



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของซีรัมโบนจากกะทือ
และฤทธิ์ทางชีวภาพ”

โดย นางสาวฉวี เย็นใจ และคณะ

31 มิถุนายน 2553

สัญญาเลขที่ DBG5180016

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของชีวมวลจากกะทือ และฤทธิ์ทางชีวภาพ”

คณะผู้วิจัย

- | | | |
|-----------------|------------|---|
| 1. นางสาวฉวี | เย็นใจ | ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น |
| 2. นางสาวจันทนา | บุญยะรัตน์ | คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น |
| 3. นางจริยา | หาญจนวงศ์ | ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น |

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอแสดงความขอบคุณต่อสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ให้การสนับสนุนด้านเงินทุนในการทำวิจัย โดยงานวิจัยชิ้นนี้ได้รับทุนประจำปี 2551-2553

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ และคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความสะดวกในการใช้สถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่จำเป็น

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการวิจัยทดลองฤทธิ์ทางชีวภาพศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ให้การสนับสนุนในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

คณะผู้วิจัย

2553

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1
สารบัญ	2
บทคัดย่อ	3
สรุปโครงการ	5
บทนำ	7
การทดลองผลการทดลอง	9
วิเคราะห์ผลการทดลอง	21
สรุปผลการทดลอง	31
ภาคผนวก	34

บทคัดย่อ

ซีรัมโบนที่แยกได้จากเหง้ากะทือนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง ได้สารอนุพันธ์ทั้งสิ้น 22 สาร เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีอันประกอบด้วย KKU100, KKU-M139, KKU-M156, KKU-M213 and KKU-M214 เซลล์มะเร็ง KB, NCI-H187, MCF-7 และเซลล์ปกติ Vero cells นอกจากนี้ยังทดสอบฤทธิ์ด้านเชื้อมาลาเรียอีกด้วย ผลการทดสอบพบว่าเอมีน 3 และ ไชยาโนเอมีน 16 แสดงฤทธิ์กับเซลล์ KKU100 ด้วยค่า $IC_{50} = 3.87$ และ $2.39 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ในการศึกษากลไกการออกฤทธิ์โดยใช้โปรแกรมโมเลคิวลาร์ ค็อกกิ้ง เพื่อดูการจับกันของอนุพันธ์ซีรัมโบนกับเอนไซม์ CDK-2, CDK-5, EGFR, และ GSK-3 พบว่าสาร 3 และ 16 จะมีอันตรกิริยากับเอนไซม์ EGFR ที่ดีกว่า

สารไบโอรีดักทีฟ 29 และ 30 ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยการเชื่อมต่อกันของสาร 3 และ 24 กับกรดควิโนนโพรพิโอนิก ตามลำดับ สารที่ได้สร้างขึ้นเพื่อให้มีการหลุดออกของสารพิษอย่างจำเพาะเจาะจงที่เซลล์มะเร็งที่มีเอนไซม์รีดักเตสและสภาวะขาดออกซิเจน สารทั้งสองแสดงค่าความเป็นพิษที่น้อยต่อเซลล์ NCI-H187 และ MCF-7 ซึ่งมีเอนไซม์รีดักเตส ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปฏิกิริยารีดักชันเกิดขึ้นได้ไม่สมบูรณ์

ABSTRACT

Zerumbone isolated from *Zingiber zerumbet* Smith was used as the starting material for structural modification. Twenty-two derivatives were synthesized and evaluated for cytotoxicity against cholangiocarcinoma cell lines including KKU100, KKU-M139, KKU-M156, KKU-M213 and KKU-M214 as well as cytotoxicity against KB, NCI-H187, MCF-7 and Vero cells. All compounds also evaluated for antimalarial activity. Amine 3 and cyanoamine 16 showed cytotoxicity against KKU-100 cell line (the least sensitive) with IC_{50} values of 3.87 and 2.39 $\mu\text{g/ml}$. To investigate the potential molecular target of the most active compound, the docking was performed using different enzymes and receptor proteins including CDK-2, CDK-5, EGFR, and GSK-3. The docking results revealed that 3 and 16 exhibited better binding interaction to EGFR than CDK-2, CDK-5 and GSK-3.

Bioreductive agents 29 and 30 were synthesized by the connection of 3 and 24 with quinone propionic acid, respectively. These prodrugs have been designed to release toxic moieties selectively and preferentially under reductive or hypoxic conditions. Both compounds showed weaker cytotoxicity against NCI-H187 and MCF-7 cell lines (reductase containing cells). These results may be due to the partial reduction of quinone derivatives resulting in the small amount of toxic moiety in cancer cells.

บทสรุปโครงการ

ชื่อโครงการ การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของซีรัมโบนจากกะทือและฤทธิ์ทางชีวภาพ

ผู้ดำเนินการวิจัย

1. นางสาวฉวี	เย็นใจ	(หัวหน้าโครงการ)
2. นางสาวจันทนา	บุญยะรัตน์	(นักวิจัย)
3. นางจริยา	หาญจนวงศ์	(นักวิจัย)
4. นางสาวอุไรวรรณ	ส่งเสียง	(นักศึกษาปริญญาโท)
5. นางสาวสิริพิศ	พิศชวนชม	(นักศึกษาปริญญาเอก)

สถานที่ทำงาน

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ช่วงเวลาการดำเนินงานวิจัย กรกฎาคม 2551-มิถุนายน 2553

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสังเคราะห์อนุพันธ์ของซีรัมโบนที่น่าจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีขึ้น โดยมุ่งเน้นฤทธิ์ต้านมะเร็ง นอกจากนี้จะศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อรา ด้านเชื้อวัณโรค ด้านเชื้อมาลาเรียอีกด้วย
2. ศึกษากลไกการจับกันของยากับรีเซพเตอร์หรือเอนไซม์โดยใช้เทคนิคทางคอมพิวเตอร์ โดยสร้างแบบจำลองของเอนไซม์หรือรีเซพเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง แล้วนำมาศึกษาโดยใช้เทคนิคโมเลกุลาร์ด็อกกิง (molecular docking)
3. คัดเลือกสารที่มีศักยภาพในการฆ่าเซลล์มะเร็งมาดัดแปลงให้เป็น bioreductive prodrug เพื่อให้มีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งที่เฉพาะเจาะจง

ระเบียบวิธีการวิจัยและแผนงาน

1. สังเคราะห์อนุพันธ์ของซีรัมโบนโดยขบวนการทางเคมีอินทรีย์สังเคราะห์ ให้มีหมู่ฟังก์ชันที่แตกต่างออกไปเช่น alcohol, amine, epoxide และ ether เป็นต้น
2. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเช่นฤทธิ์ต้านมะเร็งกับเซลล์ต่างๆคือ KB, BC, NCI-H187, MCF-7 และมะเร็งท่อน้ำดี และฤทธิ์ต้านเชื้อรา เชื้อวัณโรค และเชื้อมาลาเรีย
3. สร้างแบบจำลองเอนไซม์/รีเซพเตอร์เป้าหมาย ด้วยโปรแกรม AutoDock Tools ศึกษาการจับกันระหว่างสารที่สังเคราะห์กับเอนไซม์หรือรีเซพเตอร์ ด้วยเทคนิคทางคอมพิวเตอร์
4. คัดเลือกอนุพันธ์ที่มีศักยภาพในการฆ่าเซลล์มะเร็ง นำมาสังเคราะห์เป็น prodrug และทดสอบฤทธิ์

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. หากการวิจัยประสบความสำเร็จอาจส่งผลให้ได้ตัวยารักษาโรคมะเร็งที่ลดผลข้างเคียง หรืออย่างน้อยก็ได้ lead compound ในการรักษามะเร็ง ซึ่งยานี้จะทำให้ผู้ป่วยมีความปลอดภัยมากยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามต้องมีการพัฒนาปรับปรุงและผ่านขั้นตอนทางเภสัชวิทยาอีกมาก
2. ตีพิมพ์ผลงานในวารสารระดับนานาชาติ

ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี (พ.ศ. 2551-2553)

ผลงานตีพิมพ์ 1. Uraiwan Songsiang, Siripit Pitchuanchom, Chantana Boonyarat, Chariya Hahnvajjanawong, Chavi Yenjai

ชื่อเรื่อง Cytotoxicity against cholangiocarcinoma cell lines of zerumbone derivatives
วารสารที่ตีพิมพ์ European Journal of Medicinal Chemistry, 2010, inpress, impact factor 3.269

การนำเสนอผลงานในการประชุม

1. Uraiwan Songsiang, Chavi Yenjai, Chariya Hahnvajjanawong, Chanokbhorn Phaosiri. The proceeding of The PERCH-CIC Congress VI, Jomtien Plam Beach Hotel & Resort , Pattaya Chonburi, Thailand, 3-6 May 2009, 258.
2. Siripit Pitchuanchom, Chavi Yenjai, Natthida Weerapreeyakul. Synthesis of bioreductive esters from zerumbone derivatives. The proceeding of Pure and Applied Chemistry International Conference, Naresuan University, Thailand, 2009, 394-396.
3. Uraiwan Songsiang, Chavi Yenjai, Sineenat Siri, Cytotoxicity of zerumbone and its derivatives. The proceeding of Pure and Applied Chemistry International Conference, Naresuan University, Thailand, 2009, 440-442.

บทนำ

โรคมะเร็งถูกจัดเป็นโรคที่เป็นที่สร้างปัญหาทางสาธารณสุขระดับสำคัญของประเทศ ทั้งนี้เพราะยาที่ใช้รักษาโรคมะเร็งชนิดต่างๆ ยังไม่สามารถรักษาครอบคลุมได้ทุกชนิดของโรคในผู้ป่วย อีกทั้งยังพบอุบัติการณ์ของโรคที่ต่อเนื่อง มีพิษข้างเคียงสูง รวมทั้งยามีราคาแพง การศึกษาและวิจัยตัวยาใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงแต่มีพิษและฤทธิ์ข้างเคียงน้อย จึงยังมีความจำเป็นอยู่มาก ดังนั้นการวิจัยและค้นคว้าเพื่อพัฒนารักษามะเร็งจากธรรมชาติ ได้แก่พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ กลับเข้ามามีบทบาทสำคัญอีกครั้งหนึ่ง โครงการวิจัยนี้นอกจากจะได้พบแหล่งกำเนิดของยาตัวใหม่แล้ว ก็ยังเป็นการพัฒนาจากสารที่ได้จากธรรมชาติที่หาได้ง่ายและมีราคาถูก และลดปัญหาการขาดดุลการค้า เนื่องจากการนำเข้าประเทศได้อีกทางหนึ่งด้วย จึงได้ทำการศึกษาสารต้านมะเร็งจากเหง้ากะทือกับเซลล์มะเร็งที่เลี้ยงไว้ในหลอดทดลอง

กะทือเป็นพืชล้มลุก มีหัวหรือเหง้าใต้ดิน พบว่ามีสรรพคุณช่วยกระตุ้นการบีบตัวของลำไส้ ขับลม แก้อาการท้องอืด ท้องเฟ้อ แก้อาการจุกเสียด มีฤทธิ์ขับลมเนื่องจากมีน้ำมันหอมระเหย ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาพบว่าเป็นพิษต่อเซลล์¹⁻⁶ ขับพยาธิ เพิ่มอัตราการเต้นของหัวใจ ด้านเชื้อแบคทีเรีย⁷ คลายกล้ามเนื้อเรียบ ผู้วิจัยได้ทดลองแยกสกัดเบื้องต้นพบว่าสารหลักในกะทือคือ zerumbone⁸ ซึ่งเป็นสารประกอบประเภท sesquiterpene เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเชื้อรา ด้านเชื้อวัณโรค ด้านเชื้อมาลาเรีย และด้านเซลล์มะเร็ง พบว่า zerumbone มีฤทธิ์ต่างๆ เป็นที่น่าสนใจมาก ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ฤทธิ์ทางชีวภาพของ zerumbone

ฤทธิ์ทางชีวภาพ	IC ₅₀ (μg/ml)	Control (standard)
antiplasmodial	1.88	4.4 (Dihydroartimisinin)
Anti TB	50	1.25 (Kanamycin)
antifungal	35.22	0.043-0.057 (Amphotericin)
Cytotoxicity KB	5.28	0.223 (Ellipticine)
BC	6.06	0.802 (Ellipticine)
NCI-H187	4.16	0.034 (Doxorubicin)
Vero cell	2.98	0.7 ± 0.2 (Ellipticine)

ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะดัดแปลงโครงสร้างของ zerumbone โดยอาศัยวิธีทางเคมีอินทรีย์สังเคราะห์^๙ เพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มขึ้น โดยจะมุ่งเน้นฤทธิ์ด้านมะเร็งเป็นหลัก (ตามข้อมูลเบื้องต้นในตารางที่ 1) และนอกจากนี้ จะทำการทดสอบฤทธิ์อื่นๆด้วยเช่นกัน

จากการที่ปัจจุบันความรู้ทางด้านชีวโมเลกุลมีความก้าวหน้ามาก ทำให้สามารถพบสาเหตุตลอดจนปัจจัยในการเกิดโรคในระดับโมเลกุลของร่างกายและจุลชีพ และรู้ถึงชีวโมเลกุลเป้าหมาย (target)¹⁰⁻¹¹ ส่งผลให้มีการประยุกต์ใช้คอมพิวเตอร์เข้าช่วยในการสร้างแบบจำลอง 3 มิติของชีวโมเลกุลเป้าหมาย ซึ่งมีความถูกต้องเที่ยงตรงทำให้สามารถออกแบบสารใหม่ที่มีฤทธิ์แรงและมีความเฉพาะเจาะจง และยังสามารถนำ target มาค้นหาสารต้นแบบยาด้วยการคัดกรองประสิทธิภาพสูงทางคอมพิวเตอร์ (virtual screening)¹²⁻¹³ การพัฒนายาใหม่แบบ *in silico* นี้ นอกจากจะได้ยาใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงแล้ว ยังลดทั้งระยะเวลาและค่าใช้จ่าย

ดังนั้นในงานวิจัยชิ้นนี้จึงสนใจที่ทำวิจัยโดยนำเทคนิคทางคอมพิวเตอร์มาช่วยในการศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารสังเคราะห์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดยการศึกษาการจับกันของสารสังเคราะห์กับเอนไซม์หรือรีเซพเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง ด้วยเทคนิคโมเลกุล docking (molecular docking) ซึ่งสารที่ได้มีประโยชน์อย่างยิ่งในการพัฒนาต่อไปเป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูงในการรักษามะเร็ง

โดยทั่วไปแล้วข้อจำกัดของการพัฒนายาต้านมะเร็งนั้นมีเหตุผลมาจากการที่สารนั้นมีฤทธิ์ฆ่าทั้งเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ หากพบสารที่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งแต่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ก็จะเป็นประโยชน์อย่างมาก ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ zerumbone ให้เป็น prodrug โดยทำปฏิกิริยาทางอินทรีย์เคมีระหว่างอนุพันธ์ของ zerumbone กับสารนำส่ง ซึ่งเรียกขบวนการนี้ว่า Tumor Targeted Drug Delivery System (TDDS)¹⁴ สาร prodrug นี้ควรจะไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ แต่จะมีการปลดปล่อยสารที่เป็นพิษเมื่อถึงเซลล์มะเร็งโดยปฏิกิริยาทาง bioreduction ในเซลล์มะเร็งที่มีภาวะ hypoxia หรือมีเอนไซม์ reductase สูง¹⁵⁻¹⁶

จากโครงสร้างของ zerumbone ซึ่งพบว่าหมู่ฟังก์ชันเป็นแบบ α, β -unsaturated ketone และ isolated double bond ถ้าทำการดัดแปลงหมู่ฟังก์ชันให้เป็นอัลกอฮอล์ หรือเอมีนโดยปฏิกิริยาทางเคมี แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ด้านเซลล์มะเร็ง หากผลการทดสอบพบว่าอนุพันธ์ยังคงมีฤทธิ์ด้านเซลล์มะเร็งอยู่ก็จะนำไปต่อกับสารนำส่ง แล้วทดสอบฤทธิ์อีกครั้ง ซึ่ง prodrug นี้ไม่ควรมีฤทธิ์ฆ่าเซลล์ปกติ หรือมีฤทธิ์น้อยกว่าสารตั้งต้น แต่เมื่อสารนี้เดินทางไปถึงเซลล์มะเร็งก็ควรจะปลดปล่อยอนุพันธ์ของ zerumbone ที่เป็นพิษออกมา หากผลการทดลองเป็นไปตามสมมติฐานที่ตั้งไว้ ก็จะทำได้ยารักษามะเร็งที่มีผลข้างเคียงน้อย

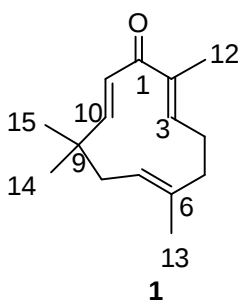
วัตถุประสงค์

4. เพื่อสังเคราะห์อนุพันธ์ของ zerumbone ที่น่าจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีขึ้น โดยมุ่งเน้นฤทธิ์ต้านมะเร็ง นอกจากนี้จะศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อรา ด้านเชื้อวัณโรค ด้านเชื้อมาลาเรียอีกด้วย
5. ศึกษากลไกการจับกันของยากับรีเซพเตอร์หรือเอนไซม์โดยใช้เทคนิคทางคอมพิวเตอร์ โดยสร้างแบบจำลองของเอนไซม์หรือรีเซพเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง แล้วนำมาศึกษาโดยใช้เทคนิคโมเลกุลาร์ด็อกกิง (molecular docking)
6. คัดเลือกสารที่มีศักยภาพในการฆ่าเซลล์มะเร็งมาดัดแปลงให้เป็น bioreductive prodrug เพื่อให้มีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งที่เฉพาะเจาะจง

วิธีการทดลอง

1. การแยกสกัดซีรัมโบน

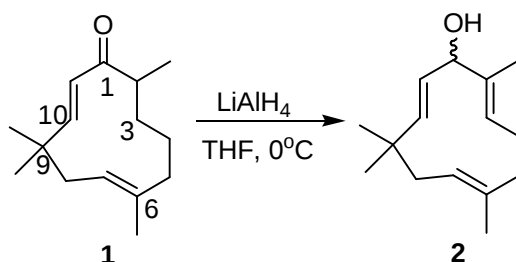
นำผงกะทือแห้งจำนวน 4 กิโลกรัม มาแยกด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต หลังจากกระเทยตัวทำละลายแล้วได้สารสกัดหยาบ 32.8 กรัม นำมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับและใช้ตัวทำละลายเฮกเซนและเอทิลอะซิเตต โดยเพิ่มความแรงของหัวจากต่ำไปสูง เก็บสารละลายเป็นส่วนๆละ 60 มิลลิลิตร เมื่อตรวจสอบส่วนย่อยต่างๆ ด้วย TLC สามารถรวมเป็นได้ทั้งหมด 13 ส่วน นำส่วนย่อยที่ 5 มาตกผลึกด้วยเฮกเซน/เอทิลอะซิเตต พบว่าได้ซีรัมโบน 15 กรัม



2. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของซีรัมโบน

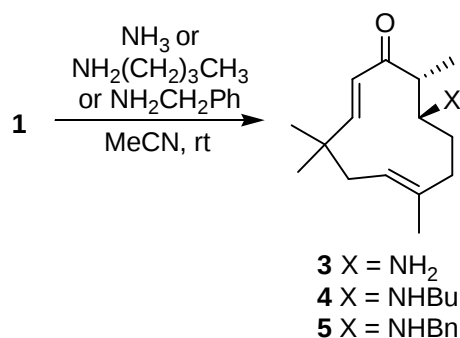
นำซีรัมโบนที่ได้มาเป็นสารตั้งต้นในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมีอินทรีย์ ได้อนุพันธ์ทั้งสิ้น 22 สาร โดยอนุพันธ์เหล่านั้นเป็นสารประกอบประเภท อัลคอกซอร์ เอสเทอร์ เอมีน เอไมด์ เอพออกไซด์ และออกซิม เป็นต้น

2.1 ปฏิกริยารีดักชันของซีรัมโบน



นำซีรัมโบน (503 มิลลิกรัม, 2.3 มิลลิโมล) ละลายในเตตระไฮโดรฟิวแรน (1 มิลลิลิตร) เติมลิเทียมอลูมิเนียมไฮไดรด์ที่แขวนลอยอยู่ในเตตระไฮโดรฟิวแรน (349 มิลลิกรัม, 9.2 มิลลิโมล) ที่ 0°C กวนสารละลายตลอดเวลาเป็นเวลา 5 ชั่วโมง เทสารละลายลงใน 10% กรดไฮโดรคลอริก ทำการสกัดแยกด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต ล้างด้วยน้ำ น้ำเกลือ ทำให้แห้งด้วยโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ ระเหยแห้ง ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี ได้สารบริสุทธิ์ 2

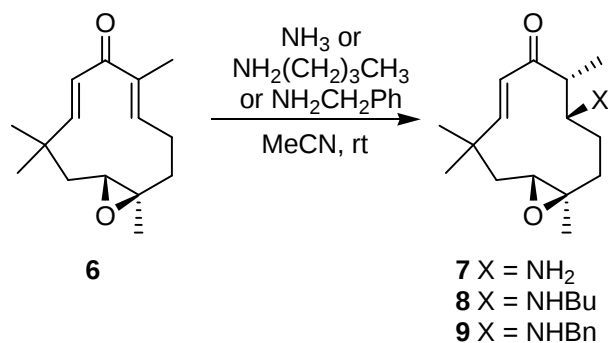
2.2 ปฏิกริยาการเติมเอมีน



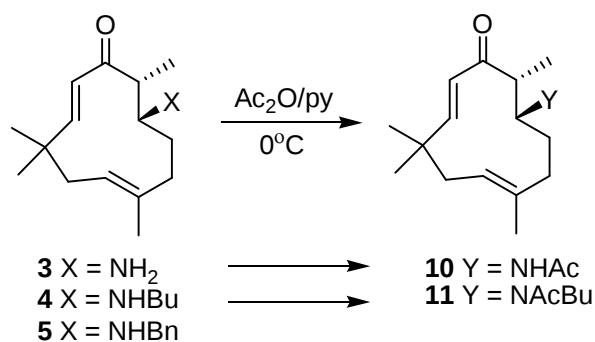
นำซีรัมโบน (50 มิลลิกรัม, 0.23 มิลลิโมล) ละลายในอะซีโตนไนไตรด์ (1 มิลลิลิตร) เติมแอมโมเนีย (30% ในน้ำ, 2 มิลลิลิตร) กวนสารละลายตลอดเวลาเป็นเวลา 5 วัน ระเหยตัวทำละลายให้แห้ง ทำการสกัดแยกด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต ล้างด้วยน้ำ น้ำเกลือ ทำให้แห้งด้วยโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ ระเหยแห้ง ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี ได้สารบริสุทธิ์ 3

เปลี่ยนเอมีนเป็น เอ็น-บิวทิลเอมีน เบนซิลเอมีนแทน พบว่าได้ผลิตภัณฑ์เป็นสาร 4 และ 5 ตามลำดับ

เปลี่ยนสารตั้งต้นจากซีรัมโบนเป็นเอพพอกไซด์ 6 โดยให้ทำปฏิกิริยากับเอมีนทั้ง 3 ชนิด ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสาร 7, 8 และ 9 ตามลำดับ

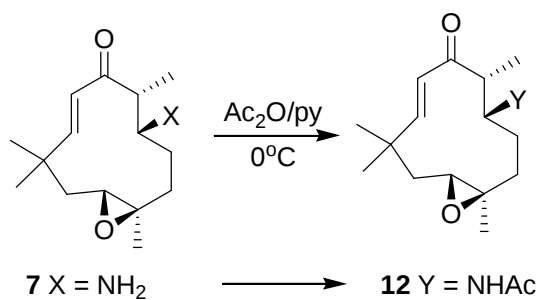


2.3 ปฏิกิริยาอะเซทิลเลชัน

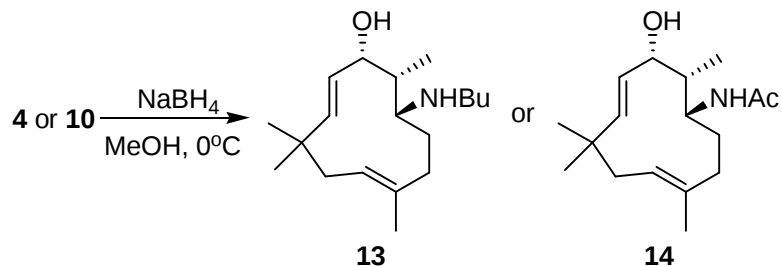


นำสาร 3 และ 4 (0.34 มิลลิโมล) มาทำปฏิกิริยากับ อะซิติกแอนไฮไดรด์ ในตัวทำละลายไพรีดีน (1 มิลลิลิตร) ที่ 0°C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เทสารละลายลงในน้ำเย็น ทำการสกัดแยกด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต ล้างด้วยน้ำ น้ำเกลือ ทำให้แห้งด้วยโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ ระเหยแห้ง ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี ได้สารบริสุทธิ์ 10 และ 11 ตามลำดับ

เมื่อเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นสาร 7 พบว่าได้ผลิตภัณฑ์เป็นสาร 12

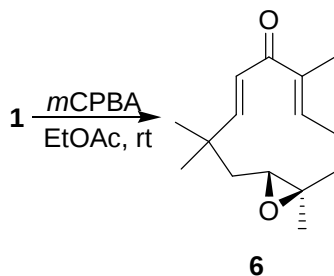


2.4 ปฏิกริยารีดักชันของสาร 4 และ 10



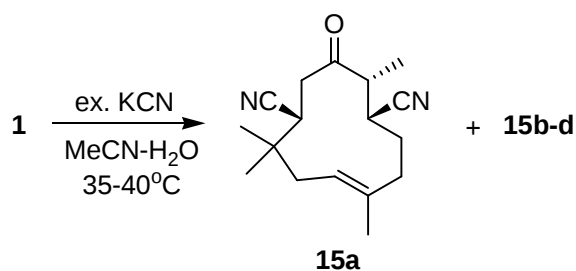
นำสาร 4 และ 10 (0.1 มิลลิโมล) ละลายในเมทานอล (1 มิลลิลิตร) เติมโซเดียมโบโรไฮไดรด์ (0.15 มิลลิโมล) ที่ 0°C กวนสารละลายตลอดเวลาเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เติสารละลายลงใน 10% กรดไฮโดรคลอริก ทำการสกัดแยกด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต ล้างด้วยน้ำ น้ำเกลือ ทำให้แห้งด้วยโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ ระเหยแห้ง ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี ได้สารบริสุทธิ์ 13 และ 14 ตามลำดับ

2.5 ปฏิกริยาเอพพอกซิเดชัน



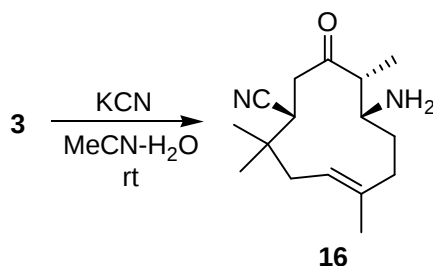
นำซีรัมบอน (39 มิลลิกรัม, 0.18 มิลลิโมล) ละลายในเอทิลอะซิเตต (0.5 มิลลิลิตร) เติมกรดเมทา-คลอโรเปอร์เบนโซอิก (37.4 มิลลิกรัม, 0.22 มิลลิโมล) ที่ 0°C กวนสารละลายตลอดเวลาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็นอุณหภูมิห้องพร้อมทั้งกวนตลอดเวลา เติสารละลายลงในน้ำ ทำการสกัดแยกด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต ล้างด้วยน้ำ น้ำเกลือ ทำให้แห้งด้วยโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ ระเหยแห้ง ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี ได้สารบริสุทธิ์ 6

2.6 ปฏิกริยากับไซยาไนด์

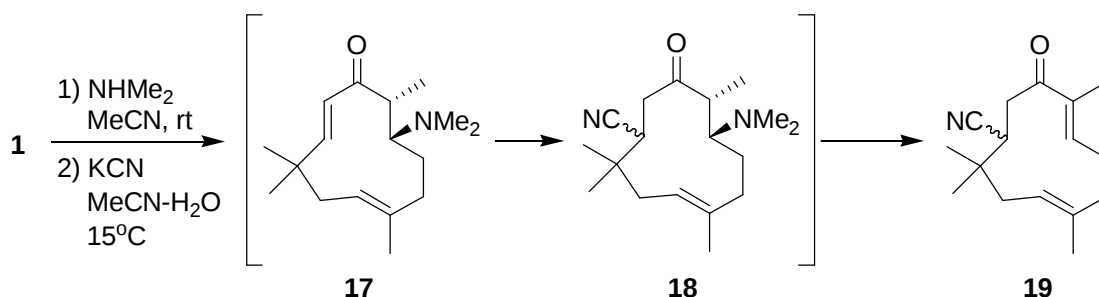


นำซีรัมโบน (66 มิลลิกรัม , 0.3 มิลลิโมล) ละลายในอะซีโตรไนไตรด์ (1 มิลลิลิตร) เติมสารละลายโปรตัสเซียมไซยาไนด์ (63 มิลลิกรัม, 0.97 มิลลิโมล) ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็น 35-40°C พร้อมทั้งคนตลอดเวลา เทสารละลายลงในน้ำ ทำการสกัดแยกด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต ล้างด้วยน้ำ น้ำเกลือ ทำให้แห้งด้วยโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ ระเหยแห้ง ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี ได้สารบริสุทธิ์ 15a-d

