7-氨基-6-硝基-[1,2,5]噁二唑并[3,4-*b*]吡啶-1-氧化物的胺化开环反应及产物的抗肿瘤活性李泽民^{†,a} 黄道锐^{†,a} 马丛明^b 许晓娟^c 刘祖亮^b 姚其正^{*,a}^(a) 中国药科大学药学院 南京 210009^(b) 南京理工大学化工学院 南京 210094^(c) 盐城师范学院化学化工学院 盐城 224002

摘要 7-氨基-6-硝基-[1,2,5]噁二唑并[3,4-*b*]吡啶-1-氧化物(**1**)与胺在温和条件下反应, 氧化呋喃环开环, 释放一分子次硝酸, 得到了蓝绿色的开环产物 2-胺取代的-3-亚硝基-4-氨基-5-硝基吡啶 **5a~5f**. 发现化合物 **1** 中的 6-位硝基对其氧化呋喃开环起到关键作用. 利用 ¹H NMR, ¹³C NMR 和 HRMS 对目标化合物进行了结构表征. 用四甲基偶氮唑盐(MTT)法测试了目标化合物体外抑制人肺癌细胞株(H522)和脑胶质瘤细胞株(U87)两种肿瘤细胞的增殖活性. 测试结果显示, 所有目标化合物均表现较强的体外肿瘤细胞抑制活性.

关键词 吡啶并氧化呋喃; 胺化开环反应; 3-亚硝基吡啶; 互变异构体; 抗肿瘤活性

Convenient Aminative Ring-Opening Reaction of 7-Amino-6-nitro-[1,2,5]oxadiazolo[3,4-*b*]pyridine-1-oxide and Antitumor Activity of Corresponding ProductsLi, Zemin^{†,a} Huang, Daorui^{†,a} Ma, Congming^b Xu, Xiaojuan^c
Liu, Zuliang^b Yao, Qizheng^{*,a}^(a) School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009^(b) School of Chemical Engineering, Nanjing University of Science & Technology, Nanjing 210094^(c) Department of Chemistry, Yancheng Teachers University, Yancheng 224002

Abstract Reaction of 7-amino-6-nitro[1,2,5]oxadiazolo[3,4-*b*]pyridine-1-oxide (**1**, namely pyridofuroxan) with ammonia or/and amines under mild conditions let to the corresponding 5-nitro-3-nitroso-2,4-diaminopyridine **5a~5f**. It is shown that the ring-opening reactivity of pyridofuroxan **1** was significantly affected by the 6-nitro substituent. The structures of all target compounds were identified by ¹H NMR, ¹³C NMR and HRMS. The biological evaluation was performed on human lung cancer cell line (H522) and glioma cell line (U87) by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-(diphenyltetrazolium) bromide (MTT) assay. The results suggested that all of the target compounds exhibited potent anti-tumor activities *in vitro*.

Keywords pyridofuroxans; aminative ring-opening reaction; 3-nitrosopyridine; tautomer; anticancer activity

氧化呋喃类化合物是一种巯基依赖性的杂环类 NO 供体, 它的衍生物如苯并氧化呋喃、氧化呋喃并噻啶同样具有 NO 供体性质, 在药物研究中具有重要应用^[1,2,3]. 7-氨基-6-硝基-[1,2,5]噁二唑并[3,4-*b*]吡啶-1-氧化物(**1**)是一种具有较好应用潜力的高能低感度含能材料^[4], 在

药学领域中亦可作为一种良好的 NO 供体分子, 用于因 NO 缺少而引发的多种疾病. 化合物 **1** 表现极好的热稳定性、耐酸稳定性, 与亲核试剂反应活性也很低, 这些性质与 **1** 的特殊结构有关, 吡啶环与氧化呋喃环耦合后形成一个大的芳香体系, 7-位氨基氢可以与 6-位硝基氧、

* E-mail: qz_yao@163.com

Received February 24, 2016; revised April 15, 2016; published online May 6, 2016.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21102125).

