

3-Allylthio-6-heterocyclalalkylaminopyridazine 유도체 합성 및 SK-Hep-1 인간간암세포에 대한 항암효과

권순경* · 이명숙

덕성여자대학교 약학대학

(Received November 1, 2005; Revised November 29, 2005)

Synthesis of 3-Allylthio-6-heterocyclalalkylaminopyridazine Derivatives and their Anti-tumor Activities Against SK-Hep-1 Human Liver Cancer Cells

Soon-Kyoung Kwon* and Myung-Sook Lee

College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

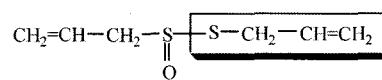
Abstract — Allylthio group of allicin and other organosulfur compounds which are isolated from garlic is considered as a pharmacophore, a key structure component of the molecule which is responsible biological activities. In the foregoing studies various 3-allylthio-6-alkoxy-pyridazine derivatives (K-compounds) and 3-allylthio-6-alkylthio-pyridazine derivatives (Thio-K-compounds) were synthesized and their biological activities were tested *in vivo*. They showed good hepatoprotective activities on the carbon tetrachloride-treated mouse and aflatoxin B1-treated rat and chemopreventive activities on hepatocarcinoma cells in rat as expected. Now 3-allylthio-6-heterocyclalalkylaminopyridazine derivatives that the oxygen atom at 6-position of 3-allylthio-6-alkoxy-pyridazine is replaced by nitrogen (N) were synthesized and their activities were tested *in vitro* against SK-Hep-1 human liver cancer cells. They showed good chemopreventive activities on hepatocarcinoma cells.

Keywords □ allylthiopyridazine, heterocyclalalkylaminopyridazine, antihepatocarcinoma, chemopreventive activity

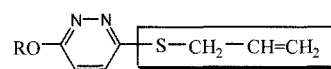
마늘은 예부터 각종 성인질환 예방치료에 사용되어 왔고 또한 과학적인 연구로 그 효과가 입증된 바 있다.^{1,2)} 마늘의 주성분인 allicin을 비롯한 많은 유기유황화합물들은 모두 allylthio기를 갖고 있으며 마늘의 약리효과와 관련이 있는 약리단은 allylthio group일 것으로 추정되고 있다.³⁾

선행연구에서 pharmacophore로 추정되는 allylthio기를 pyridazine 헤테로 고리에 도입한 각종 유도체를 합성하여 약리 활성을 검색한 바 있다.⁴⁻¹⁰⁾ 즉 allylthio기에 대한 *para* 위치에 할로젠이나 alkoxy기를 도입시킨 유도체를 다수 합성하여 CCl₄로 처리한 마우스나 또는 aflatoxin B1으로 처리한 랫트에서 간 보호작용을 검색한 결과 alkoxy를 갖는 유도체에서 좋은 활성을 나타냈다.^{11,12)} 뿐만 아니라 3-alkoxy-6-allylthiopyridazine(K-6)은 *in vitro*와 *in vivo*에서 SK-Hep-1 간암세포의 성장을 억제 할 뿐만 아니라 *in vivo*에서 부작용이 적다는 사실이 밝혀졌다.¹³⁻¹⁶⁾ 또

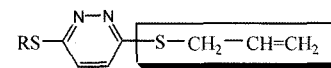
한 alkoxy의 산소(O) 원자 대신에 유황(S) 원자를 도입시킨 alkylthio기를 갖는 allylthiopyridazine 유도체도 SK-Hep-1 간암 세포의 성장을 억제 했다.¹⁷⁾ 본 연구에서는 alkoxy의 산소(O) 대신에 질소(N)를 도입한 유도체를 합성했으며 특히 헤테로고리 치환 ethylamino기를 도입한 화합물(Amino-K-compounds)이 *in*



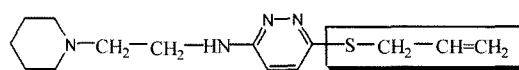
Allicin



K-compounds



Thio-K-compounds



5b

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-901-8393 (팩스) 02-901-8386
(E-mail) skkwon@duksung.ac.kr

*vitro*에서 SK-Hep-1 인간간암세포에 대한 항암활성을 검색한 결과 저농도에서 alkoxy 유도체(K-compounds)나 alkylthio 유도체(Thio-K-compounds) 보다 항암활성이 더 높게 나타났다.