เมื่อเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นสาร 3 พบว่าได้ผลิตภัณฑ์เป็นสาร 16



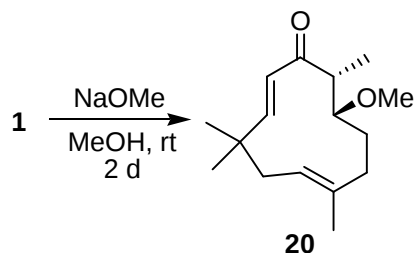
2.7 ปฏิกริยาการเตรียมโมโนไซยาไนด์



นำซีรัมโบน (50 มิลลิกรัม, 0.23 มิลลิโมล) ละลายในอะซีโตรไนไตรด์ (1 มิลลิลิตร) เติมไดเมทิลเอมีนเกินพอ กวนสารละลายตลอดเวลาเป็นเวลา 5 วัน ระเหยตัวทำละลายให้แห้ง ทำการสกัดแยกด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต ล้างด้วยน้ำ น้ำเกลือ ทำให้แห้งด้วยโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ ระเหยแห้ง ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี ได้สารบริสุทธิ์ 17

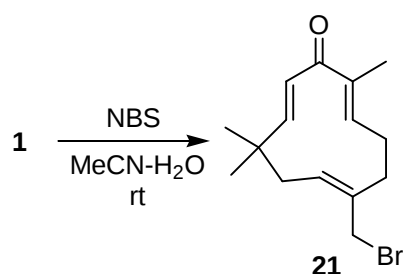
นำสาร 17 (50 มิลลิกรัม, 0.19 มิลลิโมล) มาทำปฏิกิริยากับโปรตัสเซียมไซยาไนด์ (210.3 มิลลิกรัม, 3.2 มิลลิโมล) โดยใช้อะซีโตรไนไตรด์และน้ำ (1:0.5) เป็นตัวทำละลาย คนสารละลายตลอดเวลาเป็นเวลา 2 วัน ระเหยตัวทำละลายให้แห้ง ทำการสกัดแยกด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต ล้างด้วยน้ำ น้ำเกลือ ทำให้แห้งด้วยโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ ระเหยแห้ง ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี ได้สารบริสุทธิ์ 19

2.8 ปฏิกริยากับเมทอกไซด์



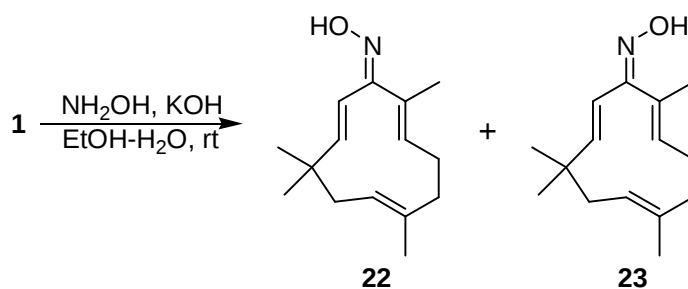
นำซีรัมโบน (50 มิลลิกรัม, 0.2 มิลลิโมล) ละลายในเมทานอล (1 มิลลิลิตร) เติมโซเดียมเมทอกไซด์ (74 มิลลิกรัม, 1.37 มิลลิโมล) ที่อุณหภูมิห้อง กวนสารละลายตลอดเวลาเป็นเวลา 2 วัน เทสารละลายลงในน้ำเย็น ทำการสกัดแยกด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต ล้างด้วยน้ำ น้ำเกลือ ทำให้แห้งด้วยโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ ระเหยแห้ง ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี ได้สารบริสุทธิ์ **20**

2.9 ปฏิกริยาการแทนที่ด้วยโบรมีน



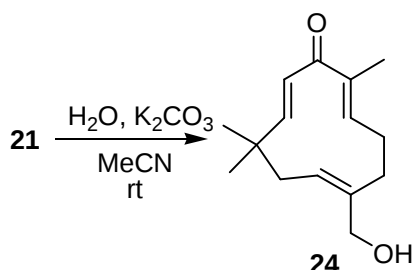
นำซีรัมโบน (20 มิลลิกรัม, 0.09 มิลลิโมล) ละลายในอะซิโตนไนด์ไดรด์และน้ำ (1:1 มิลลิลิตร) เติมเอ็น-โบรโมซัคซินาไมด์ ที่อุณหภูมิห้อง คนสารละลายตลอดเวลาเป็นเวลา 30 นาที ระเหยตัวทำละลายให้แห้ง เติมน้ำ ทำการสกัดแยกด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต ล้างด้วยน้ำ น้ำเกลือ ทำให้แห้งด้วยโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ ระเหยแห้ง ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี ได้สารบริสุทธิ์ **21**

2.10 ปฏิกริยาการเตรียมออกซิม



นำซีรัมโบน (50 มิลลิกรัม, 0.23 มิลลิโมล) ละลายในเอทานอล (1 มิลลิลิตร) เติมไฮดรอกซิลลามีนไฮโดรคลอไรด์ (158 มิลลิกรัม, 2.27 มิลลิโมล) และสารละลายโปรแตสเซียมไฮดรอกไซด์ (96 มิลลิกรัม, 1.71 มิลลิโมล) ที่อุณหภูมิห้อง คนสารละลายตลอดเวลาเป็นเวลา 2 วัน เทสารละลายลงในน้ำเย็น ทำการสกัดแยกด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต ล้างด้วยน้ำ น้ำเกลือ ทำให้แห้งด้วยโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ ระเหยแห้ง ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี ได้สารบริสุทธิ์ 22 และ 23

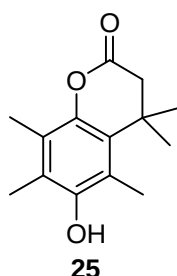
2.11 ปฏิบัติการเตรียมอัลกอฮอล์ 24



นำสาร 21 (15 มิลลิกรัม, 0.05 มิลลิโมล) ละลายในอะซิโตนไตรไรต์ (0.5 มิลลิลิตร) เติมโปตัสเซียมคาร์บอเนต (14 มิลลิกรัม, 0.1 มิลลิโมล) และน้ำ (0.2 มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิห้อง คนสารละลายตลอดเวลาเป็นเวลา 2 วัน เทสารละลายลงในน้ำ สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต ล้างด้วยน้ำ น้ำเกลือ ทำให้แห้งด้วยโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ ระเหยแห้ง ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี ได้สารบริสุทธิ์ 24

3. ปฏิบัติการเตรียมสาร bioreductive agents

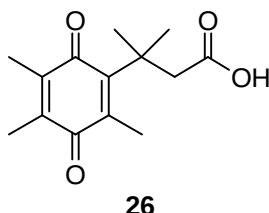
3.1 การเตรียม lactone 25



เติม methane sulphonic acid (6 มิลลิลิตร) ลงใน trimethylhydroquinone (1.0 กรัม, 6.63 มิลลิโมล) เติม 3,3-dimethylacrylic acid (0.73 กรัม, 7.3 มิลลิโมล) ให้ความร้อนที่ 70 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นลดอุณหภูมิเป็นอุณหภูมิห้อง เทสารละลายลงในน้ำ ทำการสกัดแยกด้วยตัวทำละลาย

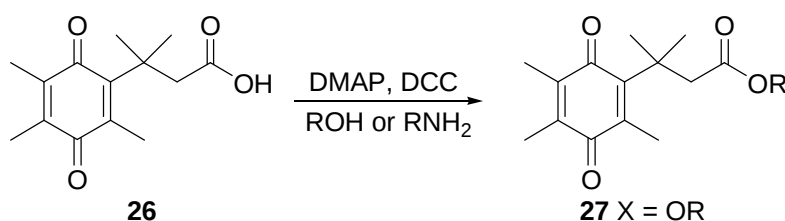
เอทิลอะซิเตต ล้างด้วยน้ำ น้ำเกลือ ทำให้แห้งด้วยโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ ระเหยแห้ง ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี ได้สารบริสุทธิ์ 25

3.2 การเตรียมอนุพันธ์ควิโนน 26



นำสาร 25 (1.8 กรัม, 7.78 มิลลิโมล) ละลายในสารละลายอะซีโตไนไทรด์ (50 มิลลิลิตร) เติมสารละลาย *n*-bromosuccinimide (8.55 กรัม, 1.52 มิลลิโมล) ในอะซีโตไนไทรด์ กวนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เทสารละลายลงในน้ำ ทำการสกัดแยกด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต ล้างด้วยน้ำ น้ำเกลือ ทำให้แห้งด้วยโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ ระเหยแห้ง ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี ได้สารบริสุทธิ์ 26

3.3 การเตรียม bioreductive compounds



ละลาย quinone propionic acid และ อนุพันธ์ของซีรัมโปนในไดคลอโรมีเทน เติม 4-(*N,N*-dimethylamino)pyridine (DMAP), และสารละลาย *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) ในไดคลอโรมีเทน กวนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นตะกอนสีขาวเกิดขึ้น กรองเอาตะกอนออก เติม 10% HCl ทำการสกัดแยกด้วยไดคลอโรมีเทน ล้างด้วย สารละลายอิ่มตัว NaHCO_3 สกัดแยกด้วยไดคลอโรมีเทน น้ำเกลือ ทำให้แห้งด้วยโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ ระเหยแห้ง ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี ได้สารบริสุทธิ์ 27-28

นำสารทั้งหมดไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพกับเซลล์มะเร็งรังท่อน้ำดี ชนิด KKU-100, KKU-M139, KKU-M156, KKU-M213 และ KKU-M214 พบว่าได้ผลดังแสดงในตาราง

ตารางที่ 1 แสดงฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งรังท่อน้ำดีของซีรัมโบนและอนุพันธ์

Compound	IC ₅₀ (μg/mL)				
	KKU-100	KKU-M139	KKU-M156	KKU-M213	KKU-M214
1	NR	NR	NR	NR	NR
2	NR	NR	NR	NR	NR
3	3.87±0.14	14.89±1.29	16.25±1.27	12.21±0.53	14.04±1.74
4	NR	NR	NR	10.67±0.19	12.11±0.17
5	NR	NR	NR	NR	NR
6	NR	NR	NR	NR	12.33±0.91
7	NR	NR	NR	NR	4.60±0.10
8	5.08±0.26	NR	14.82±0.57	11.57±0.74	15.68±0.24
9	NR	NR	NR	NR	NR
10	NR	NR	NR	NR	NR
11	NR	NR	NR	NR	NR
12	NR	NR	NR	NR	NR
13	10.37±1.73	5.76±0.34	7.73±1.2	7.98±0.38	4.71±1.78
14	NR	NR	NR	NR	NR
15a-d	NR	NR	NR	NR	18.12±0.99
16	2.39±0.41	4.53±0.02	7.05±0.92	7.11±1.24	5.70±1.25
19	6.31±0.64	13.71±1.08	9.15±0.88	11.07±0.22	13.37±0.37
20	NR	NR	NR	14.10±1.99	5.85±0.06
21	NR	NR	NR	NR	NR
22	17.97±0.76	NR	NR	NR	18.61±0.99
23	NR	NR	NR	NR	16.86±0.37
Ellipticine	6.21±0.05	1.11±0.07	2.3±0.41	0.40±0.02	0.25±0.006

^aNR = no response at > 20 μg/mL.

นอกจากนี้เมื่อนำสารบางส่วนไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆเช่น ฤทธิ์ต้านมะเร็งกับเซลล์ KB, BC, NCI-H187 และยังได้ทดสอบกับเซลล์ปกติได้แก่ Vero cells อีกด้วย นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบ ฤทธิ์ในการต้านเชื้อมาลาเรีย พบว่าได้ผลดังแสดงในตาราง

ตารางที่ 2 แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียและต้านเซลล์มะเร็งของซีรัมโบนและอนุพันธ์

Compound	Antiplasmodial	Cytotoxicity; IC ₅₀ (µg/ml)			
	IC ₅₀ (µg/ml)	NCI-H187	BC	KB	Vero cell
1	2.58	2.43	4.40	7.32	4.35
2	7.22	NR ^b	NR ^b	NR ^b	42.49
3	1.31	3.99	NR ^b	10.67	7.47
4	6.09	2.51	3.64	4.96	7.83
5	2.27	10.84	26.02	11.64	15.24
6	NR ^a	6.11	8.34	NR ^b	21.33
7	2.54	11.51	24.44	NR ^b	16.38
8	NR ^a	30.16	NR ^b	NR ^b	NR ^b
9	NR ^a	16.21	NR ^b	NR ^b	NR ^b
10	NR ^a	NR ^b	NR ^b	NR ^b	NR ^b
11	1.97	NR ^b	11.37	NR ^b	24.52
12	NR ^a	NR ^b	NR ^b	NR ^b	NR ^b
19	1.85	2.20	8.68	5.07	6.20
21	NR ^a	NR ^b	NR ^b	20.73	NR ^b
22	NR ^a	NR ^b	NR ^b	23.23	NR ^b
23	NR ^a	NR ^b	NR ^b	NR ^b	NR ^b
24	3.52	2.63	3.99	16.15	7.47
dihydroartemisinin	3.7 nM	-	-	-	-
Ellipticine	-	1.11±0.07	2.3±0.41	0.40±0.02	0.25±0.006

^aNR = no response at > 20 µg/ml.

^bNR = no response at > 50 µg/ml.

ตารางที่ 3 แสดงฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของอนุพันธ์ซีรัมโบนและควิโนน

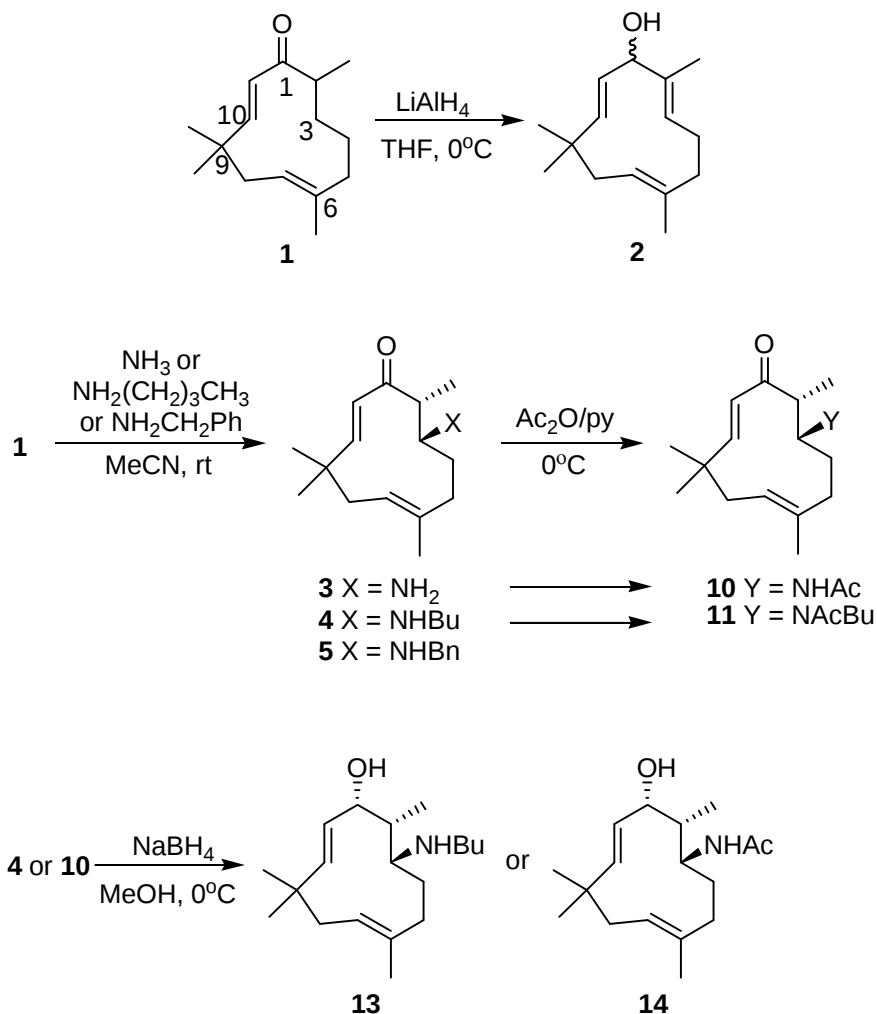
Compounds	IC ₅₀ (mg/ml)			
	KB	NCI-H187	MCF-7	Vero cell
1	7.32	2.43	10.15	4.35
3	0.39	1.37	9.76	7.95
29	37.78	5.73	18.42	13.91
24	2.63	3.99	16.15	7.47
30	17.00	25.41	36.81	Inactive
Ellipticine	0.347	0.44	-	1.025
Doxorubicine	-	-	0.976	-

Inactive at > 50 µg/ml

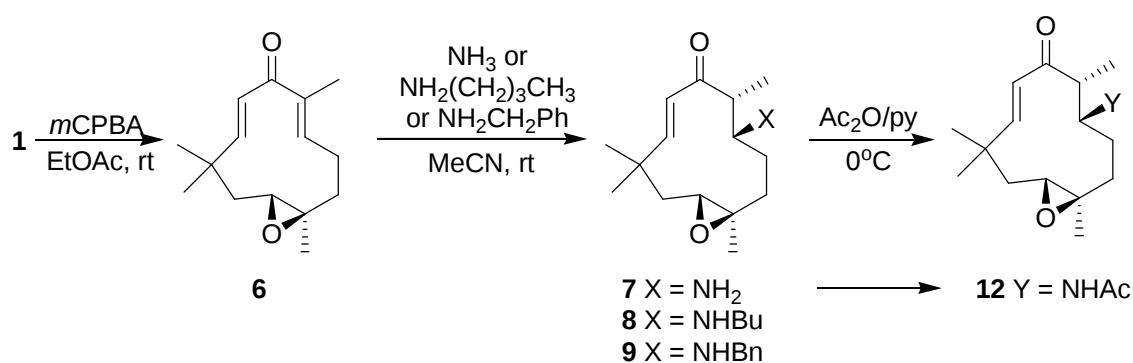
วิเคราะห์ผลการทดลอง

จากการสกัดแยกซีรัมโบน (1) จากกะทือได้จำนวน 15 กรัม โดยใช้วิธีทางโครมาโตกราฟี และตกผลึก นำซีรัมโบนที่ได้มาเป็นสารตั้งต้นในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมีอินทรีย์ ได้อนุพันธ์ทั้งสิ้น 22 สาร ในการเขียน stereochemistry ของผลิตภัณฑ์ทั้งหมดในรายงานชิ้นนี้เป็นการระบุแบบ relative stereochemistry

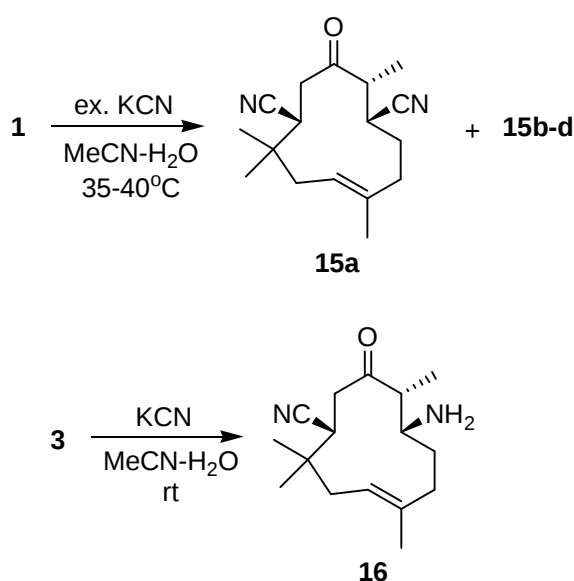
ปฏิกิริยารีดักชันของซีรัมโบนด้วย LiAlH_4 ได้สารประกอบอัลกอฮอล์ 2 จำนวน 431 มิลลิกรัมคิดเป็น 85 % yield เมื่อนำสาร 1 มาทำปฏิกิริยากับเอมีนต่างๆ พบว่าเกิดปฏิกิริยาการเติมที่ตำแหน่ง 3 จากการสืบค้นข้อมูลพบว่าผลิตภัณฑ์ 3, 4 และ 5 โดยได้เป็น *trans* ที่ตำแหน่ง 2 และ 3 การที่นิวคลีโอไฟล์ทำปฏิกิริยาเฉพาะที่ตำแหน่ง 3 ไม่เข้าที่ตำแหน่ง 10 เนื่องจากตำแหน่ง 10 มีความเกะกะมากเพราะติดอยู่กับคาร์บอน 9 ที่มีเมทิล 2 กลุ่ม เมื่อนำเอมีน 3 และ 4 มาทำปฏิกิริยากับ Ac_2O ในไพรีดีน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอไมด์ 10 และ 11 ตามลำดับ เพื่อให้ได้อนุพันธ์ของซีรัมโบนที่หลากหลายจึงนำเอมีน 4 และ เอไมด์ 10 มาทำปฏิกิริยารีดักชันด้วย NaBH_4 พบว่าได้ amino alcohol 13 และ amino amide 14 ตามลำดับ

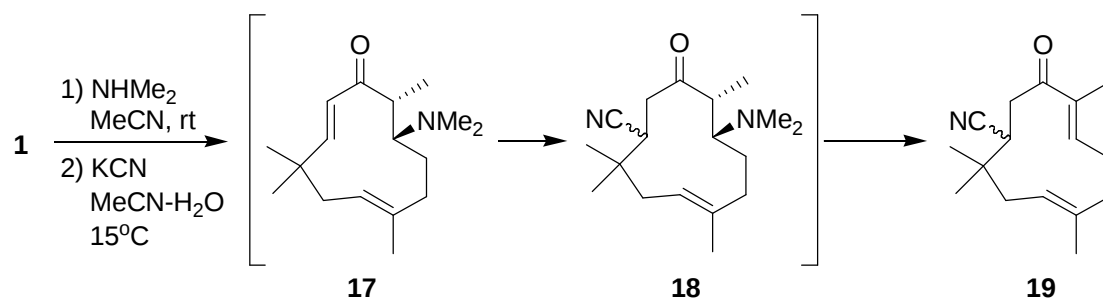


ปฏิกิริยาของซีรัมโบนกับ *m*-CPBA ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสาร 6 โดยเกิดปฏิกิริยาที่พันธะคู่ในตำแหน่ง 6-7 เพราะมีความเกะกะน้อยที่สุดและมีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนมากกว่าพันธะคู่ที่ตำแหน่งอื่น เมื่อนำสาร 6 ไปทำปฏิกิริยากับเอมีนชนิดต่างๆ พบว่าเอมีนเข้าทำปฏิกิริยาที่ตำแหน่ง 3 เหมือนกับปฏิกิริยาของซีรัมโบนกับเอมีน ก็เนื่องจากเหตุผลของความเกะกะของหมู่เมทิล 2 หมู่ที่ตำแหน่ง 9 จากนั้นทำปฏิกิริยา acetylation ของสาร 7 ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอไมด์ 12



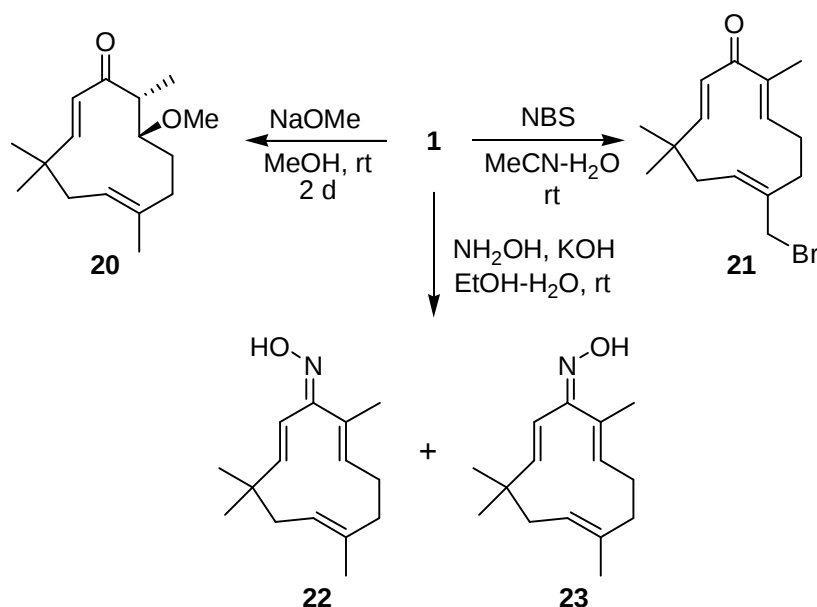
การทำปฏิกิริยาเติมหมู่ CN^- โดยใช้ KCN ที่เกินพอ พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่ CN^- เข้าทำปฏิกิริยาที่ตำแหน่ง 3 และ 10 ทั้ง 2 ตำแหน่ง โดยมีผลิตภัณฑ์ถึง 4 stereoisomers จากการสืบค้นข้อมูลพบว่าผลิตภัณฑ์หลักเป็นสารที่มี stereochemistry แบบสาร 15a เมื่อนำเอมีน 3 มาทำปฏิกิริยากับ KCN พบว่าสามารถแยกได้สารไซยาโนเอมีน 16 เป็นผลิตภัณฑ์ ในการเตรียมให้ได้อนุพันธ์ที่มีหมู่ CN^- จำนวน 1 หมู่ นั้นสามารถทำได้โดยการนำสาร 17 มาทำปฏิกิริยากับ KCN โดยที่ CN จะเข้าทำปฏิกิริยาที่ตำแหน่ง 10 ได้สาร 18 เนื่องมาจากการที่หมู่ NMe_2 สามารถหลุดออกได้ง่ายมาก จึงทำให้สาร 18 เกิดปฏิกิริยากำจัดได้ผลิตภัณฑ์เป็นสาร 19





ปฏิกิริยาการเติมนิวคลีโอไฟล์ที่เป็นออกซิเจนพบว่า methoxide ion สามารถเข้าทำปฏิกิริยาที่ตำแหน่ง 3 เช่นเดียวกับเอมีน โดย stereochemistry ของผลิตภัณฑ์ที่ตำแหน่ง 2 และ 3 เป็นแบบ *trans* ในส่วนปฏิกิริยาของซิริมโบนกับ NBS พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดการแทนที่ตรงตำแหน่งเมทิลที่ตำแหน่ง 13 โดยจาก ^1H NMR spectrum พบ methylene proton ปรากฏสัญญาณที่ δ 3.86-4.02 ppm และสัญญาณของ ^{13}C NMR พบ methylene proton ปรากฏที่ δ 30.7 ppm

เมื่อทำปฏิกิริยาระหว่างซิริมโบนกับไฮดรอกซิลามีน ไฮโดรคลอไรด์ ที่อุณหภูมิห้อง ได้ผลิตภัณฑ์เป็นออกซิม 22 เป็นผลิตภัณฑ์หลักและ 23 เป็นผลิตภัณฑ์รอง



ในการทดสอบฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำคีนัน ทดสอบกับเซลล์ KKU-100 , KKU-139, KKU-156, KKU-213 และ KKU-214 ในเซลล์เหล่านี้ KKU-100 เป็นเซลล์ที่ไม่ไวต่อยารักษามะเร็งที่สุด เห็นได้จากต้องใช้ปริมาณของ ellipticine มากเพื่อฆ่าเซลล์นี้ ($IC_{50} = 6.21 \mu\text{g/ml}$) จากตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่าสาร 3 แสดงฤทธิ์ฆ่าเซลล์นี้ได้ดี โดยมีค่า $IC_{50} = 3.87 \mu\text{g/ml}$ นอกจากนี้ยังแสดงฤทธิ์ฆ่าเซลล์อื่นๆ โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง $12-16 \mu\text{g/ml}$ สาร 4 มีฤทธิ์ปานกลางกับเซลล์ KKU-213 และ KKU-214 ($IC_{50} = 10.67$ และ $12.11 \mu\text{g/ml}$) แต่ benzylamine (5) ไม่แสดงฤทธิ์กับเซลล์เหล่านี้ ซึ่งอาจอธิบายได้ว่าสารที่มีขั้วมากกว่ามีผลต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำคีนัน

พบว่า hydroxylamine (13) มีฤทธิ์ที่ดี โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง $4-10 \mu\text{g/ml}$ ซึ่งเมื่อเทียบกับ alcohol (2) ที่ไม่แสดงฤทธิ์ก็อาจเป็นผลจากหมู่เอมีนก็เป็นได้ เป็นที่น่าสังเกตว่าสารประกอบเอพออกไซด์ 6 มีฤทธิ์น้อยกว่าเซลล์ KKU-214 แต่เมื่อทำการสังเคราะห์ epoxyamine 7 แล้วทดสอบฤทธิ์ พบว่าสารนี้มีค่า $IC_{50} = 4.60 \mu\text{g/ml}$ ในกรณีของ epoxyamine 8 ก็มีค่า $IC_{50} = 5.08 \mu\text{g/ml}$ เมื่อทดสอบกับเซลล์ KKU-100

