

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 海洋微細藻類之抗癌、抗病毒藥物開發與其他活性物質探討

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2323-B-002-009-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣大學漁業科學研究所

計畫主持人：周宏農

計畫參與人員：李怡慧

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 2 月 5 日

# 行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

## 海洋天然藥物開發研究 - 海洋微細藻類之抗癌、抗病毒藥物 開發與其他活性物質探討

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 89 - 2323 - B - 002 - 013

執行期間： 89 年 8 月 1 日 至 92 年 7 月 31 日

計畫主持人：周宏農

共同主持人：

計畫參與人員：盧重光、陳逸民、許雅雯、廖美齡、李怡慧

成果報告類型 (依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、  
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：國立台灣大學 漁業科學研究所

中 華 民 國 92 年 10 月 1 日

## 摘要

關鍵詞：微細藻，抗癌活性，活性物質，大環內酯

本研究的目的，在於由微細藻中找尋具有抗癌、抗病毒活性的物質，作為後續藥物開發的基礎。先期由微細藻種源庫的建立著手，於計畫期間共計由本省各地的採樣中純化出 206 株藻，提供理想的材料進行後續的研究。在初步的活性分析中，發現其中至少有 39 株具有明顯的細胞毒殺活性，以渦鞭毛藻的端溝藻 *Amphinidium* 及原甲藻 *Prorocentrum* 發現活性的比例最高。後續由其中的 4 個藻株純化出 26 個化合物；在其中已完成結構鑑定的 19 個化合物中，發現 1 個 new skeleton 及 5 個新化合物；其餘 7 個結構尚未完全解開的化合物預期均為新化合物，甚至 new skeleton 化合物。所有化合物中，至少已知有 6 種以上具有明顯的細胞毒殺活性，顯示省產微細藻類於新型活性化合物開發的潛力與價值。

過去已知存在於海洋生物中的大環內酯化合物 macrolides 均有極強的細胞毒殺活性，然因結構複雜，產量低，因此難以開發成為抗癌藥物，研究中發現的 prorocentrolides 化合物亦不例外。然藉由 *Prorocentrum* 藻株的篩檢，成功挑取出該類化合物含量超高的藻株，足以克服產量及後續生合成實驗的困難，如此更凸顯出微細藻種源庫的價值。

Keywords: microalgae, anti-cancer, bioactive compound, macrolide

This project aimed on the exploitation of bioactive compounds from microalgae to match the need of NHRI in drug development. For the purpose, algae indigenous to Taiwan were isolated, cultivated, and harvested for the previous screening of cytotoxicities. It was found dinoflagellate belonging to the genus of *Amphidinium* and *Prorocentrum* exerted strong cytotoxicities with high frequency. The potentially active strains of these genres were cultivated to larger volume for purifying enough bioactive compounds inside. By the way, twenty-six compounds were purified from four *Amphidinium* and *Prorocentrum* strains respectively, and the structures of 19 compounds were fully elucidated. Five of them were new compounds and 1 with new skeleton; other 7 compounds whose structures were partially elucidated were identified as new compounds or new skeletal compounds. At least 6 of them exerted strong cytotoxicities, indicating the potency to explore anti-cancer drugs from the microalgae of Taiwan.

Macrolides produced by marine creatures were known to exerted strong cytotoxicity. The complex structures and the low contents, however, restricted their utilizations on cancer therapy, with no exceptions for prorocentrolides found in our research. It was overcome, however, by finding a strain of *Prorocentrum* with high prorocentrolide content, indicating the value to keep a library of algal strains.

## 一、前言

天然物學者於 40 年代開始探索海洋中之天然物，期許浩瀚海洋環境中所蘊藏豐富之生物物種能提供人類更多更新的藥物。由過去美國癌症研究中心(NCI)所進行相關活性天然物的篩選計畫中，發現海洋無脊椎動物有相當高的比率具有顯著的細胞毒殺活性(cytotoxicity activity,  $IC_{50} < 2 \mu\text{g/ml}$ )，特別是海綿動物(Porifera)、苔蘚蟲(Bryozoa)及脊索動物(Chordata)等，其含毒頻率遠高於一般陸生生物(1)。由此，第一個以海洋天然物為基礎，用來控制疼痛的藥物已接近上市階段；另有數個用以治療腫瘤的海洋天然物新藥，亦已進入第二期臨床試驗(2)；然而大多數源自於海洋無脊椎動物的藥物開發案，多因現階段無脊椎動物的人工培養技術仍有困難而面臨量產上的問題，同時並非所有的化合物均可利用人工方法加以合成。

近年來的研究發現，許多存在於海洋無脊椎動物的活性物質，事實上為其共生或吞食之微生物，包括細菌、真菌、渦鞭毛藻或觸絲藻等所產生(3)，其中又以來自渦鞭毛藻的比例最高，化合物種類亦最為多樣。舉例來說，利馬原甲藻(*Prorocentrum lima*)證實為海綿 *Halichondria okadai* 內所含黑海綿酸(okadaic acid)的來源(4, 5)；另由熱帶珊瑚礁魚毒源生物之研究中，亦發現許多底棲性渦鞭毛藻均含有類似活性的化合物，結構十分的多樣；另 Nakajima *et al.* 進行 10 種底棲性渦鞭毛藻的小白鼠活體實驗分析的結果，發現其中 8 種呈現出各式的活性(6)；另針對行自由生活，或與海洋扁蟲 *Amphiscolops magniviridis* 共生的渦鞭毛藻 *Amphidinium* spp. 所含大環內酯(macrolides)化合物 – amphidinolides (7-10) 及 caribenolide I (11) 的抗腫瘤活性實驗中，發現 amphidinolide B & N 對於 L1210 及 KB 兩種癌細胞株的  $IC_{50}$  介於 0.05 – 0.14 ng/ml，caribenolide I 對於人類大腸癌細胞株 HCT116 及其抗藥性株 HCT116/VM46 的  $IC_{50}$  為 1 ng/ml，而對老鼠血癌細胞株 P388 的  $IC_{50}$  更低至 0.03 ng/ml，具有十分顯著的抗癌活性。除渦鞭毛藻以外，其他的海洋微細藻尚包含其他 15 個分類大項(12)，其中絕大多數仍為天然藥物開發的處女地，可預期其活性化合物的多樣與實用性，加上微藻的可培養性及穩定性，容易克服量產上的問題，為天然藥物開發的明日之星。

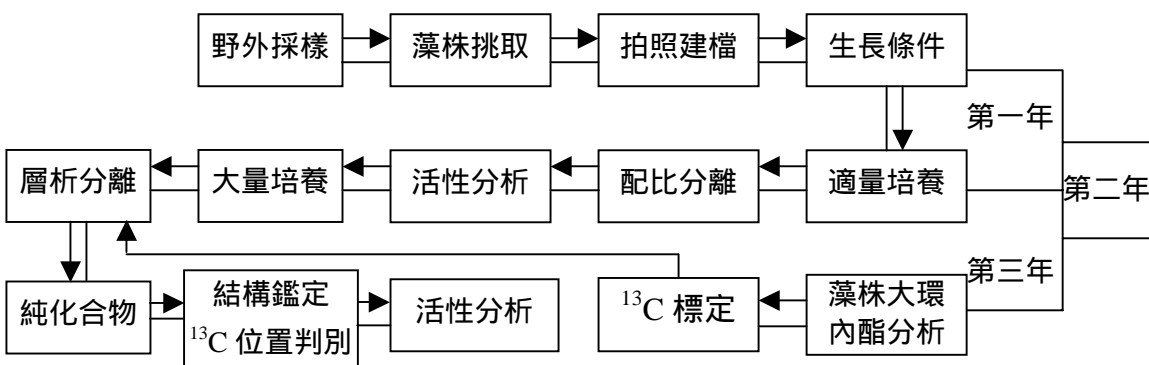
台灣位於熱帶及亞熱帶的交界，地處大陸棚邊緣，東岸緊臨數千米深的海底峽谷，西岸水深不及百米，在地形及氣候上的變化十分多樣；加上四週各種洋流，包括東岸的黑潮暖流、西北岸的大陸閩浙沿岸冷水流及西南南海水團等不同性質水團的匯入，造就了種歧異度甚高之海洋生態環境，水域中富含著各式各樣的微藻，使台灣具備從事微藻天然物研究與開發之優越環境。近年來本實驗室陸續由台灣周遭海域純化分離出許多渦鞭毛藻，經初步的活性分析結果，發現其中包括 *Alexandrium minutum*, *Gambierdiscus toxicus*, *Ostreopsis lenticularis*, *Prorocentrum* spp., *Amphidinium* spp. 及 *Gymnodinium* spp. 在內的藻株有相當高的比例具有活性，且種間的差異極大，容易從中挑出良好的材料進行研究或應用。

