

# 第一章 緒論

因為本研究以 類(indazole)化合物 ethyl 4-(1-benzyl-1*H*-indazol-3-yl)benzoate (YD-3)為先導化合物，從事其相關化合物之合成，而其涉及抗血小板、抗癌及凝血 受體拮抗劑 (thrombin-receptor antagonist)等藥理活性，所以首先將血小板之生理病理角色、癌症、thrombin 之生理功能、indazole 類化合物之合成方法以及先導化合物 YD-3 之研究概況，加以簡要敘述做為研究背景資料。

## 第一節 血小板(platelet)之生理及病理角色<sup>1</sup>

血小板在血液凝集的過程中扮演相當重要的角色。在正常的生理狀態下，血管內完整未受損的內皮細胞(endothelial cell；EC)會分泌 prostaglandin I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>)、endothelium-derived relaxing factor (EDRF) 以及 nitric oxide (NO)，並能阻擋血小板與內皮下(subendothelial)之基質結合，例如膠原(collagen)；其中 PGI<sub>2</sub> 及 EDRF 能活化血小板上的 adenylyate cyclase (AC)，NO 能活化血小板上的 soluble guanylate cyclase (sGC)，分別使血小板內的 adenosine triphosphate (ATP)代謝成 cyclic adenosine monophosphate (c-AMP)、guanosine triphosphate (GTP) 代謝成 cyclic guanosine monophosphate (c-GMP)，造成 c-AMP 及 c-GMP 含量增加而抑制血小板的活化，讓血小板以不活動的狀態在血管裡流動<sup>2</sup>。

當血管受傷破裂時，血管會先收縮，達到初步止血。而血管內皮下的 thrombogenic constituents collagen 會暴露於血液中，此刻周圍的血小板會和 collagen 結合，使血小板附著於受傷處並造成各類的血小板顆粒(、)釋出其內含物，例如 adenosine 5'-diphosphate (ADP)、纖維蛋白原(fibrinogen)以及 Ca<sup>2+</sup>等，其中部分的血小板活化物又會和本身或其他血小板上特異的受體結合，促使本身或額外活化其他的血小板產生一連串的釋放反應(Fig. 1)<sup>3</sup>。

在此先檢視一個血小板之生化反應途徑，如 Fig. 1 所示。首先 ADP、thrombin、collagen 等物質與血小板細胞膜上特定接受器結合後，再經由細胞膜傳訊作用(transmembrane signaling)活化 phospholipase C (PLC)，促使 PIP<sub>2</sub> (phosphatidyl inositol diphosphate)水解形成 IP<sub>3</sub> (inositol-1,4,5-triphosphate)及 DAG (diacylglycerol)。IP<sub>3</sub>將 Ca<sup>2+</sup>吸引進入胞液中使 Ca<sup>2+</sup>含量增加，進而引起血小板的外形改變、phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)的活化，釋放出 arachidonic acid (AA)，AA 受 cyclooxygenase (COX)的作用轉變成 prostaglandin endoperoxides (PGG<sub>2</sub> PGH<sub>2</sub>)；其中 PGH<sub>2</sub>在血小板中經由 thromboxane synthetase (TS)的作用轉變成 thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)促進血小板凝集及釋放；而 PGG<sub>2</sub>在內皮細胞經 prostacyclin I<sub>2</sub> synthetase 的作用轉變成 PGI<sub>2</sub>抑制血小板凝集。DAG (diacylglycerol)會活化 PKC (protein kinase C)，將血小板蛋白質加以磷酸化使釋出其內含物，而釋出物之一 ADP 除了可額外活化其他的血小板，還能修飾血小板表面以便讓 fibrinogen 與血小板結合，隨後 fibrinogen 將附著凝集在受損處之血小板彼此串聯結合，進而形成疏鬆的血小板凝集塊(platelet plug)。

當血管壁異常部位暴露出來的基底膜(basement membrane)接觸血液時，會活化凝血階段內因性途徑的凝血因子；而在傷口組織會釋放組織因子(tissue factors)進而活化外因性途徑的凝血因子。此兩途徑聚合至一，使凝血原(prothrombin)轉變成 thrombin。血小板凝集成塊後，凝血(thrombin)會使 fibrinogen 轉變成纖維蛋白(fibrin)將血小板凝集塊包住形成一穩定的纖維蛋白凝塊(fibrin clot)，再聚集成堅固的止血栓(thrombus)。

凝血系統通常是處於動態平衡的狀態中，血塊不斷的生成和溶解。胞漿素(plasmin)在此就扮演將血塊溶解的角色，以避免血凝塊阻塞血管。但若血栓無法即時消除，則容易造成血管栓塞，引起急性血管併發症。像懷孕、口服避孕藥物、惡性腫瘤、外科手術、高血脂、糖尿病以及動、靜脈硬化等，都會導致止血平衡失調，而促使血小板不正常活化或凝血纖維沉積，造成血栓栓塞，進而可能併發急性心肌梗塞、腦中風、腦栓塞、腎血管疾病等而導致死亡，對人類的生命有莫大之威脅。因此抑制血小板不適當的活化，乃是預防或治療血管栓塞疾病的方法之一。



## 第二節 癌症<sup>4</sup>

不分國界也無視種族的差異，癌症長久以來就是人類的共同敵人，嚴重危害人類的健康，可說是頭號殺手。它可怕的地方就在於當正常細胞在致癌因子的影響下產生突變，導致過度活絡細胞生長週期 (cell cycle)，也因細胞凋亡 (apoptosis) 自然機轉之反常，使異常細胞不斷的增生、擴散，進而干擾體內各項機能的運作，導致正常組織器官出現疼痛、潰爛、感染。

大致來說癌細胞的形成與演進要經過四個階段：

1. 開始期 (initiation phase)：  
正常細胞的 DNA 受到致癌物、致癌因子的刺激而產生質變。
2. 促進期 (promotion phase)：  
在致癌物長期持續的刺激下促進癌細胞的大量增生，開始形成較小且良性的腫瘤。
3. 進展期 (progression phase)：  
癌細胞會快速的分裂，不斷的增生，逐漸形成較大的腫瘤，進而在腫瘤組織內產生新生血管。
4. 轉移期 (metastasis phase)：  
癌細胞經由淋巴系統或血液循環侵犯擴散到鄰近的組織，甚至遠處的轉移。

癌細胞的生長與正常細胞一樣是分幾個期別來達成，這些不同期別週而復始成為一個生長的循環<sup>5</sup>：

1. 靜止期 ( $G_0$ , Gap 0)：  
細胞內部自我成長，製造形成各種特有的功能；在這時期內，一般是對化學療法不產生反應，即藥物對其無效。
2. 中間期 ( $G_1$ , Gap 1)：  
細胞內的蛋白質及核糖核酸 (ribonucleic acid ; RNA) 組成，在此末期還有大量製造 RNA 的？產生。
3. 合成期 (S, DNA synthesis)：  
細胞內的去氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid ; DNA) 產生加倍作用。

#### 4.靜止二期( $G_2$ , Gap 2) :

DNA 停止生長，但蛋白質、RNA 及一些細胞基本分裂結構仍會生成。

#### 5.分裂期(M, Mitosis) :

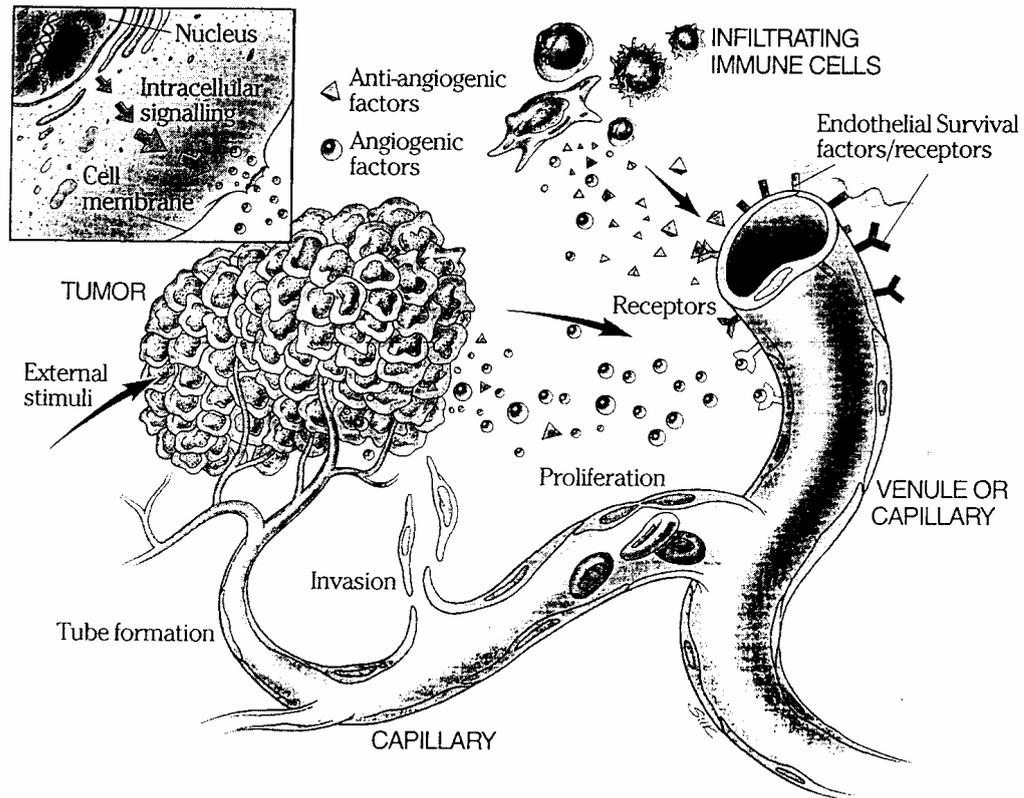
細胞內蛋白質及 RNA 急促停止生長，而基因物質分裂到子細胞中完成分裂行為。

一般的癌症治療方法有好幾種，其中化學療法(chemotherapy)最為普遍，就是使用一些化學藥物針對細胞的生長期而發生抑制作用，使癌細胞無法進行分裂增殖而致死亡。細胞毒(cytotoxicity)殺法是為化學療法的主軸，但通常在殺死癌細胞時也殺死正常正在生長的細胞。儘管現代分子生物與生化科技進展快速，但癌症的研究與藥物幾乎只有微小的進展，一般的化療藥物是破壞癌細胞的 DNA，但是對於癌細胞的血管並沒有作用。

目前，最熱門的研究是將癌細胞周圍的血管以藥物加以阻斷。當腫瘤細胞所需的營養與氧氣已不能從自生的血管達到滿足、或為了擴大其生長時，它們將會新生出血管(angiogenesis)來供給營養與氧氣，進而成長並侵犯鄰近組織，經血液循環轉移至身體其他部位，這是所謂癌細胞的轉移(metastasis)。在那裡，再一次的癌細胞生長及另外的血管新生。可怕的癌細胞就是以此種十分快速的速度在身體裡生長與蔓延，因此一旦破壞了癌細胞的新生血管，將能使其終致餓死而達抗癌作用，這是癌症治療的另一方針。

新生血管是如何開始的，如 Fig. 2 所示，腫瘤細胞會製造及釋放 angiogenic growth factors (一些蛋白質或小分子，其中 vascular endothelial growth factor (VEGF)和 basic fibroblast growth factor (bFGF)在腫瘤細胞裡是最先被合成出並釋放的)到鄰近組織，並和附近內皮細胞(endothelial cells ; EC)上的受體結合，活化 EC，接著一連串的訊息傳遞，一種具分解作用(degradation)的 會被製造並釋放至周圍，去分解細胞外的基質(matrix metalloproteinases ; MMPs)，好讓活化的 EC 能轉移至附近的組織並朝著腫瘤細胞開始分裂(divide)，進行增殖(proliferation)。之後，新生成的 EC 形成一初步的 blood vessel hollow tubes，而各個獨立的 tubes 互相連接成可讓血液流通的 blood vessel

loops , 最後平滑肌細胞(smooth muscle cell)提供其結構穩定的支持作用 , 血液即開始流通 , 一個成熟的 network of blood vessels 生成<sup>5,6</sup>。



**Fig. 2 The angiogenic process.<sup>6</sup>**

### 第三節 凝血? (thrombin)之主要生理功能<sup>7,8</sup>

如 Fig. 3 所示，thrombin 之主要生理功能如下：

#### (一) 調節血小板活化、凝血及血栓溶解的功能：

Thrombin 除了會誘導血小板的活化與凝集，還可與其他的分裂素(mitogen)及 inflammatory mediators 一起刺激細胞的附著能力，使血管壁受損處產生凝血現象。另一方面 thrombin 也會促進內皮細胞分泌 PGI<sub>2</sub>、NO 等物質，幫助血栓溶解。

#### (二) 誘導細胞增生作用：

Thrombin 會誘導 fibroblasts leukocytes 及平滑肌細胞之增殖 (proliferation)與轉移(migration)，它本身也是一種 mitogen，會刺激血小板及內皮細胞釋放 PDGF (platelet derived growth factor)、TGF-β (transforming growth factor-β)以及 thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)。在傷口組織，這些物質的釋放，產生凝血及新生血管來促進傷口癒合。但在腫瘤組織或動脈硬化的情況下，細胞增生與血管新生可能會造成很大的傷害。

#### (三) 引發白血球的趨化及發炎反應：

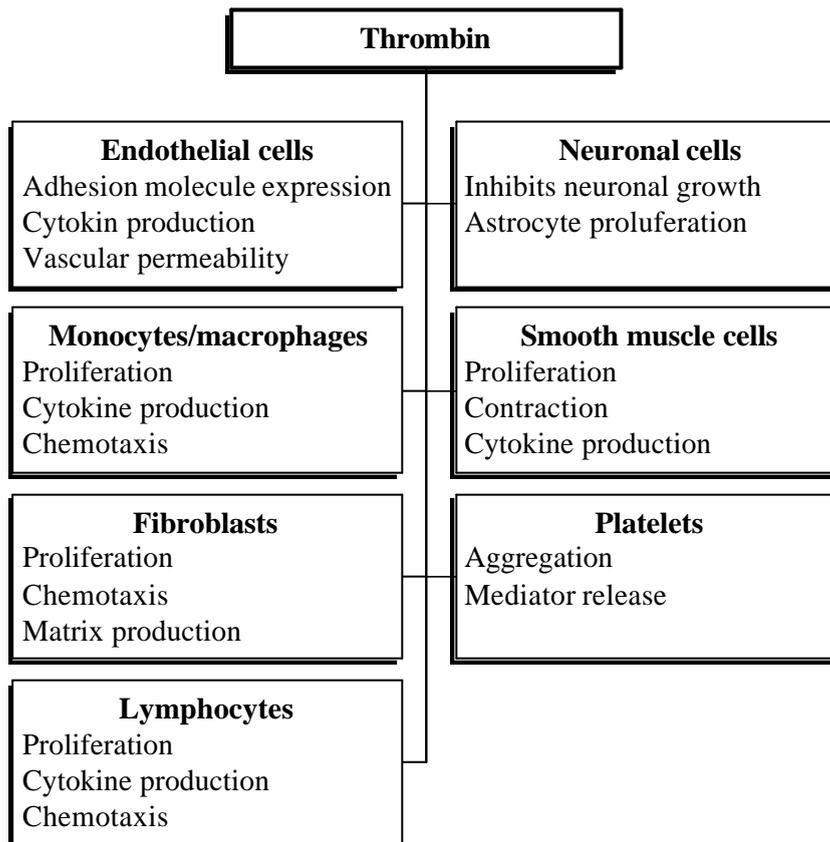
Thrombin 會刺激內皮細胞合成並釋放各種趨化因子，造成中性白血球(neutrophils)及巨噬細胞(macrophages)被吸附到受損的內皮上。另外 thrombin 也會增加內皮細胞的通透性，使白血球穿透內皮組織而滲出，造成發炎反應。

#### (四) 其他作用：

Thrombin 與血管增生有密切的關係，能促進癌細胞的附著分裂及生長，因此它在癌症病變過程中扮演相當重要的角色。

Thrombin 的受體，目前已被發現的有四種亞型，是屬於 protease activated receptors (PARs) superfamily<sup>9</sup>，其中 PAR-1<sup>10</sup> 受體經 thrombin 或 trypsin 的結合而活化，可以引起血小板凝集、內皮細胞增生、血管壁通透性增加及促進部分癌細胞的擴散。PAR-2<sup>10</sup> 受體經 trypsin 的結合活化，可參與發炎反應及促進內皮細胞增生。PAR-3<sup>11</sup> 受體經由 thrombin 及 trypsin 的結合而活化，但其活化後的生理反應並不清楚。

PAR-4<sup>12-14</sup> 受體是最近才被發現的，結構與前面三個有部分相似，是經由 thrombin 結合而活化，但它所調控的生理反應並不清楚，尚須深入探討。

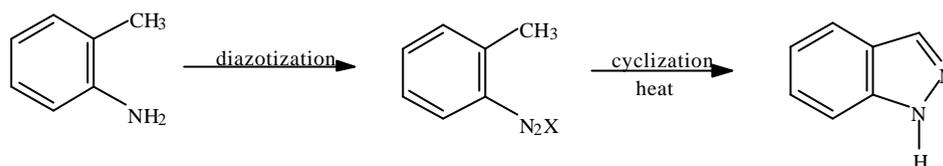


**Fig. 3 Cellular effects of thrombin.<sup>7</sup>**

## 第四節 類(indazole)化合物之合成方法

本研究之標的化合物為 類之衍生物，而此類化合物較常見之合成方法可分為四種，其餘文獻<sup>15-29</sup>上的合成方法基本上都是由這四種反應方法衍生。

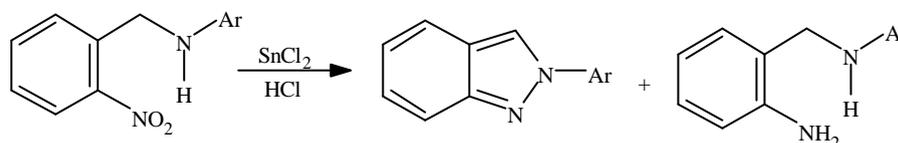
### I、方法一<sup>30</sup>：



**Scheme 1**

如 Scheme 1 所示，將具有鄰位碳苯胺之化合物進行重氮化反應(diazotization)形成偶氮鍵，再經高溫環化即可得 indazole 類化合物之雜環基本架構。

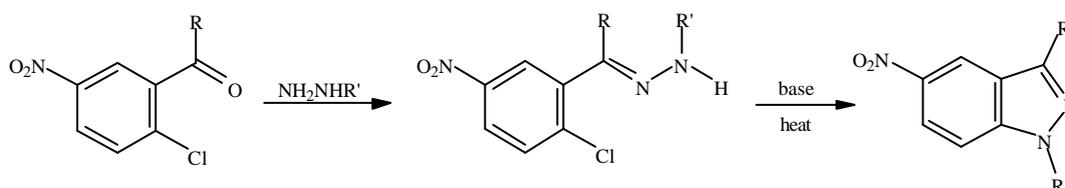
### II、方法二<sup>30</sup>：



**Scheme 2**

如 Scheme 2 所示，將具有鄰位硝基的苯甲基胺以氯化亞錫( $\text{SnCl}_2$ )將硝基還原，然後與苯甲基胺上的氮形成氮-氮鍵，進而環化形成 indazole 之雜環架構。不過此法之氮-氮鍵不易形成，會生成鄰位胺基苯甲基胺之副產物。

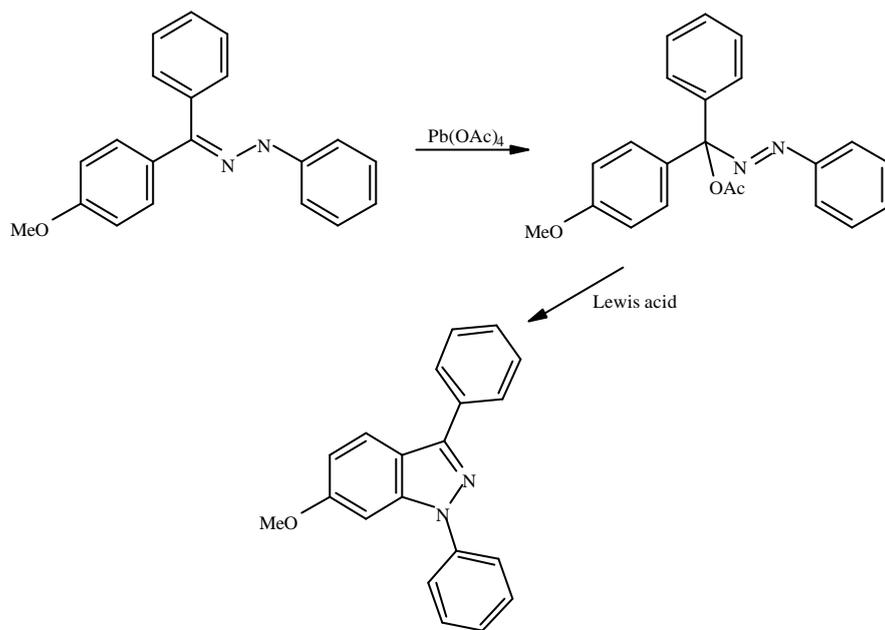
### III、方法三<sup>30</sup>：



**Scheme 3**

如 Scheme 3 所示，將具有鄰位鹵素之苯烷基酮類類與聯胺 (hydrazine) 反應形成 hydrazone 之中間體，繼而在鹼性環境下，高溫脫除 HX，環化形成 indazole 之雜環架構。

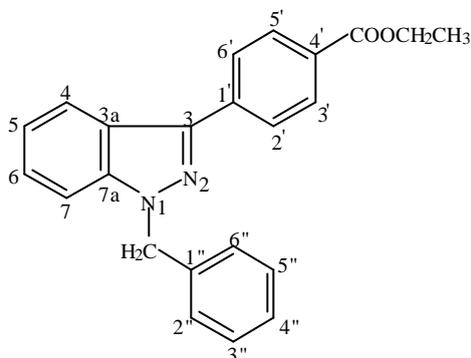
#### IV、方法四<sup>31,32</sup>：



**Scheme 4**

如 Scheme 4 所示，將 hydrazone 化合物以四醋酸鉛[Pb(OAc)<sub>4</sub>] 加以氧化以形成 acetate 的氧化加成物，繼而以 Lewis acid 脫除醋酸進行環化反應形成 indazole 之雜環架構。

## 第五節 YD-3 之研究概況



Ethyl 4-(1-benzyl-1*H*-indazol-3-yl)benzoate (**YD-3**)

**YD-3**<sup>33</sup>，是本研究室合成的 類化合物，其結構為第一位氮接有苄基，第三位苯環接有-COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>之官能基。而其合成方法是採用第四節之方法四，最初將苄基及苯甲酸乙酯基團形成，再經環化反應生成 indazole 雜環之架構。在藥理試驗方面，如 Table 1 所示，**YD-3** 對 thrombin 所引發的血小板凝集具有選擇性的抑制作用<sup>34</sup>。一般來說，抑制 thrombin 作用的途徑可分為兩種<sup>35</sup>。一種為凝血 抑制劑 (thrombin inhibitors)，例如 heparin，會加速 antithrombin - thrombin complex 的形成，以減少 thrombin 的量，干擾凝血機轉，此種作用活性雖強但容易引發出血方面的副作用。另一種為凝血 受體拮抗劑 (thrombin receptor antagonists) (屬於 PARs antagonists)，thrombin 活化細胞主要是經由 G-protein coupled thrombin receptors 而發生作用的，若經受體拮抗劑加以阻斷，只會抑制 thrombin 引起的細胞反應而不會影響凝血系統。

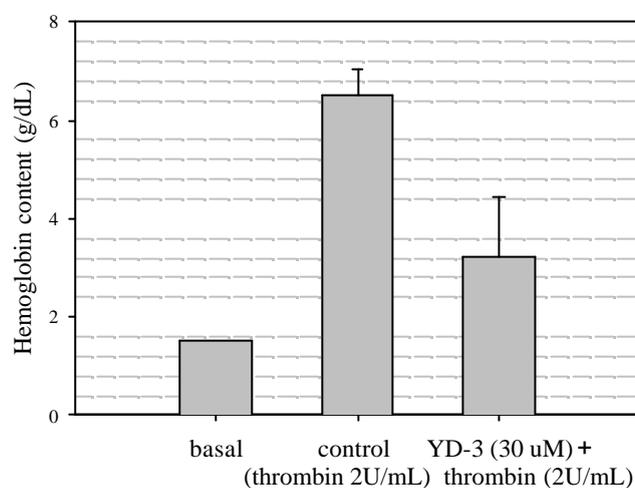
**Table 1.** The inhibitory effect of **YD-3** on platelet aggregation induced by thrombin, AA, collagen and PAF (*in vitro*).

