

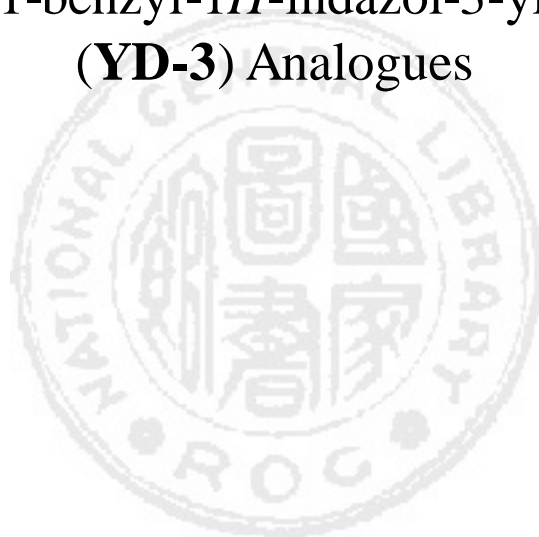
中國醫藥學院藥物化學研究所碩士論文

指導教授：郭盛助 教授
黃麗嬌 教授

論文題目

4-(1-苄基-1*H*-? 唑-3-基)苯甲酸乙酯(YD-3)
類緣化合物之合成與抗血小板活性

Synthesis and Antiplatelet Activity of
Ethyl 4-(1-benzyl-1*H*-indazol-3-yl)benzoate
(YD-3) Analogues



研究生 陳華鑫

中華民國九十一年六月

目 錄

中文摘要

英文摘要

第一章 緒論.....	1
第一節 血小板之生理和病理功能.....	1
第二節 凝血？及凝血？-受體拮抗劑.....	5
第三節 ？ 唑類化合物之合成方法.....	9
第四節 研究動機與目的.....	13
第二章 結果與討論	
第一節 化學合成.....	15
第二節 生物活性.....	30
第三章 結論.....	31
第四章 實驗部分	
第一節 試藥與溶劑.....	32
第二節 重要儀器與實驗材料.....	35
第三節 化合物之製備.....	37
第四節 藥理試驗方法.....	62
參考文獻.....	64
圖譜.....	71

中文摘要

4-(1-苄基-1*H*-咪唑-3-基)苯甲酸乙酯(YD-3)是本實驗室近期所合成出來，作為一個新型的凝血-受體拮抗劑。

在此研究中，著者將 YD-3 當作為一個先導化合物，並製備出一系列的 YD-3 衍生物(9a – 9d, 10a – 10n)。

其關鍵的中間產物 YD-3 之合成如圖表 6 所述。以 4-苯醯基苯甲酸乙酯(3)為起始物質與苄基聯胺反應即可產生 4-(苄基 苯基甲基)苯甲酸乙酯(4)，其產物為 *E*-及 *Z*-型異構物的混合物。將此混合物於低溫下，與四醋酸鉛於二氯甲烷中進行反應後，再加入三氟化硼參與反應，進而加熱即可形成所預期的高產率化合物 YD-3。

以 YD-3 為起始物，合成了不同的酯類(9a – 9d)與醯胺類(10a – 10n)化合物，提供抗血小板活性試驗的篩選。

Abstract

Ethyl 4-(1-benzyl-1*H*-indazol-3-yl)benzoate (**YD-3**) was first synthesized in our laboratory as a novel thrombin-receptor antagonist.

In this study, YD-3 was used as a lead compound and a series of its derivatives (**9a – 9d**, **10a – 10n**) were prepared.

The key intermediate YD-3, was synthesized according to Scheme 6. The starting material ethyl 4-benzoylbenzoate (**3**) was treated with benzylhydrazine to yield ethyl 4-[(benzylhydrazono)(phenyl)methyl]benzoate (**4**) as a mixture of *E*- and *Z*-form isomers. The hydrazone was then treated with lead tetraacetate in dichloromethane at low temperature, subsequently boron trifluoride etherate was added and the mixture was heated to form the expected YD-3 with high yield.

Starting from YD-3, various esters (**9a – 9d**) and amides (**10a – 10n**) were synthesized and examined for antiplatelet screening.

第一章 緒論

本論文旨在開發新型抗血小板(antiplatelet)藥物 – 凝血酶受體拮抗劑(thrombin-receptor antagonist)，而以 5-唑類(indazole)化合物，4-(1-苄基-1*H*-5-唑-3-基)苯甲酸乙酯[ethyl 4-(1-benzyl-1*H*-indazol-3-yl)benzoate；**YD-3**]為先導化合物(lead compound)，從事其相關化合物之合成，以及這些新化合物之生理活性。遂將血小板之生理和病理功能、凝血酶和凝血酶受體拮抗劑以及 indazole 合成方法簡述如下，作為研究背景資料。

第一節 血小板之生理和病理功能

血小板(platelet)在血液凝集的過程中，扮演著相當重要的角色，當血管內皮細胞受損或血管受傷破裂時，血管會先收縮，同時暴露出來的組織則會分泌出膠原(collagen)及 adenosine 5'-diphosphate (ADP)，促使血小板改變形狀，以便附著於受損處，並且引起血小板的凝集與釋放反應¹。此外，受損的組織也會釋放出組織血栓形成素(tissue thromboplastin)，進而活化凝血機制的外在系統，產生凝血酶(thrombin)。Thrombin 會使纖維蛋白原(fibrinogen)形成纖維蛋白(fibrin)，而纖維蛋白再受到 ADP 之牽引，與附著凝集在受損處之血小板集團結合，而產生凝血塊(fibrin clot)，再聚集成堅固的血小板止血栓(thrombus)，達到止血的效果²。Collagen 與 thrombin 除了會促使凝血塊的形成來幫助止血外，也可以活化血小板引起血小板釋放 ADP、serotonin 等物質，來幫助血液凝集。

當 thrombin、collagen、ADP、platelet-activating factor (PAF)及 thromboxane A₂ (TXA₂)等物質與血小板細胞膜上之特定接受體結合後，再經由 GTP-binding protein (G protein)將訊息傳遞出去，經由 G protein 活化 phospholipase C (PLC)，而促使 inositol phospholipids 的水解，增加細胞內 diacylglycerol 及 inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃)的含量，diacylglycerol 會活化 protein kinase C (PKC)，進而促使血小板的活化(Figure 1)。而 IP₃ 會促使鈣離子從血小板的 dense tube 中被釋放出來，當鈣離子的濃度增加時，可活化 phospholipase A₂ (PLA₂) 釋放出 arachidonic acid (AA)，AA 則受到 cyclooxygenase 的作用轉變成 prostaglandin endoperoxides (PGG₂, PGH₂)，再經由 thromboxane synthetase 的作用，轉變成 TXA₂，因而促進血小板的凝集與釋放反應³(Figure 2)，而 PGH₂ 在血小板中經 prostacyclin (PGI₂) synthetase 的作用，產生的 PGI₂ 會抑制 Ca²⁺的生成，而抑制血小板的凝集反應。因此，TXA₂ 所扮演的角色是血小板凝集引發劑，而 PGI₂ 則是血小板凝集抑制劑。除此之外，鈣離子亦會與一種稱之為 calmodulin 的蛋白質結合，形成 Ca²⁺-calmodulin 的複合體，而促使血小板收縮。

血小板雖可參與形成血栓，達到止血的效果，但血栓若無法及時消除，則會阻塞較小之血管造成栓塞，引起急性血管併發症。而不適當之凝血，或由於高血脂、糖尿病、腫瘤、動脈或靜脈硬化等，所造成之血小板不正常活化，均是造成血管栓塞疾病 (thromboembolism)的主因，極可能引發動脈硬化、心肌梗塞、腦中風與腎血管疾病，這些都是文明社會中常見之死因⁴。因此，抑制血小板不適當的活化，乃成為預防或治療血管栓塞疾病的重要方法之一。

目前臨床上最常被使用的抗血小板藥物 aspirin，是抑制血小板 cyclooxygenase 而阻斷 TXA₂ 之生成，但是對細胞作用的選擇性差，會抑制內皮細胞合成 prostacyclin。另一個用於臨床的抗血小板藥物 ticlopidine，則是選擇性抑制 ADP，而引起血小板活化，但是藥效緩慢，可能引起白血球缺乏。近年來也有不少新型的化合物具有抗血小板活性，主要是抑制 TXA₂ synthetase 及其與 TXA₂ receptor 結合之拮抗，其中 oragrel sodium (xanbon, OKY-046) 已在日本核准上市。然而至目前為止，aspirin 仍是臨床上公認最安全的少數抗血小板藥物之一。因此，開發更理想之新型抗血小板凝集藥物，是醫藥界急待解決之課題。

本論文之實驗即應用上述之原理，分別以 thrombin、AA、collagen 及 PAF 引發血小板凝集後，測試化合物抑制其凝集的程度。

Figure 1. The mechanism of platelet activation

Figure 2. The inhibitors of platelet activation

第二節 凝血? 及凝血? -受體拮抗劑

本研究是以作用機轉獨特的 thrombin receptor antagonist ~ ethyl 4-(1-benzyl-1*H*-indazol-3-yl)benzoate (YD-3)做為先導化合物，從事其結構修飾與活性篩選，旨在尋找與 YD-3 作用機轉相同，而臨床應用可能性更佳的新藥候補物質，因此將 thrombin、thrombin receptor 及其 antagonists 之主要生理功能與作用簡述如下：

I. Thrombin 的主要生理功能⁵

(1)調節血小板活化、凝血及血栓溶解的功能

Thrombin 會誘導血小板活化、凝集；會促使 fibrinogen 轉變為 fibrin，同時可以與其他有絲分裂原(mitogen；如 TNF- α) inflammatory mediators (oxygen derived free radical)一起刺激 cell adhesion molecule 的表現，以上數種功能共同促使血管壁受損部位產生凝血現象，而另一方面 thrombin 也會促進內皮細胞分泌 PGI₂、NO 等物質，協助血栓溶解。總而言之，thrombin 是扮演調節凝血及血栓溶解的角色。

(2)誘導細胞增生作用

Thrombin 會誘導 fibroblasts leukocytes 及 smooth muscle cells 之增生作用(proliferation)與轉移作用(migration)，可以說對血管受損傷口的復原過程或動脈硬化斑塊的形成都有促進作用。

Thrombin 本身也是一種 mitogen，它會誘導血小板及內皮細胞釋放 PDGF (platelet derived growth factor)及 TGF β (transforming growth factor β)，可能會造成受損部位下組織的永久性傷害。

(3) 引發白血球的趨化及發炎反應

Thrombin 會刺激內皮細胞合成並釋放各種趨化因子，造成 monocytes、neutrophils 及 macrophages 被吸附到受損的內皮上。Thrombin 也會增加內皮細胞的通透性，使白血球(leukocytes)穿透內皮組織而滲出，造成發炎反應。

(4) 其他作用

Thrombin 會促進血管增生及促進癌細胞的附著分裂及生長等作用⁶，因此它在某些癌症的病變過程中扮演相當重要的角色。

II. Protease-Activated Receptors (PARs)⁷

Thrombin 活化細胞主要是經由 G-protein coupled thrombin receptors 而發生作用的。G-Protein coupled thrombin receptors 是屬於 protease activated receptors (PARs) superfamily 的成員，它們是一族 seven transmembrane 之 G-protein coupled receptors，目前已被發現者有下列四種亞型：

(1) PAR-1⁸

主要分佈於血小板及內皮細胞與腦神經細胞中，經由 thrombin 或 trypsin 的結合而活化，活化後可以引起血小板凝集、內皮細胞增生、血管壁通透性增加而引起發炎反應。PAR-1 也表現在部份癌細胞上，促進癌細胞的轉移(metastases)。

(2) PAR-2⁸

主要分佈於胃腸道、呼吸道、腎臟、攝護腺及子宮等器官，經由 trypsin 的結合而活化，活化後參與發炎反應，促進內皮細胞增生，目前上有一些機轉未明的生理功能有待釐清。

(3) PAR-3⁹

主要分佈於骨髓 心臟 肝臟 小腸及氣管等器官,經由 thrombin 或 trypsin 的結合而活化,活化後所調控的生理反應並不清楚,尚待深入檢討。

(4) PAR-4¹⁰⁻¹²

PAR-4 是 1998 年由 Xu 等人發現的受體,其結構與 PAR-1 ~ PAR-3 只有部份相似而已,主要分佈於肺臟、胰臟、甲狀腺及小腸等器官,經由 thrombin 結合而活化,但是它所調控的生理迄今未明,尚待檢討。

III. 凝血? 抑制劑與凝血? -受體拮抗劑

如上所述, thrombin 與很多病理反應有密切的關係,尤其是心血管疾病及發炎性疾病,因此針對 thrombin 作用的抑制劑早已受到重視。如 Figure 3¹³ 所示,抑制 thrombin 作用的藥物依據其抑制途徑可以分成兩大類,一類稱之為 thrombin inhibitors (例如 heparin、hirudin 等),為活性甚強而且作用範圍甚廣的藥物,這些藥物雖然有很強的藥效,但是其安全範圍太窄,容易引起出血傾向的副作用。另一類則為 thrombin receptor antagonists (屬於 PAR antagonists)只會抑制 thrombin 所造成之細胞反應,不會影響凝血系統,不易引起出血傾向的副作用。因此近年來其相關研究較多,目前已發現有些 PAR-1 antagonist 頗具發展潛力¹⁴。

Figure 3. Thrombin catalytic function is central to much of hemostasis and thrombosis and also plays a role in atherosclerotic and inflammatory diseases. (Adapted from Seiler., S. M., 1996)

第三節 ? 唑類化合物之合成方法

因為本研究的標的化合物是? 唑類(indazole)衍生物，此類化合物之合成方法有很多種，其中較常見的合成方法可分為以下四種，分別簡介如下：

I.方法一¹⁵：

Scheme 1

如 Scheme 1 所示，本法之共同的特點是先將具有鄰位碳苯胺的胺基進行重氮化反應(diazotization)形成偶氮鍵，然後加高溫環化即可得到 indazole 類化合物之雜環架構。此合成法常因水氣問題而產生酚(phenol)和含氮(azo)化合物之副產品，又當苯環含有硝基(nitro group)時，則此合成法對 indazole 類化合物而言，其反應性較好。

II.方法二¹⁵：

Scheme 2

如 Scheme 2 所示，此法是將具有鄰位硝基的苯甲基胺，以氯化亞錫[tin(II) chloride ; SnCl₂]還原硝基，同時與苯甲基胺上的氮形成氮-氮鍵，環化成 indazole 之雜環架構。此合成法的缺點是氮-氮鍵不易形成，而產生鄰位胺基苯甲基胺之副產物。

另一個變通的方法如 Scheme 3 所示，將具有鄰位胺基之苯乙酮(acetophenone)的 oxime 產物，在醋酸酐(acetic anhydride)的作用下，形成氮-氮鍵，而產生 indazole 之雜環架構。