現今腫瘤及病毒仍為造成人類死亡的主要原因之一。目前除由疾病模型的建立與致病機理的研究著手之外，另一方面則由新藥之開發與藥物機制上的研究尋求解決之道。本研究以新藥開發的預期目標，提出『台灣產海洋微細藻類之抗癌與抗病毒活性化合物之分離與結構鑑定』的研究主題，期能以實驗室純化及培養微細藻株的技術，配合國家衛生研究院生物技術與藥物研究組所提供之新藥研究核心設施，在最短時間之內開發出具有潛力的

藻類藥物，而能為我國在醫藥研究的發展上有所貢獻。

## 二、研究目的

本計畫訴諸微細藻類的題材，致力於抗癌及抗病毒藥物開發的研究；配合總計畫的採樣，首先由台灣高歧異度的水域環境中單離並培養出不同種類的微藻，以建立本省第一個具有規模的微細藻種源庫為首要目標；後續以此為基礎，進行種源庫中藻株抗癌活性成分的分析與純化。在活性分析部分主要以國家衛生研究院的細胞毒殺活性實驗為依據，配合實驗室的 protein phosphatase 活性抑制分析進行比對；續根據分析結果及藻株大量培養技術的建立，在研究期間內純化並鑑定出 20 種以上具有活性之化合物。計畫後期尚針對原甲藻的大環內酯化合物進行分析，由此篩檢出含量較高的藻株，用以量產這類的化合物進行後續藥物的研究，同時利用  $^{13}\text{C}$  同位素標定的方法進行生合成的研究，期能了解這些具有強烈抗癌活性的特殊環酯化合物在藻細胞內之生合成途徑，同時由此歸納演繹出人工合成的步驟，以為後續全人工合成步驟的參考。



圖一、計畫執行工作的重點與流程

## 三、方法

### 1. 藻類種源庫的建立

於本省週邊沿海及鹹水養殖池為主的區域進行微細藻的採樣，由其中單離出個別的藻細胞進行培養；培養成功的藻細胞利用顯微鏡檢視其純度，同時進行鑑種及拍照的工作。後續測試培養條件，針對光照、溫度、打氣、及培養基的調整，尋求個別藻株最適化之生長條件。

### 2. 活性分析

將欲分析的藻株擴充培養至兩公升後，利用超音波震盪直接打破細胞；隨後依序以正己烷、二氯甲烷及正丁醇各 1/2 升萃取。將萃取液減壓濃縮至乾，完成秤重及標示後，送

至國家衛生研究院進行細胞毒殺活性試驗，測試於 20  $\mu\text{g/ml}$  及 4  $\mu\text{g/ml}$  的濃度下，樣品對人類鼻咽癌細胞株 HONE-1 及人類胃癌細胞株 NUGC 的毒殺活性。

Protein phosphatase 1 (PP-1) 抑制活性的作法是將所有樣品以甲醇溶取，統一調配為 960  $\mu\text{g/ml}$  後進行分析。取出少量樣品，以酵素反應緩衝液稀釋成 1/200 後，取其中 50  $\mu\text{l}$ ，依序和 100  $\mu\text{l}$  緩衝液，含 0.05 U 的 PP-1 酵素液 50  $\mu\text{l}$  加以混合。靜置 10 分鐘後，加入 50  $\mu\text{l}$  的 250 mM *p*-NPP 受值液開始反應；另設置以純粹甲醇代替樣品甲醇溶液的控制組進行比對。由反應一個小時期間，實驗組與控制組於 405 nm 吸光值變化的比值，推估樣品的抑制活性。

### 3. 活性物質的純化、鑑定與活性分析

以 AC06、AC09、PL01 及 PM08 等藻株為材料，進行大量培養。利用連續離心機，將藻液中的細胞收集後，利用甲醇直接萃取；隨後依序以液-液分層、LH-20 膠滲層析、矽膠速分管柱層析及逆相之高效液相層析法進行純化。純化所得樣品除委請國科會貴儀中心進行質譜、核磁共振與 X-ray 繞射的分析外，結構解析完成且足量的樣品續送交國家衛生研究院，進行 HONE-1 及 NUGC 的細胞毒殺活性分析。另委託中國醫藥研究所，按 Alley *et al.* (14) 及 Scudiero *et al.* (15) 的方法，進行人類鼻咽癌細胞株 KB 及人類子宮頸細胞株 Hela 的細胞毒殺活性分析，測試 pheophorbides 類化合物的光敏反應。

### 4. 藻株大環內酯化合物的分析

將原甲藻 *Prorocentrum* 的藻株，在 25  $^{\circ}\text{C}$ ，1500 Lux，光週期 12 小時的條件下，以 500 ml 的三角錐形瓶進行培養；待其達對數生長末期後，取其中 50 ml 進行離心，收集藻細胞。將藻細胞以 50 ml 甲醇萃取 1 次後，萃取液部分以去離子水調整濃度為 90%，以等體積正己烷加以萃取。將正己烷移除後，以去離子水稀釋為甲醇溶液至 60% 後，以等體積之二氯甲烷再萃一次。將甲醇水溶液減壓濃縮至乾，以甲醇回溶，取相當於 5000 個細胞的萃取物進行高效液相層析分析。以 0.01 M 醋酸銨/氬甲烷的流動相，Cosmosil 5C18-ARII (Nacalaitesque, Japan)，尺寸 4.6 x 250 mm 的管柱，配合氬甲烷於 0-10 分鐘內由 25 - 40% 變化的直線梯度流動相進行分析，流速 1 ml/min，以自行純化的大環內酯化合物為標準品，配合 235 nm 的偵檢，以及 photo diode array 的吸收光譜分析進行確認。

## 四、結果與討論

### 1. 微細藻種源庫的建立

在藻株的純化與培養部分，培養成功的微細藻包括 90 株渦鞭毛藻、66 株藍綠藻、8 株矽藻以及定鞭藻、綠藻各 1，合計有 166 株；另有 35 個紅藻及褐藻絲狀體藻株亦附帶納入進行保種與分析(表一、表二)。目前藻株數量仍持續擴增中。

在生長條件部分，初步嘗試經由培養基配方的調整來改善部分藻株的生長情形。實驗室原本以 K medium (13) 為渦鞭毛藻的標準培養基，然發現並非所有的藻株均能培養成功，同時細胞密度往往未如預期，因此以該配方為基礎，另行添加氮、磷鹽後，發現 *Alexandrium* 及 *Amphidinium* 在氮、磷濃度增加(原本濃度的 3 倍以內)的情況下，細胞密度成正比的提昇，

顯見氮磷為其限制因子，然 *Prorocentrum* 的密度卻未見提升，因此將朝向調整其他營養鹽濃度，亦或改變其他生長條件，諸如溫度、光照或光反應器形式的方向來改善 *Prorocentrum* 的生長情形。

