新型维甲酸类化合物的合成及生物活性研究

徐之涵 潘 燊 黄焰根*

(东华大学化学化工与生物工程学院 国家染整工程技术研究中心 上海 201620)

摘要 以苯甲醚为起始原料, 经 Friedel-Crafts 反应、溴化和亲核取代转化为硼酸中间体 **2**。以羟基丙酮 **12** 为起始原料, 经过 Wittig 反应、溴化、Arbuzov 反应、Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) 反应后得到共轭烯炔溴代物 **3**; 化合物 **2** 分别与化合物 **3**、4-溴-2-氟苯甲酸甲酯(**4**)和 6-溴烟酸甲酯(**5**)经 Suzuki 偶联反应和水解反应, 得到三个未见报道的维甲酸类似物 **1a~1c**。同时, 以溴苯为起始原料经 Friedel-Crafts 反应、硝化反应、三氟甲基化反应、硝基还原和亲核取代合成了含有三氟甲基的维甲酸类似物 **1d**。化合物 **1a~1d** 的结构经过 ^1H NMR, ^{13}C NMR, IR 及 HRMS 的表征, 并对四个化合物进行了 HL-60 细胞株分化活性能力的测试。结果表明化合物 **1a~1d** 都具有潜在的药物活性, 其中含氟维甲酸类似物 **1b** 和 **1d** 拥有较商品化药物全反式维甲酸(ATRA)更低的 IC_{50} 值。

关键词 维甲酸类似物; 合成; 有机氟化合物; 抗肿瘤

Synthesis and Biological Evaluation of New Retinoid Derivatives

Xu, Zhihan Pan, Shen Huang, Yangen*

(College of Chemistry Chemical Engineering and Biotechnology, National Engineering Research Center for Dyeing and Finishing of Textiles, Donghua University, Shanghai 201620)

Abstract The key intermediate boronic acid **2** was synthesized via sequential reactions of Friedel-Crafts alkylation, bromination and nucleophilic reaction by using anisole as starting material. Hydroxyacetone was converted to bromide compound **3** by the Wittig reaction, bromination, Arbuzov reaction and Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) reaction. Three novel retinoid derivatives **1a~1c** can be obtained via the Suzuki coupling reaction of the boronic acid **2** with bromide compound **3**, methyl 4-bromo-2-fluorobenzoate (**4**) or methyl 6-bromonicotinate (**5**) and followed by hydrolysis of the corresponding esters. In addition, trifluoromethyl substituted retinoid derivative **1d** was synthesized via sequential reactions of Friedel-Crafts alkylation, nitration, trifluoromethylation, reduction and nucleophilic reaction with bromobenzene as starting material. The structures of four new retinoid derivatives **1a~1d** were confirmed by ^1H NMR, ^{13}C NMR, IR and HRMS analyses. Furthermore, the inducing differentiation abilities of molecules **1a~1d** for HL-60 cells were tested, and the results revealed that these four retinoid derivatives are biological active. The IC_{50} values of fluorinated derivatives **1b** and **1d** are lower than that of commercial medicine all trans retinoid acid (ATRA).

Keywords retinoid derivative; synthesis; organofluorine compounds; antineoplastic

维甲酸类化合物(Retinoid)^[1~3]是一类由天然维生素 A (Vitamin A) 代谢形成的衍生物, 同时也包括所有与它具有相似结构的一系列人工合成产物, 到目前为止, 共包含 4000 多种化合物。维甲酸类化合物被广泛应用于治疗多种皮肤病, 例如寻常痤疮、银屑病、鱼鳞病、扁平苔藓、毛发红糠疹、毛囊角化病等等。此外, 维甲酸类化合物在预防和治疗恶性肿瘤上也取得了不错的进

展。目前最为成功的维甲酸类药物是 Targretin (LGD 1069), 被用于治疗皮肤病和癌症(图 1)。然而, 在临床应用上, 大部分维甲酸类药物的治疗剂量接近药物的中毒剂量, 这一缺陷限制了维甲酸类药物的进一步临床应用。因此, 合成高效低毒的维甲酸类化合物成为当务之急, 被越来越多的化学家所关注。

* E-mail: hyg@dhu.edu.cn

Received February 11, 2014; revised March 31, 2014; published online April 1, 2014.

Project supported by the Innovation Program of Shanghai Municipal Education Commission (No. 13ZZ047), the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars (No. 2011-1139) and the State Education Ministry and the Fundamental Research Funds for the Central Universities.

上海市教委科研创新项目(No. 13ZZ047)、教育部留学归国人员科研启动基金(No. 教外司留[2011]1139 号)和中央高校基本科研业务费专项资金资助项目。

图1 Targretin (LGD 1069)
Figure 1 Targretin (LGD 1069)

