2,4-二氨基喹唑啉和 2,4-二氨基吡啶并[2,3-*d*]嘧啶衍生物的合成邓兰青^{a,b} 钟宏^{*,a,c} 王帅^{a,c}^(a) 中南大学化学化工学院 长沙 410083^(b) 岳阳职业技术学院 岳阳市中草药综合利用重点实验室 岳阳 414000^(c) 有色金属资源化学教育部重点实验室(中南大学) 长沙 410083

摘要 以 6-氯-5-氰基烟酸、3-氰基-4-氟苯甲酸、4-氰基-3-氟苯甲酸和 6-氯-5-氰基-2-吡啶甲酸为原料, 经过酰胺化和关环两步反应合成了 2,4-二氨基喹唑啉和 2,4-二氨基吡啶并[2,3-*d*]嘧啶衍生物, 该方法操作简便, 除 6-氯-5-氰基-2-吡啶甲酸外, 其它三种酸的反应收率可达 65% 以上. 采用氢核磁(¹H NMR)、碳核磁(¹³C NMR)和高效液质联用(LC-MS)分析对目标产物进行了表征. 采用四甲基偶氮盐(MTT)法考察所合成化合物的体外抗肿瘤活性, 结果表明部分化合物对所选肿瘤细胞的增殖有一定的抑制活性, 化合物 **4c**, **4d**, **4e** 和 **4f** 对人白血病细胞(K562)和人肝癌细胞(HepG2)的抑制活性强于阳性对照药 5-氟尿嘧啶(5-Fu).

关键词 2,4-二氨基喹唑啉; 2,4-二氨基吡啶并嘧啶; 酰化反应; 合成

Synthesis of 2,4-Diaminoquinazoline and 2,4-Diaminopyrido[2,3-*d*]pyrimidine DerivativesDeng, Lanqing^{a,b} Zhong, Hong^{*,a,c} Wang, Shuai^{a,c}^(a) College of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083^(b) Key Laboratory of Yueyang Chinese Herbal Utilization, Yueyang Vocational Technical College, Yueyang 414000^(c) Key Laboratory of Resource Chemistry of Nonferrous Metals, Ministry of Education (Central South University), Changsha 410083

Abstract In this work, several 2,4-diaminoquinazoline and 2,4-diaminopyrido[2,3-*d*]pyrimidine derivatives were designed and synthesized by acylation reaction and ring-closure reaction, using 6-chloro-5-cyanonicotinic acid, 3-cyano-4-fluorobenzoic acid, 4-cyano-3-fluorobenzoic acid and 6-chloro-5-cyanopicolinic acid as starting materials. This method is simple and efficient. For the used acids but 6-chloro-5-cyanopicolinic acid, the reaction yields are above 65%. The structures of terminal compounds were determined by ¹H NMR, ¹³C NMR and LC-MS. The antitumor activities of the nitrogen mustard-linked chalcones were evaluated by an MTT assay. The results reveal that some of the title compounds exhibit potent anti-proliferative activities against selected tumor cells. Among which, compounds **4c**, **4d**, **4e** and **4f** against K562 and HepG2 were better than 5-fluorouracil.

Keywords 2,4-diaminoquinazoline; 2,4-diaminopyrido[2,3-*d*]pyrimidine; acylation reaction; synthesis

喹唑啉和吡啶并嘧啶类化合物以其显著的生物活性成为当今化学界研究的热点之一^[1~7]. 吡啶并嘧啶类化合物尤其以其抗肿瘤和杀菌活性而受到研究者的青睐. 喹唑啉和吡啶并[2,3-*d*]嘧啶的化合物中, 吡啶和嘧啶作为配位基团与 Fe, Cu, Ag, Ni 等过渡金属离子形成配位, 酰胺基通过羰基 O 原子或者 N 原子与金属离子配位, 酰

胺基也可作为连接基团, 作为与客体的连接桥梁. 研究表明, 含有喹唑啉或吡啶并嘧啶结构的化合物具有抗炎^[8~10]、抑菌^[11,12]、抗结核^[13]、抗糖尿病^[14,15]、抗 HIV^[16]和抗肿瘤等^[17,18,19]活性.

Finn 等^[20]研究了 7-芳基-2,4-二氨基喹唑啉的衍生物, 采用 Suzuki 偶联反应和酰化反应合成了这类化合

* E-mail: zhongh@csu.edu.cn

Received July 18, 2013; revised October 9, 2013; published online October 16, 2013.