国家自然科学基金(No. 21102125)资助项目.

[†] 共同第一作者(These authors contributed equally to this work).

氧化呋喃环外的 N-1-位氧原子形成两个稳定的氢键, 使得化合物呈现反应惰性。

1

Tennant 等^[5]曾以 5-甲基-[1,2,5]噁二唑并[3,4-*d*]嘧啶-5,7(4*H*,6*H*)-二酮 1-氧化物(**2**, 又称嘧啶并氧化呋喃)与胺反应(Eq. 1), 使呋喃开环形成中间体, 经解释出次硝酸, 得到产物 4-氨基-5-亚硝基嘧啶类衍生物 **3**。当化合物 **3** 的亚硝基邻位取代胺为伯胺时, 亚硝基的氧可与氮原子上的氢形成氢键, 从而形成嘌呤类似物结构(有时也称蝶啶类似物)。如图 1, 化合物 NU6027^[6,7], 最初是以嘌呤类细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinases, CDKs)抑制剂 Olomoucine、NU2058 等为先导化合物, 通过开环设计而成, 具有与嘌呤结构的抑制剂 NU2058 [CDK1, $IC_{50}=(5\pm1)\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; CDK2, $IC_{50}=(12\pm3)\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]相近的 CDK1、CDK2 的抑制活性 [CDK1, $IC_{50}=(2.5\pm0.4)\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; CDK2, $IC_{50}=(1.3\pm0.2)\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]. 那么, 作为嘧啶并氧化呋喃的类似物嘧啶并氧化呋喃 **1** 能否发生类似反应, 产生相似的结果。如果可以, 那么生成的开环产物亚硝基嘧啶衍生物, 是否同样具有抗肿瘤活性? 这些至今尚未见研究报道。为此, 本文以化合物 **1** 作为原料, 分别应用伯胺、仲胺等亲核试剂在温和的条件下与 **1** 反应, 成功制得 2-氨基-3-亚硝基-4-氨基-5-硝基嘧啶衍生物 **5**, 并对其抗肿瘤活性进行了初步测试。

(1)

图 1 嘌呤类似物结构

Figure 1 Chemical structures of purine analogs

1 结果与讨论

1.1 目标化合物的合成及反应机制讨论

化合物 **1** 可由商业易得的 2-氯-4-氨基吡啶为起始原料, 经硝化、叠氮取代后加热环合制备^[4]。如 Scheme 1, 化合物 **1** 在室温条件下, 以二氯甲烷做溶剂, 加入过量的胺后, 反应经历打开氧化呋喃环, 释放 HNO, 生成 2-位胺取代的 3-亚硝基-4-氨基-5-硝基嘧啶产物 **5**。