卿凤翎课题组^[4-6]在此之前曾对维甲酸类药物进行过深入研究, 本工作拟在此研究基础上, 设计合成新型的维甲酸类化合物特别是含氟衍生物, 并对它们的生理活性进行研究, 以期发现新型的综合性能更为优异的维甲酸类药物。我们以商品化维甲酸类药物 Targretin^[7](图1)作为母核, 进行分子设计。Targretin 的疏水基团部分是一个四氢萘环结构, 根据已有的报道^[8], 含该结构的维甲酸衍生物所表现出的生物活性最佳。所以我们拟在目标分子中保留该结构, 并尝试将3-位的取代基更换为三氟甲基或者甲氧基, 以期获得更好的生物活性。在连接基和极性末端基团部分上, 参考相关文献报道^[8-10], 我们发现, 在维甲酸类化合物分子中引入共轭多烯烃羧酸结构、含氟苯甲酸结构和烟酸结构时, 维甲酸类化合物的生物活性都有不同程度的提高。所以, 设想在我们设计的目标分子中引入这些结构以期获得更好的生物活性。基于以上分析, 设计了四个目标分子 **1a~1d**(图2), 期望通过对 Targretin 的结构改进, 获得高效低毒, 综合性能更为优异的维甲酸类药物。

图2 维甲酸类似物
Figure 2 Retinoid derivatives

1 结果与讨论

1.1 目标分子的逆合成分析

通过对目标分子的结构分析, 可以知道完成该类化合物合成的关键在于共轭体系的构建, 向建南课题组^[11]曾报道运用无膦钯催化 Heck 反应构建此共轭体系。我们将目标分子 **1a~1c** 分别拆分成两个片段(Scheme 1), 其中一个为共同片段, 即硼酸化合物 **2**; 另一个则是三个溴代化合物片段 **3**, **4** 和 **5**。设想通过 Suzuki 偶联反应将化合物 **2** 与化合物 **3**, **4** 和 **5** 分别连接来实现目标分子的合成, 其中 4-溴-2-氟苯甲酸甲酯(**4**)和 6-溴烟酸甲酯(**5**)是商品化试剂, 因此实际仅需合成溴代化合物 **3**。另外, 目标分子 **1d** 可拆分为三氟甲基取代苯胺衍生物 **6** 与对羧基磺酰氯 **7** 两个片段(Scheme 1), 通过磺酰化反应将两者连接。

Scheme 1

1.2 3-甲氧基-5,5,8,8-四甲基-5,6,7,8-四氢萘-2-硼酸(2)的合成

关键中间体即硼酸 **2** 的合成路线如 Scheme 2 所示. 以 2,5-二甲基-2,5-己二醇(**8**)为起始原料, 按照文献[7]方法, 首先定量转化为 2,5-二甲基-2,5-二氯己烷(**9**), 然后与苯甲醚发生 Friedel-Crafts 烷基化反应, 该步反应中催化剂无水三氯化铝的用量与原料苯甲醚和二氯代物 **9** 的物质的量之比对反应结果影响明显. 根据反复的尝试, 发现二氯代物 **9** 和苯甲醚的最佳物质的量之比为 1 : 1.3, 无水三氯化铝的用量为 10 mol%, 此时二氯代物 **9** 可以转化完全, 而过量的苯甲醚则能够通过减压蒸馏除去, 最终可以 86% 的产率获得纯净的白色固体 **10**. 化合物 **10** 经 *N*-溴代丁二酰亚胺(NBS)溴化后得化合物 **11**. 然后首先尝试了传统的硼酸制备方法, 将正丁基锂溶液在低温下加入溴代物 **11** 的四氢呋喃溶液中后, 再加入硼酸三异丙酯. 然而, 通过薄层色谱监控反应, 发现产物点比较杂乱, 目标产物 **2** 的分离产率仅为 20%. 为了改善这一结果, 我们参考 Li 等^[12]的文献, 先在低温下, 将硼酸三异丙酯加入化合物 **11** 的四氢呋喃溶液中, 再将正丁基锂溶液缓慢加入到反应体系中. 结果发现, 反应产物单一, 分离产率提高至 67%.

Scheme 2

1.3 (2*E*,4*E*)-5-(2-溴环戊烯基)-3-甲基-2,4-戊二烯酸乙酯(3)的合成

合成化合物 **1a~1c** 所需的三个溴代化合物片段 **3**, **4** 和 **5** 中, 4-溴-2-氟苯甲酸甲酯(**4**)和 6-溴烟酸甲酯(**5**)是商品化试剂. 化合物 **3** 的合成则以羟基丙酮(**12**)为起始原料(Scheme 3), 与磷叶立德 **13** 缩合得丁烯酸酯 **14**, 然后按照文献方法, 使用 $\text{PPh}_3/\text{CBr}_4/\text{imidazole}$ 体系^[13]将化合物 **14** 中的羟基转化为溴. 然而结果表明在此条件下原料转化不完全, 产率仅为 30%. 经过筛选溴化试剂, 当以三溴化磷为溴源时, 羟基能够完全转化为溴, 以 75% 的产率得到溴化物 **15**. 化合物 **15** 经与磷酸三乙酯反应后再与 2-溴环戊烯基甲醛(**17**)进行 Horner-Wadsworth-Emmons 反应, 以 55% 的分离产率获得溴代物 **3**, 在体系中加入六甲基磷酰三胺(HMPA)作为辅助溶剂, 可以将所生成双键的选择性(*E* : *Z*)由 3 : 1 略微

提高至 5 : 1.

Scheme 3

1.4 维甲酸类似物 **1a~1c** 的合成

在成功完成硼酸片段 **2** 和溴代物片段 **3** 的合成后, 我们发现二者可以在常规的 Suzuki 偶联反应条件^[14]下顺利地发生偶联(Scheme 4), 在碱性水解酯基后, 以两步 59% 的产率获得目标化合物 **1a**. 在相同反应条件下, 将溴代物 **3** 更换为 4-溴-2-氟苯甲酸甲酯(**4**)或 6-溴烟酸甲酯(**5**)后, 依次发生 Suzuki 偶联和酯基水解, 可以顺利地分别以 85% 和 64% 的产率获得目标化合物 **1b** 和 **1c** (Scheme 4).

