吡唑环桥连简约型长春碱类似物的设计合成

国翠平^a 彭群龙^a 潘 龙^a 张冬梅^{a,b} 陈河如^{*,a,b}^(a) 暨南大学药学院中药及天然药物研究所 广州 510632)^(b) 广东省中药药效物质基础及创新药物研究重点实验室 广州 510632)

摘要 利用焦磷酸氯(P₂O₃Cl₄)和DMF为Vilsmeier-Haack试剂,与2,3,3-三甲基-3*H*-吲哚反应生成二甲酰化中间体化合物,再与胍衍生物反应生成系列吡唑环桥连简约型长春碱类似物 **2a**~**2m**。目标化合物的结构均经 ¹H NMR, ¹³C NMR 和 HRMS 确证。初步的抗肿瘤活性数据表明,在 50 μmol/L 的浓度下,大部分目标化合物对人乳腺癌细胞株(MCF-7) (estrogen-positive) 和人肝癌细胞株(HepG2)具有一定的抗肿瘤活性,其中 **2f** 和 **2j** 抗肿瘤作用较强,它们对 MCF-7 细胞株的存活率分别为 28.0% 和 21.4%; 而对 HepG2 细胞株的存活率分别为 31.6% 和 34.0%。

关键词 药核相似性; 简约设计; 长春碱类似物; 抗肿瘤; 药物合成

Design and Synthesis of Pyrazol-Bridged Simplified Vinblastine Analogues

Guo, Cuiping^a Peng, Qunlong^a Pan, Long^a Zhang, Dongmei^{a,b} Chen, Heru^{*,a,b}^(a) Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Products, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632)^(b) Guangdong Province Key Laboratory of Pharmacodynamic Constituents of Traditional Chinese Medicine and New Drugs Research, Guangzhou 510632)

Abstract A series of pyrazol-bridged simplified vinblastine analogues **2a**~**2m** have been synthesized by the reaction of hydrazine derivatives with diformyl intermediates, which were prepared from 2,3,3-trimethyl-3*H*-indoles using P₂O₃Cl₄/DMF as Vilsmeier-Haack reagent. All the target compounds have been identified by ¹H NMR, ¹³C NMR and HRMS. The preliminary results of anticancer tests indicated that most of the compounds exhibit certain extent of anticancer activity against both MCF-7 (estrogen-positive) and HepG2 cell lines at the concentration of 50 μmol/L, respectively. **2f** and **2j** are the two best active compounds, where their cell viabilities against MCF-7 cell line are 28.0% and 21.4%, respectively; while against HepG2 cell line, 31.6% and 34.0%, respectively.

Keywords pharmacophore similarity; simplified design; vinca alkaloids analogues; antitumor; drug synthesis

长春碱类化合物是临床上重要的抗肿瘤药物^[1~4],但在长春花中含量很低,加上其结构复杂,难以实现工业化全合成,这些因素制约了长春碱类药物在临床上的实际应用。长期以来,人们一致致力于寻找抗肿瘤活性高、系统毒性低的长春碱衍生物,大部分工作主要集中在对长春碱类化合物的局部结构改造和修饰^[5~7],这些衍生物仍然具有长春碱类化合物复杂的稠杂环结构特征。因此,在保留长春碱类化合物的抗肿瘤活性及机制的前提下,最大程度地简化长春碱类化合物的结构是另一个有价值的研究方向。Roussi 等^[8]在这方面做了初步

尝试,他们将长春碱中的文朵灵环用简单的芳环结构替换,合成了部分简化的长春碱类似物,但仍然保留长春碱的基本骨架,目标化合物的分子结构仍然比较复杂。

本课题组提出“药核相似性”原则,即药核结构相似的化合物可能具有相似的生物功能。在前期工作中设计合成了一系列乙烯基桥连的长春碱类似物,如图 1 所示^[9]。通过实验证明该类化合物仍然部分保留了长春碱的抗肿瘤活性,且与长春碱具有相似的抗肿瘤作用机制。为了拓展结构多样性,尝试以吡唑环代替乙烯基作

* E-mail: thrchen@jnu.edu.cn

Received July 29, 2014; revised August 27, 2014; published online August 29, 2014.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81172982).