氧化呋喃开环反应的可能机制为: 胺首先亲核进攻 **1** 的吡啶 3a-位, 形成开环中间体 **4**, 然后脱去一分子次硝酸, 生成产物 **5** (如 Scheme 1 所示)。虽然嘧啶并氧化呋喃存在 **1** (N-1-氧化物)和 **1b** (N-3-氧化物)两种互变异构体, 但实验结果未发现异构体 **1b** 的 7a-位被胺进攻, 得开环反应产物 **6**。这可能由于以下四点: (a)室温下, 异构体 **1** 更加稳定, 是主要存在形式, **1b** 含量极低, Wilson^[8]和 Cmoch^[9]两位研究者曾对此类吡啶并氧化呋喃衍生物的异构体互变进行了研究, 两人分别在 -25、-50 °C 下通过 ¹H NMR、¹³C NMR 检测到少量的异构体 N-3-氧化物存在; (b)异构体 **1** 中的 4-位氨基与氧化呋喃环上 N-1-位氧形成氢键, 稳定了异构体 **1** 中 N-1-位的氧, 使得该氧不易互变到呋喃环的 N-3-位, 该因素使异构体 **1b** 含量进一步降低; (c)即使有微量的 **1b** 存在, 由吡啶氮、6-硝基、7-氨基的定位基效应可以判断 7a-位是明显的较富电子碳, 加之 7-氨基的空间位阻, 因此反应中胺很难通过进攻 **1b** 的 7a-位生成 **6**; (d)最后, 本反应中胺是过量的, 若有 **6** 生成, 通过吡啶环的定位基效应亦可判断 2-亚硝基具有不稳定性, 可被过量胺亲核取代, 但实际反应中并无 2,3-二取代胺基嘧啶生成。此外, 两个异构体的互变转换, 可经中间的吡啶分子 **1a** 来实现的, 对于分子 **1a** 来说, 由于吡啶氮和 5-位硝基的邻对位吸电子效应, 以及吡啶 4-位氨基的供电子特性, 使吡啶 **1a** 中 2-位 C 原子的缺电子程度明显高于 3-位 C 原子, 故即使存在少量的异构体 **1a**, 亦会通过反应中间体 **4** 形式, 释放一分子次硝酸, 生成产物 **5**。由于室温下异构体 **1b** 含量极少, 且有呋喃环上 N—O 空间位阻的影响, 亲核的胺经进攻 **1b** 的 3a-C 原子, 生成产物 **5**, 此种途径对产物 **5** 的生成贡献很低。

此外, 由表 1 可知, 化合物 **5a**~**5f** 的收率不是很高, 但在实验中薄层色谱跟踪检测看, 原料 **1** 转化为化合物 **5** 是较彻底的, 收率不很高的原因可能是: 为保证产品的纯度, 又因产品 **5** 极性大, 在萃取和硅胶柱层析纯化分离中产品的损失较多所致。

吡啶并氧化呋喃化合物 **1** 能与亲核试剂胺类在常温下发生开环反应, 这可能是受吡啶 5-位硝基的吸电子特性影响。最初, 设计以无硝基取代的 7-氨基-[1,2,5]噁二

图式 1 吡啶并氧化呋咱 1 的胺化开环反应机制

Scheme 1 Possible mechanism for aminative ring-opening reaction of pyridofuroxan 1

表 1 吡啶并氧化呋咱 1 的胺化开环反应产物

Table 1 Products from the aminative ring-opening reaction of pyridofuroxan 1

Compd.	R ¹	R ²	m.p./°C	Yield/%
5a	H		155~157	60
5b	H		151~153	57
5c		CH ₂ CH ₂ OCH ₂ CH ₂	147~148	31
5d	H		128~130	54
5e	H		155~157	51
5f	H		158~160	42

唑并[3,4-*b*]吡啶-1-氧化物为原料进行验证,但考虑到其在有机溶剂中溶解性较差而影响到反应,最终选择以丙胺基取代的吡啶并氧化呋咱 7 与胺的反应(Eq. 2),观察 5-位无硝基后反应能否发生.通过实验发现,化合物 7 即使在剧烈的条件下,也不会发生类似的开环反应,且化合物 7 并未因反应条件的剧烈而破坏,具有良好的热稳定性.由此也说明了吡啶并氧化呋咱 1 中的 7-位硝基对氧化呋咱发生开环反应的重要性,同时也进一步认识到芳香杂环嘧啶的缺电性类似于 3-硝基吡啶.另外,对于嘧啶来说仅有其 5-位 C 原子上的电子云密度最高,故和吸电性的硝基一样,亚硝基亦仅能稳定地位于该 C 原子上,这也为 Scheme 1 中的反应自动选择不产生化合物 6 给出了另一个原因.

对于 7-丙氨基[1,2,5]噁二唑并[3,4-*b*]吡啶-1-氧化物(7)的合成(Scheme 2),是以 2-羟基-3-硝基-4-氯吡啶(7-1)为原料,通过 4-位正丙胺亲核取代,然后 7-2 中的羟基在三氯氧磷作用下氯代,所得氯代产物可直接与叠氮化钠反应制得 7-3,将 7-3 加热环合得到产物 7.