Scheme 3

III. 方法三¹⁵：

如 Scheme 4 所示，此法為利用含鄰位鹵素之苯烷基酮類或苯甲醛類與聯胺(hydrazine)反應，形成 hydrazone 化合物，然後在鹼性環境下加高溫脫除 HX，環化形成 indazole 類化合物。此合成法通常在苯環上具有拉電子基時產率較高，而鹵素為溴時的環化產率也比氯高，另外當鹵素換成硝基時也可進行此類反應。

Scheme 4

IV. 方法四^{16, 17}：

Scheme 5

如 Scheme 5 所示，本法是以四醋酸鉛[lead tetraacetate; $\text{Pb}(\text{OAc})_4$] 氧化 hydrazone 化合物，以形成 acetate 的氧化加成產物，然後以 Lewis acid 進行脫除醋酸並環化之反應，而形成 indazole 類之化合物，通常其環化反應大多發生在含有推電子基之苯環上。

除了以上四種方法外，文獻上尚有許多合成 indazole 類緣化合物的方法，其基本上都是由上述四種反應類型衍生出來¹⁸⁻³²。

第四節 研究動機與目的

到目前為止，唯一具有選擇性而且強效的 PAR-4 antagonist ~ ethyl 4-(1-benzyl-1*H*-indazol-3-yl)benzoate (**YD-3**)，是本研究室最近合成的 indazole derivative³³。從藥理試驗得知 YD-3 對 thrombin-induced platelet aggregation 具有選擇性的抑制活性(Table 1)^{33, 34}，於是進一步的探討其作用機轉，發現 YD-3 只對 PAR-4 agonist (GYPGKF)-induced platelet aggregation 具有強效的抑制活性(IC₅₀, 0.1 μM)，而對 PAR-1 及 PAR-3 agonist-induced platelet aggregation 沒有抑制活性，確認其選擇性極高。

如 Table 1 所示，一些化學結構與 YD-3 相似的 indazole 衍生物，在抗血小板活性方面，都不具有對 thrombin-induced platelet aggregation 之選擇性抑制活性，所以著者認為在 YD-3 結構中之 -COOCH₂CH₃ 為一個關鍵的官能基，於是本研究的主要目的在改變 -COOCH₂CH₃ 官能基，而合成一系列 YD-3 衍生物，如 substituted 4-(1-benzyl-1*H*-indazol-3-yl)benzoate (**A**)及 4-(1-benzyl-1*H*-indazol-3-yl)-*N*-substitutedbenzamide (**B**)。並測試其抗血小板凝集活性，以建立其結構與活性之相關性，在另一方面，也大量合成 YD-3，以提供應用性藥理試驗之用。

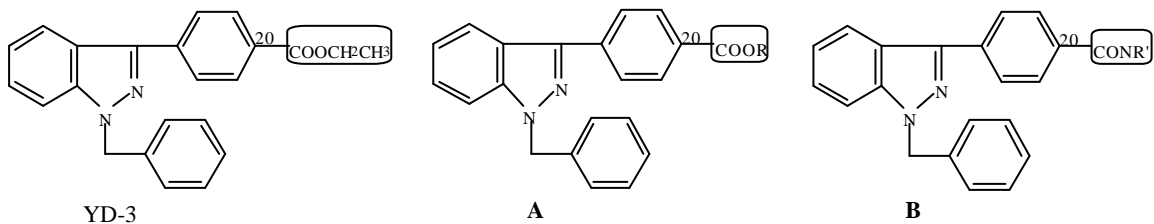


Table 1. The inhibitory effect of 1-benzyl-3-(3' or 4'-substituted phenyl) indazoles, on platelet aggregation induced by thrombin, AA, collagen and PAF.

Platelets were incubated with a tested compound at 37°C for 1 min, then thrombin (0.1 unit/ml), AA (100 µM), collagen (10 µg/ml) or PAF (2 ng/ml) was added to trigger the aggregation. Values are presented as the concentration (µM) by 50% inhibition of platelet aggregation (IC₅₀). Aspirin was used as a positive control.

*: The accuracy of IC₅₀ values are within ± 10%.

第二章 結果與討論

第一節 化學合成

I. Ethyl 4-(1-benzyl-1*H*-indazol-3-yl)benzoate (YD-3)之合成

I-1. 合成方法：

YD-3 是本研究之主要標的化合物之一，也是其它標的化合物之主要合成的中間產物，在過去，本研究室雖已合成過，但其產率不高，尤其是在最後環化的步驟，因此著者重新檢討其合成方法及反應條件。

其化學合成如 Scheme 6^{33, 35} 所示，首先以甲苯(toluene)為起始原料，在氯化鋁(aluminium chloride)的催化下，與苯醯氯(benzoyl chloride)進行 Friedel-Crafts acylation，得到高產率(74.9%)的 4-methylbenzophenone (1)，繼而以氧化鉻(chromium oxide)進行 oxidation，即可得到 4-benzoylbenzoic acid (2)，產率為 80.0%，再在 HCl_(g) 催化之下，加入 ethanol 進行 esterification，即可得到產率為 77.4% 之酯化產物 ethyl 4-benzoylbenzoate (3)。

其次關於化合物 3 與苄基聯胺(benzylhydrazine)之反應性，著者推測其原因有二，其一為化合物 3 之兩個 C=O 官能基，都可能與 benzylhydrazine 反應，而另一原因則是 benzylhydrazine 為一級氮易與醋酸起反應。於是首先用等莫耳數的化合物 3 與 benzylhydrazine 在 ethanol 中及 AcOH 存在下進行反應，結果發現其反應液中，未反應的原料化合物 3 殘存甚多。於是追加過量 1 倍的 benzylhydrazine，同時用大量的 ethanol 來稀釋反應液，以免高濃度的 benzylhydrazine

與 $-\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ 反應形成 hydrazide 副產物。結果可以得到產率為 54.7% 之預期產物 ethyl 4-[(benzylhydrazono)(phenyl)methyl]benzoate (4)，化合物 4 可能同時以 *E*-form 及 *Z*-form 之形式存在，著者也從其 TLC (正己烷：苯 = 1：1) 上發現到兩個點。從其 TLC 上顯色的程度，判斷兩者的濃度相當。然而化合物 4 之 *E*-form 及 *Z*-form 在理論上，於環化步驟的反應都會變成相同之產物，因此著者並沒有進一步將 *E*-form 與 *Z*-form 加以分離，而直接進行下一步驟反應，以得到混合物中間體 5，再進行以下的環化反應，即可得到先導化合物 ethyl 4-(1-benzyl-1*H*-indazol-3-yl)benzoate (6)。因為這反應是影響產率的關鍵步驟，所以著者以下列兩種反應條件進行反應，並且比較其產率：

(1) 參照 1-phenyl-3-(*p*-methoxycarbonylphenyl)indazole 之合成方法

36

將化合物 4 溶於 CH_2Cl_2 中，室溫下加入 lead tetraacetate (LTA) 及 boron trifluoride etherate ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) 混合試劑，反應 10 分鐘後，注入冰水中，中止其反應，將沉澱物以 CHCl_3 萃取，有機層依序以水、5% 碳酸鈉水溶液，水洗滌至中性，有機層以無水硫酸鎂乾燥，濾液減壓濃縮至無溶劑蒸出，粗產物以管柱層析純化分離後，即可得到化合物 6，產率為 8.3%，熔點為 79–81 。

(2) 將含 LTA 之 CH_2Cl_2 溶液，在 0–5 下滴加含有化合物 4 之 CH_2Cl_2 溶液，滴加後溫度維持在 0–5 下 30 分鐘，待以 TLC 檢測原料消失後，再於室溫下滴加 $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ，並使溫度自然上升，最後再升溫至迴流，反應 60 分鐘後，注入冰水中止反

應，同樣的以 CHCl_3 萃取，有機層依序以水、5%碳酸鈉水溶液，水洗滌至中性，有機層以無水硫酸鎂乾燥，濾液減壓濃縮至無溶劑蒸出，粗產物以管柱層析純化分離後，即可得到化合物 **6**，產率為 20.2%。

Scheme 6. (a) AlCl_3 ; (b) CrO_3 , AcOH , H_2SO_4 ; (c) H_3O^+ , EtOH ;
(d) benzylhydrazine, EtOH , AcOH ; (e) $\text{Pb}(\text{OAc})_4$, CH_2Cl_2 ;
(f) $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CH_2Cl_2

I-2. 化合物 **6** (YD-3) 之結構分析

化合物 **6** 雖是已知化合物，但迄今尚未有完整之 NMR 光譜數據等文獻資料，因此著者將其理化性質與光譜數據解析，敘述如下：

化合物 **6**：為淡黃色針狀結晶，熔點為 79–81 。

- (1) 元素分析：由其元素分析結果及配合 EIMS 分子離子峰 (m/z 356) 得知此化合物之分子式為 $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$ 。
- (2) IR 圖譜(圖 6-1)：在 1721 cm^{-1} 有 carbonyl group 的吸收帶，在 1611 cm^{-1} 有 imino group 的吸收帶。
- (3) UV 圖譜：在 320 nm 及 211 nm 處有最大吸收。
- (4) NMR 圖譜：在其溶媒的選擇中，著者曾將 chloroform- d_1 (CDCl_3) 與 dimethyl sulfoxide- d_6 (DMSO) 做比較，發現其 DMSO 之解析度較佳，因此選擇 DMSO 作為 NMR 之溶媒，並解析此圖譜。
(a) ^1H -NMR 圖譜(圖 6-2)：由其積分值顯示此化合物有 20 個氫。而由其化學位移、偶合情形與 ^1H - ^1H COSY 圖譜(圖 6-3a, 6-3b)，將各個質子訊號(proton signals)歸屬如下：
在最高磁場出現的 1.32 (3H, t , $J = 7.1\text{ Hz}$) 與 4.33 (2H, q , $J =$

7.1 Hz)分別歸屬於乙氧基 H-27 與 H-26 之訊號。其次，因受 N 的影響，H-10 之訊號往較低磁場移動，出現於 5.75 (2H, *s*)。而在 7.22 – 8.18 則為芳香環之質子訊號，其中，7.22 – 7.30 (6H, *m*)為 H-8, H-12, H-13, H-14, H-15 及 H-16 之訊號；7.44 (1H, *t*, $J = 7.0$ Hz)則為 H-7 之訊號；而 indazole 雜環上之 H-6 及 H-9, 分別出現在較低磁場 7.78 (1H, *d*, $J = 8.5$ Hz)及 8.12 (1H, *d*, $J = 7.5$ Hz)^{37, 38}；此外，另有一組 4 個質子之訊號出現於 8.06 – 8.18 (4H, *m*)，分別歸屬於 H-18, H-19, H-21 及 H-22

(b) ¹³C-NMR 圖譜(圖 6-4)：顯示有 19 個碳原子訊號，但由分子式得知一共有 23 個碳原子，故推測有 4 組碳訊號重疊。

(c) HMQC 圖譜(圖 6-5a, 6-5b)：依與氫譜之相關，推測 14.40, 52.33 及 60.97 的訊號分別為 C-27, C-10 及 C-26。

再者，可以將 4 個三級碳依序歸屬如下：110.77, 121.14, 122.14 及 126.85 依序歸屬為 C-6, C-9, C-8 及 C-7 之訊號

(d)至於其它芳香環上的三級碳與四級碳的訊號，則參照 HMBC 圖譜(圖 6-6a ~ 6-6c)判斷如下：首先，165.75 因與 H-26 (4.33) 有 ³*J* 遠程偶合關係(correlation)，所以應歸屬於 C-23 之訊號。又 C-23 (165.75)與 H-19, 21 (8.06 – 8.10)有 ³*J* correlation，所以推測 H-18, 22 應在 8.15 – 8.18，再配合 HMQC 圖譜時，將 128.82 歸屬於 C-18, 22 之訊號，而 130.03 則歸屬於 C-19, 21 之訊號。因為 121.30 與 H-8 (7.22 – 7.30)及 H-6 (7.78) 有 ³*J* correlation, 所以歸屬於 C-4 之訊號。129.03 因與 H-9 (8.12)及 H-18, 22 (8.15 – 8.18)有 ³*J* correlation，所以歸屬於 C-3 之訊號。而 137.41 因與 H-10 (5.75)及 H-12, 16 (

7.22 – 7.30)有 2J correlation, 所以歸屬於 C-11 之訊號。而 137.91 因與 H-19, 21 (8.06 – 8.10)有 2J correlation, 所以歸屬於 C-20 之訊號。 141.23 因與 H-10 (5.75)、H-7 (7.44)及 H-9 (8.12)有 3J correlation, 所以歸屬於 C-5 之訊號。而 141.71 因與 H-18, 22 (8.15 – 8.18)有 2J correlation, 所以應歸屬於 C-17 之訊號。再者, 由於 127.60 分別與 H-10 (5.75) 及 H-13, 15 (7.22 – 7.30)有 3J 及 2J correlation, 應歸屬於 C-12, 16 之訊號, 所以剩下的一組碳訊號 126.95 應歸屬於 C-13, 15 之訊號, 而另一個 127.83 則歸屬於 C-14 之訊號。最後將 YD-3 之各種 NMR 圖譜列表 (Table 2) 如下 :

Table 2. NMR spectral data of ethyl 4-(1-benzyl-1*H*-indazol-3-yl)benzoate (**YD-3**)

(5) 質譜 (EI-MS) (圖 6-7a) : 化合物之分子離子峰為 m/z 356, 且其分子離子峰等裂解之相對離子峰 (圖 6-7b), 與預期相符。而其它化合物裂解情況類同。

圖 6-1 化合物 6 之紅外線光譜 (IR)

圖 6-2 化合物 6 之 ^1H -NMR 光譜 (DMSO- d_6 , 200 MHz)

圖 6-3a 化合物 6 之 ^1H - ^1H COSY 光譜

圖 6-3b 化合物 6 之 ^1H - ^1H COSY 光譜

圖 6-4 化合物 6 之 ^{13}C -NMR 光譜(DMSO- d_6 , 50 MHz)