国家自然科学基金(No. 81172982)资助项目。

为桥连结构合成系列新的简约型长春碱类似物,并测定该类化合物对人乳腺癌细胞株(MCF-7) (estrogen-positive)和人肝癌细胞株(HepG2)的抗肿瘤活性,通过探讨其结构-活性关系(structure-activity relationship, SAR),夯实“药核相似性”原则的科学内涵,为进一步设计合成抗肿瘤活性更好的简约型长春碱类似物提供实验依据。

1 结果与讨论

1.1 吡唑环桥连简约型长春碱类似物的合成

参考文献[10, 11]方法,2,3,3-三甲基-3*H*-吲哚通过维尔斯迈尔-哈克反应(Vilsmeier-Haack)在2-甲基上引入两个甲酰基,生成中间产物 **1**, **1** 与胍衍生物反应生成

系列目标化合物 **2a~2m** (Scheme 1)。传统上, Vilsmeier-Haack 试剂由三氯氧磷(POCl_3)与 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)反应制备。但由于 POCl_3 是剧毒化学品,属国家管控的危险品,在一定程度上限制了该方法的应用。文献[12]中有报道,可以用草酰氯[(COCl_2)]和二氯亚砷(SOCl_2)替代 POCl_3 作为无机酸性卤化剂。通过探索,本文发现用焦磷酸氯($\text{P}_2\text{O}_3\text{Cl}_4$)替代 POCl_3 ,与 DMF 反应生成 Vilsmeier-Haack 试剂的效果最佳。

利用 $\text{P}_2\text{O}_3\text{Cl}_4$ /DMF 试剂对 2,3,3-三甲基-3*H*-吲哚的 2-甲基进行甲酰化,顺利合成中间体化合物 **1**, 收率 90%。该甲酰化反应的可能机理如 Scheme 2 所示。在冰浴条件下, DMF 与 $\text{P}_2\text{O}_3\text{Cl}_4$ 反应生成加合物卤代亚甲基

图1 基于药核相似性的系列长春碱类似物的结构图

Figure 1 Structures of simplified vinca alkaloids based on pharmacophore similarity

Entry	R	Yield/%	Entry	R	Yield/%
2a	H	85	2h	3- $\text{NO}_2\text{C}_6\text{H}_4$	62
2b	C_6H_5	85	2i	2,4-($\text{NO}_2\text{C}_6\text{H}_3$) ₂	60
2c	3- MeC_6H_4	86	2j	2- $\text{CF}_3\text{C}_6\text{H}_4$	85
2d	4- MeC_6H_4	86	2k	3- $\text{CF}_3\text{C}_6\text{H}_4$	86
2e	3- MeOC_6H_4	86	2l	4- $\text{CF}_3\text{C}_6\text{H}_4$	60
2f	4- MeOC_6H_4	86	2m	3,5-($\text{CF}_3\text{C}_6\text{H}_3$) ₂	60
2g	2 $\text{NO}_2\text{C}_6\text{H}_4$	67			

Scheme 1

铵盐, 即 Vilsmeier-Haack 试剂. 该试剂是弱的亲电试剂, 与 2,3,3-三甲基-3*H*-吲哚发生类 Aldol 反应, 随后消去 Cl^- 、水亲核加成后发生电子重排生成 **1**. **1** 与胍类衍生物反应成吡啶环得目标化合物 **2a~2m**, 收率 60%~86% (Scheme 2).