Scheme 4

1.5 维甲酸类似物 **1d** 的合成

三氟甲基是含氟药物中最广泛存在的药效团, 三氟甲基的引入可能会获得意想不到的效果^[15]. 三氟甲基取代维甲酸类似物 **1d** 的合成中(Scheme 5), 三氟甲基的高效引入是关键. 仍以 2,5-二甲基-2,5-二氯己烷(**9**)为起

始原料, 首先与溴苯发生 Friedel-Crafts 烷基化反应, 以 70% 的产率获得四甲基四氢萘骨架化合物 **18**. 在接下来的硝化反应中, 发现当使用浓硫酸/浓硝酸体系^[4]时, 反应太过剧烈, 反应进程难以控制且产物不易分离提纯. 当改用更为温和的硝化体系即浓硝酸/乙酸酐时, 反应能够很快完成, 以 90% 的产率获得硝化产物 **19**. 化合物 **19** 中苯环上的溴由于受到硝基的吸电子作用, 反应活性提高, 可以顺利地通过 Chen 等^[16]发展的方法将溴转化为三氟甲基基团, 以 89% 的产率得到三氟甲基化产物 **20**. 化合物 **25** 在还原铁粉与稀盐酸中回流反应, 以定量产率将硝基还原为氨基得关键中间体 **6**. 最后由化合物 **6** 与对羧基苯磺酰氯在吡啶中反应^[17], 以 30% 的分离产率得到目标分子 **1d**. 该步反应产率较低的原因可能在于邻位三氟甲基这一强吸电子基的影响使得氨基的亲核性降低.

Scheme 5

1.6 维甲酸类似物 **1a~1d** 的诱导肿瘤分化活性评价 (MTT)

在成功合成出四个维甲酸类似物 **1a~1d** 后, 为了进一步确认这些分子的应用前景, 我们以商品化药物全反式维甲酸(ATRA)为对照材料, 通过药理活性筛选考察化合物 **1a~1d** 对白血病细胞株 HL-60 的诱导肿瘤分化活性^[18]. 通过采用 MTT 法考察对照材料 ATRA 及目标分子 **1a~1d** 的细胞毒性. MTT 全称为 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐, 是一种黄色的染料. 其检测原理是活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶可将 MTT 试剂还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲瓖(Formazan)并沉积在细胞中, 而死细胞因为不含该类酶而无法生成甲瓖. 随后加入二甲基亚砜(DMSO)溶液溶解甲瓖, 并通过酶联免疫检测仪甲瓖的 DMSO 溶液在 570 nm 处吸收值, 可推算出活细胞的数目, 从而得知不同目标分子在诱导 HL-60 细胞分化能力上的高低, 并以此计算出各个

目标分子的 IC_{50} 值(半抑制浓度).

维甲酸类似物 **1a~1d** 的 MTT 法测试结果如图 1 所示. 可以看到化合物 **1a~1d** 在一定浓度范围内均可以促进 HL-60 细胞的凋亡, 并且随着目标分子 **1a~1d** 浓度 (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的升高, HL-60 细胞活力逐渐降低, 这表明目标分子 **1a~1d** 都具有一定的生物活性, 而且其中两个含氟的维甲酸类似物 **1b** 和 **1d** 的活性略高于非氟类似物. 依据图 1 可以计算出 ATRA, **1b** 和 **1d** 的 IC_{50} 值分别为 0.21212, 0.17172 和 0.16162 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. 表明含氟维甲酸类似物 **1b** 和 **1d** 具有比对照化合物 ATRA 更低的 IC_{50} 值, 表现出更好的药物活性. 通常维甲酸类药物的治疗剂量十分高, 往往接近药物的中毒剂量, 因此, 含氟维甲酸类似物 **1b** 和 **1d** 的低 IC_{50} 值, 对于它们的药物应用前景有着极为重要的意义.

图 1 ATRA 及目标分子 **1a~1d** 的 MTT 法活性测试
Figure 1 Biological testing results (MTT) of ATRA and target molecules **1a~1d**

2 结论

以简单易得的原料出发, 经过多步反应合成了四个新型的维甲酸类化合物 **1a~1d**, 并通过 ^1H NMR, ^{13}C NMR, IR 和 HRMS 的表征确认了化合物的结构. 以 MTT 法测定了 **1a~1d** 对白血病细胞株 HL-60 的分化活性, 结果表明目标分子 **1a~1d** 都具有潜在的药物活性. 其中, 含氟的维甲酸类似物 **1b** 和 **1d** 具有较商品化药物 ATRA 更低的 IC_{50} 值, 具有进一步药物研究价值.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

核磁共振氢谱(^1H NMR)用 BrukerAM-400(400 MHz)型核磁共振仪测定, TMS 作内标; 核磁共振碳谱(^{13}C NMR)用 BrukerAM-400 (100.6 MHz)型核磁共振仪测定, TMS 作内标; 核磁共振氟谱(^{19}F NMR)用 BrukerAM-400