圖 6-5a 化合物 6 之 HMQC 光譜

圖 6-5b 化合物 6 之 HMQC 光譜

圖 6-6a 化合物 6 之 HMBC 光譜

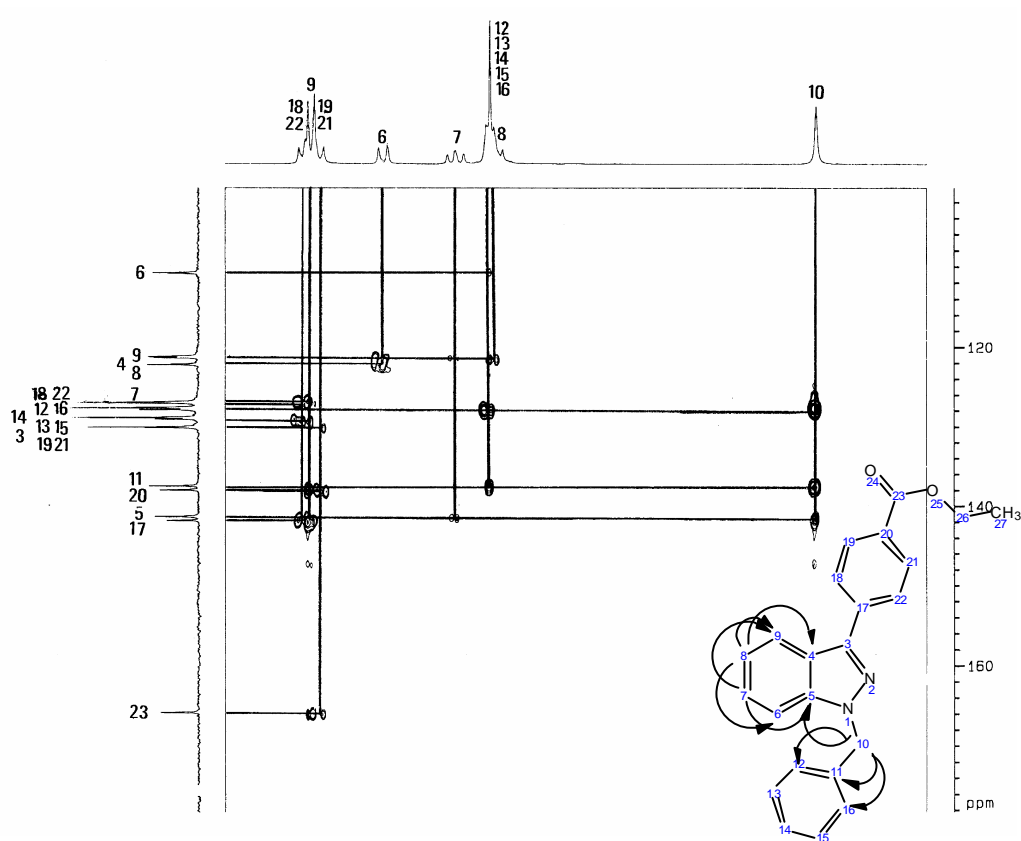


圖 6-6b 化合物 6 之 HMBC 光譜

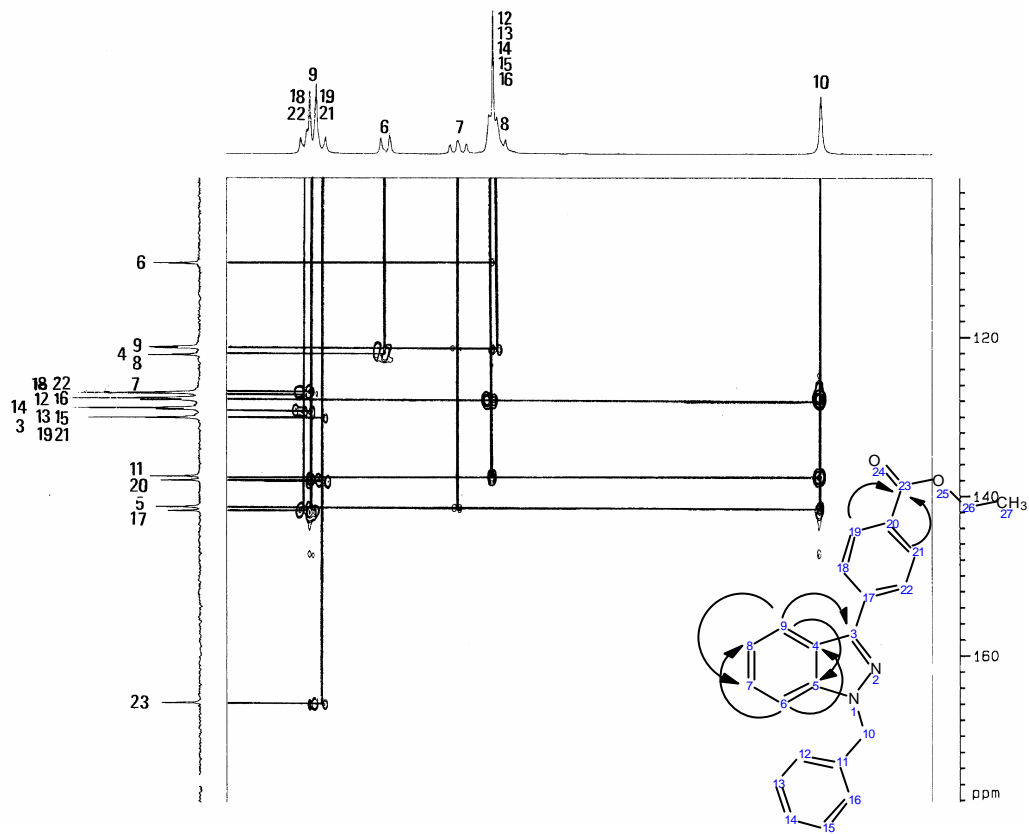


圖 6-6c 化合物 6 之 HMBC 光譜

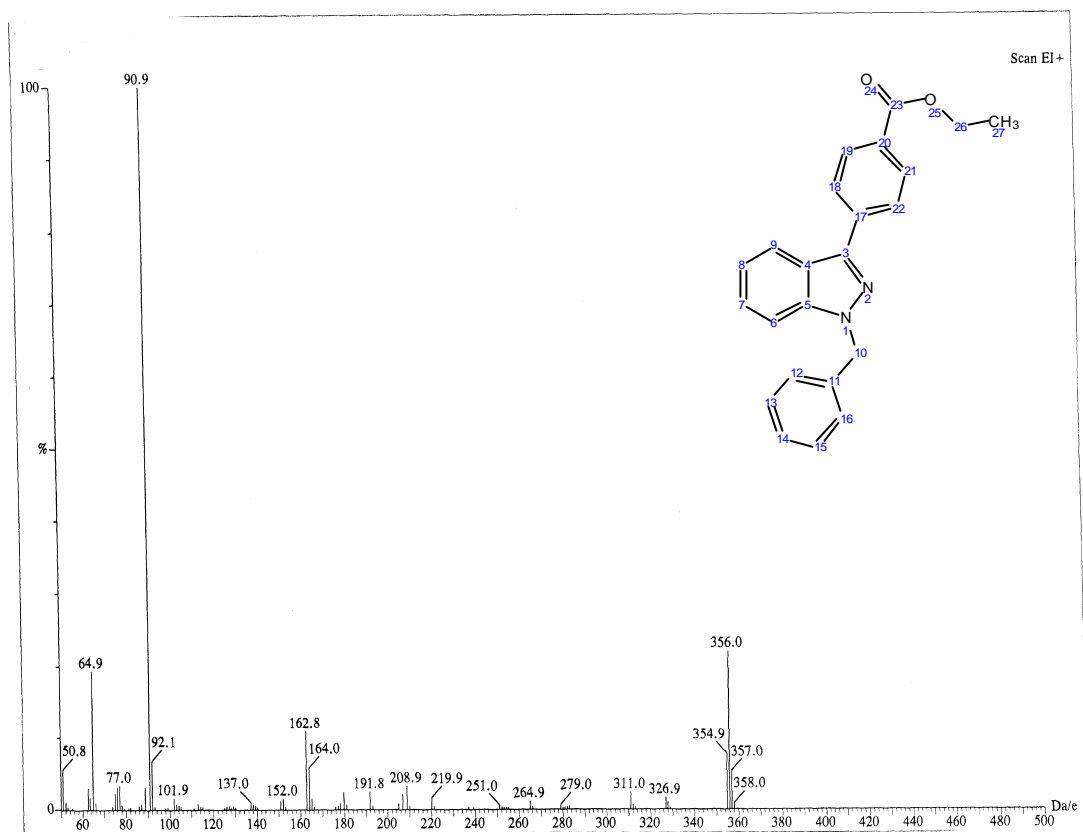


圖 6-7a 化合物 6 之質譜(EI-MS)

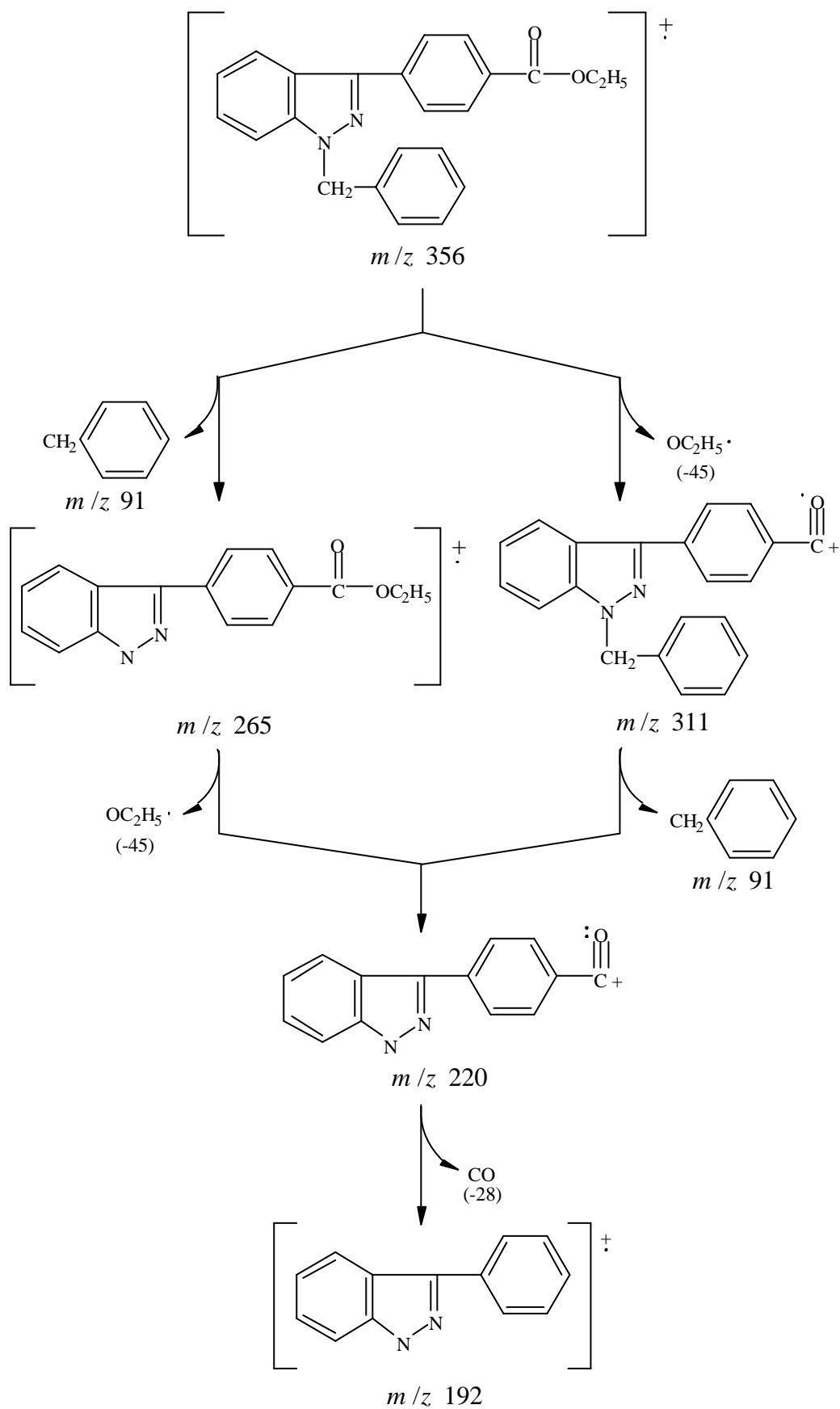


圖 6-7b 化合物 6 之分子離子峰等裂解之相對離子峰

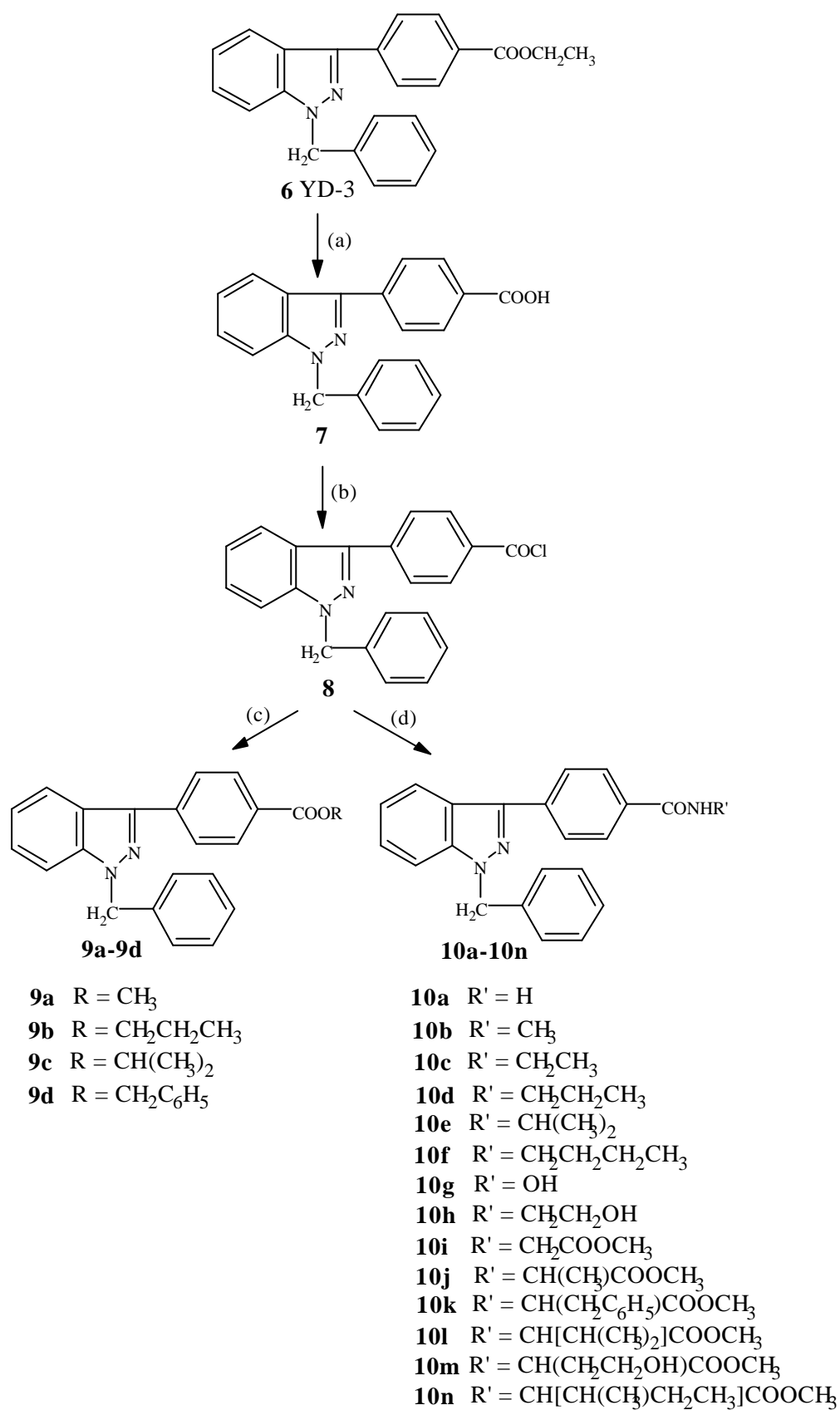
II. YD-3 衍生物(9a – 9d, 10a – 10n)之合成

如 Scheme 7^{33, 35} 所示，以 YD-3 為起始原料，先與氫氧化鈉水溶液進行水解反應，形成 4-(1-benzyl-1*H*-indazol-3-yl)benzoic acid (7)，再與二氯亞硫醯(thionyl chloride)進行氯化(chlorination)反應，即可形成 4-(1-benzyl-1*H*-indazol-3-yl)benzoyl chloride (8)，再分別與各種醇類、胺類和胺基酸酯類進行反應，即可順利得到相對應的 esters (9a – 9d)及 amides (10a – 10n)產物。