실험 방법

시약 및 기기

용점측정은 Buchi 535 Melting Point apparatus를 사용하였다. NMR spectrum은 Bruker사의 300 MHz NMR spectrometer를 사용하여 proton과 carbon nuclear resonance를 측정하였고 용매로는 Acetone-d₆, CDCl₃, DMSO-d₆을 사용하였으며, 이때 모든 화학 이동들은 TMS를 reference로 하여 ppm단위로 기록하였다. Multiplicity는 s=singlet, d=doublet, t=triplet, q=quartet, m=multiplet으로 약하여 표시하였다. IR Spectrum은 Perkin-Elmer FT-IR Spectrometer Spectrum GX를 사용하여 NaCl cell 및 nujol 용액으로 측정하였다. GC-MS는 Agilent 6890 GC 및 5973 MS를 사용하였다. 반응의 진행은 Silica-gel 60F 254로 피막된 TLC plate를 이용하여 *n*-hexane : ethyl acetate(5 : 1, 2 : 1, 1 : 1), *n*-hexane : ethyl acetate : methanol(1 : 1 : 0.5), chloroform : methanol(10 : 1) 및 methylene chloride : methanol(9 : 1)로 전개시켰으며, spot은 UV light로 확인하였다. Column chromatography는 silica gel 60 Å(70~230 mesh, Merck)을 사용하였다.

3-Allylthio-6-chloropyridazine(2)의 합성

무수 methanol 80 ml에 Na 금속 1.149 g(0.05 mol)을 녹이고 2-propene-1-thiol 4.165 ml(0.05 mol)을 가해 완전히 용해시켰다. 이 혼합물을 완전히 냉각한 후 3,6-dichloropyridazine(1) 7.449 g(0.05 mol)을 가하고 3시간 동안 실온에서 교반하였다.^{4,5)} 반응을 종결한 후 감압농축하여 ethyl acetate 40 ml와 물 20 ml를 가하여 추출한 후 유기층만 분리하였으며 이 유기층을 물로 다시 한번 세척하였다. 유기층을 무수 sodium sulfate로 건조시킨 후 감압농축하여 황색의 조결정을 얻었다.

Yield : 9.08 g(97.3%), Formula C₇H₇N₂SCl(M.W. 186.66), mp 68~70°C, ¹H NMR(DMSO-d₆) 7.76(d, J=7.9 Hz, 2H, aromatic), 6.01~5.89(m, 1H, CH=), 5.36(d, J=7.9 Hz, 1H, =CH), 5.16(d, J=10.2 Hz, 1H, =CH), 3.96(d, J=6.6 Hz, 2H, SCH₂). ¹³C NMR(DMSO-d₆) 162.01, 153.74(aromatic), 133.23(=CH₂), 129.52, 128.53(aromatic), 118.92(CH=), 32.62(SCH₂). FT-IR(NaCl) cm⁻¹ 3060(aromatic), 1564(N=N), 736(C-Cl). GC-MS: m/z(%) 186.66(M⁺) 171.1(100.0), 173.0(51.9), 73.1(27.8), 118.1(22.4), 153.1(21.7).

3-Allylthio-6-phenylmethylaminopyridazine(3a)의 합성

3-Allylthio-6-chloropyridazine(2) 1.12 g(6.0 mmol)에 *n*-butanol

10 ml 가하고 교반하면서 녹인 후 ammonium chloride 0.32 g(6.0 mmol)와 benzylamine 2.0 ml(18.0 mmol)를 넣고 48시간 환류시켰다. 반응종결 후 과량의 *n*-butanol을 감압농축하여 제거하고 농축액을 10% K₂CO₃ 50 ml 녹인 후 ethyl acetate 40 ml 2회 추출했다. Ethyl acetate층을 무수 Na₂SO₄로 건조하여 감압여과하고 ethyl acetate를 감압증류한 후 진한 갈색의 oil상 물질을 얻었다. 이 잔류물을 column chromatography(silicagel, solvent; *n*-hexane : ethyl acetate=2 : 1)로 분리하여 갈색의 powder(3a)를 얻었다.

Yield : 0.45 g(29.1%), Formula C₁₄H₁₅N₃S(M.W. 257.36), mp 65.7~67.1°C, ¹H NMR(CDCl₃) δ 7.26~7.35(m, 5H, -C₆H₅), 7.03(d, J=9.3 Hz, 1H, CH, pyridazine), 6.53(d, J=9.3 Hz, 1H, CH, pyridazine), 5.92~6.06(m, 1H, =CH), 5.26(d, J=17.1 Hz, 1H, CH₂=), 5.09(d, J=10.5 Hz, 1H, CH₂=), 4.95(s, 1H, NH), 4.60(d, J=5.7 Hz, 2H, SCH₂). ¹³C NMR(CDCl₃) δ 157.06, 151.12, 138.51, 133.66(pyridazine), 128.73, 128.29, 127.70, 117.75(C₆H₅), 127.52(=CH), 114.54(CH₂=), 46.13(CH₂), 33.66(SCH₂). FT-IR(NaCl) cm⁻¹ 3435(N-H), 3054(aromatic), 1421(C=N), 1265(C-N). GC-MS m/z(%) 93.10(100.00), 243.00(66.74), 39.10(48.63), 92.10(39.72), 41.20(30.36).