## 2. 藻株活性的篩檢

首先在 161 株微細藻中的 37 株發現顯著的細胞毒殺活性(表一、表二)。具有活性的微細藻以渦鞭毛藻為主，其中 *Amphidinium* 及 *Prorocentrum* 有相當高比例的藻株具有活性，同時活性廣佈於不同的極性分層，顯示活性物質的多樣性；*Coolia* 亦有相當高比例的藻株具有活性，然活性較低，且多侷限於氯仿層。此外在 *Alexandrium*、*Gambierdiscus*、*Gyrodinium*、*Ostreopsis* 中具有活性的藻株雖屬少數，然其活性物質的獨特性亦相對提高，有進一步研究的價值。相對於渦鞭毛藻，其他種類出現細胞毒殺活性的頻率較低。在所有藍綠藻及紅藻絲狀體中各僅兩株具有活性，其餘矽藻、綠藻及褐藻中完全沒有發現活性。

有趣的是，所有具有活性的藻種均來自海水或半淡鹹水水域，因此後續的採集將著重於海洋藻類。

在 PP-1c 抑制活性的分析中，發現有來自 24 株藻的 27 個 fractions 具有顯著的抑制活性(表一)。明顯的活性主要出現在 *Prorocentrum* 的氯仿層及 *Microcystis* 的 butanol 層，此部分已知和 *Prorocentrum* 的 OA、DTXs，以及 *Microcystis* 的 microcystins 化合物有關，其餘散布於 *Alexandrium*、*Amphidinium*、*Coolia*、*Gambierdiscus*、*Gymnodinium* 及絲狀藍綠藻品系的 phosphatase inhibitors 則為新的發現。未來將確認這些未知成份是否為 new compounds，及對於 PP-1c 是否具有專一的抑制性。而在酵素抑制活性與抗癌活性關連性的研究中，除 *Prorocentrum* 的 chloroform 層及 *Gambierdiscus* GT01 的 butanol 層同時發現具有此兩種活性外，其餘均無關連。由兩大類純毒：OA, DTXs 及 microcystins 的活性測試結果，已知前者同時具 PP-1 抑制活性及細胞毒殺活性，而 microcystins 雖具強烈抑制 PP-1 的活性，然完全不具細胞毒殺活性，此應和化合物的結構特性有關。推測 OA、DTXs 同時具環醚碳鏈的脂溶性部分及 carboxyl group 的水溶部分，因此容易通過細胞膜而產生細胞毒殺的效果，然 microcystins 的 cyclic peptide 結構較偏水溶性，不易通過細胞膜，因此細胞毒殺的活性極為有限。另其他類藻株所含的 PP-1c 的抑制活性大多來自 hexane 或 butanol 層，屬於較偏脂溶或水溶的化合物，穿透細胞的能力可能亦較差，此或許為為何這些 fractions 不具癌細胞毒殺活性的原因。

## 3. 活性物質的純化與結構鑑定

活性物質純化鑑識部份，共計完成 26 個化合物的純化，以及其中 19 個化合物的鑑定。首先由 PL-01 藻株純化出 7 種黑海綿酸(Okadaic acid, OA)系列的線狀多醚化合物，以及兩種大環內酯(macrolide)類的化合物(圖二)，其中 OA-d9D 及 4-hydroxyprorocentrolide、14-O-acetyl-4-hydroxyprorocentrolide 為新化合物；另由 PM-08 純化出兩種大環內酯類化合物 spiroprorocentrolide 及 prorocentrolide，其中前者為 new skeleton 化合物。後續由 *Amphidinium* 藻株 AC-09 中純化出 5 種 polyhydroxy 線狀多醚化合物 amphidinols、3 種脂肪酸、1 種氨基酸、3 種葉綠素代謝物 pheophorbides (PPBs)，以及一種同屬 polyhydroxy 化合物的 colopsinol 類似物；另由 AC-06 藻株中純化出另外兩種的 amphidinols 化合物(圖三)。在 amphidinols 及 colopsinol 部分，雖因其複雜的結構，至今僅完成其中一種化合物的解析，然由經現有文獻的比對，均能肯定其為新的化合物。後續仍將持續完成這些純質的結構解



析與活性分析。

在活性分析部份，受限於化合物量過少，目前僅完成 pyropheophorbide a、pheophorbide a、pheophorbide a methyl ester 及 amphidinol-A、okadaic acid 及 DTX-1 七個化合物的細胞毒殺活性的測試(表三)，所有化合物均有明顯細胞毒殺活性存在。其他化合物雖因量少仍無法送測，然可由上述實驗結果預期其他 amphidinol 及 okadaic acid 系列化合物應同具明顯細胞毒殺活性；而由文獻中 macrolide 化合物具極顯著細胞毒殺活性的結果，推測本實驗中四個 prorocontrolide 化合物應有極為顯著的細胞毒殺活性，化合物具有活性的比例極高。

在 pheophorbides 部分尚進行光敏反應實驗，比較其在照光的情況下，其細胞毒殺活性是否有明顯增強的趨勢。結果發現其對 KB 及 HeLa 細胞株在照光及不照光的條件下雖均呈現顯著之細胞毒殺活性( $ED_{50} < 20 \mu\text{g/ml}$ )，然其活性值相近，並未出現預期的光敏效應。在 HONE-1 及 NUGC 的分析結果中，pheophorbides 呈現較弱的毒性，在高達  $20 \mu\text{g/ml}$  的劑量時，pheophorbide a 仍不具活性，另兩種 pheophorbide 呈現微弱的活性，顯現國衛院的癌細胞株對於 pheophorbide 具有較強的耐受性。Amphidinol-A 在國衛院的測試中，於  $20 \mu\text{g/ml}$  的劑量下有很強的毒殺活性，然  $4 \mu\text{g/ml}$  則活性較弱；KB 及 HeLa 細胞株所測得之  $ED_{50}$  值則分別為  $5.27$  及  $9.08 \mu\text{g/ml}$ ，顯示其對各種癌細胞株的毒殺活性差異不大。

上述 pheophorbides 的分析，照光與不照光組所以具有近似的活性，推測和照光組所給的光照強度( $620\text{-}650 \text{ Lux}$ )太弱，不足以啟動光敏反應，或是不照光組在培養箱開啟時所接受的短暫微弱光源照射，即足以啟動光敏活性有關。Wongsinkongman *et al.* (16) 的研究中，以 25W 的日光燈，於距離 30 公分的弱光照條件下進行 KB 的毒殺活性分析，即可測得明顯的光敏反應效應。由於本實驗的光照參考上述條件進行設計，因此光照強度不夠的問題理應不存在。另發現 Wongsinkongman *et al.* 的研究中，所測得 pheophorbide a methyl ester 和 pheophorbide a 對 KB 的  $ED_{50}$  值為  $0.6$  及  $0.8 \mu\text{g/ml}$ ，遠較本研究的  $4.49$  及  $4.92 \mu\text{g/ml}$  的值為低。造成此差異的原因可能有二，一為反應劑之差異，本實驗使用 MTT，而 Wongsinkongman *et al.* 使用 SRB (sulforhodamine B) assay，兩種方法所測得之  $ED_{50}$  可能有差；二是本實驗所用之細胞株培養較多代，已有老化的趨勢。由於活性分析操作人員曾反應出同樣的細胞株在培養越多代的情況下，其對許多化合物的耐受性會提升。由一般 KB 對 mitomycin 的  $ED_{50}$  小於  $0.1 \mu\text{g/ml}$ ，然本實驗的活性測試值卻高達  $0.49 \mu\text{g/ml}$ ，由此研判本實驗的活性數值的偏高，應和細胞株的老化有關，而來自反應劑劑之差異。

本實驗中另行將過去研究所純化的藍綠藻毒素 microcystin (MCYST)，包括 MCYST-LR, -RR, -FR, -WR,  $[Dha^7]$ MCYST-LR, -RR 進行細胞毒殺活性分析，結果均未發現顯著活性，推測和其環狀 peptide 的結構不易進入細胞有關。