Scheme 2

显而易见, 中间体化合物 **1** 与胍类衍生物的反应与取代基 *R* 的电子属性相关. 当 *R* 为富电子体系, 如为 *H* 或其芳环上有给电子诱导效应或共轭效应的基团时 (**2a~2f**), 反应收率较高, 为 85%~86%; 当 *R* 为缺电子体系, 如其芳环上有强的吸电子共轭效应的基团时 (**2g~2i**), 反应收率较低, 为 60%~67%; 当 *R* 芳环上的强吸电子共轭效应基团处于邻/间位时, 对反应的活性影响很小 (**2j** 和 **2k**), 其收率与 **2a~2f** 相当; 当 *R* 芳环上的吸电子诱导基团处于对位时 (**2i**), 则对反应收率的影响较大, 只有 60%.

1.2 吡啶环桥连简约型长春碱类似物的抗肿瘤作用初步研究

含吡啶环化合物具有广泛的生物活性, 包括抗肿瘤活性^[13]. 参考文献[14]方法, 利用噻唑蓝(MTT)法测定了本文报道的系列吡啶环桥连简约型长春碱类似物 **2a~2m** 对人乳腺癌细胞株 MCF-7 (estrogen-positive) 和人肝癌细胞株 HepG2 的抗细胞增殖抑制活性, 以长春碱作为阳性对照药. 结果如表 1 所示, 当化合物的浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 目标化合物对两种细胞株均没有抗肿瘤活性, MCF-7 和 HepG2 细胞株的存活率均在 87%~98%

之间. 当化合物浓度增加至 50 $\mu\text{mol/L}$ 时, 大部分化合物对两种细胞株均显示出不同程度的活性. 其中 **2f** 和 **2j** 具有较强的活性, 对 MCF-7 细胞存活率分别为 28.0% 和 31.6%; 而对 HepG2 细胞的存活率分别为 21.4% 和 34.0%. 化合物 **2e**, **2i**, **2k** 和 **2l** 同样表现出一定程度的抗肿瘤活性, 其细胞存活率在 39.1%~66.3% 之间.

表 1 目标化合物 **2a~2m** 的抗肿瘤活性数据(存活率/%)^aTable 1 Anticancer activity of compounds **2a~2m** (viability rate/%)

Entry	MCF-7		HepG2	
	50 $\mu\text{mol/L}$	5 $\mu\text{mol/L}$	50 $\mu\text{mol/L}$	5 $\mu\text{mol/L}$
2a	90.4 $\pm$ 5.0	96.3 $\pm$ 5.0	97.6 $\pm$ 2.4	98.3 $\pm$ 3.7
2b	75.6 $\pm$ 4.7	97.5 $\pm$ 3.7	65.0 $\pm$ 4.4	94.4 $\pm$ 0.8
2c	77.4 $\pm$ 3.4	98.3 $\pm$ 1.3	55.4 $\pm$ 7.9	91.7 $\pm$ 5.6
2d	74.3 $\pm$ 5.4	98.9 $\pm$ 3.5	74.9 $\pm$ 3.1	97.9 $\pm$ 5.3
2e	52.6 $\pm$ 3.3	98.2 $\pm$ 6.2	61.1 $\pm$ 3.3	87.4 $\pm$ 4.1
2f	28.0 $\pm$ 1.2	66.9 $\pm$ 9.1	31.6 $\pm$ 1.5	94.0 $\pm$ 2.9
2g	82.6 $\pm$ 1.4	97.9 $\pm$ 6.1	52.9 $\pm$ 7.9	92.5 $\pm$ 7.7
2h	86.0 $\pm$ 2.6	94.1 $\pm$ 2.2	83.6 $\pm$ 6.6	93.6 $\pm$ 4.7
2i	41.4 $\pm$ 1.2	98.1 $\pm$ 2.7	41.0 $\pm$ 4.0	91.8 $\pm$ 3.4
2j	21.4 $\pm$ 0.1	89.4 $\pm$ 9.3	34.0 $\pm$ 0.1	89.3 $\pm$ 3.0
2k	47.6 $\pm$ 4.7	92.7 $\pm$ 3.9	66.3 $\pm$ 2.8	88.0 $\pm$ 0.7
2l	39.1 $\pm$ 5.5	83.0 $\pm$ 1.5	59.5 $\pm$ 1.2	98.9 $\pm$ 3.5
2m	67.7 $\pm$ 1.8	93.2 $\pm$ 4.0	96.1 $\pm$ 9.6	96.6 $\pm$ 0.5
长春碱	18.1 $\pm$ 5.1	28.1 $\pm$ 5.6	22.1 $\pm$ 0.9	23.8 $\pm$ 1.6