สาร 19 แสดงฤทธิ์ที่ดีกับเซลล์ KKU-100 ($IC_{50} = 6.31 \mu\text{g/ml}$) แต่แสดงฤทธิ์ปานกลางกับเซลล์อื่นๆ นั้นอาจแสดงว่าหมู่ nitrile ที่ตำแหน่ง 10 มีผลต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำคีนัน เนื่องจาก amine 3 และ nitrile 19 แสดงฤทธิ์ที่ดีกับเซลล์ KKU-100 ผู้วิจัยจึงคิดว่าสารประกอบที่มีหมู่ฟังก์ชันทั้งสองแบบนี้ น่าจะมีฤทธิ์ที่น่าสนใจ จึงได้ทำการสังเคราะห์ cyanoamine 16 ขึ้น ผลปรากฏว่าสารนี้แสดงฤทธิ์ที่ดีเป็นที่น่าสนใจ โดยมีค่า $IC_{50} = 2-7 \mu\text{g/ml}$ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับเซลล์ KKU-100

สารประกอบ methoxy 20 มีค่า $IC_{50} = 5.85 \mu\text{g/ml}$ กับเซลล์ KKU-214 ส่วนออกซิเม 22 และ 23 แสดงฤทธิ์ปานกลางกับเซลล์นี้ด้วยค่า $IC_{50} = 18.61$ และ $16.86 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ

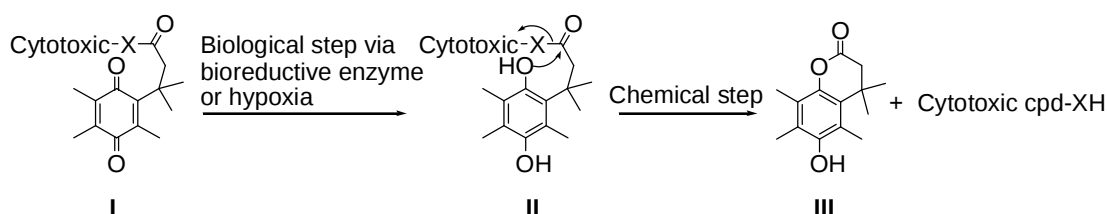
ผลการทดสอบฤทธิ์กับเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* และฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งชนิด NCI-H187, KB และ BC พร้อมทั้งเซลล์ดี (Vero cells) แสดงได้ดังในตารางที่ 2 พบว่าชิรัมิโบนมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อมาลาเรียได้ดีแต่ในขณะเดียวกันก็เป็นพิษต่อทั้งเซลล์มะเร็งและเซลล์ดีด้วย ซึ่งทำให้เป็นปัญหาในการพัฒนาเพื่อใช้จริง หากสามารถสร้างสารอนุพันธ์ที่ฆ่าเชื้อมาลาเรียและเซลล์มะเร็งได้แต่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติก็จะเป็นประโยชน์อย่างมาก

สาร 2 แสดงฤทธิ์ฆ่าเชื้อมาลาเรียด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ $7.22 \mu\text{g/ml}$ และเป็นที่น่าสนใจว่าสารนี้เป็นพิษน้อยต่อเซลล์ปกติ ($IC_{50} = 42.49 \mu\text{g/ml}$) อาจกล่าวได้ว่าหมู่ฟังก์ชัน alcohol หรืออนุพันธ์ของ alcohol น่าจะมีผลต่อการฆ่าเชื้อมาลาเรีย และอนุพันธ์เหล่านี้ น่าจะได้รับการพัฒนาต่อไป

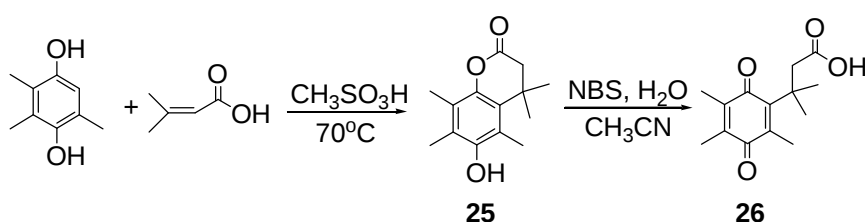
สารเอมีน 3 และ 5 แสดงฤทธิ์ที่ดีต่อเชื้อมาลาเรียด้วยค่า $IC_{50} = 1.31$ และ $2.27 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ขณะที่สาร 4 แสดงฤทธิ์ปานกลาง ($IC_{50} = 6.09 \mu\text{g/ml}$) แต่สารทั้งสามแสดงฤทธิ์เป็นพิษปานกลางต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติด้วย ฉะนั้นอนุพันธ์เหล่านี้จึงไม่เหมาะที่จะนำไปใช้

สารประกอบ butylamide 11 มีค่า IC_{50} ที่แรงกว่าสารเอมีนตั้งต้น (สาร 4) และมีค่า IC_{50} ปานกลางต่อ Vero cells ($IC_{50} = 24.52 \mu\text{g/ml}$) นั้นแสดงว่า dialkylamide เหมาะกับการฆ่าเชื้อ มาลาเรียแต่ยังเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ หากพิจารณาเฉพาะความเป็นพิษต่อเซลล์ สาร 6 เป็นพิษต่อเซลล์ NCI-H187 และ Vero cells ด้วยค่า $IC_{50} = 6.11$ และ $21.33 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ นั้นน่าจะหมายถึงว่าสารนี้อาจได้รับการพัฒนาต่อได้ สารประกอบโบรมีน 21 และออกซิมีน 22 แสดงฤทธิ์ที่คล้ายกันต่อ KB cell ด้วยค่า $IC_{50} \approx 20 \mu\text{g/ml}$ และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ จึงอาจมีการพัฒนาต่อได้

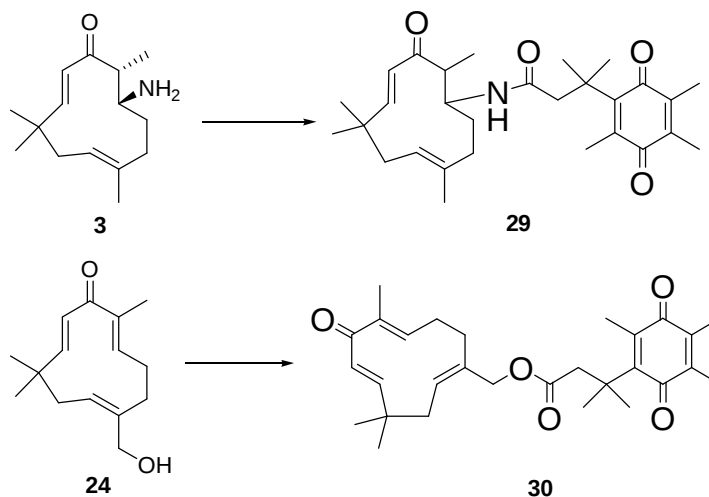
สารประกอบ bioreductive เป็นสารที่จะปลดปล่อยส่วนที่เป็นพิษต่อเซลล์ออกมาเมื่อถูกรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์ reductase หรือเมื่อสารนั้นอยู่ในภาวะขาดออกซิเจนอย่างรุนแรง หรือที่เรียกว่าสถานะ hypoxia และสาร bioreductive นี้หากไม่มีการแตกออกในเซลล์ปกติเนื่องจากระดับเอนไซม์ reductase ไม่สูง ก็จะเป็นประโยชน์อย่างมาก เพราะจะทำให้สาร prodrug นี้มีการปลดปล่อยสารพิษออกมาเฉพาะเมื่ออยู่ในเซลล์มะเร็งซึ่งมีเอนไซม์ reductase สูง หรือเซลล์ที่อยู่ในสถานะ hypoxia นั่นคือสาร bioreductive นี้จะมีความเฉพาะเจาะจงกับเซลล์มะเร็ง จากการสืบค้นพบว่าเซลล์มะเร็งชนิด NCI-H187 และ MCF-7 เป็นเซลล์ที่มีเอนไซม์ชนิดนี้สูง ฉะนั้นสารประกอบ bioreductive นี้จะปลดปล่อยสารพิษออกมาฆ่าเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดนี้ แต่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ อาจแสดงปฏิกิริยาของ bioreductive compound เมื่ออยู่ในสถานะมีเอนไซม์ reductase หรือ hypoxia ได้ตามสมการข้างล่าง



ในการเตรียมสารประกอบ bioreductive หรือที่เรียกว่าเป็น prodrug นั้น พบว่าอาจเป็นอนุพันธ์ของ quinone ตามแผนภาพข้างบน ซึ่งสารประกอบ quinone ester หรือ amide เป็นสารประกอบที่สามารถเตรียมได้จากการนำ quinone propionic acid มาทำปฏิกิริยากับอัลกอฮอล์หรือเอมีน การเตรียม quinone propionic acid สามารถเตรียมได้จากการนำสาร trimethylhydroquinone ทำปฏิกิริยากับ 3,3-dimethylacrylic acid ในสถานะที่มี methane sulfonic acid ที่อุณหภูมิสูง ได้ lactone 25 จากนั้นทำปฏิกิริยากับ NBS ก็จะได้ quinone propionic acid 26 ตามต้องการ



จากการที่ได้ปรับเปลี่ยนโครงสร้างของซีรีบโบน ผู้วิจัยได้เลือกอนุพันธ์ที่มีฤทธิ์ดีในการฆ่าเซลล์มะเร็ง และมีหมู่ไฮดรอกซี (สาร 24) และเอมีน (สาร 3) และนำไปต่อกับ quinone propionic acid 26 ได้ ester หรือ amide ดังแสดงในแผนภาพข้างล่าง



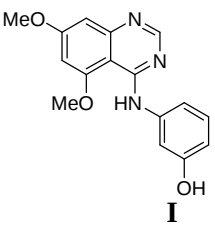
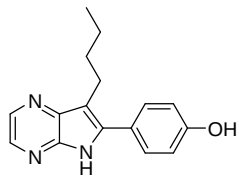
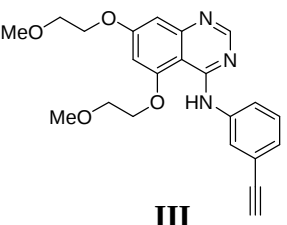
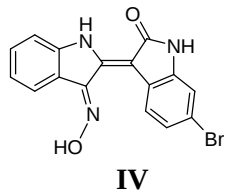
อนุพันธ์ 3 มีค่า IC_{50} ต่อเซลล์ NCI-H187, MCF-7 และ KB เท่ากับ 1.37, 9.76 และ 0.39 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อนำไปเปลี่ยนเป็น prodrug แล้ว พบว่ามีค่า IC_{50} ต่อเซลล์ NCI-H187, MCF-7 และ KB เท่ากับ 5.73, 18.42 และ 37.78 $\mu\text{g/ml}$ อาจอธิบายได้ว่าปฏิกิริยาการถูกรีดิวซ์เป็น hydroquinone และการปิดวง lactone อาจเกิดได้ไม่สมบูรณ์ จึงปลดปล่อย toxic compound ออกมาได้น้อย เมื่อดูผลของ prodrug กับ KB cells จะเห็นว่าสูงขึ้น นั่นก็อาจอธิบายได้ว่าสาร 33 นี้ไม่ถูกรีดิวซ์เนื่องจากไม่มีเอนไซม์ reductase ที่สูงผิดปกติ ผลของสารนี้กับเซลล์ปกติพบว่า IC_{50} เท่ากับ 13.91 นั่นคือสารนี้มีพิษต่อเซลล์ปกติน้อยลง

สาร 24 มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ NCI-H187 และ MCF-7 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งที่มีเอนไซม์ reductase ในระดับสูง โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.99 และ 16.15 $\mu\text{g/ml}$ และค่า IC_{50} กับเซลล์ KB เท่ากับ 2.63 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อทดสอบฤทธิ์ด้านเซลล์มะเร็งของสาร 30 พบว่าเป็นพิษต่อเซลล์ NCI-H187, MCF-7 และ KB เท่ากับ 25.41, 36.81 และ 17.00 นั่นแสดงว่า prodrug เกิดการปลดปล่อยสารพิษออกมาได้น้อย อาจเนื่องมาจากเอนไซม์แตกพันธะยาก แต่อย่างไรก็ตามสาร prodrug นี้ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ซึ่งน่าจะเป็นประโยชน์พอควร

การศึกษากลไกด้วยเทคนิคทางคอมพิวเตอร์

จากผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจะเห็นว่าสาร 3 และ 16 แสดงฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้ดีที่สุด จึงได้ทำการศึกษาด้วยเทคนิคทางคอมพิวเตอร์ในการศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารสังเคราะห์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดยการศึกษาการจับกันของสารสังเคราะห์กับเอนไซม์หรือรีเซพเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง ด้วยเทคนิคโมเลกุลาร์ด็อกกิง (molecular docking) ในเซลล์มะเร็งนั้นมักพบเอนไซม์ CDKs และ EGFR ในระดับที่สูง สำหรับมะเร็งท่อน้ำดีนั้นพบเอนไซม์ CDK-2, CDK-5 และ EGFR สูงทั้งในผู้ป่วยคนไทยและญี่ปุ่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ EGFR พบในระดับที่สูงมาก อาจกล่าวได้ว่า CDK-2, CDK-5 และ EGFR อาจเป็นตัวควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี นอกจากนี้เอนไซม์ GSK-3 ก็พบในเซลล์มะเร็งของทั้งคนไทยและญี่ปุ่น ฉะนั้นจึงได้เลือกเอนไซม์ CDK-2, CDK-5, EGFR และ GSK-3 ในการศึกษากลไกด้วยเทคนิคทางคอมพิวเตอร์ โดย template ที่ใช้ในการสร้างและ redock กับ ligand 4 ชนิด ตารางที่ 4 แสดงข้อมูลทางโครงสร้างและข้อมูลของ ligand ทั้งหมด ในตารางที่ 5 แสดงผลของการ redock กับ ligand ทั้ง 4 ชนิด ซึ่งค่า RMSD ต่ำกว่า 2 แสดงว่ามีค่าความน่าเชื่อถือพอสมควร เมื่อนำสาร 3 และ 16 มาทำการ docking กับ template ที่สร้างขึ้นโดยใช้โปรแกรม AutoDock 4 พบว่า CDK-2 เกิด H-bond กับสาร 3 ด้วยค่า binding energy เท่ากับ -6.18 kcal/mol แต่กับเอนไซม์ EGFR พบว่าค่า binding energy เท่ากับ -7.24 kcal/mol จากการดูภาพ 3 มิติแล้วพบว่าสาร 3 เกิด H-bond กับ NH ของ lysine 721 ด้วยระยะ 1.9 Å และ เอมีนของสาร 3 กับออกซิเจนของ asp 831 ด้วยระยะ 1.7 Å นั้นแสดงว่าสาร 3 นี้จะไปยับยั้ง cell proliferation โดยไปจับกับเอนไซม์ EGFR สำหรับสาร 16 เกิด H-bond กับเอนไซม์ EGFR ด้วยค่า binding energy เท่ากับ -8.25 kcal/mol โดยเกิด เกิด H-bond กับ Asp 831 ด้วยระยะ 1.7 Å และเกิด H-bond กับ Asn 818 ด้วยระยะ 2.1 Å

ตารางที่ 4 โครงสร้างของ ligand

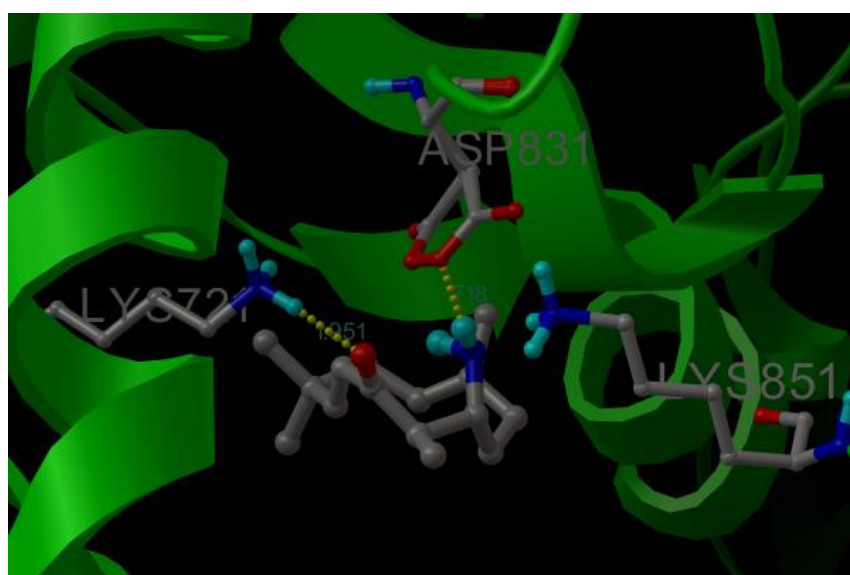
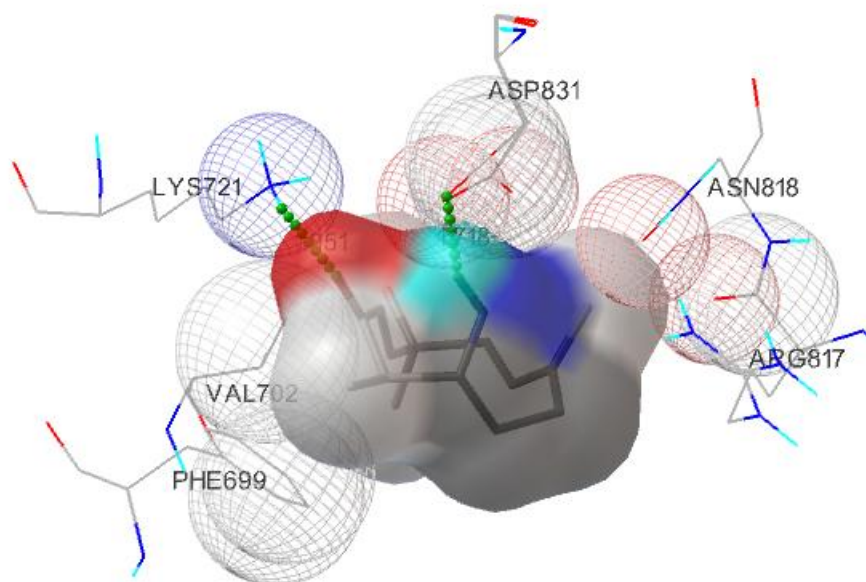
Ligand	PDB	Resolution Å
 I	1DI8	2.20
 II	1UNG	2.30
 III	1M17	2.60
 IV	1UV5	2.80

ตารางที่ 5 Docking ของตัวยับยั้ง

Ligand	Macromolecule	Members in the highest cluster	E _{binding} (kcal/mol)	RMSD from crystal orientation (Å)
I	CDK-2	87	-7.32	0.71
II	CDK-5	93	-6.53	0.92
III	EGFR	67	-7.69	1.67
IV	GSK-3	150	-9.14	0.56

ตารางที่ 6 Geometric filters ของสาร 3

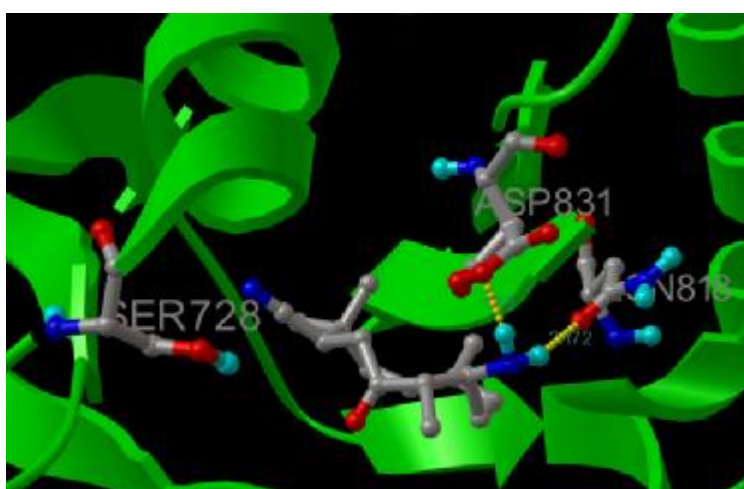
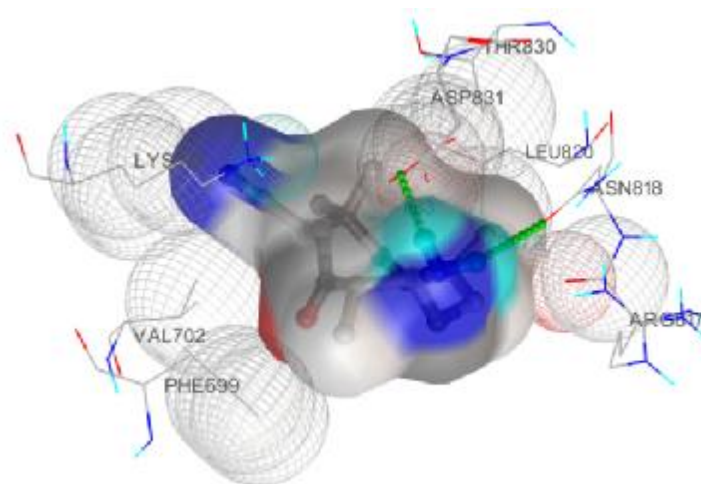
Kinase targets	Number of H-bond	Geometric filters			E_{binding} (kcal/mol)
		Amino acid residue	H-bonding atom	Distance (Å)	
CDK-2	2	Asp145	O (C=O)	2.211	-6.18
		Asp145	N (NH ₂)	2.161	
CDK-5	0	-	-	-	-6.06
EGFR	2	Lys721	O (C=O)	1.951	-7.24
		Asp831	N (NH ₂)	1.718	
GSK-3	0	-	-	-	-5.48



รูปแสดง H-bond ของสาร 3 กับ Asp 831 และ Lys 721

ตารางที่ 7 Geometric filters ของสาร 16

Kinase targets	Number of H-bond	Geometric filters			E_{binding} (Kcal/mol)
		Amino acid residue	H-bonding atom	Distance (Å)	
CDK-2	3	Lys33	O (C=O)	1.685	-7.52
		Asn132	H (NH ₂)	1.898	
		Gln131	H (NH ₂)	1.805	
CDK-5	2	Asp86	H (NH ₂)	2.124	-7.08
		Gln130	H (NH ₂)	1.977	
EGFR	2	Asp831	H (NH ₂)	1.798	-8.25
		Asn818	H (NH ₂)	2.177	
GSK-3	0	-	-	-	-6.82



รูปแสดง H-bond ของสาร 16 กับ Asp 831 และ Asn 818

สรุปผลการวิจัย

จากการนำซีรัมโบนมาเป็นสารตั้งต้นในการคัดแปลงโครงสร้างโดยมุ่งเน้นที่จะใช้ปฏิกิริยาทางเคมีอินทรีย์ที่ง่าย ไม่ยุ่งยาก ได้อนุพันธ์ทั้งหมด 22 สาร เมื่อนำสารทั้งหมดไปทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งท่อน้ำดีกับเซลล์ K KU-100, K KU-M139, K KU-M156, K KU-M213 และ K KU-M214 พบว่าสาร 3 และ 16 แสดงฤทธิ์ที่ดี โดยเฉพาะกับเซลล์ K KU-100 ซึ่งเป็นเซลล์ที่ดื้อยามากที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.87 และ 2.39 $\mu\text{g/ml}$ นอกจากนี้สาร 3 และ 16 ยังแสดงฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็ง K KU-M139, K KU-M156, K KU-M213 และ K KU-M214 ที่ดีโดยค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 4 ถึง 8 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อมาลาเรียพบว่าสาร 7 ตัวได้แก่ 2-5, 7, 11 และ 19 แสดงค่า IC_{50} ที่ดีโดยอยู่ในช่วง 1 ถึง 7 $\mu\text{g/ml}$ อนุพันธ์ส่วนใหญ่ยังแสดงฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็ง NCI-H187, BC และ KB ในระดับที่ดี แต่ปัญหาก็ยังคงเป็นพิษต่อเซลล์ปกติด้วยเช่นกัน

เมื่อนำอัลทอกออร์ 3 และ เอมีน 24 มาต่อเข้ากับ quinone propionic acid เพื่อให้ได้สารที่เป็น bioreductive agent 29 และ 30 ตามลำดับ เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง พบว่ามีค่า IC_{50} ที่ไม่ต่ำเท่าที่ควร ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก prodrugs ถูกரிคิ่วซ์ได้ไม่คีนัก

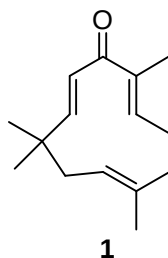
เอกสารอ้างอิง

1. Huang, C. Chien, Y. Chen, G. Wang, C. Antitumor effects of zerumbone from *Zingiber zerumbet* in P-388-D1 cells in vitro and in vivo. *Planta Medica*. 2005, 71(3), 219-224.
2. Murakami, A. Miyamoto, M. Ohigashi, H. Zerumbone, an anti-inflammatory phytochemical, induces expression of proinflammatory cytokine genes in human colon adenocarcinoma cell lines. *Biofactors*. 2004, 21(1-4), 95-101.
3. Murakami, A. Tanaka, T. Lee, JY. Surh, YJ. Kim, HW. Kawabata, K. Nakamura, Y. Jiwajinda, S. Ohigashi, H. Zerumbone, a sesquiterpene in subtropical ginger, suppresses skin tumor initiation and promotion stages in IRC mice. *International J. of Cancer*. 2004, 110(4), 481-490.
4. Kirana, C. McIntosh, GH. Record, IR. Jones, GP. Antitumor activity of extract of *Zingiber aromaticum* and its bioactive sesquiterpenoid zerumbone. *Nutrition and Cancer*. 2003, 45(2), 218-225.
5. Sawada, S. Hosokawa, T. Zerumbone, and their antiproliferative activity to cultured mouse t-lymphoma cells, EL4. *Mathematics and Natural Science*. 2000, 95, 11-17.
6. Dai, JR. Cardellina, JH. McMahon, JB. Boyd, MR. Zerumbone, an HIV-inhibitory and cytotoxic sesquiterpene of *Zingiber aromaticum* and *Zingiber zerumbet*. *Natural Products Letters*. 1997, 10(2), 115-118.
7. Yamamoto, K. Kitayama, T. Minagawa, S. Watanabe, T. Sawada, S. Okamoto, T. Utsumi, R. Antibacterial agents that inhibit histidine protein kinase YycG of *Bacillus subtilis*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2001, 65(10), 2306-2310.
8. Nakatani, N. Jitoe, A. Masuda, T. Yonemori, S. Constituents of Zingiberaceae. Flavonoid constituents of *Zingiber zerumbet* Smith. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1991, 55(2), 455-460.
9. Ohe, K. Miki, K. Yanagi, S. Tanaka, T. Sawada, S. Uemura, S. Selective conjugation addition to zerumbone and transannular cyclization of its derivatives. *Perkin 1*. 2000, 21, 3627-3634.
10. Hoog, SS. Smith, WW. Qiu, X, Janson, Cheryl A. Hellmig, B. McQueney, MS. O'Donnell, K. O'Shannessy, D. DiLella, AG. Debouck, C. Abdel-Meguid, SS. Active site cavity of herpesvirus proteases revealed by the crystal structure of herpes simplex virus protease inhibitor complex. *Biochemistry*. 1997, 36(46), 14023-14029.

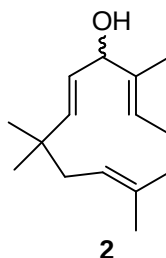
11. Holyoak, T. Wilson, MA. Fenn, TD. Kettner, CA. Petsko, GA. Fuller, RS. Ringe, D. Resolution Crystal Structure of the Prototypical Hormone-Processing Protease Kex2 in Complex with an Ala-Lys-Arg Boronic Acid Inhibitor. *Biochemistry*. 2003, 42(22), 6709-6718.
12. Schapira, M. Abagyan, R. Totrov, M. Nuclear hormone receptor targeted virtual screening. *J. Med. Chem.* 2003, 46, 3045-3059.
13. Emanuele, P. Xu, K. Kollmeyer, T.M. Kaufmann, S.H. Prendergast, F.G. Pang, Y.P. Successful virtual screening of a chemical data base for farnesyltransferase inhibitor leads. *J. Med. Chem.* 2000, 43, 401-408.
14. Gharat, L. Taneja, R. Weerapreeyakul, N. Rege, B. Polli, J. Chikhale, PJ. Targeted drug delivery systems 6: Intracellular bioreductive activation, uptake, and transport of an anticancer drug delivery system across intestinal Caco-2 cell monolayers. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001, 219(1-2), 1-10.
15. Weerapreeyakul, N. Anorach, R. Khuansawad, T. Yenjai, C. Isaka, M. Synthesis of bioreductive esters from fungal compounds. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 2007, 55(6), 930-935.
16. Weerapreeyakul, N. Hollenbeck, RG. Chikhale, PJ. Stability of bioreductive drug delivery systems containing melphalan is influenced by conformational constraint and electronic properties of substituents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2000, 10(21), 2391-2395.