其中，在合成化合物 10g 之過程中，因 hydroxylamine 的結構同時擁有-NH₂ 及-OH 兩個可與化合物 8 反應的官能基，而因為-NH₂ 之反應性比較強，所以著者以過量的 hydroxylamine 溶於 toluene 中，於室溫下緩慢滴加化合物 7，即可得到單一產物 10g。

以上各種衍生物的結構可由其元素分析、MS、IR、UV、NMR 與比對 YD-3 等各種光譜數據給予確認。

其中，在 MS 的部分，由其分子離子峰等裂解情形得知，YD-3 衍生物(9a – 9d, 10a – 10n)在 MS 光譜數據上顯現之 M-1 為其特徵。



Scheme 7. (a) NaOH, H₂O ; (b) SOCl₂, CH₂Cl₂ ; (c) R-OH, ;
 (d) NH₂R', toluene

第二節 生物活性

I. YD-3 對裸鼠血管新生之抑制作用

著者提供 YD-3 檢品委託台大醫學院藥理學研究所鄧哲明教授，測試 YD-3 對 thrombin 所誘發的裸鼠血管新生之抑制活性，試驗結果如 Figure 4 所示。YD-3 在 30 mg/kg/day 之口服投與下對裸鼠之血管新生作用，具有完全的抑制活性。而其進一步病理動物模式試驗，目前正在進行中。

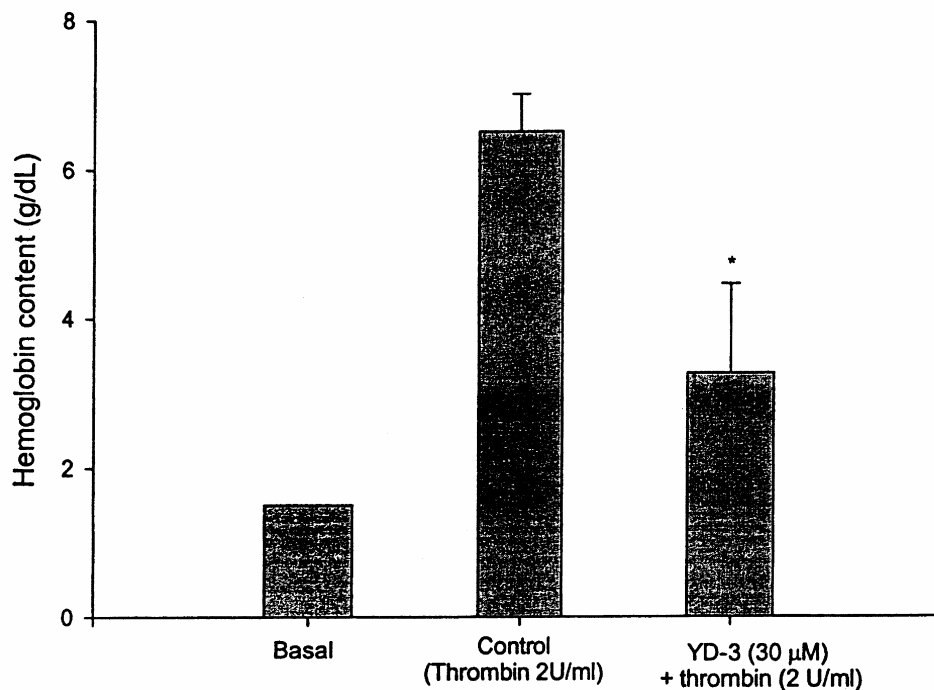


Figure 4

II. 抗血小板活性

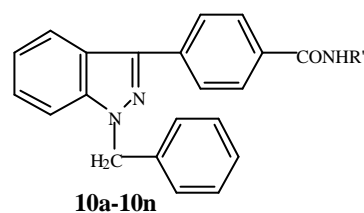
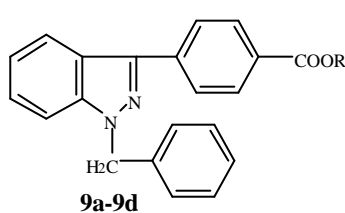
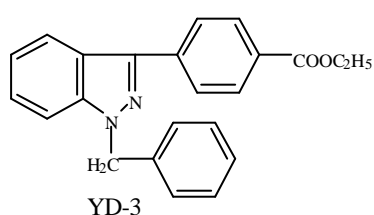
著者所合成的 YD-3 衍生物(9a – 9d, 10a – 10n)之抗血小板活性篩選，目前正在進行中。

第三章 結論

為了探討作用機轉獨特的 YD-3 之結構與其抗血小板活性之關係，著者以 YD-3 為先導化合物，改變 $-\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ 官能基，合成一系列 esters (**9a** – **9d**) 及 amides (**10a** – **10n**) 衍生物，提供抗血小板活性篩選。

另一方面，為了合成大量 YD-3 提供應用性的動物性試驗，著者也檢討了 YD-3 之合成方法，改善其產率。

YD-3 經由裸鼠血管新生實驗結果得知具有明顯之血管新生抑制作用，為極具開發潛力的新型抗癌活性物質。



- 9a** R = CH₃
9b R = CH₂CH₂CH₃
9c R = CH(CH₃)₂
9d R = CH₂C₆H₅

- 10a** R' = H
10b R' = CH₃
10c R' = CH₂CH₃
10d R' = CH₂CH₂CH₃
10e R' = CH(CH₃)₂
10f R' = CH₂CH₂CH₂CH₃
10g R' = OH
10h R' = CH₂CH₂OH
10i R' = CH₂COOCH₃
10j R' = CH(CH₃)COOCH₃
10l R' = CH[CH(CH₃)₂]COOCH₃
10k R' = CH(CH₂C₆H₅)COOCH₃
10n R' = CH[CH(CH₃)CH₂CH₃]COOCH₃
10m R' = CH(CH₂CH₂OH)COOCH₃

第四章 實驗部分

第一節 試藥與溶媒

一. 試藥

(一)購自德國 Merck 公司者：

Ammonia solution (32%)

Hydrochloric acid (37%)

Hydroxylamine (solution 50% in water)

Thionyl chloride (99.5%)

(二)購自英國 Lancaster 公司者：

Benzoyl chloride (99%)

Benzyl chloride (99%)

Boron trifluoride diethyl ether complex (99%)

Hydrazine hydrate (98%)

Methylamine (40% solution in water)

(三)購自瑞士 Fluka 公司者：

Butylamine (99%)

Ethylamine (70% aqueous solution)

Isopropylamine (99%)

Propylamine (99%)

(四)購自美國 Tedia 公司者：

Absolute ethanol (99.5%)

Ethanolamine (99.8%)

1-Propanol (*n*-propyl alcohol) (99%)

2-Propanol (isopropyl alcohol) (99%)

(五)購自美國 Aldrich 公司者：

Benzyl alcohol, anhydrous (99%)

(六)購自美國 Acros 公司者：

Chromium(VI) oxide, flakes (99%)

Lead(IV) acetate, stabilized (95%)

(七)購自日本 Sigma 公司者：

L-alanine methyl ester hydrochloride (99%)

L-glycine methyl ester hydrochloride (99%)

L-isoleucine methyl ester hydrochloride (99%)

L-phenylalanine methyl ester hydrochloride (99%)

L-serine methyl ester hydrochloride (99%)

L-valine methyl ester hydrochloride (99%)

(八)購自日本昭和化學株式會社者：

Glacial acetic acid (synthesis grade)

Magnesium sulfate anhydrous

Potassium hydroxide (synthesis grade)
Sodium carbonate, anhydrous (synthesis grade)
Sodium hydroxide (synthesis grade)
Sulfuric acid (98%)

(九) 由永信藥廠提供者：

Aluminium chloride (synthesis grade)

二. 溶媒

(一)購自德國 Merck 公司者：

Chloroform- d_1 (for NMR spectroscopy ; 99.8%)
Dimethyl sulfoxide- d_6 (for NMR spectroscopy ; 99.8%)
Dichloromethane (guaranted reagent ; G. R.)
Ethyl acetate (guaranted reagent ; G. R.)
n-Hexane (ACS grade)
Methanol (ACS grade ; spectrophotometric grade)

(二)購自美國 Tedia 公司者：

Chloroform (ACS grade)
Ethyl ether anhydrous (guaranted reagent ; G. R.)
Toluene (ACS grade)

(三)購自台灣省菸酒公賣局者：

Ethanol (95%)

第二節 重要儀器與實驗材料

一. 重要儀器

(一)融點測定器(Melting Point Apparatus)

本實驗產物之熔點係採用 Yanaco MP-500D 熔點測定器測定，而其測定範圍在 40–500 ，且溫度未經校正。

(二)質譜儀(Mass Spectrophotometer)

EI Mass 與 FAB Mass 以 VG Platform II GC-MS instrument 測定，離子化電壓為 70 eV，單位為 m/z 。(中國醫藥學院精密儀器中心及國科會中部貴重儀器使用中心)

(三)核磁共振光譜儀(Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer)

氫及碳的核磁共振光譜分析係採用 Bruker Advance DPX-200 FT-NMR Spectrometer 測定。(中國醫藥學院精密儀器中心) 以 (ppm)表示化學位移，而以 TMS (tetramethylsilane) 0 ppm 為內部標準。偶合常數(J)以 Hz 為單位，並以 s 表示單峰 (singlet)， d 表示二重峰(doublet)， t 表示三重峰(triplet)， q 表示四重峰(quartet)， br 表示寬峰(broad)， m 表示多重峰(multiplet)。

(四)紅外線光譜儀(Infrared Spectrophotometer)

紅外線光譜分析係採用 Nicolet Impact 400 FT-IR Spectrophotometer 測定，以溴化鉀(KBr)粉末為打片稀釋劑，光譜單位為 cm^{-1} 。

(五)紫外光-可見光光譜儀(UV-Visible Spectrophotometer)

紫外光-可見光光譜分析係採用 Shimadzu UV-160A UV-Visible Recording Spectrophotometer 測定，使用甲醇為溶劑，最大吸收波長(λ_{\max})單位為 nm。

(六)元素分析儀(Element Analyzer)

元素分析係採用 Perkin Elmer PE 2400 Series II CHNS/O Analyzer 測定，元素分析值與理論值相差在 $\pm 0.4\%$ 以內。
(中國醫藥學院精密儀器中心)

(七)紫外光燈(UV Equipment)

使用 CAMAG UV-Cabinet II 紫外燈觀察箱，備有 254 nm 與 366 nm 之光源。

二. 實驗材料

(一)薄層色層分析

使用德國 Merck 公司出品之 TLC aluminium sheets silica gel 60 F254 pre-coated 25 sheets 20 × 20 cm，layer thickness 0.2 mm。

(二)管柱色層分析

使用德國 Merck 公司出品之 silica gel 60 (70 – 230 mesh)當充填劑。

第三節 化合物之製備

I. Substituted 4-(1-benzyl-1*H*-indazol-3-yl)benzoate 類化合物(9a – 9d) 之合成

I-1. Ethyl 4-(1-benzyl-1*H*-indazol-3-yl)benzoate 之合成

(1) 4-Methylbenzophenone (1)之合成

秤取 85 克(0.64 莫耳)之無水氯化鋁(anhydrous aluminium chloride), 90 毫升(excess)之甲苯(toluene), 於冰浴下, 緩慢滴入 50 毫升(0.43 莫耳)之苯甲醯氯(benzoyl chloride), 室溫下攪拌過夜, 加熱至 100 再攪拌 2 小時, 降至室溫, 加入冰水終止反應, 有機層依序以水、5%碳酸鈉(sodium carbonate)水溶液, 水洗滌至中性, 取有機層以無水硫酸鎂(magnesium sulfate anhydrous)乾燥, 濾液減壓濃縮至無溶劑蒸出, 以正己烷(*n*-hexane)做再結晶, 可得化合物 1 (62.13 克); 淡褐色針狀結晶; 產率 74.9%; 熔點 54 – 56 。

(2) 4-Benzoylbenzoic acid (2)之合成

秤取 25 克(0.127 莫耳)之 4-methylbenzophenone, 加入 130 毫升之冰醋酸(glacial acetic acid), 80 毫升之水, 40 克(0.4 莫耳)之鉻酸(chromium oxide), 緩慢加入 25 毫升之濃硫酸(sulfuric acid), 升溫至 100 , 反應 4 小時, 降至室溫, 加入大量冰水終止反應, 固體析出, 為 4-benzoylbenzoic acid 之粗產物, 粗產物以 10% 氫氧化鉀(potassium hydroxide)水溶液溶解, 濾除不溶物, 於冰浴下, 濾液加入 10% 鹽酸(hydrochloric acid)水溶液酸化, 使調成 pH 2, 固體析出, 過濾, 取固體, 以乙醇(ethanol, 95%)

做再結晶，可得化合物 2 (22.96 克)；無色針狀結晶；產率 80.0%；
熔點 197 – 200

(3) Ethyl 4-benzoylbenzoate (3)之合成

秤取 20 克(0.884 莫耳)之 4-benzoylbenzoic acid，加入 150 毫升之甲苯，100 毫升之絕對酒精(absolute ethanol, 99.5%)，通入 HCl (g)，升溫至迴流，反應過夜，降至室溫，有機層依序以水、5% 碳酸鈉水溶液，水洗滌至中性，有機層以無水硫酸鎂乾燥，濾液減壓濃縮至無溶劑蒸出，粗產物以管柱層析分離純化(甲苯/矽膠)，以乙醇做再結晶，可得化合物 3 (18.81 克)；淡黃色片狀結晶；產率 77.4%；熔點 47 – 49 。

