

台北醫學大學 藥學院 藥學系碩士班 碩士論文

Taipei Medical University

College of Pharmacy

Master Program in School of Pharmacy

Master Thesis

指導教授：吳建德博士 (Jender Wu, Ph. D.)

1,3-Benzothiazinone 衍生物之合成

及細胞保護作用之活性評估

Synthesis and Biological Evaluation of 1,3-Benzothiazinone

Derivatives In Cell Protective Activities

研究生：蘇琪勝 (Chi-Sheng Su) 撰

中華民國九十七年六月

致謝

感謝我母親對於我進入研究所接受教育及訓練的支持，不論是心情低落時，或遇到挫折時，總是一路陪伴我，給我鼓勵，讓我能完成學位及論文，能為學術研究及人類健康貢獻一份微薄的力量，並且順利從研究所畢業。

感謝吳建德老師這兩年來的指導，不論在化學實驗操作、合成經驗的傳授、人生經驗的分享、作研究的基本態度、獨立研究的思維及做人處事的道理，相信在未來從事學術研究的道路上能有相當大的助益。

感謝何元順老師、陳彥州老師在生化實驗上的指導、何秀娥老師、王靜瓊老師在生化實驗上的協助以及李慶國老師在圖譜分析上的幫忙。

最後要感謝郭憲壽老師及王惠珀老師於論文口試上的指導以及協助，使本論文的整體更趨於完備。

目錄

目錄.....	3
圖表目錄.....	6
光譜目錄.....	7
縮寫索引.....	9
摘要.....	10
Abstract.....	11
一、研究背景.....	12
Glial cell and Astrocyte.....	12
提供抗氧化物質.....	12
清除 glutamate.....	12
1,3-Benzothiazinone 衍生物.....	14
Antiapoptotic effect of 2-Substituted 4H-1,3-Benzothiazin-4-one 衍生物.....	16
Ceramide.....	17
Ceramide 引發細胞凋亡之機轉：.....	19
1. 作為二級傳遞訊號.....	19
2. Ceramide 本身具有的 signaling lipid 的功能.....	20
Ceramide 與神經退化性疾病及缺血性腦傷害的關係：.....	20
Alzheimer's disease.....	21
Parkinson's disease.....	21
Ischemic brain injury / Stroke.....	22
二、研究方法及目的.....	24
化學部份.....	24
活性部份.....	25
以 C2-Ceramide 對 C6-glioma 引發之凋亡反應作為神經傷害及神經退化性疾病藥物治療以達到細胞保護作用之藥物篩選模型：.....	25
MTT Assay (評估細胞存活率).....	25
C2-Ceramide Assay.....	26
三、結果與討論.....	27
化學合成.....	27
圖譜解析.....	29
合成討論.....	31
細胞保護作用評估.....	32
C2-Ceramide Assay 反應條件確認實驗.....	32
C2-Ceramide Assay 藥物篩選實驗.....	32
四、實驗部份.....	36
儀器與試藥.....	37

化合物合成流程及光譜資料.....	39
化合物(1)	40
2-mercapto-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one.....	40
化合物(2)	41
2-(methylthio)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one	41
化合物(3)	42
2-hydroxy-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one	42
化合物(4)	43
2-amino-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one	43
化合物(5)	44
2-hydrazinyl-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one.....	44
化合物(6)	45
2-(methylamino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one	45
化合物(7)	46
2-(ethylamino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one	46
化合物(8)	47
2-(butylamino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one	47
化合物(9)	48
2-(octylamino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one.....	48
化合物(10)	49
2-(3-hydroxypropylamino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one	49
化合物(11)	50
2-(benzylamino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one	50
化合物(12)	51
2-(phenylamino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one	51
化合物(13)	52
2-(naphthalen-1-ylmethylamino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one	52
化合物(14)	53
2-(naphthalen-2-ylamino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one.....	53
化合物(15)	54
2-(furan-2-ylmethylamino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one	54
化合物(16)	55
2-(pyridin-2-ylmethylamino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one.....	55
化合物(17)	56
2-(pyrrolidin-1-yl)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one	56
化合物(19)	58
2-(azepan-1-yl)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one	58
化合物(20)	59

2-(cyclohexylamino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one.....	59
化合物(21)	60
2-((1r,4r)-4-hydroxycyclohexylamino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one	60
化合物(22)	61
3-(chloromethyl)-5H-benzo[e][1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3]thiazin-5-one ...	61
化合物(23)	62
2-(chloromethyl)-9H-benzo[e][1,2,4]triazolo[5,1-b][1,3]thiazin-9-one ...	62
化合物(24)	63
2-(azidomethyl)-9H-benzo[e][1,2,4]triazolo[5,1-b][1,3]thiazin-9-one	63
化合物(25)	64
2-((9-oxo-9H-benzo[e][1,2,4]triazolo[5,1-b][1,3]thiazin-2-yl)methyl)isoindoline-1,3-dione	64
化合物(26)	65
(9-oxo-9H-benzo[e][1,2,4]triazolo[5,1-b][1,3]thiazin-2-yl)methyl carbamimidothioate	65
化合物(27)	66
2-((9-oxo-9H-benzo[e][1,2,4]triazolo[5,1-b][1,3]thiazin-2-yl)methylthio)benzoic acid.....	66
活性測試實驗.....	67
細胞培養.....	68
試藥處理.....	68
MTT Assay 實驗步驟：	68
C2-Ceramide 確認試驗之實驗步驟：	69
C2-Ceramide 試藥篩選之實驗步驟：	69
C2-Ceramide 測試試藥 dose-dependent 之實驗步驟：	70
數據統計：	70
五、圖譜.....	71
六、參考文獻.....	125

圖表目錄

Table 1 Cell Viability of Compounds' Test	15
圖 I Ceramide 之生合成途徑	19
圖 II Ceramide 引發細胞凋亡之機轉	20
圖 III A β peptide 促進 nSMase 引發 ceramide 堆積及細胞凋亡機轉	21
圖 IV Ceramide 於 PD 中引發之細胞凋亡機轉	22
圖 V Ceramide 於 stroke 中引發之細胞凋亡機轉	22
圖 VI C2-Ceramide Assay 示意圖	26
圖 VII C2-Ceramide Assay 反應條件確認實驗	32
圖 VIII C2-Ceramide Assay 藥物篩選實驗	33
圖 IX (a) C2-Ceramide assay of compound 5 and 16 in 24hr pretreatment	34
圖 IX (b) C2-Ceramide assay of compound 10 and 18 in 24hr pretreatment	34
圖 X C2-Ceramide assay of compound 5 in dose dependent 24hr pretreatment	35
Reaction Scheme 1 of Compounds 1-21	27
Reaction Scheme 2 of Compounds 22-27	28

光譜目錄

圖一、化合物 1 之紅外光圖譜	72
圖二、化合物 2 之紅外光圖譜	73
圖三、化合物 3 之紅外光圖譜	74
圖四、化合物 4 之紅外光圖譜	75
圖五、化合物 5 之紅外光圖譜	76
圖六、化合物 6 之紅外光圖譜	77
圖七、化合物 6 之氫核磁共振圖譜	78
圖八、化合物 7 之紅外光圖譜	79
圖九、化合物 7 之氫核磁共振圖譜	80
圖十、化合物 8 之紅外光圖譜	81
圖十一、化合物 8 之氫核磁共振圖譜	82
圖十二、化合物 8 之碳核磁共振圖譜	83
圖十三、化合物 9 之紅外光圖譜	84
圖十四、化合物 9 之氫核磁共振圖譜	85
圖十五、化合物 9 之碳核磁共振圖譜	86
圖十六、化合物 10 之紅外光圖譜	87
圖十七、化合物 11 之紅外光圖譜	88
圖十八、化合物 11 之氫核磁共振圖譜	89
圖十九、化合物 12 之紅外光圖譜	90
圖二十、化合物 13 之紅外光圖譜	91
圖二十一、化合物 13 之氫核磁共振圖譜	92
圖二十二、化合物 13 之碳核磁共振圖譜	93
圖二十三、化合物 14 之紅外光圖譜	94
圖二十四、化合物 14 之氫核磁共振圖譜	95
圖二十五、化合物 15 之紅外光圖譜	96
圖二十六、化合物 15 之氫核磁共振圖譜	97
圖二十七、化合物 15 之碳核磁共振圖譜	98
圖二十八、化合物 16 之紅外光圖譜	99
圖二十九、化合物 16 之氫核磁共振圖譜	100
圖三十、化合物 16 之碳核磁共振圖譜	101
圖三十一、化合物 17 之紅外光圖譜	102
圖三十二、化合物 18 之紅外光圖譜	103
圖三十三、化合物 19 之紅外光圖譜	104
圖三十四、化合物 19 之氫核磁共振圖譜	105
圖三十五、化合物 19 之碳核磁共振圖譜	106
圖三十六、化合物 20 之紅外光圖譜	107

圖三十七、化合物 20 之氫核磁共振圖譜	108
圖三十八、化合物 20 之碳核磁共振圖譜	109
圖三十九、化合物 21 之紅外光圖譜	110
圖四十、化合物 21 之氫核磁共振圖譜	111
圖四十一、化合物 21 之碳核磁共振圖譜	112
圖四十二、化合物 22 之紅外光圖譜	113
圖四十三、化合物 22 之氫核磁共振圖譜	114
圖四十四、化合物 23 之紅外光圖譜	115
圖四十五、化合物 23 之氫核磁共振圖譜	116
圖四十六、化合物 24 之紅外光圖譜	117
圖四十七、化合物 24 之氫核磁共振圖譜	118
圖四十八、化合物 25 之紅外光圖譜	119
圖四十九、化合物 25 之氫核磁共振圖譜	120
圖五十、化合物 26 之紅外光圖譜	121
圖五十一、化合物 26 之氫核磁共振圖譜	122
圖五十二、化合物 27 之紅外光圖譜	123
圖五十三、化合物 27 之氫核磁共振圖譜	124



縮寫索引

aSMase	Acid Sphingomyelinase
CAPK	Ceramide Activated Protein Kinase
CDase	Ceramidase
Cyt C	Cytochrom C
DMF	Dimethylformamide
DMSO	Dimethylsulfoxide
ER	Endoplasmic rediculum
FADD	FAS-associated death domain
GLT1	Glutamate Transporter 1
GSH	Glutathione
HCl	Hydrogen Chloride
IL	Interleukin
JNKs	Jun-N-terminal kinases
KSR	Kinase Suppressor of Ras
LDL	Low Density Lipoprotein
MeOH	Methanol
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NMDA	N-Methyl-D-aspartate
NO	Nitric Oxide
nSMase	Neutral Sphingomyelinase
PD	Parkinsonism Disease
PKC ζ	Protein Kinase C ζ
PP1	Serine/threonine Protein Phosphatase 1
PP2A	Protein Phosphatase 2A
ROS	Reactive Oxygen Species
SM	Sphingomyline
SMase	Sphingomyelinase
SMS	Sphigomyline synthase
SPT	Serine Palmitoyltransferase
TNF	Tumor Necrosis Factor

摘要

神經退化性疾病包括 Alzheimer's Disease、Parkinson's Disease，另外，物理性造成之神經傷害，例如缺血性神經傷害(Ischemia/Stroke) 或頭部劇烈撞擊都是常見之神經傷害疾病。而研究指出，這些傷害會因為神經細胞中之膠質細胞如星狀細胞的維持而具有被保護之作用，相反的疾病造成之星狀細胞受損或凋亡，皆會進一步造成神經細胞之保護喪失而造成神經細胞之傷害甚至凋亡反應之發生，並可能為神經退化性疾病之重要機轉之一。因此保護星狀細胞可能具有保護神經細胞之作用。

在眾多研究中發現，上述之傷害皆與 Ceramide 具有關連性，因此本實驗利用易於穿透細胞膜之 C2-ceramide 作為模擬星狀細胞(C6 glioma)因疾病或外力傷害而凋亡之過程，並以此作為藥物篩選之工具，評估合成化合物對於細胞保護之作用。

1,3-Benzothiazinone 衍生物在細胞毒性評估時發現具有細胞數量增加之現象，並且於正常細胞中不具有明顯毒性之特性，再加上關於抑制凋亡活性作用之報導，因此將這類衍生物作為評估細胞保護作用之化合物。

其中發現，compound 5 在 5 及 10 μM 下具有微弱的 dose-dependent 的保護作用趨勢，但當濃度提高至 20 μM 以上即產生毒性作用，由結果推測 compound 5 確實具有細胞保護之作用。

如果藉由 compound 5 作為 lead compound 並設法去除其毒性作用，可能有機會發展成為具有細胞保護功能之藥物。

Abstract

Neurodegenerative diseases such as Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Stroke are common diseases of neuronal damage. It has been reported that these kind of damage might be protected by the maintenance of astrocytes. On the contrary, diseases caused astrocyte damage or apoptosis would result in its loss in neuro-protective activities, even cause neuron damage and cell apoptosis. Which could be one of the mechanisms of neurodegenerative diseases. As a result, astrocytes protection might be a route for neuroprotection.

Many researches have been reported that such damage is related to ceramide. As a result, we use C2-ceramide to induce apoptotic effect in C6-glioma, the astrocyte like cell line, to mimic the apoptotic condition in neurodegenerative disease and use it as a drug screening model to evaluate the cell protective activities of our compounds.

During the cytotoxic evaluation of 1,3-benzothiazinone derivatives, we found that there is an increased cell number phenomena, their nearly no toxic character in the normal cell line, and reported antiapoptotic effect, which prompt us to evaluate if these compounds have cell protective activities

We found that compound 5 in 5 and 10 μ M seems to have minor dose-dependent trend of cell protective activities, but the toxicity become profound when the concentration doubled. The results showed that compound 5 actually have cell protective activity

Use compound 5 as a lead compound to reduce its toxicity might be a route for the development of cell protective agents.

一、研究背景

Glial cell and Astrocyte

神經膠細胞(Glial cells 又稱作 neuroglia)占據大腦約 25%-50%之體積量，主要功能在提供神經元(Neuron cells)養分及調節神經傳導物質在 Synaptic cleft 間的含量以調節神經之傳導，還有當作支持神經元生長的介質¹。

其中星狀細胞(Astrocyte)與神經細胞之保護具有直接關係。星狀細胞占神經膠細胞 90%細胞數量，除了養分的輸送外，其可以藉由提供抗氧化物質及清除 glutamate 達到保護細胞之作用，分述如下：

提供抗氧化物質

目前已知 oxidative stress 跟急性之神經傷害如 ischemia、excitotoxicity，神經退化性疾病如 Alzheimer's disease 及 Parkinson's disease 有關。當 reactive oxygen species (ROS) 的生成超過細胞抗氧化能力時，就會引起 oxidative stress²。

ROS 會藉由破壞 DNA 造成細胞凋亡，也會經由破壞粒線體之外膜，促使 Cytochrom C (Cyt C) 釋出，並進一步活化 Caspase 途徑，造成細胞凋亡³。

而星狀細胞中含有高濃度的抗氧化物質，包括小分子如：ascorbic acid，glutathione (GSH)，tocopherols；及抗氧化酵素如：superoxide dismutase，catalase，glutathione reductase，glutathione peroxidase。可以藉由星狀細胞及神經細胞間 gap junction 上的通道進行抗氧化物質的傳送，具有保護週圍神經細胞免於遭受 oxidative stress 的影響而遭受破壞，而達到保護的作用²。

清除 glutamate

Glutamate 是神經細胞間重要之神經傳導物質，目的在激發神經訊

息之傳遞，如果 glutamate 沒有適時的從 synaptic cleft 清除，例如儲存在神經細胞中的 glutamate 因外力傷害如撞擊，化學性傷害如自由基破壞，缺血性傷害造成之細胞壞死或凋亡時，大量釋放到腦細胞間，會造成神經細胞的過度激化，並引起細胞毒性，稱為 excitotoxicity。

Glutamate 會刺激 NMDA receptor，促進鈣離子進入神經細胞，但當過度刺激時，會使鈣離子濃度過高，引發 ROS 的生成過量，最終造成神經細胞之凋亡。另外也會促進粒線體釋出 CytC，進一步引發細胞凋亡程序的發生³。

星狀細胞上具有高親和力的 glutamate transporter 1 (GLT1)，發現只分布於成年人腦部的星狀細胞上。有研究發現在 GLT1 knock-out mice 實驗中，其星狀細胞清除 glutamate 之能力會低於原來的 6%，可見星狀細胞在清除 glutamate，防止 excitotoxicity 所扮演的重要性⁴。

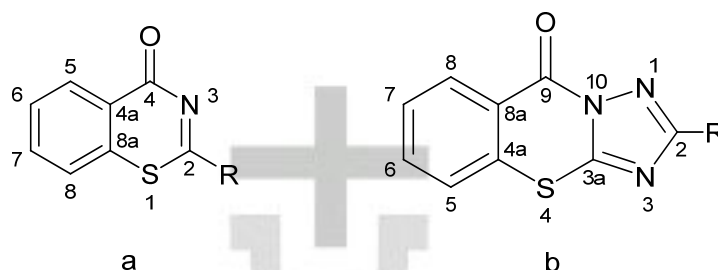
當星狀細胞受到外力傷害或疾病影響時會呈現活化狀態，表現在外觀上有 cell swelling, hypertrophy-hyperplasia (astrogliosis) 及 proliferation (astrocytosis)。在急性腦部傷害 (acute traumatic brain injury)，缺血性傷害 (ischemia/hypoxia)，及 Alzheimer's disease 都有發現這類星狀細胞受到活化的現象。這類活化現象，除了會造成神經細胞 regeneration 受到干擾外^{5,6}，也會使星狀細胞釋出毒性物質⁷。也有研究指出促使神經膠細胞功能不全，導致神經膠細胞釋放出毒性物質如 nitric oxide (NO)，cytokines 等發炎物質，會促使神經細胞死亡，同時可能也是神經退化性疾病 Parkinsonism Disease (PD) 之重要機轉⁸。而在星狀細胞活化過後，通常伴隨有大量星狀細胞死亡的現象，並同時會造成週圍神經細胞之死亡²。

因此保護星狀細胞，具有預防神經退化性疾病，及保護神經細胞受到外力傷害時所引發的進一步神經傷害，幫助神經細胞之回復。本次實驗所用的 C6 glioma 屬於神經膠質細胞瘤中的類星狀細胞⁹。

1,3-Benzothiazinone 衍生物

本論文探討之1,3-Benzothiazinone 衍生物包括有 2-Substituted 4H-1,3-Benzothiazin-4-one 衍生物及2-Substituted 1,2,4-triazolo[5,1-b][1,3]benzothiazin-9-one 衍生物。

以4H-1,3-Benzothiazin-4-one 為架構之化合物(如結構式a所示)及合成，最早是由Bohme, Horst 及Schmidt, Wilhelm 於1953所發表¹⁰。而以1,2,4-triazolo[5,1-b][1,3]benzothiazin-9-one 為架構之化合物(如結構式b所示)及合成，最早是由Heindel, Ned D.及 Schaeffer, Lee A. 於1975所發表²⁵。



到目前為止，已被發表過有關於 2-Substituted 4H-1,3-Benzothiazin-4-one 衍生物所進行的活性測試包括：抑制 xanthine oxidase¹¹，抑制 poly(ADP-ribose) polymerase/PARP1 and PARP2^{12, 13}，抑制細胞凋亡¹⁴⁻¹⁷，連結 macrophage migration inhibitory factor 之作用¹⁸，農業之抗真菌劑¹⁹，analgesics²⁰，抗結核桿菌²¹，及抑制 glutamate receptor and gamma-aminobutylamine receptor 與受體之結合能力²²，但並沒有相關的細胞毒性評估被發表過。而 2-Substituted 1,2,4-triazolo[5,1-b][1,3] benzothiazin-9-ones 衍生物已被發表過有關於活性之測試包括：CNS depressant²⁵ 及 antineoplastic agents²⁶，同樣並沒有其他活性測試如：細胞保護活性測試被發表過。

其中 2-Substituted 4H -1,3-Benzothiazin-4-one 衍生物以 amine 於二號位置進行取代之衍生物較少被用於活性測試上，僅農業之抗真菌劑¹⁹、analgesics²⁰ 及抑制 glutamate receptor and gamma-aminobutylamine receptor 與受體之結合能力²² 之活性作用被發表過，因此本實驗合成一系列以 amine 於二號位置取代之衍生

物進行活性之評估測試。用以取代的包含有 amine、hydrazine、aliphatic amines、cyclic amines、heterocyclic amines、aromatic amines。另外也將合成之中間產物及水解產物進行活性評估。

起初數個 2-Substituted 4H-1,3-Benzothiazin-4-one 衍生物被合成，目的是希望評估這些化合物是否具有抑制癌細胞生長之活性，並同時比較其在正常細胞下是否同樣具有毒性。因此使用正常細胞株 MCF-10A：normal breast cell line 及癌症細胞株 MCF-7,MDA MB-231：breast cancer cell lines, HT-29, Colo205：colon cancer cell lines, A549：lung cancer cell line, 及 HEP-3B：liver cancer cell line，來評估化合物對細胞之毒性反應。其作用如 Table 1 所示：

Table 1 Cell Viability of Compounds' Test

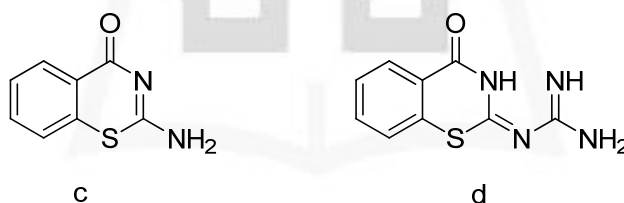
	MCF-10A	MDA-MB231	MCF-7	HT-29	Colo 205	HEP-3B	A549
	MEAN±SD (%)						
DMSO	99 ± 8%	100 ± 0%	100 ± 0%	100 ± 0%	100 ± 0%	100 ± 0%	100 ± 13%
1	105 ± 4%	109 ± 15%	85 ± 13%	115 ± 13%	105 ± 5%	75 ± 15%	122 ± 23%
2	101 ± 5%	102 ± 22%	85 ± 5%	87 ± 32%	93 ± 7%	61 ± 23%	114 ± 11%
3	126 ± 34%	94 ± 22%	71 ± 7%	55 ± 6%	73 ± 11%	34 ± 5%	79 ± 30%
4	116 ± 21%	87 ± 29%	86 ± 7%	55 ± 13%	79 ± 8%	45 ± 11%	40 ± 26%
5	92 ± 5%	104 ± 3%	112 ± 11%	89 ± 2%	71 ± 4%	186 ± 8%	118 ± 1%
8	96 ± 10%	108 ± 26%	126 ± 40%	139 ± 17%	50 ± 11%	34 ± 8%	143 ± 33%
10	83 ± 5%	67 ± 20%	91 ± 18%	104 ± 2%	89 ± 6%	162 ± 47%	125 ± 25%
11	94 ± 12%	64 ± 38%	194 ± 9%	164 ± 19%	60 ± 19%	40 ± 5%	63 ± 16%
12	114 ± 8%	92 ± 14%	137 ± 13%	198 ± 9%	112 ± 6%	61 ± 3%	146 ± 19%
13	160 ± 74%	55 ± 3%	98 ± 3%	103 ± 1%	84 ± 12%	187 ± 20%	147 ± 51%
14	140 ± 76%	68 ± 21%	133 ± 29%	150 ± 24%	44 ± 24%	25 ± 8%	175 ± 6%
15	126 ± 25%	85 ± 3%	153 ± 7%	151 ± 34%	47 ± 26%	33 ± 9%	91 ± 18%
16	88 ± 19%	68 ± 13%	99 ± 4%	110 ± 2%	86 ± 7%	180 ± 4%	164 ± 22%
17	93 ± 15%	97 ± 15%	69 ± 4%	49 ± 5%	77 ± 38%	30 ± 5%	143 ± 18%
18	95 ± 15%	73 ± 3%	74 ± 4%	39 ± 5%	85 ± 12%	30 ± 1%	162 ± 10%
19	93 ± 24%	85 ± 11%	87 ± 19%	142 ± 23%	92 ± 4%	47 ± 31%	75 ± 34%
20	90 ± 6%	67 ± 46%	158 ± 19%	152 ± 40%	93 ± 24%	55 ± 19%	81 ± 24%
21	89 ± 6%	71 ± 23%	101 ± 3%	101 ± 2%	87 ± 9%	102 ± 23%	128 ± 43%

n=3 All the cell lines were tested in 10 μM and use MTT assay to evaluate the cell viability ; Use DMSO as control ;SD=Standard Deviation ;MCF-10A :normal breast cell line ;MCF-7,MDA MB-231 :breast cancer cell lines ; HT-29, Colo205 : colon cancer cell lines, ; A549 : lung cancer cell line ; HEP-3B : liver cancer cell line

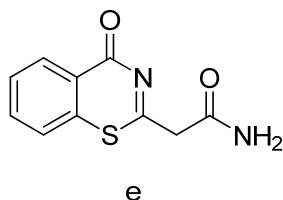
但在研究細胞毒性的過程中發現，某些 2-substituted 4H-1,3-benzothiazin-4-one 衍生物雖然在某些癌症細胞株具有細胞抑制之作用，某些衍生物則具有細胞增長之現象，而且衍生物對於正常細胞並沒有明顯的毒性作用，加上曾有其他衍生物被發表過抑制 apoptosis 之活性作用，因此我們好奇這樣的化合物特性是否具有用在細胞保護上之價值，因此又進行 2-Substituted-4H-1,3-Benzothiazin-4-one 衍生物對於細胞之保護作用評估。另外也合成了六個 2-Substituted 1,2,4-triazolo[5,1-b][1,3] benzothiazin-9-one 衍生物於相同系統下進行細胞保護作用之測試評估。

Antiapoptotic effect of 2-Substituted 4H-1,3-Benzothiazin-4-one 衍生物

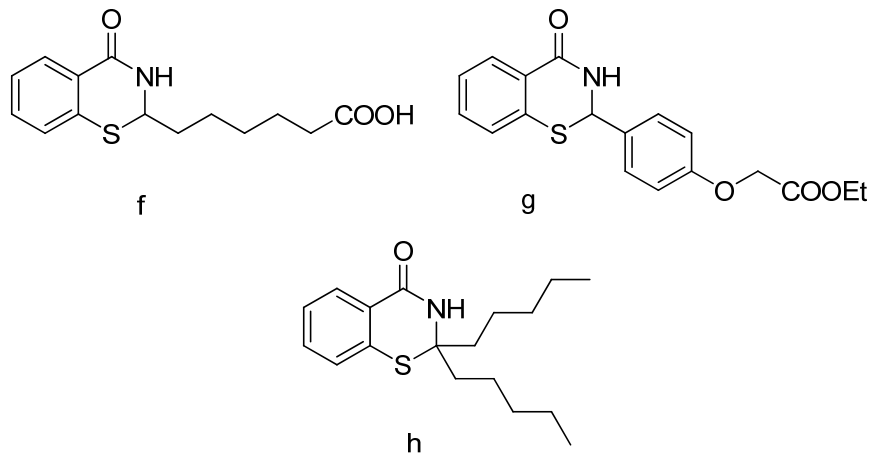
雖然 2-substituted 4H-1,3-benzothiazin-4-one 衍生物在生物活性上有許多文獻被發表，但並非都有突出的活性作用。在 xanthine oxidase 抑制上如結構 c 及 d 為其活性最高者，其 IC_{50} 分別為 5.54, 5.60 μ M，其他結構則皆大於 100 μ M¹¹。



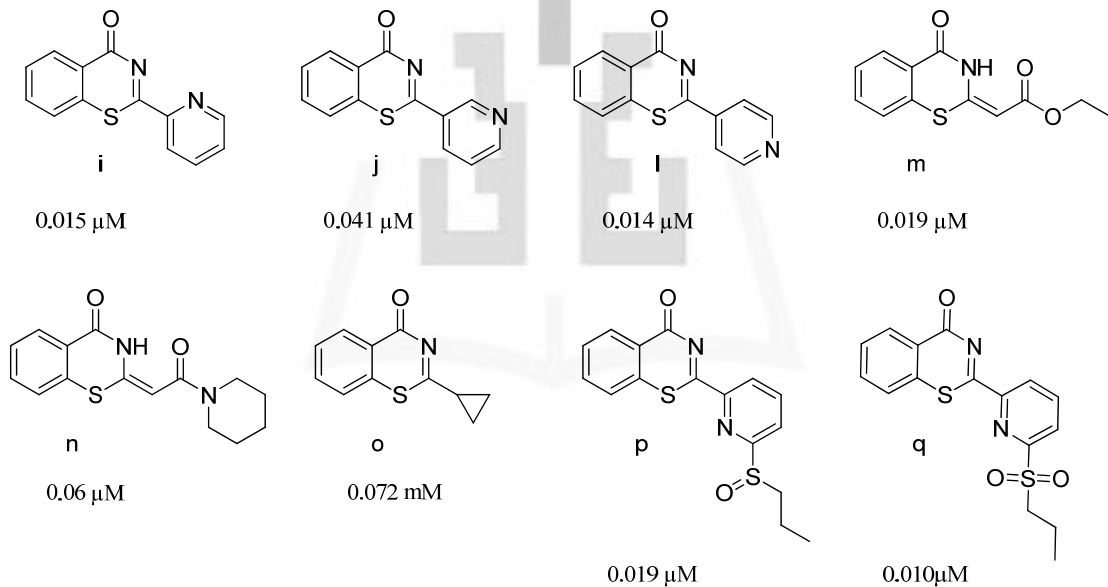
在 PARP1 及 PARP2 抑制上如結構 e，其對於 PARP1 之 EC_{50} 為 40 μ M，對 PARP2 則不具作用活性³。



在抑制抗結核桿菌作用上如結構 f、g、h 其最低抑制濃度分別為 350、290、333 μ M²¹。



然而，在利用小鼠心肌細胞在缺氧狀態下引發之凋亡反應作用中，運用 2-substituted 4H-1,3-benzothiazin-4-one 衍生物作預處理，以預防細胞凋亡之作用，卻有相當好的作用活性呈現，其結構如 i 至 q 其抑制凋亡之活性除 o 以外皆低於 μM ，達到 nM 之濃度範圍，顯示其在對抗細胞凋亡之活性有較高之選擇性¹⁴⁻¹⁷。



因此以 1,3-benzothiazinone 衍生物來作為預防星狀細胞凋亡反應之化合物可能具有相當之利用價值。

Ceramide

Ceramide 為一內生性物質，屬於細胞膜成分之一的 sphingomyelin 之代謝物，在細胞內為重要的二級訊息傳遞者 secondary messenger，會因為 cellular type、

stage of cell development、ceramide 使用的濃度、subcellular location of ceramide accumulation 的差異，而有包括 differentiation、cell survival、cell cycle arrest、apoptosis 的調控作用²³。當 ceramide 之生成量大於排除量，造成 ceramide 之堆積時，就會引起細胞凋亡之反應。

而已知的神經退化性疾病如 Alzheimer's Disease 及 Parkinson's Disease 或缺血性腦傷害如 stroke，已經證明與 ceramide 之堆積有關係。這部分會在後面進行說明。

Ceramide 之生成主要經由下列途徑生成：(如圖 I 所示²⁴)

1. De novo synthesis

Ceramide 首先在 Endoplasmic reticulum(ER)經由 serine palmitoyltransferase (SPT) 縮合 serine 及 palmitoyl CoA 生成 3-ketosphinganine，接著由 3-ketosphinganine reductase 還原成 sphinganine，再與不同碳鏈長度之 fatty acid-CoA 經由 dihydroceramide synthase 結合，生成 dihydroceramide，接著經由 dihydroceramide desaturase 在 4-5 位上去飽和生成 trans 雙鍵，完成 ceramide 的生成。在自然界中，ceramide 會依據脂肪酸所帶碳數不同而有 2-28 個碳數長度之 ceramide 類型²⁴。本次使用的 C2-Ceramide 為在 sphingosine 2 位上進 N-acetylation 之短鍊 ceramide，可利於穿透細胞幫助實驗之進行。

2. Sphingomyline (SM) hydrolysis

Sphingomyelinase (SMase) 包括有 lysosomal acid SMase(aSMase)、plasma membrane-associated neutral SMase (nSMase)，能藉由水解 sphingomyline(SM)的 phosphodiester bond 生成 ceramide。

另外可以藉由 Ceramide synthase 將 sphingosine 與 fatty acid-CoA 結合生成 ceramide、Cerabosidase 將 glucosylceramide 糖基去除生成 ceramide、以及 Ceramide-1-Phosphate phosphatase 將 Ceramide-1-Phosphate 去除磷酸根生成 ceramide²⁴。

Ceramide 清除途徑包括有：由 Sphingomyline synthase (SMS) 將 phosphorylcholine group 轉移到 ceramide 上生成 Sphingomyline、Ceramidase (CDase) 將 ceramide 切成 sphingosine 及 free fatty acid、Glucosylceramide synthase 將糖基接到 ceramide 上生成 Glucosylceramide 以及由 Ceramide kinase 將 ceramide 磷酸化生成 Ceramide-1-Phosphate²⁴。

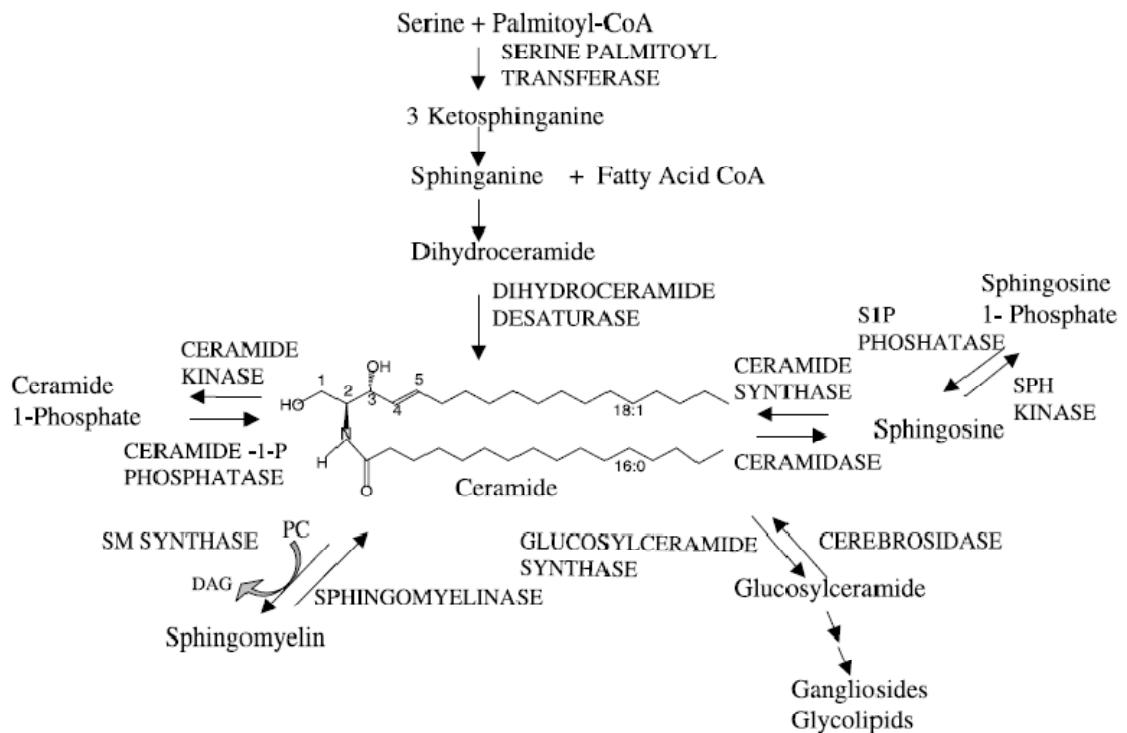


圖 I Ceramide 之生合成途徑

其中 De novo synthesis 與 SMase hydrolysis 引起的 ceramide 堆積與疾病有關係。而目前沒有證據顯示其他的 ceramide 生成途徑與疾病產生 ceramide 之堆積有關係²⁵。

Ceramide 引發細胞凋亡之機轉：

Ceramide 引發細胞凋亡的機轉主要分成兩種類型：

1. 作為二級傳遞訊號：(如圖 II 所示²⁴)

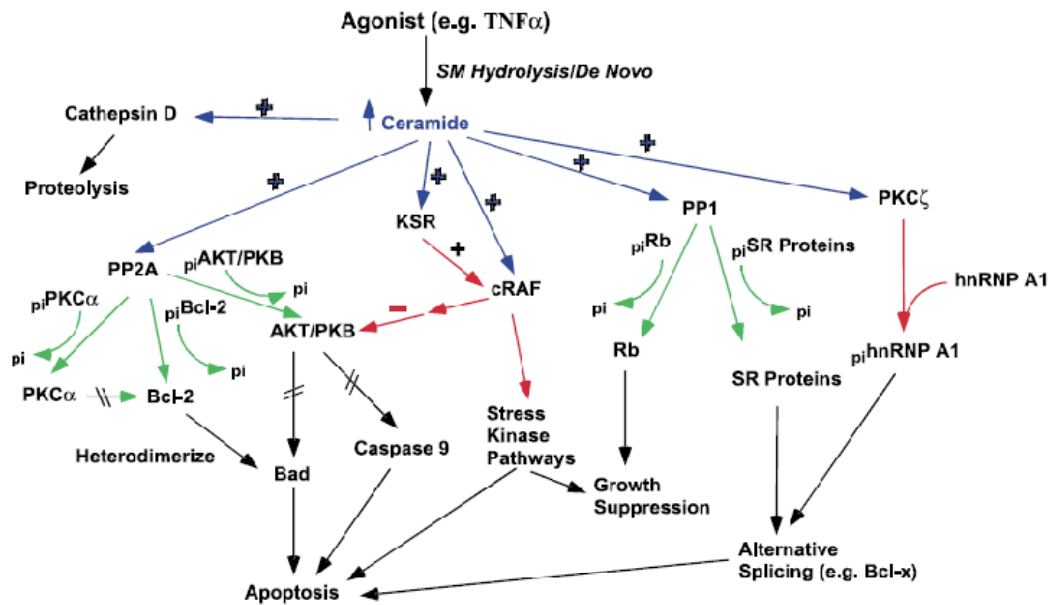


圖 II Ceramide 引發細胞凋亡之機轉

Ceramide 可以當作二級傳遞訊息直接與其調控之蛋白質結合，這些與調控細胞凋亡有關的蛋白質包括 ceramide activated protein kinase (CAPK)²⁶、²⁷、cathepsin D²⁸、serine/threonine protein phosphatases protein phosphatase 1 (PP1) and protein phosphatase 2A (PP2A)²⁹⁻³¹、protein kinase C ζ (PKC ζ)^{32, 33}、kinase suppressor of Ras (KSR)^{34, 35}、phospholipase A2^{36, 37}、Jun-N-terminal kinases (JNKs)^{34, 38}、c-Raf-1^{39, 40}、the small G-proteins Ras⁴¹、Rac^{42, 43} 及 Src-like tyrosine kinases^{44, 45}，最終造成細胞之凋亡。

2. Ceramide 本身具有的 signaling lipid 的功能

Ceramide 會自己聚集在細胞膜上，與 GSL- 及 cholesterol-containing rafts 融合，形成一個大的 signal macrodomain (signaling platform)，幫助如 FAS receptor 聚集，並進一步促進 FAS-associated death domain (FADD) protein 及 caspase 8 作用，造成細胞凋亡⁴⁶⁻⁴⁸。

另外可以直接在粒線體膜上型成通道，使 CytC 釋出，活化 caspase^{49, 50}、直接抑制粒線體呼吸傳遞鍊中的 complex III⁵¹、在粒線體內促進 ROS 產生⁵²也都是 ceramide 促進細胞凋亡的途徑。

Ceramide 與神經退化性疾病及缺血性腦傷害的關係：

Alzheimer's disease

在 Alzheimer's disease 中(如圖 III 所示)⁵³，A β amyloid peptide 25-35 可以藉由活化 nSMase 促進 sphingomyline 之 hydrolysis 促成 ceramide 生成及堆積，造成神經細胞之凋亡，對於 C6 glioma 也有相同的機轉⁵³。說明 ceramide 生成及堆積可能是 Alzheimer's disease 的重要致病機轉之一。

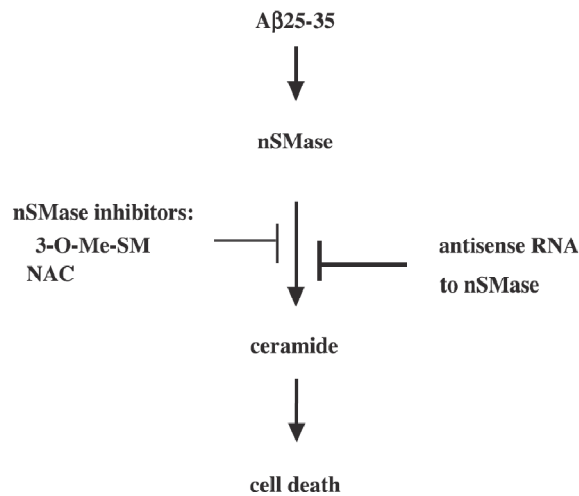


Fig. 6. Schematic diagram showing A β -induced cell death via generation of ceramide.