Project supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, No. 2013AA064102) and the Project of Science and Technology of Hunan Province (No. 2010FJ4112).

国家高技术研究发展计划(863 计划, No. 2013AA064102)和湖南省科技厅(No. 2010FJ4112)资助项目.

物. 实验证明这类化合物是一种抑制细菌二氢叶酸还原酶的抗菌药物, 尤其对革兰氏阳性菌具有良好的抗菌活性. 胡有洪等^[21]研究了 2,4-二氨基喹唑啉作为一类新的潜在的抗病毒药物, 采用醚化反应和关喹啉环反应, 在 2,4-二氨基喹唑啉上引入醚键, 并证定该类化合物具有非常强的抗登革病毒活性. Gangjee 等^[22]设计并合成了吡啶并[2,3-*d*]喹啉类衍生物, 这类化合物是一类抗叶酸制剂, 其合成方法如下: 第一步, 由 2,4,6-三氨基吡啶与 2-溴丙二醛反应关环生成 6-溴-2,4-二氨基吡啶并[2,3-*d*]喹啉; 第二步, 用新戊酰酐将 6-溴-2,4-二氨基吡啶并[2,3-*d*]喹啉上的二个氨基保护; 第三步, 采用含取代基的苯胺取代溴; 最后, 脱去保护基. 但此方法合成的产率不高, 大约为 10%~60%.

David 等^[23]研究表明, 含取代酰胺基的喹唑啉类化合物可用于治疗病毒性感染、免疫或炎症性疾病等. 在生物体内很多金属酶中的酰胺都参与了金属配位, 另外酰胺基的引入可增加药物的水溶性, 故本文在研究与金属离子配位的药物时, 设计将酰胺取代基引入喹唑啉和吡啶并[2,3-*d*]喹啉环上. 其合成路线如 Scheme 1 所示. 本文选取 4 种酸为原料, 分别为 6-氯-5-氰基烟酸(**1a**)、3-氰基-4-氟苯甲酸(**1b**)、4-氰基-3-氟苯甲酸(**1c**)、6-氯-5-氰基-2-吡啶甲酸(**1d**). 其合成步骤为: 上述 4 种原料酸分别与 3-(2-异丙氧基苯氧基)哌啶(**2a**)、3-(2-氯苯氧基)四氢吡咯(**2b**)两个仲胺的酰化反应, 得到 8 个中间体 **3**; 然后, 中间体 **3** 与盐酸胍反应关喹啉环.

Scheme 1

1 结果与讨论

1.1 反应条件的选择

研究了 2,4-二氨基喹唑啉和 2,4-二氨基吡啶并[2,3-*d*]喹啉类衍生物的合成路线, 首先, 酸与胺的酰化反应, 对于 **1a**, **1b** 和 **1c** 三种酸, 选用过 1-羟基苯并三唑 (HOBT)、苯并三唑-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯 (HBTU) 和 2-(7-偶氮苯并三唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯 (HATU) 三种缩合剂, HOBT 和 HBTU 作缩合剂的产率大约为 40%~60%, 以 HATU 作缩合剂时产率均在 80% 以上, 前者比后者的产率低, 故最终选择 HATU 作缩合剂. 对于 **1a**, **1b** 和 **1c** 三种酸来说, 酰化反应中酸、胺、HATU 和三乙胺的进料的物质的量比对反应的影响, 当酸: 胺: HATU: 三乙胺的物质的量比为 1.25: 1: 1.5: 2 时, 各产物的收率最佳.

对于 6-氯-5-氰基-2-吡啶甲酸(**1d**)与仲胺的缩合反应 (表 1), 分别以 HATU, HBTU 和 HOBT 为缩合剂, 得到的酰化产物均比较少, 因此采用 Me_3Al 和 MgCl_2 为催化剂进行 6-氯-5-氰基-2-吡啶甲酸(**1d**)与仲胺的催化酰化反应, 结果表明, 以 Me_3Al 为催化剂, 酰化的产率优于 MgCl_2 催化剂, 产率可达 50%. 6-氯-5-氰基-3-吡啶甲酸(**1a**)和 6-氯-5-氰基-2-吡啶甲酸(**1d**)同是吡啶甲酸, 可它们与胺的反应活性相差较大, 这主要是由羧基的取代位不同决定的: (1) 当羧基在吡啶环的 2 位时, 由于位阻较大, 导致胺进攻羰基的活性降低; (2) 羧基为吸电子基团, 当其在 2 位时, 会导致吡啶环上的 N 原子的电子向羰基偏移, 故其反应活性降低. 因此, 化合物 **1d** 的活性小于化合物 **1a**.

