

美和科技大學

107 年度教師專題研究計畫 結案報告

總計畫名稱：

探討五爪金英之天然物抑制第二型 DENV NS2B-NS3 蛋白

Study for the mechanism of natural products isolated from *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray as dengue virus-2 NS2B-NS3 protease inhibitors

計畫編號：MH- - -

計畫期間：107.01.01.~107.12.31.

計畫主持人：林昀生 副教授

共同主持人：李景欽 教授

研究助理：

經費總額：50,000 元

實際支用金額：50,000 元

經費來源：107 年度教育部獎補助款

中文摘要：

2015 年，根據衛福部疾管署統計，台灣南部地區感染登革熱人數約 4 萬餘人，2 百多人因此而死亡。目前在預防及治療登革熱策略上，除了 2015 年 12 月墨西哥與菲律賓核准上市四價登革熱疫苗(Dengvaxia)之外，並無特殊藥物治療，因此從動、植物與菌類的二次代謝物篩選天然先導物，並結合藥理作用、結構修飾、化學合成、臨床試驗，開發治療抗登革熱藥物為刻不容緩之事。登革熱病毒(Dengue DENV)為造成登革熱之病原體，其在產生蛋白質的過程，會先產生單一個蛋白質轉譯區，再切割成十個獨立的蛋白質，包含三個結構蛋白(structural proteins): core protein, envelope protein 和 membrane protein、和七個非結構蛋白(non-structural proteins): NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 及 NS5。目前已知只有 NS2B 蛋白會參與蛋白質切割酶反應，為了找尋和發展新藥，本研究計畫中，我們以抑制 NS2B 蛋白為生物活性篩選導向，從台灣五爪金英 *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray 中分離出八個天然物，其中化合物 A (1) 為新的植物萜類天然物；以及五個已知的萜類化合物 Tagitinin A (2)、Tagitinin C (3)、Tagitinin F (4)、 $4\beta, 10\beta$ -dihydroxy-3-oxo- 8β -isobutyroyloxyguaia-11(13)-en-6,12-olide (5)、Tagitinin G (6)；和兩個 caffeoylquinic acid 骨架之天然物分別是 3,5-dicaffeoylquinic acid (7)、methyl 3,5-dicaffeoylquinic acid (8)。在活性試驗中，針對人類肝癌細胞株 Huh-7，以登革熱第二型(strain 16681) 病毒感染 2 小時後移除病毒液，加入從台灣產五爪金英所分離得到之化合物進行抗病毒測試，初步發現化合物 A (1)、Tagitinin C (3) 分別於 $EC_{50}=0.749 \pm 0.014$ 、 0.764 ± 0.046 時，在濃度為 $1 \mu M$ 時，對 NS2B 蛋白分別具 62%、61% 的抑制率；在濃度為 $0.25 \mu M$ 時，對 NS2B 蛋白分別具 32%、28% 的抑制率、 $4\beta, 10\beta$ -dihydroxy-3-oxo- 8β -isobutyroyloxyguaia-11(13)-en-6,12-olide (5) 於 $EC_{50}=6.602 \pm 1.263$ 時，在濃度為 $5 \mu M$ 時，對 NS2B 蛋白具 34% 的抑制率；在濃度為 $1 \mu M$ 時，對 NS2B 蛋白具 22% 的抑制率。本計畫針對台灣產五爪金英進行有效成分之分離與結構鑑定工作，並進一步研究結構與 DENV3 NS2B-NS3 結合位點，推測化學結構與活性之關係(Structure-Activity Relationship)，評估其結構活性中心，並透過合作關係，探求其活性成分抗登革熱的分子機制，並規劃未來進行動物試驗，希冀本研究將對台灣抗登革熱藥物開發有所助益。

關鍵詞：登革熱病毒(Dengue DENV)、台灣產五爪金英(*Tithonia diversifolia*)、NS2B-NS3 protease

英文摘要

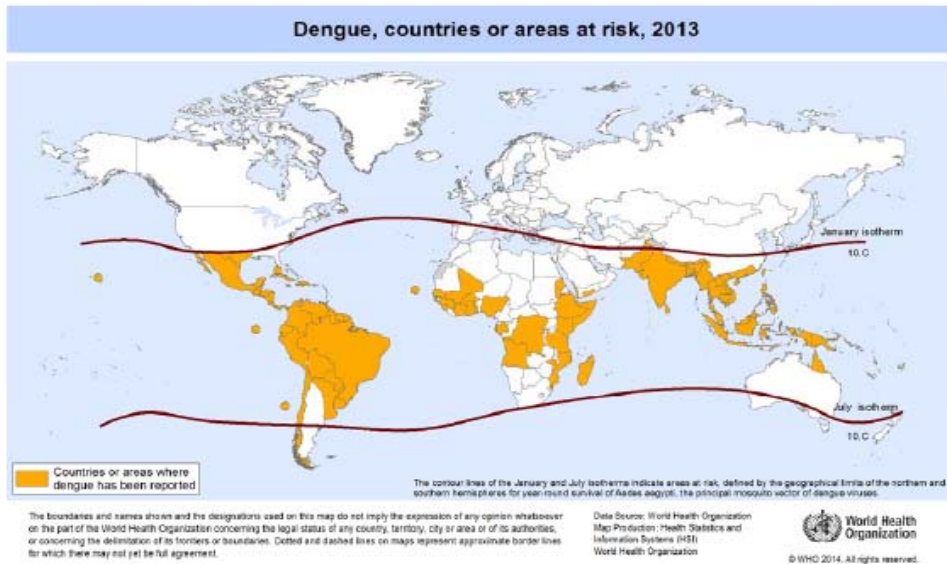
In 2015, according to the Ministry of Health, Welfare CDC statistics, about 40,000 people infected with dengue in southern Taiwan, more than 200 people died. Currently in strategy on the prevention and treatment of dengue fever, in addition in December 2015, Mexico and the Philippines approved for sale tetravalent dengue vaccine (Dengvaxia), no special medical treatment. Therefore, the secondary metabolites isolated from animals, plants and fungi natural lead compound, combined with pharmacological effects, structural modification, chemical synthesis, clinical trials, the development of anti-dengue drugs for the treatment of urgent things. Dengue virus (Dengue DENV) is caused by a pathogen of dengue fever, which in the process of producing a protein, will produce a single protein untranslated region, and then cut into ten separate proteins, it contains three structural proteins (structural proteins): core protein, envelope protein and membrane protein, and seven non-structural proteins (non-structural proteins): NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5. Currently it is known only NS2B be involved in protein cleaving enzyme reaction. In order to

find and develop new drugs, this research project, we have screening biological activity oriented to inhibit NS2B protein. At the present, six natural compounds were isolated from *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. Among them, compound A (1) is a new plant natural product; and five known terpenoids, Tagitinin A (2)、Tagitinin C (3)、Tagitinin F (4)、4 β ,10 β -dihydroxy-3-oxo-8 β -isobutyroyloxyguaia-11(13)-en-6,12-olide (5)、Tagitinin G (6); and the natural products of the two caffeoylquinic acid skeletons are 3,5- Dicafeoylquinic acid (7), methyl 3,5-dicafeoylquinic acid (8). In the antiviral activity test, the human hepatoma cell line Huh-7 was infected with dengue virus type 2 (strain 16681) for 2 hours. The virus solution is then removed. Compound A (1) and Tagitinin C (3) were found to be 62 % and 61 % inhibition rate of NS2B protein respectively when the concentration was 1 μ M and under EC₅₀ = 0.749 \pm 0.014 and 0.764 \pm 0.046, respectively. At the concentration of 0.25 μ M, the inhibitory rate of NS2B protein was 32 % and 28 % respectively. 4 β ,10 β -dihydroxy-3-oxo-8 β -isobutyroyloxyguaia-11(13)-en- 6,12-olide (5) were found to be 34 % inhibition rate of NS2B protein, when the concentration was 5 μ M and under EC₅₀ = 6.602 \pm 1.263. At the concentration of 1 μ M, the inhibitory rate of NS2B protein was 22 %. In this plan, we want to separate active ingredient and identify chemical structure from *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. And further prepared into various derivatives, research on Structure-Activity Relationship, assess their structure-activity center, and through partnership, to explore the molecular mechanism of the active ingredient. And plan animal testing, hope this research for drug development against dengue helpful.

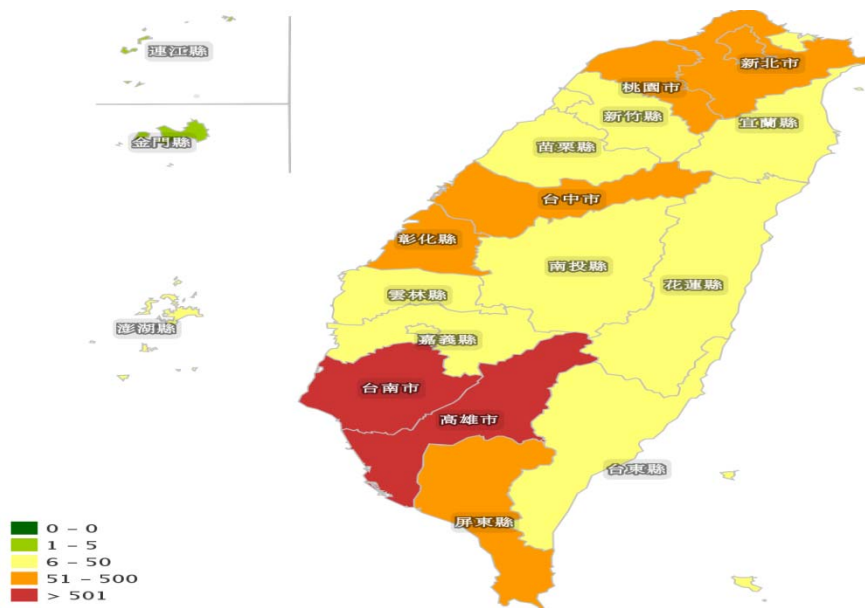
Keywords: Dengue virus, *Tithonia diversifolia*, NS2B-NS3 protease

前言

登革熱(Dengue fever) 是由登革病毒所引起的急性傳染病，這種登革病毒會藉由蚊子傳播給人類，而引起嚴重的高燒及肌肉疼痛，猶如裂骨一般，又俗稱「斷骨熱」或「天狗熱」；好發在有埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*) 和白線斑蚊 (*Aedes albopictus*) 分布的熱帶、亞熱帶等國家 (Monath, 1994)，(圖一)，為目前世界上廣為蔓延的疾病之一。全球的發病率，估計約128個國家中有25億人生活於疫區，或處於感染登革熱病毒的風險，隨著國與國之間相互流通與往返頻繁，台灣病例由境外移入的趨勢也有明顯上升(圖二)(衛福部疾管局，2015)。而在全世界每年估計有5千萬~1億人遭受登革熱病毒感染，50萬人發展為登革熱出血熱，約有22000~25000人因而死亡(WHO, 2011)。台灣地區包含本土病例與境外移入病例，感染人數約4萬餘人，2百多人因此而死亡。



圖一、全世界遭受登革熱威脅之熱帶、亞熱帶國家



圖二、2015~2016 年全國登革熱本土病例及境外移入病例地理分布圖

感染登革熱的症狀，依照疾病嚴重程度不同，臨床上可分為無症狀 (Asymptomatic)、典型登革熱 (Dengue fever)、登革出血熱 (Dengue hemorrhagic fever) 及登革熱休克症候群 (Dengue shock syndrome, DSS)。典型登革熱比較不具危險性，死亡率甚低，常見症狀為突發性高燒 (39 至 40°C) 伴隨著畏寒、前額

及後眼窩的劇痛、肌肉痛。有些則有臉部潮紅、結膜充血等等...再經2至4天全身皮膚出疹，疹子由軀體開始向臉及手腳蔓延，大約七天內，大部份病人可完全痊癒。而出血性登革熱在臨床上大多數是因為兩次以上重複感染，引起人體免疫系統的劇烈反應，造成大量細胞激素 (cytokine)及趨化因子 (chemokine) 釋放(Chaturvedi, Agarwal, Elbishbishi, & Mustafa, 2000)，而使全身血管的大量出血，症狀上除了高燒、頭痛、肌肉痛、嘔吐、全身倦怠外，常伴隨流鼻血、吐血、血便、血尿、子宮出血及胸腹部積水。當登革出血熱之血漿滲出很多時，病患會呈現四肢冰冷、脈搏加快、血壓下降，甚至休克，此時又稱為「登革休克症候群」(Kalayanarooj et al.,1997)，如果沒有及時就醫或治療就會造成死亡。

登革熱病毒 (Dengue virus, DENV) 為核糖核酸病毒 (RNA) 病毒，在分類上屬黃病毒科 (Flaviviridae)黃病毒屬 (*Flavivirus*)。登革熱病毒依血清抗原型可分為四種血清型分別為 DENV1、DENV2、DENV3 及 DENV4，而每一型都具有能感染致病的能力。雖有部分抗原結構相同，但各型所激發的抗體對其他型的病毒而言，則無法提供寄主交叉保護的作用，因此患者感染到某一型的登革病毒，就會對那一型的病毒具有終身免疫，但是對於其他型別的登革病毒僅具有短暫的免疫力 (通常約為 2-9 個月之間) (圖三)。(陳維鈞,2003)

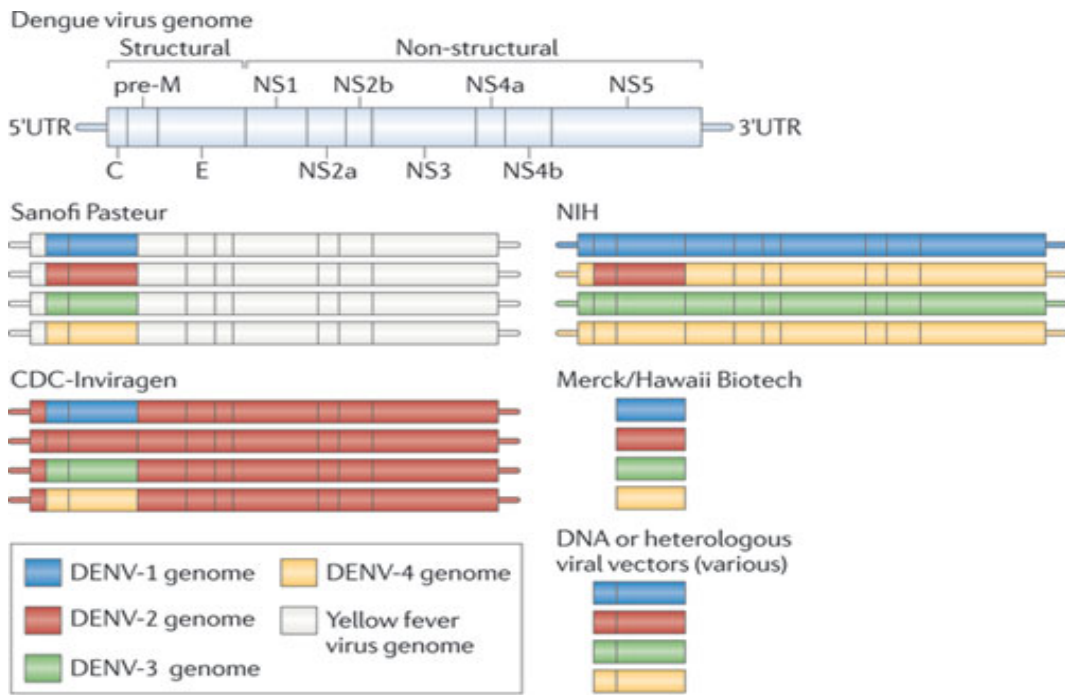
登革病毒外觀為球形，直徑約30~50 nm，內部是20面體的核殼，病毒顆粒外面分別有膜蛋白(membrane protein, M)、包膜蛋白(envelope protein, E)所包覆；而在病毒顆粒中心由核心蛋白 (coreprotein, C)以及病毒基因體所組成核殼體 (nucleocapsid) (Kummerer & Rice, 2002)。核殼內的核酸約含有一萬一千個核酸，為單股正相的核糖核酸 (RNA)，全長為11 kb。病毒內所含的核糖核酸具有感染性，可直接轉譯成病毒所需的蛋白質。登革病毒必須在細胞質內進行複製，而整個過程裡會產生10種功能不同的蛋白質，其中殼蛋白 (Core protein)、前驅膜蛋白 (Precursor membrane protein)、外膜蛋白 (Envelope protein) 為組合病毒的結構蛋白，尤其以外膜蛋白在病毒感染細胞及誘發抗體，具有登革病毒的抗原決定基 (epitope)。其他如NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B及NS5則為非結構性蛋白，它們是病毒複製、轉錄及轉譯病毒蛋白過程中的功能蛋白(圖四)。

非結構蛋白中，NS1 是大小為 45kDa的病毒糖蛋白，發現會被病毒感染哺乳類細胞所釋放(Flamand et al., 1999)，釋放出的 NS1對病毒複製有所幫助(Lindenbach & Rice, 1997, 1999)；NS2A 分子量為 22 kDa，透過 NS2B-NS3 剪切成兩種型態分別為NS2A 和 NS2A α 。研

究發現對 NS2A 進行突變，會影響具感染力的病毒生成(Kummerer & Rice, 2002)；NS2B 為 NS3 重要的輔助因子 (cofactor)，目前被認為是和病毒的蛋白質切割酵素NS3 有關聯；NS3 為具多功能的蛋白，一方面為 serine protease，負責剪切病毒轉譯出的多蛋白鏈；同時 NS3 也是核糖核酸解旋酶 (RNA helicase) 以及核糖核酸磷酸酶 (RTPase)，參與病毒基因體複製過程(Arias et al., 1993; Li et al., 1999)。

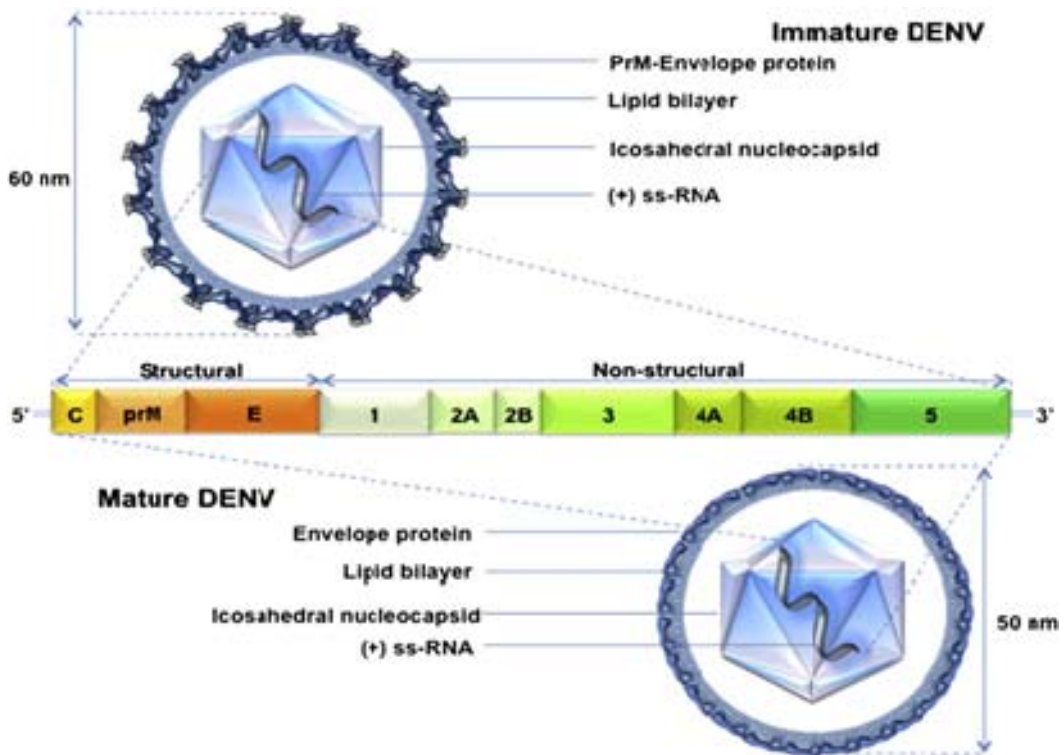
NS4A會促使宿主細胞膜重組，此重組對病毒複製有影響，目前被證實會干擾宿主細胞的干擾素 (interferon, IFN) 訊息傳導，減少宿主防衛機制 (Munoz-Jordan et al., 2005)。NS5 為核糖核酸依賴性核糖核酸聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)，負責合成病毒 RNA 基因體 (Nomaguchi et al., 2003)，此外 NS5 也具有甲基轉移酶 (methyltransferase) 功能，參與 RNA capping 過程 (Egloff et al., 2002)。

近年研究指出，NS3蛋白為一種多功能蛋白，具有絲氨酸蛋白酶的結構域 (NS3pro)，並為最重要的非結構蛋白之一。但是，NS3pro的活性取決於其輔助因子NS2B (47個氨基酸) 的相互作用，以形成NS2B-NS3pro複合物，負責剪切病毒轉譯出的多蛋白鏈。登革熱病毒的蛋白水解過程是由宿主細胞之蛋白酶和病毒NS2B-NS3蛋白酶兩者來主導反應，因此在開發抗登革熱病毒的研究中，常以找尋NS2B/NS3 Protease Inhibitor，當作指標以篩選抑制蛋白酶藥物。



Nature Reviews | Immunology

圖三: 四種登革熱病毒四種血清型的基因片段



圖四:登革熱的基因組(Genoma del virus dengue)

研究方法、步驟

第一節、樣品採集

一、植物來源：

本次實驗所使用的五爪金英 *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray，是由指導教授林昀生老師於台東所採集的，採集的時間為 2015 年 7 月。

二、實驗耗材：

- (1) 正己烷 (*n*-Hexane)、二氯甲烷 (Dichloromethane)、乙酸乙酯 (Ethyl acetate)、丙酮 (Acetone)、甲醇 (Methanol)、正丁醇 (*n*-Butanol)：美國 TEDIA 公司
- (2) Chloroform-*d*、Methanol-*d*4
- (3) 管柱色層分析: Silica gel (70~230 ; 230~400 mesh E. Merck)
- (4) 薄層色層分析: Merck TLC aluminium sheets 20 x 20 cm Silica gel 60 F₂₅₄

三、實驗儀器：

- 1、核磁共振磁光譜儀:以 Chloroform-*d*、Methanol-*d*4 等溶劑溶解待測樣品，將樣品置於 NMR tube 中，以核磁共振磁光譜儀測定氫核、碳核在高磁場下對電磁波的吸收訊號，推測樣品的分子結構。 δ 表示化學位移 (chemical shifts)；s 表示單重峰 (singlet)；d 表示雙重峰 (doublet)；t 表示三重峰 (triplet)；q 表示四重峰 (quartet)；br 表示寬峰 (broad)；m 表示多重峰 (multiplet)。
- 2、質譜儀：取少量樣品以質譜儀測定樣品的分子離子峰推定其分子量，並藉由分子斷裂碎片所產生的峰線，推測分子斷裂模式。
- 3、紅外線光譜儀:將待測樣品經毛細管點在 KBr 鹽片上，測試分子其化學鍵的振動及伸縮，用在判斷化合物的官能基。

- 4、 紫外線光譜儀：用甲醇溶解微量樣品後，裝於樣品槽中，以紫外線光譜儀來測試樣品吸收。
- 5、 旋光光度計：以 1 ml 的光譜級溶劑測試樣品溶解，裝入旋光儀樣品槽，經旋光儀得到實驗值 α ，以公式 $[\alpha]_D^t = \alpha / (L \times d)$ 計算樣品比旋光度。
〔 α 〕為樣品比旋光度，T 為溫度，D 為鈉的波長光源 (589 nm)，L 為光徑長 dm (1 dm = 10 cm)，d 為測試樣品密度 g/mL。
- 6、 高效能液相層析儀：是一種色譜分析技術，用來分離混合物，以確認並量化各個成分的比例。它依賴泵加壓樣品以令其通過填充有吸附劑的壓力柱，導致樣品的各個成分因而分離。

第二節 分離與純化

將採集到的五爪金英的地上部分烘乾後攪碎，得乾重約 (3.0 公斤)，用甲醇在室溫下浸泡五天，重複三次，將浸液合併，經由過濾、減壓濃縮後得到深褐色的膏狀粗萃物 (520 公克)，之後用乙酸乙酯 (Ethyl acetate) 與水體積 1:1 進行液液分配，將乙酸乙酯層經減壓濃縮後得到深綠色的膏狀萃取物 (220 公克)，將此萃取物以矽膠管柱色層分析做初步分離，以正己烷和乙酸乙酯進行梯度沖提，共得到十五個分離層，編號分別是 T1 ~ T15。

透過核磁共振儀 (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) 圖譜分析後，先取 T6 分離層經由 LH-20 管柱色層分析，以二氯甲烷和甲醇進行沖提後得到五個分離層，再以第三個分離層進行高效能液相層析 (High performance liquid chromatography, HPLC) 正相管柱分離純化，第一個分離層經 NMR 圖譜鑑定後，確定為 Tagitinin F (4)。

取 T8 分離層經由 Open column 管柱色層分析，以正己烷和乙酸乙酯進行梯度沖提後得到十三個分離層，以第十三個分離層進行 HPLC 正相管柱分離，共得到四個分離層，再以第二個分離層進行 HPLC 逆相管柱分離，其中第一個分離層是經 NMR 圖譜鑑定後，確定為 4 β ,10 β -dihydroxy-3-oxo-8 β -

isobutyroxyloxyguaia-11(13)-en-6,12-olide (5)。

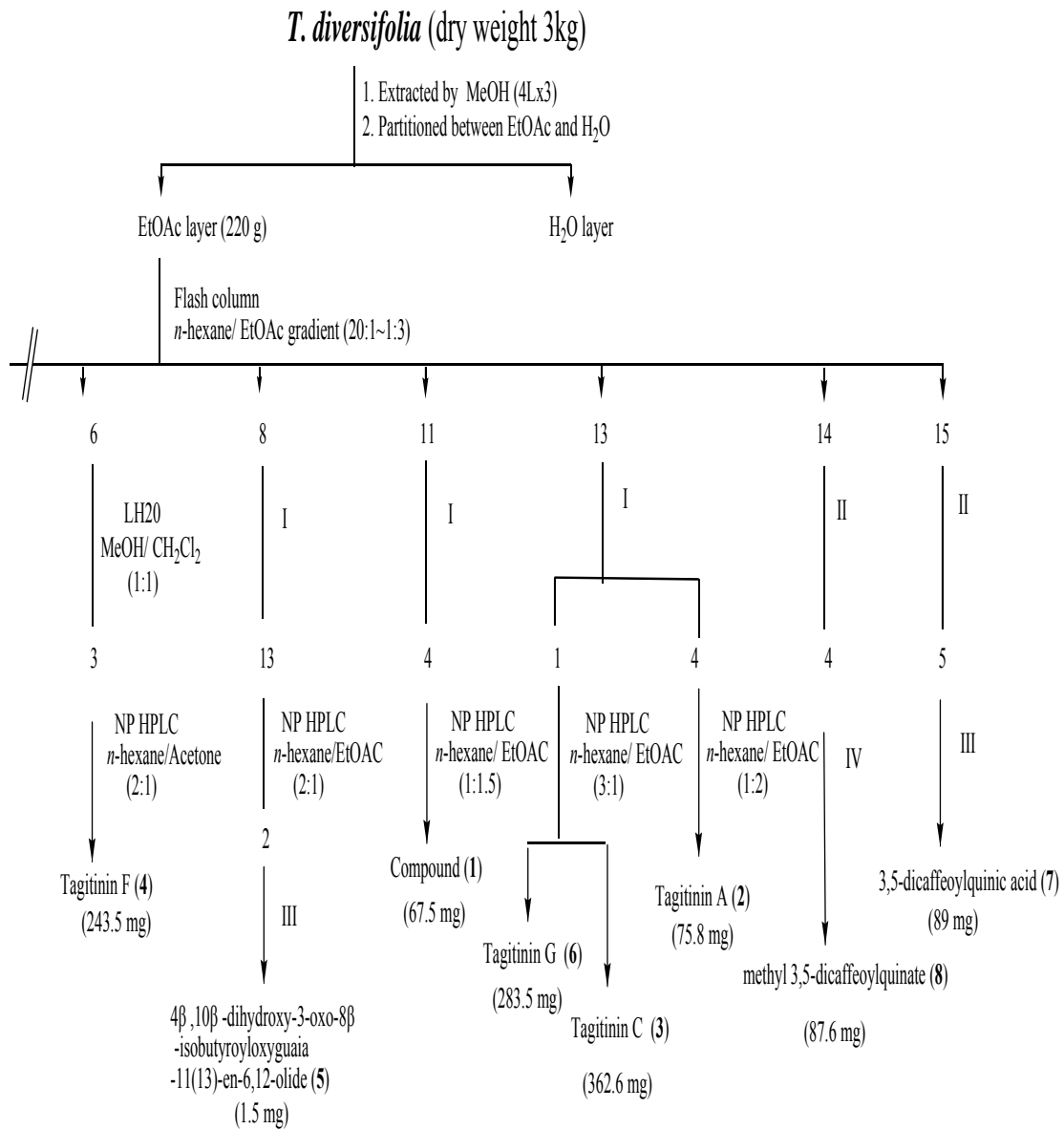
取 T11 分離層經由 Open clunm 管柱色層分析，以正己烷和乙酸乙酯進行梯度沖提後得到五個分離層，以第四個分離層進行 HPLC 正相管柱分離，共得到四個分離層，其中第一個分離層是經 NMR 圖譜鑑定後，確定為 compound A (1)

取 T13 分離層經由 Open clunm 管柱色層分析，以正己烷和乙酸乙酯進行梯度沖提後得到四個分離層，以第一個分離層進行 HPLC 正相管柱分離，共得到三個分離層，其中第一個分離層是經 NMR 圖譜鑑定後，確定為 Tagitinin G (6)，第三個分離層是經 NMR 圖譜鑑定後，確定為 Tagitinin C (3)。再將第四個分離層進行 HPLC 正相管柱分離，而得到三個分離層，以第三個分離層經 NMR 圖譜鑑定後，確定為 Tagitinin A (2)。

取 T14 分離層經由 LH-20 管柱色層分析，以甲醇進行沖提後得到五個分離層，將第四個分離層進行逆向 PTLC 跑片後得到四個分離層，其中第二個分離層是經 NMR 圖譜鑑定後，確定為 methyl 3,5-dicaffeoylquinic acid (8)

最後取 T15 分離層進行 LH-20 管柱色層分析 HPLC，以甲醇進行沖提後得到五個分離層，將第五個分離層進行 HPLC 逆相管柱分離，其中第二個分離層經 NMR 圖譜鑑定後，確定為 3,5-dicaffeoylquinic acid (7)。

其詳細分離流程如下圖六所示。



- I : Open column *n*-hexane : EtOAc = 10:1~1:3
 II : LH-20, MeOH
 III : RP-HPLC, MeOH : H₂O : CH₃CN = 55 : 40 : 5
 IV : PTLC, MeOH : H₂O : CH₃CN = 45 : 50 : 5

圖六、五爪金英 *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray
之分離流程

第三節 結構之鑑定

利用核磁共振儀測定化合物之氫譜、碳譜、DEPT 及二維圖譜如 ^1H - ^1H COSY、HMQC、HMBC 及 NOESY 等，質譜儀器測量化合物的分子量或元素含量，紅外線光譜儀、紫外線光譜儀及旋光光度計分別測定分子的各種物理數據。

DEPT：可區分出甲基、亞甲基、次甲基與四級碳

^1H - ^1H COSY：測定相偶合的氫

HMQC：測定氫譜吸收訊號對應到的碳譜吸收訊號

HMBC：測定氫譜吸收訊號對應到的相鄰碳譜吸收訊號

NOESY：測定結構上的立體關係

第四節、細胞毒性試驗

(一)、實驗原理

本實驗室所採用的細胞存活率測試為 MTT assay，其原理是因為活細胞粒腺體內的琥珀酸脫氫酶 (succinate dehydrogenase) 和水溶性黃色 methylthiazoleltetrazolium bromide (MTT) 反應後，會還原成脂溶性的藍紫色之 formazan 化合物的結晶。再加入使結晶溶解的 DMSO 溶劑，藉由波長 540 nm 測得的吸收值判斷其 MTT formazan 的生成量。以此分析法來評估化合物對細胞株之安全性與相容性。

(二)、實驗方法

1. 細胞解凍: 細胞株:Huh-7 細胞

先配置解凍液，以 5 ml DMEM medium 加入 2 ml FBS 混合均勻即可當作細胞解凍液；準備約 37-38 °C 之溫水，將細胞從液態氮桶內取出放入溫水之中，約冷凍小管內之剩下一小塊冰塊後迅速拿進無菌操作台內，將細胞吸取進解凍液內，置於離心機內以 1100 rpm 之轉速離心 5 分鐘，離心後將上清液倒棄加入新的 F12K medium 後將全部細胞置入 10

cm cell culture dish 內，再放置於 37 °C 含 5% CO₂ 之細胞培養箱內讓細胞貼附盤底，24 小時後再更換新的 F12K 培養基。

2. 細胞培養與繼代

將 10 cm cell culture dish 從細胞培養箱取出，將舊的 DMEM 培養基全部吸取倒棄，加入 1X 之 HBSS 清洗後再全部吸取倒棄，加入 1 ml trypsin-EDTA 後，置於 37°C 含 5% CO₂ 之細胞培養箱內 7 分鐘待 trypsin-EDTA 作用，7 分鐘後將 dish 取出看是細胞是否脫離盤底，脫離盤底後迅速放入無菌操作台內，加入 1 ml DMEM 培養基停止 trypsin 之作用，並將培養基與 trypsin 之混合液吸取在 dish 盤內沖洗盤底，將細胞沖散約 3-5 次至細胞完全分散在全部吸入 15 ml 之離心管內，於離心機內以 1100 rpm 之轉速離心 5 分鐘，離心完將上清液倒棄，並輕敲管底將細胞團敲散，再加入新的 DMEM medium 後並全部吸取於新的 10 cm cell culture dish 內，再放入 37°C 含 5% CO₂ 之細胞培養箱內培養。

3. 細胞藥物毒性試驗 (MTT)

使用 96 well 之 seeding 盤，seeding 之細胞數為 2×10^4 ，並培養於 37°C 5% CO₂ 之細胞培養箱內 24 小時等待貼附，待細胞貼附後，將 well 內之 medium 全部吸乾倒棄後進行給藥，以 control、DMSO 組及萃取物 6.25µg/ml、12.5µg/ml、25µg/ml、50µg/ml、100µg/ml 之藥物濃度進行給藥，每 well 為 200µl；藥物作用期間為 24 小時，24 小時後將 well 內之 medium 吸取 100µl 加入 25µl MTT 後再放入培養箱內培養，作用時間 4 小時，4 小時後將上清液倒棄，加入 100µl 之 DMSO 在震盪 5 分鐘，置於 ELISA 中以吸光值 540 nm 進行檢測，並繪圖及計算 IC₅₀。

第五節、生物活性檢測

(一)、西方點墨法 (Western blotting)

原理: 利用特定的抗體能夠專一結合其抗原蛋白質的原理針對待測樣品進行

著色，通過著色的位置與深度以檢測電泳分離的特異性目的基因表達的蛋白成分。

(二)、實驗方法

1. 瓊脂明膠膠體電泳 (Agarose Gel Electrophoresis)

電泳緩衝液為 0.5X TBE Buffer，膠體為 3%將 PCR 產物放膠體之 well 內，另取標示用核酸做對照(molecular weight marker)，以 100V 之電壓進行電泳約 40 分鐘。

2. 膠體染色法 (Coomassie Brilliant Blue R ; CBR)

將電泳結束之膠體置於 EtBr 內染色約 10 分鐘，再置於 ddH₂O 內退染約 5 分鐘，再放入照膠系統內(BIO RAD,Gel Doc XR , No.1708169)以 UV 下判讀並照相。

3. 三明治免疫呈色

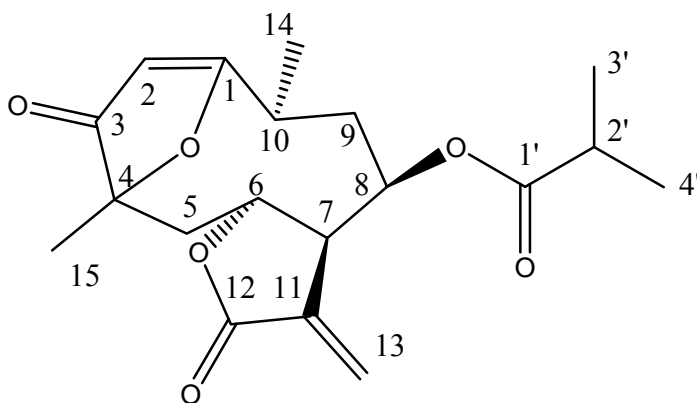
三明治法常用於檢測大分子抗原，一般之操作步驟為：

- (1) 將具有專一性之抗體固著於塑膠孔盤上，再洗去多餘抗體
- (2) 加入待測檢體，檢體中若含有待測之抗原，則其會與塑膠孔盤上的抗體進行專一性鍵結
- (3) 洗去多餘待測檢體，加入另一種對抗原專一之一次抗體，與待測抗原進行鍵結
- (4) 洗去多餘未鍵結一次抗體，加入帶有酵素之二次抗體，與一次抗體鍵結
- (5) 洗去多餘未鍵結二次抗體，加入酵素受質使酵素呈色，以肉眼或儀器讀取呈色結果

研究結果與討論

第一節 Compound A (1) 的結構解析

Compound A (1) 的外觀白色粉狀，其比旋光度 (specific rotation) $[\alpha]_D^{26}$ 為 $+19.0^\circ$ (c 0.07, CHCl_3)。在低解析電灑式質譜 (LRESIMS) 上觀察到擬分子峰 m/z 為 349.16 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 、371.11 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ，得知其分子式為 $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_6$ 。IR 圖譜在 ν_{max} 3444、1734、1603 cm^{-1} 有吸收，推測此化合物含有 hydroxy group (OH)、ester group 和 double bond。

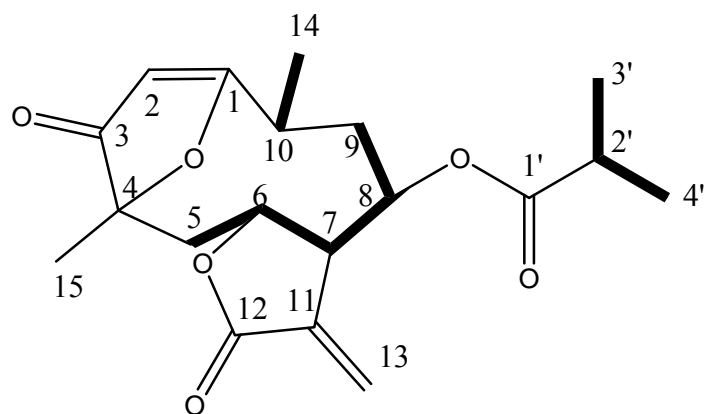


1

在 $^1\text{H-NMR}$ 圖譜中發現可發現 4 個甲基 (δ_{H} 1.32, Me-14 ; 1.40, Me-15 ; δ_{H} 1.07, Me-3' ; δ_{H} 1.09, Me-4')，1 個雙鍵上的次甲基 H-2 (δ_{H} 5.55)，2 個接氧的次甲基 H-6、H-8 (δ_{H} 5.10、4.50)，3 個次甲基 H-7、H-10、H-2' (δ_{H} 3.21、3.17、2.41)。配合 $^{13}\text{C-NMR}$ 、DEPT 圖譜發現含有 4 個甲基 C-14、C-15、C-3'、C-4' (δ_{C} 17.7、22.7、18.3、18.8)；3 個亞甲基 C-5、C-9、C-13 (δ_{C} 43.2、41.9、123.5)；6 個次甲基 C-2、C-6、C-7、C-8、C-10、C-2' (δ_{C} 104.2、73.7、51.6、76.4、33.8、33.9)；6 個四級碳 C-1、C-3、C-4、C-11、C-12、C-1' (δ_{C} 190.7、205.5、88.6、139.3、168.5、175.3)。

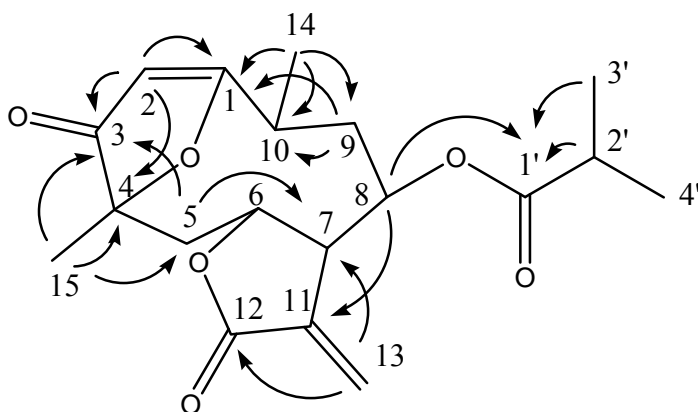
由 $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY 圖譜中發現 H-5/H-6、H-6/H-7、H-7/H-8、H-8/H-9、H-10/H-14、H-2'/H-3'、H-2'/H-4' 之間有氫和氫的關聯訊號，由此可得到分子片

段之氫序關係。

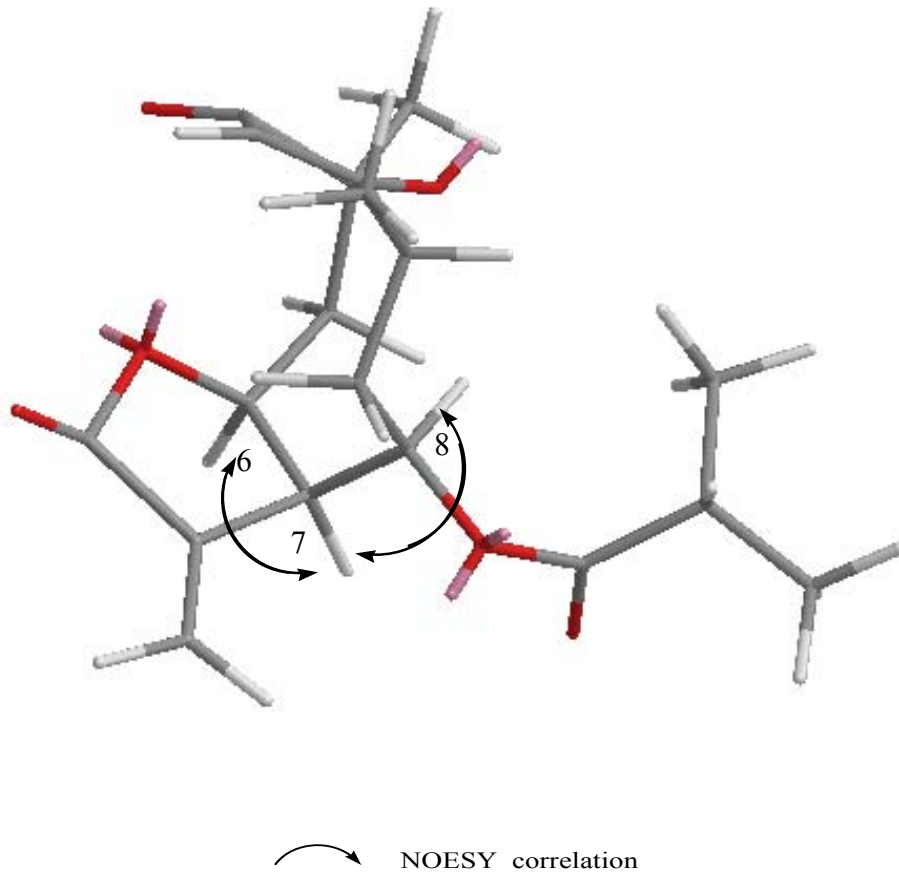


— COSY correlation

由 HMBC 圖譜中發現 H-2/C-1、C-3、C-4； H-13/C-7、C-12； H-15/C-3、C-4、C-5； H-14/C-1、C-9、C-10； H-5/C-3、C-7； H-9/C-10； H-8/C-1'； H-3'/C-1'； H-2'/C-1' 有關聯訊號，並將以上圖譜所聯結的片段相連結起來，解出此化合物之平面結構。此化合物的 $^{13}\text{C-NMR}$ 圖譜中有一 $\delta_{\text{C}} 205.5$ 的訊號，推測此結構應含有羰基，並由 HMBC 圖譜中發現 H-2/C-1、C-3、C-4，推斷 C-3 為羰基； H-2/C-1，Me-14/C-1、C-9、C-10；另外經由氫碳圖譜及 HMQC 圖譜中發現 ($\delta_{\text{H}} 5.55; \delta_{\text{C}} 104.2$) 之訊號，推測 C-2 為雙鍵；而由碳圖譜發現 C-1 ($\delta_{\text{C}} 190.7$) 並由 HMBC 圖譜中發現 H-15/C-3、C-4、C-5； H-2/C-1、C-3、C-4 有關聯訊號，推測 C-1、C-4 合氧合環之結構。

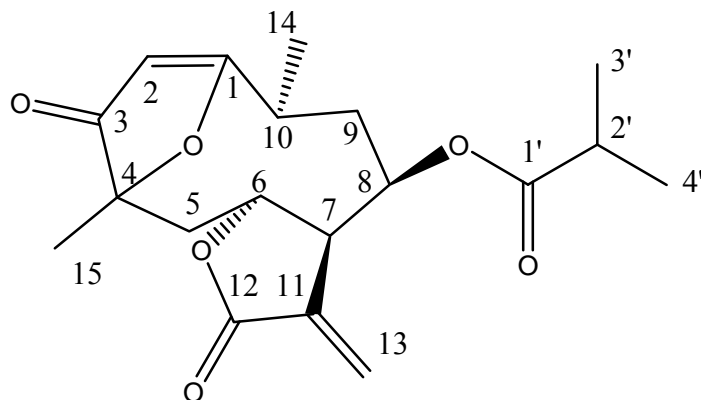


→ HMBC correlation



其化合物相對立體化學位向，是藉由比對過去文獻及本化合物的 NOESY 圖譜來確定其相對立體位向。由該圖譜顯示，假設 7 號位 H 為 α 位向，比對已知化合物 Tagitinin C (3) (Ragasa, Tepora, & Rideout, 2010)，得知 H-6/H-7 有關聯訊號，因此推測 H-6 之相對立體位向為 α 位向；於 NOESY 圖譜上發現 H-6/H-7、H7/H-8 有關聯訊號，因此確定 H-8 為 α 位向。透過以上之關聯可確定 Compound A (1) 之相對立體位向，其詳細的 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 數據見表一。

表一、Compound A (1) ^1H 和 ^{13}C NMR 光譜資料



No.	$^1\text{H}^a$ (mult, J , Hz)	$^{13}\text{C}^b$
1		190.7
2	5.55 (s)	104.2
3		205.5
4		88.6
5	2.21 (d, 14.4) 2.63 (dd, 4.8, 14.4)	43.2
6	5.10 (m)	73.7
7	3.21 (m)	51.6
8	4.50 (m)	76.4
9	2.02 (dd, 6.8, 14.4) 2.43 (m)	41.9
10	3.17 (m)	33.8
11		139.3
12		168.5
13	5.67 (s) 6.34 (s)	123.5
14	1.32 (s)	17.7
15	1.40 (s)	22.7
1'		175.3
2'	2.41 (heptet, 6.6)	33.9
3'	1.07 (d, 6.6)	18.3
4'	1.09 (d, 6.6)	18.8

^aMesaured at 400 MHz

^bMesaured at 100 MHz

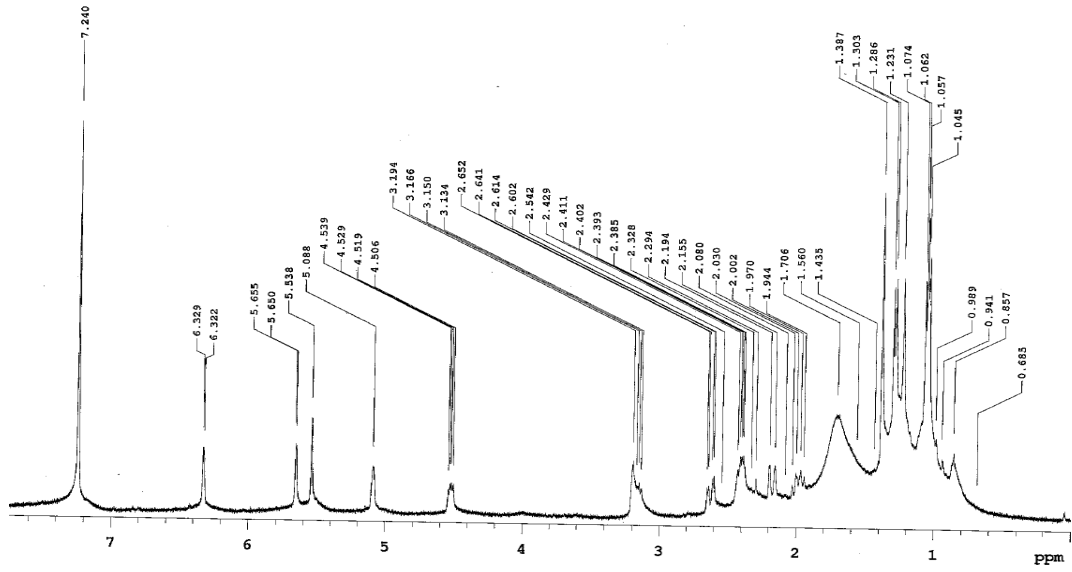


圖 7-1、Compound A (1) 之 ^1H NMR 圖譜

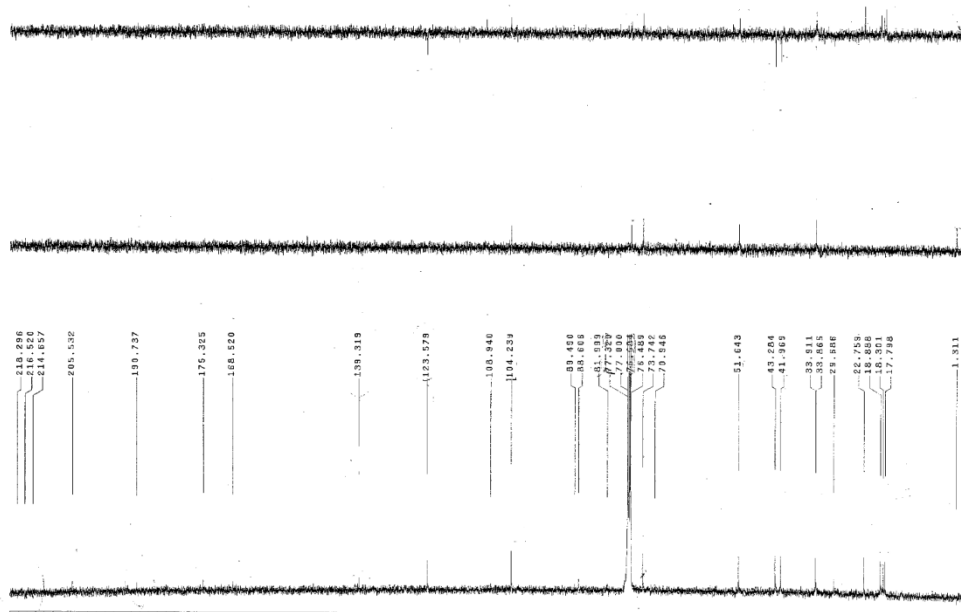


圖 7-2、Compound A (1) 之 ^{13}C NMR 與 DEPT 圖譜

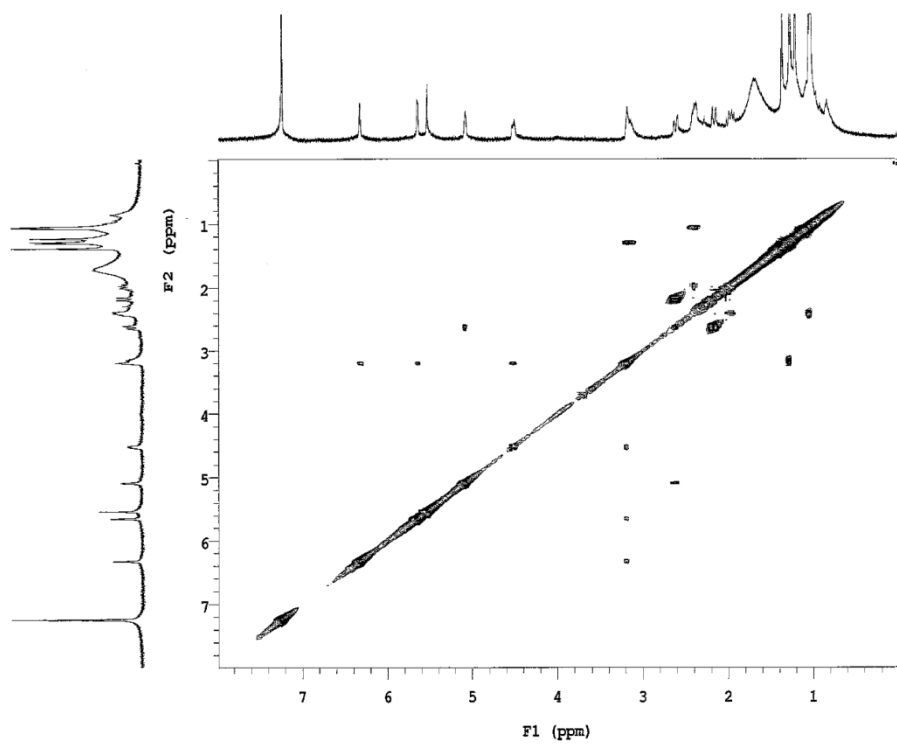


圖 7-3 、 Compound A (1) 之 COSY 圖譜

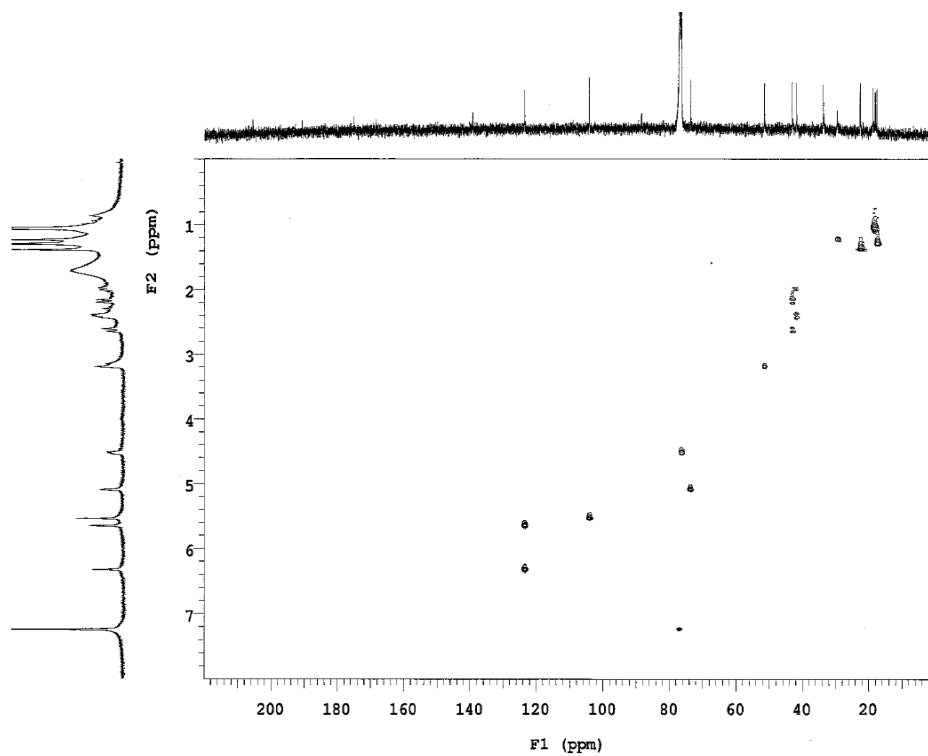


圖 7-4 、 Compound A (1) 之 HMBC 圖譜

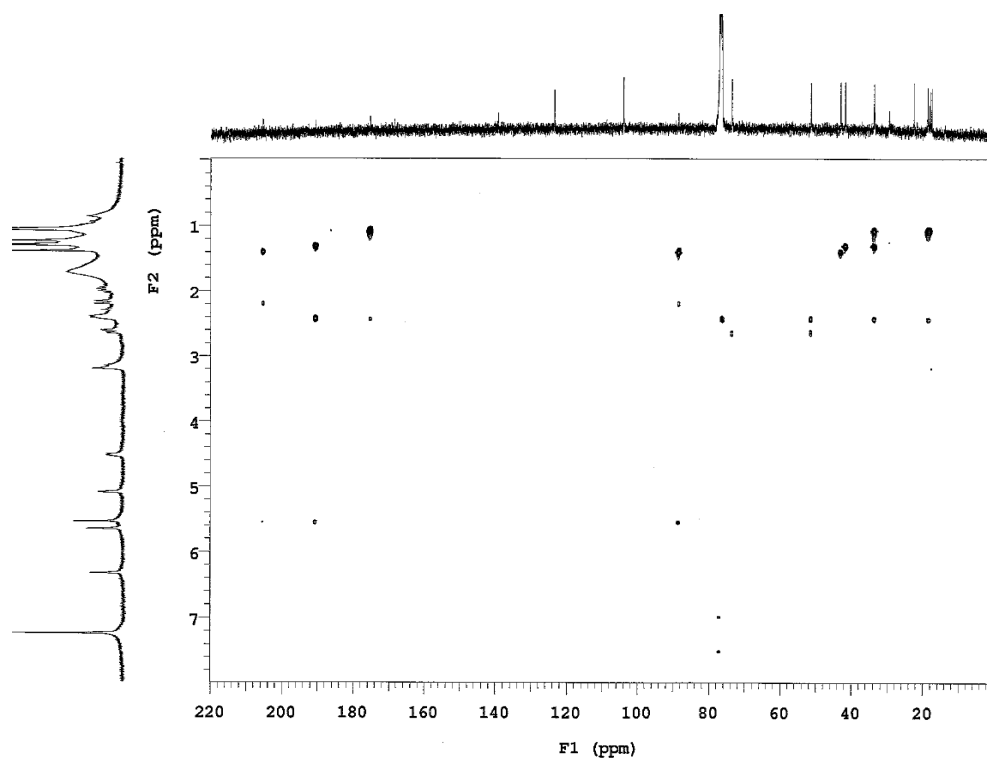


圖 7-5 、 Compound A (1) 之 HMBC 圖譜

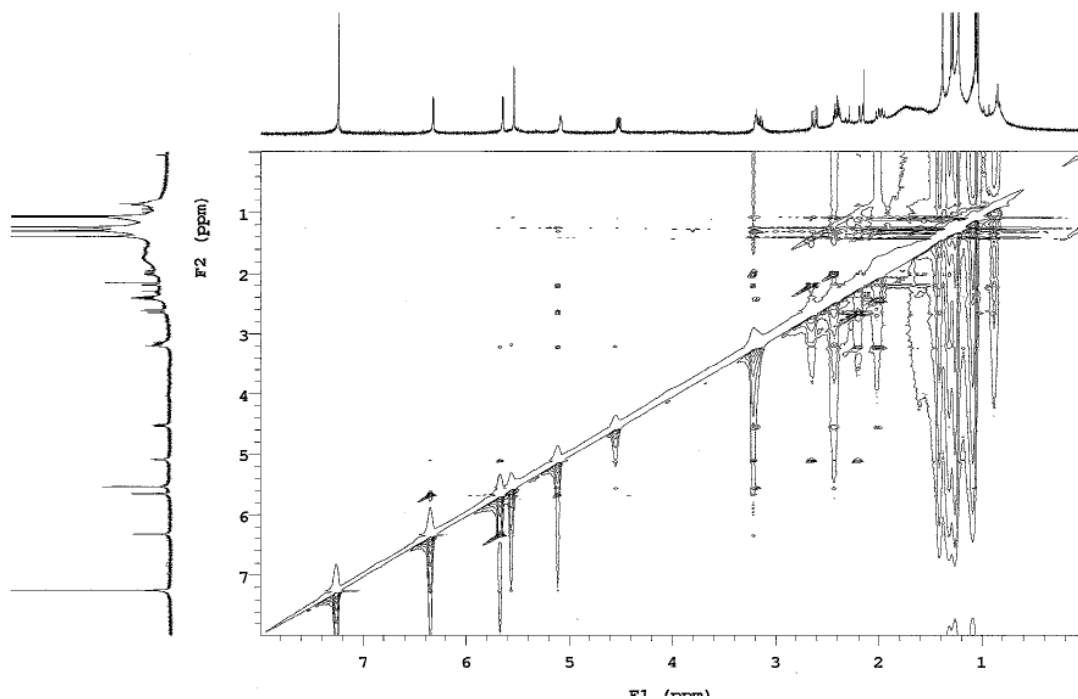


圖 7-6 、 Compound A (1) 之 NOESY 圖譜



圖 7-7 、 Compound A (1) 之 IR 圖譜

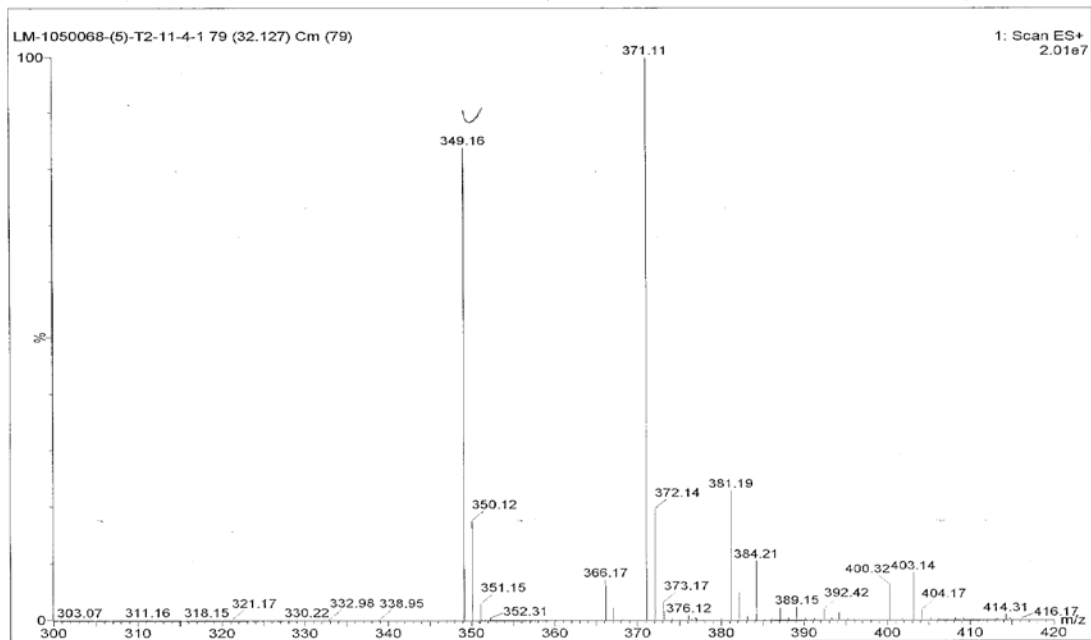
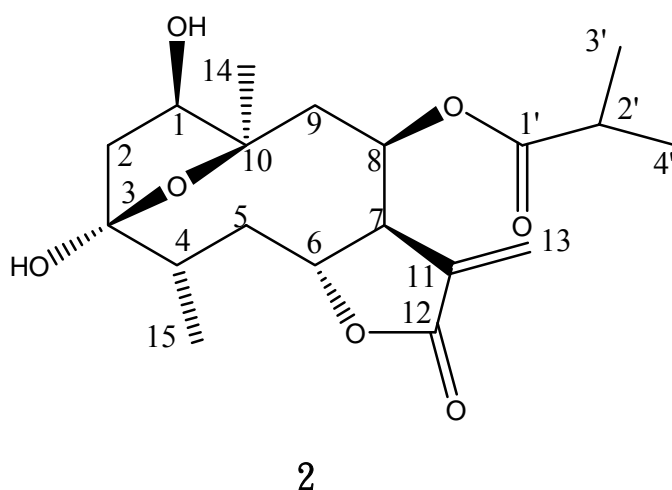


圖 7-8 、 Compound A (1) 之 LRESIMS 圖譜

第二節 Tagitinin A (2) 的結構解析

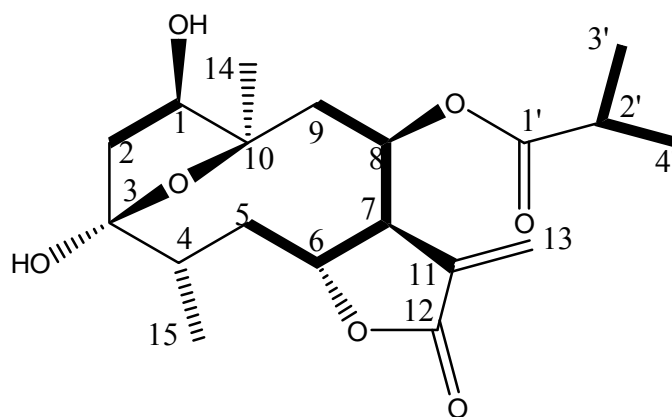
Tagitinin A (2) 的外觀白色膏狀，其比旋光度 (specific rotation) $[\alpha]_D^{22}$ 為 -160° (c 0.86, MeOH)，在低解析度電子游離法質譜 (LRESIMS) 上觀察到擬分子峰 m/z 為 369.19 $[M+H]^+$ ，得知其分子式為 $C_{19}H_{28}O_7$ 。而 UV λ_{max} (MeOH) 在 213 (4.06) nm 有吸收。IR 圖譜在 ν_{max} 3434、1738、1633 cm^{-1} 有吸收，推測此化合物含有 hydroxy group (OH)、ester group 和 double bond。此化合物 2 經由比對早期文獻之 1H -NMR、 ^{13}C -NMR 圖譜數據，可以確定化合物 2 為 Tagitinin A。此化合物在 1976 年被發現 (Pal et al., 1976)。



2

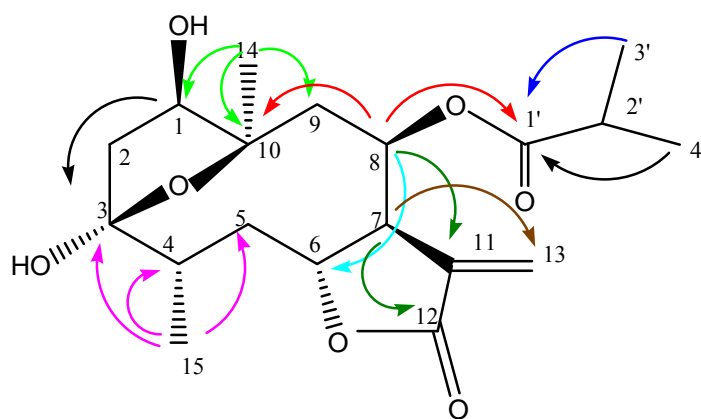
在 1H -NMR 圖譜中發現可發現 4 個甲基 (δ_H 1.46, Me-14、 δ_H 1.09, Me-15、 δ_H 1.07, Me-3'; δ_H 1.09, Me-4')，1 個五環外雙鍵的亞甲基 H-13 (δ_H 5.57, 6.29)，3 個接氧的次甲基 H-1、H-6、H-8 (δ_H 4.26、4.59、5.59)，3 個次甲基 H-4、H-7、H-2' (δ_H 2.07、4.02、2.43)，配合 ^{13}C -NMR、DEPT 圖譜發現含有 4 個甲基 C-14、C-15、C-3'、C-4' (δ_C 24.9、19.1、18.3、18.7)；4 個亞甲基 C-2、C-5、C-9、C-13 (δ_C 47.0、37.7、34.6、121.5)；6 個次甲基 C-1、C-4、C-6、C-7、C-8、C-2' (δ_C 78.6、44.3、81.3、47.8、69.6、34.0)；5 個四級碳 C-3、C-10、C-11、C-12、C-1' (δ_C 105.7、81.7、137.0、169.3、176.2)。

由 ^1H - ^1H COSY 圖譜中發現 H-1/H-2、H-5/H-6/H-7/H-8、H-8/H-9、H-2'/H-3'、H-2'/H-4' 之間有氫和氫的關聯訊號，由此可得到分子片段之氫序關係。



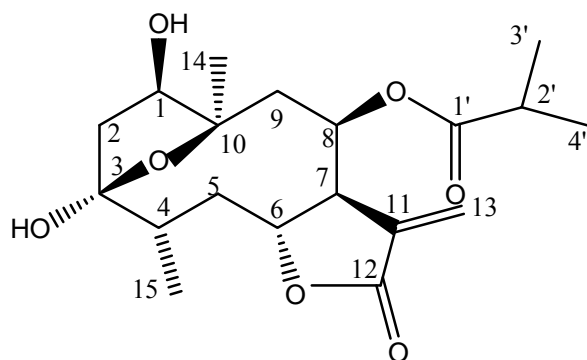
— COSY correlation

由 HMBC 圖譜中發現 H-1/C-3；H-8/C-6、C-10、C-11、C-1'；H-3/C-1'；H-3'/C-1'；H-4'/C-1'；H-7/C-12、C-13；H-14/C-1、C-9、C-10；H-15/C-3、C-4、C-5 有關聯訊號，由於以下圖譜所聯結的片段相連結起來，由 HMBC 發現 H-15/C-3、C-4、C-5 有關聯訊號，即解出此化合物之平面結構。



→ HMBC correlation

表二、Tagitinin A (2) ^1H 和 ^{13}C NMR 光譜資料



No.	$^1\text{H}^a$ (mult, J , Hz)	$^{13}\text{C}^b$
1	4.26 (overlapped)	78.6
2	2.47 (dd, 9.2, 14.0)	47.0
	2.11 (overlapped)	
3		105.7
4	2.07 (overlapped)	44.3
5	2.01 (dd, 12.6, 2.8)	37.7
	2.12 (m)	
6	4.59 (m)	81.3
7	4.02 (overlapped)	47.8
8	5.59 (m)	69.6
9	1.83 (dd, 11.7, 14.3)	34.6
	1.96 (overlapped)	
10		81.7
11		130.7
12		169.3
13	5.57 (d, 2.9)	121.5
	6.29 (d, 2.9)	
14	1.46 (s)	24.9
15	1.09 (d, 6.8)	19.1
1'		176.2
2'	2.43 (heptet, 6.8)	34.0
3'	1.07 (d, 6.8)	18.3
4'	1.09 (d, 6.8)	18.7

^aMesaured at 400 MHz

^bMesaured at 100 MHz

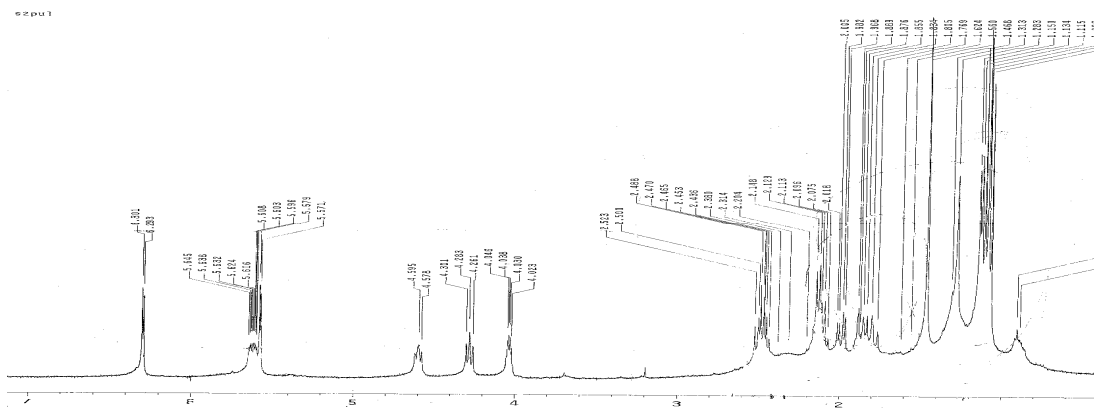


圖 8-1、Tagitinin A (2) 之 ^1H NMR 圖譜

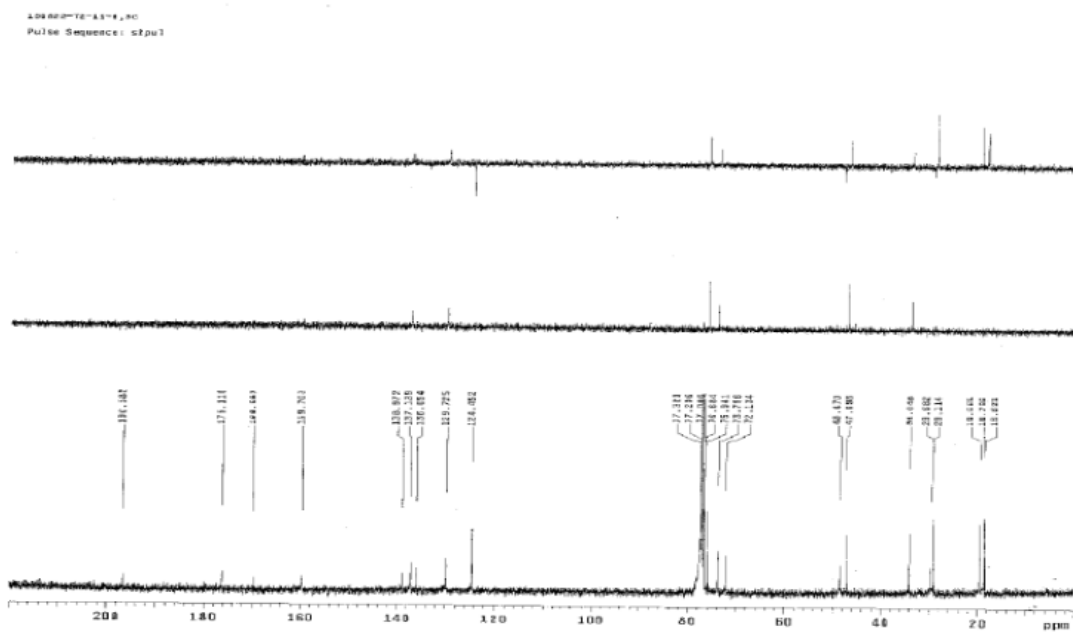


圖 8-2、Tagitinin A (2) 之 ^{13}C NMR 與 DEPT 圖譜

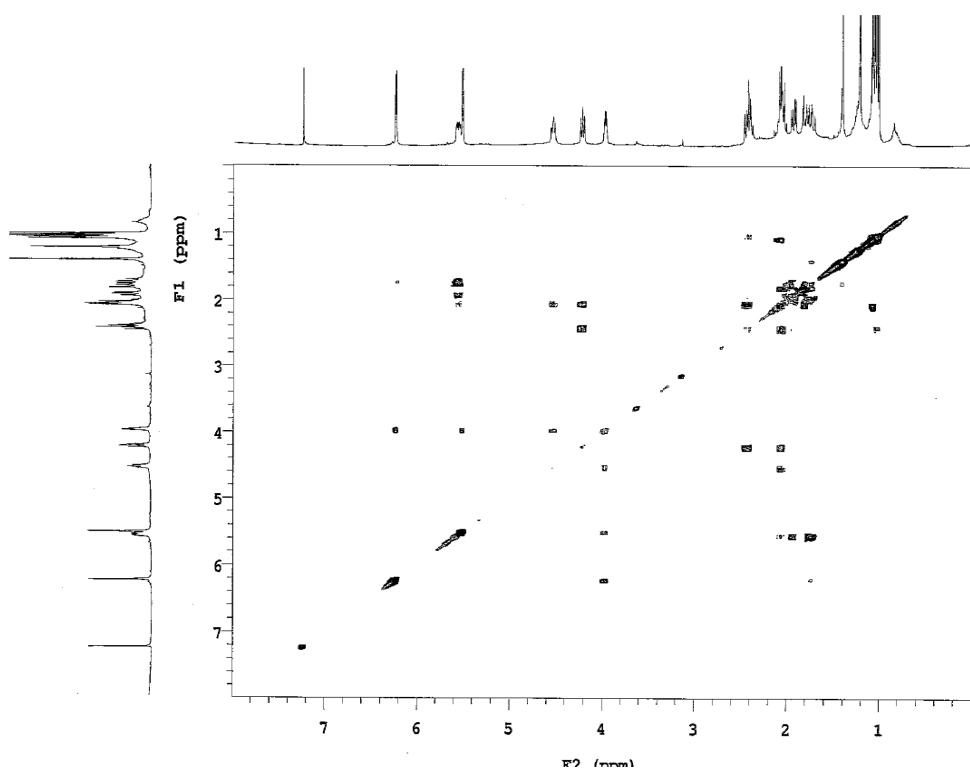


圖 8-3 、 Tagitinin A (2) 之 COSY 圖譜

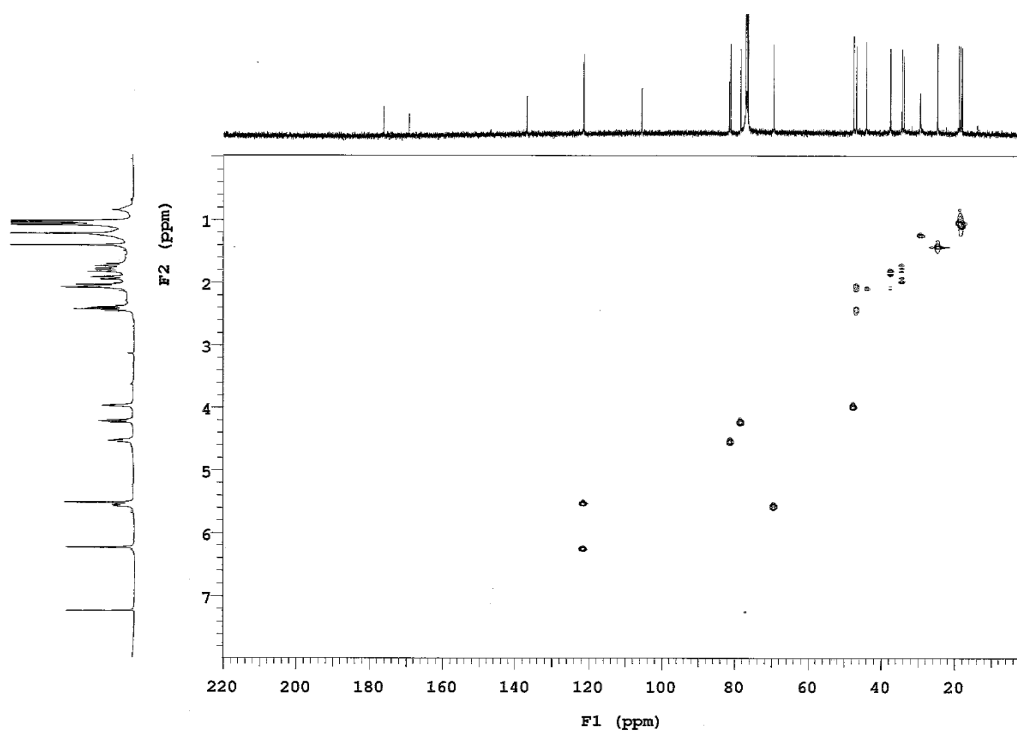


圖 8-4 、 Tagitinin A (2) 之 HMQC 圖譜

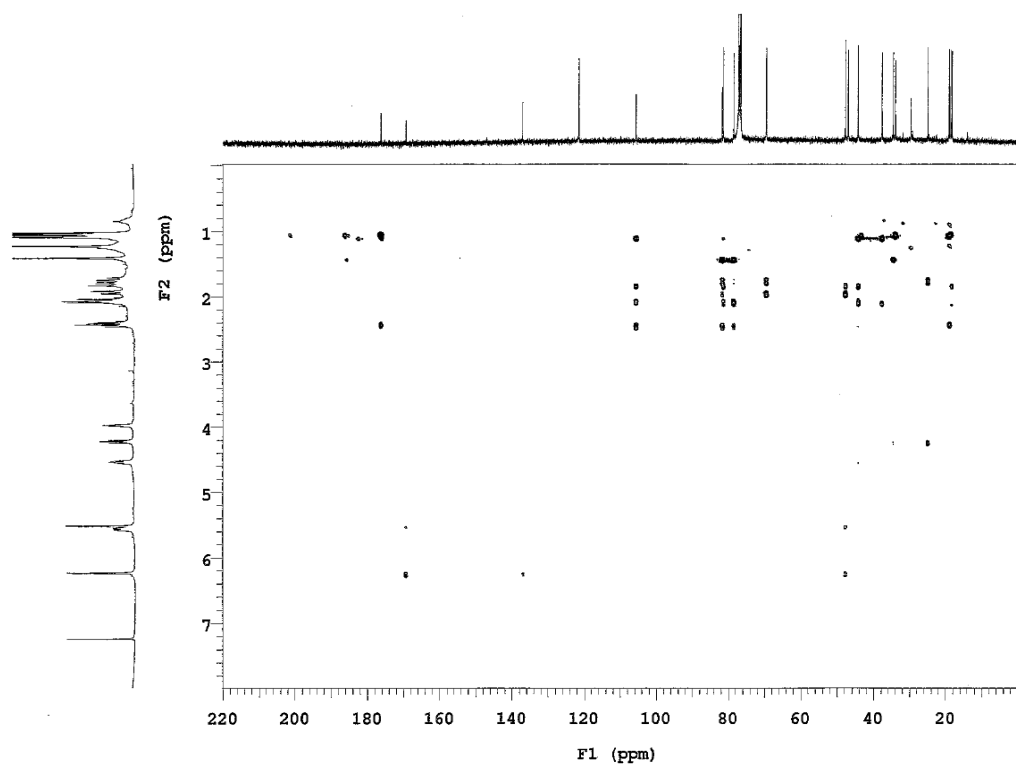


圖 8-5 、 Tagitinin A (2) 之 HMBC 圖譜

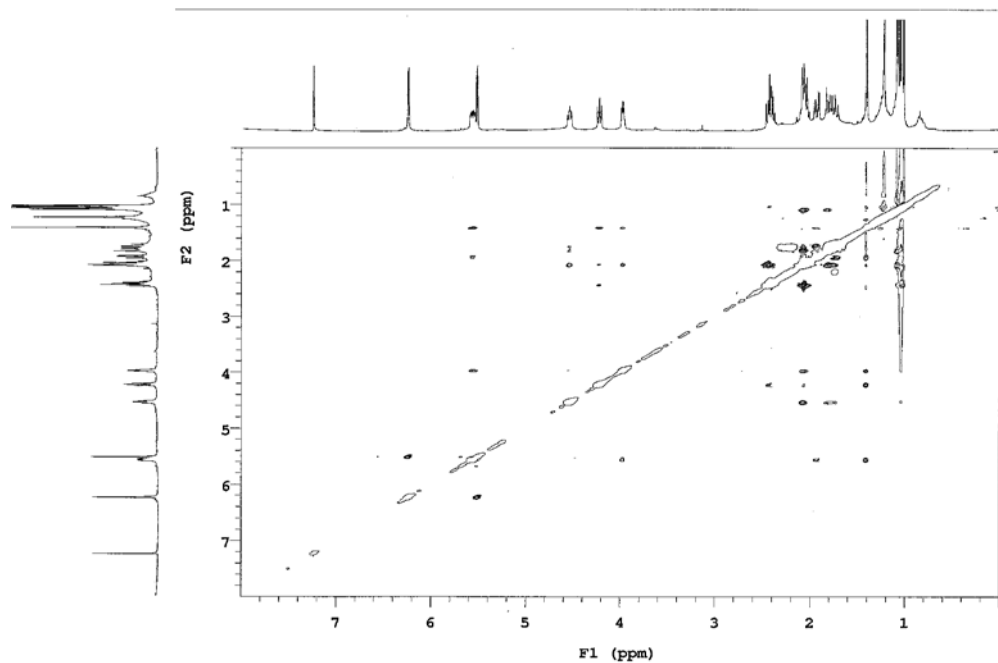


圖 8-6 、 Tagitinin A (2) 之 NOESY 圖譜

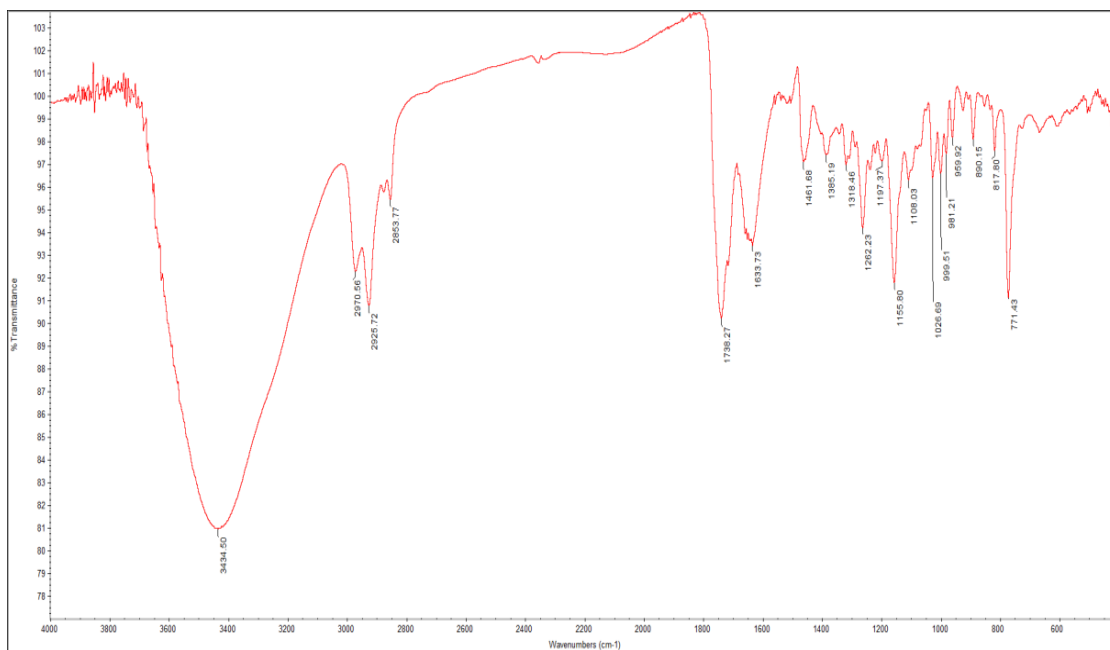


圖 8-7 、 Tagitinin A (2) 之 IR 圖譜

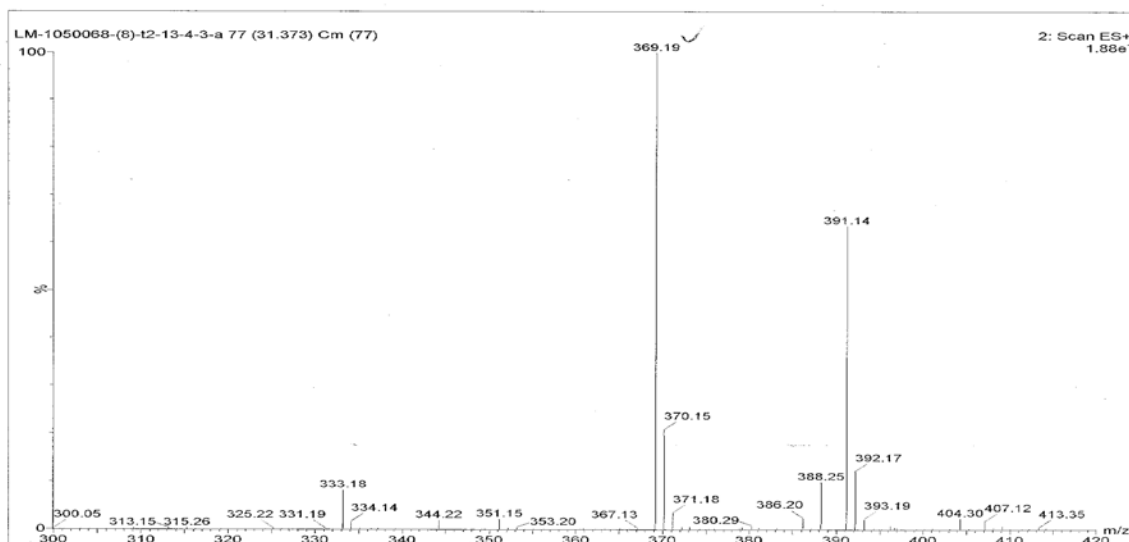
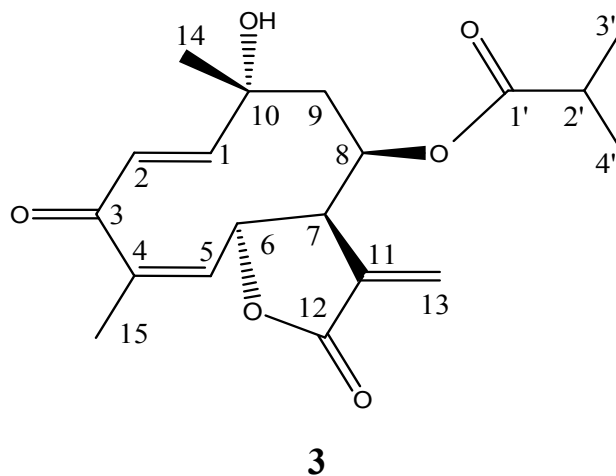


圖 8-8 、 Tagitinin A (2) 之 LRESIMS 圖譜

第三節 Tagitinin C (3) 的結構解析

Tagitinin C (3) 的外觀淡黃色膏狀，其比旋光度 (specific rotation) $[\alpha]_D^{22}$ 為 -202° (c 0.97, MeOH)。在低解析度電子游離法質譜 (LRESIMS) 上觀察到擬分子峰 m/z 為 349.10 $[M+H]^+$ ，331.12 $[M-OH]^+$ ，得知其分子式為 $C_{19}H_{24}O_6$ 。而 UV λ_{max} (MeOH) 在 214 (4.22)、247 (4.04) nm 有吸收。IR 圖譜在 ν_{max} 3446、1733、1653 cm^{-1} 有吸收，推測此化合物含有 hydroxy group (OH)、ester group 和 double bond。

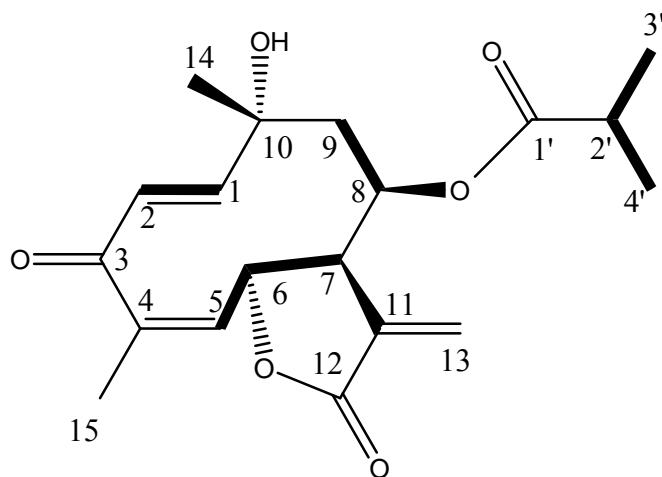


3

在 1H -NMR 圖譜中發現可發現 4 個甲基 (1.53, Me-14; 1.95, Me-15; δ_H 1.06, Me-3'; δ_H 1.04, Me-4'), 3 個雙鍵上的次甲基 H-1、H-2、H-5 (δ_H 6.93、6.25、5.87), 2 個次甲基 H-7、H-2' (δ_H 3.53、2.44), 2 個接氧的次甲基 H-6、H-8 (δ_H 5.41、5.33), 配合 ^{13}C -NMR、DEPT 圖譜發現含有 4 個甲基 C-14、C-15、C-3'、C-4' (δ_C 29.1、19.6、18.7、18.6); 2 個亞甲基 C-9、C-13 (δ_C 48.4、124.4);

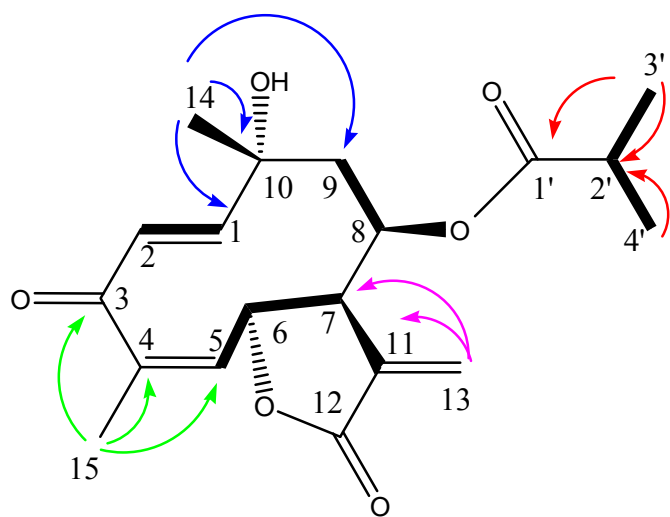
7 個次甲基 C-1、C-2、C-5、C-6、C-7、C-8、C-2' (δ_C 159.7、129.7、137.1、76.6、47.0、75.9、34.0)；6 個四級碳 C-3、C-4、C-10、C-11、C-12、C-1' (δ_C 196.5、138.9、72.1、136.0、169.5、176.1)。

由 ^1H - ^1H COSY 圖譜中發現 H-1/H-2、H-10/H-14、H-8/H-9、H-5/H-6/H-7/H-11、H-2'/H-3'、H-2'/H-4' 之間有氫和氫的關聯訊號，由此可得到分子片段之氫序關係。



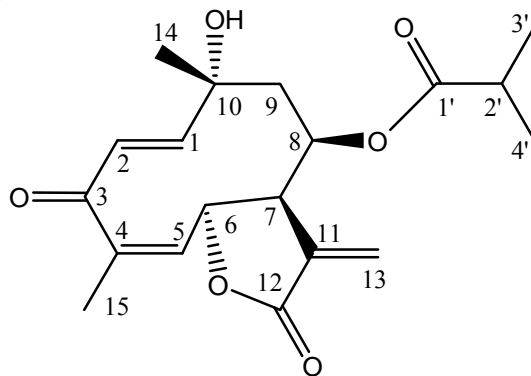
— COSY correlation

由 HMBC 圖譜中發現 H-13/C-7、C-11；H-15/C-3、C-4、C-5；H-14/C-1、C-9、C-10；H-3'/C-1'、C-2'；H-4'/C-2' 有關聯訊號，並將以上圖譜所聯結的片段相連結起來，即解出此化合物之平面結構，經由比對已知的化合物 Tagitinin C，此化合物 **3** 比對早期文獻之 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR、DEPT 圖譜數據，可以確定化合物 **3** 為 Ttagitinin C (Ragasa, Tepora, & Rideout, 2010)，此化合物最早是在 1979 年被發現。Baruah, N. C.; Sharma, R. P.; Madhusudanan, K. P.; Thyagarajan, G.; Herz, W.; Murari, R. J. *Org. Chem.* 1979, 44, 1831-1835，其詳細的 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 數據見表三。



→ HMBC correlation

表三、Tagitinin C (3) ^1H 和 ^{13}C NMR 光譜資料



No.	$^1\text{H}^a$ (mult, J , Hz)	$^{13}\text{C}^b$
1	6.93 (d, 17.6)	59.7
2	6.25 (d, 17.6)	29.7
3		96.5
4		38.9
5	5.87 (d, 9.0)	37.1
6	5.41 (d, 9.0)	76.6
7	3.53 (m)	47.0
8	5.33 (m)	75.9
9	2.01 (dd, 14.1, 4.2)	48.4
	2.41 (dd, 14.1, 4.2)	
10		72.1
11		136.0
12		169.5
13	5.80 (d, 1.8)	124.4
	6.35 (d, 1.8)	
14	1.53 (s)	29.1
15	1.95 (s)	19.6
1'		176.1
2'	2.44 (heptet, 6.8)	34.0
3'	1.06 (d, 6.8)	18.7
4'	1.06 (d, 6.8)	18.6

^aMesaured at 400 MHz

^bMesaured at 100 MHz

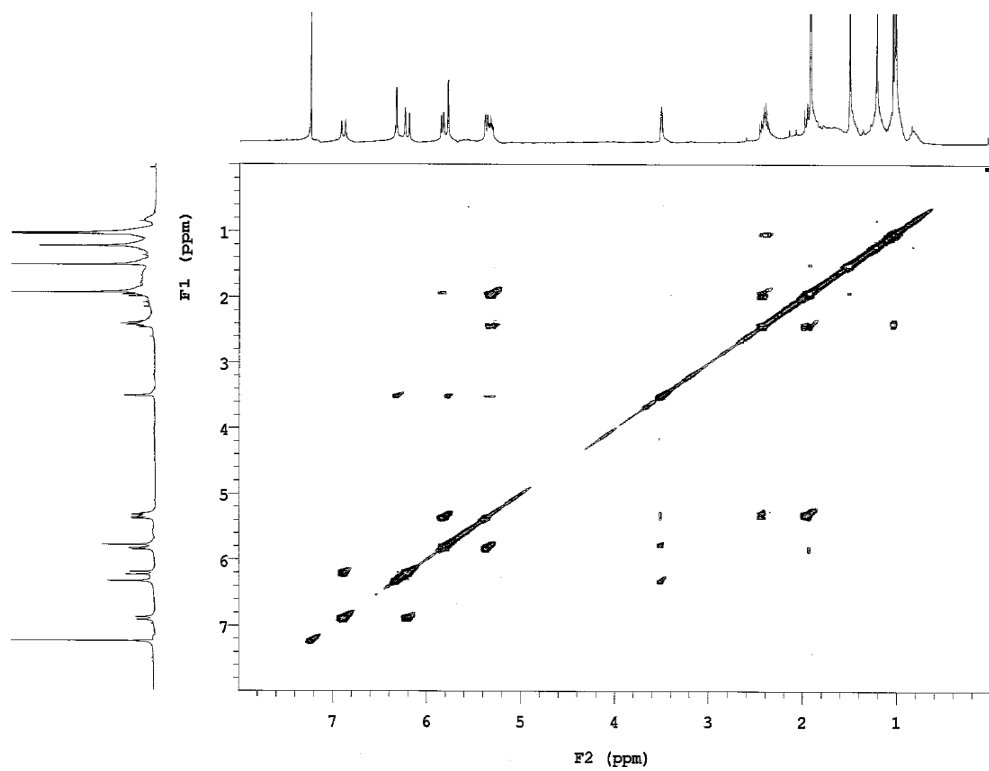


圖 9-3 、Tagitinin C (3) 之 COSY 圖譜

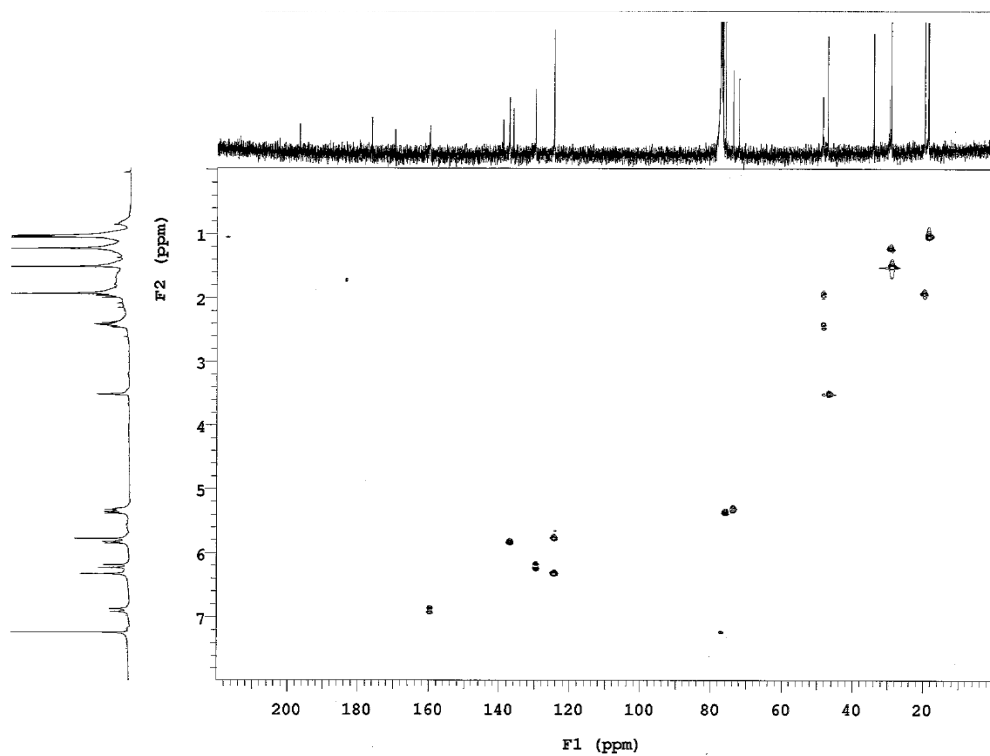


圖 9-4 、Tagitinin C (3) 之 HMQC 圖譜

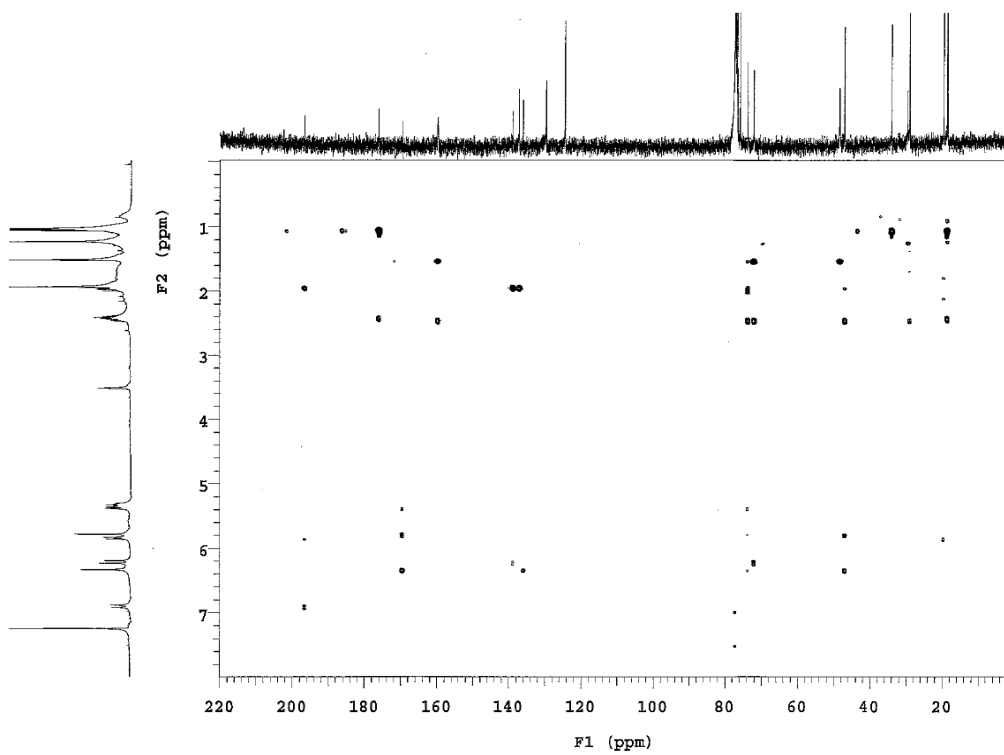


圖 9-5 、 Tagitinin C (3) 之 HMBC 圖譜

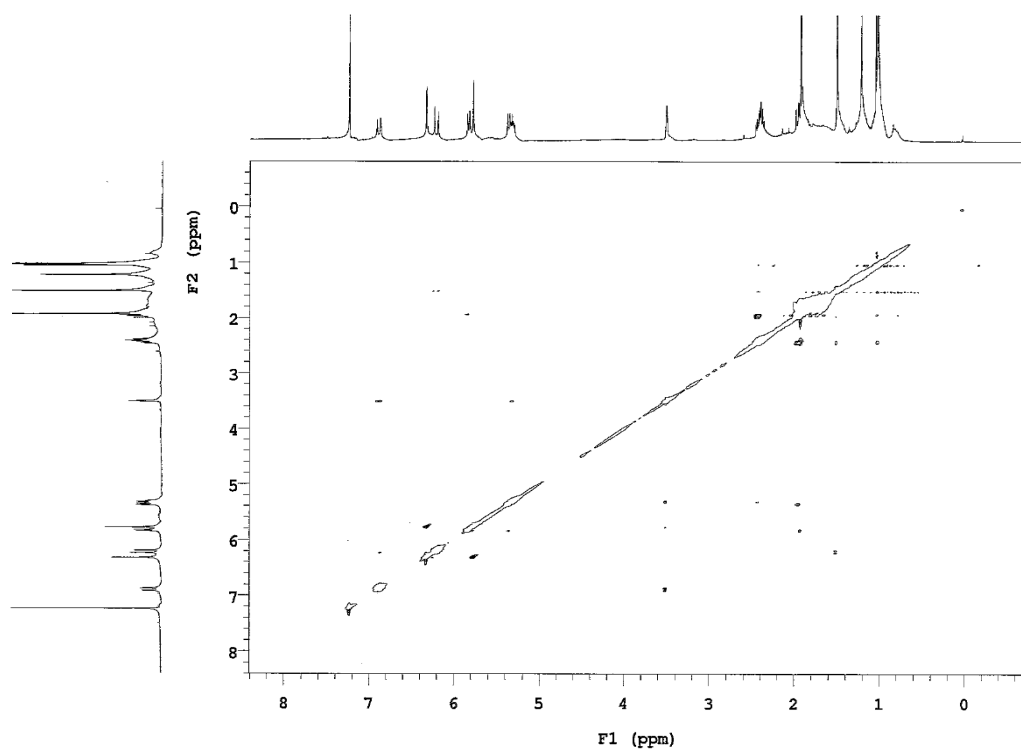


圖 9-6 、 Tagitinin C (3) 之 NOESY 圖譜

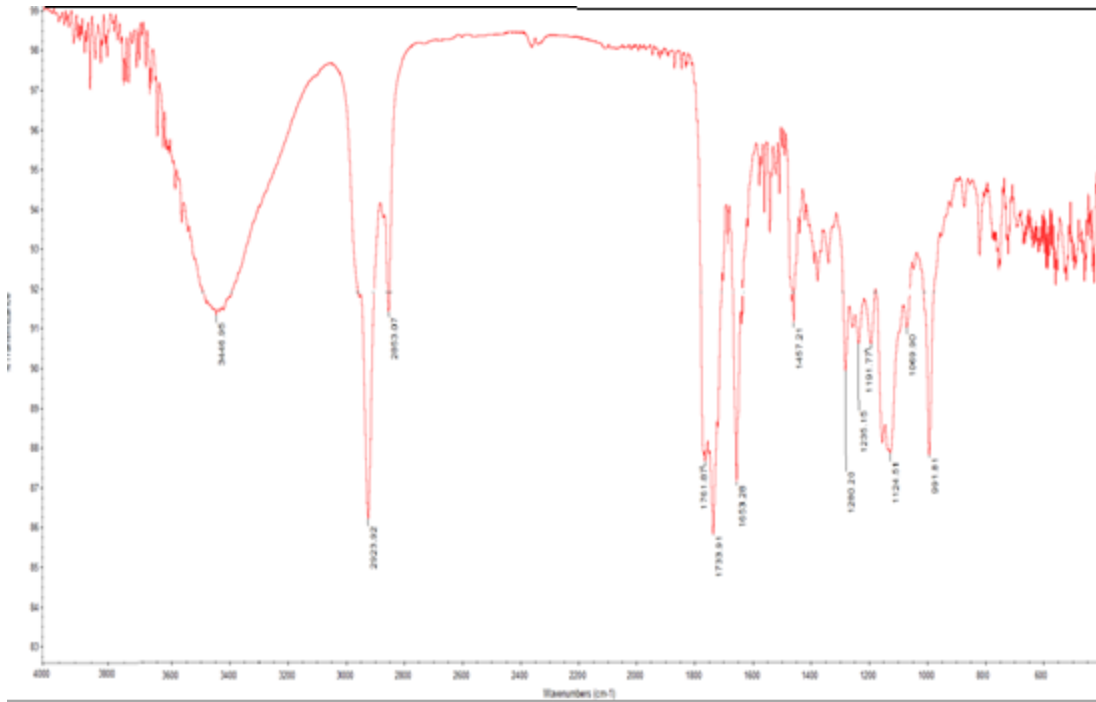


圖 9-7 、 Tagitinin C (3) 之 IR 圖譜

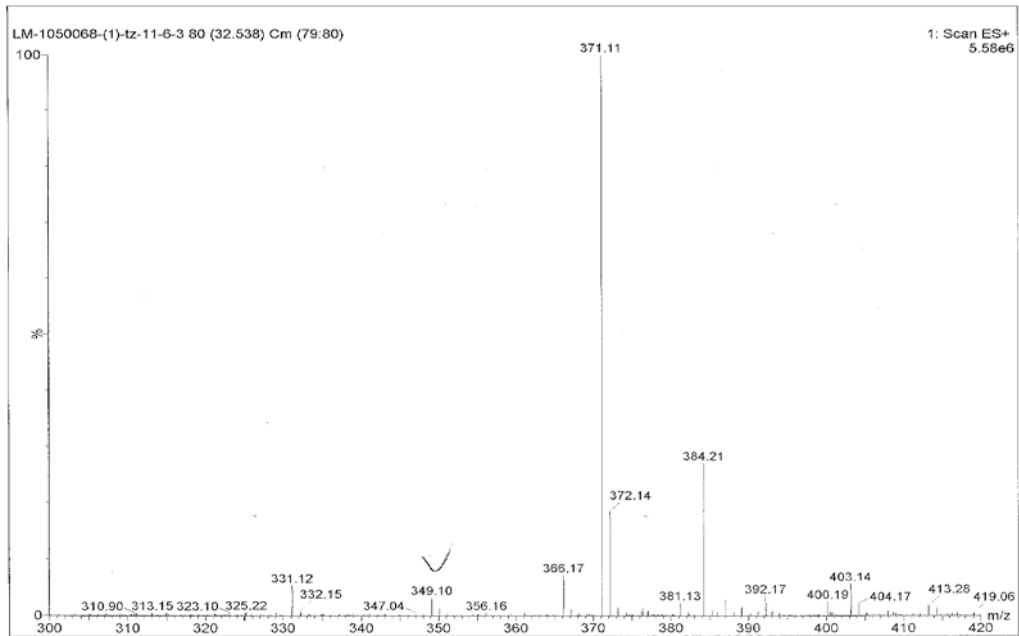
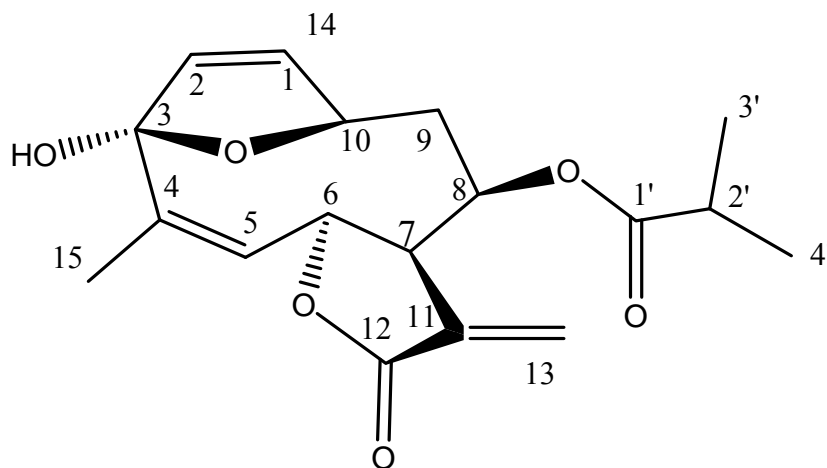


圖 9-8 、 Tagitinin C (3) 之 LRESIMS 圖譜

第四節 Tagitinin F (4) 的結構解析

Tagitinin F (4) 的外觀透明色針狀，其比旋光度 (specific rotation) $[\alpha]_D^{25}$ 為 -132° (c 0.22, MeOH)。在低解析度電子游離法質譜 (LRESIMS) 上觀察到擬分子峰 m/z 為 $349.15[M+H]^+$ ，得知其分子式為 $C_{19}H_{24}O_6$ 。而 UV λ_{max} (MeOH) 在 220 nm 有吸收。IR 圖譜在 ν_{max} 3444、1736、1644 cm^{-1} 有吸收，推測此化合物含有 hydroxy group (OH)、ester group 和 double bond。

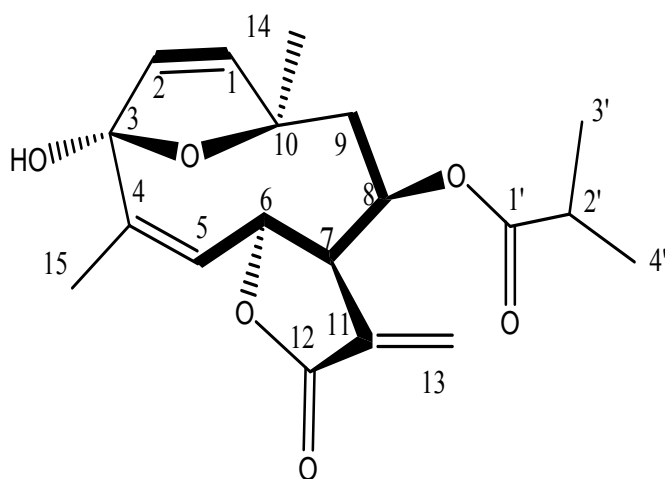


4

在 1H -NMR 圖譜中發現可發現 4 個甲基 (1.43, Me-14 ; 1.96, Me-15 ; δ_H 1.13, Me-3' ; δ_H 1.16, Me-4')，3 個雙鍵上的次甲基 H-1、H-2、H-5 (δ_H 6.33、5.84、5.70)，2 個次甲基 H-7、H-2' (δ_H 3.45、2.51)，2 個接氧的次甲基 H-6、H-8 (δ_H 5.95、5.10)，1 個五環外雙鍵的次甲基 H-13 (δ_H 5.72、6.34)，配合 ^{13}C -NMR、DEPT 圖譜發現含有 4 個甲基 C-14、C-15、C-3'、C-4' (δ_C 31.5、20.5、18.6、18.9)；2 個亞甲基 C-9、C-13 (δ_C 43.7、124.1)；7 個次甲基 C-1、C-2、C-5、C-6、C-7、C-8、C-2' (δ_C 139.3、127.7、131.0、74.5、47.8、76.4、

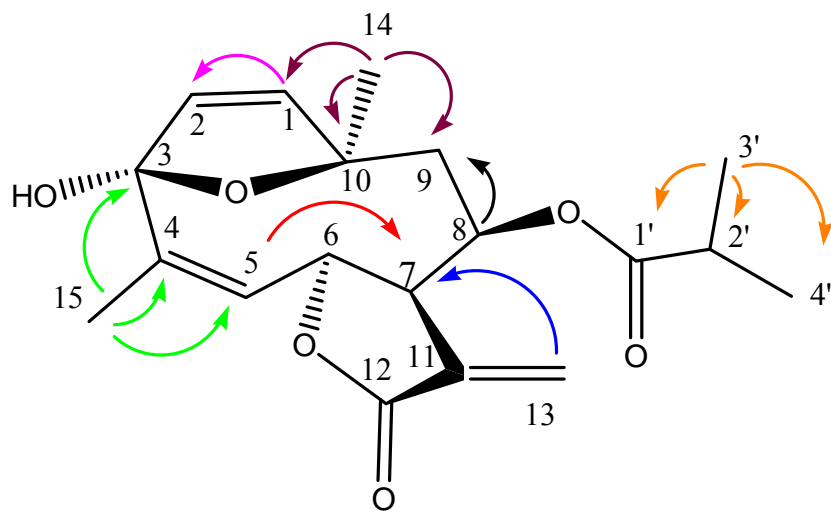
34.2) ; 6 個四級碳 C-3、C-4、C-10、C-11、C-12、C-1' (δ_C 108.3、139.4、87.0、138.8、169.7、175.7)。

由 ^1H - ^1H COSY 圖譜中發現 H-1/H-2、H-5/H-6、H6/H7、H7/H8、H-8/H-9、H-2'/H-3'、H-2'/H-4' 之間有氫和氫的關聯訊號，由此可得到分子片段之氫序關係。



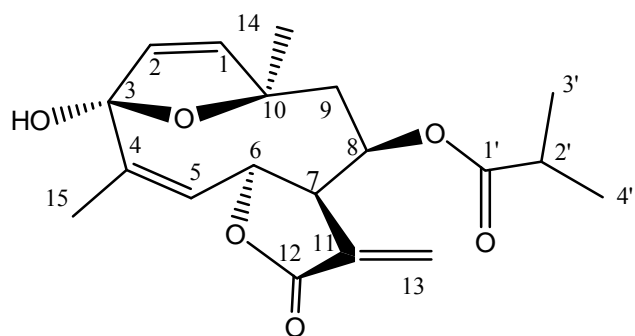
— COSY correlation

由 HMBC 圖譜中發現 H-1/C-2、C-10 ; H-14/C-1、C-9、C-10 ; H-15/C-3、C-4、C-5 ; H-5/C-7 ; H-13/C-7 ; H-3'/C-1'、C-2、C-4'有關聯訊號，並將以上圖譜所聯結的片段相連結起來，即解出此化合物之平面結構，經由比對已知的化合物 Tagitinin F，此化合物 **4** 比對早期文獻之 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR、DEPT 圖譜數據，可以確定化合物 **4** 為 Tagitinin F (吳天賞 et al;2001)。此化合物最早是在 1983 年被發現。(Tetrahedron Letters, Vo1.24,No.48,pp 5429-5432,1983)，其詳細的 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 數據見表四。



—————> HMBC correlation

表四、Tagitinin F (4) ^1H 和 ^{13}C NMR 光譜資料



No.	$^1\text{H}^{\text{a}}$ (mult, J , Hz)	$^{13}\text{C}^{\text{b}}$
1	6.33 (d, 5.6)	139.3
2	5.84 (d, 5.6)	127.7
3		108.3
4		139.4
5	5.70 (dd, 6.8, 1.2)	131.0
6	5.95 (m)	74.5
7	3.45 (dd, 4.8, 2.4)	47.8
8	5.10 (m)	76.4
9	2.34 (dd, 16.0, 3.2) 2.29 (dd, 16.0, 4.0)	43.7
10		87.0
11		138.8
12		169.7
13	5.72 (d, 2.4) 6.34 (d, 2.4)	124.1
14	1.43 (s)	31.5
15	1.96 (s)	20.5
1'		175.7
2'	2.51 (heptet, 7.2)	34.2
3'	1.13 (d, 7.2)	18.6
4'	1.16 (d, 7.2)	18.9

^aMesaured at 400 MHz

^bMesaured at 100 MHz

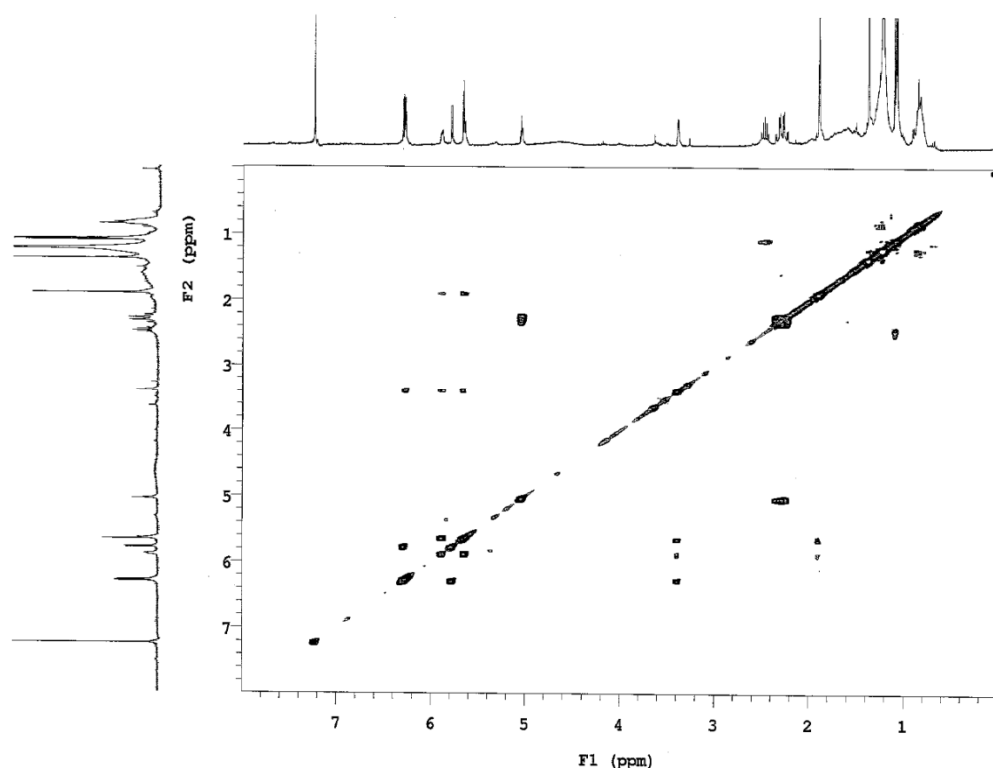


圖 10-3 、 Tagitinin F (4) 之 COSY 圖譜

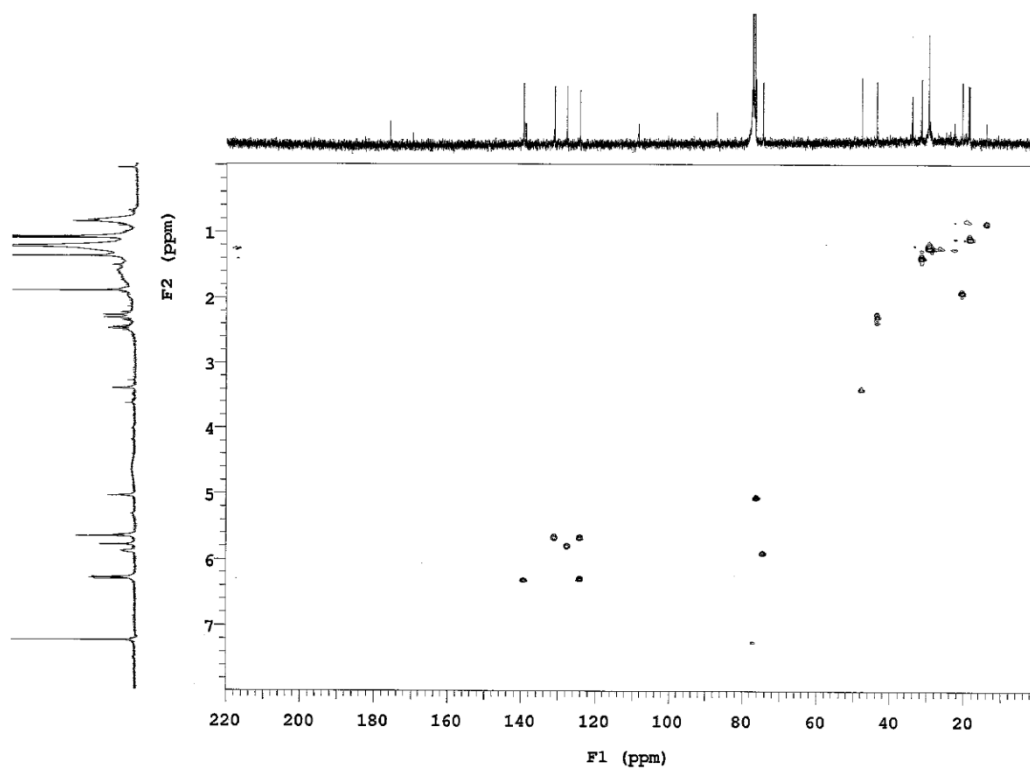


圖 10-4 、 Tagitinin F (4) 之 HMQC 圖譜

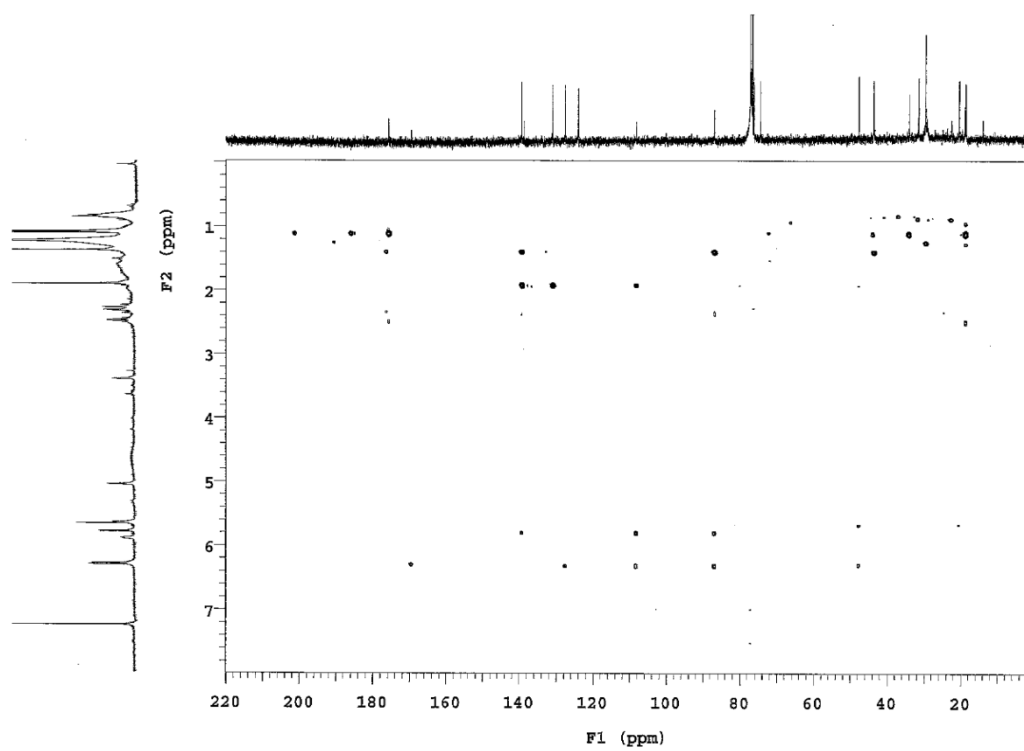


圖 10-5 、 Tagitinin F (4) 之 HMBC 圖譜

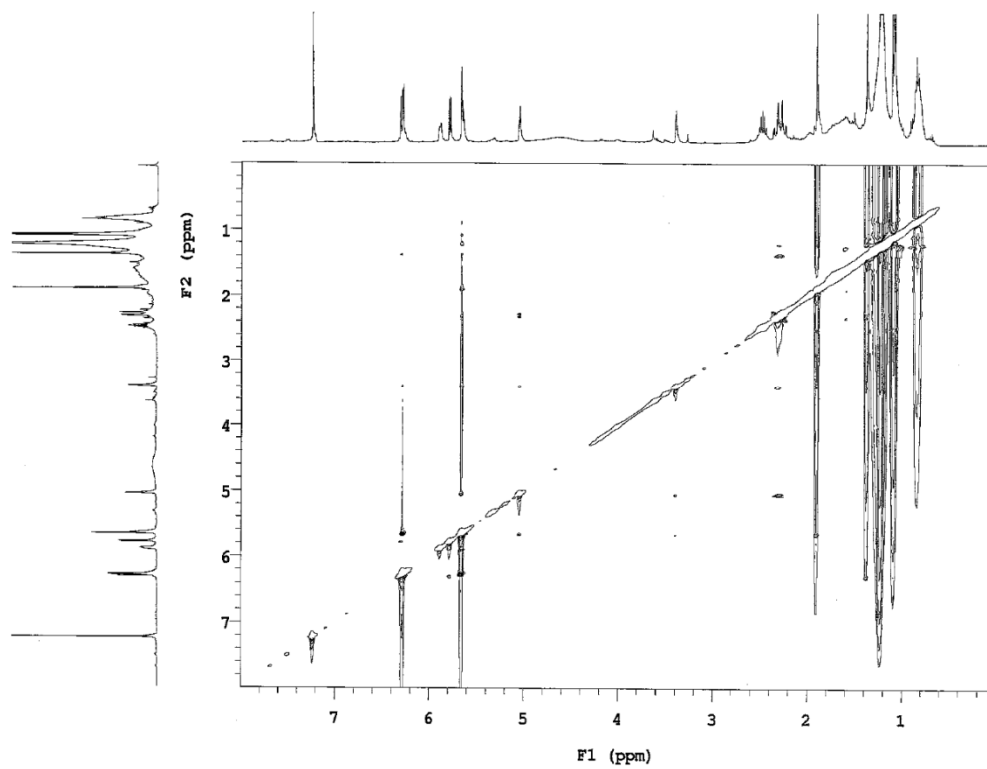


圖 10-6 、 Tagitinin F (4) 之 NOESY 圖譜

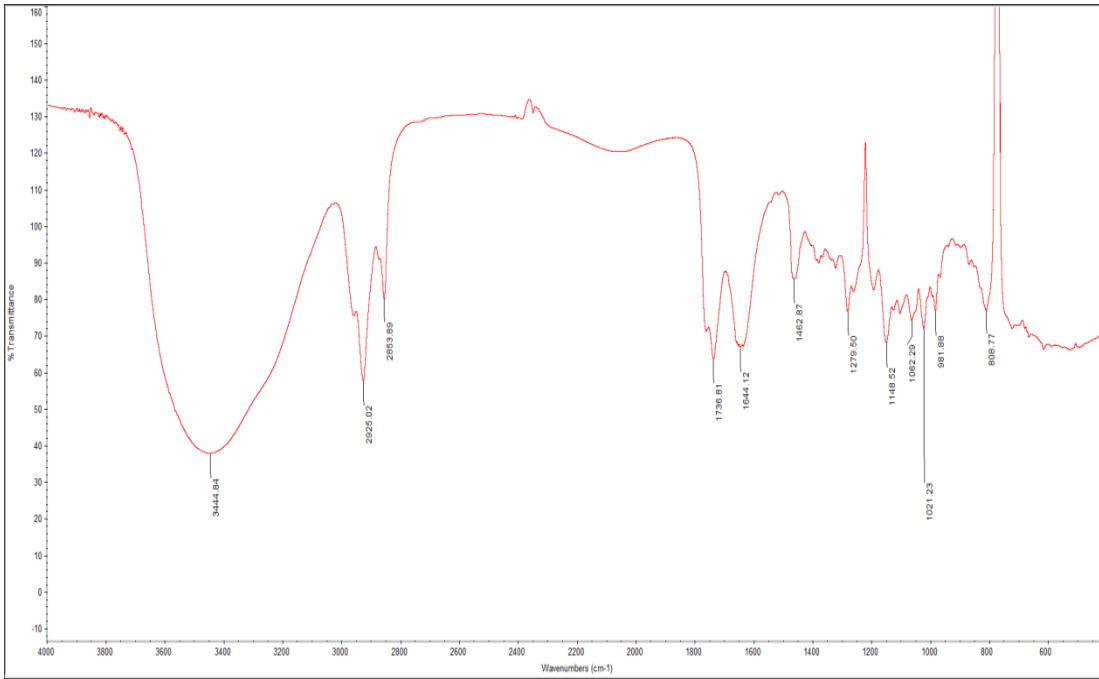


圖 10-7 、 Tagitinin F (4) 之 IR 圖譜

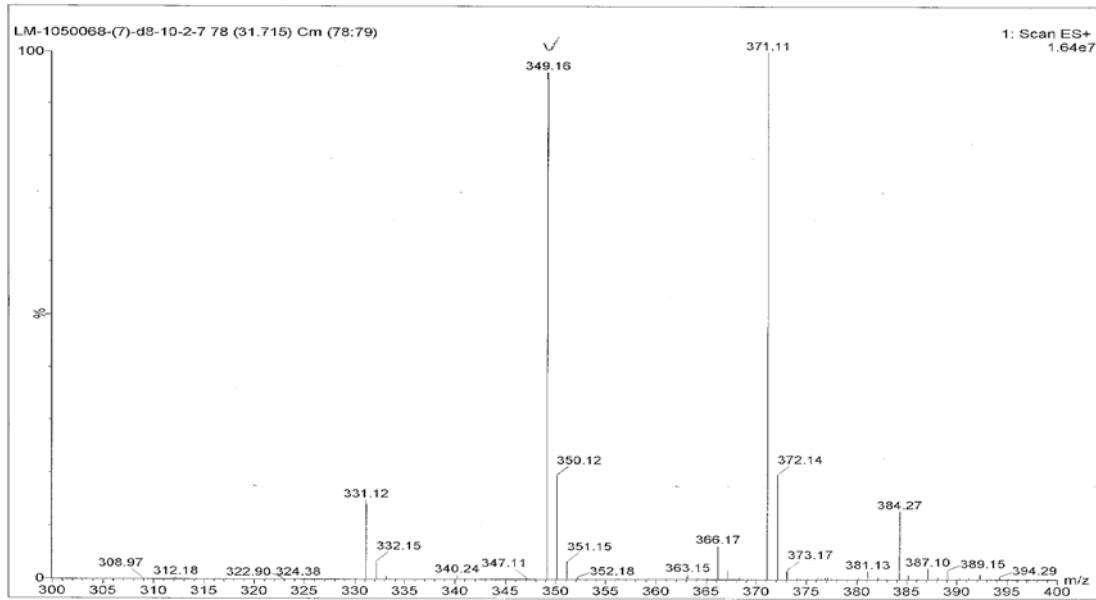
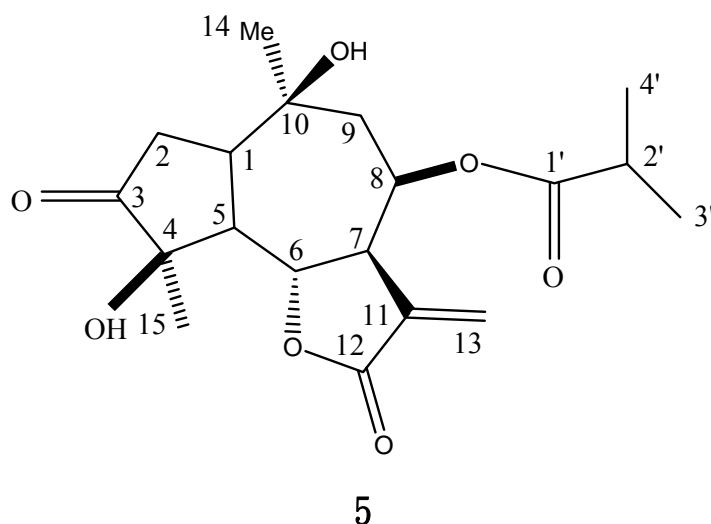


圖 10-8 、 Tagitinin F (4) 之 LRESIMS 圖譜

第五節 4 β , 10 β – dihydroxy – 3 – oxo – 8 β – isobutyroyloxyguaia-11(13)-en-6,12-olide (5) 的結構解析

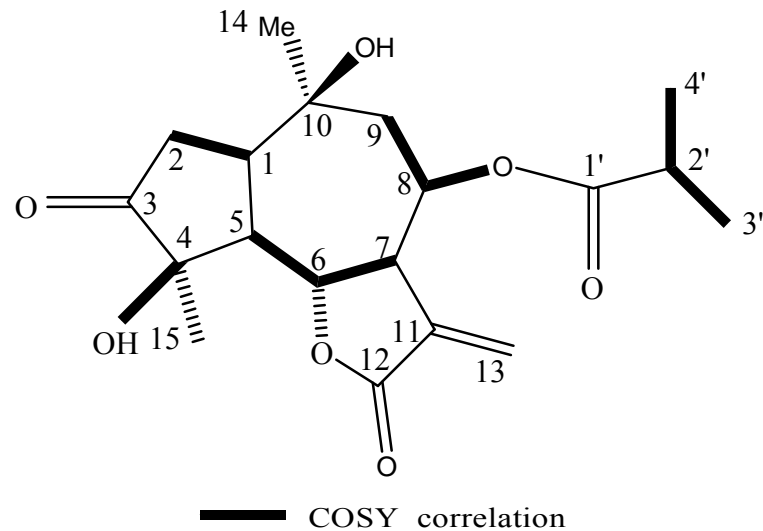
4 β ,10 β -dihydroxy-3-oxo-8-isobutyroyloxyguaia-11(13)-en-6,12-olide (5) 的外觀白色粉狀，其比旋光度 (specific rotation) $[\alpha]_D^{26}$ 為 -160° (c 0.86, MeOH)。在低解析度電子游離法質譜 (LRESIMS) 上觀察到擬分子峰 m/z 為 367.13 $[M+H]^+$ ，得知其分子式為 $C_{19}H_{27}O_7$ 。而 UV λ_{max} (MeOH) 在 211 (2.68) nm 有吸收；IR 圖譜在 ν_{max} 3424、1739、1635 cm^{-1} 有吸收，推測此化合物含有 hydroxy group (OH)、ester group 和 double bond。



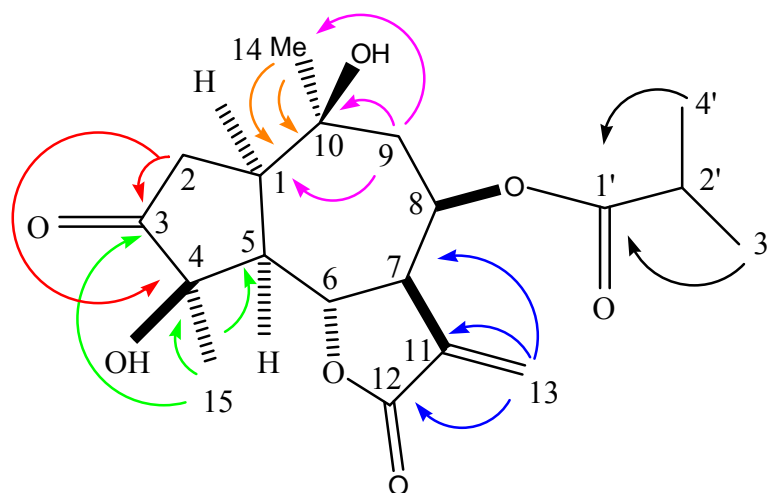
在 1H -NMR 圖譜中發現可發現 4 個甲基 (δ_H 1.29, Me-14、 δ_H 1.51, Me-15、 δ_H 1.05, Me-3'； δ_H 1.05, Me-4')，1 個五環外雙鍵的亞甲基的結構 H-13 (δ_H 5.41, 6.23)，2 個接氧的次甲基 H-6、H-8 (δ_H 4.74、5.59)，4 個次甲基 H-1、H-5、H-7、H-2' (δ_H 2.25、2.25、3.74、2.44)，配合 ^{13}C -NMR、DEPT 圖譜發現含有 4 個甲基 C-14、C-15、C-3'、C-4' (δ_C 32.0、22.7、18.8、19.1)；3 個亞甲基 C-2、C-9、C-13 (δ_C 39.3、47.0、120.7)；6 個次甲基 C-1、C-5、C-6、C-7、C-8、

C-2' (δ_C 45.3、53.3、77.0、47.7、65.3、34.0)；6 個四級碳 C-3、C-4、C-10、C-11、C-12、C-1' (δ_C 214.3、77.3、71.2、134.9、169.4、176.3)。

由 ^1H - ^1H COSY 圖譜中發現 H-1/H-2、H-5/H-6、H-6/H-7、H-8/H-9 以及 H-2'/H-3'/H-4' 之間有氫和氫的關聯訊號，由此可得到分子片段之氫序關係。

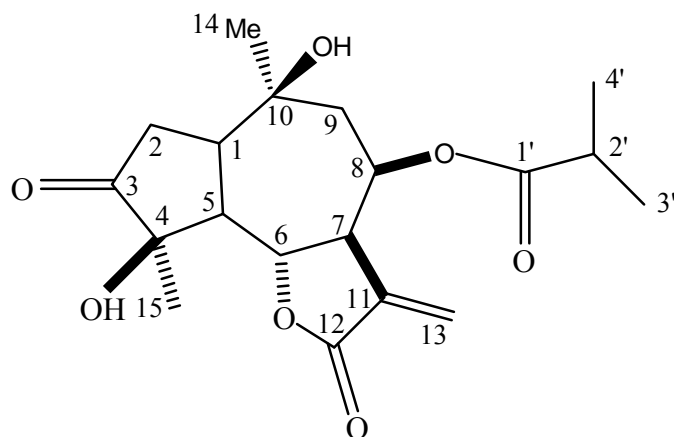


由 HMBC 圖譜中發現 H-14/C-1、C-10；H-9/C-1、C-10、C-14；H-2/C-3、C-4；H-15/C-3、C-4、C-5；H-13/C-7、C-11、C-12；H-4'/C-1'；H-3'/C-1' 有關聯訊號，並將以上圖譜所聯結的片段相連結起來，即解出此化合物之平面結構。此化合物 **5** 經由比對早期文獻之 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR 圖譜數據，可以確定化合物 **5** 為 4 β ,10 β -dihydroxy-3-oxo-8-isobutyryloxyguaia-11(13)-en-6,12-olide (**5**)，此化合物是在 2007 年被發現 (Kuroda et al., 2007)，其詳細的 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 數據見表五。



→ HMBC correlation

表五、4 β ,10 β -dihydroxy-3-oxo-8 β -
isobutyroyloxyguaia-11(13)-en-6,12-olide(5)
¹H 和 ¹³C NMR 光譜資料



No.	¹ H ^a (mult, <i>J</i> , Hz)	¹³ C ^b
1	2.25 (m)	45.3
2	2.27 (m)	39.3
	2.46 (m)	
3		214.3
4		77.3
5	2.25 (m)	53.3
6	4.74 (dd, 9.7, 9.7)	77.0
7	3.74 (m)	47.7
8	5.59 (m)	65.3
9	1.60 (dd, 16.4, 4.8)	47.0
	2.54 (dd, 16.4, 9.2)	
10		71.2
11		134.9
12		169.4
13	5.41 (d, 3.2)	120.7
	6.23 (d, 3.2)	
14	1.29 (s)	32.0
15	1.51 (s)	22.7
1'		176.3
2'	2.44 (heptet, 7.0)	34.0
3'	1.05 (d, 7.0)	18.8
4'	1.05 (d, 7.0)	19.1

^aMesaured at 400 MHz

^bMesaured at 100 MHz

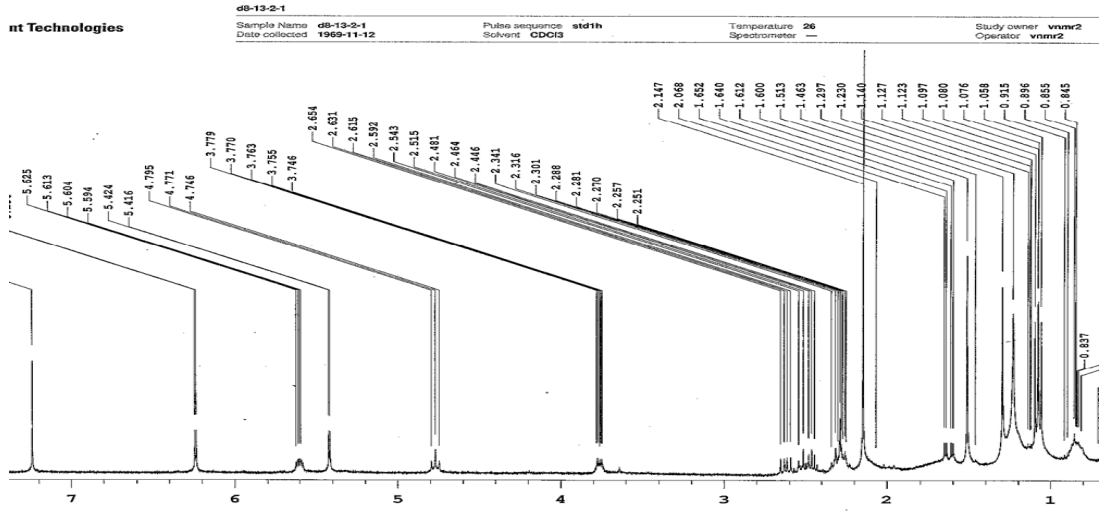


圖 11-1 、4β,10β-dihydroxy-3-oxo-8-isobutyroyloxyguaia-11(13)-en-6,12-olide (5) 之 ¹H NMR 圖譜

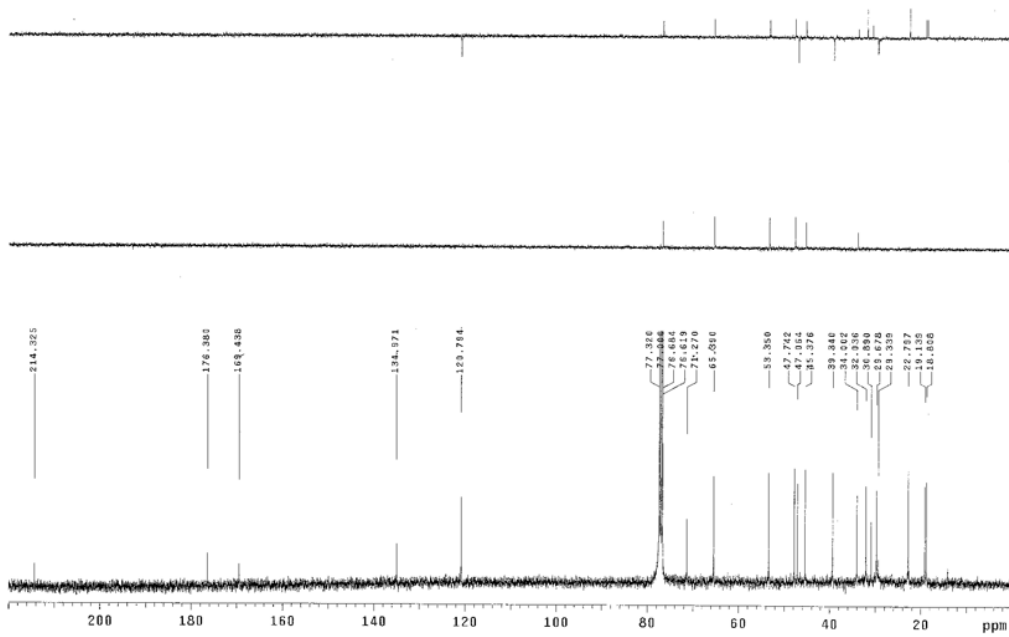


圖 11-2 、4β,10β-dihydroxy-3-oxo-8-isobutyroyloxyguaia-11(13)-en-6,12-olide (5) 之 ¹³C NMR 圖譜

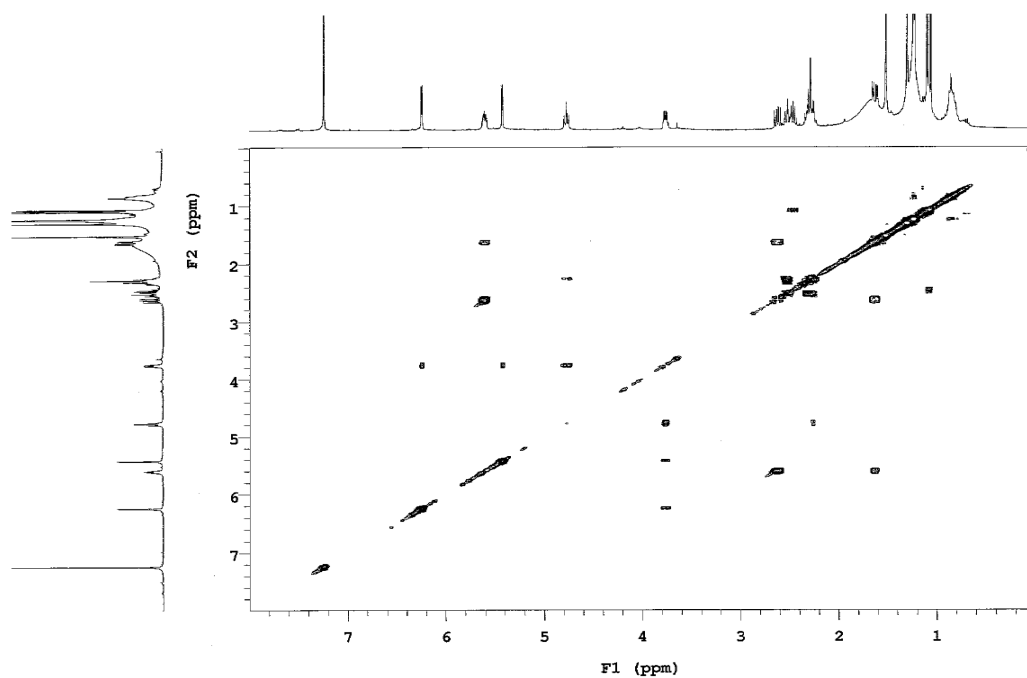


圖 11-3 、 4 β ,10 β -dihydroxy-3-oxo-8-isobutyroyloxyguaia-11(13)-
en-6,12-olide (5) 之 COSY 圖譜

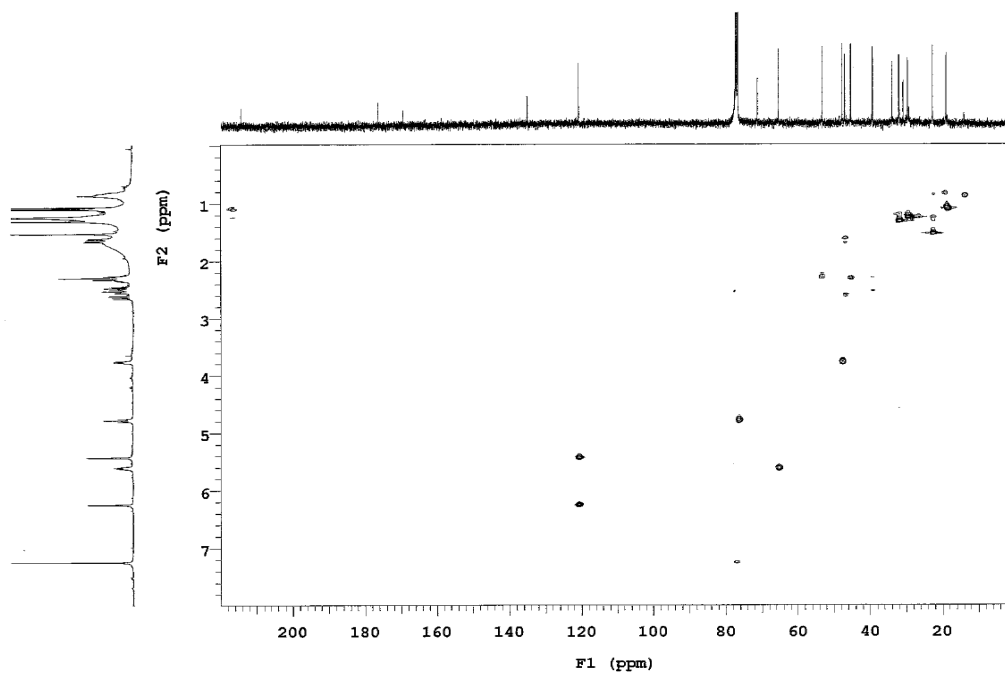


圖 11-4 、 4 β ,10 β -dihydroxy-3-oxo-8-isobutyroyloxyguaia-11(13)-
en-6,12-olide (5) 之 HMQC 圖譜

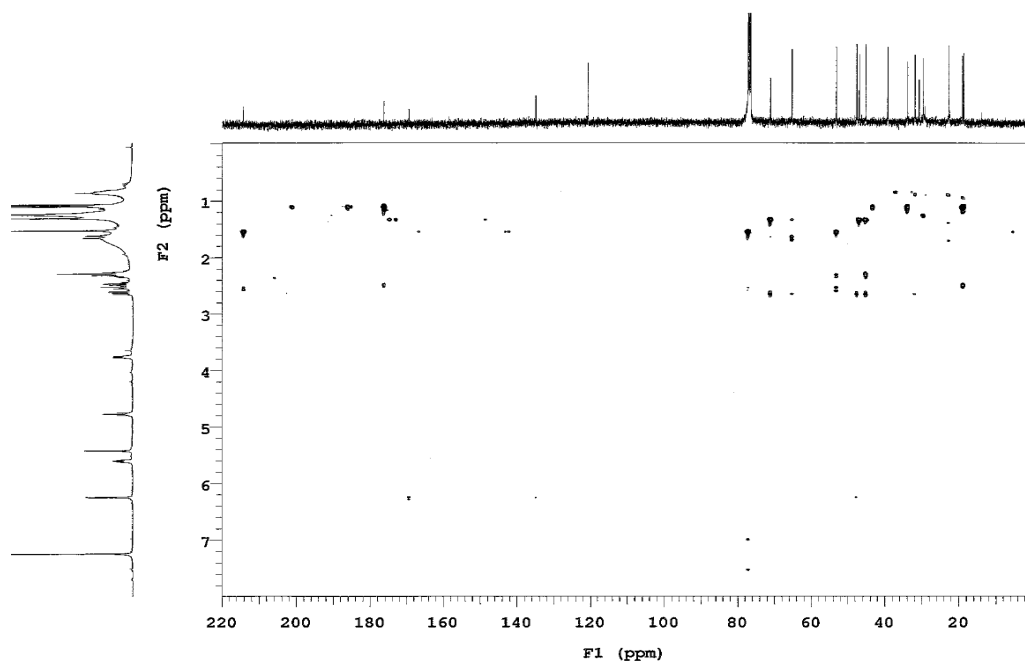


圖 11-5 、 4 β ,10 β -dihydroxy-3-oxo-8-isobutyroyloxyguaia-11(13)-
en-6,12-olide (5) 之 HMBC 圖譜

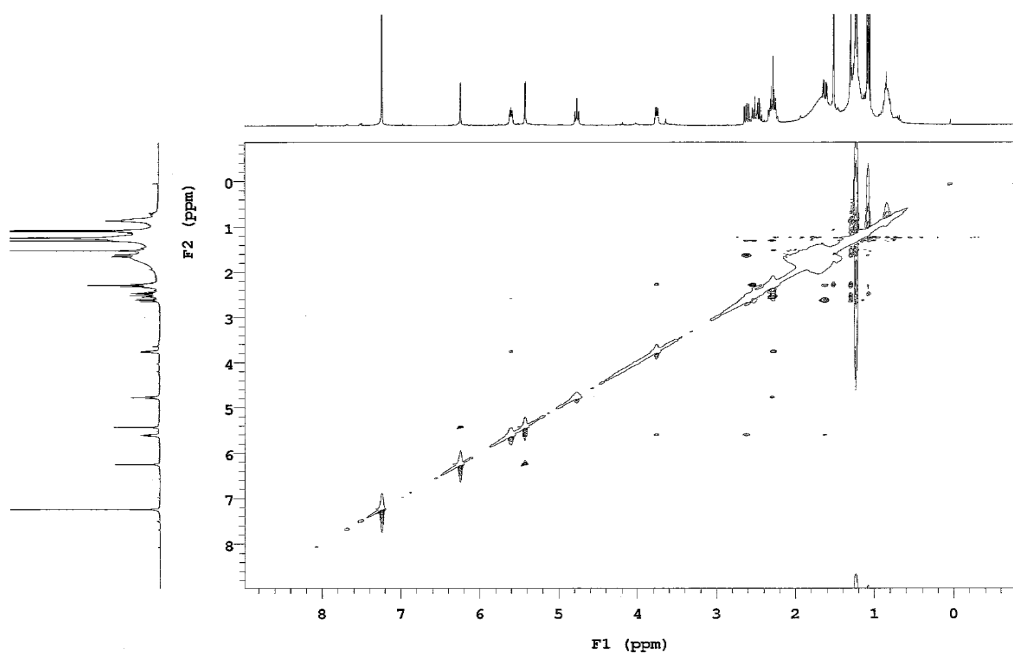


圖 11-6 、 4 β ,10 β -dihydroxy-3-oxo-8-isobutyroyloxyguaia-11(13)-
en-6,12-olide (5) 之 NOESY 圖譜

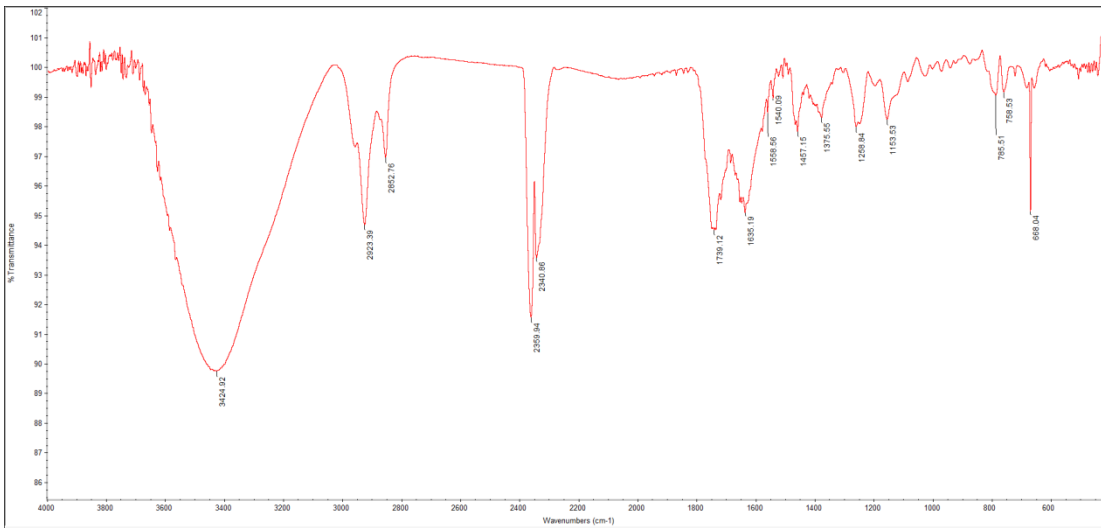


圖 11-7、 $4\beta,10\beta$ -dihydroxy-3-oxo-8-isobutyroyloxyguaia-11(13)-
en-6,12-olide (5) 之 IR 圖譜

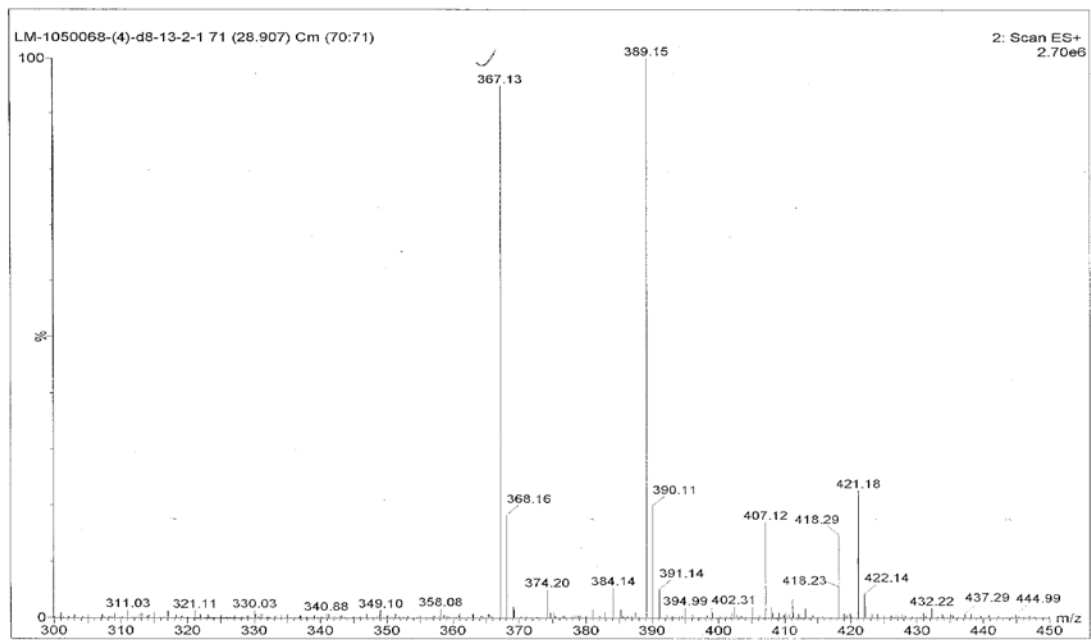
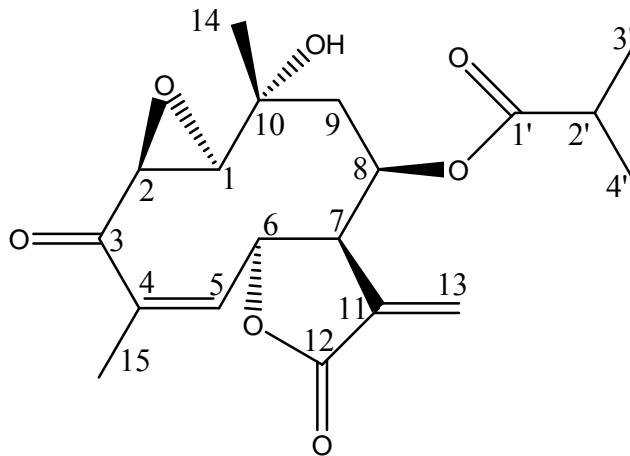


圖 11-8、 $4\beta,10\beta$ -dihydroxy-3-oxo-8-isobutyroyloxyguaia-11(13)-
en-6,12-olide (5) 之 LRESIMS 圖譜

第六節 Tagitinin G (6) 的結構解析

Tagitinin G (6) 的外觀透明無色，其比旋光度 (specific rotation) $[\alpha]_D^{22}$ 為 -134° (c 0.30, CHCl_3)。在低解析電灑式質譜 (LRESIMS) 上觀察到擬分子峰 m/z 為 365.14 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ，得知其分子式為 $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_7$ 。IR 圖譜在 ν_{ma} 1728、1678 cm^{-1} 有吸收，推測此化合物含有 ester group 和 double bond。

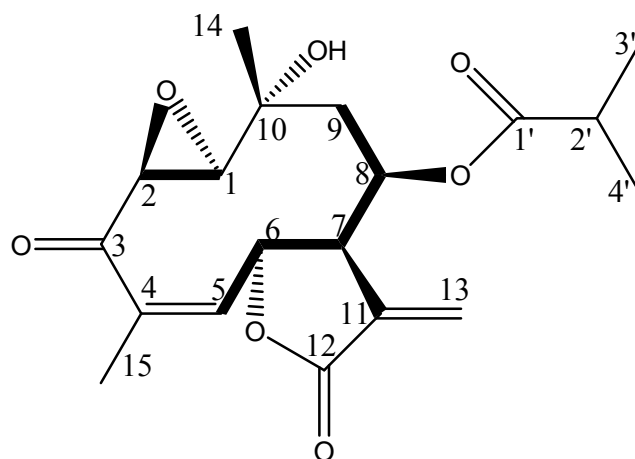


6

在 $^1\text{H-NMR}$ 圖譜中發現可發現 4 個甲基 (1.23, Me-14; 1.96, Me-15; δ_{H} 1.13, Me-3'; δ_{H} 1.13, Me-4'), 1 個雙鍵上的次甲基 H-5 (δ_{H} 6.41), 4 個接氧的次甲

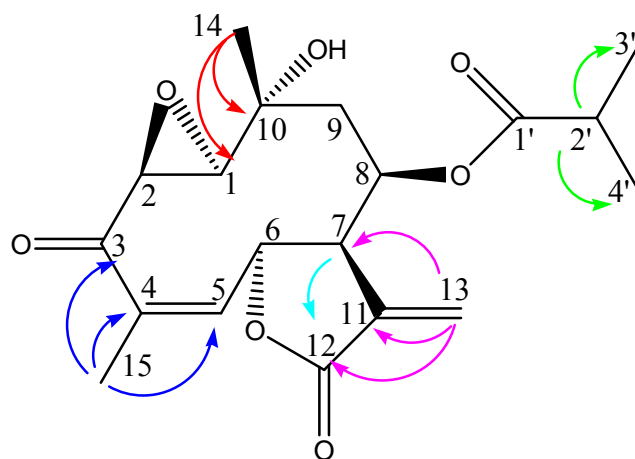
基 H-1, H-2, H-6, H-8 (δ_{H} 3.65, 3.24, 5.42, 5.66), 2 個次甲基 H-7, H-2' (δ_{H} 3.26, 2.48), 配合 ^{13}C -NMR、DEPT 圖譜發現含有 4 個甲基 C-14、C-15、C-3'、C-4' (δ_{C} 25.9, 20.2, 18.6, 18.6); 2 個亞甲基 C-9、C-13 (δ_{C} 42.2, 124.9); 7 個次甲基 C-1、C-2、C-5、C-6、C-7、C-8、C-2' (δ_{C} 58.1, 65.5, 141.5, 73.2, 49.6, 75.1, 34.0); 6 個四級碳 C-3、C-4、C-10、C-11、C-12、C-1' (δ_{C} 193.6, 137.0, 70.0, 135.6, 168.9, 176.1)。

由 ^1H - ^1H COSY 圖譜中發現 H-1/H-2、H-5/H-6、H-6/H-7、H-7/H-8 以及 H-8/H-9 之間有氫和氫的關聯訊號，由此可得到分子片段之氫序關係。



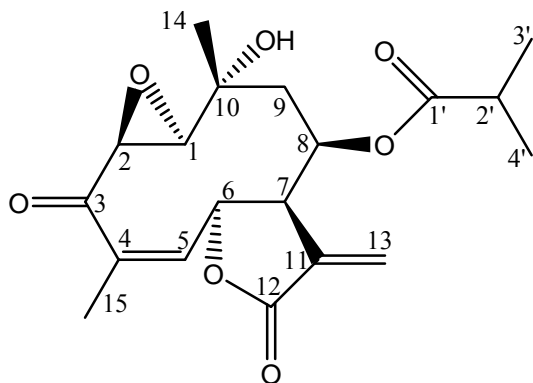
— COSY correlation

由 HMBC 圖譜中發現 H-13/C-7、C-11、C-12; H-14/C-1、C-9、C-10; H-15/C-3、C-4、C-5; H-14/C-1、C-9、C-10; H-2'/C-3'; H-2'/C-4' 有關聯訊號，並將以上圖譜所聯結的片段相連結起來，即解出此化合物之平面結構，經由比對已知的化合物 Tagitinin G，此化合物 **6** 比對早期文獻之 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR、DEPT 圖譜數據，可以確定化合物 **6** 為 Tagitinin G (Zhao, Li, Chen, Xi, & Sun, 2012)，此化合物最早是在 1980 年被發表。 (*Journal of Organic Chemistry*, 1980, vol. 45, # 24 p. 4993–4997)，其詳細的 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 數據見表六。



—————> HMBC correlation

表六、Tagitinin G (6) ^1H 和 ^{13}C NMR 光譜資料



No.	$^1\text{H}^a$ (mult, J , Hz)	$^{13}\text{C}^b$
1	3.65 (s)	58.1
2	3.24 (d, 2.0)	65.5
3		193.6
4		137.0
5	6.41 (dd, 6.8, 1.2)	141.5
6	5.42 (m)	73.2
7	3.26 (dd, 4.8, 2.4)	49.6
8	5.66 (m)	75.1
9	2.17 (dd, 15.6, 4.8)	42.2
	2.13 (m)	
10		70.0
11		135.6
12		168.9
13	5.88 (d, 2.4)	124.9
	6.39 (d, 2.4)	
14	1.23 (s)	25.9
15	1.96 (s)	20.0
1'		176.1
2'	2.48 (heptet, 7.2)	34.0
3'	1.13 (d, 7.2)	18.6
4'	1.13 (d, 7.2)	18.6

^aMesaured at 400 MHz

^bMesaured at 100 MHz

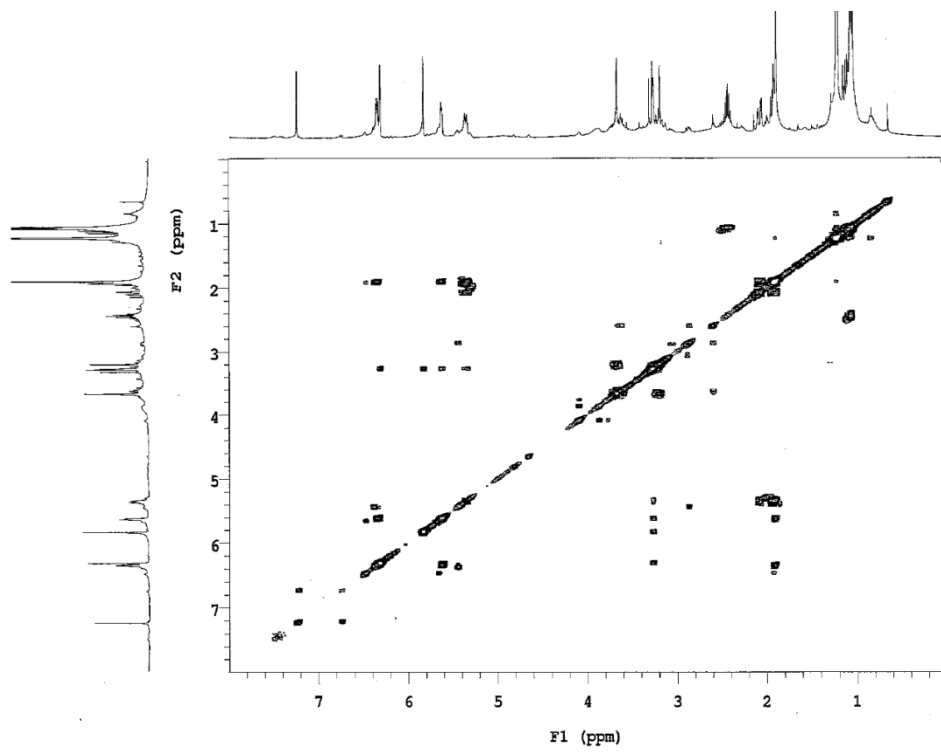


圖 12-3 、Tagitinin G (6) 之 COSY 圖譜

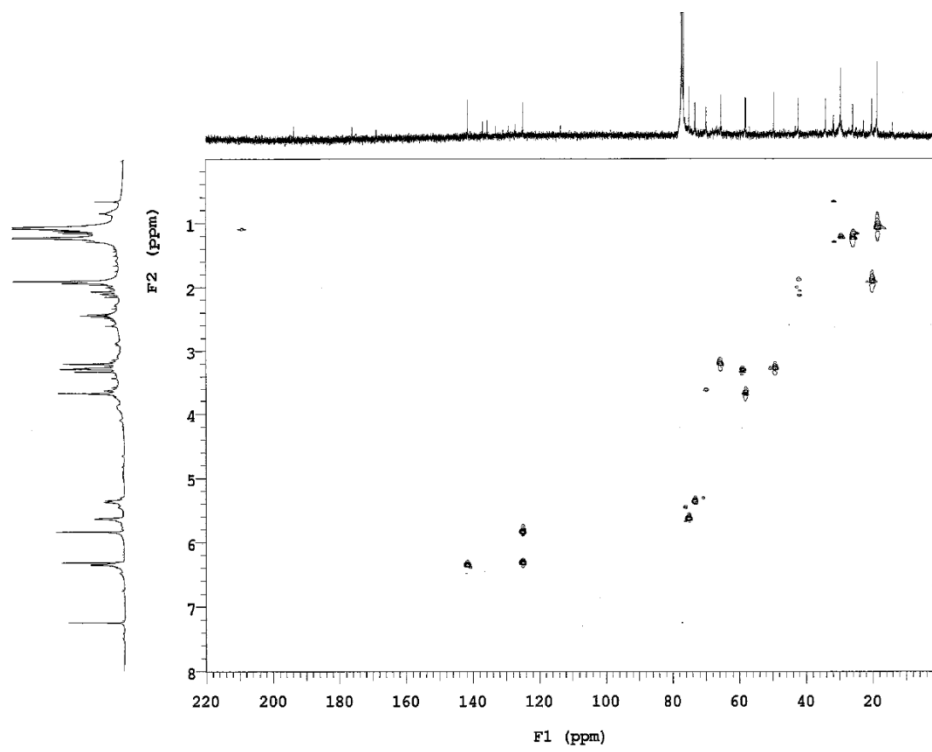


圖 12-4 、Tagitinin G (6) 之 HMBC 圖譜

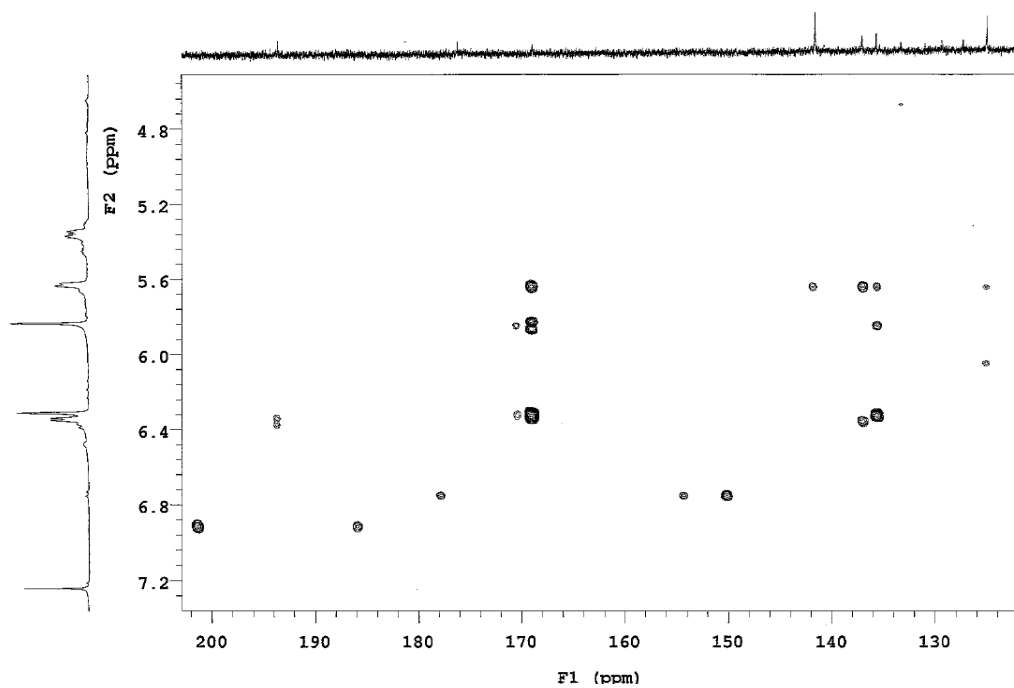


圖 12-5 、 Tagitinin G (6) 之 HMBC 圖譜

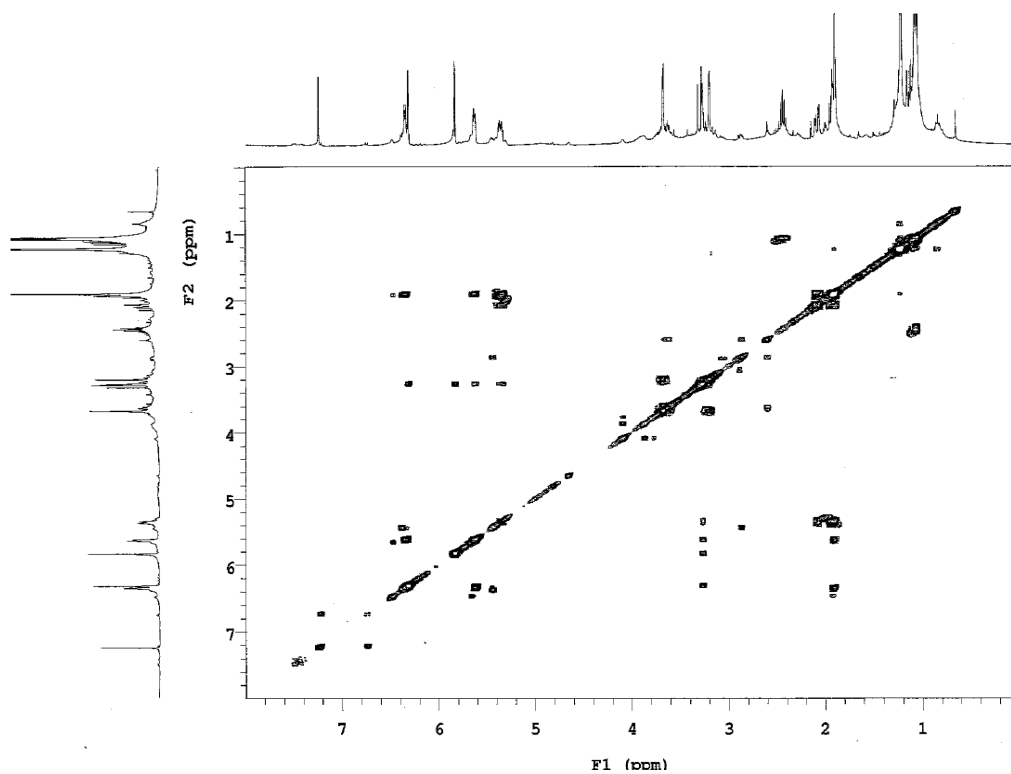


圖 12-6 、 Tagitinin G (6) 之 NOESY 圖譜

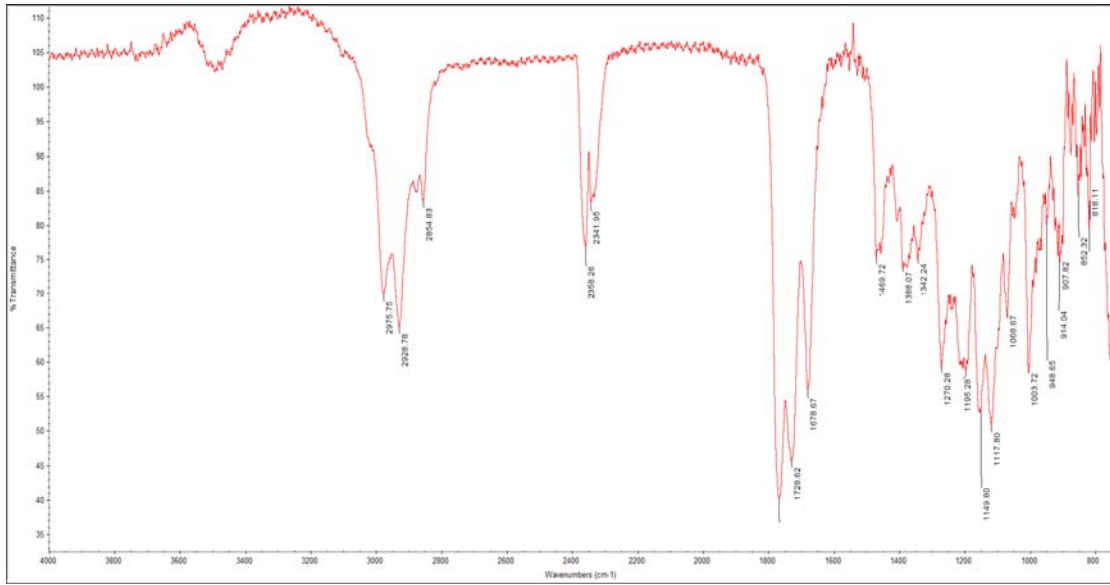


圖 12-7 、Tagitinin G (6) 之 IR 圖譜

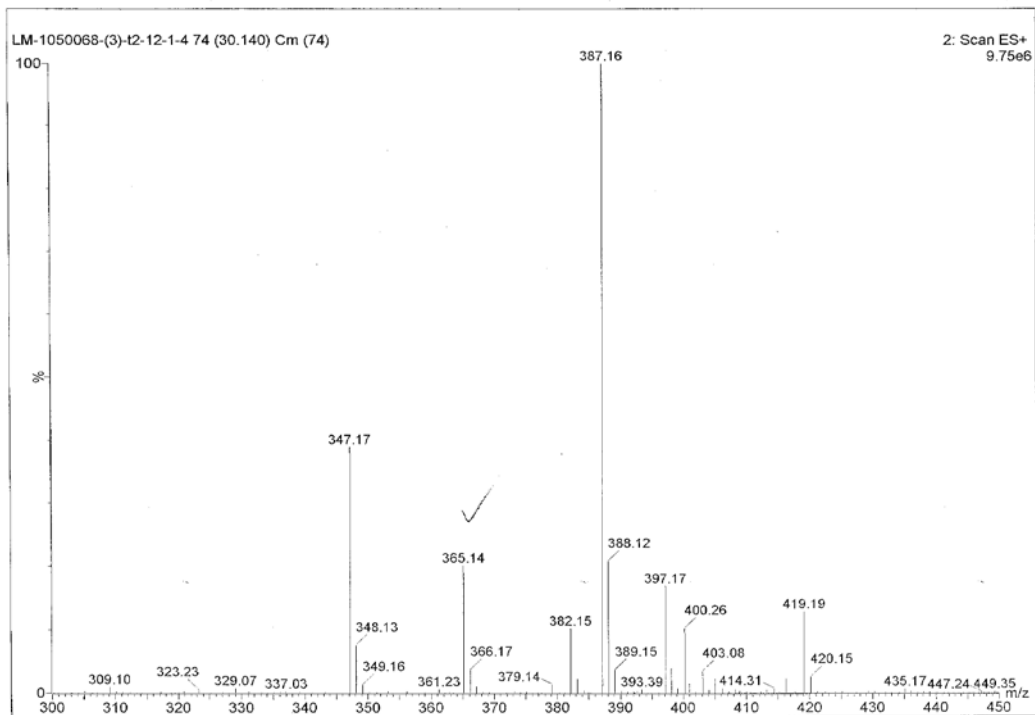
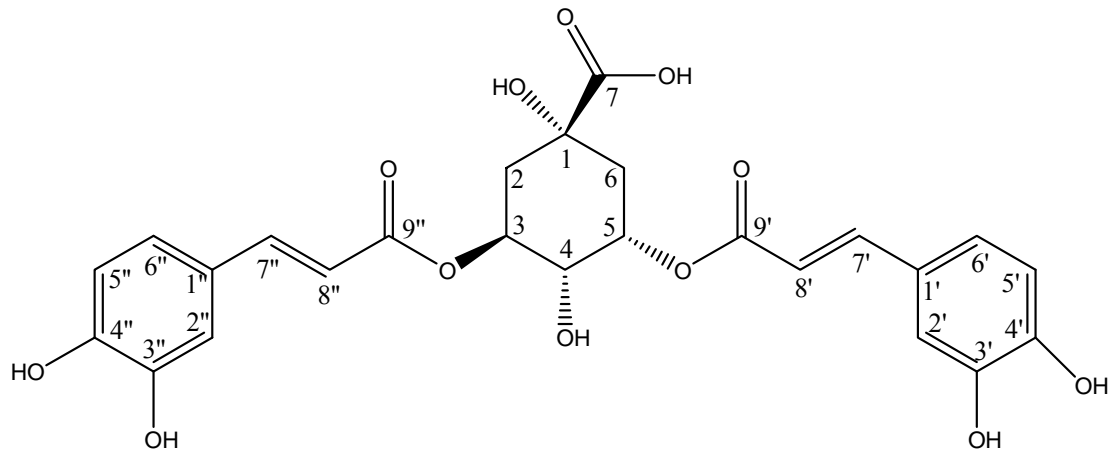


圖 12-8 、Tagitinin G (6) 之 LRESIMS 圖譜

第七節 3,5-dicaffeoylquinic acid (7) 的結構解析

3,5-dicaffeoylquinic acid (7) 的外觀淡黃色粉狀，在低解析電灑式質譜 (LRESIMS) 上觀察到擬分子峰 m/z 為 517.12 $[M+H]^+$ ，得知其分子式為 $C_{25}H_{24}O_{12}$ 。而 UV λ_{max} (MeOH) 在 327、294、248 nm 有吸收，IR 圖譜在 ν_{max} 3434、1650 cm^{-1} 有吸收，推測此化合物含有 hydroxy group (OH) 和 double bond。

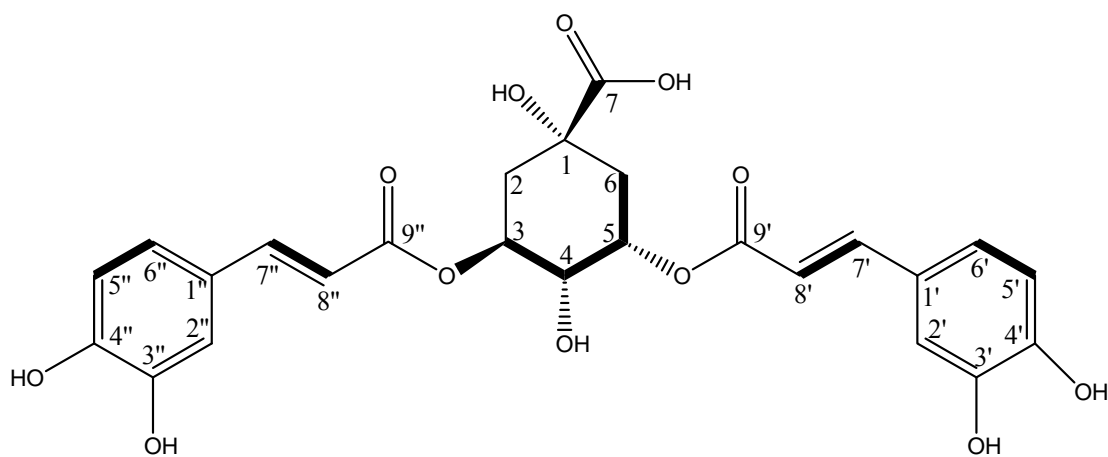


在 1H -NMR 圖譜中發現可發現 10 個雙鍵上的次甲基 H-2'/2''、H-5'/5''、H-6'/6''、H-7'/7''、H-8'/8'' (δ_H 7.10/7.09、6.82/6.80、7.00/6.98、7.63/7.59、6.43/6.33)，3 個接氧的次甲基 H-3、H-4、H-5 (δ_H 5.44、3.98、5.45) 三個訊號屬於三個接氧的脂肪族碳上的氫；H-2'/2''、H-5'/5''、H-6'/6'' (δ_H 7.10/7.09、6.82/6.80、7.00/6.98) 為 2 組苯環上 ABX 型態之的氫訊號，H-7'/7''、H-8'/8'' (δ_H 7.63/7.59、

6.43/6.33) 為兩個雙鍵上的 trans 型態之氫訊號，根據其化學位移和峰形特徵可推斷此化合物分子中存在 quinic acid 結構片段。

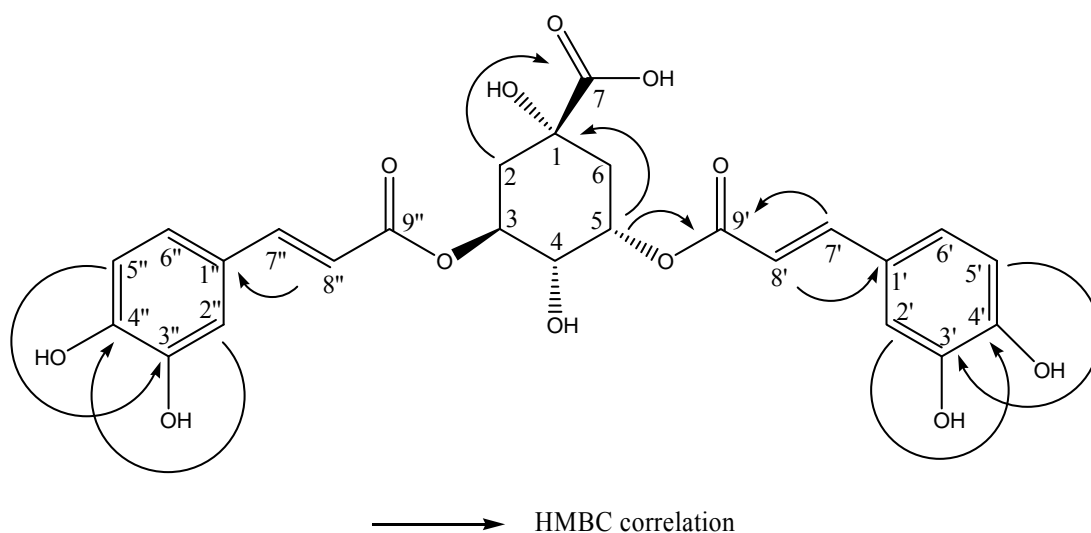
配合 ^{13}C -NMR、DEPT 圖譜共出現 25 個碳值，且結構接有 1 個 COO (δ_{C} 175.6); 2 個亞甲基 C-2、C-6 (δ_{C} 36.7、35.6); 13 個次甲基 C-3、C-4、C-5、C-2'/2''、C-5'/5''、C-6'/6''、C-7'/7''、C-8'/8'' (δ_{C} 72.2、69.7、71.8、115.2/115.3、116.4/116.4、122.9/122.9、147.0/147.4、115.1/115.1); 8 個四級碳 C-1'/1''、C-3'/3''、C-4'/4''、C-9'/9'' (δ_{C} 127.8/128.0、146.7/146.9、149.4/149.5、168.6/169.1); 其中 C-9'/9'' (δ_{C} 168.6/169.1) 為兩個 α 、 β -不飽和羰基的碳值; C-1'/1''、C-2'/2''、C-3'/3''、C-4'/4''、C-5'/5''、C-6'/6'' (δ_{C} 127.8/128.0、115.2/115.3、146.7/146.9、149.4/149.5、116.4/116.4、122.9/122.9) 為兩個苯環上的碳值; C-7'/7''、C-8'/8'' (δ_{C} 147.0/147.4、115.1/115.1) 為兩對烯碳訊號，以上信息進一步證實了兩個 caffeoyl 結構片段的的存在。

由 ^1H - ^1H COSY 圖譜中發現 H-3/H-4、H-4/H-5、H-5/H-6、H-7'/H-8'、H-7''/H-8''、H-5'/H-6'、H-5''/H-6'' 之間有氫和氫的關聯訊號，由此可得到分子片段之氫序關係。

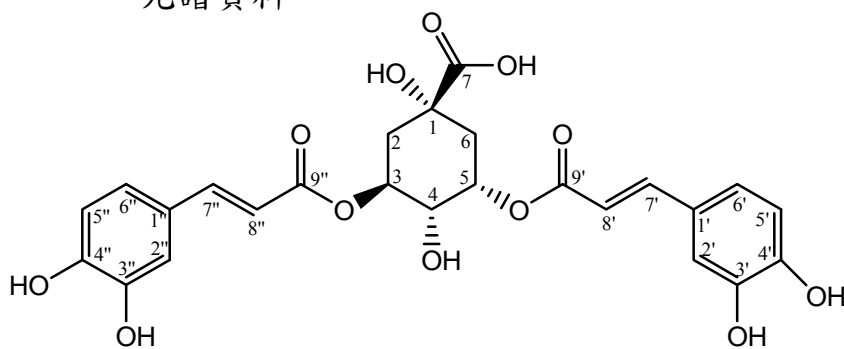


— COSY correlation

由 HMBC 圖譜中發現 H-2/C-7 ; H-5/C-1/C-9' ; H-7'/C-9' ; H-8'/C-1' ; H-2'/C-4' ; H-5'/C-3' ; H-8'/C-1'' ; H-2''/C-4'' ; H-5''/C-3'' 有關聯訊號，並將以上圖譜所聯結的片段相連結起來，即解出此化合物之平面結構，經由比對已知的化合物 3,5-dicaffeoylquinic acid，此化合物 7 比對早期文獻之 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、DEPT 圖譜數據，可以確定化合物 7 為 3,5-dicaffeoylquinic acid。此化合物最早是在 1989 年被發現 (Wald, Wray, Galensa, & Herrmann, 1989)，其詳細的 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 數據見表七。



表七、3,5-dicaffeoylquinic acid (7) ^1H 和 ^{13}C NMR
光譜資料



No.	^1H ^a (mult, <i>J</i> , Hz)	^{13}C ^b
1		73.4
2	2.15 (m) 2.32 (m)	36.7
3	5.44 (m)	72.2
4	3.98 (dd, 7.5, 2.7)	69.7
5	5.45 (m)	71.8
6	2.18 (m) 2.21 (m)	35.6
1'		127.8
2'	7.10 (s)	115.2
3'		146.7
4'		149.4
5'	6.82 (d, 8.0)	116.4
6'	7.00 (dd, 8.3, 2.2)	122.9
7'	7.63 (d, 16.0)	147.0
8'	6.43 (d, 16.0)	115.1
9'		168.6
1''		128.0
2''	7.09 (s)	115.3
3''		146.9
4''		149.5
5''	6.80 (d, 8.0)	116.4
6''	6.98 (dd, 8.3, 2.2)	122.9
7''	7.59 (d, 16.0)	147.4
8''	6.33 (d, 16.0)	115.1
9''		169.1
COO		175.6

^aMesaured at 400 MHz

^bMesaured at 100 MHz

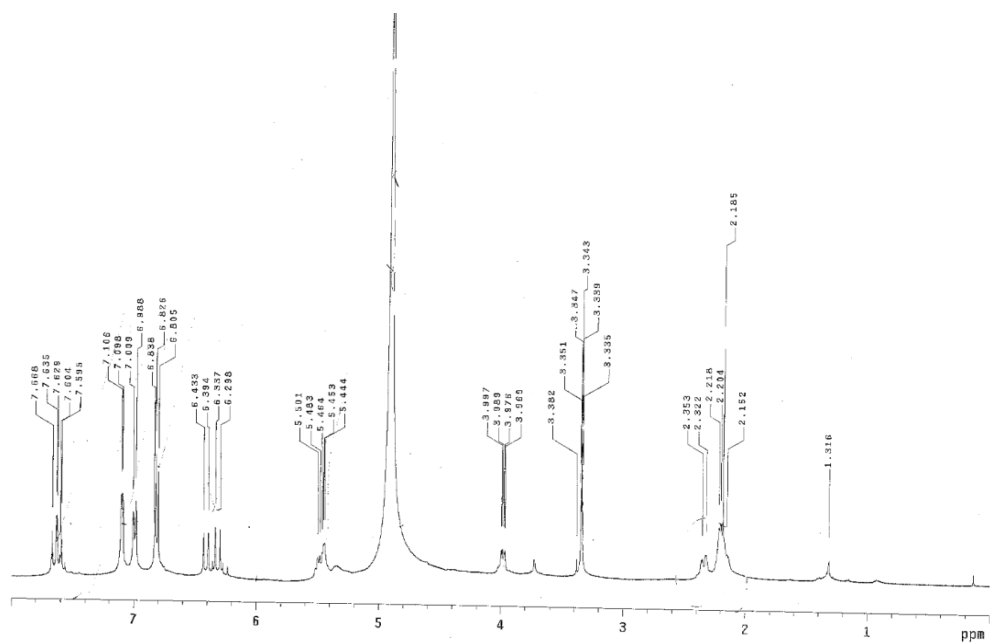


圖 13-1 、3,5-dicaffeoylquinic acid (7) 之 ^1H NMR 圖譜

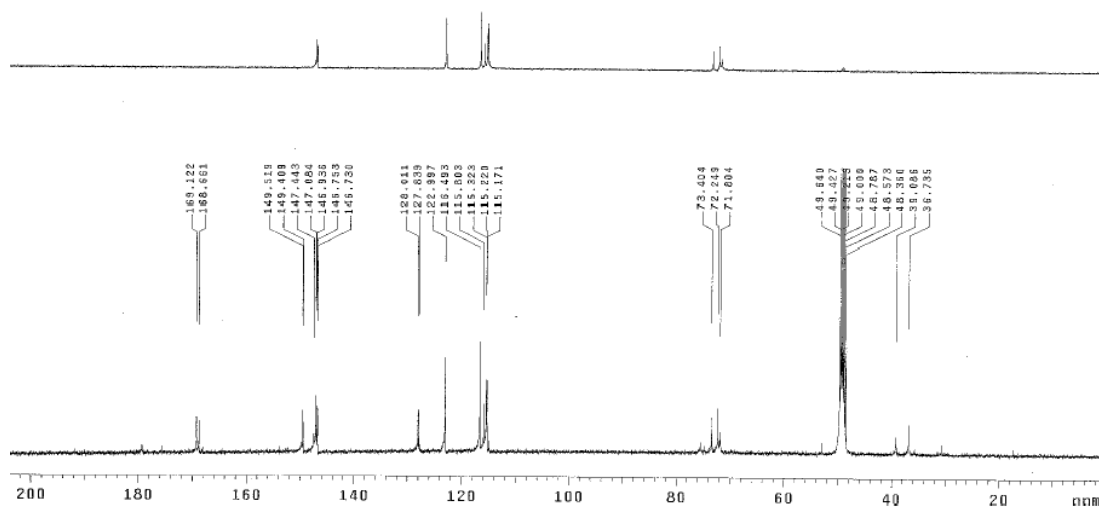


圖 13-2 、3,5-dicaffeoylquinic acid (7) 之 ^{13}C NMR 圖譜與 DEPT 圖

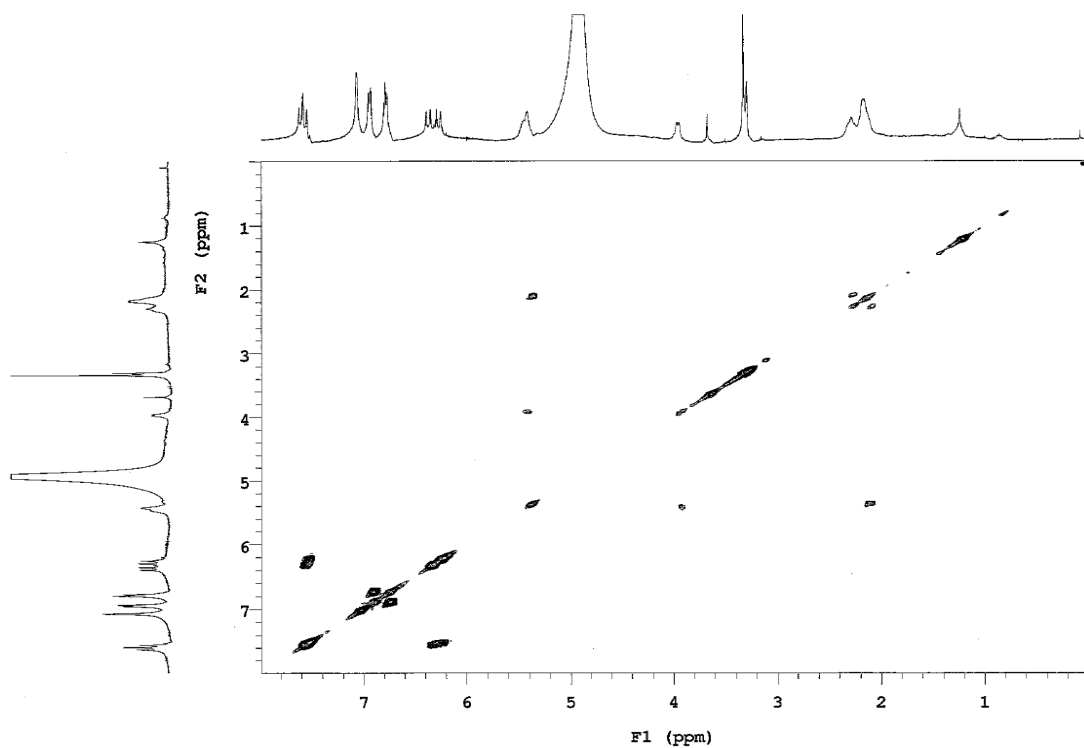


圖 13-3 、 3,5-dicaffeoylquinic acid (7) 之 COSY 圖譜

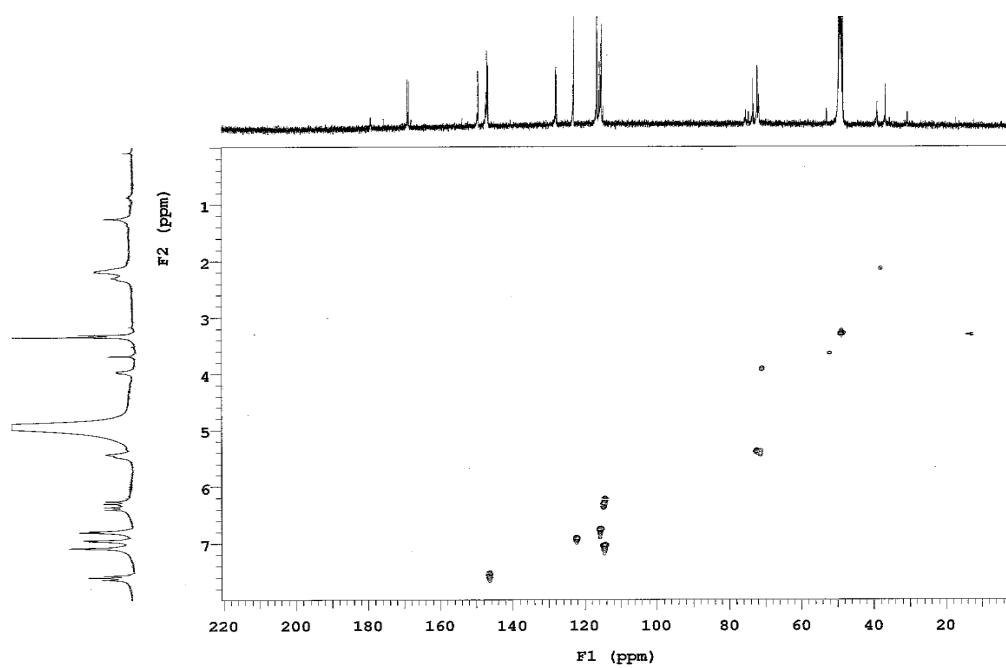


圖 13-4 、 3,5-dicaffeoylquinic acid (7) 之 HMBC 圖譜

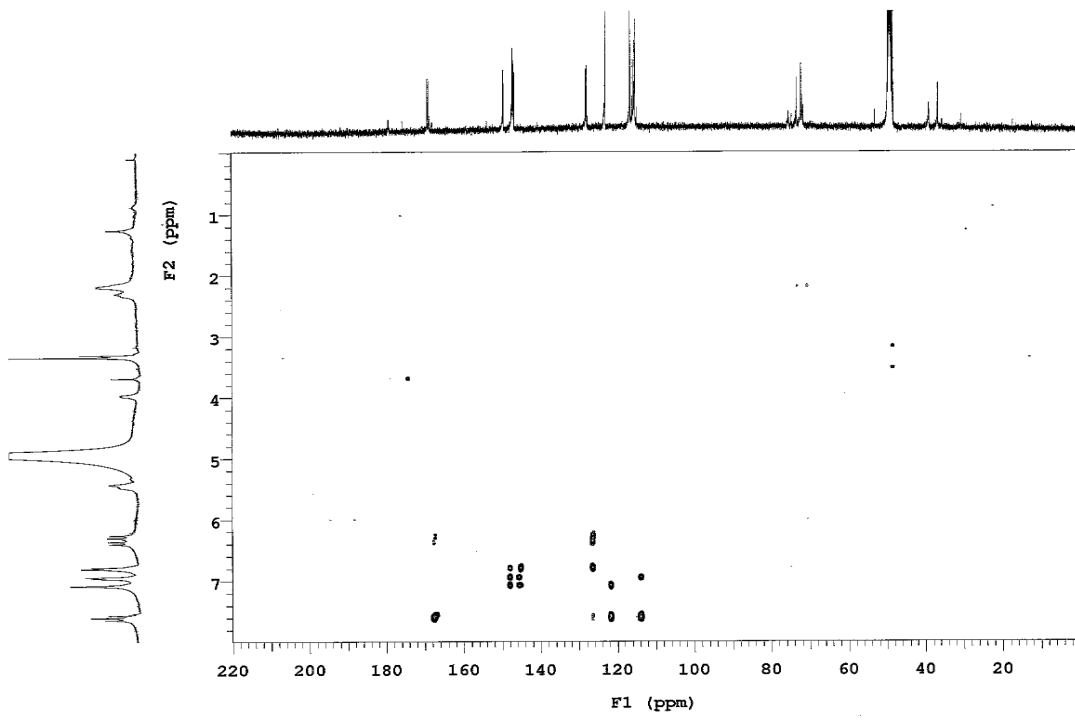


圖 13-5 、 3,5-dicaffeoylquinic acid (7) 之 HMBC 圖譜

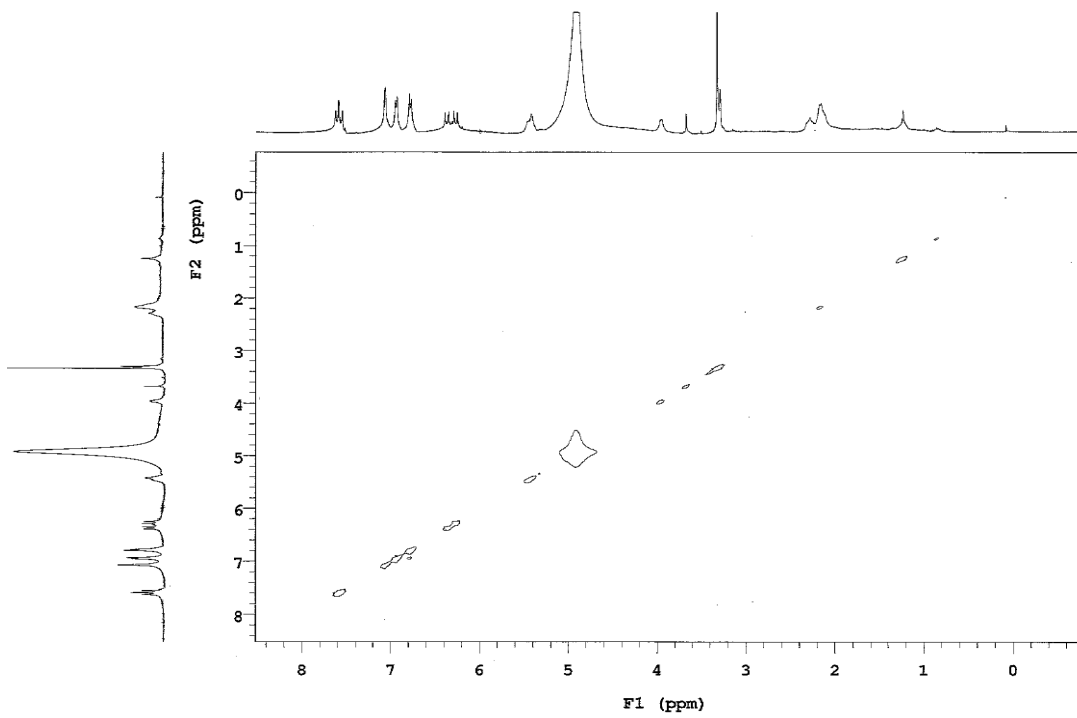


圖 13-6 、 3,5-dicaffeoylquinic acid (7) 之 NOESY 圖譜

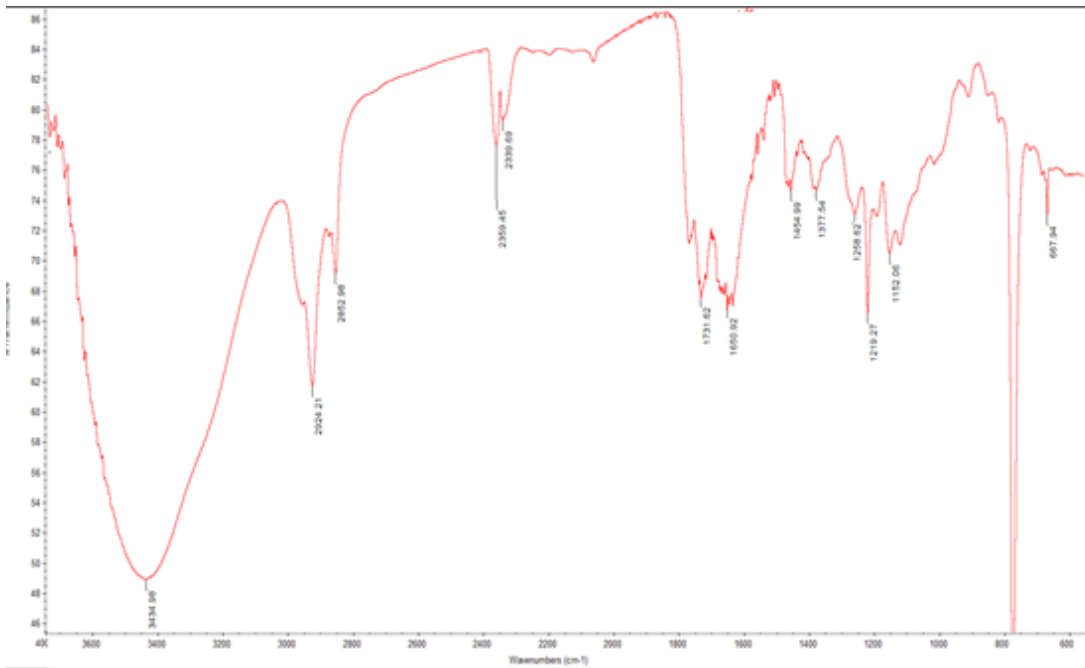


圖 13-7 、3,5-dicaffeoylquinic acid (7) 之 IR 圖譜

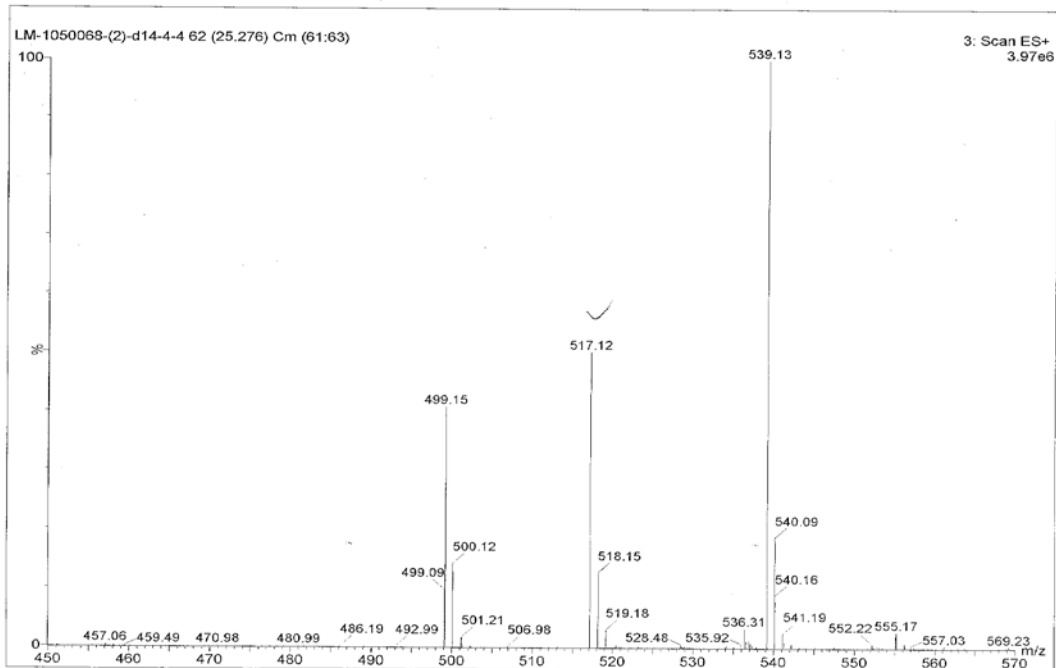
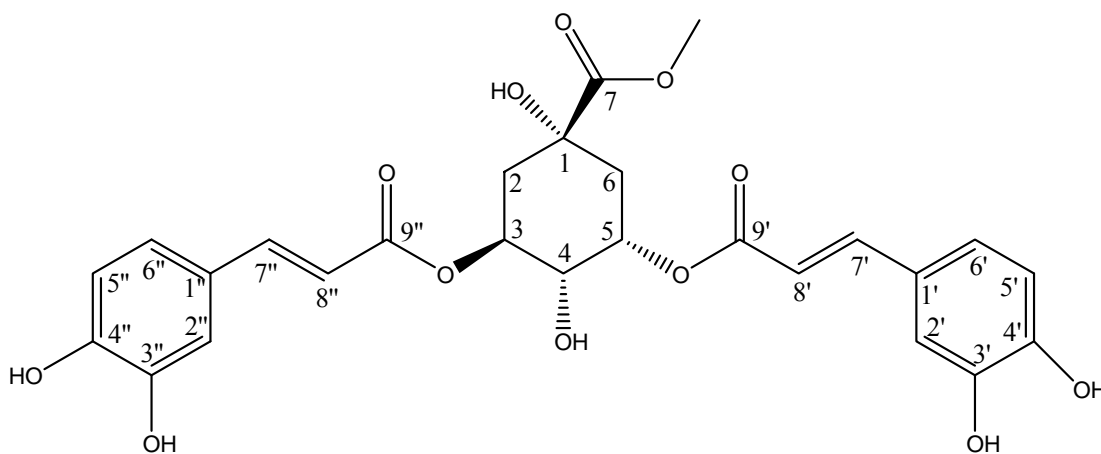


圖 13-8 、3,5-dicaffeoylquinic acid (7) 之 LRESIMS 圖譜

第八節 methyl 3,5-dicaffeoylquininate (8) 的結構

解析

methyl 3,5-dicaffeoylquininate (**8**) 的外觀深綠色粉狀，在低解析電灑式質譜 (LRESIMS) 上觀察到擬分子峰 m/z 為 529 $[M-H]^-$ ，得知其分子式為 $C_{26}H_{26}O_{12}$ 。而 IR 圖譜在 ν_{\max} 3434、1650 cm^{-1} 有吸收，推測此化合物含有 hydroxy group (OH) 和 double bond。

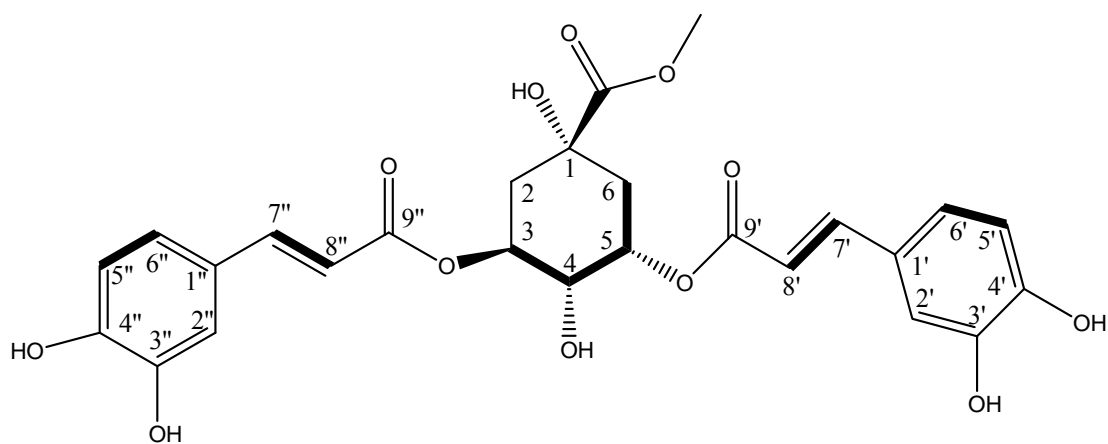


8

化合物 **8** 與化合物 **7** 的光譜特性極為相似，可推斷化合物 **8** 為 quinic acid 之衍生物。在 1H -NMR 圖譜中，發現有一單峰一個甲基 (δ_H 3.73)，出現於 H-2、H-6 (δ_H 2.15、2.23；2.18、2.21) 之訊號為脂肪族上兩個亞甲基所有，與另位於 δ_C 175.6 的羰基有偶合關係；H-2'/2"、H-5'/5"、H-6'/6" (δ_H 7.10/7.09、6.83/6.81、7.01/6.99) 為 2 組苯環上 ABX 型態之的氫訊號，H-7'/7"、H-8'/8" (δ_H 7.63/7.56、6.39/6.27) 為兩個雙鍵上的 trans 型態之氫訊號，且均與 C-9'/9" (δ_C 167.9 /168.7) 的羰基有 HMBC 關係。可推斷此化合物帶有兩個 caffeoyl 結構片段。

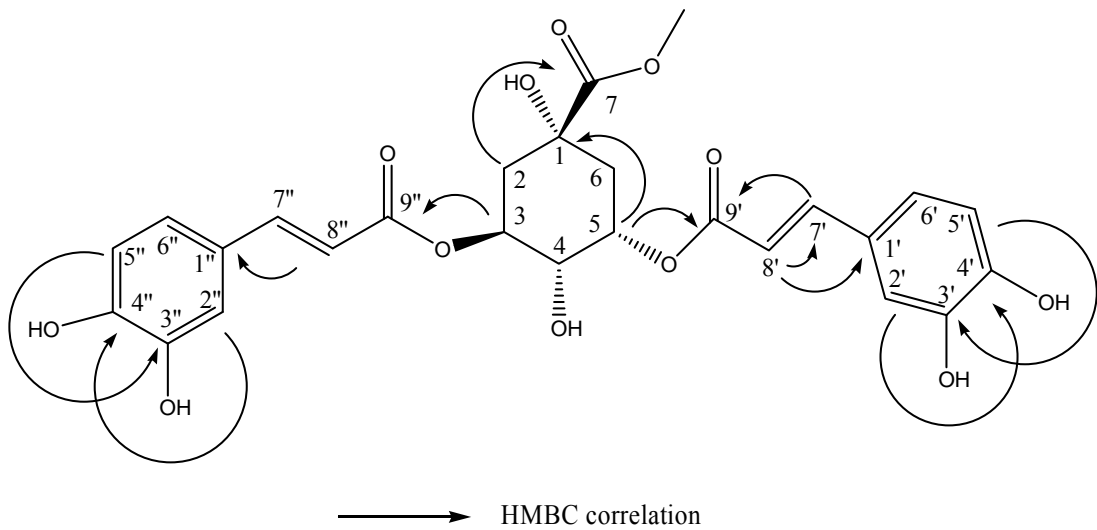
配合 $^{13}\text{C-NMR}$ 、DEPT 圖譜共出現 26 個碳值，含三個羰基 (δ_{C} 175.6、168.7、167.9)；2 個亞甲基 C-2、C-6 (δ_{C} 35.6、37.0)；13 個次甲基 C-3、C-4、C-5、C-2'/2''、C-5'/5''、C-6'/6''、C-7'/7''、C-8'/8'' (δ_{C} 72.2、69.7、71.9、115.1/115.4、116.4/116.5、122.9/123.0、147.1/147.4、114.8/115.1)；8 個四級碳 C-1'/1''、C-3'/3''、C-4'/4''、C-9'/9'' (δ_{C} 127.6/127.8、146.8/146.8、149.7/149.7、167.9/168.7)；其中 C-9'/9'' (δ_{C} 167.9/168.7) 為兩個 α 、 β -不飽和羰基的碳訊號；C-1'/1''、C-2'/2''、C-3'/3''、C-4'/4''、C-5'/5''、C-6'/6'' (δ_{C} 127.6/127.8、115.1/115.4、146.8/146.8、149.7/149.7、116.4/116.5、122.9/123.0) 為兩個苯環上的碳訊號；C-7'/7''、C-8'/8'' (δ_{C} 147.1/147.4、114.8/115.1) 為兩對烯碳信號，以上信息進一步證實了兩個 caffeoyl 結構片段的的存在。

由 $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$ 圖譜中發現 H-3、H-4、H-5 (δ_{H} 5.34、4.01、5.42) 三個訊號屬於三個接氧的脂肪族碳上的氫，而 H-4 (δ_{H} 4.01) 與另兩個訊號均有 $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$ 偶合關係。而 H-3/H-4、H-4/H-5、H-5/H-6、H-7'/H-8'、H-7''/H-8''、H-5'/H-6'、H-5''/H-6'' 之間有氫和氫的關聯訊號，由此可得到分子片段之氫序關係。

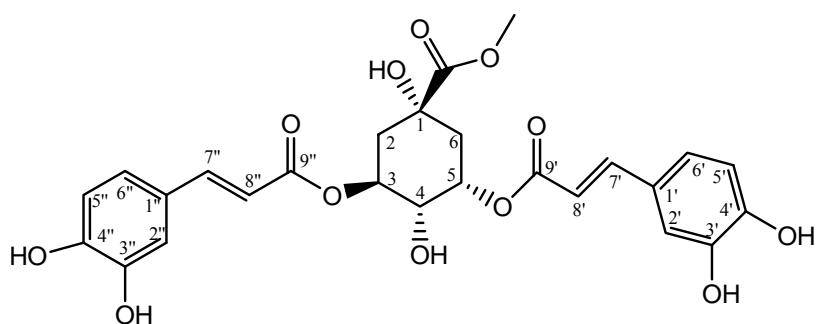


— COSY correlation

由 HMBC 圖譜中發現 H-2/C-7 ; H-5/C-1/C-9' ; H-7'/C-9' ; H-8'/C-1' ; H-2'/C-4' ; H-5'/C-3' ; H-8'/C-1'' ; H-2''/C-4'' ; H-5''/C-3'' 有關聯訊號，並將以上圖譜所聯結的片段相連結起來，即解出此化合物之平面結構，經由比對已知的化合物 methyl 3,5-dicaffeoylquininate，此化合物 **8** 比對文獻 (Chen et al., *Fitoterapia*, 99, 1-6, 2014) 之 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、DEPT 圖譜數據，可以確定化合物 **8** 為 methyl 3,5-dicaffeoylquininate，其詳細的 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 數據見表八。



表八、methyl 3,5-dicaffeoylquinic acid (8)
¹H 和 ¹³C NMR 光譜資料



No.	¹ H ^a (mult, <i>J</i> , Hz)	¹³ C ^b
1		74.6
2	2.15 (m) 2.23 (m)	35.6
3	5.34 (m)	72.2
4	4.01 (dd, 7.5, 2.7)	69.7
5	5.42 (m)	71.9
6	2.18 (m) 2.21 (m)	37.0
1'		127.6
2'	7.10 (d, 2.0)	115.1
3'		146.8
4'		149.7
5'	6.83 (d, 8.0)	116.4
6'	7.01 (d, 8.0)	122.9
7'	7.63 (d, 16.0)	147.1
8'	6.39 (d, 16.0)	114.8
9'		167.9
1''		127.8
2''	7.09 (d, 2.0)	115.4
3''		146.8
4''		149.7
5''	6.81 (d, 8.0)	116.5
6''	6.99 (d, 8.0)	123.0
7''	7.56 (d, 16.0)	147.4
8''	6.27 (d, 16.0)	115.1
9''		169.1
COO		168.7
COOCH ₃	3.73 (s)	53.0

^aMesaured at 400 MHz

^bMesaured at 100 MHz

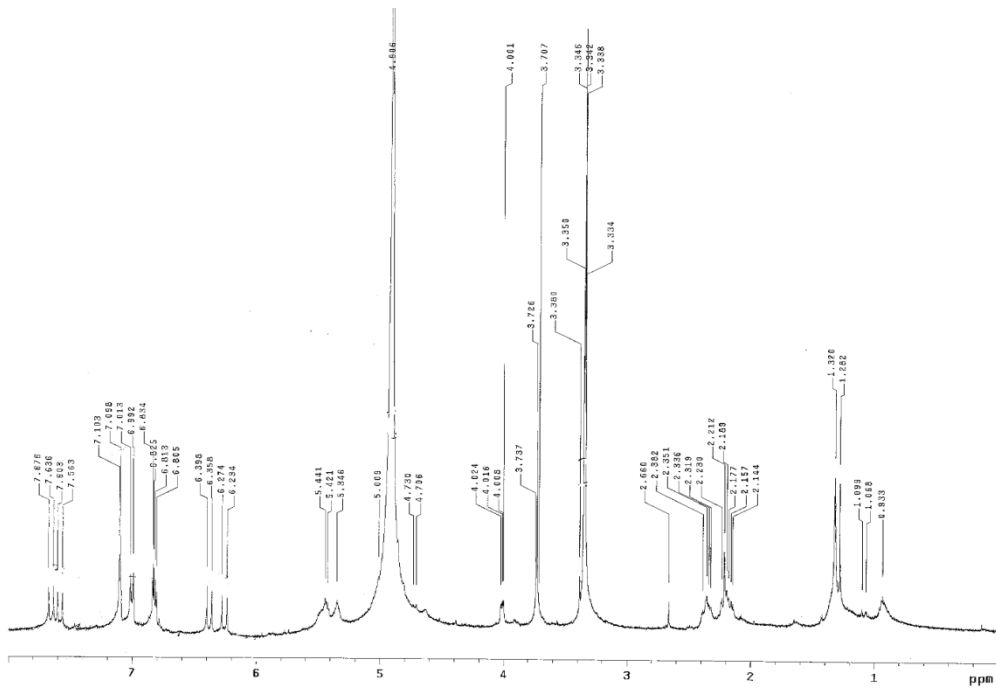


圖 14-1 、 methyl 3,5-dicaffeoylquininate (8) 之 ^1H NMR 圖譜

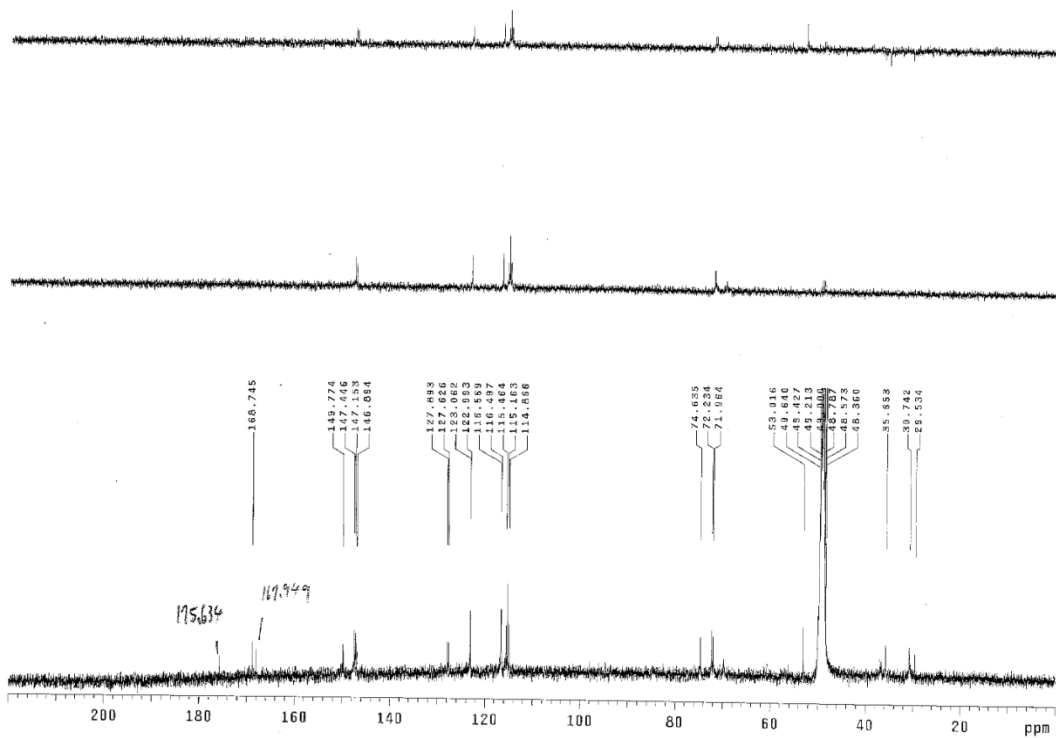


圖 14-2 、 methyl 3,5-dicaffeoylquininate (8) 之 ^{13}C NMR 圖譜

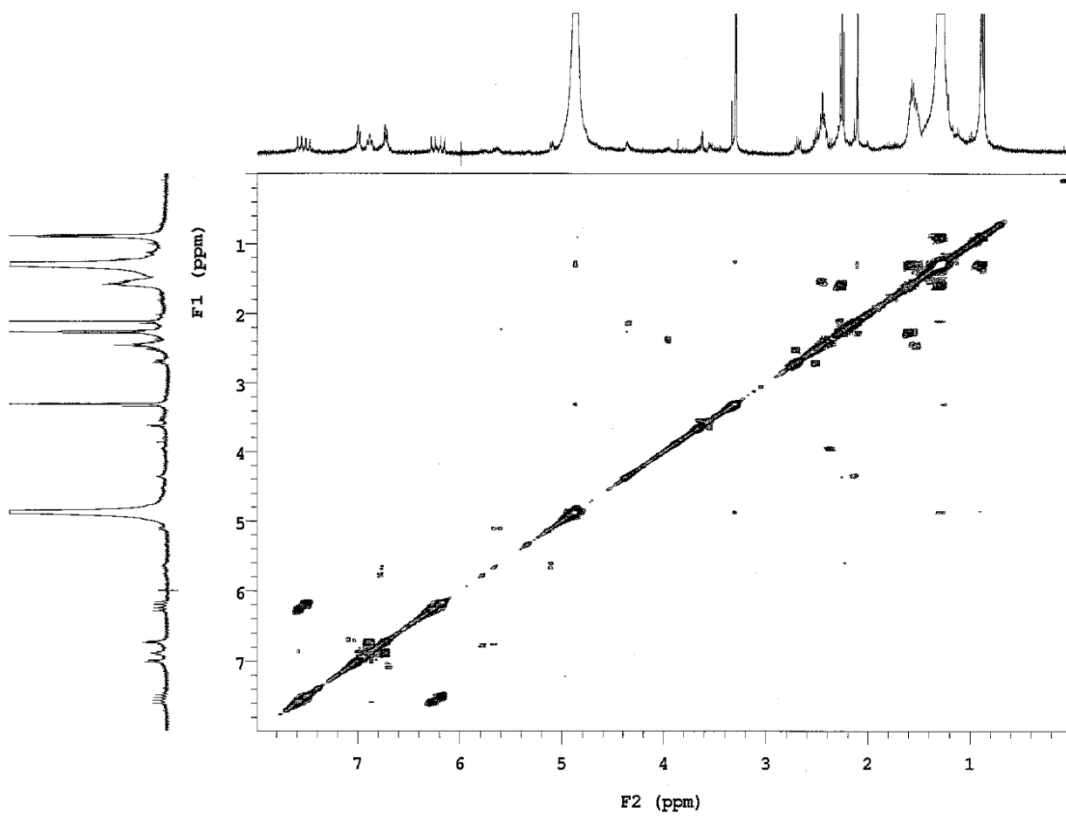


圖 14-3 、

methyl 3,5-dicaffeoylquinic acid (8) 之 COSY 圖譜

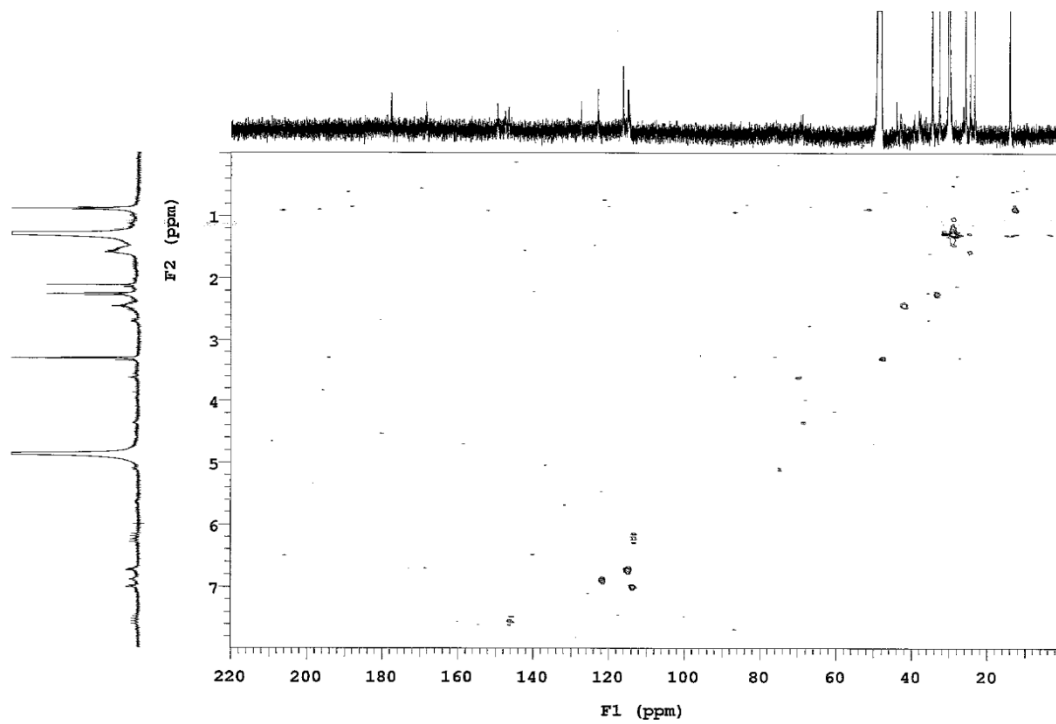


圖 14-4 、 methyl 3,5-dicaffeoylquinic acid (8) 之 HMBC 圖譜

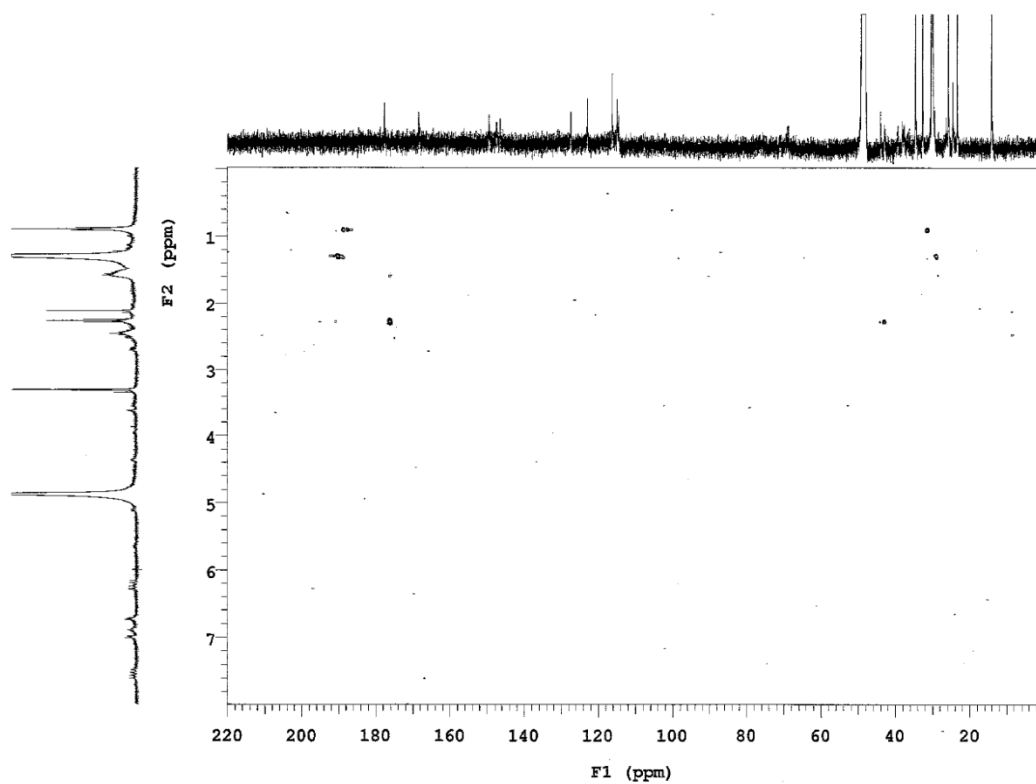


圖 14-5 、 methyl 3,5-dicaffeoylquinic acid (8) 之 HMBC 圖譜

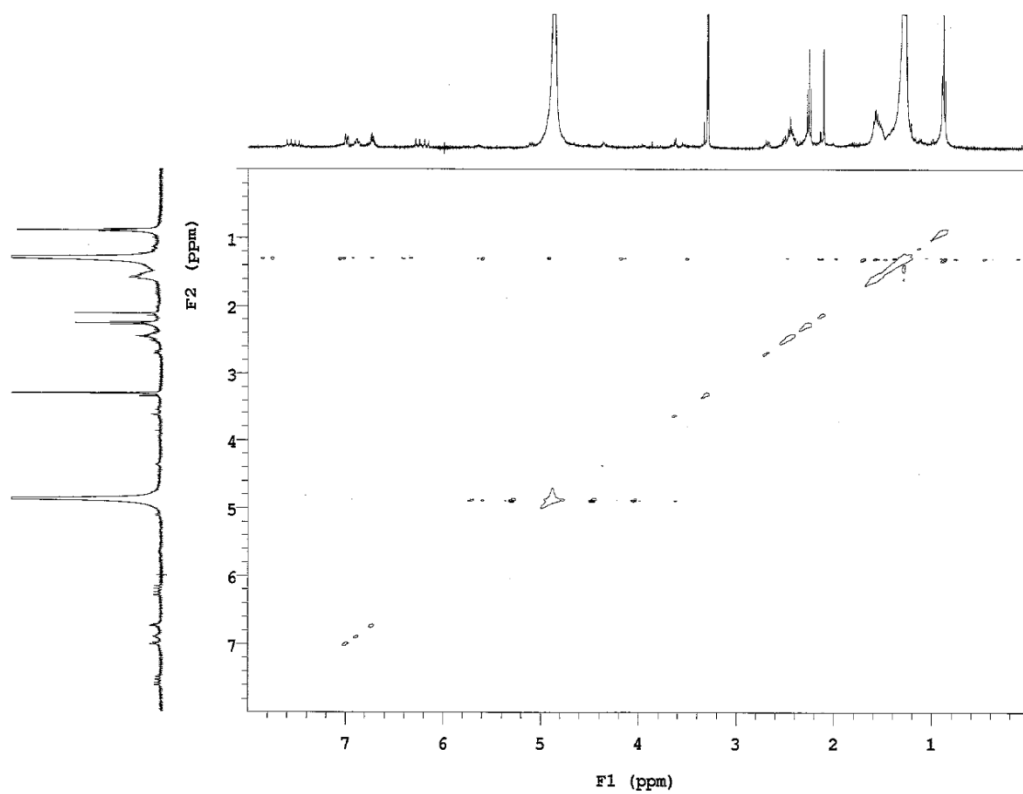


圖 14-6 、 methyl 3,5-dicaffeoylquinic acid (8) 之 NOESY 圖譜

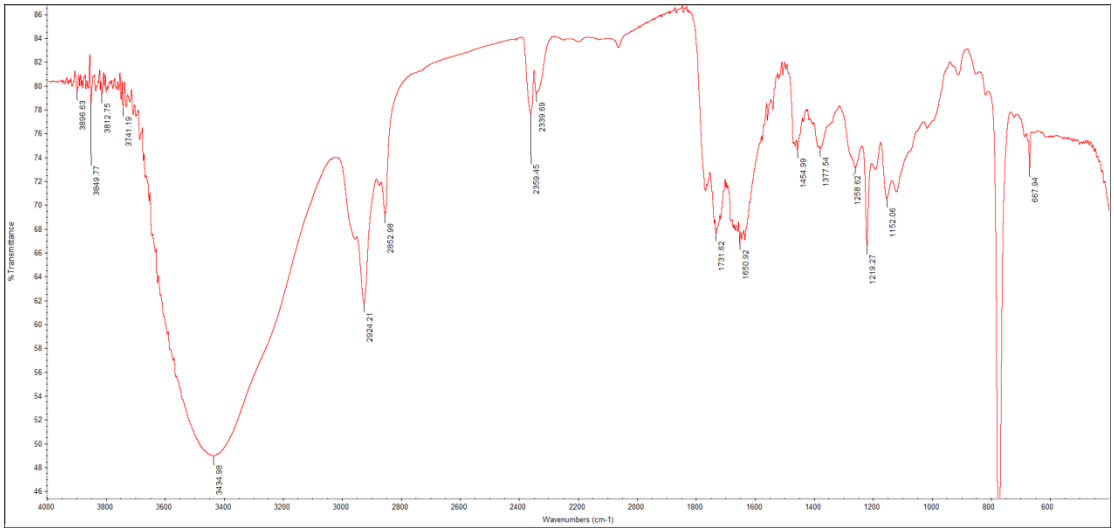


圖 14-7 、 methyl 3,5-dicaffeoylquinic acid (8) 之 IR 圖譜

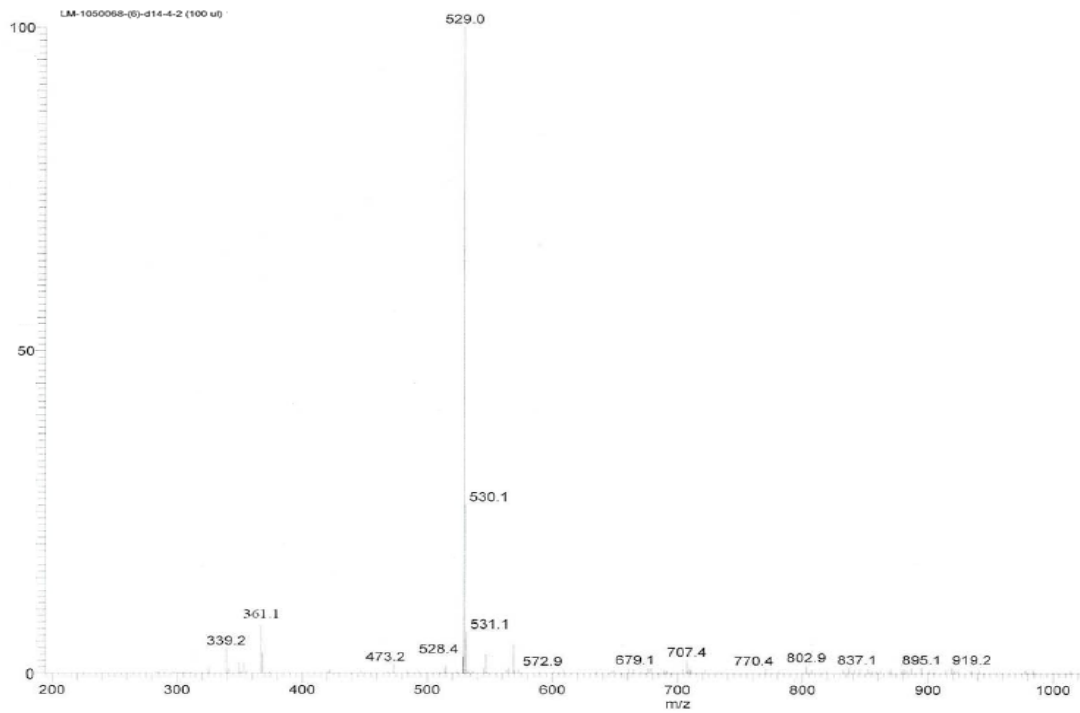


圖 14-8 、 methyl 3,5-dicaffeoylquinic acid (8) 之 LRESIMS 圖譜

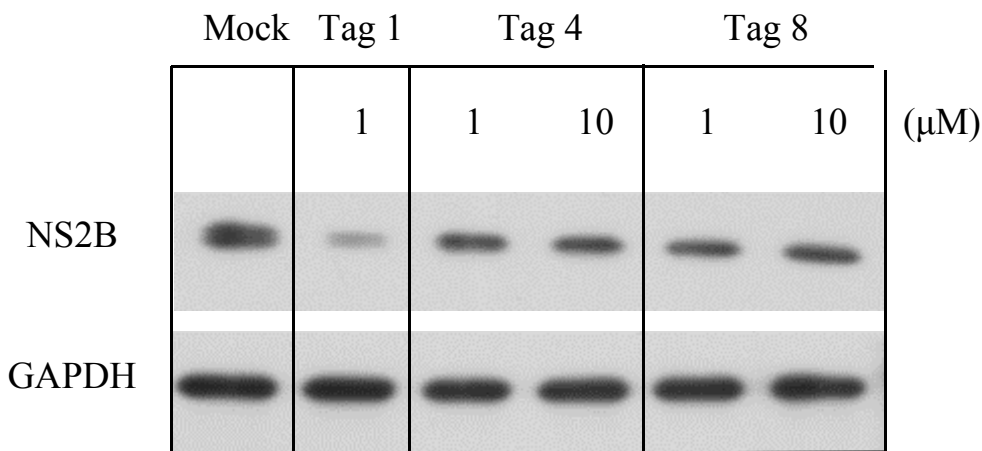
活性分析

將 Huh-7 細胞貼附於 24 孔盤 (5×10^4 /well)，以 0.2 MOI 之登革第二型(strain 16681) 病毒感染 2 小時，移除病毒液後加入不同濃度的天然萃取物，三天後收取細胞 RNA 及蛋白質，分以即時定量反轉錄-聚合酶連鎖反應 (Real time quantitative RT-PCR; RT-qPCR) 及 Western blotting 分析病毒 RNA 複製及蛋白產量，藉此計算抑制病毒之 EC_{50} ，同時以 MTS assay kit 測定萃取物細胞毒性並計算 CC_{50} 。

Tag 1-----Tagitinin C (3)

Tag 4----- $4\beta,10\beta$ -dihydroxy-3-oxo- 8β -isobutyroyloxyguaia
-11(13)-en-6,12-olide (5)

Tag 8-----Tagitinin A (2)



結論

一、 本研究從台灣五爪金英 *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray 中分離出八個

天然物，其中化合物 A (1) 為新的植物天然物；以及五個已知的萜類天然物 Tagitinin A (2)、Tagitinin C (3)、Tagitinin F (4)、4 β ,10 β -dihydroxy-3-oxo-8 β -isobutyroyloxyguaia-11(13)-en-6,12-olide (5) 與 Tagitinin G (6)；和兩個 caffeoylquinic acid 骨架之天然物分別是 3,5-dicaffeoylquinic acid (7)、methyl 3,5-dicaffeoylquinic acid (8)。

- 二、在活性試驗中，針對人類肝癌細胞株 Huh-7，以登革熱第二型 (strain 16681) 病毒感染 2 小時移除病毒液後，加入從台灣產五爪金英所分離得到之化合物 Tagitinin A (2)、Tagitinin C (3)、4 β ,10 β -dihydroxy-3-oxo-8 β -isobutyroyloxyguaia-11(13)-en-6,12-olide (5) 作測試，在濃度為 1 μ M 時，對 NS2B 蛋白分別具 25%、75%、40% 的抑制率；在濃度為 10 μ M 時，對 NS2B 蛋白化合物 (2)、(5) 分別具 21%、43% 的抑制率，由實驗發現 Tagitinin C (3) 於濃度為 1 μ M 時對 NS2B 蛋白有明顯抑制效果。
- 三、由以上試驗可得知，五爪金英莖葉部分之乙酸乙酯層分離所得到之化合物，具有開發抑制登革熱病毒藥物之潛力，未來期望能夠將本次研究中所分離到的一個新天然物、兩個 caffeoylquinic acid 骨架的化合物及兩個已知萜類天然物，並進一步探討抑制登革熱病毒之毒性測試機轉及動物試驗。

參考文獻

- 吳天賞，石麗仙，郭賓崇，呂彥禮，劉美珍，吳培琳 (2001). Cytotoxic Principles from the Leaves of *Tithonia diversifolia*. 中華藥學雜誌, 53:5, 217-223.
- 陳維鈞 (2003). (Flamand et al., 1999) (Flamand et al., 1999) 蚊子傳播登革病毒的機制。科學發展, 368, 54-59.
- 詹忠憲 (2007)。中草藥五爪金英在抗癌和抗氧化上的研究。未出版碩士，台北市，元培科學技術學院放射技術研究所。
- 衛福部疾管局 (2016)，蟲媒傳染病-登革熱
- Abe, A. E., de Oliveira, C. E., Dalboni, T. M., Chagas-Paula, D. A., Rocha, B. A., de Oliveira, R. B., & Campanelli, A. P. (2015). Anti-inflammatory sesquiterpene

- lactones from *Tithonia diversifolia* trigger different effects on human neutrophils. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25(2), 111-116.
- Arias, C. F., Preugschat, F., & Strauss, J. H. (1993). Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain. *Virology*, 193(2), 888-899.
- Borges, W. D. S., & Pupo, M. T. (2006). Novel anthraquinone derivatives produced by *Phoma sorghina*, an endophyte found in association with the medicinal plant *Tithonia diversifolia* (Asteraceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17(5), 929 - 934.
- Bouberte, M. Y., Krohn, K., Hussain, H., Dongo, E., Schulz, B., Hu, Q. (2006). Tithoniaquinone A and tithoniamide B: A new anthraquinone and a new ceramide from leaves of *Tithonia diversifolia*. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section B Journal of Chemical Sciences*, 61(1), 78 - 82.
- Chaturvedi, U. C., Agarwal, R., Elbishbishi, E. A., & Mustafa, A. S. (2000). Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 28(3), 183-188.
- Chen, J., Mangelinckx, S., Ma, L., Wang, Z., Li, W., & De Kimpe, N. (2014). Caffeoylquinic acid derivatives isolated from the aerial parts of *Gynura divaricata* and their yeast alpha-glucosidase and PTP1B inhibitory activity. *Fitoterapia*, 99, 1-6.
- Delgado, Guillermo;García, Abraham; (2006). Constituents from *Tithonia diversifolia*. Stereochemical Revision of 2-Hydroxytirotonin. *Journal of the Mexican Chemical Society*,180-183.
- Egloff, M. P., Benarroch, D., Selisko, B., Romette, J. L., & Canard, B. (2002). An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. *The EMBO Journal*, 21(11), 2757-2768.
- Flamand, M., Megret, F., Mathieu, M., Lepault, J., Rey, F. A., & Deubel, V. (1999). Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *Journal of Virology*, 73(7), 6104-6110.
- Gu, J. Q., Gills, J. J., Park, E. J., Mata-Greenwood, E., Hawthorne, M. E., Axelrod, F., Kinghorn, A. D. (2002). Sesquiterpenoids from *Tithonia diversifolia* with potential cancer chemopreventive activity. *Journal of Natural Products*, 65(4),

532-536.

- Herrera, J., Troncone, G., Sanchez, M. R., Miguel, V., & Lopez, S. E. (2007). The effect of furanoheliangolides from *Tithonia diversifolia* on superoxide anion generation in human neutrophils. *Fitoterapia*, 78(7-8), 465-469.
- Kalayanarooj, S., Vaughn, D. W., Nimmannitya, S., Green, S., Suntayakorn, S., Kunentrasai, N., Ennis, F. A. (1997). Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *The Journal of Infectious Diseases*, 176(2), 313-321.
- Kummerer, B. M., & Rice, C. M. (2002). Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. *Journal of Virology*, 76(10), 4773-4784.
- Kuo, & Chen. (1997). Diversifolol, a novel rearranged eudesmane sesquiterpene from the leaves of *Tithonia diversifolia*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 45(7), 1223 - 1224.
- Kuo, Y.-H., & Chen, C.-H. (1998). Sesquiterpenes from the Leaves of *Tithonia diversifolia*. *Journal of Natural Products*, 61(6), 827-828.
- Kuo, Y.-H., & Lin, B.-Y. (1999). A new dinorxanthane and chromone from the root of *Tithonia diversifolia*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 47(3), 428 – 429.
- Kuroda, M., Yokosuka, A., Kobayashi, R., Jitsuno, M., Kando, H., Nosaka, K., Mimaki, Y. (2007). Sesquiterpenoids and flavonoids from the aerial parts of *Tithonia diversifolia* and their cytotoxic activity. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 55(8), 1240-1244.
- Li, H., Clum, S., You, S., Ebner, K. E., & Padmanabhan, R. (1999). The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. *Journal of Virology*, 73(4), 3108-3116.
- Li, X., Huang, G., Zhao, G., Chen, W., Li, J., & Sun, L. (2013). Two new monoterpenes from *Tithonia diversifolia* and their anti-hyperglycemic activity. *Records of Natural Products*, 7(4), 351 - 354.
- Lindenbach, B. D., & Rice, C. M. (1997). trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. *Journal of Virology*, 71(12), 9608-9617.
- Lindenbach, B. D., & Rice, C. M. (1999). Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *Journal of Virology*, 73(6), 4611-4621.

- Miranda, M. A., Varela, R. M., Torres, A., Molinillo, J. M., Gualtieri, S. C., & Macías, F. A. (2015). Phytotoxins from *Tithonia diversifolia*. *Journal of Natural Products*, 78(5), 1083-1092.
- Miura, T., Nosaka, K., Ishii, H., & Ishida, T. (2005). Antidiabetic effect of Nitobegiku, the herb *Tithonia diversifolia*, in KK-Ay diabetic mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(11), 2152 - 2154.
- Monath, T. P. (1994). Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(7), 2395-2400.
- Munoz-Jordan, J. L., Laurent-Rolle, M., Ashour, J., Martinez-Sobrido, L., Ashok, M., Lipkin, W. I., & Garcia-Sastre, A. (2005). Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *Journal of Virology*, 79(13), 8004-8013.
- Nomaguchi, M., Ackermann, M., Yon, C., You, S., & Padmanabhan, R. (2003). De novo synthesis of negative-strand RNA by Dengue virus RNA-dependent RNA polymerase in vitro: nucleotide, primer, and template parameters. *Journal of Virology*, 77(16), 8831-8842.
- Obafemi, Sulaimon, Akinpelu, & Olugbade. (2006). Antimicrobial activity of extracts and a germacranolidetype sesquiterpene lactone from *Tithonia diversifolia* leaf extract. *African Journal of Biotechnology*, 5(12), 1254 - 1258.
- Oyewole, I., Adeoye, G., Anyasor, G., & Obansa, J. (2008). Anti-malarial and repellent activities of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) leaf extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2(8), 171-175.
- Pal, Raghwendra, Kulshreshtha, D.K. & Rastogi, R.P. (1976) .Chemical constituents or *Tithonia tagitiflora* Desf. : Part III-Constitution of tagitin A. *Indian Journal of Chemistry*, 14B, 259-62.
- Ragasa, C. Y., Tepora, M. M., & Rideout, J. A. (2007). Terpenoids from *Tithonia diversifolia*. *Journal of Research in Science Computing and Engineering* 4(1):1-7 .
- Rothan, H. A., Han, H. C., Ramasamy, T. S., Othman, S., Rahman, N. A., & Yusof, R. (2012). Inhibition of dengue NS2B-NS3 protease and viral replication in Vero cells by recombinant retrocyclin-1. *BioMed Central Infectious Diseases*, 12, 314.

- Rothan, H. A., Zulqarnain, M., Ammar, Y. A., Tan, E. C., Rahman, N. A., & Yusof, R. (2014). Screening of antiviral activities in medicinal plants extracts against dengue virus using dengue NS2B-NS3 protease assay. *Tropical biomedicine*, 31(2), 286-296.
- Sánchez-Mendoza, M. E., Reyes-Ramírez, A., Cruz Antonio, L., Martínez Jiménez, L., Rodríguez-Silverio, J., & Arrieta, J. (2011). Bioassay-guided isolation of an anti-ulcer compound, tagitinin C, from *Tithonia diversifolia*: Role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls. *Molecules*, 16(1), 665-674.
- Shamsuddin, Musharraf, Zobairi, & Ali. (2001). Demethylacetovanillochromene from *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. *Indian Journal of Chemistry - Section B Organic and Medicinal Chemistry*, 40(8), 751 - 752.
- Teixeira, R. R., Pereira, W. L., Oliveira, A. F., da Silva, A. M., de Oliveira, A. S., da Silva, M. L., de Paula, S. O. (2014). Natural products as source of potential dengue antivirals. *Molecules*, 19(6), 8151-8176.
- Tona, Kambu, Ngimbi, Cimanga, & Vlietinck. (1998). Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 61(1), 57 - 65.
- Wald, B., Wray, V., Galensa, R., & Herrmann, K. (1989). Malonated flavonol glycosides and 3,5-dicaffeoylquinic acid from pears. *Phytochemistry*, 28(2), 663-664.
- Zhai, H.-L., Zhao, G.-J., Yang, G.-J., Sun, H., Yi, B., Sun, L.-N., Zheng, S.-Q. (2010). A new chromene glycoside from *Tithonia diversifolia*. *Chemistry of Natural Compounds*, 46(2), 198 - 200.
- Zhao, G., Li, X., Chen, W., Xi, Z., & Sun, L. (2012). Three new sesquiterpenes from *Tithonia diversifolia* and their anti-hyperglycemic activity. *Fitoterapia*, 83(8), 1590-1597.
- Zhao, G.-J., Xi, Z.-X., Chen, W.-S., Li, X., Wang, Y., & Sun, L.-N. (2012). Two new cerebrosides from the aerial parts of *Tithonia diversifolia*. *Helvetica Chimica Acta*, 95(7), 1169 - 1174.
- Zhao, G.-J., Zhang, C.-X., Wu, Z.-J., Li, X., Yang, Y.-B., Sun, L.-N., & Zheng, S.-Q. (2010). Chemical constituent analysis of EtOAc fraction of *Tithonia diversifolia* (HEMSL.) A. Gray. *Academic Journal of Second Military Medical University*, 31(2), 189 - 192.
- Zhou, H., Peng L.-Y., Jiang B., Hou A.-J., LIN Z.-Wen., Sun H.-D. (2000). Chemical

Constitutents from *Tithonia diversifolia*. *Plant Diversity*, 22 (03): 1-3.