Compound	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>*</sup>			
	AA	Collagen	Thrombin	PAF
<b>YD-3</b>	184.83	212.36	29.7	164.04

Platelets were incubated with tested sample or 0.5 % DMSO at 37 °C for 1 min, then thrombin (0.1 U/ml), AA (100 μM), collagen (10 μg/ml) or PAF (2 ng/ml) was added to trigger the aggregation. <sup>\*</sup> : The accuracy of IC<sub>50</sub> values are within ± 10 % .

當探討進一步 YD-3 之作用機轉，發現 YD-3 是屬於 thrombin receptor antagonists，但其對 PAR-1、PAR-2 及 PAR-3 致效劑所引發的血小板凝集沒有抑制作用，只對 PAR-4 致效劑引發的血小板凝集有強效( $IC_{50}$ : 0.1  $\mu$ M)的抑制作用。因此確認 YD-3 是新穎的 PAR-4 受體拮抗劑<sup>36</sup>。

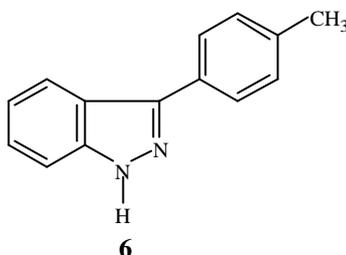
除了做抗血小板凝集試驗，我們還做了裸鼠的新生血管試驗，結果發現 YD-3 (1.5 mg/kg i.p.)對 thrombin 所引發的新生血管具有顯著的抑制作用，如 Fig. 4 所示，頗具有成為抑制癌症新生血管新藥之潛力。



**Fig. 4** Inhibition of thrombin-induced angiogenesis.

## 第六節 研究動機與目的

從第五節的敘述得知 **YD-3** 是抗血小板凝集作用機轉獨特的化合物，不僅可以提供做為研究 PAR-4 生理功能的探針，更是頗具開發潛能的新型 PAR-4 受體拮抗器及抗新生血管(antiangiogenesis)化合物。而到目前為止，文獻<sup>33</sup>上所記載一些與 **YD-3** 相似的 indazole 類衍生物，皆為在第一位氮上接無取代的苄基，無法建構良好的化學結構與活性的關係，於是著者設計 3-(4-methylphenyl)-1*H*-indazole (**6**)為主要中間體，企圖衍生數類 **YD-3** 之相關化合物。在本研究之先探性試驗中，著者合成了化合物 **6**，並試探性的測試其生理活性。

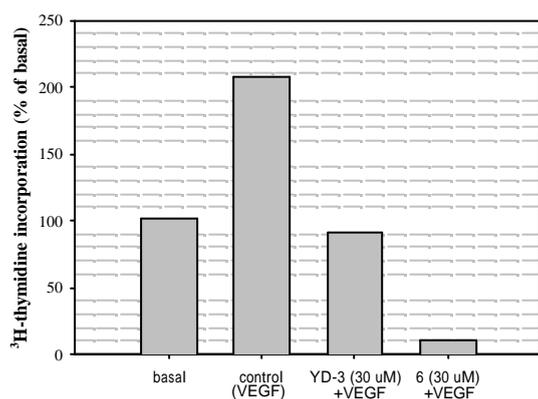


從其活性試驗結果得知，在抗血小板凝集活性方面，如 Table 2 所示，化合物 **6** 雖然不像 **YD-3** 對 thrombin 引發的血小板凝集有選擇性的抑制作用，但是對 AA 所引發的血小板凝集有選擇性的抑制作用。在抗血管增生活性方面，化合物 **6** 在濃度為 30  $\mu\text{M}$  時，抑制 VEGF 所誘發的 DNA 合成活性為 **YD-3** 的 9 倍(Fig. 5)，當濃度為 10  $\mu\text{M}$  時，化合物 **6** 與 **YD-3** 的抑制效果相當(Fig. 6)，而當濃度降為 1  $\mu\text{M}$  時，**YD-3** 之抑制效果比化合物 **6** 稍強(Fig. 7)。

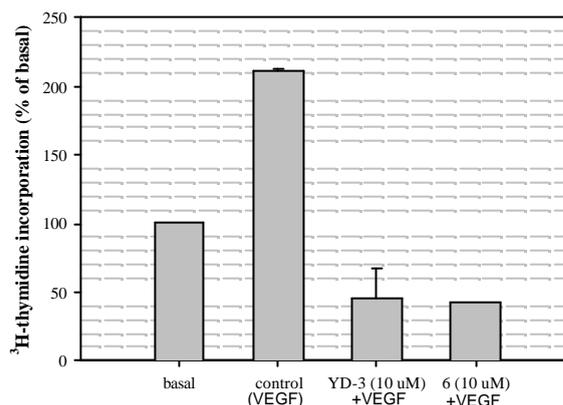
**Table 2.** The inhibitory effect of compounds (**YD-3**, **6**) on platelet aggregation induced by thrombin, AA, collagen and PAF (*in vitro*).

compound.	Conc. ( $\mu\text{M}$ )	Aggregation %			
		AA	Collagen	Thrombin	PAF
Control		86.6 $\pm$ 0.8	88.5 $\pm$ 1.1	91.5 $\pm$ 1.3	89.8 $\pm$ 1.2
<b>YD-3</b>					
IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )		184.83	212.36	<b>29.70</b>	164.04
<b>6</b>	300	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>***</sup>	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>***</sup>	85.4 $\pm$ 2.6	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>***</sup>
	100	3.0 $\pm$ 2.6 <sup>***</sup>	19.4 $\pm$ 8.1 <sup>***</sup>	-	87.4 $\pm$ 1.7
	30	5.4 $\pm$ 4.6 <sup>***</sup>	74.8 $\pm$ 5.9 <sup>*</sup>	-	-
	10	78.8 $\pm$ 2.0 <sup>**</sup>	83.9 $\pm$ 1.7 <sup>*</sup>	-	-
IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )		<b>19.67</b>	111.01	>300	197.24

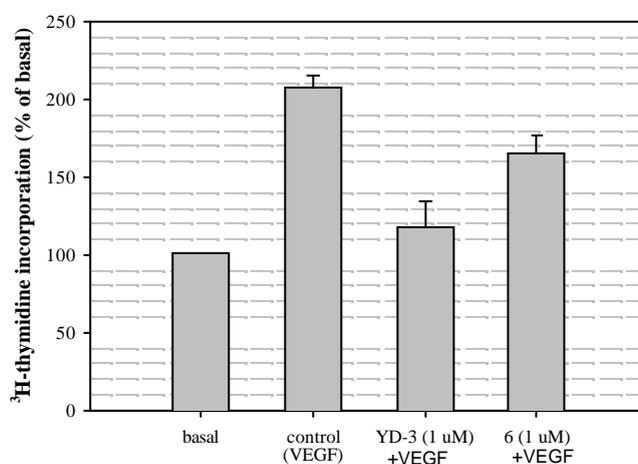
Platelets were incubated with tested sample or 0.5 % DMSO at 37 °C for 1 min, then thrombin (0.1 U/ml), AA (100  $\mu\text{M}$ ), collagen (10  $\mu\text{g/ml}$ ) or PAF (2 ng/ml) was added to trigger the aggregation. Values are presented as mean  $\pm$  S.E., \* : P<0.05, \*\* : P<0.01, \*\*\* : P<0.001.



**Fig. 5** Inhibition of VEGF-induced DNA synthesis.

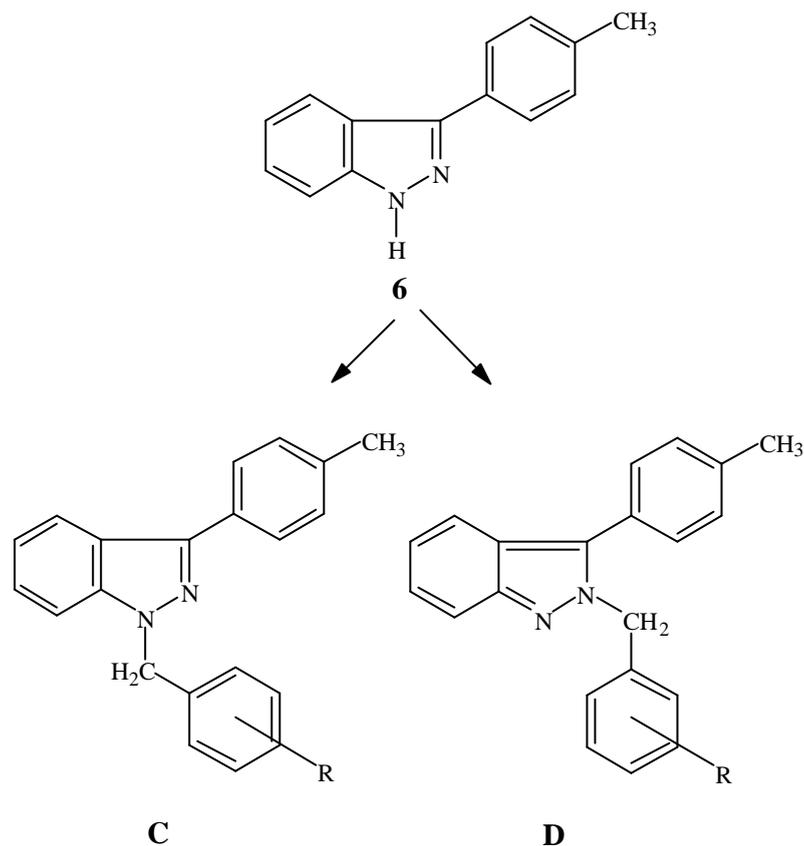


**Fig. 6** Inhibition of VEGF-induced DNA synthesis.



**Fig. 7** Inhibition of VEGF-induced DNA synthesis.

由以上初步藥理結果可知，化合物 **6** 為具開發潛能的基本架構，於是本研究即正式規劃以 3-(4-methylphenyl)-1*H*-indazole (**6**) 為 key intermediate，並與單取代的苄基進行苄基化反應(benylation)，進而能同時得到在第一位氮上(C)及第二位氮上(D)接有取代苄基之化合物，並探討其結構與抗血小板凝集、抑制血管增生等活性之關係，期望能獲得比 **YD-3** 藥理活性更佳的物質。

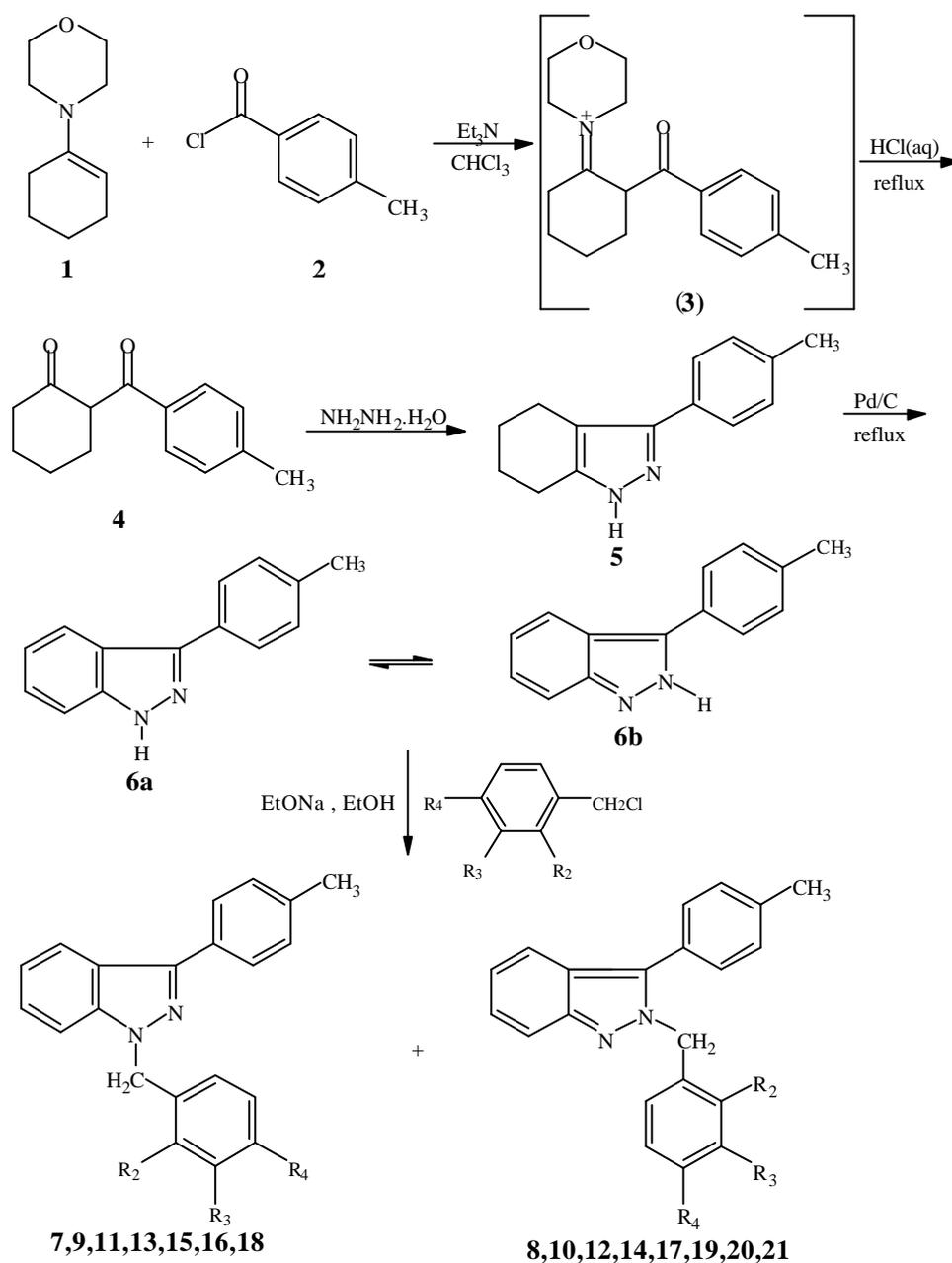


## 第二章 結果與討論

### 第一節 化學合成

#### I、標的化合物(7 - 21)的合成概述

本研究之目標化合物 7 - 21 之合成途徑如 Scheme 5 所示<sup>30,37,38</sup>。

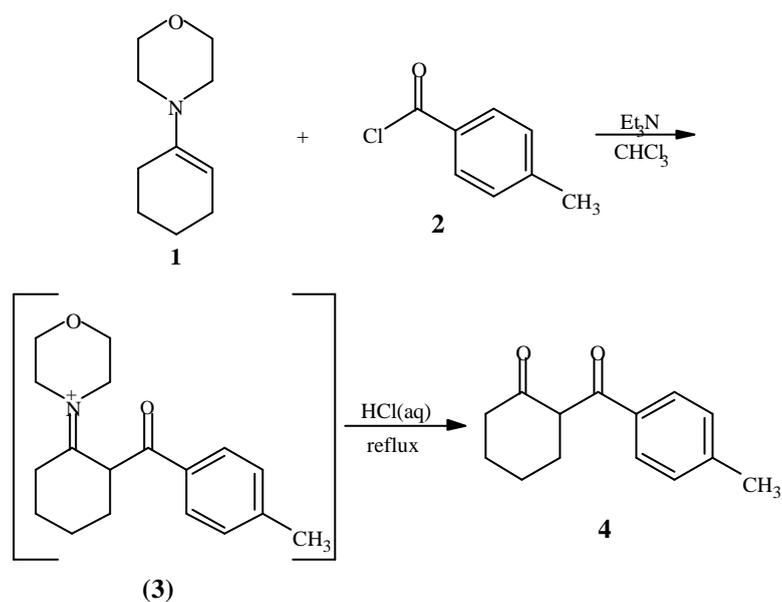


Scheme 5

化合物	R <sub>4</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>2</sub>
7	Cl	H	H
9	H	Cl	H
11	H	H	Cl
13	CH <sub>3</sub>	H	H
15	H	CH <sub>3</sub>	H
16	H	H	CH <sub>3</sub>
18	OCH <sub>3</sub>	H	H

化合物	R <sub>4</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>2</sub>
8	Cl	H	H
10	H	Cl	H
12	H	H	Cl
14	CH <sub>3</sub>	H	H
17	H	H	CH <sub>3</sub>
19	OCH <sub>3</sub>	H	H
20	H	OCH <sub>3</sub>	H
21	H	H	H

### I-1. 2-Oxocyclohexyl 4-methylphenyl ketone (4)之合成<sup>37</sup>



取1-(*N*-morpholino)cyclohexene (1)與4-methylbenzoyl chloride (2)在triethylamine的存在下進行反應，可形成4-[2-(4-methylbenzoyl)cyclohexylidene]morpholin-4-ium (3) [亞胺鹽(iminium salt)]，直接再以鹽酸水溶液加熱水解，即可得化合物2-oxocyclohexyl 4-methylphenyl ketone (4) (β-二酮類化合物)。

化合物 4 為白色結晶，熔點 106.2-107.4 。

### 質譜(EIMS) (圖 4-1) :

由其分子離子峰( $m/z$  216)及元素分析結果得知此化合物分子式為  $C_{14}H_{16}O_2$  , 與預期相符。

### IR 圖譜 :

如圖 4-2 所示 , 出現一些與預期結構相符的吸收峰。在  $1669\text{ cm}^{-1}$  以及  $1705\text{ cm}^{-1}$  有 C=O 之吸收帶。

UV 圖譜 : 在  $233.0\text{ nm}$  及  $258.8\text{ nm}$  處有最大吸收。

### $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) (圖 4-3) :

其積分值顯示此化合物有 16 個質子訊號。初步判斷  $\delta$  2.33 歸屬於 4'- $\text{CH}_3$  (3H, *s*)之訊號。其次, 位於  $\delta$  7-8 之間芳香環的氫, 因受 carbonyl group (C=O)的影響, H-2', 6' 的化學位移往較低磁場移動, 出現於  $\delta$  7.72 (2H, *d*,  $J = 8.3\text{ Hz}$ ), H-3', 5' 則在較高磁場, 出現於  $\delta$  7.17 (2H, *d*,  $J = 8.3\text{ Hz}$ )。另外, 環己酮上的 H-1 及 H-3 因受 carbonyl group (C=O)的影響, 化學位移往較低磁場移動, 分別出現於  $\delta$  4.24-4.31 (1H, *m*)與  $\delta$  2.40-2.51 (2H, *m*)。再依誘導效應及氫-氫相關譜( $\text{CDCl}_3$ ) (圖 4-4a), 可將  $\delta$  1.82-2.06 (4H, *m*)歸屬於 H-4, 5 之訊號,  $\delta$  2.18-2.40 (2H, *m*)歸屬於 H-6 之訊號。

### $^{13}\text{C-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) (圖 4-5) :

顯示有 12 個碳原子訊號, 由分子式得知有 14 個碳, 所以推測有 2 組碳訊號重疊。初步判斷在最低磁場的  $\delta$  208.64 訊號來自  $\text{C}^2=\text{O}$ , 而  $\delta$  197.02 訊號來自另一個 C=O。

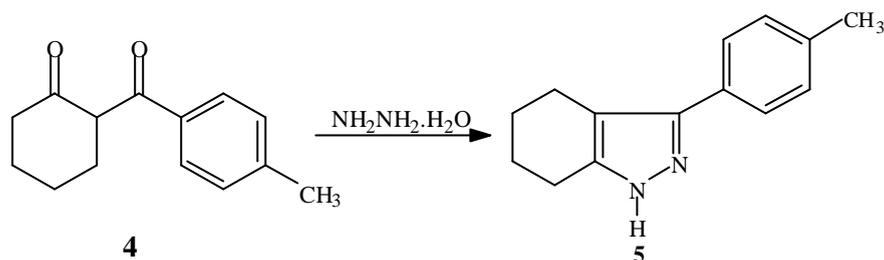
### HMQC ( $\text{CDCl}_3$ ) (圖 4-6a, 4-6b) :

依據碳與氫之相關性, 可初步將  $\delta$  21.61 歸屬於 4'- $\text{CH}_3$  之訊號,  $\delta$  22.98、 $\delta$  27.25、 $\delta$  30.03、 $\delta$  42.18、 $\delta$  58.75 分別歸屬於 C-5、C-4、C-6、C-3、C-1 之訊號,  $\delta$  128.64 及  $\delta$  129.32 分別歸屬於 C-2', 6' 及 C-3', 5' 之訊號。

剩餘的兩個四級碳, 依共振誘導效應, 可將  $\delta$  134.06 歸屬於 C-4' 之訊號,  $\delta$  144.13 歸屬於 C-1' 之訊號。

綜合上述圖譜數據分析, 初步判定化合物 4 為 2-oxocyclohexyl 4-methylphenyl ketone 之結構。

## I-2. 3-(4-Methylphenyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-indazole (5)之合成<sup>38</sup>



將化合物 4 與 hydrazine monohydrate 在室溫下進行反應可得化合物 3-(4-methylphenyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-indazole (5)。

化合物 5 為白色結晶，熔點 57.4-59.9 。

質譜(EIMS) (圖 5-1)：

由其分子離子峰( $m/z$  212)及元素分析結果得知此化合物分子式為  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2$ ，與預期相符。

