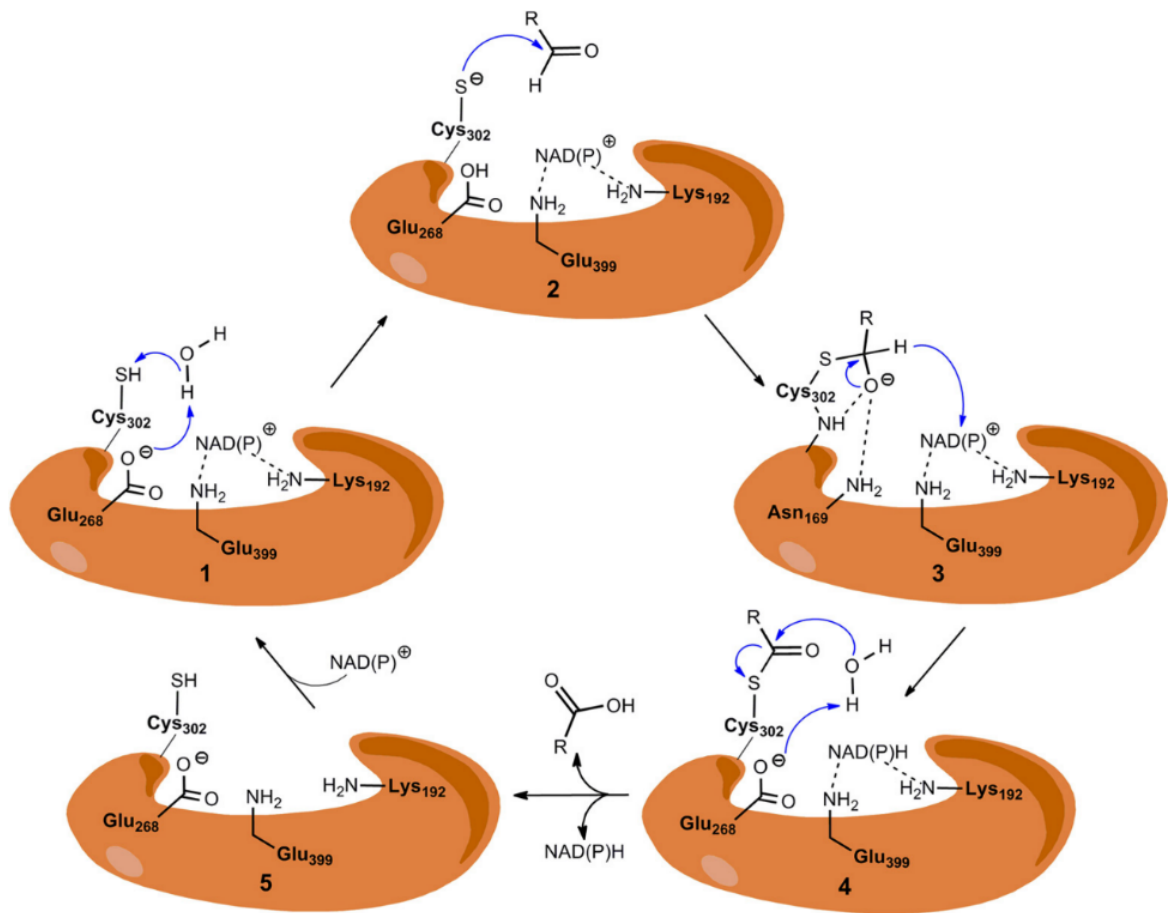


**Figure 3.** 粒線體醛去氫酶2四級結構。紅、藍單體(單體A、B)組成一個雙聚體，黃、綠單體(單體C、D)組成另一個雙聚體。分別以球型顯示NAD<sup>+</sup>(紫)與Glu487(青)之位置<sup>4</sup>。



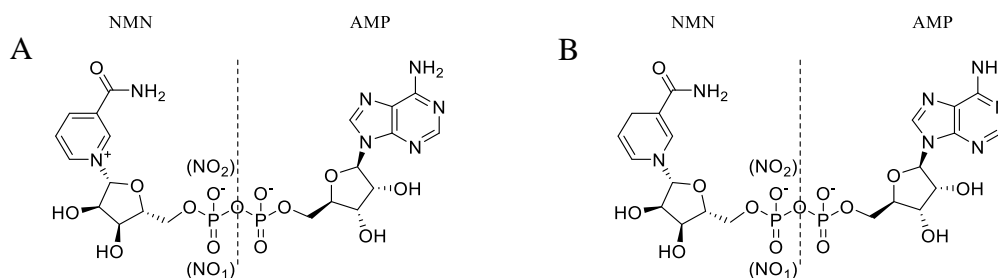
**Figure 4.** 介面示意圖，顏色對應於Figure 3之酵素結構<sup>4</sup>。

粒線體醛去氫酶2催化機轉包含五個步驟(Figure 5)：(1) Glu268將水的質子抓走，間接抓走Cys302的質子並活化之；(2) Cys的thiolate基團親和性攻擊至aldehyde，形成tetrahedral thiohemiacetal intermediate；(3) thiohemiacetal intermediate上的氧負電荷回打並將氫負離子(hydride)轉移給NAD<sup>+</sup>的pyridine環，形成thioester intermediate；(4)水解thioester intermediate；(5)釋出羧酸、NADH，隨後NAD<sup>+</sup>結合至酵素進行再生。第一、第四步皆需要一分子的水與Glu268的支鏈鍵結，以促進Cys302的去質子化及後續thioester intermediate的水解<sup>5</sup>。



**Figure 5.** The metabolic mechanism of ALDH2<sup>5</sup>

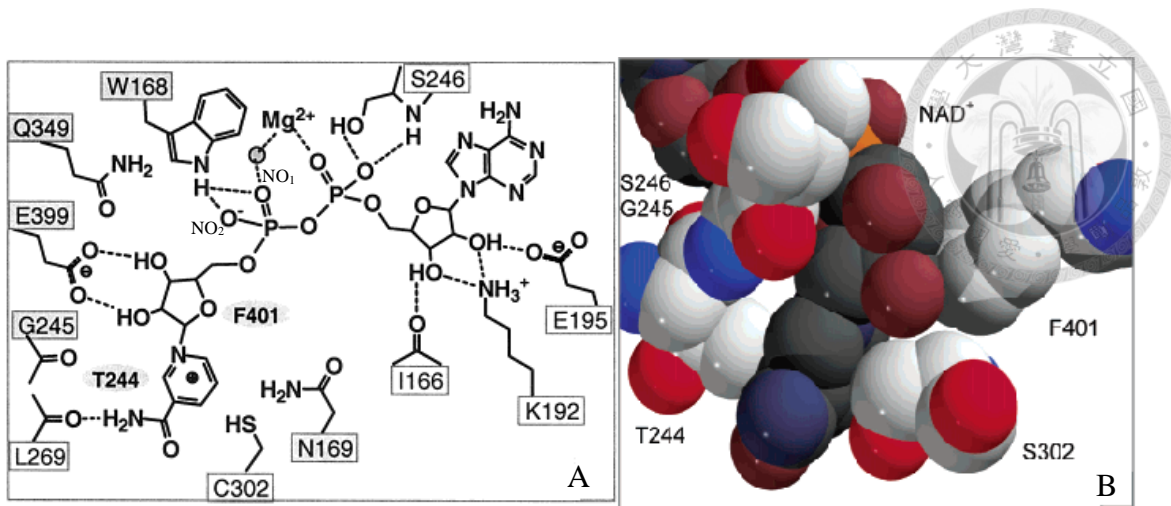
粒線體醛去氫酶 2 有不同之輔酶鍵結構形：氫負離子轉移構形(hydrate transfer conformation)及水解構形(hydrolysis conformation)。輔酶之 AMP (Figure 6)在這兩種構型裡之作用力都相同(Figure 7)，但 NMN (Figure 6)在這兩種構型裡有不同之作用力<sup>6</sup>。



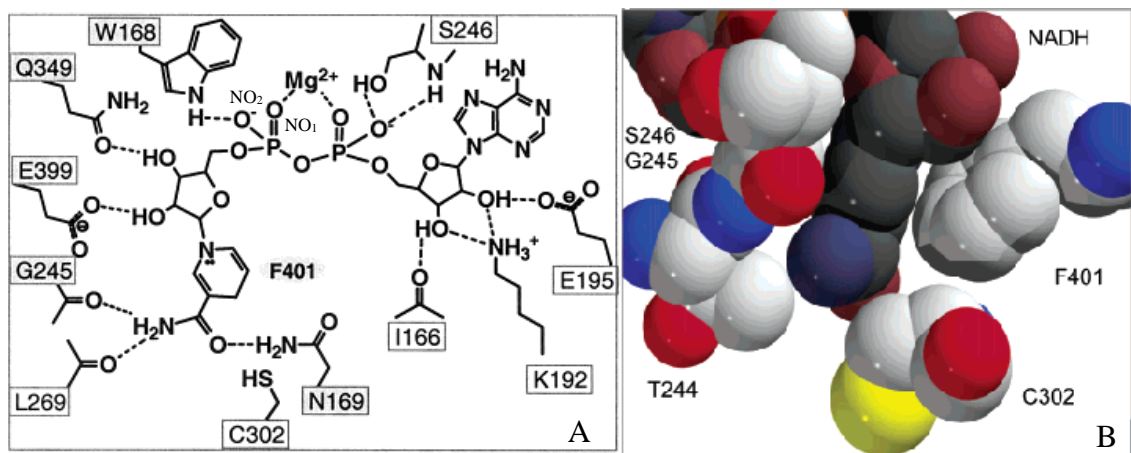
**Figure 6.** Nicotinamide adenine dinucleotide (A) 氧化型(NAD<sup>+</sup>)與(B)還原型(NADH)。(NMN: nicotinamide mononucleotide portion<sup>7</sup>; AMP: adenosine monophosphate portion<sup>6</sup>)

NMN 在氫負離子轉移構形中，NO<sub>1</sub> 透過一分子的水間接與鎂離子鍵結，NO<sub>1</sub> 和 NO<sub>2</sub> 皆與 Trp168 支鏈胺基有氫鍵作用，核糖之兩個羥基皆與 Glu399 有氫鍵作用，醯胺之胺基與 Leu269 主鏈羰基氧原子有氫鍵作用(Figure 7A)，且核糖環被 Gly245 主鏈、Phe401 支鏈之環，分別以約 3.5 Å 之距離夾在中間，菸鹼醯胺環則是被 Cys302 支鏈、Thr244 支鏈，分別以約 3.4 Å 之距離夾在中間(Figure 7B)<sup>6</sup>。

而 NMN 在水解構形中，NO<sub>1</sub> 直接與鎂離子鍵結，只剩下 NO<sub>2</sub> 與 Trp168 支鏈胺基有氫鍵作用(Figure 8A)，核糖及菸鹼醯胺分別朝向由 αD 與 αE 構成之疏水性口袋表面，約移動 3.5 Å 及 4 Å、旋轉 80° 及 30°，造成核糖之兩個羥基變成分別與 Gln349、Glu399 有氫鍵作用，醯胺之胺基與 Leu269、Glu245 主鏈羰基氧原子有氫鍵作用，醯胺之羰基氧原子與 Asn169 主鏈胺基有氫鍵作用(Figure 8A)，核糖環不再與任何酵素殘基有緊密的接觸，而菸鹼醯胺幾乎佔據了氫負離子轉移構形中核糖之位置，被 Gly245 主鏈、Phe401 支鏈之環夾在中間(Figure 8B)<sup>6</sup>。



**Figure 7.** 輔酶之氫負離子轉移構形 (A)輔酶與周圍殘基之交互作用，潛在的氫鍵以虛線表示 (B)酵素催化區與 NAD<sup>+</sup>構形之凡德瓦表面示意圖。在此構形中，NMN 之核糖被 Gly245 主鏈、Phe401 支鏈之環夾在中間，菸鹼醯胺則是被 Cys302 支鏈、Thr244 支鏈夾在中間<sup>6</sup>。



**Figure 8.** 輔酶之水解構形 (A)輔酶與周圍殘基之交互作用，潛在的氫鍵以虛線表示 (B)酵素催化區與 NADH 構形之凡德瓦表面示意圖。在此構形中，菸鹼醯胺幾乎佔據了氫負離子轉移構形中核糖之位置，被 Gly245 主鏈、Phe401 支鏈之環夾在中間<sup>6</sup>。

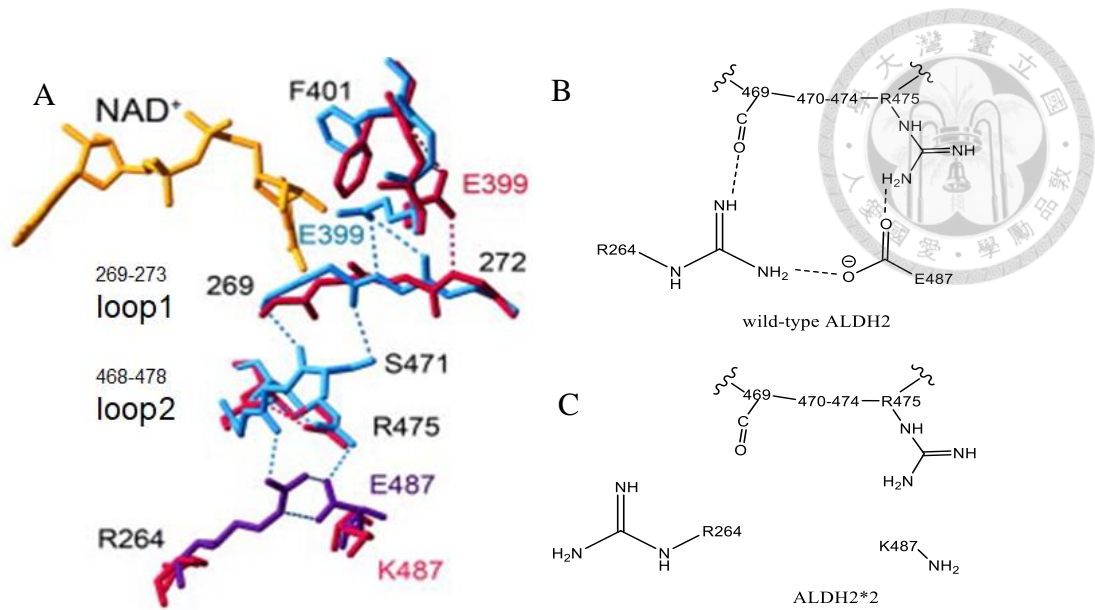


## 1.2. 野生型及亞洲變異型粒線體醛去氫酶 2

粒線體醛去氫酶2對偶基因(allele)有兩種：*ALDH2\*1*及*ALDH2\*2*，其分別生成之酵素為wild-type ALDH2 (野生型粒線體醛去氫酶2)及*ALDH2\*2* (亞洲變異型粒線體醛去氫酶2)<sup>1</sup>。

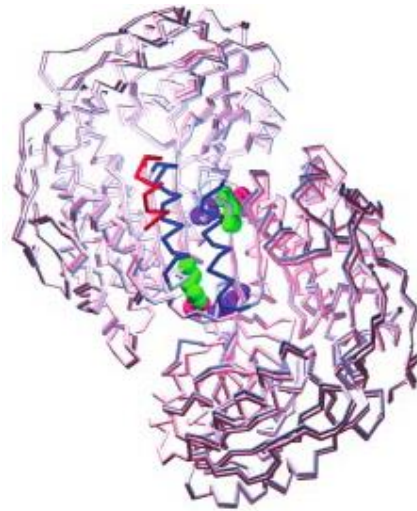
在wild-type ALDH2裡，Arg264和Glu487穿過雙聚介面與雙聚夥伴 (dimer partner)之loop2 (殘基463–478)形成氫鍵(Figure 10A and 10B)，其單體之loop2透過兩個氫鍵與loop1作用：(1)殘基472主鏈羰基氧原子(carbonyl oxygen)與殘基269主鏈胺基(amine)；(2)Ser471支鏈羥基(hydroxyl)與殘基270主鏈羰基氧原子。而Loop1透過殘基271主鏈胺基和Glu399支鏈之間的氫鍵，與催化區有所連結。

而在*ALDH2\*2*裡，殘基487由Glu變異為Lys (E487K)，使Arg264支鏈與Lys487支鏈朝向遠離彼此之方向轉動，Arg264支鏈之胍基(guanidyl group)不再與殘基469主鏈之羰基氧原子有氫鍵作用，且Lys487也不再與Arg475有氫鍵作用，導致位於雙聚介面之重要氫鍵作用力蕩然無存(Figure 10A and 10C)<sup>3</sup>。此變異也間接造成單體之loop1 (殘基269–273)主鏈旋轉，除了導致Glu268離開活化水分子之位置，也讓殘基271不再穩定催化區Glu399之支鏈，使Glu399轉離催化區且改由殘基272主鏈胺基穩定之，而Phe401則是旋轉進入由Glu399轉動而造成之空洞(Figure 10A)，造成Glu399無法再為輔酶nicotinamide ribose提供氫鍵作用<sup>3</sup>。



**Figure 9.** (A)自雙聚介面到輔酶結合裂縫(NAD<sup>+</sup>-binding cleft)之胺基酸主鏈及支鏈之移動立體圖。紫色及藍色分別為野生型ALDH2之次單元A及B，紅色為缺輔基ALDH2\*2 (apoenzyme) (B)次單元A在 wild-type ALDH2 雙聚介面透過Arg264及Glu487與次單元B之loop2有氫鍵作用 (C) ALDH2\*2次單元A之Glu487變異為Lys487，導致原本存在於wild-type ALDH2雙聚介面之氫鍵不復存在<sup>3</sup>。

與野生型粒線體醛去氫酶2相比，亞洲變異體NAD<sup>+</sup>之 $K_M$  (Michaelis constant) 增加約200倍，而 $k_{cat}$  (轉換率, turnover rate) 減少約10倍<sup>1</sup>。 $\alpha$ G位置失調(positional disorder)可能是其 $K_m^{NAD^+}$ 增加之主要原因：位在接近 $\alpha$ G C端之Arg264在wild-type ALDH2與Glu487有氫鍵作用，可幫助固定 $\alpha$ G，而E487K會導致固定 $\alpha$ G之作用力消失，使其往輔酶結合裂縫之方向移動3 Å (Figure 10)。雖NAD<sup>+</sup>與ALDH2\*2結合會稍微改善 $K_m$ ，但因為缺乏Glu487穩定loop2，造成loop1構形改變，並干擾位於催化區之 nicotinamide binding pocket 之 Glu399 和 Phe401 (Figure 9A)，讓 Glu268 與 nicotinamide portion 可能沒被適當地限制在可以進行氫負離子轉移之位置，進而使ALDH2\*2代謝反應仍舊無法順利進行，導致 $k_{cat}$ 減少<sup>3</sup>。因為人體內NAD<sup>+</sup>之濃度較亞洲變異體之 $K_M^{NAD^+}$ 低15倍，所以ALDH2\*2在體內基本上不具有活性(inactive *in vivo*)<sup>1</sup>，僅以較低代謝能力之細胞質醛去氫酶(cytosolic aldehyde dehydrogenase)代謝。



**Figure 10.** 將野生型ALDH2與ALDH2\*2之雙聚體次單元A及B重疊圖。野生型ALDH2與ALDH2\*2之 $\alpha$ G分別以藍色與紅色線呈現，圖中ALDH2\*2之 $\alpha$ G往輔酶結合裂縫移動3 Å<sup>3</sup>。綠、粉紅及紫色球形分別為殘基264、487及475。

異型合子 (heterozygous, *ALDH2\*1/\*2*) 個體有全部五種異質四聚體 (heterotetramer) 之組合<sup>註一</sup>，此外，異型合子與同型合子 (homozygous, *ALDH2\*2/\*2*)，在面部潮紅 (facial flushing)、對酒精成癮之風險 (risk for alcoholism) 裡具有顯著差異，因此將 *ALDH2\*2* 對偶基因定義為半顯性 (semi-dominant) 較為準確<sup>1</sup>。

約5.6億東亞人 (佔世界人口8%) 有 *ALDH2\*2* 基因<sup>2</sup>，其中有5–10% 為 *ALDH2\*2/\*2* 同型合子、30–40% 為 *ALDH2\*1/\*2* 異型合子<sup>1</sup>。 *ALDH2\*2* 這種喪失活性之突變仍然被視為較良性之突變 (relatively benign mutation)，因為其無活性之表現導致類似 disulfiram 之反應 (disulfiram-like reaction)，會使具有此基因之個體有較低的機率對酒精成癮。然而近幾年的研究指出，此喪失活性之突變，使個體容易因體內產生或是環境中存在之醛類而造成損害，且可能與一些疾病有關，例：心血管疾病、上呼吸消化道癌症<sup>2</sup>。

---

<sup>註一</sup> 五種異質四聚體之組合由兩種不同種類單體隨機搭配而成  $ALDH2*1:ALDH2*2 = 4:0, 3:1, 2:2, 1:3, 0:4$



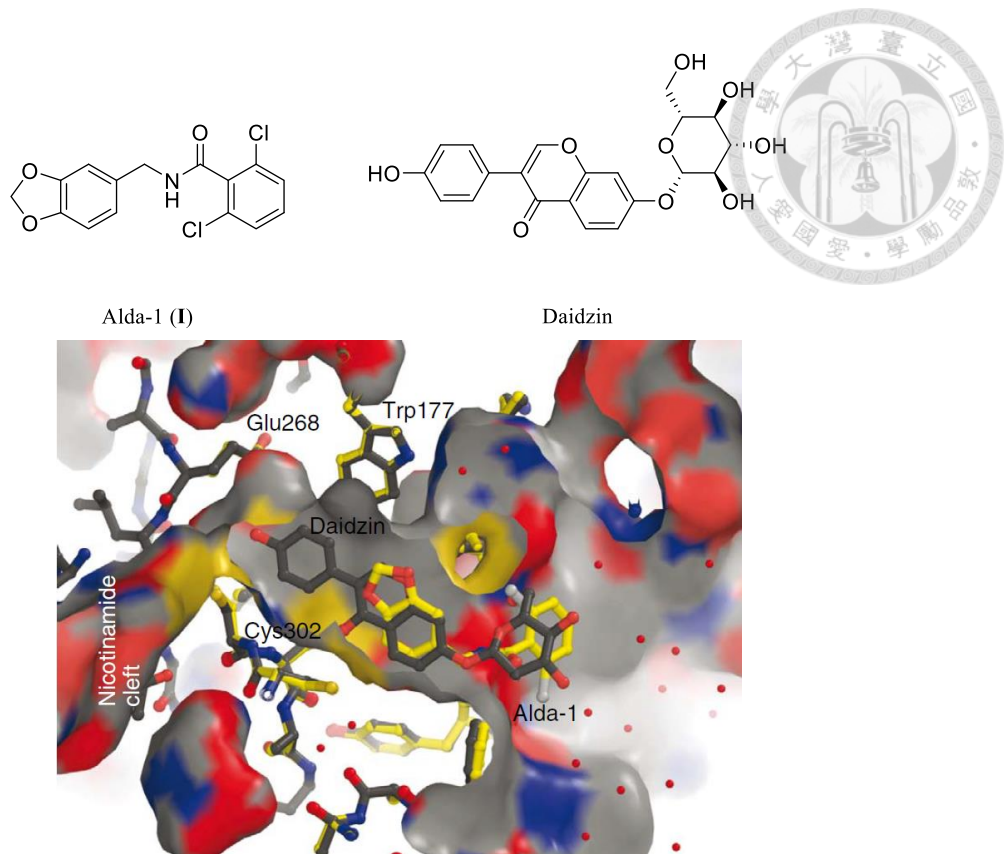
### 1.3. 粒線體醛去氫酶 2 活化劑

粒線體醛去氫酶 2 活化劑(ALDH2 activators)最早於 2008 年以高通量篩選而得。其中以 Alda-1 具有最佳粒線體醛去氫酶 2 促進活性：在 10  $\mu$ M 濃度下，促進 wild-type ALDH2 之活性 65%、亞洲變異型粒線體醛去氫酶 2 之活性達 800%<sup>8</sup>。此外，Alda-1 修復了 ALDH2\*2 因 Glu487 變異為 Lys487 所導致之活性喪失，亦防止受質(substrate)導致之去活化作用(inactivation)<sup>9</sup>。

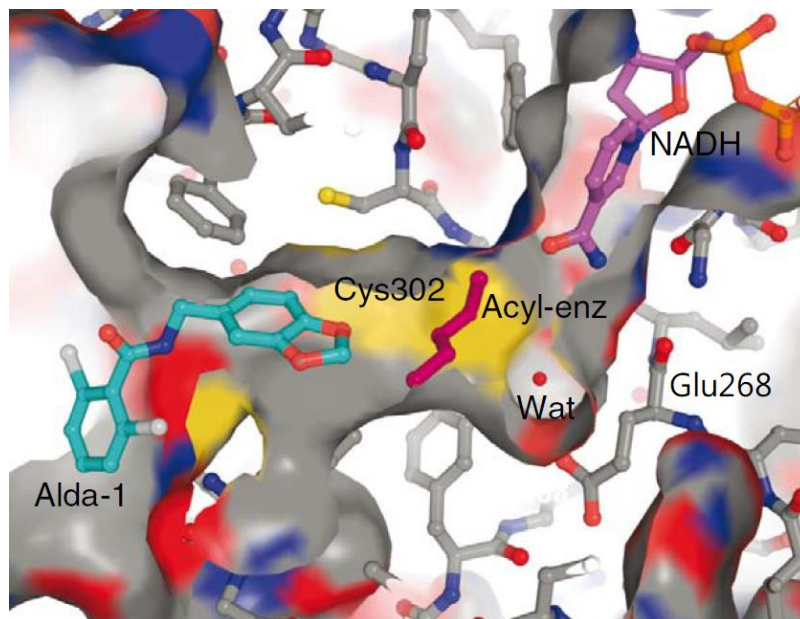
在所有醛去氫酶家族(ALDH family members)裡，催化區皆與輔酶鍵結區連在一起，形成一個穿過酵素之隧道。Alda-1 鍵結在缺輔基粒線體醛去氫酶 2 之受質通道出入口並朝內延伸至催化區，且保持 Cys302 附近暢通(Figure 11)，也因這種鍵結模式，只有小且線性之脂族醛可被 Alda-1 促進代謝(Figure 12)，且催化效果會隨受質長度而減少。Diadzin (一種粒線體醛去氫酶 2 抑制劑)之鍵結方式同 Alda-1，但因其結構中之酚(phenol)延伸得較深入，直接接觸到催化區之 Cys302、Glu268，限制受質鍵結和催化，進而抑制酵素(Figure 11)<sup>9</sup>。

Wild-type ALDH2 速率決定步驟為水解 acyl-enzyme 中間產物，而 Alda-1 促進 wild-type ALDH2 去氫化作用將近兩倍，暗示著在酵素代謝第四步驟，被活化之水分子在催化區碰到之物質平均有一半為 nonproductive encounter，因此推測 Alda-1 藉由鍵結並堵住受質出入口，增加被活化之水分子與 productive encounter (即 thioester intermediate) 彼此碰到之可能性，加速 ALDH2\*1 水解 thioester intermediate，達到促進活性之效用(Figure 12)。雖然 Alda-1 堵住了受質出入口，但輔酶在催化過程中，會由氫負離子轉移構形變成水解構形，所以受質或其代謝產物依然能經由輔酶鍵結區之出入口進出<sup>9</sup>。Alda-1 另外一個重要之特質為藉由 Alda-1 之鍵結模式，減少 4-羥基壬烯醛與 Cys302 接觸之機會，保護粒線體醛去氫酶 2 免於因 4-羥基壬烯醛與 Cys302 形成加成物而導致之去活化作用<sup>9</sup>。



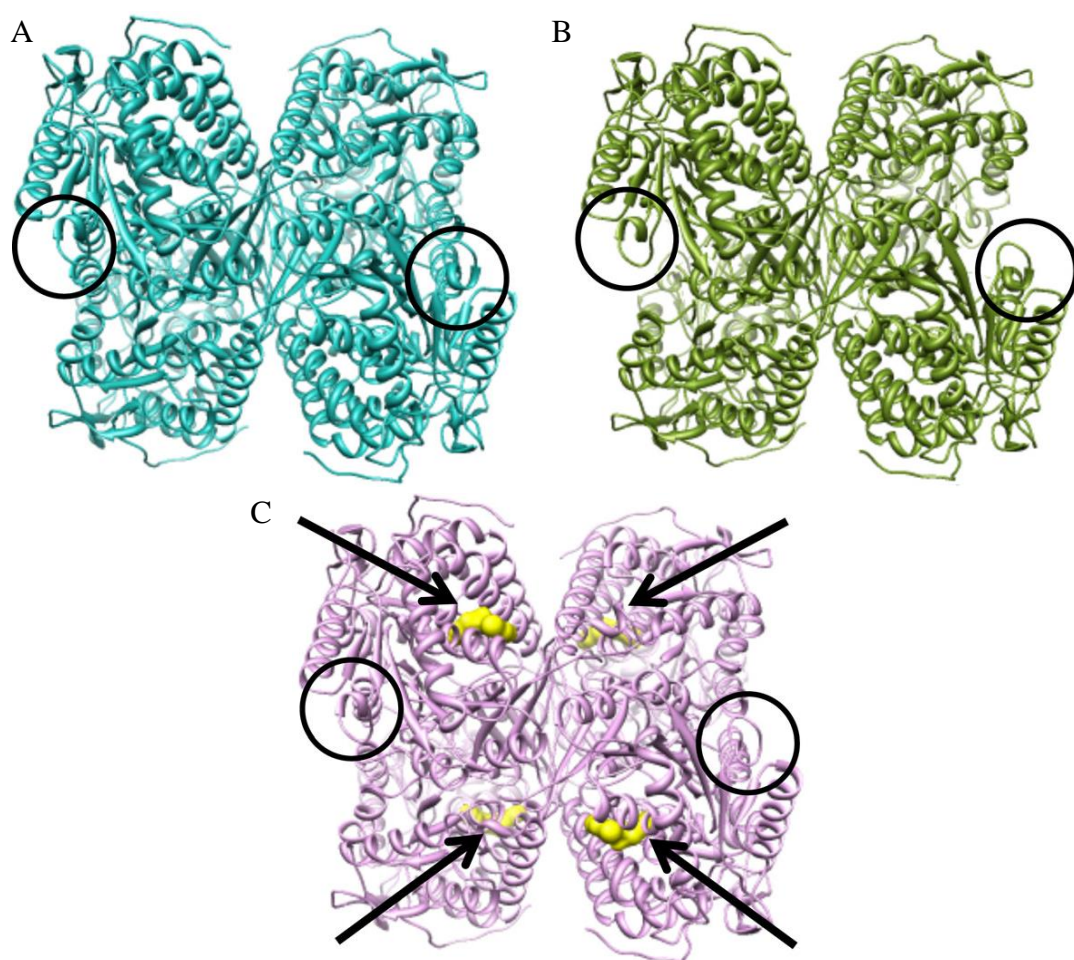


**Figure 11.** 將 ALDH2 與 Alda-1 (黃色)、daidzin (黑色) 之結晶結構重疊在一起，輔酶鍵結區(nicotinamide cleft)位於催化區之 Glu268、Cys302 左側<sup>9</sup>。



**Figure 12.** Alda-1 促進 ALDH2 之可能機轉。NADH 水解構型，丁醯基(紫紅色)代表 acyl-enzyme 中間產物，水分子(紫紅色球形)位於 Cys302 和 Glu268 之間<sup>9</sup>。

第 8 頁第 5 行提到：輔酶鍵結在 ALDH2\*2 上，可恢復部分輔酶鍵結區之周圍區域，但催化區、輔酶鍵結區周圍之蛋白質結構仍然較 wild-type ALDH2 紊亂，且位於催化區之 Glu268 (在催化中作為鹼)和 Glu399 (穩定 nicotinamide 環)依舊失調，無法發揮其功能。文獻裡作者們假設 Alda-1 透過與 Phe459、Trp177 作用(分別與 Phe465、Glu268 在空間上接近)，恢復 ALDH2\*2 減弱之酵素動力學，此結果也與 Alda-1 與 ALDH2\*2 共結晶結構相符合(Figure 13C)。因此，Alda-1 鍵結在 ALDH2\*2 上不僅增加受質在催化區之有效濃度，它也拯救了 ALDH2\*2 失調之結構和功能<sup>9</sup>。



**Figure 13.** (A) wild-type ALDH2 結晶結構 (B) ALDH2\*2 結晶結構 (C) ALDH2\*2 與 Alda-1 (箭頭所指處之黃色球體)共結晶結構。圈起來之部分皆為 $\alpha$ G，由(C)可知 Alda-1 鍵結在 ALDH2\*2 上可恢復原本失調之 $\alpha$ G [(A) vs. (B)]<sup>2</sup>。

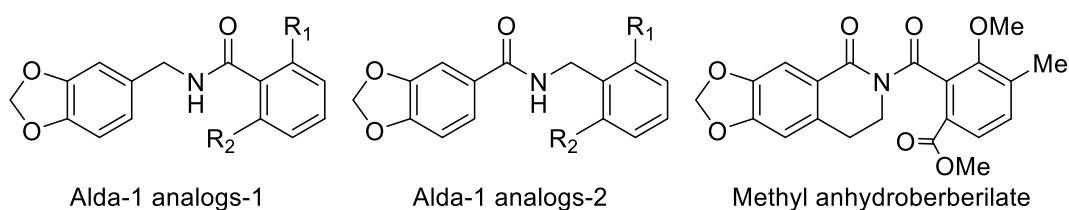


## 1.4. Methyl anhydroberberilate

黃柏(Phellodendri Cortex)為關黃柏(*Phellodendron amurense* Rupr.)或川黃柏(*P. chinense* Schneid)之去除栓皮之樹皮，藥效為清熱燥濕、瀉火解毒，兼有祛風活絡、活血散瘀之效<sup>10</sup>，除此之外，也有文獻報導其具有抗發炎、抗菌活性<sup>11-12</sup>。Methyl anhydroberberilate 於 2005 年由國立成功大學 吳天賞教授實驗室之姜玉龍碩士自臺灣黃柏(*P. amurense* var. *wilsonii*)根部分離而得，也是首次自天然界中分離而得<sup>13</sup>，其結構具有類似於 Alda-1 之 *N*-piperonylbenzamide 結構，因此推測黃柏之部分藥效可能與 methyl anhydroberberilate 有關，且可能對 ALDH2 具有與 Alda-1 類似之促進作用。然而，methyl anhydroberberilate 為臺灣黃柏根部之微量成分(約 3.95 ppm)，因此須找到快速製備此化合物之方法。文獻有報導可自小檗鹼(berberine)製備得到 methyl anhydroberberilate 之方法<sup>14-16</sup>。

## 1.5. 研究目的

考量到人為設計化合物時，常一味追求更強之結合親和力(binding affinity)而忽略其毒性，且此設計理念主要用於抑制劑之開發，對於活化劑之開發可能不適用。本研究根據 Alda-1 之結構，認為其 2,6-雙氧與羰基等官能基對所具有之官能基有決定性之影響，因此製備出一系列類似物。此外，本實驗室以天然物為起始物，以製備具與 Alda-1 類似骨架之 methyl anhydroberberilate 之類似。期能藉由野生型粒線體醛去氫酶 2 活性促進試驗，觀察結構上的改變對促進活性之影響。



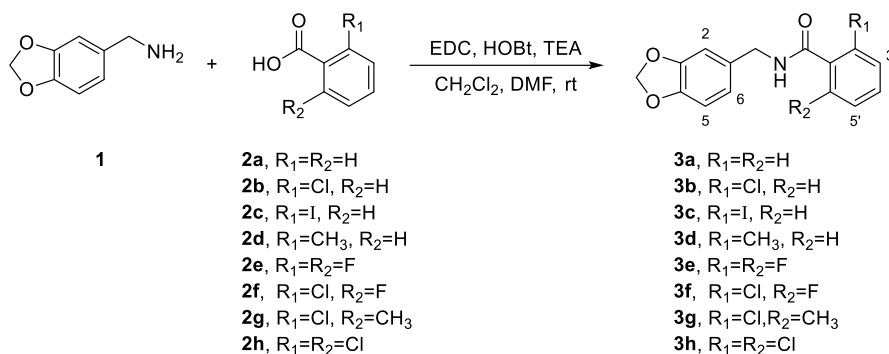


## 2. 結果與討論

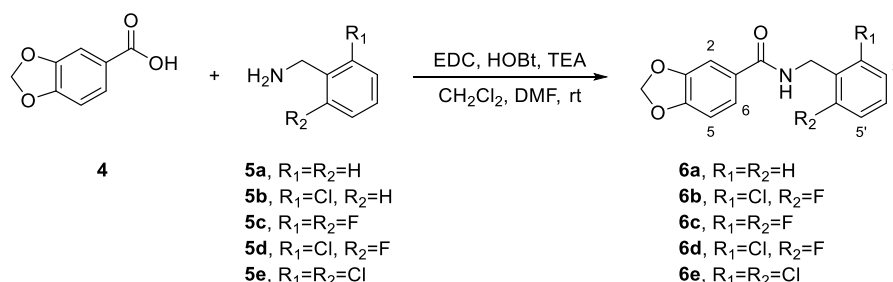
### 2.1. Alda-1 analogs-1 (**3a–h**)與 analogs-2 (**6a–e**)之製備

針對 Alda-1 之結構合成一系列類似化合物，主要分為兩個部分：Alda-1 analogs-1 與 Alda-1 analogs-2。如 Scheme 1 與 Scheme 2 所示，使用 EDC [1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride] 作為偶合試劑，將羧酸活化為 *O*-acylisourea，使化合物 **1** 及 **3** 分別與化合物 **2a–h** 及 **5a–e** 進行醯胺偶合反應。加入 HOBt (1-hydroxybenzotriazole) 可避免 *O*-acylisourea 因 acyl transfer 而轉變為不反應之 epimer (*N*-acylisourea)，此時胺基化合物再與之反應，生成醯胺化合物 **3a–d**、**3e** (Alda-2)、**3f–g**、**3h** (Alda-1) 及 **6a–e** (Scheme 3)<sup>17</sup>，產率為 74–96%。

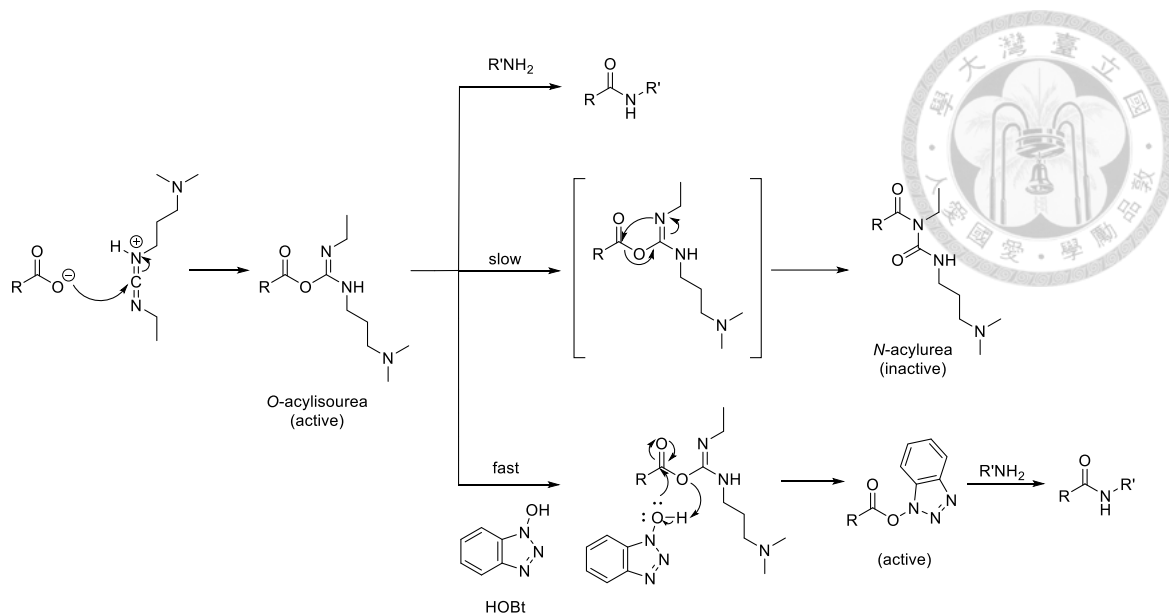
有文獻報導 2,6-dichlorobenzoyl chloride 與 piperonylamine 行加成消去反應合成 Alda-1 (Scheme 4)<sup>18</sup>，但此反應之起始物(苯甲醯氯)較本實驗之起始物不穩定且昂貴，故選擇使用 EDC 偶合反應來進行實驗。



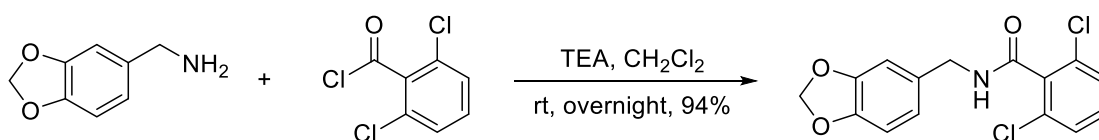
Scheme 1. Preparation of compounds **3a–h**



Scheme 2. Preparation of compounds **6a–e**



**Scheme 3.** Amide generation by EDC coupling reaction



**Scheme 4.** Preparation of Alda-1 by addition-elimination of 2,6-dichlorobenzoyl chloride and piperonylamine<sup>18</sup>