(4) Benzylhydrazine 之合成

秤取 100.12 克(2 莫耳)之聯胺(hydrazine hydrate)，加入 100 毫升之甲醇(methanol)，緩慢滴加 50.8 克(0.4 莫耳)之苄基氯(benzyl chloride)，升溫至迴流，反應過夜，降至室溫，以乙醚(ethyl ether)進行萃取，有機層依序以水、5% 碳酸鈉水溶液，水洗滌至中性，有機層以無水硫酸鎂乾燥，濾液減壓濃縮至無溶劑蒸出，再進行分餾純化分離，可得無色液體之化合物 benzylhydrazine，沸點 70 /3 mmHg。

(5) Ethyl 4-[(benzylhydrazono)(phenyl)methyl]benzoate (4)之合成

秤取 10 克(0.039 莫耳)之 ethyl 4-benzoylbenzoate，9.5 克(0.078 莫耳)之 benzylhydrazine，加入 100 毫升之乙醇，1 毫升之冰醋酸，升溫至迴流，反應過夜，降至室溫，以氯仿(chloroform)進行萃取，有機層依序以水、5% 碳酸鈉水溶液，水洗滌至中性，有機層以無水硫酸鎂乾燥，濾液減壓濃縮至無溶劑蒸出，加入

2% 鹽酸水溶液使反應物成為沉澱物，再以氯仿進行萃取，粗產物以管柱層析分離純化(正己烷：二氯甲烷=1：1/矽膠)，可得化合物 4 之粗產物，可直接進行下一步反應。

(5) Ethyl 4-(1-benzyl-1*H*-indazol-3-yl)benzoate (**6** ; **YD-3**)之合成

秤取 60 克之四醋酸鉛(lead tetraacetate)，以 400 毫升之二氯甲烷(dichloromethane)溶解，化合物 4 以 100 毫升之二氯甲烷溶解，於 0–5 °C 下，緩慢加至四醋酸鉛之溶液中，反應 30 分鐘後，再加入 200 毫升之三氟化硼(boron trifluoride etherate)，緩慢升溫至迴流，反應 1 小時，倒至冰水中以終止反應，有機層依序以水、5%碳酸鈉水溶液，水洗滌至中性，有機層以無水硫酸鎂乾燥，濾液減壓濃縮至無溶劑蒸出，粗產物以管柱層析分離純化(正己烷:氯仿=1:1/矽膠)，以正己烷做再結晶，可得化合物 6 (3.88 克)；淡黃色針狀結晶；產率 20.2%；熔點 79–81 °C。

化合物 6

MS (*m/z*) : 356

UV : max (MeOH) nm (log ϵ) : 320 (4.6), 211 (4.7)

IR : (KBr) cm^{-1} : 1721 (C=O), 1611 (C=N)

元素分析：以 $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$ 計算

計算值：C (77.51%), H (5.66%), N (7.86%)

實驗值：C (77.48%), H (5.68%), N (7.88%)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-*d*₆, 200 MHz) (ppm) :

1.32 (3H, *t*, *J* = 7.1 Hz, H-27), 4.33 (2H, *q*, *J* = 7.1 Hz, H-26),

5.75 (2H, *s*, H-10), 7.22-7.30 (6H, *m*, H-8, 12, 13, 14, 15, 16),

7.44 (1H, *t*, *J* = 7.0 Hz, H-7), 7.78 (1H, *d*, *J* = 8.5 Hz, H-6),

8.06-8.10 (2H, *m*, H-19, 21), 8.12 (1H, *d*, $J = 7.5$ Hz, H-9),
8.15-8.18 (2H, *m*, H-18, 22)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 50 MHz) (ppm) :

14.40 (C-27), 52.33 (C-10), 60.97 (C-26), 110.77 (C-6), 121.14
(C-9), 121.30 (C-4), 122.14 (C-8), 126.85 (C-7), 126.95 (C-18,
22), 127.60 (C-12, 16), 127.83 (C-14), 128.82 (C-13, 15),
129.03 (C-3), 130.03 (C-19, 21), 137.41 (C-11), 137.91 (C-20),
141.23 (C-5), 141.71 (C-17), 165.75 (C-23)

I-2. 4-(1-Benzyl-1*H*-indazol-3-yl)benzoic acid (**7**)之合成

秤取 5 克(0.014 莫耳)之化合物 **6**，加入 30 毫升之甲醇，40 毫
升之 20% 氫氧化鈉(sodium hydroxide)水溶液，升溫至迴流，反
應 1 小時，降至室溫，於冰浴下，加入 10% 鹽酸水溶液酸化至
pH 2，固體析出，過濾，取固體，以乙醇做再結晶，可得化合
物 **7** (4.13 克); 白色針狀結晶; 產率 89.8%; 熔點 203 – 206 。

化合物 7

MS (m/z) : 328

UV : max (MeOH) nm (log) :

IR : (KBr) cm^{-1} : 3441 (-OH), 1624 (C = O), 1572 (C = N)

元素分析 : 以 $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$ 計算

計算值 : C (76.81%), H (4.91%), N (8.53%)

實驗值 : C (76.84%), H (4.90%), N (8.50%)

^1H -NMR (DMSO- d_6 , 200 MHz) (ppm) :

3.57 (1H, *br*, H-25), 5.74 (2H, *s*, H-10), 7.23-7.30 (6H, *m*, H-8,

12, 13, 14, 15, 16), 7.45 (1H, *t*, $J = 6.9$ Hz, H-7), 7.79 (1H, *d*, $J = 8.4$ Hz, H-6), 8.05-8.08 (2H, *m*, H-19, 21), 8.10 (1H, *d*, $J = 3.8$ Hz, H-9), 8.11-8.16 (2H, *m*, H-18, 22)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 50 MHz) (ppm) :

52.28 (C-10), 110.76 (C-6), 121.26 (C-4, 9), 122.11 (C-8),
126.86 (C-7, 18, 22), 127.62 (C-12, 16), 127.84 (C-14), 128.84
(C-3, 13, 15), 130.24 (C-19, 21), 137.44 (C-11, 20), 141.20
(C-5), 141.86 (C-17), 167.39 (C-23)

I-3. Methyl 4-(1-benzyl-1*H*-indazol-3-yl)benzoate (**9a**)之合成

秤取 1 克(0.003 莫耳)之化合物 **7**，加入 100 毫升之二氯甲烷，緩慢加入 5 毫升(0.042 莫耳)之二氯亞硫醯(thionyl chloride)以進行氯化(chlorination)反應，升溫至迴流，反應 16 小時，降至室溫，反應液減壓濃縮至無溶劑蒸出，加入 30 毫升之甲苯，15 毫升(excess)之甲醇，升溫至迴流，反應 1 小時，降至室溫，反應液減壓濃縮至無溶劑蒸出，粗產物以管柱層析分離純化(氯仿/矽膠)，以正己烷做結晶，可得化合物 **9a** (0.56 克)；無色針狀結晶；產率 53.3%；熔點 95–97 。

化合物 9a

MS (m/z) : 342

UV : max (MeOH) nm (log) : 320 (4.5), 211 (4.6)

IR : (KBr) cm^{-1} : 1705 (C=O), 1609 (C=N)

元素分析：以 $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$ 計算

計算值：C (77.17%), H (5.30%), N (8.18%)

實驗值：C (77.20%), H (5.32%), N (8.19%)

¹H-NMR (CDCl₃-d₁, 200 MHz) (ppm) :

3.97 (3H, *s*, H-26), 5.69 (2H, *s*, H-10), 7.22-7.41 (8H, *m*, H-6, 7, 8, 12, 13, 14, 15, 16), 8.04-8.12 (2H, *m*, H-19, 21), 8.15 (1H, *d*, *J* = 9.9 Hz, H-9), 8.18-8.22 (2H, *m*, H-18, 22)

¹³C-NMR (CDCl₃-d₁, 50 MHz) (ppm) :

51.91 (C-26), 53.02 (C-10), 109.64 (C-6), 120.98 (C-9), 121.42 (C-8), 121.90 (C-4), 126.36 (C-7), 126.92 (C-12, 16, 18, 22), 127.61 (C-14), 128.54 (C-13, 15), 128.94 (C-3), 129.88 (C-19, 21), 136.36 (C-11), 137.96 (C-20), 140.92 (C-5), 142.68 (C-17), 166.79 (C-23)

I-4. Propyl 4-(1-benzyl-1*H*-indazol-3-yl)benzoate (**9b**)之合成

取 15 毫升(excess)丙醇(*n*-propanol)依照化合物 **9a** 之步驟，粗產物以管柱層析分離純化(氯仿/矽膠)，以正己烷做再結晶，可得化合物 **9b** (0.47 克)；白色針狀結晶；產率 43.3%；熔點 57–58 。

化合物 9b

MS (*m/z*) : 370

UV : max (MeOH) nm (log ε) : 321 (4.3), 211 (4.3)

IR : (KBr) cm⁻¹ : 1709 (C=O), 1611 (C=N)

元素分析：以 C₂₄H₂₂N₂O₂ 計算

計算值：C (77.81%), H (5.99%), N (7.56%)

實驗值：C (77.84%), H (5.98%), N (7.58%)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3-d_1 , 200 MHz) (ppm) :

1.07 (3H, *t*, $J = 7.5$ Hz, H-28), 1.79-1.89 (2H, *m*, H-27), 4.33
(2H, *t*, $J = 6.6$ Hz, H-26), 5.69 (2H, *s*, H-10), 7.23- 7.40 (8H, *m*,
H-6, 7, 8, 12, 13, 14, 15, 16), 8.03-8.08 (2H, *m*, H-19, 21), 8.14
(1H, *d*, $J = 10.9$ Hz, H-9), 8.18-8.21 (2H, *m*, H-18, 22)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3-d_1 , 50 MHz) (ppm) :

10.31 (C-28), 21.93 (C-27), 53.02 (C-10), 66.34 (C-26), 109.63
(C-6), 120.98 (C-9), 121.34 (C-8), 121.92 (C-4), 126.33 (C-7),
126.92 (C-12, 16, 18, 22), 127.59 (C-14), 128.53 (C-13, 15),
129.33 (C-3), 129.83 (C-19, 21), 136.36 (C-11), 137.84 (C-20),
140.92 (C-5), 142.74 (C-17), 166.36 (C-23)

I-5. Isopropyl 4-(1-benzyl-1*H*-indazol-3-yl)benzoate (**9c**)之合成

取 15 毫升(excess)異丙醇(isopropanol)依照化合物 **9a** 之步驟 ,
粗產物以管柱層析分離純化(氯仿/矽膠) , 以正己烷做再結晶 ,
可得化合物 **9c** (0.51 克); 白色簇狀結晶 ; 產率 46.7% ; 熔點 75 –
77 。

化合物 9c

MS (m/z) : 370

UV : max (MeOH) nm (log) : 320 (4.6), 211 (4.7)

IR : (KBr) cm^{-1} : 1713 (C = O), 1605 (C = N)

元素分析 : 以 $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$ 計算

計算值 : C (77.81%), H (5.99%), N (7.56%)

實驗值 : C (77.84%), H (6.01%), N (7.55%)

¹H-NMR (CDCl₃-d₁, 200 MHz) (ppm) :

1.42 (6H, *d*, *J* = 6.2 Hz, H-27, 28), 5.24-5.37 (1H, *m*, H-26),
5.69 (2H, *s*, H-10), 7.20- 7.39 (8H, *m*, H-6, 7, 8, 12, 13, 14, 15,
16), 8.03-8.07 (2H, *m*, H-19, 21), 8.12 (1H, *d*, *J* = 10.5 Hz,
H-9), 8.17-8.20 (2H, *m*, H-18, 22)

¹³C-NMR (CDCl₃-d₁, 50 MHz) (ppm) :

21.81 (C-27, 28), 53.00 (C-10), 68.19 (C-26), 109.66 (C-6),
121.00 (C-9), 121.42 (C-8), 121.95 (C-4), 126.35 (C-7), 126.87
(C-18, 22), 126.97 (12, 16), 127.61 (C-14), 128.55 (C-13, 15),
129.77 (C-3), 129.83 (C-19, 21), 136.41 (C-11), 137.78 (C-20),
140.95 (C-5), 142.76 (C-17), 165.81 (C-23)

I-6. Benzyl 4-(1-benzyl-1*H*-indazol-3-yl)benzoate (**9d**)之合成

取 15 毫升(excess)苄基醇(benzyl alcohol)依照化合物 **9a** 之步驟，粗產物以管柱層析分離純化(正己烷:氯仿=1:1/矽膠)，以正己烷做再結晶，可得化合物 **9d** (0.44 克)；白色球狀結晶；產率 36.7%；熔點 74–75 。

化合物 9d

MS (*m/z*) : 418

UV : max (MeOH) nm (log) : 322 (4.6), 211 (4.7)

IR : (KBr) cm⁻¹ : 1709 (C = O), 1609 (C = N)

元素分析：以 C₂₈H₂₂N₂O₂ 計算

計算值：C (80.36%), H (5.30%), N (6.69%)

實驗值：C (80.33%), H (5.34%), N (6.71%)

¹H-NMR (CDCl₃-d₁, 200 MHz) (ppm) :

5.43 (2H, *s*, H-26), 5.69 (2H, *s*, H-10), 7.24- 7.53 (13H, *m*, H-6, 7, 8, 12, 13, 14, 15, 16, 28, 29, 30, 31, 32), 8.03-8.12 (2H, *m*, H-19, 21), 8.17 (1H, *d*, *J* = 16.3 Hz, H-9), 8.22-8.26 (2H, *m*, H-18, 22)

¹³C-NMR (CDCl₃-d₁, 50 MHz) (ppm) :

53.03 (C-10), 66.49 (C-26), 109.64 (C-6), 120.96 (C-9), 121.43 (C-8), 121.92 (C-4), 126.35 (C-7), 126.93 (C-12, 16, 18, 22), 127.61 (C-14), 127.96 (C-13, 15), 128.06 (C-30), 128.39 (C-29, 31), 128.53 (C-28, 32), 128.91 (C-3), 130.01 (C-19, 21), 135.90 (C-27), 136.34 (C-11), 138.09 (C-20), 140.93 (C-5), 142.65 (C-17), 166.12 (C-23)

II. 4-(1-Benzyl-1*H*-indazol-3-yl)-*N*-substitutedbenzamide 類化合物 (**10a – 10n**)之合成

II-1. 4-(1-Benzyl-1*H*-indazol-3-yl)benzamide (**10a**)之合成

通入氨氣(ammonia solution, 32%)(excess)依照化合物 **9a** 之步驟，粗產物以管柱層析分離純化(氯仿:乙酸乙酯=1:2/矽膠)，以乙醇做再結晶，可得化合物 **10a** (0.37 克)；無色針狀結晶；產率 36.7%；熔點 182 – 185 。

化合物 10a

MS (*m/z*) : 327

UV : max (MeOH) nm (log) : 317 (4.2), 211 (4.3)

IR : (KBr) cm⁻¹ : 1636 (C = O), 1558 (C = N)

元素分析：以 C₂₁H₁₇N₃O 計算

計算值：C (77.04%), H (5.23%), N (12.84%)

實驗值：C (77.07%), H (5.24%), N (12.87%)

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 200 MHz) (ppm) :