表 1 6-氯-5-氰基-2-吡啶-甲酸与胺的酰化反应条件

Table 1 Acylation reaction condition of 6-chloro-5-cyanopyridinecarboxylic acid with amine

序号	反应条件	产率/%
1	HATU, DCM, r.t. 8 h	<10
2	HBTU, DCM, r.t. 8 h	<10
3	HOBT, DCM, r.t. 8 h	<10
4	Me_3Al , THF, r.t. 7 h	50
5	MgCl_2 , THF, r.t. 10 h	<10
6	CH_3COOH , MeCN, 100 °C, 10 h	<10

第二步, 关喹啉环反应, 采用碘化亚铜催化合成了 4-氨基喹唑啉和 2,4-二氨基喹唑啉衍生物^[24,25]. Fu 等^[15]结果表明, 2-溴苯腈类衍生物与烷基脒盐酸盐反应生 4-氨基喹唑啉的最佳条件为: 以 0.2 equiv. 的 *N,N*-二甲乙二胺为配体, 0.1 equiv. 的 CuI 为催化剂, 2.0 equiv. 的 K_2CO_3 作为碱, DMF 为溶剂, 反应瓶中充 N_2 作保护气体, 加热至 80 °C, 反应产率达到最高. 当反应温度高于 100 °C 时, 会导致副产物的生成; 当反应温度低于 60 °C

时, 产物的产率会明显降低.

按照上述条件, 尝试用 CuI 催化关环, 但得到的目标产物较少, 且有副产物生成. 选用过四氢呋喃、二甲基亚砜(DMSO)、*N,N*-二甲基吡咯烷酮(NMP)和 DMA 分别为溶剂, 但前面的这些溶剂经实验检测后, 副产物较多, 目标产物相对较少, 故我们最终选择 DMA 为溶剂. 对于温度的选择, 以 DMA 为溶剂, 当反应温度升高至 135 °C 回流, 导致副产物的生成, 目标产物非常少; 当反应温度低于 90 °C 时, 目标产物非常少, 因此, 当反应温度为 110 °C 时, 此时反应收率最高, 收率在 80% 以上.

1.2 抗肿瘤活性

我们采用 MTT 法测试了化合物对人肺癌细胞(A549)、人白血病细胞(K562)、人肝癌细胞(HepG2)、人乳腺癌细胞(MCF-7)的体外抗肿瘤活性, 以抗肿瘤药物 5-氟尿嘧啶(5-Fu)为阳性对照. 活性评价结果显示, 这类化合物对肿瘤细胞有一定的增殖抑制活性, 且与其取代基的不同而活性有所变化. 化合物 **4c**~**4f** 对人白血病细胞(K562)和人肝癌细胞(HepG2)都显示出较强的抑制作用, 且其抑制活性比 5-氟尿嘧啶要强, 其中化合物 **4d** 对 K562 的 IC₅₀ 值仅为 8.9 μmol/L. 以上结果为今后研究该类化合物结构与活性的关系提供了一定的依据, 进一步的结构优化与生物活性研究正在进行中.

表 2 目标化合物对 A549, K562, PC-3 和 MCF-7 的 IC₅₀ 值 (μmol·L⁻¹)

Table 2 IC₅₀ (μmol·L⁻¹) values of target compounds against A549, K562, PC-3 and MCF-7

化合物	A549	K562	HepG2	MCF-7
4a	20.3	52.0	>100	>100
4b	23.6	41.3	>100	>100
4c	19.5	19.5	51.0	39.1
4d	20.3	8.9	58.7	61.2
4e	19.6	17.3	65.7	80.9
4f	19.3	12.4	78.6	76.2
4g	26.4	66.2	>100	>100
4h	25.8	73.1	>100	>100
5-Fu	8.4	45.4	>100	12.8