在化合物 **3a-h** 及 **6a-e** 之 <sup>13</sup>C NMR 圖譜中，於δ 160.2–169.8皆出現醯胺碳之訊號，再配合質譜分析裡可見 **3a-3h** 及 **6a-e** 偽分子峰分別為[M + Na]<sup>+</sup> m/z 278.0, 312.0, 403.9, 292.0, 314.0, 330.0, 326.0, 346.0, 278.0, 312.0, 314.0, 329.8, 345.8，可證實此系列化合物之結構。

在化合物 **3a-h** 之  $^1\text{H}$  NMR 圖譜( $\text{CDCl}_3$ , Table 1-3)皆出現 *N*-piperonyl 之訊號 [ $\delta$  6.89–6.80 (d,  $J = 1.6$ – $1.2$  Hz, 1H, H-2), 6.83–6.76 (dd,  $J = 8.0$ – $7.9$ ,  $1.6$ – $1.2$  Hz, 1H, H-6), 6.76–6.72 (d,  $J = 7.9$ – $7.8$  Hz, 1H, H-5), 5.94–5.90 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 4.57–4.47 (d,  $J = 5.8$ – $5.6$  Hz, 2H,  $\text{NHCH}_2$ )]；在化合物 **6a-e** 之  $^1\text{H}$  NMR 圖譜( $\text{CD}_3\text{OD}$ , Table 4 and 5)<sup>註二</sup>皆出現 3,4-methylenedioxybenzamide [ $\delta$  7.46–7.37 (dd,  $J = 8.2$ – $8.1$ ,  $1.8$  Hz, 1H, H-6), 7.34–7.26 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H, H-2), 6.89–6.83 (d,  $J = 8.2$ – $8.1$  Hz, 1H, H-5), 6.03–6.00 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{O}$ )]與 *N*-benzylic 氫 [ $\delta$  4.81–4.53 (s, 2H,  $\text{NHCH}_2$ )]。

化合物 **3h** (Alda-1)之 NMR  $^1\text{H}$  圖譜 NMR 圖譜(Figure S16)中，H-4'之訊號呈現訊號強度由化學位移高往低方向漸弱之雙峰訊號 [ $\delta$  7.36 (dd,  $J = 9.5$ ,  $6.2$  Hz, 1H, H-4')]，而 H-3'呈現一組雙峰與寬化單峰組成之訊號。觀察 **6e** 之  $^1\text{H}$  NMR 圖譜(Figure S38)，其 H-3'為不對稱寬化雙峰，推測其為兩組訊號強度由化學位移高往低方向漸強之雙峰重疊，根據上述訊息，推測 **3h** 之 H-3'亦呈現兩組訊號強度由化學位移高往低方向漸強之雙峰訊號，而此二雙峰只有化學位移較低之兩個峰重疊在一起使成為寬化單峰 [ $\delta$  7.42 (d,  $J = 9.5$  Hz, 1H), 7.41 (d,  $J = 6.4$  Hz, 1H)]。透過 HSQC、HMBC 可標定  $^{13}\text{C}$  NMR 圖譜之訊號(Table 4)，而其中 HSQC 顯示訊號( $\delta$  132.1)與 H-3'及 H-4'有關聯(Figure S20)，推測其為兩根訊號重疊。

---

<sup>註二</sup> **6a-e**  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) 之 solvent peak 與此類化合物芳香環區訊號嚴重地重疊，影響圖譜判讀，故另外以  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 輔助結構解析。

**Table 1.**  $^1\text{H}$  (400 MHz) and  $^{13}\text{C}$  (50 MHz) NMR data of **3a–c** in  $\text{CDCl}_3^{\text{a}}$ 

Position	<b>3a</b>		<b>3b</b>		<b>3c</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (J/Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J/Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J/Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		132.0	-	131.4		131.3
2	6.80 d (1.3)	108.3	6.83 d (1.4)	108.3	6.89 d (1.2)	108.3
3		146.9		147.0		147.1
4		147.9		147.9		147.9
5	6.72 d (7.9)	108.4	6.74 d (7.8)	108.4	6.76 d (7.9)	108.7
6	6.76 dd (8.0, 1.4)	121.1	6.79 dd (8.0, 1.4)	127.0	6.83 dd (7.9, 1.3)	128.2
1'		134.2		134.8		141.9
2'	7.76–7.74 m	126.9		130.6		92.4 <sup>b</sup>
3'	7.38 br. t (7.2)	128.5	7.36 dd (7.9, 1.5)	130.2	7.39–7.33 m	139.9
4'	7.46 tt (7.3, 1.1)	131.5	7.32 td (7.1, 1.8)	131.3	7.39–7.33 m	131.2
5'			7.28 td (7.1, 1.7)	121.2	7.07 td (7.5, 2.0)	128.2
6'			7.62 dd (7.2, 1.8)	130.1	7.83 d (7.9)	121.5
OCH <sub>2</sub> O	5.90 s	101.0	5.92 s	101.1	5.94 s	101.1
NHCH <sub>2</sub>	4.48 d (5.6)	43.8	4.51 d (5.6)	44.0	4.52 d (5.6)	44.0
C=O		167.3		166.3		169.1
NHCH <sub>2</sub>	6.63 br. s		6.51 br. s		5.97 br. s	

<sup>a</sup>: 使用 nmrdb.org 預測  $^1\text{H}$  和  $^{13}\text{C}$  NMR 圖譜以輔助各訊號之標定

<sup>b</sup>: 取代基為碘，導致碳化學位移較低

**Table 2.**  $^1\text{H}$  (400 MHz) and  $^{13}\text{C}$  (50 MHz) NMR data of **3d**, **3g** in  $\text{CDCl}_3$ <sup>a</sup>

Position	<b>3d</b>		<b>3g</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (J/Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J/Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		132.0		130.5
2	6.81 d (1.2)	108.30	6.85 d (1.6)	108.3
3		147.0		147.1
4		147.9		147.9
5	6.74 d (7.9)	108.35	6.74 d (7.9)	108.6
6	6.77 dd (8.0, 1.2)	125.7	6.80 dd (7.9, 1.6)	121.4
1'		136.1		136.3
2'		136.1		126.7
3'	7.19–7.13 m	131.0	7.17–7.15 m	130.2
4'	7.27 td (7.6, 1.1)	129.9	7.07–7.05 m	129.8
5'	7.19–7.13 m	126.6	7.17–7.15 m	128.5
6'	7.31 d (7.6)	121.1		137.1
OCH <sub>2</sub> O	5.92 s	101.0	5.93 s	101.1
NHCH <sub>2</sub>	4.47 d (5.8)	43.6	4.53 d (5.7)	43.7
C=O		169.8		167.1
NHCH <sub>2</sub>	6.11 br. s		5.98 br. s	
Ar-CH <sub>3</sub>	2.41 s	19.8	2.32 s	19.3

<sup>a</sup>: 使用 nmrdb.org 預測  $^1\text{H}$  和  $^{13}\text{C}$  NMR 圖譜以輔助各訊號之標定



**Table 3.**  $^1\text{H}$  (400 MHz) and  $^{13}\text{C}$  (BBD, 50 MHz) NMR data of **3e** and **3f** in  $\text{CDCl}_3$ <sup>a</sup>

Position	<b>3e</b>		<b>3f</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (J/Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J/Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		131.2		131.0
2	6.84 d (1.3)	108.3	6.82 d (1.4)	108.3
3		147.1		147.0
4		147.9		147.9
5	6.75 d (7.9)	108.3	6.73 d (7.9)	108.4
6	6.79 dd (7.9, 1.3)	121.1	6.77 dd (7.9, 1.4)	121.2
1'		114.1 t (20.0) <sup>b</sup>		125.1 d (21.6) <sup>b</sup>
2'		159.9 dd (250.7, 6.5) <sup>b</sup>		132.3 d (5.6) <sup>b</sup>
3'	6.92 t-like (8.2) <sup>b</sup>	112.0 dd (22.7, 3.2) <sup>b</sup>	7.16 br. d (8.0) <sup>b</sup>	125.5 d (4.0) <sup>b</sup>
4'	7.34 tt (8.4, 6.4) <sup>b</sup>	131.7 t (10.4) <sup>b</sup>	7.25 td (8.2, 6.0) <sup>b</sup>	131.1 d (9.4) <sup>b</sup>
5'			6.99 td (8.5, 0.9) <sup>b</sup>	114.4 d (22.3) <sup>b</sup>
6'				159.4 d (251.5) <sup>b</sup>
$\text{OCH}_2\text{O}$	5.93 s	101.1	5.91 s	101.1
$\text{NHCH}_2$	4.54 d (5.7)	43.8	4.51 d (5.7)	43.8
$\text{C}=\text{O}$		160.2		162.2
$\text{NHCH}_2$	6.19 br. s		6.21 br. s	

<sup>a</sup>: 使用 nmrdb.org 預測  $^1\text{H}$  和  $^{13}\text{C}$  NMR 圖譜以輔助各訊號之標定

<sup>b</sup>: 與氟偶合之訊號

**Table 4.**  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR, HSQC and HMBC data of **3h** in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (600 MHz)

Position	<b>3h</b>			
	$\delta_{\text{H}}$ (J/Hz)	$\delta_{\text{C}}$	HSQC	HMBC
1		133.1		5, <u>NHCH<sub>2</sub></u>
2	6.92 d (1.6)	109.5	2	6, <u>NHCH<sub>2</sub></u>
3		148.4		2
4		149.2		5
5	6.76 d (7.9)	109.0	5	
6	6.87 dd (7.9, 1.6)	122.4	6	2, <u>NHCH<sub>2</sub></u>
1'		137.3		3', 5'
2'		133.2		3', 4', 5'
3'	7.41 d (6.4) 7.42 d (9.4)	132.1 129.2	3', 5'	3', 5'
4'	7.36 dd (9.5, 6.2)	132.1	4'	
5'	7.41 d (6.4) 7.42 d (9.4)	132.1 129.2	3', 5'	3', 5'
6'		133.2		3', 4', 5'
OCH <sub>2</sub> O	5.92 s	102.3	OCH <sub>2</sub> O	
<u>NHCH<sub>2</sub></u>	4.47 s	44.2	<u>NHCH<sub>2</sub></u>	
C=O		167.0		<u>NHCH<sub>2</sub></u>

**Table 5.**  $^1\text{H}$  (400 MHz) or  $^{13}\text{C}$  (50 MHz) NMR data of **6a**, **6b** and **6e** in  $\text{CD}_3\text{OD}$  or  $\text{CDCl}_3$ , respectively<sup>a</sup>

Position	<b>6a</b>		<b>6b</b>		<b>6e</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (J/Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J/Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J/Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		128.5		128.3		128.3
2	7.34–7.20 m	107.6	7.34 d (1.8)	107.6	7.27 d (1.8)	107.7
3		147.9		147.9		147.9
4		150.3		150.4		150.3
5	6.87 d (8.2)	107.9	6.89 d (8.1)	107.9	6.84 d (8.1)	107.9
6	7.43 dd (8.2, 1.8)	121.5	7.46 dd (8.1, 1.8)	121.6	7.37 dd (8.1, 1.8)	121.6
1'		134.2		135.5		133.5
2'	7.34–7.20 m	127.8		133.6		136.2
3'	7.34–7.20 m	128.5	7.40–7.35 m	128.9	7.41 d (8.0)	128.5
4'	7.34–7.20 m	127.5	7.29–7.22 m	130.2	7.29 dd (8.6, 7.4)	129.6
5'			7.29–7.22 m	127.1		
6'			7.40–7.35 m	129.5		
OCH <sub>2</sub> O	6.02 s	101.6	6.03 s	101.7	6.00 s	101.1
NHCH <sub>2</sub>	4.53 s	44.1	4.62 s	42.0	4.81 s	44.0
C=O		166.6		166.7		166.3

<sup>a</sup>: 使用 nmrdb.org 預測  $^1\text{H}$  和  $^{13}\text{C}$  NMR 圖譜以輔助各訊號之標定

**Table 6.**  $^1\text{H}$  (400 MHz) or  $^{13}\text{C}$  (BBD, 50 MHz) NMR data of **6c** and **6d** in  $\text{CD}_3\text{OD}$  or  $\text{CDCl}_3$ , respectively<sup>a</sup>

Position	<b>6c</b>		<b>6d</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (J/Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J/Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		128.3		128.3
2	7.26 d (1.8)	107.7	7.27 d (1.8)	108.6
3		147.9		147.8
4		150.3		150.3
5	6.83 d (8.1)	107.9	6.84 d (8.2)	107.9
6	7.37 dd (8.1, 1.8)	121.6	7.37 dd (8.2, 1.8)	121.6
1'		113.8 t (19.1)		123.7 d (17.4) <sup>b</sup>
2'		161.5 dd (247.4, 8.0) <sup>b</sup>		135.5 d (4.7) <sup>b</sup>
3'	6.96 t-like (8.0) <sup>b</sup>	111.4 dd (18.8, 6.6) <sup>b</sup>	7.27–7.25 m <sup>b</sup>	125.4 d (4.0) <sup>b</sup>
4'	7.32 tt (8.4, 6.5) <sup>b</sup>	129.5 t (10.3) <sup>b</sup>	7.34–7.29 m <sup>b</sup>	129.7 d (9.5) <sup>b</sup>
5'		-	7.10 ddd <sup>b</sup> (9.5, 8.1, 1.4)	114.4 d (23.1) <sup>b</sup>
6'				161.6 d (248.3) <sup>b</sup>
OCH <sub>2</sub> O	6.00 s	101.1	6.00 s	101.6
NHCH <sub>2</sub>	4.60 s	43.8	4.68 d (1.4) <sup>B</sup>	35.4 d (4.1) <sup>b</sup>
C=O	-	166.3		166.2

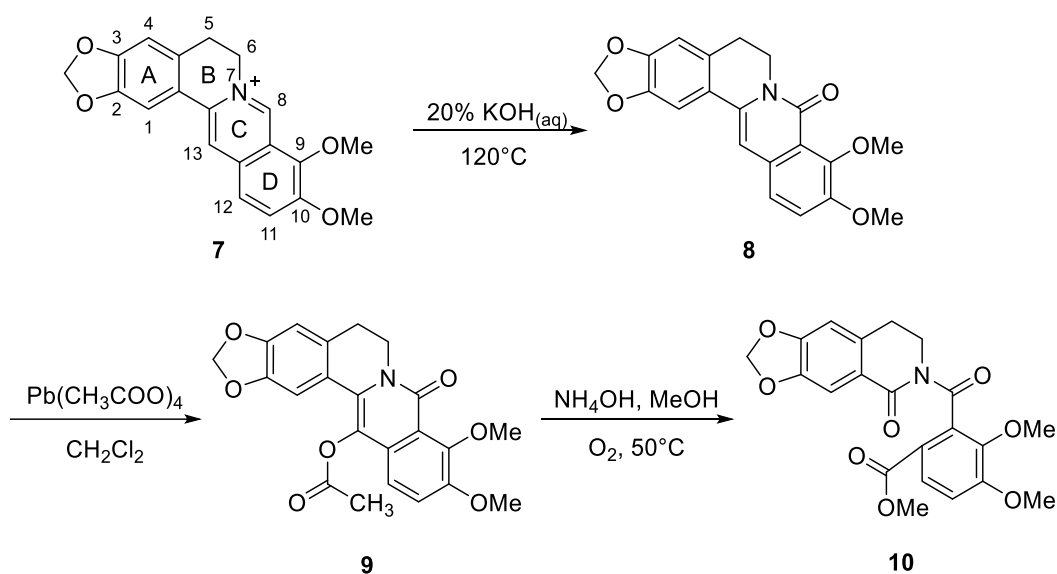
<sup>a</sup>: 使用 nmrdb.org 預測  $^1\text{H}$  和  $^{13}\text{C}$  NMR 圖譜以輔助各訊號之標定

<sup>b</sup>: 與氟偶合之訊號



## 2.2. Methyl anhydroberberilate (10)之製備

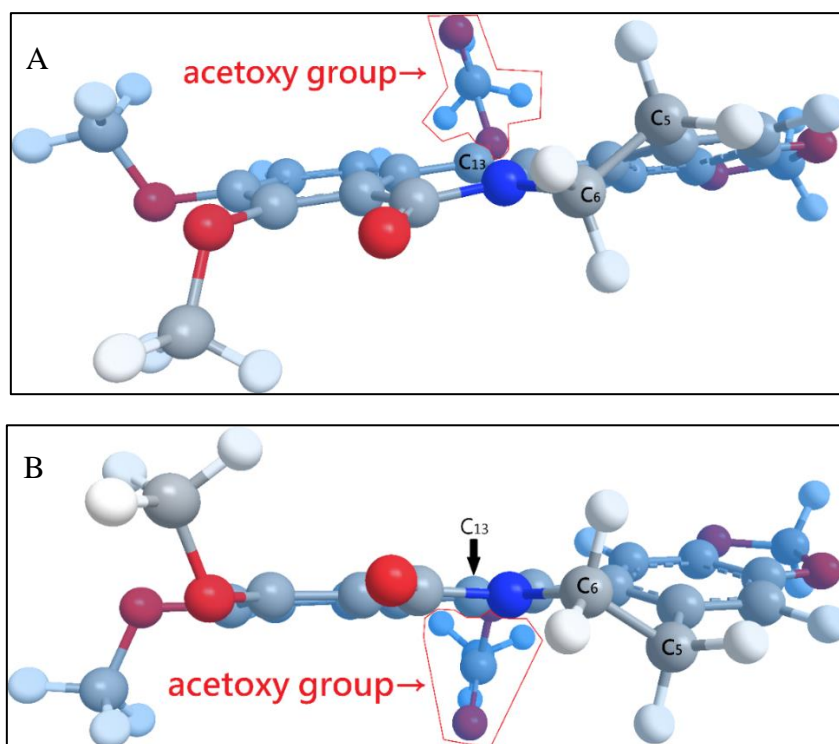
參考文獻方法(Scheme 5)<sup>14-16</sup>，自小檗鹼(berberine, 7)進行化合物 10 之製備。在高溫強鹼條件下，將 7 之 C-8 氧化成羰基(carbonyl)，於 <sup>1</sup>H NMR 圖譜中可見芳香族訊號區之 H-8 [ $\delta$  9.77 (s)] 已消失，且於 <sup>13</sup>C NMR 中可見醯胺碳之訊號( $\delta$  160.1)，支持 C-8 被氧化成羰基，與文獻比對確認為 oxyberberine (8)<sup>14</sup>。不同鹽類，對反應時間影響甚鉅。當起始物為氯鹽(berberine chloride)時，反應時間 6–12 小時，可得產率 44–48%；若起始物為過氯酸鹽(berberine perchlorate)時，反應時間須拉長至 20.5 小時，才能達到 46% 之產率。因為過氯酸鹽的溶解度非常差，故推測多數固體在反應進行時並未溶解於反應液中，導致反應速率大幅下降。



Scheme 5. Preparation of methyl anhydroberberilate (10)<sup>14-16</sup>

將化合物 8 溶於二氯甲烷，加入四乙酸鉛[Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>4</sub>]，使 C-13 接上一個乙醯氧基(acetoxy group)。於 <sup>1</sup>H NMR 與 <sup>13</sup>C NMR 圖譜中可見乙醯氧基之訊號 [ $\delta$  2.35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>) ppm /  $\delta$  21.2 (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>), 169.0 (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>) ]，與文獻比對確認為 13-acetoxyoxyberberine (9)<sup>15</sup>，產率為 50%。推測化合物 9 在較低溫之環境下，C<sub>13</sub>-

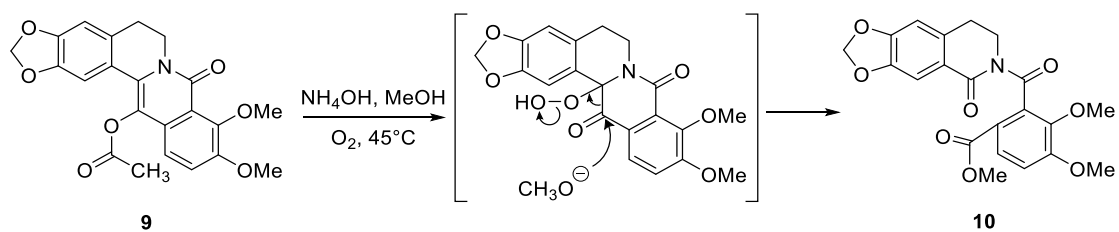
乙醯氧基無法轉過整個分子平面，故只能以其中一個構形存在(Figure 15)<sup>15</sup>，進而導致 C-6、C-5 位置之兩個 H 分別處在偽軸型(pseudo-axial)及偽赤道型(pseudo-equatorial)之位置上。H-6 較接近 C<sub>8</sub>=O，故其於 <sup>1</sup>H NMR 圖譜之化學位移較 H-5 高，其中又以 H-6<sub>pseudo-eq</sub> 與 C<sub>8</sub>=O 共平面，導致其受到較強之 anisotropic effect，故其化學位移最高，H-6<sub>pseudo-ax</sub> 次之，再配合偶合常數及訊號分裂<sup>註三</sup>，可標定 H-6<sub>pseudo-eq</sub> 及 H-6<sub>pseudo-ax</sub> [ $\delta$  5.12 (dt-like,  $J = 13.0$  Hz, 1H, H-6<sub>pseudo-eq</sub>), 3.30 (td,  $J = 12.8, 2.9$  Hz, 1H, H-6<sub>pseudo-ax</sub>) ppm]。藉由偶合常數及訊號分裂，可標定 H-5<sub>pseudo-ax</sub> 及 H-5<sub>pseudo-eq</sub> [ $\delta$  2.88 (td,  $J = 12.7, 3.8$  Hz, 1H, H-5<sub>pseudo-ax</sub>), 2.78 (dt-like,  $J = 15.2$  Hz, 1H, H-5<sub>pseudo-eq</sub>) ppm]。



**Figure 14.** 以ChemBio 3D計算化合物9之能量最小立體結構，乙醯氧基在整個分子平面上(A)、下(B)時，皆具有最小之能量(54.3039 kcal/mol)。

<sup>註三</sup> <sup>1</sup>H NMR (400 MHz)圖譜解析度不足，導致 H-6<sub>pseudo-eq</sub> 與 H-5 之較小偶合常數無法被解析，進而使其訊號呈現 dt-like 之分裂，H-5<sub>pseudo-eq</sub> 與上述情形相同。

化合物 **9** 接著以甲醇和氨水在 45°C 條件下進行開環氧化反應(Scheme 5)，於  $^1\text{H}$  NMR 圖譜與  $^{13}\text{C}$  NMR 圖譜甲脂基之訊號 [ $\delta$  3.89 (s, 3H,  $\text{COOCH}_3$ ) ppm /  $\delta$  28.0 ( $\text{COOCH}_3$ ), 168.8 ( $\text{COOCH}_3$ ) ppm]，於  $^{13}\text{C}$  NMR 中可見醯亞胺之二個羰基碳 (imide carbonyl carbons) 訊號( $\delta$  163.7, 165.6 ppm)，與文獻比對確認為 methyl anhydroberberilate (**10**)<sup>16</sup>，產率為 74%。



**Scheme 6.** Proposed mechanism of the C ring opening of **9**<sup>19</sup>

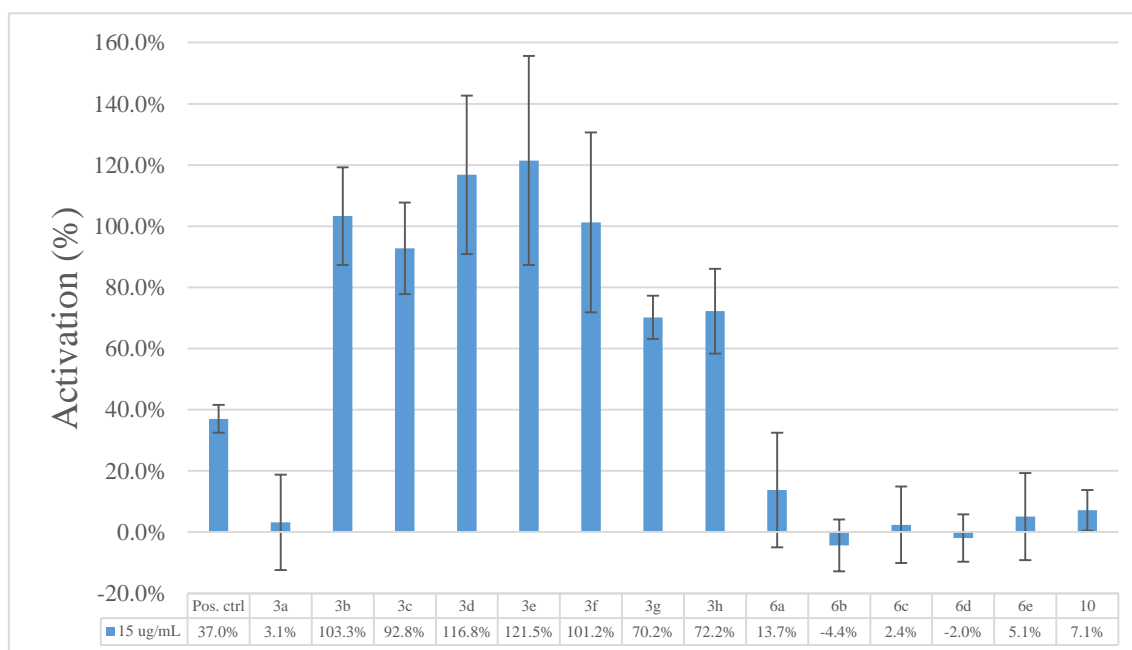


### 2.3. 體外野生型粒線體醛去氫酶 2 促進活性結果

因亞洲變異型粒線體醛去氫酶 2 取得不易，故以野生型粒線體醛去氫酶 2 作為本實驗之標的酵素。將製備之化合物進行體外野生型粒線體醛去氫酶 2 促進活性測試(Figure 15)。將化合物 **3a–h**、**6a–e**、**10** 以 DMSO (dimethyl sulfoxide) 溶解，配成測試之終濃度為 15  $\mu\text{g/mL}$ ，1% DMSO 溶液，除化合物 **3c** 外，其他化合物在 15  $\mu\text{g/mL}$  之濃度下之莫耳濃度皆接近 50  $\mu\text{M}$  (Table 7)，正向控制組為 3  $\mu\text{g/mL}$  (約 9.25  $\mu\text{M}$ ) Alda-1 (**I**)。三重覆結果顯示於 Figure 16，化合物 **3b–h** 具有較佳之促進活性，其中 **3b**、**3d**、**3e**、**3f** 在此濃度下之促進活性大於 100%。

**Table 7.** 化合物 **3a–h**、**6a–e** 及 **10** 於 15  $\mu\text{g/mL}$  與莫耳濃度之換算表

Cpd	3a	3b	3c	3d	3e	3f	3g	3h	6a	6b	6c	6d	6e	10
Conc. ( $\mu\text{M}$ )	58.8	51.8	39.4	55.7	51.5	48.7	49.5	46.3	58.8	51.8	51.5	48.7	46.3	36.3



**Figure 15.** Activation (%) of ALDH2 by compounds **3a–h**、**6a–e** 及 **10**. Pos. ctrl 為 positive control.





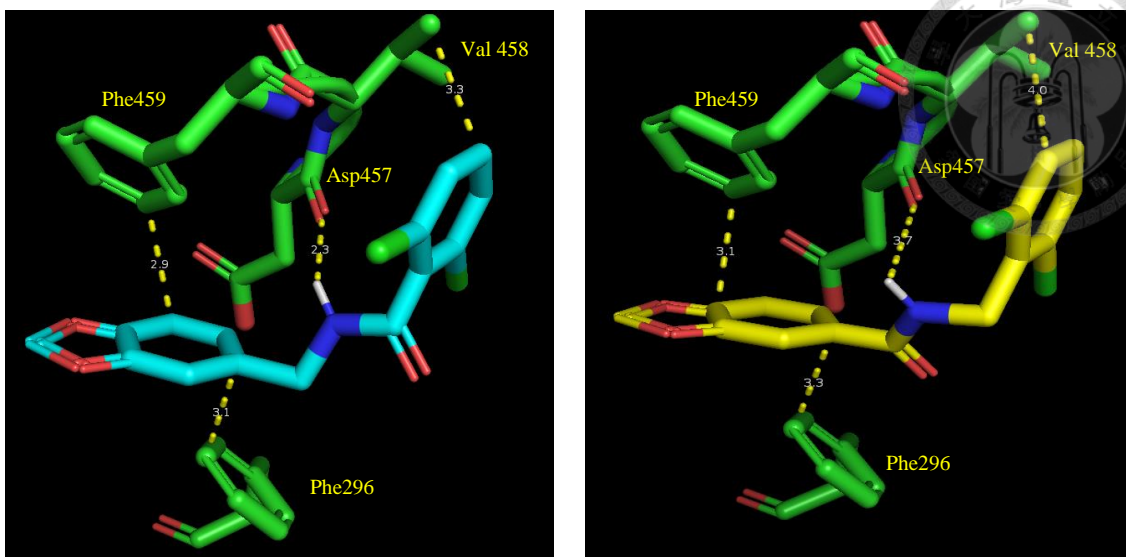
化合物 **3a-h**、**6a-e** 之分子量、 $\text{clog } P$ 、氫鍵給予者數量與氫鍵接受者數量 (Table 8) 皆符合 Lipinski's rule of five (分子量  $\leq 500$  道爾吞,  $\log P \leq 5$ , 氫鍵給予者數量  $\leq 5$  與氫鍵接受者數量  $\leq 10$ )，而化合物 **10** 為天然物，不適用於 Lipinski's rule of five，故不列入討論。

**Table 8.** 化合物 **3a-h**、**6a-e** 及 **10** 之分子量、 $\text{clog } P$ 、氫鍵給予者數量與氫鍵接受者數量

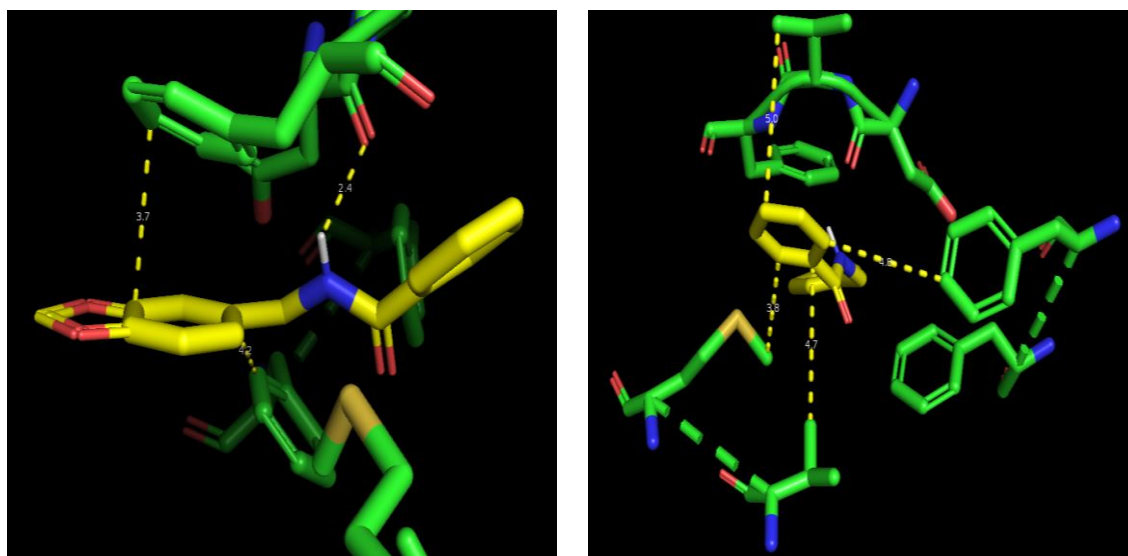
Cpd	3a	3b	3c	3d	3e	3f	3g	3h	6a	6b	6c	6d	6e
MW	278.1	312.0	404.0	292.1	314.1	330.0	326.1	346.0	278.1	312.0	314.1	330.0	346.0
$\text{clog } P$	2.79	2.88	3.07	2.95	2.53	2.68	3.04	2.83	3.02	3.73	3.30	3.87	4.44
H-bond donors	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
H-bond acceptors	4	5	5	4	6	6	5	6	4	5	6	6	6

列於 Figure 15 之體外野生型粒線體醛去氫酶 2 促進活性結果可以發現，當羰基位於甲苯基團 (benzyl group) 之苄基位 (benzylic position) 時 (即化合物 **3b-h**)，促進活性較羰基位於 piperonyl 基團之苄基位，最多增強約 51 倍 [121.5 % (**3e**) / 2.4 % (**6c**) = 50.625]。根據電腦分子模擬結果<sup>註四</sup>，推測其原因為醯胺基之氮與 Asp457 主鏈羰基之間的氫鍵交互作用，受到羰基之位置影響，例如：化合物 **3h** 之羰基位於甲苯基團之苄基位，其醯胺基之氮與 Asp457 主鏈羰基之距離約為 2.3 Å，為氫鍵可作用距離；而化合物 **6e** 之羰基位於 piperonyl 基團之苄基位，其醯胺基之氮與 Asp457 主鏈羰基之距離約為 3.7 Å，大於氫鍵可作用距離 (Figure 16)。

<sup>註四</sup> 電腦分子模擬結果及相關推論由本實驗室鄭名哲同學完成



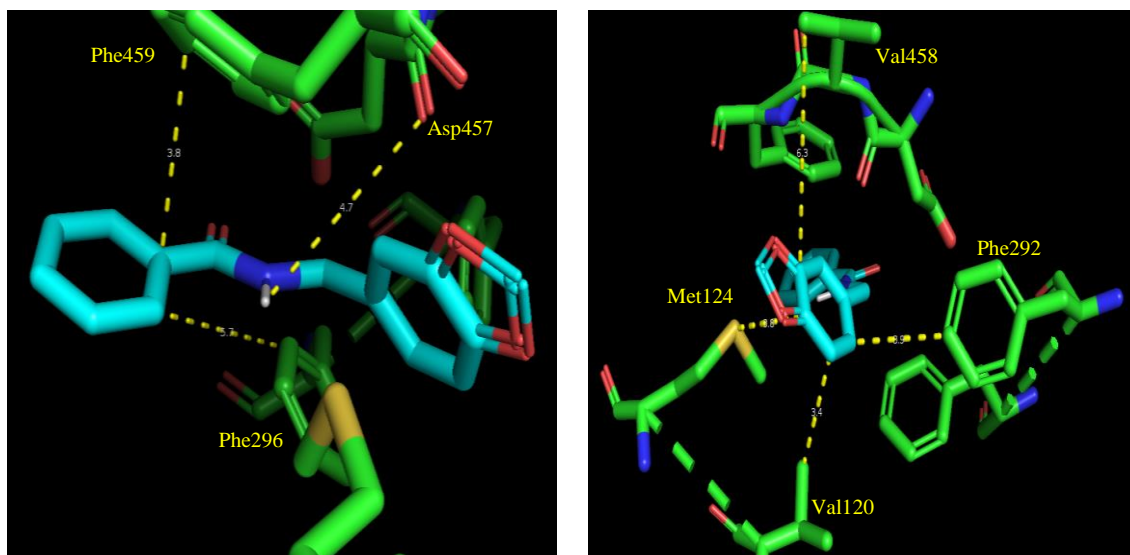
**Figure 16.** 化合物 **3h** (左, 主骨架為青色)及 **6e** (右, 主骨架為黃色)與野生型粒線體醛去氫酶 2 鍵結之電腦分子模擬結果。**3h** 之醯胺基氫與 Asp457 主鏈羰基之距離為 2.3 Å；**6e** 之醯胺基氫與 Asp457 主鏈羰基之距離為 3.7 Å，大於氫鍵可作用距離。



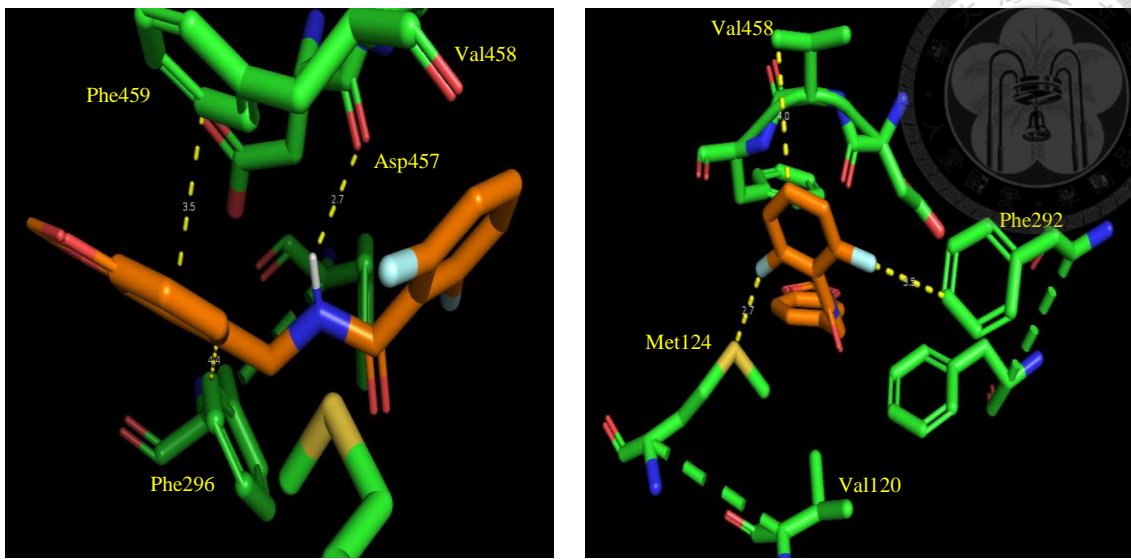
**Figure 17.** 化合物 **3a** (主骨架為黃色)與野生型粒線體醛去氫酶 2 鍵結之電腦分子模擬結果。左(側視圖):醯胺基氫與 Asp457 主鏈羰基之距離為 2.4 Å；右(視角由分子進入口外側往內側)。

另外透過電腦分子模擬結果，化合物 **3a** 之苯甲醯基芳香環不具有取代基，使其不會卡在酵素受質出入口，導致其與酵素之結合模式可能有兩種：一種即與其他化合物 **3** 之結合模式相同，由 piperonyl 那一端插入野生型粒線體醛去氫酶 2 (Figure 17)；另一種結合模式為苯甲醯基芳香環插入野生型粒線體醛去氫酶 2 (Figure 18)，此種結合模式導致醯胺基之氮與 Asp457 主鏈羰基之距離約為 4.7 Å，大於氫鍵可作用距離，而根據實驗結果，**3a** 應是採用後者之結合模式。

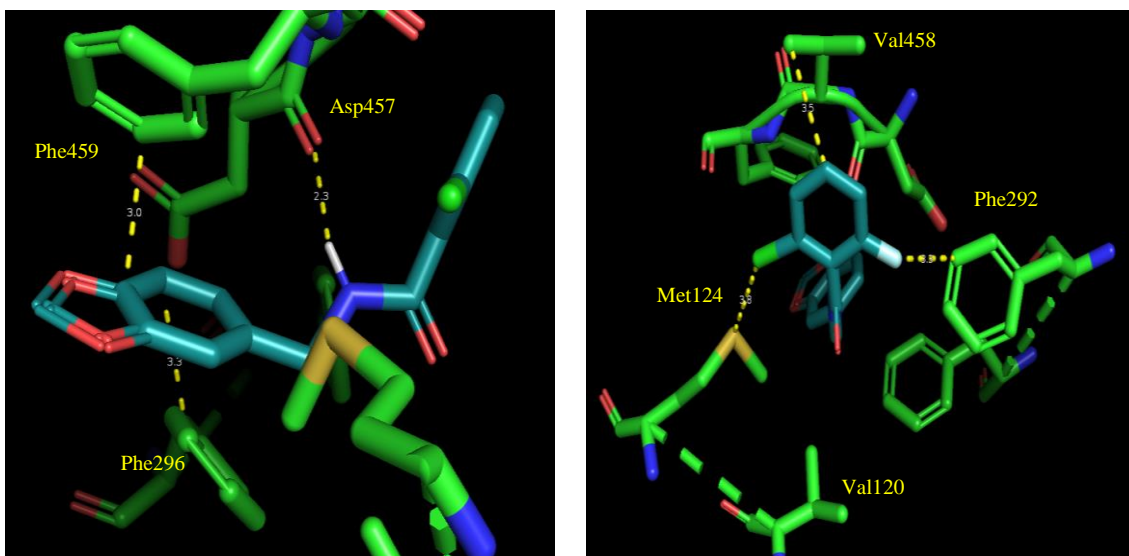
此外，也可看到野生型粒線體醛去氫酶 2 之受質出入口有許多非極性胺基酸 (Figure 19 右)，而當 **3b-h** 之苯甲醯基 (benzoyl group) 之芳香環，其 2' 或 6' 位置上之取代基，若使整個芳香環較為非極性，則促進活性稍佳。除此之外，前述位置之取代基大小也會影響促進活性，若取代基較大而導致較大之立體阻礙，使分子偏離與酵素最佳結合之位置，進而降低促進活性，例如：化合物 **3e** 之 3,4-亞甲二氧苄基基團之苯環與 Phe459 支鏈芳香環平行 (Figure 19)，可能具有  $\pi$ - $\pi$  交互作用；而化合物 **3f** 只與 **3e** 差在其中一個氟變為氯，其 3,4-亞甲二氧苄基基團之苯環卻不再與 Phe459 支鏈芳香環平行 (Figure 20)，因此無  $\pi$ - $\pi$  交互作用。