5.74 (2H, *s*, H-10), 7.26-7.31 (5H, *m*, H-12, 13, 14, 15, 16),

7.41-7.45 (2H, *m*, H-7, 8), 7.79 (1H, *d*, *J* = 8.5 Hz, H-6),

7.99-8.05 (2H, *m*, H-19, 21), 8.07 (1H, *d*, *J* = 7.7 Hz, H-9),

8.09-8.16 (2H, *m*, H-18, 22)

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 50 MHz) (ppm) :

52.23 (C-10), 110.69 (C-6), 121.24 (C-4, 9), 121.98 (C-8),

126.62 (C-18, 22), 126.82 (C-7), 127.61 (C-12, 16), 127.82

(C-14), 128.42 (C-13, 15), 128.84 (C-19, 21), 133.54 (C-3),

136.05 (C-11), 137.51 (C-20), 141.17 (C-5), 142.08 (C-17),

167.78 (C-23)

II-2. 4-(1-Benzyl-1*H*-indazol-3-yl)-*N*-methylbenzamide (**10b**)之合成

通入甲氨氣體(methylamine, 40%)(excess)依照化合 **9a** 之步驟，粗產物以管柱層析分離純化(氯仿:乙酸乙酯=1:2/矽膠)，以乙醇做再結晶，可得化合物 **10b** (0.42 克)；白色針狀結晶；產率 40.0%；熔點 187–189 。

化合物 10b

MS (*m/z*) : 341

UV : max (MeOH) nm (log) : 317 (4.5), 211 (4.7)

IR : (KBr) cm⁻¹ : 3018 (-NH), 1636 (C=O), 1552 (C=N)

元素分析：以 $C_{22}H_{19}N_3O$ 計算

計算值：C (77.40%), H (5.61%), N (12.31%)

實驗值：C (77.44%), H (5.62%), N (12.33%)

1H -NMR (DMSO- d_6 , 200 MHz) (ppm) :

2.80 (3H, *d*, $J = 4.3$ Hz, H-26), 5.74 (2H, *s*, H-10), 7.22-7.29
(6H, *m*, H-8, 12, 13, 14, 15, 16), 7.45 (1H, *t*, $J = 7.0$ Hz, H-7),
7.78 (1H, *d*, $J = 8.3$ Hz, H-6), 7.95-7.98 (2H, *m*, H-19, 21), 8.02
(1H, *d*, $J = 12.7$ Hz, H-9), 8.11-8.15 (2H, *m*, H-18, 22), 8.52
(1H, *q*, $J = 4.4$ Hz, H-25)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 50 MHz) (ppm) :

26.52 (C-26), 52.23 (C-10), 110.69 (C-6), 121.23 (C-4, 9),
121.97 (C-8), 126.68 (C-18, 22), 126.81 (C-7), 127.60 (C-12,
16), 127.82 (C-14), 127.98 (C-13, 15), 128.84 (C-19, 21),
133.76 (C-3), 135.86 (C-11), 137.51 (C-20), 141.17 (C-5),
142.06 (C-17), 166.49 (C-23)

II-3. 4-(1-Benzyl-1*H*-indazol-3-yl)-*N*-ethylbenzamide (**10c**)之合成

通入乙氨氣體(ethylamine, 70%)(excess)依照化合物 **9a** 之步驟，粗產物以管柱層析分離純化(氯仿:乙酸乙酯=1:1/矽膠)，以乙醇做再結晶，可得化合物 **10c** (0.47 克)；白色針狀結晶；產率 43.3%；熔點 161 – 164 。

化合物 10c

MS (m/z) : 355

UV : max (MeOH) nm (log) : 317 (4.1), 211 (4.3)

IR : (KBr) cm^{-1} : 3125 (-NH), 1631 (C=O), 1547 (C=N)

元素分析 : 以 $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}$ 計算

計算值 : C (77.72%), H (5.96%), N (11.82%)

實驗值 : C (77.69%), H (5.98%), N (11.79%)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 200 MHz) (ppm) :

1.14 (3H, *t*, $J = 7.2$ Hz, H-27), 3.23-3.43 (2H, *m*, H-26), 5.74 (2H, *s*, H-10), 7.19-7.32 (6H, *m*, H-8, 12, 13, 14, 15, 16), 7.45 (1H, *t*, $J = 7.3$ Hz, H-7), 7.78 (1H, *d*, $J = 8.5$ Hz, H-6), 7.96-8.00 (2H, *m*, H-19, 21), 8.03 (1H, *d*, $J = 10.1$ Hz, H-9), 8.09-8.15 (2H, *m*, H-18, 22), 8.55 (1H, *t*, $J = 5.4$ Hz, H-25)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 50 MHz) (ppm) :

15.05 (C-27), 34.29 (C-26), 52.22 (C-10), 110.68 (C-6), 121.23 (C-4, 9), 121.95 (C-8), 126.63 (C-18, 22), 126.80 (C-7), 127.58 (C-12, 16), 127.80 (C-14), 128.03 (C-13, 15), 128.83 (C-19, 21), 133.94 (C-3), 135.83 (C-11), 137.51 (C-20), 141.18 (C-5), 142.09 (C-17), 165.76 (C-23)

II-4. 4-(1-Benzyl-1*H*-indazol-3-yl)-*N*-propylbenzamide (**10d**)之合成

取 15 毫升(excess)丙氨(propylamine) 依照化合物 **9a** 之步驟, 粗產物以管柱層析分離純化(氯仿:乙酸乙酯=6:1/矽膠), 以乙醇作再結晶, 可得化合物 **10d** (0.45 克); 白色針狀結晶; 產率 40.1%; 熔點 135 – 137 。

化合物 10d

MS (m/z) : 369

UV : max (MeOH) nm (log) : 317 (4.4), 211 (4.5)

IR : (KBr) cm^{-1} : 3152 (-NH), 1628 (C=O), 1543 (C=N)

元素分析 : 以 $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}$ 計算

計算值 : C (78.02%), H (6.27%), N (11.37%)

實驗值 : C (78.04%), H (6.28%), N (11.35%)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 200 MHz) (ppm) :

0.90 (3H, *t*, $J = 7.3$ Hz, H-28), 1.49-1.60 (2H, *m*, H-27),
3.19-3.29 (2H, *m*, H-26), 5.74 (2H, *s*, H-10), 7.21-7.32 (6H, *m*,
H-8, 12, 13, 14, 15, 16), 7.45 (1H, *t*, $J = 8.0$ Hz, H-7), 7.78 (1H,
d, $J = 8.4$ Hz, H-6), 7.96-8.00 (2H, *m*, H-19, 21), 8.02 (1H, *d*, $J = 9.9$ Hz, H-9), 8.09-8.15 (2H, *m*, H-18, 22), 8.55 (1H, *t*, $J = 5.5$ Hz, H-25)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 50 MHz) (ppm) :

11.72 (C-28), 22.65 (C-27), 41.24 (C-26), 52.22 (C-10), 110.70
(C-6), 121.23 (C-4, 9), 121.97 (C-8), 126.64 (C-18, 22), 126.82
(C-7), 127.59 (C-12, 16), 127.82 (C-14), 128.07 (C-13, 15),
128.84 (C-19, 21), 133.98 (C-3), 135.82 (C-11), 137.52 (C-20),
141.18 (C-5), 142.10 (C-17), 165.97 (C-23)

II-5. 4-(1-Benzyl-1*H*-indazol-3-yl)-*N*-isopropylbenzamide (**10e**)之合成

取 15 毫升(excess)異丙氨(isopropylamine)依照化合物 **9a** 之步驟, 粗產物以管柱層析分離純化(氯仿:乙酸乙酯=8:1/矽膠), 以乙醇做再結晶, 可得化合物 **10e** (0.56 克); 白色棉絮狀結晶;

產率 49.9% ; 熔點 169–171 。

化合物 10e

MS (m/z) : 369

UV : max (MeOH) nm (log) : 317 (4.3), 211 (4.4)

IR : (KBr) cm^{-1} : 3157 (-NH), 1723 (C=O), 1628 (C=N)

元素分析 : 以 $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}$ 計算

計算值 : C (78.02%), H (6.27%), N (11.37%)

實驗值 : C (78.06%), H (6.26%), N (11.35%)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3-d_1 , 200 MHz) (ppm) :

1.30 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-27, 28), 4.29-4.39 (1H, *m*, H-26),
5.67 (2H, *s*, H-10), 6.07 (1H, *d*, $J = 7.5$ Hz, H-25), 7.19-7.35
(6H, *m*, H-8, 12, 13, 14, 15, 16), 7.37 (2H, *d*, $J = 3.7$ Hz, H-6,
7), 7.90 (2H, *d*, $J = 8.3$ Hz, H-19, 21), 8.02 (1H, *d*, $J = 8.5$ Hz,
H-9), 8.08 (2H, *d*, $J = 8.3$ Hz, H-18, 22)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3-d_1 , 50 MHz) (ppm) :

22.67 (C-27, 28), 41.74 (C-26), 52.96 (C-10), 109.60 (C-6),
120.96 (C-9), 121.32 (C-8), 121.87 (C-4), 126.33 (C-7), 126.92
(C-14, 18, 22), 127.12 (C-12, 13, 15, 16), 127.58 (C-3), 128.52
(C-19, 21), 133.72 (C-11), 136.41 (C-20), 140.91 (C-5), 142.78
(C-17), 166.17 (C-23)

II-6. 4-(1-Benzyl-1*H*-indazol-3-yl)-*N*-butylbenzamide (**10f**)-之合成

取 15 毫升(excess)丁氨(butylamine)依照化合物 **9a** 之步驟, 粗產物以管柱層析分離純化(氯仿:乙酸乙酯=6:1/矽膠), 以乙醇做

再結晶，可得化合物 **10f** (0.52 克)；白色針狀結晶；產率 46.5%；
熔點 143 – 145 。

化合物 10f

MS (m/z) : 383

UV : max (MeOH) nm (log) : 317 (4.2), 211 (4.3)

IR : (KBr) cm^{-1} : 3090 (NH), 1632 (C=O), 1539 (C=N)

元素分析：以 $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}$ 計算

計算值：C (78.30%), H (6.57%), N (10.96%)

實驗值：C (78.32%), H (6.58%), N (10.94%)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3-d_1 , 200 MHz) (ppm) :

0.98 (3H, *t*, $J = 7.2$ Hz, H-29), 1.39-1.50 (2H, *m*, H-28),
1.61-1.72 (2H, *m*, H-27), 3.50 (2H, *q*, $J = 7.1$ Hz, H-26), 5.67
(2H, *s*, H-10), 6.25 (1H, *s*, H-25), 7.19-7.39 (8H, *m*, H-6, 7, 8,
12, 13, 14, 15, 16), 7.90 (2H, *d*, $J = 4.8$ Hz, H-19, 21), 8.03 (1H,
d, $J = 8.2$ Hz, H-9), 8.08 (2H, *d*, $J = 4.8$ Hz, H-18, 22)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3-d_1 , 50 MHz) (ppm) :

13.58 (C-29), 19.97 (C-28), 31.56 (C-27), 39.65 (C-26), 52.97
(C-10), 109.59 (C-6), 120.97 (C-9), 121.32 (C-8), 121.87 (C-4),
126.33 (C-7), 126.92 (C-14, 18, 22), 127.14 (C-12, 13, 15, 16),
127.58 (C-3), 128.52 (C-19, 21), 133.61 (C-11), 136.41 (C-20),
140.91 (C-5), 142.77 (C-17), 166.99 (C-23)

II-7. 4-(1-Benzyl-1*H*-indazol-3-yl)-*N*-hydroxybenzamide (**10g**)之合
成

秤取 1 克(0.003 莫耳)之化合物 7，加入 100 毫升之二氯甲烷，緩慢加入 5 毫升(0.042 莫耳)之二氯亞硫醯以進行氯化反應，升溫至迴流，反應 16 小時，降至室溫，反應液減壓濃縮至無溶劑蒸出，於室溫下，加入 30 毫升之甲苯，緩慢加至 20 毫升(0.303 莫耳)之羥氨(hydroxylamine, solution 50% in water)中，反應 1 小時，固體析出，取固體以 50% 乙醇做再結晶，可得化合物 10g (0.38 克)；白色針狀結晶；產率 37.0%；熔點 165 – 167

。

化合物 10g

MS (m/z): 343

UV: max (MeOH) nm (log ϵ): 316 (4.1), 211 (4.2)

IR: (KBr) cm^{-1} : 3044 (-NH), 1613 (C=O), 1512 (C=N)

元素分析：以 $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}$ 計算

計算值：C (73.45%), H (4.99%), N (12.24%)

實驗值：C (73.47%), H (4.97%), N (12.27%)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 200 MHz) (ppm):

5.74 (2H, *s*, H-10), 7.22-7.29 (6H, *m*, H-8, 12, 13, 14, 15, 16),

7.45 (1H, *t*, $J = 7.0$ Hz, H-7), 7.78 (1H, *d*, $J = 8.2$ Hz, H-6),

7.90 (2H, *d*, $J = 8.2$ Hz, H-19, 21), 8.06 (2H, *d*, $J = 8.2$ Hz,

H-18, 22), 8.13 (1H, *d*, $J = 8.2$ Hz, H-9), 9.05 (1H, *s*, H-25),

11.30 (1H, *s*, H-26)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 50 MHz) (ppm):

52.22 (C-10), 110.69 (C-6), 121.22 (C-4, 9), 122.00 (C-8),

126.78 (C-7, 18, 22), 127.61 (C-12, 14, 16), 127.83 (C-13, 15),

128.84 (C-19, 21), 132.05 (C-3), 136.00 (C-11), 137.47 (C-20),
141.17 (C-5), 142.02 (C-17), 164.21 (C-23)

(十四) 4-(1-Benzyl-1*H*-indazol-3-yl)-*N*-(hydroxyethyl)benzamide (**10h**)之
合成

取 10 毫升(0.164 莫耳)乙醇氨(ethanolamine)依照化合物(**10g**)之
步驟，固體析出，取固體以 50%乙醇做再結晶，可得化合物 **10h**
(0.49 克)；白色針狀結晶；產率 44.0%；熔點 164–166 。

化合物 10h

MS (*m/z*) : 371

UV : max (MeOH) nm (log) : 317 (4.1), 211 (4.2)

IR : (KBr) cm^{-1} : 3183 (-NH), 1631 (C=O), 1535 (C=N)

元素分析：以 $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2$ 計算

計算值：C (74.37%), H (5.70%), N (11.31%)

實驗值：C (73.41%), H (5.68%), N (11.29%)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 200 MHz) (ppm) :

3.51-3.60 (2H, *m*, H-26), 4.77 (2H, *t*, $J = 5.5$ Hz, H-27), 5.74
(2H, *s*, H-10), 7.22-7.29 (6H, *m*, H-8, 12, 13, 14, 15, 16), 7.45
(1H, *t*, $J = 6.9$ Hz, H-7), 7.78 (1H, *d*, $J = 8.4$ Hz, H-6),
7.99-8.03 (2H, *m*, H-19, 21), 8.05 (1H, *d*, $J = 7.5$ Hz, H-9),
8.11-8.15 (2H, *m*, H-18, 22), 8.52 (1H, *t*, $J = 5.4$ Hz, H-25)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 50 MHz) (ppm) :