图式 2 化合物 7 的合成路线

Scheme 2 Synthetic route of the compound 7

1.2 目标化合物的异构体形式

在对吡啶并氧化呋咱 1 胺化开环反应得到的产物 5 进行 ¹H NMR、¹³C NMR 结构确证时发现,伯胺取代所得产物 5a、5b、5d~5f 所得谱图峰总是伴随着一组很小的互变异构体峰出现,如化合物 5b ¹H NMR 两组峰面积比约 1:0.168 (CDCl₃, 300MHz, 20 °C),推测产物 5 也存在互变异构体现象.推测可能如 Scheme 3 所示的两种互变结果,即 5 可发生异构转化为 8 或 9 两种形式.但根据仲胺取代产物,如吗啉取代产物 5c 的 ¹H NMR、¹³C NMR 只出现一组产物峰,并没有出现类似伯胺取代物的异构体峰.由此可见,吡啶 4-位的氨基与邻位的

硝基和亚硝基形成氢键而稳定, 其上质子不易发生如异构体 **8** 中互变移动, 从而表明 **5a**、**5b**、**5d~5f** 的异构体应为 **9**, 而非 **8**。

图式 3 化合物 **5** 的互变异构体形式

Scheme 3 Tautomeric forms of compounds **5**

1.3 目标化合物的抗肿瘤活性

以甲异靛(Meisoindigo, 一个已知的 CDK2 抑制剂) 为阳性对照品, 采用 MTT 法测试了目标化合物 **5a~5f** 对人肺癌细胞(H522)和脑胶质瘤细胞(U87)的体外抗肿瘤活性, 结果如表 2 所示。测试结果显示, 所有化合物对两种癌细胞株均表现较强抑制效果, 特别是目标化合物 **5f** 对两种肿瘤细胞的抑制活性[H522, $IC_{50} = (2.89 \pm 0.26) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; U87, $IC_{50} = (3.19 \pm 0.01) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$]均优于甲异靛[H522, $IC_{50} = (5.60 \pm 0.97) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; U87, $IC_{50} = (7.46 \pm 0.82) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$]。目标产物 **5a~5f** 对肿瘤细胞抑制活性与其结构类似物 NU6027 [$GI_{50} = (10 \pm 6) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$]^[6]相近, 说明该类化合物具有进一步研究价值。

表 2 目标化合物 **5a~5f** 的体外抗肿瘤活性

Table 2 The antiproliferative activities of target compounds **5a~5f**

Compd.	$IC_{50}/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	
	H522	U87
5a	6.12 ± 0.19	30.63 ± 2.91
5b	12.61 ± 2.44	15.74 ± 4.19
5c	9.35 ± 0.34	>30
5d	7.86 ± 1.28	6.26 ± 0.25
5e	17.98 ± 10.09	14.74 ± 1.80
5f	2.89 ± 0.26	3.19 ± 0.01
Meisoindigo	5.60 ± 0.97	7.46 ± 0.82

2 结论

本文通过 7-氨基-6-硝基-[1,2,5]噁二唑并[3,4-*b*]吡啶-1-氧化物(**1**)与胺的亲核开环反应, 得到 2-位胺取代的 3-亚硝基-4-氨基-5-硝基吡啶 **5**, 该方法为噁二唑、硝基取代吡啶等缺电子芳环引入亚硝基提供了一种潜在的可行合成方案, 拓宽了氧化呋喃环在有机化学合成中应用。对用本文方法获得的化合物 **5a~5f** 进行的初步抗肿瘤活性测试, 结果表明这类化合物具有较强的抗肿瘤作用, 推测其抗肿瘤活性机制可能来自对 CDKs 的抑制作用, 具有深入研究的价值, 体现了合成该类化合物的意义。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