^a Values are shown as means $\pm$ S.D. from at least three independent experiments.

从表 1 可见, *R* 芳环上取代基的电子性质对抗肿瘤作用没有表现出明显的影响, 但其在芳环上的相对位置对抗肿瘤活性有影响. 当取代基处于 4-和 2-位时, 抗肿瘤活性较强. 相对而言, 芳环上 4-或 2-位上大的取代基有利于增强其抗癌活性.

可见, 吡啶环桥连简约型长春碱类似物仍然保留有一定的抗肿瘤活性(5 $\mu\text{mol/L}$ < IC_{50} < 50 $\mu\text{mol/L}$), 但活性较乙烯桥连简约型长春碱类似物弱(IC_{50} = 0.89 $\mu\text{mol/L}$). 究其原因, 与该类化合物的抗肿瘤作用机制有关. Gigant 等^[15]对长春碱类化合物抗肿瘤的分子作用机制的研究结果表明, 长春碱化合物分子像“楔子”一样作用在两个微管蛋白分子之间, 抑制微管蛋白的聚集, 使纺锤体不能形成, 使细胞分裂停止在有丝分裂中期. 显然, 长春碱类化合物与微管蛋白的相互作用取决于该分子在三维空间的构象、分子的大小及与微管蛋白的相互作用力等. 从其三维结构上看, 乙烯桥连简约型长春碱类似物更好地模拟长春碱的片层三维空间构象, 因而表现出较强的与微管蛋白“楔合”的作用; 而 3(*N*)-位芳基取代的吡啶环桥连简约型长春碱类似物更像 V 型结构, 不利于与微管蛋白的“楔合”. 该结果为今后设计活性更好的简约型长春碱类似物提供科学依据.

2 结论

本文成功合成了 13 个吡唑环桥连简约型长春碱类似物 **2a**~**2m**, 收率 60%~86%, 并进一步研究了该类化合物的抗肿瘤活性. 结果表明, 在浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 时, 大部分化合物对人乳腺癌细胞株(MCF-7) (estrogen-positive)和人肝癌细胞株(HepG2)两种细胞株均表现出不同程度的抗增殖抑制活性, 其中 **2f** 和 **2j** 是活性最强的两个化合物, 它们对 MCF-7 细胞株的存活率分别为 28.0%和 21.4%; 而对 HepG2 细胞株的存活率分别为 31.6%和 34.0%.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

Bruker-AV400MHz 型核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司); LC-UV100 液相色谱仪(上海伍丰科学仪器有限公司); 柱层析硅胶(200~300 目, 烟台化学工业研究所); 薄层层析硅胶(HSGF-254, 烟台江友硅胶开发有限公司); 人乳腺癌细胞株(MCF-7) (estrogen-positive)和人肝癌细胞株(HepG2)购买于美国典型培养物保藏中心(ATCC, Rockville, MD); 其它化学品均为市售国产分析纯试剂, 不经纯化, 直接使用.