IR 圖譜：

如圖 5-2 所示，比化合物 4 在  $3203\text{ cm}^{-1}$  多了 N-H 之吸收帶，在  $1320\text{ cm}^{-1}$ 、 $1442\text{ cm}^{-1}$  及  $1513\text{ cm}^{-1}$  多了 C-C 及 C-N 環的吸收帶，而化合物 4 的 C=O 吸收帶消失，且出現一些與預期結構相符的吸收峰。

UV：在 233.4 nm 及 280.6 nm 處有最大吸收。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) (圖 5-3)：

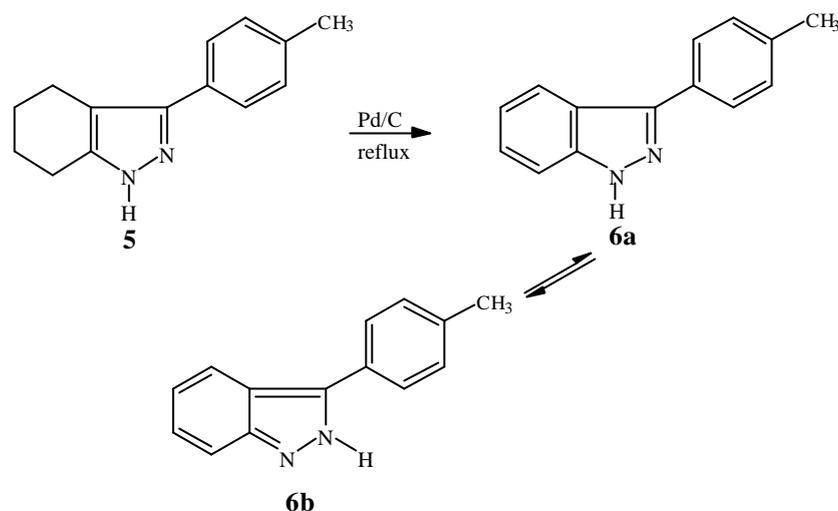
其積分值顯示此化合物有 16 個質子訊號。初步判斷  $\delta$  2.25 歸屬於 4'- $\text{CH}_3$  (3H, *s*) 之訊號， $\delta$  7.04 (2H, *d*,  $J = 8.4\text{ Hz}$ ) 為 H-3', 5'-之訊號， $\delta$  7.41 (2H, *d*,  $J = 8.1\text{ Hz}$ ) 為 H-2', 6'-之訊號， $\delta$  9-10 (1H, *br*) 為 N<sup>1</sup>-H 之訊號。其餘的訊號尚未做進一步確認。

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) (圖 5-4) 及  $^{13}\text{C-}^1\text{H cosy}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) (圖 5-5a, 5-5b)：

顯示有 12 個碳原子訊號，由分子式得知有 14 個碳，所以推測有 2 組碳訊號重疊。初步判斷  $\delta$  21.21 為 4'- $\text{CH}_3$  之訊號， $\delta$  126 為 C-2', 6'-之訊號， $\delta$  129.24 為 C-3', 5'-之訊號。其餘的訊號尚未做進一步確認。

綜合上述圖譜數據分析，初步判定化合物 5 為 3-(4-methylphenyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-indazole 之結構。

### I-3. 3-(4-Methylphenyl)-1*H*-indazole (6)之合成<sup>30,38</sup>



取化合物 5 經由 Pd/C 催化，高溫脫氫反應，即可得化合物 3-(4-methylphenyl)-1*H*-indazole (6)。

化合物 6 為白色結晶，熔點 63.1-65.2 。

質譜(EIMS) (圖 6-1)：

由其分子離子峰( $m/z$  208)及元素分析結果得知此化合物分子式為  $C_{14}H_{12}N_2$ ，與預期相符。

IR 圖譜：如圖 6-2 所示，出現一些與預期結構相符的吸收峰。

UV 圖譜：在 233.4 nm、246.0 nm、311.6 nm 有最大吸收。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) (圖 6-3)：

其積分值顯示此化合物有 11 個質子訊號，由分子式得知有 12 個氫，在圖譜上沒有明顯出現的 1 個質子訊號可能是  $N^1\text{-H}$ 。而由其化學位移、偶合情形及氫-氫相關譜( $\text{CDCl}_3$ ) (圖 6-4)，將各個質子訊號歸屬如下：在最高磁場的 d 2.47 (3H, *s*) 歸屬於 4'- $\text{CH}_3$  之訊號。其次，因受 4'- $\text{CH}_3$  的影響，H-3', 5' 的化學位移往較高磁場移動，出現於 d 7.34-7.38 (3H, *m*)，而 H-2', 6' 則往低磁場移動，出現於 d 7.93 (2H, *d*,  $J = 8.0$  Hz)。

### $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) (圖 6-5) :

顯示有 11 個碳原子訊號，由分子式得知有 14 個碳，所以推測有 3 組碳訊號重疊。初步判斷  $\delta$  21.33 為 4'- $\text{CH}_3$  之訊號。

### HMQC ( $\text{CDCl}_3$ ) (圖 6-6) :

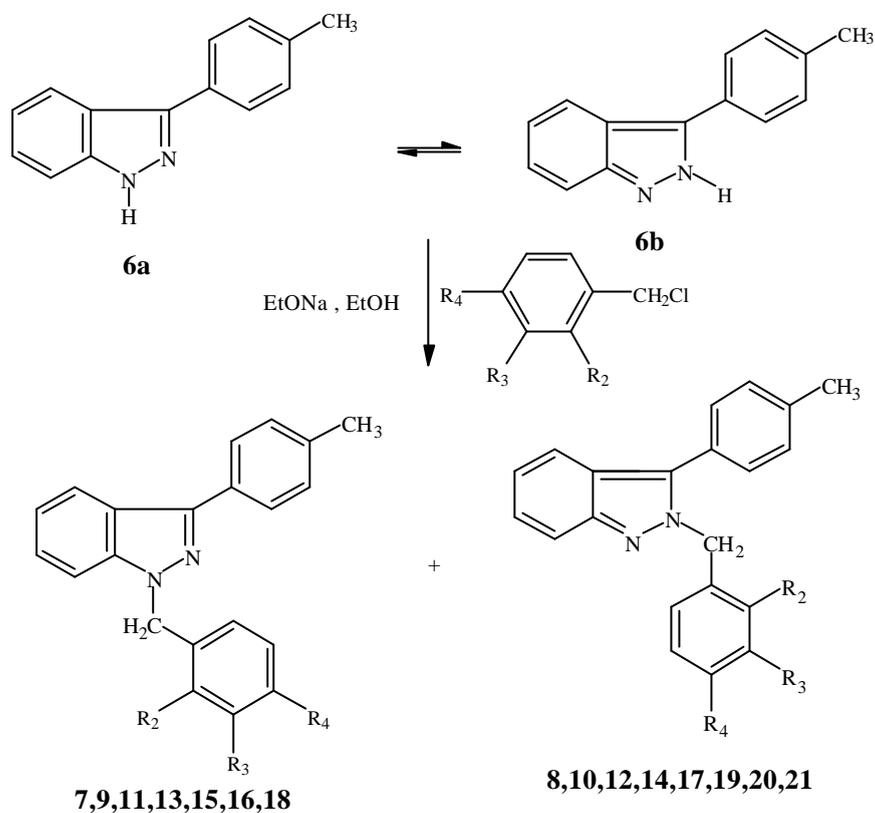
依據碳與氫之相關性，可將  $\delta$ 127.60 歸屬於 C-2', 6' 之訊號， $\delta$ 129.62 歸屬於 C-3', 5' 之訊號。

其餘的碳與氫之訊號需參照 HMBC ( $\text{CDCl}_3$ ) (圖 6-7) 來做進一步的確認。由 4'- $\text{CH}_3$  之遠程偶合關係，可將  $\delta$  138.02 歸屬於 C-4' 之訊號。其次，由 H-2', 6' 之遠程偶合關係，將  $\delta$  145.68 歸屬於 C-3 之訊號。剩餘的三個四級碳，其中 C-3a 及 C-7a 參照文獻<sup>39</sup>與考慮兩者受 N 影響的程度，將兩者分別訂為  $\delta$  120.92 及  $\delta$  141.66，進而將  $\delta$ 130.65 歸屬於 C-1' 之訊號。因為  $\delta$  8.03 (1H, *d*,  $J = 8.1$  Hz) 及  $\delta$  7.34-7.38 (3H, *m*) 與 C-7a 有  $^3J_{\text{CH}}$  correlation，再加上受 N 的影響，所以將其分別歸屬於較低磁場的 H-4 與較高磁場的 H-6 之訊號，進而將  $\delta$  7.19-7.29 (2H, *m*) 歸屬於 H-5, H-7 之訊號。再依據 HMQC 圖譜(圖 6-6)可以將四個三級碳依序歸屬如下： $\delta$  110.26、 $\delta$  121.17、 $\delta$  126.70 分別為 C-7、C-4, 5、C-6 之訊號。

綜合上述圖譜數據分析，初步判定化合物 6 為 3-(4-methyl phenyl)-1*H*-indazole 之結構。

**I-4. 1-(Substituted benzyl)-3-(4-methylphenyl)-1*H*-indazole (7、9、11、13、15、16、18)及 2-(substituted benzyl)-3-(4-methylphenyl)-2*H*-indazole (8、10、12、14、17、19 - 21)之合成**

**I-4-1.合成方法：**



化合物	R <sub>4</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>2</sub>
7	Cl	H	H
9	H	Cl	H
11	H	H	Cl
13	CH <sub>3</sub>	H	H
15	H	CH <sub>3</sub>	H
16	H	H	CH <sub>3</sub>
18	OCH <sub>3</sub>	H	H

化合物	R <sub>4</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>2</sub>
8	Cl	H	H
10	H	Cl	H
12	H	H	Cl
14	CH <sub>3</sub>	H	H
17	H	H	CH <sub>3</sub>
19	OCH <sub>3</sub>	H	H
20	H	OCH <sub>3</sub>	H
21	H	H	H

取化合物 6 和各種取代的 benzyl chloride，在無水乙醇中，乙醇鈉的存在下，進行 benzylation。再經管柱層析純化(氯仿/矽膠)後可得到第一位氮上及第二位氮上接上含不同取代基之 benzyl group 的化合物，而第一位氮上 benzylated 產物的產率皆比第二位氮上 benzylated 產物的產率多。此類化合物我們以 1-(4-methoxybenzyl)-3-(4-methyl

phenyl)-1*H*-indazole (**18**)及 1-(4-methoxybenzyl)-3-(4-methylphenyl)-2*H*-indazole (**19**)為例進行分析。

#### I-4-2.產物 18、19 之結構分析：

##### 質譜(EIMS) (圖 18-1) (圖 19-1)：

化合物 **18**、**19** EIMS 的斷裂型態皆相似，如 Fig. 8 所示，因為 N 上孤電子共振關係，加上陰電性較次甲基為大，使得 N 呈弱酸性較易得電子，因此 4-methoxybenzyl group 更易失去電子而形成帶正電的  $\text{H}_2\text{C}^+-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OCH}_3$ ，所以從圖譜 18-1、19-1 可見到由 4-methoxybenzyl group 形成的基峰， $m/z$  121；而在高質量區可見到其互補離子  $m/z$  207。其它化合物都有相似的情形。由兩者分子離子峰( $m/z$  328)及元素分析結果得知此兩化合物分子式皆為  $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}$  與預期相符，因此可判斷這兩種產物是 *N*-benzylated 之異構物。

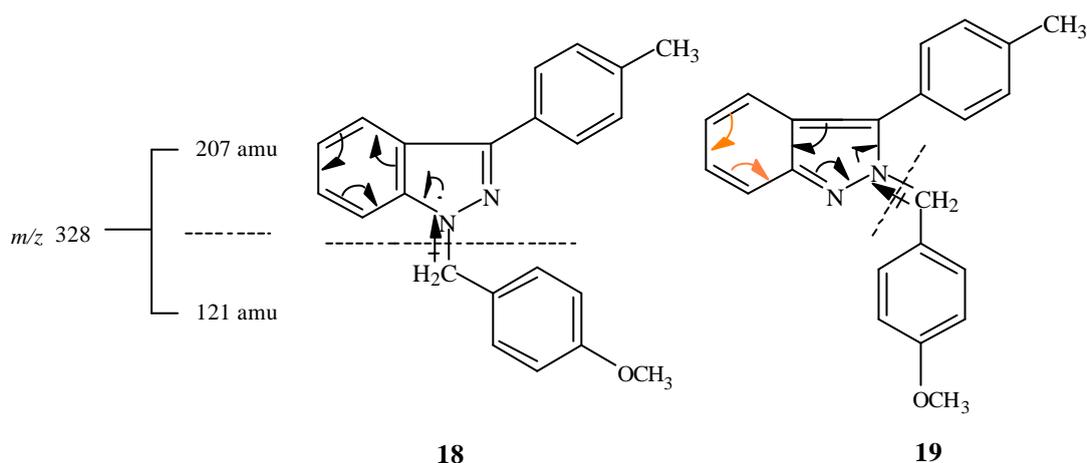


Fig. 8

化合物 18：白色結晶，Rf 值(氯仿)為 0.68，熔點 66.3-69.1 。

##### IR 圖譜：

如圖 18-2 所示，出現一些與預期結構相符的吸收峰。在  $1611\text{ cm}^{-1}$ 、 $1512\text{ cm}^{-1}$  以及  $1491\text{ cm}^{-1}$  有 C-C 及 C-N 環之吸收帶，在  $1252\text{ cm}^{-1}$  有不對稱 C-O-C 之吸收帶，在  $1027\text{ cm}^{-1}$  有對稱 C-O-C 之吸收帶。

UV 圖譜：在 232.8 nm、243.4 nm、313.8 nm 處有最大吸收。

### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) (圖 18-3) :

其積分值顯示此化合物有 20 個質子訊號。而由其化學位移、偶合情形及氫-氫相關譜(DMSO-*d*<sub>6</sub>) (圖 18-4), 將各個質子訊號歸屬如下: 在最高磁場的  $\delta$  2.31 (3H, *s*) 歸屬於 4'-CH<sub>3</sub> 之訊號,  $\delta$  3.63 (3H, *s*) 為 4''-OCH<sub>3</sub> 之訊號。因受 N 的影響 N-CH<sub>2</sub>- 的化學位移往較低磁場移動, 出現於  $\delta$  5.59 (2H, *s*)。其次, 因受 4''-OCH<sub>3</sub> 的影響, H-3'', 5'' 的化學位移往較高磁場移動, 出現於  $\delta$  6.81 (2H, *d*,  $J = 8.6$  Hz), 再依據氫-氫相關譜(圖 18-4)進一步將  $\delta$  7.24 (2H, *d*,  $J = 8.6$  Hz) 歸屬於 H-2'', 6'' 之訊號。因受 4'-CH<sub>3</sub> 的影響, 可將  $\delta$  7.28 (2H, *d*,  $J = 8.0$  Hz) 歸屬於 H-3', 5' 之訊號; 再依據氫-氫相關譜(圖 18-4)進一步將  $\delta$  7.87 (2H, *d*,  $J = 8.0$  Hz) 歸屬於 H-2', 6'。其餘之 H-4, 5, 6, 7 在此並不能確認位置, 只能獲得兩項訊息: H-4, 7 之訊號會受旁邊一個氫而成兩裂 (doublet); H-5, 6 之訊號會受旁邊兩個氫而成三裂 (triplet)。且從氫-氫相關譜中可看出  $\delta$  7.18 (1H, *dd*,  $J = 7.5, 7.5$  Hz) 與  $\delta$  8.00 (1H, *d*,  $J = 8.2$  Hz) 有偶合關係是相鄰的質子訊號,  $\delta$  7.38 (1H, *dd*,  $J = 7.6, 7.6$  Hz) 與  $\delta$  7.68 (1H, *d*,  $J = 8.6$  Hz) 有偶合關係是相鄰的質子訊號。

### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) (圖 18-5) :

顯示有 17 個碳原子訊號, 由分子式得知有 22 個碳, 所以推測有 5 組碳訊號重疊。初步判斷  $\delta$  21.12 歸屬於 4'-CH<sub>3</sub> 之訊號。

### HMQC (DMSO-*d*<sub>6</sub>) (圖 18-6) :

依據碳與氫之相關性, 將  $\delta$  51.76 歸屬於 N-CH<sub>2</sub>- 之訊號,  $\delta$  55.26 歸屬於 4''-OCH<sub>3</sub> 之訊號。

其餘的碳與氫之訊號需參照 HMBC (DMSO-*d*<sub>6</sub>) (圖 18-7) 來做進一步的確認。由 4'-CH<sub>3</sub> 遠程偶合關係, 可將  $\delta$  129.80 歸屬於 C-3', C-5' 之訊號,  $\delta$  137.51 歸屬於 C-4' 之訊號, 同時將  $\delta$  7.28 (2H, *d*,  $J = 8.0$  Hz) 確定為 H-3', 5' 之訊號,  $\delta$  7.87 (2H, *d*,  $J = 8.0$  Hz) 確定為 H-2', 6' 之訊號, 再依 H-2', 6'、H-3', 5' 之  $^1J_{\text{CH}} - ^3J_{\text{CH}}$  correlation 關係將  $\delta$  127.08 歸屬於 C-2', 6' 之訊號,  $\delta$  130.82 歸屬於 C-1' 之訊號,  $\delta$  143.02 歸屬於 C-3 之訊號。

由 4''-OCH<sub>3</sub> 遠程偶合關係, 可將  $\delta$  159.02 歸屬於 C-4'' 之訊號,

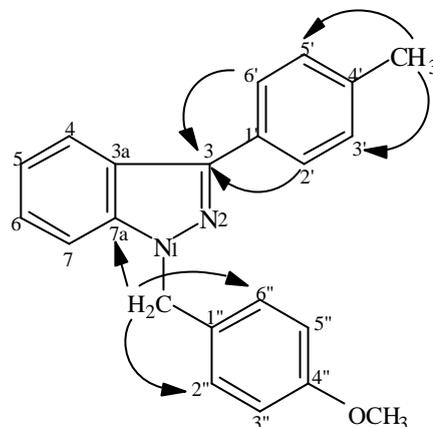
同時將  $\delta$  6.81 (2H, *d*,  $J = 8.6$  Hz) 確定為 H-3", 5" 之訊號,  $\delta$  7.24 (2H, *d*,  $J = 8.6$  Hz) 確定為 H-2", 6" 之訊號, 再依 H-2", 6"、H-3", 5" 之  $^1J_{\text{CH}} - ^3J_{\text{CH}}$  correlation 關係, 將  $\delta$  114.20 歸屬於 C-3", 5" 之訊號,  $\delta$  129.16 歸屬於 C-2", 6" 之訊號,  $\delta$  129.60 歸屬於 C-1" 之訊號。

由  $N\text{-CH}_2$ -遠程偶合關係來看, Fig. 9。不論此化合物是  $N^1$ -benzylated 或  $N^2$ -benzylated 之產物,  $N\text{-CH}_2$ -皆與 C-2", 6" 和 1 個四級碳(C-3 或 C-7a)有  $^3J_{\text{CH}}$  correlation, 若此四級碳是 C-3 之訊號, 其必定與 H-2', 6' 有  $^3J_{\text{CH}}$  correlation, 但是從 HMBC 圖譜(圖 18-7)上發現這四級碳訊號並沒有與 H-2', 6' 有  $^3J_{\text{CH}}$  correlation, 反而是和  $\delta$  7.38 (1H, *dd*,  $J = 7.6, 7.6$  Hz) 與  $\delta$  8.00 (1H, *d*,  $J = 8.2$  Hz) 這兩個質子訊號有偶合關係, 另一方面從 H-2', 6' 遠程偶合關係已將  $\delta$  143.02 歸屬於 C-3 之訊號, 因此進一步確認此  $\delta$  140.98 為四級碳 C-7a 之訊號 進而可將  $\delta$  7.18 (1H, *dd*,  $J = 7.5, 7.5$  Hz) 歸屬於 H-5 之訊號,  $\delta$  7.38 (1H, *dd*,  $J = 7.6, 7.6$  Hz) 歸屬於 H-6 之訊號,  $\delta$  7.68 (1H, *d*,  $J = 8.6$  Hz) 歸屬於 H-7 之訊號,  $\delta$  8.00 (1H, *d*,  $J = 8.2$  Hz) 歸屬於 H-4 之訊號。再依據 HMQC 圖譜(圖 18-6)可以將四個三級碳依序歸屬如下:  $\delta$  110.53、 $\delta$  121.35、 $\delta$  121.51、 $\delta$  126.61 分別為 C-7、C-4、C-5、C-6 之訊號。最後  $\delta$  121.28 之碳訊號與 H-5( $\delta$  7.17)及 H-7( $\delta$  7.68)有  $^3J_{\text{CH}}$  correlation, 所以歸屬於 C-3a (隱藏在 C-4 訊號  $\delta$  121.35 下)。

綜合上述光譜數據分析, 特別是  $N\text{-CH}_2$ -與 C-7a 有  $^3J_{\text{CH}}$  correlation 之現象, 足以判定化合物 **18** 之結構為  $N^1$ -benzyl isomer ~ 1-(4-methoxybenzyl)-3-(4-methylphenyl)-1*H*-indazole。

HMBC correlations	
$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
H-4	C-6, C-7a
H-5	C-3a, C-7
H-6	C-4, C-7a
H-7	C-3a, C-5
H-2'', 6''	-CH <sub>2</sub> -, C-6'', 2'', C-4''
H-3'', 5''	C-1'', C-5'', 3'', C-4''*
<b>H-2', 6'</b>	<b>C-3</b> , C-4', C-6', 2'
H-3', 5'	4'-CH <sub>3</sub> , C-1', C-5', 3'
4''-OCH <sub>3</sub>	C-4''
4'-CH <sub>3</sub>	C-5', 3', C-4''*
<b>N-CH<sub>2</sub></b>	C-2'', 6'', <b>C-7a</b>

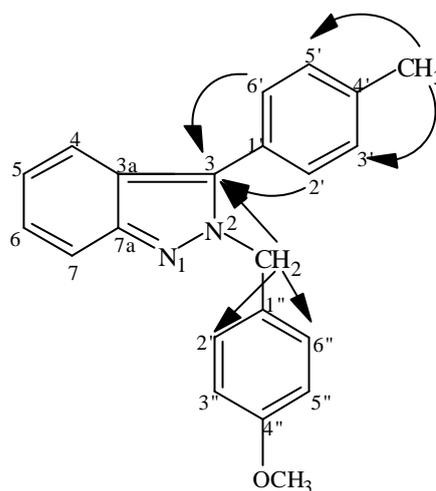
\* :  $^2J_{\text{CH}}$  correlation ; 其餘為  $^3J_{\text{CH}}$  correlation.



化合物 18

HMBC correlations	
$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
H-4	C-6, C-7a
H-5	C-3a, C-7
H-6	C-4, C-7a
H-7	C-3a, C-5
H-2'', 6''	-CH <sub>2</sub> -, C-6'', 2'', C-4''
H-3'', 5''	C-1'', C-5'', 3'', C-4''*
<b>H-2', 6'</b>	<b>C-3</b> , C-4', C-6', 2'
H-3', 5'	4'-CH <sub>3</sub> , C-1', C-5', 3'
4''-OCH <sub>3</sub>	C-4''
4'-CH <sub>3</sub>	C-5', 3', C-4''*
<b>N-CH<sub>2</sub></b>	C-6'', 2'', <b>C-3</b>

\* :  $^2J_{\text{CH}}$  correlation ; 其餘為  $^3J_{\text{CH}}$  correlation.