圖 III A β peptide 促進 nSMase 引發 ceramide 堆積及細胞凋亡機轉

Parkinson's disease

在 Parkinson's disease 中(如圖 IV 所示)，已知 dopaminergic 因 monoamine oxidase (MAO)在代謝 dopamine 時會生成 hydrogen peroxide(H₂O₂)，一般要清除 H₂O₂ 會藉由 glutathione (GSH) 達成，但當 GSH 量不足時，多出的 H₂O₂ 便會造成 oxidative stress 並促使細胞凋亡。有研究指出，GSH depletion 會促進 nSMase 之作用，使 ceramide 堆積，引發細胞凋亡反應⁵⁴。所以 ceramide 堆積可能也是 Parkinson's disease 的致病機轉之一。

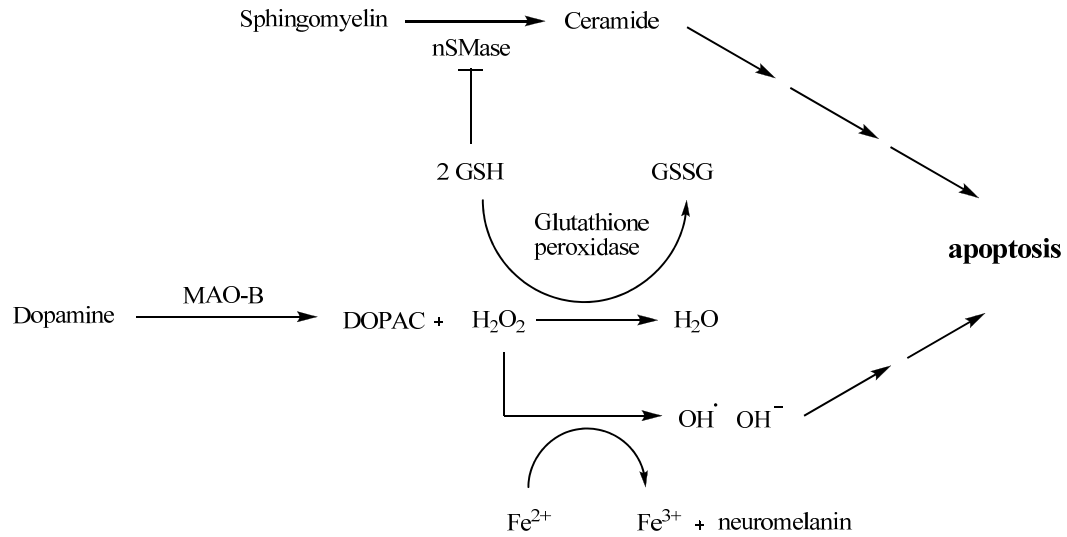


圖 IV Ceramide 於 PD 中引發之細胞凋亡機轉

Ischemic brain injury / Stroke

在 ischemic brain injury 例如 stroke 病人身上，同樣也有發現在缺血狀態下所造成 ceramide 濃度增加之現象，藉由 GSH 可以抑制 ceramide 的生成(如圖 V 所示)，也證明 ceramide 對於缺血性腦部傷害引起的細胞死亡有關係⁵⁵。

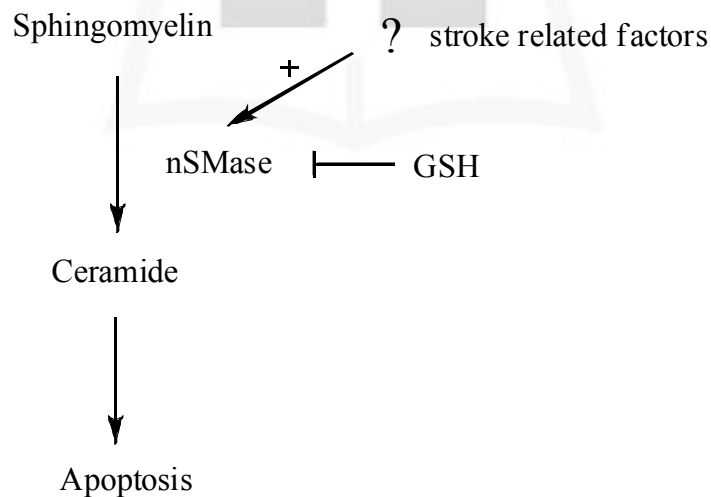


圖 V Ceramide 於 stroke 中引發之細胞凋亡機轉

另外會導致 ceramide 堆積之因子還包括 heat shock、ionizing radiation、oxidative stress、progesterone、vitamin D3、daunorubicin、tumor necrosis factor

(TNF)-a、interleukin (IL)-1a、IL-1b、interferon-g、Fas ligand、fenretinide、oxidized lowdensity lipoprotein (LDL) 以及 nitric oxide^{56, 57}。

如果以 1,3-Benzothiazinone 衍生物來作為預防星狀細胞因利用 ceramide 模擬神經退化性疾病所引發之凋亡反應之化合物，可能具有開發出細胞保護功能之化合物。

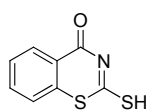


二、研究方法及目的

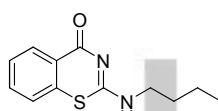
化學部份

下列為合成之 2-Substituted 4H -1,3-Benzothiazin-4-one 衍生物

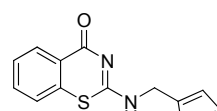
其中 compound 1 及 2 為中間產物，compound 3 為 compound 2 之水解產物
compound 4 至 21 為分別以 hydrazine、aliphatic amine、aromatic amine、
heterocyclic amine 及 cyclic amine 合成之化合物，試比較於二號位置上不同原子
大小、碳鏈長度、環的大小、環之芳香性及非芳香性及含有雜原子之芳香環是否
對於化合物之生物活性具有影響。



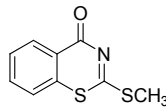
1



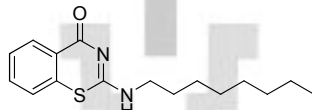
8



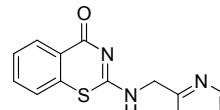
15



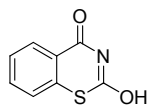
2



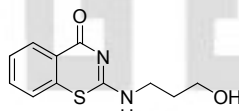
9



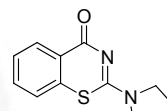
16



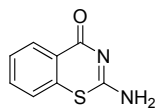
3



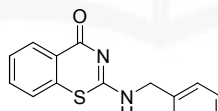
10



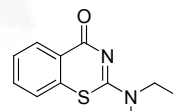
17



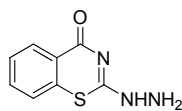
4



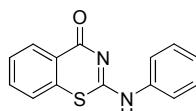
11



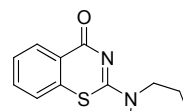
18



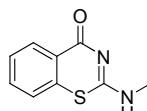
5



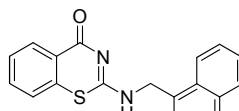
12



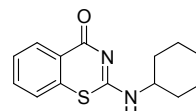
19



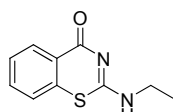
6



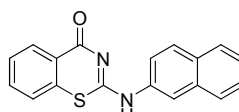
13



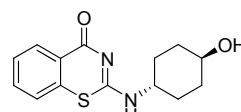
20



7



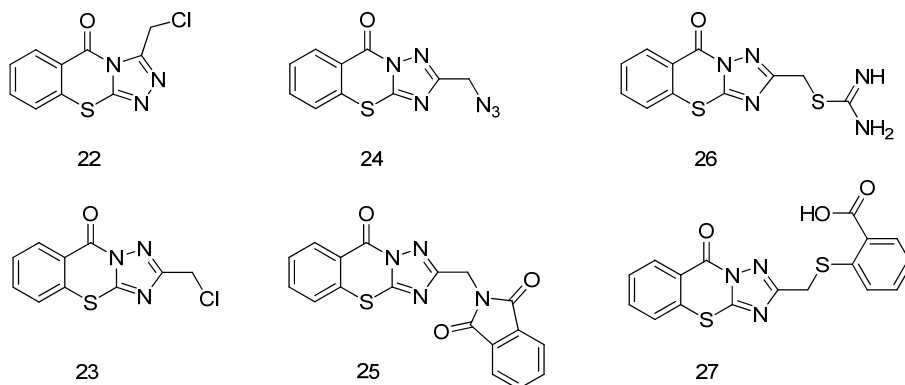
14



21

下列為合成之 2-Substituted 1,2,4-triazolo[5,1-b][1,3] benzothiazin-9-ones 衍生物

其中 compound 24 至 26 為用 compound 23 進行取代，以比較增加化合物極性是否對於化合物之生物活性具有影響。



活性部份

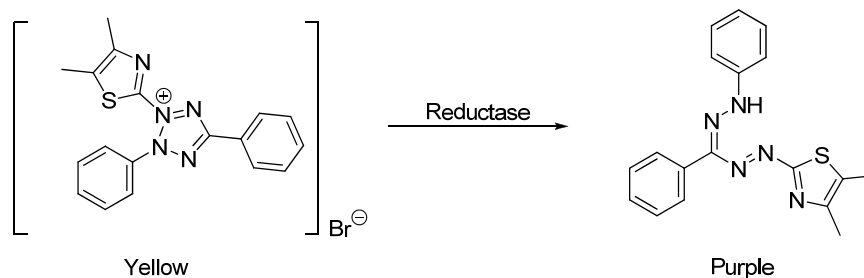
以 C2-Ceramide 對 C6-glioma 引發之凋亡反應作為神經傷害及神經退化性疾病藥物治療以達到細胞保護作用之藥物篩選模型：

由第一部分之討論可以歸納出星狀細胞的功能與神經病變之關聯以及 ceramide 與神經病變之關聯，而且短鍊 C2-ceramide 已被證明具有與 ceramide 相等之作用特性，及實驗上有利於穿透細胞膜之特點⁵⁸，加上 C6-glioma 已被應用在研究神經病變如 Alzheimer's disease、Parkinson's disease 與 ceramide 之關聯性上，因此本次實驗利用 C2-Ceramide 對 C6-glioma 引發之凋亡反應作為神經傷害及神經退化性疾病藥物治療以達到細胞保護作用之藥物篩選模型。

MTT Assay (評估細胞存活率)

原理：

黃色的 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 會在活細胞中被粒線體的 reductase 還原成紫色的 formazan，如下圖所示。



如果活細胞越多，則 MTT 被還原的能力也越強，所以可以作為細胞在加入試藥後存活或死亡的初步篩選工具。紫色結晶物(Formazan)可以 DMSO : 95% EtOH=1 : 1 之混合溶液加以溶解，並以分光光度計加以定量，區別試藥對細胞是否具有毒性之判別。Formazan 之 OD 值 570 nm 為最高；550-600 nm 為可測範圍^{59, 60}。

C2-Ceramide Assay

原理：(如下圖 VI 所示)

先將藥物加入後作用一段時間，當作預防性用藥。再加入 C2-Ceramide 來模擬退化神經性疾病之凋亡作用來測試試藥是否具有阻斷與其相關之凋亡程序進行達到保護細胞之功能，並以 MTT assay 作為測定細胞存活率之方法^{53, 61}。

依預先加藥作用時間長短來粗略推測化合物可能的作用機轉。三小時之作用為相對較短時間，如果化合物在相對較短時間產生作用，其作用可能藉由化合物直接與標的分子結合而產生直接的保護效果。二十四小時之作用為相對較長時間，足夠讓基因進行表現，如果化合物在相對較長時間產生作用，其作用可能藉由基因調控產生之物質來間接達成保護效果。

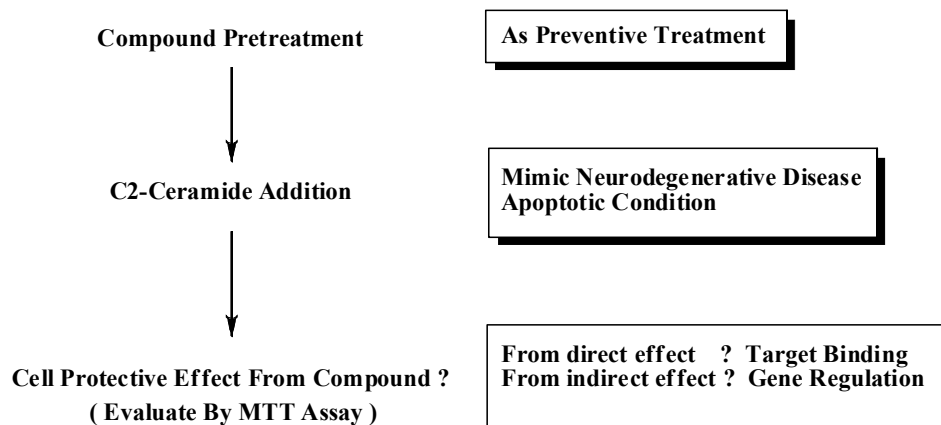


圖 VI C2-Ceramide Assay 示意圖

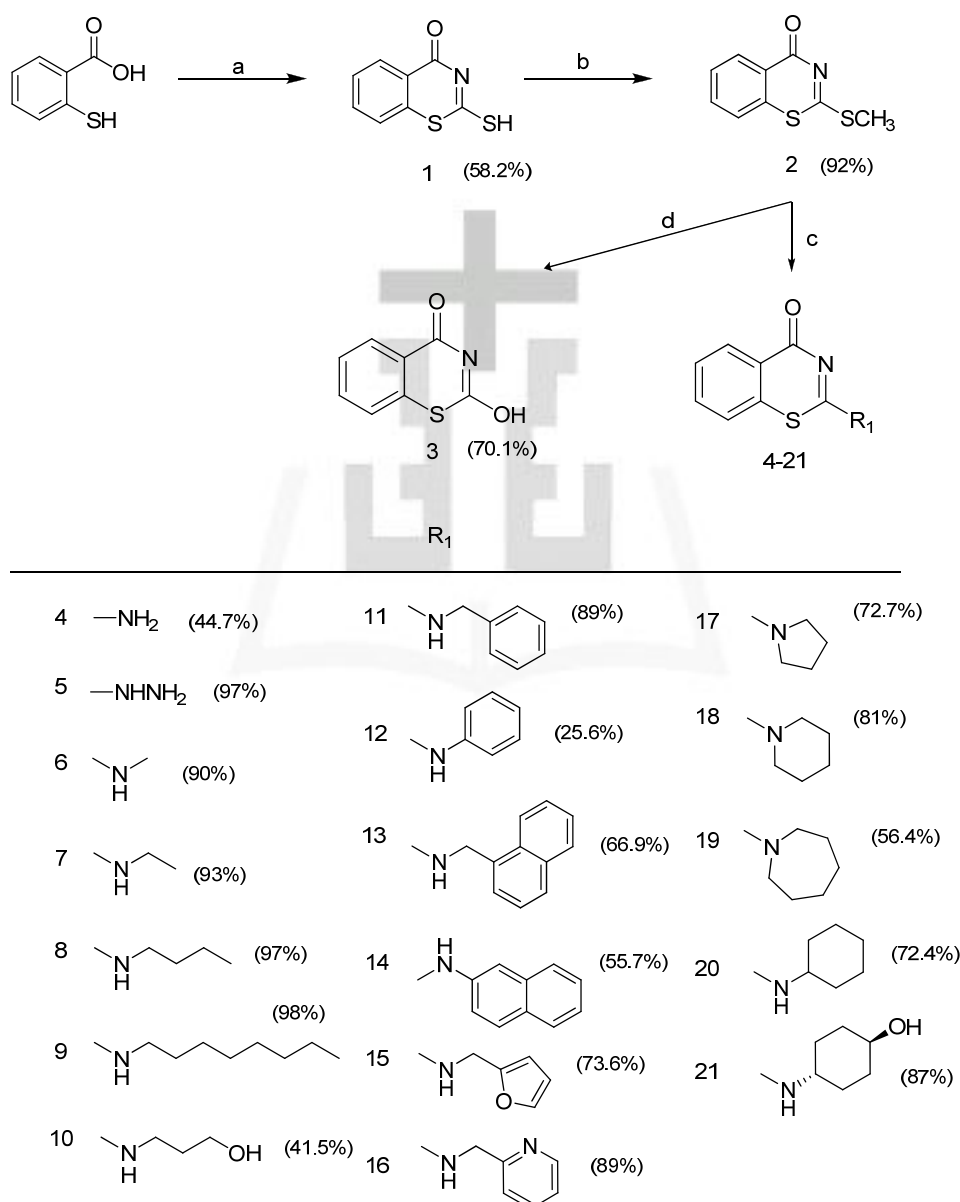
三、結果與討論

化學合成

2-Substituted 4H-1,3-Benzothiazin-4-one 衍生物之合成主要是參考石碧珍團隊於 1988 年所發表之高產率合成方法⁶²進行修改，合成目標化合物。

合成流程如 Reaction Scheme 1 所示：

Reaction Scheme 1 of Compounds 1-21

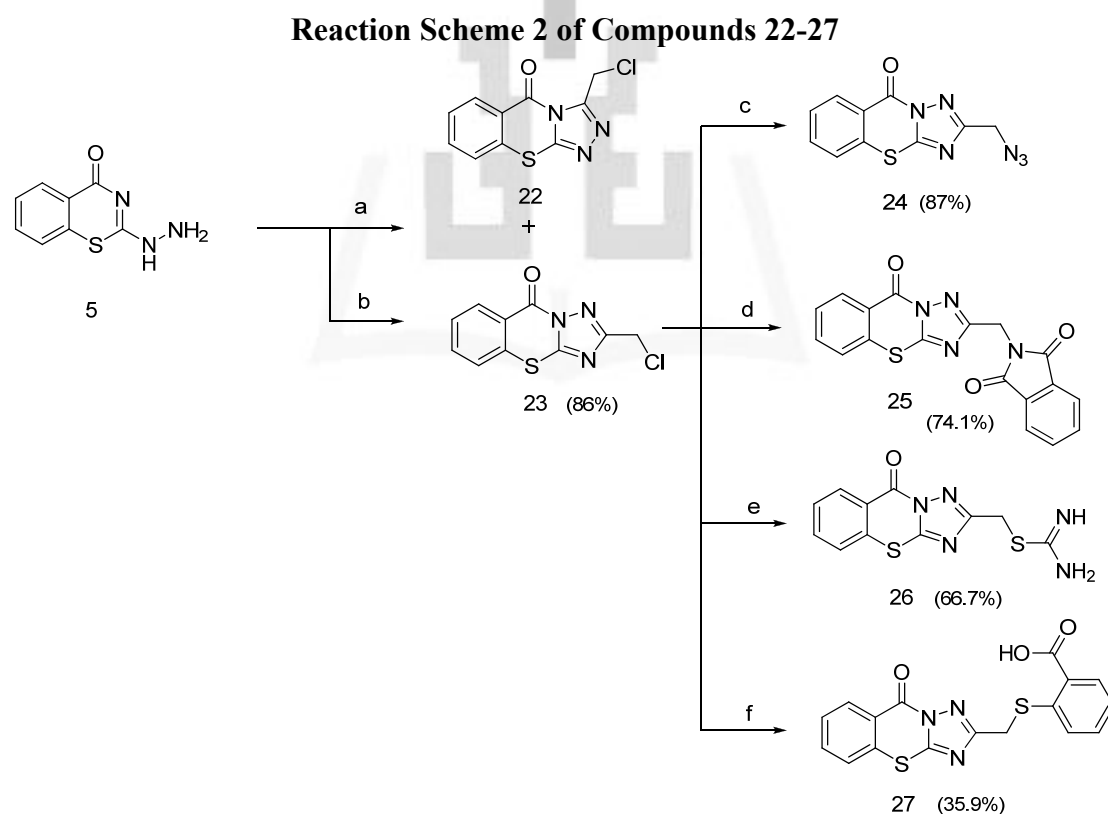


Reagents and conditions: (a) KSCN, Acetic acid, 110°C, 5h ; (b) CH_3I , 0.5N NaOH(aq), room temperature, overnight;(c) corresponding amines , MeOH or CH_2Cl_2 , room temperature; (d) H_2O , Con.HCl, reflux, 2h.

首先經由 thiosalislyic acid 以 acetic acid 為 solvent 與 potassium thiocyanate 於 110°C 下作用生成 compound 1，再將 compound 1 溶於 0.5N NaOH (aq) 中，以 methyl iodide 進行 methylation 生成 compound 2，再藉由 amine 對二號位置上之 thioether 於室溫下進行取代得到 compound 4-21，另外將 compound 2 於濃鹽酸水溶液下加熱水解得到 compound 3。並進行 2-Substituted 4H-1,3-Benzothiazin-4-one 衍生物生物活性之評估。

另外，又根據 Liu, Kang Chien 團隊於 1990 年所發表，以二號位置取代衍生物並進行環化之衍生物合成方法進行修改合成 Condensed 1,3-benzothiazinones：1,2,4-triazolo[5,1-b][1,3]benzothiazin-9-ones⁶³，並合成四個二位取代之 1,2,4-triazolo[5,1-b][1,3]benzothiazin-9-ones 衍生物。

合成流程如 Reaction Scheme 2 所示：



Reagents and conditions: (a) chloroacetyl chloride, DMF, r.t., 2h ; (b) chloroacetyl chloride, DMF, 100-110°C, 18h, (86%); (c) NaN₃, DMSO, r.t., O/N, (87%); (d) potassium phthalimide, KI, DMF, r.t., O/N, (74.1%); (e) thiourea, KI, DMF, 100°C, 30min, (92%) ; (f) thiosalislyic acid, NaOH(aq), DMF, r.t., O/N, (35.9%).

首先經由compound 5以DMF為solvent與chloroacetyl chloride於35°C下作用生成compound 22及23，compound 22是經由Dimroth-like rearrangement⁶⁴的方式生成compound 23，但實際的機轉並不明確，其中如果把加熱溫度變更為100-110°C及延長反應時間至18h則可得到單一產物compound 23。將compound 23與sodium azide以DMSO為solvent於室溫下作用隔夜得到compound 24⁶⁵；將compound 23與potassium phthalimide, potassium iodide以DMF為solvent於室溫下作用隔夜得到compound 25⁶⁶；將compound 23與thiourea, potassium iodide以DMF為solvent於100°C下作用30分鐘得到compound 26⁶⁷；將thiosalicylic acid 溶在NaOH(aq)溶液中，再加入compound 23及DMF於室溫下作用隔夜生成compound 27⁶⁸。並評估二位取代之1,2,4-triazolo[5,1-b][1,3]benzothiazin-9-ones衍生物其增加極性基團時對活性之影響。

圖譜解析

合成的化合物中，其中化合物 8、9、13、15、16、19、20、21、24、25、26、27 為新化合物，以下就光譜部分進行討論：

2-Substituted 4H -1,3-Benzothiazin-4-one 衍生物其 carbonyl 基團位在 lactam 結構上，其吸收範圍因週圍環境之共振或拉電子機團的誘導效應關係在 1650 cm^{-1} 附近有強吸收，尤其當二號位置接上氮原子後，其電子環境會因共振作用而更趨於穩定，降低原子間的極性差異，因此 carbonyl 的 force constant 會降低，觀察到的位置為 1630 cm^{-1} 附近⁶⁹。

1,2,4-triazolo[5,1-b][1,3]benzothiazin-9-ones 衍生物其 carbonyl 基團位在兩個共振結構中間，雙方都呈現拉電子狀態，因此其吸收呈現在 1710 cm^{-1} 左右之範圍。

2-substituted 4H -1,3-benzothiazin-4-one 衍生物基本骨架中位於 5、6、7、8 號苯環上的 H 為骨架的基本判斷位置，其中 5 號位置因為 4 號位置 carbonyl 之影響而呈現在較 down field 的範圍，大於 δ 8.0。在碳譜部份則是藉由判斷 5、6、

7、8 號苯環上的碳及 4 號 carbonyl 及 2 號 imine 的碳為骨架的基本判斷位置，苯環上的碳範圍在 δ 120-140 左右，C-4 在 δ 170 左右，C-2 則在 δ 160 左右。

1,2,4-triazolo[5,1-b][1,3]benzothiazin-9-ones 衍生物基本骨架中位於 5、6、7、8 號苯環上的及二號位置上的兩個 H- α 為骨架的基本判斷位置，其中 8 號位置因為 9 號位置 carbonyl 之影響同樣呈現在較 down field 的範圍，大於 δ 8.0。

將基本骨架判斷出來後，剩下的則是所使用來取代的結構部分判定：

在化合物 8 中之長練部份，其氫譜呈現的是 H- α 、 β 、 γ 分別位在 δ 3.53、 δ 1.71、 δ 1.41 及尾端的甲基 δ 0.92；碳譜部分則是 δ 42.59 (C- α)、 δ 31.21 (C- β)、 δ 20.04 (C- γ)、 δ 13.73 (C- δ)。

在化合物 9 中之長練部份，其氫譜呈現的是 H- α 、 β 位在 δ 3.48、 δ 1.73，H- γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ 、 η 位在 δ 1.24-1.38 間及尾端的甲基 δ 0.84；碳譜部分則是 δ 42.93 (C- α)、 δ 31.66 (C- β)、 δ 29.13 (C- γ)、 δ 29.09 (C- δ)、 δ 28.97 (C- ϵ)、 δ 26.81 (C- ζ)、 δ 22.50 (C- η)、 δ 13.96 (C- θ)。

在化合物 13 中之 methylnaphthalene 部份，其氫譜呈現的是包含基本骨架共有十個苯環上的氫，範圍從 δ 7.45-8.02，而 H- α 則位在 δ 1.25；碳譜部分則是共有十四個苯環上的碳，範圍從 δ 133.37-122.88，而 C- α 位在 δ 43.24。

在化合物 15 中之 furan 部份，其氫譜呈現 H-3' 及 H-4' 於 δ 6.36-6.42 之間，H-5' 位在 δ 7.45，而 H- α 則位在 δ 4.65；碳譜部分則是 δ 150.54 (C-2')、 δ 142.63 (C-5')、 δ 110.63 (C-4')、 δ 108.15 (C-3')，而 C- α 位在 δ 38.04 (C- α)。

在化合物 16 中之 pyridine 部份，其氫譜呈現包含基本骨架共有八個共振環上的氫，而 H- α 則位在 δ 4.93；碳譜部分則是共有十個共振環上的碳，範圍從 δ 117.57-138.68，C-2' 位在 δ 147.19，而 C- α 位在 δ 45.85。

在化合物 19 中之 azepane 部份，其氫譜呈現 H-2' 位在 δ 3.99，H-7' 位在 δ 3.64，H-3',6' 位在 δ 1.83 而 H-4',5' 則位在 δ 1.59；碳譜部分則是 C-2' 位在 δ 49.40，C-7' 位在 δ 48.99，C-3',6' 位在 δ 27.27，C-4',5' 位在 δ 26.70。

在化合物 20 中之 cyclohexyl 部份，其氫譜呈現 H-2'位在 δ 2.06，H-6'位在 δ 1.75，H-3',5'位在 δ 1.64，H-4'位在 δ 1.42，但 H-1'沒有出現在圖譜中；碳譜部份則是 C-2',6'位在 δ 32.61，C-4'位在 δ 25.18，C-3',5'位在 δ 24.62。值得注意的是，雖然苯環的基本架構皆有顯示，但卻未顯示出 C-2 及 C-4 的訊號，且苯環的碳譜訊號 C-7 δ 132.06，C-5 δ 127.62，C-8 δ 125.21 也相當弱，且兩次的碳譜測定皆得到同樣的結果，目前並不清楚是甚麼原因造成這樣的現象，但結構在判定上由氫譜及碳譜所得的數據來看應該是沒有問題。

在化合物 21 中之 cyclohexanol 部份，其氫譜呈現 H-4'位在 δ 4.61，H-1'位在 δ 3.97，H-2',6'位在 1.82-1.90，H-3',5'位在 1.20-1.37；碳譜部份則是 C-4'位在 δ 68.04，C-1'位在 δ 50.41，C-3',5'位在 δ 33.78，C-2',6'位在 δ 29.71。

在化合物 24 中，azide 部分可由 IR 吸收在 2136, 2104, 2082 cm^{-1} 觀察到⁷⁰，且 H- α 之化學位移由 δ 4.76 移到 δ 4.69。

在化合物 25 中，phthalimide 部分，其氫譜呈現包括基本骨架共有 7 個苯環上的氫，範圍從 δ 7.61-7.91，且 H- α 之化學位移由 δ 4.76 移到 δ 5.16 更 down field 的位置。

在化合物 26 中，thiourea 呈現的是 protonation 帶正電的狀態，所以其氫譜上呈現在非常 down field 的範圍，位在 δ 9.30 共有 4 個 thiourea 的氫。

在化合物 27 中，thiosalicylic acid 部份，其氫譜呈現包括基本骨架共有 7 個苯環上的氫，範圍從 δ 7.21-7.98。

合成討論

化合物 4、10、12 為已知化合物，為根據先前的作法所合成的化合物，但並沒有如預期的較高產率，可能因為化合物較高的溶解度，在處理過程中流失掉有關。

另外化合物 27 的低產率可能與化合物本身不耐鹼的特性有關，在測試實驗過程中會發現，只要加入強鹼，化合物本身會立刻改變，變得極性高無法以 TLC

觀察，且容易溶在 MeOH 或水中，與起始物只易溶在 DMSO 相差許多。所以當加入起始物於鹼性溶液時可能造成了部份起始物的破壞，連帶降低產率。

細胞保護作用評估

C2-Ceramide Assay 反應條件確認實驗

在細胞保護作用評估時首先進行 C2-Ceramide 濃度對於凋亡反應的確認。一方面因為 C2-Ceramide 是從生物體萃取後進行之半合成產物，要避免因其他因素造成之實驗失敗，也同時要找出適合我們實驗室操作之適當濃度。

實驗結果如(圖 VII)所示：

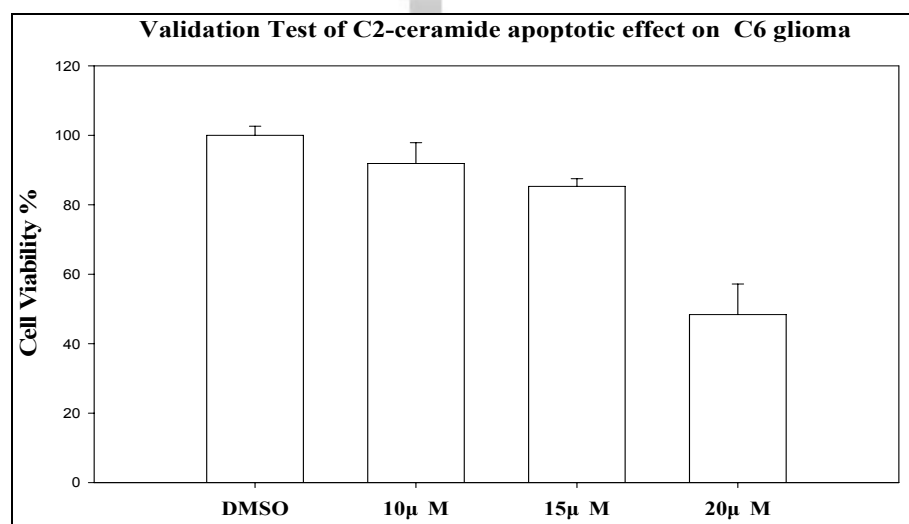


圖 VII C2-Ceramide Assay 反應條件確認實驗

我們最後以五萬顆細胞，在 **20µM** C2-Ceramide 下作用 24h 作為模擬星狀細胞在神經退化性疾病及傷害下之凋亡過程，進行藥物篩選之實驗條件。

C2-Ceramide Assay 藥物篩選實驗

在作藥物篩選時，我們的作法是先除去在初篩中會增加凋亡作用的試藥後，再以 **10µM** 預先處理試藥三小時後才加入 C2-Ceramide 的方式進行試驗。

實驗結果如(圖 VIII)所示：

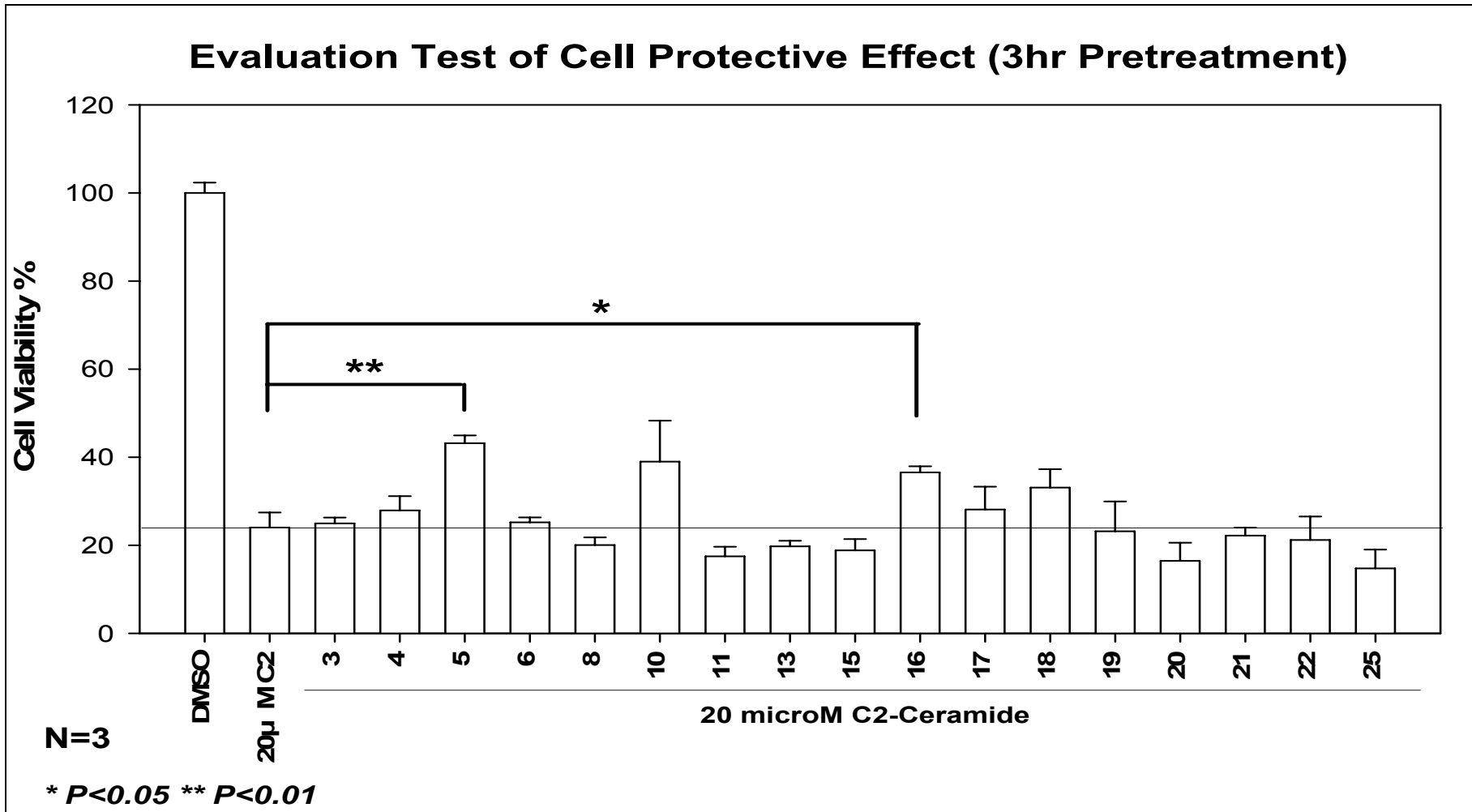


圖 VIII C2-Ceramide Assay 藥物篩選實驗

其中 Compound 5 及 Compound 16 在統計上具有顯著之差異性顯示，其作用可能與化合物直接與標的分子結合有關係。但觀察細胞外觀仍呈現皺縮之球狀。

另外因為 2-Substituted 4H -1,3-Benzothiazin-4-one 衍生物在細胞毒性測試中呈現之增長現象，為作用 24h 所得之結果，為了解這些化合物是否會藉由進一步之基因調控達到細胞保護之作用，所以將上組化合物中明顯高於 C2-Ceramide 組之化合物以 10 μ M 進行試藥預處理 24h 後再加入 C2-Ceramide 的方式進行試驗。

實驗結果如(圖 IX)所示：

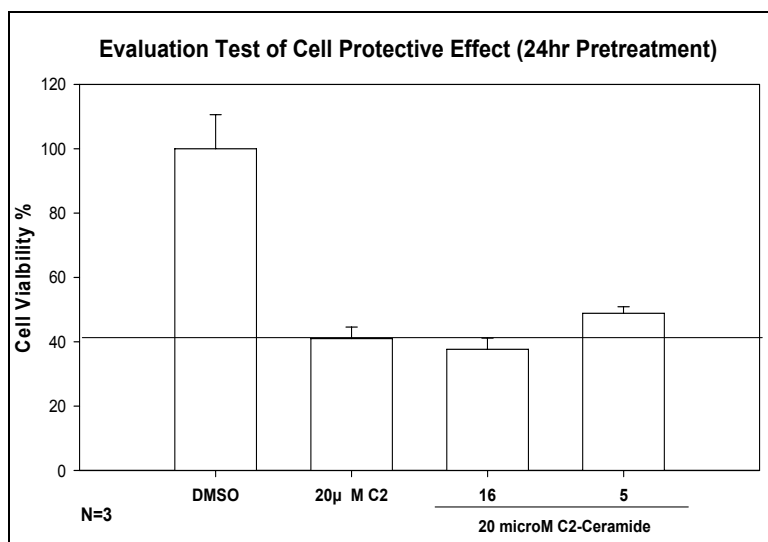


圖 IX (a) C2-Ceramide assay of compound 5 and 16 in 24hr pretreatment

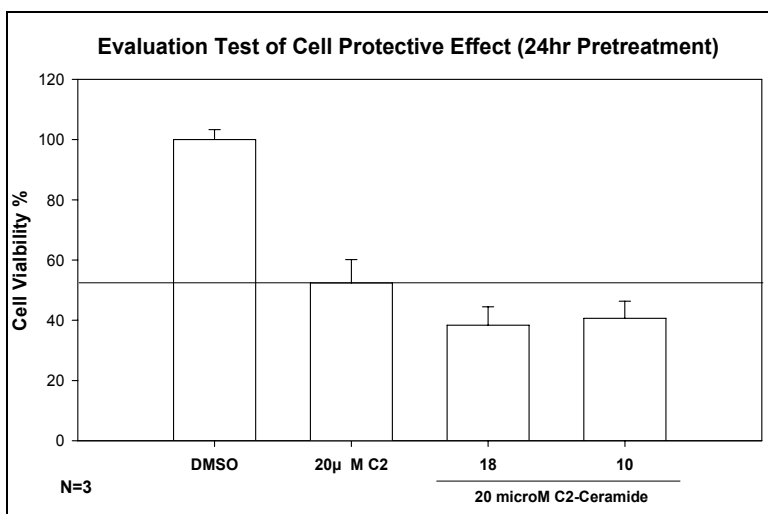


圖 IX (b) C2-Ceramide assay of compound 10 and 18 in 24hr pretreatment

其中只有 compound 5 在 24h 作用下仍具有微弱的保護作用趨勢。但在統計上卻看不出明顯的差異性。

我們又進一步確認 compound 5 是否具有 dose-dependent 的保護作用。

實驗結果如(圖 X)所示：

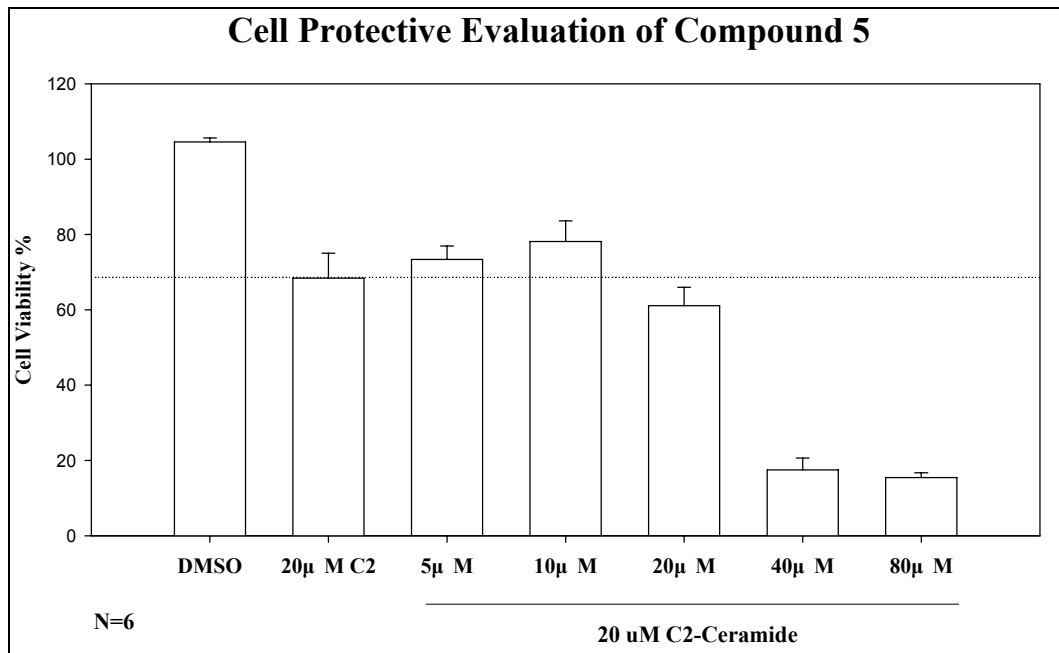


圖 X C2-Ceramide assay of compound 5 in dose dependent 24hr pretreatment

Compound 5 在 5 及 10 μM 下確實呈現隨濃度增加保護作用增加之趨勢，但在統計上沒有顯著差異，且在到達 20 μM 以上即呈現出毒性作用。

綜合上述資料發現，2-Substituted4H -1,3-Benzothiazin-4-one 衍生物在細胞保護上看不出有結構與活性之作用關係，其中 compound 5 在三小時預處理下具有顯著保護作用，另外在二十四小時實驗下呈現出隨濃度增加而有增加保護作用之趨勢，顯示 compound 5 可能同時具有直接作用在標的分子及藉由基因調控達到保護細胞功能之作用，但事實上是否真由這兩種方式達到保護之作用必須再進一步以實驗確認，本實驗只能提供初步之方向及確認 compound 5 的確具有細胞保護之作用。如果以 compound 5 作為 lead compound 並設法降低其毒性，或許有機會開發出具有細胞保護作用之化合物。

四、實驗部份

儀器與試藥

Acros Belgium	furfuryl amine, hydrazine monohydrate, potassium phthalimide, trans-4-aminocyclohexanol, aniline, cyclohexylamine
Aldrich USA	3-aminopropanol
Alfa Aesar USA	hexamethyleneimine, 2-(aminomethyl)pyridine
Cambridge Isotop Laboratory Inc. UK	<i>d</i> -chloroform, <i>d</i> -DMSO
Fisher Scientific USA	DMSO
Fluka Chem AG Switzerland	chloroacetylchloride
Hayashi Japan	methyl iodide
Janssen Belgium	n-butylamine, piperidine, pyrrolidine
Labguard USA	methyl alcohol
Lancaster UK	1-naphthmethyleneamine, n-Octylamine
Merck Germany	acetic acid, dichloromethan, DMF, Potassium iodide, thiourea
Shimakyo Japan	potassium thiocyanate, HCl
Sigma USA	Sodium azide, C2-ceramide (N-Acetyl-D-sphingosine)
Sinyl chemica	1-naphthalenamine
Taiwan Taiwan	NaOH
TEDIA USA	ethylamine
WAKO USA	methylamine
TCI Japan	benzylamine

熔點測定儀：

Laboratory Devices MET-TEMP II apparatus USA

電子溫度計：

Fluke 51 k/J thermometer USA 未校正

紅外光譜儀：

ThermoMattson IR 300 USA

Bio-Rad spectrometer console USA

核磁共振儀：

Bruker AM300 (300 MHz for ^1H , 75 MHz for ^{13}C) Germany

Bruker DRX-500 (500 MHz for ^1H , 125 MHz for ^{13}C) Germany

Bruker AVANC-400 (400 MHz for ^1H , 100 MHz for ^{13}C) Germany

減壓濃縮機：

Büchi Rotavator R-200 Switzerland

油壓式抽汽機：

ULVAC G-100D Japan

加熱板：

CORNING Laboratory Stirrer / Hot plate PC-series USA

微量電動天平：

SCALTEC SBC 31 Germany

電動天平：

METTLER Globalance PJ-1000 USA

玻璃儀器：

永旭行 台灣

東光玻璃 台灣

多孔讀盤機：

Fluostar Optima Germany

化合物合成流程及光譜資料

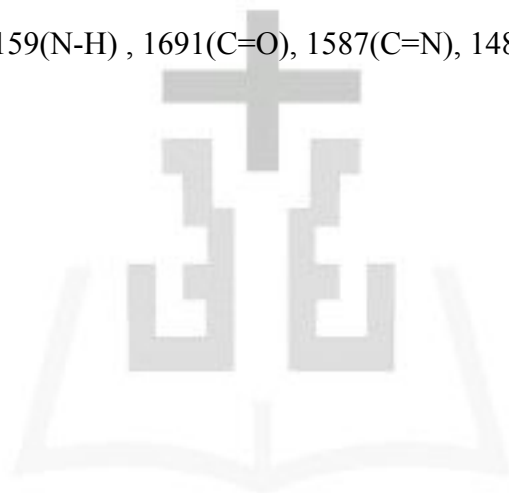


化合物(1)

2-mercapto-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one

取 3g (19.46 mmole) 2-thiosalicylic acid 及 3.78g (38.9mmole) potassium thiocyanate 置於 100 ml 圓底瓶中，加入 acetic acid 25ml 於油浴上加熱至 110 °C 6 小時，冷卻後將黃色沉澱以布氏漏斗抽氣過濾，以水沖洗 3-4 次，乾燥後，共得產物 2.21g (58.5%)；以 acetic acid 作再結晶，得黃色針狀結晶；熔點 237-241 °C (Ref²² : 232-233°C)

IR(KBr)cm⁻¹ : 3159(N-H), 1691(C=O), 1587(C=N), 1480, 1438 (C=C), 1337 (C-N), 740 (Ar-H)

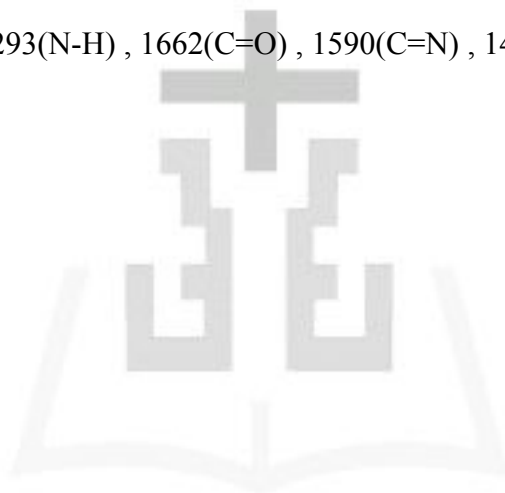


化合物(2)

2-(methylthio)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one

取 10g (47.78 mmole) 化合物 1 置於 250 ml 圓底瓶中，加入 NaOH(aq) (2.32 g 溶於 70ml 水中)，攪拌至溶解呈黃色溶液，加入 8g (56.36 mmole) methyl iodide，約 2 分鐘後白色沉澱析出，再加入 100-150ml 水並用力攪拌 7 小時。將白色沉澱以布氏漏斗抽氣過濾，以水沖洗，乾燥後，共得產物 9.82g (92%)；以 MeOH 作再結晶，得白色絮片狀結晶；熔點 128-129 °C (Ref²² : 126-127°C)

IR(KBr)cm⁻¹ : 3293(N-H) , 1662(C=O) , 1590(C=N) , 1437(C=C) , 1403(C-N) ,
738 (Ar-H)



化合物(3)

2-hydroxy-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one

取 0.5g (2.39 mmole) 化合物 2 置於 25 ml 圓底瓶中，加入 5ml water 及 5ml 濃鹽酸後加熱迴流 1 小時。將白色沉澱抽氣過濾，以水沖洗，乾燥後，共得產物 0.3g (70.1%)；以 MeOH 作再結晶，得細粒白黃色結晶；熔點 212-213 °C (Ref²² : 211°C)

IR(KBr)cm⁻¹ : 3331(N-H) , 1664(C=O) , 1585(C=N) , 1444(C=C) , 1358 (C-N) , 740 (Ar-H)

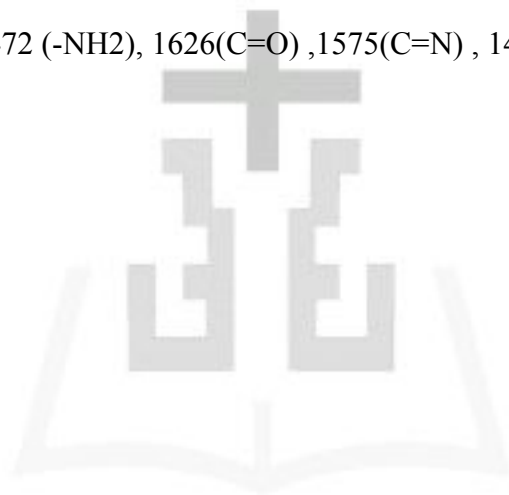


化合物(4)

2-amino-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one

取 210mg (1 mmole) 化合物 2 置於 25ml 圓底瓶中，加入 MeOH 17 ml 攪拌至溶解呈無色溶液，加入 140mg (4 mmole) ammonia water，室溫下作用 1 天，反應完成後將溶劑以減壓濃縮機抽乾，加入水後收集白色固體，將白色固體抽氣過濾，以水沖洗，乾燥後，共得產物 80mg (44.7%)；熔點 281-284 °C (Ref²² : 275-276°C)

IR(KBr)cm⁻¹ : 3472 (-NH₂), 1626(C=O), 1575(C=N), 1440 (C=C), 1335 (C-N), 740 (Ar-H)

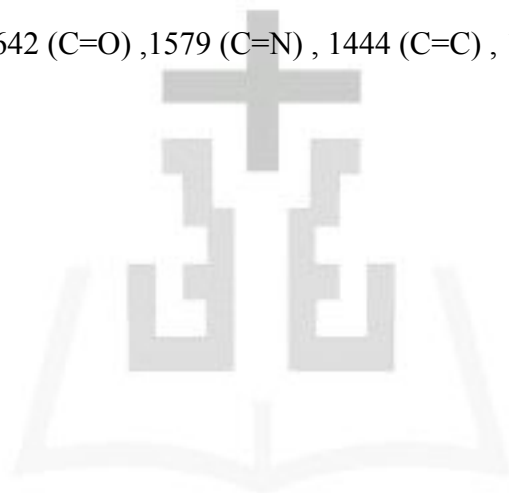


化合物(5)

2-hydrazinyl-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one

取 2.91g (18.87mmole) 化合物 2 置於 100ml 圓底瓶中,加入 MeOH 50 ml 攪拌呈白色懸浮液,加入 762 mg (20.37mmole) hydrazine monohydrate, 呈淡黃綠色懸浮液,室溫下作用 4 小時,反應完成後將但綠色固體直接以布式漏斗抽氣過濾,以 MeOH 20ml 沖洗兩次,乾燥後,共得產物 2.59 g (97%); 熔點 230-232 °C (Ref⁶² : 232-234°C)

IR(KBr)cm⁻¹ : 1642 (C=O) ,1579 (C=N) , 1444 (C=C) , 1313 (C-N) ,749(Ar-H)



化合物(6)

2-(methylamino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one

取 200mg (0.956 mmole) 化合物 2 置於 25ml 圓底瓶中，加入 MeOH 13 ml 攪拌至溶解呈淡黃色溶液，加入 99mg (1.3 mmole) 40 % methylamine，約 5 分鐘黃色溶液變成懸浮液，室溫下作用 1 天，反應完成後，直接將白色固體抽氣過濾，以水沖洗，乾燥後，共得產物 166mg (90%)；以 MeOH 作再結晶，得白色絮狀結晶；熔點 256-257 °C (Ref⁷¹ : 251-252°C)