3-Allylthio-6-phenylethylaminopyridazine(3b)의 합성

3-Allylthio-6-chloropyridazine(2) 1.12 g(6.0 mmol)에 *n*-butanol 10 ml 가하고 교반하면서 녹인 후 ammonium chloride 0.32 g(6.0 mmol)와 phenethylamine 2.3 ml(18.0 mmol)를 넣고 30시간 환류시켰다. 3a의 합성방법과 동일하게 처리하여 갈색의 powder(3b)를 얻었다.

Yield : 0.64 g(39.3%), Formula C₁₅H₁₇N₃S(M.W. 271.39), mp 48.0~50.0°C, ¹H NMR(CDCl₃) δ 7.20~7.31(m, 5H, -C₆H₅), 7.02(d, J=9.3 Hz, 1H, CH, pyridazine), 6.46(d, J=9.3 Hz, 1H, CH, pyridazine), 5.96~6.05(m, 1H, =CH), 5.27(d, J=17.1 Hz, 1H, CH₂=), 5.10(d, J=9.9 Hz, 1H, CH₂=), 4.48(s, 1H, NH), 3.90(d, J=7.2 Hz, 2H, SCH₂), 3.71(q, J=12.6 Hz, 2H, CH₂), 2.96(t, J=6.9 Hz, 2H, CH₂). ¹³C NMR(CDCl₃) δ 156.95, 150.84, 139.04, 133.72(pyridazine), 128.86, 128.65, 128.22, 117.72(C₆H₅), 126.51(=CH), 114.75(CH₂=), 42.95(CH₂), 35.36(CH₂), 33.65(SCH₂). FT-IR(NaCl) cm⁻¹ 3434(N-H), 3053(aromatic), 1554(N=N), 1423(C=N), 1265(C-N). GC-MS m/z(%) 256.00(100.00), 91.10(27.48), 105.10(20.34), 79.10(19.86), 152.00(18.86).

3-Allylthio-6-phenylpropylaminopyridazine(3c)의 합성

3-Allylthio-6-chloropyridazine(2) 1.12 g(6.0 mmol)에 *n*-butanol 10 ml 가하고 교반하면서 녹인 후 ammonium chloride 0.32 g(6.0 mmol)와 3-phenylpropylamine 1.8 ml(13.0 mmol) 넣고 48

시간 환류시켰다. **3a**의 합성방법과 동일하게 처리하여 갈색의 powder(**3c**)를 얻었다.

Yield : 0.62 g(36.2%), Formula $C_{16}H_{19}N_3S$ (M.W. 285.41), mp 39.0~39.4°C, 1H NMR($CDCl_3$) δ 7.17~7.28(m, 5H, $-C_6H_5$), 7.02(d, $J=9.0$ Hz, 1H, CH, pyridazine), 6.45(d, $J=9.3$ Hz, 1H, CH, pyridazine), 5.95~6.01(m, 1H, =CH), 5.26(d, $J=16.8$ Hz, 1H, $CH_2=$), 5.09(d, $J=9.9$ Hz, 1H, $CH_2=$), 4.52(s, 1H, NH), 3.89(d, $J=6.9$ Hz, 2H, SCH_2), 3.43(q, $J=12.9$ Hz, 2H, CH_2), 2.73(t, $J=7.8$ Hz, 2H, CH_2), 1.93~2.03(m, 2H, CH_2). ^{13}C NMR($CDCl_3$) δ 157.19, 150.60, 141.47, 133.74(pyridazine), 128.47, 128.40, 128.27, 117.69(C_6H_5), 126.02(=CH), 114.37($CH_2=$), 41.58(CH_2), 33.69(CH_2), 33.29(SCH_2), 30.93(CH_2). FT-IR(NaCl) cm^{-1} 3272(N-H), 3052(aromatic), 1601(C=C), 1453(C=N), 1265(C-N). GC-MS $m/z(\%)$ 270.10(100.00), 91.10(49.90), 271.10(19.06), 166.00(15.89), 41.20(10.57).

3-Allylthio-6-phenylbutylaminopyridazine(**3d**)의 합성

3-Allylthio-6-chloropyridazine(**2**) 1.12 g(6.0 mmol)에 *n*-butanol 10 ml 가하고 교반하면서 녹인 후 ammonium chloride 0.32 g(6.0 mmol)와 4-phenylbutylamine 2.8 ml(18.0 mmol) 넣고 48시간 환류시켰다. **3a**의 합성방법과 동일하게 처리하여 미백색의 powder(**3d**)를 얻었다.