3.2 实验方法

3.2.1 2-(2,3,3-三甲基-3H-吡唑基)丙二醛(**1**)的合成

5 mL *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)在冰浴中冷却, 滴加焦磷酸氯 5.5 mL (37.5 mmol), 搅拌 10 min. 随后滴加 2.0 mL (12.5 mmol) 2,3,3-三甲基-3H-吡唑溶解于 5 mL 的 DMF 溶液. 滴加完毕, 移去冰浴, 加热到 75 $^{\circ}\text{C}$, 反应 4~6 h. 将反应混合物滴加到冰水中, 用 35% NaOH 调节 pH 值至中性. 乙酸乙酯萃取(100 mL $\times$ 3), 合并有机相, 水洗涤数次, 无水 MgSO_4 干燥. 旋干, 乙醇重结晶得橙黄色固体 2.4 g, 收率 90%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 1.76 (s, 6H), 7.21 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.29~7.32 (m, 1H), 7.35 (dt, $J=4.0, 12.0$ Hz, 2H), 9.78 (s, 2H), 13.58 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 23.4(2), 51.4, 109.4, 112.7, 122.2, 125.8, 128.3, 139.3, 140.7, 179.5(2), 190.2; ESI-MS m/z : 216.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 214.5 $[\text{M}-\text{H}]^-$. 数据同文献[10].

3.2.2 吡唑桥连简约型长春碱类似物的合成

2-(1H-吡唑-基)-3,3-二甲基-3H-吡唑(**2a**)的合成: 将 43 mg (0.2 mmol) 中间体化合物 **1** 溶解于 5 mL 无水乙醇中, 加入 80%水合肼 25 μL (0.4 mmol), 室温搅拌 24 h. 反应混合物浓缩, 过滤, 乙醇重结晶, 得到针状黄色晶体 **2a** 33 mg, 收率 85%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 1.52 (s, 6H), 7.24 (t, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.35 (dd, $J=4.0, 8.0$

Hz, 2H), 7.64 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 8.33 (s, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 26.2(2), 54.7, 117.5, 121.3, 122.4, 126.8(2), 129.3, 135.4, 147.5, 154.7, 180.4. ESI-MS 212.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS m/z : calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 212.1182, found 212.1182.

目标化合物 **2b**~**2m** 的合成通法: 将 43 mg (0.2 mmol) 中间体化合物 **1** 溶解于 5 mL 无水乙醇中, 加入 0.22 mmol 肼衍生物, 加热回流 2~3 h, 冷却, 反应混合物旋蒸浓缩, 粗产品用柱层析 [V (乙酸乙酯): V (甲苯)=1:5] 分离、纯化, 得到纯的目标产物, 收率 60%~86%.

2-(1-苯基-1H-吡唑-基)-3,3-二甲基-3H-吡唑(**2b**): 红色晶体, 收率 85%. $R_f=0.63$; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 1.72 (s, 6H), 7.40~7.42 (m, 2H), 7.46~7.49 (m, 2H), 7.52 (t, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.88 (dd, $J=4.0, 8.0$ Hz, 3H), 8.45 (s, 1H), 10.05 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 26.8(2), 54.3, 119.5, 121.2(2), 123.0, 123.1, 128.9, 129.0, 129.8, 130.4, 131.2(2), 133.8, 140.0, 142.9, 144.3, 179.54; ESI-MS m/z : 288.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$. 数据同文献[10].

2-[(3-甲基苯基)-1H-吡唑-基]-3,3-二甲基-3H-吡唑(**2c**): 黄色糖浆状物, 收率 86%. $R_f=0.68$; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 1.47 (s, 6H), 2.35 (s, 3H), 7.07 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.16 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.28 (dd, $J=4.0, 8.0$ Hz, 3H), 7.49 (d, $J=4.0$ Hz, 1H), 7.58 (t, $J=8.0$ Hz, 2H), 8.28 (s, 1H), 8.59 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.8, 26.1(2), 54.6, 117.9, 119.4, 121.4, 121.6, 122.4, 126.8, 128.7, 129.3, 129.5, 130.8, 140.8, 141.1, 142.0, 147.6, 154.9, 179.7; ESI-MS m/z : 302.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$. 数据同文献[10].