**Figure 18.** 化合物 **3a** (主骨架為青色)與野生型粒線體醛去氫酶 2 鍵結之另一種電腦分子模擬結果。左(側視圖):醯胺基氮與 Asp457 主鏈羰基之距離約為 4.7 Å，超過氫鍵可作用距離；右(視角由分子進入口外側往內側)。



**Figure 19.** 化合物 **3e** (主骨架為棕色)與野生型粒線體醛去氫酶 2 鍵結之電腦分子模擬結果。左(側視圖):醯胺基氫與 Asp457 主鏈羰基之距離為 2.7 Å，且 piperonyl 基團之苯環與 Phe459 支鏈芳香環平行，可能具有 $\pi$ - $\pi$ 交互作用；右(視角由分子進入口外側往內側): **3e** 之 2,6-雙氟苯環與粒線體醛去氫酶 2 受質入口周圍之胺基酸可能具有疏水性交互作用(hydrophobic interaction)。



**Figure 20.** 化合物 **3f** (主骨架為深綠色)與野生型粒線體醛去氫酶 2 鍵結之電腦分子模擬結果。左(側視圖)；右(視角由分子進入口外側往內側)。2-氯原子取代基之體積較 **3e** 之 2-氟原子取代基大，可能因此立體障礙導致 **3f** piperonyl 基團之苯環不像 **3e** 與 Phe459 支鏈芳香環平行，失去 $\pi$ - $\pi$ 交互作用。

此外，在本研究中，**3e** 之促進活性大於 **3h**，與文獻結果相反<sup>註五</sup>，推測其原因為 **3e** 之 2,6-雙氟取代基較 **3h** 之 2,6-雙氯取代基小，導致其具有較佳之酵素結合位置(Figures 16 左 與 17)，進而使其促進活性較好。

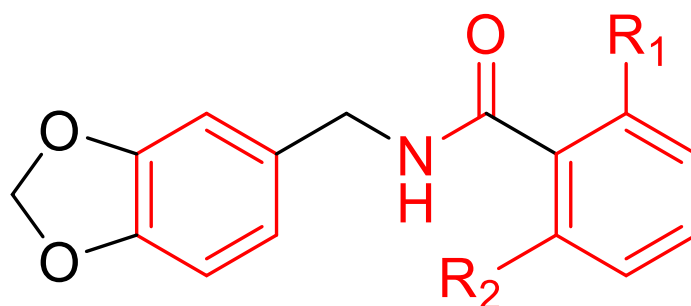


Figure 21. 影響Alda-1類似物促進活性之可能基團(紅色部分)

透過上述體外活性試驗結果與電腦分子模擬結果<sup>註六</sup>，可以推測出 Alda-1 analogs 之結構活性關係(Structure-Activity Relationship)：(1)醯胺氫與 Asp457 主鏈羰基必須在氫鍵可作用距離內；(2)苯甲醯基芳香環 2'或 6'位置上之必須至少存在一取代基使 Alda analogs 以正確方式作用於野生型粒線體醛去氫酶 2；(3)苯甲醯基芳香環 2'或 6'位置上之取代基須使整個芳香環較非極性且其造成之立體障礙越小越好；(4) piperonyl 基團之苯環須與 Phe459 支鏈芳香環平行以得到 $\pi$ - $\pi$ 交互作用。

<sup>註五</sup> 10  $\mu$ M of **3e** and **3h** were reported to increase wild-type ALDH2 enzyme activity by 41% and 65%, respectively; however, in our results, **3e** increased wild-type ALDH2 better than that of **3h** (121.5% and 72.2% for **3e** and **3h**, respectively, at around 50  $\mu$ m)

<sup>註六</sup> 電腦分子模擬結果及相關推論由本實驗室鄭名哲同學完成



### 3. 實驗方法

#### 3.1. 儀器與材料

##### 3.1.1. 理化性質測定儀器

各化合物之物理數據係以下列儀器測定：

Fourier-Transform Infrared Spectrometer: JASCO FT/IR-410 (JASCO, Tokyo, Japan)

Ultraviolet: U-2100 spectrophotometer (Hitachi High-Technology Corp., Tokyo, Japan)

ESI-MS: Esquire 2000 ion trap mass spectrometer (Bruker Daltonik, Bremen, Germany)

HR-ESI-MS: microTOF orthogonal ESI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonik, Bremen, Germany)

NMR: Bruker DPX-200 NMR spectrometer (Bremen, Germany)

Bruker Avance 400 NMR spectrometer (Bremen, Germany)

溶劑化學位移校正值如下：

CDCl<sub>3</sub>:  $\delta_H$  7.24,  $\delta_C$  77.0; CD<sub>3</sub>OD:  $\delta_H$  3.30,  $\delta_C$  49.0

##### 3.1.2. cLogP 預測軟體

Chemdraw 13.0 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)

##### 3.1.3. 電腦分子模擬計算軟體

AutoDock Vina 1.1.2 (Win 32 version), AutoDock Tools 1.5.6 (Molecular Graphics Lab, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA)

##### 3.1.4. 分子模擬結果成像軟體

PyMOL 2.0 (Schrödinger, New York, NY, USA)



### 3.1.5. 化合物核磁共振圖譜預測

nmrdb.org (Institute of Chemical Sciences and Engineering, Lausanne, Switzerland)

### 3.1.6. 化合物合成、純化使用之材料、溶劑與試藥

#### 3.1.6.1. 化合物純化所使用之材料

分析用薄層矽膠片：

TLC plate, silica gel 60 F254, aluminum sheets (Merck, Darmstadt, Germany)

層析吸附劑：

Silica gel 60 (40–63  $\mu\text{m}$ ) (Merck, Darmstadt, Germany)

Amberlite IRA-400(Cl), ion exchange resin (20–50 mesh) (Fisher, Waltham, MA, USA)

#### 3.1.6.2. 溶劑

ACS 級溶劑：

MeOH (J. T. Baker, Center Valley, PA, USA),  $\text{CHCl}_3$  (Seedchem, Vic Melbourne, Australia),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (Echo Chemical Co., Taiwan), hexanes (Anaqua Chemicals Supply, Hong Kong), EtOAc, isopropanol (Merck, Darmstadt, Germany)

光譜級溶劑：MeOH (Merck, Darmstadt, Germany)

氘取代溶劑：

$\text{CDCl}_3$  99.8%,  $\text{D}_2\text{O}$  99.9% (Cambridge Isotope Lab. Inc., Andover, MA, USA)

$\text{CD}_3\text{OD}$  99.8% (Merck, Darmstadt, Germany)

#### 3.1.6.3. 試藥

Acros (Geel, Belgium):

Benzoic acid, 2-chlorobenzoic acid, 2-chlorobenzylamine, 2-chloro-6-fluorobenzylamine, 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, 2-iodobenzoic acid,



lead (IV) acetate

Alfa Aesar (Heysham, Lancashire, UK):

2-Chlorobenzylamine, 2,6-dichlorobenzoic acid, 2,6-difluorobenzylamine,  
piperonylamine, piperonylic acid

Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MI, USA):

Ammonium hydroxide solution (25%), 2,6-difluorobenzoic acid, 2-iodobenzoic acid,  
triethylamine

J.T. Baker (Center Valley, PA, USA):

Magnesium sulfate (anhydrous), potassium carbonate (anhydrous)

Tokyo Chemical Industry Co. (Tokyo, Japan):

2-Chloro-6-fluorobenzoic acid, *o*-toluic acid

Matrix Scientific (Columbia, SC, USA):

2-Chloro-6-fluorobenzoic acid

Merck (Kenilworth, NJ, USA):

*N,N*-Dimethylformamide

Shanghai Hanhong Chemical Co. (Shanghai, China):

1-Hydroxybenzotriazole hydrate

Wako (Osaka, Japan):

Potassium hydroxide



### 3.1.7. 粒線體醛去氫酶 2 促進活性試驗所用試劑與儀器



酵素：ALDH2 human (Prospec, Rehovot, Israel)

受質：Acetaldehyde (Merck, Darmstadt, Germany)

試藥與溶劑：

2-Mercaptoethanol, Tris HCl (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MI, US), NAD<sup>+</sup> (Acros, Geel, Belgium), potassium chloride (Showa, Tokyo, Japan), NaOH, HCl (J.T. Baker, Center Valley, PA, USA), DI water

儀器：

Microplate spectrophotometer, SpectraMax<sup>®</sup>Paradigm<sup>®</sup>Multi-Mode Detection Platform (Molecular Device, San Jose, CA, USA)



## 3.2. 化合物之製備

### 3.2.1. Alda analogs-1 (**3a–h**)之製備

一般製備方法(以合成化合物 **3a** 為例)：

先將化合物 **2a** (34.5 mg, 0.283 mmol)置於反應瓶中，以二氯甲烷(2.8 mL)溶解後，加入二甲基甲醯胺(280  $\mu$ L)、三乙胺(39  $\mu$ L, 0.280 mmol)與化合物 **1** (35  $\mu$ L, 0.281 mmol)，而後快速加入 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC, 57.8 mg, 0.302 mmol)與 1-hydroxybenzotriazole hydrate (HOBT hydrate, 40.5 mg, 0.300 mmol)，於氮氣環境及室溫下反應 8 小時。加入水(30 mL)，以氯仿(30 mL  $\times$  3)萃取，將有機層合併，減壓濃縮，殘留物以氯仿(10 mL)回溶，依序以 5%檸檬酸水溶液(20 mL  $\times$  3)、飽和碳酸氫鈉水溶液(20 mL  $\times$  3)及飽和食鹽水(10 mL  $\times$  2)分配，有機層減壓濃縮，以二氯甲烷-正己烷之溶劑進行再結晶可得化合物 **3a** (66.1 mg, 92%)。

#### 3.2.1.1. N-(3,4-Methylenedioxy)benzylbenzamide (**3a**)之物理數

據

White solid; m.p.: 114–115°C (文獻值: 115–116°C<sup>20</sup>)

UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) (log  $\epsilon$ ) 283 (4.72)

IR (KBr): 3305, 3067, 3002, 2975, 2940, 2894, 2846, 2787, 1974, 1853, 1759, 1629, 1604, 1578, 1499, 1440, 1309, 1251, 1229, 1090, 1043, 940, 821, 769, 720, 697, 640  $\text{cm}^{-1}$

clog *P*: 2.79

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) data:

$\delta$  7.76–7.74 (m, 2H, H-2'), 7.46 (tt, *J* = 7.3, 1.1 Hz, 1H, H-4'), 7.38 (br. t, *J* = 7.2 Hz, 2H, H-3'), 6.80 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H-2), 6.76 (dd, *J* = 8.0, 1.4 Hz, 1H, H-6), 6.72 (d, *J*



= 7.9 Hz, 1H, H-5), 6.63 (br. s, 1H, NH, D<sub>2</sub>O exchangeable), 5.90 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 4.48 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>)

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) data:

δ 167.3 (C), 147.9 (C), 146.9 (C), 134.2 (C), 132.0 (C) 131.5 (CH), 128.5 (CH × 2), 126.9 (CH × 2), 121.1 (CH), 108.4 (CH), 108.3 (CH), 101.0 (CH<sub>2</sub>), 43.8 (CH<sub>2</sub>)

ESI-MS: [M + Na]<sup>+</sup> *m/z* 278.0, [M + H]<sup>+</sup> *m/z* 256.1

HR-ESI-MS: [M + Na]<sup>+</sup> *m/z* calcd. For C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>NNaO<sub>3</sub>: 278.0788; found: 278.0792

### 3.2.1.2. N-(3,4-Methylenedioxy)benzyl-2-chlorobenzamide (**3b**)

#### 之製備與物理數據

將化合物 **1** (35 μL, 0.281 mmol) 與化合物 **2b** (43.9 mg, 0.280 mmol)，依上述製備方法，得化合物 **3b** (66.0 mg, 82%)。

White solid; m.p.: 102–103°C

UV λ<sub>max</sub> (MeOH) (log ε) 285 (4.69)

IR (KBr): 3304, 3074, 3002, 2930, 2893, 2778, 1849, 1644, 1592, 1531, 1504, 1443, 1375, 1309, 1255, 1039, 926, 746 cm<sup>-1</sup>

clog *P*: 2.88

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) data:

δ 7.62 (dd, *J* = 7.2, 1.8 Hz, 1H, H-6'), 7.36 (dd, *J* = 7.9, 1.5 Hz, 1H, H-3'), 7.32 (td, *J* = 7.1, 1.8 Hz, 1H, H-4'), 7.28 (td, *J* = 7.1, 1.7 Hz, 1H, H-5'), 6.83 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H-2), 6.79 (dd, *J* = 8.0, 1.4 Hz, 1H, H-6), 6.74 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-5), 6.51 (br. s, 1H, NH, D<sub>2</sub>O exchangeable), 5.92 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 4.51 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>)

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) data:

δ 168.3 (C), 147.9 (C), 147.0 (C), 134.8 (C), 131.4 (C) 131.3 (CH), 130.6 (C), 130.2

(CH), 130.1 (CH), 127.0 (CH), 121.2 (CH), 108.4 (CH), 108.3 (CH), 101.1 (CH<sub>2</sub>), 44.0 (CH<sub>2</sub>)

ESI-MS (rel. int. %): [M + 2 + Na]<sup>+</sup> *m/z* 314.0 (35), [M + Na]<sup>+</sup> *m/z* 312.0 (100)

HR-ESI-MS: [M + Na]<sup>+</sup> *m/z* calcd. For C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>ClNNaO<sub>3</sub>: 312.0421; found: 312.0398

### 3.2.1.3. N-(3,4-Methylenedioxy)benzyl-2-iodobenzamide (**3c**)之

#### 製備與物理數據

將化合物 **1** (35 μL, 0.281 mmol)與化合物 **2c** (69.0 mg, 0.278 mmol)，依上述製備方法，得化合物 **3c** (87.0 mg, 82%)。

White solid; m.p.: 141–142°C

UV λ<sub>max</sub> (MeOH) (log ε) 285 (4.70)

IR (KBr): 3253, 3067, 2992, 2899, 2841, 2779, 1969, 1929, 1848, 1637, 1539, 1503, 1443, 1251, 1036, 932, 806, 728 cm<sup>-1</sup>

clog *P*: 3.07

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) data:

δ 7.83 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-6') 7.39–7.33 (m, 2H, H-3' and H-4'), 7.07 (td, *J* = 7.5, 2.0 Hz, 1H, H-5') 6.89 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H-2), 6.83 (dd, *J* = 7.9, 1.3 Hz, 1H, H-6) 6.76 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-5) 5.97 (br. s, 1H, NH, D<sub>2</sub>O exchangeable), 5.94 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 4.52 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>)

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) data:

δ 169.1 (C), 147.9 (C), 147.1 (C), 141.9 (C), 139.9 (C) 131.3 (C), 131.2 (CH), 128.23 (CH), 128.16 (CH), 121.5 (CH), 108.7 (CH), 108.3 (CH), 101.1 (CH<sub>2</sub>), 92.4 (C), 44.0 (CH<sub>2</sub>)

ESI-MS: [M + Na]<sup>+</sup> *m/z* 403.9, [M + H]<sup>+</sup> *m/z* 382.0

HR-ESI-MS:  $[M + Na]^+$   $m/z$  calcd. For  $C_{15}H_{12}INNaO_3$ : 403.9730; found: 403.9766

#### 3.2.1.4. N-(3,4-Methylenedioxy)benzyl-2-methylbenzamide (**3d**)

##### 之製備與物理數據

將化合物 **1** (35  $\mu$ L, 0.281 mmol)與化合物 **2d** (39.0 mg, 0.286 mmol)，依上述製備方法，得化合物 **3d** (91%)。

White solid; m.p.: 114–115°C

UV  $\lambda_{max}$  (MeOH) ( $\log \epsilon$ ) 284 (4.73)

IR (KBr): 3281, 3066, 3021, 2921, 2878, 2789, 1964, 1843, 1732, 1627, 1521, 1503, 1487, 1252, 1039, 933, 809, 741  $cm^{-1}$

clog  $P$ : 2.95

$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ) data:

$\delta$  7.31 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H, H-6'), 7.27 (td,  $J = 7.6, 1.1$  Hz, 1H, H-4'), 7.19–7.13 (m, 2H, H-3' and H-5'), 6.81 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H, H-2), 6.77 (dd,  $J = 8.0, 1.2$  Hz, 1H, H-6), 6.74 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H-5), 6.11 (br. s, 1H, NH,  $D_2O$  exchangeable), 5.92 (s, 2H,  $OCH_2O$ ), 4.47 (d,  $J = 5.8$  Hz, 2H,  $NHCH_2$ ), 2.41 (s, 3H,  $C_2-CH_3$ )

$^{13}C$  NMR (50 MHz,  $CDCl_3$ ) data:

$\delta$  169.8 (C), 147.9 (C), 147.0 (C), 136.1 (C  $\times$  2), 132.0 (C), 131.0 (CH), 129.9 (CH), 126.6 (CH), 125.7 (CH), 121.1 (CH), 108.35 (CH), 108.30 (CH), 101.0 ( $CH_2$ ), 43.6 ( $CH_2$ ), 19.8 ( $CH_3$ )

ESI-MS:  $[M + Na]^+$   $m/z$  292.0,  $[M + H]^+$   $m/z$  270.1

HR-ESI-MS:  $[M + Na]^+$   $m/z$  calcd. For  $C_{16}H_{15}NNaO_3$ : 292.0944; found: 292.0966



### 3.2.1.5. N-(3,4-Methylenedioxy)benzyl-2,6-difluorobenzamide

#### (3e)之製備與物理數據

將化合物 **1** (35  $\mu$ L, 0.281 mmol)與化合物 **2e** (45.0, 0.285 mmol)，依上述製備方法，得化合物 **3e** (68.6 mg, 84%)。

White solid; m.p.: 127–128°C

UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) (log  $\epsilon$ ) 286 (4.69)

IR (KBr): 3364, 3073, 3041, 3002, 2972, 2940, 2906, 2790, 1954, 1858, 1652, 1524, 1491, 1459, 1250, 1038, 999, 975, 926, 799, 776, 646  $\text{cm}^{-1}$

clog *P*: 2.53

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data:

$\delta$  7.34 (tt,  $J = 8.4, 6.4$  Hz, 1H, H-4'), 6.92 (t-like,  $J = 8.2$  Hz, 2H, H-3'), 6.84 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H, H-2), 6.79 (dd,  $J = 7.9, 1.3$  Hz, 1H, H-6), 6.75 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H-5), 6.19 (br. s, 1H, NH,  $\text{D}_2\text{O}$  exchangeable) 5.93 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 4.54 (d,  $J = 5.7$  Hz, 2H,  $\text{NHCH}_2$ )

$^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data:

$\delta$  160.2 (C), 159.9 (dd,  $J_{\text{C-F}} = 250.7, 6.5$  Hz, C, C-2'), 147.9 (C), 147.1 (C), 131.7 (t,  $J_{\text{C-F}} = 10.4$  Hz, C, C-4'), 131.2 (C), 121.1 (CH), 114.1 (t,  $J_{\text{C-F}} = 20.0$  Hz, CH, C-1'), 112.0 (dd,  $J_{\text{C-F}} = 22.7, 3.2$  Hz, CH, C-3'), 108.3 (CH  $\times$  2), 101.1 ( $\text{CH}_2$ ), 43.8 ( $\text{CH}_2$ )

ESI-MS:  $[\text{M} + \text{Na}]^+ m/z$  314.0,  $[\text{M} + \text{H}]^+ m/z$  292.1

HR-ESI-MS:  $[\text{M} + \text{Na}]^+ m/z$  calcd. For  $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{F}_2\text{NNaO}_3$ : 314.0599; found: 314.0621

### 3.2.1.6. N-(3,4-Methylenedioxy)benzyl-2-chloro-6-

### fluorobenzamide (**3f**)之製備與物理數據



將化合物 **1** (35  $\mu$ L, 0.281 mmol)與化合物 **2f** (48.3 mg, 0.277 mmol)，依上述製備方法，得化合物 **3f** (62.6 mg, 74%)。

White needle crystal; m.p.: 114–115°C

UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) (log  $\epsilon$ ) 274 (4.87)

IR (KBr): 3260, 3069, 2911, 1848, 1648, 1544, 1489, 1445, 1254, 1040, 928, 899  $\text{cm}^{-1}$

clog  $P$ : 2.68

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data:

$\delta$  7.25 (td,  $J = 8.2, 6.0$  Hz, 1H, H-4'), 7.16 (br. d,  $J = 8.0$  Hz, 2H, H-3'), 6.99 (td,  $J = 8.5, 0.9$  Hz, 1H, H-5'), 6.82 (d,  $J = 1.4$  Hz, 1H, H-2), 6.77 (dd,  $J = 7.9, 1.4$  Hz, 1H, H-6), 6.73 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H-5), 6.21 (br. s, 1H, NH,  $\text{D}_2\text{O}$  exchangeable), 5.91 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 4.51 (d,  $J = 5.7$  Hz, 2H,  $\text{NHCH}_2$ )

$^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data:

$\delta$  162.2 (C), 159.4 (d,  $J_{\text{C-F}} = 251.5$  Hz, C, C-6'), 147.9 (C), 147.0 (C), 132.3 (d,  $J_{\text{C-F}} = 5.6$  Hz, C, C-2'), 131.1 (d,  $J_{\text{C-F}} = 9.4$  Hz, CH, C-4'), 131.0 (C), 125.5 (d,  $J_{\text{C-F}} = 4.0$  Hz, CH, C-3'), 125.1 (d,  $J_{\text{C-F}} = 21.6$  Hz, C, C-1'), 121.2 (CH), 114.4 (d,  $J_{\text{C-F}} = 22.3$  Hz, CH, C-5'), 108.4 (CH), 108.3 (CH), 101.1 ( $\text{CH}_2$ ), 43.8 ( $\text{CH}_2$ )

ESI-MS (rel. int. %):  $[\text{M} + 2 + \text{Na}]^+ m/z$  332.0 (35),  $[\text{M} + \text{Na}]^+ m/z$  330.0 (100),  $[\text{M} + 2 + \text{H}]^+ m/z$  310.0 (4),  $[\text{M} + \text{H}]^+ m/z$  308.1 (10)

HR-ESI-MS:  $[\text{M} + \text{Na}]^+ m/z$  calcd. For  $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClFNNaO}_3$ : 330.0304; found: 330.0319

### 3.2.1.7. N-(3,4-Methylenedioxy)benzyl-2-chloro-6-

### methylbenzamide (**3g**)之製備與物理數據(new)



將化合物 **1** (35  $\mu$ L, 0.281 mmol)與化合物 **2g** (48.3 mg, 0.283 mmol)，依上述製備方法，得化合物 **3g** (73.5 mg, 86%)。

White solid; m.p.: 134–136°C

UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) (log  $\epsilon$ ) 284 (4.74)

IR (KBr): 3247, 3080, 2877, 2777, 1870, 1639, 1488, 1440, 1248, 1041, 944, 868  $\text{cm}^{-1}$

clog  $P$ : 3.04

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data:

$\delta$  7.17–7.15 (m, 2H, H-3' and H-5'), 7.07–7.05 (m, 1H, H-4'), 6.85 (d,  $J = 1.6$  Hz, 1H, H-2), 6.80 (dd,  $J = 7.9, 1.6$  Hz, 1H, H-6), 6.74 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H-5), 5.98 (br. s, 1H, NH,  $\text{D}_2\text{O}$  exchangeable), 5.93 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 4.53 (d,  $J = 5.7$  Hz, 2H,  $\text{NHCH}_2$ ), 2.32 (s, 3H,  $\text{C}_6\text{-CH}_3$ )

$^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data:

$\delta$  167.1 (C), 147.9 (C), 147.1 (C), 137.1 (C), 136.3 (C), 131.4 (C), 130.5 (CH), 129.8 (CH), 128.5 (CH), 126.7 (CH), 121.4 (CH), 108.6 (CH), 108.3 (CH), 101.1 ( $\text{CH}_2$ ), 43.7 ( $\text{CH}_2$ ), 19.3 ( $\text{CH}_3$ )

ESI-MS (rel. int. %):  $[\text{M} + 2 + \text{Na}]^+ m/z$  328.0 (36),  $[\text{M} + \text{Na}]^+ m/z$  326.0 (100)

HR-ESI-MS:  $[\text{M} + \text{Na}]^+ m/z$  calcd. For  $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{ClNNaO}_3$ : 326.0544; found: 326.0578





### 3.2.1.8. N-(3,4-Methylenedioxy)benzyl-2,6-dichlorobenzamide

#### (3h)之製備與物理數據

將化合物 **1** (35  $\mu$ L, 0.281 mmol)與化合物 **2h** (53.6 mg, 0.281 mmol)，依上述製備方法，得化合物 **3h** (70.8 mg, 78%)。

White needle crystal; m.p.: 175–176°C

UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) (log  $\epsilon$ ) 284 (4.74)

IR (KBr): 3258, 3072, 2930, 2899, 2871, 1850, 1641, 1549, 1486, 1430, 1248, 1217, 1039, 932, 789, 694  $\text{cm}^{-1}$

clog *P*: 2.83

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data:

$\delta$  7.31–7.29 (m, 2H, H-3'), 7.25–7.21 (m, 1H, H-4'), 6.89 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H, H-2), 6.83 (dd,  $J = 7.9, 1.3$  Hz, 1H, H-6), 6.75 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H-5), 5.94 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 5.93 (br. s, 1H, NH,  $\text{D}_2\text{O}$  exchangeable), 4.57 (d,  $J = 5.6$  Hz, 2H,  $\text{NHCH}_2$ )

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) data:

$\delta$  7.42 (d,  $J = 9.5$  Hz, 1H, H-3' or H-5'), 7.41 (d,  $J = 6.4$  Hz, 1H, H-3' or H-5'), 7.36 (dd,  $J = 9.5, 6.2$  Hz, 1H, H-4'), 6.92 (d,  $J = 1.6$  Hz, 1H, H-2), 6.87 (dd,  $J = 7.9, 1.6$  Hz, 1H, H-6), 6.76 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H-5), 5.92 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 4.47 (s, 2H,  $\text{NHCH}_2$ )

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data:

$\delta$  164.2 (C), 147.9 (C), 147.1 (C), 135.8 (C), 132.3 (C), 131.0 (C), 130.7 (CH), 128.1 (CH  $\times$  2), 121.4 (CH), 113.8 (C), 108.6 (CH), 108.3 (CH), 101.1 ( $\text{CH}_2$ ), 43.9 ( $\text{CH}_2$ )

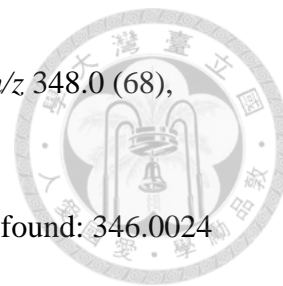
$^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) data:

$\delta$  167.0 (C), 149.2 (C), 148.4 (C), 137.3 (C), 133.2 (C  $\times$  2), 133.1 (C), 132.1 (CH  $\times$  2), 129.2 (CH), 122.4 (CH), 109.5 (CH), 109.0 (CH), 102.3 ( $\text{CH}_2$ ), 44.2 ( $\text{CH}_2$ )

ESI-MS (rel. int. %):  $[M + 4 + Na]^+$   $m/z$  349.9 (11),  $[M + 2 + Na]^+$   $m/z$  348.0 (68),

$[M + Na]^+$   $m/z$  346.0 (100)

HR-ESI-MS:  $[M + Na]^+$   $m/z$  calcd. For  $C_{15}H_{11}Cl_2NNaO_3$ : 346.0008; found: 346.0024





### 3.2.2. Alda analogs-2 (**6a–e**)之製備

一般製備方法(以合成化合物 **6e** 為例)：

先將化合物 **4** (49.8 mg, 0.300 mmol) 置於反應瓶中，以二氯乙烷(2.6 mL) 溶解後，加入二甲基甲醯胺(260  $\mu$ L)、三乙胺(37  $\mu$ L, 0.265 mmol)與化合物 **5e** (35  $\mu$ L, 0.264 mmol)，而後快速加入 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC, 70.0 mg, 0.365 mmol)與 1-hydroxybenzotriazole hydrate (HOBT hydrate, 50.1 mg, 0.371 mmol)，於氮氣環境及室溫下反應 12 小時。加入水(30 mL)，以氯仿(30 mL  $\times$  3)萃取，將有機層合併，減壓濃縮，殘留物以氯仿(10 mL)回溶，依序以 5% 檸檬酸水溶液(20 mL  $\times$  3)、飽和碳酸氫鈉水溶液(20 mL  $\times$  3)及飽和食鹽水(10 mL  $\times$  2)分配，有機層減壓濃縮，以二氯甲烷-正己烷之溶劑進行再結晶可得化合物 **6e** (82.5 mg, 96%)。

#### 3.2.2.1. *N*-2,6-Dichlorobenzyl-(3,4-methylenedioxy)benzamide

##### (**6e**)之物理數據(new)

White solid; m.p.: 172–173°C

UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) (log  $\epsilon$ ) 293 (4.86), 260 (4.96)

IR (KBr): 3317, 3092, 3068, 3002, 2963, 2913, 2464, 2414, 1942, 1870, 1789, 1744, 1635, 1614, 1504, 1437, 1421, 1350, 1250, 1039, 930, 874, 764  $\text{cm}^{-1}$

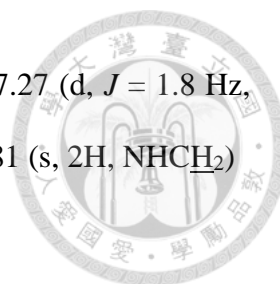
clog *P*: 4.44

$^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data:

$\delta$  7.38–7.14 (m, 5H), 6.78 (d-like,  $J = 8.7$  Hz, 1H, H-5), 6.30 (br. s, 1H, NH,  $\text{D}_2\text{O}$  exchangeable), 5.99 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 4.91 (d,  $J = 5.4$  Hz, 2H,  $\text{NHCH}_2$ )

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) data:

$\delta$  7.41 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H, H-3'), 7.37 (dd,  $J = 8.1, 1.8$  Hz, 1H, H-6), 7.31–7.27 (m, 2H,



H-2 and H-4') [Figure S32: 7.29 (dd,  $J = 8.6, 7.4$  Hz, 1H, H-4'), 7.27 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H, H-2)], 6.84 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H, H-5), 6.00 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 4.81 (s, 2H, NHCH<sub>2</sub>)

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) data:

$\delta$  166.3 (C), 150.3 (C), 147.9 (C), 136.2 (C  $\times$  2), 133.5 (C), 129.6 (CH) 128.5 (CH  $\times$  2), 128.3 (C), 121.6 (CH), 121.6 (CH), 107.9 (CH), 107.7 (CH), 101.6 (CH<sub>2</sub>), 39.8 (CH<sub>2</sub>)

ESI-MS (rel. int. %): [M + 2 + Na]<sup>+</sup>  $m/z$  347.8 (71), [M + Na]<sup>+</sup>  $m/z$  345.8 (100)

HR-ESI-MS: [M + Na]<sup>+</sup>  $m/z$  calcd. For C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>2</sub>NNaO<sub>3</sub>: 346.0008; found: 346.0022

### 3.2.2.2. *N*-Benzyl-(3,4-methylenedioxy)benzamide (**6a**)之製備

#### 與物理數據

將化合物 **4** (46.0 mg, 0.277 mmol)與化合物 **5a** (30  $\mu$ L, 0.275 mmol)，依上述製備方法，得化合物 **6a** (67.8 mg, 97%)，與文獻比對可證實為 **6a**<sup>21</sup>。

White needle crystal; m.p.: 124–125°C

UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) (log  $\epsilon$ ) 292 (4.86), 259 (4.98)

IR (KBr): 3335, 3088, 3056, 3035, 2907, 2786, 2606, 1873, 1638, 1616, 1550, 1550, 1482, 1437, 1365, 1309, 1252, 1096, 1038, 933, 728, 653 cm<sup>-1</sup>

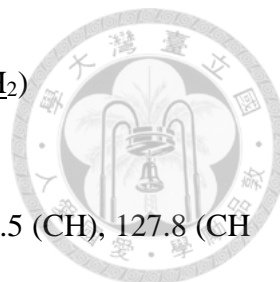
clog *P*: 3.02

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) data:

$\delta$  7.33–7.25 (m, 7H, H-2, H-6, H-2', H-3' and H-4'), 6.77 (d-like,  $J = 8.7$  Hz, 1H, H-5), 6.45 (br. s, 1H, NH, D<sub>2</sub>O exchangeable), 5.98 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 4.57 (d,  $J = 5.5$  Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) data:

$\delta$  7.43 (dd,  $J = 8.2, 1.8$  Hz, 1H, H-6), 7.34–7.20 (m, 6H, H-2, H-2', H-3' and H-4'), 6.87



(d,  $J = 8.2$  Hz, 1H, H-5), 6.02 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 4.53 (s, 2H, NHCH<sub>2</sub>)

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) data:

δ 166.6 (C), 150.3 (C), 147.9 (C), 138.2 (C), 128.7 (CH × 2), 128.5 (CH), 127.8 (CH × 2), 127.5 (CH), 121.5 (CH), 107.9 (CH), 107.6 (CH), 101.6 (CH<sub>2</sub>), 44.1 (CH<sub>2</sub>)

ESI-MS: [M + Na]<sup>+</sup>  $m/z$  278.0, [M + H]<sup>+</sup>  $m/z$  256.0

HR-ESI-MS: [M + Na]<sup>+</sup>  $m/z$  calcd. For C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>NNaO<sub>3</sub>: 278.0788; found: 278.0816

### 3.2.2.3. *N*-2-Chlorobenzyl-(3,4-methylenedioxy)benzamide (**6b**)

#### 之製備與物理數據

將化合物 **4** (41.3 mg, 0.249 mmol) 與化合物 **5b** (30 μL, 0.249 mmol)，依上述製備方法，得化合物 **6b** (64.2 mg, 89%)。

White solid; m.p.: 109–110°C

UV λ<sub>max</sub> (MeOH) (log ε) 293 (4.85), 260 (4.95)

IR (KBr): 3304, 3065, 2895, 2789, 2456, 2364, 1845, 1634, 1617, 1603, 1546, 1458, 1354, 1308, 1259, 1040, 937, 750, 600, 522 cm<sup>-1</sup>

clog *P*: 3.73

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) data:

δ 7.42–7.15 (m, 6H, H-2, H-6, H-3', H-4', H-5' and H-6'), 6.77 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H-5), 6.65 (br. s, 1H, NH, D<sub>2</sub>O exchangeable), 5.98 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 4.64 (d,  $J = 5.6$  Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) data:

δ 7.46 (dd,  $J = 8.1, 1.8$  Hz, 1H, H-6), 7.40–7.35 (m, 2H, H-3',6'), 7.34 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H, H-2), 7.29–7.22 (m, 2H, H-4',5'), 6.89 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H, H-5), 6.03 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 4.62 (s, 2H, NHCH<sub>2</sub>)



$^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data:

$\delta$  166.7 (C), 150.4 (C), 147.9 (C), 135.5 (C), 133.6 (C), 130.2 (CH), 129.5 (CH), 128.9 (CH), 128.3 (C), 127.1 (CH), 121.6 (CH), 107.9 (CH), 107.6 (CH), 101.7 ( $\text{CH}_2$ ), 42.0 ( $\text{CH}_2$ )

ESI-MS (rel. int. %):  $[\text{M} + 2 + \text{Na}]^+ m/z$  314.0 (34),  $[\text{M} + \text{Na}]^+ m/z$  312.0 (100)

HR-ESI-MS:  $[\text{M} + \text{Na}]^+ m/z$  calcd. For  $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{ClNNaO}_3$ : 312.0398; found: 312.0414

### 3.2.2.4. *N*-2,6-Difluorobenzyl-(3,4-methylenedioxy)benzamide

#### (6c)之製備與物理數據 (new)

將化合物 **4** (41.7 mg, 0.251 mmol)與化合物 **5c** (30  $\mu\text{L}$ , 0.251 mmol)，依上述製備方法，得化合物 **6c** (61.8 mg, 85%)。

White solid; m.p.: 129–130°C

UV  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) ( $\log \epsilon$ ) 292 (4.89), 277 (5.03)

IR (KBr): 3338, 3279, 3075, 2996, 2944, 2910, 2786, 2478, 2416, 1926, 1865, 1761, 1635, 1624, 1603, 1550, 1502, 1457, 1419, 1358, 1260, 1061, 1034, 981, 883, 821, 787, 760, 490  $\text{cm}^{-1}$

$\text{clog } P$ : 3.30

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data:

$\delta$  7.27–7.20 (m, 3H, H-2, H-6 and H-4'), 6.88 (t-like,  $J = 7.9$  Hz, 2H, H-3'), 6.77 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H-5), 6.44 (br. s, 1H, NH,  $\text{D}_2\text{O}$  exchangeable), 5.98 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 4.69 (d,  $J = 5.6$  Hz, 2H,  $\text{NHCH}_2$ )

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) data:

$\delta$  7.37 (dd,  $J = 8.1, 1.8$  Hz, 1H, H-6), 7.32 (tt,  $J = 8.4, 6.5$  Hz, 1H, H-4'), 7.26 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H, H-2), 6.96 (t-like,  $J = 8.0$  Hz, 2H, H-3'), 6.83 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H, H-5), 6.00



(s, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 4.60 (s, 2H, NHCH<sub>2</sub>)

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) data:

δ 166.3 (C), 161.5 (dd,  $J_{C-F} = 247.4, 8.0$  Hz, C, C-2'), 150.3 (C), 147.9 (C), 129.5 (t,  $J_{C-F} = 10.3$  Hz, CH, C-4'), 128.3 (CH), 121.6 (CH), 113.8 (t,  $J_{C-F} = 19.1$  Hz, C, C-1'), 111.4 (dd,  $J_{C-F} = 18.8, 6.6$  Hz, CH, C-3'), 107.9 (CH), 107.7 (CH), 101.6 (CH<sub>2</sub>), 32.0 (t,  $J_{C-F} = 3.7$  Hz, NHCH<sub>2</sub>)

ESI-MS: [M + Na]<sup>+</sup> *m/z* 314.0

HR-ESI-MS: [M + Na]<sup>+</sup> *m/z* calcd. For C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>F<sub>2</sub>NNaO<sub>3</sub>: 314.0599; found: 314.0624

### 3.2.2.5. *N*-2-Chloro-6-fluorobenzyl-(3,4-

#### methylenedioxy)benzamide (**6d**) 製備與物理數據 (new)

將化合物 **4** (39.5 mg, 0.238 mmol) 與化合物 **5d** (30 μL, 0.233 mmol)，依上述製備方法，得化合物 **6d** (62.5 mg, 84%)。

White needle crystal; m.p.: 149.5–150.5°C

UV λ<sub>max</sub> (MeOH) (log ε) 294 (4.84), 260 (4.93)

IR (KBr): 3296, 3101, 3069, 3013, 2959, 2912, 1935, 1870, 1752, 1637, 1617, 1582, 1541, 1487, 1454, 1366, 1282, 1250, 1169, 1040, 986, 928, 877, 781, 676 cm<sup>-1</sup>

clog *P*: 3.87

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) data:

δ 7.27–7.17 (m, 4H, H-2, H-6, H-3' and H-4'), 7.03–6.98 (m, 1H, H-5'), 6.77 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H-5), 6.47 (br. t, 1H, NH, D<sub>2</sub>O exchangeable), 5.98 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 4.76 (dd,  $J = 5.5, 1.3$  Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) data:

δ 7.37 (dd,  $J = 8.2, 1.8$ , 1H, H-6), 7.34–7.29 (m, 1H, H-4'), 7.27–7.25 (m, 1H, H-3'),

7.27 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H, H-2), 7.10 (ddd,  $J = 9.5, 8.1, 1.4$  Hz, 1H, H-5'), 6.84 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H, H-5), 6.00 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 4.68 (d,  $J = 1.4$  Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>)

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) data:

$\delta$  166.3 (C), 161.6 (d,  $J_{C-F} = 244.2$  Hz, C, C-6'), 150.3 (C), 147.8 (C), 135.5 (d,  $J_{C-F} = 4.7$  Hz, C, C-2'), 129.7 (d,  $J_{C-F} = 9.5$  Hz, CH, C-4'), 128.3 (C), 125.4 (d,  $J_{C-F} = 4.0$  Hz, CH, C-3'), 123.7 (d,  $J_{C-F} = 17.4$  Hz, C, C-1'), 121.6 (CH), 114.4 (d,  $J_{C-F} = 23.1$  Hz, CH, C-5'), 107.9 (CH), 107.6 (CH), 101.6 (CH<sub>2</sub>), 35.4 (t,  $J_{C-F} = 4.1$  Hz, NHCH<sub>2</sub>)

ESI-MS (rel. int. %): [M + 2 + Na]<sup>+</sup>  $m/z$  331.8 (29), [M + Na]<sup>+</sup>  $m/z$  329.8 (100)

HR-ESI-MS: [M + Na]<sup>+</sup>  $m/z$  calcd. For C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>ClFNNaO<sub>3</sub>: 330.0304; found: 330.0319





### 3.2.3. Methyl anhydroberberilate (**10**)之製備

#### 3.2.3.1. Oxyberberine (**8**)之製備

將 berberine perchlorate<sup>註七</sup> (1047.4 mg) 以甲醇-丙酮(1 : 1)之溶劑溶解，經離子交換樹脂[Amberlite IRA-400 (Cl), ion exchange resin (20–50 mesh), 氯離子來源為 NaCl<sub>(aq)</sub>]置換為 berberine chloride (**7**, 913.5 mg)<sup>22</sup>。將化合物 **7** 懸浮於 20% 氫氧化鉀水溶液(500 mL)中，於 120 °C 下反應 12 小時，以氯仿(500 mL × 3)抽取，有機層合併後減壓濃縮，殘留物經管柱層析法[矽膠 40–63 μm, 異丙烷-氯仿(1:99 至 10:90)]純化可得產物 **8** (409.1 mg, 47%)。