2 结论

在前人^[2-14]的研究基础上, 将酰胺基团引入到 2,4-二氨基喹唑啉和 2,4-二氨基吡啉并[2,3-*d*]嘧啶的环上 6-位或 7-位, 因为引入酰胺基可以增加药剂的水溶性, 酰胺基可以形成氢键, 氢键是主客体分子识别的最主要的作用力, 同时也有利于该类化合物的生物活性的增加, 喹唑啉的化合物 **4c**~**4f** 对人白血病细胞(K562)和人肝癌细胞(HepG2)的抑制活性明显高于 5-氟尿嘧啶. 2,4-二氨基喹唑啉和 2,4-二氨基吡啉并嘧啶衍生物的合成路线避免使用剧毒化学药品, 合成操作简单, 后处理简便,

且 **1a**~**1c** 三种酸的最后总收率均在 65% 以上.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

核磁共振谱由 Bruker-AV400 型核磁共振仪测定; 色谱仪由美国安捷伦 Agilent 1100 高效液相色谱仪测定; 液质联用仪由美国安捷伦 Agilent 6000LC/MS 测定; WFH-203 型三用紫外分析仪; CHN CORDER MF-3 型元素分析仪, X-4 数字显微熔点仪, LRH-250-S 恒温培养箱. 二氯甲烷(DCM), *N,N*-二甲基乙酰胺(DMA), 四氢呋喃(THF), 二甲基亚砜(DMSO)均为无水分析纯试剂; 其它试剂均为市售分析纯试剂.

3.2 中间体 3 的合成

对于 6-氯-5-氰基烟酸(**1a**)、3-氰基-4-氟苯甲酸(**1b**)、4-氰基-3-氟苯甲酸(**1c**)这三种酸与两个仲胺(**2a**, **2b**)的酰化反应, 经过多次实验后确定最佳反应条件为: 选用 2-(7-偶氮苯并三唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(HATU)为缩合剂. 操作步骤为: 分别称取 1.25 mmol 酸 **1a**~**1c** 置于 6 个圆底烧瓶中(附上标签 **1a_2a**, **1a_2b**, **1b_2a**, **1b_2b**, **1c_2a**, **1c_2b**), 依次加入 6 mL 无水 DCM, 对应称取 1.00 mmol 的胺 **2a**~**2b** 和 2.00 mmol 的三乙胺于上述反应瓶中, 室温下搅拌, 反应 1 h, 然后再向反应瓶中加入 1.50 mmol 的 HATU, 搅拌, 室温下反应 7 h. 反应结束后, 用 0.10 mol 的 NaOH 水溶液洗涤, 再用 DCM 萃取, 有机层经无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压蒸除溶剂, 再将其于真空下干燥 10 h, 得到的 6 个中间体 **3a**~**3f** 直接用作下一步反应.

对于 6-氯-5-氰基-2-吡啶甲酸(**1d**)与仲胺(**2a**, **2b**)的酰化反应, 最佳的反应条件为: 分别称取 1.00 mmol 的胺分别置于圆底烧瓶中, 加入 7 mL 无水 THF, 称取 1.00 mmol 三甲基铝(Me₃Al)加入反应瓶中, 室温下搅拌, 反应 4 h, 然后称取 1.00 mmol 的 6-氯-5-氰基-2-吡啶甲酸(**1d**)加入反应瓶中, 室温下搅拌, 反应 7 h. 反应结束后, 用 0.10 mol 的 NaOH 水溶液洗涤, 再用 DCM 萃取, 有机层经无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压蒸除溶剂, 再将其于真空下干燥 10 h, 得到的 2 个中间体 **3g**, **3h** 直接用作下一步反应.

3.3 2,4-二氨基喹唑啉和 2,4-二氨基吡啉并[2,3-*d*]嘧啶类化合物的生成

在 8 个中间体 **3a**~**3h** 分别置于反应瓶中, 分别量取 10 mL *N,N*-二甲基乙酰胺(DMA)于反应瓶中, 称取 2.00 mmol 的盐酸胍加入上述反应瓶中, 密封, 搅拌, 加热至 110 °C 回流, 反应 10 h. 将反应后的混合物减压蒸除溶剂, 再经过柱提纯, 得到 8 个目标产物 **4a**~**4h**.