ภาคผนวก

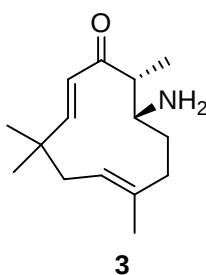
ข้อมูลทาง spectroscopy



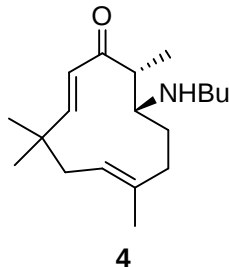
Zerumbone (15.0 g, 0.33%) as a white solid, mp 66-67°C. IR $\nu_{\max}$ 3025, 2962, 1655, 1263, 964 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 6.03 (1H, br d, $J = 12.6$ Hz, H-3), 6.00 (1H, d, $J = 16.4$ Hz, H-11), 5.85 (1H, d, $J = 16.4$ Hz, H-10), 5.24 (1H, br d, $J = 15.7$ Hz, H-7), 2.40-2.50 (1H, m, H-4), 2.30-2.40 (2H, m, H-5 and H-8), 2.15-2.27 (2H, m, H-4 and H-5), 1.89 (1H, br d, $J = 12.8$ Hz, H-8), 1.80 (3H, s, H-12), 1.58 (3H, s, H-13), 1.20 (3H, s, H-14 or 15), 1.05 (3H, s, H-15 or 14); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 204.3 (C1), 160.7 (C10), 148.8 (C3), 137.9 (C2), 136.2 (C6), 127.1 (C11), 125.0 (C7), 42.4 (C8), 39.4 (C5), 37.8 (C9), 29.4 (C14 or 15), 24.4 (C4), 24.2 (C15 or 14), 15.2 (C13), 11.7 (C12); HRMS m/z calcd mass for $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}$ 241.1568 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, found 241.1568.



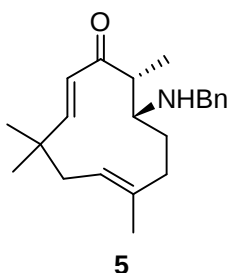
($\pm$)-(2*E*,6*E*,10*E*)-2,6,9,9-Tetramethylcycloundeca-2,6,10-trienol (2). Yield 447 mg, 88%; mp 72-73°C; IR $\nu_{\max}$ 3290, 2955, 1445, 1297, 1076, 969 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 5.56 (1H, dd, $J = 16.1, 7.2$ Hz, H-11), 5.25 (1H, d, $J = 16.1$ Hz, H-10), 5.22 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-3), 4.83 (1H, dd, $J = 10.1, 4.0$ Hz, H-7), 4.63 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1), 2.16-2.24 (1H, m, H-4), 2.04-2.14 (3H, m, H-4 and 2H-5), 2.01 (1H, dd, $J = 13.7, 2.8$ Hz, H-8), 1.80 (1H, dd, $J = 13.7, 3.8$ Hz, H-8), 1.67 (3H, s, CH_3 -12), 1.44 (3H, s, CH_3 -13), 1.08 (3H, s, CH_3 -14 or 15), 1.06 (3H, s, CH_3 -15 or 14); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 141.8 (C2), 139.3 (C10), 133.0 (C6), 131.3 (C11), 124.9 (C7), 124.8 (C3), 78.6 (C1), 41.9 (C8), 39.1 (C5), 37.1 (C9), 29.4 (CH_3 -14 or 15), 24.2 (CH_3 -15 or 14), 22.9 (C4), 15.0 (CH_3 -13), 12.7 (CH_3 -12); HRMS m/z calcd mass for $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$ 243.1725 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, found 243.1725.



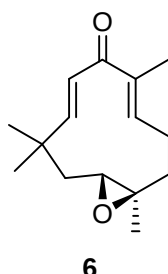
(±)-[6*E*,10*E*]-3-Amino-2,6,9,9-tetramethylcycloundeca-6,10-dienone (3). Yield 32 mg, 56%; mp 90-91°C; IR ν_{max} 3373, 3304, 1677, 1625, 1451, 995 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3OD) δ 6.13 (1H, d, J = 16.1 Hz, H-10), 6.08 (1H, d, J = 16.1 Hz, H-11), 5.04 (1H, dd, J = 11.7, 4.4 Hz, H-7), 3.23-3.35 (1H, m, H-3), 2.65 (1H, dq, J = 6.6, 2.9 Hz, H-2), 2.20 (1H, t, J = 12.4 Hz, H-8), 1.98-2.06 (1H, m, H-5), 1.78-1.90 (2H, m, H-5 and H-8), 1.30 (3H, s, CH_3 -13), 1.10 (3H, s, CH_3 -14 or 15), 1.08 (3H, s, CH_3 -15 or 14), 0.98-1.02 (2H, m, H-4), 0.90 (3H, d, J = 6.6 Hz, CH_3 -12); ^{13}C NMR (CD_3OD) δ 202.6 (C1), 152.5 (C10), 137.7 (C6), 127.8 (C11), 122.2 (C7), 54.4 (C2), 52.7 (C3), 41.2 (C8), 39.9 (C9), 37.7 (C5), 29.9 (C4), 28.7 (CH_3 -14 or 15), 22.7 (CH_3 -15 or 14), 16.2 (CH_3 -13), 5.7 (CH_3 -12).



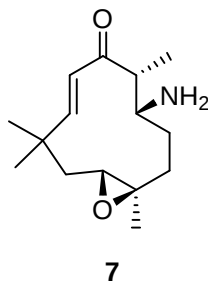
(±)-[6*E*,10*E*]-3-Butylamino-2,6,9,9-tetramethylcycloundeca-6,10-dienone (4). Yield 62 mg, 93%; IR ν_{max} 3332, 1693, 1674, 1626, 1455, 998 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 6.12 (1H, d, J = 16.1 Hz, H-10), 5.58 (1H, d, J = 16.1 Hz, H-11), 5.00 (1H, dd, J = 11.7, 4.6 Hz, H-7), 2.97-2.99 (1H, m, H-3), 2.84-2.92 (1H, m, H-2), 2.60-2.66 (1H, m, H-1'), 2.47-2.55 (1H, m, H-1'), 2.12 (1H, t, J = 12.3 Hz, H-8), 1.95-2.02 (1H, m, H-5), 1.78-1.81 (2H, m, H-5 and H-8), 1.40-1.50 (2H, m, H-2'), 1.25-1.33 (2H, m, H-3'), 1.28 (3H, s, CH_3 -13), 1.10 (3H, s, CH_3 -14 or 15), 1.08 (3H, s, CH_3 -15 or 14), 0.90-1.00 (2H, m, H-4), 0.85 (3H, t, J = 7.3 Hz, H-4'), 0.80 (3H, d, J = 6.6 Hz, CH_3 -12); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 203.2 (C1), 152.0 (C10), 138.1 (C6), 127.7 (C11), 122.0 (C7), 58.5 (C3), 48.6 (C2), 46.8 (C1'), 41.3 (C8), 40.0 (C9), 38.3 (C5), 31.9 (C2'), 28.8 (CH_3 -14 or 15), 28.7 (C4), 22.7 (CH_3 -15 or 14), 20.4 (C3'), 16.2 (CH_3 -13), 13.9 (C4'), 5.9 (CH_3 -12).



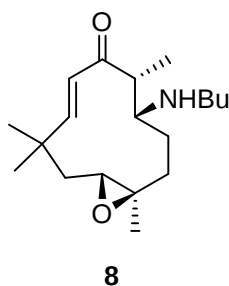
(±)-[6*E*,10*E*]-3-Benzylamino-2,6,9,9-tetramethylcycloundeca-6,10-dienone (5). Yield 51 mg, 68%; mp 80-82°C; IR ν_{max} 3421, 2922, 1687, 1624, 1042, 744, 701 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.26-7.60 (5H, m, Ar-H), 6.05 (1H, d, $J = 16.1$ Hz, H-10), 5.65 (1H, d, $J = 16.1$ Hz, H-11), 4.54 (1H, dd, $J = 11.8, 4.2$ Hz, H-7), 4.02 (1H, d, $J = 13.6$ Hz, H-1'), 3.77 (1H, d, $J = 13.6$ Hz, H-1'), 3.00 (1H, dq, $J = 6.6, 2.7$ Hz, H-2), 2.92 (1H, dd, $J = 7.5, 2.7$ Hz, H-3), 2.10 (1H, t, $J = 12.3$ Hz, H-8), 1.92-1.99 (1H, m, H-5), 1.61 (NH), 1.75 (1H, t, $J = 12.0$ Hz, H-5), 1.68 (1H, dd, $J = 12.0, 4.5$ Hz, H-8), 1.31 (3H, s, CH_3 -13), 1.08 (3H, s, CH_3 -14 or 15), 1.01-1.05 (1H, m, H-4), 0.96 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, CH_3 -12), 0.86-0.94 (1H, m, H-4), 0.77 (3H, s, CH_3 -15 or 14); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 203.1 (C1), 151.4 (C10), 140.0 (C-Ar), 137.9 (C-Ar), 137.9 (C6), 128.6 (C-Ar), 128.4 (C-Ar), 127.9 (C11), 127.3 (C-Ar), 121.9 (C7), 56.0 (C3), 50.5 (C1'), 47.4 (C2), 41.3 (C8), 39.7 (C9), 37.5 (C5), 29.0 (CH_3 -14 or 15), 28.9 (C4), 22.7 (CH_3 -15 or 14), 16.4 (CH_3 -13), 6.0 (CH_3 -12); HRMS m/z calcd mass for $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{NO}$ 348.2303 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, found 348.2303.



(±)-[2*E*,10*E*]-6,7-Epoxy-2,6,9,9-tetramethylcycloundeca-2,10-dienone (6). Yield 41 mg, 97%; mp 84-85°C; IR ν_{max} 2963, 1656, 1262, 1119, 971 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 6.02-6.10 (3H, m, H-3, H-10 and H-11), 2.70 (1H, dd, $J = 11.2, 1.5$ Hz, H-7), 2.34-2.45 (2H, m, H-4), 2.21-2.27 (1H, m, H-5), 1.89 (1H, d, $J = 14.0$ Hz, H-8), 1.80 (3H, s, CH_3 -12), 1.41 (1H, dd, $J = 14.0, 11.2$ Hz, H-8), 1.26-1.34 (1H, m, H-5), 1.25 (3H, s, CH_3 -14 or 15), 1.18 (3H, s, CH_3 -13), 1.03 (3H, s, CH_3 -15 or 14); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 202.8 (C1), 159.4 (C10), 147.7 (C3), 139.4 (C2), 128.2 (C11), 62.7 (C7), 61.3 (C6), 42.6 (C8), 38.1 (C5), 35.9 (C9), 29.7 (CH_3 -14 or 15), 24.6 (C4), 24.0 (CH_3 -15 or 14), 15.6 (CH_3 -13), 12.0 (CH_3 -12); HRMS m/z calcd mass for $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2$ 257.1517 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, found 257.1517.

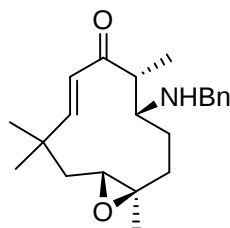


(±)-[10*E*]-3-Amino-6,7-epoxy-2,6,9,9-tetramethylcycloundeca-10-enone (7). Yield 51%; mp 126-127°C; IR ν_{max} 3382, 1693, 1631, 1009, 914 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 6.29 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-11), 6.20 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-10), 3.12-3.17 (1H, m, H-3), 2.62-2.68 (2H, m, H-2 and H-7), 2.00-2.06 (1H, m, H-5), 1.84 (1H, t, $J = 12.5$ Hz, H-8), 1.30 (1H, dd, $J = 11.3, 2.5$ Hz, H-8), 1.20 (3H, s, CH_3 -14 or 15), 1.06 (3H, s, CH_3 -15 or 14), 1.04 (3H, s, CH_3 -13), 0.94-0.98 (3H, m, 2H-4 and H-5), 0.90 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, CH_3 -12); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 203.1 (C1), 150.8 (C10), 127.7 (C11), 62.0 (C6), 60.7 (C7), 54.3 (C3), 53.2 (C2), 40.2 (C8), 36.6 (C5), 36.1 (C9), 29.4 (CH_3 -14 or 15), 27.4 (C4), 23.1 (CH_3 -15 or 14), 16.6 (CH_3 -13), 5.6 (CH_3 -12); HRMS m/z calcd mass for $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{NO}_2$ 252.1964 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found 252.1962.

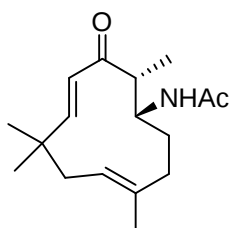


(±)-[10*E*]-3-Butylamino-6,7-epoxy-2,6,9,9-tetramethylcycloundeca-10-enone (8). Yield 15%; mp 76-77°C; IR ν_{max} 3434, 1688, 1628, 1114, 917 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 6.30 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-11), 6.25 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-10), 2.92-3.00 (2H, m, H-2 and H-7), 2.66-2.74 (2H, m, H-3 and H-1'), 2.44-2.52 (1H, m, H-1'), 2.05-2.09 (1H, m, H-5), 1.90 (1H, d, $J = 13.8$ Hz, H-8), 1.42-1.50 (2H, m, H-2'), 1.34-1.41 (3H, m, H-8 and 2H-3'), 1.26 (3H, s, CH_3 -14 or 15), 1.15 (3H, s, CH_3 -15 or 14), 1.10 (3H, s, CH_3 -13), 1.00-1.10 (2H, m, H-4), 1.00-1.05 (1H, m, H-5), 0.93 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, H-4'), 0.90 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, CH_3 -12); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 203.8 (C1), 150.3 (C10), 127.8 (C11), 62.0 (C6), 60.7 (C7), 60.7 (C3), 47.8 (C2), 47.0 (C1'), 40.5 (C8), 37.2 (C5), 36.2 (C9), 32.4 (C2'), 29.6 (CH_3 -14 or 15), 26.2 (C4), 23.3 (CH_3 -15 or 14), 20.4

(C3'), 16.8 (CH₃-13), 14.0 (C4'), 5.8 (CH₃-12); HRMS m/z calcd mass for C₁₉H₃₄NO₂ 308.2590 [M+H]⁺, found 308.2593.

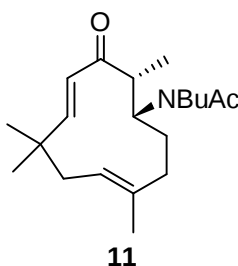
**9**

(±)-[10*E*]-3-Benzylamino-6,7-epoxy-2,6,9,9-tetramethylcycloundec-10-enone (9). Yield 18%; mp 80-81°C; IR $\nu_{\max}$ 3350, 1686, 1626, 1113, 917, 749, 704 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.28-7.42 (5H, m, Ar-H), 6.16 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-10), 5.84 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-11), 4.02 (1H, d, J = 13.4 Hz, H-1'), 3.72 (1H, d, J = 13.4 Hz, H-1'), 3.00 (1H, dq, J = 6.6, 3.2 Hz, H-2), 2.80 (1H, dd, J = 9.3, 3.2 Hz, H-3), 2.14 (1H, dd, J = 11.2, 1.6 Hz, H-7), 2.00 (1H, dd, J = 8.6, 8.2 Hz, H-5), 1.74 (1H, d, J = 13.5 Hz, H-8), 1.20-1.28 (1H, m, H-8), 1.08-1.14 (2H, m, H-4), 1.06 (3H, s, CH₃-14 or 15), 1.04 (3H, s, CH₃-13), 0.96 (3H, d, J = 6.6 Hz, CH₃-12), 0.90 (3H, s, CH₃-15 or 14); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 203.8 (C1), 150.1 (C10), 139.7 (C-Ar), 128.7 (C-Ar), 128.4 (C-Ar), 127.7 (C11), 127.5 (C-Ar), 61.7 (C6), 60.4 (C7), 57.2 (C3), 50.3 (C1'), 46.4 (C2), 40.7 (C8), 36.5 (C5), 36.0 (C9), 29.6 (CH₃-14 or 15), 25.9 (C4), 23.0 (CH₃-15 or 14), 16.8 (CH₃-13), 5.7 (CH₃-12); HRMS m/z calcd mass for C₂₂H₃₂NO₂ 342.2433 [M+H]⁺, found 342.2433.

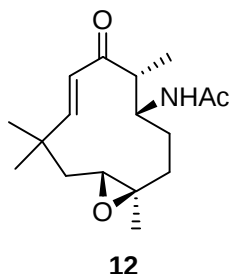
**10**

(±)-[6*E*,10*E*]-3-(*N*-Acetylamino)-2,6,9,9-tetramethyl-cycloundeca-6,10-dienone (10). Yield 92 mg, 92%; mp 199-200°C; IR $\nu_{\max}$ 3300, 1694, 1633, 1547 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 6.40 (1H, d, J = 16.2 Hz, H-11), 6.14 (1H, d, J = 16.2 Hz, H-10), 5.15 (1H, dd, J = 11.7, 4.2 Hz, H-7), 4.47 (1H, br d, J = 8.3 Hz, H-3), 2.90 (1H, dq, J = 6.7, 2.6 Hz, H-2), 2.20 (1H, t, J = 12.3 Hz, H-8), 1.98 (3H, s, CH₃ of NHAc), 1.90-1.96 (1H, m, H-5), 1.85 (1H, dd, J = 13.0, 4.4 Hz, H-8), 1.70 (1H, t, J = 12.3 Hz, H-5), 1.36 (3H, s, CH₃-13), 1.19 (3H, s, CH₃-14 or 15), 1.13 (3H, s,

CH₃-15 or 14), 0.95-1.00 (2H, m, H-4), 0.95 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, CH₃-12); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 202.6 (C1), 170.7 (C=O of NHAc), 152.1 (C10), 136.5 (C6), 128.4 (C11), 123.2 (C7), 50.8 (C2), 50.7 (C3), 41.5 (C8), 40.0 (C9), 37.0 (C5), 28.8 (CH₃-14 or 15), 27.4 (C4), 22.9 (CH₃ of NHAc), 22.8 (CH₃-15 or 14), 16.3 (CH₃-13), 6.6 (CH₃-12); HRMS m/z calcd mass for C₁₇H₂₇NO₂ 300.1939 [M+Na]⁺, found 300.1939.

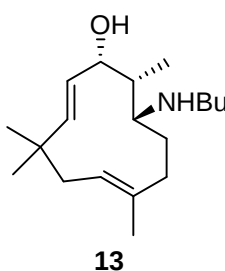


(±)-[6*E*,10*E*]-3-(*N*-Acetylbutylamino)-2,6,9,9-tetramethylcycloundeca-6,10-dienone (11). Yield 97 mg, 85%; mp 72-73°C; IR $\nu_{\max}$ 3554, 3476, 1693, 1619 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 6.62 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-11), 6.16 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-10), 5.14-5.20 (2H, m, H-3 and H-7), 3.28-3.60 (1H, m, H-1'), 3.14-3.23 (1H, m, H-1'), 2.80 (1H, dq, $J = 6.7, 2.2$ Hz, H-2), 2.22-2.32 (1H, m, H-8), 2.18 (3H, s, CH₃ of NHAc), 1.95 (1H, dd, $J = 12.5, 6.5$ Hz, H-5), 1.87 (1H, dd, $J = 13.2, 4.3$ Hz, H-8), 1.56-1.66 (2H, m, H-4 and H-5), 1.46-1.56 (2H, m, H-2'), 1.41 (3H, s, CH₃-13), 1.28-1.36 (2H, tq, $J = 14.7, 7.3$ Hz, H-3'), 1.26 (3H, s, CH₃-14 or 15), 1.15 (3H, s, CH₃-15 or 14), 0.99 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, CH₃-12), 0.94 (3H, t, $J = 7.3$ Hz, H-4'), 0.80-0.90 (1H, m, H-4); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 202.5 (C1), 171.8 (C=O of NHAc), 151.7 (C10), 136.2 (C6), 128.8 (C11), 123.7 (C7), 54.1 (C3), 51.7 (C2), 45.9 (C1'), 41.7 (C8), 40.2 (C9), 37.1 (C5), 33.3 (C2'), 29.0 (CH₃-14 or 15), 23.1 (CH₃-15 or 14), 23.0 (C4), 22.3 (CH₃ of NHAc), 20.2 (C3'), 16.3 (CH₃-13), 13.7 (C4'), 8.3 (CH₃-12); HRMS m/z calcd mass for C₂₁H₃₅NO₂ 356.2565 [M+Na]⁺, found 356.2566.

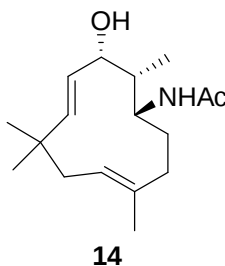


(±)-[10*E*]-3-(*N*-Acetylaminio)-6,7-epoxy-2,6,9,9-tetramethylcycloundeca-10-enone (12). Yield 15.6 mg, 66%; mp 205-206°C; IR $\nu_{\max}$ 3243, 3072, 1699, 1632, 1551, 1107, 916 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 6.59 (1H, d, $J = 16.1$ Hz, H-11), 6.29 (1H, d, $J = 16.1$ Hz, H-10), 4.47 (1H,

dt, $J = 7.5, 3.1$ Hz, H-3), 2.96 (1H, dq, $J = 6.7, 3.1$ Hz, H-2), 2.85 (1H, dd, $J = 11.2, 1.7$ Hz, H-7), 1.98-2.03 (1H, m, H-5), 2.01 (3H, s, CH₃ of NHAc), 1.90-1.95 (1H, m, H-8), 1.36-1.41 (1H, dd, $J = 11.2, 2.5$ Hz, H-8), 1.34 (3H, s, CH₃-13), 1.19-1.28 (1H, m, H-4), 1.15 (3H, s, CH₃-14 or 15), 1.12 (3H, s, CH₃-15 or 14), 1.00-1.06 (1H, m, H-4), 0.95 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, CH₃-12), 0.95-0.98 (1H, m, H-5); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 202.6 (C1), 170.1 (C=O of NHAc), 150.6 (C10), 128.4 (C11), 61.1 (C6), 60.3 (C7), 52.0 (C3), 49.7 (C2), 40.8 (C8), 36.3 (C9), 36.0 (C5), 29.5 (CH₃-14 or 15), 24.9 (C4), 23.4 (CH₃-13), 23.3 (CH₃ of NHAc), 16.8 (CH₃-15 or 14), 6.5 (CH₃-12); HRMS m/z calcd mass for C₁₇H₂₇NO₃ 316.1889 [M+Na]⁺, found 316.1889.

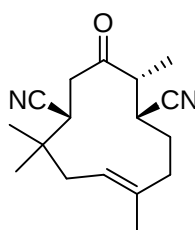


(±)-[6E,10E]-3-Butylamino-2,6,9,9-tetramethylcycloundeca-6,10-dienol (13). Yield 81%; IR $\nu_{\max}$ 3428, 2959, 1563, 1413, 1022 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 5.26 (1H, br d, $J = 15.3$ Hz, H-10), 4.98-5.10 (2H, m, H-7 and H-11), 3.98 (1H, br s, H-1), 2.58-2.70 (1H, m, H-3), 2.40-2.52 (2H, m, H-1'), 2.02-2.12 (1H, m, H-8), 1.80-1.94 (3H, m, H-2 and 2H-5), 1.68 (1H, t, $J = 13.0$ Hz, H-8), 1.54 (3H, s, CH₃-13), 1.38-1.46 (2H, m, H-2'), 1.20-1.30 (4H, m, 2H-4 and 2H-3'), 1.00 (6H, s, 2CH₃-14, 15), 0.88 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, CH₃-12), 0.84 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, H-4'); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 145.1 (C10), 140.2 (C6), 128.8 (C11), 128.4 (C7), 79.9 (C1), 60.2 (C3), 50.8 (C2), 44.4 (C1'), 44.1 (C8), 42.1 (C9), 39.0 (C5), 34.7 (C4), 31.9 (CH₃-14 or 15), 29.4 (CH₃-15 or 14), 27.8 (C2'), 24.3 (C3'), 23.0 (CH₃-13), 17.6 (C4'), 11.7 (CH₃-12); HRMS m/z calcd mass for C₁₉H₃₅NO 294.2797 [M+H]⁺, found 294.2798.

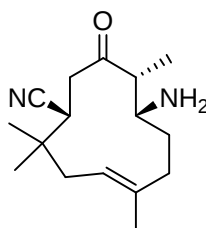


(±)-[6E,10E]-3-(N-Acetylamino)-2,6,9,9-tetramethylcycloundeca-6,10-dienol (14). Yield 54%; mp 84-85°C; IR $\nu_{\max}$ 3383, 1632, 1290, 1023, 978 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 5.23-

5.36 (2H, m, H-10 and H-11), 5.13 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-7), 4.19-4.23 (1H, m, H-1), 2.88-2.91 (1H, m, H-3), 1.90-2.02 (2H, m, H-2 and H-8), 1.89 (3H, s, CH₃ of NHAc), 1.77-1.83 (1H, m, H-8), 1.58-1.63 (2H, m, H-5), 1.57 (3H, s, CH₃-13), 1.11-1.28 (2H, m, H-4), 1.12 (3H, s, CH₃-14 or 15), 1.03 (3H, s, CH₃-15 or 14), 0.91 (3H, d, $J = 7.3$ Hz, CH₃-12); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 170.4 (C=O of NHAc), 138.9 (C10), 136.2 (C6), 126.4 (C11), 124.1 (C7), 74.7 (C1), 48.1 (C3), 42.9 (C8), 41.3 (C9), 38.2 (C2), 35.4 (C5), 27.8 (CH₃-14, 15), 23.0 (C4), 22.9 (CH₃ of NHAc), 18.0 (CH₃-13), 8.9 (CH₃-12); HRMS m/z calcd mass for C₁₇H₂₉NO₂ 302.2096 [M+Na]⁺, found 302.2096.

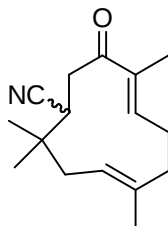
**15a**

(±)-[6E]-3,10-Dicyano-2,6,9,9-tetramethylcycloundeca-6-enone (15a). Yield 35 mg, 42%; mp 115-116°C; IR $\nu_{\max}$ 2962, 2234, 1726 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 5.11 (1H, dd, $J = 10.5$, 4.0 Hz, H-7), 3.36 (1H, dd, $J = 19.4$, 5.2 Hz, H-11), 3.25-3.28 (1H, m, H-10), 2.83-2.86 (2H, m, H-2 and H-3), 2.50 (1H, dd, $J = 19.4$, 3.2 Hz, H-11), 2.12-2.22 (3H, m, 2H-8 and H-5), 1.84-1.92 (3H, m, 2H-4 and H-5), 1.45 (3H, s, CH₃-13), 1.26 (3H, s, CH₃-14 or 15), 1.22 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, CH₃-12), 1.16 (3H, s, CH₃-15 or 14); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 202.2 (C1), 136.1 (C6), 122.1 (C7), 121.9 (CN at C10), 121.6 (CN at C3), 45.9 (C3), 41.3 (C8), 41.1 (C11), 38.9 (C5), 35.9 (C9), 33.5 (C10), 33.3 (C2), 31.9 (CH₃-14 or 15), 24.5 (C4), 21.5 (CH₃-15 or 14), 16.3 (CH₃-13), 11.2 (CH₃-12); HRMS m/z calcd mass for C₁₇H₂₄N₂O 295.1786 [M+Na]⁺, found 295.1787.

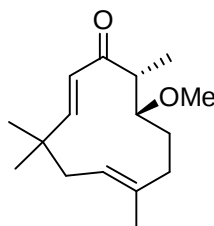
**16**

(2RS,3RS,10SR)-[6E]-3-Amino-10-cyano-2,6,9,9-tetramethyl-cycloundeca-6-enone (16). Yield 38 mg, 56% ; mp 158-160°C; IR $\nu_{\max}$ 3421, 2966, 2236, 1716 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 5.07 (1H, dd, $J = 10.8$, 3.6 Hz, H-7), 3.37-3.43 (1H, m, H-11), 3.22 (1H, t, $J = 4.1$ Hz, H-10), 3.08-3.12 (1H, m, H-3), 2.60 (1H, dq, $J = 6.7$, 2.4 Hz, H-2), 2.38 (1H, dd, $J = 3.6$, 3.6 Hz, H-11),

2.07 (1H, dd, $J = 10.9, 3.8$ Hz, H-8), 1.95-2.02 (1H, m, H-5), 1.87-1.91 (1H, m, H-5), 1.75-1.85 (1H, m, H-8), 1.57-1.66 (1H, m, H-4), 1.36 (3H, s, CH₃-13), 1.15-1.23 (1H, m, H-4), 1.17 (3H, s, CH₃-14), 1.09 (3H, s, CH₃-15), 0.96 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, CH₃-12); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 208.8 (C1), 140.8 (C6), 126.2 (CN at C10), 125.0 (C7), 57.8 (C3), 55.2 (C2), 45.4 (C11), 45.1 (C8), 42.4 (C5), 39.7 (C9), 37.1 (C10), 35.7 (CH₃ on C9), 32.9 (C4), 25.1 (CH₃ on C9), 19.8 (CH₃ on C6), 11.9 (CH₃ on C2) ; HRMS m/z calcd mass for C₃₂H₅₃N₃O₂ 512.3100 [M+H]⁺, found 512.3100.