2-[(4-甲基苯基)-1H-吡唑-基]-3,3-二甲基-3H-吡唑(**2d**): 浅黄色固体, 收率 86%. $R_f=0.68$; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 1.55 (s, 6H), 2.40 (s, 3H), 7.23 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.28 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.35 (dd, $J=4.0, 8.0$ Hz, 2H), 7.65 (d, $J=8.0$ Hz, 3H), 8.30 (s, 1H), 8.65 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.4, 26.2(2), 54.6, 119.1, 120.9(2), 121.4, 122.4, 126.8, 128.7, 129.4, 131.6(2), 138.4, 138.7, 141.9, 147.5, 154.6, 179.7; ESI-MS m/z : 302.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 302.1652, found 302.1650.

2-[(3-甲氧基苯基)-1H-吡唑-基]-3,3-二甲基-3H-吡唑(**2e**): 红色糖浆状物, 收率 86%. $R_f=0.66$; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 1.51 (s, 6H), 3.82 (s, 3H), 6.84 (d, $J=4.0$ Hz, 1H), 7.22 (ddd, $J=4.0, 8.0, 12.0$ Hz, 1H), 7.30~7.32 (m, 3H), 7.33~7.35 (m, 2H), 7.62 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.68 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz,

CDCl_3) δ : 26.2(2), 47.2, 57.0, 106.7, 112.8, 114.8, 119.0, 121.3, 122.5, 127.0, 129.1, 129.4, 131.8(2), 142.0, 147.3, 154.2, 162.1, 179.6; ESI-MS m/z : 318.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 318.1601, found 318.1605.

2-[1-(4-甲氧基苯基)-1*H*-吡唑-基]-3,3-二甲基-3*H*-吡啶(**2f**): 深红色晶体, 收率 86%. $R_f=0.55$; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 1.60 (s, 6H), 3.86 (s, 3H), 7.02 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.30 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.39 (t, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.71 (d, $J=8.0$ Hz, 3H), 8.32 (s, 1H), 8.91 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 24.8(2), 52.4, 55.6, 114.7(2), 116.0, 119.2, 121.0, 121.2(2), 125.9, 128.2, 128.7, 132.8, 140.6, 145.1, 149.7, 158.8, 178.4; ESI-MS m/z : 318.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$. 数据同文献[10].

2-[1-(2-硝基苯基)-1*H*-吡唑-基]-3,3-二甲基-3*H*-吡啶(**2g**): 浅红色晶体, 收率 67%. $R_f=0.42$; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 1.54 (s, 6H), 7.26 (dd, $J=4.0, 8.0$ Hz, 1H), 7.36 (t, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.59 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.66 (dd, $J=4.0, 8.0$ Hz, 2H), 7.74 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.95 (d, $J=4.0$ Hz, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.42 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 26.0(2), 54.7, 120.0, 121.7, 122.4, 126.8, 127.0, 127.9, 129.4, 130.6, 131.6, 134.3, 134.7, 143.1, 145.8, 147.6, 155.0, 179.1; ESI-MS m/z : 333.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 333.1346, found 333.1347.

2-[1-(3-硝基苯基)-1*H*-吡唑-基]-3,3-二甲基-3*H*-吡啶(**2h**): 紫红色固体, 收率 62%. $R_f=0.58$; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 1.58 (s, 6H), 7.29 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.38 (dd, $J=4.0, 8.0$ Hz, 2H), 7.69 (dd, $J=8.0, 12.0$ Hz, 2H), 8.20 (t, $J=8.0$ Hz, 2H), 8.38 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 8.80 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 26.0(2), 54.7, 115.6, 121.7, 122.5, 123.1, 126.1, 127.3, 128.4, 128.7, 129.5, 132.1, 141.4, 141.7, 147.0, 143.0, 150.3, 179.0; ESI-MS m/z : 333.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 333.1346, found 333.1341.