6-[3-(2-异丙氧基苯氧基)哌啶-1-甲酮]-2,4-二氨吡

啉[2,3-*d*]并嘧啶(**4a**): 白色固体, 303.8 mg, 产率 72%, LC-MS 分析纯度 100%. m.p. 701.59~703 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 1.37 (d, *J*=6 Hz, 6H, CH₃), 1.40~1.61 (m, 2H, CH₂), 1.78~2.02 (m, 2H, CH₂), 3.39 (t, *J*=8 Hz, 2H, CH₂), 3.94 (d, *J*=12 Hz, 2H, CH₂), 4.45~4.53 (m, 2H, CH), 6.68~6.76 (m, 4H, CH), 6.86 (s, 2H, NH), 6.93 (s, 2H, NH), 8.81 (s, 1H, CH), 8.88 (s, 1H, CH); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 21.86, 26.00, 29.71, 45.24, 49.36, 71.51, 75.46, 103.90, 118.89, 121.60, 124.99, 137.68, 150.47, 153.88, 160.91, 161.06, 164.49, 167.38; ESI-MS *m/z* (%): 423.2 ([*M*+1]⁺, 100). Anal. calcd for C₂₂H₂₆N₆O₃: C 62.54, H 6.20, N 19.89; found C 62.43, H 6.31, N 19.96.

6-[3-(2-氯苯氧基)四氢吡咯-1-甲酮]-2,4-二氢吡啉[2,3-*d*]并嘧啶(**4b**): 浅黄色固体, 249.6 mg, 产率 65%, LC-MS 分析纯度 97.5%. m.p. 895.85 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 2.15~2.37 (m, 2H, CH₂), 3.61 (t, *J*=8 Hz, 2H, CH₂), 3.81 (d, *J*=12 Hz, 2H, CH₂), 5.02~5.13 (m, 1H, CH), 6.89 (d, *J*=12 Hz, 2H, CH), 7.05 (s, 2H, NH₂), 7.14 (t, *J*=8 Hz, 2H, CH), 7.29 (s, 2H, NH₂), 8.83 (s, 1H, CH), 9.02 (s, 1H, CH); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 30.89, 44.88, 53.56, 76.05, 103.91, 115.84, 122.52, 122.85, 126.40, 129.49, 137.40, 153.96, 161.06, 164.49, 166.33; ESI-MS *m/z* (%): 385.1 ([*M*+1]⁺, 100), 387.1 ([*M*+3]⁺, 36.1). Anal. calcd for C₁₈H₁₇ClN₆O₂: C 56.18, H 4.45, N 21.84; found C 56.02, H 4.63, N 21.97.

6-[3-(2-异丙氧基苯氧基)哌啶-1-甲酮]-2,4-二氢喹啉(**4c**): 淡黄色固体, 315.8 mg, 产率 75%, LC-MS 分析纯度 100%. m.p. 903.77 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 1.38 (d, *J*=12 Hz, 6H, CH₃), 1.40~1.60 (m, 2H, CH₂), 1.79~2.03 (m, 2H, CH₂), 3.35 (t, *J*=12 Hz, 2H, CH₂), 3.90 (d, *J*=16 Hz, 1H, CH₂), 4.35 (d, *J*=8 Hz, 1H, CH₂), 4.42~4.52 (m, 2H, CH), 6.69~6.76 (m, 3H, CH), 6.85 (d, *J*=8 Hz, 1H, CH), 6.94 (s, 2H, NH₂), 7.46 (s, 2H, NH₂), 7.86 (d, *J*=8 Hz, 2H, CH), 8.57 (s, 1H, CH); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 21.86, 25.98, 29.71, 45.86, 49.94, 71.51, 75.63, 105.47, 116.15, 121.60, 121.79, 127.41, 127.86, 128.08, 149.35, 150.47, 159.87, 161.61, 168.84; ESI-MS *m/z* (%): 422.2 ([*M*+1]⁺, 100). Anal. calcd for C₂₃H₂₇N₅O₃: C 65.54, H 6.46, N 16.62; found C 65.34, 6.58, N 16.52.