化合物 19

Fig. 9

化合物 19：白色結晶，Rf 值(氯仿)為 0.28，熔點 113.6-115 。

**IR 圖譜**：如圖 19-2 所示，出現一些與預期結構相符的吸收峰。

**UV 圖譜**：在 232.8 nm、243.0 nm、313.8 nm 處有最大吸收。

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) (圖 19-3)：**

其積分值顯示此化合物有 20 個質子訊號。而由其化學位移、偶合情形及氫-氫相關譜(DMSO-*d*<sub>6</sub>) (圖 19-4)，將各個質子訊號歸屬如下：在最高磁場的 δ 2.37 (3H, *s*) 歸屬於 4'-CH<sub>3</sub> 之訊號，δ 3.66 (3H, *s*) 為 4''-OCH<sub>3</sub> 之訊號。因受 N 的影響 N-CH<sub>2</sub>- 的化學位移往較低磁場移動，出現於 δ 5.50 (2H, *s*)。其次，因受 4''-OCH<sub>3</sub> 的影響，H-3'', 5'' 的化學位移往較高磁場移動，出現於 δ 6.80 (2H, *d*, *J* = 8.7 Hz)；再依據氫-氫相關譜(圖 19-4)進一步將 δ 6.97 (2H, *d*, *J* = 8.7 Hz) 歸屬於 H-2'', 6'' 之訊號。因受 4'-CH<sub>3</sub> 的影響，可將 δ 7.35 (2H, *d*, *J* = 8.1 Hz) 歸屬於 H-3', 5' 之訊號；再依據氫-氫相關譜(圖 19-4)進一步將 δ 7.40 (2H, *d*, *J* = 8.2 Hz) 歸屬於 H-2', 6' 之訊號。其餘之 H-4, 5, 6, 7 在此並不能確認位置，同化合物 18 只能獲得其訊號分裂模式、偶合常數及偶合關係等資訊。

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) (圖 19-5)：**

顯示有 18 個碳原子訊號 初步判斷 δ 21.15 歸屬於 4'-CH<sub>3</sub> 之訊號

**HMQC (DMSO-*d*<sub>6</sub>) (圖 19-6)：**

依據碳與氫之相關性，將 δ 53.47 歸屬於 N-CH<sub>2</sub>- 之訊號，δ 55.27 為 4''-OCH<sub>3</sub> 之訊號。

其餘的碳與氫之訊號需參照 HMBC (DMSO-*d*<sub>6</sub>) (圖 19-7a, 19-7b) 來做進一步的確認。由 4'-CH<sub>3</sub> 遠程偶合關係，可將 δ 130.04 歸屬於 C-3', C-5' 之訊號，δ 138.74 歸屬於 C-4' 之訊號，同時將 δ 7.35 (2H, *d*, *J* = 8.1 Hz) 確定為 H-3', 5' 之訊號，δ 7.40 (2H, *d*, *J* = 8.2 Hz) 確定為 H-2', 6' 之訊號，再依 H-2', 6'、H-3', 5' 之 <sup>1</sup>J<sub>CH</sub>-<sup>3</sup>J<sub>CH</sub> correlation 關係將 δ 126.41 歸屬於 C-1' 之訊號，δ 129.57 歸屬於 C-2', 6' 之訊號，δ 135.69 歸屬於 C-3 之訊號。

由 4"-OCH<sub>3</sub> 及 N-CH<sub>2</sub>-遠程偶合關係，可將 d 128.65 歸屬於 C-2"，6" 之訊號，d 158.87 歸屬於 C-4" 之訊號，同時將 d 6.80 (2H, *d*, *J* = 8.7 Hz) 確定為 H-3"，5" 之訊號，d 6.97 (2H, *d*, *J* = 8.7 Hz) 確定為 H-2"，6" 之訊號，進而確認 d 114.13 為 C-3"，5" 之訊號，d 129.26 為 C-1" 之訊號。

從 HMBC 圖譜上無法直接得知剩餘的 2 個四級碳(C-3a、C-7a) 與 H(或 C)-4、5、6、7 之位移，但是受 N 陰電性的影響，會使 C-7a 往低磁場移動(d 147.70)，而 C-3a 往較高磁場移動(d 120.96)。進而將 d 7.03 (1H, *dd*, *J* = 7.5, 7.5 Hz) 歸屬於 H-5 之訊號，d 7.26 (1H, *dd*, *J* = 8, 8 Hz) 歸屬於 H-6 之訊號，d 7.49 (1H, *d*, *J* = 8.5 Hz) 歸屬於 H-4 之訊號，d 7.62 (1H, *d*, *J* = 8.7 Hz) 歸屬於 H-7 之訊號，再依據 HMQC 圖譜(圖 19-6)可以將四個三級碳依序歸屬如下：d 117.28、d 120.41、d 121.85、d 126.27 分別為 C-7、C-4、C-5、C-6 之訊號。

綜合上述光譜數據分析，特別是 N-CH<sub>2</sub>-與 C-3 有 <sup>3</sup>*J*<sub>CH</sub> correlation 之現象，足以判定產物 **19** 之結構為 *N*<sup>2</sup>-benzyl isomer ~ 2-(4-methoxy benzyl)-3-(4-methylphenyl)-2*H*-indazole。

### I-4-3. 化合物 18、19 之質子訊號與碳訊號之特徵：

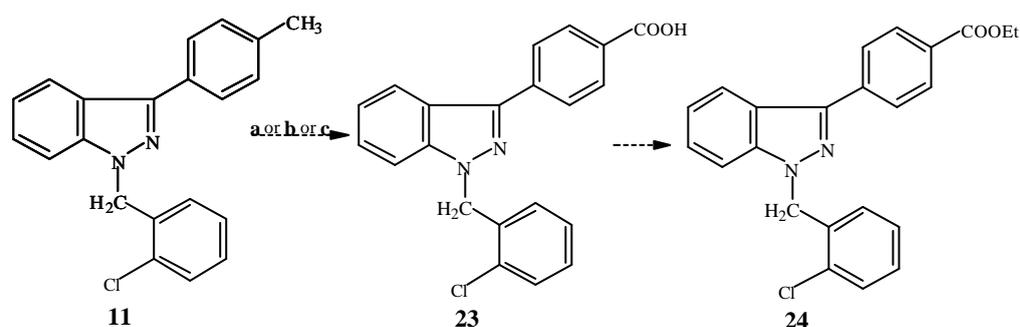
從化合物 18、19 之  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ )圖譜的比較中發現  $N^1$ -benzylated 產物在較低磁場出現的質子訊號順序為 H-4 (d 8.00)、H-2', 6' (d 7.87)、H-7 (d 7.68)。而  $N^2$ -benzylated 產物在較低磁場出現的質子訊號順序為 H-7 (d 7.62)、H-4 (d 7.49)、H-2', 6' (d 7.40)。在其它化合物都有相似的情形。這些質子訊號的特徵可做為其他衍生物結構簡易判斷之參考。

從化合物 18、19 之  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ )圖譜的比較中發現  $N^1$ -benzylated 產物在 d 143.02-121.35 出現的碳訊號順序為 3、7a、4'、1'、3a。而  $N^2$ -benzylated 產物在 d 147.70-120.96 出現的碳訊號順序為 7a、4'、3、1'、3a。此特徵也供其他衍生物判斷結構之參考。

化合物 6 根據文獻<sup>30</sup>是以兩種 isomer 的情況存在，而著者以化合物 6 進行 benzylation 時也得到兩大類產物。但是著者進一步觀察化合物 6 的 TLC 片( $\text{CHCl}_3$ )，卻只看的到一點，另外，在  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) (圖 6a-3)較低磁場中可觀察到質子訊號順序為 H-4、H-2', 6'、H-7，在  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) (圖 6a-5)較低磁場中可觀察到碳訊號順序為 3、7a、4'、1'、3a，與上述化合物 18、19 之質子訊號與碳訊號之特徵做比較，發現化合物 6 是屬於  $N^1$  類的化合物，因此著者認為在以氯仿為溶媒的情況下，化合物 6 是以 6a 為主要結構存在。

### I-5. 化合物 11 之氧化反應：

著者試將化合物 11 苯環上的甲基進行氧化及酯化反應如 Scheme 6 所示，形成 YD-3 的類緣物。不過都未能得到預期的化合物。

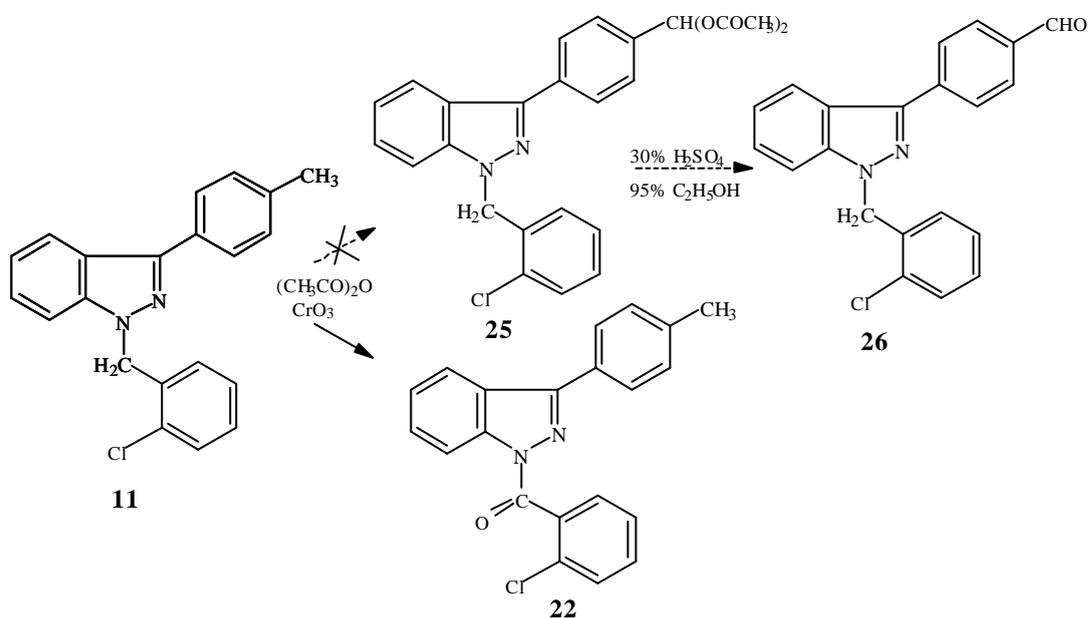


Scheme 6

茲將所嘗試過的氧化反應簡述如下：

- 以  $\text{KMnO}_4$  為催化劑，乙醇與水一定的比例<sup>40,41</sup> (1:1 或 3:1，或完全大量的水以增加催化劑與反應物之接觸) 當溶媒進行氧化反應。但反應性不佳，幾乎不反應，可能原因是反應物之溶解度非常差。
- 取化合物 **11** (0.23 克；0.0007 莫耳)，以 *N*-bromosuccinimide (NBS) (0.63 克；0.0035 莫耳) 與 benzoyl peroxide (0.024 克；0.0001 莫耳) 為催化劑，benzene (30 毫生) 當溶媒進行反應。產物極度複雜。
- 取化合物 **11** (1 克；0.003 莫耳)，以  $\text{CrO}_3$  (1 克；0.01 莫耳) 為催化劑，水 (1.5 毫生) 與冰醋酸 (9.6 毫升) 為溶媒，加熱迴流進行反應<sup>42</sup>。產物複雜。

另一方面亦嘗試以化合物 **11** (1 克；0.003 莫耳) 為原料如 Scheme 7 所示，以 acetic anhydride (醋酸酐) (16 毫升) 為溶媒企圖使反應於醛的階段停止，再經 30 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$  進行氧化反應<sup>43</sup>，結果產物複雜。而其產率較多的中間體經管柱層析分離純化(氯仿/矽膠)及一維與二維圖譜的確認，發現其並非為化合物 **25** 之結構而是化合物 1-(2-chlorobenzoyl)-3-(4-methylphenyl)-1*H*-indazole (**22**)。



Scheme 7

其結構解析如下：

化合物 **22** 為白色結晶，熔點 144.1-145.2 。

### 質譜 (EIMS) (圖 22-1) :

由其分子離子峰( $m/z$  346)及元素分析結果得知此化合物分子式為  $C_{21}H_{15}N_2OCl$ 。其基峰也從化合物 **11** (圖 11-1)之  $m/z$  125(鄰位氯取代的苄基)變成化合物 **22** 之  $m/z$  139(鄰位氯取代的苯甲醯基), 表示在化合物 **11** 之次甲基部份可能氧化成酮。

### IR 圖譜 :

如圖 22-2 所示,比化合物 **11** 之 IR 圖譜(圖 11-2)在  $1687\text{cm}^{-1}$  多了  $\text{C}=\text{O}$  之吸收帶, 在  $1388\text{cm}^{-1}$  多了醯胺的  $\text{C}-\text{N}$  吸收帶, 且出現一些與預期結構相符的吸收峰。

UV 圖譜 : 在 245.8 nm 及 315.8 nm 處有最大吸收。

### $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) (圖 22-3) :

其積分值顯示此化合物有 15 個質子訊號。初步判斷在最高磁場  $\delta$  2.29 (3H, *s*) 為  $4'\text{-CH}_3$  之訊號, 參考化合物 **11** 之  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) (圖 11-3), 發現在高磁場的  $\text{N-CH}_2$ -訊號在此未見到, 與化合物 **11** 相比對, 可初步將  $\delta$  7.89 (1H, *d*,  $J = 8.0\text{ Hz}$ ) 歸屬於 H-4 之訊號, 而 H-7 因受 carbonyl group ( $\text{C}=\text{O}$ ) 的影響出現在較低磁場  $\delta$  8.55 (1H, *d*,  $J = 8.3\text{ Hz}$ ),  $\delta$  7.17 (2H, *d*,  $J = 8.0\text{ Hz}$ ) 歸屬於 H-3', 5'-之訊號,  $\delta$  7.66 (2H, *d*,  $J = 8.2\text{ Hz}$ ) 歸屬於 H-2', 6'-之訊號, 再由氫-氫相關譜 ( $\text{CDCl}_3$ ) (圖 22-4) 之偶合關係來判斷, 可知 H-5 之訊號在  $\delta$  7.27- 7.39 (4H, *m*) 之間,  $\delta$  7.55 (1H, *dd*,  $J = 7.5, 7.5\text{ Hz}$ ) 為 H-6 之訊號,  $\delta$  7.27-7.39 (4H, *m*) 之其中 3 個氫和  $\delta$  7.50 (1H, *dd*,  $J = 7.5, 1.8\text{ Hz}$ ) 之 1 個氫為 benzoyl group 上芳香環的氫, 而 H-6'' 因受 carbonyl group ( $\text{C}=\text{O}$ ) 的影響出現在較低磁場  $\delta$  7.50 (1H, *dd*,  $J = 7.5, 1.8\text{ Hz}$ ), 故 H-3'', 4'', 5'' 之訊號出現在  $\delta$  7.27-7.39 (4H, *m*)。

### $^{13}\text{C-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) (圖 22-5) :

顯示有 17 個碳原子訊號, 由分子式得知有 21 個碳, 故有 3 組碳訊號重疊, 其中  $\delta$  129.5 為 3 個碳原子之訊號。初步判斷  $\delta$  21.38 為  $4'\text{-CH}_3$  之訊號。參考化合物 **11** 之  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) (圖 11-4), 發現在高磁場的  $\text{N-CH}_2$ -訊號在此未見到, 而在最低磁場處多了  $\text{C}=\text{O}$  之訊號, 為  $\delta$  167.17, 表示在化合物 **11** 之次甲基部份可能氧化成酮。

### HMQC (CDCl<sub>3</sub>) (圖 22-6) :

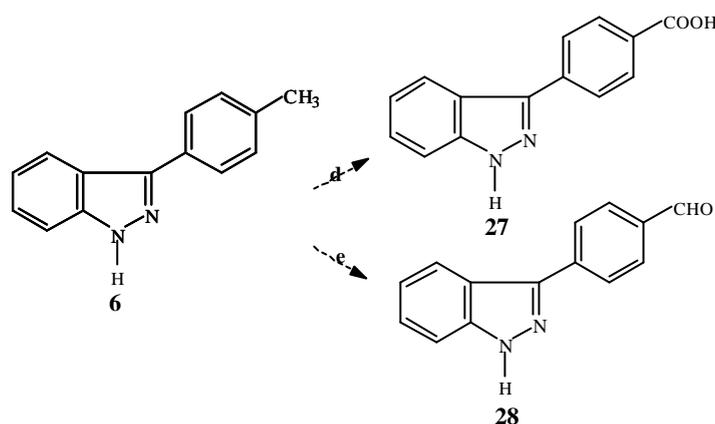
依據碳與氫之相關性，可將  $\delta$  115.96 歸屬於 C-7 之訊號， $\delta$  121.43 歸屬於 C-4 之訊號， $\delta$  128.06 歸屬於 C-2', 6' 之訊號， $\delta$  129.63 歸屬於 C-3', 5' 之訊號， $\delta$  129.50 歸屬於 C-6、C-6" 之訊號。

檢視 HMBC (CDCl<sub>3</sub>) (圖 22-7a, 22-7b)，由 H-7 之遠程偶合關係，可將  $\delta$  125.18、 $\delta$  125.32 歸屬於 C-3a、C-5 之訊號。由 H-4 之遠程偶合關係，可將  $\delta$  129.50、 $\delta$  140.72 歸屬於 C-6、C-7a 之訊號。由 4'-CH<sub>3</sub> 和 H-2', 6' 之遠程偶合關係，可將  $\delta$  139.69、 $\delta$  151.07 歸屬於 C-4'、C-3' 之訊號。由 H-3', 5' 之遠程偶合關係，可將  $\delta$  128.68 歸屬於 C-1' 之訊號。由 H-6" 之遠程偶合關係，可將  $\delta$  131.19 歸屬於 C-4" 之訊號。由 H-3", 4", 5" 之偶合關係及共振誘導效應，可將  $\delta$  126.35、 $\delta$  129.5 歸屬於 C-3"、C-5"、C-6" 之訊號， $\delta$  131.96、 $\delta$  134.92 歸屬於 C-1"、C-2" 之訊號。

綜合上述光譜數據分析可判定產物 **22** 為 1-(2-chlorobenzoyl)-3-(4-methylphenyl)-1*H*-indazole 之結構。

## I-6. 化合物 6 之氧化反應：

從上述化合物 11 之氧化反應並未得到預期的中間產物 25，而得到在次甲基氧化的產物 22，這暗示著 *N*-benzylated 化合物之氧化會優先在次甲基發生，甚至可能會 debenzylation 徒增產物之複雜性，於是著者試以化合物 6 為原料直接進行氧化反應如 Scheme 8 所示：



著者試過下述兩種方法：

- d. 取化合物 6 0.8 克(0.004 莫耳)，以  $\text{CrO}_3$  (1 克；0.01 莫耳)為催化劑，水(1.5 毫升)與冰醋酸(9.6 毫升)為溶媒進行反應<sup>42</sup>。得到一個產率較多 Rf(氯仿)值為 0.67 之橘色針狀結晶(化合物 I)，熔點 194.8-196.7 °C，由 EIMS (圖 I-1)顯示其分子量為 418，IR 圖譜(圖 I-2)在  $1654\text{ cm}^{-1}$  有吸收可能有 carbonyl group， $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) (圖 I-3)上只有 11 個質子訊號，目前尚未確認其結構。
- e. 取化合物 6 5 克(0.024 莫耳)，以 acetic anhydride (62 ml)為溶媒， $\text{CrO}_3$  (9 克；0.09 莫耳)為催化劑，再經 30 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$  進行氧化反應<sup>43</sup>，想將化合物 6 氧化成醛。產物極度複雜，未分離到純化合物。

以上著者分別將化合物 6 及 *N*<sup>1</sup>-benzylated 之產物進行氧化反應，企圖合成 3-phenylacetic acid 衍生物，結果都不順利，反應失敗的原因可能是 *N*<sup>1</sup>-benzylated 之產物在氧化加熱的條件下容易發生 *N*-debenzylated，從 EIMS 圖譜(如圖 18-1)上也可以發現 debenzylated 的現象。而一旦變成化合物 6 時，indazole 環上的 *N-N* linkage 可能會繼續被氧化而形成複雜的產物，這方面的反應尚待繼續深入探討。

## 第二節 藥理活性試驗結果

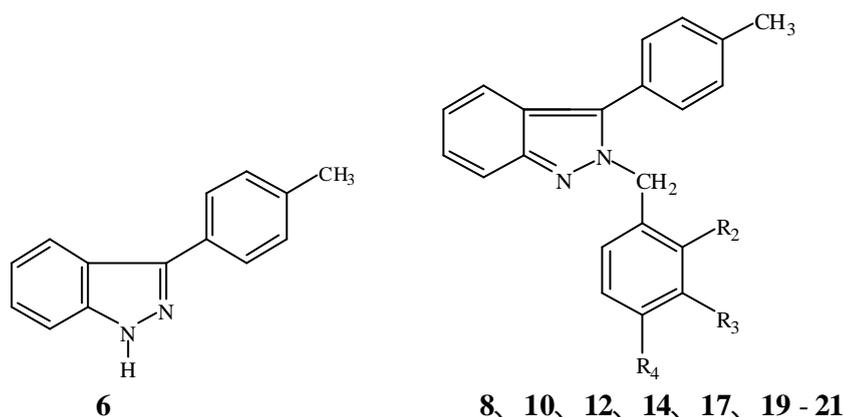
### I、抗血小板凝集活性

著者將所合成之化合物 **6**、 $N^2$ -benzyl isomer (**8**、**10**、**12**、**14**、**17**、**19** - **21**)及  $N^1$ -benzyl isomer (**9**、**11**、**13**、**15**、**16**)委託台灣大學醫學院藥理學研究所鄧哲明教授測試其對 AA、collagen、thrombin 及 PAF 引發的血小板凝集之抑制活性。結果如 Table 3 及 Table 4 所示。

由 Table 3 及 Table 4 可發現化合物 **6** 和  $N^2$ -benzyl isomer (**8**、**10**、**12**、**14**、**17**、**20**、**21**)，除了化合物 **19**對 AA 和 collagen 所引發的血小板凝集反應之抑制活性皆比  $N^1$ -benzyl isomer (**9**、**11**、**13**、**15**、**16**)強，但所有的化合物都不像 **YD-3** 對 thrombin 所引發的血小板凝集試驗有選擇性的抑制作用。化合物 **6** 對 AA 所引發的血小板凝集試驗有選擇性的抑制作用，其強度與 aspirin 相當，而理化性質顯然與 aspirin 相差甚多，其抗血小板活性值得進一步探討。而化合物 **10** 及 **21** 對 AA 所引發的血小板凝集反應之抑制活性相當顯著，其強度分別相當於 aspirin 之 4 倍與 10 倍，這兩個化合物在動物體內可能的代謝物都是化合物 **6**，理化性質與 aspirin 迥異，因此著者認為化合物 **10** 與 **21** 之抗血小板活性也值得進一步的探討。

由 Table 3 之藥理結果可知，若在化合物 **6** indazole 環之  $N^2$  位置接上有(無)取代之苄基能提升抑制 collagen 所引發的血小板凝集反應之活性。

**Table 3.** The inhibitory effect of compounds (**6**, **8**, **10**, **12**, **14**, **17**, **19** - **21**) on platelet aggregation induced by thrombin, AA, collagen and PAF (*in vitro*).