#### 4. 研究室現有 *Procentrum* 藻株大環內酯成份的分析

研究結果顯示，大多數的 *Procentrum lima* (PL) 與 *Procentrum sp.* PS 藻株含一至兩種已知的大環內酯成份，組成形式差異不大；*Procentrum minutum* (PM) 藻株和 PL 與 PS 間則有較明顯的差異(圖四)，除含有大環內酯的頻率較低外，種類也不太相同。在 PM 藻株中，僅發現 prorocontrolide 及 spiroprocentromine 兩種，然 PL 及 PS 除 prorocontrolide、4-hydroxyl-prorocontrolide 及 14-O-acetyl-prorocontrolide 外，另在 PL-05、-08 及 PS-01 中發現一疑似大環內酯類的物質，種類十分多樣。在初步的結構解析中，已知該化合物為極似 prorocontrolide 的化合物。由於在 PL-08 中所含該物質的含量極高，層析圖譜又十分單純，容易純化，因此後續除將儘速分析其結構外，同時將以本藻種進行 prorocontrolide 化合物的合成實驗，以及該化合物的量產。

表一、實驗室現有藻株的種類及活性測試結果

渦鞭毛藻

學名藻株	Hone-1			NUGC			PP-1			
	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	BuOH	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	BuOH	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	BuOH	
<i>Alexandrium minutum</i>	Amtk1	1%	2%	104%	6%	1%	122%	72%	97%	69%
	Amtk2	1%	1%	93%	7%	5%	126%	103%	98%	58%
	Amtk3	-1%	104%	92%	0%	117%	124%	91%	95%	105%
	Amtk4	106%	107%	79%	107%	125%	119%	92%	102%	62%
	Amtk5	110%	106%	100%	108%	118%	124%	97%	102%	104%
	Amtk6	105%	104%	98%	114%	118%	120%	107%	114%	98%
	Amtk7	110%	105%	96%	112%	119%	122%	88%	98%	91%
	Amks1	124%	127%	109%	99%	106%	103%	104%	101%	90%
	Amks2	103%	103%	49%	114%	117%	107%	91%	94%	37%
	Amks3	102%	102%	99%	120%	122%	122%	60%	92%	92%
	Amks4	106%	104%	99%	115%	121%	122%	106%	102%	74%
Amks5	127%	133%	111%	101%	101%	104%	23%	102%	106%	
<i>Alexandrium tamarense</i>	Athk1	92%	103%	104%	102%	2%	105%	107%	115%	100%
	Athk2	96%	84%	99%	93%	97%	101%	98%	102%	90%
	Atan-1	*	*	*	*	*	*	-	-	-
<i>Amphidinium carterae</i>	AC01	90%	88%	94%	11%	3%	1%	42%	32%	42%
	AC02	119%	10%	-1%	102%	2%	0%	50%	39%	37%
	AC03	114%	1%	0%	114%	2%	0%	28%	46%	40%
	AC04	102%	102%	0%	103%	96%	0%	66%	63%	54%
	AC05	110%	104%	0%	98%	109%	1%	42%	48%	49%
	AC06	119%	110%	0%	102%	115%	0%	35%	42%	40%
	AC07	119%	122%	1%	100%	107%	0%	103%	102%	67%
	AC08	55%	110%	32%	108%	117%	2%	58%	77%	71%
	AC09	111%	0%	0%	101%	5%	1%	57%	48%	40%
	AC10	94%	121%	129%	97%	103%	105%	96%	92%	72%
	AC11	121%	90%	88%	121%	121%	118%	104%	106%	111%
<i>Amphidinium klebsii</i>	AK01	78%	96%	0%	100%	117%	0%	40%	50%	51%
<i>Amphidinium spp.</i>	AS01	-	-	-	107%	104%	81%	58%	71%	70%
	AS02	-	-	-	105%	100%	104%	55%	52%	75%
	AS03	-	-	-	104%	97%	102%	75%	73%	82%
	AS04	108%	101%	105%	96%	82%	88%	86%	82%	75%
	AS05	-	-	-	103%	100%	107%	76%	10%	66%
	AS06	-	-	-	105%	104%	103%	23%	64%	69%
	AS08	*	*	*	*	*	*	-	-	-
	AS09	*	83%	109%	*	106%	109%	-	-	-
	<i>Coolia monotis</i>	CM01	107%	52%	109%	99%	52%	112%	57%	52%
CM02		106%	61%	123%	96%	126%	127%	64%	48%	74%
CM03		100%	52%	109%	101%	48%	113%	62%	61%	54%
CM04		110%	62%	116%	96%	72%	113%	106%	103%	46%
CM05		98%	58%	108%	96%	66%	108%	63%	66%	34%
CM06		91%	121%	108%	101%	114%	107%	68%	76%	80%
CM08		103%	89%	-	99%	86%	108%	77%	75%	68%
CM09		-	-	-	108%	108%	109%	61%	61%	60%
CM10		96%	91%	0%	103%	108%	74%	71%	37%	53%
CM11		95%	129%	111%	114%	104%	103%	83%	76%	16%
CM15		85%	127%	107%	109%	82%	107%	103%	98%	96%
CM16		119%	1%	107%	100%	0%	104%	98%	99%	89%
<i>Gambierdiscus toxicus</i>		GT01	94%	-1%	93%	112%	1%	109%	88%	95%
	GT05	103%	106%	100%	119%	120%	115%	117%	114%	109%
<i>Gymnodinium catenatum</i>	GCHK01	99%	100%	93%	122%	121%	117%	88%	87%	12%

續表一

### 渦鞭毛藻

學名藻株	Hone-1			NUGC			PP-1			
	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	BuOH	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	BuOH	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	BuOH	
<i>Gymnodinium</i> sp.	YL01	111%	139%	123%	101%	128%	107%	72%	56%	66%
<i>Gyrodinium instriatum</i>	GI02	-	-	-	103%	104%	95%	62%	73%	64%
	GI03	-	-	-	104%	103%	109%	78%	67%	80%
	GI08	-	-	-	102%	104%	103%	70%	70%	70%
<i>Gyrodinium</i> spp.	GY01	110%	105%	97%	112%	125%	121%	73%	90%	83%
	GY04	82%	11%	113%	37%	-1%	104%	100%	104%	112%
	GY05	126%	130%	113%	107%	102%	105%	65%	76%	72%
<i>Ostreopsis lenticularis</i>	OL01	120%	122%	115%	110%	122%	149%	123%	104%	105%
<i>Ostreopsis</i> spp.	OL02	90%	99%	92%	123%	118%	114%	84%	93%	94%
	OL03	91%	104%	89%	122%	118%	118%	49%	96%	97%
	OL04	98%	102%	94%	123%	114%	115%	94%	91%	90%
	OL05	96%	100%	94%	123%	120%	120%	55%	101%	92%
	OS02	102%	0%	-1%	112%	0%	0%	115%	115%	50%
<i>Prorocentrum lima</i>	PL01	113%	-1%	1%	103%	26%	2%	85%	48%	106%
	PL02	0%	0%	0%	6%	1%	1%	104%	86%	42%
	PL03	0%	4%	4%	1%	2%	3%	106%	10%	75%
	PL04	6%	3%	5%	3%	8%	5%	89%	34%	82%
	PL05	4%	2%	4%	2%	6%	3%	100%	20%	61%
<i>Prorocentrum maxicanum</i>	PM03	123%	121%	107%	102%	121%	117%	77%	72%	60%
<i>Prorocentrum</i> spp.	PE01	102%	79%		104%	87%		88%		
	PL07	98%	1%	2%	118%	1%	1%	66%	63%	31%
	PL08	104%	0%	25%	100%	1%	12%	100%	47%	94%
	PM01				109%	37%	105%	76%	72%	69%
	PM02				103%	95%	103%	60%	62%	68%
	PM04				107%	71%	108%	57%	40%	52%
	PM05				109%	105%	104%	59%	46%	50%
	PM06				103%	77%	108%	70%	57%	46%
	PM07				105%	107%	108%	65%	66%	38%
	PM08	93%	114%	107%	92%	113%	109%	57%	54%	59%
	PM09				107%	93%	104%	40%	47%	66%
	PM10				103%	100%	103%	89%	97%	83%
	PM11				107%	108%	105%	74%	87%	97%
	PM12	72%	-1%	106%	52%	-1%	103%	100%	38%	103%
	PS01	2%	0%	108%	1%	1%	106%	77%	89%	76%
	PS02	3%	3%	4%	3%	7%	4%	82%	28%	18%
	PS03	0%	2%	5%	2%	0%	2%	90%	16%	84%
PS04	105%	100%	107%	98%	100%	91%	109%	73%	98%	
PS06	110%	-1%	105%	118%	1%	127%	16%	32%	76%	
PS07	113%	-1%	105%	102%	0%	107%	56%	88%	88%	
<i>Prorocentrum tropicalis</i>	PT01	110%	2%	105%	99%	81%	107%	87%	95%	102%