化合物 **8** 之物理數據

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) data:

δ 7.29 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-11), 7.25 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-12), 7.18 (s, 1H, H-13), 6.69 (s, 1H, H-1), 6.67 (s, 1H, H-4), 5.98 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 4.26 (t-like, *J* = 6.1 Hz, 2H, H-6), 3.98 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.92 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.86 (t-like, *J* = 6.1 Hz, 2H, H-5)

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) data:

δ 160.1 (C), 151.3 (C), 149.3 (C), 148.4 (C), 147.3 (C), 135.5 (C), 132.2 (C), 130.0 (C), 123.7 (CH), 122.3 (CH), 119.3 (C), 118.8 (CH), 107.9 (CH), 104.6 (CH), 101.4 (CH<sub>2</sub>), 101.3 (CH), 61.6 (CH<sub>3</sub>), 56.8 (CH<sub>3</sub>), 39.3 (CH<sub>2</sub>), 28.6 (CH<sub>2</sub>)

ESI-MS: [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* 351.9

---

<sup>註七</sup> 由李水盛教授之實驗室提供



### 3.2.3.2. 13-Acetoxyoxoberberine (9)之製備

將化合物 **8** (476.9 mg, 1.36 mmol) 溶於二氯甲烷 (100 mL)，加入四乙酸鉛 (2359.6 mg, 5.32 mmol) 於室溫下反應 1.5 小時，加入甘油 (5 mL) 終止反應，加入水 (100 mL)，以二氯甲烷 (100 mL × 3) 抽取，有機層合併後減壓濃縮，殘留物經管柱層析法 [矽膠 40–63 μm，乙酸乙酯–二氯乙烷 (1:9)] 初步分離後，再以乙酸乙酯–二氯乙烷進行多次再結晶可得產物 **9** (274.9 mg, 50%)。

化合物 **9** 之物理數據

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) data:

δ 7.44 (s, 1H, H-1), 7.32 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H-11), 7.20 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H-12), 7.18 (s, 1H, H-13), 6.70 (s, 1H, H-4), 5.98 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 5.12 (dt-like, *J* = 13.0 Hz, 1H, H-6<sub>pseudo-eq</sub>), 3.97 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.92 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.30 (td, *J* = 12.8, 2.9 Hz, 1H, H-6<sub>pseudo-ax</sub>), 2.88 (td, *J* = 12.7, 3.8 Hz, 1H, H-5<sub>pseudo-ax</sub>), 2.78 (dt-like, *J* = 15.2 Hz, 1H, H-5<sub>pseudo-eq</sub>), 2.35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>)

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) data:

δ 169.0 (C), 158.7 (C), 152.2 (C), 149.7 (C), 148.1 (C), 146.6 (C), 132.7 (C), 127.7 (C), 127.6 (C), 126.5 (C), 121.1 (C), 119.4 (C), 118.6 (CH), 116.4 (CH), 108.1 (CH), 107.8 (CH), 101.4 (CH<sub>2</sub>), 61.6 (CH<sub>3</sub>), 56.7 (CH<sub>3</sub>), 40.3 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>), 21.2 (CH<sub>3</sub>)

ESI-MS: [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* 432.1



### 3.2.3.3. Methyl anhydroberberilate (**10**)之製備

將化合物 **9** (92.4 mg, 0.226 mmol) 溶於甲醇 (27 mL)，加入 25% 氫氧化鈉水溶液 (10 mL) 於 50 °C 下反應 1.5 小時之後，減壓濃縮去除大部分之液體，加入水 (10 mL) 後以氯仿 (10 mL × 3) 抽取，有機層合併後減壓濃縮，殘留物經管柱層析法 [矽膠 40–63 μm，乙酸乙酯–二氯乙烷–正己烷 (1 : 2 : 2)] 純化可得產物 **10** (69.2 mg, 74%)。

化合物 **10** 之物理數據

White solid; m.p.: 176–179 °C (文獻值: 186–187 °C<sup>16</sup>)

UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) (log  $\epsilon$ ) 318 (5.00), 262 (5.22)

IR (KBr): 3414, 3335, 3095, 2938, 2843, 2639, 2609, 2070, 2018, 1908, 1714, 1676, 1596, 1484, 1455, 1389, 1345, 1281, 1255, 1161, 1098, 1037, 890, 775 cm<sup>-1</sup>

clog *P*: 3.72

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) data:

$\delta$  7.78 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H-12), 7.35 (s, 1H, H-1), 6.89 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H-11), 6.64 (s, 1H, H-4), 5.96 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 4.49–4.12 (m, 2H, H-6), 3.89 (s, 1H, COOCH<sub>3</sub>), 3.76 (s, 1H, OCH<sub>3</sub>), 3.75 (s, 1H, OCH<sub>3</sub>), 3.03–2.97 (m, 2H, H-5)

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) data:

$\delta$  168.8 (C), 165.6 (C), 163.7 (C), 156.2 (C), 151.9 (C), 147.1 (C), 143.7 (C), 136.9 (C), 136.6 (C), 127.0 (CH), 122.5 (C), 118.7 (C), 110.9 (CH), 108.7 (CH), 106.9 (CH), 101.7 (CH<sub>2</sub>), 61.0 (CH<sub>3</sub>), 55.8 (CH<sub>3</sub>), 52.0 (CH<sub>3</sub>), 41.7 (CH<sub>2</sub>), 28.0 (CH<sub>2</sub>)

ESI-MS: [M + Na]<sup>+</sup> *m/z* 435.8, [M + H]<sup>+</sup> *m/z* 413.8

HR-ESI-MS: [M + Na]<sup>+</sup> *m/z* calcd. For C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>NNaO<sub>8</sub>: 436.1003; found: 436.1018



### 3.3. 粒線體醛去氫酶 2 促進活性試驗

#### 3.3.1. 原理

野生型粒線體醛去氫酶 2 (wild-type ALDH2)以乙醛為受質，進行酵素催化之氧化反應而產生乙酸與 NADH，在紫外線波長 340 nm 下測量 NADH 之吸光值，據此計算出酵素活性的促進率。在 25 °C 及 pH 8.0 的環境下，一個活性單位的野生型粒線體醛去氫酶 2，每分鐘可產生 1.0  $\mu\text{mol}$  乙酸。

#### 3.3.2. 實驗方法

##### 3.3.2.1. 試劑配製

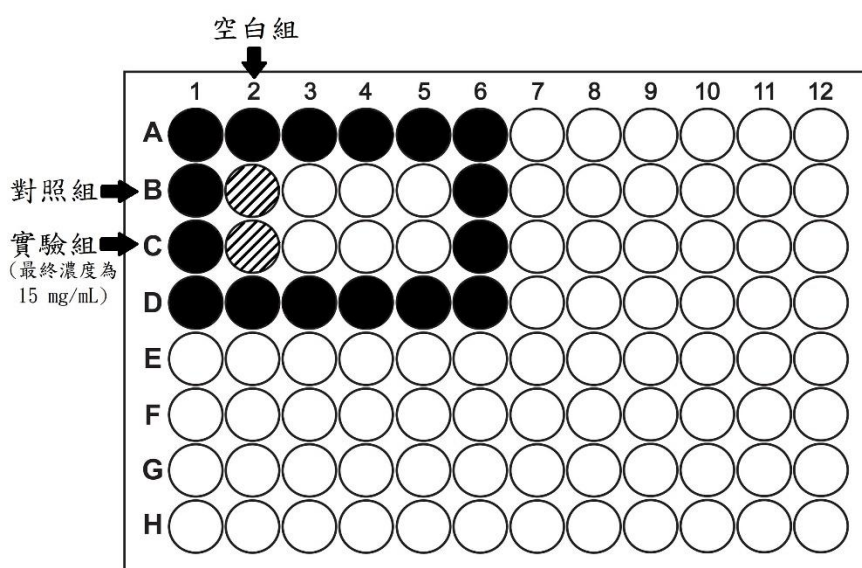
- 三羥甲基胺基甲烷緩衝液(tris(hydroxymethyl)aminomethane buffer solution, Tris buffer solution)：取 1346.0 mg 溶於 100 mL 去離子水配置成 111.11 mM 之三羥甲基胺基甲烷緩衝液，最後再以 1.0 M  $\text{KOH}_{(\text{aq})}$ 、1.0 M  $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ 調整至 pH 8.0。
- 酵素：粒線體醛去氫酶 2 溶於三羥甲基胺基甲烷緩衝液，濃度為 6.25 unit/mL。
- 受質：取 6  $\mu\text{L}$  之乙醛溶於 10 mL 之三羥甲基胺基甲烷緩衝液，濃度為 10 mM。
- $\text{NAD}^+$ ：取 9.9 mg  $\text{NAD}^+$ 溶於 1.5 mL 之三羥甲基胺基甲烷緩衝液，濃度為 10 mM。
- 氯化鉀(KCl)與巯基乙醇(2-mercaptoethanol)溶液：先取 372.8 mg KCl 溶於 10 mL 三羥甲基胺基甲烷緩衝液配置成 500 mM KCl 溶液，再取 1  $\mu\text{L}$  巯基乙醇溶於 283  $\mu\text{L}$  KCl 溶液，配置成濃度為 500 mM KCl、50 mM 2-mercaptoethanol 之溶液。
- 測試樣品：樣品以 DMSO 溶解，配置成 1.5 mg/mL 之溶液，再以去離子水稀釋，使其為濃度 150  $\mu\text{g/mL}$  之 10% (v/v) DMSO 樣品溶液。
- 正向控制組：化合物 **3h** 溶於 DMSO，配置成 1.5 mg/mL 之溶液，再以 DMSO

及去離子水稀釋，使其為濃度 30  $\mu\text{g/mL}$  之 10% (v/v) DMSO 正向控制組溶液。

### 3.3.2.2. 實驗步驟

實驗採用 96 孔微量測試盤(96-well microtiter plate)。在實驗中除了測試樣品之實驗組外，必須有空白實驗組、對照組及正向控制組。每一組測試樣品均有其各自的空白實驗組，可以扣除樣品本身於 340 nm 下吸收時對實驗之影響；對照組為不加入測試樣品或促進物時，酵素與受質之反應程度，作為酵素活性的比較基準；正向控制組為已知的粒線體醛去氫酶 2 活化劑 Alda-1 (此處為自己合成之化合物 **3h**)，以此為基準與實驗組中的樣品比較促進率。在 96 孔微量測試盤的排列情形如

Figure 16 所示：



**Figure 21.** 96孔微量測試盤樣品添加方式(n=3)。實心黑色圓圈為預防樣品槽溶液蒸散而添加之水。



實驗步驟詳述如下：

- (1) 酶溶液：將  $\text{NAD}^+$  溶液、氯化鉀與巰基乙醇溶液、酵素溶液以 2:2:3 之比例混合並靜置 1 小時。

空白組溶液： $\text{NAD}^+$  溶液、氯化鉀與巰基乙醇溶液、三羥甲基胺基甲烷緩衝液以 2:2:3 之比例混合。

- (2) 對照組、實驗組及空白組之內容物

對照組：10  $\mu\text{L}$  10% DMSO 水溶液、20  $\mu\text{L}$  受質溶液及 70  $\mu\text{L}$  酶溶液

實驗組：10  $\mu\text{L}$  樣品或正向控制組、20  $\mu\text{L}$  受質溶液及 70  $\mu\text{L}$  酶溶液

空白組：10  $\mu\text{L}$  樣品或正向控制組、20  $\mu\text{L}$  受質溶液及 70  $\mu\text{L}$  空白組溶液

[最終總體積：100  $\mu\text{L}$ ；最終濃度：100 mM Tris (pH 8.0)、100 mM KCl、10 mM 2-mercaptoethanol、2 mM  $\text{NAD}^+$ 、2 mM acetaldehyde、1% (v/v) DMSO、15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sample、3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  positive control]

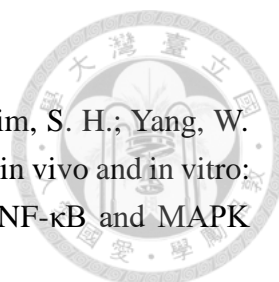
- (3) 在 96 孔微量測試盤依序加入 70  $\mu\text{L}$  空白組溶液、70  $\mu\text{L}$  酶溶液
- (4) 在 96 孔微量測試盤中依序加入 10  $\mu\text{L}$  樣品、正向控制組或 10% (v/v) DMSO 水溶液。
- (5) 將 96 孔微量測試盤在 35°C 下預熱 5 分鐘，再加入 20  $\mu\text{L}$  受質溶液於 96 孔微量測試盤全盤，以分光光度計測量波長 340 nm、35°C 下的吸光值，每 30 秒測一次，共 10 分鐘。之後置於室溫下，並以同上述之步驟(添加受質溶液除外)，於每小時測量一次，共 6 小時。最後，以下述公式計算酶的活性促進率：

$$\text{促進率}(\%) = \left( \frac{\text{實驗組之吸光值, Absorbance}_{\text{sample}}}{\text{對照組之吸光值, Absorbance}_{\text{control}}} - 1 \right) \times 100\%$$



## 參考文獻：

1. Hurley, T. D.; Edenberg, H. J.; Li, T. K., Pharmacogenomics of alcoholism. In *Pharmacogenomics: The Search for Individualized Therapies* [online]; John Wiley & Sons: New York, 2003; Chapter 21, pp 417-441. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/3527600752.ch21/summary> (accessed Aug 16, 2017)
2. Chen, C. H.; Ferreira, J. C. B.; Gross, E. R.; Mochly-Rosen, D., Targeting aldehyde dehydrogenase 2: New therapeutic opportunities. *Physiol. Rev.* **2014**, *94* (1), 1-34.
3. Larson, H. N.; Weiner, H.; Hurley, T. D., Disruption of the coenzyme binding site and dimer interface revealed in the crystal structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase 'asian' variant. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (34), 30550-6.
4. Steinmetz, C. G.; Xie, P.; Weiner, H.; Hurley, T. D., Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: The genetic component of ethanol aversion. *Structure* **1997**, *5* (5), 701-711.
5. Koppaka, V.; Thompson, D. C.; Chen, Y.; Ellermann, M.; Nicolaou, K. C.; Juvonen, R. O.; Petersen, D.; Deitrich, R. A.; Hurley, T. D.; Vasiliou, V., Aldehyde dehydrogenase inhibitors: A comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action, substrate specificity, and clinical application. *Pharmacol. Rev.* **2012**, *64* (3), 520-39.
6. Perez-Miller, S. J.; Hurley, T. D., Coenzyme isomerization is integral to catalysis in aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry* **2003**, *42* (23), 7100-7109.
7. Larson, H. N.; Zhou, J.; Chen, Z.; Stamler, J. S.; Weiner, H.; Hurley, T. D., Structural and functional consequences of coenzyme binding to the inactive asian variant of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: roles of residues 475 and 487. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (17), 12940-50.
8. Chen, C.-H.; Budas, G. R.; Churchill, E. N.; Disatnik, M.-H.; Hurley, T. D.; Mochly-Rosen, D., Activation of Aldehyde Dehydrogenase-2 Reduces Ischemic Damage to the Heart. *Science* **2008**, *321* (5895), 1493-1495.
9. Perez-Miller, S.; Younus, H.; Vanam, R.; Chen, C. H.; Mochly-Rosen, D.; Hurley, T. D., Alda-1 is an agonist and chemical chaperone for the common human aldehyde dehydrogenase 2 variant. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17* (2), 159-164.
10. 臺灣藥學會生藥學組，常用中藥。臺灣藥學會：臺北，2012年；第133頁。



11. Choi, Y. Y.; Kim, M. H.; Han, J. M.; Hong, J.; Lee, T. H.; Kim, S. H.; Yang, W. M., The anti-inflammatory potential of Cortex Phellodendron in vivo and in vitro: Down-regulation of NO and iNOS through suppression of NF- $\kappa$ B and MAPK activation. *Int. Immunopharmacol.* **2014**, *19* (2), 214-220.
12. Chen, M. L.; Xian, Y. F.; Ip, S. P.; Tsai, S. H.; Yang, J. Y.; Che, C. T., Chemical and biological differentiation of Cortex Phellodendri Chinensis and Cortex Phellodendri Amurensis. *Planta Med.* **2010**, *76* (14), 1530-5.
13. 姜玉龍。國立成功大學化學研究所碩士論文：臺灣黃柏根部之成分研究。2005年。
14. Cheng, Z.; Chen, A. F.; Wu, F.; Sheng, L.; Zhang, H. K.; Gu, M.; Li, Y. Y.; Zhang, L. N.; Hu, L. H.; Li, J. Y.; Li, J., 8,8-Dimethyldihydroberberine with improved bioavailability and oral efficacy on obese and diabetic mouse models. *Biorg. Med. Chem.* **2010**, *18* (16), 5915-5924.
15. Koszyk, F. J.; Lenz, G. R., Lead tetraacetate oxidation of oxyprotoberberines. A convenient synthesis of 13-oxygenated berbines and oxyprotoberberines. *J. Org. Chem.* **1984**, *49* (14), 2642-2644.
16. Hanaoka, M.; Mukai, C.; Arata, Y., Chemical Transformation of Protoberberines. III. Convenient Synthesis of 8-Methoxyberberinephenolbetaine by Photooxygenation of Berberine. A Novel Conversion of Berberine into ( $\pm$ )-Ophiocarpine, ( $\pm$ )-Epiophiocarpine, ( $\pm$ )- $\alpha$ -Hydrastine, and ( $\pm$ )- $\beta$ -Hydrastine. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1983**, *31* (3), 947-952.
17. Valeur, E.; Bradley, M., Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (2), 606-631.
18. Beretta, M.; Gorren, A. C. F.; Wenzl, M. V.; Weis, R.; Russwurm, M.; Koesling, D.; Schmidt, K.; Mayer, B., Characterization of the East Asian Variant of Aldehyde Dehydrogenase-2: BIOACTIVATION OF NITROGLYCERIN AND EFFECTS OF Alda-1. *J. Biol. Chem* **2010**, *285* (2), 943-952.
19. Moniot, J. L.; Shamma, M., Conversion of berberine into phthalideisoquinolines. *J. Org. Chem.* **1979**, *44* (24), 4337-4342.
20. Masahiko, S. Process for production of biphenyl derivative. US Patent 2012232283, Sep 13, 2012.
21. Allen, C. L.; Davulcu, S.; Williams, J. M. J., Catalytic Acylation of Amines with Aldehydes or Aldoximes. *Org. Lett.* **2010**, *12* (22), 5096-5099.
22. Lee, S. S.; Dung, K. T., Semisynthesis of tetrahydropalmatine, an active ingredient from *Corydalis Balbosa*, from berberine. *Chin. Pharm. J.* **1991**, *43* (4), 303-309.





# 附圖

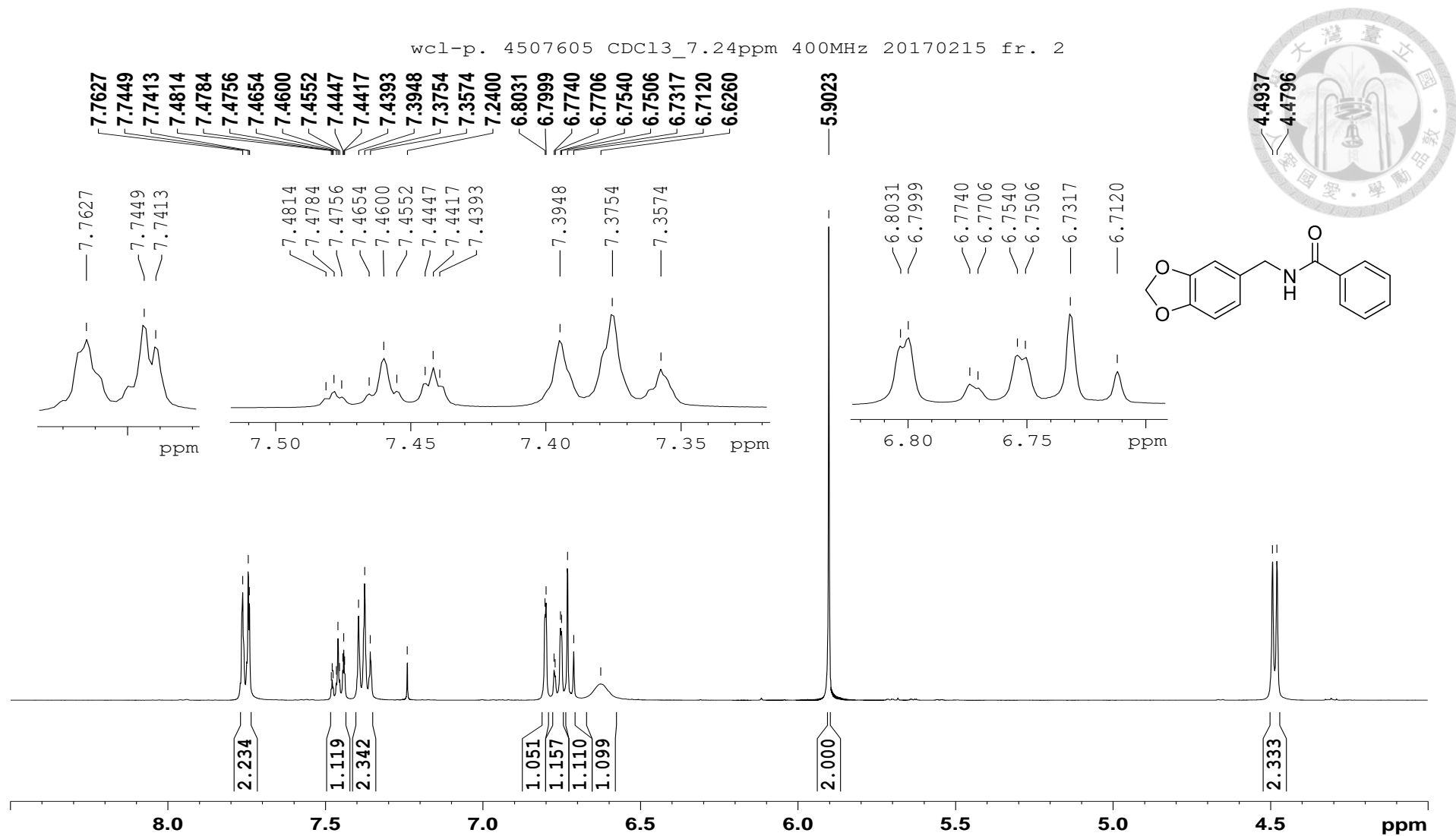
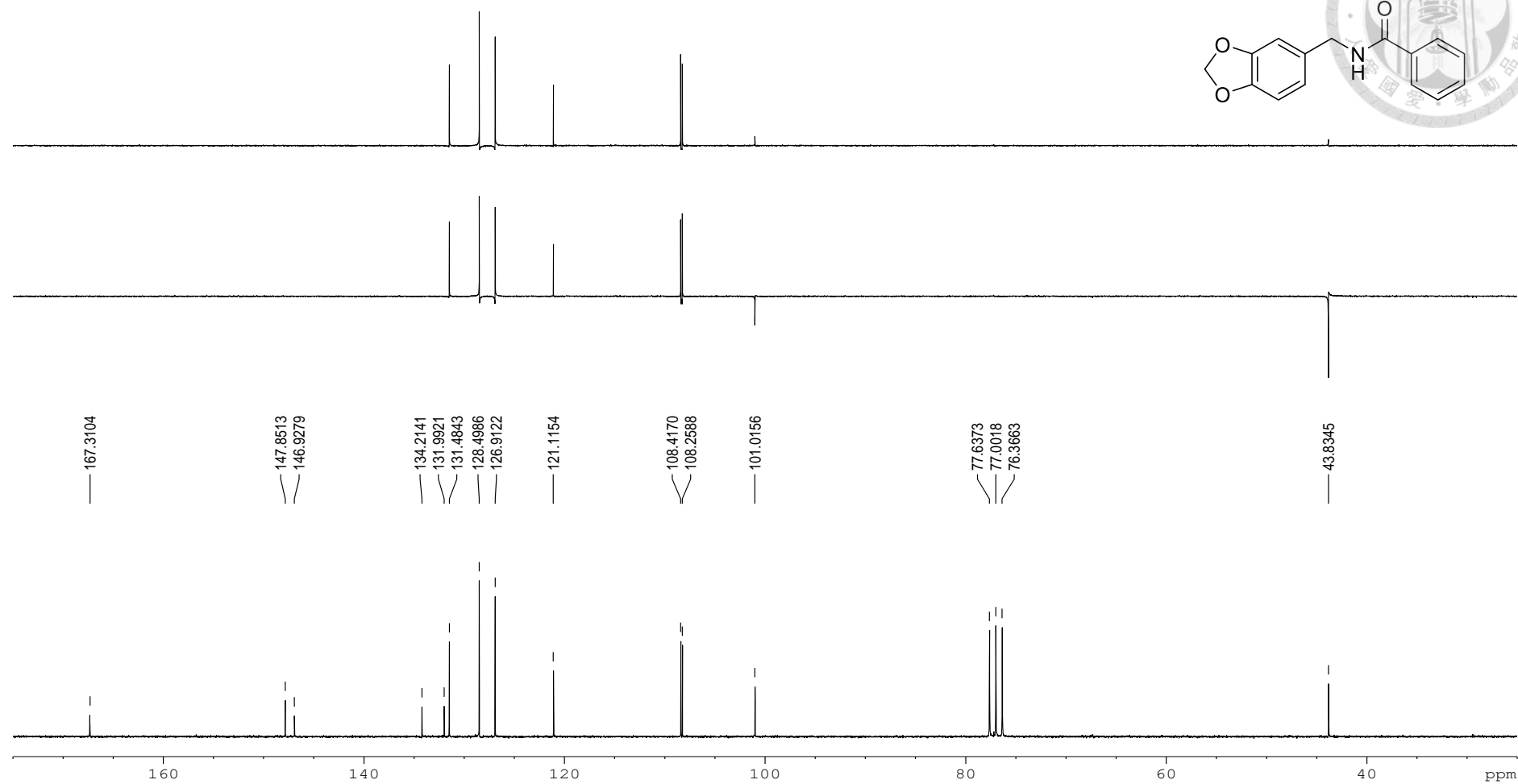
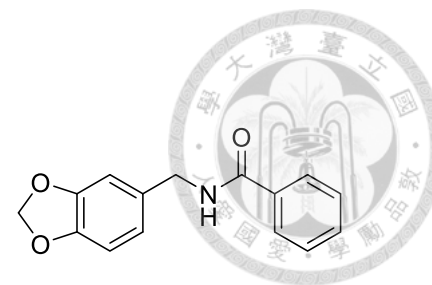


Figure S1. <sup>1</sup>H NMR spectrum of 3a (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

wcl-p. 4507605 CDCl3\_77.0ppm 200MHz 20170214 fr. 2



**Figure S2.** <sup>13</sup>C NMR spectrum (DEPT-90, top; DEPT-135, middle; BBD, bottom) of **3a** (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz)

wcl-p. 4507606 CDCl3\_7.24ppm 400MHz 20170215 fr. 3

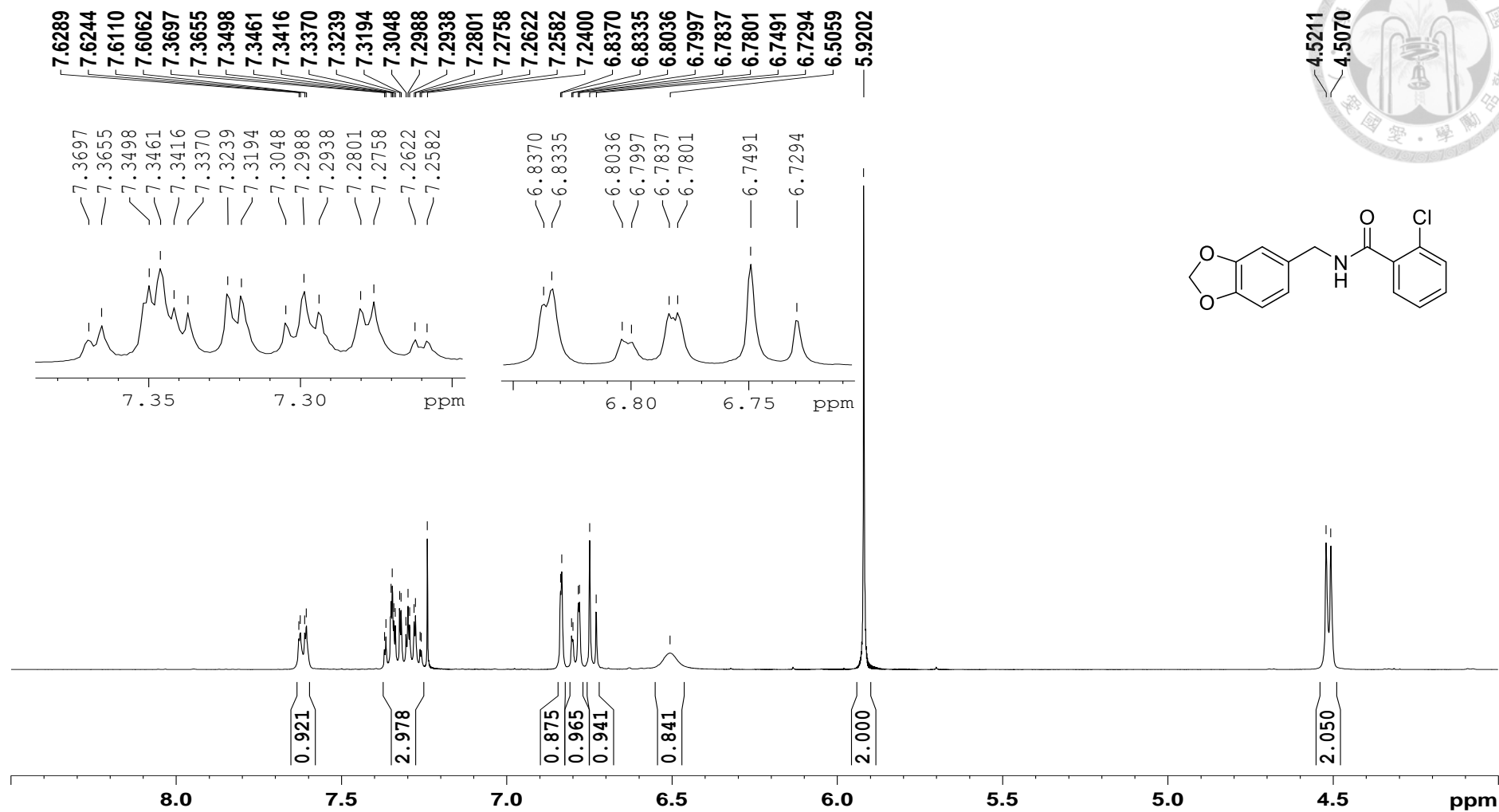
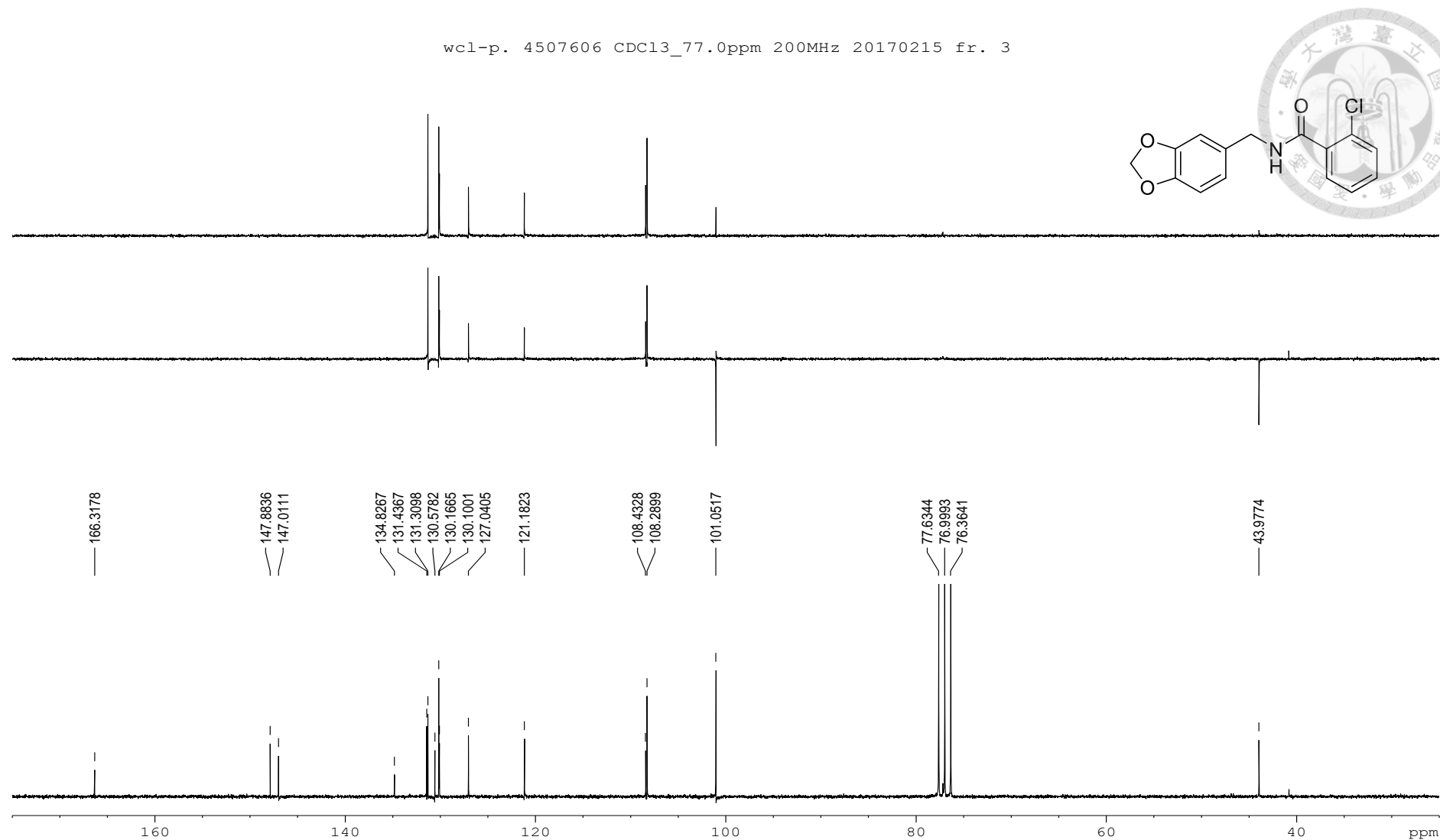


Figure S3. <sup>1</sup>H NMR spectrum of 3b (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

wcl-p. 4507606 CDCl3\_77.0ppm 200MHz 20170215 fr. 3



**Figure S4.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum (DEPT-90, top; DEPT-135, middle; BBD, bottom) of **3b** ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)

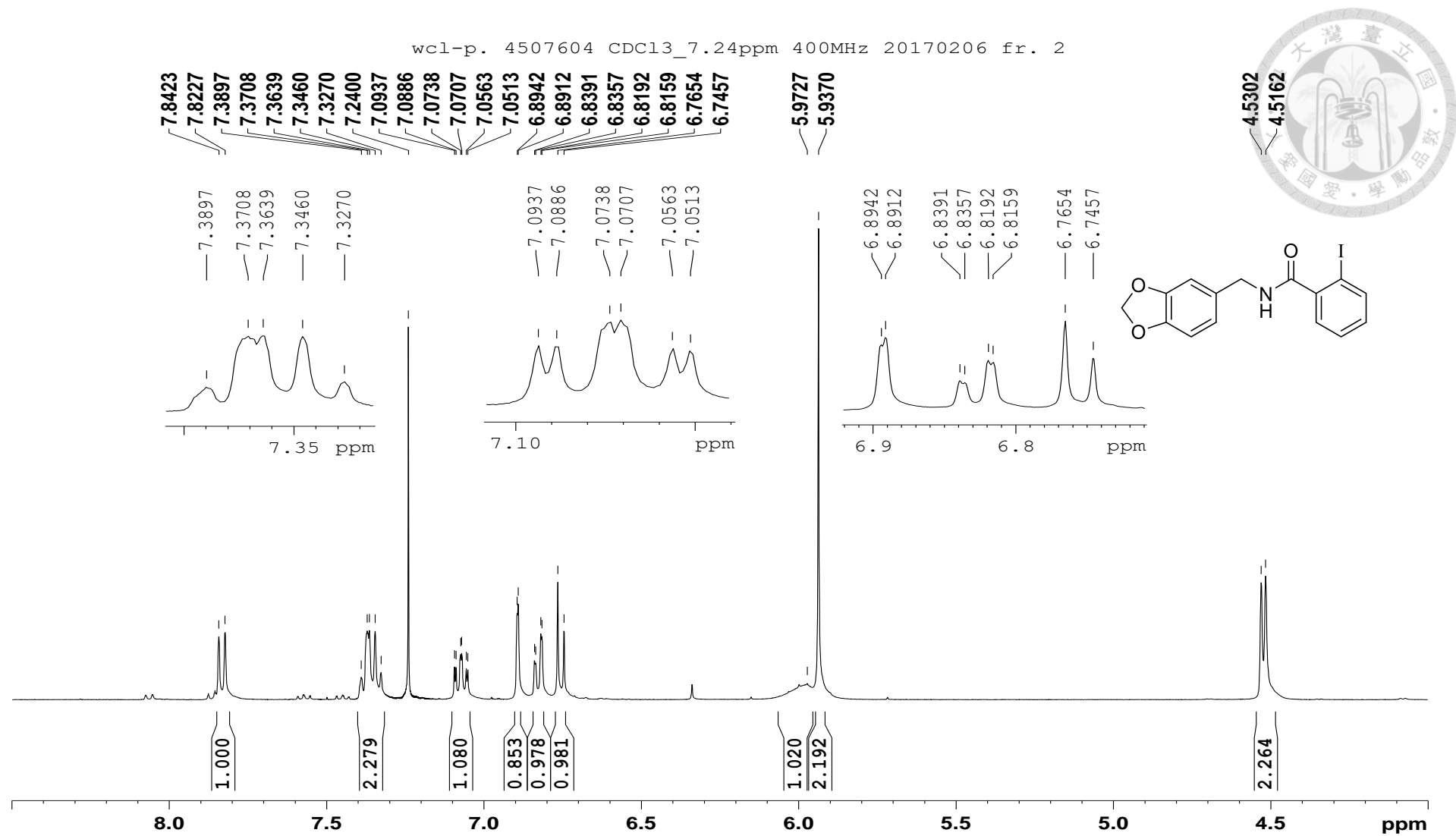


Figure S5. <sup>1</sup>H NMR spectrum of 3c (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

wcl-p. 4507604 CDCl3\_77.0ppm 200MHz 20170206 fr. 2

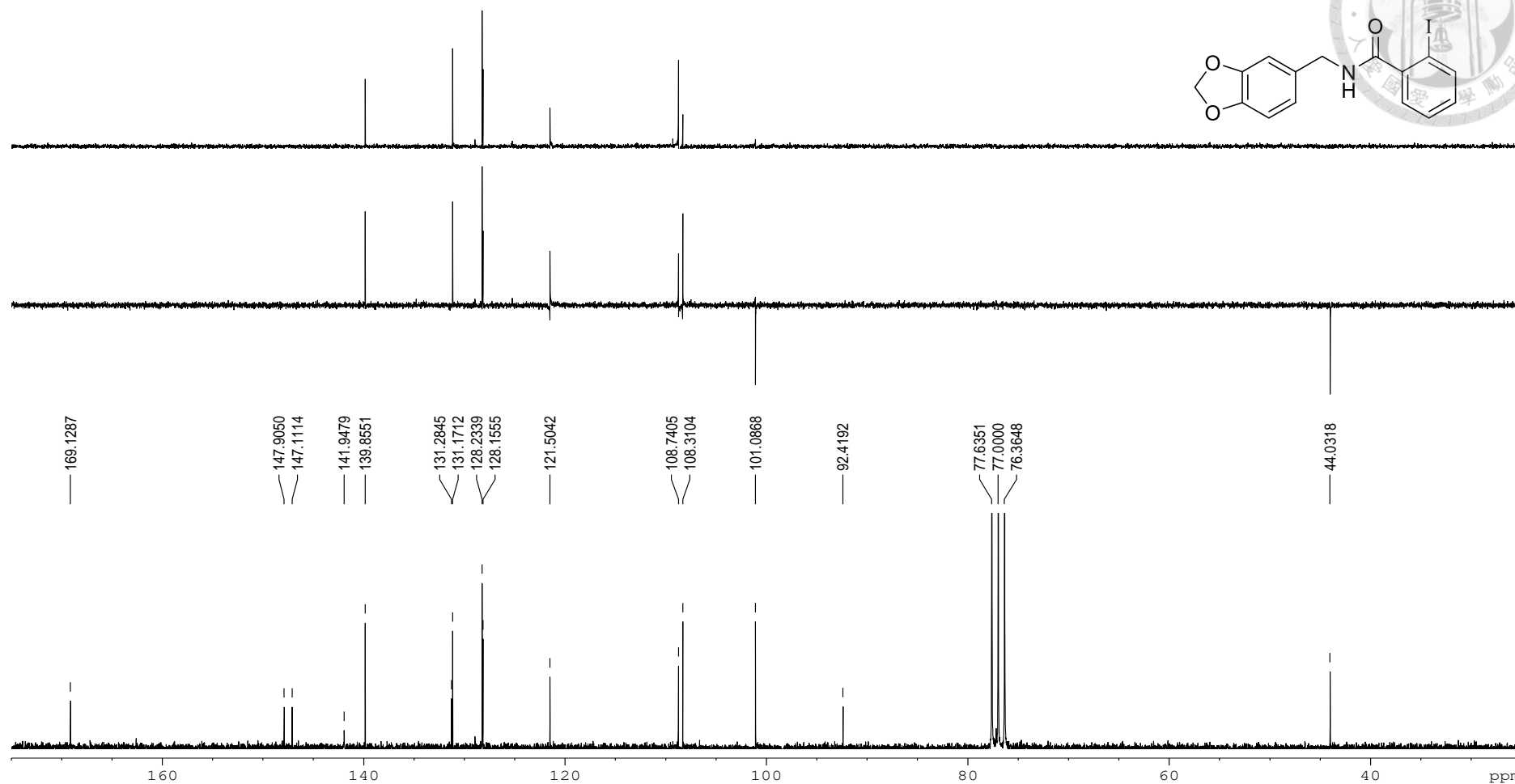
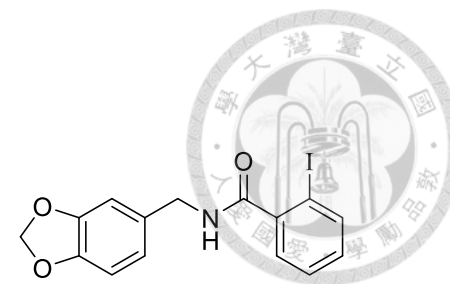