Animal : rabbit.

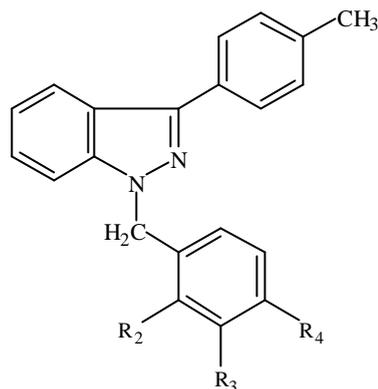
No.	Conc. ( $\mu\text{M}$ )	R <sub>4</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>2</sub>	Aggregation %			
					AA	Collagen	Thrombin	PAF
<b>YD-3</b>		-	-	-	<b>184.83</b>	<b>212.36</b>	<b>29.70</b>	<b>164.04</b>
<b>IC<sub>50</sub></b> ( $\mu\text{M}$ )		-	-	-				
<b>Aspirin</b>		-	-	-	<b>20.00</b>	<b>&gt;270</b>	<b>&gt;270</b>	<b>&gt;270</b>
<b>IC<sub>50</sub></b> ( $\mu\text{M}$ )		-	-	-				
<b>Control</b>					<b>86.6<math>\pm</math>0.8</b>	<b>88.5<math>\pm</math>1.1</b>	<b>91.5<math>\pm</math>1.3</b>	<b>89.8<math>\pm</math>1.2</b>
<b>6</b>	300	-	-	-	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>***</sup>	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>***</sup>	85.4 $\pm$ 2.6	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>***</sup>
	100				3.0 $\pm$ 2.6 <sup>**</sup>	19.4 $\pm$ 8.1 <sup>***</sup>	-	87.4 $\pm$ 1.7
	30				5.4 $\pm$ 4.6 <sup>**</sup>	74.8 $\pm$ 5.9 <sup>*</sup>	-	-
	10				78.8 $\pm$ 2.0 <sup>*</sup>	83.9 $\pm$ 1.7 <sup>*</sup>	-	-
<b>IC<sub>50</sub></b> ( $\mu\text{M}$ )					<b>19.67</b>	<b>111.01</b>	<b>&gt;300</b>	<b>197.24</b>
<b>8</b>	300	Cl	H	H	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>***</sup>	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>***</sup>	80.7 $\pm$ 1.6 <sup>***</sup>	76.7 $\pm$ 4.2 <sup>***</sup>
	100				0.0 $\pm$ 0.0 <sup>***</sup>	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>***</sup>	88.8 $\pm$ 0.9	88.3 $\pm$ 0.5
	30				43.2 $\pm$ 14.7 <sup>*</sup>	67.2 $\pm$ 10.4	-	-
	10				82.4 $\pm$ 0.8 <sup>**</sup>	86.9 $\pm$ 0.9	-	-
<b>IC<sub>50</sub></b> ( $\mu\text{M}$ )					<b>44.96</b>	<b>54.05</b>	<b>&gt;300</b>	<b>&gt;300</b>
<b>10</b>	300	H	Cl	H	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>***</sup>	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>***</sup>	83.8 $\pm$ 0.4 <sup>***</sup>	58.6 $\pm$ 8.1 <sup>***</sup>
	100				0.0 $\pm$ 0.0 <sup>***</sup>	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>***</sup>	-	83.9 $\pm$ 2.1 <sup>*</sup>
	30				0.0 $\pm$ 0.0 <sup>***</sup>	6.2 $\pm$ 5.0 <sup>**</sup>	-	85.1 $\pm$ 1.2 <sup>*</sup>
	10				0.0 $\pm$ 0.0 <sup>***</sup>	76.5 $\pm$ 2.7 <sup>***</sup>	-	-
	3				50.4 $\pm$ 1.8 <sup>***</sup>	82.5 $\pm$ 0.6 <sup>***</sup>	-	-
	1				78.1 $\pm$ 0.9 <sup>***</sup>	-	-	-
<b>IC<sub>50</sub></b> ( $\mu\text{M}$ )					<b>4.61</b>	<b>17.97</b>	<b>&gt;300</b>	<b>&gt;300</b>
<b>14</b>	300	CH <sub>3</sub>	H	H	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>***</sup>	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>***</sup>	81.7 $\pm$ 1.6 <sup>***</sup>	59.7 $\pm$ 4.6 <sup>***</sup>
	100				0.0 $\pm$ 0.0 <sup>***</sup>	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>***</sup>	88.1 $\pm$ 0.2 <sup>*</sup>	76.1 $\pm$ 4.6 <sup>**</sup>
	30				70.9 $\pm$ 4.1 <sup>***</sup>	78.4 $\pm$ 2.9 <sup>**</sup>	-	87.8 $\pm$ 2.0
	10				82.5 $\pm$ 0.7	89.5 $\pm$ 1.3	-	-
<b>IC<sub>50</sub></b> ( $\mu\text{M}$ )					<b>54.99</b>	<b>57.84</b>	<b>&gt;300</b>	<b>&gt;300</b>
<b>19</b>	300	OCH <sub>3</sub>	H	H	50.8 $\pm$ 2.3 <sup>***</sup>	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>***</sup>	68.1 $\pm$ 1.2 <sup>***</sup>	51.5 $\pm$ 7.5 <sup>***</sup>
	100				77.7 $\pm$ 1.9 <sup>***</sup>	82.0 $\pm$ 1.3 <sup>**</sup>	86.8 $\pm$ 0.4 <sup>**</sup>	81.8 $\pm$ 0.4 <sup>***</sup>
<b>IC<sub>50</sub></b> ( $\mu\text{M}$ )					<b>&gt;300</b>	<b>192.07</b>	<b>&gt;300</b>	<b>&gt;300</b>

**Table 3. (continued )**

<b>21</b>	300	H	H	H	0.0±0.0 <sup>***</sup>	0.0±0.0 <sup>***</sup>	80.2±1.5 <sup>***</sup>	34.6±9.7 <sup>***</sup>
	100				0.0±0.0 <sup>***</sup>	0.0±0.0 <sup>***</sup>	88.8±0.5	85.1±1.5 <sup>*</sup>
	30				0.0±0.0 <sup>***</sup>	26.1±13.1 <sup>***</sup>	-	-
	10				0.0±0.0 <sup>***</sup>	67.1±4.5 <sup>***</sup>	-	-
	3				4.0±3.2 <sup>***</sup>	85.1±1.2	-	-
	1				71.9±1.6 <sup>***</sup>	-	-	-
<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>					<b>1.69</b>	<b>36.16</b>	<b>&gt;300</b>	<b>288.3</b>
<b>Control</b>					<b>88.5±0.6</b>	<b>88.9±1.0</b>	<b>93.7±1.7</b>	<b>93.7±2.6</b>
<b>12</b>	100	H	H	Cl	5.4±4.6 <sup>***</sup>	1.1±0.9 <sup>***</sup>	90.6±3.9	80.6±4.8 <sup>*</sup>
	50				24.4±19.2 <sup>***</sup>	41.6±11.1 <sup>***</sup>	-	-
	20				41.1±18.8 <sup>**</sup>	46.8±13.4 <sup>**</sup>	-	-
	10				74.0±6.9 <sup>*</sup>	58.8±16.4 <sup>*</sup>	-	-
	5				75.5±7.6 <sup>*</sup>	83.3±1.6 <sup>**</sup>	-	-
	2				85.0±2.7	-	-	-
<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>					<b>39.64</b>	<b>39.60</b>	<b>&gt;100</b>	<b>&gt;100</b>
<b>17</b>	150	H	H	CH <sub>3</sub>	11.3±9.8 <sup>***</sup>	1.1±0.9 <sup>***</sup>	88.7±4.6	69.4±8.0 <sup>*</sup>
	100				13.2±11.5 <sup>***</sup>	1.1±0.9 <sup>***</sup>	-	-
	50				37.0±17.1 <sup>**</sup>	11.7±6.5 <sup>***</sup>	-	-
	20				57.0±17.1	53.0±12.9 <sup>*</sup>	-	-
	10				76.8±6.6	76.7±4.8 <sup>*</sup>	-	-
	5				87.3±1.5	-	-	-
<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>					<b>61.43</b>	<b>34.21</b>	<b>&gt;150</b>	<b>&gt;150</b>
<b>20</b>	300	H	OCH <sub>3</sub>	H	0.0±0.0 <sup>***</sup>	0.0±0.0 <sup>***</sup>	86.7±7.7	64.9±23.2
	100				0.0±0.0 <sup>***</sup>	1.1±0.9 <sup>***</sup>	-	82.8±8.8
	50				15.2±13.2 <sup>***</sup>	8.9±5.3 <sup>***</sup>	-	-
	20				27.5±18.2 <sup>*</sup>	30.3±16.3 <sup>***</sup>	-	-
	10				74.0±6.8 <sup>*</sup>	56.7±14.4 <sup>*</sup>	-	-
	5				71.3±8.5 <sup>*</sup>	72.7±3.5 <sup>***</sup>	-	-
2				85.5±1.0 <sup>*</sup>	79.2±2.2 <sup>***</sup>	-	-	
<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>					<b>32.78</b>	<b>27.29</b>	<b>&gt;300</b>	<b>&gt;300</b>

Platelets were incubated with tested sample or 0.5 % DMSO at 37 °C for 1 min, then thrombin (0.1 U/ml), AA (100 μM), collagen (10 μg/ml) or PAF (2 ng/ml) was added to trigger the aggregation. Values are presented as mean ± S.E., \* : P<0.05, \*\* : P<0.01, \*\*\* : P<0.001

**Table 4.** The inhibitory effect of compounds (**9**, **11**, **13**, **15**, **16**) on platelet aggregation induced by thrombin, AA, collagen and PAF (*in vitro*).



**9**, **11**, **13**, **15**, **16**

Animal : rabbit.

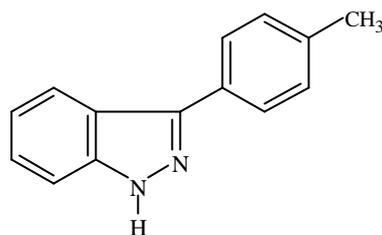
No.	Conc. ( $\mu\text{M}$ )	$\text{R}_4$	$\text{R}_3$	$\text{R}_2$	Aggregation %			
					AA	Collagen	Thrombin	PAF
<b>YD-3</b>								
		-	-	-	<b>184.83</b>	<b>212.36</b>	<b>29.7</b>	<b>164.04</b>
<b>Aspirin</b>								
		-	-	-	<b>20.00</b>	<b>&gt;270</b>	<b>&gt;270</b>	<b>&gt;270</b>
<b>Control</b>					<b>88.5<math>\pm</math>0.6</b>	<b>88.9<math>\pm</math>1.0</b>	<b>93.7<math>\pm</math>1.7</b>	<b>93.7<math>\pm</math>2.6</b>
<b>9</b>	300	H	Cl	H	65.7 $\pm$ 7.7 <sup>**</sup>	47.6 $\pm$ 14.8 <sup>***</sup>	83.5 $\pm$ 10.0	81.3 $\pm$ 9.5
	100				80.7 $\pm$ 1.7 <sup>***</sup>	61.5 $\pm$ 11.0 <sup>**</sup>	-	-
	50				-	84.0 $\pm$ 1.8 <sup>*</sup>	-	-
	<b>IC<sub>50</sub></b> ( $\mu\text{M}$ )				<b>&gt;300</b>	<b>&gt;300</b>	<b>&gt;300</b>	<b>&gt;300</b>
<b>11</b>	300	H	H	Cl	73.5 $\pm$ 3.4 <sup>**</sup>	60.7 $\pm$ 15.4	80.7 $\pm$ 7.4	83.2 $\pm$ 7.5
	100				86.3 $\pm$ 0.4 <sup>*</sup>	81.8 $\pm$ 2.0 <sup>**</sup>	-	-
	<b>IC<sub>50</sub></b> ( $\mu\text{M}$ )				<b>&gt;300</b>	<b>&gt;300</b>	<b>&gt;300</b>	<b>&gt;300</b>
<b>13</b>	300	CH <sub>3</sub>	H	H	54.2 $\pm$ 1.7 <sup>***</sup>	54.3 $\pm$ 16.3 <sup>*</sup>	87.2 $\pm$ 6.1	82.7 $\pm$ 10.7
	100				79.4 $\pm$ 1.1 <sup>***</sup>	76.9 $\pm$ 5.2 <sup>*</sup>	-	-
	50				84.5 $\pm$ 0.6	-	-	-
	<b>IC<sub>50</sub></b> ( $\mu\text{M}$ )				<b>&gt;300</b>	<b>&gt;300</b>	<b>&gt;300</b>	<b>&gt;300</b>
<b>15</b>	300	H	CH <sub>3</sub>	H	66.1 $\pm$ 2.9 <sup>**</sup>	42.4 $\pm$ 18.0 <sup>**</sup>	83.5 $\pm$ 9.2	79.5 $\pm$ 8.8
	100				81.5 $\pm$ 2.9 <sup>**</sup>	85.1 $\pm$ 2.3	-	-
	<b>IC<sub>50</sub></b> ( $\mu\text{M}$ )				<b>&gt;300</b>	<b>&gt;300</b>	<b>&gt;300</b>	<b>&gt;300</b>
<b>16</b>	150	H	H	CH <sub>3</sub>	77.7 $\pm$ 2.2 <sup>***</sup>	79.6 $\pm$ 1.9	82.3 $\pm$ 2.6 <sup>**</sup>	87.5 $\pm$ 4.6
	<b>IC<sub>50</sub></b> ( $\mu\text{M}$ )				<b>&gt;150</b>	<b>&gt;150</b>	<b>&gt;150</b>	<b>&gt;150</b>

Platelets were incubated with tested sample or 0.5 % DMSO at 37 for 1 min, then thrombin (0.1 U/ml), AA (100  $\mu\text{M}$ ), collagen (10  $\mu\text{g/ml}$ ) or PAF (2 ng/ml) was added to trigger the aggregation.

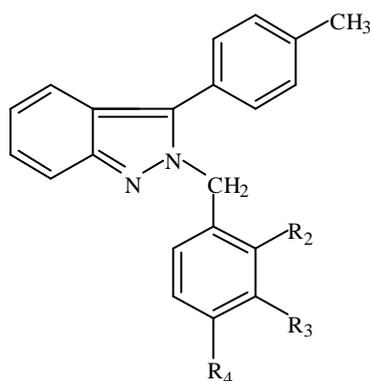
Values are presented as mean  $\pm$  S.E., \* : P<0.05, \*\* : P<0.01, \*\*\* : P<0.001

## II、 抑制血管增生之活性

為了確定所抑制的是癌細胞所新生的血管，因此著者將化合物 6、 8、 10、 14、 19、 21 委託台灣大學醫學院藥理學研究所鄧哲明教授，測試抑制 DNA 合成、 抑制管柱生成及抑制血管增生之定量性活性測試等三個藥理試驗來探討其對新生血管之抑制活性。



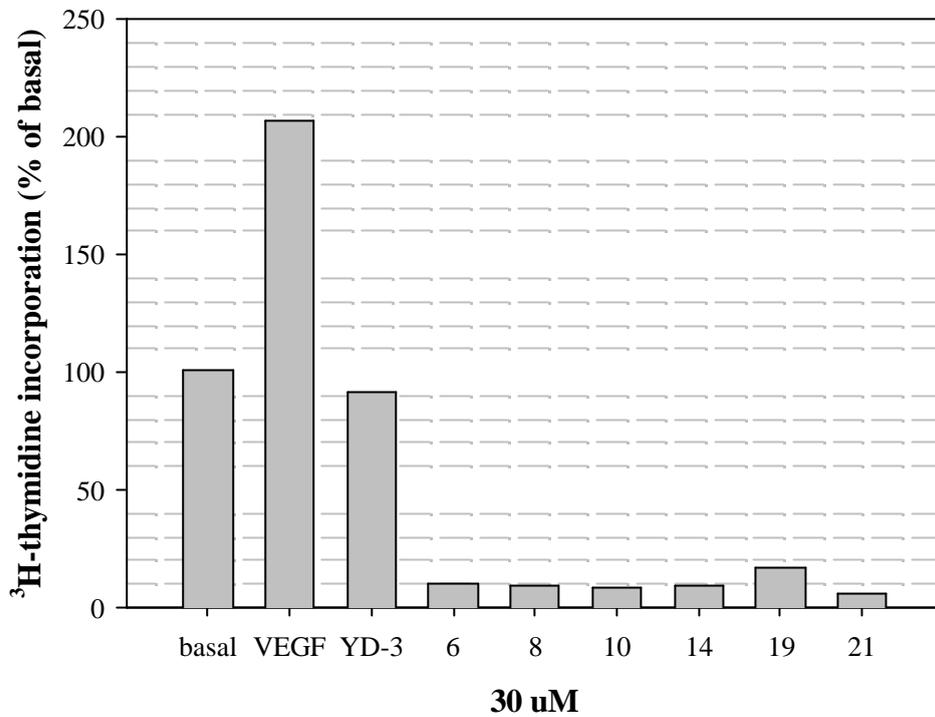
6



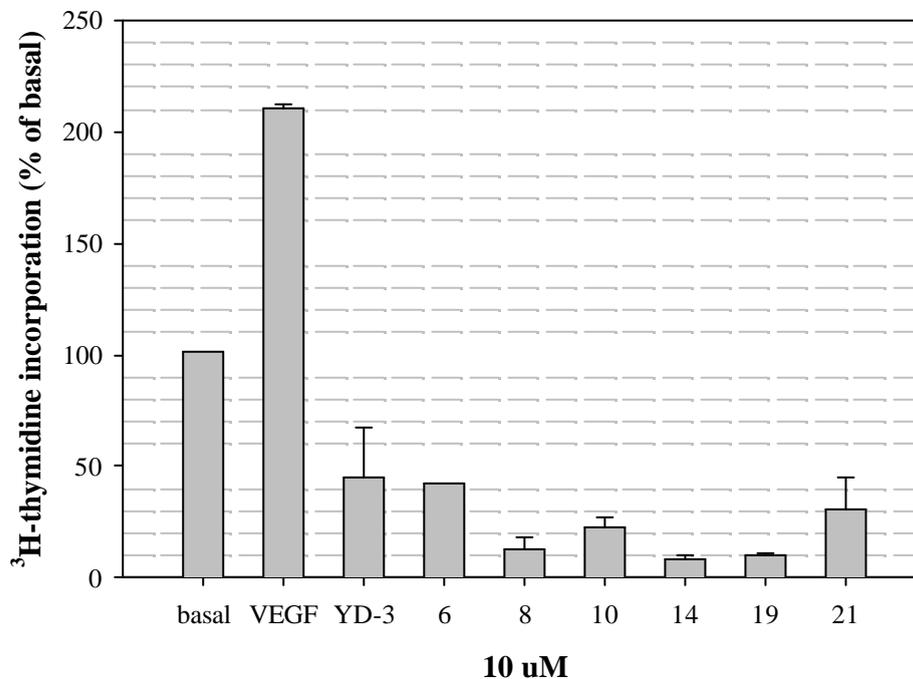
- 8 R<sub>4</sub>=Cl R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=H  
10 R<sub>3</sub>=Cl R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=H  
14 R<sub>4</sub>=CH<sub>3</sub> R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=H  
19 R<sub>4</sub>=OCH<sub>3</sub> R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=H  
21 R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=H

### II-1. 抑制 DNA 的合成

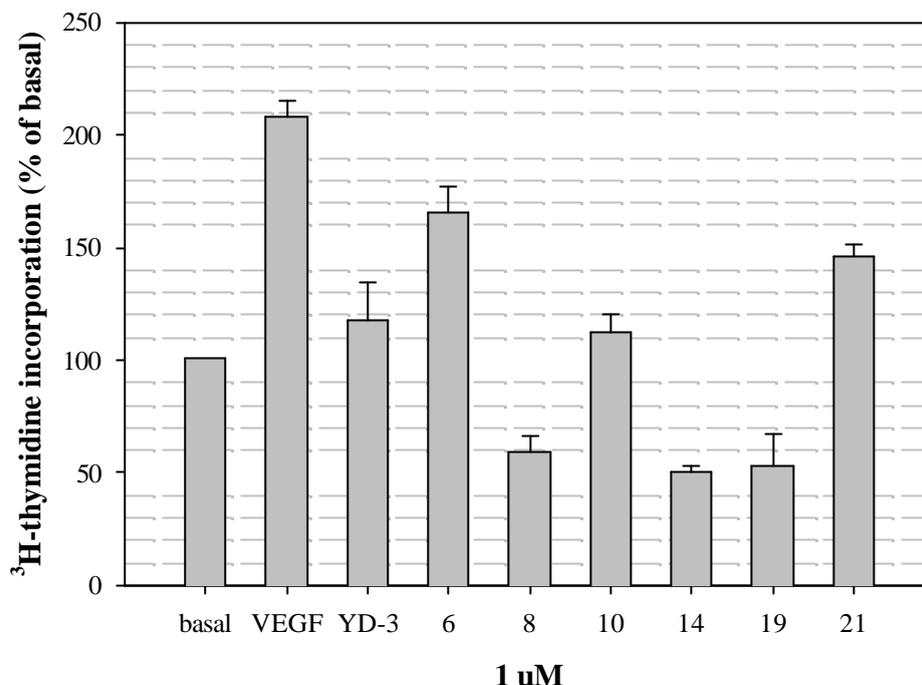
腫瘤細胞會釋放出 VEGF，促使內皮細胞分裂、複製，進行增殖，形成新的血管。Fig. 10 - Fig. 12 為化合物 6、 8、 10、 14、 19、 21 在 30 μM、 10 μM、 1 μM 濃度下，對 VEGF (10 ng/mL) 所引起之 DNA 合成之抑制活性。



**Fig. 10 In vitro assay (inhibition of DNA synthesis).** Human umbilical vein endothelial cells were incubated in the absence (basal and control) or presence of tested sample (**YD-3**, **6**, **8**, **10**, **14**, **19**, **21**), and then vascular endothelial growth factor (VEGF) was added (except for basal) to induce DNA synthesis, which was detected using [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation assay.



**Fig. 11 In vitro assay (inhibition of DNA synthesis).** Human umbilical vein endothelial cells were incubated in the absence (basal and control) or presence of tested sample (**YD-3**, **6**, **8**, **10**, **14**, **19**, **21**), and then vascular endothelial growth factor (VEGF) was added (except for basal) to induce DNA synthesis, which was detected using [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation assay. Means ± S.E. (n = 5) were presented.