IR(KBr)cm⁻¹ : 2822 (C-H), 1606 (C=O), 1560 (C=N), 1454 (C=C), 1416 (C-N), 735(Ar-H)

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 500 MHz) : δ(ppm) 8.86 (s, 1H, -NH-), 8.17 (m, 1H, H-5), 7.42-7.59 (m, 3H, Ar-H), 2.91 (s, 3H, N-CH₃)

化合物(7)

2-(ethylamino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one

取 200mg (0.956 mmole) 化合物 2 置於 25ml 圓底瓶中，加入 MeOH 12 ml 攪拌至溶解呈淡黃色溶液，加入 73.9 mg (1.1 mmole) 70% ethylamine，溶液變成綠黃色，室溫下作用 2 天，反應完成後將溶劑以減壓濃縮機抽乾，加入水後收集黃色固體，將黃色固體抽氣過濾，以水沖洗，乾燥後，共得產物 184mg (93%)；以 MeOH 作再結晶，得白色針狀結晶；熔點 171-173 °C (Ref⁷² : 176-177°C)

IR(KBr)cm⁻¹ : 2968,2861 (C-H), 1638 (C=O),1594 (C=N), 1468 (C-CH₃) 1442 (C=C), 746 (Ar-H)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) : δ(ppm) 8.41-8.45 (m, 1H,H-5), 7.34-7.66 (m, 3H , Ar-H), 3.63 (s, 2H, N-CH₂), 1.24-1.49 (m, 3H, -CH₃)

化合物(8)

2-(butylamino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one

取 200mg (0.956 mmole) 化合物 2 置於 25ml 圓底瓶中，加入 MeOH 11 ml 攪拌至溶解呈淡黃色溶液，加入 98mg (1.1 mmole) n-butylamine，約 5 分鐘溶液變成黃色，室溫下作用 2 天，反應完成後將溶劑以減壓濃縮機抽乾，加入水後又加入數滴 acetic acid，靜置使沉澱完全。將黃色固體抽氣過濾，以水沖洗，乾燥後，共得產物 218mg (97%)；以 MeOH 作再結晶，得灰白色細粒晶；熔點 130-132 °C

IR(KBr) cm^{-1} : 2953,2860 (C-H), 1636(C=O), 1598(C=N), 1442 (C=C),

742(Ar-H)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) : δ (ppm) 8.40 (m , 1H , H-5) , 7.24-7.48 (m , 3H , Ar-H) , 3.53 (s , 2H , H- α) , 1.71(s , 2H , H- β) , 1.41(s , 2H , H- γ) , 0.92(s , 3H , CH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) : δ (ppm) 165.59 (C-4), 165.53 (C-2), 132.21 (C-7) , 131.98 (C-4a) ,130.21 (C-5) , 127.90 (C-8) , 125.60 (C-6) ,123.35 (C-8a) , 42.59 (C- α) , 31.21(C- β) , 20.04 (C- γ) , 13.73 (C- δ)

化合物(9)

2-(octylamino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one

取 200mg (0.956 mmole) 化合物 2 置於 25ml 圓底瓶中，加入 MeOH 12 ml 攪拌至溶解呈淡黃色溶液，加入 151mg (1.1 mmole) n-Octylamine，溶液變成綠黃色，室溫下作用 2 天，反應完成後將溶劑以減壓濃縮機抽乾，加入水後收集黃色固體，將黃色固體抽氣過濾，以水沖洗，乾燥後，共得產物 271.8mg (98%)；

以 MeOH 作再結晶，得白色結晶；熔點 141-142 °C

IR(KBr)cm⁻¹ : 2954 , 2920 , 2850 (C-H) , 1636 (C=O) , 1601 (C=N) , 1464 (C-CH₃) 1441 (C=C) , 746 (Ar-H)

¹H-NMR (CDCl₃ , 500 MHz) : δ(ppm) 8.41-8.43 (m , 1H , H-5) , 7.34-7.50 (m , 3H , Ar-H) , 3.48 (s , 2H , H-α) , 1.73 (s , 2H , H-β) , 1.24-1.38 (m , 10H , H-γδ , ε , ζ , η) , 0.84 (m , 3H , CH₃)

¹³C-NMR (CDCl₃ , 75 MHz) : δ(ppm) 174.29 (C-4) , 168.80(C-2) , 132.10 (C-7) , 130.18 (C-5) , 127.97 (C-8) , 125.59 (C-6) , 123.18 (C-8a) , 42.93 (C-α) , 31.66 (C-β) , 29.13 (C-γ) , 29.09 (C-δ) , 28.97 (C-ε) , 26.81 (C-ζ) , 22.50 (C-η) , 13.96 (C-θ)

化合物(10)

2-(3-hydroxypropylamino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one

取 105mg (0.5mmole) 化合物 2 置於 25ml 圓底瓶中，加入 CH₂Cl₂ 3 ml 攪拌至溶解呈淡黃色溶液，加入 58mg (0.75mmole) 3-aminopropanol，室溫下作用 12 小時，溶液變成黃色懸浮液，反應完成後將溶劑以減壓濃縮機抽乾，加入水後收集黃色固體，將黃色固體抽氣過濾，以水沖洗，乾燥後，共得產物 48 g (41.5%)；以 MeOH 作再結晶，得粉狀白色結晶；熔點 164-165 °C (Ref²² : 157-159 °C)

IR(KBr)cm⁻¹ : 3454 (-OH), 2945,2845 (C-H), 1621 (C=O), 1596(C=N), 1439 (C=C) ,1323 (C-N), 1058 (CH₂-OH), 745(Ar-H)

化合物(11)

2-(benzylamino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one

取 210mg (1 mmole) 化合物 2 置於 25ml 圓底瓶中，加入 MeOH 10 ml 攪拌至溶解呈無色溶液，加入 130mg (1.2 mmole) benzylamine，約 1 小時沉澱析出，室溫下作用 15 小時，反應完成後將溶劑以減壓濃縮機抽乾，加入水後收集白色固體，將白色固體抽氣過濾，以水沖洗，乾燥後，共得產物 240 mg (89%)；以 MeOH/water 作再結晶，得白色細粒結晶；熔點 241-243 °C (Ref²² : 220-222°C)

IR(KBr)cm⁻¹ : 2840 (C-H), 1626 (C=O), 1593(C=N), 1447(C=C), 1351 (C-N),
750 (Ar-H)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) : δ(ppm) 8.44 (d, 1H, H-5, J=7.5 Hz), 7.29-7.53
(m, 8H, Ar-H), 4.79 (s, 2H, CH₂)

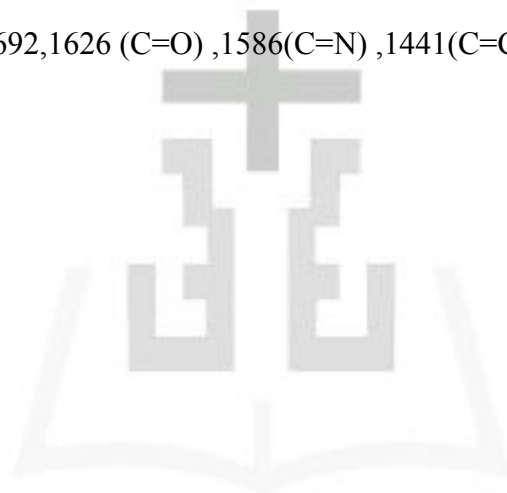
化合物(12)

2-(phenylamino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one

取 200mg (0.956 mmole) 化合物 2 置於 25ml 圓底瓶中，加入 MeOH 12 ml 攪拌至溶解呈淡黃色溶液，加入 100mg (1.1 mmole) aniline，室溫下作用 2 天，反應完成後將溶劑以減壓濃縮機抽乾，加入水後將黃色固體以抽氣過濾收集，以水沖洗，乾燥後，共得產物 70 mg (25.6%)；以 MeOH 作再結晶，得黃白色細粒結晶；熔點 192-194 °C (Ref²² : 188-190°C)

IR(KBr)cm⁻¹ : 1692,1626 (C=O) ,1586(C=N) ,1441(C=C) ,1348 (C-N) ,743

(Ar-H)



化合物(13)

2-(naphthalen-1-ylmethylamino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one

取 209mg (1 mmole) 化合物 2 置於 25ml 圓底瓶中，加入 CH₂Cl₂ 3 ml 攪拌至溶解呈淡黃色溶液，加入 352 mg (2.2 mmole) 1-naphthmethyleneamine，室溫下作用 2 天，反應完成後將溶劑以減壓濃縮機抽乾，加入水後並加入數 ml 濃 NH₄Cl(aq)，淡粉紅色沉澱析出，抽氣過濾收集固體後，以熱 MeOH 沖洗固體並過濾之，乾燥後，共得產物 213 mg (66.9 %)；以 Isopropyl alcohol 作再結晶，得氮膚色粉狀結晶；熔點 247-249°C

IR(KBr)cm⁻¹ : 2844 (C-H), 1629 (C=O), 1579(C=N), 1446(C=C), 1359 (C-N), 747(Ar-H)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) : δ(ppm) 8.48 (d, 1H, H-5, J= 8.5 Hz), 7.45-8.02 (m, 10H, Ar-H), 1.25 (s, 2H, CH₂)

¹³C-NMR (d₆-DMSO, 125 MHz) : δ(ppm) 168.05 (C-4), 161.76(C-2), 133.37, 132.95, 132.39, 130.95, 129.57, 128.63, 127.74, 126.55, 126.15, 126.02, 125.90, 125.52, 123.44, 122.88 (Ar-C), 43.24 (C-α)

化合物(14)

2-(naphthalen-2-ylamino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one

取 209mg (1 mmole) 化合物 2 及 1-naphthalenamine 255mg (1.7 mmole) 置於 25ml 圓底瓶中，加入 MeOH 15 ml 攪拌至溶解，室溫下作用 3 天，沉澱析出。將固體以抽氣過濾收集，以 MeOH 沖洗，乾燥後，共得產物 170 mg (55.7 %)；以 Toluene 作再結晶，得膚色細粒星狀結晶；熔點 244-246 °C (Ref⁷³ : 239°C)

IR(KBr)cm⁻¹ : 1688 (C=O) ,1584(C=N) ,1441(C=C) ,1342 (C-N), 741(Ar-H)

¹H-NMR (CDCl₃ , 500 MHz): δ(ppm) 8.85 (s , 1H , NH) , 7.04-7.92 (m , 11H , Ar-H)

化合物(15)

2-(furan-2-ylmethylamino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one

取 210mg (1 mmole) 化合物 2 置於 25ml 圓底瓶中，加入 MeOH 10 ml 攪拌至溶解呈淡黃色溶液，加入 120mg (1.2 mmole) furfuryl amine，室溫下作用 21 小時，反應完成後將溶劑以減壓濃縮機抽乾，加入水後收集白色固體，將白色固體抽氣過濾，以水沖洗，乾燥後，共得產物 190 mg (73.6%)；以 MeOH 作再結晶，得白色星狀結晶；熔點 192-194 °C

IR(KBr) cm^{-1} : 3110 (C-H), 1631(C=O), 1602(C=N), 1450(C=C), 1341 (C-N), 746(Ar-H)

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO, 500 MHz) : δ (ppm) 9.34 (s, 1H, NH), 8.18 (d, 1H, H-5), 7.44-7.61 (m, 4H, Ar-H, H-5'), 6.36-6.42 (m, 2H, H-3',4'), 4.65 (s, 2H, CH₂)

$^{13}\text{C-NMR}$ (d_6 -DMSO, 125 MHz) : δ (ppm) 167.89 (C-4), 161.77(C-2), 150.54 (C-2'), 142.63 (C-5'), 132.81 (C-7), 132.36 (C-4a), 129.52 (C-5), 127.73 (C-8), 125.88 (C-6), 122.80 (C-8a), 110.63 (C-4'), 108.15 (C-3'), 38.04 (C- α)

化合物(16)

2-(pyridin-2-ylmethylamino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one

取 209mg (1 mmole) 化合物 2 置於 25ml 圓底瓶中，加入 MeOH 10 ml 攪拌至溶解呈淡黃色溶液，加入 260 mg (2.4 mmole) 2-(aminomethyl)pyridine，室溫下作用 1 天，反應完成後將溶劑以減壓濃縮機抽乾，加入水後收集黃色固體，將黃色固體抽氣過濾，以水沖洗，乾燥後，共得產物 240 g (89 %)；以 Isopropyl alcohol 作再結晶，得白色粉狀結晶；熔點 192-194 °C

IR(KBr)cm⁻¹ : 2865 (C-H), 1625(C=O), 1590(C=N), 1434(C=C), 1359 (C-N), 751(Ar-H)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) : δ(ppm) 7.22-8.55 (m , 8H , Ar-H), 4.93(s , 2H , CH₂)

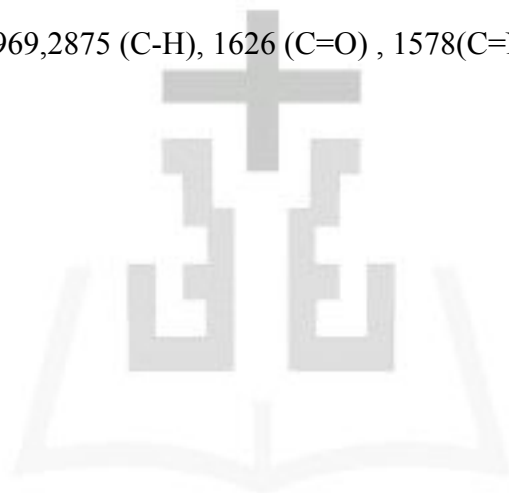
¹³C-NMR (CDCl₃, 125MHz) : δ(ppm) 162.54 (C-4), 154.26(C-2),147.19 (C-2'), 138.68, 132.68, 132.17, 130.62, 129.50, 127.82, 125.26, 123.19, 122.08, 117.57 (Ar-C), 45.85 (C-α)

化合物(17)

2-(pyrrolidin-1-yl)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one

取 200mg (0.956 mmole) 化合物 2 置於 25ml 圓底瓶中，加入 MeOH 10 ml 攪拌至溶解呈淡黃色溶液，加入 120mg (1.43 mmole) pyrrolidine，室溫下作用 16 小時，反應完成後將溶劑以減壓濃縮機抽乾，加入水後收集黃色固體，將黃色固體抽氣過濾，以水沖洗，乾燥後，共得產物 190 mg (72.7 %)；以 MeOH 作再結晶，得白色針狀結晶；熔點 212-214 °C (Ref²² : 208-210°C)

IR(KBr)cm⁻¹ : 2969,2875 (C-H), 1626 (C=O), 1578(C=N), 1439(C=C), 1331 (C-N), 760 (Ar-H)

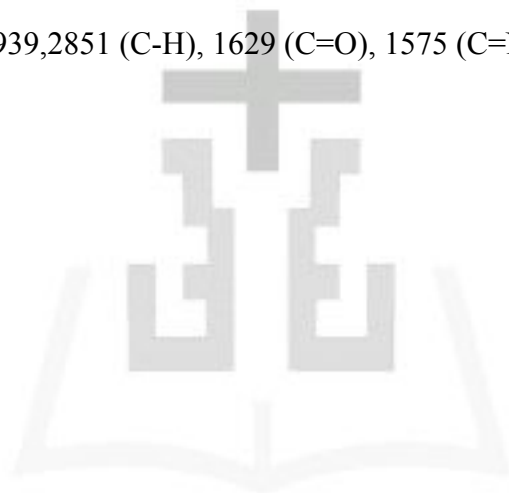


化合物(18)

2-(piperidin-1-yl)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one

取 200mg (0.956 mmole) 化合物 2 置於 25ml 圓底瓶中，加入 MeOH 10 ml 攪拌至溶解呈淡黃色溶液，加入 100mg (1.14 mmole) piperidine，室溫下作用 1.5 小時，反應完成後將溶劑以減壓濃縮機抽乾，加入水後收集白色固體，將白色固體抽氣過濾，以水沖洗，乾燥後，共得產物 190 mg (81%)；以 MeOH 作再結晶，得白色小針狀結晶；熔點 160-162 °C (Ref²² : 179-181°C)

IR(KBr)cm⁻¹ : 2939,2851 (C-H), 1629 (C=O), 1575 (C=N), 1443 (C=C), 1316 (C-N), 759 (Ar-H)



化合物(19)

2-(azepan-1-yl)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one

取 200mg (0.956 mmole) 化合物 2 置於 25ml 圓底瓶中，加入 MeOH 10 ml 攪拌至溶解呈淡黃色溶液，加入 114mg (1.14 mmole) hexamethyleneimine，室溫下作用 16 小時，反應完成後將溶劑以減壓濃縮機抽乾，加入水後收集黃色固體，將黃色固體抽氣過濾，以水沖洗，乾燥後，共得產物 140 mg (56.4 %)；以 MeOH 作再結晶，得膚色片狀結晶；熔點 155-157 °C

IR(KBr) cm^{-1} : 2923(C-H), 1632 (C=O), 1576(C=N), 1448(C=C), 1319 (C-N), 754 (Ar-H)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) : δ (ppm) 8.44 (d, 1H, H-5, $J=7.6$ Hz), 7.30-7.49 (m, 3H, Ar-H), 3.99 (s, 2H, H-2'), 3.64 (s, 2H, H-7'), 1.83 (m, 4H, H-3',6'), 1.59 (s, 4H, H-4',5')

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) : δ (ppm) 169.06 (C-4), 162.20 (C-2), 132.72 (C-7), 131.63 (C-4a), 130.33 (C-5), 127.82 (C-8), 125.28 (C-6), 123.93 (C-8a), 49.40 (C-2'), 48.99 (C-7'), 27.27 (C-3',6'), 26.70 (C-4',5')

化合物(20)

2-(cyclohexylamino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one

取 210mg (1 mmole) 化合物 2 置於 25ml 圓底瓶中，加入 MeOH 12 ml 攪拌至溶解呈淡黃色溶液，加入 120mg (1.2 mmole) cyclohexylamine，室溫下作用，反應完成後將溶劑以減壓濃縮機抽乾，加入水後收集固體，將固體抽氣過濾，以水沖洗，乾燥後，共得產物 190 mg (72.4%)；以 MeOH 作再結晶，得白色至黃色結晶物；熔點 199-202 °C

IR(KBr) cm^{-1} : 3200 (NH), 2929, 2854(C-H), 1618 (C=O), 1576(C=N),
1442(C=C) ,1347 (C-N) ,744(Ar-H)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) : δ (ppm) 8.43 (d, 1H, H-5, $J= 8.75$ Hz) , 7.29-7.51 (m, 3H, Ar-H), 2.06 (d , 2H , H-2' , $J= 8.9$ Hz) , 1.75 (s , 2H, H-6') , 1.64 (d, 4H , H-3',5')

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) : δ (ppm) 132.06 (C-7) , 130.52 (C-4a) ,127.62 (C-5),
125.21 (C-8), 123.29 (C-6), 32.61 (C-2',6') , 25.18 (C-4') , 24.62 (C-3',5')

化合物(21)

2-((1*r*,4*r*)-4-hydroxycyclohexylamino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one

取 105mg (0.5mmole) 化合物 2 及 173mg (1.5mmole) trans-4-aminocyclohexanol 置於 25ml 圓底瓶中，加入 MeOH 8 ml 攪拌至溶解，室溫下作用 16 小時，反應完成後將溶劑以減壓濃縮機抽乾，加入水後白色沉澱析出，收集固體，將固體抽氣過濾，以水沖洗，乾燥後，共得產物 120 mg (87%)；以 EtOH 作再結晶，得白色菱形針狀結晶；熔點 253-255 °C

IR(KBr)cm⁻¹ : 3303 (-OH), 1618 (C=O), 1576(C=N), 1442(C=C), 1347

(C-N), 744(Ar-H)

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 500 MHz) : δ(ppm) 8.76 (d, 1H, NH, J= 6.99 Hz), 8.15 (d, 1H, H-5), 7.40-7.57 (m, 3H, Ar-H), 4.61 (d, 1H, H-4', J= 4.11 Hz), 3.97 (m, 1H, H-1'), 1.82-1.90 (m, 4H, H-2',6'), 1.20-1.37 (m, 4H, H-3',5')

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 125 MHz) : δ(ppm) 168.06 (C-4), 160.76 (C-2), 132.98 (C-7), 132.23 (C-4a), 129.48 (C-5), 127.57 (C-8), 125.77 (C-6), 122.87 (C-8a), 68.04 (C-4'), 50.41 (C-1'), 33.78 (C-3',5'), 29.71 (C-2',6')

化合物(22)

3-(chloromethyl)-5H-benzo[e][1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3]thiazin-5-one

取 200mg (1.035 mmole) 化合物 5 置於 25ml 圓底瓶中，加入 DMF 6 ml ，於冰浴下邊攪拌邊加入 243mg (2.15mmole) chloroacetylchloride，懸浮液慢慢變成黃色溶液，於室溫下作用 1 天。反應完成後，將溶液倒入含碎冰的水中，將黃色的混和固體抽氣過濾並乾燥後得 185mg。取 100mg 以 MeOH 作再結晶，將溶液上層固體(5mg)及下層固體(15mg)分別以抽氣過濾收集，上層固體為化合物 23，下層為產物 22，得黃色顆粒結晶；熔點 171-172 °C (Ref⁶³ : 160-161°C)

IR(KBr)cm⁻¹ : 3048(=C-H), 1709 (C=O), 1587(C=N), 1433(C=C), 1343(C-N), 741 (Ar-H)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) : δ(ppm) 8.58-8.60 (m, 1H, H-6), 7.57-7.80 (m, 3H, Ar-H), 5.25 (s, 2H, CH₂)

化合物(23)

2-(chloromethyl)-9H-benzo[e][1,2,4]triazolo[5,1-b][1,3]thiazin-9-one

取 6.38g (33mmole) 化合物 5 置於 250ml 圓底瓶中，加入 DMF 70 ml，於冰浴下邊攪拌邊加入 4.48g (39.7mmole) chloroacetylchloride，懸浮液慢慢變成黃色溶液。加熱至 100-110°C 18 小時，溶液變成偏淡橘色。冷卻後將溶液加到含碎冰的水中，淡粉紅色的固體以布式漏斗抽氣過濾，以水沖洗數次，乾燥後，共得產物 7.14g (86%)；以 MeOH 作再結晶，得淡綠色絮狀結晶；熔點 209-211 °C (Ref⁷⁴ : 218-219°C)

IR(KBr)cm⁻¹ : 3054(=C-H) 1718 (C=O) , 1588(C=N) , 1513(C=C) , 1356(C-N) , 743 (Ar-H)

¹H-NMR (CDCl₃ , 500 MHz) : δ(ppm) 8.67-8.69 (m, 1H, H-8) , 7.62-7.81 (m, 3H, Ar-H), 4.76 (s, 2H, CH₂)

化合物(24)

2-(azidomethyl)-9H-benzo[e][1,2,4]triazolo[5,1-b][1,3]thiazin-9-one

500 mg Sodium azide 至於 25ml 圓底瓶中，加入 DMSO 4ml 攪拌隔夜約 24hr。取 200mg (0.795 mmole) 化合物 23 於 25ml 圓底瓶中，加入 3ml DMSO，接著加入含 sodium azide 的 DMSO 溶液 1.7ml (0.874 mmole)，攪拌呈淡橘色溶液。約 1 小時左右沉澱析出，加入水後收集淡黃色沉澱，以水沖洗，乾燥後，共得產物 152mg (74.1%)；以 MeOH 作再結晶，得黃色顆粒結晶；熔點 156-158°C

IR(KBr) cm^{-1} : 2136, 2104, 2082 (C(NN)N), 1711(C=O), 1591 (C=N), 1518 (C=C), 1251 (C-N), 737(Ar-H)

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO, 500 MHz): δ (ppm) 8.48-8.49 (m, 1H, H-8), 7.68-8.00 (m, 3H, Ar-H), 4.69 (s, 2H, CH₂)

化合物(25)

2-((9-oxo-9H-benzo[e][1,2,4]triazolo[5,1-b][1,3]thiazin-2-yl)methyl)isoindoline-1,3-dione

取 200mg (0.795 mmole) 化合物 23 於 25ml 圓底瓶中，加入 153mg (0.826 mmole) potassium phthalimide, 16 mg (0.08mmole) potassium iodide 加入 5 ml DMF 於室溫下攪拌約 1 小時左右沉澱析出，作用 3 小時加入水，收集淡黃色沉澱，以水沖洗，乾燥後，共得產物 192mg (66.7%)；以 DMF 作再結晶，得黃色片狀結晶；熔點>300°C

IR(KBr) cm^{-1} : 1771 ,1718(C=O) , 1595 (C=N) , 1439 (C=C) , 1268 (C-N) ,744 (Ar-H)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) : δ (ppm) 8.65-8.67 (m , 1H ,H-8) , 7.61-7.91 (m , 7H , Ar-H) , 5.16 (s , 2H , CH_2)

化合物(26)

(9-oxo-9H-benzo[e][1,2,4]triazolo[5,1-b][1,3]thiazin-2-yl)methyl carbamimidothioate

取 200mg (0.795 mmole) 化合物 23 於 25ml 圓底瓶中，加入 66.5mg(0.847 mmole) thiourea, 23mg(0.139mmole) potassium iodide 加入 4 ml DMF 並加熱至 100°C。約 30 分鐘左右由淡黃色懸浮液變成溶液再變成白色懸浮液，作用 1 小時後，冷卻以抽氣過濾收集白色沉澱，以水沖洗，乾燥後，共得產物 213mg (92%)；以水作再結晶，得白色顆粒結晶；熔點 279-281°C

IR(KBr) cm^{-1} : 3133 , 2993; 1714 ,1655(C=O) ,1590 (C=N) , 1434 (C=C) , 1245 (C-N) ,740(Ar-H)

$^1\text{H-NMR}$ (*d6*-DMSO , 500 MHz) : δ (ppm) 9.30 (s, 4H, SC(NH₂)₂) , 8.48-8.50 (m, 1H, H-8), 7.69-8.01 (m, 3H, Ar-H), 4.78 (s, 2H, CH₂)

化合物(27)

2-((9-oxo-9H-benzo[e][1,2,4]triazolo[5,1-b][1,3]thiazin-2-yl)methylthio)benzoic acid

取 200mg (0.795 mmole) 化合物 23 及 132 mg (0.836mmole) thiosalisyllic acid 於 25ml 圓底瓶中，加入 NaOH(aq) 7.4 ml (104mg 溶在 10ml 水中) (1.924mmole)，攪拌至溶解呈黃色溶液，接著加入化合物 23 200mg (0.795 mmole) 及 DMF 8ml，作用隔夜呈淡黃色溶液。作用完成後溶液加至含碎冰水中，以 acetic acid 酸化，白色沉澱析出，約 30 分鐘後，以抽氣過濾收集沉澱，以 5ml MeOH 分三次沖洗沉澱物，乾燥後，得產物 111mg (35.9%)；以 THF/water 作再結晶，得淡膚色粉狀結晶；熔點 269-271°C

IR(KBr)cm⁻¹ : 2600-3300 (COOH), 1714, 1680 (C=O), 1587 (C=N), 1511 (C=C), 1256(C-N), 742(Ar-H)

¹H-NMR (*d6*-DMSO, 500 MHz) : δ(ppm) 8.47-8.50 (m, 1H, H-8), 7.21-7.98 (m, 7H, Ar-H), 4.43 (s, 2H, CH₂)

活性測試實驗



細胞培養

HT-29、COLO-205、MCF-7、MDA-MB 231、MCF-10A、HEP-3B、HEP-G2、A549 及 C6 細胞株來自於 American Type Culture Collection (ATCC)。細胞株之培養方式如下：MEM (for Hep 3B、Hep G2、MCF-7)；RPMI-1640 (for COLO 205、HT 29、A549)；DMEM/F12 (for MDA-MB 231、MCF-10A) 外加10% FBS (fetal bovine serum)，1% PSA or DMEM (for C6) 外加5% FBS, 1% PSA，於37°C，充以5% CO₂之humidified incubator中進行培養，其中MCF-10A還需外加 20ng/ml EGF、0.5μg/ml Hydrocortisone、10μg/ml Insulin、1% Non-essential amino acid進行培養。

細胞培養至七八分滿後，分盤至 24 well 或 96 well中，於incubator 中至少培養12h使細胞貼附後再進行試藥處理。

試藥處理

試藥以DMSO溶解，配製成所需濃度後加入medium中，將含有試藥之medium振搖均勻後加入含有細胞之培養皿中，再作用24h後進行後續之處理。DMSO之總濃度皆維持在千分之五以下。

MTT Assay 實驗步驟：

1. 以 PBS(phosphate buffer saline)配製經過濾除菌並避光保存之 5 mg/ml MTT 溶液以 medium：MTT = 9：1 之比例加入含有事先以試藥處理之細胞的培養皿中。
2. 於 37°C incubation 2-4 hrs 形成紫色結晶物。
3. 小心取出將 medium 吸乾，放置烘箱或室溫乾燥。
4. 測吸光度之前再加入 DMSO：95% EtOH=1:1 混合溶液 200λ 震搖使紫色結晶物"完全溶解"後各加 100λ 之溶液於 96 well，用 ELISA reader 於 OD550 或 Flurostar optima 於 OD590 在 30 分鐘內測試完畢。

(上述步驟是以 24well 培養時之方式，若直接以 96 well 培養，則加入 100 λ 混合溶液，溶解後測吸光值。)

- 將所有吸光值扣除空白組之吸光值後，以下列公式換算，即為細胞之存活率。

$$(\text{Sample 吸光值} / \text{Control 吸光值}) \times 100\%$$

C2-Ceramide 確認試驗之實驗步驟：

- 細胞分盤(五萬顆細胞 300 λ)後，培養至少 12hr。
- 依下列方式配置試藥後各加 300 λ 於 well 中，再作用 24 hr。

DMSO	1000 λ medium + 1 λ DMSO	當 Control 組
50 μM	1200 λ medium + 6 λ 10mM C2-ceramide	
25 μM	1000 λ medium + 2.5 λ 10mM C2-ceramide	
10 μM	1200 λ medium + 1.2 λ 10mM C2-ceramide	
5 μM	900 λ medium + 100 λ 50 μ M C2-ceramide	
1 μM	900 λ medium + 100 λ 10 μ M C2-ceramide	

- 用 5mg/ml MTT 加在 medium 中稀釋十倍後各加 300 λ 到 well 中，作用 2-3hr。
- 以 DMSO/ 95% EtOH 1:1 各 200 λ 溶結晶物後 transfer 100 λ 至 96 well 用 Flurostar optima 以 OD590 讀取數據。

C2-Ceramide 試藥篩選之實驗步驟：

- 細胞分盤(五萬顆細胞 300 λ)後，培養至少 12hr。
- 用 medium 1000 λ 加入 1 λ (溶在 DMSO 配成 10mM) 的試藥, 使成爲 10 μ M 各加 300 λ 於各測試 well 中。
- 24h 後加入以 DMSO 稀釋成 6 mM 的 C2-Ceramide 1 λ 於各測試組使成爲 20 μ M，再作用 24 hr。

4. 用 5mg/ml MTT 加在 medium 中稀釋十倍後各加 300 λ 到 well 中，作用 2-3hr。
5. 以 DMSO/ 95% EtOH 1:1 各 200 λ 溶結晶物後 transfer 100 λ 至 96 well 用 Flurostar optima 以 OD590 讀取數據。

C2-Ceramide 測試試藥 dose-dependent 之實驗步驟：

1. 細胞分盤(五萬顆細胞 300 λ)後，培養至少 12hr。
2. 依下列方式配置試藥後各加 300 λ 於 well 中。

DMSO	1000 λ medium + 4.9 λ DMSO	當 Control 組
80 μM	1000 λ medium + 1.6 λ 50 mM compound	配 2 組
40 μM	500 λ medium + 500 λ 80 μ M compound	
20 μM	750 λ medium + 250 λ 80 μ M compound	
10 μM	875 λ medium + 125 λ 80 μ M compound	
5 μM	937.5 λ medium + 62.5 λ 80 μ M compound	

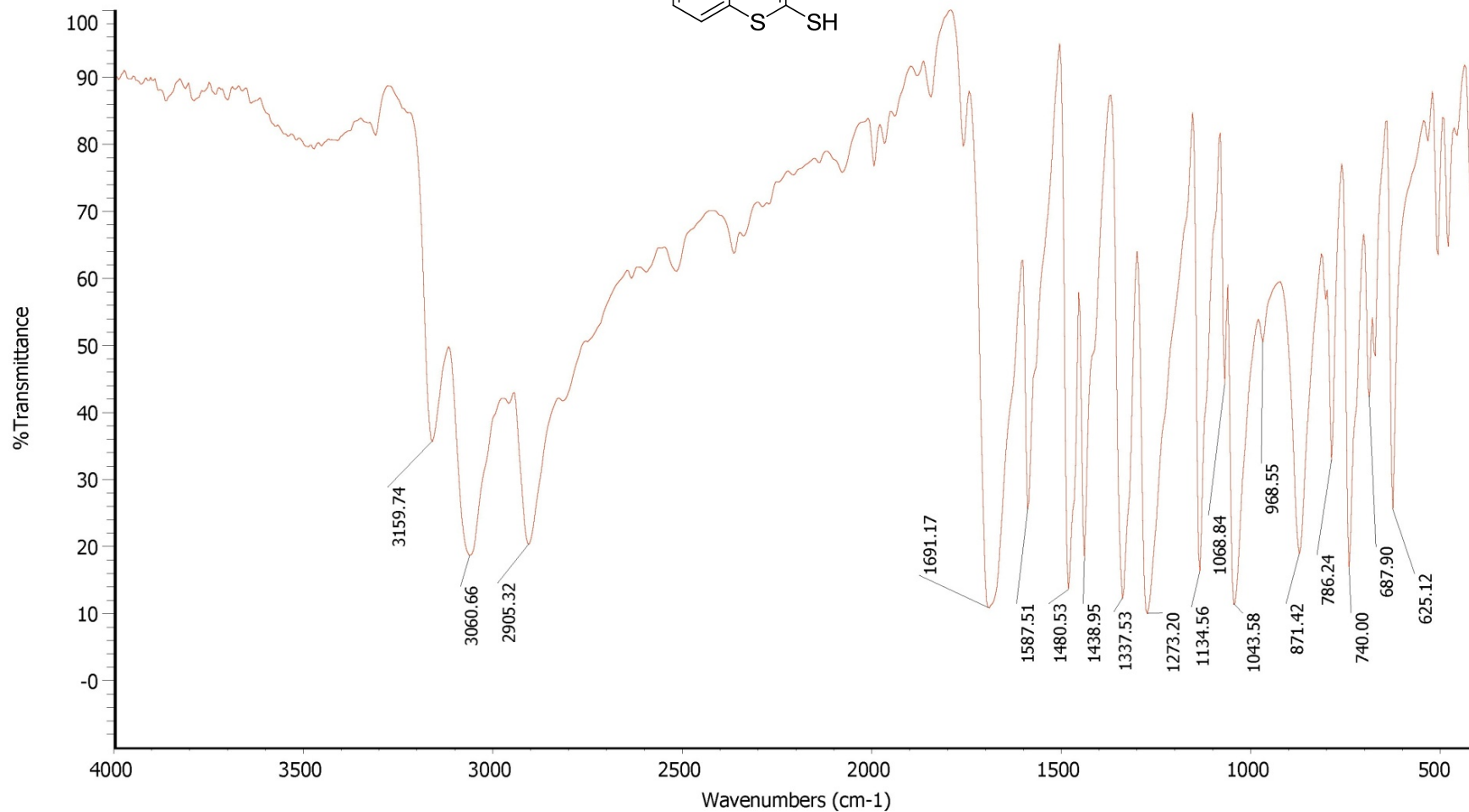
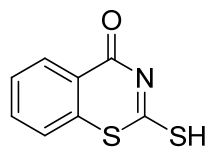
3. 24h 後加入以 DMSO 稀釋成 6 mM 的 C2-Ceramide 1 λ 於各測試組 使成爲 20 μ M，再作用 24 hr。
4. 用 5mg/ml MTT 加在 medium 中稀釋十倍後各加 300 λ 到 well 中，作用 2-3hr。
5. 以 DMSO/ 95% EtOH 1:1 各 200 λ 溶結晶物後 transfer 100 λ 至 96 well 用 Flurostar optima 以 OD590 讀取數據。

數據統計：

上述生物活性評估皆均經過三次以上獨立實驗，分別計算平均值(Mean)及標準偏差(SD)，並以 Pair-*t*-test 進行統計分析檢定，設定 $p < 0.05$ 之差異爲有意義 (*, $p < 0.05$; **, $P < 0.01$)。

五、圖譜



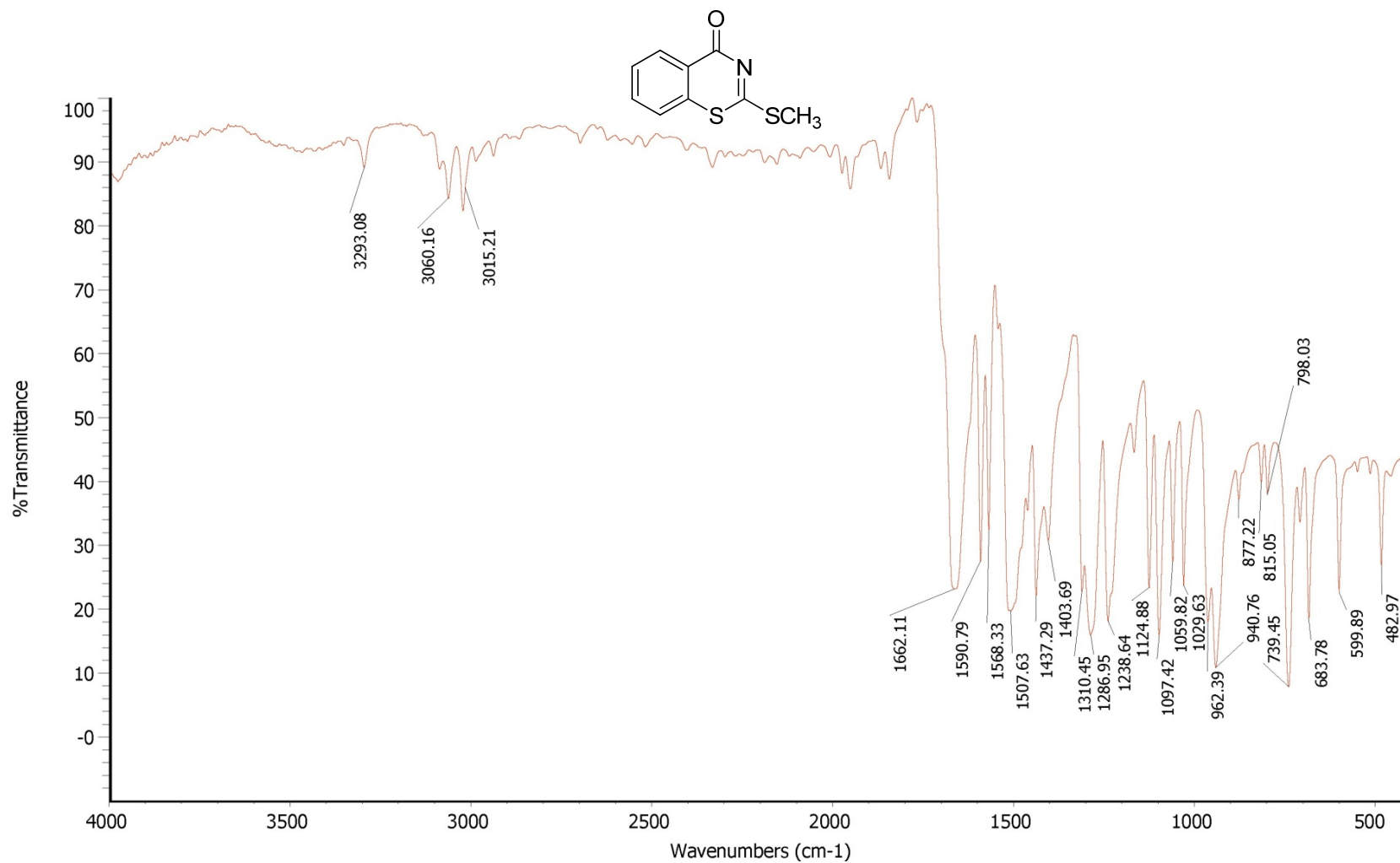


BJ-1 (1)

Number of sample scans: 32
Number of background scans: 32
Resolution: 8.000
Sample gain: 1.0
Mirror velocity: 6.2500
Aperture: 100.00

Detector: DTGS KBr
Beamsplitter: Unknown
Source: IR

圖一、化合物 1 之紅外光圖譜

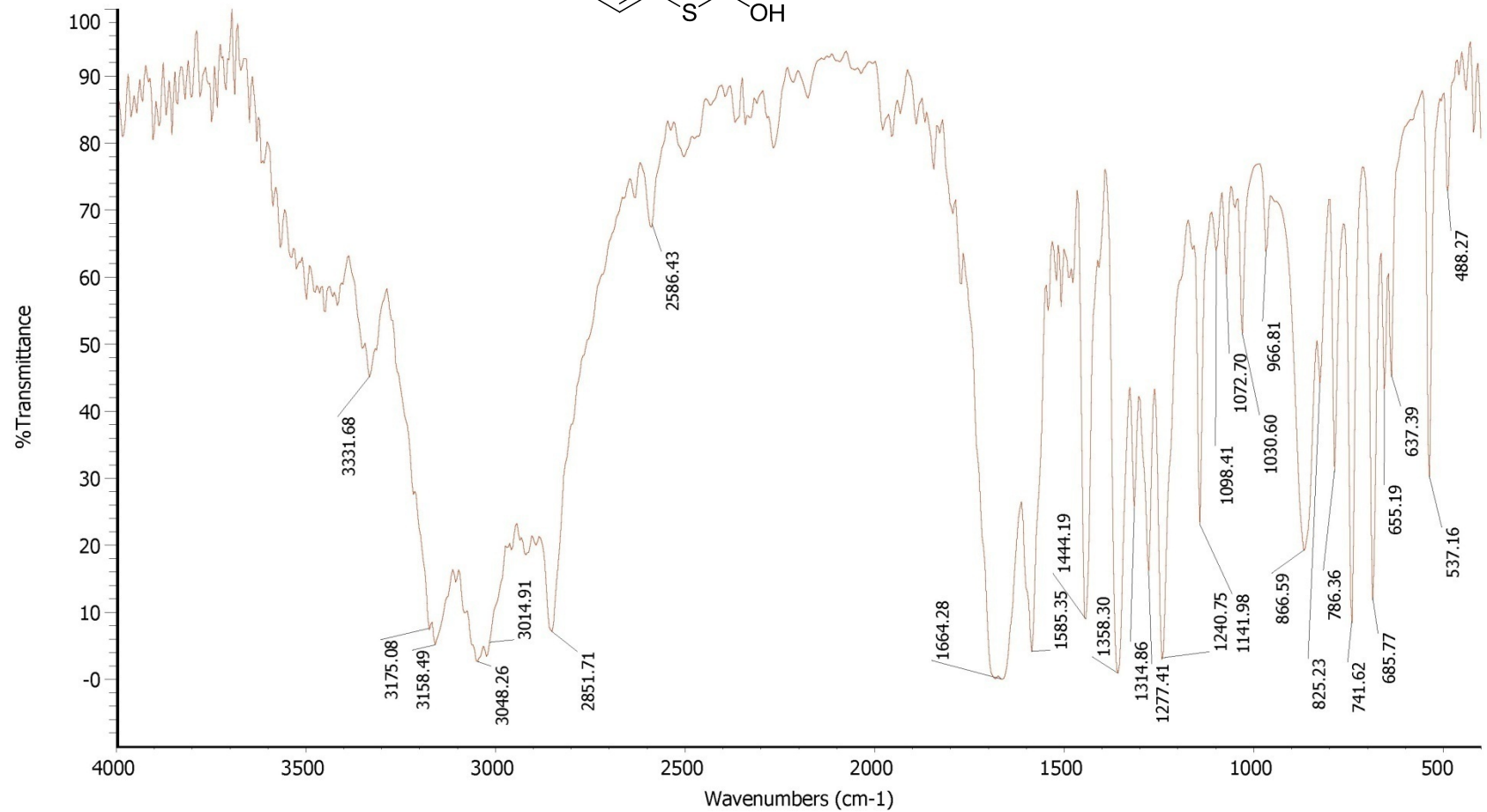
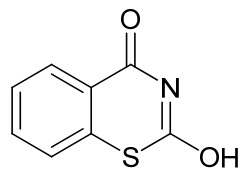


BJ-2 (2)

Number of sample scans: 16
 Number of background scans: 16
 Resolution: 4.000
 Sample gain: 10.0
 Mirror velocity: 6.2500
 Aperture: 100.00