### 藍綠藻

<i>Coelosphaerium</i> sp.	C.TN1	104%	103%	104%	123%	121%	128%	88%	100%	131%
<i>Microcystis aeruginosa</i>	M.TY1	106%	105%	103%	115%	125%	122%	111%	95%	1%
	M.TY2	109%	109%	107%	117%	110%	110%	75%	92%	0%
	M.YL1	110%	109%	108%	120%	122%	124%	112%	100%	86%

續表一

藍綠藻

學名	藻株	Hone-1			NUGC			PP-1		
		C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	BuOH	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	BuOH	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	BuOH
<i>Microcystis aeruginosa</i>	M.TN1	104%	93%	101%	111%	105%	114%	65%	74%	89%
	M.TN2	100%	102%	105%	109%	104%	112%	97%	83%	9%
	M.TN3	100%	104%	105%	114%	105%	113%	59%	56%	88%
	M.TN4	106%	104%	106%	113%	99%	111%	32%	68%	-3%
	M.TN5	95%	105%	103%	120%	112%	111%	30%	63%	43%
	M.KS1	105%	104%	111%	117%	102%	111%	65%	78%	64%
	M.KS15	108%	113%	108%	120%	113%	109%	5%	34%	2%
M.KS29	112%	111%	114%	121%	113%	113%	72%	101%	-1%	
<i>Oscillatoria</i> sp.	O.TS1	106%	103%	106%	115%	116%	112%	50%	67%	70%
<i>Spirulina</i> spp.	FE-01	94%	101%	106%	108%	95%	100%	-	-	-
	FE-02	101%	102%	105%	100%	103%	106%	-	-	-
	FE-03	1055	111%	103%	107%	111%	109%	-	-	-
	FE-04	102%	95%	105%	95%	105%	105%	-	-	-
	FE-05	100%	105%	105%	99%	106%	108%	-	-	-
	FE-06	56%	111%	95%	103%	108%	91%	-	-	-
	FE-07	102%	85%	98%	99%	102%	105%	-	-	-
	FE-08	105%	97%	105%	104%	109%	107%	-	-	-
	FE-09	*	*	*	*	*	*	-	-	-
	FE-10	*	*	*	*	*	*	-	-	-
	FE-11	83%	104%	102%	101%	96%	109%	88%	85%	88%
	NP-01	*	*	*	*	*	*	-	-	-
	NP-02	*	*	*	*	*	*	-	-	-
	NP-03	*	*	*	*	*	*	-	-	-
	NP-04	*	*	*	*	*	*	-	-	-
	NP-05	*	*	*	*	*	*	-	-	-
	NP-06	*	*	*	*	*	*	-	-	-
	NP-07	*	*	*	*	*	*	-	-	-
	NP-08	*	*	*	*	*	*	-	-	-
	NP-09	*	*	*	*	*	*	-	-	-
	NP-10	*	*	*	*	*	*	-	-	-
NP-11	*	*	*	*	*	*	-	-	-	
NP-12	*	*	*	*	*	*	-	-	-	
NP-13	*	*	*	*	*	*	-	-	-	
NP-14	*	*	*	*	*	*	-	-	-	
NP-15	*	*	*	*	*	*	-	-	-	
NP-16	*	*	*	*	*	*	-	-	-	
NP-17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
NP-18	*	*	*	*	*	*	-	-	-	
NP-19	*	*	*	*	*	*	-	-	-	
NP-20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
NP-21	*	*	*	*	*	*	-	-	-	
品種未知	BG1	1%	97%	95%	2%	108%	113%	106%	109%	113%
	BG2	104%	113%	111%	116%	110%	108%	35%	68%	69%
	BG3	115%	130%	120%	98%	115%	112%	84%	88%	67%
	BG4	118%	146%	119%	101%	111%	106%	95%	89%	101%
	BG5	118%	132%	112%	99%	101%	106%	87%	91%	99%
	BG6	95%	88%	94%	110%	113%	115%	113%	114%	112%
	BR1	104%	98%	94%	102%	110%	113%	92%	96%	92%
	BR2	104%	98%	94%	98%	99%	102%	99%	95%	85%
BR3	97%	93%	99%	110%	114%	119%	109%	117%	110%	
BR4	98%	98%	95%	114%	113%	117%	110%	111%	109%	

續表一  
藍綠藻

學名藻株	Hone-1			NUGC			PP-1			
	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	BuOH	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	BuOH	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	BuOH	
品種未知	CG1	100%	99%	98%	104%	112%	116%	90%	96%	90%
	CG2	106%	97%	89%	100%	109%	109%	110%	112%	96%
	CG3	96%	95%	102%	101%	102%	93%	91%	15%	93%
	CR1	98%	91%	98%	104%	112%	110%	106%	105%	111%
	CR2	99%	94%	97%	108%	106%	117%	126%	103%	104%
	CR3	93%	90%	95%	103%	5%	119%	100%	106%	107%
	CR4	97%	99%	99%	115%	116%	120%	115%	112%	111%
	CR5	98%	99%	99%	108%	114%	118%	25%	51%	79%
	OS1	96%	96%	102%	113%	119%	125%	88%	102%	106%
	菲六	*	*	*	*	*	*	-	-	-

定鞭藻

<i>Prymnesium parvan</i>	PP1	29%	130%	117%	47%	113%	105%	96%	92%	93%
--------------------------	-----	-----	------	------	-----	------	------	-----	-----	-----

綠藻

<i>Dunaliella</i> sp.	DS1	58%	52%	105%	102%	111%	63%	104%	110%	94%
-----------------------	-----	-----	-----	------	------	------	-----	------	------	-----

矽藻

品種未知	CF3	102%	98%	101%	108%	114%	120%	110%	105%	108%
	DP1	*	*	*	*	*	*	-	-	-
	G2	94%	99%	99%	133%	118%	123%	110%	110%	119%
	MP1	102%	103%	103%	108%	112%	116%	99%	104%	114%
	MP2	102%	100%	102%	111%	111%	109%	102%	107%	102%
	Unk1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Unk2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Unk3	-	-	-	-	-	-	-	-	-

紅藻絲狀體

<i>Bangia atropurpurea</i>	Ba01	123%	119%	105%	104%	101%	108%	-	-	-
	Ba02	113%	82%	101%	106%	89%	107%	-	-	-
	Ba03	0%	110%	108%	96%	110%	105%	-	-	-
	Ba04	93%	113%	107%	88%	107%	106%	-	-	-
	Ba05	1%	85%	101%	73%	110%	112%	-	-	-
<i>Galaxaura cylindrica</i>	Gc01	108%	105%	115%	107%	108%	106%	-	-	-
<i>Galaxaura oblogata</i>	Go01	110%	122%	106%	110%	108%	98%	-	-	-
<i>Grateloupia filicina</i>	Gf01	103%	110%	110%	108%	109%	108%	-	-	-
<i>Grateloupia</i> sp.	Grs01	108%	100%	106%	103%	97%	98%	-	-	-
	Grs02	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Grs03	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Grs04	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Helminthocladia australis</i>	Ha01	116%	121%	107%	116%	114%	104%	-	-	-
	Ha02	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ha03	101%	98%	98%	103%	104%	103%	-	-	-
	Ha04	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Halymenia ceylanica</i>	Hc01	117%	125%	111%	105%	111%	112%	25%	27%	40%
	Hc02	109%	129%	105%	99%	108%	88%	30%	45%	39%
	Hc03	119%	105%	106%	110%	108%	108%	-	-	-
<i>Liagora orientalis</i>	Lo01	121%	117%	112%	112%	100%	98%	-	-	-