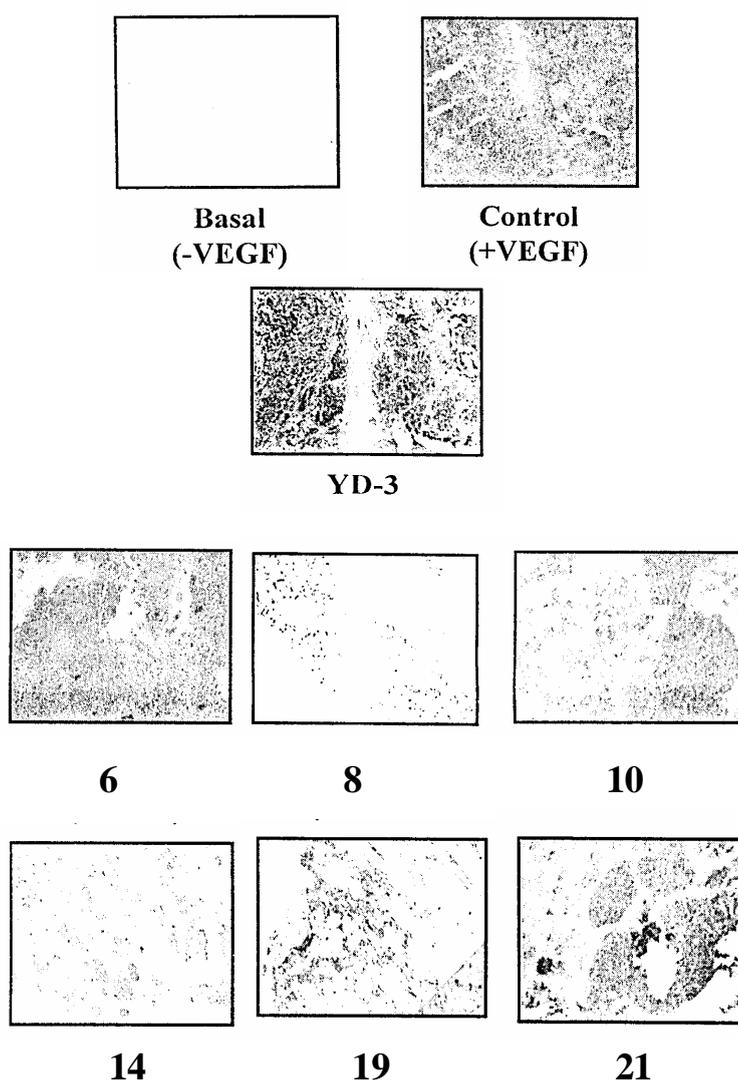


**Fig. 12 In vitro assay (inhibition of DNA synthesis).** Human umbilical vein endothelial cells were incubated in the absence (basal and control) or presence of tested sample (YD-3, 6, 8, 10, 14, 19, 21), and then vascular endothelial growth factor (VEGF) was added (except for basal) to induce DNA synthesis, which was detected using [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation assay. Means ± S.E. (n = 5) were presented.

在 30 μM 濃度下，化合物 6、8、10、14、19、21 對 DNA 合成皆呈現明顯的抑制活性，約相當於 YD-3 之 5-14 倍。而當濃度為 10 μM 時，只有化合物 8、14、19 呈現明顯的抑制活性，約相當於 YD-3 之 3-5 倍，而化合物 6 和 YD-3 之抑制效果相當。當濃度降為 1 μM 時，化合物 8、14、19 較具有抑制活性，而化合物 10 和 YD-3 之抑制效果相當，化合物 6 及 21 之抑制活性皆比 YD-3 為弱。由上可知，在化合物 6 indazole 環之 N<sup>2</sup> 接上含有 Cl、CH<sub>3</sub> 或 OCH<sub>3</sub> 取代的苄基基團能提升抑制 DNA 合成之活性，尤以對位取代之苄基基團為佳。

## II-2. 抑制 tube(管柱)的生成

利用 VEGF 於 Human umbilical vein endothelial cells (HUVEs；人體臍帶靜脈內皮細胞)中作用，可使細胞重新組合進行分化作用形成管柱的結構。而以化合物 6、8、10、14、19、21 處理後，由 VEGF 所誘導內皮細胞產生的分化作用可被阻斷其網狀結構，且由 MTT 試劑作染色，並拍照存證。結果如 Fig. 13 所示。

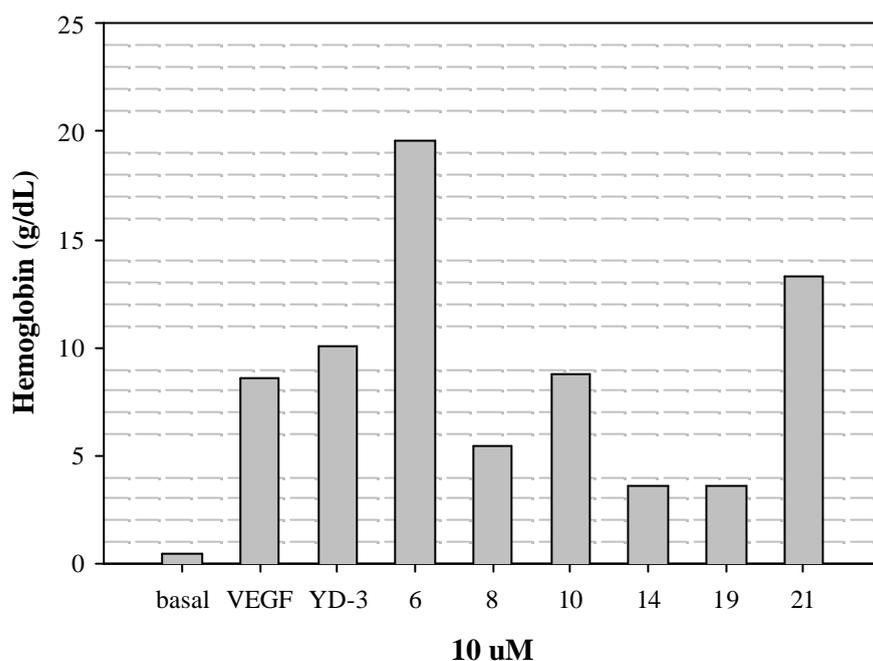


**Fig. 13 In vitro assay (inhibition of tube formation).** Human umbilical vein endothelial cells were cultured onto chamberslide, which was precoated with Matrigel (10 mg/ml). Cells were treated without (basal and control) or with tested sample (**YD-3 6 8 10 14 19 21**) and then vascular endothelial growth factor (VEGF) was added to induce tube formation. All pictures were taken at 100 × magnification.

化合物 **8**、**10**、**14**、**19**、**21** 均具抑制管柱生成的作用，其抑制效果皆勝於 **YD-3**，而其中以 **8** 及 **14** 抑制效果最為顯著。由上可知，在化合物 **6** indazole 環之  $N^2$  接上含有 Cl、 $CH_3$ 、 $OCH_3$  取代的或無取代的苄基基團能提升抑制管柱生成之活性。

### II-3.抑制血管增生之定量性活性測試

血管增生，相對的血紅素含量也會增加。因此若化合物具有抑制血管增生的活性，其所測出的血紅素含量會少於 VEGF 組(只加入 VEGF 誘發血管新生，未加化合物)的血紅素含量，做為定量性的活性測試。Fig. 14 為化合物 6、8、10、14、19、21 對 VEGF 所誘導之血管增生之抑制活性。



**Fig. 14 Quantitative analysis of angiogenic effect.** Nude mice were subcutaneously injected with a Matrigel plug containing 150 ng/ml vascular endothelial growth factor (VEGF). Vehicle or tested sample (YD-3 6 8 10 14 19 21) was orally administrated into the mice. After a seven-day administration, the animals were euthanatized and the plugs were cut of the mice for the measurement of angiogenic effect using the hemoglobin concentration as the parameter by means of a hemoglobin detection kit (Sigma). Means  $\pm$  S.E. (n = 3) were presented.

在 10  $\mu$ M 的濃度下，化合物 8、14 及 19 具有顯著的抑制血管增生之活性，其相對強度與其在 10  $\mu$ M 及 1  $\mu$ M 濃度下抑制 DNA 合成(Fig. 11 及 Fig. 12)的強度相呼應，故能更佳證明化合物 8、14 及 19 具有抑制血管增生之活性。化合物 10 與 YD-3 之效果相當，有輕微促進血管增生之現象。然而化合物 6 及 21 卻有促進血管增生的現象。

由上可知，在化合物 6 indazole 環之  $N^2$  接上對位取代(Cl、 $CH_3$  或  $OCH_3$ )的苄基基團能提升抑制血管增生之活性。

### III、細胞致毒活性

著者鑑於部份化合物具有抑制血管增生之活性，因此進一步探討化合物是否會具有抗癌的活性。將合成之化合物 6、22、*N*<sup>2</sup>-benzyl isomer (8、10、12、14、17、19 - 21)及 *N*<sup>1</sup>-benzyl isomer (7、9、11、13、15、16、18)委託本研究所林怡倩同學測試其對白血病細胞 (HL-60 cells)之細胞致毒活性。結果如 Table 5、6 所示。

由 Table 5 及 Table 6 可發現 *N*<sup>2</sup>-benzyl isomer (8、10、12、14、17、19，除了化合物 21)之  $IC_{50}$  值皆在 33-45  $\mu$ M 之間。而 *N*<sup>1</sup>-benzyl isomer 之中，除了化合物 13 及 18 之  $IC_{50}$  值分別為 5  $\mu$ M 及 2.1  $\mu$ M 之外，其它化合物之  $IC_{50}$  值皆大於 50  $\mu$ M。另外，化合物 22 也顯示出明顯的細胞致毒的活性，其  $IC_{50}$  值為 20.6  $\mu$ M。

由上可知，*N*<sup>2</sup>-benzyl isomer 之細胞致毒活性比大部份的 *N*<sup>1</sup>-benzyl isomer 還要強一點，這代表著 *N*<sup>2</sup>-benzyl isomer 比大部份的 *N*<sup>1</sup>-benzyl isomer 有較強的抗癌作用。而從化合物 11 氧化過程中意外得到的化合物 22，其  $IC_{50}$  值也提升至 20.6  $\mu$ M，表示可能在細胞致毒活性之構效關係中，*N*<sup>1</sup>-acyl 之官能基扮演著微妙的角色，這點值得提供今後 SAR 研究之參考。





### 第三章 結論

著者以 3-(4-methylphenyl)-1*H*-indazole (化合物 6) 為主要中間體，採行有別於以往合成 YD-3 之方法，從事其衍生物的合成。得到化合物 7 - 21，經由一維圖譜及二維圖譜確認，可分為兩類，一為  $N^1$  取代的化合物~ 1-(substituted benzyl)-3-(4-methylphenyl)-1*H*-indazoles (7、9、11、13、15、16、18)；另一為  $N^2$  取代的化合物~ 2-(substituted benzyl)-3-(4-methylphenyl)-2*H*-indazoles (8、10、12、14、17、19 - 21)。並將這兩類化合物測試其抗血小板凝集活性、抑制血管增生活性及細胞致毒活性。

在抗血小板凝集活性試驗中，兩類化合物(7 - 21)都不像 YD-3 對 thrombin 引發的血小板凝集有選擇性的抑制作用。大部份  $N^2$  取代的化合物(8、10、12、14、17、20、21)對 AA 及 collagen 所引發的血小板凝集之抑制活性比  $N^1$  取代的化合物(9、11、13、15、16)強。另外，化合物 10 ( $IC_{50} = 4.61 \mu M$ )及 21 ( $IC_{50} = 1.69 \mu M$ )對 AA 所引發的血小板凝集之抑制活性相當顯著，更勝於化合物 6 ( $IC_{50} = 19.67 \mu M$ )。

在抑制血管增生活性試驗中， $N^2$  取代的化合物(8、14 及 19)抑制效果比化合物 6 及 YD-3 還要顯著。而  $N^1$  取代的化合物之抑制血管增生活性之試驗正在進行中。另外，在細胞致毒活性中， $N^2$  取代的化合物(8、10、12、14、17、19、20)其活性比化合物 6 及大部分  $N^1$  取代的化合物(7、9、11、15、16)強。

因為  $N^2$  取代的化合物不像 YD-3 對 thrombin 引發的血小板凝集有選擇性的抑制作用，也因此未深入測試對 thrombin 引發的血管增生是否具有抑制活性(YD-3 對 thrombin 引發的新生血管具有顯著的抑制作用)，但從其明顯的抑制血管增生活性，著者認為其作用機轉值得再深入探討。

由抑制血管增生與細胞致毒兩者藥理活性結果比較中發現，化合物 8、14 及 19 雖然在細胞致毒活性中  $IC_{50}$  值在於 36 - 43  $\mu M$  間，但其活性比大部分  $N^1$  取代的化合物(7、9、11、15、16,  $IC_{50} > 50 \mu M$ )

強，而在抑制血管增生活性中，化合物 **8**、**14** 及 **19** 之抑制效果相當顯著。這些兼具抑制血管增生及細胞致毒活性的特性，在抗血管增生的化合物是相當罕見的。

因此著者認為化合物 **8**、**14** 及 **19** 是頗具開發潛能的抗癌物質。同時其類緣化合物的製備與抗癌活性之評估也是相當有意義的研究方向。

## 第四章 實驗部份

### 第一節 試藥

(一)購自德國 E. Merck 公司者

Acetic anhydride, 98 %

*N*-Bromosuccinimide, 98 %

Chloroform-*d*<sub>1</sub>, >99.8 %

Dimethylsulfoxide-*d*<sub>6</sub>, > 99.8 %

Methanol

Palladium 10% on activated carbon

Triethylamine, > 99 %

(二)購自美國 Acros 公司者

Benzene, 99 %

Benzoyl peroxide, remainder water, 75 %

Chromium (VI) oxide, > 99 %

(三)購自英國 Lancaster 公司者

Benzyl chloride, > 99 %

Hydrazine monohydrate, > 98 %

(四)購自瑞士 Fluka 公司者

Natrium, 99.5 %

(五)購自日本昭和化學株式會社者

Magnesium sulfate anhydrous

Sulfuric acid, 97 %

(六)購自日本關東化學株式會社者

Potassium permanganate, 99.3 %

(七)購自日本 Osaka 株式會社者

Sodium hydroxide, > 95 %

(八)購自日本東京化成工業株式會社者

4-Chlorobenzyl chloride, > 98 %

3-Chlorobenzyl chloride, > 95 %

2-Chlorobenzyl chloride, > 98 %

*trans*-Decahydronaphthalene, > 98 %

4-Methylbenzyl chloride, > 98 %

3-Methylbenzyl chloride, > 95 %

2-Methylbenzyl chloride, > 98 %

4-Methoxybenzyl chloride, > 97 %

3-Methoxybenzyl chloride, > 95 %

1-(*N*-Morpholino)cyclohexene, > 90 %

*p*-Toluoyl chloride, > 97 %

(九)購自台灣聯工試藥公司者

Acetic acid, glacial, > 99 %

Hydrochloric acid, > 35 %

Petroleum ether, > 90 %

(十)購自景明化工股份有限公司者

Chloroform

*n*-Hexane

(十一)購自台灣省菸酒公賣局者

Ethanol, 95 %

## 第二節 重要儀器

### (一)熔點測定器(Melting Point Apparatus)

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

### (二)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-Visible Recording Spectrophotometer 測定，使用氯仿為溶劑，最大吸收波長(  $\lambda_{\max}$ ) 單位為 nm，以 log 表示 Molar absorptivity。

### (三)紅外線光譜儀(Infrared Spectrophotometer)

紅外線光譜分析係採用 Spectrum One FT-IR Spectrometer 測定，以溴化鉀粉末作為打錠稀釋劑，光譜單位為  $\text{cm}^{-1}$ 。

### (四)質譜儀(Mass Spectrophotometer)

EIMS 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)。

### (五)元素分析

採用 Heraeus CHN-OS RAPID 元素分析儀(國科會中部貴重儀器使用中心)測定，元素分析值皆在理論值 $\pm 4\%$ 以內。

### (六)紫外光燈(UV Equipment)

使用 CAMAG UV-Cabinet II 紫外燈觀察箱，備有短波長 254 nm 與長波長 366 nm 之光源。

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

採用 Bruker Advance DPX-200 FT-NMR Spectrometer、Bruker Advance DPX-400 FT-NMR Spectrometer (中國醫藥學院精密儀器中心)及 Bruker Advance DPX-300 FT-NMR Spectrometer (國立成功大學精密儀器中心)測定：

以 (ppm)值表示其化學位移值，而以 TMS (tetramethylsilane) ( $\delta = 0$ )為內部標準。偶合常數( $J$ )以 Hz 為單位，並以  $s$  表單峰

(singlet) , *d* 表二重峰(doublet) , *t* 表三重峰(triplet) , *q* 表四重峰(quartet) , *m* 表多峰(multiplet) , *br* 表寬峰(broad) , *dd* 表雙二重峰(double doublet) , *ddd* 表參二重峰(double double doublet)。

(八)薄層色層分析(Thin-Layer Chromatography)

使用德國 E. Merck 公司出品之 pre-coated aluminium TLC sheets (silica gel 60 F<sub>254</sub>, 20 × 20 cm, 0.2 mm layer thickness, Art.5554)。

(九)管柱色層分析(Column Chromatography)

以德國 E. Merck 公司出品之 Silica gel 60 (70 - 230 mesh)當充填劑。

### 第三節 各化合物之製備

#### (一) 3-(4-Methylphenyl)-1*H*-indazole (6)之合成

- (a) 秤取 1-(*N*-Morpholino)cyclohexene 33.4 克(0.2 莫耳)與 triethylamine 28 毫升溶於 100 毫升之氯仿置於 500 毫升之反應瓶中，再秤取 4-methylbenzoyl chloride 26.42 毫升(0.2 莫耳)溶於 40 毫升之氯仿，置於滴加管中，於 45 °C 下慢慢滴入前面之溶液，繼續反應 3 小時；加入 20 % 之鹽酸水溶液，加熱迴流 5 小時，將反應液冷卻，取氯仿層，以 50 毫升水洗 4 次，合併氯仿層，以無水硫酸鎂脫水過濾後，減壓濃縮將氯仿去除，殘餘溶液靜置冷卻後固體析出，收集固體並以石油醚清洗，乾燥，可得 2-oxocyclohexyl 4-methylphenyl ketone (4)，21.2 克(產率 49 %)，熔點：106.2-107.4 °C。
- (b) 秤取化合物 4 13.01 克(0.06 莫耳)懸浮於 100 毫升之甲醇中，稍微加熱直到溶解再降至室溫；取 4 毫升 85 % 之 hydrazine monohydrate (NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O)置於滴加管中慢慢滴入，反應 30 分鐘，減壓濃縮至剩下約 35 毫升之溶劑，靜置冷卻後固體析出，收集固體並以石油醚清洗，乾燥，可得 3-(4-methylphenyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1*H*-indazole (5)，12.39 克(產率 97 %)，熔點：57.4-59.9 °C。
- (c) 秤取化合物 5 12.3 克(0.058 莫耳)溶於 160 毫升之 *trans*-decahydronaphthalene (*trans*-decalin)置於 500 毫升之反應瓶中，再加入 2.7 克 10 % 之 Pd/C，加熱迴流 24 小時，使用油浴鍋減壓濃縮至剩下約 20 毫升之溶劑，趁熱加入 80 毫升之石油醚，輕輕搖晃使溶劑與石油醚混合均勻，靜置冷卻固體析出，可得 3-(4-methylphenyl)-1*H*-indazole (6)，9.85 克(產率 82 %)。

化合物 6 的物理性質，光譜及數據如下：

熔點：63.1-65.2 °C

MS (*m/z*)：208 (M<sup>+</sup>)

IR (KBr)  $\nu_{\max}$ ：見圖 3-2

UV,  $\nu_{\max}$  (CHCl<sub>3</sub>) nm (log *e*)：233.4(3.850), 246.0(4.223),  
311.6(4.251)

元素分析：以 C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub> 計算

	H %	C %	N %
計算值 :	5.81	80.74	13.45
實際值 :	5.75	80.70	13.40

<sup>1</sup>H-NMR (*d*-chloroform, 200 MHz) d (ppm) :

2.47 (3H, *s*, 4'-CH<sub>3</sub>)  
 7.19-7.29 (2H, *m*, H-5, H-7)  
 7.34-7.38 (3H, *m*, H-6, H-3', 5')  
 7.93 (2H, *d*, *J* = 8.0 Hz, H-2', 6')  
 8.03 (1H, *d*, *J* = 8.1 Hz, H-4)

<sup>13</sup>C-NMR (*d*-chloroform, 50 MHz) d (ppm) :

21.33 (4'-CH <sub>3</sub> )	110.26 (C-7)	120.92 (C-3a)
121.17 (C-4, C-5)	126.70 (C-6)	
127.60 (C-2', 6')	129.62 (C-3', 5')	130.65 (C-1')
138.02 (C-4')	141.66 (C-7a)	145.68 (C-3)

## (二) 1-(4-Chlorobenzyl)-3-(4-methylphenyl)-1*H*-indazole (7)及 2-(4-chlorobenzyl)-3-(4-methylphenyl)-2*H*-indazole (8)之合成

秤取化合物 6 4.16 克(0.02 莫耳)溶於 30 毫升之無水乙醇，置於反應瓶中，加入 0.92 克(0.04 莫耳)之乙醇鈉，在室溫下攪拌 1.5 小時；秤取 4-chlorobenzyl chloride 6.44 克(0.04 莫耳)置於滴加管中慢慢滴入前面之溶液中，加熱迴流 1.5 小時，白色固體析出，趁熱過濾並以氯仿多次清洗固體，取濾液減壓濃縮去除溶媒，以管柱層析(矽膠)純化，以氯仿為沖提液，得化合物 7 (3.1 克，產率 47 %)及化合物 8 (0.23 克，產率 3 %)。

化合物 7 的物理性質，光譜及數據如下：

熔點：79.9-82.3

MS (*m/z*) : 332 (M<sup>+</sup>)

IR (KBr)  $\nu_{\max}$  : 見圖 7-2

UV,  $\nu_{\max}$  (CHCl<sub>3</sub>) nm (log *e*) : 232.2(3.769), 244.6(4.079),  
313.4(4.099)

元素分析：以 C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>Cl 計算

	H %	C %	N %
計算值 :	5.15	75.78	8.42
實際值 :	5.13	75.74	8.41

<sup>1</sup>H-NMR (*d*-chloroform, 200 MHz) d (ppm) :

2.35 (3H, *s*, 4'-CH<sub>3</sub>)  
 5.52 (2H, *s*, -CH<sub>2</sub>-)

7.06-7.28 (9H, *m*, aromatic-H)  
 7.79 (2H, *d*,  $J = 8.1$  Hz, H-2', 6')

$^{13}\text{C-NMR}$  (*d*-chloroform, 50 MHz)  $\delta$  (ppm) :