(376.5 MHz)型核磁共振仪测定, FCCl_3 为外标, 高场为负; 红外光谱用 Nicolet 380 FT-IR 傅立叶变换红外光谱仪测定; MS 用 Fimiigan-MAT-8430 型测定; HRMS 用 Bruker Daltonics, Inc. APEXIII 7.0 TESLA FTMS 测定; 熔点由北京泰克仪器有限公司的 WRS-2A 型显微熔点测定仪测得, 测熔点所用温度计未经校正。

血细胞计数板, 上海求精生化试剂仪器有限公司; 96 孔细胞培养板, 海门博阳实验器材厂; 25 mL 培养瓶, 美国 Corning Incorporation; XD5-100 型倒置显微镜, 上海长方光学仪器有限公司; TDL80-2B 型台式离心机, 上海安亭科学仪器厂; Heraeus BB15 型 CO_2 培养箱, 美国 Thermo Scientific; MK3 型酶标仪, 美国 Thermo Scientific.

实验所用化学试剂均由上海泰坦科技有限公司和萨恩化学有限公司生产提供. 实验所用分析纯溶剂均由上海政创有限公司和上海凌峰化学试剂有限公司生产提供. 人原髓细胞白血病细胞(HL-60 细胞), 由中国科学院细胞库提供.

3.2 实验方法

3.2.1 6-甲氧基-1,1,4,4-四甲基-1,2,3,4-四氢萘(10)的合成

在冰浴下, 将三氯化铝(0.5 g, 3.7 mmol)分三批加入到 2,5-二氯-2,5-二甲基己烷(9) (10.0 g, 54.6 mmol)、苯甲醚(8 mL, 72 mmol)和二氯甲烷(80 mL)的混合溶液中. 将反应体系温度升至室温, 反应搅拌过夜. 反应结束后, 在冰浴下, 向体系中加入稀盐酸(25 mL), 并继续搅拌 10 min. 用石油醚(80 mL $\times$ 3)对反应液进行萃取, 合并有机相, 依次用饱和碳酸氢钠溶液和饱和食盐水洗涤, 经无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干溶剂. 在油浴下, 减压蒸馏得到白色固体 10 (120~123 $^{\circ}\text{C}$ /300 Pa, 9.6 g, 44.2 mmol), 产率为 81%. m.p. 42~45 $^{\circ}\text{C}$ (文献值^[7]: 40~42 $^{\circ}\text{C}$); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.32 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.80 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 3.86 (s, 3H), 1.76 (s, 4H), 1.34 (s, 12H).

3.2.2 6-溴-7-甲氧基-1,1,4,4-四甲基-1,2,3,4-四氢萘(11)的合成

在冰浴下, 将 *N*-溴代丁二酰亚胺(4.5 g, 24 mmol)分三批加入到化合物 10 (5.0 g, 22.9 mmol)和 DMF (30 mL)的混合溶液中. 将反应体系温度升至室温, 反应避光搅拌过夜. 反应结束后, 在冰浴下, 向体系中缓慢加入水(20 mL), 乙酸乙酯萃取(30 mL $\times$ 3), 合并有机相, 依次用水、饱和碳酸氢钠溶液和饱和食盐水洗涤, 经无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干溶剂, 经快速柱层析(硅胶, 石油醚)分离提纯后得到白色固体 11 (6.5 g, 21.8 mmol), 产率为 95%. m.p. 75~77 $^{\circ}\text{C}$ (文献值^[6]: 75~76 $^{\circ}\text{C}$); ^1H

NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.44 (s, 1H), 6.82 (s, 1H), 3.89 (s, 3H), 1.68 (s, 4H), 1.30 (s, 6H), 1.27 (s, 6H).

3.2.3 3-甲氧基-5,5,8,8-四甲基-5,6,7,8-四氢萘-2-硼酸(2)的合成

用四氢呋喃(25 mL)溶解化合物 11 (8.3 g, 27.9 mmol)和硼酸三异丙酯(18 mL, 78 mmol). 将反应体系温度降至-78 $^{\circ}\text{C}$ 后, 将正丁基锂(18.3 mL, 29.3 mmol)缓慢滴加入到反应体系中. 滴加结束后, 继续在一78 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌 2 h. 随后, 将反应体系温度升至室温, 反应搅拌过夜. 反应结束后, 在冰浴下, 向体系中缓慢加入水(20 mL), 用乙醚(30 mL $\times$ 3)对反应液进行萃取, 合并有机相, 用饱和食盐水洗涤, 经无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干溶剂, 经快速柱层析(硅胶, 石油醚/二氯甲烷)梯度淋洗分离提纯, 石油醚重结晶后得到白色固体 2 (4.9 g, 18.7 mmol), 产率为 67%. m.p. 146~148 $^{\circ}\text{C}$ (文献值^[20]: 140~142 $^{\circ}\text{C}$); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.78 (s, 1H), 6.82 (s, 1H), 5.85 (s, 2H), 3.90 (s, 3H), 1.68 (s, 4H), 1.29 (s, 12H).