2-[1-(2,4-二硝基苯基)-1*H*-吡唑-基]-3,3-二甲基-3*H*-吡啶(**2i**): 黄色固体, 收率 60%. $R_f=0.56$; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 1.58 (s, 6H), 7.32 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.40 (t, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.70 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.97 (s, 1H), 8.41 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.77 (s, 1H), 8.79 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 24.6(2), 53.1, 117.1, 120.4, 121.1, 121.3, 126.2, 126.4, 127.8, 128.2, 128.3, 130.6, 140.4, 143.1, 145.6, 146.2, 149.3, 178.1. ESI-MS m/z : 378.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 378.1197, found 378.1197.

2-[1-(2-三氟甲基苯基)-1*H*-吡唑-基]-3,3-二甲基-

3*H*-吡啶(**2j**): 浅黄色固体, 收率 85%. $R_f=0.47$; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 1.53 (s, 6H), 7.26 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.35 (t, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.61 (t, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.65 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.71 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.84 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.40 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 26.0(2), 54.7, 118.9, 121.6, 122.4, 125.7, 126.8, 128.7, 128.8, 129.3, 130.4, 130.8, 133.4, 134.4, 139.4, 142.4, 147.6, 155.0, 179.4; ESI-MS m/z : 356.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{F}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 356.1369, found 356.1370.

2-[1-(3-三氟甲基苯基)-1*H*-吡唑-基]-3,3-二甲基-3*H*-吡啶(**2k**): 红色糖浆状物, 收率 86%. $R_f=0.71$; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 1.56 (s, 6H), 7.26 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.36 (m, 2H), 7.61 (d, $J=4.0$ Hz, 2H), 7.66 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.98 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 8.11 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.78 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 26.0(2), 54.7, 117.8, 119.8, 121.5, 122.5, 123.6, 123.7, 125.2, 125.3, 127.2, 128.8, 129.4, 131.7, 141.2, 142.6, 147.4, 154.3, 179.3; ESI-MS m/z : 356.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{F}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 356.1369, found 356.1369.

2-[1-(4-三氟甲基苯基)-1*H*-吡唑-基]-3,3-二甲基-3*H*-吡啶(**2l**): 浅黄色针状晶体, 收率 60%. $R_f=0.76$; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 1.58 (s, 6H), 7.30 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.39 (t, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.68 (d, $J=4.0$ Hz, 1H), 7.78 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.94 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 8.36 (s, 1H), 8.91 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 25.1(2), 53.2, 116.0, 119.1, 119.6(2), 121.5, 126.9, 127.0, 127.1(2), 128.6, 129.1, 130.4, 141.1, 141.6, 144.1, 147.7, 177.7; ESI-MS m/z : 356.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{F}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 356.1369, found 356.1369.

2-[1-(3,5-双三氟甲基苯基)-1*H*-吡唑-基]-3,3-二甲基-3*H*-吡啶(**2m**): 黄色针状晶体, 收率 60%. $R_f=0.84$; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 1.59 (s, 6H), 7.30 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.39 (dd, $J=4.0, 8.0$ Hz, 2H), 7.69 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.86 (s, 1H), 8.29 (s, 2H), 8.38 (s, 1H), 8.88 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 26.0(2), 54.7, 120.6, 121.5, 122.0, 122.5(2), 125.5, 125.6, 127.4, 129.6(2), 134.2, 134.5, 134.9, 141.7, 143.1(2), 144.1, 178.8; ESI-MS m/z : 424.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{F}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 424.1243, found 424.1245.

3.2.3 MTT 法检测肿瘤细胞存活率

利用 MTT 法筛选该类化合物的抗肿瘤活性. 实验过程: 细胞培养至对数生长期, 用 0.25%胰蛋白酶消化, 之后, 细胞悬液接种到 96 孔板中, 细胞浓度为 5×10^3 个/孔. 平板置于 37 $^\circ\text{C}$, 5% CO_2 及饱和湿度培养箱中

培养 24 h. 之后将不同浓度的样品溶液加入到 96 孔板中, 培养 72 h. 之后加入 30 μL MTT [5 mg/mL in PBS(磷酸钾缓冲溶液)], 继续培养 4 h. 吸掉上层培养液, 加入 100 μL DMSO, 微震荡 10 min 后, 用酶标仪 (Thermo MK3, USA) 检测 570 nm 处的吸光度值. 化合物初筛浓度为 50 和 5 $\mu\text{mol/L}$. 细胞对照组: 只加细胞, 不加药物; 阳性对照组: 长春碱; 空白对照组: 不加细胞, 不加培养液. 细胞存活率(%) = (加药孔 - 空白孔) / (正常细胞孔 - 空白孔) $\times 100\%$.

References

- [1] Noble, R. L.; Beer, C. T.; Cutts, J. H. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1958**, 76, 882.
- [2] Svoboda, G. H.; Neuss, N.; Gorman, M. J. *J. Am. Pharm. Assoc.* **1959**, 48, 659.
- [3] Dancey, J.; Steward, W. P. *Anti-cancer Drugs* **1995**, 6, 625.
- [4] (a) Langlois, N.; Gueritte, F.; Langlois, Y.; Potier, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 7017.
(b) Cros, S.; Wright, M.; Morimoto, M.; Lataste, H.; Couzinier, J. P.; Krikorian, A. *Semin. Oncol.* **1989**, 16, 15.
- [5] Sasaki, Y.; Kato, D.; Boger, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 13533.
- [6] Schleicher, K. D.; Sasaki, Y.; Tam, A. Kato, D.; Duncan, K. K.; Boger, D. L. *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 483.
- [7] Keglevich, P.; Hazai, L.; Kalas, G.; Szántay, C. *Molecules* **2012**, 17, 5893.
- [8] Ngo, Q. A.; Roussi, F.; Thoret, S.; Guéritte, F. *Chem. Biol. Drug Des.* **2010**, 75, 284.
- [9] Zheng, J.; Deng, L. J.; Chen, M. F.; Xiao, X. Z.; Xiao, S. W.; Guo, C. P.; Xiao, G. K.; Bai, L. L.; Ye, W. C.; Zhang, D. M.; Chen, H. R. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 65, 158.
- [10] Baradarani, M. M.; Afghan, A.; Zebajadi, F.; Hasanzadeh, K.; Joule, J. A. *J. Heterocycl. Chem.* **2006**, 43, 1591.
- [11] Rashidi, A.; Afghan, A.; Baradarani, M. M.; Joule, J. A. *J. Heterocycl. Chem.* **2009**, 46, 428.
- [12] Ye, J. H.; Ye, W. F.; Xiao, C. T.; Chen, Y.; Wang, G. P.; Zhang, W. *Chin. J. Org. Chem.* **2012**, 32, 1503 (in Chinese).
(叶家海, 叶文芳, 肖承涛, 陈雨, 王光普, 张文超, 有机化学, **2012**, 32, 1503.)
- [13] Kumar, V.; Kaur, K.; Karelia, D. N.; Beniwal, V.; Gupta, G. K.; Sharma, A. K.; Gupta, A. K. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 81, 267.
- [14] Zhang, D. M.; Liu, J. S.; Tang, M. K.; Liu, A.; Cao, H. H.; Jiang, L.; Chan, J. Y.; Tian, H. Y.; Fung, K. P.; Ye, W. C. *Eur. J. Pharmacol.* **2012**, 692, 19.
- [15] Gigant, B.; Wang, C. G.; Ravelli, R. B. G.; Roussi, F.; Steinmetz, M. O.; Curmi, P. A.; Sobel, A.; Knossow, M. *Nature* **2005**, 435, 519.

(Qin, X.)