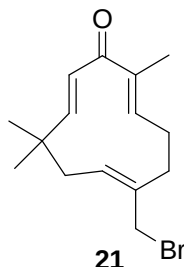
**19**

[2*E*,6*E*]-10-Cyano-2,6,9,9-tetramethylcycloundeca-2,6-dienone (19). Yield 32 mg, 60% in the final step; mp 104-105°C; IR $\nu_{\max}$ 2966, 2232, 1672, 1461, 1267, 817 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 5.95-6.05 (1H, m, H-3), 5.11 (1H, t, $J = 5.9$ Hz, H-7), 2.88-3.07 (1H, br s, H-11), 2.72-2.80 (1H, m, H-10), 2.53-2.66 (1H, m, H-11), 2.42-2.52 (1H, m, H-5), 2.24-2.42 (3H, m, 2H-4 and H-5), 2.00-2.22 (2H, m, H-8), 1.79 (3H, s, CH₃-12), 1.57 (3H, s, CH₃-13), 1.19 (3H, s, CH₃-14 or 15), 1.07 (3H, s, CH₃-15 or 14); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 202.9 (C1), 143.7 (C3), 137.0 (C6), 134.9 (C2), 122.8 (C7), 120.2 (CN at C10), 39.9 (C8), 39.6 (C4), 39.0 (C11), 37.3 (C9), 36.6 (C10), 28.3 (CH₃-14 or 15), 25.8 (CH₃-15 or 14), 24.6 (C5), 15.8 (CH₃-13), 12.5 (CH₃-12); HRMS m/z calcd mass for C₁₆H₂₃NO 268.1677 [M+Na]⁺, found 268.1677.

**20**

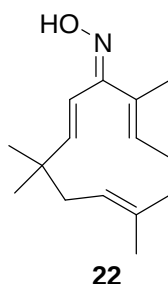
(2*RS*,3*RS*)-[6*E*,10*E*]-3-Methoxy-2,6,9,9-tetramethylcycloundeca-6,10-dienone (20). Yield 26 mg, 45% ; IR $\nu_{\max}$ 2935, 1691, 1626, 1451, 1091 cm⁻¹ ; ¹H NMR (CD₃OD) δ 6.17 (1H, d, $J = 16.1$ Hz, H-10), 6.04 (1H, d, $J = 16.1$ Hz, H-11), 5.07 (1H, dd, $J = 11.7, 4.7$ Hz, H-7), 3.68 (1H, m, H-3), 3.40 (3H, s, OCH₃ at C3), 3.06 (1H, dq, $J = 6.6, 3.3$ Hz, H-2), 2.21 (1H, t, $J = 12.0$ Hz, H-8), 2.08 (1H, dd, $J = 12.7, 6.9$ Hz, H-5), 1.87 (2H, t, $J = 12.0$ Hz, H-5 and H-8), 1.37-1.41 (1H, m, H-4), 1.35 (3H, s, CH₃ on C6), 1.16 (3H, s, CH₃ on C9), 1.13 (3H, s, CH₃ on C9), 0.98-

1.06 (1H, m, H-4), 0.95 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, CH₃ on C2); ¹³C NMR (CD₃OD) δ 201.4 (C1), 151.8 (C10), 138.1 (C6), 128.0 (C11), 121.9 (C7), 82.3 (C3), 57.0 (OCH₃ at C3), 49.2 (C2), 41.3 (C8), 40.1 (C9), 38.5 (C5), 28.9 (CH₃ on C9), 28.2 (C4), 22.9 (CH₃ on C9), 16.2 (CH₃ on C6), 6.1 (CH₃ on C2).



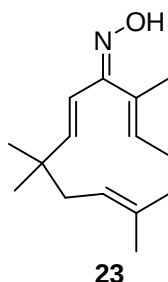
(2*E*,6*Z*,10*E*)-6-(Bromomethyl)-2,9,9-trimethylcycloundeca-2,6,10-trienone (21).

Yield 0.110 g, 39%, mp 98-100°C. IR ν_{max} 2959, 2862, 1636, 775, 658 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 6.03 (1H, d, $J = 16.4$ Hz, H-11), 6.00 (1H, br, H-3), 5.99 (1H, d, $J = 16.4$ Hz, H-10), 5.44 (1H, t, $J = 8.3$ Hz, H-7), 3.86-4.02 (2H, m, H-13), 2.52-2.67 (2H, br, H-5), 2.35-2.47 (1H, br, H-8), 2.17-2.33 (1H, br, H-4), 1.92-2.04 (1H, br, H-8), 1.73 (3H, s, H-12), 1.12 (3H, br s, H-14 or 15), 1.08 (3H, br s, H-15 or 14); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 206.3 (C1), 162.3 (C10), 150.4 (C3), 139.8 (C2), 135.9 (C6), 133.7 (C7), 128.4 (C11), 43.6 (C8), 38.6 (C9), 37.9 (C5), 30.7 (C13), 26.5 (C4), 24.9 (C14 or 15), 24.0 (C15 or 14), 13.2 (C12); HRMS m/z calcd mass for C₁₅H₂₁BrO 319.0806 and 321.0875 [M+Na]⁺, found 319.0806 and 321.0875.



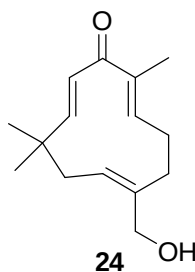
(2*E*,6*E*,10*E*)-2,6,9,9-Tetramethylcycloundeca-2,6,10-trienone oxime (22). To a solution of zerumbone (0.050 g, 0.23 mmol) in ethyl acetate was added HONH₂.HCl (0.158 g, 2.27 mmol) and KOH (0.96 g, 1.71 mmol) in EtOH and H₂O at room temperature. The mixture was stirred for 24 h and then poured into the cold water at 0°C. The organic layer was separated and the water layer was extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with water, brine and dried over anhydrous sodium sulfate. Evaporation of solvent gave the crude oil, which was recrystallized from hexane to give adducts 5 (0.030 g, 0.128 mmol, 54%) as a white

solid, mp 179-181°C. IR $\nu_{\max}$ 3215, 2917, 1641, 1433, 944 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 6.30 (1H, d, $J = 16.5$ Hz, H-11), 5.56 (1H, d, $J = 16.5$ Hz, H-10), 5.42 (1H, br t, H-3), 5.17 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-7), 2.05-2.40 (6H, m, 2H-4, 2H-5 and 2H-8), 1.86 (3H, s, H-12), 1.44 (3H, s, H-13), 1.14 (6H, s, H-14 and 15); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 162.7 (C1), 154.4 (C10), 140.8 (C3), 135.6 (C6), 132.9 (C2), 124.4 (C7), 119.7 (C11), 42.8 (C8), 39.8 (C5), 37.6 (C9), 30.0 (C14 or 15), 29.9 (C15 or 14), 24.0 (C4), 15.1 (C13), 14.9 (C12); HRMS m/z calcd mass for $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{NO}$ 256.1677 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, found 256.1674.



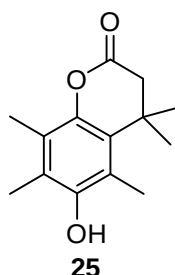
(2E,6E,10E)-2,6,9,9-Tetramethylcycloundeca-2,6,10-trienone oxime (23).

Yield 12 mg, 23% ; mp 110-112°C ; IR $\nu_{\max}$ 3724, 1631, 1439, 1208, 959 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 6.00 (1H, d, $J = 16.4$ Hz, H-11), 5.66 (1H, d, $J = 16.4$ Hz, H-10), 4.95-5.40 (2H, m, H-3 and H-7), 2.00-2.20 (6H, m, 2H-4, 2H-5 and 2H-8), 1.88 (3H, s, CH_3 on C2), 1.50 (3H, s, CH_3 on C6), 1.03 (6H, s, 2 CH_3 on C9) ; ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 163.3 (C1), 155.5 (C10), 138.3 (C3), 135.8 (C6), 131.9 (C2), 123.9 (C7), 123.9 (C11), 42.9 (C8), 40.0 (C5), 36.6 (C9), 29.7 (2 CH_3 on C9), 23.7 (C4), 15.4 (CH_3 on C6), 14.7 (CH_3 on C2) ; HRMS m/z calcd mass for $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{NO}$ 234.1858 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found 234.1858.

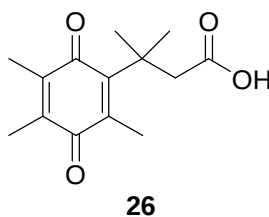


(2E,6Z,10E)-13-hydroxy-2,9,9-trimethylcycloundeca-2,6,10-trienone (24). Yield 0.0085 g, 70%) as a colorless oil. IR $\nu_{\max}$ 3419, 2961, 2926, 1644, 1451, 1267, 1102, 1011 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 6.01 (1H, d, $J = 6.5$ Hz, H-3), 5.89 (1H, d, $J = 16.4$ Hz, H-10), 5.78 (1H, d, J

= 16.4 Hz, H-11), 5.36 (1H, t, J = 8.2 Hz, H-7), 4.33 (1H, br s, H-13a), 3.86 (1H, br s, H-13b), 2.77 (1H, br s, H-5a), 2.47 (2H, m, H-4), 2.29 (1H, br s, H-8a), 2.14 (1H, br s, H-8b), 1.97 (1H, br s, H-5b), 1.77 (3H, s, H-12), 1.21 (3H, s, H-14 or 15), 1.07 (3H, s, H-15 or 14); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 204.0 (C1), 160.1 (C11), 149.6 (C3), 139.1 (C6), 138.2 (C2), 128.4 (C7), 127.2 (C10), 59.2 (C13), 42.0 (C4), 37.3 (C9), 35.0 (C8), 29.3 (C14 or 15), 24.7 (C5), 24.0 (C15 or 14), 11.9 (C12); HRMS m/z calc mass for $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2$ 235.1698 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found 235.1696 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

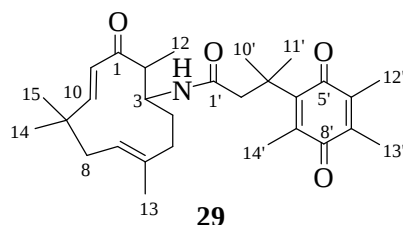


6-hydroxy-4,4,5,7,8-pentamethylhydrocoumarin (25). Methanesulfonic acid 6 mL was added into trimethylhydroquinone (1.0 g, 6.63 mmol) followed by the addition of 3,3-dimethylacrylic acid (0.73 g, 7.3 mmol). The mixture was heated at 70°C for 1 h and then cooled to room temperature. The solution was diluted with water and extracted with ethyl acetate two times. The combined ethyl acetate extracts were washed with water, saturated NaCl, dried (Na_2SO_4) and evaporated to dryness. Purification of the crude by column chromatography (silica gel, 90% CH_2Cl_2 /hexane) to afford pure lactone 13 (1.25 g, 5.33 mmol, 80%) as a white solid, mp 183-185°C. IR ν_{max} 3444, 2961, 1744, 1614, 1295, 1261, 1191, 1088 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3OD) 4.55 (1H, s, OH), 2.54 (2H, s, H-2), 2.35 (3H, s, CH_3 -14), 2.22 (3H, s, H-12), 2.18 (3H, s, H-13), 1.45 (6H, s, H-10 and 11); ^{13}C NMR (CD_3OD) 168.8 (C1), 148.8 (C8), 143.5 (C5), 128.2 (C4), 123.4 (C7), 121.8 (C6), 118.9 (C9), 46.1 (C2), 35.4 (C3), 27.7 (C10 and 11), 14.4 (C14), 12.5 (C12), 12.2 (C13); HRMS m/z calc mass for $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_3$ 257.1154 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, found 257.1164 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

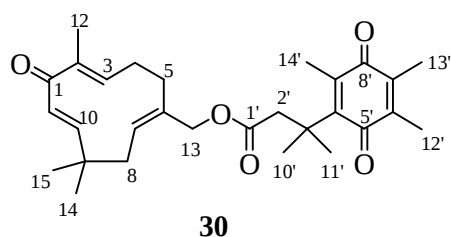


Quinonepropanoic acid (26). Yield 1.65 g, 85%) as a yellow solid, mp 93-95°C. IR ν_{max} 3028, 2971, 1706, 1645, 1286, 1225 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3OD) 3.01 (2H, s, H-2), 2.14 (3H, s, H-

14), 1.95 (3H, s, H-13), 1.92 (3H, s, H-12), 1.43 (6H, s, H-10 and 11); ^{13}C NMR (CD_3OD) 190.8 (C5), 187.4 (C8), 177.9 (C1), 151.9 (C4), 142.9 (C7), 139.0 (C9), 138.4 (C6), 47.1 (C2), 37.9 (C3), 28.8 (C10 and 11), 14.3 (C14), 12.5 (C12), 12.1 (C13); HRMS m/z calc mass for $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$ 273.1103 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, found 273.1103 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.



Amide 29. Yellow oil, 59% yield, $R_f = 0.68$ (10% EtOAc/ CH_2Cl_2); IR ν_{max} 3371, 2931, 1644, 1524, 1450, 1372, 1267, 1225, 1153, 1098, 1046, 1001 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) 6.33 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-11), 6.13 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-10), 5.36 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, -NH), 5.07 (1H, dd, $J = 4.2, 12.0$ Hz, H-7), 4.37 (1H, br t, H-3), 2.92 (1H, d, $J = 14.6$ Hz, H-2'a), 2.83 (1H, dq, $J = 2.6, 6.7$ Hz, H-2), 2.71 (1H, d, $J = 14.6$ Hz, H-2'b), 2.22 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-8a), 2.17 (3H, s, H-14'), 1.96 (3H, s, H-12'), 1.95 (3H, s, H-13'), 1.91 (1H, m, H-5a), 1.85 (1H, d, $J = 4.2$ Hz, H-8b), 1.61 (1H, s, H-5b), 1.45 (6H, s, H-10' and 11'), 1.37 (3H, s, H-13), 1.16 (3H, s, H-14), 1.15 (3H, s, H-15), 1.04 (1H, m, H-4a), 0.97 (1H, m, H-4b), 0.86 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-12); ^{13}C NMR (CDCl_3) 201.8 (C1), 191.5 (C5'), 187.4 (C8'), 171.7 (C1'), 152.7 (C4'), 151.8 (C10), 143.1 (C7'), 138.8 (C9'), 138.3 (C6'), 136.5 (C6), 128.4 (C11), 123.2 (C7), 50.6 (C3), 50.5 (C2), 49.1 (C2'), 41.5 (C8), 39.9 (C9), 38.7 (C3'), 36.9 (C5), 29.5 (C10'), 29.4 (C11'), 28.9 (C14 or 15), 27.8 (C4), 23.1 (C15 or 14), 16.4 (C13), 14.1 (C14'), 12.5 (C12'), 12.0 (C13'), 6.7 (C12); HRMS m/z calc mass for $\text{C}_{29}\text{H}_{41}\text{NO}_4$ 468.3114 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found 468.3111.



Ester 30. Yellow oil, 45% yield, $R_f = 0.66$ (10% EtOAc/ CH_2Cl_2); IR ν_{max} 2927, 1726, 1644, 1436, 1371, 1268, 1190 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) 5.99 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-10), 5.95 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-11), 5.75 (1H, dd, $J = 16.4, 2.1$ Hz, H-3), 5.41 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-7), 4.56 (1H, br s, H-8a), 4.30 (1H, br s, H-8b), 2.98 (2H, s, H-2'), 2.51 (2H, br s, H-13), 2.14 (3H, s, H-14'),

1.95 (6H, s, H-12' and 13'), 1.89 (2H, br s, H-4), 1.77 (3H, s, H-12), 1.62 (2H, s, H-5), 1.43 (3H, s, H-10'), 1.42 (3H, s, H-11'), 1.21 (3H, s, H-14 or 15), 1.05 (3H, s, H-15 or 14); ^{13}C NMR (CDCl_3) 203.7 (C1), 190.7 (C5'), 187.4 (C8'), 172.6 (C1'), 159.7 (C3), 152.2 (C4'), 149.0 (C11), 142.9 (C7'), 138.9 (C9'), 138.5 (C2), 138.4 (C6'), 134.3 (C6), 131.1 (C7), 127.3 (C10), 60.6 (C8), 47.7 (C2'), 42.2 (C4), 38.2 (C3'), 37.3 (C9), 35.4 (C13), 29.2 (C14 or 15), 28.8 (C-10' and 11'), 24.5 (C5), 24.0 (C15 or 14), 14.3 (C14'), 12.6 (C12'), 12.1 (C13'), 12.0 (C12); HRMS m/z calc mass for $\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{O}_5$ 489.2617 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, found 489.2613.

ผลงานวิจัย

1. Uraiwan Songsiang, Siripit Pitchuanchom, Chantana Boonyarat, Chariya Hahnvajanawong, Chavi Yenjai. Cytotoxicity against cholangiocarcinoma cell lines of zerumbone derivatives, European Journal of Medicinal Chemistry, 2010, in press, impact factor 3.269.
2. Uraiwan Songsiang, Chavi Yenjai, Chariya Hahnvajanawong, Chanokbhorn Phaosiri. Structural Modification of zerumbone from *Zingiber zerumbet* Smith and their biological activities. The preceeding of The PERCH-CIC Congress VI, Jomtien Plam Beach Hotel & Resort , Pattaya Chonburi, Thailand, 3-6 May 2009, 258.
3. Siripit Pitchuanchom, Chavi Yenjai, Natthida Weerapreeyakul. Synthesis of bioreductive esters from zerumbone derivatives. The proceeding of Pure and Applied Chemistry International Conference, Naresuan University, Thailand, 2009, 394-396.
4. Uraiwan Songsiang, Chavi Yenjai, Sineenat Siri, Cytotoxicity of zerumbone and its derivatives. The proceeding of Pure and Applied Chemistry International Conference, Naresuan University, Thailand, 2009, 440-442.



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

Original article

Cytotoxicity against cholangiocarcinoma cell lines of zerumbone derivatives

Uraivan Songsiang^a, Siripit Pitchuanchom^a, Chantana Boonyarat^b, Chariya Hahnvajjanawong^c, Chavi Yenjai^{a,*}^a Natural Products Research Unit, Center for Innovation in Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand^b Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand^c Department of Microbiology, Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 January 2010

Received in revised form

6 May 2010

Accepted 12 May 2010

Available online xxx

Keywords:

Zingiber zerumbet Smith

Zerumbone

Sesquiterpene

Cholangiocarcinoma

Cytotoxicity

Docking

ABSTRACT

Cholangiocarcinoma (CCA) is an aggressive malignancy with a very high morbidity and mortality for which an effective treatment is lacking. In this study, seventeen zerumbone derivatives were synthesized and evaluated for in vitro cytotoxicity against cholangiocarcinoma cell lines. **5** showed the most potent antiproliferative activity against KKU-100 cell line with an IC₅₀ value of 16.44 μ M. To investigate the potential molecular target of the most active compound, the docking was performed using different enzymes and receptor proteins including CDK-2, CDK-5, EGFR, and GSK-3. The docking results revealed that **5** exhibited better binding interaction to EGFR than CDK-2, CDK-5 and GSK-3. All results indicate that **5** should be a promising candidate for treatment of cancer.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Cholangiocarcinoma (CCA) is a primary cancer of the bile duct epithelial cells. It is one of the most serious and highest incidence diseases in the northeast of Thailand where the prevalence of *Opisthorchis viverrini* (OV) infection is high [1]. An increasing trend of CCA incidence has been reported in several countries in the world [2]. This tumor continues to be associated with poor prognosis [1]. At present, surgical resection is the best treatment available and is a potentially curative therapy for CCA. However, more than half CCA patients present with advanced, unresectable malignancy. In addition, the response of CCA to chemotherapy and radiotherapy is relatively poor [3]. At present, there is no effective chemotherapy regimen for treating patients with advanced cholangiocarcinoma. Therefore, novel and effective therapeutic agents and more effective medical treatment options are urgently needed.

Much attention has been focused on the targeted medical therapy. Recently, the status and future perspectives of anti-angiogenic and growth factor receptor-based pharmacological approaches for the treatment of biliary tract cancer have been reported. Among the cellular molecules, the epidermal growth

factor receptor (EGFR) and protein kinases are found to play an important role in cell cycle progression, cell proliferation and induction of apoptosis [4].

Medicinal plants which also show promising effects in treatment of cancers are now attracting great attention in the world. The rhizomes of *Zingiber zerumbet* Smith are employed as traditional medicine in relieving stomach ache, as a diuretic, and when macerated in alcohol are regarded as a tonic and depurative. Moreover, it is also used as the spice ginger and a novel food factor for mitigating experimental ulcerative colitis [5].

Zerumbone, a crystalline sesquiterpene, is the major component in the rhizomes of this plant and is readily available from a widespread natural source. It contains three double bonds; an isolated one at C6 and two double bonds at C2 and C10 which are part of a cross conjugated dienone system. It was found that the C2 double bond appears least hindered due to being furthest from the *gem* dimethyl substituents at C9. It has been reported that the X-ray structure shows that the dienone system lies in a slightly distorted plane which is perpendicular to that of the isolated double bond [6].

Zerumbone has been studied for various biological activities because it acts to suppress tumor promoters [7] and to inhibit the growth of a human leukemia cell line [8]. It is also antiproliferative and an anti-platelet activating factor [9,10], and has anti HIV activities [11]. Thus, it is expected that the zerumbone derivatives

* Corresponding author. Tel.: +66 43 202222x12243; fax: +66 43 202373.

E-mail address: chayen@kku.ac.th (C. Yenjai).

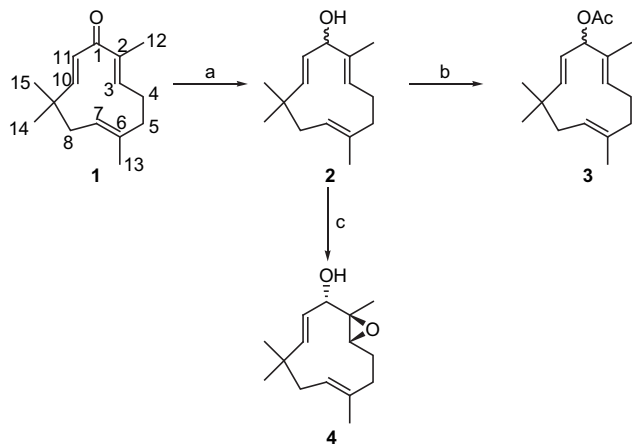
might show useful biological activities, especially cytotoxicity against CCA cell lines.

Kitayama and coworkers [12–15] have reported the isolation and structural transformation of zerumbone as well as the regio- and stereochemistry of its derivatives. Due to this chemical information and as part of our research program on anti-tumor drugs from natural products, we planned to synthesize known and new derivatives of zerumbone and evaluate them for *in vitro* cytotoxicity against CCA cell lines including KKU-100 (poorly-differentiated adenocarcinoma), KKU-M139 (squamous cell carcinoma), KKU-M156 (moderately-differentiated adenocarcinoma), KKU-M213 (adenosquamous carcinoma) and KKU-M214 (moderately-differentiated adenocarcinoma) cell lines [16]. It is expected that this work will find potent compounds for the development of anti-CCA agents. In addition, to understanding the mode of reaction, the interaction between the most active compound and the enzymes or receptor proteins involved with cell cycle and cell growth was studied using molecular modeling techniques.

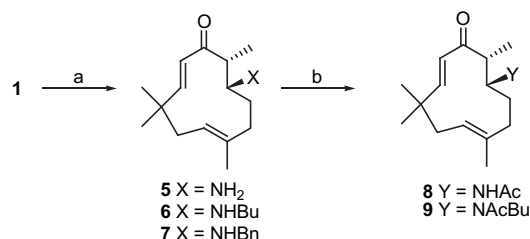
2. Results and discussion

2.1. Chemistry

Seventeen zerumbone derivatives were successfully prepared using organic reactions. Reduction of zerumbone (**1**) using LiAlH_4 at 0 °C gave crystalline ($\pm$) zerumbol (**2**) [12]. Acetylation of this compound using Ac_2O /pyridine afforded **3** while epoxidation of **2** with *m*CPBA yielded racemic **4** (Scheme 1). The relative stereochemistry of hydroxyl and epoxide groups was *trans* configuration. Zerumbone was stirred with excess ammonia, butylamine and benzylamine at room temperature to provide monoamines **5**, **6** and **7**, respectively. This conjugated amination yielded a single diastereomer as relatively *trans* configuration adducts of each monoamine (Scheme 2). As in a previous report [13], no diamine and no another diastereomer of products was observed. Michael addition of amines occurred selectively at the less hindered conjugated double bond (C2–C3) of zerumbone. Acetylation of amine groups at C3 position of **5** and **6** using Ac_2O /pyridine at 0 °C provided the corresponding amides **8** and **9**, respectively. The reaction of butylamine **6** with NaBH_4 afforded hydroxyamine **10** as a single diastereoisomer in 81% yield. The reduction of amide **8** with NaBH_4 at 0 °C afforded a single diastereoisomer hydroxyamide **11** in the yield of 54%. The NOESY experiment showed the correlation of protons at C1 and C2 which indicated the relatively *cis* orientation of these positions (Scheme 3).



Scheme 1. Reagents and conditions: (a) LiAlH_4 , THF, 0 °C, 1 h, 88%; (b) Ac_2O , pyridine, reflux, 30 min, 74%; (c) *m*CPBA, EtOAc, rt, 24 h, 15%. **Note:** The stereochemistry shown in all schemes are relative configuration.



Scheme 2. Reagents and conditions: (a) NH_3 or BuNH_2 or BnNH_2 , MeCN, rt, 5 days, 56% (**5**), 93% (**6**), 68% (**7**); (b) Ac_2O , pyridine, 0 °C, 8 h, 92% (**8**), 85% (**9**).

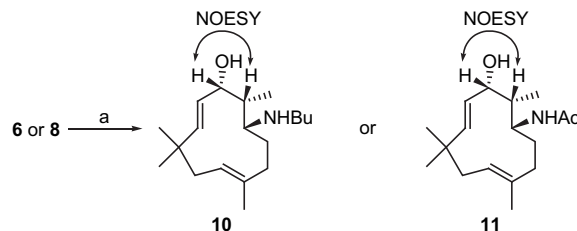
Epoxidation of the isolated double bond in zerumbone at C6 and C7 using *m*CPBA provided epoxide **12** in 97% yield [13]. This formation has high regioselectivity due to the high electron density and the less steric double bond. The epoxide **12** was further treated with an excess amount of various amines at room temperature providing corresponding amines **13–15**. As in the reaction of zerumbone, conjugate additions occurred at the C3 position and no nucleophilic addition of the remaining double bond (C10) was observed. As in a previous report, these amino derivatives were obtained as relatively *trans* configuration on C2 and C3. The relative orientation of the amino groups and epoxide oxygen showed that amination occurred on the same face of the epoxide. The reason for this observation was the steric repulsion of the two methyl groups at C2 and C6 of **12** which are located on one face of the ring while the oxide oxygen lies on the opposite face [14]. Further acetylation of **13** using Ac_2O in pyridine gave corresponding amide **16** in 66% yield (Scheme 4).

In contrast to the reaction of **1** with various amines, the excess KCN reacted with zerumbone at 40 °C for 3 days provided conjugate addition of cyanide ion at both C3 and C10 double bonds [15]. A mixture of four diastereoisomeric dicyano derivatives **17** was obtained. It was reported that in the major diastereoisomer (**17a**), two cyano groups were located on the same face of the ring while the two methyl groups at C2 and C6 lie on the opposite face (Scheme 5) [15].

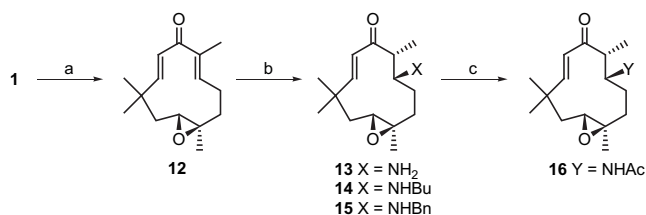
After treatment of **1** with dimethylamine in the presence of acetonitrile at room temperature, followed by stirring with excess KCN at 15 °C, the nitrile derivative **20** was detected [13]. This can be explained as that conjugate addition of dimethylamine at C3 gave intermediate **18**, while conjugate addition of the cyanide ion at C10 yielded intermediate **19**. After the easy elimination of the dimethylamino group, cyano **20** was observed as a sole product (Scheme 6). The ^1H NMR spectrum showed an olefinic proton at δ 5.95–6.50 (H3) and a singlet signal at δ 1.79 (CH_3 -12) which indicates the presence of α,β -unsaturated ketone at C2 and C3. Two doublet signals of olefinic protons at H10 and H11 disappeared.

2.2. Biological activity [17]

Zerumbone (**1**) and its derivatives (**2–17** and **20**) were tested for their cytotoxicity against CCA cell lines; KKU-100, KKU-M139,



Scheme 3. Reagents and conditions: (a) NaBH_4 , MeOH, 0 °C, 3 h, 81% (**10**), 54% (**11**).



Scheme 4. Reagents and conditions: (a) *m*CPBA, EtOAc, rt, 24 h, 97%; (b) NH₃ or BuNH₂ or BnNH₂, MeCN, rt, 5 days, 51% (**13**), 15% (**14**), 18% (**15**); (c) Ac₂O, pyridine, 0 °C, 10 h, 66%.

KKU-M156, KKU-M213 and KKU-M214 and their activities are shown in Table 1. Among these cell lines, KKU-100 was the least sensitive cell line which showed the highest IC₅₀ value of 25.21 μM to ellipticine. It was found that zerumbone and alcohol derivatives showed no cytotoxic activity against all cell lines. Fortunately, primary amine **5** exhibited cytotoxic activity against KKU-100 cell line with an IC₅₀ value of 16.44 μM which is about 1.5-fold higher toxicity than the ellipticine standard (IC₅₀ = 25.21 μM). This compound also showed cytotoxicity against KKU-M139, KKU-M156, KKU-M213 and KKU-M214 cell lines with IC₅₀ values ranging from 51 to 69 μM. Butylamine **6** possessed cytotoxicity against KKU-M213 and KKU-M214 cell lines with IC₅₀ values of 36.61 and 41.55 μM, respectively. In contrast, benzylamine **7** showed no cytotoxicity against these five cell lines. It is interesting to note that the more polar primary amine **5** may play an important role in cytotoxicity.