6-[3-(2-氯苯氧基)四氢吡咯-1-甲酮]-2,4-二氢喹啉(**4d**): 白色固体, 298.7 mg, 产率 78%, LC-MS 分析纯度 100%. m.p. 620.58 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 2.17~2.40 (m, 2H, CH₂), 3.57 (t, *J*=8 Hz, 2H, CH₂),

3.75 (d, *J*=8 Hz, 2H, CH₂), 4.91~5.01 (m, 1H, CH), 6.85~6.93 (m, 3H, NH₂, CH), 7.06 (d, *J*=8 Hz, 1H, CH), 7.14 (t, *J*=12 Hz, 1H, CH), 7.30 (d, *J*=8 Hz, 1H, CH), 7.48 (s, 2H, NH₂), 7.94 (d, *J*=8 Hz, 2H, CH), 8.55 (s, 1H, CH); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 30.96, 45.02, 53.84, 76.00, 105.49, 115.84, 121.75, 126.40, 127.56, 127.82, 129.49, 153.79, 159.87, 161.61, 167.79; ESI-MS *m/z* (%): 384.2 ([*M*+1]⁺, 100), 386.1 ([*M*+3]⁺, 41.7). Anal. calcd for C₁₉H₁₈ClN₅O₂: C 59.45, H 4.73, N 18.25; found C 59.36, H 4.81, N 18.37.

7-[3-(2-异丙氧基苯氧基)哌啶-1-甲酮]-2,4-二氢喹啉(**4e**): 白色固体, 303.1 mg, 产率 72%, LC-MS 分析纯度 100%. m.p. 632.45 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 1.38 (d, *J*=8 Hz, 6H, CH₃), 1.41~1.59 (m, 2H, CH₂), 1.79~2.02 (m, 2H, CH₂), 3.36 (t, *J*=12 Hz, 2H, CH₂), 3.95 (d, *J*=12 Hz, 1H, CH₂), 4.34 (d, *J*=8 Hz, 1H, CH₂), 4.43~4.52 (m, 2H, CH), 6.67~6.76 (m, 4H, CH), 6.89 (s, 4H, NH₂), 7.42 (s, 1H, CH), 7.60 (d, *J*=8 Hz, 1H, CH), 8.16 (d, *J*=8 Hz, 1H, CH); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 21.86, 25.98, 29.71, 45.76, 49.73, 71.51, 75.63, 112.23, 116.15, 119.13, 121.57, 127.52, 137.87, 150.47, 153.16, 160.14, 161.70, 169.10; ESI-MS *m/z* (%): 422.2 ([*M*+1]⁺, 100). Anal. calcd for C₂₃H₂₇N₅O₃: C 65.54, H 6.46, N 16.62; found C 65.45, H 6.54, N 16.81.

7-[3-(2-氯苯氧基)四氢吡咯-1-甲酮]-2,4-二氢喹啉(**4f**): 白色固体, 256.6 mg, 产率 67%, LC-MS 分析纯度 100%. m.p. 620.15 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 2.17~2.40 (m, 2H, CH₂), 3.58 (t, *J*=12 Hz, 2H, CH₂), 3.70~3.83 (m, 2H, CH₂, CH), 4.96 (t, *J*=8 Hz, 1H, CH₂), 6.86~6.92 (m, 3H, NH₂, CH), 7.05 (d, *J*=8 Hz, 1H, CH), 7.14 (t, *J*=8 Hz, 1H, CH), 7.30 (d, *J*=8 Hz, 1H, CH), 7.50 (s, 2H, NH₂), 7.58 (d, *J*=8 Hz, 2H, CH), 8.06 (s, 1H, CH); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 15.40, 31.22, 44.85, 54.09, 75.35, 112.23, 113.00, 119.21, 121.86, 124.94, 125.97, 127.53, 131.09, 136.92, 153.21, 158.01, 160.14, 161.70, 168.07; ESI-MS *m/z* (%): 384.2 ([*M*+1]⁺, 100), 386.1 ([*M*+3]⁺, 40.3). Anal. calcd for C₁₉H₁₈ClN₅O₂: C 59.45, H 4.73, N 18.25; found C 59.61, H 4.86, N 18.17.