Figure S6. <sup>13</sup>C NMR spectrum (DEPT-90, top; DEPT-135, middle; BBD, bottom) of 3c (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz)



wc1-p. 4507607 CDC13\_7.24ppm 400MHz 20170226 fr.2

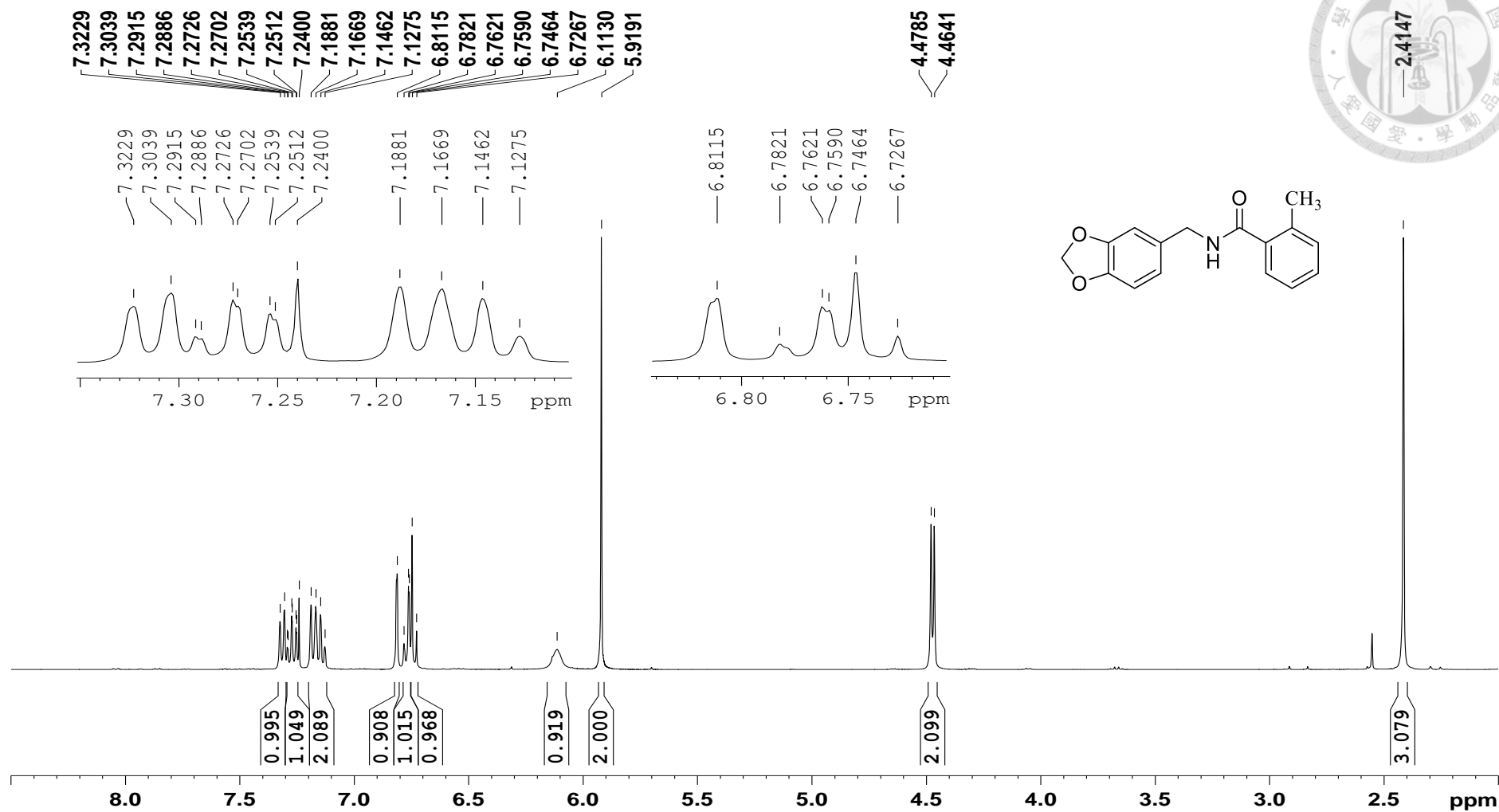
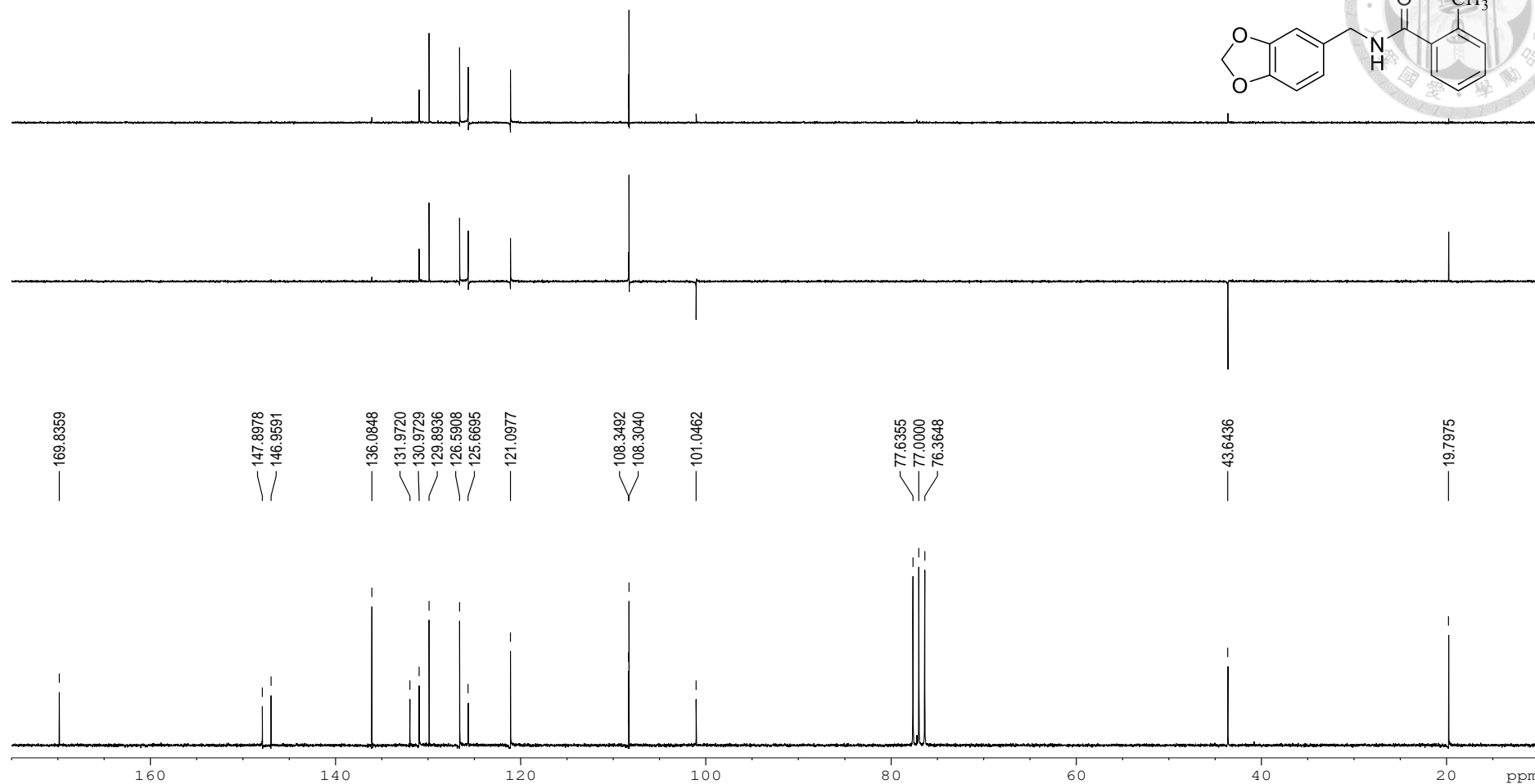
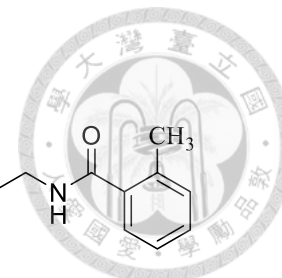


Figure S7. <sup>1</sup>H NMR spectrum of 3d (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)



wc1-p. 4507607 CDC13\_77.0ppm 200MHz 20170225 fr.2



**Figure S8.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum (DEPT-90, top; DEPT-135, middle; BBD, bot) of **3d** ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)

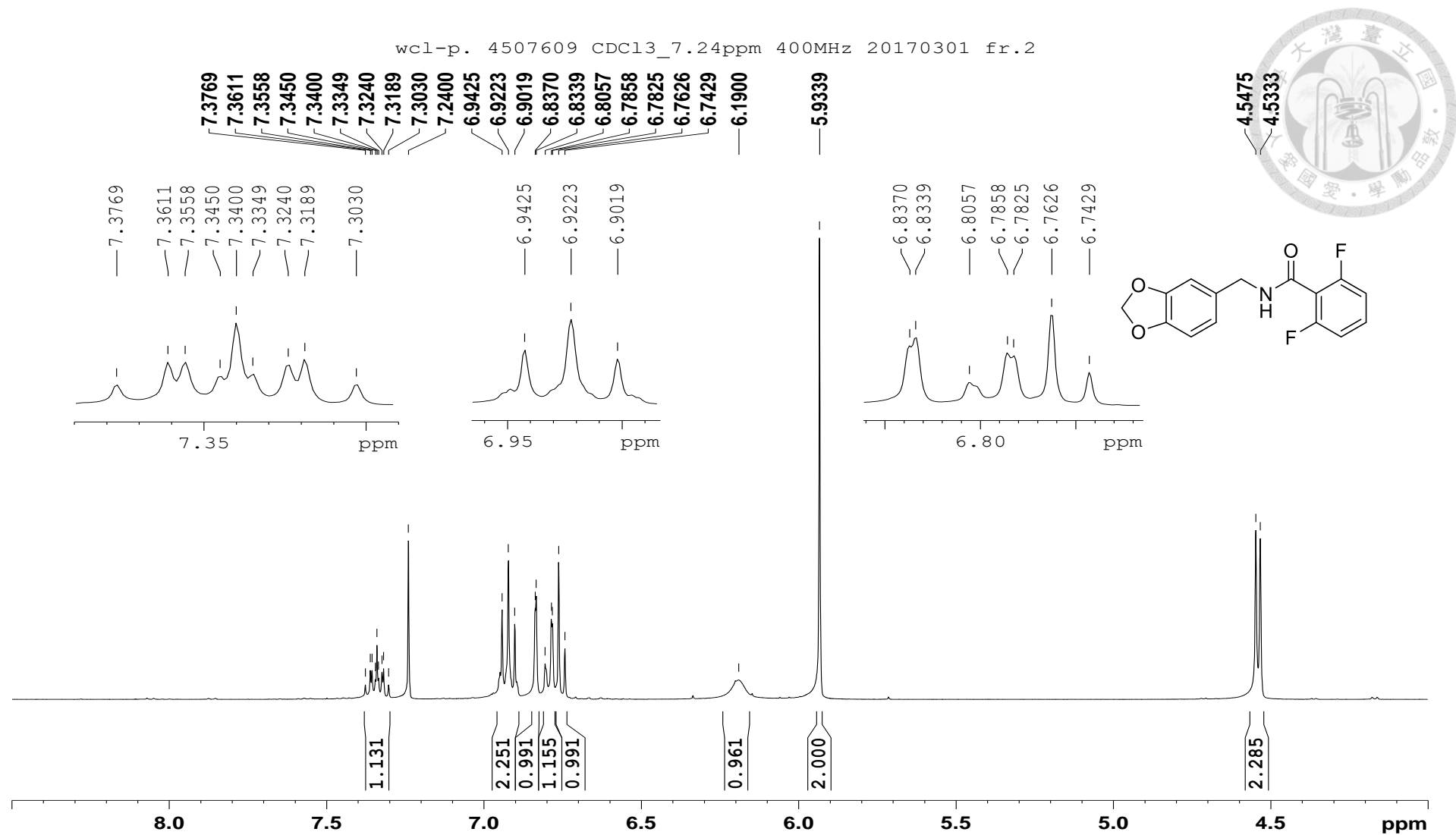


Figure S9. <sup>1</sup>H NMR spectrum of **3e** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

wcl-p. 4507609 CDC13\_77.0ppm 200MHz 20170304 fr.2

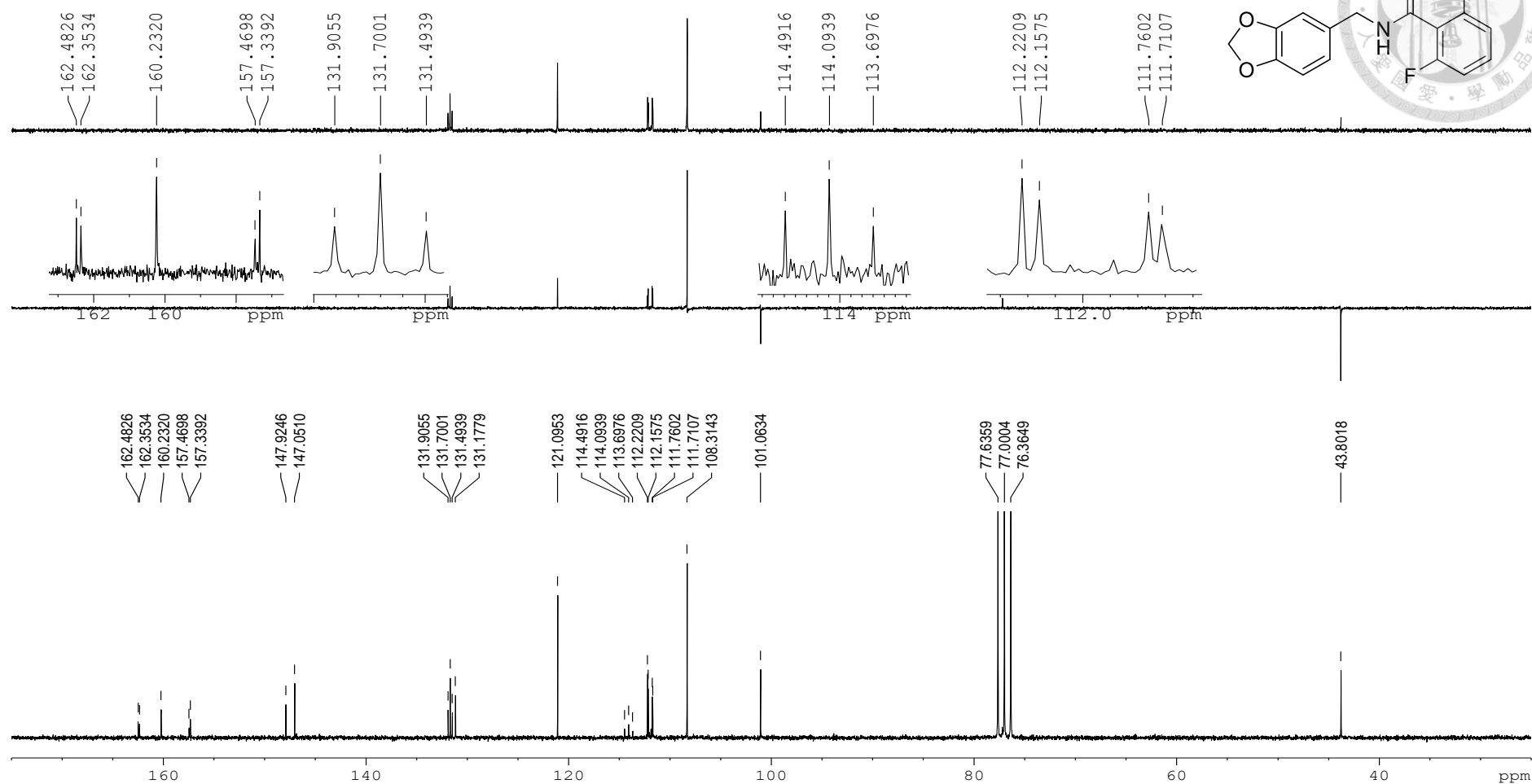


Figure S10.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum (DEPT-90, top; DEPT-135, middle; BBD, bottom) of **3e** ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)

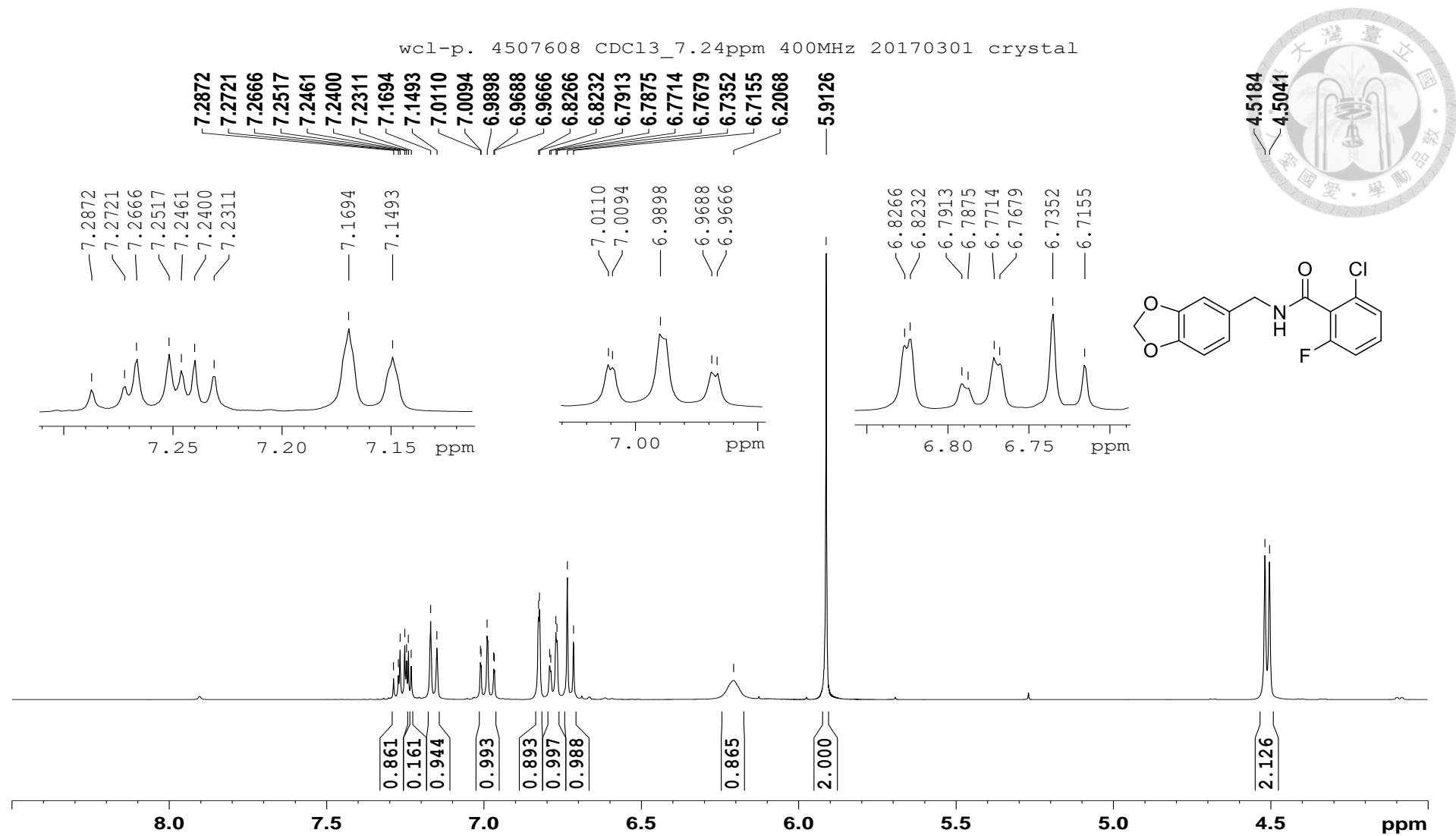


Figure S11. <sup>1</sup>H NMR spectrum of **3f** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

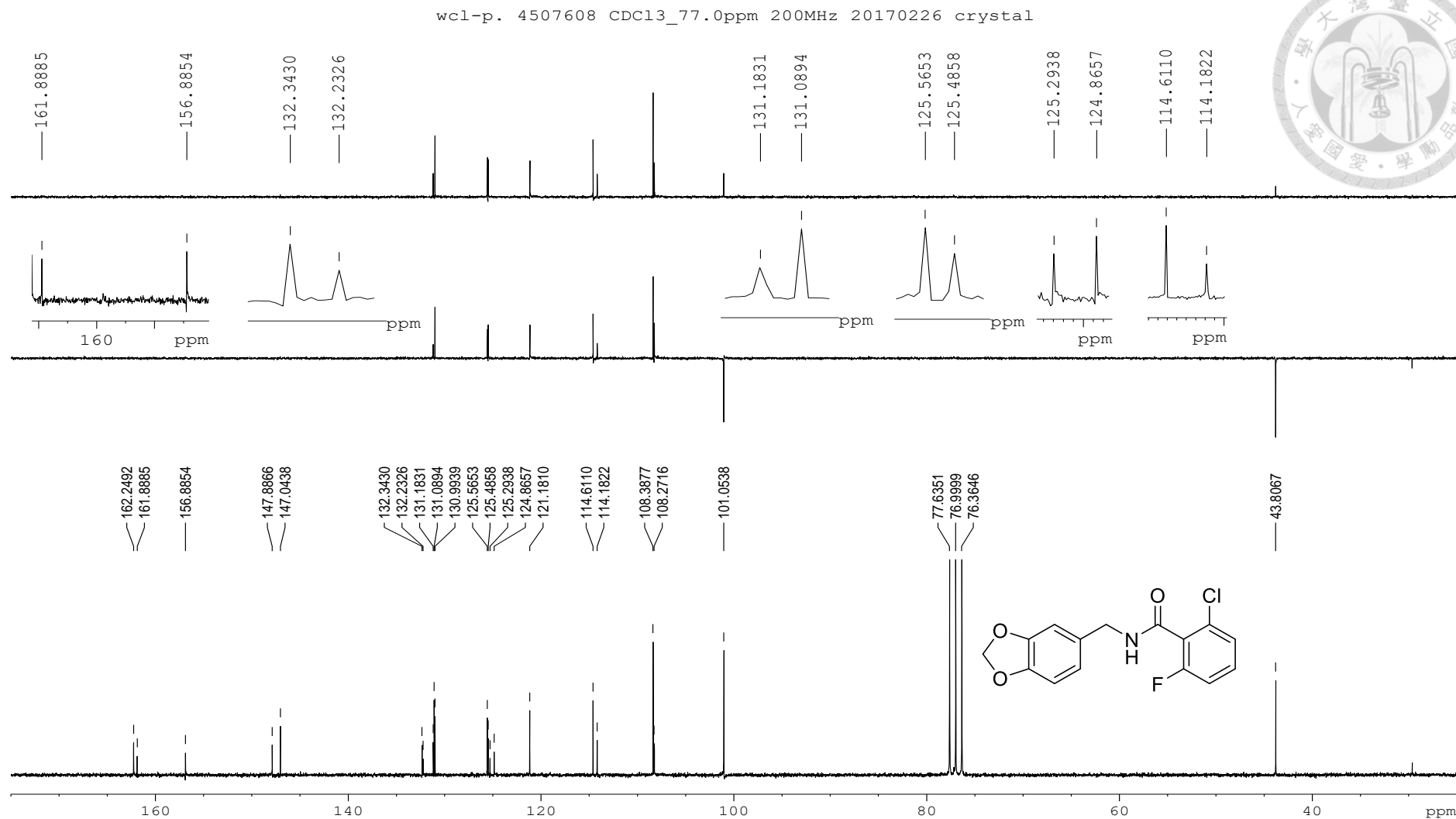


Figure S12. <sup>13</sup>C NMR spectrum (DEPT-90, top; DEPT-135, middle; BBD, bottom) of **3f** (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz)

wcl-p. 4507612 CDCl<sub>3</sub>\_7.24ppm 400MHz 20171026

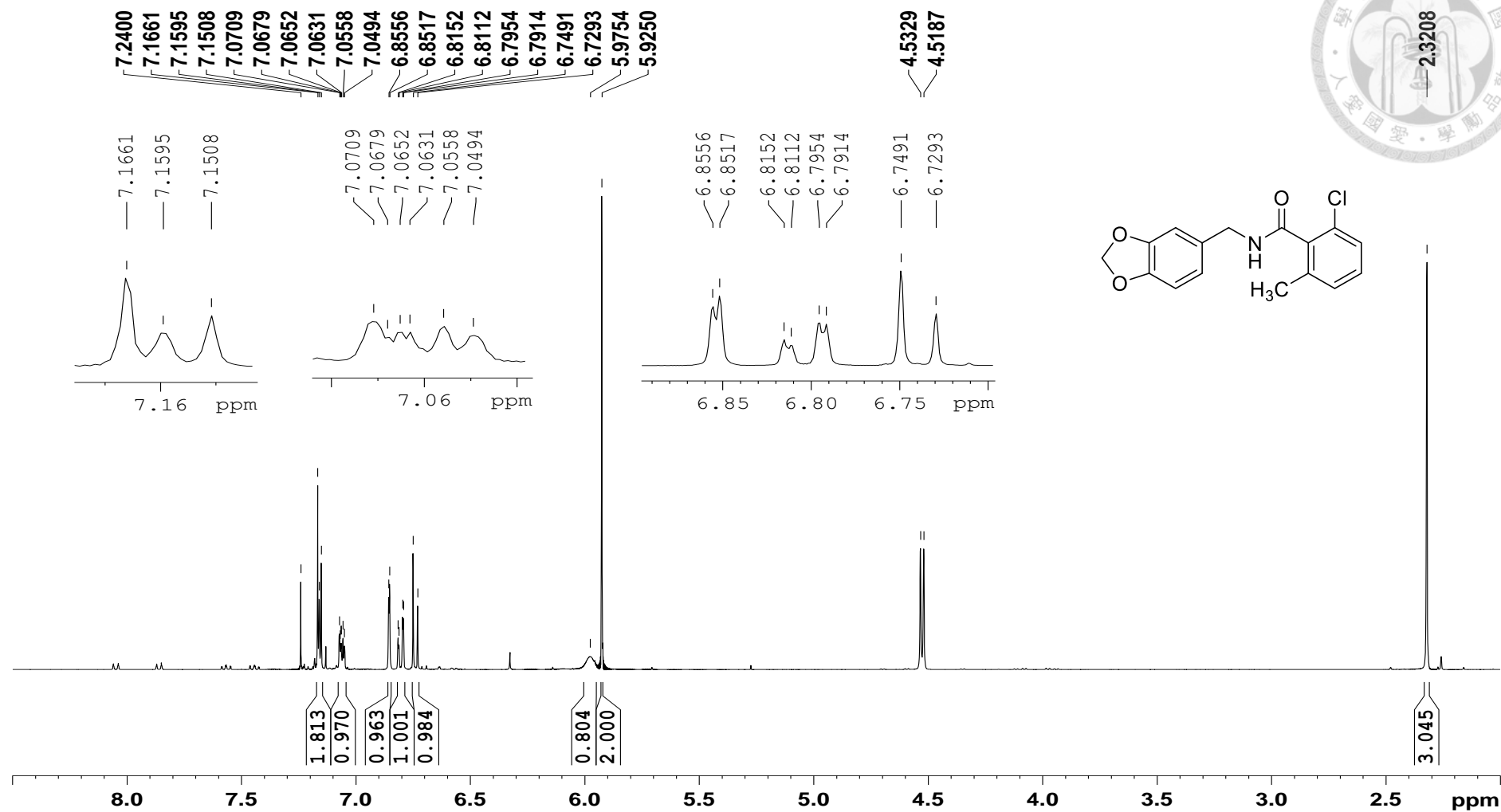
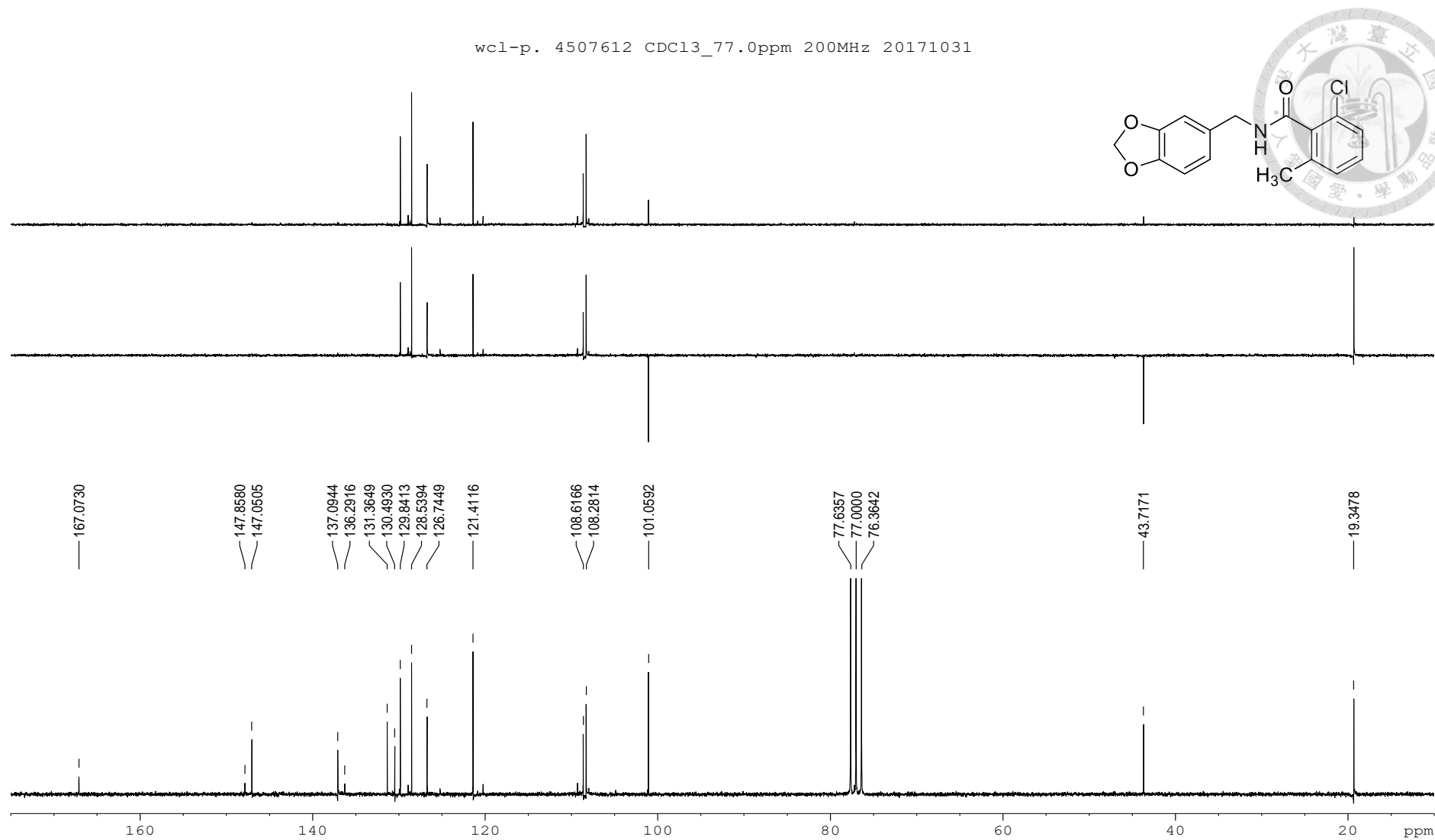


Figure S13. <sup>1</sup>H NMR spectrum of **3g** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

wc1-p. 4507612 CDC13\_77.0ppm 200MHz 20171031



**Figure S14.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum (DEPT-90, top; DEPT-135, middle; BBD, bottom) of **3g** ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)

wcl-p. 4507610 CDCl<sub>3</sub>\_7.24ppm 400MHz 20170307 crystal

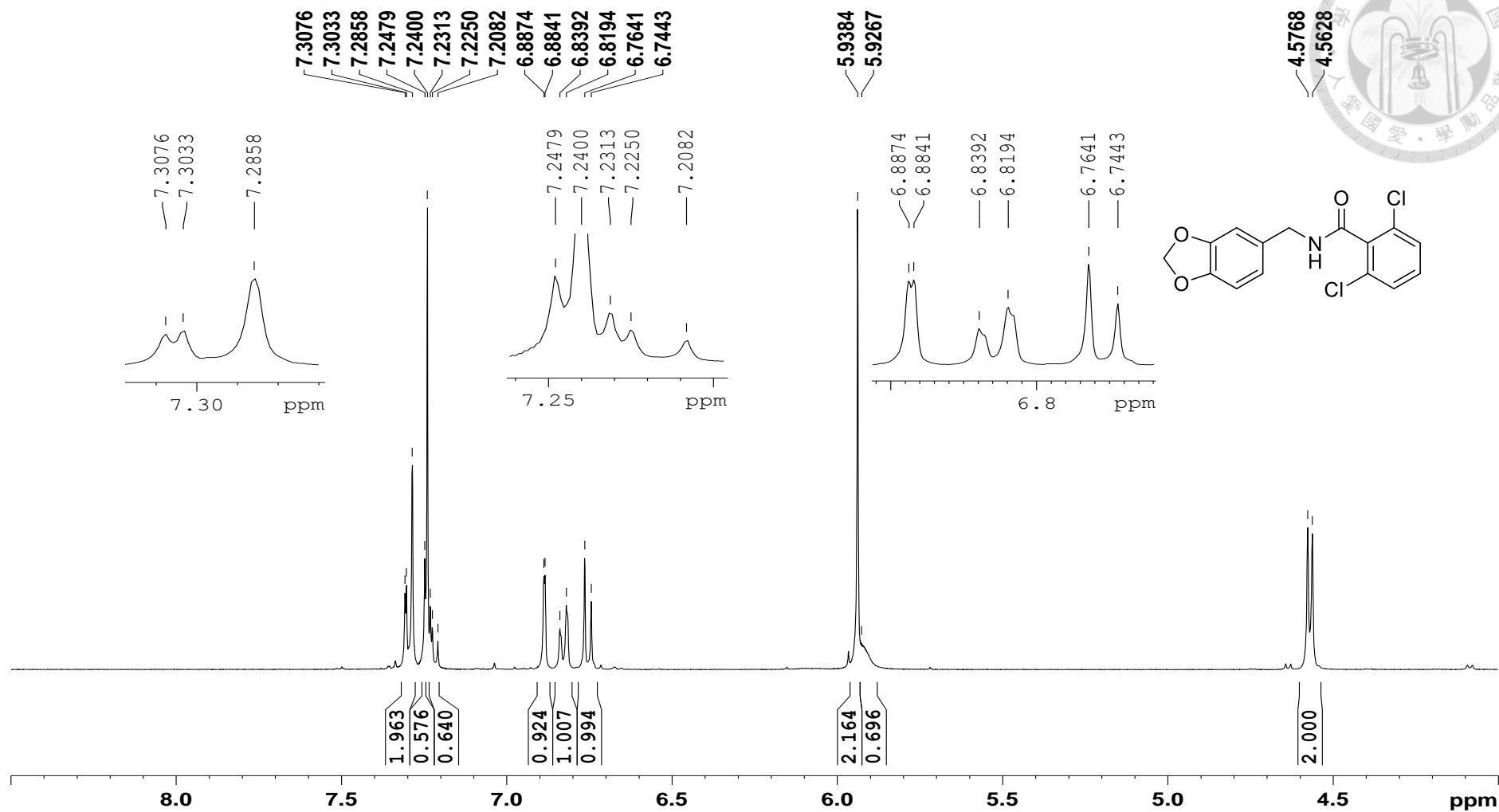


Figure S15. <sup>1</sup>H NMR spectrum of **3h** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)