^1H NMR 和 ^{13}C NMR 以 $\text{DMSO}-d_6$ 或 CDCl_3 为溶剂, 瑞士 Bruker AM 300 核磁共振仪测定, 内标为 TMS; 熔点用 Mel-TEMP 熔点仪, 温度计未经校正; 高分辨质谱由 Finnigan MAT 型质谱仪测定。所有试剂都为分析纯或化学纯, 除特别说明外, 未经处理直接使用。柱层析均采用青岛海洋化工有限公司生产的 100~200 目硅胶作为固定相, 薄层层析板(GF254)从烟台江友硅胶开发有限公司购得。

RPMI Medium-1640 干粉培养基(美国 Gibco 公司); 胎牛血清 FBS(美国 Hyclone 公司); MTT(Sigma 公司); 细胞株: 人肺癌细胞 H522 和脑胶质瘤细胞 U87。阳性对照药: 甲异靛(Meisoindigo)。 CO_2 恒温培养箱: Series II water Jacket (Thermo Scientific 公司); 酶标仪(美国 Bio-Rad680 公司); 倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司); 电热恒温水槽(DK-8D 型, 上海精宏实验设备有限公司); 水热恒温振荡器(SHY-2A 型, 金坛市金城国胜实验仪器厂); 磁力搅拌器(95-1 型, 上海安亭电子仪器厂); 电子天平(BS110S 型, 德国 Sartorius 公司); 超净工作台(1300 Series A2 型, Thermo Scientific 公司); 低温高速离心机(5804R 型, 德国 Eppendorf 公司)。

3.2 化合物的合成

3.2.1 7-氨基-6-硝基-[1,2,5]噁二唑并[3,4-*b*]吡啶-1-氧化物(**1**)的合成

7-氨基-6-硝基-[1,2,5]噁二唑并[3,4-*b*]吡啶-1-氧化物(**1**)根据文献[4]方法合成, 所得数据与文献一致。

3.2.2 **5a~5f** 的合成

称取 7-氨基-6-硝基-[1,2,5]噁二唑并[3,4-*b*]吡啶-1-氧化物(**1**) 0.1 g 加入 6 mL 二氯甲烷溶液中, 搅拌溶解, 待其全溶后滴加相应的胺(过量, >20 equiv.), 室温反应 2 h。反应完毕, 用二氯甲烷将反应液稀释至 50 mL, 依次用稀盐酸, 饱和食盐水洗, 有机相经无水硫酸钠干燥后减压浓缩, 所得固体经柱层析分离纯化, 得到 2-位取代胺的绿色固体产物 **5a~5f**。

2-异丁氨基-3-亚硝基-4-氨基-5-硝基吡啶(**5a**): 柱层析 [V (石油醚): V (二氯甲烷) = 2:1~1:1], 绿色固体 73 mg, 产率 60%。m.p. 155~157 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 1.01 (d, $J=6.7$ Hz, 6H), 1.87~1.99 (m, 1H), 3.51 (t, $J=6.7$ Hz, 2H), 8.42 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 9.10 (s, 1H), 12.25 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 20.13, 28.31, 47.67, 139.83, 145.69, 154.12, 158.44, 158.65; HRMS calcd for $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_3$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 240.1091, found 240.1095; 异构体 ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 1.04 (d,

$J=6.7$ Hz, 6H), 2.01~2.10 (m, 1H), 3.67 (t, $J=6.6$ Hz, 2H), 8.42 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 9.15 (s, 1H), 11.72 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 20.13, 29.70, 49.09, 139.83, 145.69, 154.12, 158.44, 158.65.