續表一

**紅藻絲狀體**

學名	藻株	Hone-1			NUGC			PP-1		
		C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	BuOH	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	BuOH	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	BuOH
<i>Liagosa</i> sp.	Ls01	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ls02	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Porphyra angusta</i>	Pa01	123%	119%	105%	104%	101%	108%	-	-	-
<i>Porphyra dentata</i>	Pd01	*	*	*	*	*	*	-	-	-
<i>Porphyra yezoensis</i>	Py01	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Porphyridium</i> sp.	Pos01	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pterocladia capillacea</i>	Pc01	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Scinaia moniformis</i>	Sm01	115%	121%	111%	114%	114%	107%	-	-	-
品種未知	Unk01	-	-	-	--	-	-	-	-	-
	Unk02	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Unk03	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Unk06	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Unk07	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Unk08	-	-	-	-	-	-	-	-	-

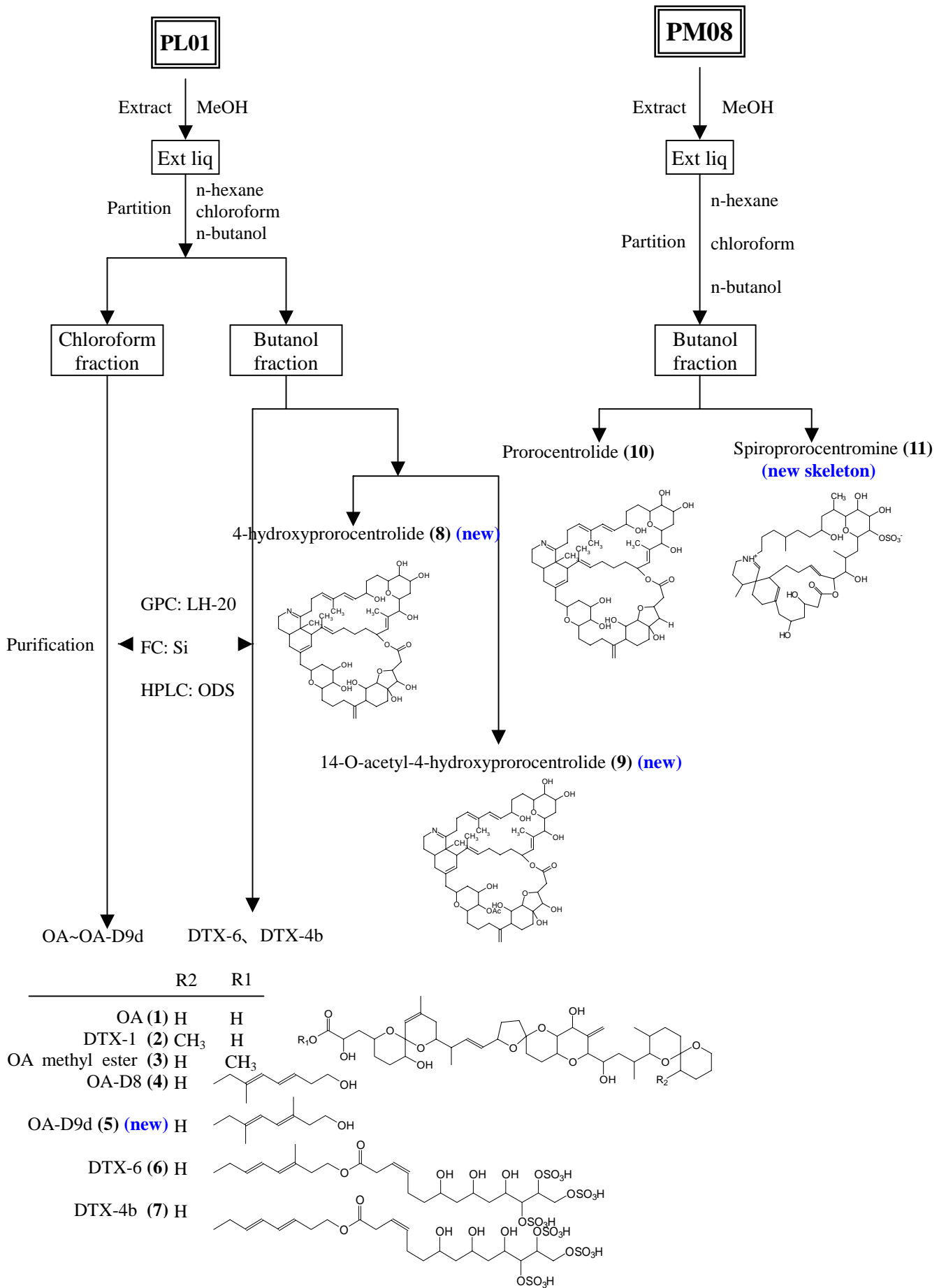
**褐藻絲狀體**

<i>Ectocarpus</i>	Ec01	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-------------------	------	---	---	---	---	---	---	---	---	---