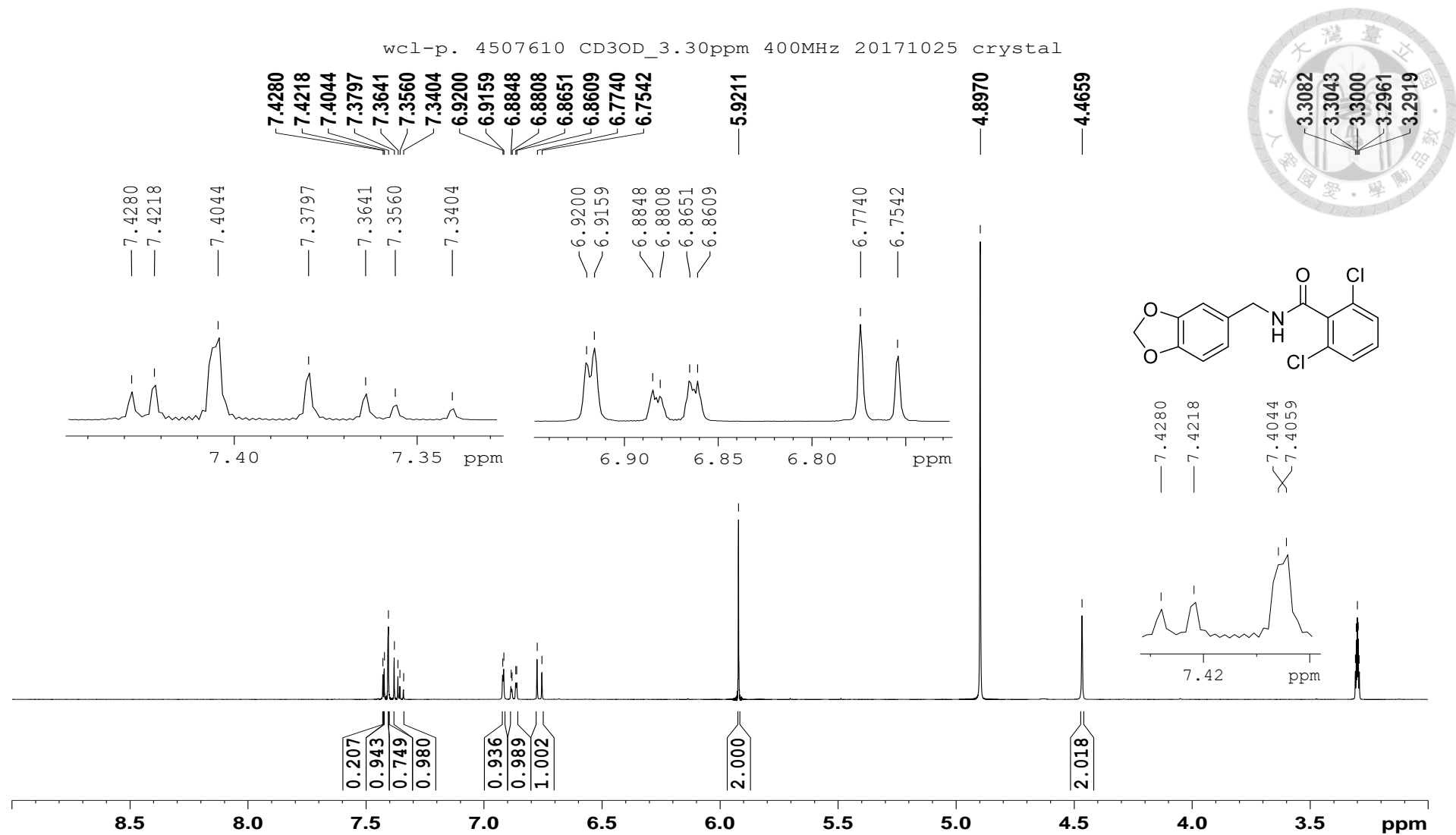


Figure S16. <sup>1</sup>H NMR spectrum of **3h** (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz)

wcl-p. 4507610 CDCl3\_77.0ppm 400MHz 20170304 crystal

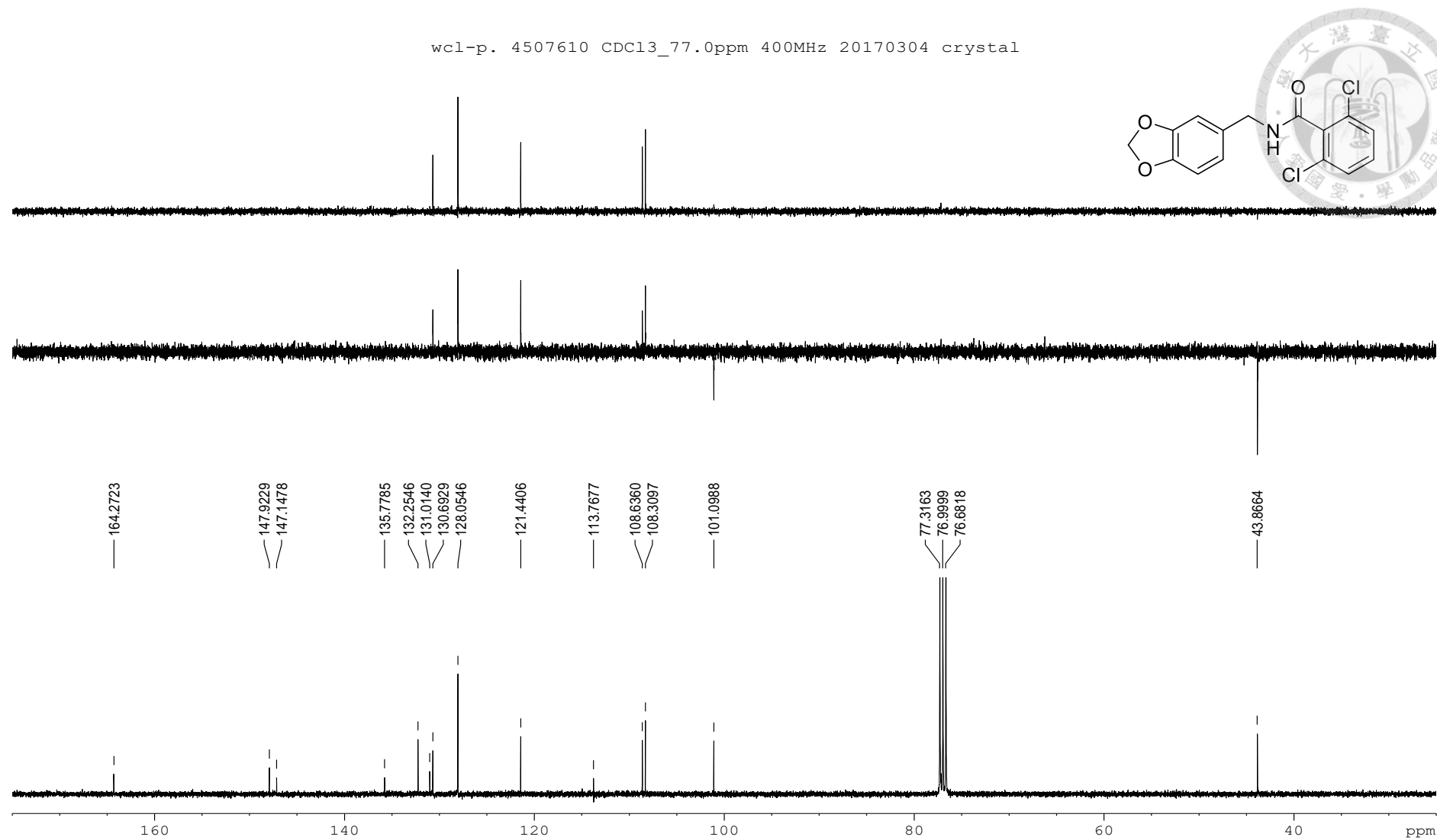
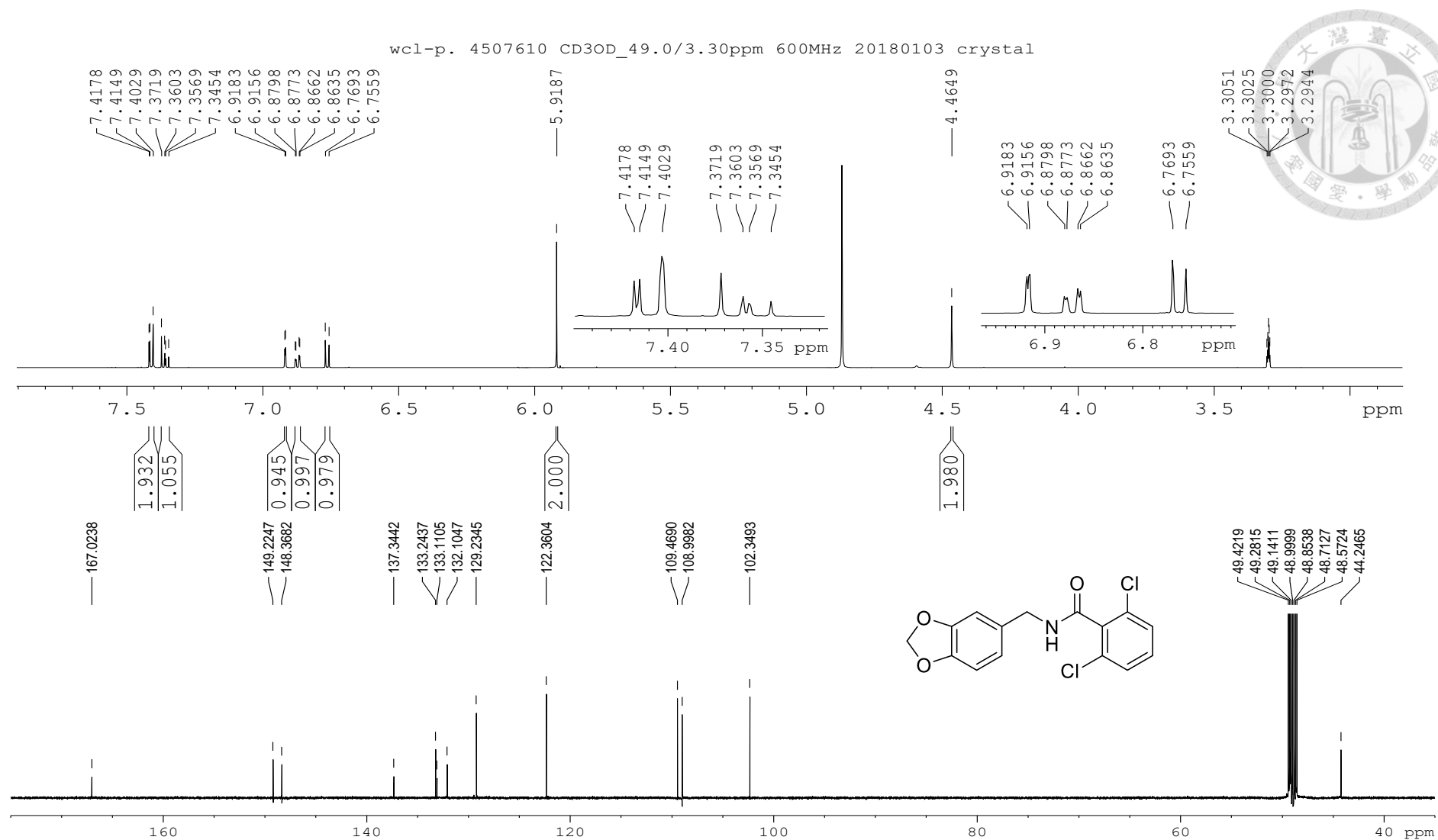
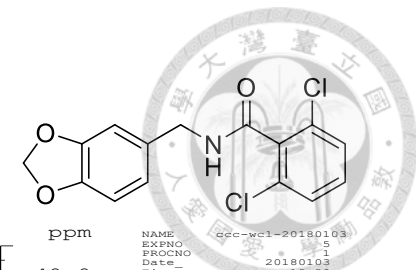
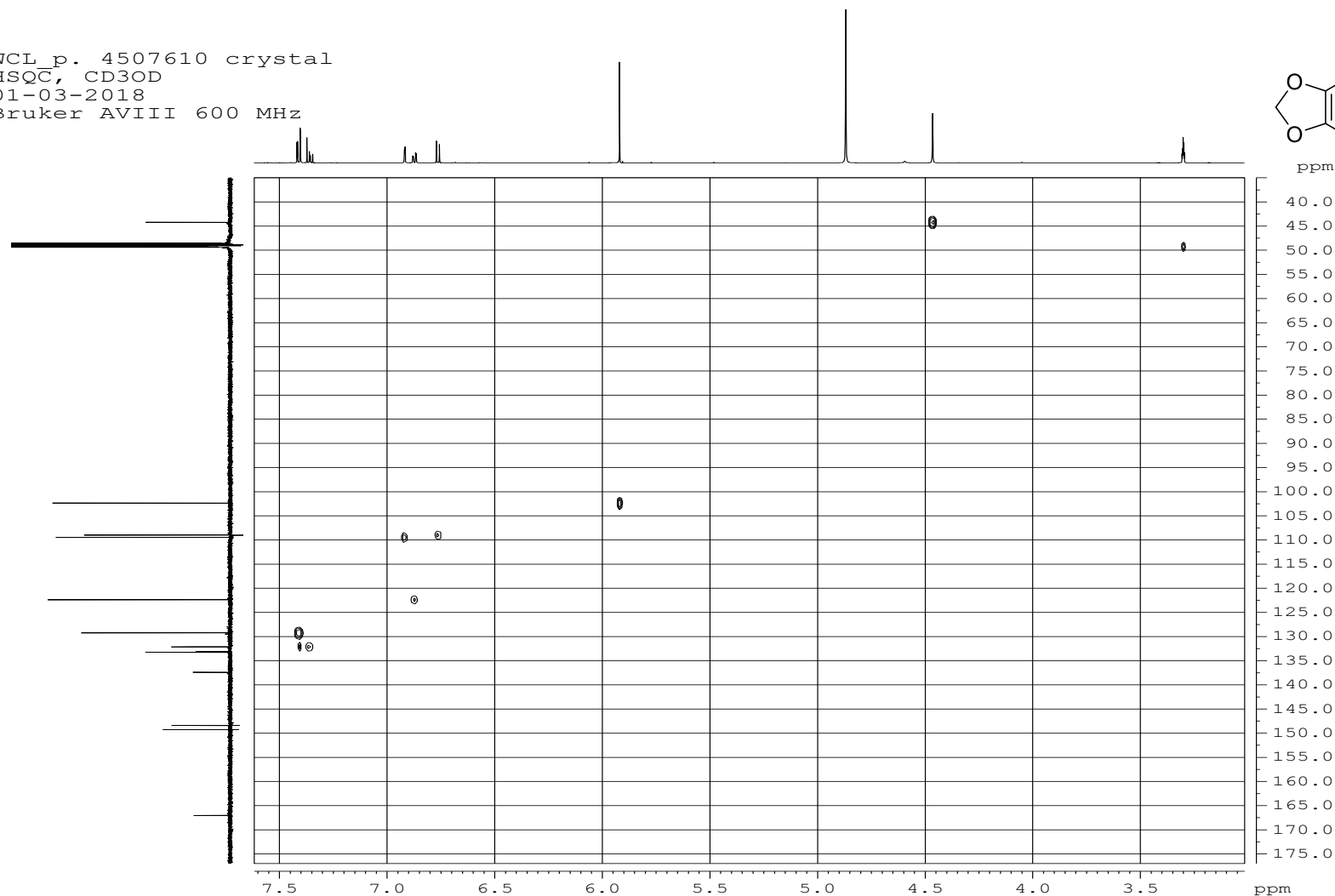


Figure S17.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum (DEPT-90, top; DEPT-135, middle; BBD, bottom) of **3h** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)



**Figure S18.** <sup>1</sup>H NMR spectrum of **I** (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz), top; <sup>13</sup>C NMR spectrum (BBD) of **3h** (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz), bot.

WCL\_p. 4507610 crystal  
 HSQC, CD3OD  
 01-03-2018  
 Bruker AVIII 600 MHz



```

NAME      gcc-wcl-20180103
EXPNO     1
PROCNO    1
Date_     20180103
Time      15.38
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm PABBO BB-
PULPROG   hsqcetgpsimp2.2
TD         2048
SOLVENT   MeOD
NS         16
DS         16
SWH        8012.820 Hz
FIDRES     3.912510 Hz
AQ         0.1278452 sec
RG         1030
DW         62.400 usec
DE         20.00 usec
TE         296.8 K
CNST2     145.0000000
CNST17    -0.5000000
DO         0.00000300 sec
D1         1.50000000 sec
D4         0.00172414 sec
D11        0.03000000 sec
D16        0.00020000 sec
D24        0.00086207 sec
IN0        0.00001540 sec

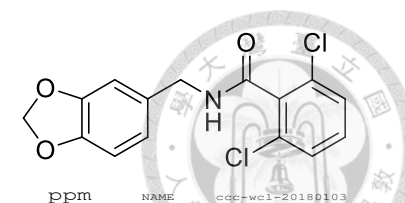
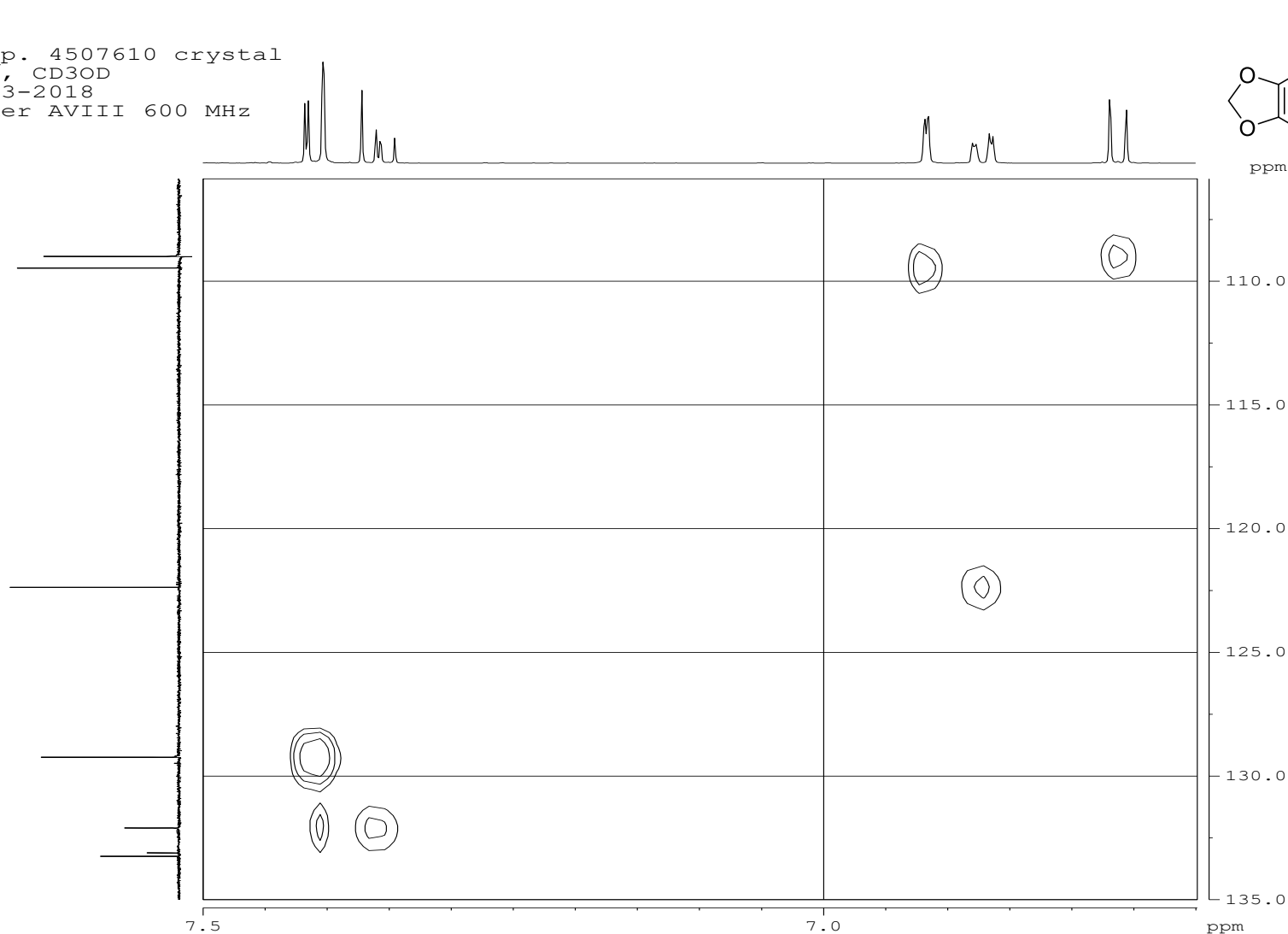
===== CHANNEL f1 =====
NUC1       13C
P1         14.50 usec
P2         29.00 usec
P28        0.00 usec
PL1        -0.10 dB
PL1W       16.47623634 W
SFO1       600.1836011 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2   garp
NUC2       13C
P3         11.50 usec
P4         500.00 usec
P24        2000.00 usec
PCPD2     65.00 usec
PL0        120.00 dB
PL2        2.00 dB
PL12       17.50 dB
PL1W       0.00000000 W
PL2W       57.84860229 W
PL12W     1.63039505 W
SFO2       150.9289624 MHz
SP3        8.95 dB
SP7        8.95 dB
SPNAM3     Crp60,0.5,20.1
SPNAM7     Crp60comp,4
SFOAL3     0.500
SFOAL7     0.500
SPOFFS3    0.00 Hz
SPOFFS7    0.00 Hz

===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM1     SINE,100
GPNAM2     SINE,100
GPNAM3     SINE,100
GPNAM4     SINE,100
GPZ1       80.00 %
GPZ2       20.10 %
GPZ3       11.00 %
GPZ4       -5.00 %
P16        1000.00 usec
P19        600.00 usec
ND0        2
TD         256
SFO1       150.929 MHz
SFO2       126.756744 Hz
SW         215.000 PPM
FRMODE     Echo-Antiecho
SI         1024
SF         600.1800134 MHz
WDW        QSINE
SSB        0.00 Hz
GB         0
PC         1.40
SI         1024
MC2        echo-antiecho
SF         150.9151715 MHz
WDW        QSINE
SSB        2
LB         0.00 Hz
GB         0
  
```

Figure S19. HSQC spectrum of **3h** (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) (I)

WCL\_p. 4507610 crystal  
 HSQC, CD3OD  
 01-03-2018  
 Bruker AVIII 600 MHz



```

NAME ccc-wcl-20180103
EXPNO 5
PROCNO 1
Date_ 20180103
Time 15.38
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB-
PULPROG haqcetpsisq2.2
TD 2048
SOLVENT MeOD
NS 16
DS 16
SWH 8012.820 Hz
FIDRES 3.912510 Hz
AQ 0.1278452 sec
RG 1030
DW 62.400 usec
DE 20.00 usec
TE 296.8 K
CNST2 145.0000000
CNST17 -0.5000000
DO 0.00000300 sec
D1 1.5000000 sec
D4 0.00172414 sec
D11 0.03000000 sec
D16 0.00020000 sec
D24 0.00086207 sec
INO 0.00001540 sec

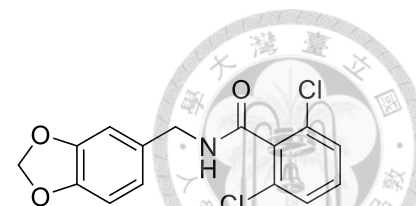
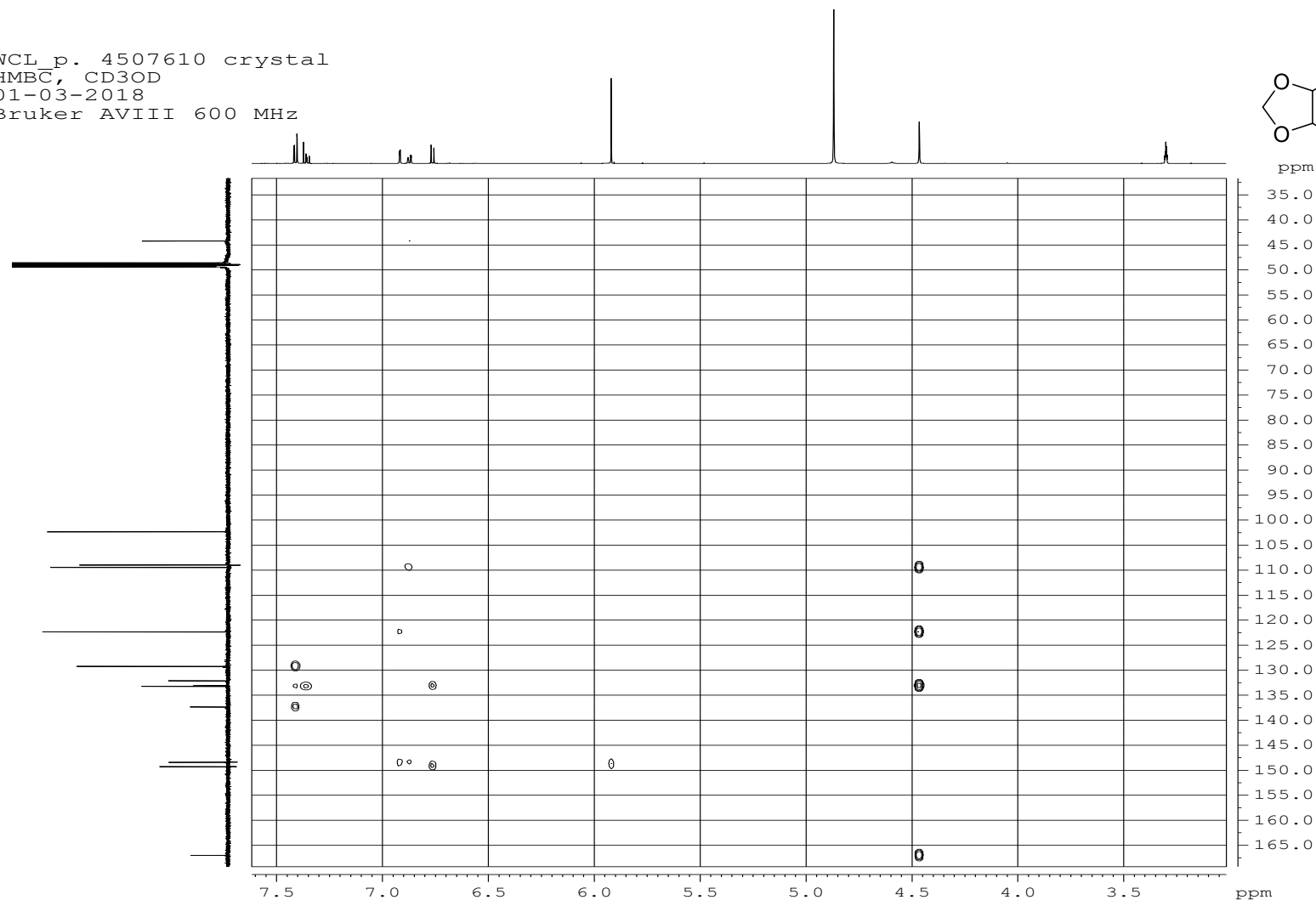
===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 14.50 usec
P2 29.00 usec
P28 0.00 usec
PL1 -0.10 dB
PL1W 16.47623634 W
SF01 600.1836011 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 Garp
NUC2 13C
P3 11.50 usec
P4 500.00 usec
P24 2000.00 usec
PCPD2 65.00 usec
PL0 120.00 dB
PL2 2.00 dB
PL12 17.50 dB
PLOW 0.00000000 W
PL2W 57.84860239 W
PL12W 1.63039505 W
SF02 150.9289624 MHz
SP3 8.95 dB
SP7 8.95 dB
SPNAM3 Crp60,0.5,20.1
SPNAM7 Crp60comp,4
SPOAL3 0.500
SPOAL7 0.500
SPOFFS3 0.00 Hz
SPOFFS7 0.00 Hz

===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM1 SINE.100
GPNAM2 SINE.100
GPNAM3 SINE.100
GPNAM4 SINE.100
GP21 80.00 %
GP22 20.10 %
GP23 11.00 %
GP24 -5.00 %
P16 1000.00 usec
P19 600.00 usec
ND0 2
TD 256
SF01 150.929 MHz
FIDRES 126.756744 Hz
SW 215.000 ppm
FrMODE Echo-Antiecho
SI 1.024
SF 600.1800134 MHz
WDW QSINE
SSB 2
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.40
ST 1024
MC2 echo-antiecho
SF 150.9151715 MHz
WDW QSINE
SSB 2
LB 0.00 Hz
GB 0
  
```

Figure S20. HSQC spectrum of **3h** (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) (II)

WCL\_p. 4507610 crystal  
 HMBC, CD3OD  
 01-03-2018  
 Bruker AVIII 600 MHz



ppm

```

NAME ccc-wcl-20180103
EXPNO 16
PROCNO 1
Date_ 20180103
Time 17.32
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB-
PULPROG hmcgplpndqf
TD 2048
SOLVENT MeOD
NS 32
DS 16
SWH 8012.820 Hz
FIDRES 3.912510 Hz
AQ 0.1278452 sec
RG 2050
DW 62.400 usec
DE 20.00 usec
TE 297.2 K
CNST2 145.0000000
CNST13 8.0000000
DO 0.0000300 sec
D1 1.5000000 sec
D2 0.00344828 sec
D6 0.06250000 sec
D16 0.00020000 sec
INQ 0.00001325 sec

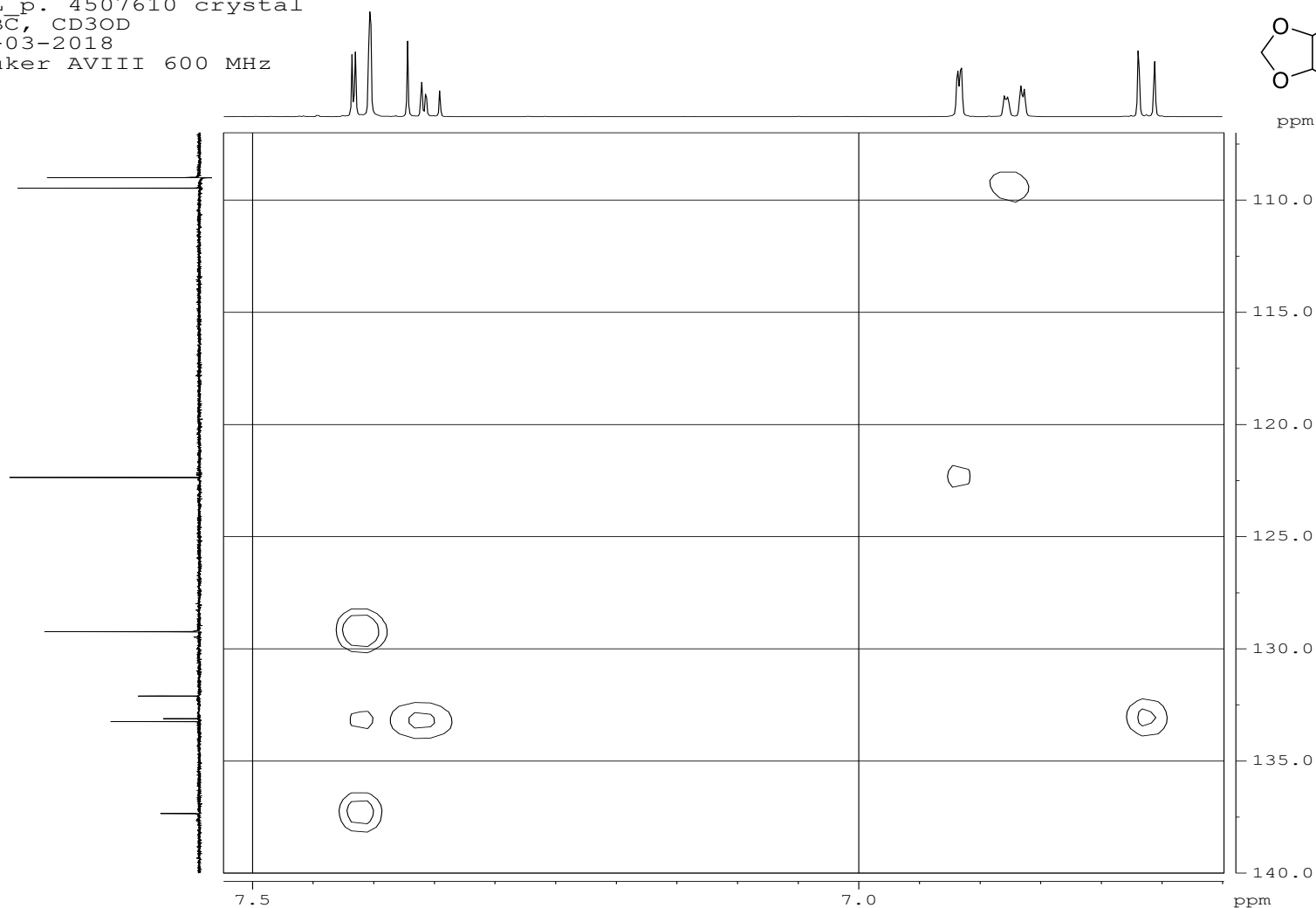
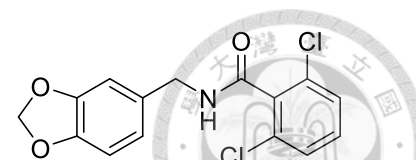
----- CHANNEL f1 -----
NUC1 1H
P1 14.50 usec
P2 29.00 usec
PL1 -0.10 dB
PL1W 16.47623634 W
SFO1 600.1836011 MHz

----- CHANNEL f2 -----
NUC2 13C
P3 11.50 usec
PL2 2.00 dB
PL2W 57.84860229 W
SFO2 150.9334899 MHz

----- GRADIENT CHANNEL -----
GPNAM1 SINE.100
GPNAM2 SINE.100
GPNAM3 SINE.100
GPZ1 50.00 %
GPZ2 30.00 %
GPZ3 40.10 %
P16 1000.00 usec
ND0 2
TD 256
SFO1 150.9335 MHz
FIDRES 147.395981 Hz
SW 250.000 ppm
FMODE QF
SI 1024
SF 600.1800136 MHz
WDW SINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.40
SI 1024
MC2 QF
SF 150.9151603 MHz
WDW SINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
  
```

Figure S21. HMBC spectrum of **3h** (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) (I)

WCL p. 4507610 crystal  
 HMBC, CD3OD  
 01-03-2018  
 Bruker AVIII 600 MHz



```

NAME ccc-wcl-20180103
EXPNO 6
PROCNO 1
Date_ 20180103
Time 17.32
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB-
PULPROG hmbcgp1pndgr
TD 2048
SOLVENT MeOD
NS 32
DS 16
SWH 8012.820 Hz
FIDRES 3.912510 Hz
AQ 0.1278452 sec
RG 2050
DW 62.400 usec
DE 20.00 usec
TE 297.2 K
CNST2 145.0000000
CNST13 8.0000000
D0 0.00000300 sec
D1 1.50000000 sec
D2 0.00344828 sec
D6 0.06250000 sec
D16 0.00020000 sec
INO 0.00001325 sec

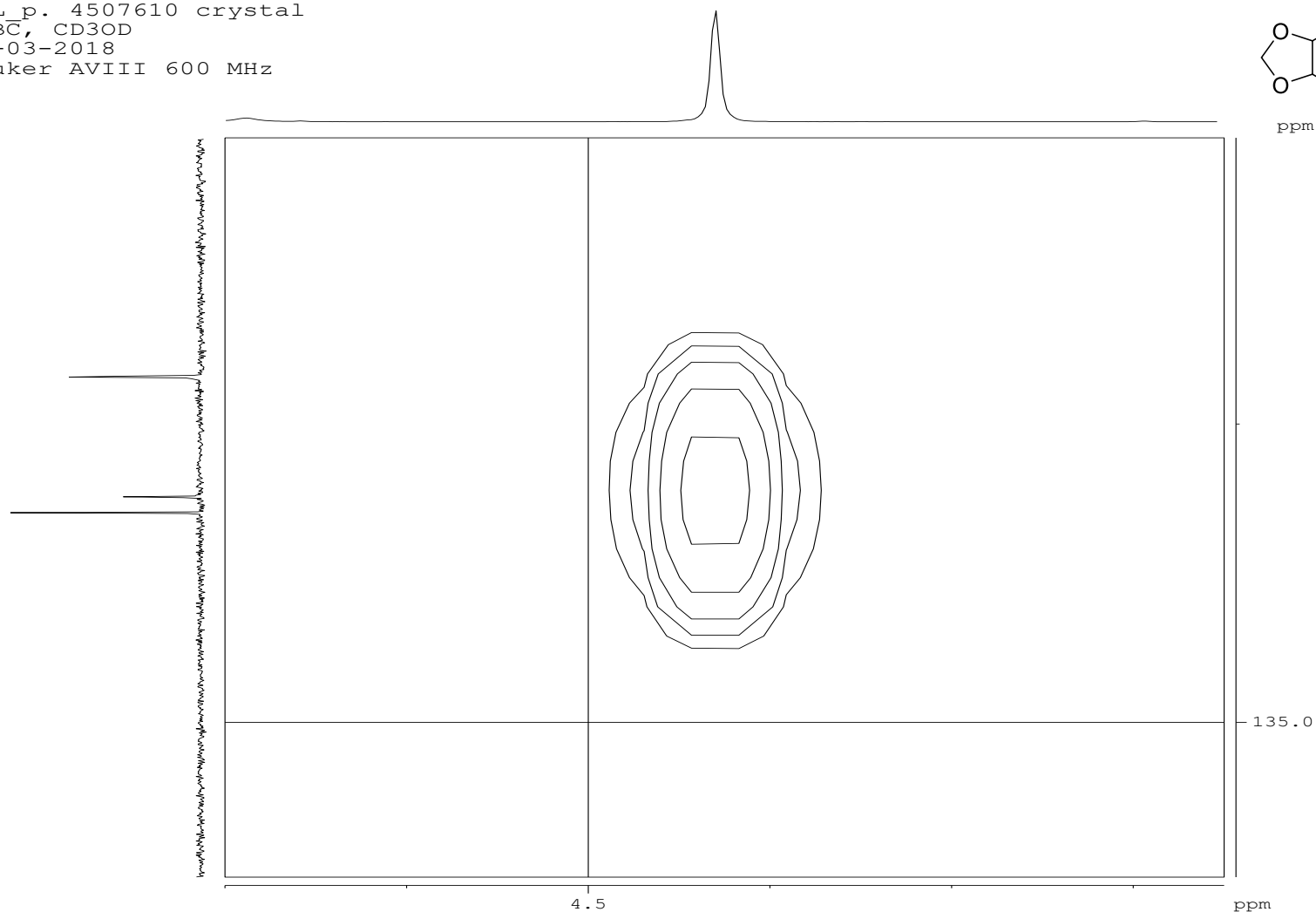
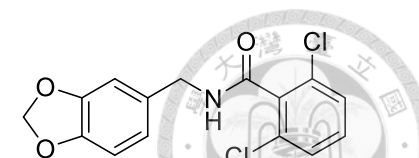
===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 14.50 usec
P2 29.00 usec
PL1 -0.10 dB
PL1W 16.47623634 W
SFO1 600.1836011 MHz

===== CHANNEL f2 =====
NUC2 13C
P3 11.50 usec
PL2 2.00 dB
PL2W 57.84860229 W
SFO2 150.9334899 MHz

===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM1 SINE.100
GPNAM2 SINE.100
GPNAM3 SINE.100
GPZ1 50.00 %
GPZ2 30.00 %
GPZ3 40.10 %
P16 1000.00 usec
NDO 2
TD 256
SFO1 150.9335 MHz
FIDRES 147.395981 Hz
SW 250.000 ppm
FMODE QF
SI 1024
SF 600.1800136 MHz
WDW SINE
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.40
SI 1024
MC2 OF
SF 150.9151603 MHz
WDW SINE
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
  
```

Figure S22. HMBC spectrum of 3h (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) (II)

WCL p. 4507610 crystal  
 HMBC, CD3OD  
 01-03-2018  
 Bruker AVIII 600 MHz



```

NAME ccc-wcl-20180103
EXPNO 6
PROCNO 1
Date_ 20180103
Time 17.32
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB-
PULPROG hmbcgp1pndgr
TD 2048
SOLVENT MeOD
NS 32
DS 16
SWH 8012.820 Hz
FIDRES 3.912510 Hz
AQ 0.1278452 sec
RG 2050
DW 62.400 usec
DE 20.00 usec
TE 297.2 K
CNST2 145.0000000
CNST13 8.0000000
D0 0.00000300 sec
D1 1.50000000 sec
D2 0.00344828 sec
D6 0.06250000 sec
D16 0.00020000 sec
INO 0.00001325 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 14.50 usec
P2 29.00 usec
PL1 -0.10 dB
PL1W 16.47623634 W
SFO1 600.1836011 MHz

===== CHANNEL f2 =====
NUC2 13C
P3 11.50 usec
PL2 2.00 dB
PL2W 57.84860229 W
SFO2 150.9334899 MHz

===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM1 SINE.100
GPNAM2 SINE.100
GPNAM3 SINE.100
GPZ1 50.00 %
GPZ2 30.00 %
GPZ3 40.10 %
P16 1000.00 usec
NDO 2
TD 256
SFO1 150.9335 MHz
FIDRES 147.395981 Hz
SW 250.000 ppm
FMODE QF
SI 1024
SF 600.1800136 MHz
WDW SINE
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.40
SI 1024
MC2 QF
SF 150.9151603 MHz
WDW SINE
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
  
```

Figure S23. HMBC spectrum of **3h** (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) (III)



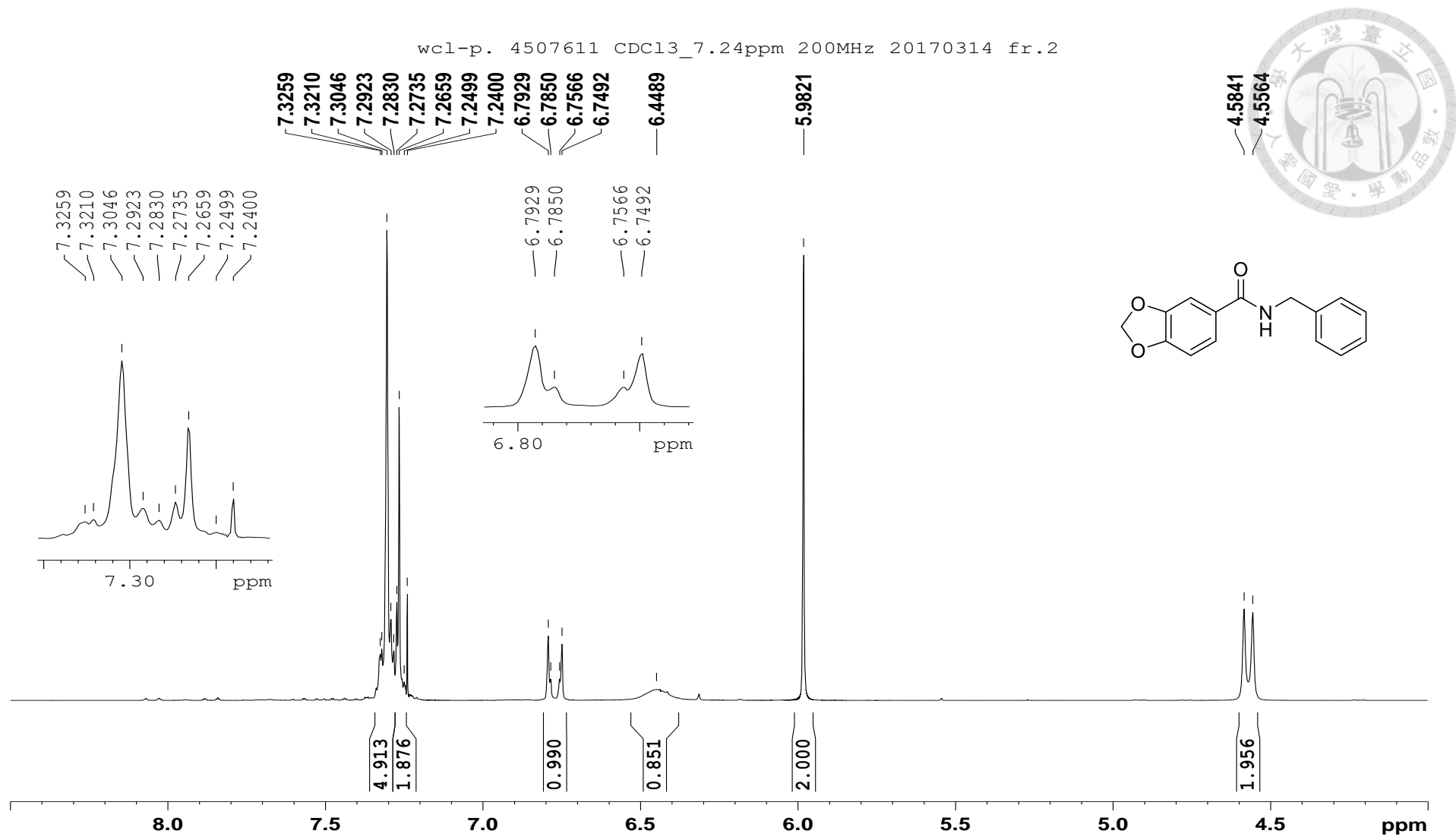


Figure S24. <sup>1</sup>H NMR spectrum of **6a** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)