42.46 (C-26), 52.25 (C-10), 60.03 (C-27), 110.68 (C-6), 121.25
(C-4, 9), 121.98 (C-8), 126.64 (C-18, 22), 126.83 (C-7), 127.59

(C-12, 16), 127.83 (C-14), 128.13(C-13, 15), 128.84 (C-19, 21),
133.82 (C-3), 135.92 (C-11), 137.49 (C-20), 141.18 (C-5),
142.09 (C-17), 166.24 (C-23)

(十五) Methyl{[4-(1-benzyl-1*H*-indazol-3-yl)benzoyl]amino}acetate (**10i**)
之合成

- (a) 稱取 1 克(0.003 莫耳)之化合物 7，加入 100 毫升之二氯甲烷，緩慢加入 5 毫升(0.042 莫耳)之二氯亞硫酸以進行氯化反應，升溫至迴流，反應 16 小時，降至室溫，反應液減壓濃縮至無溶劑蒸出，於室溫下，加入 30 毫升之甲苯。
- (b) 稱取 2 克(0.016 莫耳)之甘胺酸鹽酸鹽(L-glycine methyl ester hydrochloride)，於冰浴下，加入 20 毫升之 3.5% 氫氧化鈉水溶液，緩慢加入(a)之溶液，反應 1 小時，有機層以水洗滌至中性，有機層以無水硫酸鎂乾燥，濾液減壓濃縮至無溶劑蒸出，粗產物以管柱層析分離純化(氯仿:乙酸乙酯=9:1/矽膠)，以氯仿做再結晶，可得化合物 **10i** (0.49 克)；白色針狀結晶；產率 40.7%；熔點 127 – 129 。

化合物 10i

MS (*m/z*): 399

UV: max (MeOH) nm (log ϵ): 318 (4.3), 211 (4.4)

IR: (KBr) cm^{-1} : 3129 (-NH), 1756 (C=O), 1640 (C=N)

元素分析：以 $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3$ 計算

計算值：C (72.16%), H (5.30%), N (10.52%)

實驗值：C (72.20%), H (5.28%), N (10.49%)

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 200 MHz) (ppm) :

3.67 (3H, *s*, H-30), 4.05 (2H, *d*, *J* = 5.7 Hz, H-26), 5.75 (2H, *s*, H-10), 7.23-7.29 (6H, *m*, H-8, 12, 13, 14, 15, 16), 7.46 (1H, *t*, *J* = 7.0 Hz, H-7), 7.79 (1H, *d*, *J* = 8.4 Hz, H-6), 8.00-8.05 (2H, *m*, H-19, 21), 8.07 (1H, *d*, *J* = 11.1 Hz, H-9), 8.14-8.17 (2H, *m*, H-18, 22), 9.05 (1H, *s*, H-25)

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 50 MHz) (ppm) :

41.50 (C-26), 51.98 (C-30), 52.26 (C-10), 110.71 (C-6), 121.25 (C-4, 9), 122.01 (C-8), 126.78 (C-18, 22), 126.83 (C-7), 127.60 (C-12, 16), 127.83 (C-14), 128.23 (C-13, 15), 128.84 (C-19, 21), 132.83 (C-3), 136.36 (C-11), 137.49 (C-20), 141.20 (C-5), 141.98 (C-17), 166.49 (C-23), 170.65 (C-27)

(十六) Methyl 2-[[4-(1-benzyl-1*H*-indazol-3-yl)benzoyl]amino} propanoate (**10j**)之合成

秤取 2 克(0.014 莫耳)之丙胺酸鹽酸鹽(L-alanine methyl ester hydrochloride)及 20 毫升之 2.9% 氫氧化鈉水溶液依照化合物 **10i** 之步驟，固體以氯仿做再結晶，可得化合物 **10j** (0.53 克)；白色針狀結晶；產率 42.7%；熔點 196 – 198 。

化合物 10j

MS (*m/z*) : 413

UV : max (MeOH) nm (log) : 318 (4.6), 211 (4.8)

IR : (KBr) cm⁻¹ : 3329 (-NH), 1748 (C=O), 1640 (C=N)

元素分析：以 C₂₅H₂₃N₃O₃ 計算

計算值：C (72.62%), H (5.61%), N (10.16%)

實驗值：C (72.59%), H (5.62%), N (10.13%)

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 200 MHz) (ppm) :

1.42 (3H, *d*, *J* = 7.3 Hz, H-27), 3.65 (3H, *s*, H-31), 4.48-4.55
(1H, *m*, H-26), 5.75 (2H, *s*, H-10), 7.21-7.31 (6H, *m*, H-8, 12, 13,
14, 15, 16), 7.45 (1H, *t*, *J* = 7.1 Hz, H-7), 7.78 (1H, *d*, *J* = 8.5
Hz, H-6), 8.00-8.05 (2H, *m*, H-19, 21), 8.07 (1H, *d*, *J* = 6.2 Hz,
H-9), 8.12-8.16 (2H, *m*, H-18, 22), 8.89 (1H, *d*, *J* = 6.9 Hz,
H-25)

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 50 MHz) (ppm) :

16.99 (C-27), 48.55 (C-26), 52.13 (C-31), 52.26 (C-10), 110.71
(C-6), 121.25 (C-4, 9), 122.03 (C-8), 126.67 (C-18, 22), 126.85
(C-7), 127.59 (C-12, 16), 127.83 (C-14), 128.41 (C-13, 15),
128.85 (C-19, 21), 132.91 (C-3), 136.29 (C-11), 137.50 (C-20),
141.20 (C-5), 142.02 (C-17), 166.14 (C-23), 173.44 (C-28)

(十七) Methyl 2-[[4-(1-benzyl-1*H*-indazol-3-yl)benzoyl]amino}

-3-phenylpropanoate (**10k**)之合成

秤取 2 克(0.009 莫耳)之苯丙胺酸鹽酸鹽(L-phenylalanine methyl ester hydrochloride)及 20 毫升之 1.85% 氫氧化鈉水溶液依照化合物 **10i** 之步驟，粗產物以管柱層析純化(氯仿:乙酸乙酯=9:1/矽膠)，以氯仿/正己烷做再結晶，可得化合物 **10k** (0.59 克)；白色針狀結晶；產率 40.9%；熔點 144 – 146 。

化合物 10j

MS (m/z) : 489

UV : max (MeOH) nm (log ϵ) : 319 (4.5), 210 (4.7)

IR : (KBr) cm^{-1} : 3113 (-NH), 1736 (C=O), 1644 (C=N)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 200 MHz) (ppm) :

3.13-3.18 (2H, *m*, H-27), 4.70 (1H, *q*, $J = 5.9$ Hz, H-26), 5.75 (2H, *s*, H-10), 7.16-7.35 (11H, *m*, H-8, 12, 13, 14, 15, 16, 29, 30, 31, 32, 33), 7.45 (1H, *t*, $J = 7.0$ Hz, H-7), 7.79 (1H, *d*, $J = 8.4$ Hz, H-6), 7.96 (2H, *d*, $J = 8.4$ Hz, H-19, 21), 8.09 (2H, *d*, $J = 8.4$ Hz, H-18, 22), 8.14 (1H, *d*, $J = 8.3$ Hz, H-9), 8.95 (1H, *d*, $J = 7.8$ Hz, H-25)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 50 MHz) (ppm) :

36.47 (C-27), 52.20 (C-10, 37), 54.57 (C-26), 110.72 (C-6), 121.26 (C-4, 9), 122.02 (C-8), 126.70-129.31 (C-7, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 21, 22, 29, 30, 32, 33), 132.87 (C-3), 136.34 (C-11), 137.49 (C-20), 137.96 (C-31), 141.19 (C-5), 142.00 (C-17), 166.31 (C-23), 172.45 (C-34)

(十八) Methyl 3-methyl-2-[[4-(1-benzyl-1*H*-indazol-3-yl)benzoyl]amino] butanoate (**10l**)之合成

秤取 2 克(0.012 莫耳)之纈胺酸鹽酸鹽(L-valine methyl ester hydrochloride)及 20 毫升之 2.4% 氫氧化鈉水溶液依照化合物 **10i** 之步驟，粗產物以管柱層析分離純化(氯仿:乙酸乙酯=9:1/矽膠)，以乙醇做再結晶，可得化合物 **10l** (0.54 克)；白色針狀結晶；產率 40.7%；熔點 165–167 。

化合物 10l

MS (m/z) : 441

UV : max (MeOH) nm (log ϵ) : 317 (4.1), 212 (4.1)

IR : (KBr) cm^{-1} : 2932 (-NH), 1749 (C=O), 1644 (C=N)

元素分析 : 以 $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_3$ 計算

計算值 : C (73.45%), H (6.16%), N (9.52%)

實驗值 : C (73.44%), H (6.14%), N (9.53%)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 200 MHz) (ppm) :

0.93-1.05 (6H, *m*, H-28, 31), 2.19-2.23 (1H, *m*, H-27), 3.66 (3H, *s*, H-33), 4.33 (1H, *t*, $J = 7.6$ Hz, H-26), 5.75 (2H, *s*, H-10), 7.23-7.29 (6H, *m*, H-8, 12, 13, 14, 15, 16), 7.46 (1H, *t*, $J = 7.0$ Hz, H-7), 7.79 (1H, *d*, $J = 8.4$ Hz, H-6), 8.02-8.05 (2H, *m*, H-19, 21), 8.07 (1H, *d*, $J = 4.2$ Hz, H-9), 8.12-8.16 (2H, *m*, H-18, 22), 8.71 (1H, *d*, $J = 7.7$ Hz, H-25)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 50 MHz) (ppm) :

19.40 (C-28, 31), 29.75 (C-27), 51.88 (C-33), 52.26 (C-10), 58.94 (C-26), 110.71 (C-6), 121.28 (C-4, 9), 122.02 (C-8), 126.62 (C-18, 22), 126.84 (C-7), 127.60 (C-12, 16), 127.83 (C-14), 128.62 (C-13, 15), 128.84 (C-19, 21), 133.12 (C-3), 136.26 (C-11), 137.50 (C-20), 141.20 (C-5), 142.06 (C-17), 166.88 (C-23), 172.51 (C-29)

(十九) Methyl 3-hydroxy-2- $\{$ 4-(1-benzyl-1*H*-indazol-3-yl)benzoyl]amino $\}$ propanoate (**10m**)之合成

秤取 2 克(0.013 莫耳)之絲胺酸鹽酸鹽(L-serine methyl ester hydrochloride)及 20 毫升之 2.55% 氫氧化鈉水溶液依照化合物 **10i** 之步驟，粗產物以管柱層析分離純化(氯仿:乙酸乙酯=9:1/矽膠)，以乙醇做再結晶，可得化合物 **10m** (0.47 克)；白色針狀結晶；產率 36.5%；熔點 153–156 。

化合物 10m

MS (m/z) : 429

UV : max (MeOH) nm (log) : 317 (4.2), 211 (4.3)

IR : (KBr) cm^{-1} : 3028 (-NH), 1744 (C=O), 1611 (C=N)

元素分析：以 $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4$ 計算

計算值：C (69.92%), H (5.40%), N (9.78%)

實驗值：C (69.89%), H (5.38%), N (9.77%)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 200 MHz) (ppm) :

3.66 (3H, *s*, H-32), 3.82 (2H, *t*, $J = 5.7$ Hz, H-27), 4.57 (1H, *q*, $J = 7.3$ Hz, H-26), 5.09 (1H, *t*, $J = 6.1$ Hz, H-28), 5.75 (2H, *s*, H-10), 7.24-7.31 (6H, *m*, H-8, 12, 13, 14, 15, 16), 7.46 (1H, *t*, $J = 7.0$ Hz, H-7), 7.79 (1H, *d*, $J = 8.5$ Hz, H-6), 8.02-8.05 (2H, *m*, H-19, 21), 8.08 (1H, *d*, $J = 6.7$ Hz, H-9), 8.13-8.17 (2H, *m*, H-18, 22), 8.66 (1H, *d*, $J = 7.4$ Hz, H-25)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 50 MHz) (ppm) :

51.40 (C-32), 51.53 (C-10), 55.20 (C-26), 60.55 (C-27), 109.99 (C-6), 120.52 (C-4, 9), 121.30 (C-8), 125.96 (C-18, 22), 126.12 (C-7), 126.86 (C-12, 16), 127.10 (C-14), 127.68 (C-13, 15), 128.12 (C-19, 21), 132.20 (C-3), 135.60 (C-11), 136.76 (C-20),

140.47 (C-5), 141.27 (C-17), 165.66 (C-23), 170.58 (C-29)

(二十) Methyl 2-{{[4-(1-benzyl-1*H*-indazol-3-yl)benzoyl]amino}

-3-methylpentanoate (**10n**)之合成

秤取 2 克(0.011 莫耳)之異亮胺酸鹽酸鹽(L-isoleucine methyl ester hydrochloride)及 20 毫升之 2.2% 氫氧化鈉水溶液依照化合物 **10i** 之步驟，粗產物以管柱層析分離純化(氯仿:乙酸乙酯 =19:1/矽膠)，以乙醇做再結晶，可得化合物 **10n** (0.54 克)；白色針狀結晶；產率 39.7%；熔點 142–145 。

化合物 10n

MS (*m/z*): 455

UV: max (MeOH) nm (log ϵ): 317 (4.1), 211 (4.2)

IR: (KBr) cm^{-1} : 3160 (-NH), 1748 (C=O), 1644 (C=N)

元素分析：以 $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_3$ 計算

計算值：C (73.82%), H (6.42%), N (9.22%)

實驗值：C (73.78%), H (6.41%), N (9.24%)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 200 MHz) (ppm):

0.84-0.93 (6H, *m*, H-29, 32), 1.21-1.54 (2H, *m*, H-28), 1.97-2.02 (1H, *m*, H-27), 3.66 (3H, *s*, H-34), 4.38 (1H, *t*, $J = 7.6$ Hz, H-26), 5.75 (2H, *s*, H-10), 7.21-7.29 (6H, *m*, H-8, 12, 13, 14, 15, 16), 7.46 (1H, *t*, $J = 7.0$ Hz, H-7), 7.79 (1H, *d*, $J = 8.4$ Hz, H-6), 8.01-8.05 (2H, *m*, H-19, 21), 8.06 (1H, *d*, $J = 4.7$ Hz, H-9), 8.12-8.16 (2H, *m*, H-18, 22), 8.71 (1H, *d*, $J = 7.7$ Hz, H-25)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 50 MHz) (ppm):