Yield : 0.75 g(41.7%), Formula $C_{17}H_{21}N_3S$ (M.W. 299.44), mp 55.9~56.6°C, 1H NMR($CDCl_3$) δ 7.15~7.27(m, 5H, $-C_6H_5$), 7.02(d, $J=9.3$ Hz, 1H, CH, pyridazine), 6.48(d, $J=9.0$ Hz, 1H, CH, pyridazine), 5.92~6.06(m, 1H, =CH), 5.26(d, $J=16.8$ Hz, 1H, $CH_2=$), 5.08(d, $J=9.9$ Hz, 1H, $CH_2=$), 4.55(s, 1H, NH), 3.88(d, $J=6.9$ Hz, 2H, SCH_2), 3.41(q, $J=12.3$ Hz, 2H, CH_2), 2.65(t, $J=6.9$ Hz, 2H, CH_2), 1.65~1.73(m, 2H \times 2, $CH_2\times 2$). ^{13}C NMR($CDCl_3$) δ 157.21, 150.50, 142.10, 133.75(pyridazine), 128.40, 128.35, 128.26, 117.68(C_6H_5), 125.83(=CH), 114.41($CH_2=$), 41.91(CH_2), 35.56(CH_2), 33.70(SCH_2), 29.00(CH_2), 28.77(CH_2). FT-IR(NaCl) cm^{-1} 3291(N-H), 3051(aromatic), 1601(C=C), 1452(C=N), 1265(C-N). GC-MS $m/z(\%)$ 284.10(100.00), 91.10(41.47), 285.10(19.51), 152.00(10.69), 299.10(7.31).

3-Allylthio-6-morpholinoethylaminopyridazine(**4b**)의 합성

3-Allylthio-6-chloropyridazine(**2**) 1.12 g(6.0 mmol)에 *n*-butanol 30 ml 가하고 교반하면서 녹인 후 ammonium chloride 0.32 g(6.0 mmol)와 4-(2-aminoethyl)morpholine 2.4 ml(18.0 mmol)를 넣고 48시간 환류시켰다. 반응종결 후 과량의 *n*-butanol을 감압 농축하여 제거하고 농축액을 10% K_2CO_3 50 ml 녹인 후 ethyl acetate 40 ml로 2회 추출했다. 유기층으로 이동된 목적화합물을 10% citric acid로 분리추출하고 다시 수용액층을 K_2CO_3 로 약알

칼리화시킨 후 ethyl acetate 40 ml로 2회 추출했다. 무수 Na_2SO_4 로 건조하여 감압여과하고 ethyl acetate를 감압증류한 후 진한 갈색의 oil상 물질을 얻었다. 이 잔류물을 column chromatography(silicagel, solvent; *n*-hexane : ethyl acetate : methanol=1 : 1 : 0.5)로 분리하여 갈색의 powder(**4b**)를 얻었다.

Yield : 0.27 g(16.1%), Formula $C_{13}H_{20}N_4OS$ (M.W. 280.39), mp 57.4~59.1°C, 1H NMR($CDCl_3$) δ 7.03(d, $J=9.3$ Hz, 1H, CH, pyridazine), 6.60(d, $J=6.6$ Hz, 1H, CH, pyridazine), 5.94~6.00(m, 1H, =CH), 5.22~5.29(m, 2H, NH+ $CH_2=$), 5.08(d, $J=9.9$ Hz, 1H, $CH_2=$), 3.87(d, $J=6.9$ Hz, 2H, SCH_2), 3.70(t, $J=4.5$ Hz, 2H \times 2, $CH_2\times 2$, morpholine), 3.51(q, $J=11.7$ Hz, 2H, CH_2), 2.64(t, $J=6.0$ Hz, 2H, CH_2), 2.48(t, $J=4.5$ Hz, 2H \times 2, $CH_2\times 2$, morpholine). ^{13}C NMR($CDCl_3$) δ 156.38, 133.69, 117.65(pyridazine), 128.10(=CH), 115.25($CH_2=$), 66.85, 53.30(morpholine), 56.92(CH_2), 37.80(CH_2), 33.63(SCH_2), 14.84(CH_3), 12.13(CH_3). FT-IR(NaCl) cm^{-1} 3434(N-H), 3054(aromatic), 1550(N=N), 1421(C=N), 1265(C-N). GC-MS $m/z(\%)$ 100.10(100.00), 56.10(27.64), 42.10(22.97), 70.10(22.62), 113.10(16.27).

3-Allylthio-6-morpholinopropylaminopyridazine(**4c**)의 합성

3-Allylthio-6-chloropyridazine(**2**) 1.12 g(6.0 mmol)에 *n*-butanol 10 ml 가하고 교반하면서 녹인 후 ammonium chloride 0.32 g(6.0 mmol)와 3-morpholinopropylamine 2.6 ml(18.0 mmol) 넣고 30시간 환류시켰다. **4b**의 합성방법과 동일하게 처리하여 갈색의 powder(**4c**)를 얻었다.

Yield : 0.25 g(14.1%), Formula $C_{14}H_{22}N_4OS$ (M.W. 294.42), mp 49.4~51.2°C, 1H NMR($CDCl_3$) δ 7.02(d, $J=9.3$ Hz, 1H, CH, pyridazine), 6.52(d, $J=9.0$ Hz, 1H, CH, pyridazine), 5.93~6.06(m, 1H, =CH), 5.78(s, 1H, NH), 5.25(d, $J=16.2$ Hz, 1H, $CH_2=$), 5.08(d, $J=9.9$ Hz, 1H, $CH_2=$), 3.88(d, $J=7.2$ Hz, 2H, SCH_2), 3.72(t, $J=4.8$ Hz, 2H \times 2, $CH_2\times 2$, morpholine), 3.46~3.53(m, 2H, CH_2), 2.45~2.52(m, 2H \times 3, $CH_2\times 3$, morpholine), 1.78~1.86(m, 2H, CH_2). ^{13}C NMR($CDCl_3$) δ 157.23, 150.27, 133.77, 117.64(pyridazine), 128.17(=CH), 114.75($CH_2=$), 67.07, 53.73(morpholine), 57.54(CH_2), 41.50(CH_2), 25.03(CH_2), 33.69(SCH_2). FT-IR(NaCl) cm^{-1} 3435(N-H), 3053(aromatic), 1552(N=N), 1421(C=N), 1265(C-N). GC-MS $m/z(\%)$ 100.10(100.00), 166.00(67.51), 42.10(63.16), 56.10(56.40), 41.20(49.08).

3-Allylthio-6-piperidinyethylaminopyridazine(**5b**)의 합성

3-Allylthio-6-chloropyridazine(**2**) 1.12 g(6.0 mmol)에 *n*-butanol 10 ml 가하고 교반하면서 녹인 후 ammonium chloride 0.32 g(6.0 mmol)와 1-(2-aminoethyl) piperidine 2.6 ml(18.0 mmol)를 넣고 48시간 환류시켰다. **4b**의 합성방법과 동일하게 처리하여 갈

색의 powder(5b)를 얻었다.

Yield : 0.45 g(26.9%), Formula $C_{14}H_{22}N_4S$ (M.W. 278.42), mp 34.0~36.0°C, 1H NMR($CDCl_3$) δ 7.01(d, $J=9.3$ Hz, 1H, CH, pyridazine), 6.58(d, $J=9.3$ Hz, 1H, CH, pyridazine), 5.93~6.06(m, 1H, =CH), 5.39(s, 1H, NH), 5.26(d, $J=17.7$ Hz, 1H, $CH_2=$), 5.08(d, $J=10.2$ Hz, 1H, $CH_2=$), 3.88(d, $J=6.9$ Hz, 2H, SCH_2), 3.49(q, $J=11.1$ Hz, 2H, CH_2), 2.59(t, $J=6.0$ Hz, 2H, CH_2), 2.43(s, 2H \times 2, $CH_2\times 2$, piperidine), 1.54~1.60(m, 2H \times 2, $CH_2\times 2$, piperidine), 1.44~1.46(m, 2H, CH_2 , piperidine). ^{13}C NMR($CDCl_3$) δ 157.08, 150.29, 128.00, 117.59(pyridazine), 133.18(=CH), 115.29($CH_2=$), 57.13(CH_2), 54.27, 24.32, 21.04 (piperidine), 38.16(CH_2), 33.61(SCH_2). FT-IR(NaCl) cm^{-1} 3391(N-H), 3053(aromatic), 1544(N=N), 1265(C-N). GC-MS m/z (%) 98.20(100.00), 111.10(23.94), 41.20(11.57), 99.10(9.69), 55.20(9.66).

3-Allylthio-6-pyrrolidinylethylaminopyridazine(6b)의 합성

3-Allylthio-6-chloropyridazine(2) 1.12 g(6.0 mmol)에 *n*-butanol 10 ml 가하고 교반하면서 녹인 후 ammonium chloride 0.32 g(6.0 mmol)와 1-(2-aminoethyl) pyrrolidine 2.2 ml(18.0 mmol) 넣고 48시간 환류시켰다. 4b의 합성방법과 동일하게 처리하여 갈색의 powder(6b)를 얻었다.

Yield : 0.28 g(17.7%), Formula $C_{13}H_{20}N_4S$ (M.W. 264.39), mp 70.3~74.5°C, 1H NMR($CDCl_3$) δ 7.01(d, $J=9.3$ Hz, 1H, CH, pyridazine), 6.55(d, $J=9.3$ Hz, 1H, CH, pyridazine), 5.94~6.07(m, 1H, =CH), 5.26(d, $J=17.1$ Hz, 1H, $CH_2=$), 5.20(s, 1H, NH), 5.09(d, $J=10.2$ Hz, 1H, $CH_2=$), 3.89(d, $J=6.9$ Hz, 2H, SCH_2), 3.52(q, $J=11.7$ Hz, 2H, CH_2), 2.74(t, $J=6.0$ Hz, 2H, CH_2), 2.52~2.57(m, 2H \times 2, $CH_2\times 2$, pyrrolidine), 1.76~1.81 (m, 2H \times 2, $CH_2\times 2$, pyrrolidine). ^{13}C NMR($CDCl_3$) δ 157.05, 150.41, 128.00, 117.63(pyridazine), 133.80(=CH), 115.32($CH_2=$), 54.58(CH_2), 53.86, 23.46(pyrrolidine), 40.25(CH_2), 33.59(SCH_2). FT-IR(NaCl) cm^{-1} 3070(aromatic), 1500(N=N). GC-MS m/z (%) 84.10(100.00), 97.10(32.89), 42.10(22.48), 96.10(10.60), 41.20 (9.23).

3-Allylthio-6-[(2-pyridyl)methylamino]pyridazine(7a)의 합성

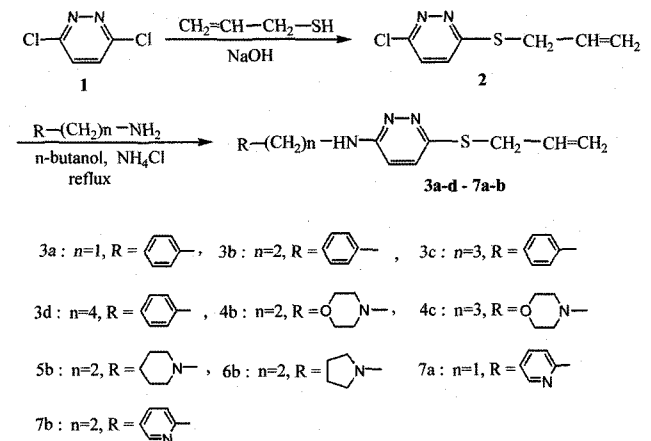
3-Allylthio-6-chloropyridazine(2) 1.12 g(6.0 mmol)에 *n*-butanol 30 ml 가하고 교반하면서 녹인 후 ammonium chloride 0.32 g(6.0 mmol)와 2-(aminomethyl)pyridine 1.24 ml(12.0 mmol) 넣고 48시간 환류시켰다. 반응종결 후 과량의 *n*-butanol을 감압농축하여 제거하고 농축액을 10% K_2CO_3 50 ml 녹인 후 ethyl acetate 40 ml로 2회 추출했다. 유기층으로 이동된 목적화합물을

10% citric acid로 분리추출하고 다시 수용액을 K_2CO_3 로 약알칼리화시킨 후 ethyl acetate 40 ml로 2회 추출했다. 무수 Na_2SO_4 로 건조하여 감압여과하고 ethyl acetate를 감압증류한 후 진한 갈색의 oil상 물질을 얻었다. 2a와 동일방법으로 처리하여 얻은 oil상 물질을 column chromatography(silicagel, solvent; *n*-hexane : ethyl acetate=1 : 1)로 분리하여 갈색의 powder(7a)를 얻었다.

Yield : 0.31 g(20.0%), Formula $C_{13}H_{14}N_4S$ (M.W. 258.35), mp 94.0~98.0°C, 1H NMR($CDCl_3$) δ 8.55(d, $J=4.5$ Hz, 1H, CH, pyridine), 7.66(t, $J=7.5$ Hz, 1H, CH, pyridine), 7.29(d, $J=7.8$ Hz, 1H, CH, pyridine), 7.20(t, $J=6.0$ Hz, 1H, CH, pyridine), 7.04(d, $J=9.0$ Hz, 1H, CH, pyridazine), 6.66(d, $J=9.3$ Hz, 1H, CH, pyridazine), 5.93~6.08(m, 1H, =CH), 5.88 (s, 1H, NH), 5.27(d, $J=16.9$ Hz, 1H, $CH_2=$), 5.10(d, $J=10.2$ Hz, 1H, $CH_2=$), 4.78(d, $J=5.1$ Hz, 2H, CH_2), 3.90(d, $J=6.9$ Hz, 2H, SCH_2). ^{13}C NMR($CDCl_3$) δ 156.93, 148.92, 122.33, 122.25, 117.70(pyridine), 156.62, 151.07, 136.73, 128.11 (pyridazine), 133.76(=CH), 115.62($CH_2=$), 46.54(SCH_2), 33.58 (NH CH_2). FT-IR(NaCl) cm^{-1} 3399(N-H), 3053(aromatic), 1594 (N=N), 1421(C=N), 1265(C-N). GC-MS m/z (%) 93.10(100.00), 243.00(54.92), 39.10(49.07), 92.10(37.73), 107.10(27.91).

3-Allylthio-6-[(2-pyridyl)ethylamino]pyridazine(7b)의 합성

3-Allylthio-6-chloropyridazine(2) 1.12 g(6.0 mmol)에 *n*-butanol 30 ml 가하고 교반하면서 녹인 후 ammonium chloride 0.32 g(6.0 mmol)와 2-(2-aminoethyl)pyridine 1.44 ml(12.0 mmol) 넣고 48시간 환류시켰다. 6a의 합성방법과 동일하게 처리하여 얻은 oil상 물질을 column chromatography(silicagel, solvent; *n*-hexane : ethyl acetate : methanol=1 : 1 : 0.5)로 분리하여 갈색의 oil상 물질(7b)을 얻었다.



Scheme 1 - Synthesis of 3-allylthio-6-aralkylaminopyridazine derivatives.

Yield : 0.13 g(8.0%), Formula $C_{14}H_{16}N_4S$ (M.W. 272.37), 1H NMR($CDCl_3$) δ 8.51(d, $J=4.5$ Hz, 1H, CH, pyridine), 7.59(d, $J=7.8$ Hz, 1H, CH, pyridine), 7.01~7.19(m, 1H \times 2, CH \times 2, pyridine), 6.94(d, $J=23.4$ Hz, 1H, CH, pyridazine), 6.56(d, $J=9.3$ Hz, 1H, CH, pyridazine), 5.92~6.04(m, 1H, =CH), 5.59(s, 1H, NH), 5.25(d, $J=17.4$ Hz, 1H, $CH_2=$), 5.08(d, $J=10.2$ Hz, 1H, $CH_2=$), 3.84~3.89(m, 2H \times 2, $CH_2\times$ 2), 3.12(t, $J=6.6$ Hz, 2H, SCH_2). ^{13}C NMR($CDCl_3$) δ 159.699, 149.11, 123.56, 121.52, 117.63(pyridine), 156.99, 149.43, 136.61, 128.06(pyridazine), 1343.73(=CH), 115.27($CH_2=$), 41.24(SCH_2), 36.55, 33.60($CH_2\times$ 2).

항암작용 검색

사용한 세포주 및 배양조건

Hepatocarcinoma cell인 SK-Hep-1 세포는 Korean Cell Line Bank(Seoul, Korea)에서 구입하였으며 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's Medium) 배지를 사용하여 5% CO_2 를 함유한 37°C 배양기에서 24시간 배양하였다.

MTT assay

96-well plate(Corning costar, USA)에 세포를 1×10^5 cells/well로 도말하여 24시간 배양한 다음, 합성한 화합물을 농도별(0.12, 0.5, 1 mM)로 처리하고 다시 48시간 배양하였다.

합성화합물은 DMSO에 녹여서 100 mM stock solution을 만들고 처리 전에 DMSO로 희석하여 사용하였으며 positive control은 K6 화합물(3-allylthio-6-methoxypyridazine)을 사용하였다.

세포에 합성화합물을 48시간 처리 후, 25 mg/ml의 0.5% MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) 용액을 가한 다음 4시간동안 5% CO_2 항온 배양기에 방치하였다. 세포에 100 μ l의 DMSO를 가한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 control과 비교하였다.

결과 및 고찰

낮은 농도(0.005~0.5 mM)에서 대조약물로 사용한 K-6(3-allylthio-6-methoxypyridazine)보다 간암세포 증식억제작용이 큰 화합물들에 비교그림은 Fig. 1과 같다. 강한 활성을 나타낸 4종 화합물의 구조특성을 살펴보면 pyridazine 핵의 6번 위치에 phenylalkylamines이 결합한 화합물 보다는 piperidine, pyrrolidine, morpholine과 같은 헤테로고리로 치환된 alkylamines이 결합한 화합물이 더 효과가 있음을 알 수 있었다. 4종 모두 alkyl chain 중에서 탄소가 2개인 ethyl기가 붙었다는 공통점이 있었다.

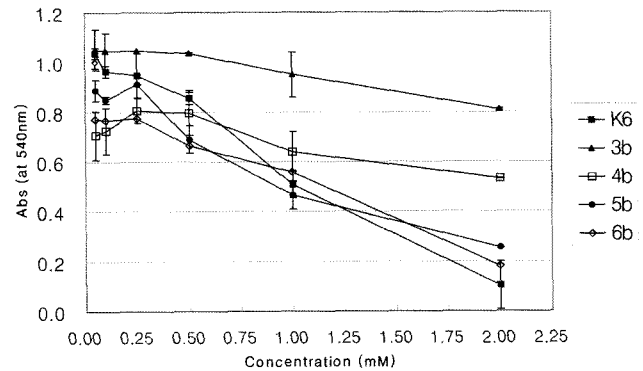


Fig. 1 - Comparison of chemopreventive activities of K6 and 3-allylthio-6-arylethylaminopyridazine compounds.