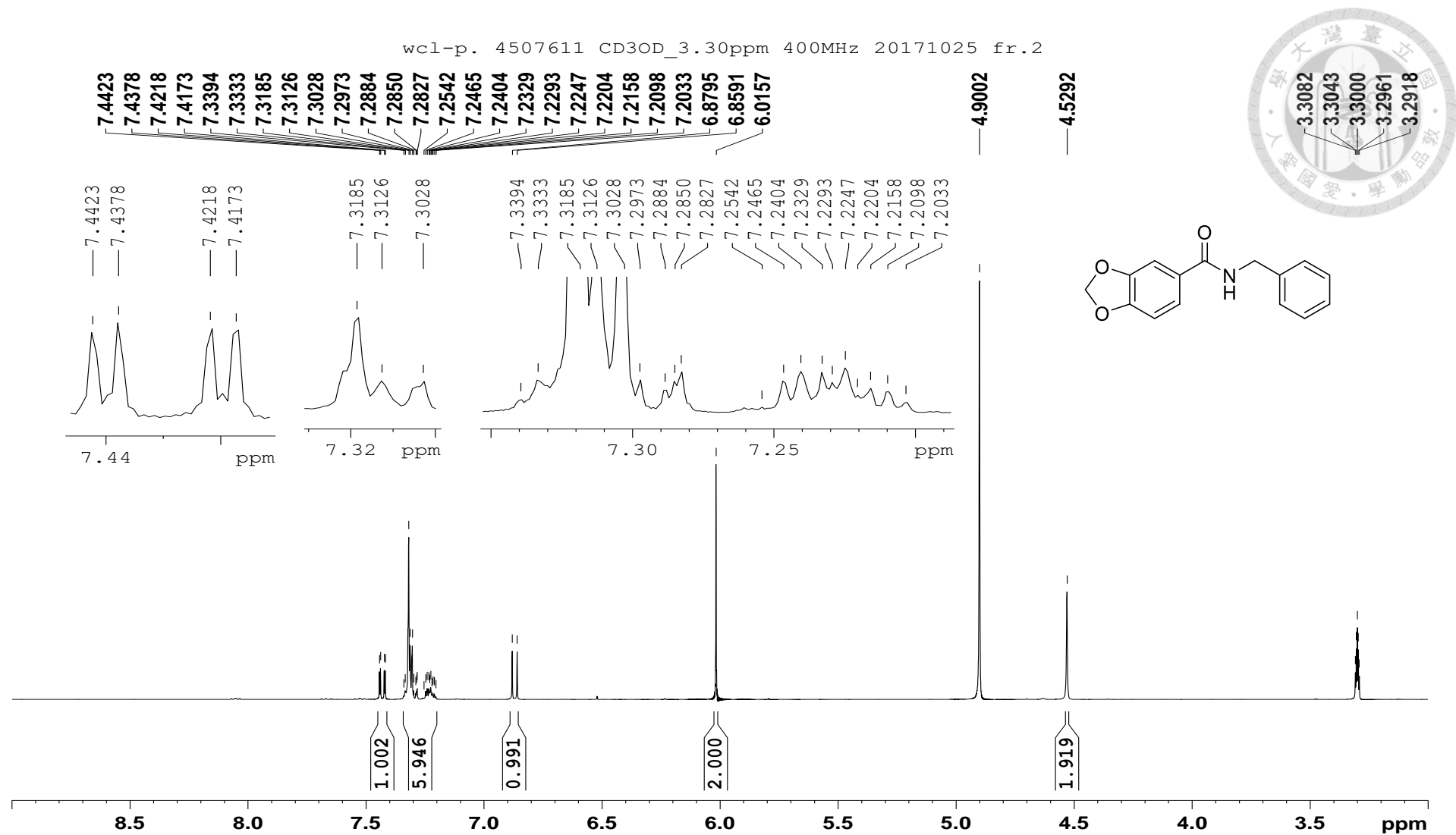


Figure S25. <sup>1</sup>H NMR spectrum of **6a** (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz)

wcl-p. 4507611 CDC13\_77.0ppm 200MHz 20170314 fr.2

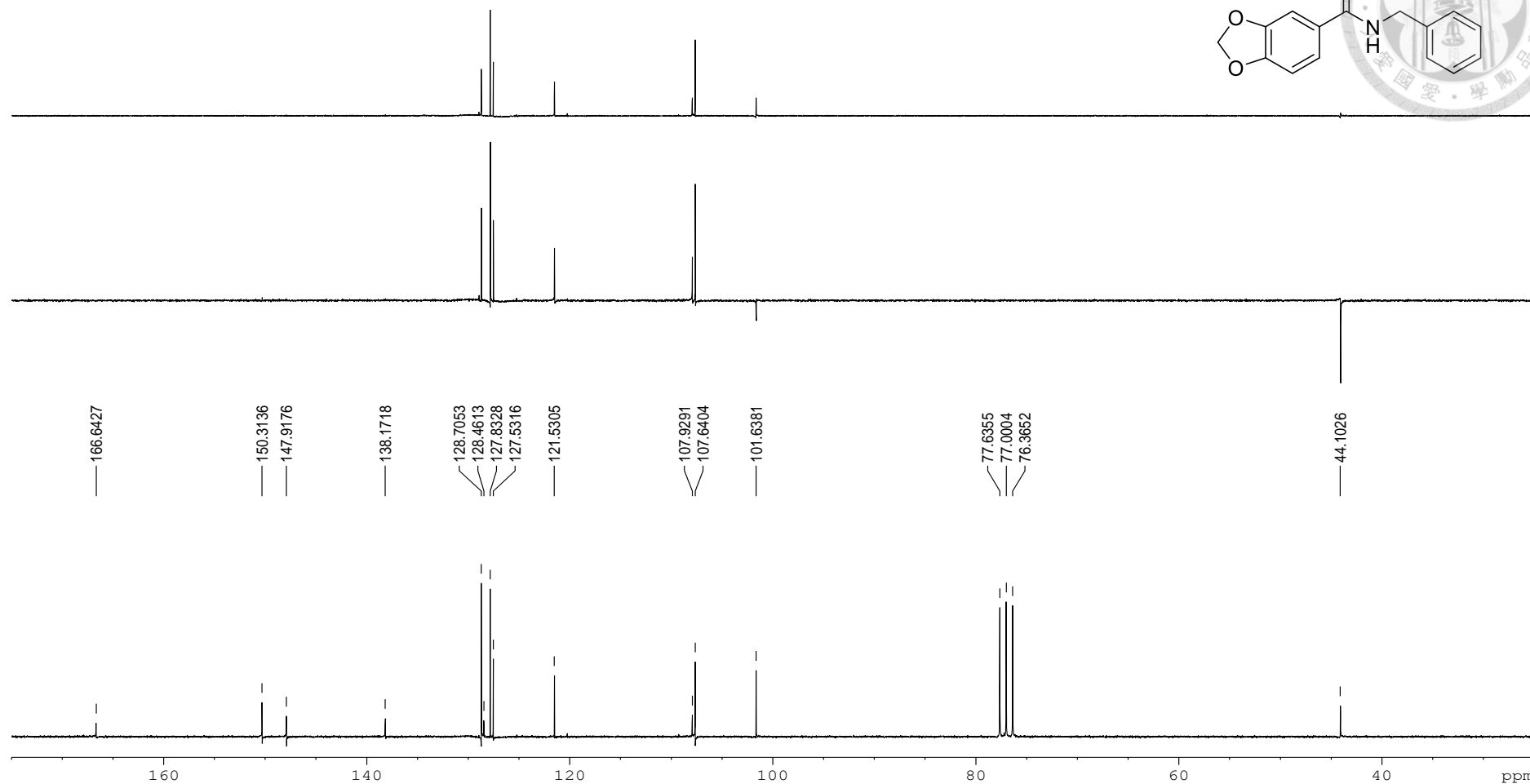
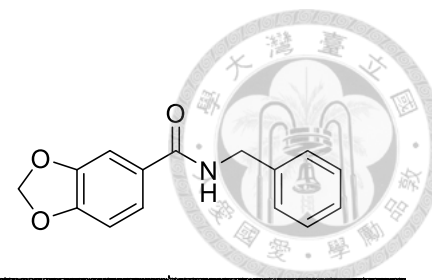


Figure S26. <sup>13</sup>C NMR spectrum (DEPT-90, top; DEPT-135, middle; BBD, bottom) of **6a** (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz)

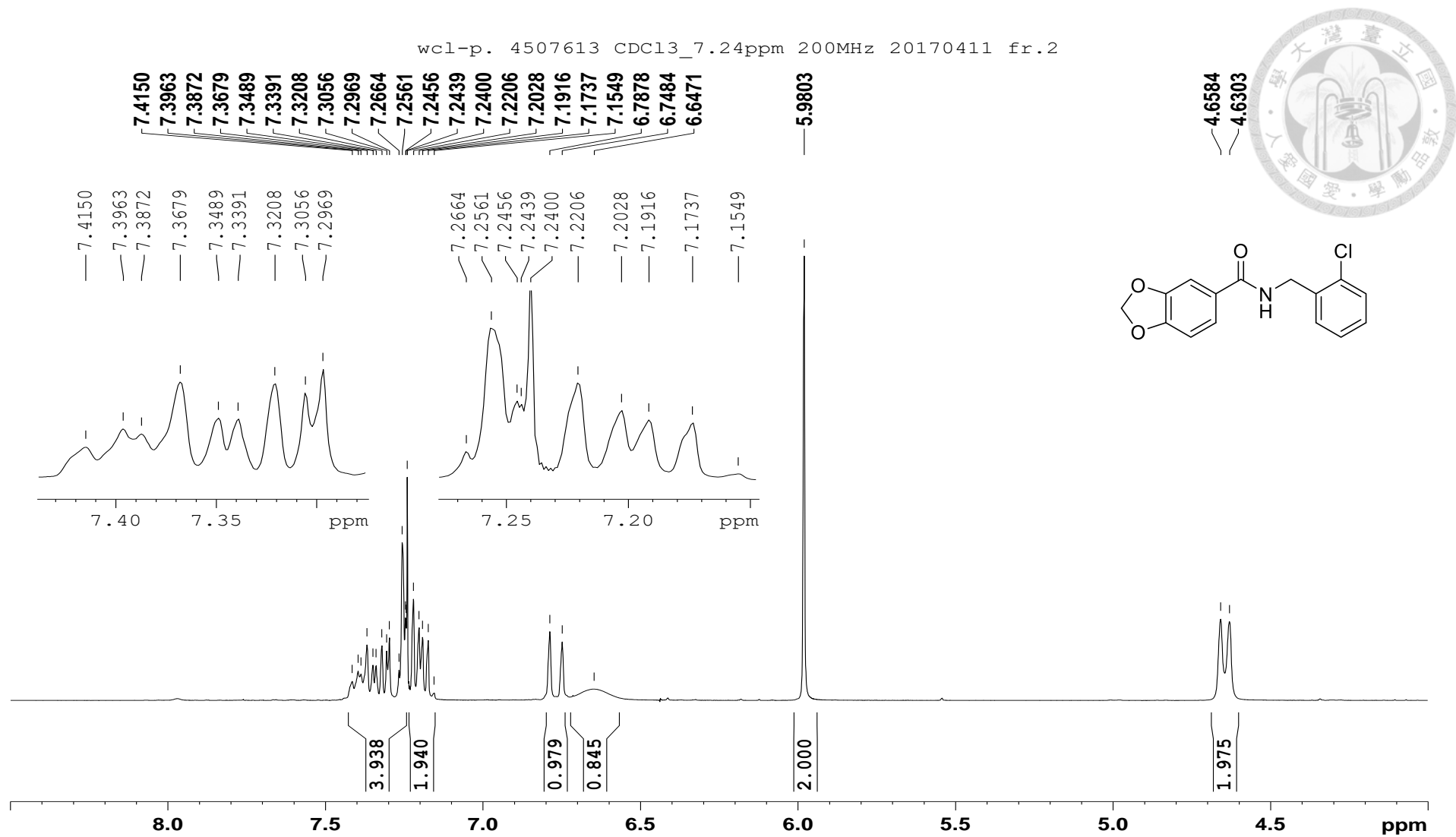


Figure S27. <sup>1</sup>H NMR spectrum of **6b** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

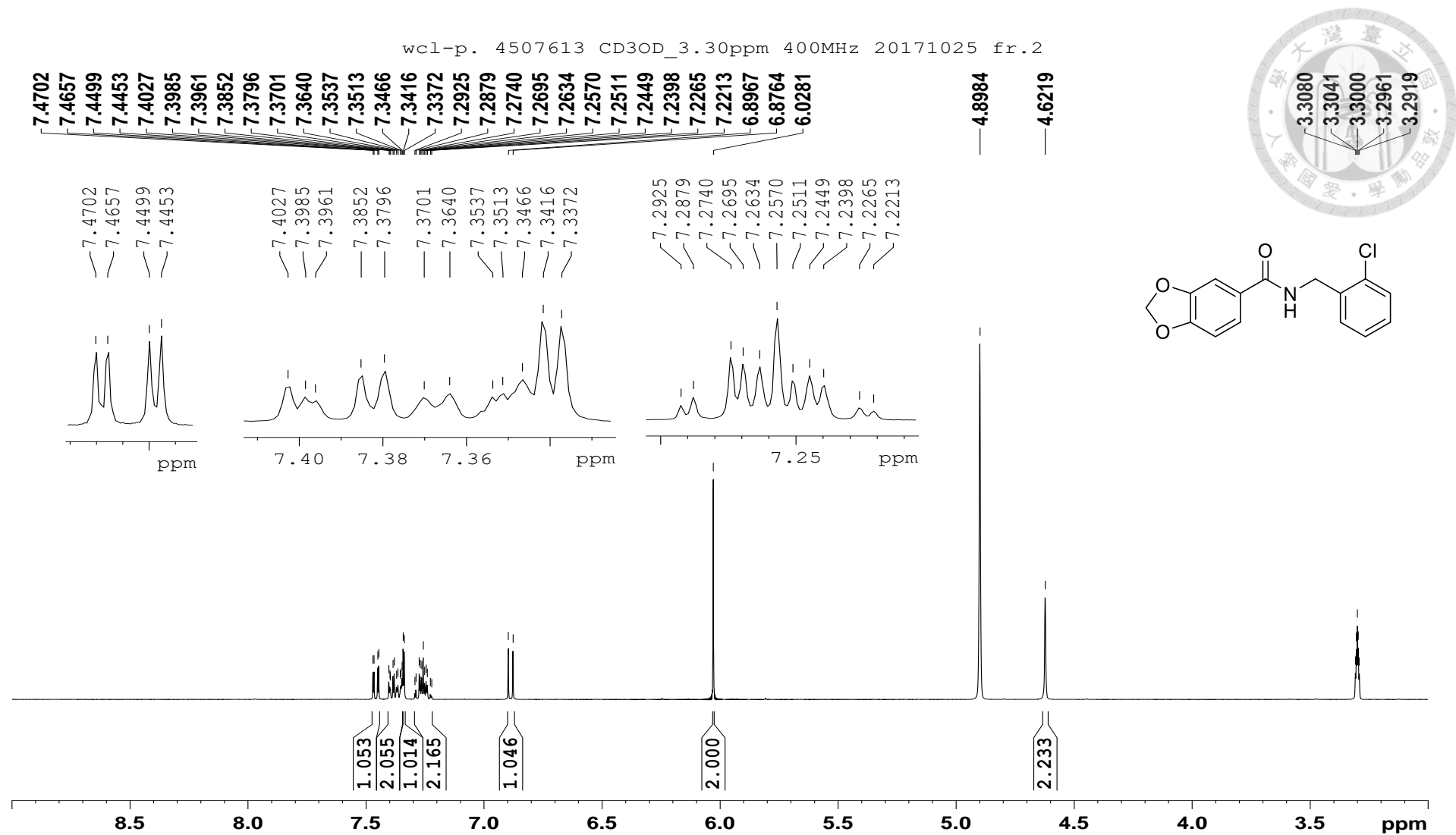
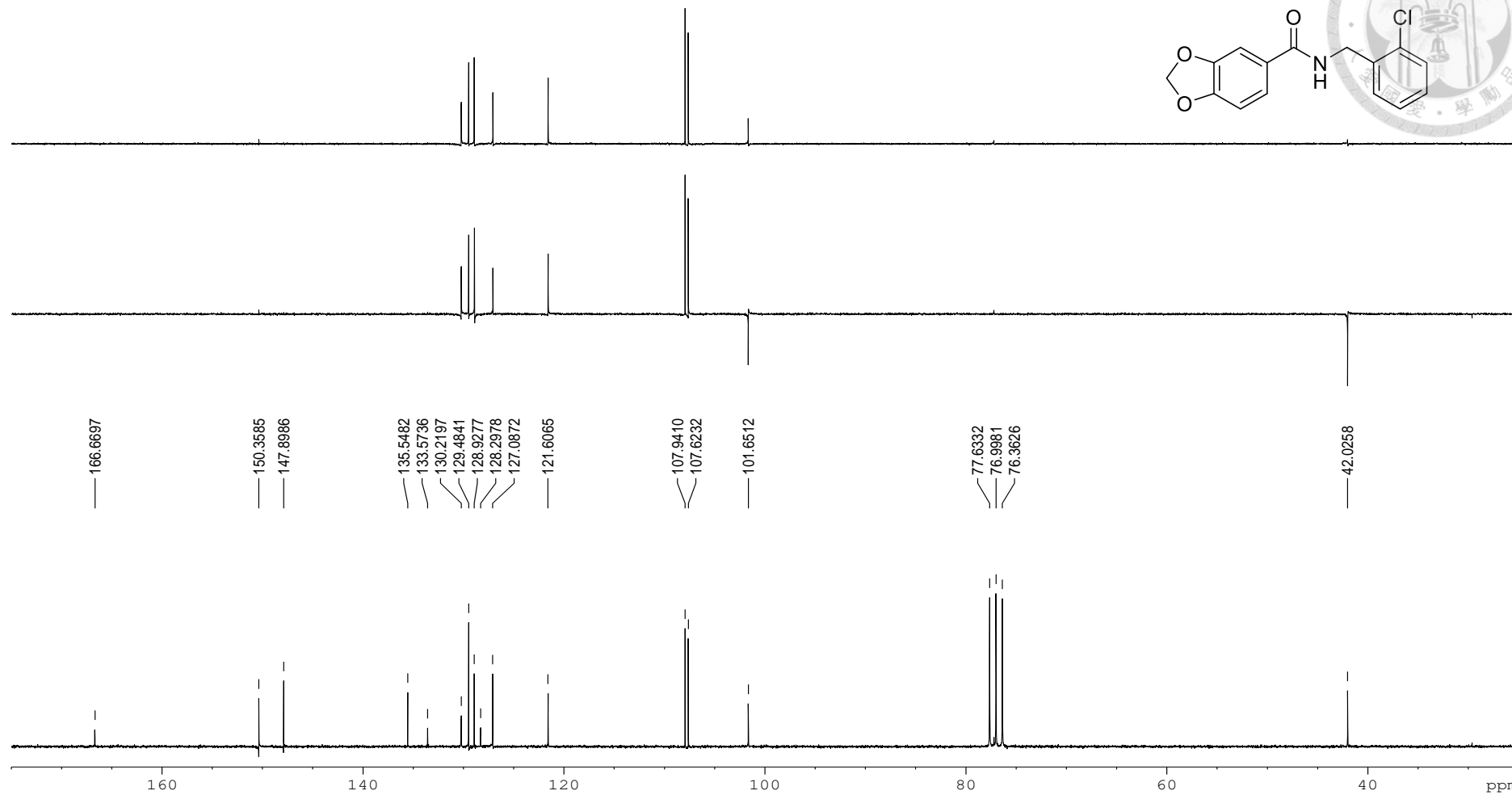
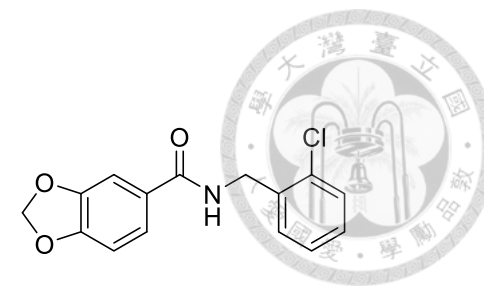


Figure S28. <sup>1</sup>H NMR spectrum of **6b** (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz)

wc1-p. 4507613 CDC13\_77.0ppm 200MHz 20170411 fr.2



**Figure S29.** <sup>13</sup>C NMR spectrum (DEPT-90, top; DEPT-135, middle; BBD, bottom) of **6b** (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz)

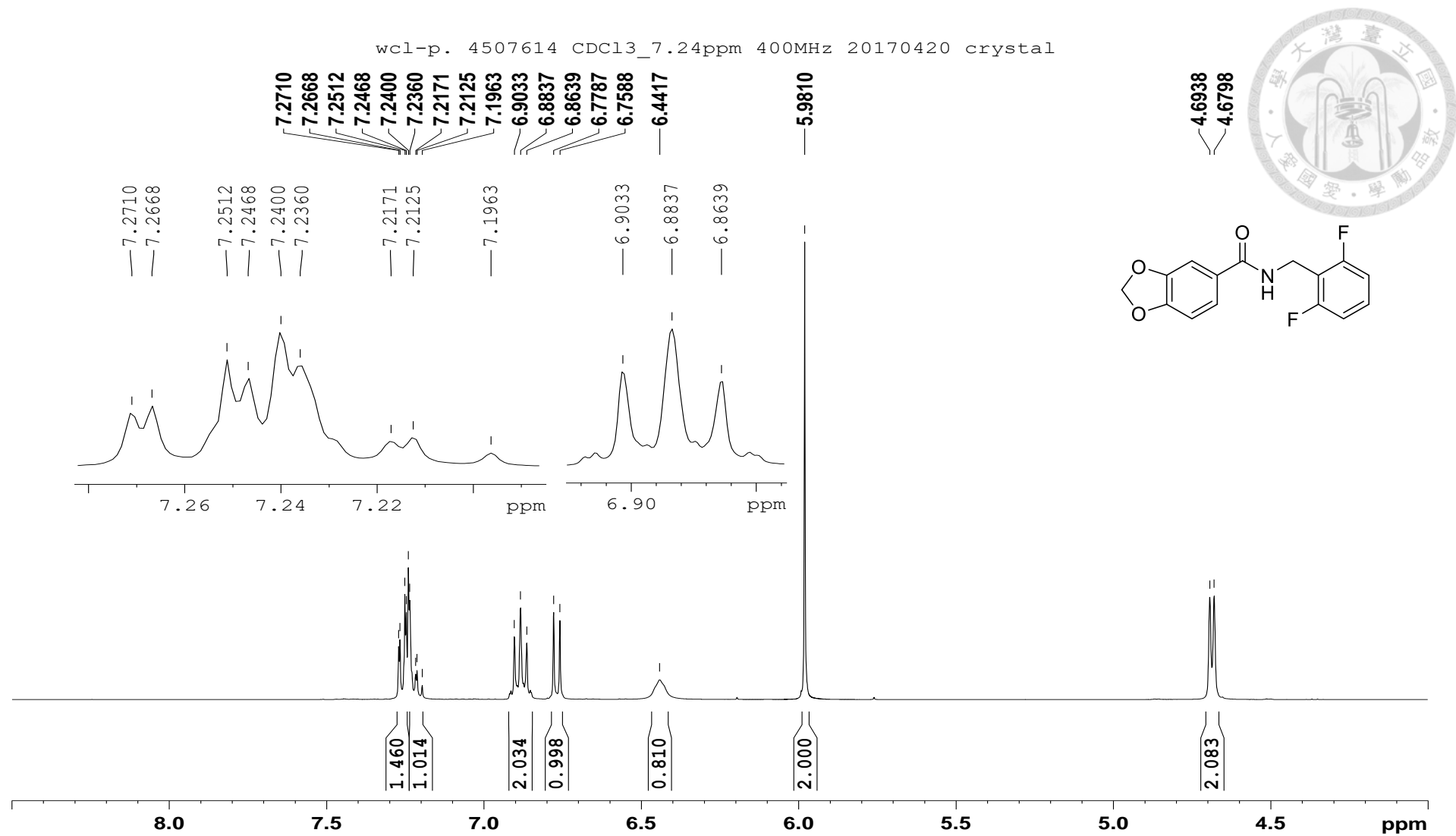


Figure S30. <sup>1</sup>H NMR spectrum of **6c** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

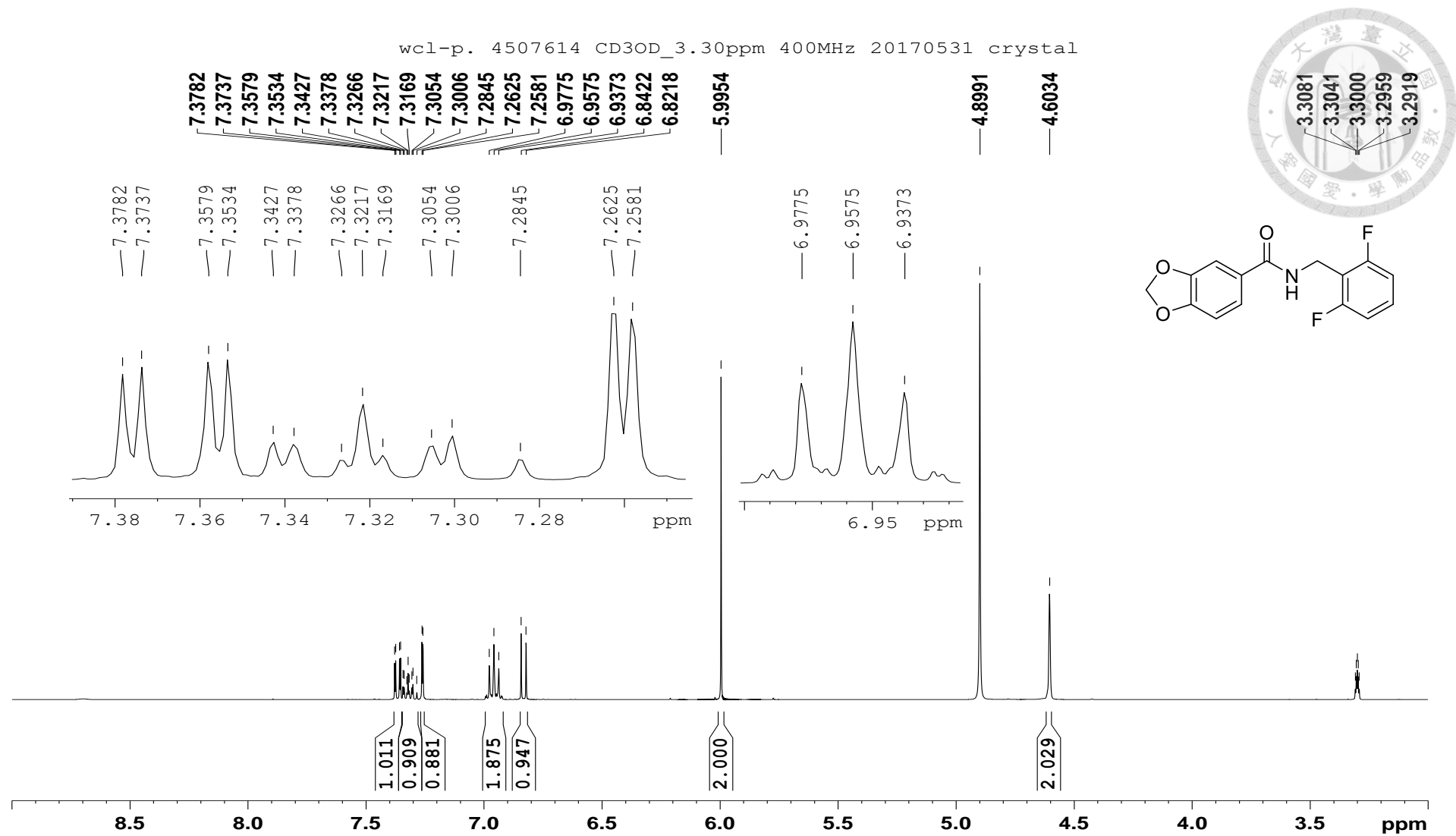


Figure S31. <sup>1</sup>H NMR spectrum of **6c** (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz)





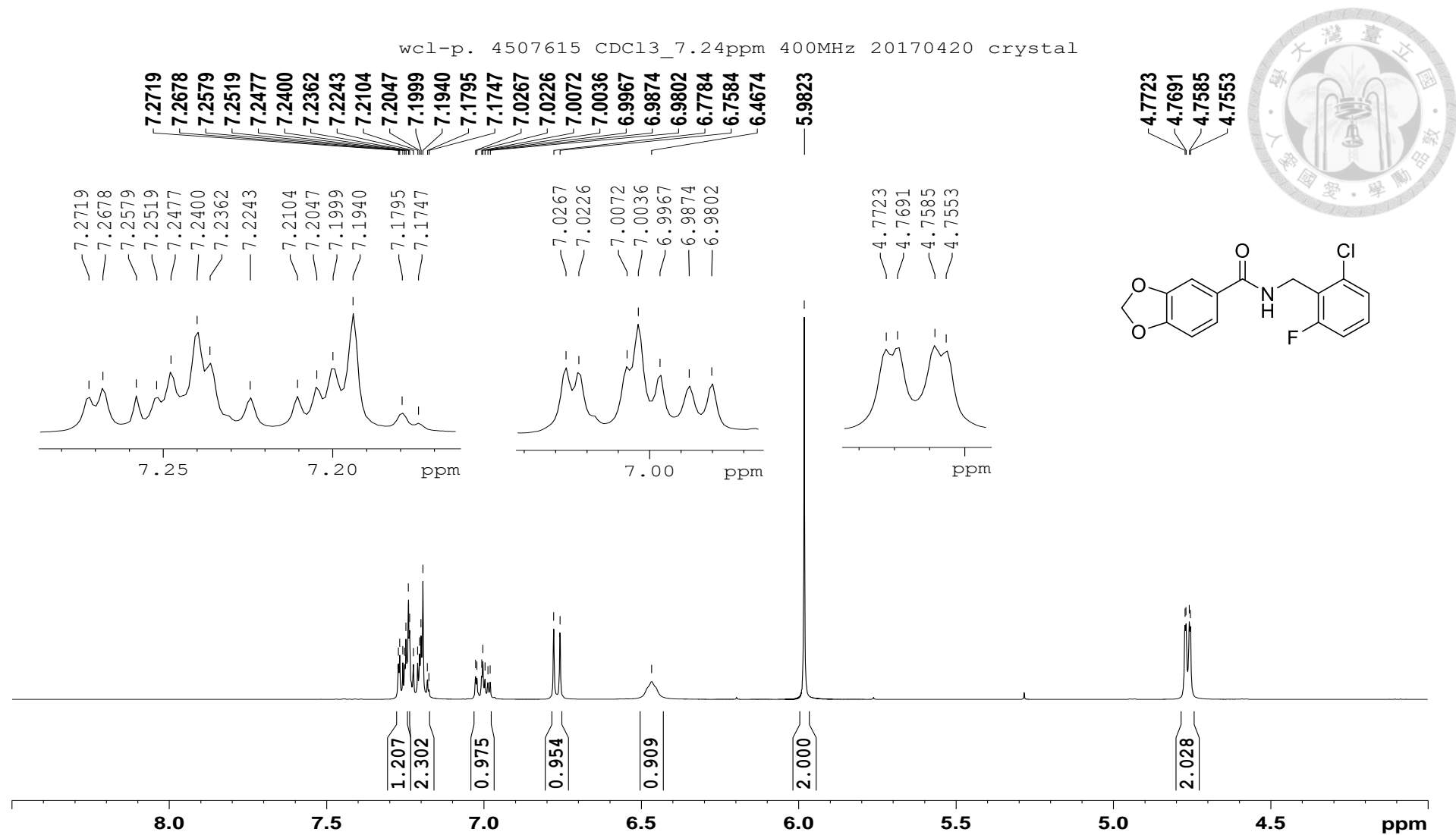


Figure S33. <sup>1</sup>H NMR spectrum of **6d** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

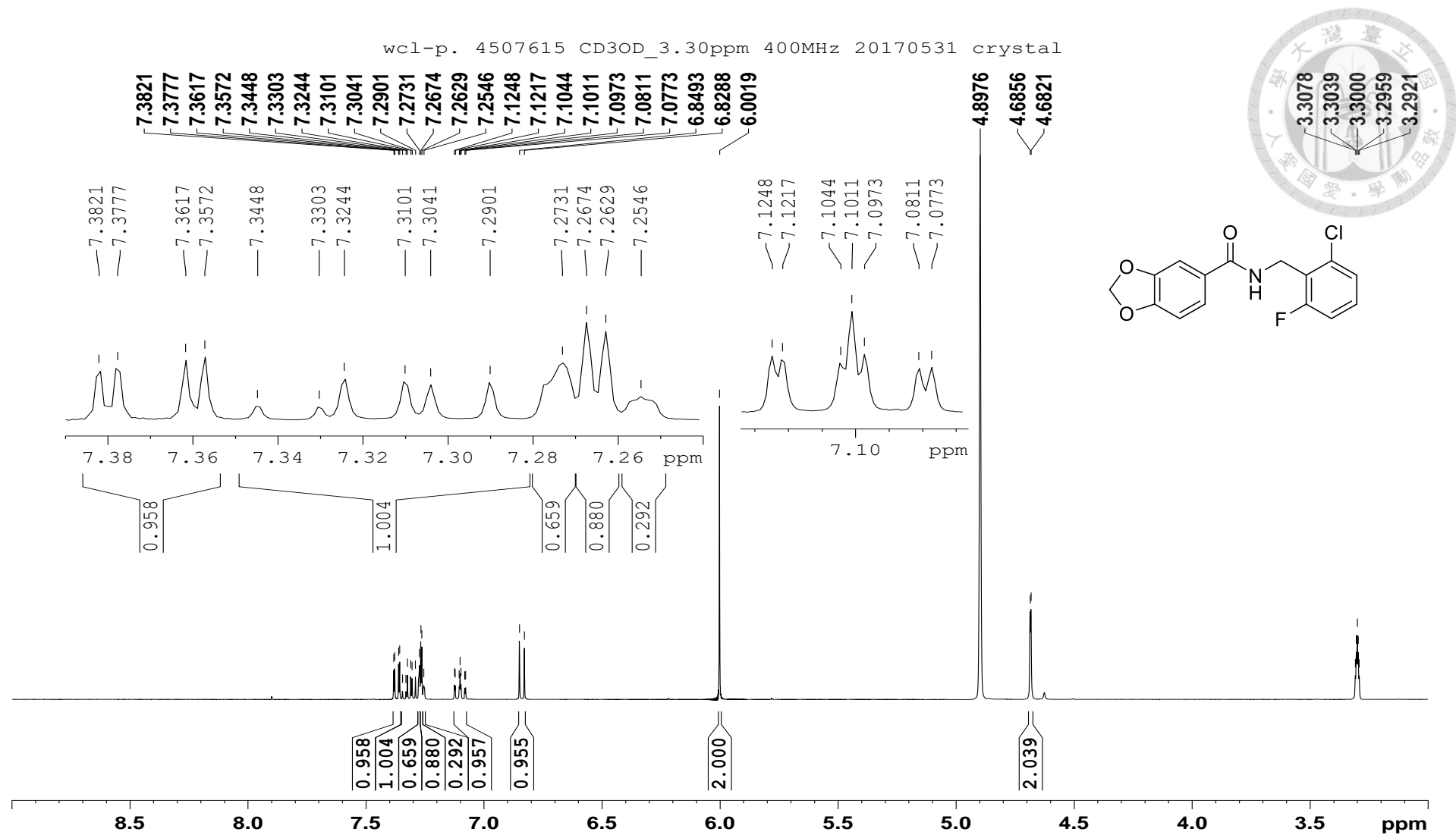


Figure S34. <sup>1</sup>H NMR spectrum of **6d** (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz)

wc1-p. 4507615 CDCl3\_77.0ppm 200MHz 20170420 crystal

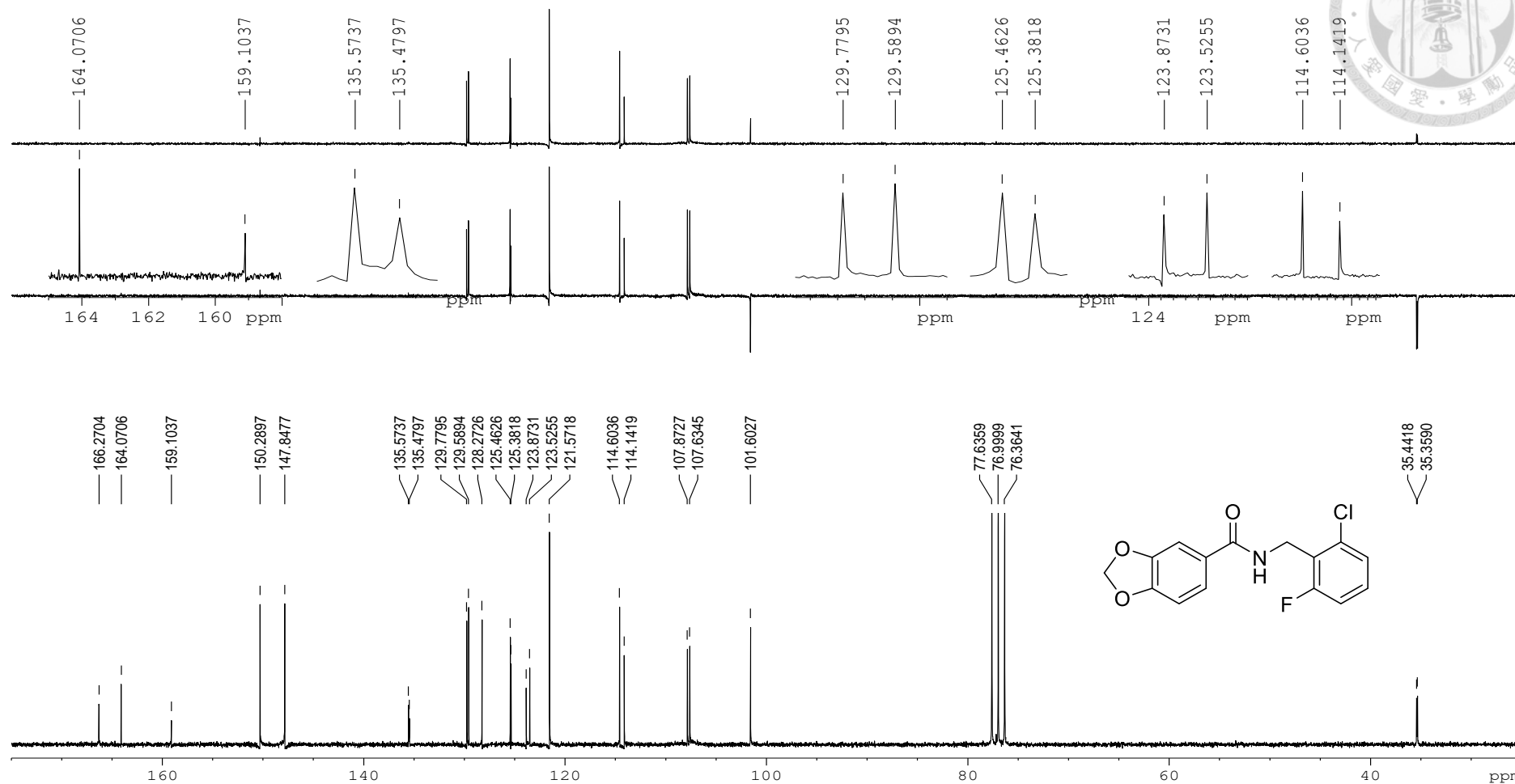


Figure S35.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum (DEPT-90, top; DEPT-135, middle; BBD, bottom) of **6d** ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)