11.09 (C-29), 15.76 (C-32), 25.51 (C-28), 35.84 (C-27), 51.84
(C-34), 52.26 (C-10), 57.63 (C-26), 110.72 (C-6), 121.28 (C-4,
9), 122.03 (C-8), 126.21 (C-18, 22), 126.83 (C-7), 127.60 (C-12,
16), 127.83 (C-14), 128.61 (C-13, 15), 128.84 (C-19, 21), 133.09
(C-3), 136.26 (C-11), 137.50 (C-20), 141.20 (C-5), 142.06
(C-17), 166.78 (C-23), 172.55 (C-30)

第四節 藥理試驗方法

一. 抗血小板凝集活性試驗

(一)血小板凝集引發劑之製備

- (1) Thrombin – 購自 Park Davis Co. USA , 溶解於 50% (v/v) glycerol 中 , 製備成 100 NIH units/ml 之 stock solution。
- (2) Arachidonic acid (AA) – 購自 Sigma Chem. Co. USA , 以去離子水溶解之。
- (3) Collagen (Type I bovine Achilles tendon) – 購自 Sigma Chem. Co. USA , 4 下於 25 毫升醋酸中研磨均勻 , 以去離子水稀釋成 1 mg/ml , 儲存於-70 下。
- (4) Platelet-activation factor (PAF) – 購自 Sigma Chem. Co. USA , 溶於氯仿 , 儲存於-20 , 使用前以 0.9% NaCl 稀釋之。
- (5) Adenosine diphosphate (ADP) – 以去離子水溶解備用。

(二)血小板懸浮液 (Platelet suspension) 之製備

將 EDTA 與兔耳靜脈抽出血混合後 , 使 EDTA 之最終濃度為 6 mM , 在室溫下即以 $90 \times g$ 離心 10 分鐘 , 取出上層富含血小板之血漿 (platelet-rich plasma) , 再將其以 $500 \times g$ 離心 10 分鐘 , 除去血漿後 , 將下層血小板以含有 EDTA (2 mM) 及 Bovine serum albumin (3.5 mg/ml) 的 Tyrode's solution (calcium free) 清洗之 , 在於相同轉速 ($500 \times g$) 下離心 10 分鐘 , 所得之血小板以不含有 EDTA 之 Tyrode's solution 清洗之 , 再於相同之條件下離心後 , 取血小板層 , 將其懸浮於 Tyrode's solution , 其組成如下 (mM) : NaCl

(136.8) KCl (2.8) NaHCO₃ (11.9) MgCl₂ (1.1) NaH₂PO₄ (0.33)、CaCl₂ (1.0) and glucose (11.2) , 並以 Coulter counter (Model ZM) 計數, 調整血小板數約為 4.5×10^8 platelet/ml 左右, 最後加 1 mM 鈣離子(Ca⁺²)放置 30 分鐘後, 進行實驗。

(三)血小板凝集(platelet aggregation)之試驗

利用混濁度法(turbidimetric method)之原理來測定凝集程度³⁹, 並以 Lumi-aggregometer (Model 1020, PayLon, Canada)測定之。將血小板懸浮液 0.4 毫升加至經 silicone 包衣的小玻璃管之中, 並以小磁棒做每分鐘 900 轉(900 rpm)的攪拌, 若未特別說明, 均在加入樣品三分鐘後, 再加入凝集引發劑, 六分鐘後觀察結果。為了排除溶媒(DMSO)影響, 在血小板溶液的濃度為 0.5%, 全部反應過程皆在 37 °C 下進行, 凝集程度的表示方法如下⁴⁰:

$$\text{凝集(\%)} = [(A_1 - A_2) / (A_1 - A_b)] \times 100\%$$

A₁ = 加引發劑前的吸光度

A₂ = 加引發劑後的吸光度

A_b = Tyrode's solution 的吸光度

二. 裸鼠的血管新生實驗

從國家實驗動物中心買進裸鼠, 其每隻重約 20 克, 並依所需之情況不同, 而將裸鼠分成數組, 將其飼養於特殊實驗室(無菌實驗室)數日, 才開始進行以下實驗。裸鼠的血管新生實驗, 乃是將 matrigel 在 4 °C 液態狀時, 混合 vehicle 或是 thrombin, 若需觀察藥物的作用, 則將所需之藥物劑量混合入 matrigel 中, 以皮下注射方式打入裸鼠

左下腹部(0.5 ml)，經過六天後將裸鼠犧牲，小心的將 matrigel 部位剪下，拍照存證，若是 vehicle 組，則 matrigel 並無任何血管新生發生，若是 VEGF 組，則 matrigel 處有明顯之血管新生發生(Figure 5)。此外，並將此 matrigel 部位減成相等之兩半，一半做病理組織切片(H&E 染色)，一半做 hemoglobin 含量測定，來將血管新生作用量化。



Basal

Control
(Thrombin 2 U/ml)

YD-3 (30 μ M)
+ thrombin (2 U/ml)

Figure 5

參考文獻

- (1) H. P. Baumgartner, R. Muggli, T. B. Tschopp and V. T. Turitto, Platelet adhesion, release and aggregation in flowing blood : effects of surface properties and platelet function. *Thromb. Haemost.*, **35**, 124-138 (1976).
- (2) M. B. Stemerman, H. R. Baumgartner and T. H. Spaet, The subendothelial microfibril and platelet adhesion . *Lab. Invest.*, **24**, 176-186 (1972).
- (3) C. Malmsten, M. Hamberg, J. Svensson and B. Samuelsson, Physiological role of an endoperoxide in human platelets : hemostatic defect due to cyclooxygenase deficiency. *Pro. Natl. Acad. Sci.*, **72**, 1446-1448 (1975).
- (4) B. S. Coller, Antiplatelet agents in the prevention and therapy of thrombosis. *Annu. Rev. Med.*, **43**, 1171-1180 (1992).
- (5) A. Ray, L. G. Hegde, J. B. Gupta , Related Articles Thrombin receptor: a novel target for antiplatelet drug development. *Thromb. Res.*, **87**, 37-50 (1997).
- (6) B. W. Festoff, I. V. Smirnova, J. Ma, B. A. Citron, Thrombin, its receptor and protease nexin I, its potent serpin, in the nervous system. *Semin. Thromb. Hemost.*, **22**, 267-271 (1996).
- (7) S. R. Macfarlane, M. J. Seatter, T. Kanke, G. D. Hunter, R. Plevin, Related Articles Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev.*, **53**, 245-282 (2001).
- (8) O. Dery, C. U. Corvera, M. Steinhoff, N. W. Bunnett , Related Articles

- Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am. J. Physiol.*, **274**, c1429-452 (1998).
- (9) L. D. Cupit, V. A. Schmidt, W. F. Bahou, Related Articles Proteolytically activated receptor-3. A member of an emerging gene family of protease receptors expressed on vascular endothelial cells and platelets. *Trends Cardiovasc Med.*, **9**, 42-48. (1999).
- (10) W. F. Xu, H. Andersen, T. E. Whitmore, S. R. Presnell, D.P. Yee, A. Ching, T. Gilbert, E. W. Davie, D. C. Foster, Related Articles, Nucleotide, OMIM, Free in PMC , Protein Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. sci.* , **95**, 6642-6646 (1998).
- (11) M. L. Kahn, Y. W. Zheng, W. Huang, V. Bigornia, D. Zeng, S. Moff , R. V. Farese Jr, Tam C, Coughlin SR. Related Articles, Nucleotide, OMIM, Protein A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature.*, **394**, 690-694 (1998).
- (12) M. L. Kahn, M. Nakanishi-Matsui, M. J. Shapiro, H. Ishihara, S. R. Coughlin, Related Articles, Protein Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J. Clin. Invest.* , **103**, 879-887 (1999).
- (13) S. M. Seiler, Thrombin receptor antagonists. *Semin Thromb Hemost.* , **22**, 223-232 (1996).
- (14) H. C. Zhang, C. K. Derian, P. Andrade-Gordon, W. J. Hoekstra, D. F. McComsey, K. B. White, B. L. Poulter, M. F. Addo, W. M. Cheung, B. P. Damiano, D. Oksenberg, E. E. Reynolds, A. Pandey, R. M.

- Scarborough, B. E. Maryanoff. Discovery and optimization of a novel series of thrombin receptor (par-1) antagonist : potent, selective peptide mimetics based on indole and indazole templates. *J. Med. Chem.*, **44**, 1021-1024 (2001).
- (15) L. C. Behr, Indazoles and condensed types. In A. Weissberger ed. : The chemistry of heterocyclic compounds ; Pyrazoles, pyrazolines, pyrazolidines, indazoles and condensed rings. Part 3, 289-382 (1967).
- (16) W. A. F. Gladstone, R. O. C. Norman. *J. Chem. Soc.*, 3048-3050 (1965).
- (17) S. Yashina, A. Tanaka, S. C. Kuo. *Yakugaku Zasshi.*, **97**, 955-961 (1977).
- (18) E. Hannig, C. Kollmorgen, I. Geipel, The preparation of some derivatives of 5-methylindazole-3-carboxylic acid. *Pharmazie.*, **28**, 720-723 (1973).
- (19) E. Hannig, C. Kollmorgen, M. Dressel, Various derivatives of 1-benzyl-6-aminoindazole. *Pharmazie.*, **29**, 685-687 (1974).
- (20) S. Ina, S. Inoue, I. Noguchi, N-heterocyclic compounds. I. Facile synthesis of 5,6-dialkoxy-2-aryl-2H-indazoles (author's transl). *Yakugaku Zasshi.*, **95**, 1245-1249 (1975).
- (21) G. Corsi, G. Palazzo, 1-Halobenzyl-1H-indazole-3-carboxylic acid. A new class of antispermatogenic agents. *J. Med. Chem.*, **19**, 778-783 (1976).
- (22) G. A. Bistocchi, G. De Meo, M. Pedini, A. Ricci, H. Brouilhet, S. Boucherie, M. Rabaud, P. Jacquignon, N1-substituted 1H-indazole-3-ethyl carboxylates and 1H-indazole-3-hydroxamic acids. *Farmaco* -

- Edizione Scientifica.*, **36**, 315-333 (1981).
- (23) G. A. Conway, L. J. Loeffler, I. H. Hall, Synthesis and antitumor evaluation of selected 5,6-disubstituted 1(2)H-indazole-4,7-diones. *J. Med. Chem.*, **26**, 876-884 (1983).
- (24) L. Cecchi, F. Melani, G. Filacchioni, M. Tredici, Synthesis and biological activity of some 3-(pyrazol-1'-yl)indazole derivatives. *Farmaco - Edizione Scientifica.*, **39**, 945-952 (1984).
- (25) L. Mosti, G. Menozzi, P. Schenone, L. Molinaro, F. Conte, C. Montanario, E. Marmoe, Acetic acids bearing the 1-phenyl-1H-indazole nucleus with analgesic and anti-inflammatory activity. *Farmaco - Edizione Scientifica.*, **43**, 763-774 (1988).
- (26) L. Mosti, G. Menozzi, P. Schenone, D. Cervo, G. Esposito, E. Marmoe, 4-Substituted 1-phenyl-1H-indazoles with analgesic, anti-inflammatory, antipyretic and local anesthetic activities. *Farmaco.*, **45**, 415-429 (1990).
- (27) D. W. Robertson, W. Bloomquist, M. L. Cohen, L. R. Reid, K. Schenck, D. T. Wong, Synthesis and biochemical evaluation of tritium-labeled 1-methyl-N-(8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-yl)-1H-indazole-3-carboxamide, a useful radioligand for 5-HT₃ receptors. *J. Med. Chem.*, **33**, 3176-3181 (1990).
- (28) U. Wrzeciono, E. Linkowska, K. Majewska, A. Gzella, K. Stochla, Synthesis and anti-inflammatory activity of some indazole derivatives. 36. Azoles. *Pharmazie.*, **48**, 582-584 (1993).
- (29) R. B. Pemi, M. P. Wentland, J. I. Huang, R. G. Powles, S. Aldous, K. M.

- Klingbeil, A. D. Peverly, R. G. Robinson, T. H. Corbett, J. L. Jones, K. C. Mattes, J. B. Rake, S. A. Coughlin, Synthesis and antitumor activity of 4-aminomethylthioxanthenone and 5-aminomethylbenzothiopyrano-indazole derivatives. *J. Med. Chem.*, **41**, 3645-3654 (1998).
- (30) S. Andronati, V. Sava, S. Makan, G. Kolodeev, Synthesis of 3-aryl-1-[(4-phenyl-1-piperazinyl)butyl]indazole derivatives and their affinity to 5-HT_{1A} serotonin and dopamine D₁ receptors. *Pharmazie.*, **54**, 99-101 (1999).
- (31) J. J. Song, N. K. Yee, A novel synthesis of 2-aryl-2H-indazoles via a palladium-catalyzed intramolecular amination reaction. *Organic Letters.*, **2**, 519-521 (2000).
- (32) E. M. Isin, M. de Jonge, N. Jr. Castagnoli, Studies on synthetic approaches to 1H- and 2H-indazolyl derivatives. *J. Org. Chem.*, **66**, 4220-4226 (2001).
- (33) F. Y. Lee, J. C. Lien, L. J. Huang, T. M. Huang, S. C. Tsai, C. M. Teng, C. C. Wu, F. C. Cheng, S. C. Kuo, Synthesis of 1-benzyl-3-(5'-hydroxymethyl-2-furyl)indazole analogues as novel antiplatelet agents. *J. Med. Chem.*, **44**, 3746-3749 (2001).
- (34) C. C. Wu, S. W. Huang, T. L. Hwang, S. C. Kuo, F. Y. Lee, C. M. Teng, YD-3, a novel inhibitor of protease-induced platelet activation. *Br. J. Pharmacol.*, **130**, 1289-1296 (2000).
- (35) S. Yoshina, A. Tanaka, S. C. Kuo, Related Articles [Studies on heterocyclic compounds. XXXIII. Synthesis of furo[3,2-c]-pyrazole derivatives. (1). Synthetic investigation of furo[3,2-c]pyrazoles (author's

- transl)]. *Yakugaku Zasshi*, **97**, 955-961 (1977).
- (36) 蔡勝忠 , YC-1 之苯并咪唑類緣化合物的合成及其抗血小板凝集活性 , 中國醫藥學院博士論文(2000).
- (37) J. Elguero, Pyrazoles and their benzo derivatives. In K. T. Potts ed. : Comprehensive heterocyclic chemistry : The structure , reactions, synthesis and uses of heterocyclic compounds. **5** : 4A, 4.04, 167-304 (1984)
- (38) R. M. Silverstein , G. C. Bassler and T. C. Morrill ed. Spectrometric identification of organic compounds, John Wiley & Sons, Inc. press 5th ed. (1991).
- (39) J. R. O'Brien, Platelet aggregation II. Some results from a new method of study. *J. Clin. Path.*, **15**, 452-455 (1962).
- (40) C. M. Teng, W. Y. Chen, W. C. Ko and C. Ouyang, Antiplatelet effect of butylidenephthalide. *Biochem. Biophys. Acta.*, **924**, 375-382 (1987).