3.2.4 (*E*)-4-溴-3-甲基-2-丁烯酸乙酯(15)的合成

在冰浴下, 将三溴化磷(11 mL, 116 mmol)缓慢地滴加到化合物 14 (8.4 g, 58 mmol)和二氯甲烷(25 mL)的混合溶液中. 滴加完毕后, 将反应体系温度升至室温, 搅拌反应 6 h. 反应结束后, 在冰浴下, 向体系中缓慢加入冰水(20 mL), 用乙酸乙酯(30 mL $\times$ 3)对反应液进行萃取, 合并有机相, 依次用水、饱和碳酸氢钠溶液和饱和食盐水洗涤, 经无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干溶剂, 经快速柱层析(硅胶, 石油醚/乙酸乙酯, $V:V=50:1$)分离提纯后得到无色液体 15^[13] (9.0 g, 43.4 mmol), 产率为 75%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.93 (s, 1H), 4.15 (q, 2H), 3.92 (s, 2H), 2.24 (s, 3H), 1.25 (t, $J=7.2$ Hz, 3H).

3.2.5 (*E*)-4-(二乙氧基)磷酰基-3-甲基-2-丁烯酸乙酯(16)的合成

将化合物 15 (3.8 g, 17.7 mmol)和磷酸三乙酯(2.6 g, 15.5 mmol)混合. 反应回流(140 $^{\circ}\text{C}$)搅拌过夜. 反应结束后, 将反应体系温度降至室温, 用乙酸乙酯稀释反应液, 经快速柱层析(硅胶, 石油醚/乙酸乙酯, $V:V=50:1$; 石油醚/乙酸乙酯, $V:V=1:1$)梯度淋洗分离提纯后得到无色液体 16^[13] (4.0 g, 15.4 mmol), 产率为 87%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.75 (d, $J_{\text{P,H}}=4.0$ Hz, 1H), 4.11~4.04 (m, 6H), 2.69~2.61 (m, $J_{\text{P,H}}=24.0$ Hz, $J_{\text{H,H}}=8.0$ Hz, 2H), 2.30~2.21 (m, 3H), 1.31~1.21 (m, 9H).

3.2.6 (*2E,4E*)-5-(2-溴环戊-1-烯基)-3-甲基-2,4-戊二烯酸乙酯(3)的合成

在冰浴下, 将化合物 16 (1.8 g, 6.7 mmol)和四氢呋喃(10 mL)的混合溶液缓慢地滴加到 60%氢化钠(0.3 g,

7.4 mmol)和四氢呋喃(5 mL)的混合溶液中. 滴加完毕后, 继续反应 15 min, 向体系中加入六甲基磷酰三胺(5 mL), 再继续反应 15 min, 向反应体系中缓慢加入化合物 **17** (0.97 g, 5.6 mmol)和四氢呋喃(10 mL)的混合溶液. 滴加完毕后, 将反应体系温度升至室温, 反应搅拌过夜. 反应结束后, 在冰浴下, 向体系中缓慢加入饱和氯化铵水溶液(10 mL), 用乙酸乙酯(10 mL $\times$ 3)对反应液进行萃取, 合并有机相, 用饱和食盐水洗涤, 经无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干溶剂, 经快速柱层析(硅胶, 石油醚/乙酸乙酯, $V:V=50:1$)分离提纯, 乙醇重结晶后得到白色固体 **3** (0.87 g, 3.0 mmol), 产率为 55%. m.p. 68~70 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 6.90 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 6.25 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 5.86 (s, 1H), 4.20 (q, $J=8.0$ Hz, 2H), 2.79~2.83 (m, 2H), 2.54~2.50 (m, 2H), 2.38 (s, 3H), 2.08~2.00 (m, 2H), 1.33~1.29 (m, 3H).

3.2.7 (2*E*,4*E*)-5-[2-(3-甲氧基-5,5,8,8-四甲基-5,6,7,8-四氢萘-2-基)环戊-1-烯基]-3-甲基-2,4-戊二烯酸(**1a**)的合成

将 2.0 mol/L 碳酸钠溶液(2 mL, 4.0 mmol) 加入到化合物 **2** (0.5 g, 1.9 mmol)、化合物 **3** (0.5 g, 1.9 mmol)、四(三苯基磷)钼(0.065 g, 0.057 mmol)和甲苯(8 mL)的混合溶液中. 在 85 °C 下反应 2 h. 反应结束后, 将反应体系冷却至室温, 加入水淬灭反应. 用乙酸乙酯(5 mL $\times$ 3)萃取反应液, 合并有机相, 用饱和食盐水洗涤, 经无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干溶剂, 经快速柱层析(硅胶, 石油醚/乙酸乙酯, $V:V=50:1$)分离提纯后得到偶联产物为黄色固体(0.7 g, 1.7 mmol), 产率为 88%. m.p. 120~122 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.04 (s, 1H, ArH), 6.91 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 6.83 (s, 1H, ArH), 6.25 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 5.83 (s, 1H), 4.21 (q, $J=8.0$ Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 2.92 (t, $J=4.0$ Hz, 2H), 2.69 (t, $J=4.0$ Hz, 2H), 2.24 (s, 3H), 2.07~2.00 (m, 2H), 1.71 (s, 4H), 1.35 (s, 6H), 1.28 (s, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 167.29, 155.09, 153.40, 145.49, 145.43, 136.74, 136.60, 132.11, 130.66, 129.54, 124.19, 118.23, 108.62, 59.53, 55.37, 35.23, 35.16, 34.57, 33.67, 31.92, 31.77, 22.38, 14.36, 13.70; IR (KBr) ν : 2957, 2853, 1709, 1607, 1527, 1497, 1463, 1234, 1154, 1091, 1046, 961, 836 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 445.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{NaO}_3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 445.2713, found 445.2692.