7-[3-(2-异丙氧基苯氧基)哌啶-1-甲酮]-2,4-二氢吡啉[2,3-*d*]并嘧啶(**4g**): 淡黄色固体, 206.7 mg, 产率 49%, LC-MS 分析纯度 96.5%. m.p. 701.62 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 1.38 (d, *J*=8 Hz, 6H, CH₃), 1.39~1.62 (m, 2H, CH₂), 1.88~2.11 (m, 2H, CH₂), 3.43 (t, *J*=16 Hz, 2H, CH₂), 4.02 (d, *J*=12 Hz, 1H, CH₂), 4.41 (d, *J*=8 Hz, 1H, CH₂), 4.46~4.54 (m, 2H, CH), 6.67~

6.75 (m, 4H, CH), 6.88 (s, 4H, NH₂), 7.43 (d, $J=8$ Hz, 1H, CH), 8.59 (d, $J=8$ Hz, 1H, CH); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 21.88, 25.87, 29.52, 45.88, 49.98, 71.51, 75.74, 105.77, 116.15, 117.03, 118.89, 121.60, 136.68, 149.35, 150.47, 151.24, 160.98, 161.24, 163.35, 166.64; ESI-MS m/z (%): 423.3 ([M+1]⁺, 100). Anal. calcd for C₂₂H₂₆N₆O₃ C 62.54, H 6.20, N 19.89; found C 62.29, H 6.13, N 19.76.

7-[3-(2-氯苯氧基)四氢吡咯-1-甲酮]-2,4-二氨吡啶 [2,3-*d*]并嘧啶 (**4h**): 白色固体, 134.4 mg, 产率 35%, LC-MS 分析纯度 100%. m.p. 677.65 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 2.20~2.43 (m, 2H, CH₂), 3.65 (t, $J=18$ Hz, 2H, CH₂), 3.78~3.90 (m, 2H, CH₂, CH), 5.02 (d, $J=12$ Hz, 1H, CH₂), 6.85~6.92 (m, 3H, CH, NH₂), 7.06 (d, $J=8$ Hz, 1H, CH), 7.12~7.17 (m, 2H, CH), 7.29 (s, 2H, NH₂), 7.84 (d, $J=8$ Hz, 1H, CH), 8.59 (d, $J=8$ Hz, 1H, CH); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 30.74, 44.97, 54.34, 75.89, 105.77, 115.44, 115.84, 122.52, 122.85, 126.40, 129.49, 133.07, 151.18, 153.79, 160.99, 161.34, 163.35, 165.63; ESI-MS m/z (%): 385.2 ([M+1]⁺, 100), 387.1 ([M+3]⁺, 44.0). Anal. calcd for C₁₈H₁₇ClN₆O₂ C 56.18, H 4.45, N 21.84; found C 56.32, H 4.63, N 21.67.

3.4 生物活性

对于目标化合物 **4a~4h**, 采用四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT)测定其对肿瘤细胞的抑制作用. 将对数生长期的细胞用 0.25%胰酶/EDTA 消化后, 配制成为一定浓度的单细胞悬液, 根据细胞生长速度的差异按 800~2000 个/孔接种于 96 孔板, 每孔加入细胞悬液 100 μ L, 将培养板放入 CO₂ 培养箱, 于 37 °C, 5% CO₂ 下培养 24 h, 待培养细胞贴壁后, 加入 100 μ L 不同浓度药物的受试化合物, 每个浓度设 4 个孔, 另设空白组和阳性对照组. 加药完毕后置于 CO₂ 培养箱中, 37 °C, 5% CO₂ 下培养 72 h 后, 每孔加入 20 μ L MTT, 培养 4 h, 弃上清, 加入 150 μ L DMSO 溶解, 振荡均匀, 用酶标仪($\lambda=570$ nm)检测吸光度值, 计算抑制率, 抑制率(%)=(1-给药组吸光度值/空白吸光度值)×100%.

辅助材料(Supporting Information) 提供了 ¹H NMR 谱图和液质联用谱图, 这些材料可以免费从本刊网站 (<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

[1] Liu, C.-E.; Yu, Q.-Y.; Tang, J.-H.; Li, J.-R. *Chin. J. Org. Chem.*

2012, 32(3), 537 (in Chinese).

(刘长娥, 于琪瑶, 唐健红, 李加荣, 有机化学, **2012**, 32(3), 537.)