2-环戊氨基-3-亚硝基-4-氨基-5-硝基吡啶(**5b**): 柱层析[$V(\text{石油醚}) : V(\text{乙酸乙酯})=4 : 1$], 绿色固体 71 mg, 产率 57%. m.p. 151~153 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 1.56~2.11 (m, 8H), 4.70~4.72 (m, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 9.10 (s, 1H), 12.26 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 23.86, 33.37, 52.25, 139.63, 144.85, 154.10, 158.57, 158.61; HRMS calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_3$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 252.1091, found 252.1090; 异构体 ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 1.56~2.11 (m, 8H), 4.82~4.84 (m, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 9.15 (s, 1H), 11.75 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 23.81, 33.33, 53.68, 139.63, 144.85, 154.10, 158.57, 158.61.

2-吗啉基-3-亚硝基-4-氨基-5-硝基吡啶(**5c**): 柱层析[$V(\text{石油醚}) : V(\text{乙酸乙酯})=4 : 1$], 绿色固体 39 mg, 产率 31%. m.p. 147~148 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 3.92~3.94 (m, 4H), 4.30 (s, 4H), 8.76 (s, 1H), 9.07 (s, 1H), 11.76 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 46.10, 67.55, 138.41, 145.35, 147.83, 154.36; HRMS calcd for $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_4$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 254.0884, found 254.0889.

2-苯乙氨基-3-亚硝基-4-氨基-5-硝基吡啶(**5d**): 柱层析[$V(\text{石油醚}) : V(\text{乙酸乙酯})=3 : 1$], 绿色固体 78 mg, 产率 54%. m.p. 128~130 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 2.88 (t, $J=6.7$ Hz, 2H), 3.81~3.83 (m, 2H), 7.22~7.31 (m, 5H), 8.67 (s, 1H), 8.99 (s, 1H), 10.00 (s, 1H), 12.15 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 35.32, 41.93, 126.79, 126.99, 128.73, 128.84, 137.72, 139.84, 154.09, 158.22, 158.50; HRMS calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_3$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 288.1091, found 288.1096; 异构体 ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 3.01 (t, $J=6.7$ Hz, 2H), 3.92~4.01 (m, 2H), 7.42~7.50 (m, 5H), 8.67 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 10.35 (s, 1H), 11.71 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 35.71, 43.09, 126.79, 126.99, 128.73, 128.84, 137.72, 139.84, 154.09, 158.22, 158.50.

2-(3'-甲氧基乙氨基)-3-亚硝基-4-氨基-5-硝基吡啶(**5e**): 柱层析[$V(\text{石油醚}) : V(\text{乙酸乙酯})=3 : 1$], 绿色固体 61 mg, 产率 51%. m.p. 155~157 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 3.42 (s, 3H), 3.57 (t, $J=5.1$ Hz, 2H), 3.82~3.88 (m, 2H), 8.40 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 12.08 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 40.32, 59.08, 70.07, 137.42, 139.93, 154.17, 158.15, 158.42; HRMS calcd for $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_4$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 242.0884, found

242.0888; 异构体 ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 3.40 (s, 3H), 3.68 (t, $J=5.0$ Hz, 2H), 4.00~4.05 (m, 2H), 8.58 (s, 1H), 8.76 (s, 1H), 9.14 (s, 1H), 11.68 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 41.69, 59.08, 70.52, 137.42, 139.93, 154.17, 158.15, 158.42.

2-(2'-甲氧基苯甲氨基)-3-亚硝基-4-氨基-5-硝基吡啶(**5f**): 柱层析[$V(\text{石油醚}) : V(\text{二氯甲烷})=1 : 1$], 绿色固体 63 mg, 产率 42%. m.p. 158~160 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 3.72 (s, 3H), 4.76 (d, $J=5.7$ Hz, 2H), 6.82~7.24 (m, 3H), 8.69 (s, 1H), 9.00 (s, 1H), 10.05 (s, 1H), 12.38 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 44.20, 55.31, 113.29, 113.71, 120.03, 130.09, 137.51, 139.93, 154.17, 158.38, 158.71; HRMS calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_4$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 304.1040, found 304.1042; 异构体 ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 3.72 (s, 3H), 4.87 (s, 2H), 6.97~7.27 (m, 4H), 8.93 (s, 1H), 9.00 (s, 1H), 10.74 (s, 1H), 11.69 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 45.64, 55.31, 113.29, 113.71, 120.03, 130.09, 137.51, 139.93, 154.17, 158.38, 158.71.