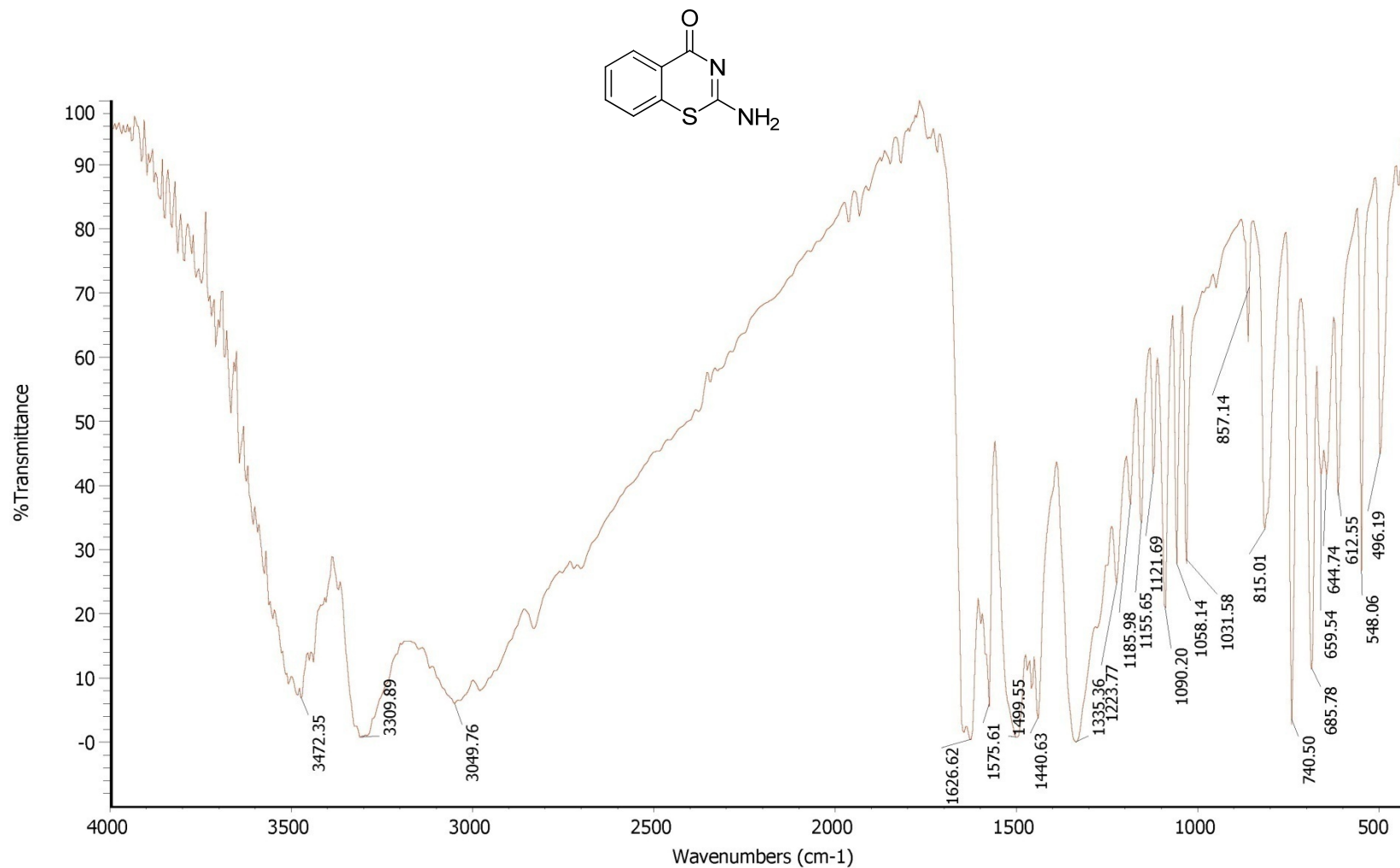
Detector: DTGS KBr
 Beamsplitter: KBr
 Source: IR

圖二、化合物 2 之紅外光圖譜



BJ-7 (3) Number of sample scans: 16 Detector: DTGS KBr
 Number of background scans: 16 Beamsplitter: KBr
 Resolution: 8.000 Source: IR
 Sample gain: 20.0
 Mirror velocity: 6.2500
 Aperture: 100.00

圖三、化合物 3 之紅外光圖譜

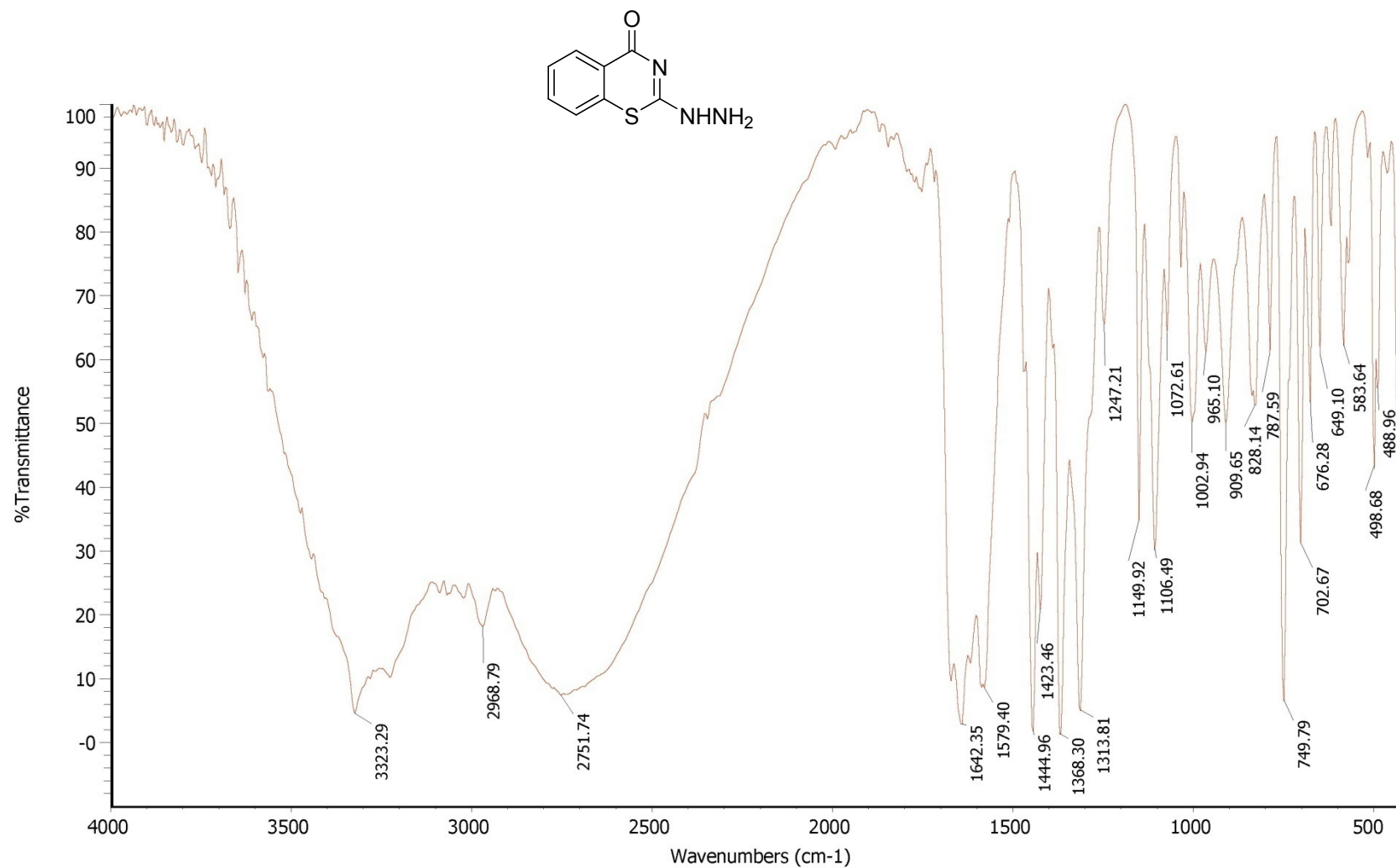


BJ-6 (4)

Number of sample scans: 1
 Number of background scans: 0
 Resolution: Unknown
 Sample gain: 1.0
 Mirror velocity: 0.0000
 Aperture: 0.00

Detector: Unknown
 Beamsplitter: KBr
 Source: Off

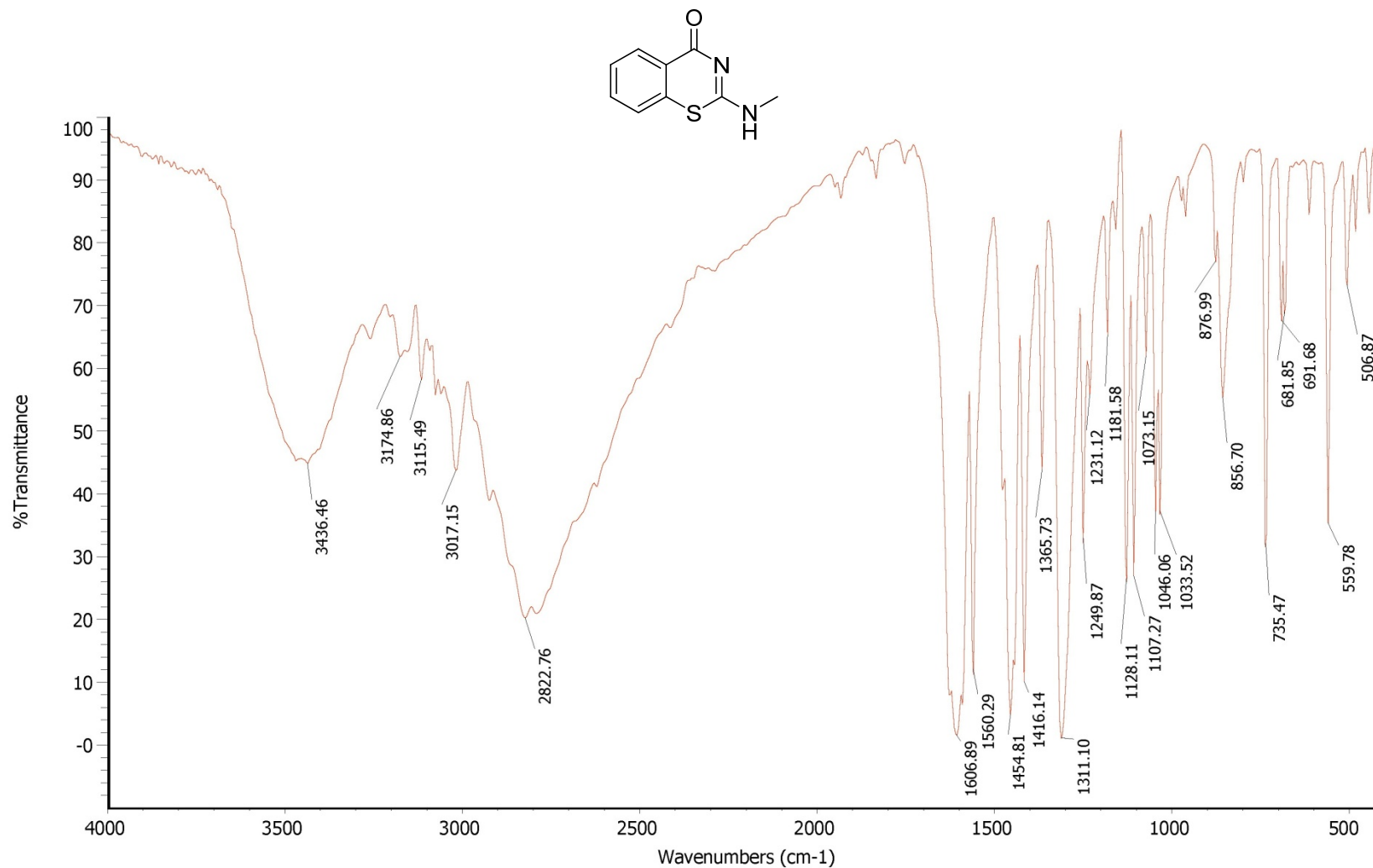
圖四、化合物 4 之紅外光圖譜



BJ-3 (5)

Number of sample scans: 1
 Number of background scans: 0
 Resolution: Unknown
 Sample gain: 1.0
 Mirror velocity: 0.0000
 Aperture: 0.00
 Detector: Unknown
 Beamsplitter: KBr
 Source: Off

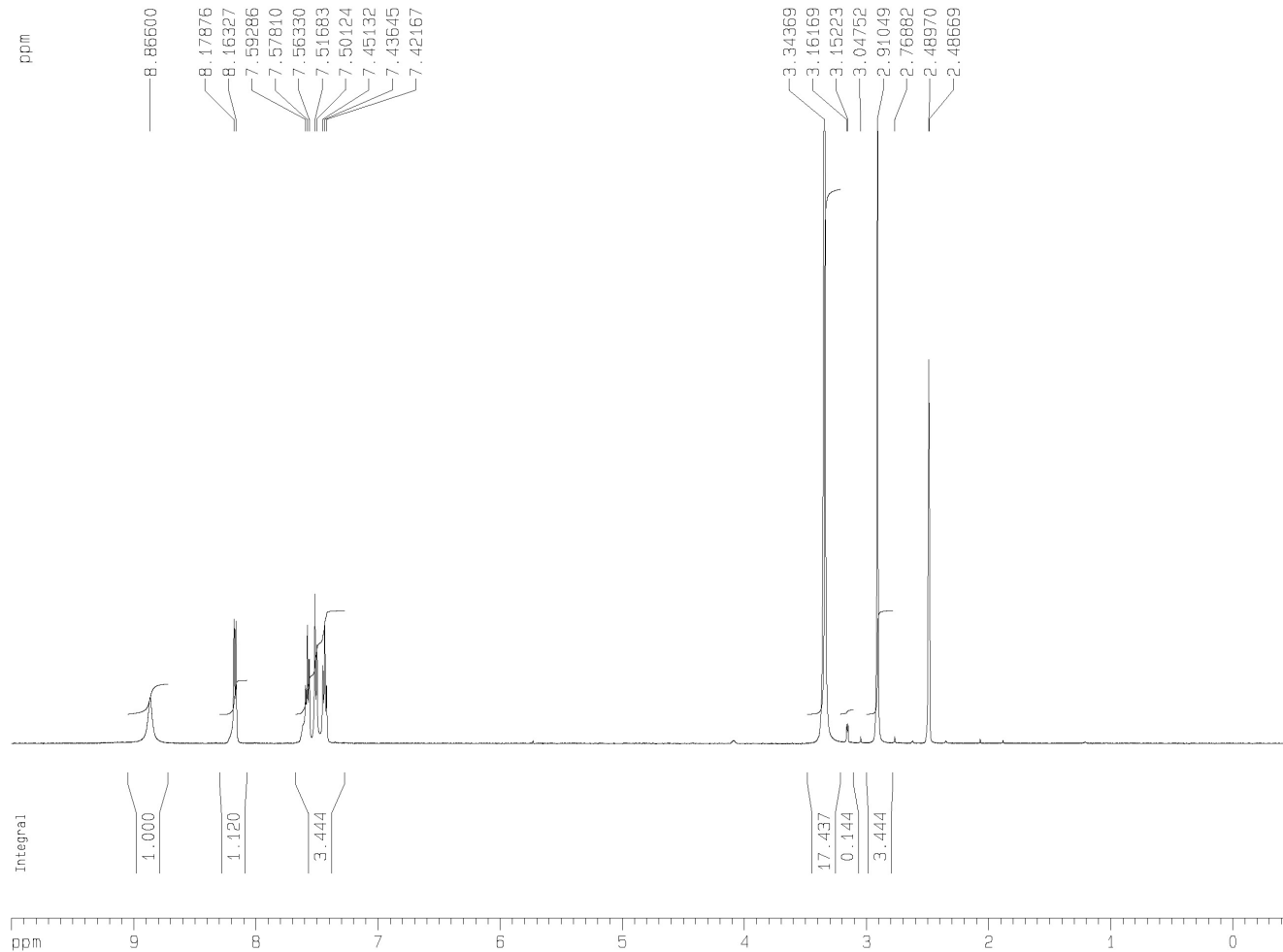
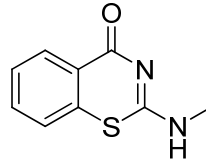
圖五、化合物 5 之紅外光圖譜



BJ-6-Me (6) Number of sample scans: 1 Detector: Unknown
 Number of background scans: 0 Beamsplitter: KBr
 Resolution: Unknown Source: Off
 Sample gain: 1.0
 Mirror velocity: 0.0000
 Aperture: 0.00

圖六、化合物 6 之紅外光圖譜

BJ-6-Me/DMSO/1D-H
0225-bj6me/1/1/wjd



Current Data Parameters
NAME 0225-bj6me
EXPNO 1
PROCNO 1

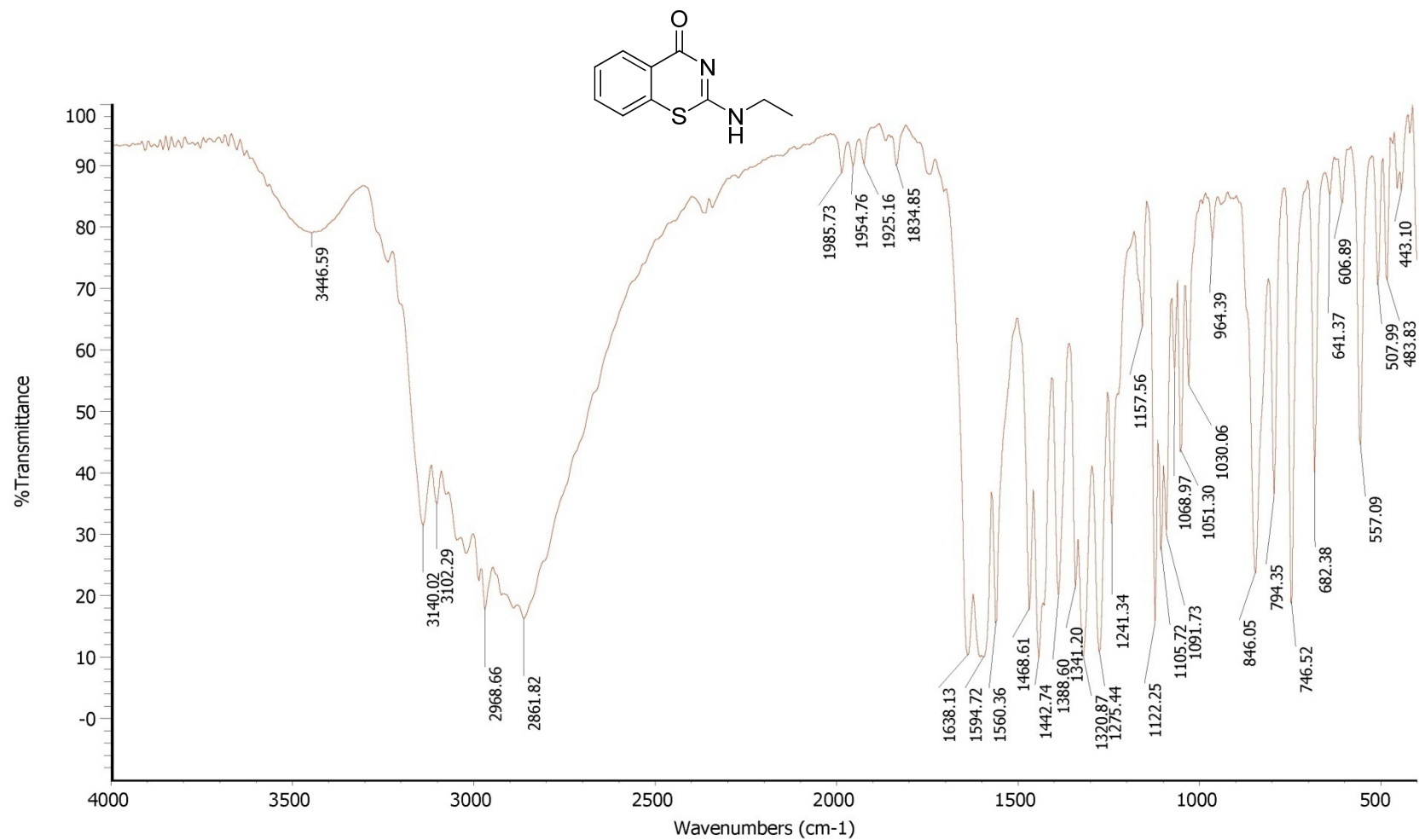
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20080125
Time 9.55
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm TXI 13C Z
PULPROG zg30
TD 32768
SOLVENT DMSO
NS 16
DS 2
SWH 10330.578 Hz
FIDRES 0.315264 Hz
AQ 1.5860212 sec
RG 812.7
DW 48.400 usec
DE 6.50 usec
TE 300.0 K
D1 1.00000000 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 12.40 usec
PL1 -5.00 dB
SFO1 500.1330885 MHz

F2 - Processing parameters
SI 16384
SF 500.1300102 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

1D NMR plot parameters
CX 22.00 cm
CY 100.00 cm
F1P 10.000 ppm
F1 5001.30 Hz
F2P -0.500 ppm
F2 -250.06 Hz
PPMCM 0.47727 ppm/cm
HZCM 238.69839 Hz/cm

圖七、化合物 6 之氫核磁共振圖譜



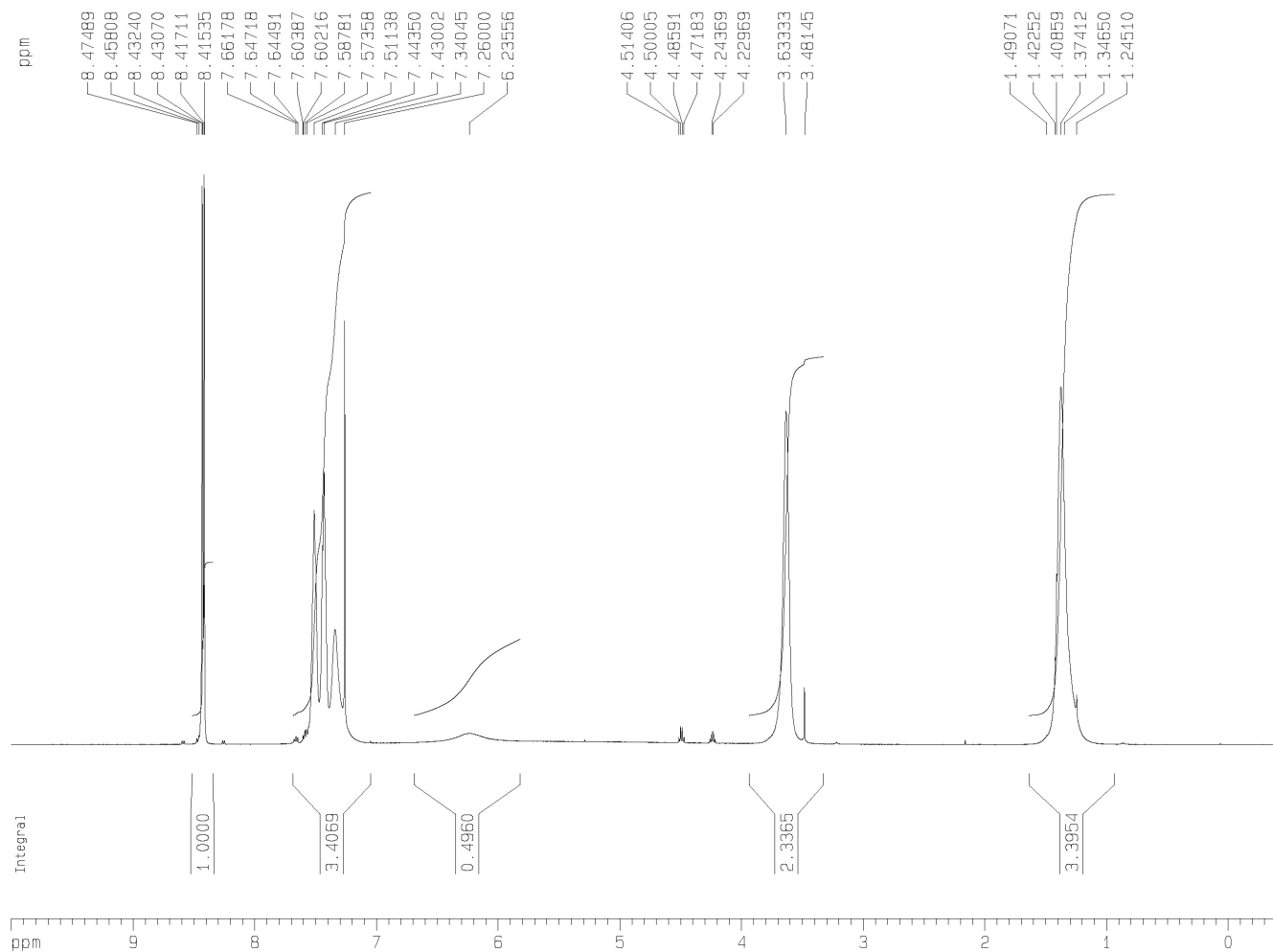
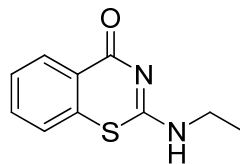
BJ-6-Et (7)

Number of sample scans: 16
 Number of background scans: 16
 Resolution: 8.000
 Sample gain: 4.0
 Mirror velocity: 6.2500
 Aperture: 95.00

Detector: DTGS KBr
 Beamsplitter: KBr
 Source: IR

圖八、化合物 7 之紅外光圖譜

BJ-6-Et/CDC13/1D-H
0215-bj6et/1/1/wjd



Current Data Parameters
NAME 0215-bj6et
EXPNO 1
PROCNO 1

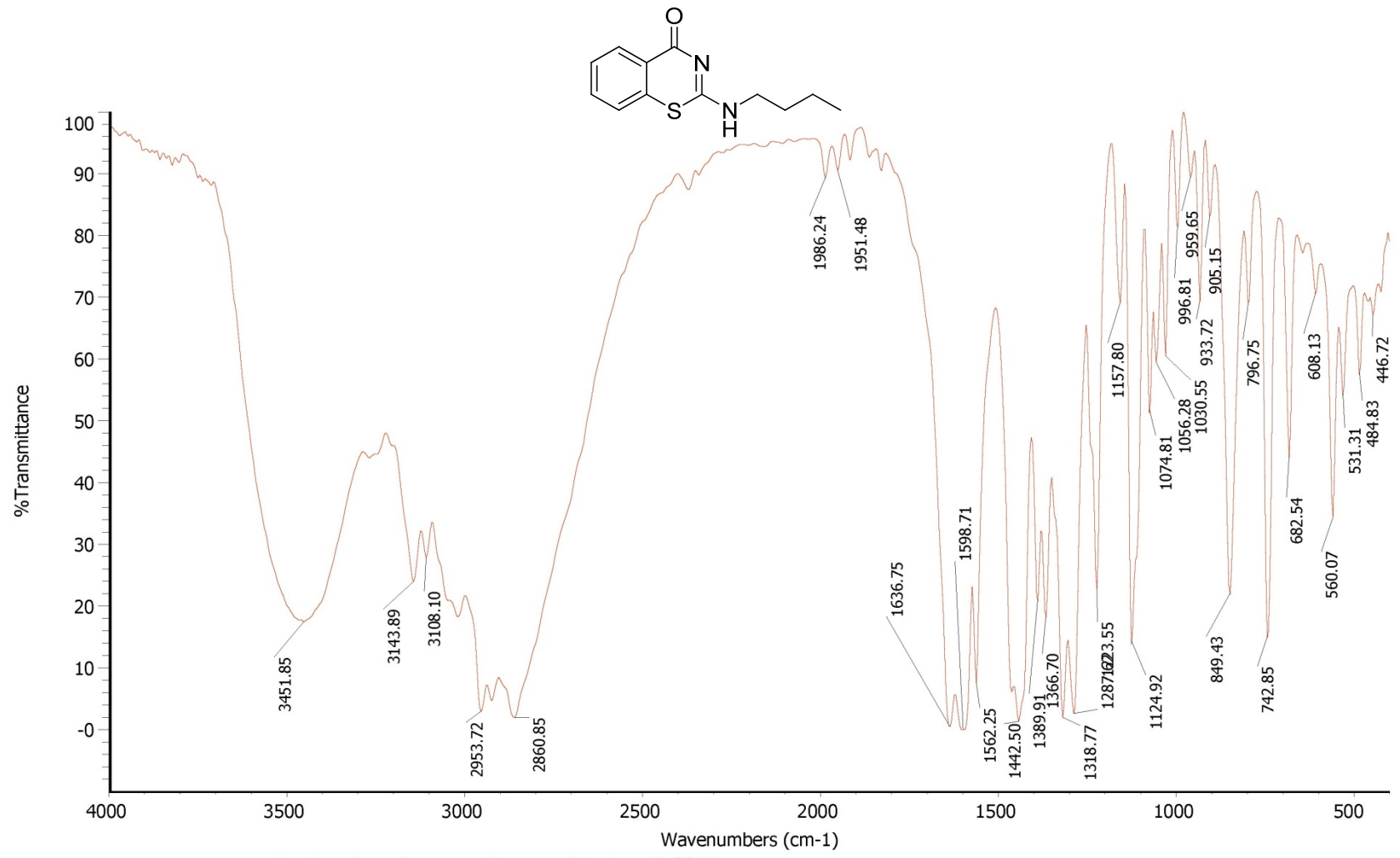
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20080214
Time 15.34
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm TXI 13C Z
PULPROG zg30
TD 32768
SOLVENT Pyr
NS 16
DS 2
SWH 10330.578 Hz
FIDRES 0.315254 Hz
AQ 1.5860212 sec
RG 128
DW 48.400 usec
DE 6.50 usec
TE 300.0 K
D1 1.00000000 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWPK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 12.40 usec
PL1 -5.00 dB
SFO1 500.1330885 MHz

F2 - Processing parameters
SI 16384
SF 500.1300136 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

1D NMR plot parameters
CX 22.00 cm
CY 10.00 cm
F1P 10.000 ppm
F1 5001.30 Hz
F2P -0.500 ppm
F2 -250.06 Hz
PPMCM 0.47727 ppm/cm
HZCM 238.69839 Hz/cm

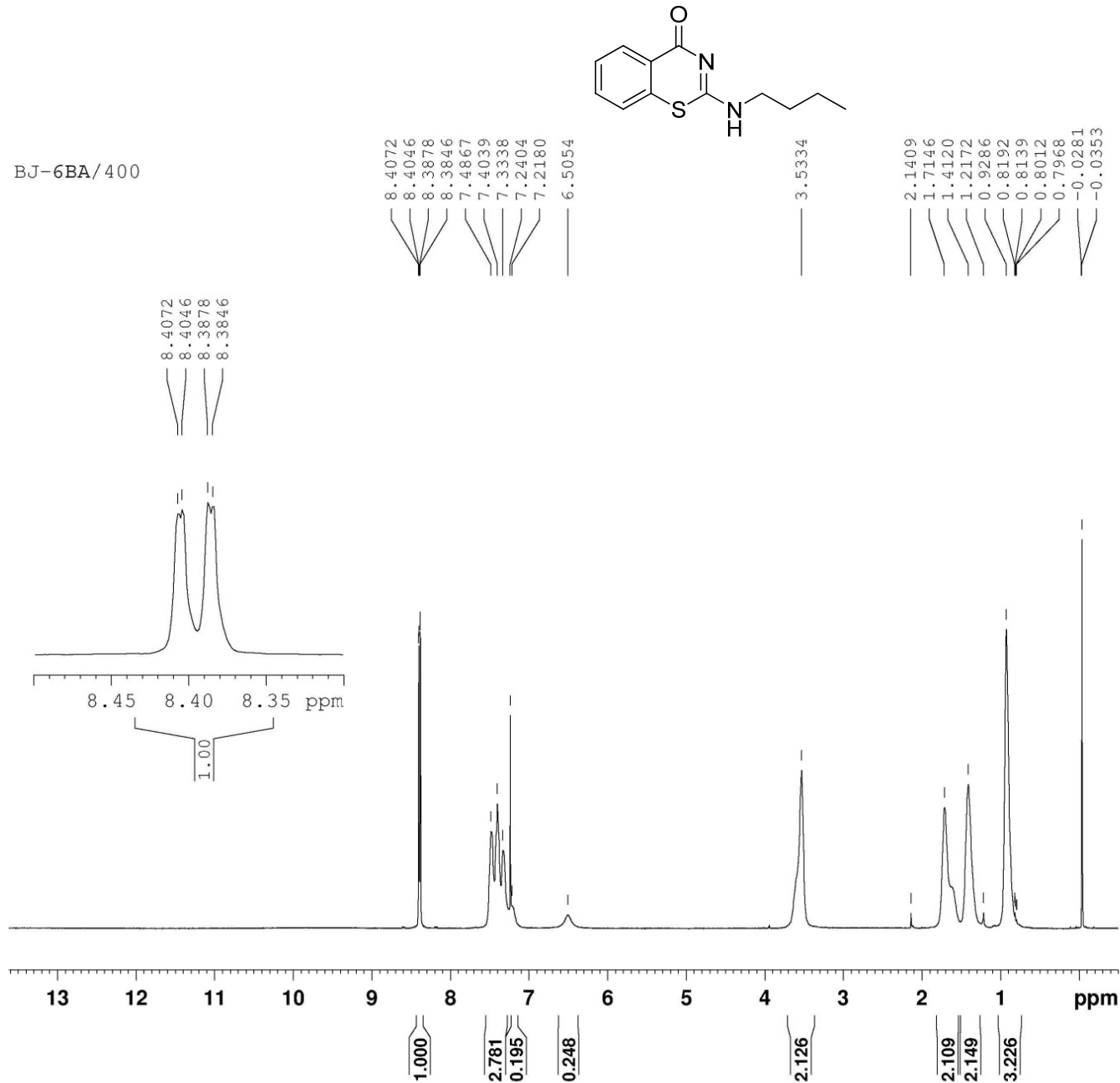
圖九、化合物 7 之氫核磁共振圖譜



BJ-6BA (8) Number of sample scans: 16 Detector: DTGS KBr
 Number of background scans: 16 Beamsplitter: KBr
 Resolution: 8.000 Source: IR
 Sample gain: 10.0
 Mirror velocity: 6.2500
 Aperture: 100.00

圖十、化合物 8 之紅外光圖譜

BJ-6BA/400



Current Data Parameters
NAME CKLee
EXPNO 19
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20061028
Time 16.13
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Dual 13C/
PULPROG zg30
TD 32768
SOLVENT CDC13
NS 32
DS 0
SWH 6410.256 Hz
FIDRES 0.195625 Hz
AQ 2.5559540 sec
RG 406.4
DW 78.000 usec
DE 7.50 usec
TE 294.2 K
D1 2.00000000 sec
TD0 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 10.80 usec
PL1 1.00 dB
SFO1 400.1328009 MHz

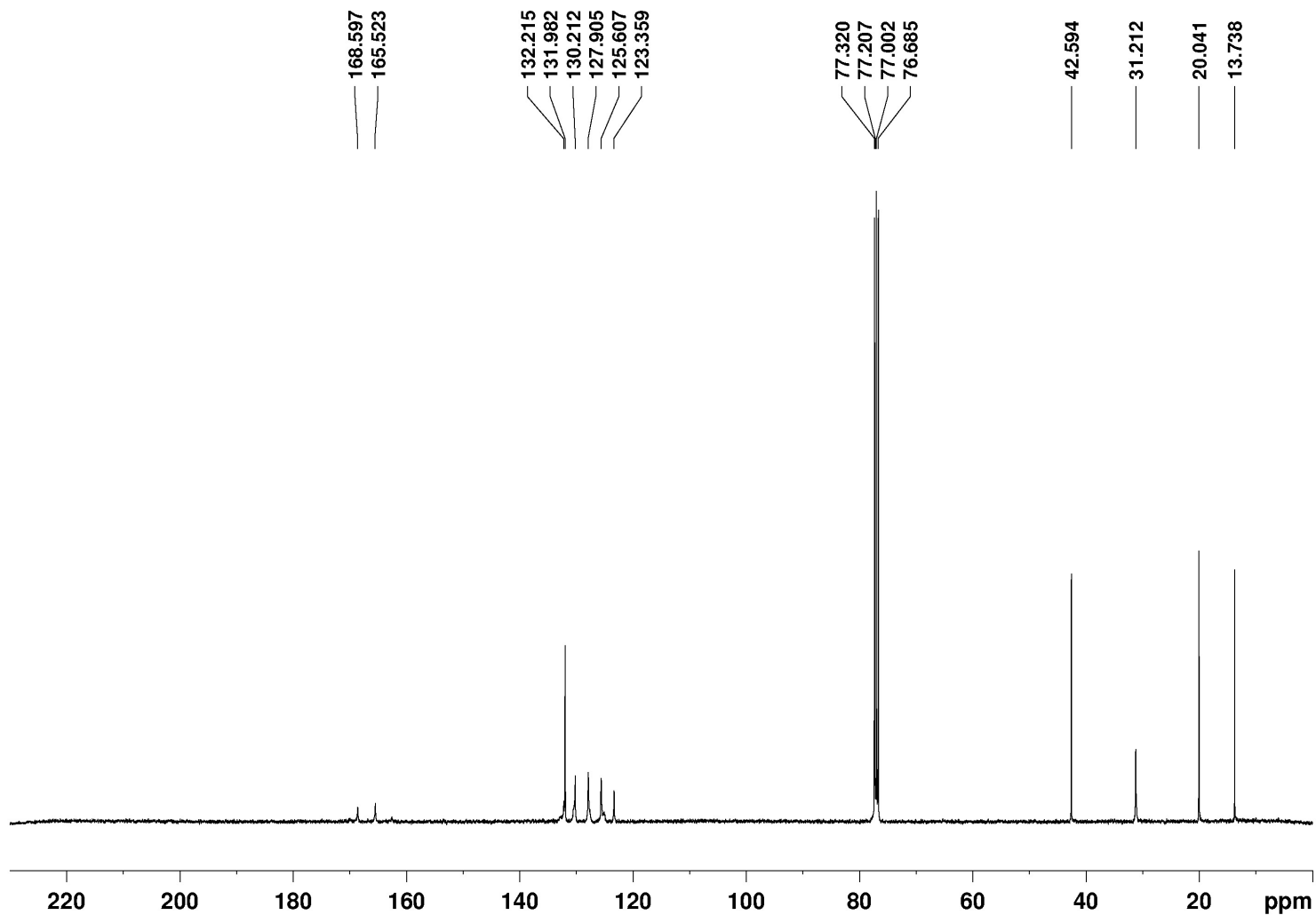
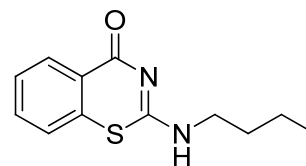
F1 - Acquisition parameters
ND0 2
TD 4096
SFO1 100.6273 MHz
FIDRES 1.719611 Hz
SW 69.996 ppm
FnMODE undefined

F2 - Processing parameters
SI 16384
SF 400.1300174 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.10 Hz
GB 0
PC 1.00

F1 - Processing parameters
SI 256
MC2 OF
SF 100.6127753 MHz
WDW SINE
SSB 2
LB 0.00 Hz
GB 0

圖十一、化合物 8 之氫核磁共振圖譜

BJ-6BA



```
Current Data Parameters
NAME          OKLee
EXPNO        20
PROCNO       1

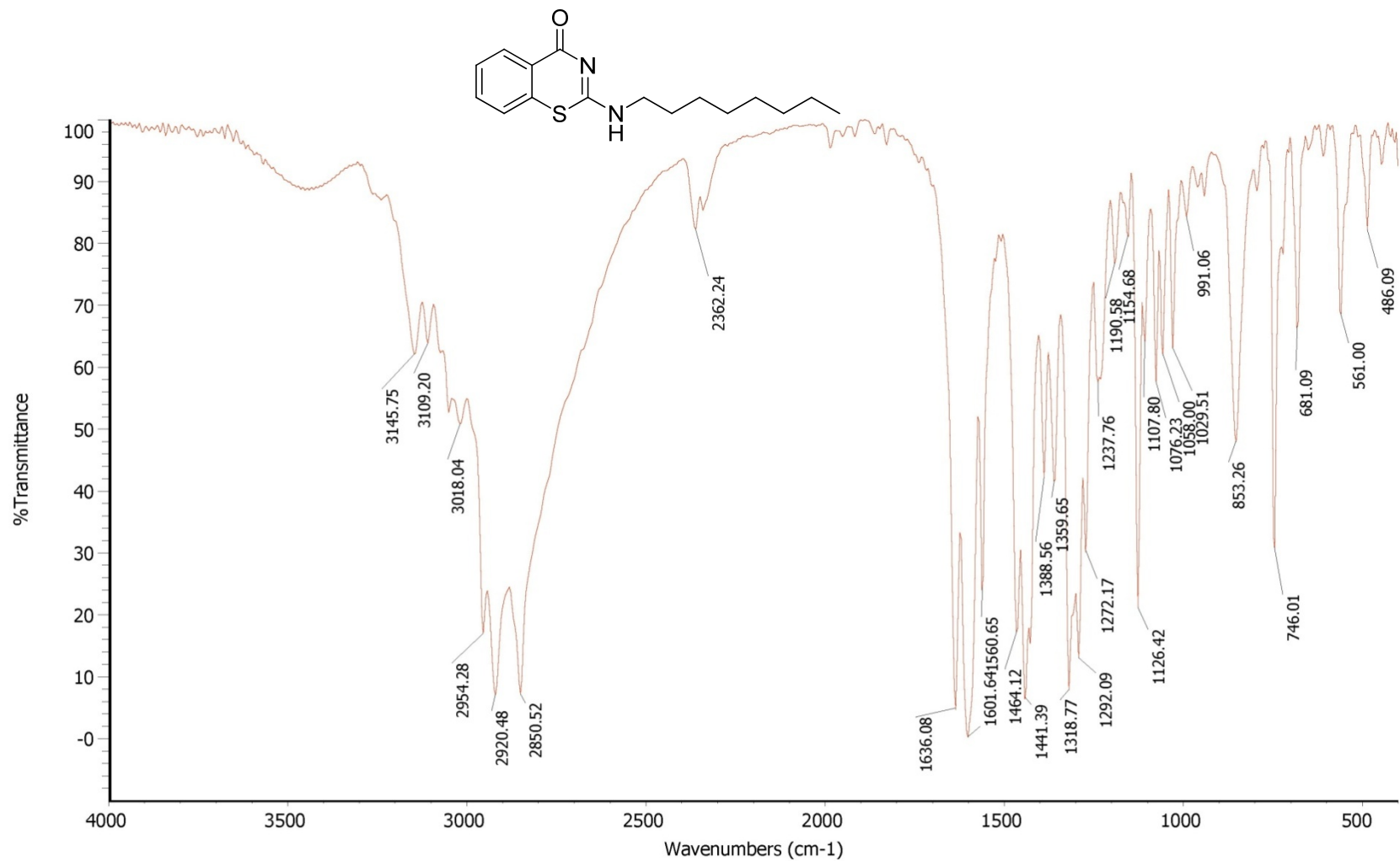
F2 - Acquisition Parameters
Date_        20061029
Time         1.57
INSTRUM      spect
PROBHD       5 mm Dual 13C/
PULPROG      zgpg30
TD           65536
SOLVENT      CDCl3
NS           10240
DS           0
SWH          24154.590 Hz
FIDRES       0.368870 Hz
AQ           1.3566452 sec
RG           46341
DS           20.700 usec
DE           11.50 usec
TE           294.2 K
D1           2.00000000 sec
d11          0.03000000 sec
DELTA        1.89999998 sec
TD0          1

----- CHANNEL f1 -----
NUC1         13C
P1           10.00 usec
PL1          -2.00 dB
SFO1         100.6243995 MHz

----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2      waltz16
NUC2         1H
PCPD2        90.00 usec
PL2          1.00 dB
PL12         18.00 dB
PL13         21.00 dB
SFO2         400.1318006 MHz

F2 - Processing parameters
SI           32768
SF           100.612758 MHz
WDW          EM
SSB          0
LB           2.00 Hz
GB           0
FC           1.00
```

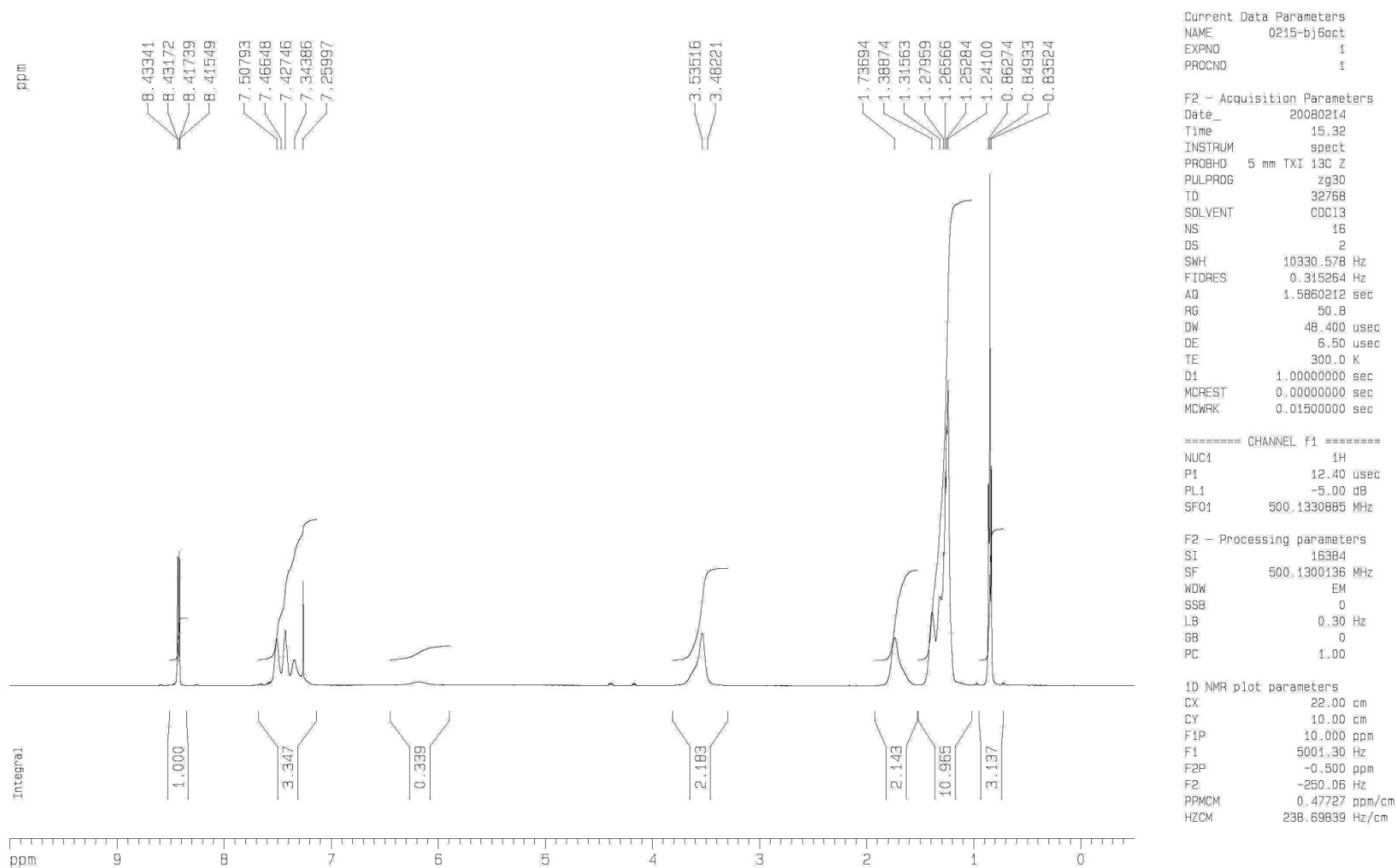
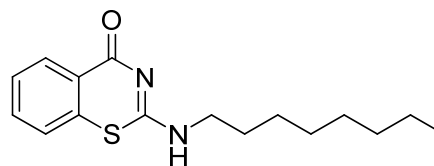
圖十二、化合物 8 之碳核磁共振圖譜