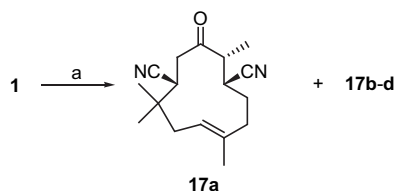
Zerumbol (**2**) showed no cytotoxicity against all CCA cell lines. But, when hydroxyamine **10** was synthesized and evaluated for cytotoxicity, it was found that this derivative displayed interesting results by showing cytotoxic activity against all cell lines with IC₅₀ values ranging from 16 to 35 μM.

Epoxide **12** demonstrated weak cytotoxicity to KKU-M214 cell line with an IC₅₀ value of 52.61 μM. From the cytotoxicity results of amine **5** and epoxide **12**, we hoped that epoxyamine **13** would exhibit good results on cytotoxicity testing. However, this compound displayed strong cytotoxicity only to the KKU-M214 cell line with an IC₅₀ value of 18.30 μM. Epoxyamine **14** displayed good results to KKU-100 cell line by showing an IC₅₀ value of 16.52 μM. In addition, this compound exhibited activity with IC₅₀ values of 48.20, 37.63 and 51.00 μM against KKU-M156, KKU-M213 and KKU-M214, respectively.

Compound **20** showed strong cytotoxicity against the least sensitive cell line (KKU-100) with an IC₅₀ value of 25.72 μM which is nearly equal to the ellipticine standard. This derivative also displayed moderate cytotoxicity against the other cell lines with IC₅₀ values ranging from 37 to 56 μM. It was suggested that the nitrile group at the C10 position was favorable for CCA cell lines. All results show convincingly that amine, hydroxylamine, epoxyamine and nitrile groups are essential for cytotoxicity.

2.3. Molecular modeling simulation

From the results of the bioactivity testing, **5** containing an amine group exhibits the most potent antiproliferative activity, especially



Scheme 5. Reagents and conditions: (a) excess KCN, MeCN-H₂O, 40 °C, 3 days, 42% (**17a**).

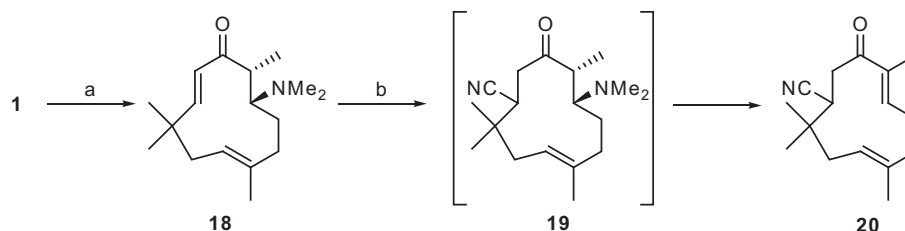
against KKU-100 cell line. In order to understand the modes of action of **5**, molecular modeling based on the docking approach was used to find possible targets of cholangiocarcinoma activity. Excessive activity of cyclin-dependent kinases (CDKs) has been observed as one of the mechanisms underlying pathological hyperproliferation [18]. Consequently, inhibition of CDKs could be a therapeutic option for treatment of cancer [19]. In addition, since the epidermal growth factor receptor (EGFR) is found to play an important role in cell cycle progression, cell proliferation and induction of apoptosis, it has become an important target in cancer therapy [20]. In cholangiocarcinoma cells, the expression of CDK-2, CDK-5 and EGFR in tumor tissues were found in both Thai intra-hepatic cholangiocarcinoma (ICCs) and Japanese ICCs. Several reports indicate that the EGFR is frequently overexpressed in CCA [21]. Therefore, inhibition of CDK-2, CDK-5 or EGFR could provide control of the cell proliferation of certain cancers. Moreover, the expression of GSK-3β which plays an important in regulation of tumor cell proliferation through the activation of the Wnt/β-catenin pathway was found in 16/20 (80%) of Thai ICCs and in 16/20 (80%) of Japanese ICCs [22]. Therefore, in the course of our molecular modeling, we selected CDK-2, CDK-5, EGFR and GSK-3 for the elucidation of the possible characteristics of zerumbone derivatives in cholangiocarcinoma cells. The template of each protein target was constructed and validated by redocking with the native ligand. The chemical structures of these ligands are shown in Table 2 which summarizes the data and source of these structures [23–26]. The 3D-configuration of four inhibitors obtained from redocking with the developed protein templates were compared with the crystallographic poses. The results showed a good match of the docked and the crystallographic binding orientation with RMSD of less than 2.0 Å (Table 3). The validation results show that the constructed template is a good model system for predicting ligand binding orientation and binding affinity.

The docking results using AutoDock 4 indicate that **5** interacted with CDK-2 through the 2 H-bond at Asp145 with binding energy of −6.18 kcal/mol. In contrast, for CDK-5 and GSK-3 complexes it is seen that hydrogen bonds were not formed (Table 4).

The best binding interactions of **5** was formed in the complex with EGFR with the lowest binding energy of −7.24 kcal/mol. The binding energy of zerumbone, which showed no cytotoxic activity against KKU-100 at 75 μM, with EGFR was also calculated. The docking result showed that the binding energy of zerumbone was higher than the standard known inhibitor with the binding energy of −6.22 kcal/mol, as a result, the affinity of zerumbone decrease. Thus, zerumbone showed no antiproliferation activity at 75 μM. These patterns correlated with antiproliferative activities. For the binding mode of compound **5**, the core structure, sesquiterpene, is tightly bound to the pocket binding site with a hydrophobic interaction. The oxygen atom of the carbonyl group in **5** forms a hydrogen bond with the H–N of Lys721 (bond length 1.9 Å). The interaction between the primary amine and the oxygen atom of the Asp831 residue has a 1.7 Å bond length (Fig. 1). The docking result suggests that **5** might inhibit the proliferation of cancer via EGFR inhibition.

3. Conclusion

A series of zerumbone derivatives were synthesized and their in vitro cytotoxicity against cholangiocarcinoma cell lines were evaluated. Compounds **5**, **10**, **14** and **20** exhibited cytotoxic activity against all CCA cell lines to different extents, indicating their broad spectrum of anti-CCA effects. Our results indicate that these five CCA cell lines, with different histological types, respond differently to different compounds. This may be due to the variation in functional groups present in the compounds. The chemical structure



Scheme 6. Reagents and conditions: (a) Me_2NH , MeCN, rt, 5 days; (b) KCN, MeCN- H_2O , 15 °C, 2 days, 30% in two steps.

diversity of the four compounds reflects the biological activities. The presence of amine (**5**), hydroxylamine (**10**), epoxyamine (**14**), and nitrile (**20**) groups is believed to play an important role in potent anticancer activities. Among the tested compounds, **5**, which contained an amine group, exhibited higher potency. The docking result indicates that **5** may inhibit the proliferation of cancer through EGFR inhibition. This preliminary investigation is a good basis for further medicinal chemistry study.

4. Experimental

4.1. General

NMR spectra were recorded on a Varian Mercury plus spectrometer operating at 400 MHz (^1H) and at 100 MHz (^{13}C). IR spectra were recorded as KBr disks or thin films, using Perkin Elmer Spectrum One FT-IR spectrophotometer. Mass spectra were determined on Micromass Q-TOF 2 hybrid quadrupole time-of-flight (Q-TOF) mass spectrometer with a Z-spray ES source (Micromass, Manchester, UK). Melting points were determined on a SANYO Gallenkamp melting point apparatus and were uncorrected. Thin layer chromatography (TLC) was carried out on MERCK silica gel 60 F₂₅₄ TLC aluminum sheet. Column chromatography was done with silica gel 0.063–0.200 mm or less than 0.063 mm. Preparative layer chromatography (PLC) was carried out on glass supported silica gel plates using silica gel 60 PF₂₅₄ for preparative layer chromatography. All solvents were routinely distilled prior to use.

4.2. Extraction and purification of zerumbone (**1**)

Dried rhizomes of *Z. zerumbet* Smith (4.0 kg) were ground into powder and then extracted with EtOAc (3×5 L) at room temperature. Removal of solvent under reduced pressure gave crude EtOAc extract (32.8 g) which was further subjected to column chromatography (CC) on silica gel 60 (500 g) and subsequently eluted with three solvents (hexane, EtOAc and MeOH) by gradually increasing

polarity of elution solvents system. The eluents were collected and monitored by TLC resulting in 15 fractions (F_1 – F_{15}). The solid in F_6 was separated by filtration, recrystallized from CH_2Cl_2 -hexane to afford zerumbone (**1**, 15.0 g).

4.3. Preparation of zerumbone derivatives

4.3.1. Preparation of zerumbol (**2**)

To a solution of compound **1** (503 mg, 2.30 mmol) in dry THF (5.0 mL) was added LiAlH_4 (348 mg, 9.2 mmol) at 0 °C and the solution was stirred for 1 h. The reaction mixture was quenched with 10% HCl (10 mL) and extracted with EtOAc (3 times). The organic layer was combined, washed with water, brine, dried over anhydrous Na_2SO_4 and evaporated to dryness. Purification of crude oil by column chromatography (silica gel, 10% EtOAc:hexane) gave a white solid of compound **2**.

4.3.2. ($\pm$)-(2E,6E,10E)-2,6,9,9-tetramethylcycloundeca-2,6,10-trienol (**2**)

Yield 447 mg, 88%; mp 72–73 °C; IR ν_{max} 3290, 2955, 1445, 1297, 1076, 969 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 5.56 (1H, dd, $J = 16.1, 7.2$ Hz, H-11), 5.25 (1H, d, $J = 16.1$ Hz, H-10), 5.22 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-3), 4.83 (1H, dd, $J = 10.1, 4.0$ Hz, H-7), 4.63 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1), 2.16–2.24 (1H, m, H-4), 2.04–2.14 (3H, m, H-4 and 2H-5), 2.01 (1H, dd, $J = 13.7, 2.8$ Hz, H-8), 1.80 (1H, dd, $J = 13.7, 3.8$ Hz, H-8), 1.67 (3H, s, CH_3 -12), 1.44 (3H, s, CH_3 -13), 1.08 (3H, s, CH_3 -14 or 15), 1.06 (3H, s, CH_3 -15 or 14); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 141.8 (C2), 139.3 (C10), 133.0 (C6), 131.3 (C11), 124.9 (C7), 124.8 (C3), 78.6 (C1), 41.9 (C8), 39.1 (C5), 37.1 (C9), 29.4 (CH_3 -14 or 15), 24.2 (CH_3 -15 or 14), 22.9 (C4), 15.0 (CH_3 -13), 12.7 (CH_3 -12); HRMS m/z calcd mass for $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$ 243.1725 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, found 243.1725.

4.3.3. Preparation of compound **3**

Compound **2** (35 mg, 0.16 mmol) was refluxed with acetic anhydride (1.0 mL) in the presence of pyridine (1.0 mL) for 30 min. The water was added and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 (3

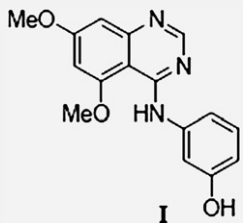
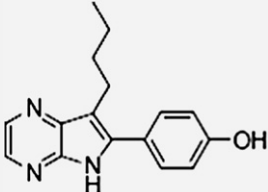
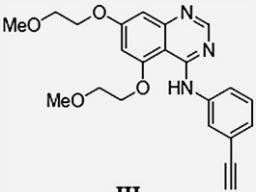
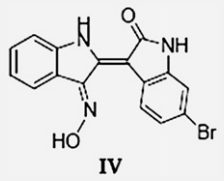
Table 1
Cytotoxicity of all compounds against cholangiocarcinoma cell lines.^a

Compound	$\text{IC}_{50}(\mu\text{M})$				
	KKU-100	KKU-M139	KKU-M156	KKU-M213	KKU-M214
Zerumbone	NR	NR	NR	NR	NR
5	16.44 $\pm$ 0.59	63.26 $\pm$ 5.48	69.04 $\pm$ 5.40	51.88 $\pm$ 2.25	59.65 $\pm$ 7.39
6	NR	NR	NR	36.61 $\pm$ 0.65	41.55 $\pm$ 0.58
10	35.33 $\pm$ 5.89	19.63 $\pm$ 1.26	26.34 $\pm$ 4.0	27.19 $\pm$ 1.29	16.05 $\pm$ 6.06
12	NR	NR	NR	NR	52.61 $\pm$ 3.88
13	NR	NR	NR	NR	18.30 $\pm$ 0.39
14	16.52 $\pm$ 0.84	NR	48.20 $\pm$ 1.85	37.63 $\pm$ 2.4	51.00 $\pm$ 0.78
17a–d	NR	NR	NR	NR	66.52 $\pm$ 3.63
20	25.72 $\pm$ 2.60	55.88 $\pm$ 4.4	37.30 $\pm$ 3.58	45.12 $\pm$ 0.89	54.50 $\pm$ 1.5
Other	NR	NR	NR	NR	NR
Ellipticine	25.21 $\pm$ 0.2	4.5 $\pm$ 0.28	9.34 $\pm$ 1.66	1.62 $\pm$ 0.08	1.01 $\pm$ 0.02

NR = no response at $> 75 \mu\text{M}$.

^a Data shown are from triplicate experiments.

Table 2
Crystal ligand structures used in this study.

Ligand	PDB	Resolution Å
 I	1DI8	2.20
 II	1UNG	2.30
 III	1M17	2.60
 IV	1UV5	2.80

times). The organic layer was combined, washed with water, brine and dried over anhydrous Na_2SO_4 . Evaporation of solvent gave a crude oil, which was purified by PLC (40% CH_2Cl_2 :Hexane) to give a white solid of compound **3**.

4.3.4. ($\pm$)-(2*E*,6*E*,10*E*)-2,6,9,9-tetramethylcycloundeca-2,6,10-trienyl acetate (**3**)

Yield 31 mg, 74%; mp 70–71 °C; IR ν_{max} 2955, 1737, 1368, 1240 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 5.54 (1H, dd, J = 15.8, 7.4 Hz, H-11), 5.48 (1H, d, J = 7.4 Hz, H-1), 5.31 (1H, d, J = 15.8 Hz, H-10), 5.26 (1H, t, J = 7.7 Hz, H-3), 4.84 (1H, dd, J = 10.6, 4.2 Hz, H-7), 2.12–2.20 (3H, m, 2H-4 and H-8), 2.02–2.10 (2H, m, H-5), 2.06 (3H, s, CH_3 of OAc), 1.78–1.84 (1H, m, H-8), 1.64 (3H, s, CH_3 -12), 1.45 (3H, s, CH_3 -13),

Table 3
Docking of crystal inhibitors.

Ligand	Macromolecule	Members in the highest cluster	E_{binding} (kcal/mol)	RMSD from crystal orientation (Å)
I	CDK-2	87	−7.32	0.71
II	CDK-5	93	−6.53	0.92
III	EGFR	67	−7.69	1.67
IV	GSK-3	150	−9.14	0.56

Table 4
Geometric filters for training set of compound **5**.

Kinase targets	Number of H-bond	Geometric filters			E_{binding} (kcal/mol)
		Amino acid residue	H-bonding atom	Distance (Å)	
CDK-2	2	Asp145	O (C=O)	2.211	−6.18
		Asp145	N (NH_2)	2.161	
CDK-5	0	—	—	—	−6.06
EGFR	2	Lys721	O (C=O)	1.951	−7.24
		Asp831	N (NH_2)	1.718	
GSK-3	0	—	—	—	−5.48

1.08 (3H, s, CH_3 -14 or 15), 1.07 (3H, s, CH_3 -15 or 14); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 170.4 (C=O of OAc), 140.8 (C2), 138.7 (C6), 133.2 (C11), 127.7 (C7), 127.1 (C10), 124.7 (C3), 79.9 (C1), 41.1 (C8), 39.2 (C5), 37.3 (C9), 29.5 (CH_3 -14 or 15), 23.8 (CH_3 -15 or 14), 23.0 (C4), 21.2 (CH_3 of OAc), 15.0 (CH_3 -13), 13.2 (CH_3 -12); HRMS m/z calcd mass for $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_2$ 285.1825 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, found 285.1835.

4.3.5. Preparation of compound **4**

To a solution of compound **2** (39 mg, 0.18 mmol) in EtOAc (0.5 ml) was added *m*CPBA (37.4 mg, 0.22 mmol) at 0 °C. The solution was stirred for 1 h and then allowed to warm at room temperature for 24 h. The water was added and the mixture was extracted with EtOAc (3 times). The organic layer was combined, washed with water, brine and dried over anhydrous Na_2SO_4 . Evaporation of solvent gave a crude oil, which was purified by PLC (25% EtOAc:hexane) to give a white solid of **4**.

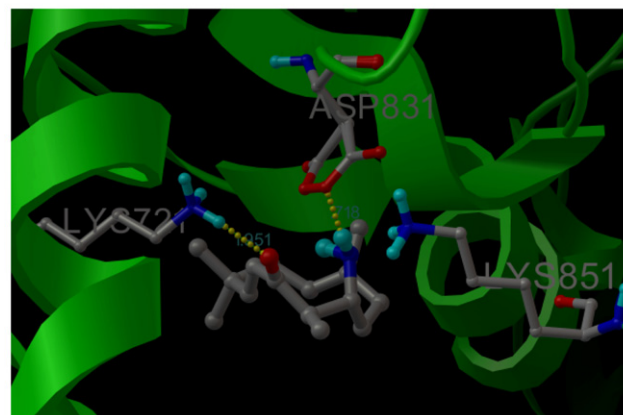
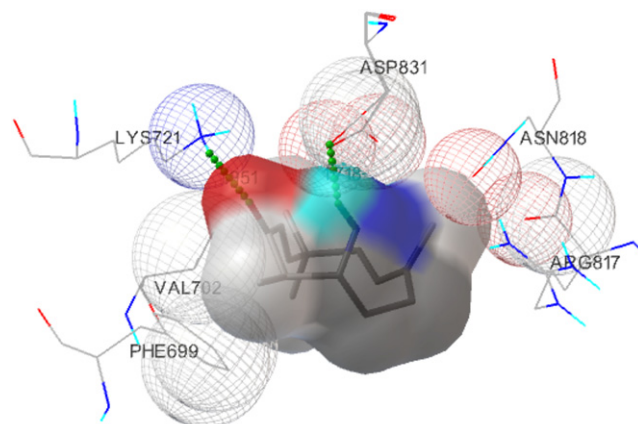


Fig. 1. Binding orientation of compound **5** on EGFR kinase.

4.3.6. ($\pm$)-[6E,10E]-2,3-epoxy-2,6,9,9-tetramethylcycloundeca-6,10-dienol (**4**)

Yield 41 mg, 15%; mp 84–85 °C; IR $\nu_{\max}$ 3418, 2959, 1388, 1268, 1059 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 5.30 (1H, dd, J = 16.0, 6.9 Hz, H-11), 5.23 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-10), 4.95 (1H, dd, J = 10.7, 3.7 Hz, H-7), 3.57 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-1), 2.46 (1H, dd, J = 9.9, 4.3 Hz, H-3), 2.20–2.32 (2H, m, H-4 and H-5), 2.00–2.12 (2H, m, H-5 and H-8), 1.82 (1H, br d, J = 13.7 Hz, H-8), 1.55 (3H, s, CH₃-13), 1.36–1.44 (1H, m, H-4), 1.32 (3H, s, CH₃-12), 1.12 (3H, s, CH₃-14 or 15), 1.08 (3H, s, CH₃-15 or 14); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 142.7 (C10), 132.0 (C6), 125.7 (C7), 125.2 (C11), 81.6 (C1), 65.6 (C2), 60.5 (C3), 40.2 (C8), 36.4 (C9), 36.1 (C5), 30.9 (CH₃-14 or 15), 29.8 (CH₃-15 or 14), 24.5 (C4), 15.0 (CH₃-13), 10.6 (CH₃-12); HRMS m/z calcd mass for C₁₅H₂₄O₂ 237.1849 [M + H]⁺, found 237.1848.

4.3.7. Preparation of amines **5**, **6** and **7**

A mixture of compound **1** (50 mg, 0.23 mmol) in MeCN (1.0 mL) and ammonia (30% in water, 2.0 mL) was stirred for 5 days at room temperature. The solution was concentrated on a rotary evaporator under reduced pressure. The water was added and the mixture was extracted with EtOAc (3 times). The organic layer was combined, washed with water, brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. Evaporation of solvent gave a crude oil, which was purified by PLC (10% MeOH:EtOAc) to give a white solid of compound **5**. The reaction of compound **1** with *n*-butylamine or benzylamine (excess, 4.0 mL) gave a yellow oil of **6** and a white solid of **7**, respectively.

4.3.8. ($\pm$)-[6E,10E]-3-amino-2,6,9,9-tetramethylcycloundeca-6,10-dienone (**5**)

Yield 32 mg, 56%; mp 90–91 °C; IR $\nu_{\max}$ 3373, 3304, 1677, 1625, 1451, 995 cm⁻¹; ¹H NMR (CD₃OD) δ 6.13 (1H, d, J = 16.1 Hz, H-10), 6.08 (1H, d, J = 16.1 Hz, H-11), 5.04 (1H, dd, J = 11.7, 4.4 Hz, H-7), 3.23–3.35 (1H, m, H-3), 2.65 (1H, dq, J = 6.6, 2.9 Hz, H-2), 2.20 (1H, t, J = 12.4 Hz, H-8), 1.98–2.06 (1H, m, H-5), 1.78–1.90 (2H, m, H-5 and H-8), 1.30 (3H, s, CH₃-13), 1.10 (3H, s, CH₃-14 or 15), 1.08 (3H, s, CH₃-15 or 14), 0.98–1.02 (2H, m, H-4), 0.90 (3H, d, J = 6.6 Hz, CH₃-12); ¹³C NMR (CD₃OD) δ 202.6 (C1), 152.5 (C10), 137.7 (C6), 127.8 (C11), 122.2 (C7), 54.4 (C2), 52.7 (C3), 41.2 (C8), 39.9 (C9), 37.7 (C5), 29.9 (C4), 28.7 (CH₃-14 or 15), 22.7 (CH₃-15 or 14), 16.2 (CH₃-13), 5.7 (CH₃-12).

4.3.9. ($\pm$)-[6E,10E]-3-butylamino-2,6,9,9-tetramethylcycloundeca-6,10-dienone (**6**)

Yield 62 mg, 93%; IR $\nu_{\max}$ 3332, 1693, 1674, 1626, 1455, 998 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 6.12 (1H, d, J = 16.1 Hz, H-10), 5.58 (1H, d, J = 16.1 Hz, H-11), 5.00 (1H, dd, J = 11.7, 4.6 Hz, H-7), 2.97–2.99 (1H, m, H-3), 2.84–2.92 (1H, m, H-2), 2.60–2.66 (1H, m, H-1'), 2.47–2.55 (1H, m, H-1'), 2.12 (1H, t, J = 12.3 Hz, H-8), 1.95–2.02 (1H, m, H-5), 1.78–1.81 (2H, m, H-5 and H-8), 1.40–1.50 (2H, m, H-2'), 1.25–1.33 (2H, m, H-3'), 1.28 (3H, s, CH₃-13), 1.10 (3H, s, CH₃-14 or 15), 1.08 (3H, s, CH₃-15 or 14), 0.90–1.00 (2H, m, H-4), 0.85 (3H, t, J = 7.3 Hz, H-4'), 0.80 (3H, d, J = 6.6 Hz, CH₃-12); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 203.2 (C1), 152.0 (C10), 138.1 (C6), 127.7 (C11), 122.0 (C7), 58.5 (C3), 48.6 (C2), 46.8 (C1'), 41.3 (C8), 40.0 (C9), 38.3 (C5), 31.9 (C2'), 28.8 (CH₃-14 or 15), 28.7 (C4), 22.7 (CH₃-15 or 14), 20.4 (C3'), 16.2 (CH₃-13), 13.9 (C4'), 5.9 (CH₃-12).

4.3.10. ($\pm$)-[6E,10E]-3-benzylamino-2,6,9,9-tetramethylcycloundeca-6,10-dienone (**7**)

Yield 51 mg, 68%; mp 80–82 °C; IR $\nu_{\max}$ 3421, 2922, 1687, 1624, 1042, 744, 701 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.26–7.60 (5H, m, Ar-H), 6.05 (1H, d, J = 16.1 Hz, H-10), 5.65 (1H, d, J = 16.1 Hz, H-11), 4.54 (1H, dd, J = 11.8, 4.2 Hz, H-7), 4.02 (1H, d, J = 13.6 Hz, H-1'), 3.77 (1H, d, J = 13.6 Hz, H-1'), 3.00 (1H, dq, J = 6.6, 2.7 Hz, H-2), 2.92

(1H, dd, J = 7.5, 2.7 Hz, H-3), 2.10 (1H, t, J = 12.3 Hz, H-8), 1.92–1.99 (1H, m, H-5), 1.61 (NH), 1.75 (1H, t, J = 12.0 Hz, H-5), 1.68 (1H, dd, J = 12.0, 4.5 Hz, H-8), 1.31 (3H, s, CH₃-13), 1.08 (3H, s, CH₃-14 or 15), 1.01–1.05 (1H, m, H-4), 0.96 (3H, d, J = 6.6 Hz, CH₃-12), 0.86–0.94 (1H, m, H-4), 0.77 (3H, s, CH₃-15 or 14); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 203.1 (C1), 151.4 (C10), 140.0 (C-Ar), 137.9 (C-Ar), 137.9 (C6), 128.6 (C-Ar), 128.4 (C-Ar), 127.9 (C11), 127.3 (C-Ar), 121.9 (C7), 56.0 (C3), 50.5 (C1'), 47.4 (C2), 41.3 (C8), 39.7 (C9), 37.5 (C5), 29.0 (CH₃-14 or 15), 28.9 (C4), 22.7 (CH₃-15 or 14), 16.4 (CH₃-13), 6.0 (CH₃-12); HRMS m/z calcd mass for C₂₂H₃₁NO 348.2303 [M + Na]⁺, found 348.2303.

4.3.11. Preparation of compounds **8** and **9**

Compound **5** (or **6**) (0.34 mmol) reacted with acetic anhydride (1.0 mL) in the presence of pyridine (1.0 mL) at 0 °C for 8 h. The water was added and the mixture was extracted with EtOAc (3 times). The organic layer was combined, washed with water, brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. Evaporation of solvent gave a crude oil, which was purified by PLC (50% EtOAc:hexane) to give a white solid of **8** or a yellow solid of **9**, respectively.

4.3.12. ($\pm$)-[6E,10E]-3-(*N*-Acetylamino)-2,6,9,9-tetramethylcycloundeca-6,10-dienone (**8**)

Yield 92 mg, 92%; mp 199–200 °C; IR $\nu_{\max}$ 3300, 1694, 1633, 1547 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 6.40 (1H, d, J = 16.2 Hz, H-11), 6.14 (1H, d, J = 16.2 Hz, H-10), 5.15 (1H, dd, J = 11.7, 4.2 Hz, H-7), 4.47 (1H, br d, J = 8.3 Hz, H-3), 2.90 (1H, dq, J = 6.7, 2.6 Hz, H-2), 2.20 (1H, t, J = 12.3 Hz, H-8), 1.98 (3H, s, CH₃ of NHAc), 1.90–1.96 (1H, m, H-5), 1.85 (1H, dd, J = 13.0, 4.4 Hz, H-8), 1.70 (1H, t, J = 12.3 Hz, H-5), 1.36 (3H, s, CH₃-13), 1.19 (3H, s, CH₃-14 or 15), 1.13 (3H, s, CH₃-15 or 14), 0.95–1.00 (2H, m, H-4), 0.95 (3H, d, J = 6.7 Hz, CH₃-12); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 202.6 (C1), 170.7 (C=O of NHAc), 152.1 (C10), 136.5 (C6), 128.4 (C11), 123.2 (C7), 50.8 (C2), 50.7 (C3), 41.5 (C8), 40.0 (C9), 37.0 (C5), 28.8 (CH₃-14 or 15), 27.4 (C4), 22.9 (CH₃ of NHAc), 22.8 (CH₃-15 or 14), 16.3 (CH₃-13), 6.6 (CH₃-12); HRMS m/z calcd mass for C₁₇H₂₇NO₂ 300.1939 [M + Na]⁺, found 300.1939.

4.3.13. ($\pm$)-[6E,10E]-3-(*N*-Acetylbutylamino)-2,6,9,9-tetramethylcycloundeca-6,10-dienone (**9**)

Yield 97 mg, 85%; mp 72–73 °C; IR $\nu_{\max}$ 3554, 3476, 1693, 1619 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 6.62 (1H, d, J = 16.2 Hz, H-11), 6.16 (1H, d, J = 16.2 Hz, H-10), 5.14–5.20 (2H, m, H-3 and H-7), 3.28–3.60 (1H, m, H-1'), 3.14–3.23 (1H, m, H-1'), 2.80 (1H, dq, J = 6.7, 2.2 Hz, H-2), 2.22–2.32 (1H, m, H-8), 2.18 (3H, s, CH₃ of NHAc), 1.95 (1H, dd, J = 12.5, 6.5 Hz, H-5), 1.87 (1H, dd, J = 13.2, 4.3 Hz, H-8), 1.56–1.66 (2H, m, H-4 and H-5), 1.46–1.56 (2H, m, H-2'), 1.41 (3H, s, CH₃-13), 1.28–1.36 (2H, tq, J = 14.7, 7.3 Hz, H-3'), 1.26 (3H, s, CH₃-14 or 15), 1.15 (3H, s, CH₃-15 or 14), 0.99 (3H, d, J = 6.7 Hz, CH₃-12), 0.94 (3H, t, J = 7.3 Hz, H-4'), 0.80–0.90 (1H, m, H-4); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 202.5 (C1), 171.8 (C=O of NHAc), 151.7 (C10), 136.2 (C6), 128.8 (C11), 123.7 (C7), 54.1 (C3), 51.7 (C2), 45.9 (C1'), 41.7 (C8), 40.2 (C9), 37.1 (C5), 33.3 (C2'), 29.0 (CH₃-14 or 15), 23.1 (CH₃-15 or 14), 23.0 (C4), 22.3 (CH₃ of NHAc), 20.2 (C3'), 16.3 (CH₃-13), 13.7 (C4'), 8.3 (CH₃-12); HRMS m/z calcd mass for C₂₁H₃₅NO₂ 356.2565 [M + Na]⁺, found 356.2566.