21.33 (4'-CH <sub>3</sub> )	52.26 (-CH <sub>2</sub> -)	109.34 (C-7)
121.08 (C-4)	121.59 (C-5)	122.13(C-3a)
126.48 (C-6)	127.38	128.48
128.85	129.52	130.61( C-1')
133.52 (C-4'')	135.42 (C-1'')	137.82 (C-4')
140.95 (C-7a)	144.52 (C-3)	

化合物 8 的物理性質, 光譜及數據如下:

熔點: 107.4-109.5

MS ( $m/z$ ): 332 ( $M^+$ )

IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 見圖 8-2

UV,  $\nu_{\max}$  (CHCl<sub>3</sub>) nm (log  $e$ ): 232.4(3.683), 244.8(3.996),  
 314.6(4.056)

元素分析: 以 C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>Cl 計算

	H %	C %	N %
計算值:	5.15	75.78	8.42
實際值:	5.10	75.69	8.38

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

2.45 (3H, *s*, 4'-CH<sub>3</sub>)

5.59 (2H, *s*, -CH<sub>2</sub>-)

7.01-7.32 (10H, *m*, aromatic-H)

7.57 (1H, *d*,  $J = 8.4$  Hz, H-4)

7.74 (1H, *d*,  $J = 8.7$  Hz, H-7)

$^{13}\text{C-NMR}$  (*d*-chloroform, 50 MHz)  $\delta$  (ppm) :

21.17 (4'-CH<sub>3</sub>) 53.38 (-CH<sub>2</sub>-) 117.13 (C-7)

120.23 (C-4) 121.09 (C-3a) 121.68 (C-5)

126.25 (C-1') 126.35 (C-6) 128.14

128.63 129.30 129.57

133.38 (C-4'') 135.22 (C-1'') 136.48 (C-3)

138.89 (C-4') 148.15 (C-7a)

### (三) 1-(3-Chlorobenzyl)-3-(4-methylphenyl)-1*H*-indazole (9)及 2-(3-chlorobenzyl)-3-(4-methylphenyl)-2*H*-indazole (10)之合成

秤取化合物 6 10.4 克(0.05 莫耳)、乙醇鈉 2.3 克(0.1 莫耳)、  
 3-chlorobenzyl chloride 16.1 克(0.1 莫耳), 比照化合物 7 之合成  
 方法, 得化合物 9 (7.1 克, 產率 43 %)及化合物 10 (0.76 克, 產

率 5 %)。

化合物 9 的物理性質, 光譜及數據如下:

熔點: 66.6-68

MS ( $m/z$ ): 332 ( $M^+$ )

IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 見圖 9-2

UV,  $\nu_{\max}$  ( $\text{CHCl}_3$ ) nm (log e): 233.2(3.797), 245.4(4.09),  
313.0(4.107)

元素分析: 以  $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{Cl}$  計算

	H %	C %	N %
計算值:	5.15	75.78	8.42
實際值:	5.09	75.68	8.39

$^1\text{H-NMR}$  ( $d$ -chloroform, 200 MHz)  $\delta$  (ppm):

2.32 (3H,  $s$ , 4'- $\text{CH}_3$ )

5.48 (2H,  $s$ ,  $-\text{CH}_2-$ )

6.98-6.99 (1H,  $m$ , H-4'')

7.05-7.25 (8H,  $m$ , aromatic-H)

7.78 (2H,  $d$ ,  $J = 8.1$  Hz, H-2', 6')

7.92 (1H,  $d$ ,  $J = 8.1$  Hz, H-4)

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $d$ -chloroform, 50 MHz)  $\delta$  (ppm):

21.30 (4'- $\text{CH}_3$ )    52.24 ( $-\text{CH}_2-$ )    109.27 (C-7)

121.09 (C-4)    121.56 (C-5)    122.09 (C-3a)

125.20 (C-4'')    126.50 (C-6)    127.18 (C-6'')

127.37 (C-2', 6')    127.87 (C-2'')    129.49 (C-3', 5')

129.95 (C-5'')    130.57 (C-1')    134.53 (C-3'')

137.80 (C-4')    138.93 (C-1'')    140.97 (C-7a)

144.56 (C-3)

化合物 10 的物理性質, 光譜及數據如下:

熔點: 98-100

MS ( $m/z$ ): 332 ( $M^+$ )

IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 見圖 10-2

UV,  $\nu_{\max}$  ( $\text{CHCl}_3$ ) nm (log e): 232.2(3.706), 244.2(4.007),  
313.4(4.047)

元素分析: 以  $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{Cl}$  計算

	H %	C %	N %
計算值:	5.15	75.78	8.42
實際值:	5.13	75.72	8.41

$^1\text{H-NMR}$  ( $d$ -chloroform, 200 MHz)  $\delta$  (ppm):

2.37 (3H,  $s$ , 4'- $\text{CH}_3$ )

5.51 (2H, *s*, -CH<sub>2</sub>-)  
 6.86-7.29 (10H, *m*, aromatic-H)  
 7.50 (1H, *dd*, *J* = 8.4, 1.0 Hz, H-4)  
 7.67 (1H, *dd*, *J* = 8.7, 0.9 Hz, H-7)

<sup>13</sup>C-NMR (*d*-chloroform, 50 MHz) d (ppm) :

21.36 (4'-CH <sub>3</sub> )	53.64 (-CH <sub>2</sub> -)	117.36 (C-7)
120.44 (C-4)	121.26 (C-3a)	121.91 (C-5)
125.08 (C-4'')	126.39 (C-1')	126.58 (C-6)
127.10 (C-6'')	127.95 (C-5'')	129.51 (C-2', 6')
129.78 (C-3', 5')	129.96 (C-2'')	134.59 (C-3'')
136.79 (C-3)	138.84 (C-4')	139.13 (C-1'')
148.37 (C-7a)		

**(四) 1-(2-Chlorobenzyl)-3-(4-methylphenyl)-1*H*-indazole (11)及  
 2-(2-chlorobenzyl)-3-(4-methylphenyl)-2*H*-indazole (12)之合成**

秤取化合物 **6** 10.4 克 (0.05 莫耳)、乙醇鈉 2.3 克 (0.1 莫耳)、  
 2-chlorobenzyl chloride 16.1 克 (0.1 莫耳), 比照化合物 **7** 之合成  
 方法, 得化合物 **11** (7.3 克, 產率 44 %) 及化合物 **12** (0.58 克, 產  
 率 3 %)。

化合物 11 的物理性質, 光譜及數據如下:

熔點: 77.6-78.8

MS (*m/z*): 332 (M<sup>+</sup>)

IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 見圖 11-2

UV,  $\nu_{\max}$  (CHCl<sub>3</sub>) nm (log *e*): 232.4(3.659), 245.4(3.94),  
 312.6(3.995)

元素分析: 以 C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>Cl 計算

	H %	C %	N %
計算值:	5.15	75.78	8.42
實際值:	4.79	75.57	8.49

<sup>1</sup>H-NMR (*d*-chloroform, 200 MHz) d (ppm) :

2.35 (3H, *s*, 4'-CH<sub>3</sub>)

5.69 (2H, *s*, -CH<sub>2</sub>-)

6.70-7.35 (9H, *m*, aromatic-H)

7.81 (2H, *d*, *J* = 8.1 Hz, H-2', 6')

7.96 (1H, *d*, *J* = 8.1 Hz, H-4)

<sup>13</sup>C-NMR (*d*-chloroform, 50 MHz) d (ppm) :

21.30 (4'-CH <sub>3</sub> )	50.00(-CH <sub>2</sub> -)	109.44 (C-7)
-----------------------------	---------------------------	--------------

121.12 (C-4)	121.50 (C-5)	121.94 (C-3a)
126.52 (C-6)	127.10 (C-5'')	127.37 (C-2', 6')
128.31 (C-3'')	128.75 (C-4'')	129.34 (C-6'')
129.49 (C-3', 5')	130.66 (C-1')	132.24 (C-2'')
134.67 (C-1'')	137.79 (C-4')	141.32 (C-7a)
144.69 (C-3)		

化合物 12 的物理性質, 光譜及數據如下:

熔點: 131.3-137.8

MS ( $m/z$ ): 332 ( $M^+$ )

IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 見圖 12-2

UV,  $\nu_{\max}$  ( $\text{CHCl}_3$ ) nm (log e): 232.8(3.691), 244.6(4.007),  
314.8(4.06)

元素分析: 以  $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{Cl}$  計算

	H %	C %	N %
計算值:	5.15	75.78	8.42
實際值:	5.10	75.74	8.38

$^1\text{H-NMR}$  ( $d$ -chloroform, 200 MHz)  $\delta$  (ppm):

2.43 (3H,  $s$ , 4'- $\text{CH}_3$ )

5.74 (2H,  $s$ ,  $-\text{CH}_2-$ )

6.63-7.40 (10H,  $m$ , aromatic-H)

7.64 (1H,  $d$ ,  $J = 8.5$  Hz, H-4)

7.76 (1H,  $d$ ,  $J = 8.7$  Hz, H-7)

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $d$ -chloroform, 50 MHz)  $\delta$  (ppm):

21.33 (4'- $\text{CH}_3$ )    51.95 ( $-\text{CH}_2-$ )    117.43 (C-7)

120.55 (C-4)    121.12 (C-3a)    121.94 (C-5)

126.33(C-1')    126.57 (C-6)    127.28 (C-5'')

127.84 (C-3'')    128.78 (C-4'')    129.19 (C-2', 6')

129.20 (C-6'')    129.80 (C-3', 5')    131.73 (C-2'')

135.04 (C-1'')    137.23 (C-3)    139.01 (C-4')

148.56 (C-7a)

### (五) 1-(4-Methylbenzyl)-3-(4-methylphenyl)-1H-indazole (13)及 2-(4-methylbenzyl)-3-(4-methylphenyl)-2H-indazole (14)之合成

秤取化合物 6 4.16 克(0.02 莫耳), 乙醇鈉 0.92 克(0.04 莫耳)、  
4-methylbenzyl chloride 6.33 克(0.045 莫耳), 比照化合物 7 之合  
成方法, 得化合物 13 (3.1 克, 產率 50%)及化合物 14 (0.4 克,  
產率 6%)。

化合物 13 的物理性質, 光譜及數據如下:

熔點: 79.6-82.3

MS ( $m/z$ ): 312 ( $M^+$ )

IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 見圖 13-2

UV,  $\nu_{\max}$  ( $\text{CHCl}_3$ ) nm (log  $e$ ): 232.8(3.806), 243.4(4.090)  
313.8(4.096)

元素分析: 以  $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_2$  計算

	H %	C %	N %
計算值:	6.45	84.58	8.97
實際值:	6.41	84.55	8.93

$^1\text{H-NMR}$  ( $d$ -chloroform, 200 MHz)  $\delta$  (ppm):

2.21 (3H,  $s$ )  
2.34 (3H,  $s$ )  
5.53 (2H,  $s$ ,  $-\text{CH}_2-$ )  
6.99-7.26 (9H,  $m$ , aromatic-H)  
7.80 (2H,  $d$ ,  $J = 8.1$  Hz, H-2', 6')  
7.92 (1H,  $d$ ,  $J = 8.1$  Hz, H-4)

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $d$ -chloroform, 50 MHz)  $\delta$  (ppm):

21.07	21.31	52.85 ( $-\text{CH}_2-$ )
109.62 (C-7)	120.86 (C-4)	121.44 (C-5)
122.10 (C-3a)	126.22 (C-6)	127.14
127.38	129.32	129.46
130.83 (C-1')	133.90 (C-1'')	137.34 (C-4'')
137.62 (C-4')	140.95 (C-7a)	144.10 (C-3)

化合物 14 的物理性質, 光譜及數據如下:

熔點: 107.5-109.3

MS ( $m/z$ ): 312 ( $M^+$ )

IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 見圖 14-2

UV,  $\nu_{\max}$  ( $\text{CHCl}_3$ ) nm (log  $e$ ): 233.8(3.723), 243(4.046),  
266.0(3.883), 314.6(4.06)

元素分析: 以  $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_2$  計算

	H %	C %	N %
計算值:	6.45	84.58	8.97
實際值:	6.39	84.48	8.88

$^1\text{H-NMR}$  ( $d$ -chloroform, 200 MHz)  $\delta$  (ppm):

2.31 (3H,  $s$ )  
2.45 (3H,  $s$ )  
5.60 (2H,  $s$ ,  $-\text{CH}_2-$ )

6.98-7.39 (10H, *m*, aromatic-H)  
 7.48 (1H, *dd*,  $J = 8.4, 1.0$  Hz, H-4)  
 7.66 (1H, *dd*,  $J = 8.7, 0.9$  Hz, H-7)  
<sup>13</sup>C-NMR (*d*-chloroform, 50 MHz) d (ppm) :

21.06	21.34	54.03 (-CH <sub>2</sub> -)
117.39 (C-7)	120.40 (C-4)	121.28 (C-3a)
121.62 (C-5)	126.23 (C-6)	126.73 (C-1')
126.90	129.30	129.62
133.98 (C-1'')	136.49 (C-3)	137.32 (C-4'')
138.83 (C-4')	148.29 (C-7a)	

### (六) 1-(3-Methylbenzyl)-3-(4-methylphenyl)-1*H*-indazole (15)之合成

秤取化合物 **6** 4.16 克(0.02 莫耳), 乙醇鈉 0.92 克(0.04 莫耳)、  
 3-methylbenzyl chloride 6.33 克(0.045 莫耳), 比照化合物 **7** 之合  
 成方法, 得化合物 **15** (3.2 克, 產率 51 %)。

化合物 15 的物理性質, 光譜及數據如下:

熔點: 78.5-80.1

MS ( $m/z$ ): 312 ( $M^+$ )

IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 見圖 15-2

UV,  $\nu_{\max}$  (CHCl<sub>3</sub>) nm (log  $e$ ): 233.2(3.771), 243.8(4.063),  
 314.0(4.077)

元素分析: 以 C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub> 計算

	H %	C %	N %
計算值:	6.45	84.58	8.97
實際值:	6.42	84.56	8.94

<sup>1</sup>H-NMR (*d*-chloroform, 200 MHz) d (ppm) :

2.19 (3H, *s*)

2.34 (3H, *s*)

5.52 (2H, *s*, -CH<sub>2</sub>-)

6.95-7.26 (9H, *m*, aromatic-H)

7.81 (2H, *d*,  $J = 8.0$  Hz, H-2', 6')

7.93 (1H, *d*,  $J = 8.1$  Hz, H-4)

<sup>13</sup>C-NMR (*d*-chloroform, 50 MHz) d (ppm) :

21.33 (3''-CH<sub>3</sub>, 4'-CH<sub>3</sub>) 53.02 (-CH<sub>2</sub>-)

109.61 (C-7) 120.88 (C-4) 121.44 (C-5)

122.07 (C-3a) 124.23 (C-4'') 126.24 (C-6)

127.39 (C-2', 6') 127.84 (C-6'') 128.43 (C-5'')

128.53 (C-2'') 129.46 (C-3', 5') 130.83 (C-1')

136.84 (C-1")	137.63 (C-4')	138.36 (C-3")
141.01 (C-7a)	144.12 (C-3)	

(七) 1-(2-Methylbenzyl)-3-(4-methylphenyl)-1*H*-indazole (16)及  
2-(2-methylbenzyl)-3-(4-methylphenyl)-2*H*-indazole (17)之合成

秤取化合物 6 4.16 克(0.02 莫耳), 乙醇鈉 0.92 克(0.04 莫耳)、  
2-methylbenzyl chloride 6.33 克(0.045 莫耳), 比照化合物 7 之合  
成方法, 得化合物 16 (3.05 克, 49 %)及化合物 17 (0.28 克, 4 %)

化合物 16 的物理性質, 光譜及數據如下:

熔點: 114.1-116.5

MS (m/z): 312 (M<sup>+</sup>)

IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 見圖 16-2

UV,  $\nu_{\max}$  (CHCl<sub>3</sub>) nm (log e): 233.2(3.814), 244.8(4.092)  
314.2(4.128)

元素分析: 以 C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub> 計算

	H %	C %	N %
計算值:	6.45	84.58	8.97
實際值:	6.41	84.57	8.95

<sup>1</sup>H-NMR (*d*-chloroform, 200 MHz)  $\delta$  (ppm):

2.33 (3H, <i>s</i> )
2.34 (3H, <i>s</i> )
5.57 (2H, <i>s</i> , -CH <sub>2</sub> -)
6.72-6.75 (1H, <i>d</i> , aromatic-H)
6.97-7.25 (9H, <i>m</i> , aromatic-H)
7.80 (2H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8.2, 1.8 Hz, H-2', 6')
7.95 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8.1, 1.0 Hz, H-4)

<sup>13</sup>C-NMR (*d*-chloroform, 50 MHz)  $\delta$  (ppm):

19.35	21.31	51.27 (-CH <sub>2</sub> -)
109.61 (C-7)	120.92 (C-4)	121.49 (C-5)
121.96 (C-3a)	126.20 (C-4")	126.28 (C-6)
127.30 (C-5")	127.36 (C-2', 6')	127.63 (C-3")
129.47 (C-3', 5')	130.42 (C-6")	130.78 (C-1')
134.90 (C-2")	135.70 (C-1")	137.67 (C-4')
141.28 (C-7a)	144.14 (C-3)	

化合物 17 的物理性質, 光譜及數據如下:

熔點: 125-128.8

MS ( $m/z$ ) : 312 ( $M^+$ )

IR (KBr)  $\nu_{\max}$  : 見圖 17-2

UV,  $\nu_{\max}$  ( $\text{CHCl}_3$ ) nm (log  $e$ ) : 232.6(3.695), 243.4(3.995),  
315.2(4.102)

元素分析 : 以  $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_2$  計算

	H %	C %	N %
計算值 :	6.45	84.58	8.97
實際值 :	6.41	84.49	8.91

$^1\text{H-NMR}$  ( $d$ -chloroform, 200 MHz)  $\delta$  (ppm) :

2.16 (3H,  $s$ )  
2.35 (3H,  $s$ )  
5.54 (2H,  $s$ ,  $-\text{CH}_2-$ )  
6.52-6.55 (1H,  $d$ , aromatic-H)  
6.98-7.30 (9H,  $m$ , aromatic-H)  
7.55 (1H,  $d$ ,  $J = 8.4$  Hz, H-4)  
7.67 (1H,  $d$ ,  $J = 8.7$  Hz, H-7)

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $d$ -chloroform, 50 MHz)  $\delta$  (ppm) :

19.07	21.33	52.21 ( $-\text{CH}_2-$ )
117.46 (C-7)	120.45 (C-4)	121.14 (C-3a)
121.73 (C-5)	126.30 (C-4'')	126.44 (C-6, 5'')
126.67 (C-1')	127.46 (C-3''')	129.27 (C-2', 6')
129.71 (C-3', 5')	130.10 (C-6'')	134.54 (C-2'')
135.46 (C-1''')	126.84 (C-3)	138.85 (C-4')
148.41 (C-7a)		

#### (八) 1-(4-Methoxybenzyl)-3-(4-methylphenyl)-1*H*-indazole (18)及 2-(4-methoxybenzyl)-3-(4-methylphenyl)-2*H*-indazole (19)之合成

秤取化合物 **6** 10.4 克 (0.05 莫耳), 乙醇鈉 2.3 克 (0.1 莫耳)、  
4-methoxybenzyl chloride 23.5 克 (0.15 莫耳), 比照化合物 **7** 之合成  
方法, 得化合物 **18** (7.3 克, 產率 46 %)及化合物 **19** (0.49 克,  
產率 3 %)。

化合物 **18** 的物理性質, 光譜及數據如下:

熔點 : 66.3-69.1

MS ( $m/z$ ) : 328 ( $M^+$ )

IR (KBr)  $\nu_{\max}$  : 見圖 18-2

UV,  $\lambda_{\max}$  (CHCl<sub>3</sub>) nm (log e) : 232.8(4.801), 243.4(4.107),  
313.8(4.091)

元素分析：以 C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O 計算

	H %	C %	N %
計算值	6.14	80.46	8.53
實際值	6.11	80.43	8.50

<sup>1</sup>H-NMR (*d*-chloroform, 200 MHz)  $\delta$  (ppm) :

2.31 (3H, *s*, 4'-CH<sub>3</sub>)  
3.63 (3H, *s*, 4''-OCH<sub>3</sub>)  
5.59 (2H, *s*, -CH<sub>2</sub>-)  
6.81 (2H, *d*, *J* = 8.6 Hz, H-3'', 5'')  
7.18 (1H, *dd*, *J* = 7.5, 7.5 Hz, H-5)  
7.24 (2H, *d*, *J* = 8.6 Hz, H-2'', 6'')  
7.28 (2H, *d*, *J* = 8.0 Hz, H-3', 5')  
7.38 (1H, *dd*, *J* = 7.6, 7.6 Hz, H-6)  
7.68 (1H, *d*, *J* = 8.6 Hz, H-7)  
7.87 (2H, *d*, *J* = 8.0 Hz, H-2', 6')  
8.00 (1H, *d*, *J* = 8.2 Hz, H-4)

<sup>13</sup>C-NMR (*d*-chloroform, 50 MHz)  $\delta$  (ppm) :

21.12 (4'-CH <sub>3</sub> )	51.76 (-CH <sub>2</sub> -)	55.26 (4''-OCH <sub>3</sub> )
110.53(C-7)	114.20(C-3'', 5'')	121.28 (C-3a)
121.35 (C-4)	121.51 (C-5)	126.61 (C-6)
127.08 (C-2', 6')	129.16 (C-2'', 6'')	129.60 (C-1'')
129.80 (C-3', 5')	130.82 (C-1')	137.51 (C-4')
140.98 (C-7a)	143.02 (C-3)	159.02 (C-4'')

化合物 19 的物理性質, 光譜及數據如下:

熔點 : 113.6-115

MS (*m/z*) : 328 (M<sup>+</sup>)

IR (KBr)  $\nu_{\max}$  : 見圖 19-2

UV,  $\lambda_{\max}$  (CHCl<sub>3</sub>) nm (log e) : 232.8(3.769), 243.0(4.083),  
313.8(4.065)

元素分析：以 C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O 計算

	H %	C %	N %
計算值	6.14	80.46	8.53
實際值	6.13	80.42	8.51

<sup>1</sup>H-NMR (*d*-chloroform, 200 MHz)  $\delta$  (ppm) :

2.37 (3H, *s*, 4'-CH<sub>3</sub>)  
3.66 (3H, *s*, 4''-OCH<sub>3</sub>)  
5.50 (2H, *s*, -CH<sub>2</sub>-)  
6.80 (2H, *d*, *J* = 8.7 Hz, H-3'', 5'')