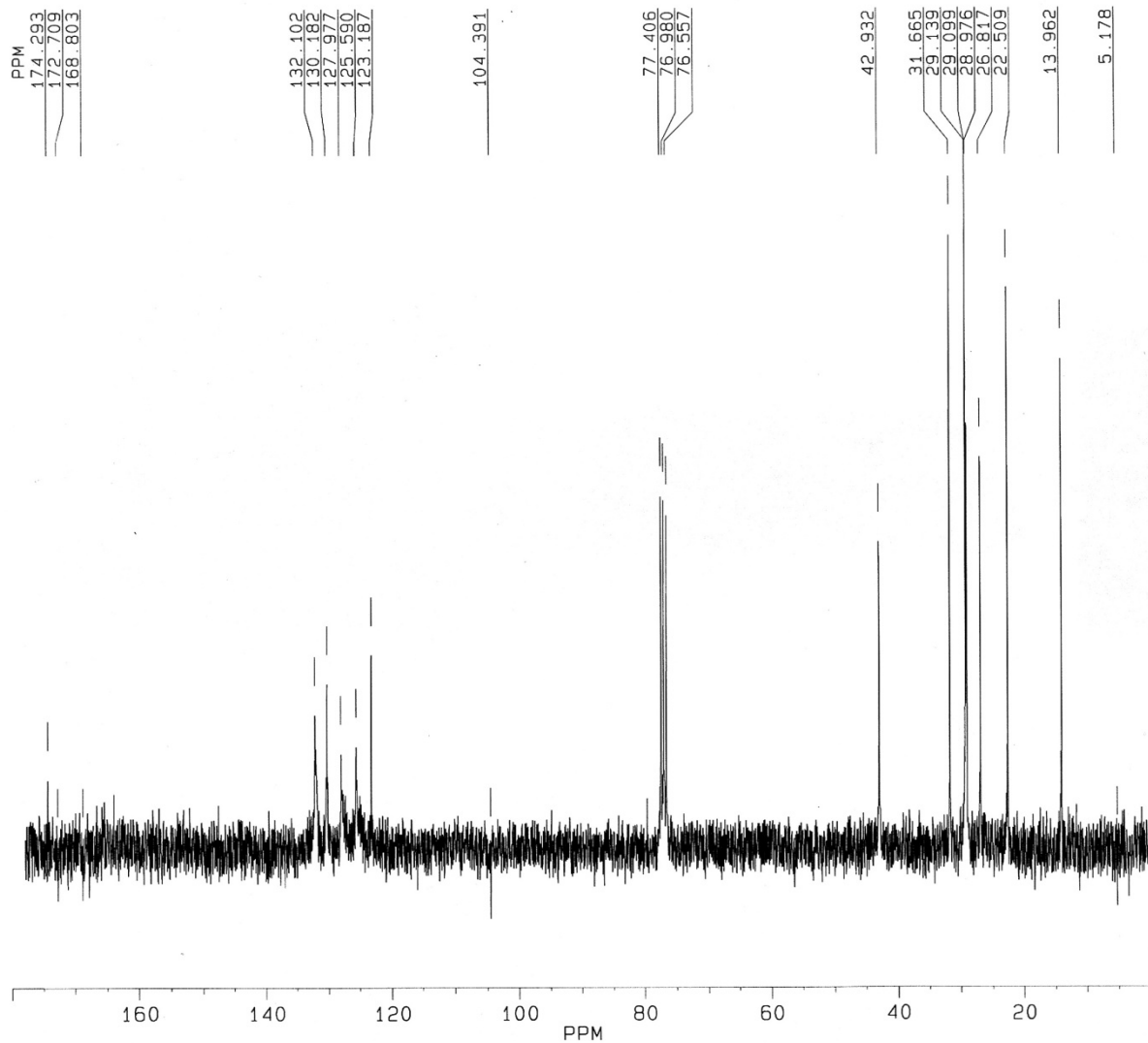
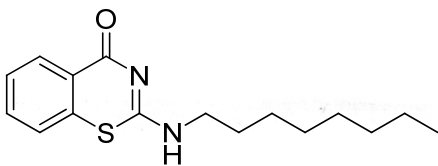
BJ-6-Oct (9) Number of sample scans: 16 Detector: DTGS KBr
 Number of background scans: 16 Beamsplitter: KBr
 Resolution: 8.000 Source: IR
 Sample gain: 4.0
 Mirror velocity: 6.2500
 Aperture: 95.00

圖十三、化合物 9 之紅外光圖譜

BJ-6-Oct/CDC13/1D-H
0215-bj6oct/1/1/wjd



圖十四、化合物 9 之氫核磁共振圖譜



DATE 6-3-8

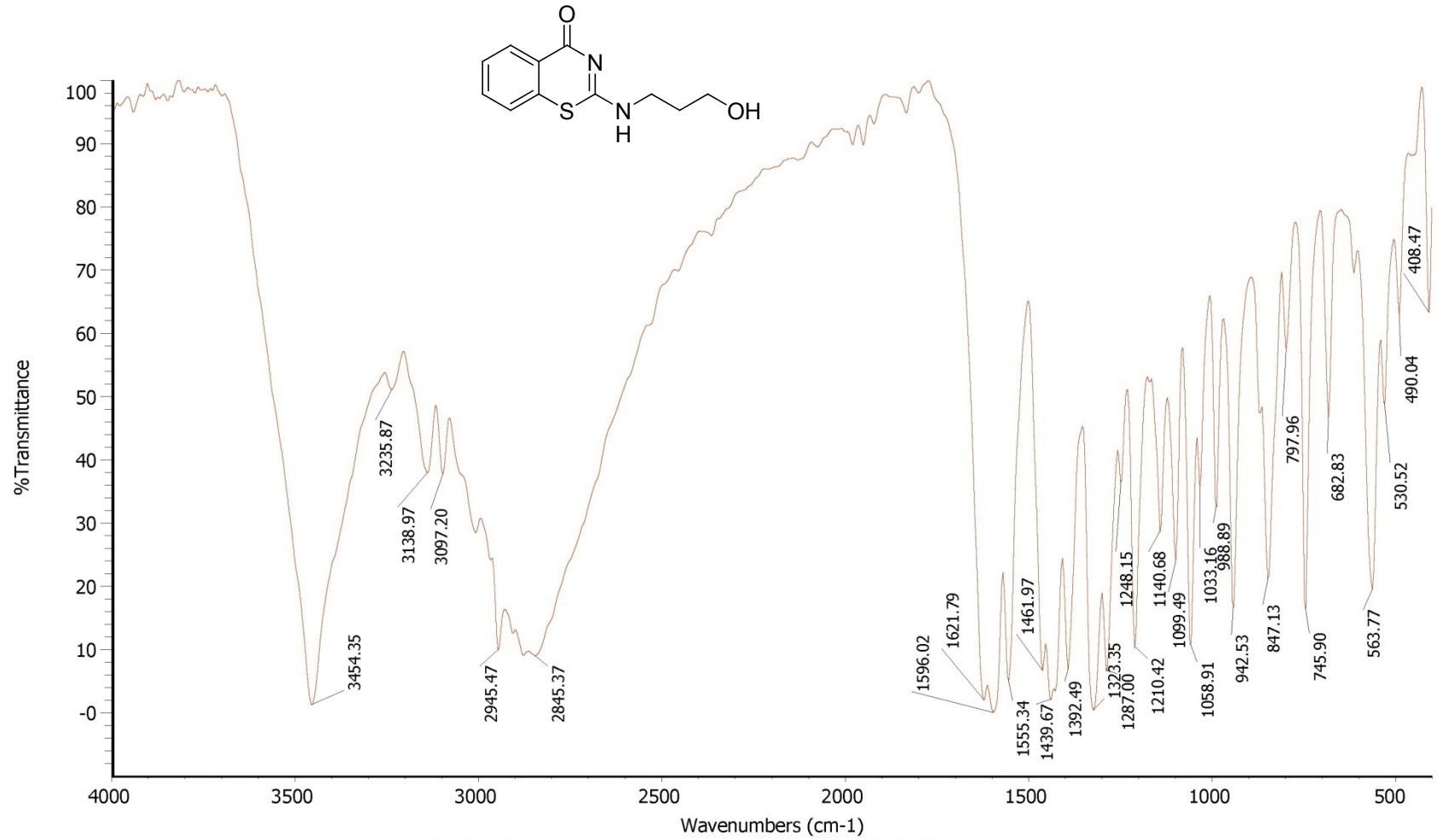
SF 75.482
 SY 75.0
 Q1 -4117.185
 SI 65536
 TD 65536
 SW 14285.714
 HZ/PT .436

PW 4.0
 RD 3.000
 AQ 2.294
 RG 400
 NS 140
 TE 297

FW 17900
 O2 4400.000
 DP 11H CPD

LB 1.000
 GB 0.0
 CX 20.00
 CY 12.00
 F1 179.967P
 F2 .001P
 HZ/CM 679.212
 PPM/CM 8.998
 SR -10398.67

圖十五、化合物 9 之碳核磁共振圖譜

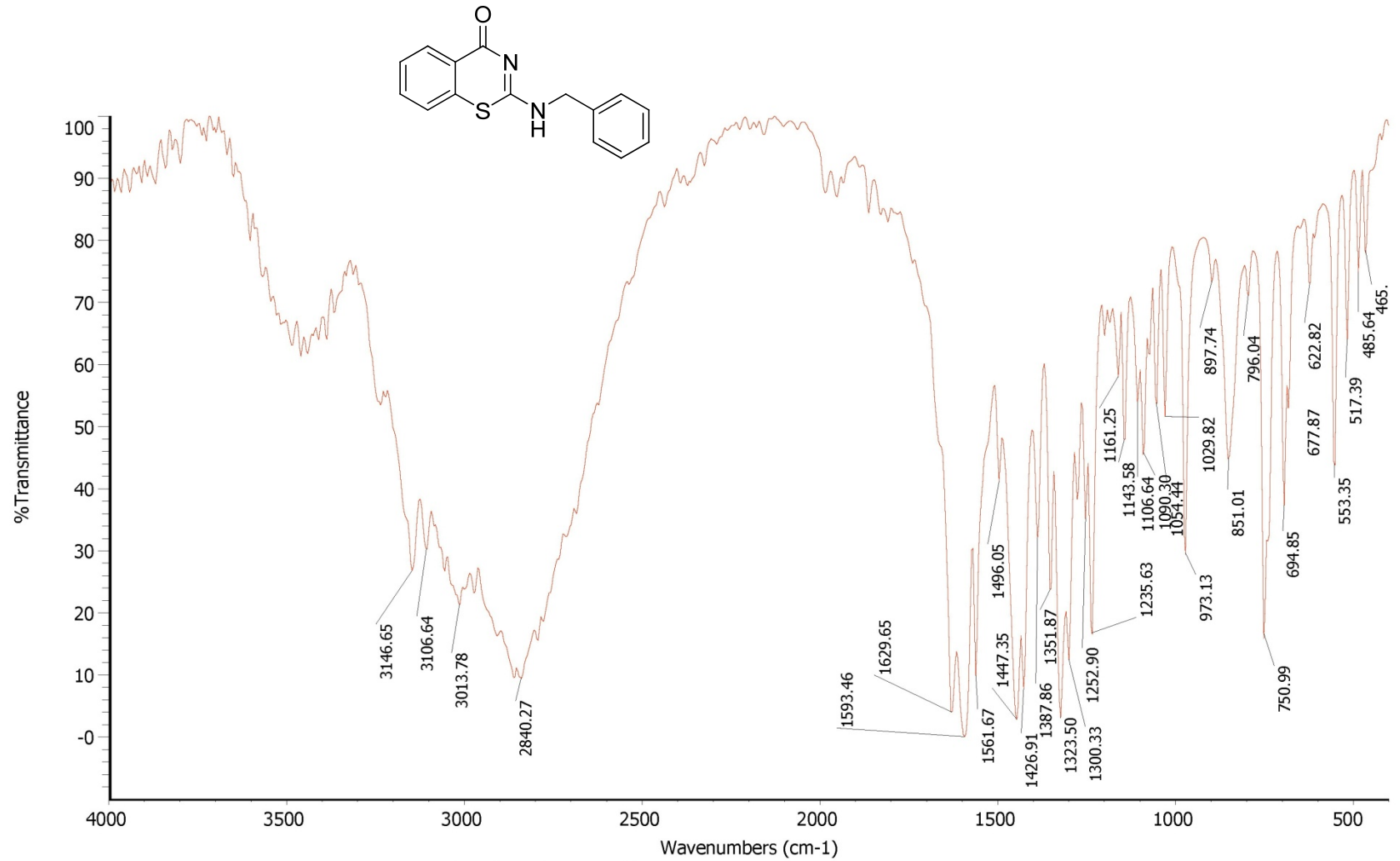


BJ-6-papanol (10)

Number of sample scans: 16
 Number of background scans: 16
 Resolution: 8.000
 Sample gain: 20.0
 Mirror velocity: 6.2500
 Aperture: 100.00

Detector: DTGS KBr
 Beamsplitter: KBr
 Source: IR

圖十六、化合物 10 之紅外光圖譜



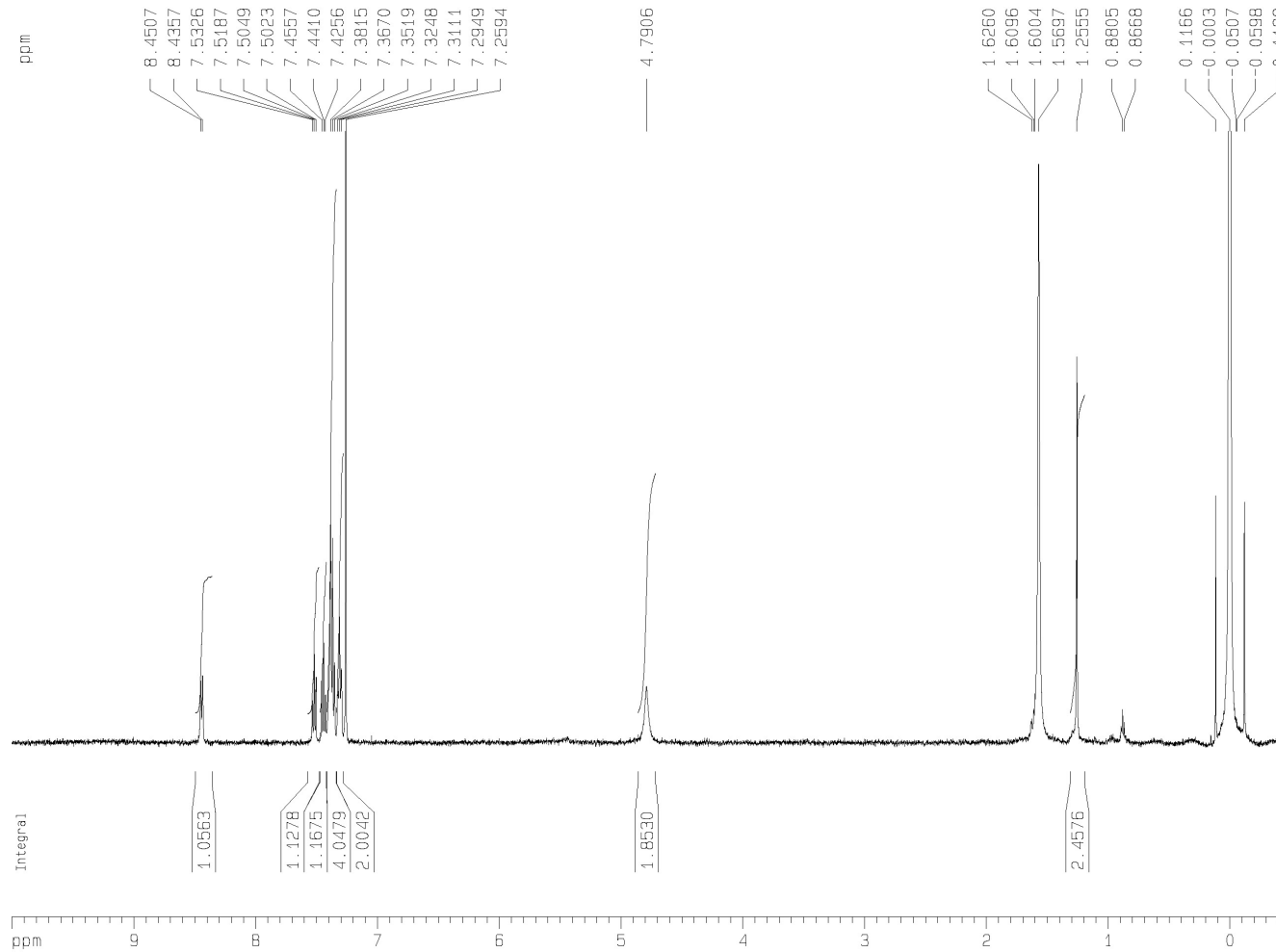
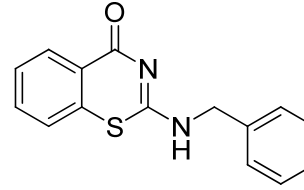
BJ-6-benzyl (11)

Number of sample scans: 32
 Number of background scans: 16
 Resolution: 8.000
 Sample gain: 20.0
 Mirror velocity: 6.2500
 Aperture: 100.00

Detector: DTGS KBr
 Beamsplitter: KBr
 Source: IR

圖十七、化合物 11 之紅外光圖譜

BJ-6-benzyl-9/CDC13/1D-H
0215-bj6benzyl9/1/1/wjd



Current Data Parameters
NAME 0215-bj6benzyl9
EXPNO 1
PROCNO 1

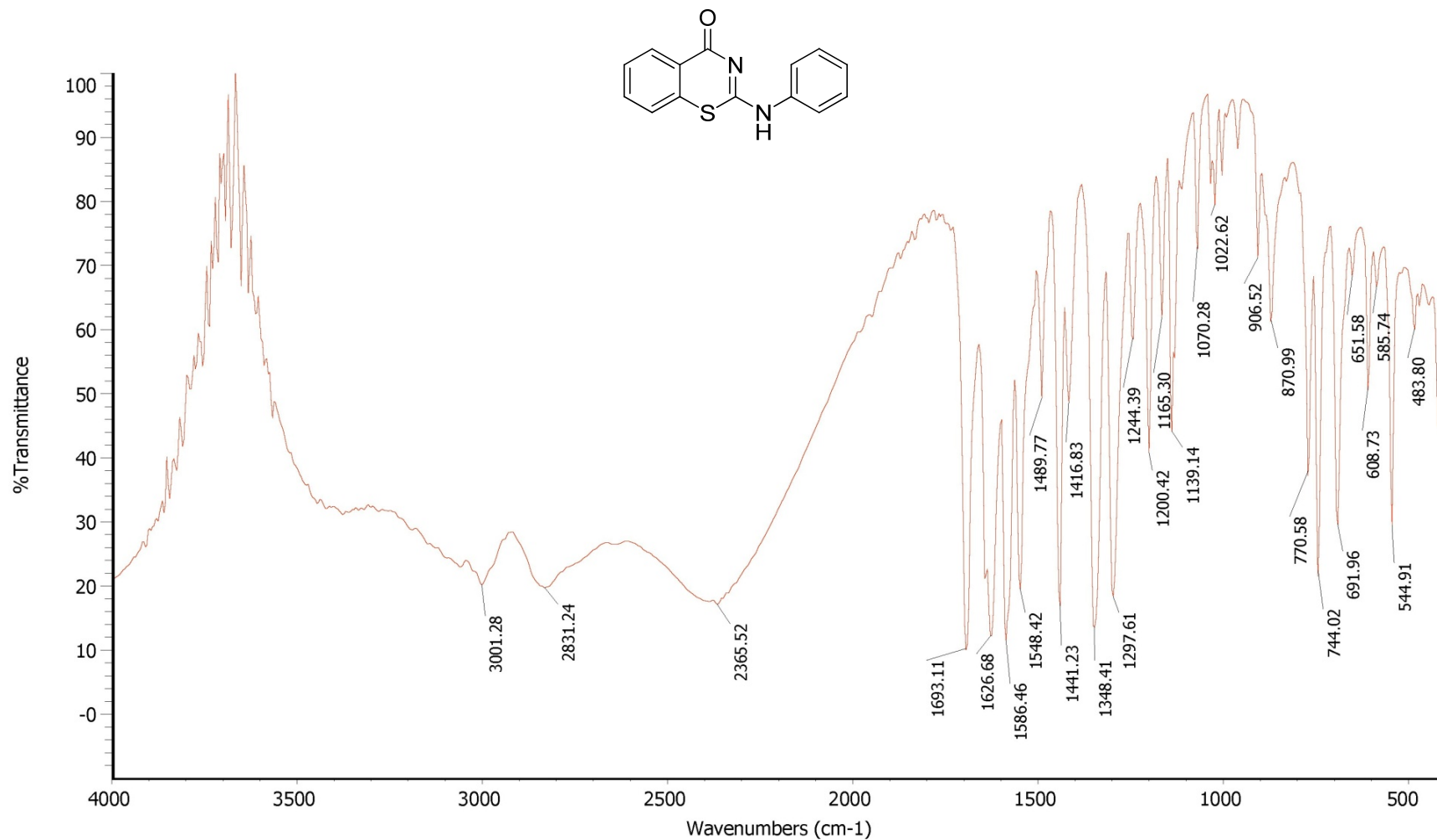
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20070214
Time 18.05
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm TXI 13C Z
PULPROG zg30
TD 32768
SOLVENT CDC13
NS 16
DS 2
SWH 10330.578 Hz
FIDRES 0.315264 Hz
AQ 1.5860212 sec
RG 2580.3
DW 48.400 usec
DE 6.50 usec
TE 300.0 K
D1 1.00000000 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 10.00 usec
PL1 -2.00 dB
SFO1 500.1330885 MHz

F2 - Processing parameters
SI 16384
SF 500.1300137 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

1D NMR plot parameters
CX 22.00 cm
CY 10.00 cm
F1P 10.000 ppm
F1 5001.30 Hz
F2P -0.500 ppm
F2 -250.06 Hz
PPMCM 0.47727 ppm/cm
HZCM 238.69839 Hz/cm

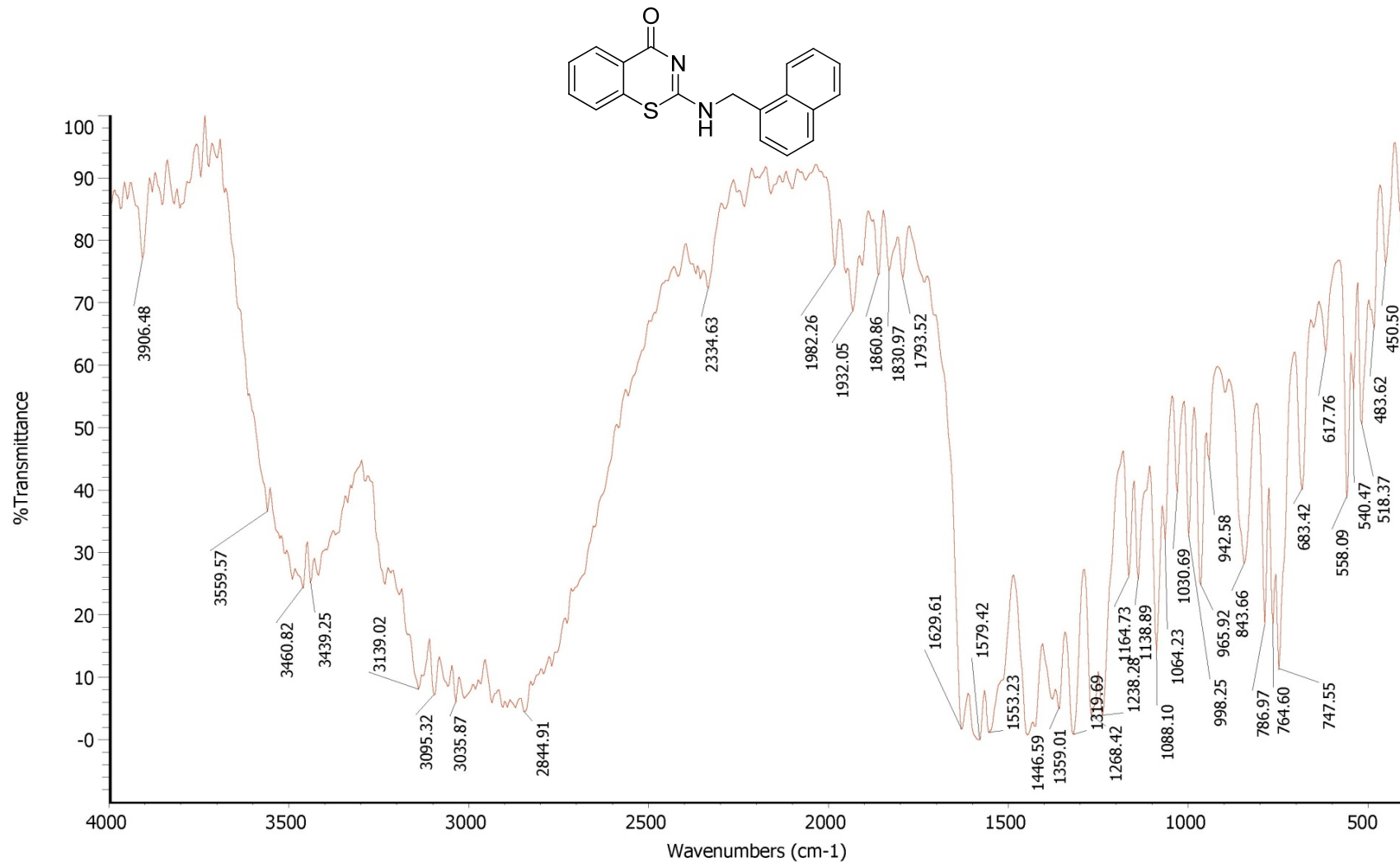
圖十八、化合物 11 之氫核磁共振圖譜



BJ-6-anil (12)

Number of sample scans: 1
 Number of background scans: 0
 Resolution: Unknown
 Sample gain: 1.0
 Mirror velocity: 0.0000
 Aperture: 0.00
 Detector: Unknown
 Beamsplitter: KBr
 Source: Off

圖十九、化合物 12 之紅外光圖譜

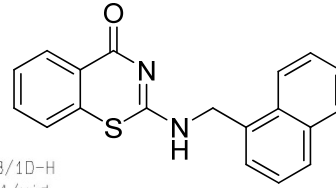


BJ-6-menaph (13)

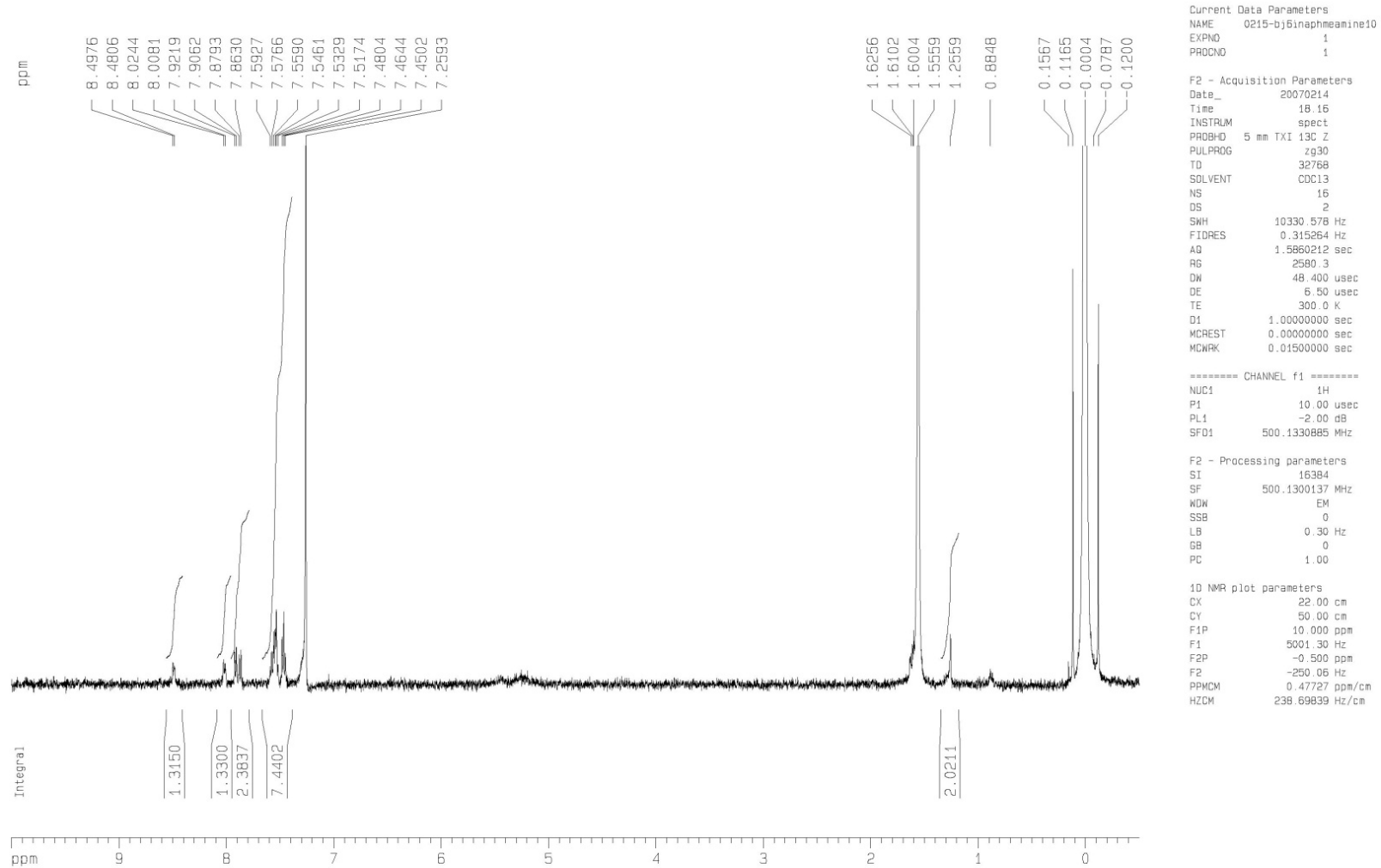
Number of sample scans: 16
 Number of background scans: 16
 Resolution: 8.000
 Sample gain: 20.0
 Mirror velocity: 6.2500
 Aperture: 100.00

Detector: DTGS KBr
 Beamsplitter: KBr
 Source: IR

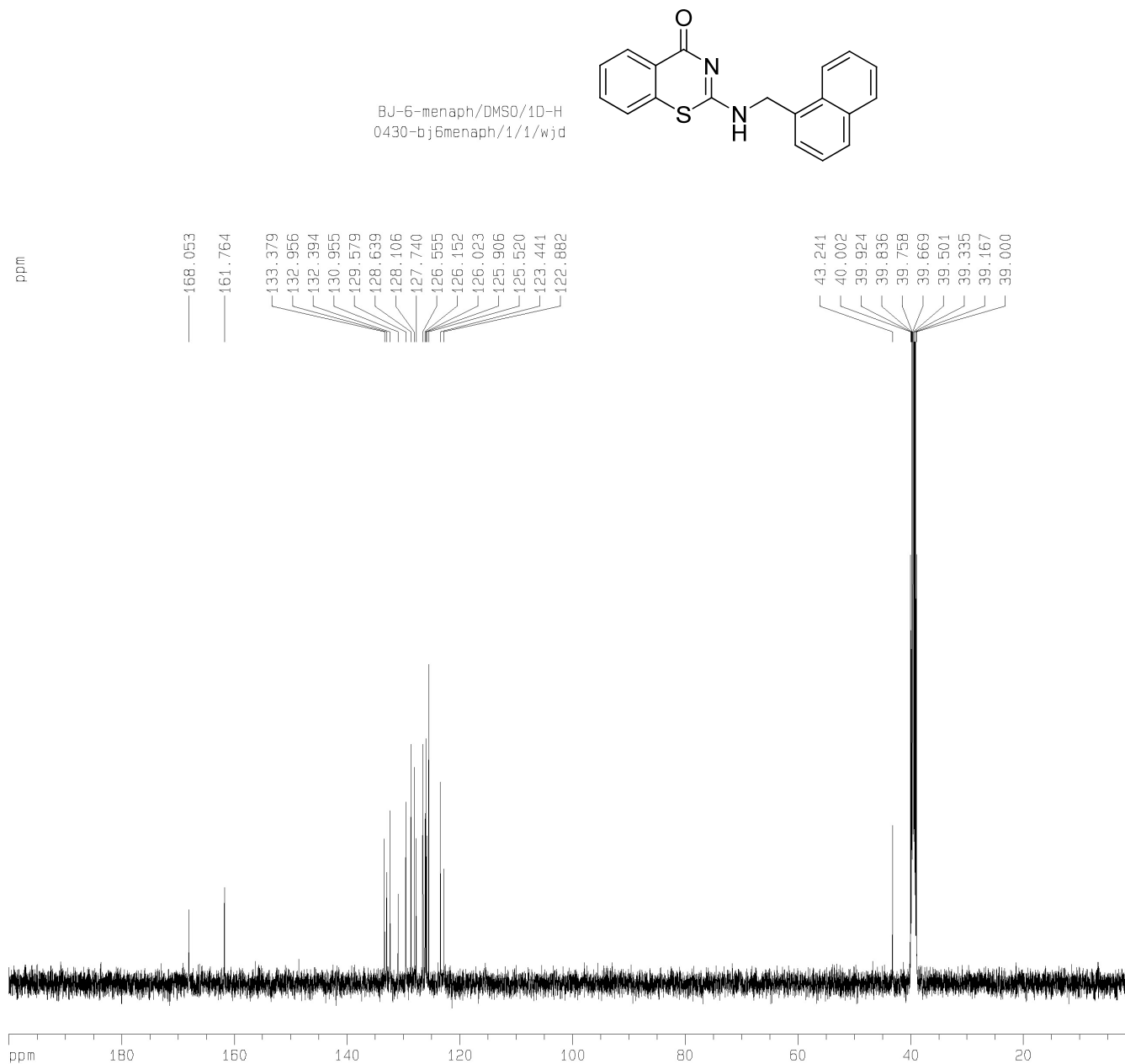
圖二十、化合物 13 之紅外光圖譜



BJ-6-Inaphmeamine-10/CDC13/1D-H
0215-bj6inaphmeamine10/1/1/wjd



圖二十一、化合物 13 之氫核磁共振圖譜



Current Data Parameters
NAME 0505-bj6menaph
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20080505
Time 17.32
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Dual 13C/
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT DMSO
NS 227
DS 2
SWH 37593.984 Hz
FIDRES 0.573639 Hz
AQ 0.8716788 sec
RG 32768
DN 13.300 usec
DE 6.50 usec
TE 300.0 K
D1 1.50000000 sec
D11 0.03000000 sec
DELTA 1.39999998 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

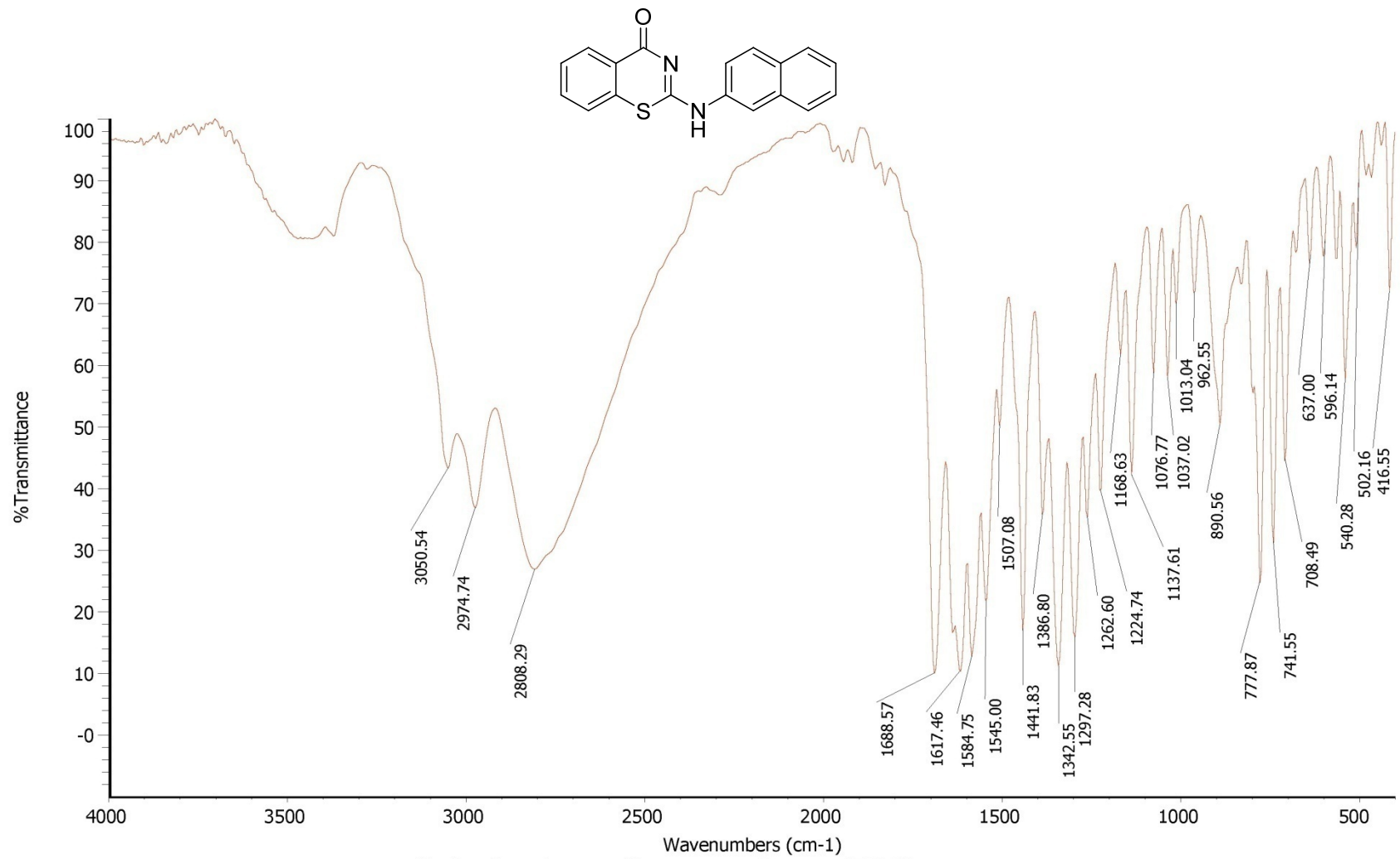
===== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 9.80 usec
PL1 5.00 dB
SFO1 125.7703148 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waitz16
NUC2 1H
PCPD2 90.00 usec
PL2 -5.00 dB
PL12 14.20 dB
PL13 17.20 dB
SFO2 500.1320005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 125.7578453 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

1D NMR plot parameters
CX 22.00 cm
CY 60.00 cm
F1P 200.000 ppm
F1 25151.57 Hz
F2P -0.000 ppm
F2 -0.00 Hz
PPHCM 9.09091 ppm/cm
HZCM 1143.25317 Hz/cm

圖二十二、化合物 13 之碳核磁共振圖譜

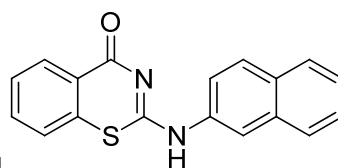


BJ-6-naph (14)

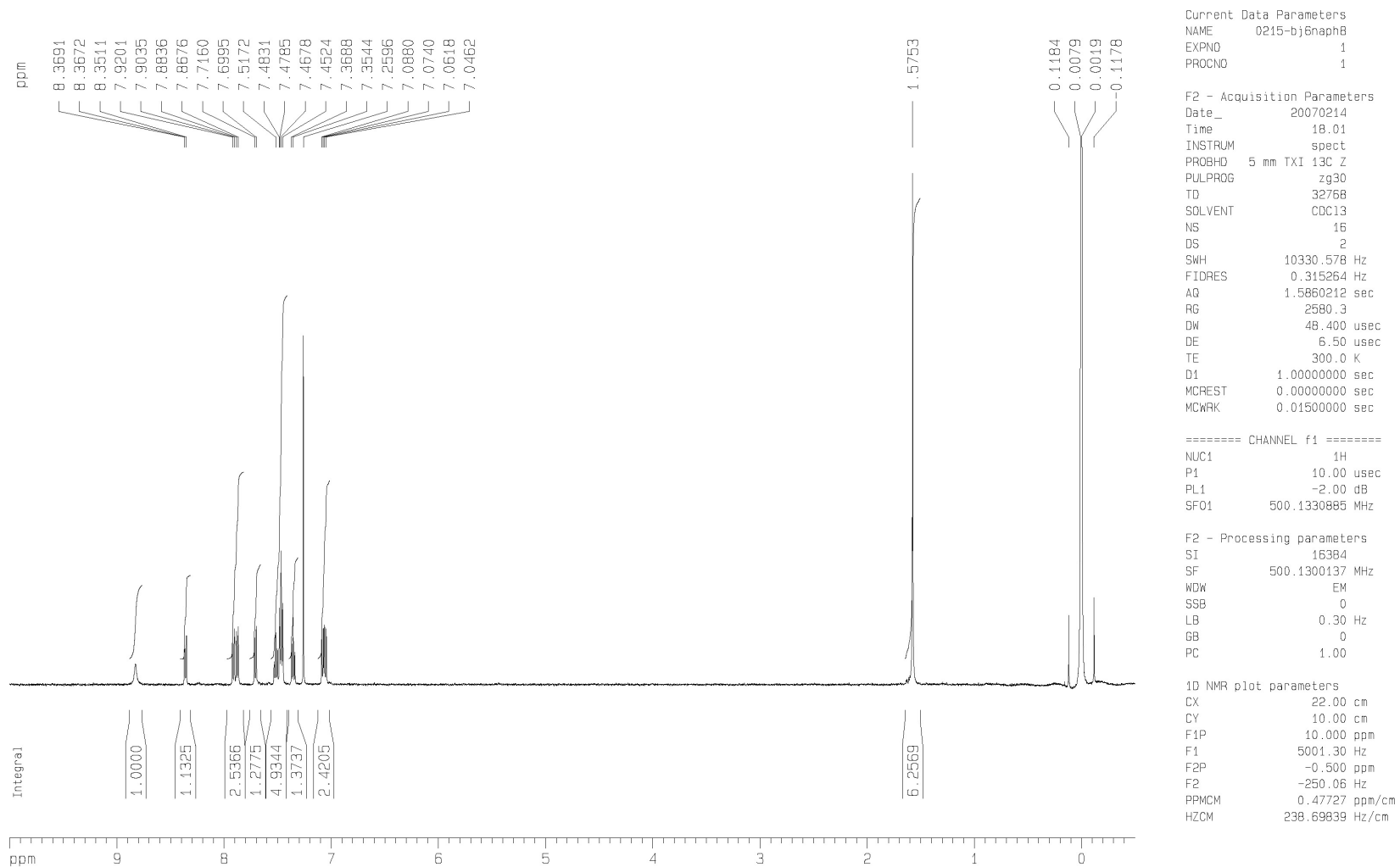
Number of sample scans: 32
 Number of background scans: 32
 Resolution: 8.000
 Sample gain: 20.0
 Mirror velocity: 6.2500
 Aperture: 100.00

Detector: DTGS KBr
 Beamsplitter: KBr
 Source: IR

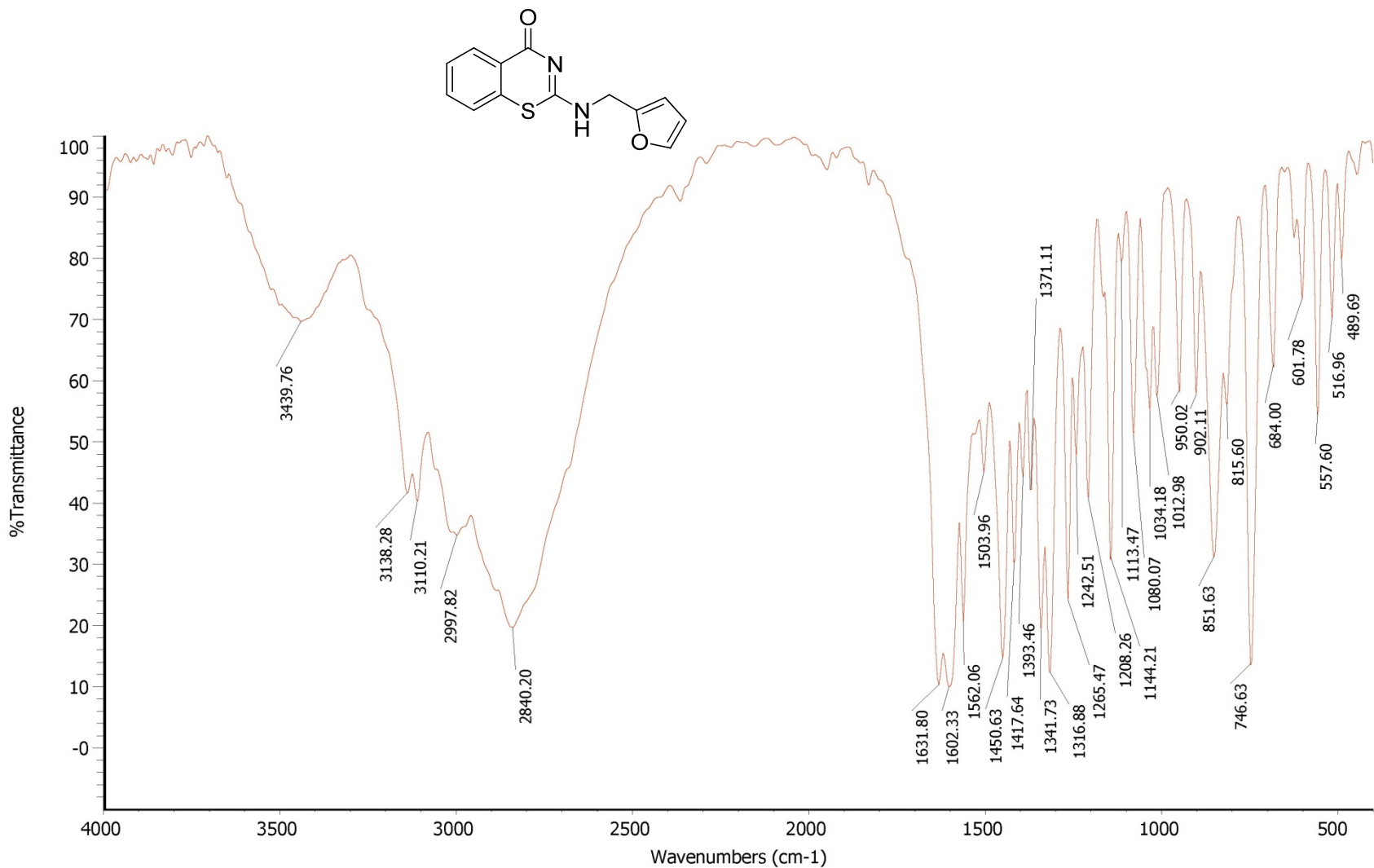
圖二十三、化合物 14 之紅外光圖譜



BJ-6-nap-8/CDC13/1D-H
0215-bj6nap8/1/1/wjd



圖二十四、化合物 14 之氫核磁共振圖譜



BJ-6-Fura (15)