4.3.14. Preparation of compounds **10** and **11**

To a solution of compound **6** (or **8**) (0.10 mmol) in MeOH (1.0 mL) was added NaBH₄ (0.15 mmol) at 0 °C and the solution was stirred for 3 h. The reaction mixture was quenched with 10% HCl (10 mL) and extracted with EtOAc (3 times). The organic layer was combined, washed with water, brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. Evaporation of solvent gave a crude oil, which was purified by PLC (100% EtOAc) to give a white solid of compound **10** (or **11**).

4.3.15. (±)-[6E,10E]-3-butylamino-2,6,9,9-tetramethylcycloundeca-6,10-dienol (**10**)

Yield 81%; IR $\nu_{\max}$ 3428, 2959, 1563, 1413, 1022 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 5.26 (1H, br d, J = 15.3 Hz, H-10), 4.98–5.10 (2H, m, H-7 and H-11), 3.98 (1H, br s, H-1), 2.58–2.70 (1H, m, H-3), 2.40–2.52 (2H, m, H-1'), 2.02–2.12 (1H, m, H-8), 1.80–1.94 (3H, m, H-2 and 2H-5), 1.68 (1H, t, J = 13.0 Hz, H-8), 1.54 (3H, s, CH_3 -13), 1.38–1.46 (2H, m, H-2'), 1.20–1.30 (4H, m, 2H-4 and 2H-3'), 1.00 (6H, s, 2 CH_3 -14, 15), 0.88 (3H, d, J = 6.9 Hz, CH_3 -12), 0.84 (3H, t, J = 7.2 Hz, H-4'); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 145.1 (C10), 140.2 (C6), 128.8 (C11), 128.4 (C7), 79.9 (C1), 60.2 (C3), 50.8 (C2), 44.4 (C1'), 44.1 (C8), 42.1 (C9), 39.0 (C5), 34.7 (C4), 31.9 (CH_3 -14 or 15), 29.4 (CH_3 -15 or 14), 27.8 (C2'), 24.3 (C3'), 23.0 (CH_3 -13), 17.6 (C4'), 11.7 (CH_3 -12); HRMS m/z calcd mass for $\text{C}_{19}\text{H}_{35}\text{NO}$ 294.2797 $[\text{M} + \text{H}]^+$, found 294.2798.

4.3.16. (±)-[6E,10E]-3-(N-Acetylamino)-2,6,9,9-tetramethylcycloundeca-6,10-dienol (**11**)

Yield 54%; mp 84–85 °C; IR $\nu_{\max}$ 3383, 1632, 1290, 1023, 978 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 5.23–5.36 (2H, m, H-10 and H-11), 5.13 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-7), 4.19–4.23 (1H, m, H-1), 2.88–2.91 (1H, m, H-3), 1.90–2.02 (2H, m, H-2 and H-8), 1.89 (3H, s, CH_3 of NHAc), 1.77–1.83 (1H, m, H-8), 1.58–1.63 (2H, m, H-5), 1.57 (3H, s, CH_3 -13), 1.11–1.28 (2H, m, H-4), 1.12 (3H, s, CH_3 -14 or 15), 1.03 (3H, s, CH_3 -15 or 14), 0.91 (3H, d, J = 7.3 Hz, CH_3 -12); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 170.4 (C=O of NHAc), 138.9 (C10), 136.2 (C6), 126.4 (C11), 124.1 (C7), 74.7 (C1), 48.1 (C3), 42.9 (C8), 41.3 (C9), 38.2 (C2), 35.4 (C5), 27.8 (CH_3 -14, 15), 23.0 (C4), 22.9 (CH_3 of NHAc), 18.0 (CH_3 -13), 8.9 (CH_3 -12); HRMS m/z calcd mass for $\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{NO}_2$ 302.2096 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, found 302.2096.

4.3.17. Preparation of compound **12**

To a solution of **1** (39 mg, 0.18 mmol) in EtOAc (0.5 mL) was added *m*CPBA (37.4 mg, 0.22 mmol) at 0 °C, the solution was stirred for 1 h and then allowed to warm at room temperature for 24 h. The water was added and the mixture was extracted with EtOAc (3 times). The organic layer was combined, washed with water, brine and dried over anhydrous Na_2SO_4 . Evaporation of solvent gave a crude oil, which was purified by PLC (20% EtOAc:hexane) to give a crystalline solid of compound **12**.

4.3.18. (±)-[2E,10E]-6,7-epoxy-2,6,9,9-tetramethylcycloundeca-2,10-dienone (**12**)

Yield 41 mg, 97%; mp 84–85 °C; IR $\nu_{\max}$ 2963, 1656, 1262, 1119, 971 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 6.02–6.10 (3H, m, H-3, H-10 and H-11), 2.70 (1H, dd, J = 11.2, 1.5 Hz, H-7), 2.34–2.45 (2H, m, H-4), 2.21–2.27 (1H, m, H-5), 1.89 (1H, d, J = 14.0 Hz, H-8), 1.80 (3H, s, CH_3 -12), 1.41 (1H, dd, J = 14.0, 11.2 Hz, H-8), 1.26–1.34 (1H, m, H-5), 1.25 (3H, s, CH_3 -14 or 15), 1.18 (3H, s, CH_3 -13), 1.03 (3H, s, CH_3 -15 or 14); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 202.8 (C1), 159.4 (C10), 147.7 (C3), 139.4 (C2), 128.2 (C11), 62.7 (C7), 61.3 (C6), 42.6 (C8), 38.1 (C5), 35.9 (C9), 29.7 (CH_3 -14 or 15), 24.6 (C4), 24.0 (CH_3 -15 or 14), 15.6 (CH_3 -13), 12.0 (CH_3 -12); HRMS m/z calcd mass for $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2$ 257.1517 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, found 257.1517.

4.3.19. Preparation of compounds **13–15**

The synthesis of compounds **13–15** was similar as described in the preparation of compounds **5–7**.

4.3.20. (±)-[10E]-3-amino-6,7-epoxy-2,6,9,9-tetramethylcycloundeca-10-enone (**13**)

Yield 51%; mp 126–127 °C; IR $\nu_{\max}$ 3382, 1693, 1631, 1009, 914 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 6.29 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-11), 6.20 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-10), 3.12–3.17 (1H, m, H-3), 2.62–2.68 (2H, m, H-2 and H-7), 2.00–2.06 (1H, m, H-5), 1.84 (1H, t, J = 12.5 Hz, H-8), 1.30 (1H, dd, J = 11.3, 2.5 Hz, H-8), 1.20 (3H, s, CH_3 -14 or 15), 1.06 (3H, s, CH_3 -15 or 14), 1.04 (3H, s, CH_3 -13), 0.94–0.98 (3H, m, 2H-4

and H-5), 0.90 (3H, d, J = 6.7 Hz, CH_3 -12); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 203.1 (C1), 150.8 (C10), 127.7 (C11), 62.0 (C6), 60.7 (C7), 54.3 (C3), 53.2 (C2), 40.2 (C8), 36.6 (C5), 36.1 (C9), 29.4 (CH_3 -14 or 15), 27.4 (C4), 23.1 (CH_3 -15 or 14), 16.6 (CH_3 -13), 5.6 (CH_3 -12); HRMS m/z calcd mass for $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{NO}_2$ 252.1964 $[\text{M} + \text{H}]^+$, found 252.1962.

4.3.21. (±)-[10E]-3-butylamino-6,7-epoxy-2,6,9,9-tetramethylcycloundeca-10-enone (**14**)

Yield 15%; mp 76–77 °C; IR $\nu_{\max}$ 3434, 1688, 1628, 1114, 917 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 6.30 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-11), 6.25 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-10), 2.92–3.00 (2H, m, H-2 and H-7), 2.66–2.74 (2H, m, H-3 and H-1'), 2.44–2.52 (1H, m, H-1'), 2.05–2.09 (1H, m, H-5), 1.90 (1H, d, J = 13.8 Hz, H-8), 1.42–1.50 (2H, m, H-2'), 1.34–1.41 (3H, m, H-8 and 2H-3'), 1.26 (3H, s, CH_3 -14 or 15), 1.15 (3H, s, CH_3 -15 or 14), 1.10 (3H, s, CH_3 -13), 1.00–1.10 (2H, m, H-4), 1.00–1.05 (1H, m, H-5), 0.93 (3H, t, J = 7.2 Hz, H-4'), 0.90 (3H, d, J = 6.4 Hz, CH_3 -12); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 203.8 (C1), 150.3 (C10), 127.8 (C11), 62.0 (C6), 60.7 (C7), 60.7 (C3), 47.8 (C2), 47.0 (C1'), 40.5 (C8), 37.2 (C5), 36.2 (C9), 32.4 (C2'), 29.6 (CH_3 -14 or 15), 26.2 (C4), 23.3 (CH_3 -15 or 14), 20.4 (C3'), 16.8 (CH_3 -13), 14.0 (C4'), 5.8 (CH_3 -12); HRMS m/z calcd mass for $\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{NO}_2$ 308.2590 $[\text{M} + \text{H}]^+$, found 308.2593.

4.3.22. (±)-[10E]-3-benzylamino-6,7-epoxy-2,6,9,9-tetramethylcycloundeca-10-enone (**15**)

Yield 18%; mp 80–81 °C; IR $\nu_{\max}$ 3350, 1686, 1626, 1113, 917, 749, 704 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.28–7.42 (5H, m, Ar-H), 6.16 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-10), 5.84 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-11), 4.02 (1H, d, J = 13.4 Hz, H-1'), 3.72 (1H, d, J = 13.4 Hz, H-1'), 3.00 (1H, dq, J = 6.6, 3.2 Hz, H-2), 2.80 (1H, dd, J = 9.3, 3.2 Hz, H-3), 2.14 (1H, dd, J = 11.2, 1.6 Hz, H-7), 2.00 (1H, dd, J = 8.6, 8.2 Hz, H-5), 1.74 (1H, d, J = 13.5 Hz, H-8), 1.20–1.28 (1H, m, H-8), 1.08–1.14 (2H, m, H-4), 1.06 (3H, s, CH_3 -14 or 15), 1.04 (3H, s, CH_3 -13), 0.96 (3H, d, J = 6.6 Hz, CH_3 -12), 0.90 (3H, s, CH_3 -15 or 14); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 203.8 (C1), 150.1 (C10), 139.7 (C-Ar), 128.7 (C-Ar), 128.4 (C-Ar), 127.7 (C11), 127.5 (C-Ar), 61.7 (C6), 60.4 (C7), 57.2 (C3), 50.3 (C1'), 46.4 (C2), 40.7 (C8), 36.5 (C5), 36.0 (C9), 29.6 (CH_3 -14 or 15), 25.9 (C4), 23.0 (CH_3 -15 or 14), 16.8 (CH_3 -13), 5.7 (CH_3 -12); HRMS m/z calcd mass for $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{NO}_2$ 342.2433 $[\text{M} + \text{H}]^+$, found 342.2433.

4.3.23. Preparation of compound **16**

Acetylation reaction of compound **13** (23 mg 0.08 mmol) was similar as described above.

4.3.24. (±)-[10E]-3-(N-Acetylamino)-6,7-epoxy-2,6,9,9-tetramethylcycloundeca-10-enone (**16**)

Yield 15.6 mg, 66%; mp 205–206 °C; IR $\nu_{\max}$ 3243, 3072, 1699, 1632, 1551, 1107, 916 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 6.59 (1H, d, J = 16.1 Hz, H-11), 6.29 (1H, d, J = 16.1 Hz, H-10), 4.47 (1H, dt, J = 7.5, 3.1 Hz, H-3), 2.96 (1H, dq, J = 6.7, 3.1 Hz, H-2), 2.85 (1H, dd, J = 11.2, 1.7 Hz, H-7), 1.98–2.03 (1H, m, H-5), 2.01 (3H, s, CH_3 of NHAc), 1.90–1.95 (1H, m, H-8), 1.36–1.41 (1H, dd, J = 11.2, 2.5 Hz, H-8), 1.34 (3H, s, CH_3 -13), 1.19–1.28 (1H, m, H-4), 1.15 (3H, s, CH_3 -14 or 15), 1.12 (3H, s, CH_3 -15 or 14), 1.00–1.06 (1H, m, H-4), 0.95 (3H, d, J = 6.7 Hz, CH_3 -12), 0.95–0.98 (1H, m, H-5); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 202.6 (C1), 170.1 (C=O of NHAc), 150.6 (C10), 128.4 (C11), 61.1 (C6), 60.3 (C7), 52.0 (C3), 49.7 (C2), 40.8 (C8), 36.3 (C9), 36.0 (C5), 29.5 (CH_3 -14 or 15), 24.9 (C4), 23.4 (CH_3 -13), 23.3 (CH_3 of NHAc), 16.8 (CH_3 -15 or 14), 6.5 (CH_3 -12); HRMS m/z calcd mass for $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{NO}_3$ 316.1889 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, found 316.1889.

4.3.25. Preparation of compounds **17a-d**

To a solution of compound **1** (66 mg, 0.30 mmol) in MeCN (1.0 mL) was added the solution of KCN (63 mg, 0.97 mmol) in H_2O (1.0 mL), the reaction mixture was stirred for 3 days at 40 °C. The reaction mixture was quenched with H_2O (10 mL) and extracted

with EtOAc (3 times). The organic layer was combined, washed with water, brine and dried over anhydrous Na_2SO_4 and evaporated to dryness. Purification of crude oil by PLC (30% EtOAc:Hexane) gave a white solid of a major diastereomer **17a**.

4.3.26. ($\pm$)-[6E]-3,10-dicyano-2,6,9,9-tetramethylcycloundeca-6-enone (**17a**)

Yield 35 mg, 42%; mp 115–116 °C; IR ν_{max} 2962, 2234, 1726 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 5.11 (1H, dd, $J = 10.5, 4.0$ Hz, H-7), 3.36 (1H, dd, $J = 19.4, 5.2$ Hz, H-11), 3.25–3.28 (1H, m, H-10), 2.83–2.86 (2H, m, H-2 and H-3), 2.50 (1H, dd, $J = 19.4, 3.2$ Hz, H-11), 2.12–2.22 (3H, m, 2H-8 and H-5), 1.84–1.92 (3H, m, 2H-4 and H-5), 1.45 (3H, s, CH_3 -13), 1.26 (3H, s, CH_3 -14 or 15), 1.22 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, CH_3 -12), 1.16 (3H, s, CH_3 -15 or 14); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 202.2 (C1), 136.1 (C6), 122.1 (C7), 121.9 (CN at C10), 121.6 (CN at C3), 45.9 (C3), 41.3 (C8), 41.1 (C11), 38.9 (C5), 35.9 (C9), 33.5 (C10), 33.3 (C2), 31.9 (CH₃-14 or 15), 24.5 (C4), 21.5 (CH₃-15 or 14), 16.3 (CH₃-13), 11.2 (CH₃-12); HRMS m/z calcd mass for $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}$ 295.1786 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, found 295.1787.

4.3.27. Preparation of compound **20**

Dimethylamine derivative **18** was prepared in the same procedure as described above and used as the starting material for the further step. A mixture of **18** (50 mg, 0.19 mmol) and KCN (210.3 mg, 3.2 mmol) in MeCN:H₂O (1:0.5 mL) was stirred for 2 days at 15 °C. The solution was concentrated on a rotary evaporator under reduced pressure. The water was added and the mixture was extracted with EtOAc (3 times). The organic layer was combined, washed with water, brine and dried over anhydrous Na_2SO_4 . Evaporation of solvent gave a crude oil, which was purified by PLC (50% EtOAc:hexane) to give a white solid of compound **20**.

4.3.28. [2E,6E]-10-cyano-2,6,9,9-tetramethylcycloundeca-2,6-dienone (**20**)

Yield 32 mg, 60% in the final step; mp 104–105 °C; IR ν_{max} 2966, 2232, 1672, 1461, 1267, 817 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 5.95–6.05 (1H, m, H-3), 5.11 (1H, t, $J = 5.9$ Hz, H-7), 2.88–3.07 (1H, br s, H-11), 2.72–2.80 (1H, m, H-10), 2.53–2.66 (1H, m, H-11), 2.42–2.52 (1H, m, H-5), 2.24–2.42 (3H, m, 2H-4 and H-5), 2.00–2.22 (2H, m, H-8), 1.79 (3H, s, CH_3 -12), 1.57 (3H, s, CH_3 -13), 1.19 (3H, s, CH_3 -14 or 15), 1.07 (3H, s, CH_3 -15 or 14); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 202.9 (C1), 143.7 (C3), 137.0 (C6), 134.9 (C2), 122.8 (C7), 120.2 (CN at C10), 39.9 (C8), 39.6 (C4), 39.0 (C11), 37.3 (C9), 36.6 (C10), 28.3 (CH₃-14 or 15), 25.8 (CH₃-15 or 14), 24.6 (C5), 15.8 (CH₃-13), 12.5 (CH₃-12); HRMS m/z calcd mass for $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{NO}$ 268.1677 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, found 268.1677.

4.4. Cytotoxicity assay

Cytotoxic activity of the compounds was determined by the sulforhodamine B (SRB) assay [17]. Briefly, 190 mL/well of cell suspensions ($0.5\text{--}1.0 \times 10^5$ cells/mL) were seeded in 96-well plates and incubated at 37 °C for 24 h. Then 10 mL/well of each concentration of the compounds was added in triplicate to obtain final concentration of 0.025, 0.16, 0.8, 4 and 20 μg /well and 0.1% DMSO was used as the solvent-control wells. The plates were incubated for 1 h (starting cells) and 72 h at 37 °C. At the end of each exposure time, the medium was removed. The cells were fixed with 20% (w/v) trichloroacetic acid (TCA, Sigma, St. Louis, MO, USA) at 4 °C for 1 h and stained with 0.4% (w/v) SRB (Sigma) dissolved in 1% acetic acid (Sigma) at room temperature for 30 min. After five times washing with 1% acetic acid, protein-bound dye was solubilized with 10 mM Tris base, pH10 (Sigma) and the absorbance (OD) at 510 nm was determined with an ELISA plate reader (ELX-800; Bio-Tek Instruments, Inc.). Percentage cell viability was calculated as: $[(\text{OD treated cells on day 3} - \text{OD starting cells})/(\text{OD control on day 3} - \text{OD$

starting cells)] $\times 100$. Dose-response curves were plotted and growth inhibition of 50% (IC_{50}) was determined at compound concentration which results in 50% reduction of total protein increase in control cells.

4.5. Investigation the target protein of compounds **1** and **5** by docking study

4.5.1. Template preparation

A crystallographic structure of cyclin-dependent kinases 2 (CDK-2) [23], cyclin-dependent kinases 5 (CDK-5) [24], epidermal growth factor receptor (EGFR) [25] and glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) [26] bound to the selective inhibitor 4-[3-hydroxyanilino]-6,7-dimethoxyquinazoline (ligand **I**) for CDK-2, 6-phenyl[5H]pyrrolo[2,3-b]pyrazine (ligand **II**) for CDK-5, [6,7-bis(2-methoxyethoxy)quinazoline-4-yl]-(3-ethynylphenyl)amine (ligand **III**) for EGFR and 6-bromoinidirubin-3'-oxime (ligand **IV**) for GSK-3 were selected as the docking template. These structures were obtained from the Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>) (PDB codes: 1DI8 for CDK-2, 1UNG for CDK-5, 1M17 for EGFR and 1UV5 for GSK-3, Table 2). In order to prepare the target protein as a template, ligand and crystallographic water were removed. Hydrogens and Gasteiger charges were assigned by using AutoDockTools (ADT) [27]. Atomic salvation parameters, based on the Stouten model, and fragmental volumes were added in accordance with the AutoDock force field [28]. Cubic affinity grid maps for each atom type in the ligand set (plus an electrostatics map) centered on the cavity with dimensions of $45 \times 45 \times 45$ Å and 0.375 Å spacing between grid points were computed using AutoGrid 4.0 for each protein model. Lennard–Jones parameters 12-10 and 12-6 were used for modeling H-bonds and Van Der Waals interactions, respectively.

4.5.2. Template validation

To validate the constructed templates, the crystal structures of native ligands including ligands **I**, **II**, **III** and **IV** were used to redock with its template, CDK-2, CDK-5, EGFR and GSK-3, respectively.

To prepare the inhibitors to dock to the constructed template, all hydrogens were added and Gasteiger charges were assigned for all inhibitors. ADT was used to merge nonpolar hydrogens and define which bonds were rotatable for each ligand.

AutoDock 4 was employed to perform the docking calculation. Each ligand was docked to the developed CDK-2, CDK-5, EGFR and GSK-3 templates by using a Lamarckian genetic algorithm search (LGA). Due to the stochastic nature of genetic search algorithms, each ligand was docked in 150 trials. Docking trial for each ligand was initiated with a randomly generated population of 150 ligand orientations and the highest affinity configuration was selected after 2 million energy evaluations had been performed. Standard AutoDock parameters were used for the genetic algorithm: 2% point mutation; 80% cross over rate; 6% local search rate.

The resulting ligand configurations, from 150 trials within a 2.0 RMSD (root-mean-square deviation) tolerance of each other, were grouped together in clusters. The results of the docking experiments were evaluated by calculating the positional RMSD of the corresponding atoms of each conformation. The final docked structure, RMSD from the bound crystal structure, docked energy and predicted free energy of binding were all used to analyze its interaction with the active site.

5. Molecular docking of **1** and **5** to the constructed protein templates

To prepare **1** and **5** for docking with four constructed templates, all hydrogens were added and Gasteiger charges were assigned

[29]. The ADT was used to merge nonpolar hydrogens and define which bonds were rotatable. **1** and **5** was docked to the four protein templates by using a Lamarkian genetic algorithm search. Due to the stochastic nature of genetic search algorithms, each ligand was docked in 150 trials. Each docking trial for ligand was initiated with a randomly generated population of 150 ligand orientations and the highest affinity orientation was selected after 2 million energy evaluations had been performed. Standard AutoDock parameters were used for the genetic algorithm: 2% point mutation; 80% cross over rate; 6% local search rate [28]. The resulting ligand orientations from 150 trials with a 2.0 Å RMSD tolerance of each other were grouped together as clusters. The final docked structure, docked energy and predicted free energy of binding were used for the analysis of its interaction with the active site.

Acknowledgements

The authors are grateful to Associate Professor Dr. Banchob Sripa for providing cholangiocarcinoma cell lines. Thai Research Fund (DBG5180066) and The Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) are gratefully acknowledged.

References

- [1] B. Sripa, C. Pairojikul, *Curr. Opin. Gastroenterol.* 24 (2008) 349–356.
- [2] K.A. McGlynn, R.E. Tarone, H.B. El-Serag, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 15 (2006) 1198–1203.
- [3] L.K. Sampson, S.M. Vickers, W. Ying, J.O. Phillips, *Cancer Res.* 57 (1997) 1743–1749.
- [4] M. Höpfner, D. Schuppan, H. Scherübl, *World Gastroenterol.* 14 (2008) 7021–7032.
- [5] N.R. Fransworth, N. Bunyaphrathasara, *Thai Medicinal Plants*. Prachachon, Bangkok, Thailand, 1992, pp. 261–3.
- [6] S.R. Hall, S. Nimgirawath, C.L. Roston, A. Sittatrakul, S. Thadaniti, N. Thirasasana, A.H. White, *Aust. J. Chem.* 34 (1981) 2243–2247.
- [7] A. Murakami, D. Takahashi, T. Kinoshita, K. Koshimizu, H.W. Kim, A. Yoshihiro, Y. Nakamura, S. Jiwajinda, J. Terao, H. Ohigashi, *Carcinogenesis* 23 (2002) 795–802.
- [8] G.C. Huang, T.Y. Chien, C.C. Wang, *Planta. Med.* 71 (2005) 219–224.
- [9] S. Alwi, S. Sakinah, M. Nallappan, A. Pihie, L. Hawariah, *Malaysian J. Biochem. Mol. Biol.* 15 (2007) 19–23.
- [10] I. Jantan, I.A.A. Rafi, J. Jalil, *Phytomedicine* 12 (2005) 88–92.
- [11] J.R. Dai, J.H. Cardellina, J.B. McMahon, M.R. Boyd, *Nat. Prod. Lett.* 10 (1997) 115–118.
- [12] T. Kitayama, A. Furuya, C. Moriyama, T. Masuda, S. Fushimi, Y. Yonekura, H. Kubo, Y. Kawai, S. Sawada, *Tetrahedron: Asymmetry* 17 (2006) 2311–2316.
- [13] T. Kitayama, T. Yokoi, Y. Kawai, R.K. Hill, M. Morita, T. Okamoto, Y. Yamamoto, V.V. Fokin, K.B. Sharpless, S. Sawada, *Tetrahedron* 59 (2003) 4857–4866.
- [14] T. Kitayama, K. Yamamoto, R. Utsumi, M. Takatani, R.K. Hill, Y. Kawai, S. Sawada, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65 (2001) 2193–2199.
- [15] T. Kitayama, T. Okamoto, R.K. Hill, Y. Kawai, S. Takahashi, S. Yonemori, Y. Yamamoto, K. Ohe, S. Uemura, S. Sawada, *J. Org. Chem.* 64 (1999) 2667–2672.
- [16] (a) N. Tepsiri, L. Chaturat, B. Sripa, W. Namwat, S. Wongkham, V. Bhudhisawasdi, W. Tassaneeyakul, *World J. Gastroenterol.* 11 (2005) 2748–2753;
(b) B. Sripa, S. Leungwattanawanit, T. Nitta, C. Wongkham, V. Bhudhisawasdi, A. Puapairoj, C. Sripa, M. Miwa, *World J. of Gastroenterol.* 11 (2005) 3392–3397;
(c) P. Thuwajit, W. Chawengrattanachot, C. Thuwajit, B. Sripa, F.E.B. May, B.R. Westley, N. Tepsiri, A. Puapairoj, S. Chauin, *Hepatol. Res.* 37 (2007) 295–304.
- [17] P. Skehan, R. Storeng, D. Scdiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J.T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney, M.R. Boyd, *J. Natl. Cancer Inst.* 82 (1990) 1107–1112.
- [18] H. Lin, J.L. Juang, P.S. Wang, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 29302–29307.
- [19] Y.M. Ahn, L. Vogeti, C.J. Liu, H.K.R. Santhapuram, J.M. White, V. Vasandani, L.A. Mitscher, G.H. Lushington, P.R. Hanson, D.R. Powell, R.H. Himes, K.F. Roby, Q. Ye, G.I. Georg, *15* (2007) 702–13.
- [20] G.Y. Gwak, J.H. Yoon, C.M. Shin, Y.J. Ahn, J.K. Chung, Y.A. Kim, T.Y. Kim, H. S. Lee, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 131 (2005) 649–652.
- [21] N. Jinawath, Y. Chamgramol, Y. Furukawa, K. Obama, T. Tsunoda, B. Sripa, C. Pairojikul, Y. Nakamura, *Hepatology* 44 (2006) 1025–1038.
- [22] K. Lim, C. Han, L. Xu, K. Isse, A.J. Demetris, T. Wu, *Cancer Res.* 68 (2008) 553–560.
- [23] L. Shewchuk, A. Hassell, B. Wisely, W. Rocque, W. Holmes, J. Veal, L.F. Kuyper, *J. Med. Chem.* 43 (2000) 133–138.
- [24] M. Mapelli, L. Massimiliano, C. Crovace, M.A. Seeliger, L.H. Tsai, L. Meijer, A. Musachio, *J. Med. Chem.* 48 (2005) 671–679.
- [25] J. Stamos, M.X. Sliwkwodki, C. Eigenbrot, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 46265–46272.
- [26] L. Meijer, A.L. Skaltsounis, P. Magiatis, P. Polychronopoulos, M. Knockaert, M. Leost, X.P. Ryan, C.A. Vonica, A. Brivanlou, R. Dajani, C. Crovace, C. Tarricone, A. Musacchio, S.M. Roe, L. Pearl, P. Greengard, *Chem. Biol.* 10 (2003) 1255–1266.
- [27] S.J. Weiner, P.A. Kollman, D.A. Case, U.C. Singh, C. Ghio, G. Alahona, S. Profeta, P. Weiner, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 765–784.
- [28] (a) G.M. Morris, D.S. Goodsell, R.S. Halliday, R. Huey, W.E. Hart, R.K. Belew, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* 19 (1998) 1639–1662;
(b) P.F.W. Stouten, C. Froemmel, H. Nakamura, C. Sander, *Mol. Simulation* 10 (1993) 97–120;
(c) G.M. Morris, D.S. Goodsell, R. Huey, A.J. Olson, *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 10 (1996) 293–304.
- [29] J. Gasteiger, M. Marsili, *Tetrahedron* 36 (1980) 3219–3228.