- [2] Deng, L.-Q.; Xu, Z.-H.; Shang Y.-F.; Dai, W.-J.; Hu, H.-M.; Deng, S.-P.; Ouyang, J.-M. *Chin. J. Org. Chem.* **2012**, 32(6), 1141 (in Chinese).
(邓兰青, 徐中海, 尚云峰, 戴文静, 胡辉敏, 邓穗平, 欧阳健明, 有机化学, **2012**, 32(6), 1141.)
- [3] Liu, H.-B.; Xu, H.-J.; Lv, P.; Pan, N.-N.; Li, S.-Q. *Acta Chim. Sinica* **2012**, 32(5), 674 (in Chinese).
(刘海彬, 徐惠娟, 吕萍, 潘宁宁, 李双奇, 化学学报, **2012**, 32(5), 674.)
- [4] Ren, Q.-Y.; Wang, T.; Liu, J.-C.; He, H.-W. *Chin. J. Org. Chem.* **2005**, 25(12), 1530 (in Chinese).
(任青云, 王涛, 刘建超, 贺红武, 有机化学, **2005**, 25(12), 1530.)
- [5] Liu, J.-H.; Liu, Y.; Jian, J.-Y.; Bao, X.-P. *Chin. J. Org. Chem.* **2013**, 33(12), 370 (in Chinese).
(刘军虎, 刘勇, 蹇军友, 鲍小平, 有机化学, **2013**, 33(12), 370.)
- [6] Wang, Y.-K. *M. S. Thesis*, Dalian University of Technology, Dalian, **2012** (in Chinese).
(王永康, 硕士论文, 大连理工大学, 大连, **2012**.)
- [7] He, N.-Q.; Yan, S.-J.; Lin, J. *Chemistry* **2010**, 314 (in Chinese).
(贺能琴, 严胜骄, 林军, 化学通报, **2010**, 314.)
- [8] Laddha, S.-S.; Bhatnagar, S.-P. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17(9), 6796.
- [9] Alafeefy, A.-M.; Kadi, A.-A.; Al-Deeb, O.-A. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45(11), 4947.
- [10] McLaughlin, N.-P.; Evans, P. *J. Org. Chem.* **2010**, 75(2), 518.
- [11] Manjula, S.-N.; Bharath, E.-N.; Divya, B. *Int. J. Pharm. Biosci.* **2011**, 2(1), 780.
- [12] Wang, Y.; Serradell, N.; Rosa, E. *Drugs Future* **2008**, 33(6), 473.
- [13] Selvam, T.-P.; Kumar, P.-V.; Kumar, A.-S. *J. Pharm. Res.* **2010**, 3(7), 1637.
- [14] Yang, S.-H.; Khadka, D.-B.; Cho, S.-H. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19(12), 968.
- [15] Rusnak, D.-W.; Lackey, K.; Affleck, K. *Mol. Cancer Ther.* **2001**, 1(2), 85.
- [16] Graffner-Nordberg, M.; Kolmodin, K.; Aqvist, J.; Queener, F.-S.; Hallberg, A. *Med. Chem.* **2001**, 44(15), 2391.
- [17] Thurmond, J.; Butchbach, M.-E.-R.; Palomo, M.; Pease, B.; Rao, M.; Singh, J. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 449.
- [18] Zink, M.; Lanig, H.; Troschutz, R. *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, 39, 1079.
- [19] Gangjee, A.; Adair, O.-O.; Pagley, M.; Queener, S.-F. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 6195.
- [20] Li, X.-M.; Hilgers, M.; Cunningham, M.; Chen, Z.-Y.; Trzoss, M.; Zhang, J.-H.; Finn, J. *Bioorg. Med. Lett.* **2011**, 21, 5171.
- [21] Chao, B.; Tong, X.-K.; Tang, W.; Li, D.-W.; Garcia, J.-M.; Zuo, J.-P.; Hu, Y.-H. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 3135.
- [22] Gangjee, A.; Namjoshi, O.-A.; Raghavan, S.; Queener, S.-F.; Kisliuk, R.-L.; Cody, V. *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 4422.
- [23] Mc Gowan, D.; Raboisson, P. J.-M. B.; Jonckers, T. H. M.; Last, S. J.; Embrechts, W.; Pieters, S. M. A. A. *WO 2012/156498*, **2012** [*Chem. Abstr.* **2012**, 157, 734765].
- [24] Yang, X.-B.; Liu, H.-X.; Fu, H.; Qiao, R.-Z.; Jiang, Y.-Y.; Zhao, Y.-F. *Synlett* **2010**, 101.
- [25] Khabnadideh, S.; Pez, D.; Musso, A.; Brun, R.; Perez, L.-M.-R.; Gilbert, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 2637.

(Li, L.; Fan, Y.)