Number of sample scans: 16
 Number of background scans: 16
 Resolution: 8.000
 Sample gain: 20.0
 Mirror velocity: 6.2500
 Aperture: 100.00

Detector: DTGS KBr
 Beamsplitter: KBr
 Source: IR

圖二十五、化合物 15 之紅外光圖譜



Current Data Parameters
 NAME 0430-bj6fura
 EXPNO 1
 PROCNO 1

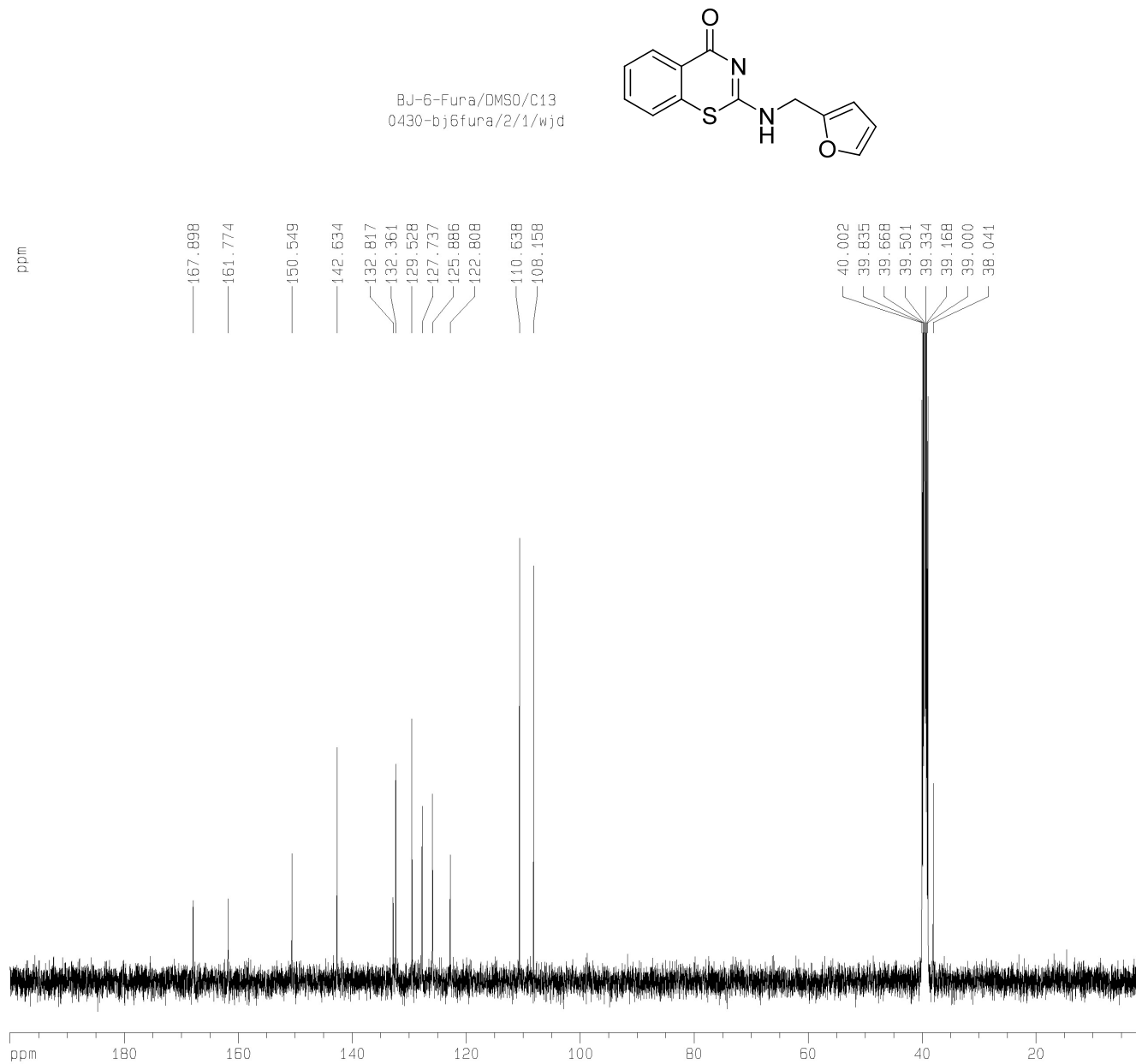
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20080430
 Time 14.35
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm TXI 13C Z
 PULPROG zg30
 TD 32768
 SOLVENT CDC13
 NS 16
 DS 2
 SWH 10330.578 Hz
 FIDRES 0.315264 Hz
 AQ 1.5860212 sec
 RG 64
 DW 48.400 usec
 DE 6.50 usec
 TE 300.0 K
 D1 1.0000000 sec
 MCREST 0.0000000 sec
 MCWRK 0.0150000 sec

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P1 12.50 usec
 PL1 -5.00 dB
 SFO1 500.1330885 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 16384
 SF 500.1300102 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

1D NMR plot parameters
 CX 22.00 cm
 CY 100.00 cm
 F1P 10.000 ppm
 F1 5001.30 Hz
 F2P -0.500 ppm
 F2 -250.06 Hz
 PPMCM 0.47727 ppm/cm
 HZCM 238.69839 Hz/cm

圖二十六、化合物 15 之氫核磁共振圖譜



Current Data Parameters
NAME 0430-bj6fura
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20080505
Time 16.38
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Dual 13C/
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT DMSO
NS 384
DS 2
SWH 37593.984 Hz
FIDRES 0.573639 Hz
AQ 0.8716788 sec
RG 32768
DW 13.300 usec
DE 6.50 usec
TE 300.0 K
D1 1.50000000 sec
D11 0.03000000 sec
DELTA 1.39999998 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCNRK 0.01500000 sec

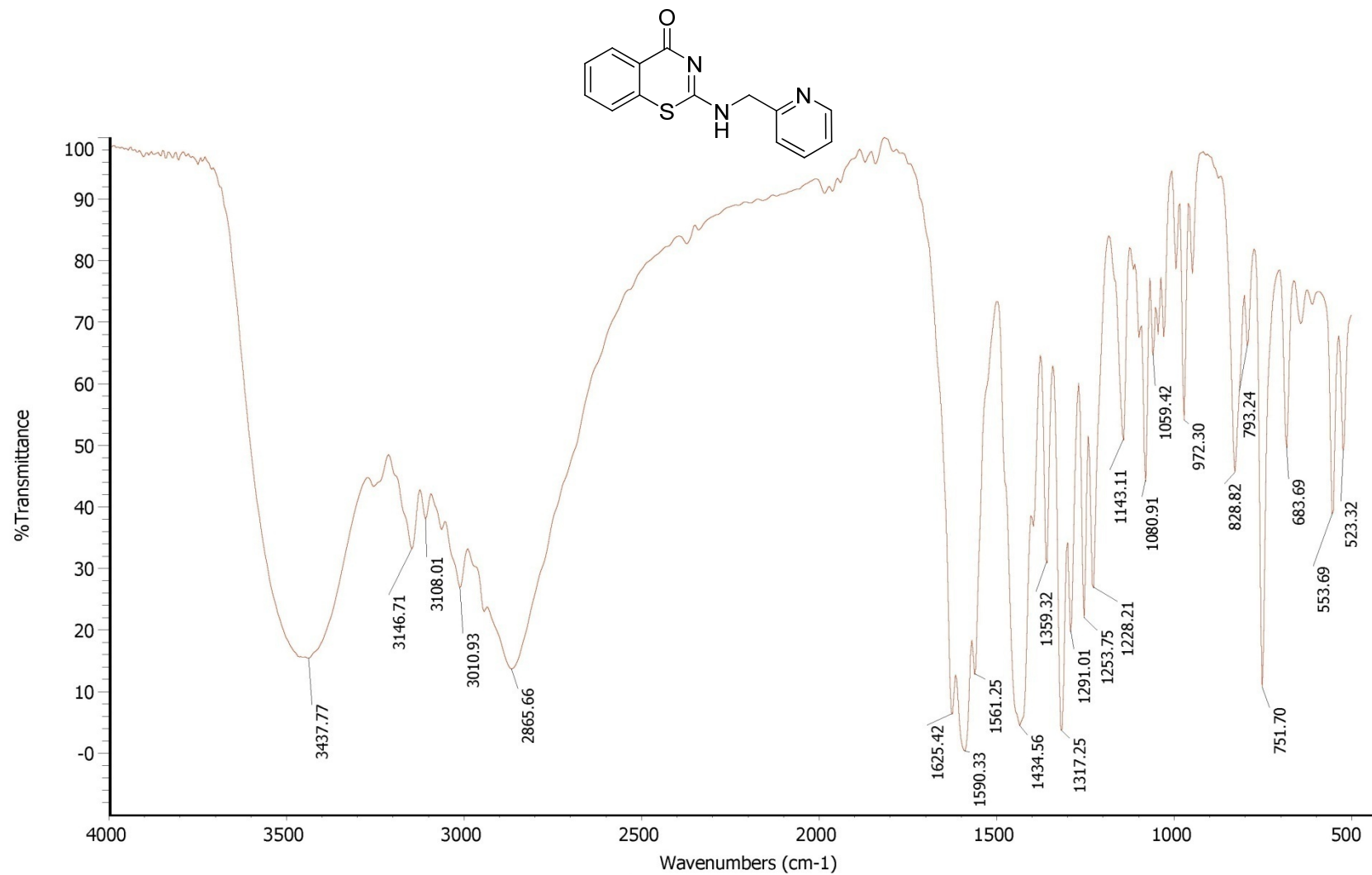
===== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 9.80 usec
PL1 5.00 dB
SF01 125.7703148 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 90.00 usec
PL2 -5.00 dB
PL12 14.20 dB
PL13 17.20 dB
SF02 500.1320005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 125.7578476 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

1D NMR plot parameters
CX 22.00 cm
CY 80.00 cm
F1P 200.000 ppm
F1 25151.57 Hz
F2P -0.000 ppm
F2 -0.00 Hz
PPMCM 9.09091 ppm/cm
HZCM 1143.25317 Hz/cm

圖二十七、化合物 15 之碳核磁共振圖譜

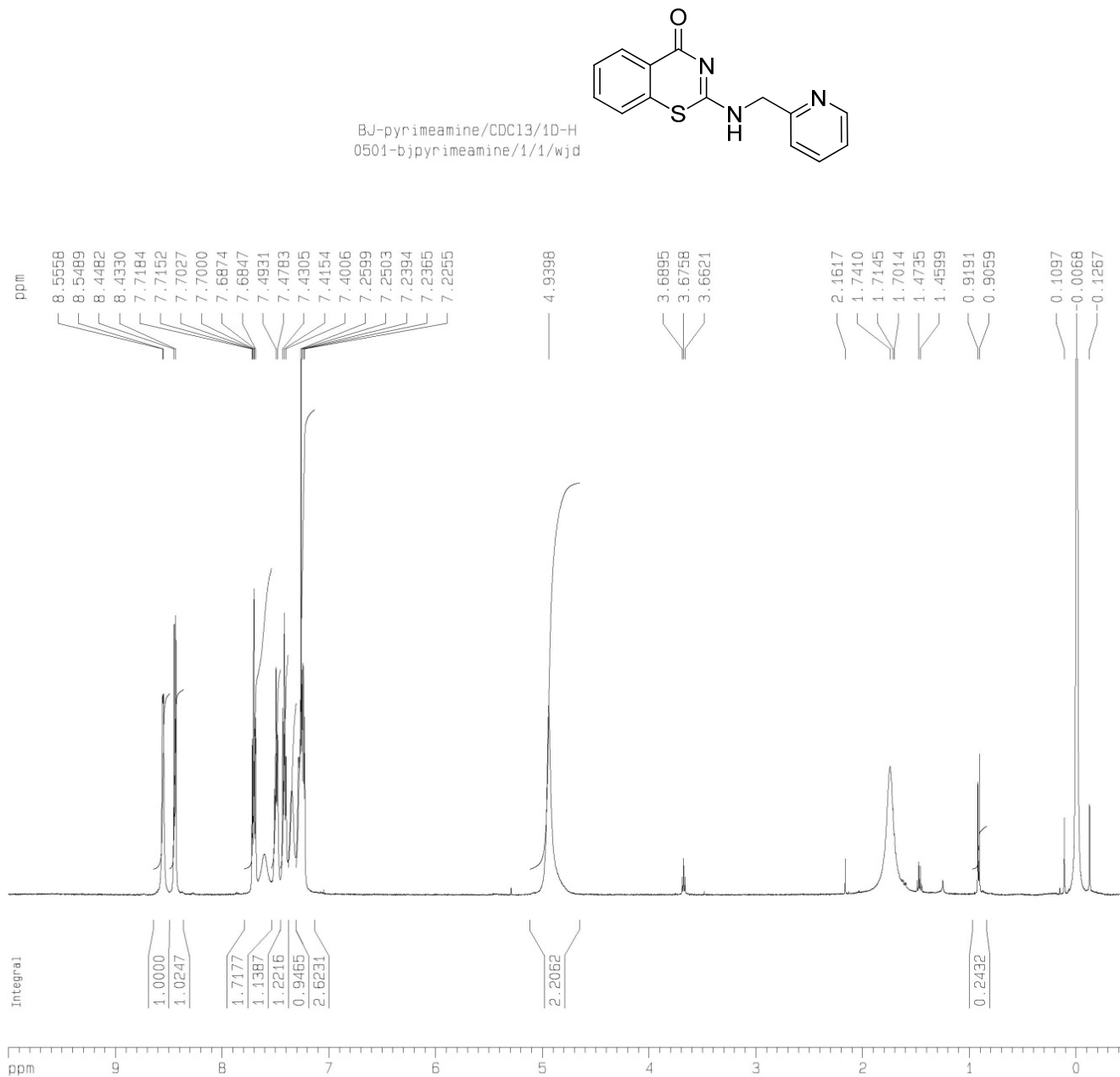


BJ-pyrimineamine (16)

Number of sample scans: 16
 Number of background scans: 16
 Resolution: 8.000
 Sample gain: 4.0
 Mirror velocity: 6.2500
 Aperture: 100.00

Detector: DTGS KBr
 Beamsplitter: KBr
 Source: IR

圖二十八、化合物 16 之紅外光圖譜



```

Current Data Parameters
NAME      0501-bjpyrimeamine
EXPNO     1
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20070430
Time      17.36
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm Dual 13C/
PULPROG   zg30
TD         32768
SOLVENT   CDC13
NS         16
DS         2
SWH        10330.578 Hz
FIDRES     0.315264 Hz
AQ         1.5860212 sec
RG         362
DW         48.400 usec
DE         6.50 usec
TE         300.0 K
D1         1.00000000 sec
MCREST     0.00000000 sec
MCWRK     0.01500000 sec

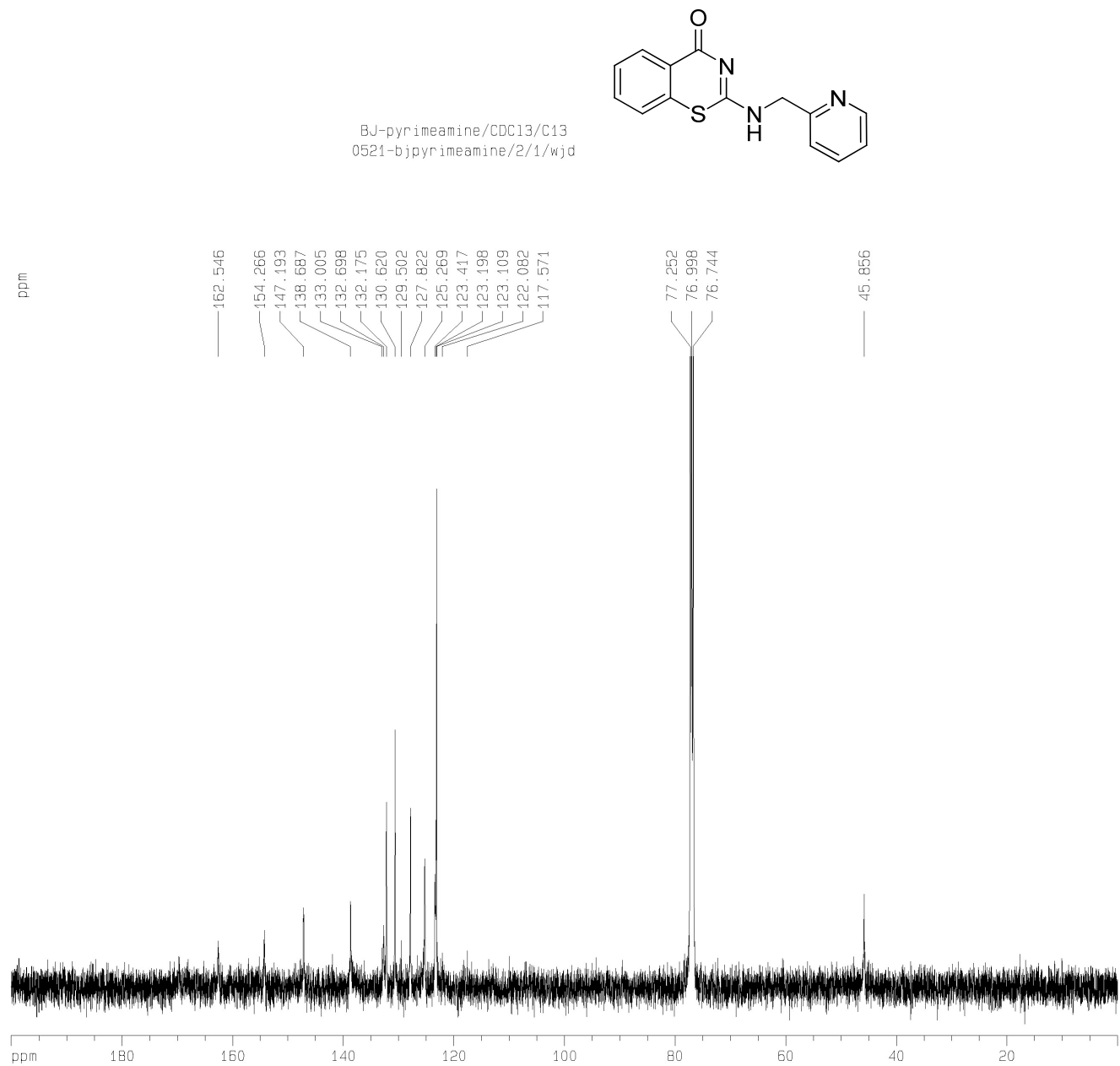
===== CHANNEL f1 =====
NUC1       1H
P1         12.70 usec
PL1        -5.00 dB
SF01       500.1330885 MHz

F2 - Processing parameters
SI         16384
SF         500.1300137 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         0.30 Hz
GB         0
PC         1.00

1D NMR plot parameters
CX         22.00 cm
CY         6.00 cm
F1P        10.000 ppm
F1         5001.30 Hz
F2P        -0.500 ppm
F2         -250.05 Hz
PPMCM      0.47727 ppm/cm
HZCM       238.69839 Hz/cm

```

圖二十九、化合物 16 之氫核磁共振圖譜



```

Current Data Parameters
NAME      0521-bjpyrimeamine
EXPNO    2
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20080521
Time     15.01
INSTRUM spect
PROBHD   5 mm Dual 13C/
PULPROG zgpg30
TD        65536
SOLVENT  CDCl3
NS        4808
DS        2
SWH       37593.984 Hz
FIDRES    0.573639 Hz
AQ        0.6716788 sec
RG        7296.2
DW        13.300 usec
DE        6.50 usec
TE        300.0 K
D1        1.50000000 sec
D11       0.03000000 sec
DELTA     1.39999998 sec
MCREST    0.00000000 sec
MCWRK     0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1      13C
P1        9.80 usec
PL1       5.00 dB
SFO1     125.7703148 MHz

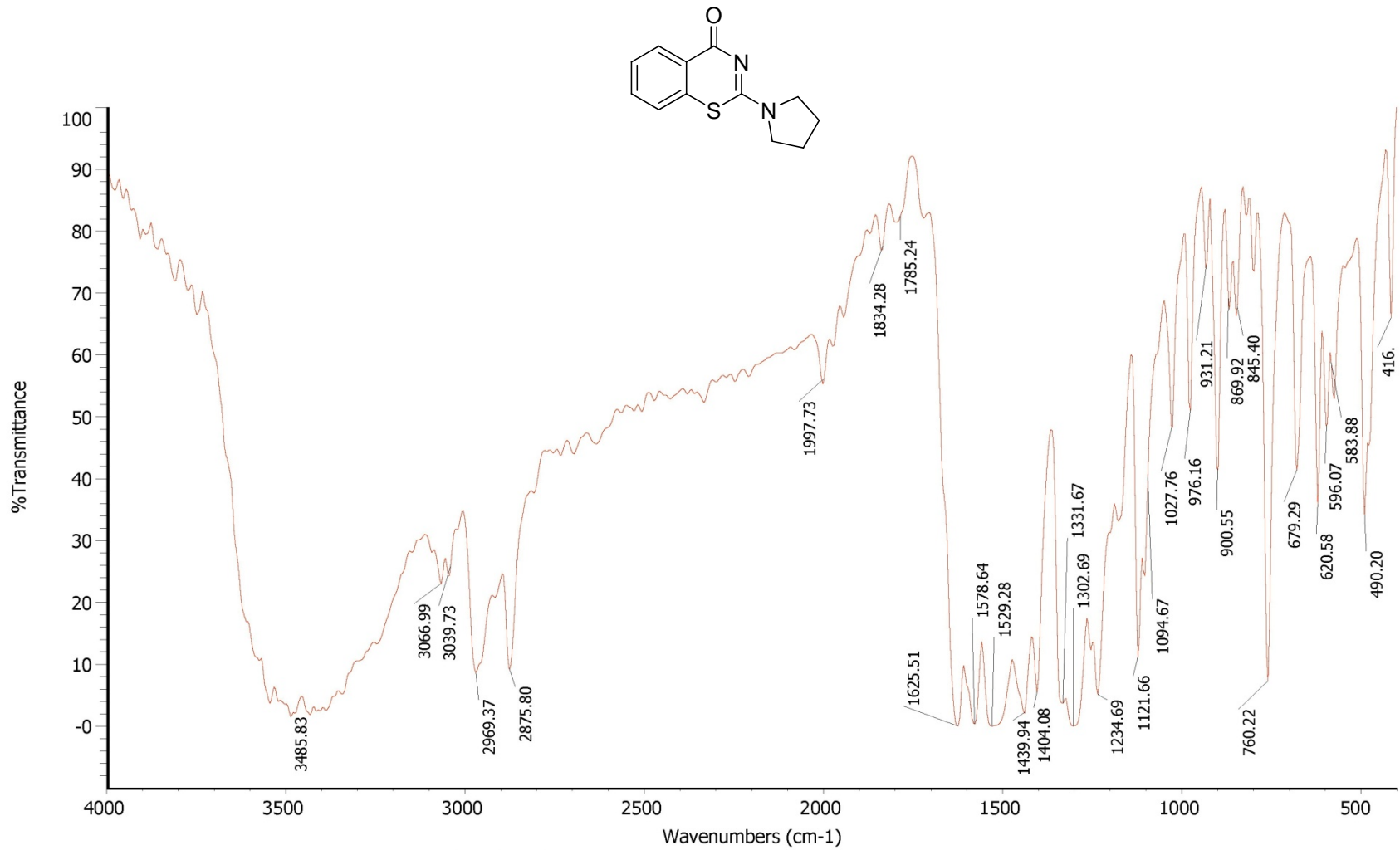
===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2   waltz16
NUC2      1H
PCPD2     90.00 usec
PL2       -5.00 dB
PL12      14.20 dB
PL13      17.20 dB
SFO2     500.1320005 MHz

F2 - Processing parameters
SI        32768
SF        125.7577931 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        1.00 Hz
GB        0
PC        1.00

1D NMR plot parameters
CX        22.00 cm
CY        10.00 cm
FIP       200.000 ppm
F1        25151.56 Hz
F2P       -0.000 ppm
F2        -0.00 Hz
PPMCM     9.09091 ppm/cm
HZCM      1143.25289 Hz/cm

```

圖三十、化合物 16 之碳核磁共振圖譜

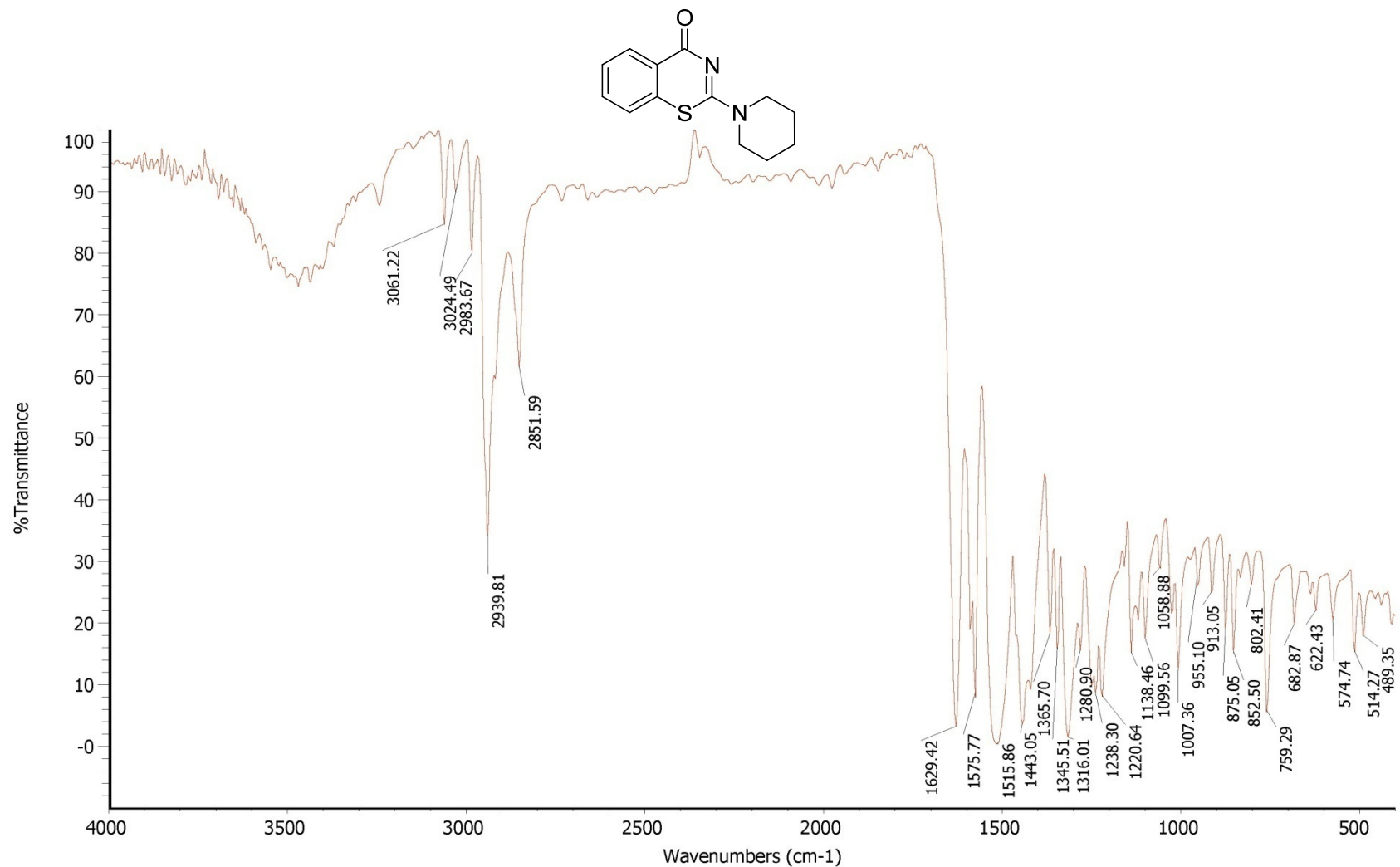


BJ-Pyrodine (17)

Number of sample scans: 16
 Number of background scans: 16
 Resolution: 8.000
 Sample gain: 20.0
 Mirror velocity: 6.2500
 Aperture: 100.00

Detector: DTGS KBr
 Beamsplitter: KBr
 Source: IR

圖三十一、化合物 17 之紅外光圖譜

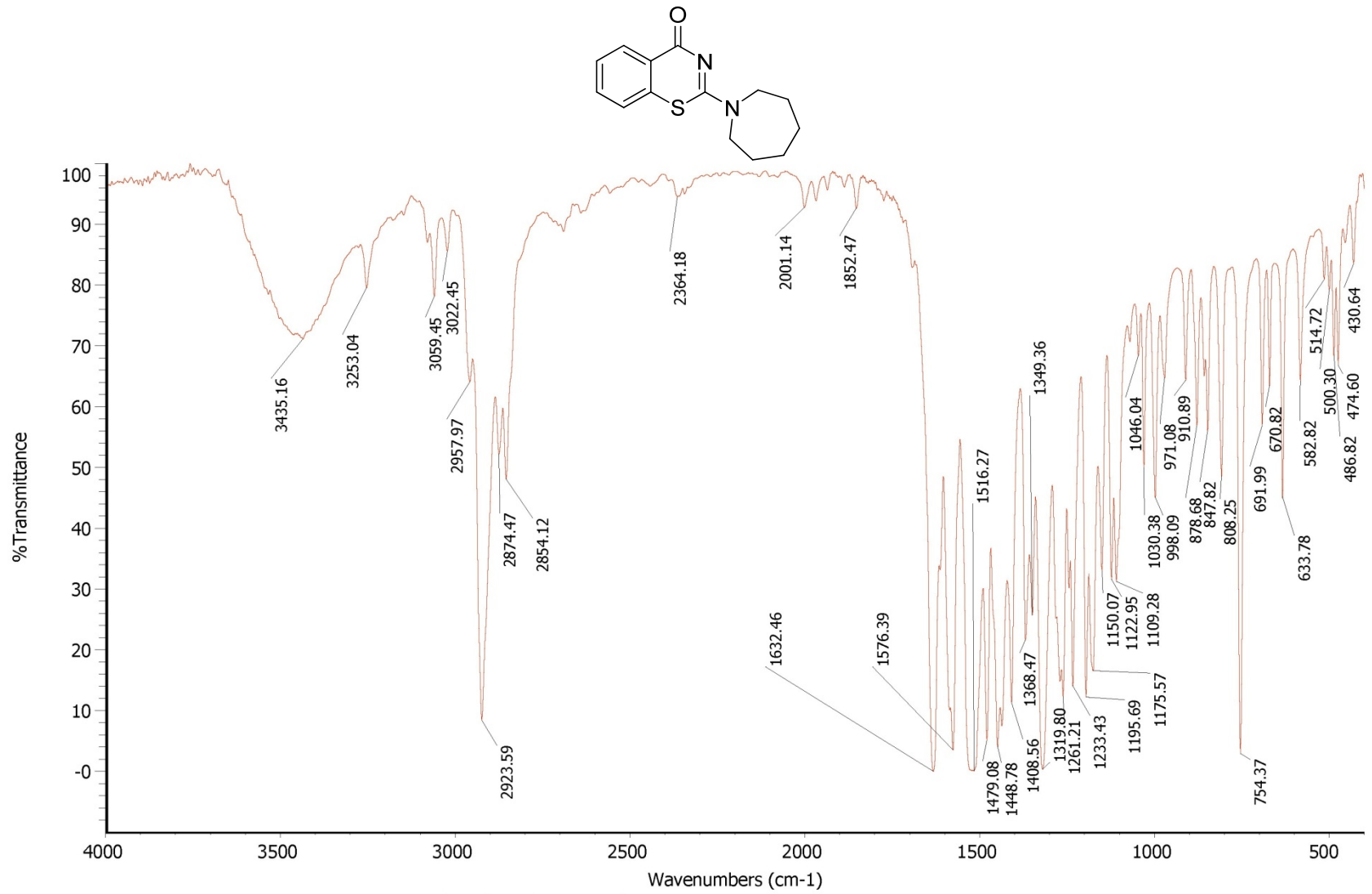


BJ-peridine (18)

Number of sample scans: 1
 Number of background scans: 0
 Resolution: Unknown
 Sample gain: 1.0
 Mirror velocity: 0.0000
 Aperture: 0.00

Detector: Unknown
 Beamsplitter: KBr
 Source: Off

圖三十二、化合物 18 之紅外光圖譜

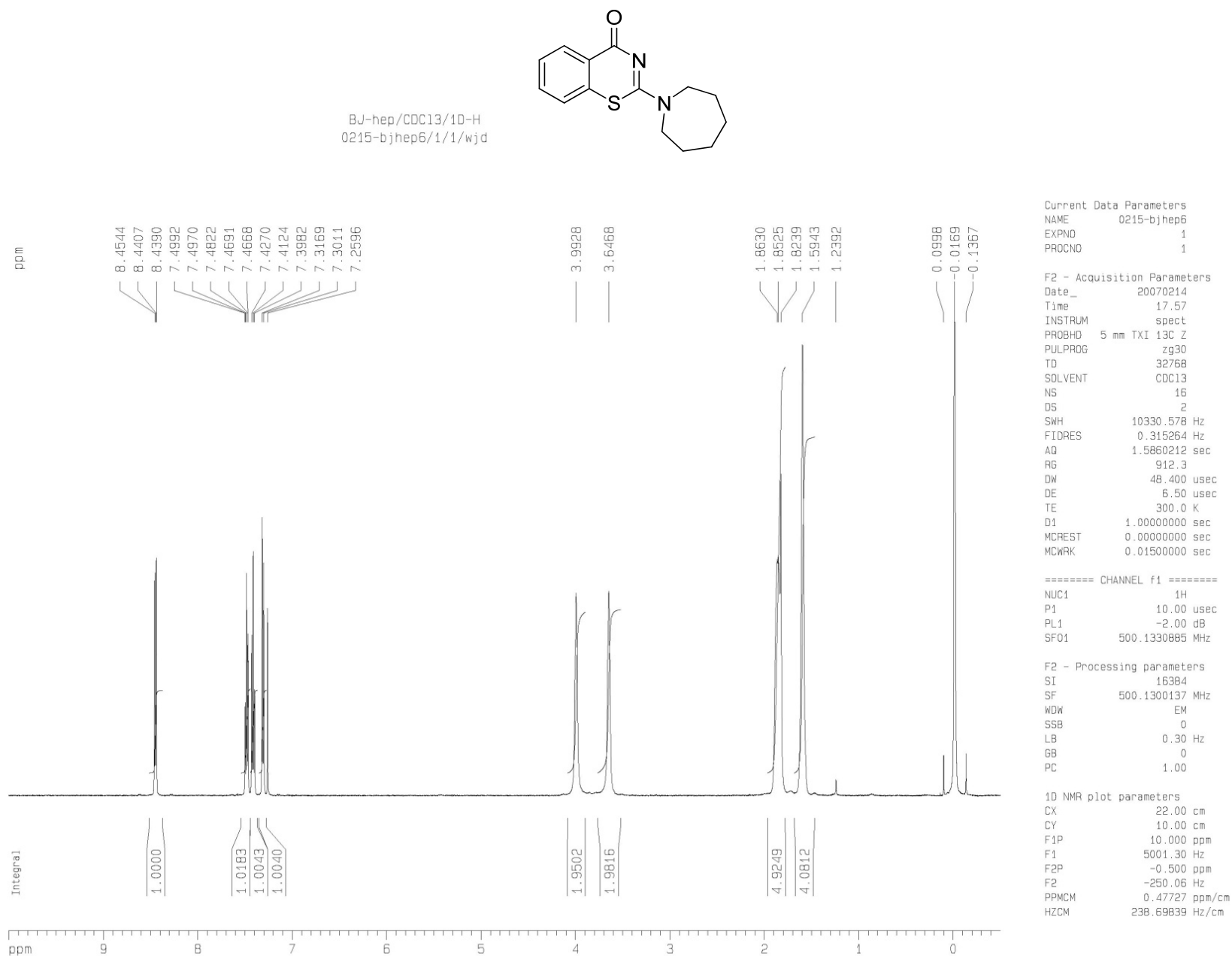


BJ-hep (19)

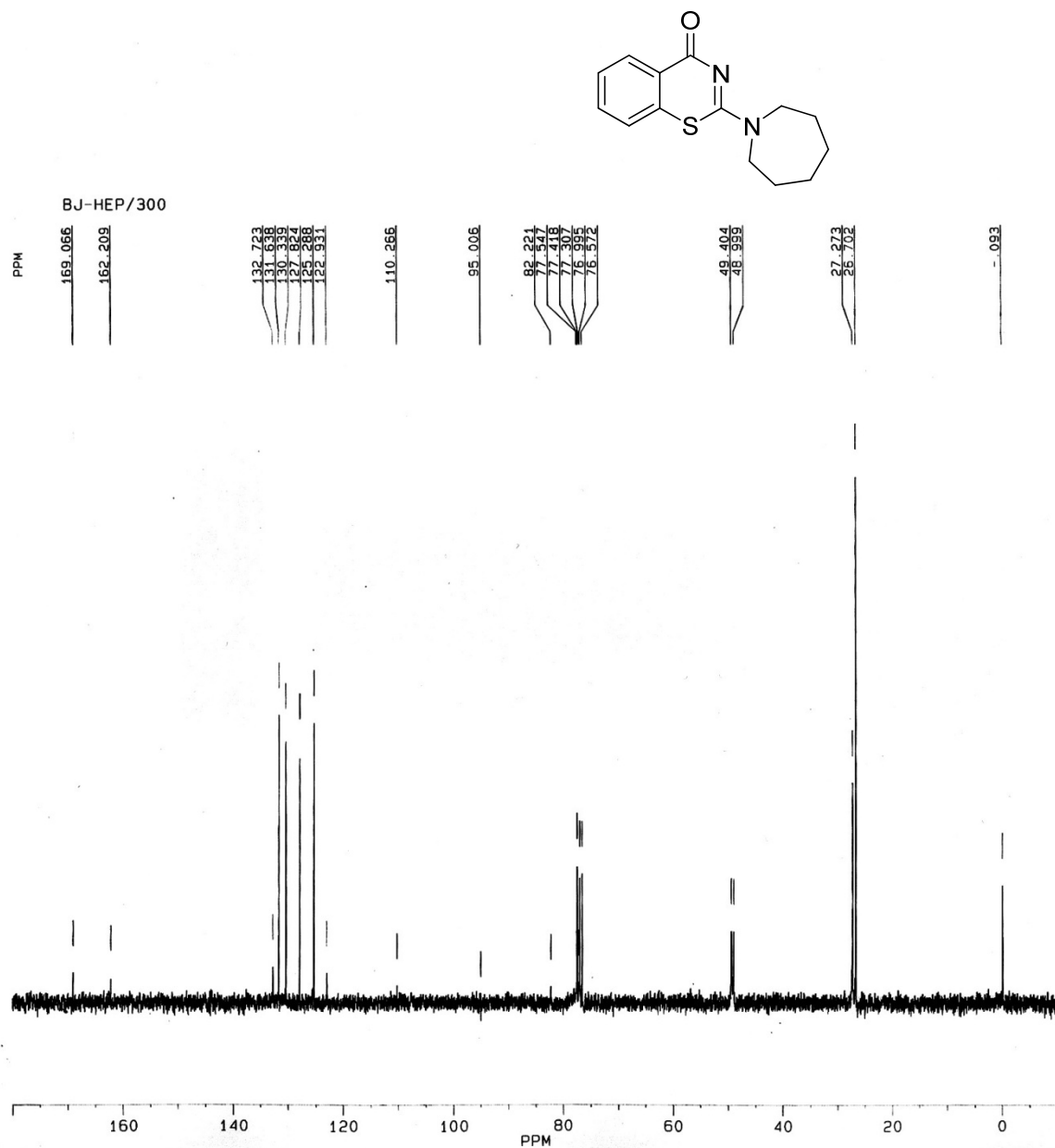
Number of sample scans: 16
 Number of background scans: 16
 Resolution: 4.000
 Sample gain: 10.0
 Mirror velocity: 6.2500
 Aperture: 100.00

Detector: DTGS KBr
 Beamsplitter: KBr
 Source: IR

圖三十三、化合物 19 之紅外光圖譜



圖三十四、化合物 19 之氫核磁共振圖譜



DATE 23-4-7

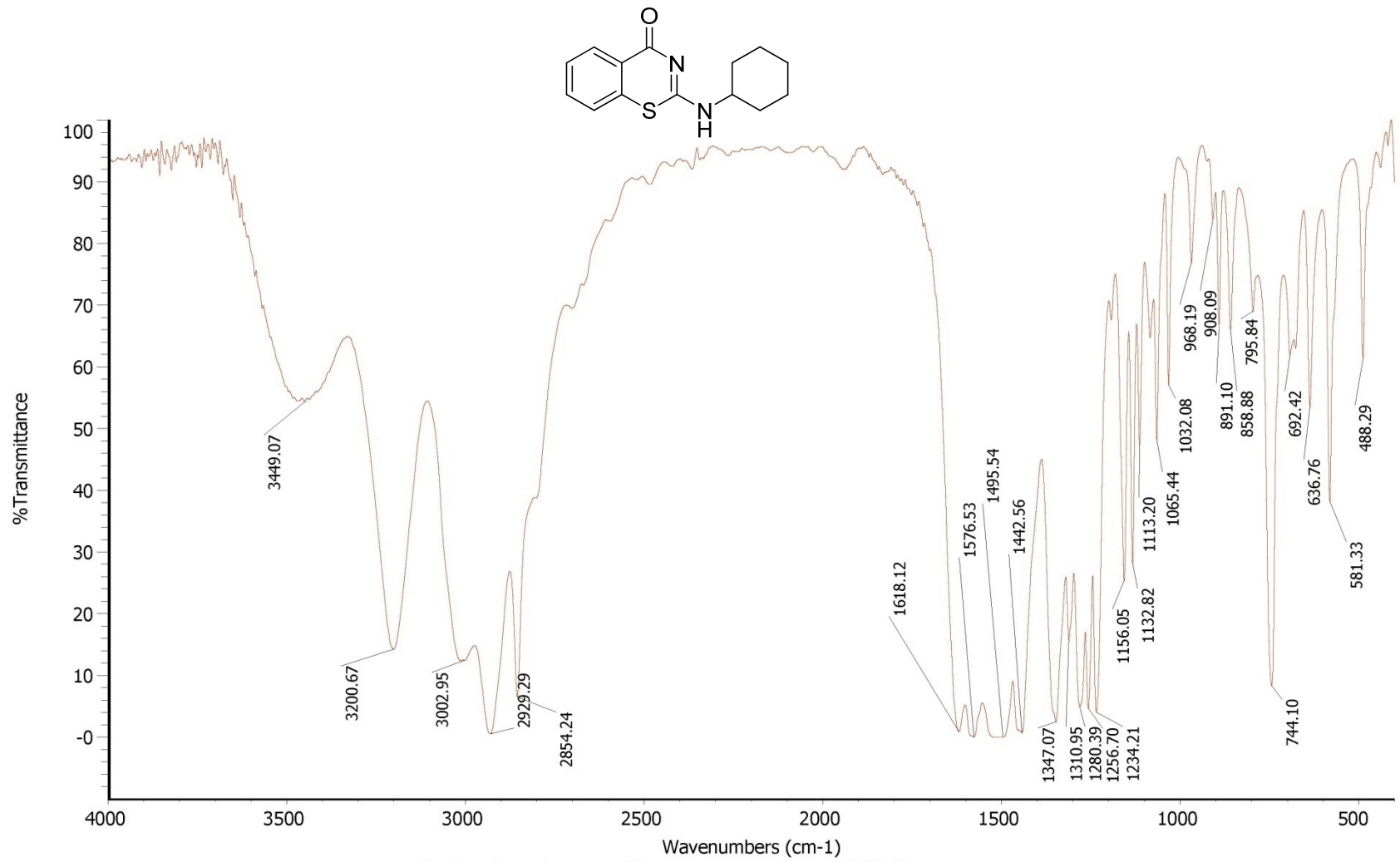
SF 75.469
SY 75.0
O1 -4117.185
SI 65536
TD 65536
SW 29411.765
HZ/PT .898