将偶联产物(84 mg, 0.2 mmol)溶于乙醇(10 mL)中, 加入氢氧化钠溶液(2 mol $\cdot$ L $^{-1}$, 0.5 mL, 4.0 mmol). 回流反应 12 h, 反应结束后, 将反应体系冷却至室温, 用 1 mol $\cdot$ L $^{-1}$ 的盐酸将体系 pH 值调至 2. 用乙酸乙酯萃取(5 mL $\times$ 3), 合并有机相, 用饱和食盐水洗涤, 经无水硫酸

钠干燥, 过滤, 旋干溶剂, 经快速柱层析(硅胶, 石油醚/乙酸乙酯, $V:V=4:1$)分离提纯后得到黄色固体 **1a** (54.6 mg, 0.13 mmol), 产率为 67%. m.p. 140~145 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.04 (s, 1H, ArH), 6.96 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 6.83 (s, 1H, ArH), 6.27 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 5.83 (s, 1H), 3.82 (s, 3H), 2.92 (t, $J=4.0$ Hz, 2H), 2.69 (t, $J=4.0$ Hz, 2H), 2.25 (s, 3H), 2.07~2.00 (m, 2H), 1.71 (s, 4H), 1.35 (s, 6H), 1.28 (s, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 171.52, 155.90, 155.09, 146.27, 145.60, 136.75, 136.62, 131.88, 131.56, 129.52, 124.11, 117.15, 108.63, 55.37, 38.15, 35.22, 35.14, 34.58, 33.67, 32.69, 31.92, 31.77, 22.38, 13.91; IR (KBr) ν : 3418, 2957, 2926, 2853, 1675, 1593, 1498, 1461, 1261, 1187, 1046, 804 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 393.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 393.2435, found 393.2428.

3.2.8 2-氟-4-(3-甲氧基-5,5,8,8-四甲基-5,6,7,8-四氢萘-2-基)苯甲酸(**1b**)的合成

化合物 **1b** 的合成方法参照化合物 **1a**, 由化合物 **2** 和 **4** 在 100 °C 下反应 12 h 后得到偶联产物为无色液体, 产率为 88%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.02~7.99 (m, 1H, ArH), 7.43~7.40 (m, 2H, ArH), 7.36 (s, 1H, ArH), 6.95 (s, 1H, ArH), 3.99 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 1.76 (s, 4H), 1.39 (s, 6H), 1.35 (s, 6H); ^{19}F NMR (375 MHz, CDCl_3) δ : -110.38; ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 165.03 (d, $J_{\text{F,C}}=4.0$ Hz), 164.99 (d, $J_{\text{F,C}}=4.0$ Hz), 162.92 (d, $J_{\text{F,C}}=257.0$ Hz), 160.35 (d, $J_{\text{F,C}}=257.0$ Hz), 154.26, 147.05, 145.88 (d, $J_{\text{F,C}}=9.0$ Hz), 145.79 (d, $J_{\text{F,C}}=9.0$ Hz), 137.66, 131.53, 128.77, 125.94, 125.02 (d, $J_{\text{F,C}}=3.0$ Hz), 124.99 (d, $J_{\text{F,C}}=3.0$ Hz), 117.96 (d, $J_{\text{F,C}}=24.0$ Hz), 117.72 (d, $J_{\text{F,C}}=24.0$ Hz), 116.42 (d, $J_{\text{F,C}}=10.0$ Hz), 116.32 (d, $J_{\text{F,C}}=10.0$ Hz), 109.17, 55.57, 52.17, 35.13, 34.68, 33.78, 31.94, 31.82; IR (KBr) ν : 2958, 2861, 1729, 1621, 1568, 1513, 1492, 1294, 1265, 1237, 878, 778, 738 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 393.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{FNaO}_3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 393.1826, found 393.1828.

偶联产物碱性水解后得到白色固体 **1b**, 产率为 97%. m.p. 40~45 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.14~8.10 (m, 1H, ArH), 7.49~7.45 (m, 2H, ArH), 7.32 (s, 1H, ArH), 6.96 (s, 1H, ArH), 3.87 (s, 3H), 1.76 (s, 4H), 1.39 (s, 6H), 1.35 (s, 6H); ^{19}F NMR (375 MHz, CDCl_3) δ : -109.87; ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 169.79, 163.65 (d, $J_{\text{F,C}}=259.0$ Hz), 161.06 (d, $J_{\text{F,C}}=259.0$ Hz), 154.25, 147.27, 147.02 (d, $J_{\text{F,C}}=10.0$ Hz), 146.92 (d, $J_{\text{F,C}}=10.0$ Hz), 137.71, 132.18, 128.82, 125.78, 125.18 (d, $J_{\text{F,C}}=3.0$ Hz), 125.15 (d, $J_{\text{F,C}}=3.0$ Hz), 118.11 (d, $J_{\text{F,C}}=23.0$ Hz),

117.88 (d, $J_{\text{FC}}=23.0$ Hz), 115.39, 109.14, 55.58, 35.11, 34.72, 33.81, 31.96, 31.83; IR (KBr) ν : 2963, 2928, 2857, 1684, 1621, 1197, 881, 734, 703 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 355.2 $[\text{M}-1]^-$; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{FO}_3$ $[\text{M}-1]^-$ 355.1711, found 355.1715.