6.97 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8.7 Hz, H-2", 6")		
7.03 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 7.5, 7.5 Hz, H-5)		
7.26 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8.0, 8.0 Hz, H-6)		
7.35 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8.1 Hz, H-3', 5')		
7.40 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8.2 Hz, H-2', 6')		
7.49 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8.5 Hz, H-4)		
7.62 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8.7 Hz, H-7)		
<sup>13</sup> C-NMR ( <i>d</i> -chloroform, 50 MHz) δ (ppm) :		
21.15 (4'-CH <sub>3</sub> )	53.47 (-CH <sub>2</sub> -)	55.27 (4"-OCH <sub>3</sub> )
114.13 (C-3", 5")	117.28 (C-7)	120.41 (C-4)
120.96 (C-3a)	121.85 (C-5)	126.28 (C-6)
126.41 (C-1')	128.65 (C-2", 6")	129.26 (C-1")
129.57 (C-2', 6')	130.05 (C-3', 5')	135.69 (C-3)
138.74 (C-4')	147.70 (C-7a)	158.87 (C-4")

### (九) 2-(3-methoxybenzyl)-3-(4-methylphenyl)-2*H*-indazole (20)之合成

秤取化合物 **6** 6.24 克(0.03 莫耳), 乙醇鈉 1.38 克(0.06 莫耳)、3-methoxybenzyl chloride 10.18 克(0.065 莫耳), 比照化合物 **7** 之合成方法, 得化合物 **20** (0.39 克, 產率 4%)。

化合物 **20** 的物理性質, 光譜及數據如下:

熔點: 97.6-99.8

MS (*m/z*): 328 (M<sup>+</sup>)

IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 見圖 20-2

UV,  $\nu_{\max}$  (CHCl<sub>3</sub>) nm (log *e*): 243.0(3.992), 283.2(3.912),  
314.0(4.054)

元素分析: 以 C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O 計算

	H %	C %	N %
計算值:	6.14	80.46	8.53
實際值:	6.06	80.39	8.50

<sup>1</sup>H-NMR (*d*-chloroform, 200 MHz) δ (ppm) :

2.37 (3H, <i>s</i> , 4'-CH <sub>3</sub> )
3.64 (3H, <i>s</i> , 4"-OCH <sub>3</sub> )
5.52 (2H, <i>s</i> , -CH <sub>2</sub> -)
6.57-7.30 (10H, <i>m</i> , aromatic-H)
7.50 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8.1 Hz, H-4)
7.66 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8.3 Hz, H-7)

<sup>13</sup>C-NMR (*d*-chloroform, 50 MHz) d (ppm) :

21.31 (4'-CH <sub>3</sub> )	54.15 (-CH <sub>2</sub> -)	55.12 (4''-OCH <sub>3</sub> )
112.55 (C-4'')	113.14 (C-2'')	117.38 (C-7)
119.17 (C-6'')	120.40 (C-4)	121.25 (C-3a)
121.68 (C-5)	126.30 (C-6)	126.65 (C-1')
129.55 (C-2', 6')	129.66 (C-3', 5', 5'')	
136.58 (C-3)	138.50 (C-4')	138.86 (C-1'')
148.33 (C-7a)	159.79 (C-3'')	

### (十) 2-benzyl-3-(4-methylphenyl)-2*H*-indazole (21)之合成

稱取化合物 **6** 6.24 克(0.03 莫耳), 乙醇鈉 1.38 克(0.06 莫耳)、3-methoxybenzyl chloride 10.18 克(0.065 莫耳), 比照化合物 **7** 之合成方法, 得化合物 **21** (0.45 克, 產率 5%)。

化合物 21 的物理性質, 光譜及數據如下:

熔點: 110.7-111.3

MS (*m/z*): 298 (M<sup>+</sup>)

IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 見圖 21-2

UV,  $\nu_{\max}$  (CHCl<sub>3</sub>) nm (log *e*): 233.2(3.641), 243(3.956),  
314.6(3.972)

元素分析: 以 C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub> 計算

	H %	C %	N %
計算值:	6.08	84.53	9.39
實際值:	6.02	84.50	9.34

<sup>1</sup>H-NMR (*d*-chloroform, 200 MHz) d (ppm) :

2.37 (3H, <i>s</i> , 4'-CH <sub>3</sub> )
5.50 (2H, <i>s</i> , -CH <sub>2</sub> -)
6.92-7.23 (10H, <i>m</i> , aromatic-H)
7.48 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8.4 Hz, H-4)
7.66 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8.7 Hz, H-7)

<sup>13</sup>C-NMR (*d*-chloroform, 50 MHz) d (ppm) :

21.36 (4'-CH <sub>3</sub> )	53.56 (-CH <sub>2</sub> -)	117.31 (C-7)
120.42 (C-4)	121.27 (C-3a)	121.86 (C-5)
126.43 (C-1')	126.53 (C-6)	128.32
128.82	129.49	129.75
133.56 (C-1'')	135.41 (C-4'')	136.67 (C-3)
139.07 (C-4')	148.34 (C7a)	

(十一) 1-(2-Chlorobenzoyl)-3-(4-methylphenyl)-1*H*-indazole (22)之合成

取化合物 11 1 克(0.003 莫耳)懸浮於 16 毫升醋酸酐溶液中，以冷水浴冷卻以維持溫度 5-10 ，在二小時內分次加入氧化鉻 4.3 克(0.043 莫耳)，然後在 10 繼續攪拌至反應完全，加入環己烷萃取，取環己烷層，經無水硫酸鎂脫水後，過濾，將溶媒抽乾，粗產物以管柱層析(氯仿)分離純化，繼而以石油醚與乙醚再結晶，得白色針狀結晶，化合物 22 (0.075 克，產率 7%)。

化合物 22 的物理性質，光譜及數據如下：

熔點：144.1-145.2

MS ( $m/z$ )：346 ( $M^+$ )

IR (KBr)  $\nu_{\max}$ ：見圖 22-2

UV,  $\nu_{\max}$  ( $\text{CHCl}_3$ ) nm ( $\log \epsilon$ )：245.8(6.759), 315.8(4.319)

元素分析：以  $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{OCl}$  計算

	H %	C %	N %
計算值	4.36	72.73	8.08
實際值	4.33	72.70	8.05

$^1\text{H-NMR}$  ( $d$ -chloroform, 200 MHz)  $\delta$  (ppm)：

2.29 (3H, *s*, 4'- $\text{CH}_3$ )  
7.17 (2H, *d*,  $J = 8.0$  Hz, H-3', 5')  
7.27-7.39 (4H, *m*, H-5, 3'', 4'', 5'')  
7.50 (1H, *dd*,  $J = 7.5, 1.8$  Hz, H-6'')  
7.55 (1H, *dd*,  $J = 7.5, 7.5$  Hz, H-6)  
7.66 (2H, *d*,  $J = 8.2$  Hz, H-2', 6')  
7.89 (1H, *d*,  $J = 8.0$  Hz, H-4)  
8.55 (1H, *d*,  $J = 8.3$  Hz, H-7)

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $d$ -chloroform, 50 MHz)  $\delta$  (ppm)：

21.38 (4'- $\text{CH}_3$ )	115.96 (C-7)	121.43 (C-4)
125.18 (C-3a)	125.32 (C-5)	126.35 (C-3'', 5'')
128.06 (C-2', 6')	128.68 (C-1')	129.5 (C-6, 6'')
129.63 (C-3', 5')	131.19 (C-4'')	131.96 (C-1'')
134.92 (C-2'')	139.69 (C-4')	140.72 (C-7a)
151.07 (C-3)	167.17 (C=O)	

## 第四節 藥理試驗方法

### (一) 抗血小板凝集活性試驗方法

#### 1. 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 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; 於 25 ml acetic acid 研磨均勻, 以 1 mg/ml 儲存於-70 。

(4)Platelet-activating factor (PAF):購自 Sigma Chem. Co. USA; 溶於 chloroform, 使用前以 0.9 % NaCl 稀釋之。

#### 2. 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, 在室溫下立即以  $90 \times g$  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 (platelet pellets) 以含有 EDTA (2 mM) 及 Bovin serum albumin (3.5 mg/ml) 的 Tyrode's solution (calcium free) 清洗之, 在相同轉速 ( $500 \times g$ ) 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),  $\text{NaHCO}_3$  (11.9),  $\text{MgCl}_2$  (1.1),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0.33),  $\text{CaCl}_2$  (1.0) and glucose (11.2); 並以 Coulter counter (Model ZM) 計數, 調整血小板數約為  $4.5 \times 10^8$  platelets/ml, 最後加 1 mM 鈣離子 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 放置 30 分鐘後進行實驗。

#### 3. 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<sup>44</sup>, 並以 Lumiaggregometer (Model 1020, PayLon, Canada) 測定之。將血小板懸浮液 0.4 毫升加入經 Silicone 包衣的小玻璃管中, 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再加入引發劑, 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：

$$\text{凝集}(\%) = [(A_1 - A_2) \div (A_1 - A_3)] \times 100 \%$$

A<sub>1</sub>=加引發劑前的吸光度

A<sub>2</sub>=加引發劑後的吸光度

A<sub>3</sub>=Tyrode`s solution 的吸光度

## (二) 抑制血管增生試驗方法

### 1. 抑制 DNA 合成：

將 Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)(人體臍帶靜脈內皮細胞) 分別加入不同濃度之 indazole 類緣化合物或不加入化合物(basal 組)，且在每一組都加 VEGF (除了 basal 組)來誘使 DNA 合成，然後以 [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation 偵測 DNA 的生長

### 2. 抑制 tube 生成：

利用 VEGF 於 Human umbilical vein endothelial cells (HUVEs；人體臍帶靜脈內皮細胞)中作用，可使細胞重新組合進行分化作用形成管柱的結構。而以 indazole 類緣化合物處理後(除了 basal 和 control 組)，由 VEGF 所誘導內皮細胞產生的分化作用可被阻斷其網狀結構，且由 MTT 試劑作染色，拍照存證。

### 3. 抑制血管增生之定量性活性測試：

以皮下注射方式將含有 150 ng/mL VEGF 之 Matrigel plug 打入裸鼠左下腹部，然後將 Vehicle 或一系列化合物以口服的方式讓裸鼠服用 7 天，之後將裸鼠犧牲，剪下 Matrigel 部位並拍照存證，檢視化合物有無抑制血管增生作用。並使用 hemoglobin detection kit (購自 Sigma Chem. Co.)做 Hemoglobin 之含量測定，將血管新生作用量化。

### (三) 細胞致毒活性試驗方法

~人類前骨髓性血癌細胞(HL-60 cells)增殖作用(proliferation)實驗~

#### 1. 細胞培養與前處理：

Indazole 類緣化合物用 DMSO 溶解；並將一系列不同濃度之化合物儲放於  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱，待加藥時再解凍。DMSO 之最後濃度需控制在 0.1 % 以下，以避免 DMSO 本身對 HL-60 cells 之影響<sup>45</sup>。HL-60 cells ( $1 \times 10^5/\text{mL}$ ) 培養於 24-well 之培養皿中使總體積為 1 mL/well；並加入各種不同濃度之化合物於溫度  $37^{\circ}\text{C}$ 、溼度 95 %、5 %  $\text{CO}_2$  之培養相中培養 24 小時之後，分別取出作 MTT-proliferation assay 實驗。

#### 2. MTT-proliferation assay：

首先自每個 well 取出已去培養基之  $50 \mu\text{L}$  細胞培養液置入 96-well plate 中，加入  $10 \mu\text{L}$  MTT solution 於  $37^{\circ}\text{C}$  培養箱培養 4 小時；取出後再使用 DMSO ( $150 \mu\text{L}/\text{well}$ ) 溶解細胞之紫黑色顆粒，最後以 ELASA reader 於波長  $570 \text{ nm}$  之條件測得  $\text{OD}_{570}$  值<sup>46,47</sup>。

$$\text{Proliferation (\%)} = \text{Sample } \text{OD}_{570} / \text{Cont. } \text{OD}_{570} \times 100 \%$$

## 參考文獻

1. Murray, R. K.; Granner, D. K.; Mayes, P. A.; Rodwell, V. W. Harper's Biochemistry, 24<sup>th</sup> ed.; Prentice-Hall International, Inc.: London, 1996; p 707-731.
2. Gonzalez, E. R. Antiplatelet Therapy in Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Clin. Therapeutics*. **1998**, *20*, supplement 2, B18-41.
3. Bang, N. U.; Wilson, D. B. Normal Platelet Function and Antiplatelet Drugs. *ACC Cur. J. Rev.* **1999**, *8*, 13-16.
4. Haskell, C. M. Cancer Treatment, 5<sup>th</sup> ed.; W. B. Saunders Co.: Philadelphia, 2001; p 2-29, 98-99, 480-481.
5. Abeloff, M. D.; Armitage, J. O.; Lichter, A. S.; Niederhuber, J. E. Clinical Oncology, 2<sup>th</sup> ed.; Churchill Livingstone: Philadelphia, 2000; p 10-53, 242-250.
6. DeVita Jr, V. T.; Hellman, S.; Rosenberg, S. A. Cancer Principles & Practice of Oncology, 6<sup>th</sup> ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 2001; p 137-147.
7. Goldsack, N. R.; Chambers, R. C.; Dabbagh, K.; Laurent, G. J. Molecules in Focus Thrombin. *Intern. J. Biochem. & Cell Biol.* **1998**, *30*, 641-646.
8. Ray, A.; Hegde, L. G.; Gupta, J. B. Related Articles Thrombin Receptor: A Novel Target for Antiplatelet Drug Development. *Thromb. Res.* **1997**, *87*, 37-50.
9. Macfarlane, S. R.; Seatter, M. J.; Kanke, T.; Hunter, G. D.; Plevin, R. Related Articles Proteinase-activated Receptors. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 245-282.
10. Dery, O.; Corvera, C. U.; Steinhoff, M.; Bunnett, N. W. Related Articles Proteinase-activated Receptors: Novel Mechanisms of Signaling by Serine Proteases. *Am. J. Physiol.* **1998**, *274*, c1429-1452.

11. Cupit, L. D.; Schmidt, V. A.; Bahou, W. F. Related Articles Proteolytically Activated Receptor-3. A Number of an Emerging Gene Family of Protease Receptors Expressed on Vascular Endothelial Cells and Platelets. *Trends Cardiovasc. Med.* **1999**, *9*, 42-48.
12. Xu, W. F.; Andersen, H.; Whitmore, T. E.; Presnell, S. R.; Yee, D. P.; Ching, A.; Gilbert, T.; Davie, E. W.; Foster, D. C. Related Articles, Nucleotide, OMIM, Free in PMC, Protein Cloning and Characterization of Human Protease-activated Receptor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. Sua.* **1998**, *95*, 6642-6646.
13. Kahn, M. L.; Zheng, T. W.; Huang, W.; Bigornia, V.; Zeng, D.; Moff, S.; Farese Jr, R. V.; Tam, C.; Coughlin, S. R. Related Articles, Nucleotide, OMIM, Protein a Dual Thrombin Receptor Sysem for Platelet Activation. *Nature.* **1998**, *394*, 690-694.
14. Kahn, M. L.; Nakanishi-Matsui, M.; Shapiro, M. J.; Ishihara, H.; Coughlin, S. R. Related Articles, Protein Protease-activated Receptors 1 and 4 Mediate Activation of Human Platelets by Thrombin. *J. Clin. Invest.* **1999**, *103*, 879-887.
15. Hannig, E.; Kollmorgen, C.; Geipel, I. The Preparation of Some Derivatives of 5-Methylindazole-3-carboxylic Acid. *Pharmazie.* **1973**, *28*, 720-723.
16. Hannig, E.; Kollmorgen, C.; Dressel, M. Various Derivatives of 1-Benzyl-6-aminoindazole. *Pharmazie.* **1974**, *29*, 685-687.
17. Ina, S.; Inoue, S.; Noguchi, T. N-heterocyclic Compounds. I. Facile Synthesis of 5,6-dialkoxy-2-aryI-2H-indazoles (author's transl). *Yakugaku Zasshi.* **1975**, *95*, 1245- 1249.
18. Corsi, G.; Palazzo, G. 1-Halobenzyl-1H-indazole-3-carboxylic Acid. A New Class of Antispermatic agents. *J. Med. Chem.* **1976**, *19*, 778-783.
19. Bistocchi, G. A.; De Meo, G.; Pedini, M.; Ricci, A.; Brouilhet, H.; Boucherie, S.; Rabaud, M.; Jacquignon, P. N<sup>1</sup>-Substituted 1H-indazole-3-ethyl Carboxylates and 1H-Indazole-3-hydroxamic Acids. *Farmaco –Edizione Scientifica.* **1981**, *36*, 315-333.

20. Conway, G. A.; LoefEler, L. J.; Hall, I. H. Synthesis and Antitumor Evaluation of Selected 5,6-Disubstituted 1(2)*H*-indazole-4,7-diones. *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 876-884.
21. Cecchi, L.; Melani, E; Filacchioni, G.; Tredici, M. Synthesis and Biological Activity of Some 3-(Pyrazol-1'-yl)indazole Derivatives. *Farmaco - Edizione Scientifica.* **1984**, *39*, 945-952.
22. Mosti, L.; Menozzi, G.; Schenone, P.; Molinario, L.; Conte, F.; Montanario, C.; Marmoe, E. Acetic Acids Bearing the 1-Phenyl-1*H*-indazole Nucleus with Analgesic and Anti-inflammatory Activity. *Farmaco - Edizione Scientifica.* **1988**, *43*, 763-774.
23. Mosti, L; Menozzi, G.; Schenone, P.; Cervo, D.; Esposito, G.; Marmoe, E. 4-Substituted 1-Phenyl-1*H*-indazoles with Analgesic, Anti-inflammatory, Antipyretic and Local Anesthetic Activities. *Farmaco.* **1990**, *45*, 415-429.
24. Robertson, D. W.; Bloomquist, W.; Cohen, M. L.; Reid, L. R.; Schenck, K.; Wong, D. T. Synthesis and Biochemical Evaluation Tritium-labeled 1-Methyl-*N*-(8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-yl)-1*H*-indazole-3-carboxamide, A Useful Radioligand for 5-HT<sub>3</sub> Receptors. *J. Med Chem.* **1990**, *33*, 3176-3181.
25. Wrzeciono, U.; Linkowska, E.; Majewska, K.; Gzella, A.; Stochla, K. Synthesis and Anti-inflammatory Activity of Some Indazole Derivatives. 36. Azoles. *Pharmazie.* **1993**, *48*, 582-584.
26. Perni, R. B.; Wentland, M. P.; Huang, J. I.; Powles, R. Aldous, G.; S.; Klingbeil, K. M.; Peverly, A. D.; Robinson, R. G.; Corbett, T. H.; Jones, J. L.; Mattes, K. C.; Rake, J. B; Coughlin, S. A. Synthesis and Antitumor Activity of 4-Aminomethylthioxanthenone and 5-Aminomethylbenzothiopyrano-indazole Derivatives. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3645-3654.
27. Andronati, S.; Sava, V.; Mekan, S.; Kolodeev, G. Synthesis of 3-Aryl-1-[(4-phenyl-1-piperazinyl)butyl]indazole Derivatives and Their Affinity to 5-HT<sub>1A</sub> Serotonin and Dopamine D<sub>1</sub> receptors. *Pharmazie.* **1999**, *54*, 99-101.
28. Song, J. J.; Yee, N. K. A Novel Synthesis of 2-Aryl-2*H*-indazoles via a Palladium-catalyzed Intramolecular Amination Reaction. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 519-521.
29. Isin, E. M.; de Jonge, M.; Jr. Castagnoli, N. Studies on Synthetic Approaches to

- 1*H*- and 2*H*-Indazolyl Derivatives. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 4220-4226.
30. Richard, H. W. Pyrazoles, Pyrazolines, Pyrazolidines, Indazoles and Condensed Rings.; Interscience Publishers: New York, 1967, Pt. 3, p 289-382.
31. Gladstone, W. A. F. *J. Chem. Soc.* **1965**, 3048-3050.
32. Yashina, S.; Tanaka, A.; Kuo, S. C. *Yakugaku Zasshi.* **1977**, 97, 955-961.
33. Lee, F. Y.; Lien, J. C.; Huang, L. J.; Huang, T. M.; Tsai, S. C.; Teng, C. M.; Wu, C. C.; Cheng, F. C.; Kuo S. C. Synthesis of 1-Benzyl-3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)indazole Analogues as Novel Antiplatelet Agents. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 3746-3749.
34. Wu, C. C.; Huang, S. W.; Hwang T. L.; Kuo S. C.; Lee F. Y.; Teng C. M. YD-3, A Novel Inhibitor of Protease-induced Platelet Activation. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, 130, 1289-1296.
35. Seiler, S. M. Related Articles Thrombin Receptor Antagonists. *Semi. Thromb. Hemost.* **1996**, 22, 223-231.
36. Wu, C. C.; Hwang, T. L.; Liao, C. H.; Kuo, S. C.; Lee, F. Y.; Lee, C. Y.; Teng, C. M. Selective Inhibition of Protease-activated Receptor 4-dependent Platelet Activation by YD-3, *Thromb. Haemost.* **2002**, 87, 1026-33.
37. McCrae, W. Basic Organic Reaction.; Heyden & Son Inc.: New York, 1973; p 80-82.
38. Norman, R. Organic Synthesis, 2<sup>th</sup> ed.; John Wiley & Sons, Inc.: New York, 1967; Col. Vol. 4. p 536-539.
39. 李芳裕, 3-(5'-羥甲基-2'-噻吩基)-1-苯甲基噻吩類緣化合物之合成及其抗血小板活性, 中國醫藥學院藥物化學研究所博士論文, **1997**。
40. Horning, E. C. Organic. Synthesis.; John Wiley & Sons, Inc.: New York, 1957; Col. Vol. 3. p 740-741.
41. Blatt, A. H. Organic Synthesis, 7<sup>th</sup> ed.; John Wiley & Sons, Inc.: New York, 1955;

Col. Vol. 2. p 135-136.

42. a) Wuehrmenn, H. Ger. Patent 2, 307, 292, 1973.  
b) Matsude, H.; Mori H. and Matoba, H. Jpn. Patent 2, 263, 879 , 1973.  
c) Rosenberg, R. Ger. Patent 2, 115, 945, 1971.  
d) Chu , V. and Cohen, A. Fr. Patent 2, 001, 923, 1969.
43. Howell, J. B. L.; Altounyan, R. E. C. *Lancet*. **1967**, 2, 539.
44. Teng, C. M.; Chen, W. Y.; Ko, W.C.; Ouyang, C. Antiplatelet Effect of Butylindenepthalide. *Biochem. Biophys. Acta*. **1987**, 924, 375-382.
45. Lopez-Lluch, G.; Buron, M. I.; Alcain, F. J.; Quesada, J. M.; Navas, P. Redox Regulation of Camp Levels by Ascorbate in 1,25-Dihydroxy-vitamine D<sub>3</sub>-induced Differentiation of HL-60 Cells. *Biochem. J*. **1998**, 331(Pt. 1), 21-27.
46. He, Q.; Jiang, D. A Novel Aminosteroid is Active for Proliferation Inhibition and Differentiation Induction of Human Acute Myeloid Leukemia HL-60 Cells. *Leuk. Res*. **1999**, 23(4), 369-372.
47. Berridge, M. V.; Tan, A. S. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Arch. Biochem. Biophys*. **1993**, 303, 474-482.