3.2.3 7-2 的合成

将 0.1 g (0.57 mmol) 2-羟基-3-硝基-4-氯吡啶(**7-1**)溶解于 10 mL 乙腈, 搅拌, 室温下滴入 74 mg (1.25 mmol) 正丙胺, 反应加热至回流, TLC 检测反应完成. 冷却至室温, 减压蒸去溶剂, 所得固体溶解于 50 mL 二氯甲烷, 然后依次用稀盐酸, 饱和食盐水洗, 干燥浓缩后得到淡黄色固体产物, 柱层析[$V(\text{石油醚}) : V(\text{乙酸乙酯}) : V(\text{甲醇})=10 : 10 : 1$]纯化得 2-羟基-3-硝基-4-丙氨基吡啶(**7-2**), 淡黄色固体 0.10 g, 产率 89%. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 0.98 (t, $J=7.3$ Hz, 3H), 1.63~1.72 (m, 2H), 3.29~3.35 (m, 2H), 5.95 (s, 1H), 7.67 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 9.56 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 11.71 (s, 1H).

3.2.4 7-3 的合成

将 0.1 g (0.5 mmol) 的 **7-2** 溶于 2 mL 三氯氧磷, 搅拌, 加热至回流 3h, 然后减压蒸除剩余三氯氧磷, 所得粗品溶解到 15 mL 10% 的乙醇水溶液中室温搅拌, 10 min 后小心加入 99 mg (1.52 mmol) NaN_3 , 待其完全溶解后缓慢滴加 3 滴浓盐酸(约 5 equiv.), 室温搅拌 15 h 后停止反应, 加入 70 mL 乙酸乙酯和 10 mL 水, 萃取三次, 将酯层合并, 饱和盐水洗涤后干燥浓缩, 柱层析[$V(\text{二氯甲烷}) : V(\text{甲醇})=20 : 1$]纯化得 2-叠氮基-3-硝基-4-丙氨基吡啶(**7-3**), 淡黄色固体 78 mg, 产率 69%. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 0.91 (t, $J=7.3$ Hz, 3H), 1.59~1.71 (m, 2H), 3.56~3.63 (m, 2H), 7.31 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 9.11 (dd, $J=7.9, 0.51$ Hz, 1H), 10.04 (s, 1H).

3.2.5 7 的合成

将 78 mg (0.4 mmol) **7-3** 溶于 10 mL 甲苯, 搅拌, 加热至回流, TLC 检测反应终点, 反应结束后冷却至室温, 减压蒸去甲苯得 7-丙氨基[1,2,5]噁二唑并[3,4-*b*]吡啶-1-氧化物(**7**), 黄色固体 65 mg, 产率 95%. m.p. 100~102 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 1.03 (t, $J=7.4$ Hz, 3H), 1.70~1.82 (m, 2H), 3.26~3.32 (m, 2H), 5.94 (d, $J=5.2$ Hz, 1H), 6.39 (s, 1H), 8.33 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 10.81, 21.16, 44.27, 132.00, 141.71, 156.27, 159.92, 160.49; MS (ESI) m/z : 217.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3.3 抗肿瘤活性实验

用 RPMI Medium-1640 培养液(内含 10%胎牛血清, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素)按照一般悬浮细胞传代培养的方法, 置于 37 °C, 5% CO_2 的培养箱内培养人肺癌细胞 H522 和脑胶质瘤细胞 U87, 隔 2~3 d 传代一次. 将对数生长期的细胞均匀混合后计数, 用苔盼蓝染色, 活细胞数计数在 98%以上. 将细胞均匀分为一个对照组, 即细胞悬液; 若干实验组, 即细胞悬液+药; 一个空白对照组, 只加培养液, 不加细胞.

在无菌台中, 将被测药物用 DMSO 配置成浓度为 20 mmol/L 的储备液, -20 °C 保存备用. 实验时以含 10%胎牛血清的 RPMI Medium-1640 培养液稀释, 采用无菌操作技术配制成梯度浓度为 1.25~20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的含药培养液, 5 个浓度梯度, 相邻浓度之间为两倍稀释.

取对数生长期细胞, 离心, 计数, 用含 10%胎牛血清 RPMI Medium-1640 培养液稀释, 调整细胞浓度为 $2.5 \times 10^4/\text{mL}$, 接种于 96 孔板每孔约 500 cell/200 μL 细胞株, 置于 37 °C, 5% CO_2 的培养箱内培养 24 h 后, 按照以上药物浓度接种 6 组, 每个浓度设立 3 个复孔. 孵育 48 小时后, 进行 MTT 快速比色, 通过酶标仪比色,

通过酶标仪于 570 nm 波长下测定各微孔的 OD 值. 抑制率(%)=(OD_{空白孔}-OD_{给药孔})/OD_{对照孔}×100%, 依据公式, 得出不同浓度化合物对细胞的抑制率, 并用 GraphPad Prism 5.0 软件计算各化合物的 IC_{50} 值.

辅助材料(Supporting Information) 化合物 **5a~5f** 的 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 图谱和 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] Cerecetto, H.; González, M. *Benzofuroxan and Furoxan. Chemistry and Biology, Bioactive Heterocycles IV*, Springer Berlin Heidelberg, 2007, p. 265.
- [2] Sartini, S.; Cosconati, S.; Marinelli, L.; Barresi, E.; Di Maro, S.; Simorini, F.; Taliani, S.; Salerno, S.; Marini, A. M.; Da Settimo, F.; Novellino, E.; La Motta, C. *J. Med. Chem.* **2012**, 55(23), 10523.
- [3] Deng, Y. J.; Shi, J. B.; Jiang, L. X.; Gao, J.; Yao, Q. Z. *Acta Chim. Sinica* **2006**, 64(18), 1911(in Chinese). (邓艳君, 石静波, 姜力勋, 高静, 姚其正, 化学学报, **2006**, 64(18), 1911.)
- [4] Ma, C.; Wang, Y.; Hou, K.; Liu, Z.; Yao, Q. Z. *Chin. J. Org. Chem.* **2013**, 31(10), 1299.
- [5] Tannant, G.; Wallace, G. M. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1982**, 4), 267.
- [6] Arris, C. E.; Boyle, F. T.; Calvert, A. H.; Curtin, N. J.; Endicott, J. A.; Garman, E. F.; Gibson, A. E.; Golding, B. T.; Grant, S.; Griffin, R. J. *J. Med. Chem.* **2000**, 43(15), 2797.
- [7] Sayle, K. L.; Bentley, J.; Boyle, F. T.; Calvert, A. H.; Cheng, Y.; Curtin, N. J.; Endicott, J. A.; Golding, B. T.; Hardcastle, I. R.; Jewsbury, P.; Mesguiche, V.; Newell, D. R.; Noble, M. E. M.; Parsons, R. J.; Pratt, D. J.; Wang, L. Z.; Griffin, R. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13(18), 3079.
- [8] Lowe-Ma, C. K.; Nissan, R. A.; Wilson, W. S. *J. Org. Chem.* **1990**, 55(12), 3755.
- [9] Cmoch, P.; Kamiński, B.; Kamińska-Trela, K.; Stefaniak, L.; Webb G. A. *J. Phys. Org. Chem.* **2000**, 13(8), 480.

(Li, L.; Fan, Y.)