PW 6.0
RD 3.000
AQ 1.114
RG 400
NS 132
TE 297

FW 36800
O2 4400.000
DP 11H CPD

LB 1.000
GB 0.0
CX 20.00
CY 10.00
F1 180.008P
F2 -9.988P
HZ/CM 716.939
PPM/CM 9.500
SR -10400.39

圖三十五、化合物 19 之碳核磁共振圖譜



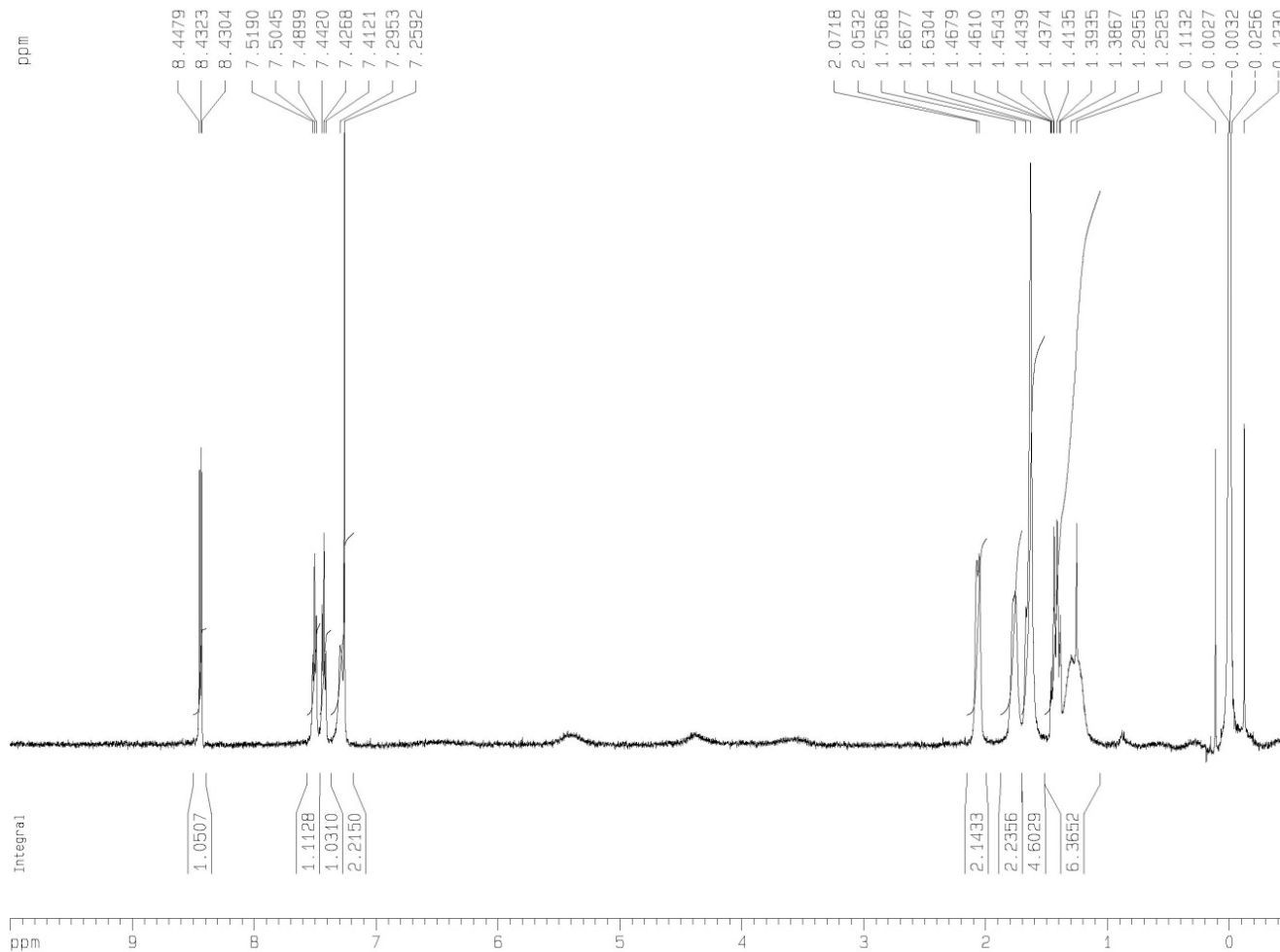
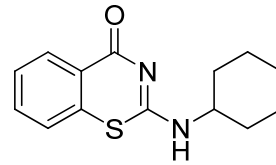
BJ-hexyl (20)

Number of sample scans: 16
 Number of background scans: 16
 Resolution: 4.000
 Sample gain: 10.0
 Mirror velocity: 6.2500
 Aperture: 100.00

Detector: DTGS KBr
 Beamsplitter: KBr
 Source: IR

圖三十六、化合物 20 之紅外光圖譜

BJ-6-hexyl-7/CDC13/1D-H
0215-bj6hexyl7/1/1/wjd



Current Data Parameters
NAME 0215-bj6hexyl7
EXPNO 1
PROCNO 1

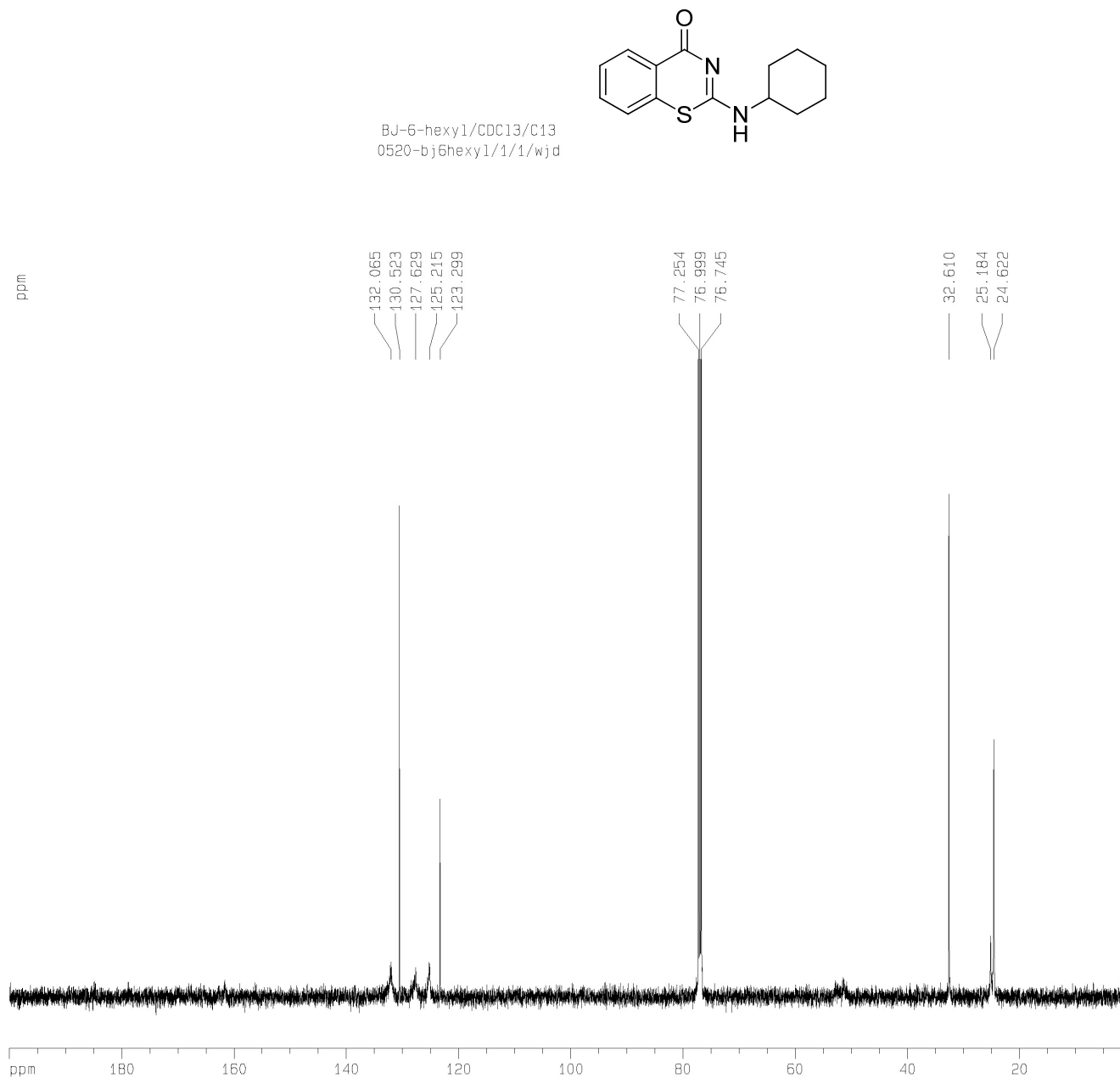
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20070214
Time 18.12
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm TXI 13C Z
PULPROG zg30
TD 32768
SOLVENT CDC13
NS 16
DS 2
SWH 10330.578 Hz
FIDRES 0.315264 Hz
AQ 1.5860212 sec
RG 2580.3
DW 48.400 usec
DE 6.50 usec
TE 300.0 K
D1 1.00000000 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 10.00 usec
PL1 -2.00 dB
SF01 500.1330885 MHz

F2 - Processing parameters
SI 16384
SF 500.1300137 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

1D NMR plot parameters
CX 22.00 cm
CY 10.00 cm
F1P 10.000 ppm
F1 5001.30 Hz
F2P -0.500 ppm
F2 -250.06 Hz
PPMCM 0.47727 ppm/cm
HZCM 238.69839 Hz/cm

圖三十七、化合物 20 之氫核磁共振圖譜



Current Data Parameters

NAME 0520-bj6hexyl
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters

Date_ 20080521
Time 12.36
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Dual 13C/
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT CDC13
NS 512
DS 2
SWH 37593.984 Hz
FIDRES 0.573639 Hz
AQ 0.8716789 sec
RG 4597.6
DW 13.300 usec
DE 6.50 usec
TE 300.0 K
D1 1.50000000 sec
D11 0.03000000 sec
DELTA 1.39999999 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====

NUC1 13C
P1 9.60 usec
PL1 5.00 dB
SF01 125.7703148 MHz

===== CHANNEL f2 =====

CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 90.00 usec
PL2 -5.00 dB
PL12 14.20 dB
PL13 17.20 dB
SF02 500.1320005 MHz

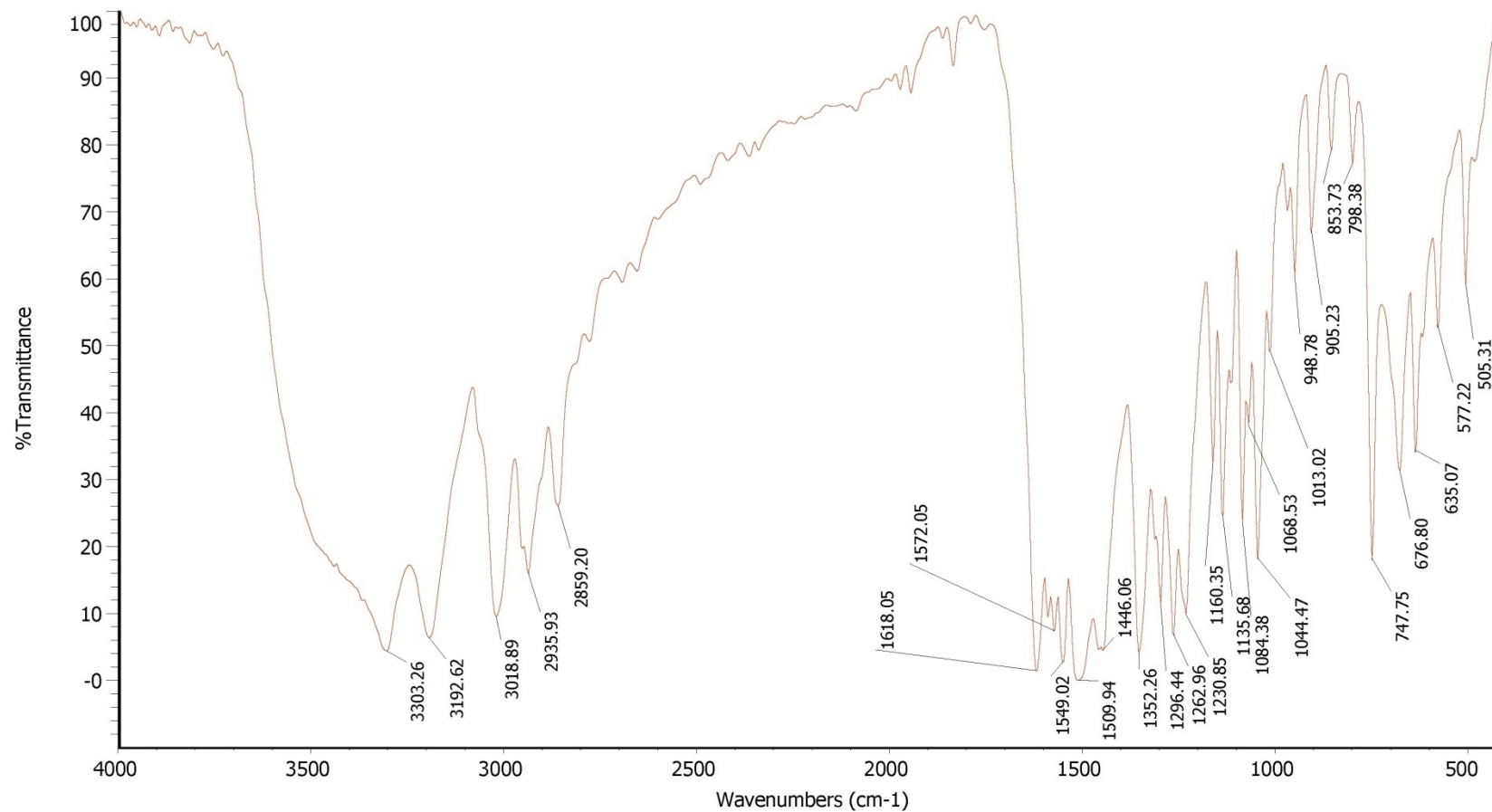
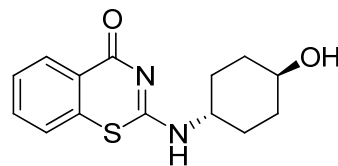
F2 - Processing parameters

SI 32768
SF 125.7577985 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

1D NMR plot parameters

CX 22.00 cm
CY 10.00 cm
F1P 200.000 ppm
F1 25151.55 Hz
F2P -0.000 ppm
F2 -0.00 Hz
PPMCM 9.09091 ppm/cm
HZCM 1143.25269 Hz/cm

圖三十八、化合物 20 之碳核磁共振圖譜



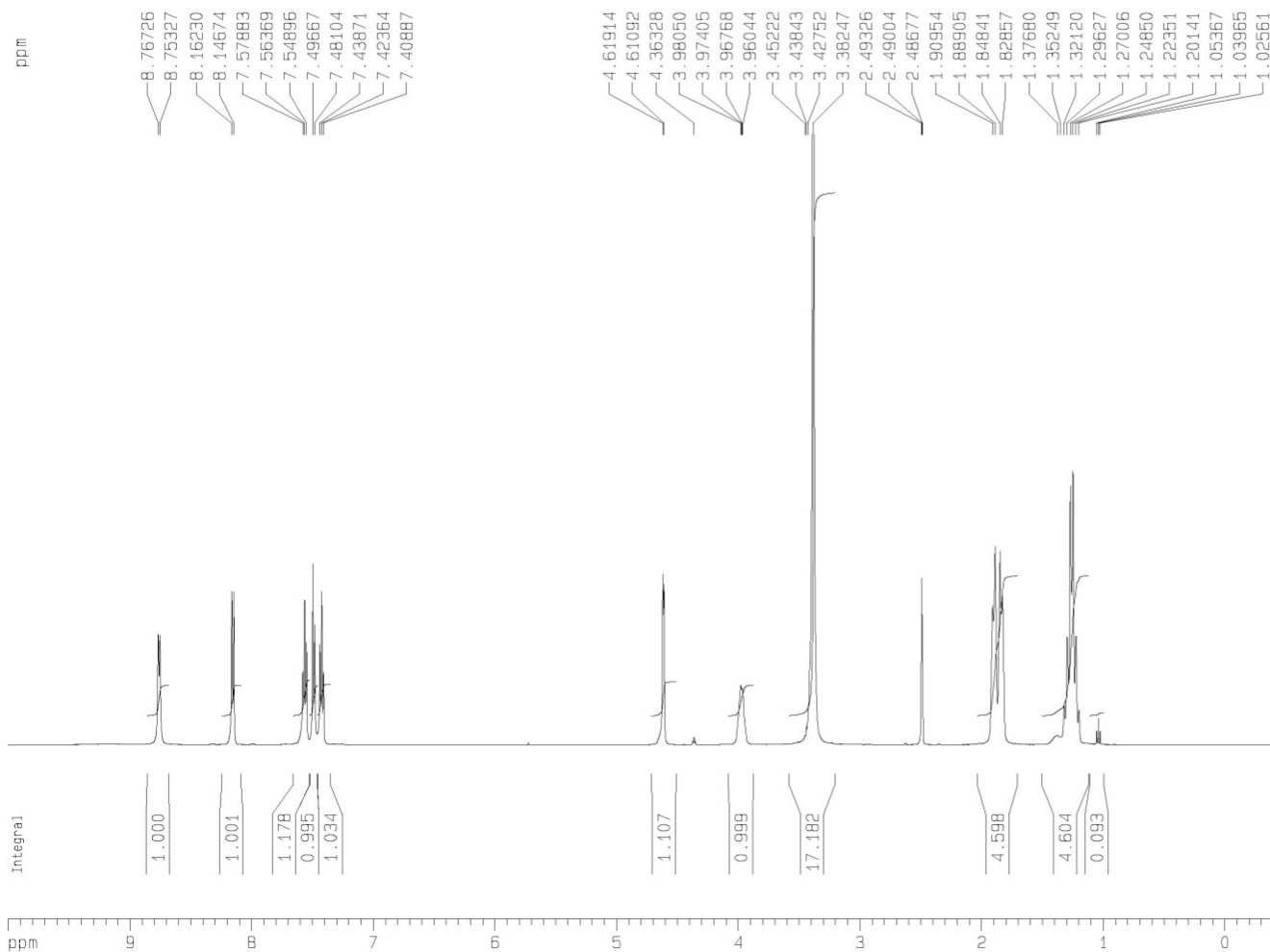
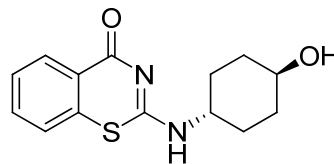
BJ-6-hexanol (21)

Number of sample scans: 16
 Number of background scans: 16
 Resolution: 8.000
 Sample gain: 20.0
 Mirror velocity: 6.2500
 Aperture: 100.00

Detector: DTGS KBr
 Beamsplitter: KBr
 Source: IR

圖三十九、化合物 21 之紅外光圖譜

BJ-6-hexanol/DMSO/1D-H
0430-bj6hexanol/1/1/wjd



Current Data Parameters
NAME 0430-bj6hexanol
EXPNO 1
PROCNO 1

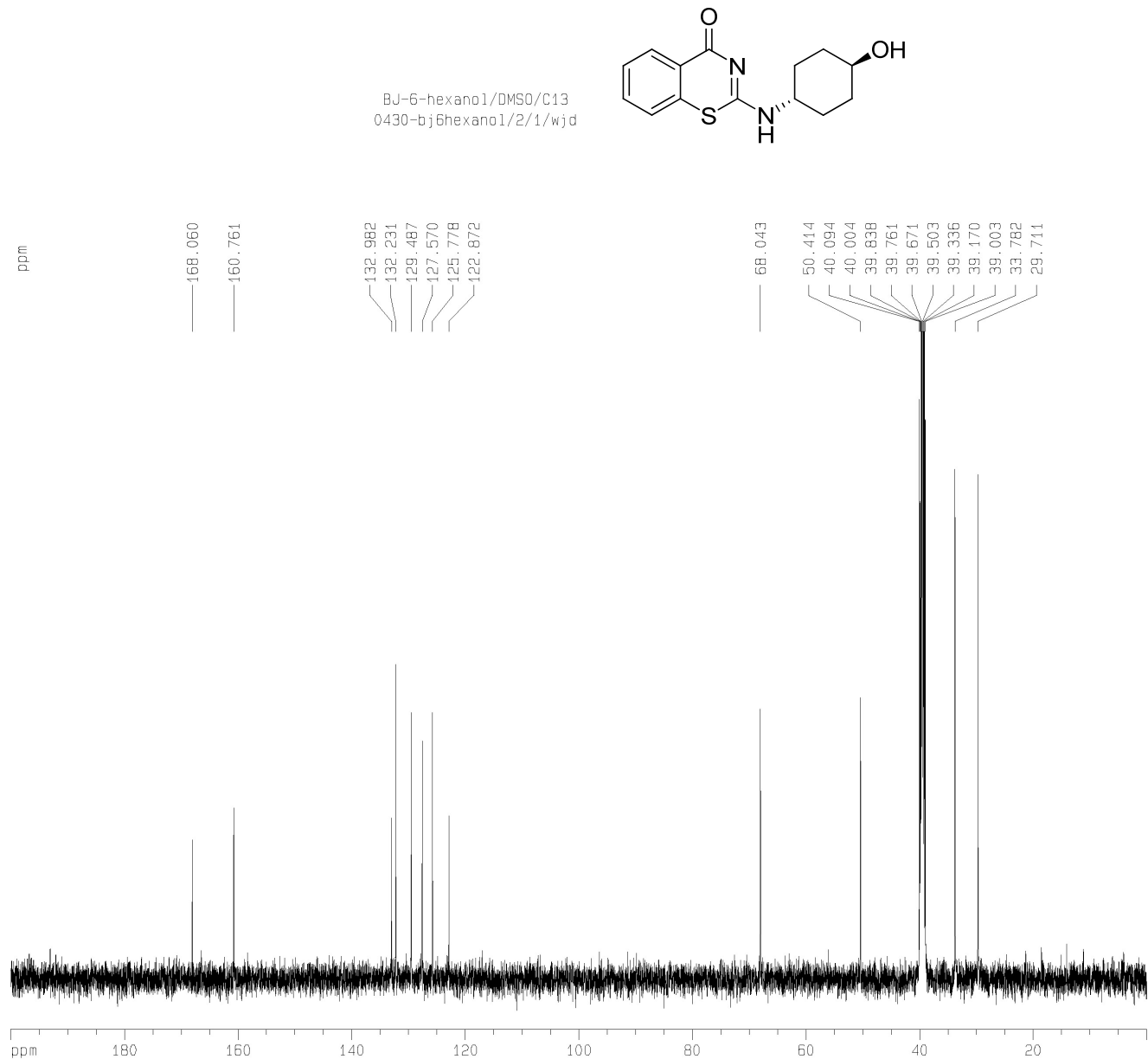
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20080430
Time 14.33
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm TXI 13C Z
PULPROG zg30
TD 32768
SOLVENT DMSO
NS 16
DS 2
SWH 10330.578 Hz
FIDRES 0.315264 Hz
AQ 1.5860212 sec
RG 45.3
DW 48.400 usec
DE 6.50 usec
TE 300.0 K
D1 1.00000000 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 12.50 usec
PL1 -5.00 dB
SFO1 500.1330885 MHz

F2 - Processing parameters
SI 16384
SF 500.1300102 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

1D NMR plot parameters
CX 22.00 cm
CY 100.00 cm
F1P 10.000 ppm
F1 5001.30 Hz
F2P -0.500 ppm
F2 -250.06 Hz
PPMCM 0.47727 ppm/cm
HZCM 238.69839 Hz/cm

圖四十、化合物 21 之氫核磁共振圖譜



```

Current Data Parameters
NAME      0430-bj6hexanol
EXPNO     2
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20080505
Time      17.19
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm Dual 13C/
PULPROG   zgpg30
TD         65536
SOLVENT   DMSO
NS         256
DS         2
SWH        37593.984 Hz
FIDRES     0.573639 Hz
AQ         0.8716788 sec
RG         32768
DW         13.300 usec
DE         6.50 usec
TE         300.0 K
D1         1.50000000 sec
D11        0.03000000 sec
DELTA     1.39999999 sec
MCREST    0.00000000 sec
MCWRK     0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1       13C
P1         9.80 usec
PL1        5.00 dB
SFO1       125.7703148 MHz

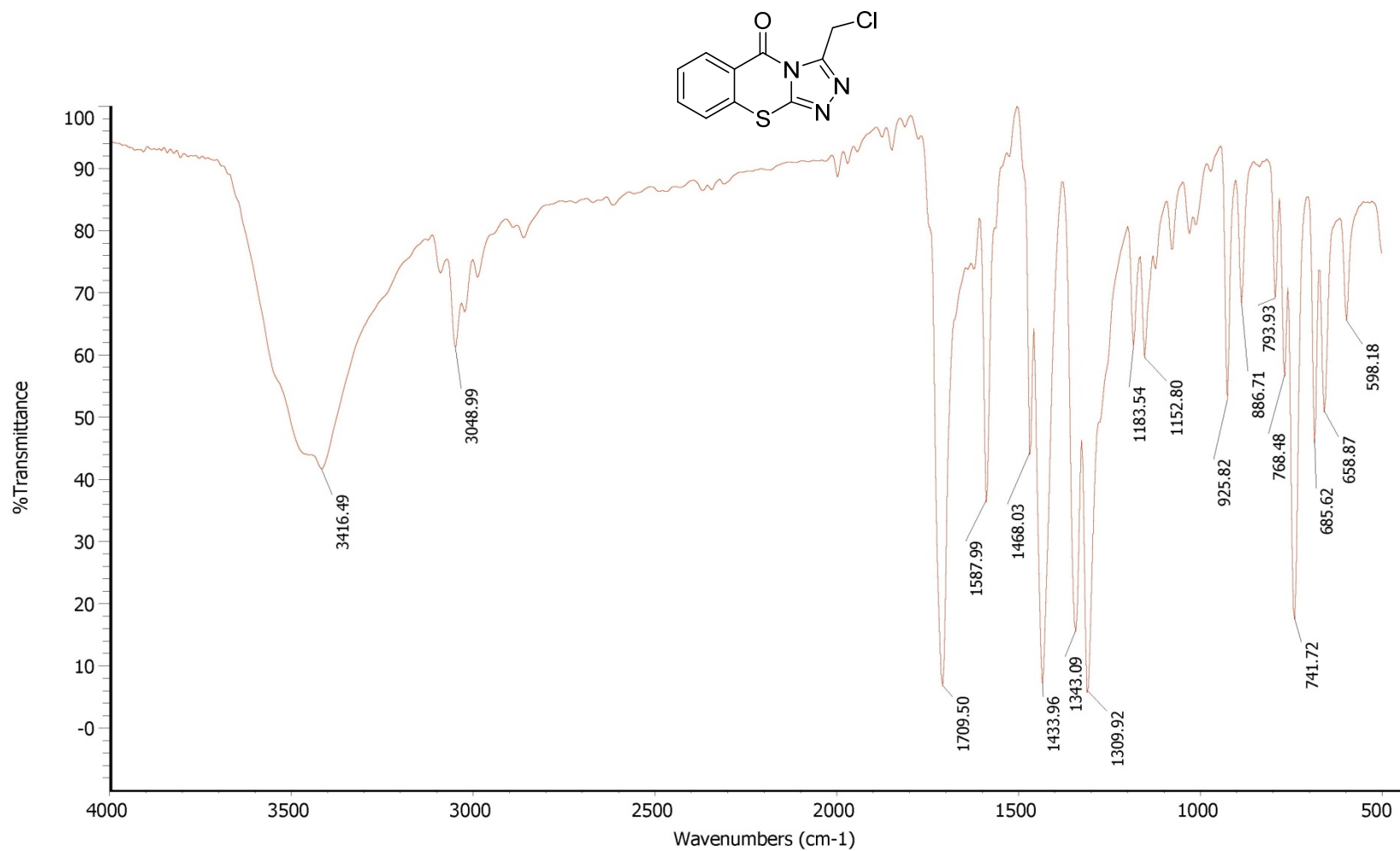
===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2    waltz16
NUC2       1H
PCPD2      90.00 usec
PL2        -5.00 dB
PL12       14.20 dB
PL13       17.20 dB
SFO2       500.1320005 MHz

F2 - Processing parameters
SI         32768
SF         125.7578453 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         1.00 Hz
GB         0
PC         1.40

1D NMR plot parameters
CX         22.00 cm
CY         80.00 cm
F1P        200.000 ppm
F1         25151.57 Hz
F2P        -0.000 ppm
F2         -0.00 Hz
PPMCM      9.09091 ppm/cm
HZCM       1143.25317 Hz/cm

```

圖四十一、化合物 21 之碳核磁共振圖譜

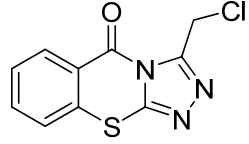


BJ-3-AcCl-1 (22)

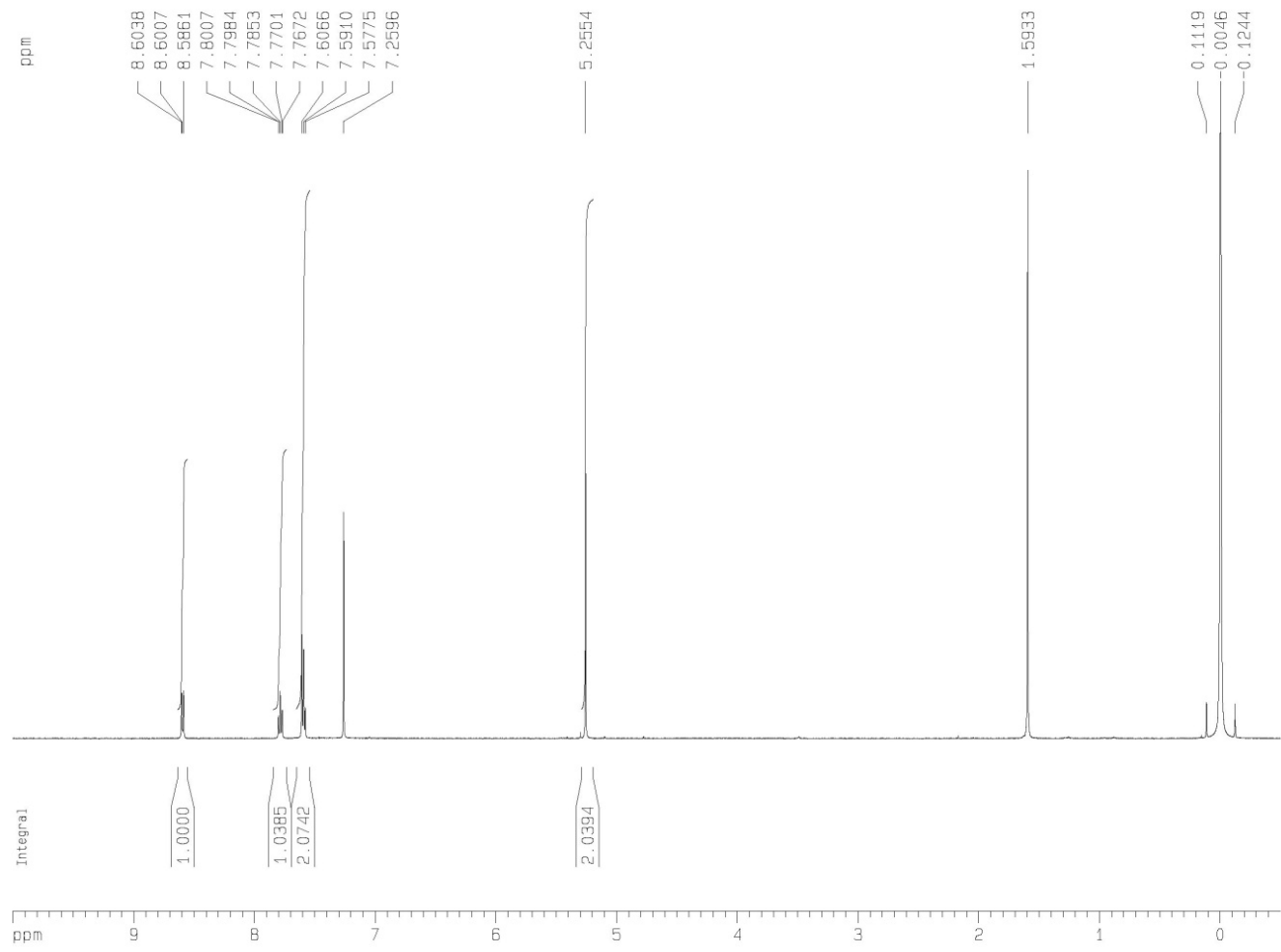
Number of sample scans: 16
 Number of background scans: 16
 Resolution: 8.000
 Sample gain: 4.0
 Mirror velocity: 6.2500
 Aperture: 100.00

Detector: DTGS KBr
 Beamsplitter: KBr
 Source: IR

圖四十二、化合物 22 之紅外光圖譜



BJ-3-AcCl-1/CDC13/1D-H
0316-bj3acc11/1/1/wjd



Current Data Parameters
NAME 0316-bj3acc11
EXPNO 1
PROCNO 1

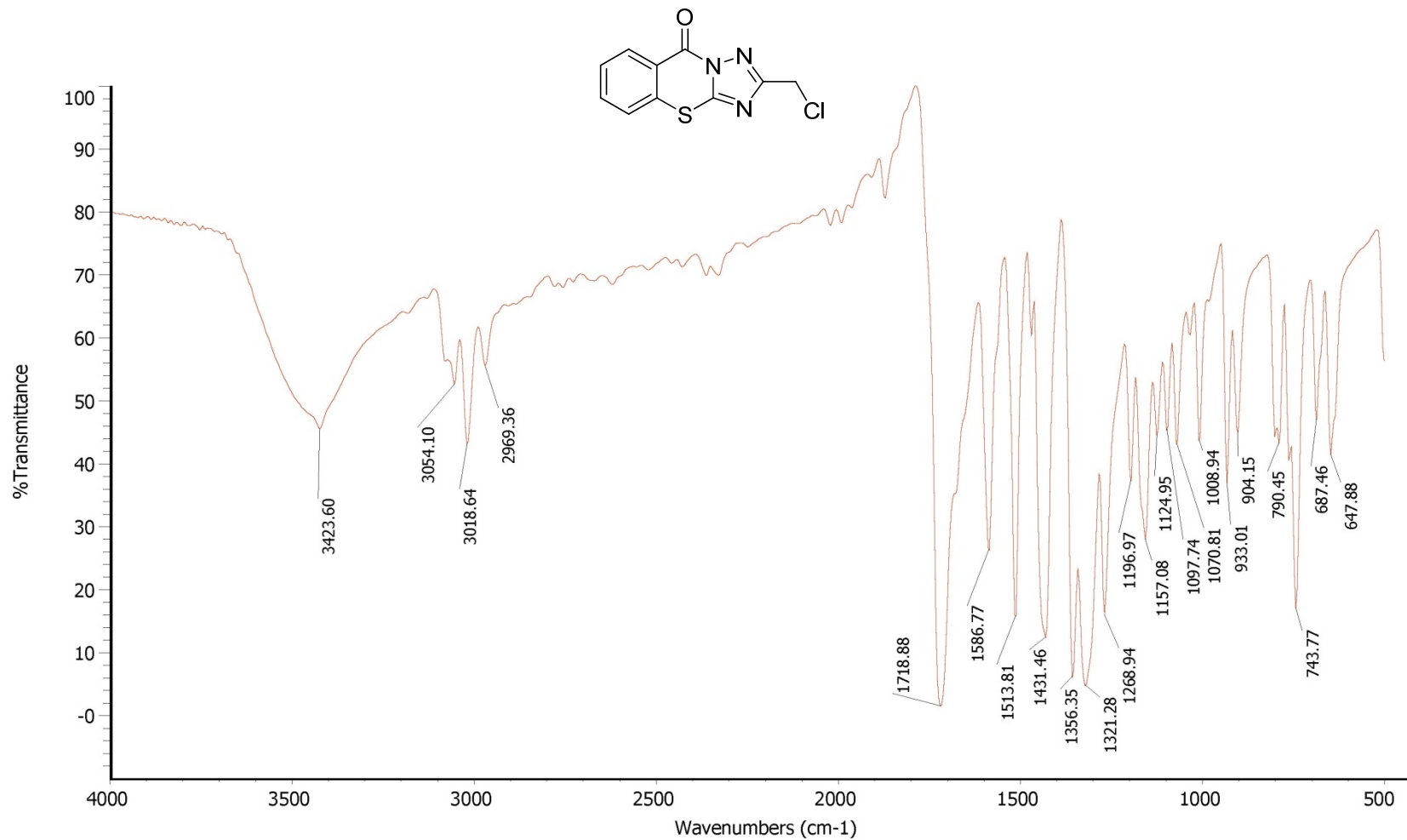
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20070315
Time 9.22
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm TXI 13C Z
PULPROG zg30
TD 32768
SOLVENT CDC13
NS 16
DS 2
SWH 10330.578 Hz
FIDRES 0.315264 Hz
AQ 1.5860212 sec
RG 1625.5
DW 48.400 usec
DE 6.50 usec
TE 293.9 K
D1 1.00000000 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 12.70 usec
PL1 -5.00 dB
SF01 500.1330885 MHz

F2 - Processing parameters
SI 16384
SF 500.1300137 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

1D NMR plot parameters
CX 22.00 cm
CY 10.00 cm
F1P 10.000 ppm
F1 5001.30 Hz
F2P -0.500 ppm
F2 -250.06 Hz
PPMCM 0.47727 ppm/cm
HZCM 238.69839 Hz/cm

圖四十三、化合物 22 之氫核磁共振圖譜



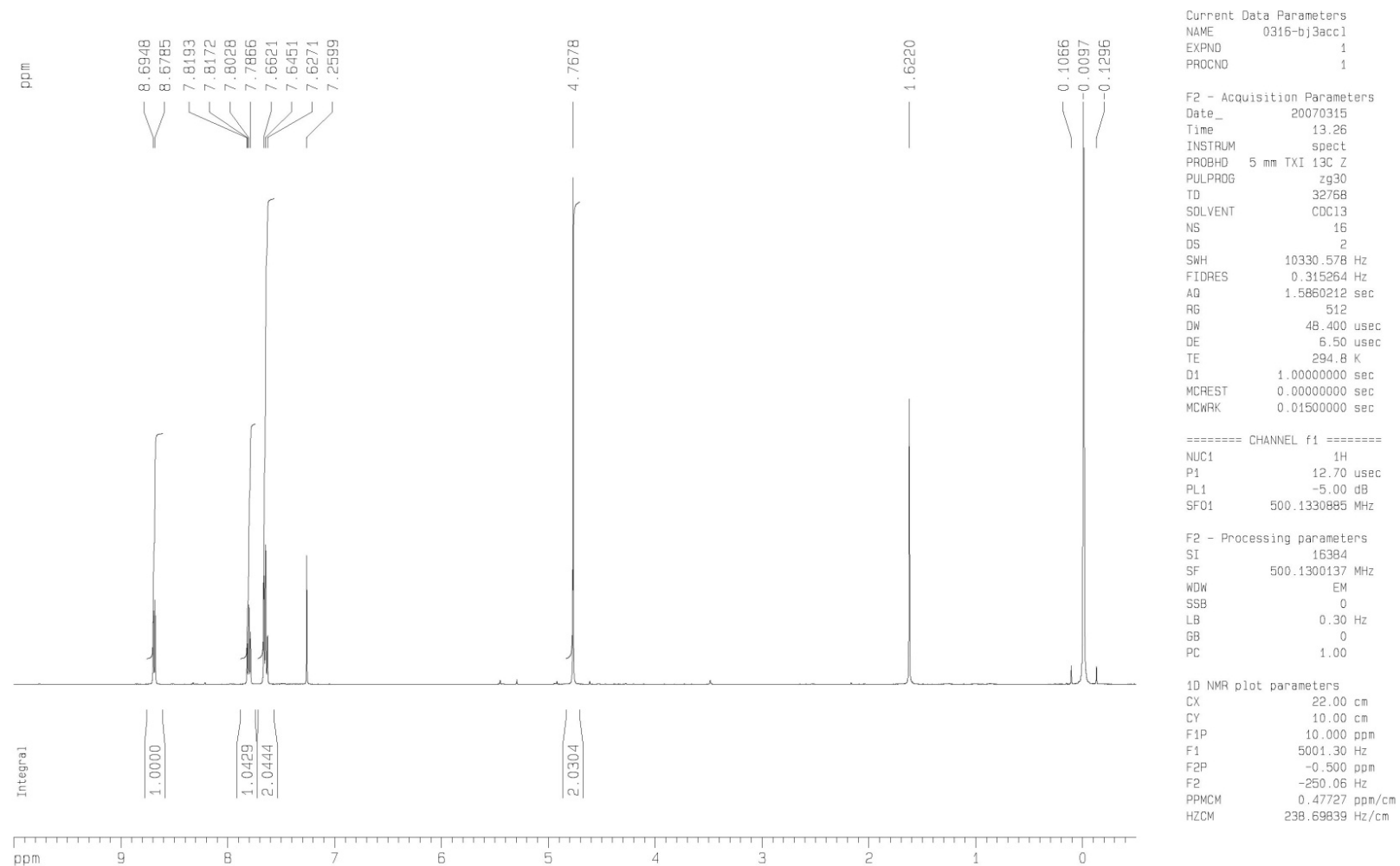
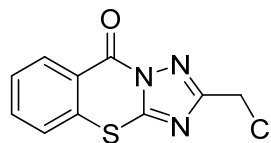
BJ-3-AcCl (23)

Number of sample scans: 16
 Number of background scans: 16
 Resolution: 8.000
 Sample gain: 4.0
 Mirror velocity: 6.2500
 Aperture: 100.00

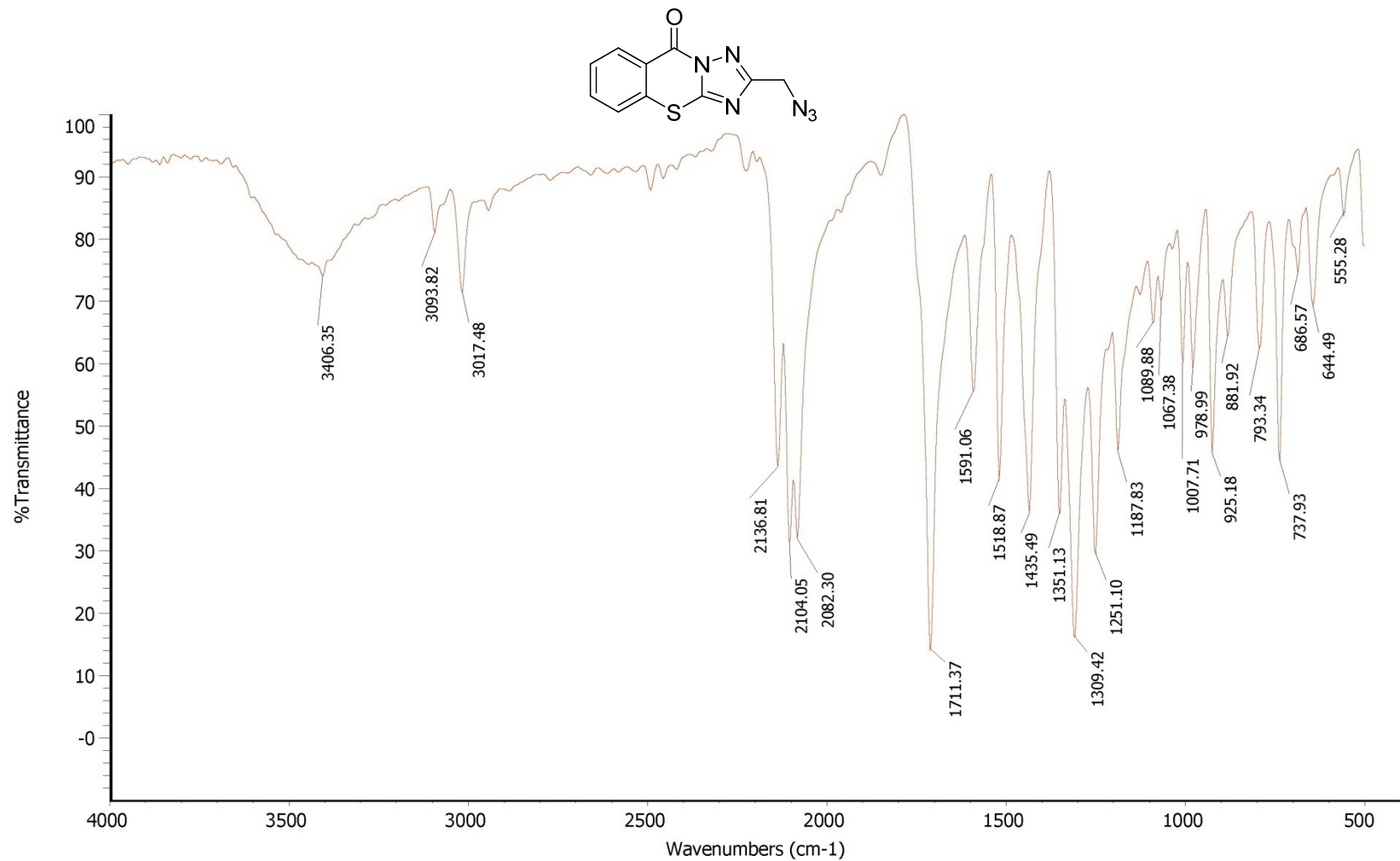
Detector: DTGS KBr
 Beamsplitter: KBr
 Source: IR

圖四十四、化合物 23 之紅外光圖譜

BJ-3-AcCl/CDC13/1D-H
0316-bj3acc1/1/1/wjd



圖四十五、化合物 23 之氫核磁共振圖譜



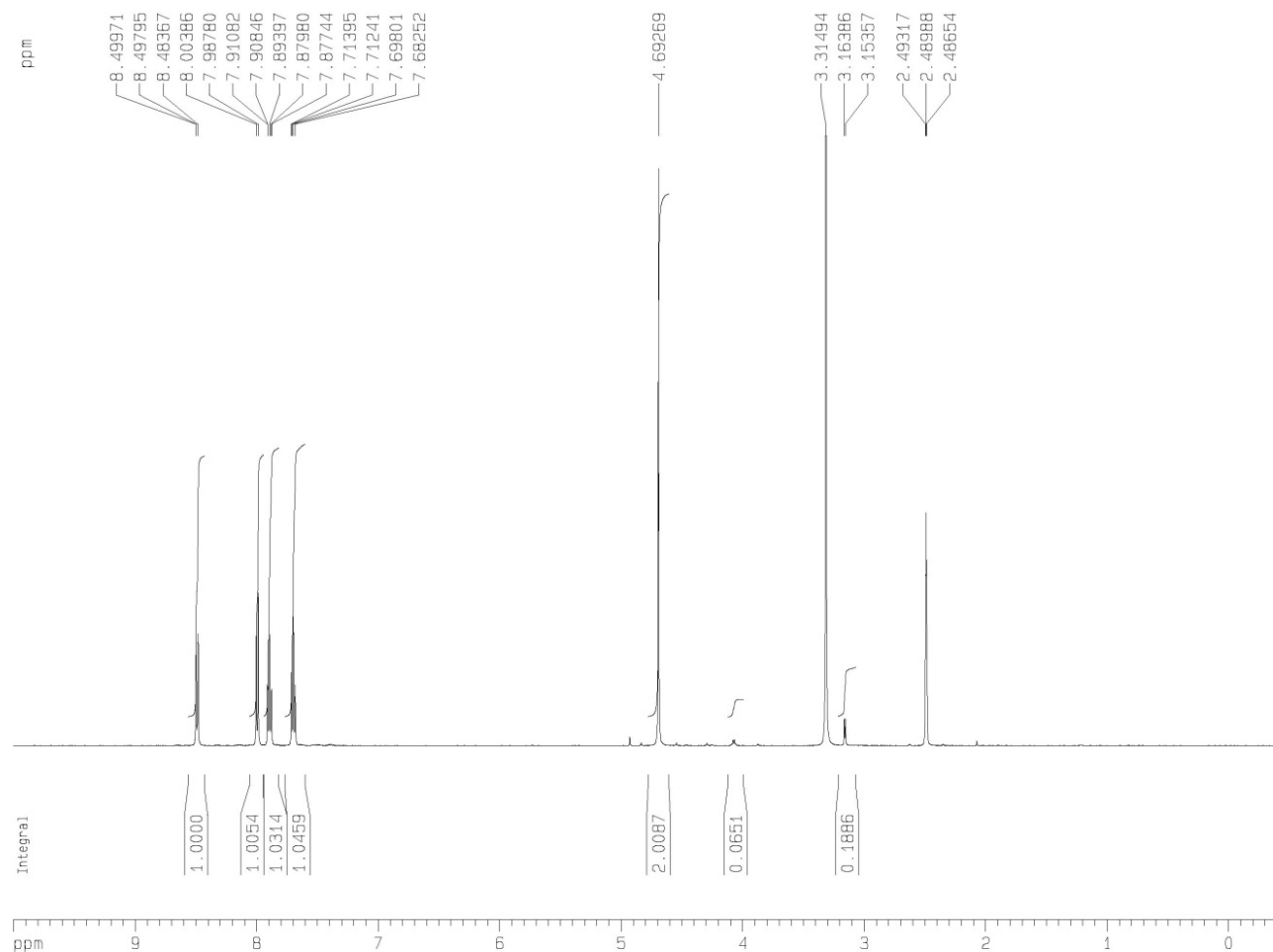
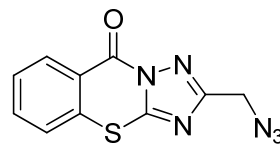
BJ-3-AcCl-4-1 (2) (24)