\*表已送測，結果未送回， -表未送測

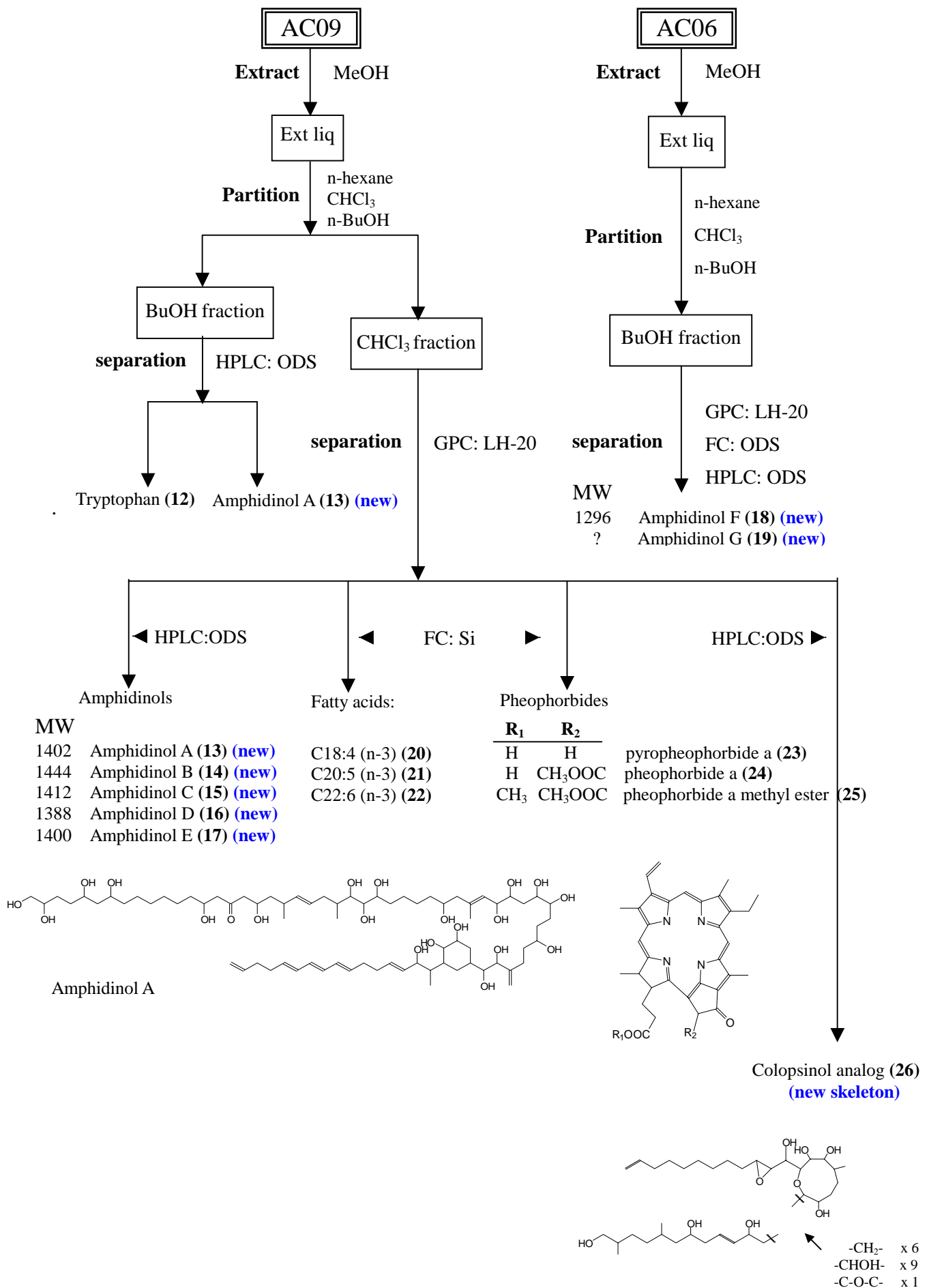
表二、藻株活性分析統計數據

分類別	屬名	總株數	送測數	癌細胞毒殺活性數*			PP-1 抑制活性數**				
				株數	己烷層	氯仿層	丁醇層	株數	己烷層	氯仿層	丁醇層
渦鞭藻	<i>Alexandrium</i>	15	15	4	3	3	0	1	1	0	0
	<i>Amphidinium</i>	20	20	10	1	4	10	3	2	1	0
	<i>Coolia</i>	12	12	2	0	1	1	1	0	0	1
	<i>Gamdierdiscus</i>	2	2	1	0	1	0	1	0	0	1
	<i>Gymnodinium</i>	2	2	0	0	0	0	1	0	0	1
	<i>Gyrodinium</i>	6	6	1	0	1	0	0	0	0	0
	<i>Ostreopsis</i>	6	6	1	0	1	1	0	0	0	0
	<i>Prorocentrum</i>	27	27	14	7	14	9	5	1	3	1
藍綠藻	<i>Coelosphaerium</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Microcystis</i>	12	12	0	0	0	0	8	3	0	7
	<i>Oscillatoria</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Spirullina</i>	32	30	0	0	0	0	0	0	0	0
	Unidentified	20	20	2	1	1	0	2	1	1	0
矽藻	Unidentified	8	5	0	0	0	0	0	0	0	0
定鞭藻	<i>Prymnesium</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
綠藻	<i>Dunallina</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
紅藻	<i>Bangia</i>	5	5	2	2	0	0	0	0	0	0
	<i>Galaxaura</i>	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Grateloupia</i>	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Helminthocladia</i>	4	2	0	0	0	0	2	2	1	0
	<i>Halymenia</i>	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Liagora</i>	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Porphyra</i>	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Porphyridium</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Pterocledia</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Scinaria</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	Unidentified	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
褐藻	<i>Ectocarpus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>總計</b>		201	178	37	14	26	21	24	10	6	11



圖二、*Prorocentrum* 藻株化合物純化流程及結構鑑定結果





圖三、Amphinidium 藻株化合物純化流程及結構鑑定結果

表三、化合物之活性分析數據

化合物名稱	編號	NUGC		HONE-1	
		10 $\mu$ M	50 $\mu$ M	10 $\mu$ M	50 $\mu$ M
Okadaic acid	1	-1%	3%	5%	3%
DTX-1	2	0%	4%	10%	2%
MCYST-LR	27	103%	101%	103%	104%
MCYST-RR	28	99%	93%	100%	100%
MCYST-FR	30	99%	99%	95%	100%
MCYST-WR	31	103%	107%	101%	103%
[Dha <sup>7</sup> ] MCYST-LR	32	104%	103%	103%	98%
[Dha <sup>7</sup> ] MCYST-RR	33	103%	100%	99%	104%

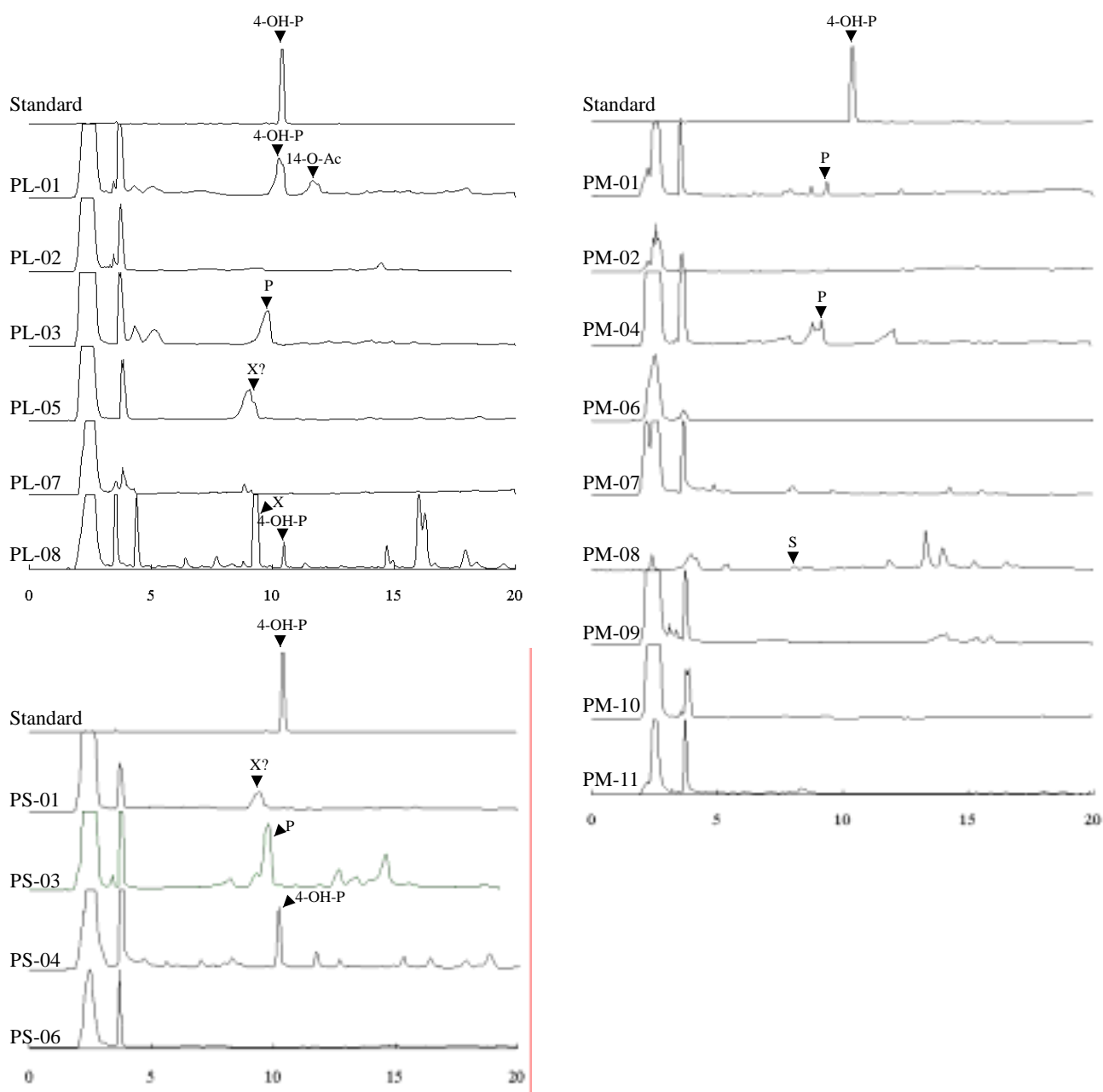
化合物名稱	編號	NUGC		HONE-1	
		4 $\mu$ g/ml	20 $\mu$ g/ml	4 $\mu$ g/ml	20 $\mu$ g/ml
Amphidinol-A	13	97%	0%	85%	0%
Pyropheorbide a	23	127%	85%	76%	34%
Pheorbide a	24	94%	1%	75%	0%
Pheorbide a methyl ester	25	88%	39%	35%	13%