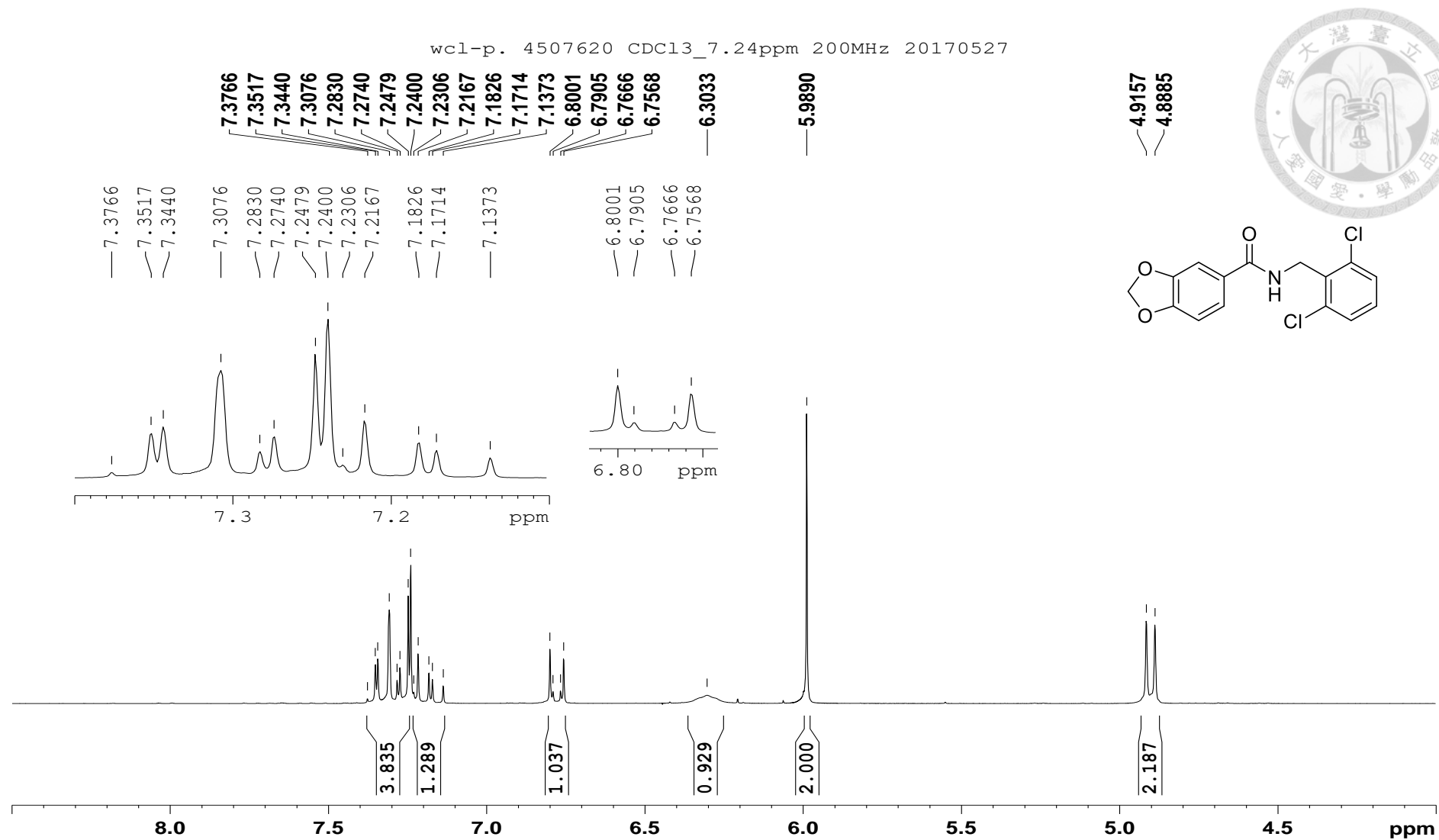


Figure S36. <sup>1</sup>H NMR spectrum of **6e** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

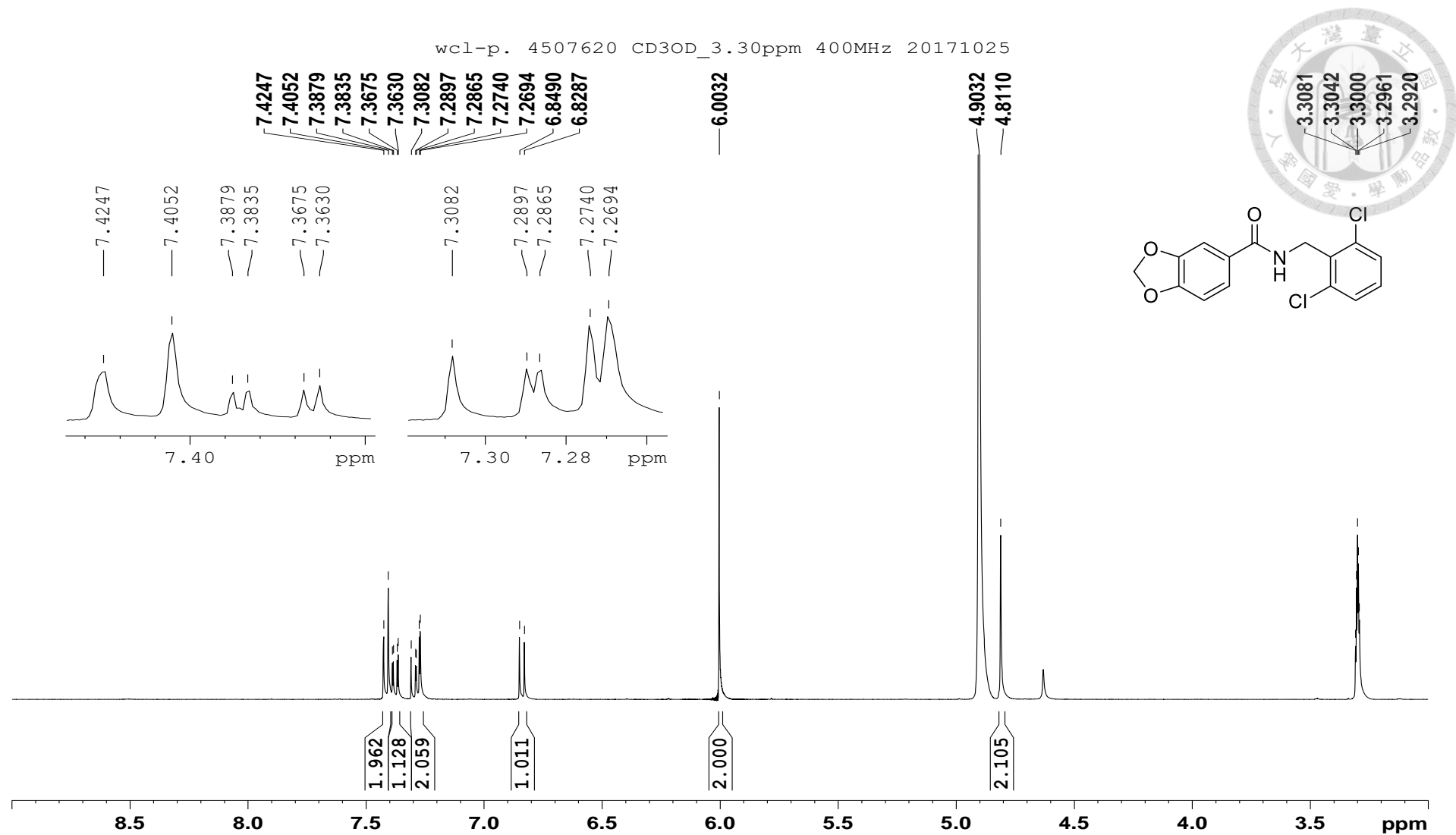


Figure S37.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **6e** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)

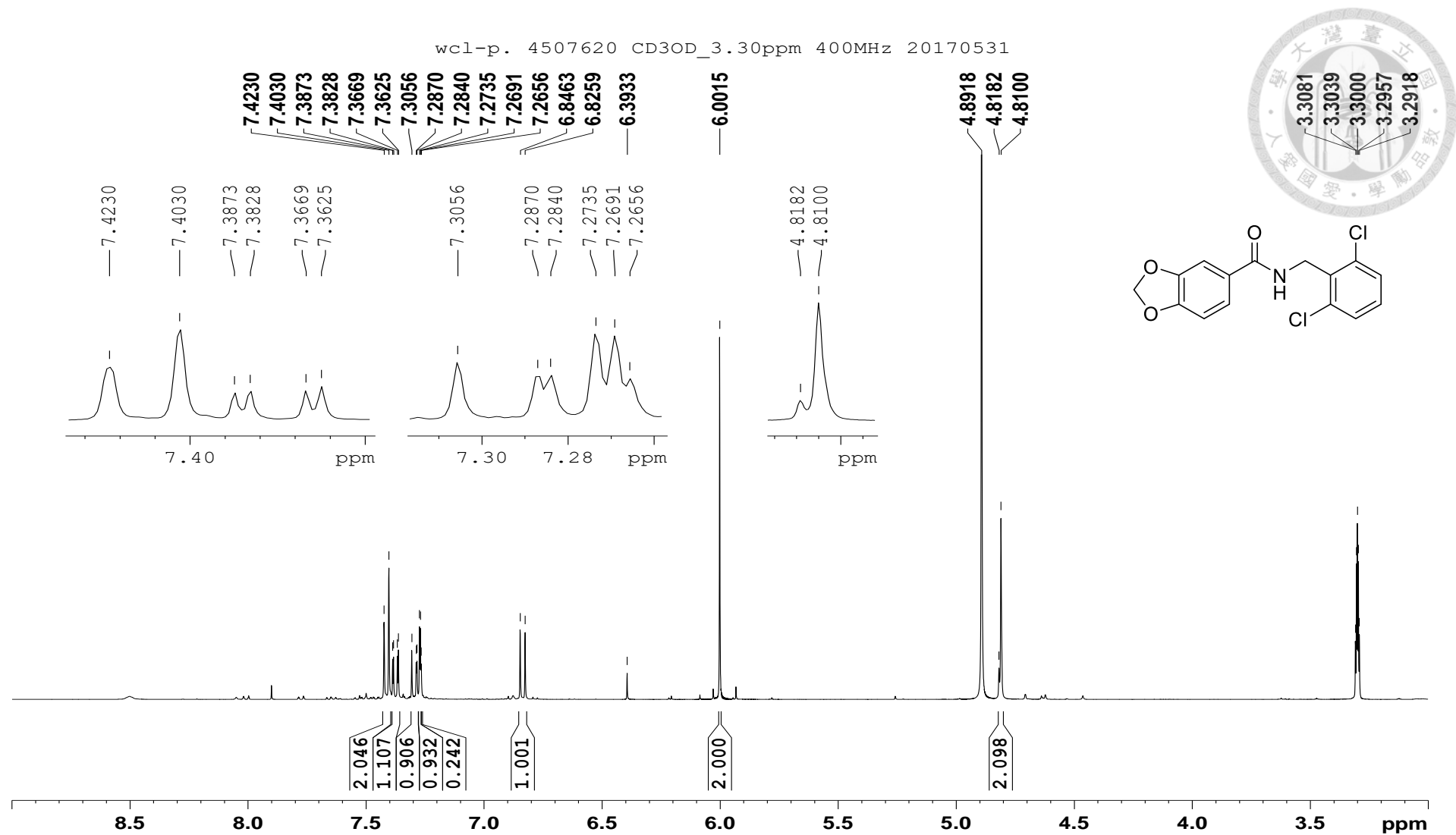
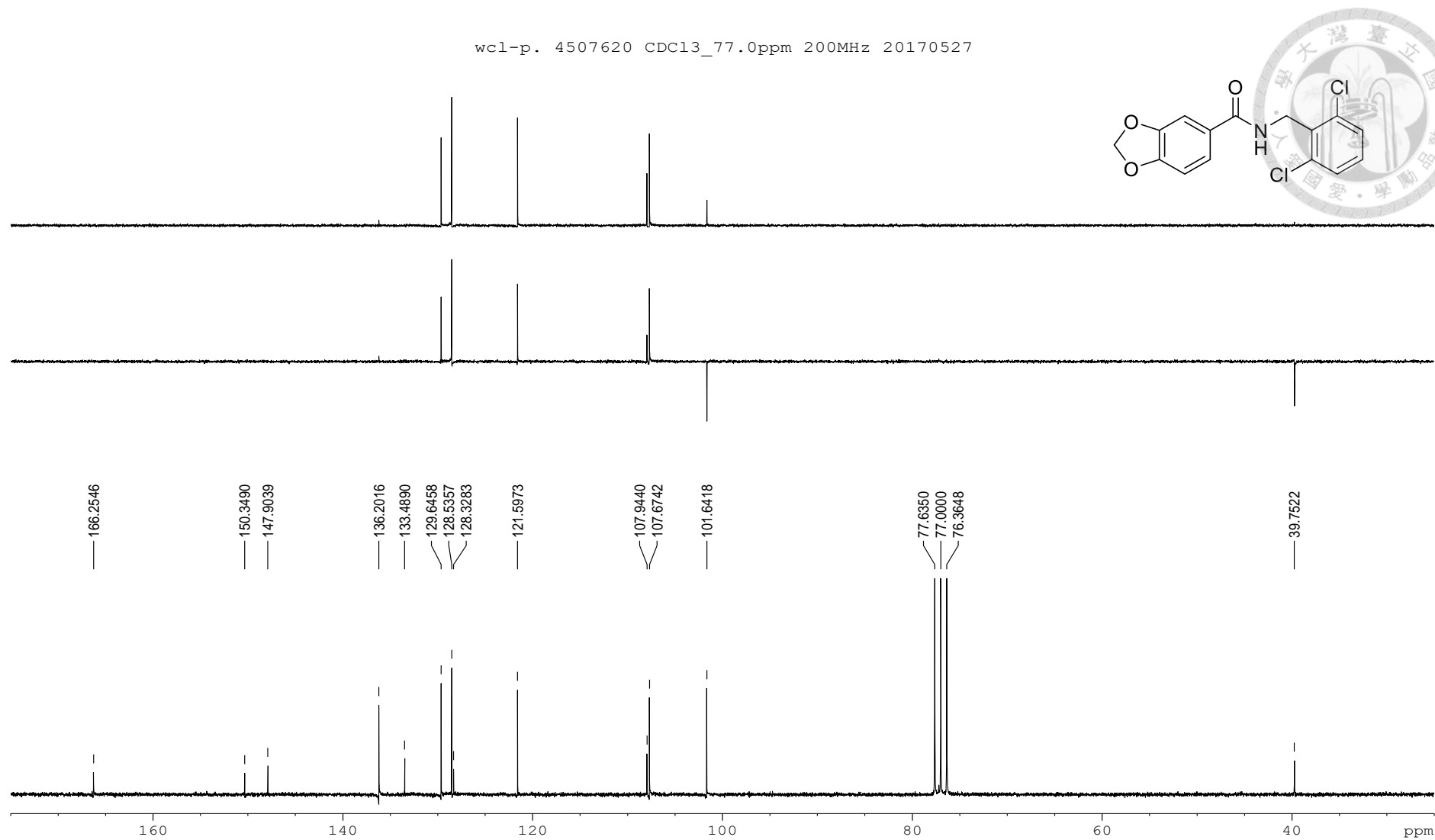


Figure S38. Supporting  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **6e** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)

wc1-p. 4507620 CDC13\_77.0ppm 200MHz 20170527



**Figure S39.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum (DEPT-90, top; DEPT-135, middle; BBD, bottom) of **6e** ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)



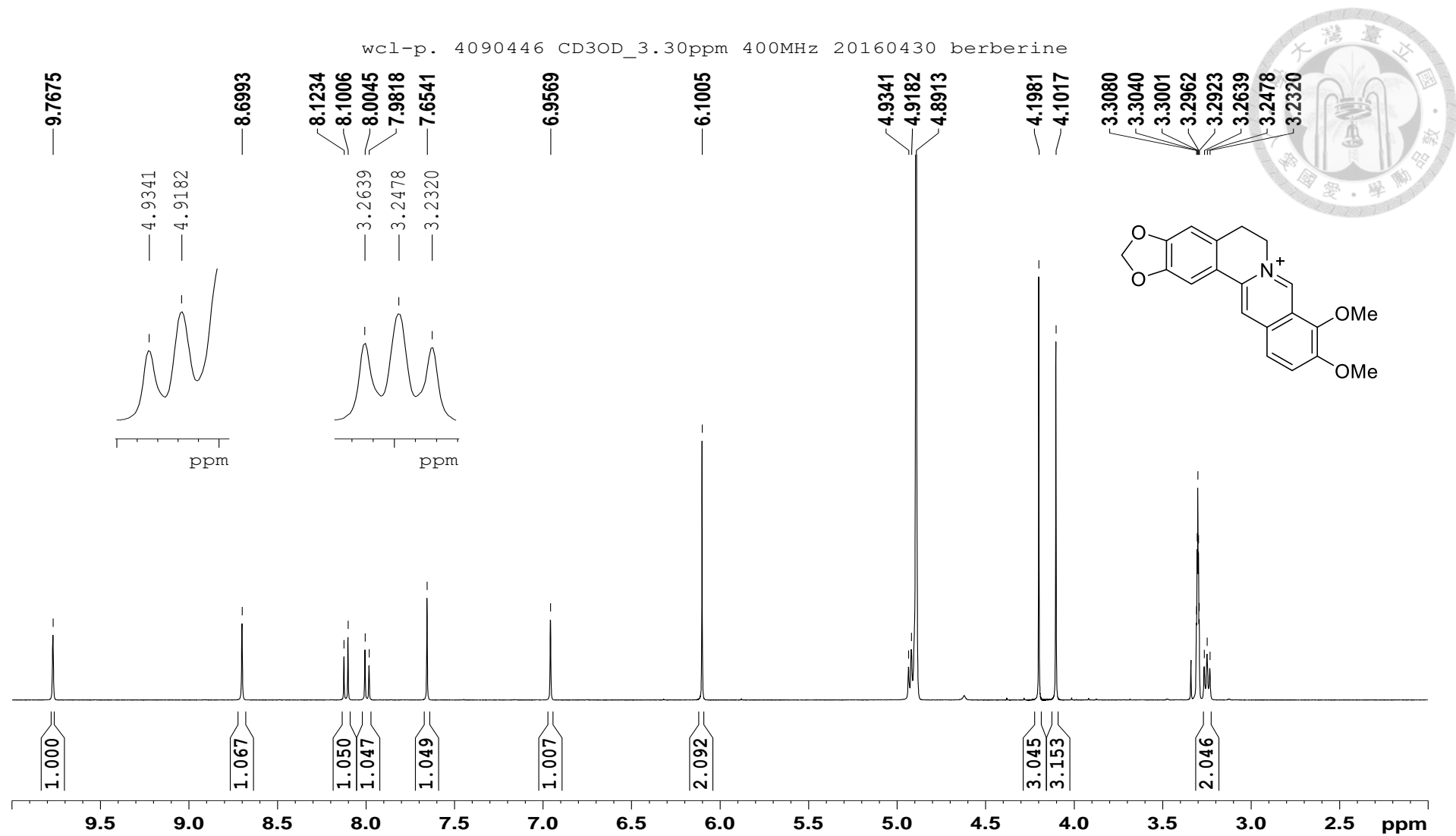


Figure S40.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 7 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

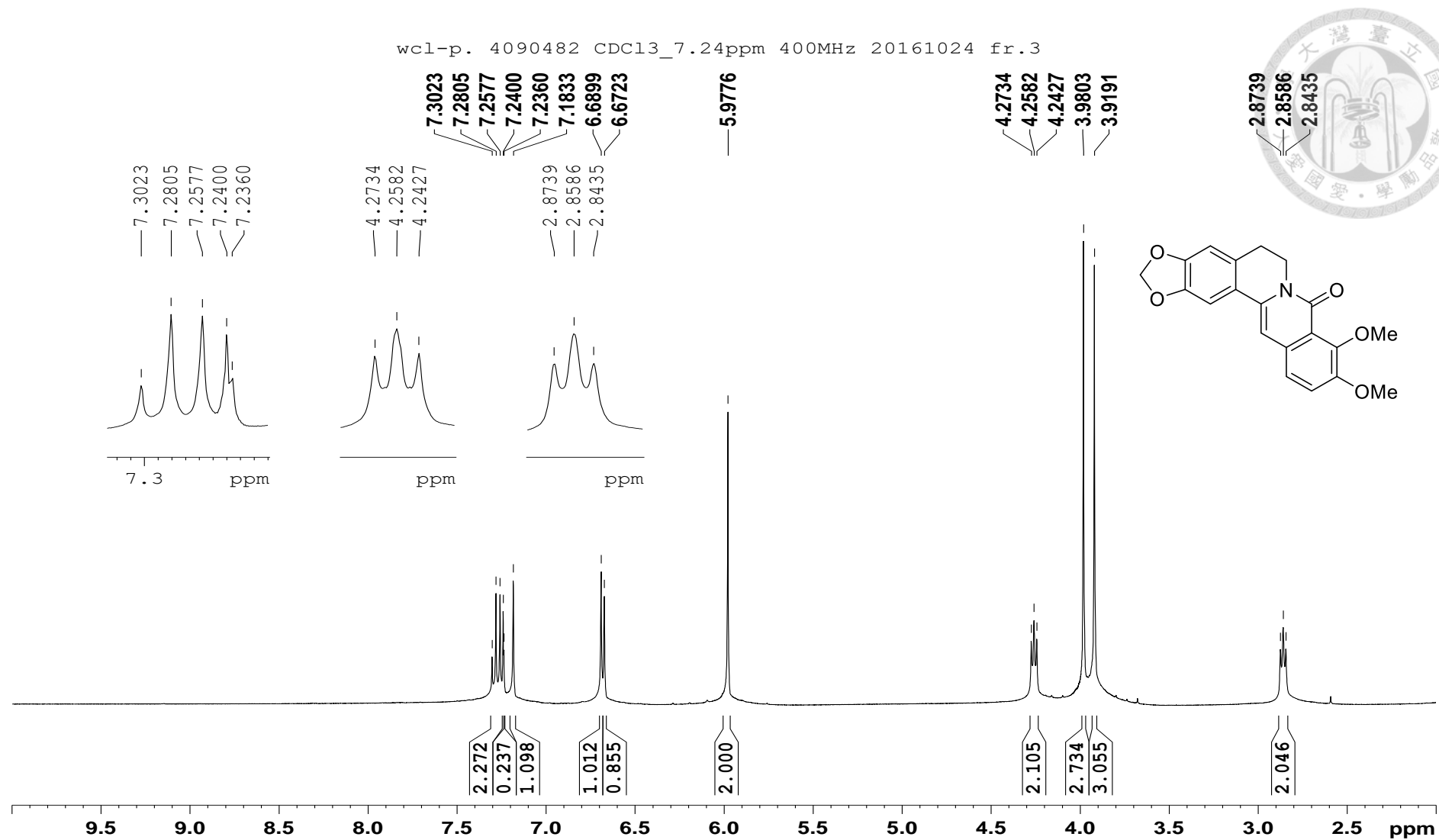
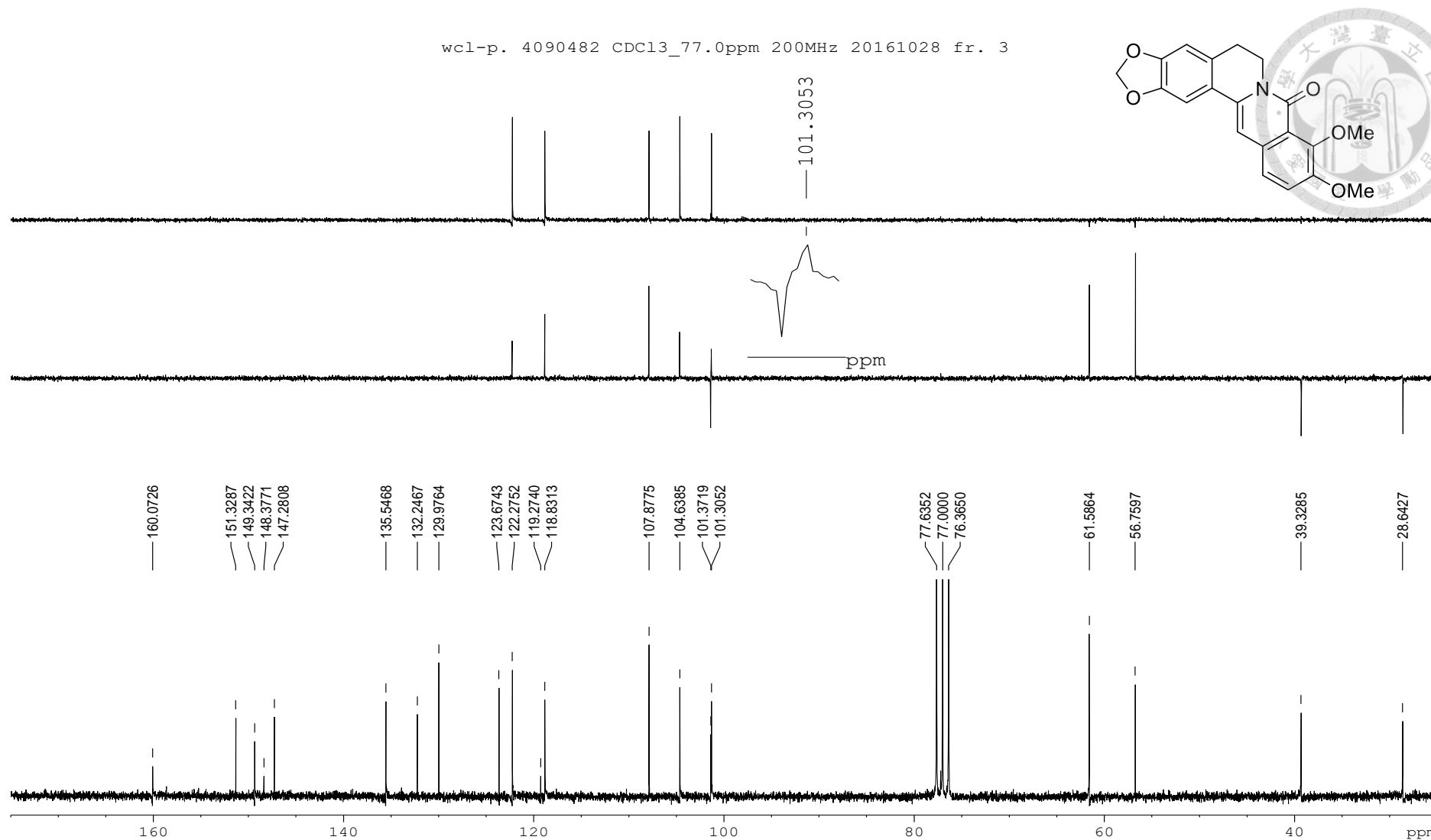


Figure S41. <sup>1</sup>H NMR spectrum of **8** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

wcl-p. 4090482 CDCl3\_77.0ppm 200MHz 20161028 fr. 3



**Figure S42.** <sup>13</sup>C NMR spectrum (DEPT-90, top; DEPT-135, middle; BBD, bottom) of **8** (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz)

wcl-p. 4090488 CDCl3\_7.24ppm 400MHz 20161107 fr.3

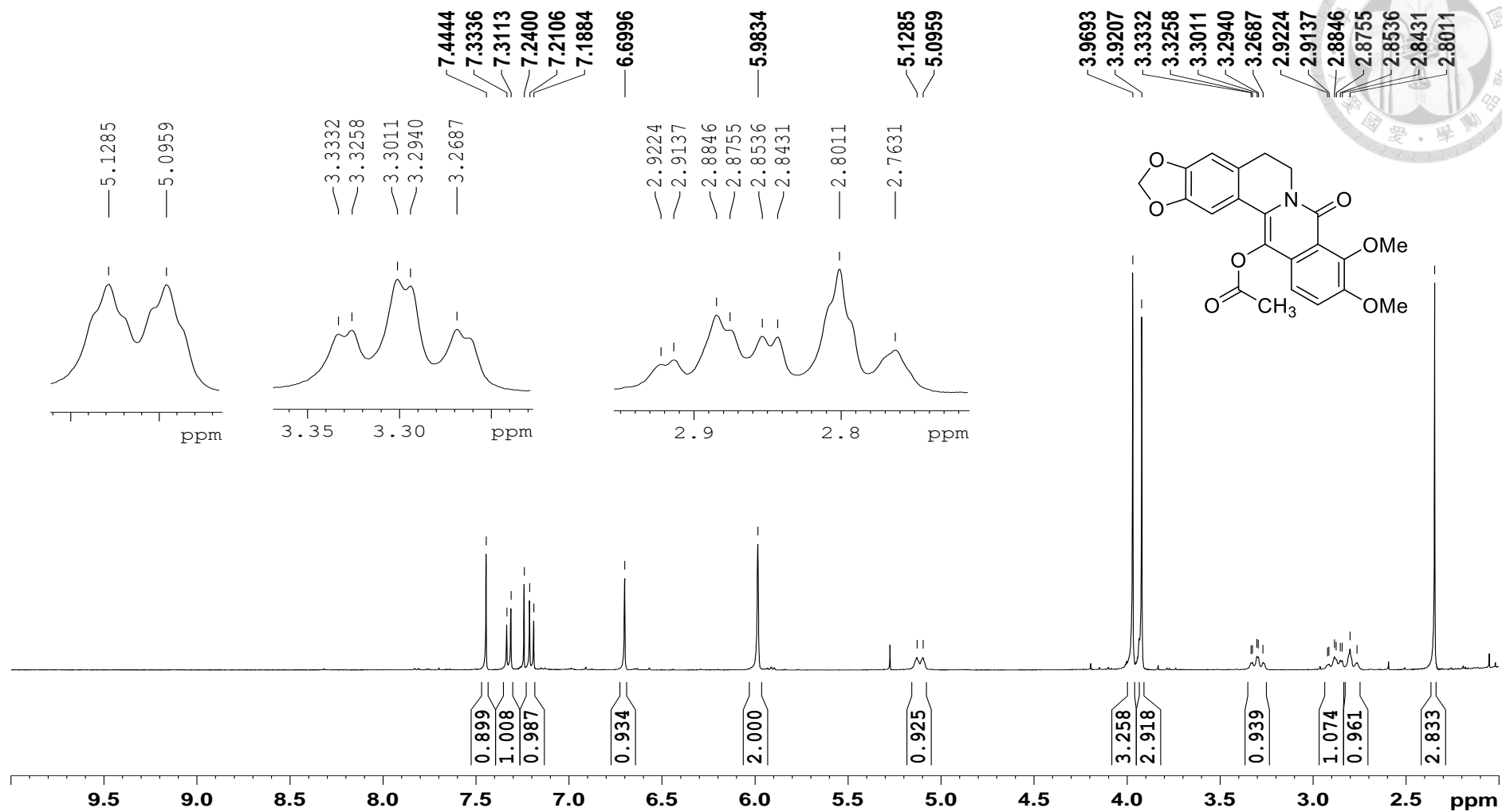


Figure S43.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **9** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

wcl-p. 4090488 CDC13\_77.0ppm 200MHz 20161107 fr.3

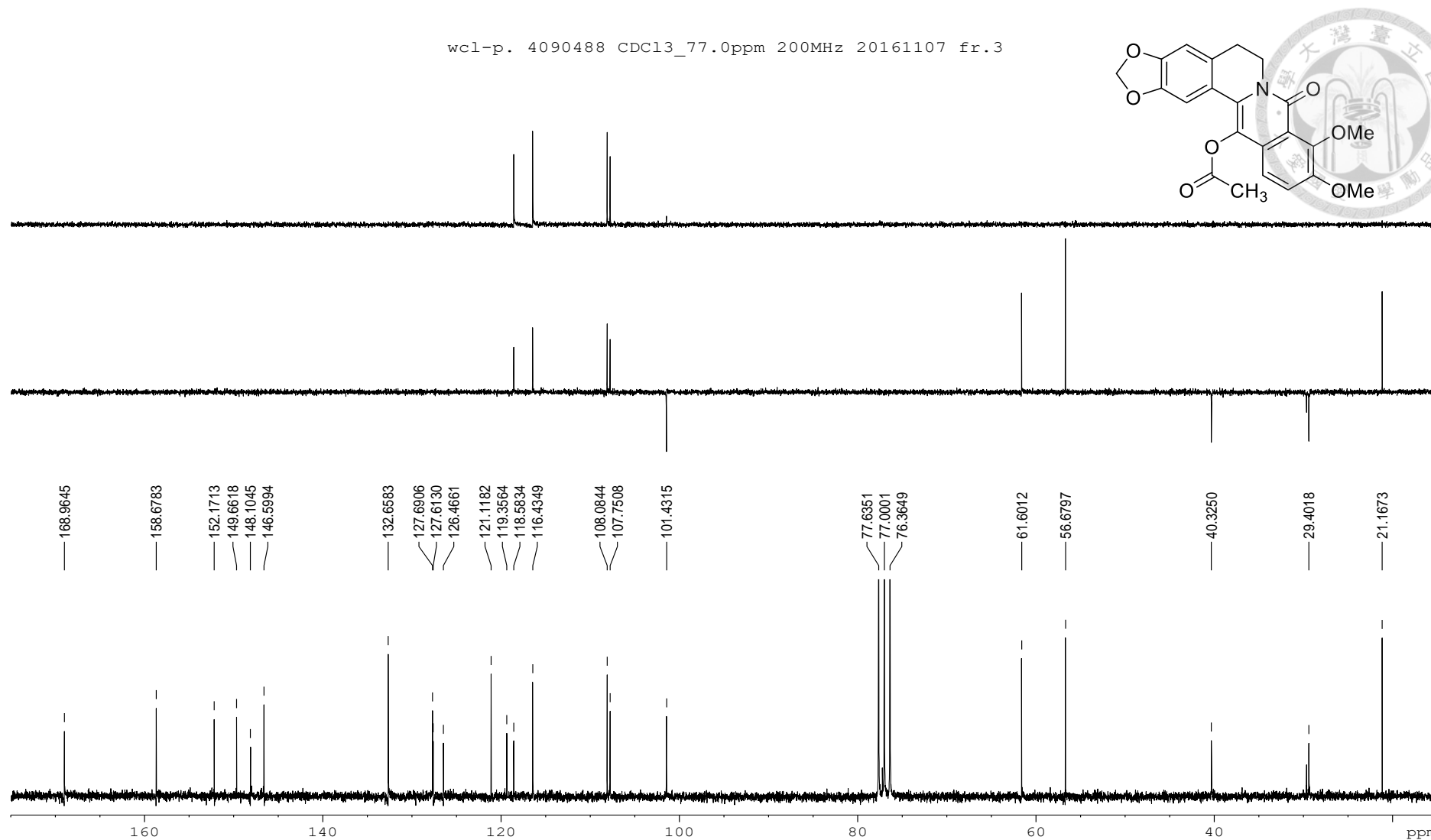


Figure S44. <sup>13</sup>C NMR spectrum (DEPT-90, top; DEPT-135, middle; BBD, bottom) of **9** (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz)

wcl-p. 4090499-3 CDCl<sub>3</sub>\_7.24ppm 200MHz 20170106 fr. 1

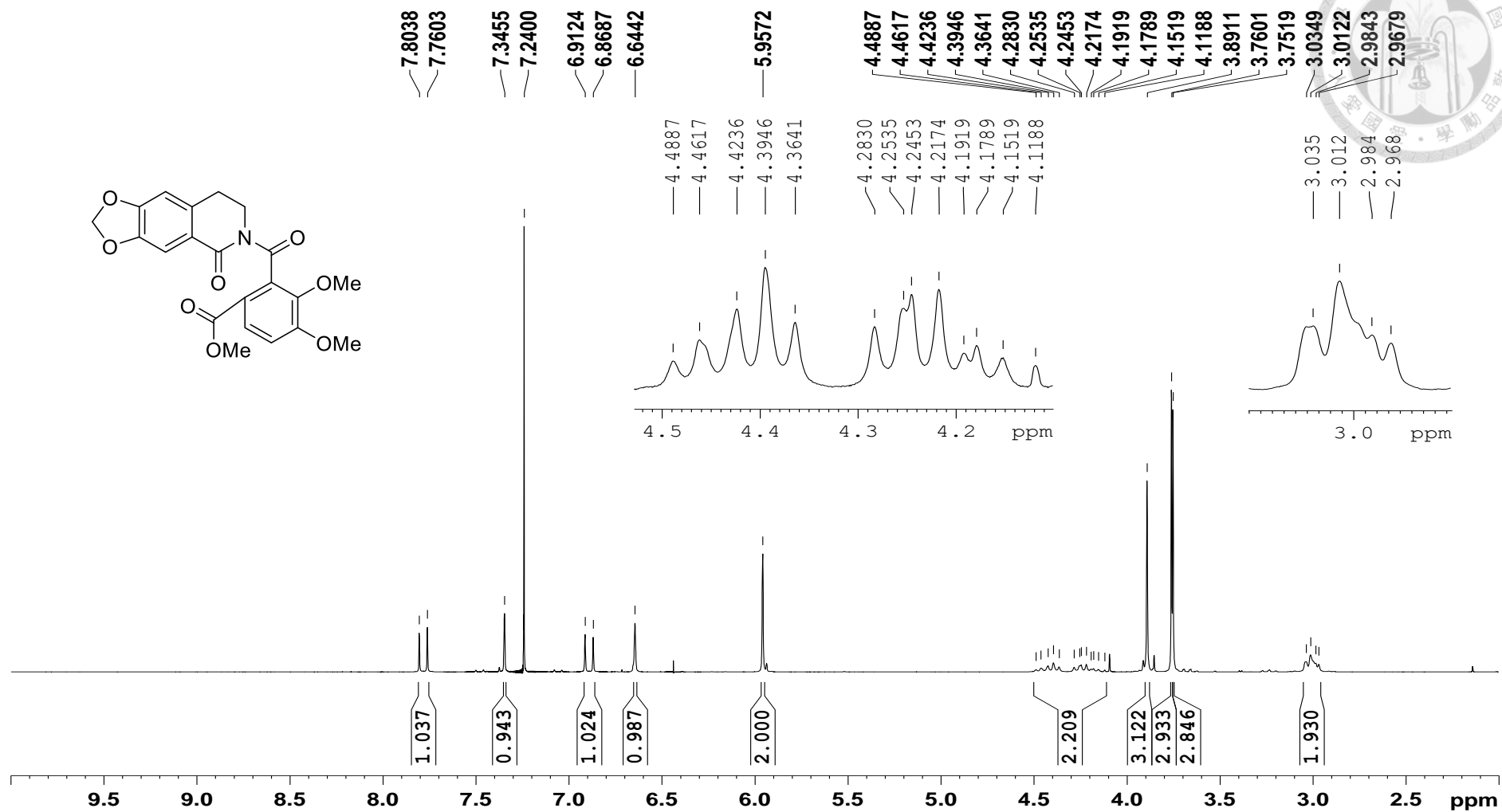
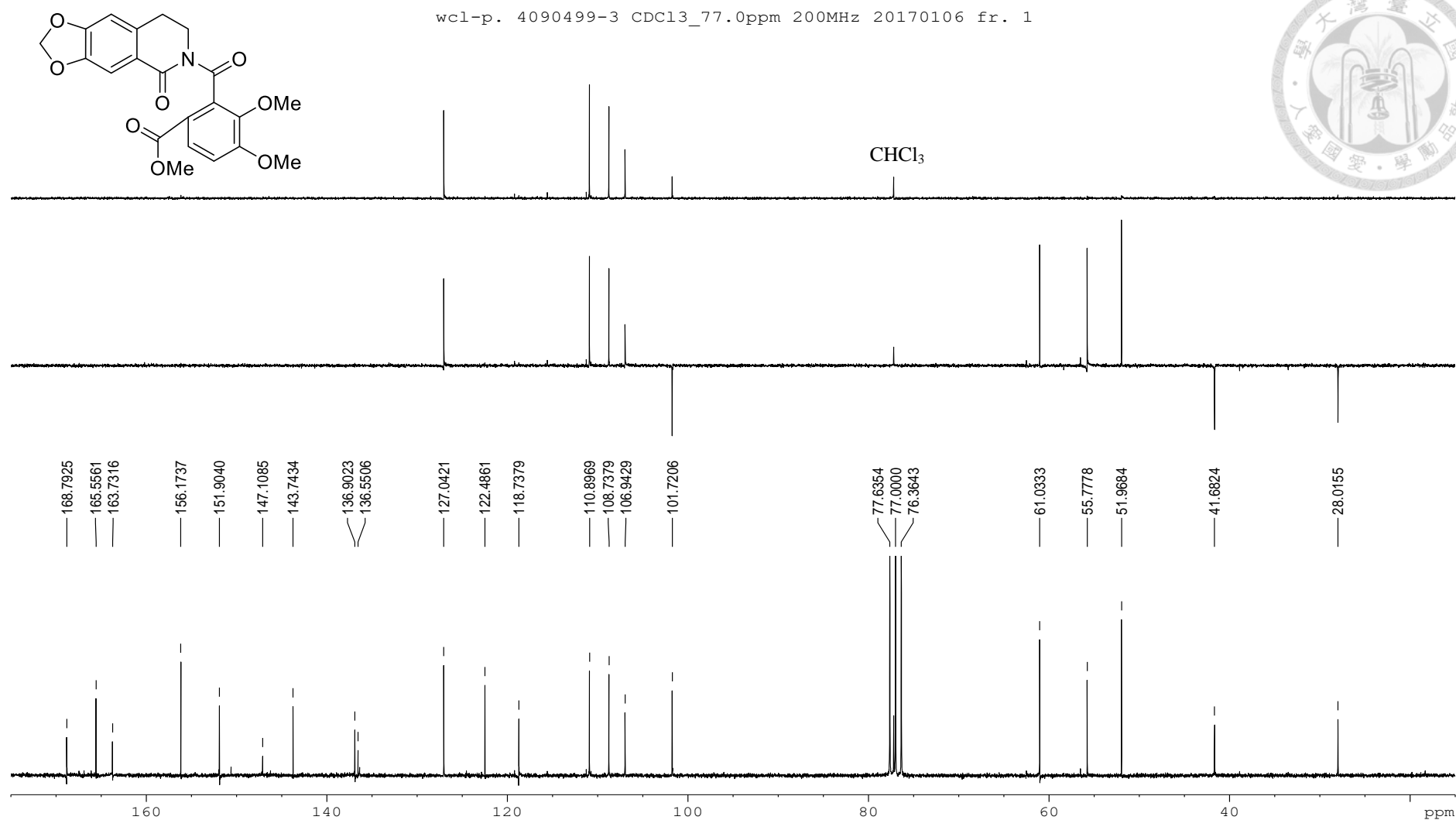


Figure S45. <sup>1</sup>H NMR spectrum of **10** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)



**Figure S46.** <sup>13</sup>C NMR spectrum (DEPT-90, top; DEPT-135, middle; BBD, bottom) of **10** (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz)