

การสังเคราะห์สารในกลุ่ม 4-ไฮดรอกซีคูมารินที่มีหมู่แทนที่ ที่ตำแหน่งที่ 3
และฤทธิ์ทางชีวภาพ

นายวิชัย สิริสุขสุคนธ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เคมี ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-333-838-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SYNTHESIS OF 3-SUBSTITUTED-4-HYDROXYCOUMARINS
AND THEIR BIOLOGICAL ACTIVITIES

Mr. Wichai Sirisuksukon

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Chemistry

Department of Chemistry

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 1999

ISBN 974-333-838-1

วิชัย สิริสุขสุคนธ์ : การสังเคราะห์สารในกลุ่ม 4-ไฮดรอกซีคูมารินที่มีหมู่แทนที่ ที่ตำแหน่งที่ 3 และฤทธิ์ทางชีวภาพ (SYNTHESIS OF 3-SUBSTITUTED-4-HYDROXY COUMARINS AND THEIR BIOLOGICAL ACTIVITIES) อ. ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. วรินทร์ ชาศิริ; 133 หน้า. ISBN 974-333-838-1

ได้สังเคราะห์สารในกลุ่ม 4-ไฮดรอกซีคูมารินที่มีหมู่แทนที่ ที่ตำแหน่งที่ 3 สองชนิดได้แก่ ไคคูมารอลและ 3-อัลคิล-4-ไฮดรอกซีคูมาริน สารในกลุ่มไคคูมารอลและสารคล้ายคลึงกันห้าสิบห้า สาร ได้จากปฏิกิริยาคอนเดนเซชันระหว่าง 4-ไฮดรอกซีคูมารินกับอัลดีไฮด์ที่สนใจ สารในกลุ่ม 3-อัลคิล-4-ไฮดรอกซีคูมารินสิบห้าสารสังเคราะห์ได้โดยปฏิกิริยารีดักทีฟแฟรงกแมนเทชันของไคคูมารอล โดยใช้โซเดียมไซยาโนโบโรไฮไดรด์ นำสารเหล่านี้มาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพสามชนิด สำหรับฤทธิ์ ความเป็นพิษต่อโรส่น้ำตาลนั้น พบว่าไคคูมารอลสี่ชนิดได้แก่ [3,3'-(4-*n*-hexyloxy-3-methoxy benzylidene)]bis-, [3,3'-((*E*)-3-phenylprop-2-enylidene)]bis-, [3,3',3'',3'''-(1,5-pentylidene)]tetrakis- และ [(3-(1-hydroxy-2-trichloroethylidene)]-4-hydroxycoumarin แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพสูง และพบว่าโดยทั่วไปสาร 3-อัลคิล-4-ไฮดรอกซีคูมาริน แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูงกว่า ไคคูมารอล ในส่วนของฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย พบว่า สารเหล่านี้แสดงฤทธิ์ด้านอย่างเลือกจำเพาะกับ แบคทีเรียสี่ชนิดได้แก่ *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* และ flat sour spoilage 3-อัลคิล-4-ไฮดรอกซีคูมารินแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่สูงกว่าไคคูมารอล และแสดงฤทธิ์เทียบเคียงได้กับยาปฏิชีวนะสองชนิด สำหรับฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสเอชเอสวี-1 และเอชเอสวี-2 พบว่าไคคูมารอลแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสเอชเอสวี-1 ได้สูงกว่า เอชเอสวี-2 แต่ผลที่ได้กลับตรงข้ามกับ สาร 3-อัลคิล-4-ไฮดรอกซีคูมาริน ไคคูมารอลที่มีหมู่แทนที่บนวงเบนซิลิดีนเป็นหมู่ในโตรแทนที่ ที่ ตำแหน่งที่ 2 และเป็นหมู่ไทรฟลูออโรเมทิลแทนที่ ที่ตำแหน่งที่ 4 และสารฟิวส์ริงที่มีหมู่แทนที่ ที่ ตำแหน่งที่ 3 เป็นหมู่เมทอกซีบนวงเบนซิลิดีน แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อเอชเอสวี-1 ได้ร้อยเปอร์เซ็นต์

ภาควิชา.....เคมี..... ลายมือชื่อนิสิต..... 

สาขาวิชา.....เคมี..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... 

ปีการศึกษา.....2542.....


4072386223 MAJOR CHEMISTRY

KEY WORD: DICOUMAROL / 3-ALKYL-4-HYDROXYCOUMARIN / BIOLOGICAL ACTIVITY

WICHAI SIRISUKSUKON : SYNTHESIS OF 3-SUBSTITUTED-4-HYDROXY COUMARINS AND THEIR BIOLOGICAL ACTIVITIES.

THESIS ADVISOR : ASSISTANT PROFESSOR WARINTHORN CHAVASIRI, Ph.D. 133 pp. ISBN 974-333-838-1

Two types of 3-substituted-4-hydroxycoumarins: dicoumarols and 3-alkyl-4-hydroxycoumarins were synthesized. Fifty five dicoumarols and analogues were derived from the condensation reaction between 4-hydroxycoumarins and interesting aldehydes. Fifteen 3-alkyl-4-hydroxycoumarins were synthesized by reductive fragmentation of dicoumarols using sodium cyanoborohydride. These well-characterized compounds were subjected to three bioassays. For brine shrimp lethality test, high activities were observed in four dicoumarols, namely, [3,3'-(4-*n*-hexyloxy-3-methoxybenzylidene)]*bis*-, [3,3'-((*E*)-3-phenylprop-2-enylidene)]*bis*-, [3,3',3'',3'''-(1,5-pentylidene)]*tetrakis*- and [(3-(1-hydroxy-2-trichloroethylidene))-4-hydroxycoumarin and in general 3-alkyl-4-hydroxy coumarins were found to display higher activity than dicoumarols. In the case of antibacterial activity, these compounds selectively inhibited against four bacteria including *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and flat sour spoilage. 3-Alkyl-4-hydroxycoumarins revealed higher activity than dicoumarols and displayed the activity comparable with two antibiotic drugs. For antiviral activity against HSV-1 and HSV-2 virus, it was found that the activity of dicoumarols against HSV-1 was higher than HSV-2 but *vice versa* for 3-alkyl-4-hydroxycoumarins. Dicoumarols with 2-nitro and 4-trifluoromethyl substituents on a benzylidene ring and a 3-methoxy group on a benzylidene ring of fused ring displayed 100% inhibition against HSV-1.

ภาควิชา.....เคมี..... ลายมือชื่อนิติศ..... 

สาขาวิชา.....เคมี..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... 

ปีการศึกษา.....2542.....

ACKNOWLEDGEMENT

Firstly, the author would like to express his sincere gratitude to Assistant Professor Dr. Warinthorn Chavasiri, his major advisor, for his kindly helpful suggestions, valuable assistance and encouraging throughout the entire period of this research. Sincere thanks are also extended to Associate Professor Dr. Udom Kokpol, Professor Dr. Padet Sidisunthorn and Associate Professor Dr. Pipat Karntiang, his thesis committee, for their comments and suggestions.

Gratitude is also expressed to the staff of the Natural Products Research Unit, Department of Chemistry, Chulalongkorn University for their helpful discussion. Besides, the author greatly appreciated the Graduate School of Chulalongkorn University for granting him a research assistantship during 1997-1999 and partial financial support to this research work.

The author also greatest thanks to his bioassay supports: Associate Professor Dr. Kingkaew Wattanasermkit (Department of Biology, Chulalongkorn University) and Miss Siriporn Anyasimaphon for providing and giving an advice in Brine Shrimp Lethality Test, Mrs. Siriporn Stonsaovapak (Institute of Food Research and Product Development, Kasetsart University) for performance of antibacterial bioassay and Associate Professor Dr. Wimolmas Lipipun (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University) for kindly testing of antiviral bioassay.

Special thanks are expanded to Mr. Sangchai Wattanasereekul for providing some dicoumarols and Department of Chemistry, Chulalongkorn University for supporting materials, chemicals and everything else.

Moreover, the author would like to express his sincere gratitude to his parents and family members for their love, understanding, encouragement, limitless sacrifice and advice throughout the entire study. Ultimately, he never forgets to profoundly thank someone special who is a nice person for continuously cheering up.

Contents

	Pages
Abstract in Thai	iv
Abstract in English	v
Acknowledgment	vi
List of Figures	ix
List of Tables	xii
List of Schemes	xiii
List of Abbreviations	xiv
CHAPTER I : INTRODUCTION	1
1.1 Literature Reviews	2
1.1.1 Synthesis of 3-Substituted-4-hydroxycoumarins	5
1.1.2 Biological Activity of 3- Substituted-4-hydroxycoumarins	6
1.2 Goal of Research	7
CHAPTER II : EXPERIMENTAL	8
2.1 Instruments and Equipment	8
2.2 Chemicals	8
2.3 Synthesis	9
2.3.1 Synthesis of Dicoumarols	9
2.3.2 Synthesis of 3-Alkyl-4-hydroxycoumarins	28
2.4 Bioassay Procedures	36
2.4.1 Brine Shrimp Cytotoxic Lethality Test	36
2.4.2 Antibacterial Bioassay	37
2.4.3 Anti HSV-1 and HSV-2 Assays	37
CHAPTER III : RESULTS AND DISCUSSION	39
3.1 Synthesis	39
3.1.1 Synthesis of Dicoumarols and Their Analogues	39

	Pages
3.1.2 Spectroscopy of Dicoumarols and Analogues	44
3.1.3 Synthesis of 3-Alkyl-4-hydroxycoumarins	60
3.1.4 Spectroscopy of 3-Alkyl-4-hydroxycoumarins	62
3.2 Biological Activity	70
3.2.1 Brine Shrimp Cytotoxic Lethality Test against <i>Artemia salina</i> Leach.	70
3.2.2 Antibacterial Results	81
3.2.3 Antiviral Activity	91
CHAPTER IV : CONCLUSION	97
REFERENCES	101
APPENDICES.....	107
VITA	133

List of Figures

Figs	Pages
2.1 The structures of dicoumarols and analogues	10
2.2 The structures of 3-alkyl-4-hydroxycoumarins	28
3.1 The general synthesis of dicoumarols	40
3.2 The new synthetic dicoumarols and analogues	41
3.3 Dynamic structure of substituted dicoumarols	48
3.4 Comparison of LC ₅₀ value of substituents on a benzylidene ring of dicoumarols	74
3.5 Effect of carbon atom on LC ₅₀ value of dicoumarols 27-33	75
3.6 Effect of substituent on a benzylidene ring against <i>B. cereus</i>	85
3.7 Effect of substituent on a benzylidene ring against <i>L. monocytogenes</i>	85
1 The FT-IR spectrum of Compound 17	108
2 The ¹ H-NMR spectrum of Compound 17	108
3 The ¹³ C-NMR spectrum of Compound 17	109
4 The mass spectrum of Compound 17	109
5 The FT-IR spectrum of Compound 23	110
6 The ¹ H-NMR spectrum of Compound 23	110
7 The ¹³ C-NMR spectrum of Compound 23	111
8 The mass spectrum of Compound 23	111
9 The FT-IR spectrum of Compound 29	112
10 The ¹ H-NMR spectrum of Compound 29	112
11 The ¹³ C-NMR spectrum of Compound 29	113
12 The mass spectrum of Compound 29	113
13 The FT-IR spectrum of Compound 30	114
14 The ¹ H-NMR spectrum of Compound 30	114

Figs	Pages
15 The ^{13}C -NMR spectrum of Compound 30	115
16 The mass spectrum of Compound 30	115
17 The FT-IR spectrum of Compound 31	116
18 The ^1H -NMR spectrum of Compound 31	116
19 The ^{13}C -NMR spectrum of Compound 31	117
20 The mass spectrum of Compound 31	117
21 The FT-IR spectrum of Compound 32	118
22 The ^1H -NMR spectrum of Compound 32	118
23 The ^{13}C -NMR spectrum of Compound 32	119
24 The mass spectrum of Compound 32	119
25 The FT-IR spectrum of Compound 33	120
26 The ^1H -NMR spectrum of Compound 33	120
27 The ^{13}C -NMR spectrum of Compound 33	121
28 The mass spectrum of Compound 33	121
29 The FT-IR spectrum of Compound 38	122
30 The ^1H -NMR spectrum of Compound 38	122
31 The ^{13}C -NMR spectrum of Compound 38	123
32 The mass spectrum of Compound 38	123
33 The FT-IR spectrum of Compound 44	124
34 The ^1H -NMR spectrum of Compound 44	124
35 The ^{13}C -NMR spectrum of Compound 44	125
36 The mass spectrum of Compound 44	125
37 The FT-IR spectrum of Compound 50	126
38 The ^1H -NMR spectrum of Compound 50	126
39 The ^{13}C -NMR spectrum of Compound 50	127
40 The mass spectrum of Compound 50	127
41 The FT-IR spectrum of Compound 54	128

Figs		Pages
42	The ^1H -NMR spectrum of Compound 54	128
43	The ^{13}C -NMR spectrum of Compound 54	129
44	The expanded ^{13}C -NMR spectrum of Compound 54	129
45	The DEPT 135 spectrum of Compound 54	130
46	The mass spectrum of Compound 54	130
47	The FT-IR spectrum of Compound R12	131
48	The ^1H -NMR spectrum of Compound R12	131
49	The ^{13}C -NMR spectrum of Compound R12	132
50	The mass spectrum of Compound R12	132

List of Tables

Tables	Pages
3.1 The physical properties and % yield of synthesized compounds	42
3.2 The FT-IR absorption band assignments of dicoumarols and analogues	46
3.3 The ¹ H-NMR spectral assignments of dicoumarols and analogues	50
3.4 The ¹³ C-NMR spectral assignments of dicoumarols and analogues	52
3.5 The ¹³ C-NMR spectral assignments for Compound 54	55
3.6 Mass spectral assignments of Compounds 17, 23, 29-33, 38, 44, 50 and 54 .	56
3.7 The physical properties and % yield of synthesized 3-alkyl-4-hydroxycoumarins	61
3.8 The FT-IR absorption band assignments of 3-alkyl-4-hydroxycoumarins	63
3.9 The ¹ H-NMR spectral assignments of 3-alkyl-4-hydroxycoumarins	65
3.10 The ¹³ C-NMR spectral assignments of 3-alkyl-4-hydroxycoumarins	67
3.11 Mass spectral assignment for R12	68
3.12 The LC ₅₀ value at 24h of tested dicoumarols and analogues	71
3.13 The LC ₅₀ value at 24h of tested 3-alkyl-4-hydroxycoumarins	78
3.14 The comparative results of the LC ₅₀ values of dicoumarols and 3-alkyl-4-hydroxycoumarins	80
3.15 Antibacterial properties of dicoumarols and analogues	82
3.16 Antibacterial properties of 3-alkyl-4-hydroxycoumarins	88
3.17 The comparative antibacterial activity between dicoumarols and 3-alkyl-4-hydroxycoumarins	90
3.18 Antiviral activity of dicoumarols and analogues	92
3.19 Antiviral activity of 3-alkyl-4-hydroxycoumarins	96

List of Schemes

Schemes	Pages
3.1 The proposed mass fragmentation pattern of dicoumarols	59
3.2 The possible mass fragmentation pattern of Compound 54	59
3.3 The proposed mass fragmentation pattern of Compound R12	69

List of Abbreviations

br	broad	m.p.	melting point
°C	degree Celsius	MS	mass spectroscopy
cm ⁻¹	unit of wavenumber	MW	molecular weight
d	doublet (NMR)	<i>m/z</i>	mass per charge
dd	doublet of doublet (NMR)	NMR	nuclear magnetic resonance
dec	decomposed	ppm	part per million
DMSO	dimethylsulfoxide	q	quartet (NMR)
dt	doublet of triplet (NMR)	rel. int.	relative intensity
g	gram (s)	R _f	retardation factor
Hz	hertz	s	strong (IR)
IR	infrared	s	singlet (NMR)
J	coupling constant	t	triplet (NMR)
LC ₅₀	concentration that caused 50% lethality	w	weak (IR)
lit	literature	wt	weight
m	multiplet (NMR)	δ	chemical shift
m	medium (IR)	%	percent
mL	milliliter (s)	μg	microgram (s)
		μL	microliter (s)