化合物名稱	編號	KB ED <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)		HELA ED <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)	
		不照光	照光	不照光	照光
Amphidinol-A	13	5.27	-	9.08	-
Pyropheorbide a	23	1.68	2.36	1.21	1.13
Pheorbide a	24	5.53	4.92	3.11	4.03
Pheorbide a methyl ester	25	2.71	4.49	2.15	5.39
Mitomycin*	-	0.49	-	0.94	-

\* positive control

## 五、成果自評

在藻種源庫的建立部份，目前已完成近兩百株微細藻株的建立與培養。以現有研究室的人力和經費評量，和國外數個知名大型種原庫的規模與成果相比毫不遜色。本藻株種源庫的建立，不僅能為本計畫後續研究持續提供良好材料，尚能支援國內外其他相關研究之進行，價值非凡。在藻株的活性篩檢中，已知在本種源庫的許多渦鞭毛藻藻株中含有許多獨特的活性成份，極具開發的價值，評估在未來的十至十五年內，可陸續由此開發出許多成果。而在活性物質的純化與結構解析中，目前雖已完成 26 種化合物的純化，然由於絕大多數物質的結構均十分複雜，因此目前僅完成 19 個化合物結構的解析。其餘化合物雖仍無法在近日內解析完成，然由初步與文獻的比對中，得知其幾乎均為新化合物，且含有活性的比例極高，極具開發的價值。



圖四、*Prorocentrum* 藻株的大環內酯分析結果。P: prorocentrolide, 4-OH-P: 4-hydroxyprorocentrolide, 14-O-P: 14-O-acetylprorocentrolide, X: prorocentrolide analog, S: spiroprorocentromine.

## 六、參考文獻

1. Garsen, M. J., 1994. The biosynthesis of sponge secondary metabolites: why it is important. In: van Soest, R. W. M., van Kempen, T. M. G., Breakman, J. C. (Eds.), *Sponges in time and space*. Balkema, Rotterdam, pp.427-440.
2. Murray, H. G., Blunt, J. W., Dumdei, E. J., Hickford, S. J. R., Lill, R. E., Christopher, C. N. and Duckworth, A. R., 1999. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *J. Biotech.*, 70:15-25.
3. Kobayashi, J. I. and Ishibashi, M., 1993. Bioactive metabolites of symbiotic marine microorganism. *Chem. Rev.*, 93:1753-1769.
4. Tachibana, K., Sheuer, P. J., Tsukitani, H., van Engen, D., Clardy, J., Gopichand, Y. and Shmitz, F. J., 1981. Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two sponges of the genus *Halichondria*. *J. Am. Chem. Soc.*, 103:2469-2471.
5. Murakami, Y., Oshima, Y. and Yasumoto, T., 1982. Identification of okadaic acid as a toxic component of marine dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 48: 69-72.
6. Nakajima, I., Oshima, Y. and Yasumoto, T., 1981. Toxicity of benthic dinoflagellates in Okinawa. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 47: 543-572.
7. Ishibashi, M. and Kobayashi, J. I., 1997. Amphidinolides: unique macrolides from marine dinoflagellates. *Heterocycles*, 44: 543-572.
8. Tsuda, M., Endo, T. and Kobayashi, J. I., 1999. Amphidinolide U, noval 20-membered macrolide from marine dinoflagellate *Amphidinium* sp.. *Tetrahedron*, 55: 14565-144570.
9. Kubota, T., Tsuda, M. and Kobayashi, J. I., 2000. Amphidinolide V, noval 14-membered macrolide from marine dinoflagellate *Amphidinium* sp.. *Tetrahedron Lett.*, 41: 713-719.
10. Tsuda, M., Endo, T. and Kobayashi, J. I., 2000. Amphidinolide T, noval 19-membered macrolide from marine dinoflagellate *Amphidinium* sp.. *J. Org. Chem.*, 65: 1349-1352.
11. Bauer, I., Maramba, L., Young, K. A. and Shimizu, Y., 1995. Isolation and structure of caribenolide I, a high potent antitumor macrolide from a dinoflagellate, *Amphidinium* sp. S1-36-5. *J. Org. Chem.*, 60: 1084-1086.
12. South, G. R. and Whittick, A., 1987. Introduction to phycology. Blackwell Scientific Publication, pp. 5-9.
13. Keller, M. D. and Guillard, R. R. L., 1985. Factors significant to marine dinoflagellate culture. In: *Toxic dinoflagellates*. Anderson, D. M., White, A. W. and Baden, D. G. (eds), Elsevier, New York, pp. 113-116.
14. Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monks, A., Hursey, M. L., Czerwinski, M. J., Fine, D. L., Abbott, B. J., Mayo, J. G., Shoemaker, R. H. and Boyd, M. R., 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.*, 48: 589-601.
15. Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paul, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H.,

Currens. M. J., Seniff, D. and Boyd, M. R., 1988. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.*, 48: 4827-4833.

16. Wongsinkongman, P., Brossi, A., Wang, H. K., Bastow, K. W. and Lee, K. H., 2002. Antitumor agents. Part 209: pheophorbide-a derivatives as photo-independent cytotoxic agents. *Bioorg. Med. Chem.*, 10: 581-591.

## 附件：相關著作

註：群體計畫(PPG)者，不論是否提出各子計畫資料，都必須提出總計畫整合之資料。若為群體計畫，請勾選本表屬於 ■ 子計畫；或 總計畫(請自行整合)。

1. 列出貴計畫於本年度中之所有計畫產出於下表，包含已發表或已被接受發表之文獻、已取得或被接受之專利、擬投稿之手稿 (manuscript) 以及專著等。
2. 「計畫產出名稱」欄位：請依「臺灣醫誌」參考文獻方式撰寫；
3. 「產出型式」欄位：填寫該產出為國內期刊、國外期刊、專利、手稿或專著等。
4. 「SCI」欄位：Science Citation Index，若發表之期刊為SCI所包含者，請在欄位上填寫該期刊當年度之 impact factor。
5. 「致謝與否」欄位：請註明該成果產出之致謝單位。若該成果產出有註明國科會資助字樣者，請以NSC註明。

序號	計畫產出名稱	產出型式	SCI*	致謝與否
1.	Lu, C. K., Lee, G. H., Huang, R. and Chou, H. N., 2001. Spiro-prorocentrimine, a noval macrocyclic lactone from a benthic <i>Prorocentrum</i> sp. of Taiwan. <i>Tetrahedron Lett.</i> , 42: 1713-1716.	國外期刊	是	
2.	Lu, C. K. and Chou, H. N., 2001. Research of marine dinoflagellate bioactive compounds in Taiwan. Proceeding of 70th anniversary of the Japanese society of fisheries science international commemorative symposium	國外期刊	否	
3.	Lu, C. K. and Chou, H. N., 2001. Toxins of <i>Prorocentrum</i> spp. (Dinophyta) isolated from Taiwan. 10th International Symposium on marine nature product, Nanko, Okinawa.	研討會	-	
4.	Chou, H. N., Lu, C. K., Oshima, Y. and Quilliam, M. A., 2001. Studies of dinoflagellate toxins toward certified reference material and pharmaceutical development. 10th International Symposium on marine nature product, Nanko, Okinawa.	研討會	-	
5.	Chen, Y.-M., Bai, J. -Y, Huang, R. and Chou, H. N., 2001. Protein phosphatase assay for screening toxic <i>Microcystis</i> . 6th Asian fisheries forum, Kaohsiung, Taiwan.	研討會	-	
6.	台灣產兩種原甲藻的毒素研究	博士論文	-	
7.	渦鞭毛藻 <i>Amphidinium carterae</i> 活性物質的研究及分析	碩士論文	-	

\*本表如不敷使用，請自行影印。