S2-P88

Structural Modification of Zerumbone from *Zingiber zerumbet* Smith and Their Biological Activities

Uraivan Songsiang,^a Chavi Yenjai,^a Jariya Hahnvajanawong^b and Chanokkhorn Phaosiri^a

^a Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.

^b Department of Microbiology and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.

Objective

To modify the structure of zerumbone which was isolated from *Zingiber zerumbet* Smith and evaluate for their biological activities.

Methods

Zerumbone (1), isolated from *Zingiber zerumbet* Smith, was used as the starting material for structural modification. Reduction of zerumbone by using NaBH₄ yielded zerumbol 2. Treatment of zerumbone with *m*-CPBA gave zerumbone epoxide 3 which was further reacted with various amines affording Michael addition products 7, 8, 9 and 10. Amine derivatives 4, 5 and 6 were obtained by treatment of zerumbone with NH₃, *n*-BuNH₂ and PhCH₂NH₂, respectively, at room temperature for 5 days. Amides 11, 12 and 13 were synthesized by treatment of amines with acetic anhydride in pyridine. Zerumbone was treated with KCN in MeCN-H₂O at 35-40°C, conjugated addition of cyanide ion at C3 and C10 double bonds led to dicyano 14 while reaction of 8 with excess KCN at room temperature gave dicyano 15 and aminonitrile 16. Bromination of 1 by using NBS in MeOH-H₂O at room temperature for 30 minutes yielded 17.

Results

Compounds 1-17 were evaluated for cytotoxicity against cholangiocarcinoma cell lines, KKU-100, KKU-M139, KKU-M156, KKU-M213 and KKU-M214. The results are shown in Table 1.

Table 1. Cytotoxicity of zerumbone (1) and its derivatives.

Compound	IC ₅₀ (μg/ml)				
	KKU-100	KKU-M139	KKU-M156	KKU-M213	KKU-M214
1	NR	NR	NR	NR	NR
3	NR	NR	NR	NR	12.33±0.91
4	3.87±0.14	14.89±1.29	16.25±1.27	12.21±0.53	14.04±1.74
5	NR	NR	NR	10.67±0.19	12.11±0.17
7	5.08±0.26	NR	14.82±0.57	11.57±0.74	15.68±0.24
14	NR	NR	NR	NR	18.12±0.99
15	NR	NR	NR	NR	11.47±2.72
17	NR	NR	NR	13.25±3.00	16.62±1.15
Other	NR	NR	NR	NR	NR
Ellipticine	7.11±0.09	1.21±0.03	2.02±0.11	0.30±0.001	0.54±0.04

Conclusion

The chemical transformation of zerumbone such as reduction, oxidation, amination, acetylation, cyanation and bromination was performed. Zerumbone showed no cytotoxicity against five human cholangiocarcinoma cell lines. Among all derivatives, compounds 4 and 7 exhibited strong cytotoxicity against cholangiocarcinoma KKU-100 cell line with IC₅₀ values of 3.87 and 5.08 μg/ml.

Keywords: zerumbone, *Zingiber zerumbet* Smith, cholangiocarcinoma

Selected References:

1. Kitayama, T.; Yokoi, T.; Kawai, Y. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 2311-2316.
2. Damodaran, N. P.; Dev, S. *Tetrahedron Lett.* **1965**, *24*, 1977-1981.
3. Ohe, K.; Koji, M.; Yanagi, S. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, **2000**, *17*, 3627-3634.

Synthesis of Bioreductive Esters from Zerumbone Derivatives.

S. Pitchuanchom¹, C. Yenjai^{1*}, N. Weerapreeyakul²

¹Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002 Thailand

²Faculty of Pharmaceutical Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002 Thailand

*E-mail:chayen@kku.ac.th, Tel: +66-86-8593883

Abstract: The bioreductive esters have been synthesized. Their structures composed of trimethyl lock containing quinone propionic acid with an ester linkage to the zerumbone derivatives. The synthesized esters are aimed to act *via* reductive activation specifically at the cancer cells, resulting from hypoxia and overexpression of reductases. Quinone delivery systems containing a trimethyl lock have been designed to release toxic moieties selectively and preferentially under reductive/hypoxic conditions. Therefore, the toxicity will be lessened during distribution across the normal cells. The anticancer activity was determined in cancer cell lines with reported reductase *i.e.*, MCF-7 and NCI-H187 as well as in non-reductase containing cancer cells; KB cells. Biological evaluation especially toxicity assessment on the synthesized esters will be reported.

Introduction

The bioreductive agents are drug active prodrugs under conditions of either low oxygen tension or undergo the specific enzyme reductases [1,2]. For example, bioreductive agents are used in clinical such as mitomycin C, porfirimycin and tirapazamine. In this study, we are interested in the biochemical specificity of reductase enzymes which can be utilized to activate bioreductive drugs leading to effective antitumor treatment.

Quinone delivery systems has been recognized as a tumor targeted drug delivery system (TDDS) [3,4]. The TDDS was a substituted benzoquinone, which can also attach to cytotoxic compounds *via* an ester or amide linker. Upon reductive activation, the quinone was converted to its hydroquinone. The lone pair electrons form the *ortho*-OH was used in an intramolecular cyclization to release the potent drug resulting in the formation of non-toxic lactone species.

Zerumbone was isolated from *Zingiber zerumbet* Smith [5] as a major component. It has been reported that this compound showed various biological activities such as cytotoxicity, antiproliferative, anti-inflammatory, antileukemia. In our previous study [6], we found that the zerumbone derivatives demonstrated cytotoxicity to the cancer cells. Then, we designed to synthesize bioreductive prodrugs by the combination of zerumbone derivatives with quinone system.

Materials and Methods

Alcohol (2) A mixture of zerumbone **1** (0.150 g, 0.687 mmol) in methanol and sodium borohydride

(0.105 g, 2.77 mmol) was stirred for 1 hr at 0°C. The reaction mixture was diluted with water and extracted with ethyl acetate (2 times). The organic layer was combined, washed with water, brine and dried with anhydrous Na₂SO₄. Evaporation of solvent gave a crude oil, which was purified by PLC (20% EtOAc:hexane) to afford pure compound **2** (110 g, 0.499 mmol, 72%) as a white solid, mp 72-73°C.

Oxime (3) To a solution of zerumbone **1** (150 g, 0.687 mmol) in ethyl acetate was added HONH₂·HCl (0.48 g, 6.87 mmol) and KOH (0.3 g, 5.496 mmol) in EtOH and H₂O at room temperature. The mixture was stirred for 24 hr and then poured into water at 0°C. The organic layer was separated and the water layer was extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with water, brine and dried over anhydrous sodium sulfate. Evaporation of solvent gave the crude oil, which was recrystallized from hexane to give adduct **3** (0.069 g, 0.295 mmol, 43%), mp 179-181°C.

Lactone (6) Methanesulfonic acid 6 ml was added into trimethylhydroquinone (1.0 g, 6.63 mmol) followed by the addition of 3,3-dimethylacrylic acid (0.73 g, 7.3 mmol). The mixture was heated at 70°C for 1 hr and then cooled to room temperature. The solution was diluted with water and extracted with ethyl acetate two times. The combined ethyl acetate extracts were washed with water, saturated NaCl, dried (anh. Na₂SO₄) and evaporated to dryness. Purification of the crude by column chromatography (silica gel, 90% CH₂Cl₂:hexane) to afford pure lactone (**1.25 g**, 5.33 mmol, 80%) as a white solid, mp 183-185°C.

Quinone Propionic Acid (7) To a stirred solution of lactone **6** (1.8 g, 7.78 mmol) in 50 ml of 10% aqueous acetonitrile was added dropwise solution of *N*-bromosuccinimide (NBS) (8.55 g, 1.52 mmol) in 10 ml of acetonitrile. The reaction mixture was stirred for 1 hr at room temperature, diluted with water and extracted with several portions of ethyl acetate. The combined organic extracts were washed with water, brine and dried (anh. Na₂SO₄). Removal of solvent and crystallization (EtOAc-hexane) then washed with cold acetonitrile afforded quinone propionic acid **7** in quantitative yield as a yellow solid, mp 93-95°C.

Bioreductive Ester 8 and 9 Quinone propionic acid was dissolved in dry dichloromethane and reacted with alcohol **2** or oxime **3** under nitrogen gas. 4-(*N,N*-dimethylamino)pyridine (DMAP) was added into the reaction mixture followed by *N,N*-dicyclohexyl carbodiimide (DCC) in dry dichloromethane solution. The reaction mixture was allowed to react at room temperature for 2 h with observed the formation of a white precipitate. The filtrate was collected after filtering, cold 10% HCl was added and it was then extracted with dichloromethane and adjusted to neutral pH by sodium hydrogen carbonate. The aqueous layer was washed with dichloromethane and dried over anhydrous Na₂SO₄. Solvent was removed by rotary evaporation. The residue was purified by column chromatography giving yellow crystals of ester **8** and **9**.

Results and Discussion

The carbonyl group of zerumbone **1** was easily reduced by treatment with sodium borohydride (NaBH₄) at 0°C to generate alcohol **2** [7]. In addition, zerumbone **1** was reacted with hydroxylamine hydrochloride (HO-NH₂·HCl) under basic condition as potassium hydroxide (KOH) afforded oxime **3** [8] (Fig. 1).

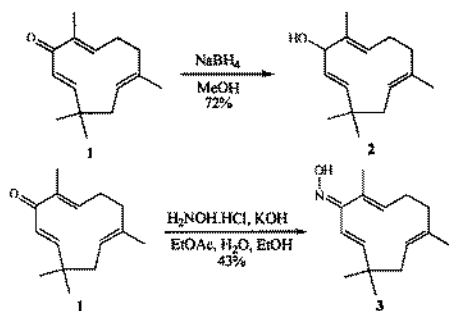


Figure 1. Preparation of Zerumbone Derivatives

Quinone delivery systems were synthesized according to the general method [9,10]. Initially, the trimethylhydroquinone was heated with 3,3-dimethyl acrylic acid in methanesulfonic acid at 70°C to obtain lactone **6** in 80% yield. For the further step, the oxidative ring opening of lactone **6** by using *N*-bromosuccinimide (NBS) as the oxidizing agent afforded quinone propionic acid **7** in quantitative yield (Fig. 2).

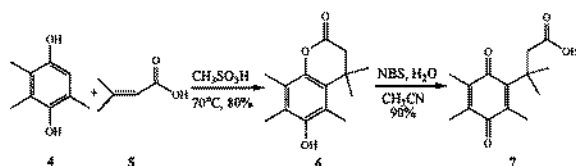


Figure 2. Synthesis of Quinone Propionic Acid

The esterification of quinone **7** with zerumbone derivatives **2** and **3** by using 4-(*N,N*-dimethyl

amino)pyridine (DMAP) and *N,N*-dicyclohexyl carbodiimide (DCC) [11] afforded quinone ester **8** and **9**, respectively, in high yield (Fig. 3).

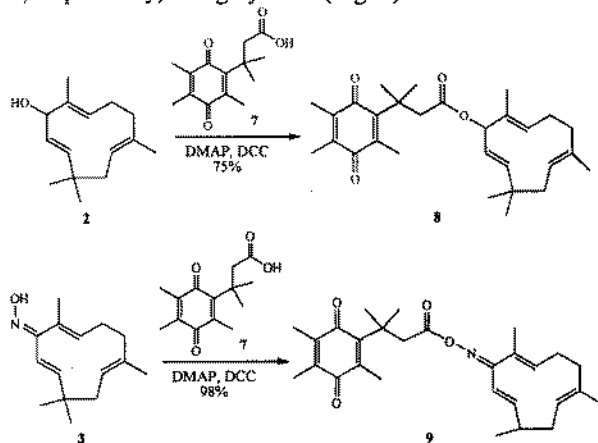


Figure 3. Synthesis of Bioreductive Ester

The bioassay were carried out at the Bioassay Laboratory National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Thailand and the results are shown in Table 1. It was found that alcohol **2** was still toxic to MCF-7 (reductase-containing cell) with an IC₅₀ value of 25.83 µg/ml and less toxic to Vero cell (IC₅₀ = 42.49 µg/ml) than the parent compound. After structural change into bioreductive ester **8**, unfortunately, this ester demonstrated non-cytotoxic to all cancer cells. It may be due to the partial reduction of quinone ester **8** in reductase-containing as well as non reductase-containing (KB) cancer cells led to a small amount of toxic moiety which was released in the cancer cells. Unluckily, oxime derivative **3** showed no cytotoxic against all cancer cells except KB cell. However, the other zerumbone derivatives as well as quinone esters will be prepared in our laboratory.

Table 1: Cytotoxicity of zerumbone, zerumbone derivatives and bioreductive esters

compounds	IC ₅₀ (µg/ml)			
	Vero cells	KB	MCF-7	NCI-H187
1	4.35	7.32	39.67	2.43
2	42.49	NR	25.83	NR
8	NR	NR	NR	NR
3	NR	23.23	NR	NR
9	inprocess	inprocess	inprocess	inprocess

NR = no response

Conclusions

Nucleophilic addition of hydride to zerumbone provided alcohol **2**. The condensation of hydroxylamine hydrochloride with zerumbone furnished oxime derivative **3**. The esterification of quinone **7** with zerumbone derivatives **2** and **3** yielded bioreductive esters **8** and **9**, respectively. Quinone ester **8** showed non cytotoxic against Vero cell as well as reductase containing cell. The possible explanation

was the uncomplete reduction of this ester in cancer cells.

Acknowledgment

Financial support from the Center of excellence for innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Commission on Higher Education, Ministry of Education is gratefully acknowledged. We also thank Thai Research Fund (DBG5180016) for partial support of this work.

References

- [1] R. Phillips, *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 7 (1998), pp. 905-928.
- [2] M. J. Boyer, *Oncol Res*. 9 (1997), pp. 391-395.
- [3] L. Gharat, P. Visser, M. Brummelhuis, R. Guiles and P. J. Chikhale, *Med. Chem. Res*. 8 (1998), pp. 444-456.
- [4] N. Weerapreeyakul, P. Visser, M. Brummelhuis, L. Gharat and P. J. Chikhale, *Med. Chem. Res*. 10 (2000), pp. 149-163.
- [5] S. Dev, *Tetrahedron*. 8 (1960), pp. 171-180.
- [6] U. Songsiang, C. Yenjai, C. Hahnvajjanawong and C. Phaosiri, *KKU Res J (GS)*. 8 (2008), pp. 54-59.
- [7] L. A. Paquette, T. Z. Wang, Christophe M. C. Philippo, and S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994), pp. 3367-3374.
- [8] I. Papanastasiou, A. Tsotinis, N. Kolocouris, S. R. Prathalingam and J. M. Kelly, *J. Med. Chem.* 51 (2008), pp. 1496-1500.
- [9] R. T. Borchardt and L. A. Cohen, *J. Am. Chem. Soc.* (1972), pp. 9175-9182.
- [10] L. A. Carpino, S. A. Triolo and R. A. Berglund, *J. Org. Chem.* 54 (1989), pp. 3303-3310.
- [11] N. Weerapreeyakul, R. Anorach, T. Khuansawad, C. Yenjai and M. Isaka, *Chem. Pharm. Bull.* 6 (2007), pp. 930-935.

Cytotoxicity of zerumbone and its derivatives

U. Songsiang,¹ C. Yenjai,^{1*} and S. Siri.²

¹Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

²Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

*E-mail:chayen@kku.ac.th

Abstract: Zerumbone (1), isolated from *Zingiber zerumbet* Smith, was used as the starting material for structural modification. Bromination of zerumbone by using *N*-bromosuccinimide (NBS) yielded 6'-bromomethylzerumbone (2). Treatment of zerumbone with *m*-CPBA gave zerumbone epoxide 3. Amine derivatives 4, 5, 6 and 7 were obtained by treatment of zerumbone with butylamine, benzylamine, dimethylamine and ammonia, respectively, at room temperature. Conjugate addition of 3 with benzylamine gave epoxyamine 8. After treatment of dimethylamine 6 with KCN at 15°C, cyano derivative 9 was detected. Amides 10 and 11 were synthesized by treatment of amines 4 and 7 with acetic anhydride in pyridine, respectively. Among these substances, amine 5 exhibited cytotoxicity against HEK and MCF-7 cell lines with LC₅₀ values of 30.98 and 40.30 µM, respectively. Fortunately, this compound showed no cytotoxicity against NIH3T3 cell line. Cyano 9 possessed cytotoxicity against HEK and MCF-7 cell lines with LC₅₀ values of 14.11 and 20.48 µM, respectively.

Introduction

Zingiber zerumbet Smith, a member of the family Zingiberaceae, is found in the tropical areas, widespread in Southeast Asia, India and China. It is commonly known in Thai as "Kha thue". The rhizome is used to relieve stomachache, while the alcoholic maceration is regarded as tonic, stimulant and depurative. It is also used as the spice ginger. The boiled flower buds are eaten as vegetable [1]. Zerumbone, (2*E*,6*E*,10*E*)-2,6,9,9-tetramethylcycloundeca-2,6,10-trien-1-one (1), isolated from *Zingiber zerumbet* Smith, is a crystalline sesquiterpene found as the major product [2,3]. This compound has been studied intensively for potential use in anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial, anti-HIV, chemopreventive and chemotherapeutic strategies [4]. In this work, structural modification of zerumbone from *Zingiber zerumbet* Smith and their biological activities have been studied.

Materials and Methods

1. Extraction and Isolation of Zerumbone (1)

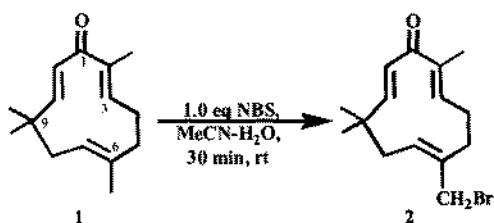
The air dried rhizomes of *Zingiber zerumbet* Smith (4.0 kg) were ground into powder and then extracted successively with EtOAc for 3 times (3x700 ml) at room temperature for three days. Removal of solvent from the extract under reduced pressure gave crude EtOAc extract (32.8 g). Isolation of crude EtOAc

extract using column chromatography (CC) followed by crystallization in hexane afforded a crystalline solid of zerumbone (1, 15.0 g) in 0.33% yield.

2. The derivatives of zerumbone

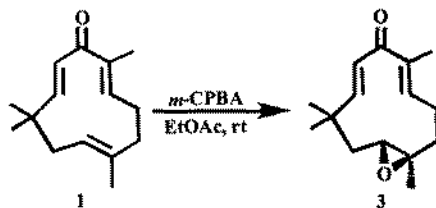
2.1 Bromination of zerumbone

To a solution of 1 (20 mg, 0.09 mmol) in 1:1 MeCN:H₂O (1 ml) was added NBS (20 mg, 0.11 mmol) at room temperature for 30 minutes. The water was added and the mixture was extracted with EtOAc (3 times). The organic layer was combined, washed with water, brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. Evaporation of solvent gave a crude oil, which was purified by PLC (10% EtOAc:hexane) yielded a white solid of 6'-bromomethylzerumbone (2, 10.2 mg, 38% ; mp 98-100°C).



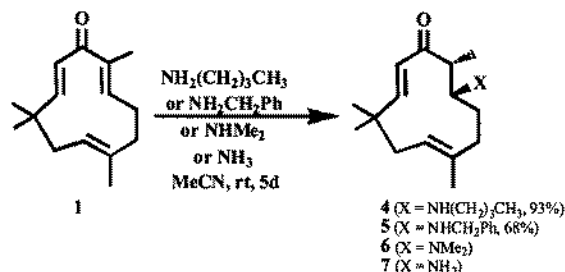
2.2 Epoxidation of zerumbone

To a solution of 1 (39 mg, 0.18 mmol) in EtOAc (0.5 ml) was added *m*-CPBA (37.4 mg, 0.22 mmol) at 0°C, the solution was stirred for 1 hour and then allowed to warm at room temperature for 24 hours. The water was added and the mixture was extracted with EtOAc (3 times). The organic layer was combined, washed with water, brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. Evaporation of solvent gave a crude oil, which was purified by PLC (20% EtOAc:hexane) to give a white solid of zerumbone epoxide (3, 41 mg, 97% ; mp 84-85°C).

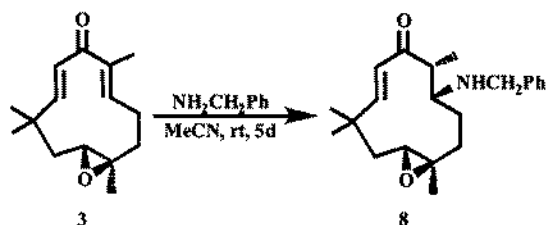


2.3 Amination of zerumbone and zerumbone epoxide

A mixture of **1** (50 mg, 0.23 mmol) in MeCN (1.0 ml) and *n*-butylamine (excess, 4.0 ml) was stirred for 5 days at room temperature. The solution was concentrated under reduced pressure. The water was added and the mixture was extracted with EtOAc (3 times). The organic layer was combined, washed with water, brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. Evaporation of solvent gave a crude oil, which was purified by PLC (50% EtOAc:hexane) to give a yellow oil of compound **4** (62 mg, 93%). The reaction of compound **1** with benzylamine or dimethylamine (excess, 4.0 ml) or ammonia (30% in water, 2.0 ml) afforded compounds **5** (51 mg, 68%, mp 80-82°C), **6** and **7**, respectively.

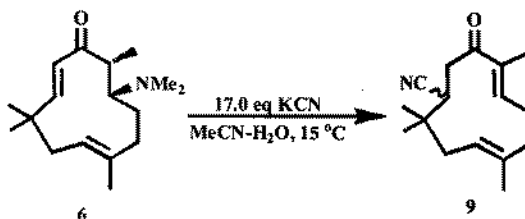


The same procedure as mentioned above was applied for the preparation of **8**. A mixture of **3** (50 mg, 0.21 mmol) in MeCN (1.0 ml) and benzylamine (excess, 3.0 ml) was stirred for 5 days at room temperature. The solution was concentrated under reduced pressure. The water was added and the mixture was extracted with EtOAc (3 times). The organic layer was combined, washed with water, brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated to dryness. The crude product was purified by PLC (30% EtOAc:hexane) to obtain a white solid of epoxyamine **8** (13 mg, 18%; mp 80-81°C).



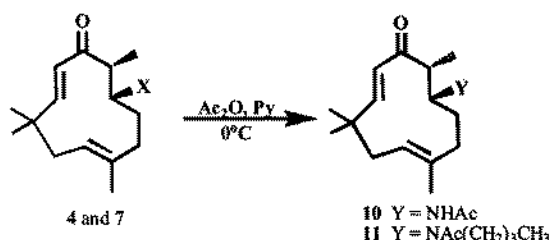
2.4 Cyanation of dimethylamine derivative

A mixture of amine **6** and KCN (137.3 mg, 2.1 mmol) in MeCN:H₂O (1:0.5 ml) was stirred for 2 days at 15°C. The solution was concentrated under reduced pressure. The water was added and the mixture was extracted with EtOAc (3 times). The organic layer was combined, washed with water, brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. Further evaporation of solvent gave a crude oil, which was purified by PLC (50% EtOAc:hexane) yielded a white solid of cyano **9** (32 mg, 56%, mp 104-105°C).



2.5 Acetylation of amines

Compounds **4** and **7** (78 mg, 0.34 mmol) were reacted with acetic anhydride (1.0 ml) in the presence of pyridine (1.0 ml) at 0°C for 8 hours. The water was added and the mixture was extracted with EtOAc (3 times). The organic layer was combined, washed with water, brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. Evaporation of solvent gave a crude oil, which was purified by PLC (50% EtOAc:hexane) furnished a crystalline amide **10** (72 mg, 92%, mp 199-200°C) and a yellow crystalline of amide **11** (97 mg, 85%; mp 72-73°C), respectively.



Results and Discussion

Zerumbone which contained one dienone and one isolated double bond at C-6 position was used as the starting material for this work. Conjugate addition of various nucleophiles such as ammonia, amines and cyanide in mild conditions was examined. Bromination, epoxidation and acetylation of zerumbone were prepared [5-7]. Cytotoxic activity of all derivatives against NIH3T3, MCF-7 and HEK cell lines was examined.

Bromination of zerumbone (**1**) by using NBS in MeOH-H₂O at room temperature for 30 minutes yielded 6'-bromomethylzerumbone (**2**). In this case, the allylic bromination was occurred at the methyl group on C-6 position. It may be due to the most electron rich of this double bond.

The reaction of zerumbone with *m*-CPBA in EtOAc as the solvent at room temperature furnished zerumbone epoxide **3** in high yield. Epoxidation was happened selectively at the isolated double bond (C-6-C-7). The stereochemistry of zerumbone epoxide **3** was determined by a single crystal X-ray analysis [7], which shows a conformation in which the two methyl groups at C2 and C6 are located on one face of the ring while the oxide oxygen lies on the opposite face, minimizing repulsion among these functional groups.

Amination of **1** with *n*-butylamine, benzylamine, dimethylamine or ammonia in acetonitrile at room temperature gave monoamines **4**, **5**, **6** and **7**,

respectively. A single diastereoisomer of each monoamine was detected. Reaction of **3** with benzylamine under the same condition as mentioned above afforded epoxyamine **8**. Conjugate addition of amines selectively occurred at the less hindered on C-3 position of **1** and **3** led to *syn* addition products and no products derived from addition to C10 were observed in these reactions.

Interestingly, cyanation of dimethylamine **6** with KCN at 15°C provided conjugate addition of cyanide ion at C-10 and dimethylamine group at C-3 was disappeared. The reason was the easily elimination of this dimethylamine group led to the generation of cyano **9**. The [2*E*]-geometry of cyano **9** was determined by X-ray diffraction [7].

Further acetylation of amines **4** and **7** by acetic anhydride in the presence of pyridine afforded amides **10** and **11**, respectively, in high yield.

Cytotoxicity

The cytotoxicity of all compounds was carried out at the Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Thailand. The zerumbone and its derivatives were tested for cytotoxicity against NIH3T3 (mouse embryonic fibroblast), HEK (human embryonic kidney 293 cells) and MCF-7 (human breast cancer) cell lines using MTT method [8] and the results are shown in Table 1.

Table 1: Cytotoxicity of zerumbone and its derivatives.

Compound	LC ₅₀ (μM)		
	NIH3T3	HEK	MCF-7
1	18.08	12.28	39.67
2	18.14	27.45	90.26
3	>100	66.76	>100
5	>100	30.98	40.30
8	61.18	45.23	50.3
9	36.00	14.11	20.48
10	>100	>100	>100
11	46.58	40.24	>100

Conclusions

The chemical transformation of zerumbone such as bromination gave allylic bromine, epoxidation using *m*-CPBA afforded zerumbone epoxide, amination with ammonia, primary amines (*n*-butylamine or benzylamine), secondary amine (dimethylamine) furnished conjugate addition at C2 and C3 of substrate. Michael addition of zerumbone epoxide with benzylamine gave epoxyamine **8**. Acetylation of amines **4** and **7** by Ac₂O/pyridine yielded amides **10** and **11**, respectively. Cyanation of amine **6** with KCN gave cyano **9**.

Zerumbone showed cytotoxicity against NIH3T3, HEK and MCF-7 cell lines with LC₅₀ values of 18.08, 12.28 and 39.67 μM, respectively. Among all derivatives, amine **5** exhibited cytotoxicity against HEK and MCF-7 cell lines with LC₅₀ values of 30.98

and 40.30 μM, respectively. Fortunately, this compound showed no cytotoxicity against NIH3T3 cell line. Cyano **9** possessed cytotoxicity against HEK and MCF-7 cell lines with LC₅₀ values of 14.11 and 20.48 μM, respectively.

Acknowledgement

Financial support from the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Commission on Higher Education, Ministry of Education is gratefully acknowledged. We also thank the Thai Research Fund (Grant no. DBG5180016) for partial support of this work.

References

- [1] P. Sirirugs, *Pure Appl Chem.* **70** (1998), pp. 2111-2118.
- [2] S. Dev, J.E. Anderson, V. Cormier, N.P. Damodaran, J.D. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.* **90** (1968), pp 1246-1248.
- [3] S. Sawada, T. Yokoi and T. Kitayama, *Aroma Res.* **9** (2002), pp 34-39.
- [4] T. Kitayama, K. Yamamoto, R. Utsumi, M. Takatani, R.K. Hill, Y. Kawai, S. Sawada and T. Okamoto, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65** (2001), pp 2193-2199 and references cite therein.
- [5] T. Kitayama, T. Okamoto, R.K. Hill, Y. Kawai, S. Takahashi, S. Yonemori, Y. Yamamoto, K. Ohe, S. Uemura and S. Sawada, *J. Org. Chem.* **64** (1999), pp 2667-2672.
- [6] K. Ohe, K. Miki, S. Yanagi, T. Tanaka, S. Sawadab and S. Uemura, *J. Chem. Soc., Perkin Trans I.* (2000), pp 3627-3634.
- [7] T. Kitayama, T. Yokoi, Y. Kawai, R. K. Hill, M. Morita, T. Okamoto, Y. Yamamoto, V.V. Fokin, K.B. Sharpless and S. Sawada, *Tetrahedron.* **59** (2003), pp 4857-4866.
- [8] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods.* **65** (1983), pp 55-63.