이러한 효과는 용매로 사용한 DMSO에 대한 화합물들의 용해도와 세포에 분주했을 때 화합물들이 흡수되는 정도와도 연관이 있을 것으로 추정되고 있다.

Pyridazine의 moiety 중 allylthio기가 없는 pyridazine 유도체에서는 항암효과가 없거나 약했으며 allylthio 부분이 항암효과에 중요한 약리단(pharmacophore)임을 확인할 수 있었다. Amino-K-compounds에 대한 전반적인 합성과 항암성 검색결과는 추후 발표예정이다.

감사의 말씀

본 연구는 2005학년도 덕성여자대학교 연구비지원으로 수행되었으며 이에 감사합니다.

문헌

- 1) Fenwick, G. R. and Hanley, A. B. : The Genus *Allium*. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **23**, 1 (1985).
- 2) Block, E. : The organosulfur chemistry of the Genus *Allium* - Implications for the organic chemistry of sulfur. *Angew. Chem. Int. Engl.* **31**, 1135 (1992).
- 3) Kwon, S. K. : Organosulfur compounds from *Allium sativum* and physiological activities. *J. Appl. Pharm.* **11**, 8 (2003).
- 4) Kwon, S. K. and Seoul Pharm. Co. : *Allylthiopyridazine Derivatives and Process for Preparing the Same*. US Patent, 5,942,511 (1999).
- 5) Kwon, S. K. and Seoul Pharm. Co. : *Novel Allylthiopyridazine Derivatives and Process for Preparing the Same*. European Patent, 1,058,681 (2003).
- 6) Lee, J. I., Park, H., Yun, Y. S. and Kwon, S. K. : An efficient synthesis of 3-alkoxy-6-allylthiopyridazine. *J. Kor. Chem. Soc.* **45**, 386 (2001).
- 7) Kwon, S. K., Lee, E. B., Kim, M. K. and Park, Y. N. : Synthesis

- of allylthiopyridazine derivatives and hepatoprotective activities. *Duksung Bull. Pharm. Sci.* **9**, 3 (1998).
- 8) Kwon, S. K. and Kim, M. K. : Synthesis of aryloxyallylthiopyridazine derivatives. *Hakhak Hoeji* **46**, 89 (2002).
- 9) Kwon, S. K. : Synthesis of 4,5-substituted 3-alkoxy-6-allylthiopyridazine derivatives. *Hakhak Hoeji* **46**, 155 (2002).
- 10) Shin, H. S. and Kwon, S. K. : Protective effects of synthetic allylthiopyridazine derivatives on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Dukung Bull. Pharm. Sci.* **13**, 47 (2002).
- 11) Shin, H. S. and Kwon, S. K. : Synthesis of allylthiopyridazine derivatives and inhibition of aflatoxin B1-induced hepatotoxicity in rats. *Arch. Pharm. Res.* **26**, 351 (2003).
- 12) Shin, H. S. and Kwon, S. K. : Hepatoprotective effects of synthetic 3-alkoxy-6-allylthiopyridazine derivatives on aflatoxin B1-induced chronic or acute toxicity. *Duksung Women's University Journal* **32**, 175 (2003).
- 13) Jung, M. Y., Kwon, S. K. and Moon, A. R. : Chemopreventive allylthiopyridazine derivatives induce apoptosis in SK-Hep-1 hepatocarcinoma cells through a caspase-3-dependent mechanism. *Eur. J. Cancer.* **37**, 2104 (2001).
- 14) Lee, E. J., Shin, I. C., Kwon, S. K., Shin, H. S. and Moon, A. R. : Chemopreventive allylthiopyridazines inhibit invasion, migration and angiogenesis in hepatocarcinoma cells. *Int. J. Oncol.* **23**, 1645 (2003).
- 15) Chai, H. Y., Sin, J. S., Moon, A. R., Kwon, S. K. and Kang, J. K. *et al.* : Antitumor activity of pyridazine derivative in nude mice. *Kor. J. Lab. Animal Sci.* **20**, 68 (2004).
- 16) Kwon, S. K. and Moon, A. R. : *In vivo* anti-tumor activity of 3-methoxy-6-allylthiopyridazine in nude mice xenografted with Hep-G2 hepatocarcinoma. *J. Appl. Pharmacol.* **13**, 113 (2005).
- 17) Kwon, S. K. and Moon, A. R. : 3-Alkylthio-6-allylthiopyridazine derivatives and their antihepatocarcinoma activity. *Arch. Pharm. Res.* **28**, 391 (2005).