Number of sample scans: 16
 Number of background scans: 16
 Resolution: 8.000
 Sample gain: 20.0
 Mirror velocity: 6.2500
 Aperture: 100.00

Detector: DTGS KBr
 Beamsplitter: KBr
 Source: IR

圖四十六、化合物 24 之紅外光圖譜

BJ3acc14-1/DMSO-1D-H
0719-bj3acc141/1/1/wjd



Current Data Parameters
NAME 0719-bj3acc141
EXPNO 1
PROCNO 1

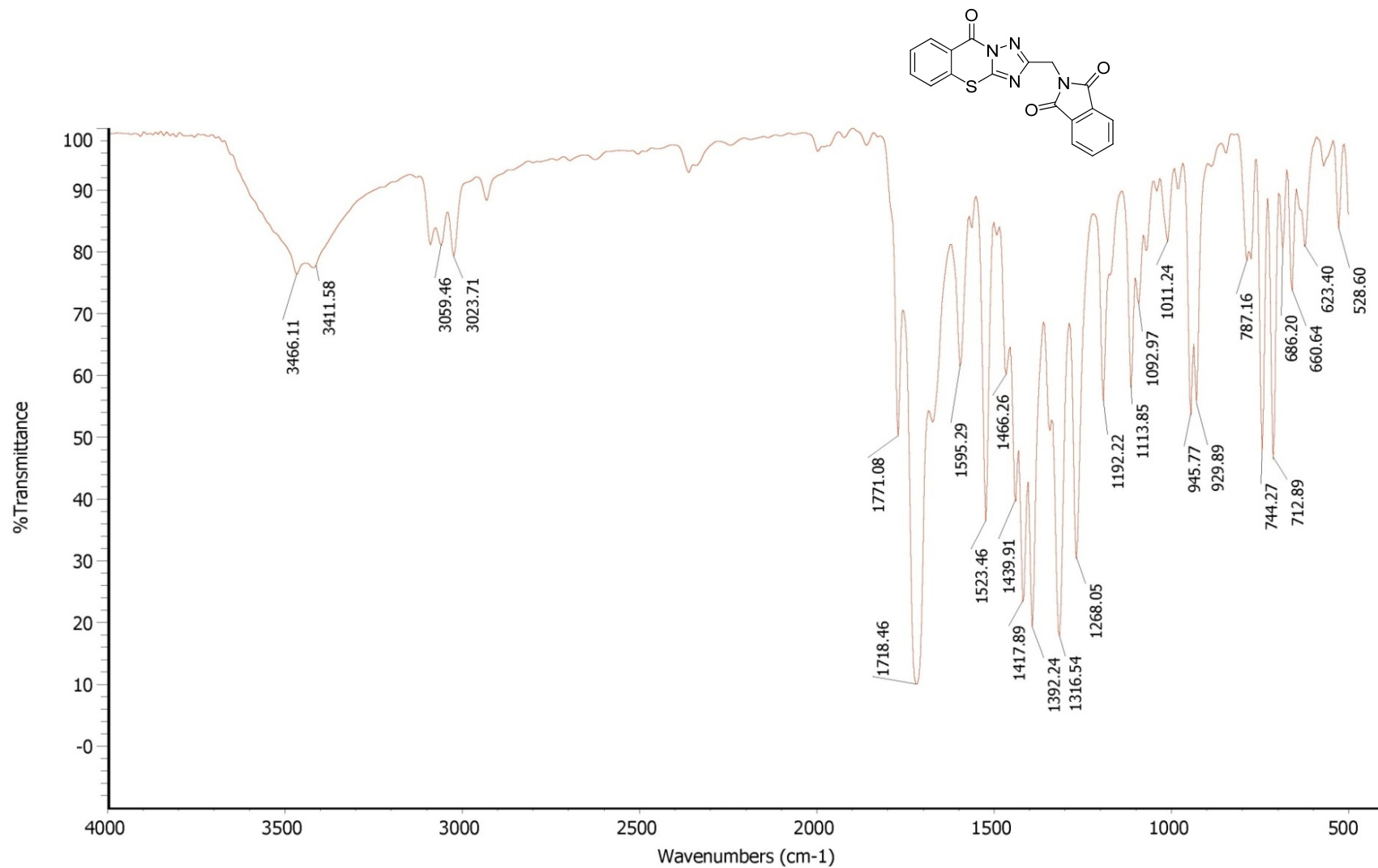
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20070719
Time 16.26
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Dual 13C/
PULPROG zg30
TD 32768
SOLVENT CDCl3
NS 16
DS 2
SWH 10330.578 Hz
FIDRES 0.315264 Hz
AQ 1.5860212 sec
RG 574.7
DW 48.400 usec
DE 6.50 usec
TE 300.0 K
D1 1.00000000 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 10.30 usec
PL1 -2.00 dB
SFO1 500.1323521 MHz

F2 - Processing parameters
SI 16384
SF 500.1300102 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

1D NMR plot parameters
CX 22.00 cm
CY 30.00 cm
F1P 10.000 ppm
F1 5001.30 Hz
F2P -0.500 ppm
F2 -250.06 Hz
PPMCM 0.47727 ppm/cm
HZCM 238.69839 Hz/cm

圖四十七、化合物 24 之氫核磁共振圖譜

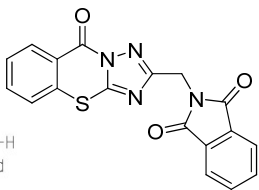


BJ-3-AcCl-4-2 (25)

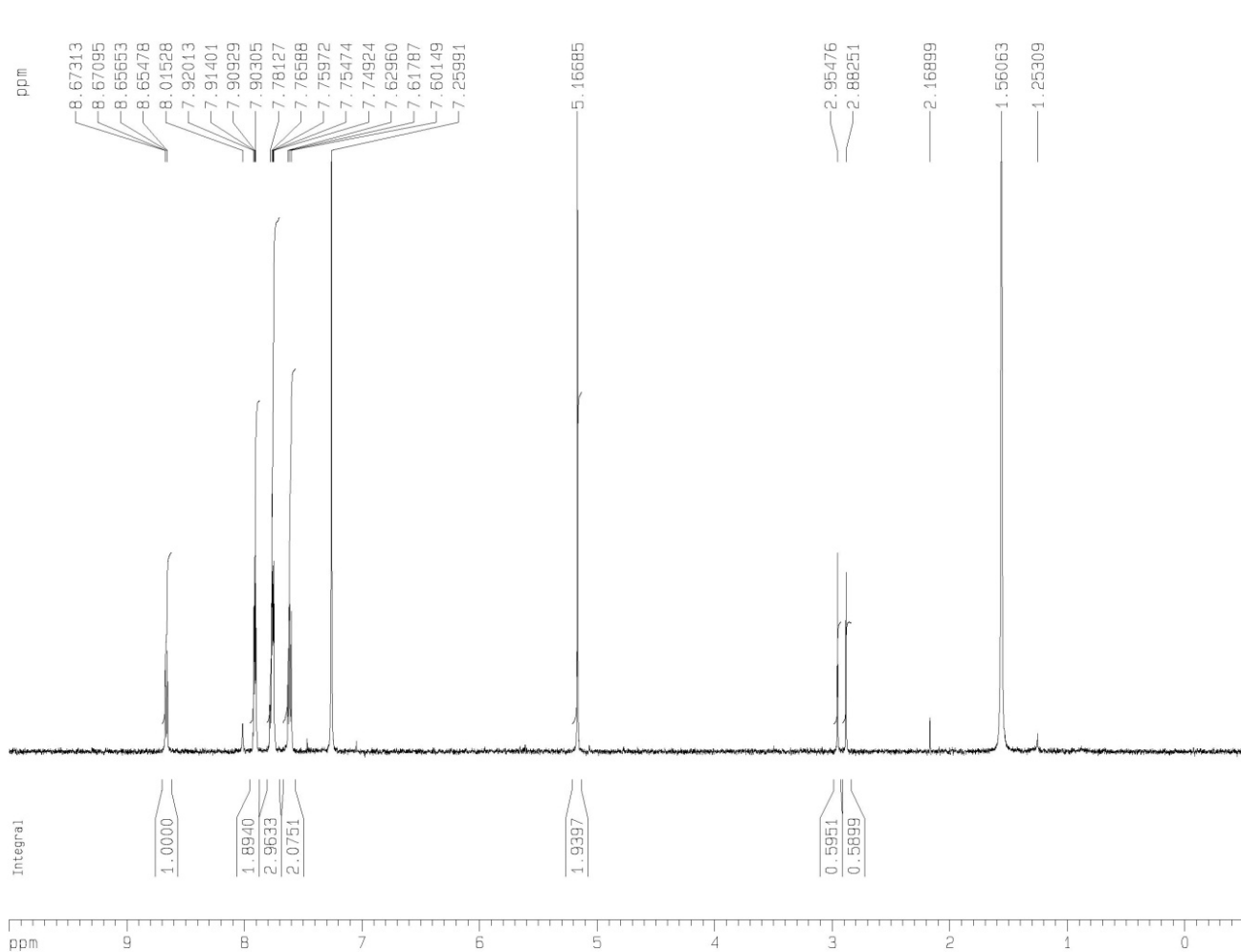
Number of sample scans: 16
 Number of background scans: 16
 Resolution: 8.000
 Sample gain: 1.0
 Mirror velocity: 6.2500
 Aperture: 100.00

Detector: DTGS KBr
 Beamsplitter: KBr
 Source: IR

圖四十八、化合物 25 之紅外光圖譜



BJ-3-AcCl-4-2/CDC13/1D-H
0806-bj3acc142/1/1/wjd



Current Data Parameters
NAME 0806-bj3acc142
EXPNO 1
PROCNO 1

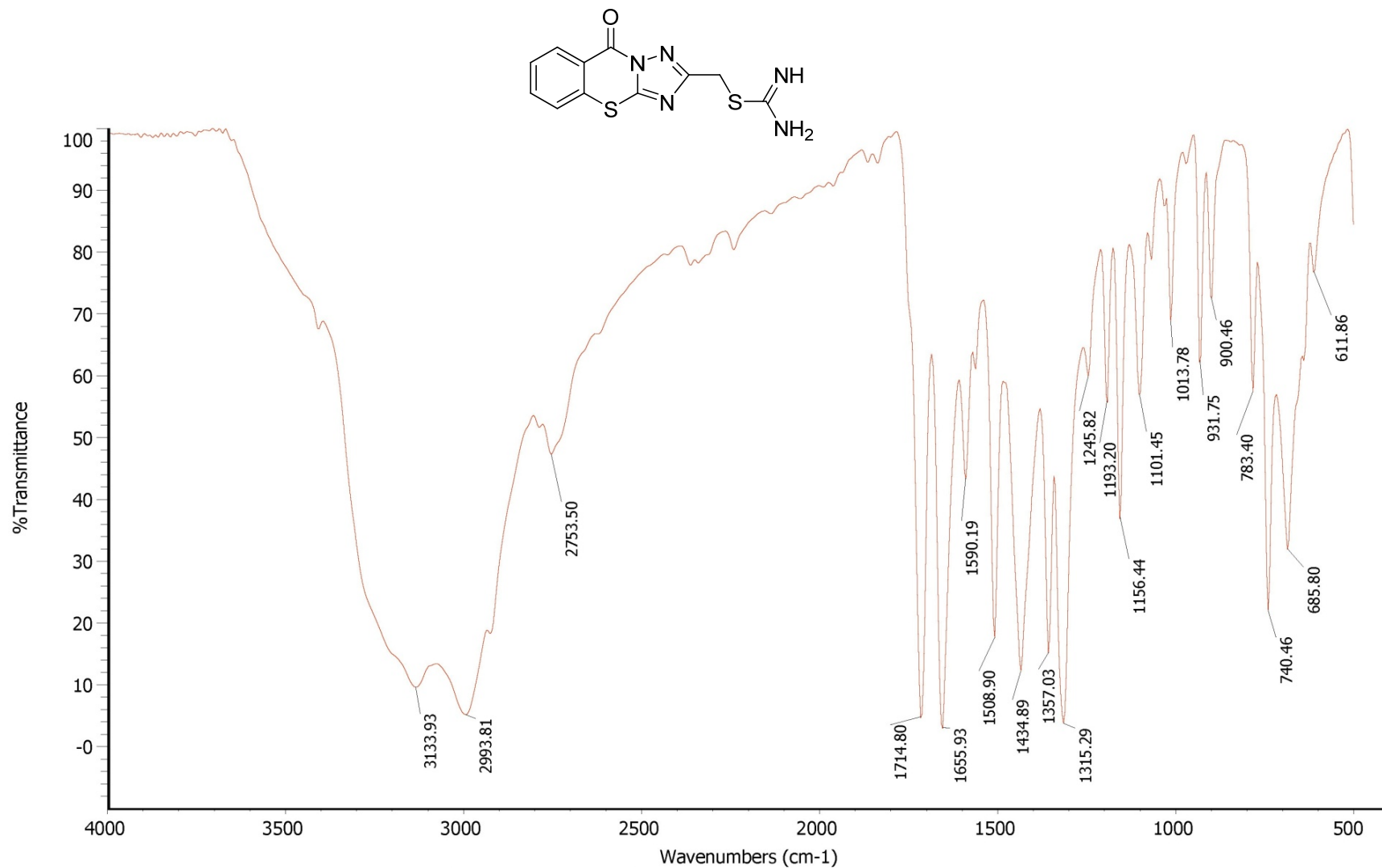
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20070806
Time 13.49
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Dual 13C/
PULPROG zg30
TD 32768
SOLVENT CDCl3
NS 16
DS 2
SWH 10330.578 Hz
FIDRES 0.315264 Hz
AQ 1.5860212 sec
RG 3649.1
DW 48.400 usec
DE 6.50 usec
TE 300.0 K
D1 1.00000000 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 10.30 usec
PL1 -2.00 dB
SF01 500.1323521 MHz

F2 - Processing parameters
SI 16384
SF 500.1300137 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

1D NMR plot parameters
CX 22.00 cm
CY 100.00 cm
F1P 10.000 ppm
F1 5001.30 Hz
F2P -0.500 ppm
F2 -250.06 Hz
PPMCM 0.47727 ppm/cm
HZCM 238.69839 Hz/cm

圖四十九、化合物 25 之氫核磁共振圖譜

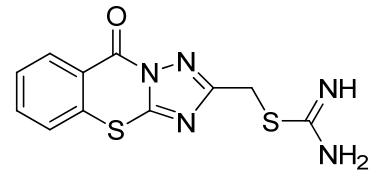


BJ-3-AcCl-3-1(2) (26)

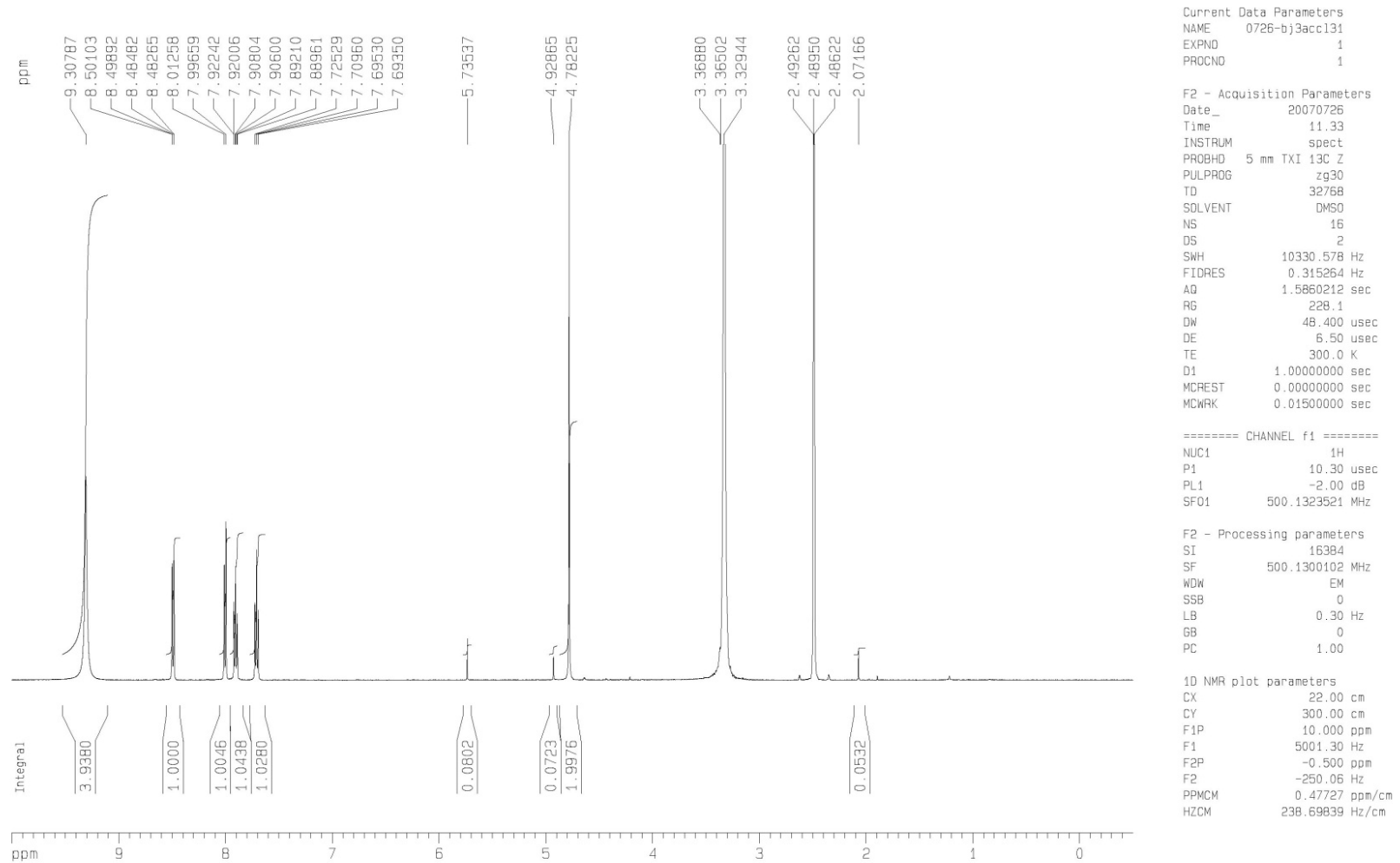
Number of sample scans: 16
 Number of background scans: 16
 Resolution: 8.000
 Sample gain: 4.0
 Mirror velocity: 6.2500
 Aperture: 100.00

Detector: DTGS KBr
 Beamsplitter: KBr
 Source: IR

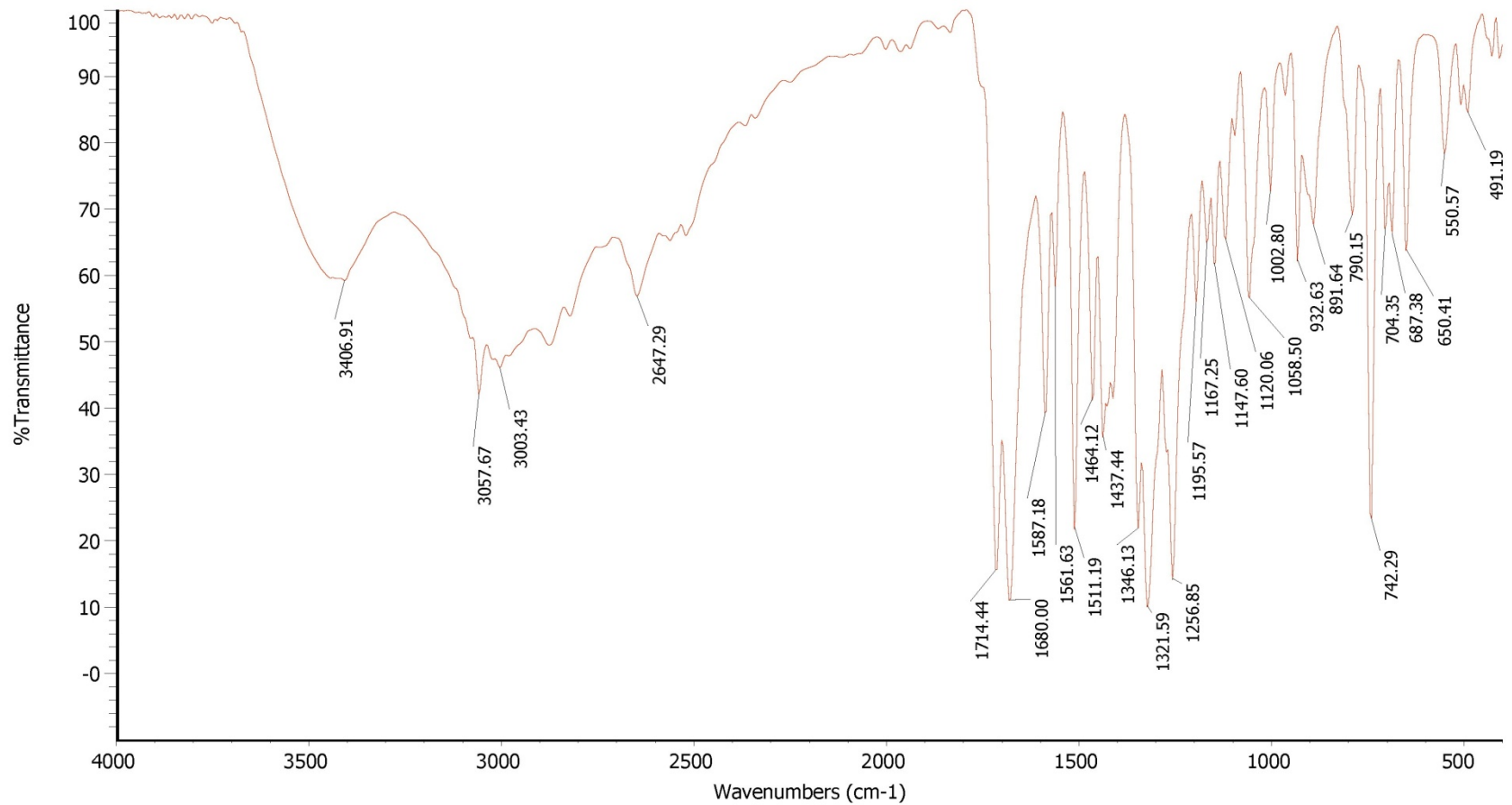
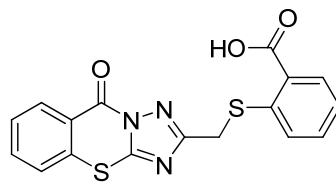
圖五十、化合物 26 之紅外光圖譜



BJ-3-AcC1-3-1/DMSO/1D-H
0726-bj3acc131/1/1/wdj



圖五十一、化合物 26 之氫核磁共振圖譜



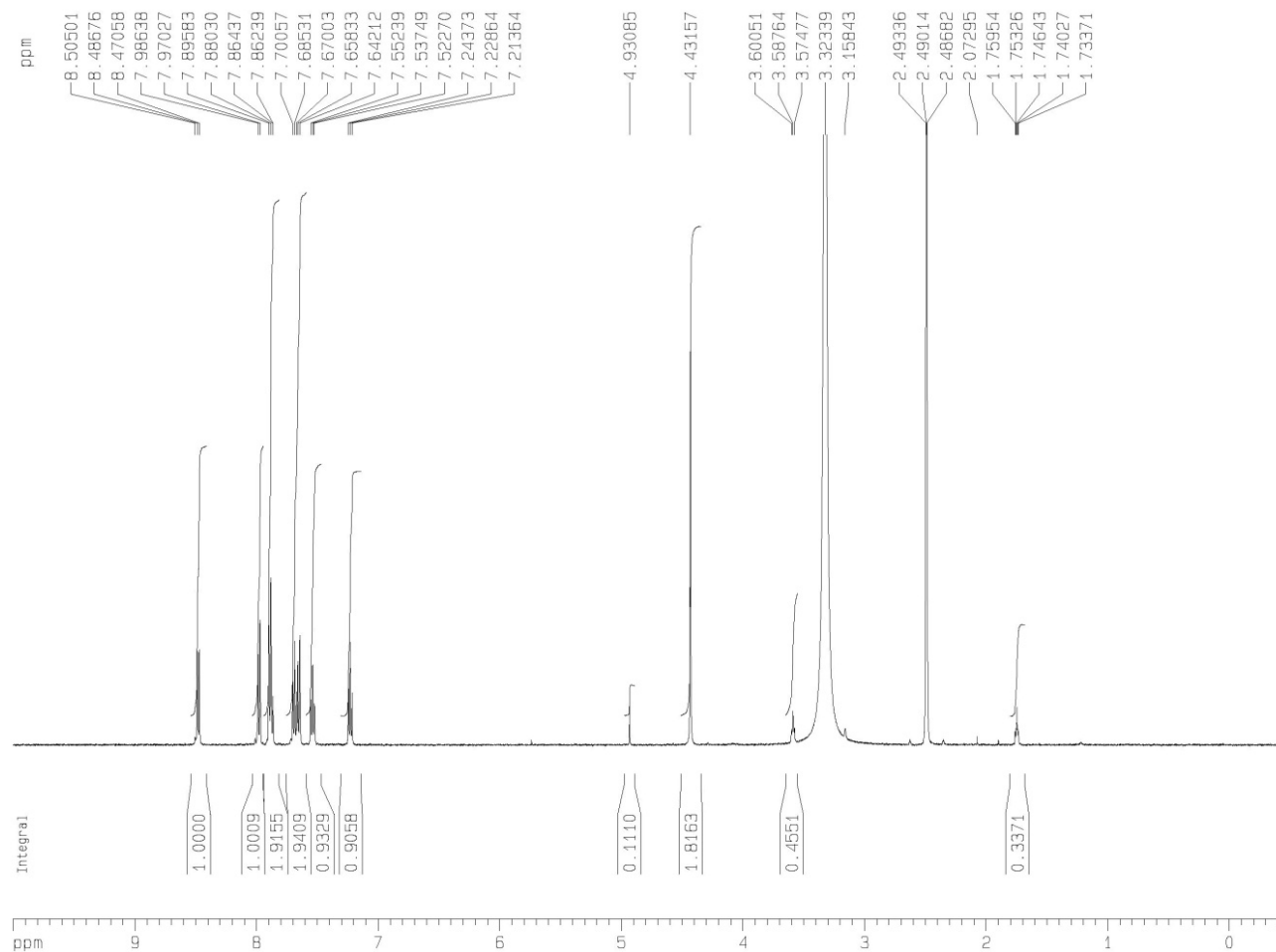
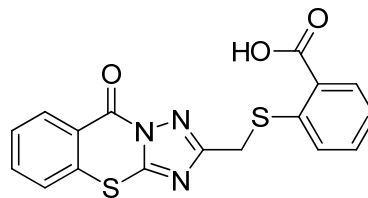
BJ-3-AcCl-TSA (27)

Number of sample scans: 16
 Number of background scans: 16
 Resolution: 8.000
 Sample gain: 4.0
 Mirror velocity: 6.2500
 Aperture: 100.00

Detector: DTGS KBr
 Beamsplitter: KBr
 Source: IR

圖五十二、化合物 27 之紅外光圖譜

BJ-3-AcCl-TSA/DMSO/1D-H
0919-bj3accltsa/1/1/wjd



Current Data Parameters
NAME 0919-bj3accltsa
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20070919
Time 14.50
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm TXI 13C Z
PULPROG zg30
TD 32768
SOLVENT MeOD
NS 16
DS 2
SWH 10330.578 Hz
FIDRES 0.315264 Hz
AQ 1.5860212 sec
RG 1824.6
DW 48.400 usec
DE 6.50 usec
TE 300.0 K
D1 1.00000000 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 10.30 usec
PL1 -2.00 dB
SF01 500.1330885 MHz

F2 - Processing parameters
SI 16384
SF 500.1300095 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

1D NMR plot parameters
CX 22.00 cm
CY 30.00 cm
F1P 10.000 ppm
F1 5001.30 Hz
F2P -0.500 ppm
F2 -250.06 Hz
PPMCM 0.47727 ppm/cm
HZCM 238.69839 Hz/cm

圖五十三、化合物 27 之氫核磁共振圖譜

六、參考文獻

1. Purves, D. *Neuroscience 4th ed.* Sunderland, Mass. : Sinauer: 2008.
2. Takuma, K.; Baba, A.; Matsuda, T. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Prog Neurobiol* **2004**, 72, 111-27.
3. Bèahr, M. *Neuroprotection : models, mechanisms, and therapies* Wiley-VCH: 2004.
4. Tanaka, K.; Watase, K.; Manabe, T.; Yamada, K.; Watanabe, M.; Takahashi, K.; Iwama, H.; Nishikawa, T.; Ichihara, N.; Kikuchi, T.; Okuyama, S.; Kawashima, N.; Hori, S.; Takimoto, M.; Wada, K. Epilepsy and Exacerbation of Brain Injury in Mice Lacking the Glutamate Transporter GLT-1. *Science* **1997**, 276, 1699-1702.
5. Smith, G. M.; Rutishauser, U.; Silver, J.; Miller, R. H. Maturation of astrocytes in vitro alters the extent and molecular basis of neurite outgrowth. *Developmental Biology* **1990**, 138, 377-390.
6. Tiveron, M.-C.; Barboni, E.; Pliego Rivero, F. B.; Gormley, A. M.; Seeley, P. J.; Grosveld, F.; Morris, R. Selective inhibition of neurite outgrowth on mature astrocytes by Thy-1 glycoprotein. *Nature* **1992**, 355, 745-748.
7. Burkhard Becher, A. P. J. P. A. Brain-immune connection: Immuno-regulatory properties of CNS-resident cells. *Glia* **2000**, 29, 293-304.
8. de Bernardo, S.; Canals, S.; Casarejos, M. J.; Solano, R. M.; Menendez, J.; Mena, M. A. Role of extracellular signal-regulated protein kinase in neuronal cell death induced by glutathione depletion in neuron/glia mesencephalic cultures. *Journal of Neurochemistry* **2004**, 91, 667-682.
9. Fiona E. Parkinson, J. F. C. R. Z. W. X. Gene expression for enzymes and transporters involved in regulating adenosine and inosine levels in rat forebrain neurons, astrocytes and C6 glioma cells. *Journal of Neuroscience Research* **2006**, 84, 801-808.
10. Bohme, H.; Schmidt, W. Oxo compounds of the benzothiazine series. *Arch. Pharm.* **1953**, 286, 437-41.
11. Sheu, S.-Y.; Lin, C.-Y.; Wu, J.-D.; Chiang, H.-C. Inhibition of xanthine oxidase by benzothiazinone analogs. *Anticancer Research* **1999**, 19, 119-123.
12. Perkins, E.; Sun, D.; Nguyen, A.; Tulac, S.; Francesco, M.; Tavana, H.; Nguyen, H.; Tugendreich, S.; Barthmaier, P.; Couto, J.; Yeh, E.; Thode, S.; Jarnagin, K.; Jain, A.; Morgans, D.; Melese, T. Novel inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase/PARP1 and PARP2 identified using a cell-based screen in yeast. *Cancer Research* **2001**, 61, 4175-4183.
13. Melese, T.; Perkins, E. L.; Yeh, E.; Sun, D. Heterocyclic poly(ADP-ribose)

- polymerase (PARP) inhibitors. 2001-US46811
2002044157, 20011203., 2002.
14. Kajino, M.; Kawada, A.; Nakayama, Y.; Kimura, H. Preparation of 2-heterocycl-1,3-benzothiazinone derivatives as inhibitors of apoptosis or cytoprotective agents. 2002-JP8866
2003020719, 20020902., 2003.
15. Kajino, M.; Nakayama, Y.; Kimura, A. Preparation of 1,3-benzothiazinones as macrophage migration inhibitory factor binders and apoptosis inhibitors, and treatment of diseases with them or their prodrugs. 2003-406172
2004196792, 20031204., 2004.
16. Kimura, H.; Sato, Y.; Takizawa, M.; Horiguchi, T.; Notoya, K. Cell death inhibitor. 2003-JP5256
2003090782, 20030424., 2003.
17. Kimura, H.; Tanida, S.; Kaneko, T. Preparation of benzothiazinone derivatives as heart muscular cell apoptosis inhibitors and remedies for heart diseases. 2001-JP7468
2002018356, 20010830., 2002.
18. Kajino, M.; Imaeda, T. Preparation of 1,3-benzothiazinone derivatives having a capability of binding to a macrophage migration inhibitory factor (MIF) and activating of an antioxidant response element (ARE). 2006-JP311977
2006132438, 20060608., 2006.
19. Gilkerson, T.; Jennens, D. C.; Coombs, M. E. Preparation of benzothiazinone derivatives as agrochemical fungicide. 87-200819
245902, 19870429., 1987.
20. Wolf, M.; Sellstedt, J. H. Analgesic 2-substituted-4H-1,3-benzothiazin-4-ones. 67-627296
3470168, 19670331., 1969.
21. Gheorghiu, C. V.; Stoicescu-Crivetz, L.; Budeanu, C.; Budeanu, E.; Alexa-Petrovanu, M.; Mandasescu, L.; Constantinescu, N.; Toma, A.; Stavri, G. Antituberculous substances. *Rev. chim., Acad. rep. populare Roumaine* **1956**, 1, 97-125.
22. 李惠玲. Synthesis of 2-Amino-Benzo[e][1,3]thiazin-4-ones Derivatives and Studies of Their Central Nervous System Activities. Taipei Medical University, Taipei, 2002.
23. Posse de Chaves, E. I. Sphingolipids in apoptosis, survival and regeneration in the nervous system. *Biochim Biophys Acta* **2006**, 1758, 1995-2015.
24. Pettus, B. J.; Chalfant, C. E.; Hannun, Y. A. Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids* **2002**, 1585, 114-125.

25. Lahiri, S.; Futerman, A. H. The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids. *Cell Mol Life Sci* **2007**, *64*, 2270-84.
26. Muller, G.; Ayoub, M.; Storz, P.; Rennecke, J.; Fabbro, D.; Pfizenmaier, K. PKC ζ is a molecular switch in signal transduction of TNF- α , bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. *EMBO Journal* **1995**, *14*, 1961-1969.
27. Lozano, J.; Berra, E.; Municio, M. M.; Diaz-Meco, M. T.; Dominguez, I.; Sanz, L.; Moscat, J. Protein kinase C ζ isoform is critical for κ B-dependent promoter activation by sphingomyelinase. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 19200-19202.
28. Heinrich, M.; Wickel, M.; Winoto-Morbach, S.; Schneider-Brachert, W.; Weber, T.; Brunner, J.; Saftig, P.; Peters, C.; Krohnke, M.; Schütze, S. Ceramide as an activator lipid of cathepsin D. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2000; Vol. 477, pp 305-315.
29. Wolff, R. A.; Dobrowsky, R. T.; Bielawska, A.; Obeid, L. M.; Hannun, Y. A. Role of ceramide-activated protein phosphatase in ceramide-mediated signal transduction. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 19605-19609.
30. Dobrowsky, R. T.; Kamibayashi, C.; Mumby, M. C.; Hannun, Y. A. Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 15523-15530.
31. Dobrowsky, R. T.; Hannun, Y. A. Ceramide stimulates a cytosolic protein phosphatase. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 5048-5051.
32. Bourbon, N. A.; Yun, J.; Kester, M. Ceramide directly activates protein kinase C ζ to regulate a stress-activated protein kinase signaling complex. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 35617-35623.
33. Muller, G.; Ayoub, M.; Storz, P.; Renneck, J.; Fabbro, D.; Pfizenmaier, K. PKC ζ is a molecular switch in signal transduction of TNF- α , bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. *Embo J.* **1995**, *14*, 1961-9.
34. Ruvolo, P. P. Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. *Pharmacol. Res.* **2003**, *47*, 383-392.
35. Zhang, Y.; Yao, B.; Delikat, S.; Bayoumy, S.; Lin, X.-H.; Basu, S.; McGinley, M.; Chan-Hui, P.-Y.; Lichenstein, H.; Kolesnick, R. Kinase suppressor of Ras is ceramide-activated protein kinase. *Cell (Cambridge, Mass.)* **1997**, *89*, 63-72.
36. Gulbins, E.; Grassme, H. Ceramide and cell death receptor clustering. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids* **2002**, *1585*, 139-145.
37. Huwiler, A.; Johansen, B.; Skarstad, A.; Pfeilschifter, J. Ceramide binds to the CaLB domain of cytosolic phospholipase A2 and facilitates its membrane docking and arachidonic acid release. *Faseb J.* **2001**, *15*, 7-9.
38. Westwick, J. K.; Bielawska, A. E.; Dbaibo, G.; Hannun, Y. A.; Brenner, D. A. Ceramide activates the stress-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*,

2689-92.

39. Blazquez, C.; Galve-Roperh, I.; Guzman, M. De novo-synthesized ceramide signals apoptosis in astrocytes via extracellular signal-regulated kinase. *Faseb J.* **2000**, *14*, 2315-2322.
40. Yao, B.; Zhang, Y.; Delikat, S.; Mathias, S.; Basu, S.; Kolesnick, R. Phosphorylation of Raf by ceramide-activated protein kinase. *Nature (London)* **1995**, *378*, 307-10.
41. Gulbins, E.; Bissonnette, R.; Mahboubi, A.; Martin, S.; Nishioka, W.; Brunner, T.; Baier, G.; Baier-Bitterlich, G.; Byrd, C.; et al. Fas-induced apoptosis is mediated via a ceramide-initiated Ras signaling pathway. *Immunity* **1995**, *2*, 341-51.
42. Brenner, B.; Koppenhoefer, U.; Weinstock, C.; Linderkamp, O.; Lang, F.; Gulbins, E. Fas- or ceramide-induced apoptosis is mediated by a Rac1-regulated activation of Jun N-terminal kinase/p38 kinases and GADD153. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 22173-22181.
43. Embade, N.; Valeron, P. F.; Aznar, S.; Lopez-Collazo, E.; Lacal, J. C. Apoptosis induced by Rac GTPase correlates with induction of FasL and ceramides production. *Mol. Biol. Cell* **2000**, *11*, 4347-4358.
44. Gruber, C.; Henkel, M.; Budach, W.; Belka, C.; Jendrossek, V. Involvement of tyrosine kinase p56/Lck in apoptosis induction by anticancer drugs. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *67*, 1859-1872.
45. Gulbins, E.; Szabo, I.; Baltzer, K.; Lang, F. Ceramide-induced inhibition of T lymphocyte voltage-gated potassium channel is mediated by tyrosine kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 7661-7666.
46. Bollinger Claudia, R.; Teichgraber, V.; Gulbins, E. Ceramide-enriched membrane domains. *Biochim Biophys Acta* **2005**, *1746*, 284-94.
47. Gulbins, E.; Kolesnick, R. Raft ceramide in molecular medicine. *Oncogene* **2003**, *22*, 7070-7077.
48. Brown, D. A.; London, E. Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J. Membr. Biol.* **1998**, *164*, 103-114.
49. Siskind, L. J.; Kolesnick, R. N.; Colombini, M. Ceramide forms channels in mitochondrial outer membranes at physiologically relevant concentrations. *Mitochondrion* **2006**, *6*, 118-125.
50. Siskind, L. J.; Kolesnick, R. N.; Colombini, M. Ceramide channels increase the permeability of the mitochondrial outer membrane to small proteins. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 26796-26803.
51. Gudiz, T. I.; Tserng, K.-Y.; Hoppel, C. L. Direct inhibition of mitochondrial respiratory chain complex III by cell-permeable ceramide. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 24154-24158.

52. Garcia-Ruiz, C.; Morales, A.; Colell, A.; Rodes, J.; Yi, J.-R.; Kaplowitz, N.; Fernandez-Checa, J. C. Evidence that the rat hepatic mitochondrial carrier is distinct from the sinusoidal and canalicular transporters for reduced glutathione. Expression studies in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 15946-9.
53. Yang, D.-I.; Yeh, C.-H.; Chen, S.; Xu, J.; Hsu, C. Y. Neutral sphingomyelinase activation in endothelial and glial cell death induced by amyloid beta-peptide. *Neurobiol. Dis.* **2004**, *17*, 99-107.
54. Yoshimura, S.-I.; Banno, Y.; Nakashima, S.; Hayashi, K.; Yamakawa, H.; Sawada, M.; Sakai, N.; Nozawa, Y. Inhibition of neutral sphingomyelinase activation and ceramide formation by glutathione in hypoxic PC12 cell death. *J. Neurochem.* **1999**, *73*, 675-683.
55. Wang, C. X.; Brindley, D. N.; Shuaib, A. Role of ceramide in ischemic brain injury in an embolic model of stroke in rats. *Int. J. Angiol.* **2006**, *15*, 165-170.
56. Mathias, S.; Pena, L. A.; Kolesnick, R. N. Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem. J.* **1998**, *335*, 465-480.
57. Schenck, M.; Carpinteiro, A.; Grassme, H.; Lang, F.; Gulbins, E. Ceramide: Physiological and pathophysiological aspects. *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, *462*, 171-175.
58. Brugg, B.; Michel, P. P.; Agid, Y.; Ruberg, M. Ceramide Induces Apoptosis in Cultured Mesencephalic Neurons. *Journal of Neurochemistry* **1996**, *66*, 733-739.
59. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **1983**, *65*, 55-63.
60. Wilson, A. P. Cytotoxicity and viability assays. *Anim. Cell Cult. (3rd Ed.)* **2000**, 175-219.
61. Chen, Y.-C.; Chow, J.-M.; Lin, C.-W.; Wu, C.-Y.; Shen, S.-C. Baicalein inhibition of oxidative-stress-induced apoptosis via modulation of ERKs activation and induction of HO-1 gene expression in rat glioma cells C6. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2006**, *216*, 263-273.
62. Liu, K. C.; Shih, B. J. An efficient synthesis of 2-hydrazono-3,4-dihydro-2H-1,3-benzothiazin-4-one. *Chung-hua Yao Hsueh Tsa Chih* **1988**, *40*, 245-51.
63. Liu, K. C.; Shih, B. J.; Chern, J. W. Condensed 1,3-benzothiazinones. 3. Synthesis of 3-substituted 1,2,4-triazolo[3,4-b][1,3]benzothiazin-5-ones. *J. Heterocycl. Chem.* **1990**, *27*, 391-5.
64. Brown, D. J.; Nagamatsu, T. Isomerizations akin to the Dimroth rearrangement. III. The conversion of simple s-triazolo[4,3-a]pyrimidines into their [1,5-a] isomers. *Australian Journal of Chemistry* **1977**, *30*, 2515-25.

65. Alvarez, S. G.; Alvarez, M. T. A practical procedure for the synthesis of alkyl azides at ambient temperature in dimethyl sulfoxide in high purity and yield. *Synthesis* **1997**, 413-414.
66. Sheehan, J. C.; Bolhofer, W. A. An improved procedure for the condensation of potassium phthalimide with organic halides. *Journal of the American Chemical Society* **1950**, *72*, 2786-8.
67. Urquhart, G. G.; Gates, J. W., Jr.; Connor, R. Dodecyl (lauryl) mercaptan. *Org. Synth.* **1941**, *21*, 36-8.
68. Saito, Y.; Wada, N.; Kusano, S.; Miyazawa, T.; Takahashi, S.; Toyokawa, Y.; Kajiwara, I. Preparation and formulation of 2-[(carboxyphenyl)thio]-4,6-dimethoxypyrimidines as herbicides. 89-415871 4932999, 19891002., 1990.
69. Robert M. Silverstein, F. X. W., David J. Kiemle. *Spectrometric identification of organic compounds*. John Wiley & Sons: 2005.
70. Khlifi, M.; Paillous, P.; Bruston, P.; Raulin, F.; Guillemin, J. C. Absolute IR Band Intensities of CH₂N₂, CH₃N₃, and CH₃NC in the 250-4300 cm⁻¹ Region and Upper Limits of Abundance in Titan's Stratosphere. *Icarus* **1996**, *124*, 318-328.
71. Wagner, G.; Richter, P. Preparation and Dimroth rearrangement of 2-imino-4-oxodihydro-5,6-benzo-1,3-thiazines. *Z. Chem.* **1967**, *7*, 231.
72. Wagner, G.; Richter, P. Synthesis and reaction of 2-imino-4-oxo- and 2-oxo-4-iminodihydro-2H-1,3-benzothiazines. *Pharmazie* **1969**, *24*, 100-8.
73. Ceraulo, L.; Agozzino, P.; Ferrugia, M.; Giannola, L. I. Studies in organic mass spectrometry. I. Electron impact-induced fragmentation of 2-substituted 4H-1,3-benzothiazin-4-ones. *Ann. Chim. (Rome)* **1977**, *67*, 707-19.
74. Liu, K. C.; Shih, B. J.; Chern, J. W. Condensed 1,3-benzothiazinones. 2. Synthesis of 2-substituted 1,2,4-triazolo[5,1-b][1,3]benzothiazin-9-ones. *J. Heterocycl. Chem.* **1989**, *26*, 457-60.