3.2.9 6-(3-甲氧基-5,5,8,8-四甲基-5,6,7,8-四氢萘-2-基)烟酸(**1c**)的合成

化合物 **1c** 的合成方法参照化合物 **1a**, 由化合物 **2** 和 **5** 在 100 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 12 h 得到偶联产物为白色固体, 产率为 63.5%. m.p. 80~82 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 9.31 (s, 1H), 8.29 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.98 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.85 (s, 1H), 6.93 (s, 1H), 3.98 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 1.74 (s, 4H), 1.35 (s, 12H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 166.11, 160.02, 155.13, 150.44, 148.18, 137.80, 136.60, 129.63, 125.76, 124.35, 123.37, 109.35, 55.65, 52.15, 35.20, 35.13, 34.75, 33.85, 31.92, 31.80; IR (KBr) ν : 2959, 2924, 2855, 1719, 1593, 1235, 863, 793, 739 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 354.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 354.2064, found 354.2049.

偶联产物碱性水解后得到白色固体 **1c**, 产率为 100%. m.p. 95~99 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 9.14 (s, 1H), 8.26 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.97 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.02 (s, 1H), 3.84 (s, 3H), 1.66 (s, 4H), 1.31 (s, 6H), 1.25 (s, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 166.81, 159.29, 155.40, 150.55, 148.16, 137.25, 137.12, 129.27, 125.58, 124.70, 124.62, 110.01, 56.16, 35.08, 34.88, 33.84, 32.18, 31.91; IR (KBr) ν : 2962, 2923, 2857, 1708, 1603, 1191, 863, 794, 737 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 338.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 338.1762, found 338.1760.

3.2.10 6-溴-1,1,4,4-四甲基-7-硝基-1,2,3,4-四氢萘(**19**)的合成

用乙酸酐(10 mL)溶解化合物 **18** (1.6 g, 6 mmol). 在 0 $^{\circ}\text{C}$ 下, 将浓硝酸(2.0 mL)缓慢地加入到反应体系中. 滴加完毕后, 将反应体系温度升至室温, 继续反应 2 h. 反应结束后, 将反应液倒入冰水混合物中, 并加入稀盐酸(2 mL), 有黄色沉淀析出. 在室温下搅拌混合物 5~10 min, 过滤混合物, 用水和饱和碳酸氢钠溶液洗涤滤饼, 得到淡黄色固体 **19**^[4] (1.7 g, 5.4 mmol), 产率为 90%. m.p. 117~119 $^{\circ}\text{C}$ (文献值^[5]: m.p. 121~123 $^{\circ}\text{C}$); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.85 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 1.73 (s, 4H), 1.32 (s, 12H).

3.2.11 4-(*N*-(5,5,8,8-四甲基-3-三氟甲基-5,6,7,8-四氢萘-2-基)磺酰胺基)苯甲酸(**1d**)的合成

将化合物 **7** (0.31 g, 1.4 mmol)分五批加入到化合物

6 (0.2 g, 0.74 mmol)、吡啶(1 mL)和二氯甲烷(5 mL)的混合溶液中. 在室温下, 反应持续搅拌 24 h. 反应结束后, 用水淬灭反应, 用二氯甲烷(5 mL $\times$ 3)萃取, 合并有机相, 用稀盐酸溶液和饱和食盐水洗涤, 经无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干溶剂, 经快速柱层析(石油醚/乙酸乙酯, $V:V=1:1$)分离纯化得到白色固体 **1d** (0.11 g, 0.25 mmol), 产率为 30%. m.p. 200~202 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.17 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.87 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.72 (s, 1H), 7.39 (s, 1H), 6.77 (s, 1H), 1.70 (s, 4H), 1.31 (s, 6H), 1.25 (s, 6H); ^{19}F NMR (375 MHz, CDCl_3) δ : -59.62; ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 168.53, 150.90, 143.46, 143.00, 130.66, 130.44, 127.52, 124.91, 125.40, 124.91 (q, $J_{\text{FC}}=6.0$ Hz), 122.42, 122.365, 118.95, 118.65, 34.75, 34.57, 34.44, 34.11, 31.53, 31.46; IR (KBr) ν : 2961, 2924, 2852, 2617, 2505, 2361, 2265, 1712, 1617, 1575, 1506, 912, 804, 769, 705 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 454.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{NO}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 454.1305, found 454.1301.

3.2.12 目标分子 **1a~1d** 对 HL-60 细胞株的诱导分化活性测试

HL-60 细胞被用来进行细胞水平评价实验. HL-60 细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5%二氧化碳浓度条件下持续生长于 50 mL 的细胞培养瓶内, 采用 DMEM 高糖培养基 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 培养. 培养基内添加青霉素(100 units/mL), 链霉素(100 $\mu\text{L}/\text{mL}$)和 10%灭活的胎牛血清. 细胞毒性实验时, 提前一天在 96 孔板内每孔种 1×10^4 个细胞, 并采用 MTT(噻唑蓝)法考察各组材料的细胞毒性.

以 MTT 测试来检测制备得到的目标分子 **1a~1d** 的药物活性, 先将 HL-60 细胞以 1×10^4 /孔的密度种入 96 孔板中. 在过夜孵化之后, 分别称取一定量的 **1a~1d**, 溶于含 0.5% DMSO 的 PBS 缓冲液中, 配制成目标分子 **1a~1d** 的浓度为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液, 再分别稀释到 5, 1, 0.5, 0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液, 将上述不同浓度的目标分子(其各自的终浓度均为 0.5, 0.1, 0.05, 0.01 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)孵化 HL-60 细胞 48 h 后, 加入 20 μL MTT, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵化 4 h 后, 用平板离心机离心 96 孔板(1000 r/min, 5 min), 然后将培养液倒掉, 加入 200 μL DMSO, 摇床振摇 20 min 后, 在 570 nm 用酶标仪测得结果, 得到实验数据.

辅助材料(Supporting Information) 化合物 **6**, **9**, **14**, **17**, **18**, **20** 的合成方法及 ^1H NMR, ^{19}F NMR 数据. 化合物 **1a~1d** 的 ^1H NMR, ^{19}F NMR, ^{13}C NMR 和 HRMS 谱图. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Barnard, J. H.; Collings, J. C.; Whiting, A.; Przyborski, S. A.; Marder, T. B. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 11430.
- [2] Vaezi, M. F.; Alam, M.; Muccio, D. D.; Rogers, T. S.; Simpson-Herren, L.; Wille, J. J.; Hill, D. L.; Doran, T. I.; Brouillette, W. J.; Muccio, D. D. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 4499.
- [3] Alam, M.; Zhestkov, V.; Sani, B. P.; Venepally, P.; Levin, A. A.; Kazmer, S.; Li, E.; Norris, A. W.; Zhang, X. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2302.
- [4] Qing, F. L.; Fan, J. F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 2117.
- [5] Qing, F. L.; Fan, J. F. *J. Fluorine Chem.* **1999**, *96*, 159.
- [6] Qing, F. L.; Yue, X. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 3053.
- [7] Boehm, M. F.; Zhang, L.; Badea, B. A.; White, S. K.; Mais, D. E.; Berger, E.; Suto, C. M.; Goldman, M. E.; Heyman, R. A. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2930.
- [8] Faul, M. M.; Ratz, A. M.; Sullivan, K. A.; Trankle, W. G.; Winneroski, L. L. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5772.
- [9] Farmer, L. J.; Jeong, S.; Kallel, E. A.; Koch, S. S. C.; Croston, G. E.; Flatten, K. S.; Heyman, R. A.; Nadzan, A. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 2393.
- [10] Wagner, C. E.; Jurutka, P. W.; Marshall, P. A.; Groy, T. L.; Vaart, A.; Ziller, J. W.; Furmick, J. K.; Graeber, M. E.; Matro, E.; Miguel, B. V.; Tran, I. T.; Kwon, J.; Tedeschi, J. N.; Moosavi, S.; Danishyar, A.; Philp, J. S.; Khamees, R. O.; Jackson, J. N.; Grupe, D. K.; Badshah, S. L.; Hart, J. W. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5950.
- [11] Liu, X. Y.; Li, Z. Z.; Wu, Y. D.; Zhang, Z. Y.; Liang, S. Z.; Jia, X. L.; Xiang, J. N. *Acta Chim. Sinica* **2008**, *66*, 1086 (in Chinese). (刘西洋, 李治章, 吴运东, 张尊英, 梁盛宗, 贾晓雷, 向建南, 化学学报, **2008**, *66*, 1086.)
- [12] Li, W. J.; Nelson, D. P.; Jensen, M. S.; Hoerrner, R. S.; Cai, D. W.; Larsen, R. D.; Reider, P. J. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 5394.
- [13] Magoulas, G. E.; Bariamis, S. E.; Athanassopoulos, C. M.; Haskopoulos, A.; Dedes, P. G.; Krokidis, M. G.; Karamanos, N. K.; Kletsas, D.; Papaioannou, D.; Maroulis, G. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 721.
- [14] Miyashita, K.; Sakai, T.; Imanishi, T. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2683.
- [15] Qing, F.-L.; Qiu, X. *Organofluorine Chemistry*, Science Press, Beijing, **2007** (in Chinese). (卿凤翎, 邱小龙, 有机氟化学, 科学出版社, 北京, **2007**.)
- [16] Chen, Q. Y.; Wu, S. W. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1989**, 705.
- [17] Zheng, X. X.; Oda, H.; Takamatsu, K.; Sugimoto, Y.; Tai, A.; Akaho, E.; Ali, H. I.; Oshiki, T.; Kakuta, H.; Sasaki, K. *Biol. Med. Chem.* **2007**, *15*, 1014.
- [18] Hao, B. C.; Zhang, Y. H.; Lai, Y. S.; Yuan, S. T.; Zhang, L. Y. *Chin. J. Org. Chem.* **2007**, *27*, 629 (in Chinese). (郝北辰, 张奕华, 赖宜生, 袁胜涛, 张陆勇, 有机化学, **2007**, *27*, 629.)
- [19] Tsang, K. Y.; Sinha, S.; Liu, X.; Bhat, S.; Chandraratna, R. A. *US 20050148590*, **2005** [*Chem. Abstr.* **2005**, *143*, 97206].
- [20] Nahoum, V.; Pérez, E.; Germain, P.; Rodríguez-Barrios, F.; Manzo, F.; Kammerer, S.; Lemaire, G.; Hirsch, O.; Royer, C. A.; Grone-meyer, H.; Lera, A. R.; Bourguet, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 17323.

(Zhao, C.)