新型 5,6-二氢-6-烷基吡喃酮类衍生物的设计、合成及肿瘤细胞增殖抑制活性研究

徐海伟^{*,b} 贾世龙^{a,b} 谢晓平^b 罗姣^b 王树^{*,a}

(^a 河北北方学院药学系 张家口 075000)

(^b 郑州大学药学院 郑州 450001)

摘要 为了研究吡喃酮结构中不饱和双键修饰对该类化合物生物活性的影响. 基于 5,6-二氢-6-烷基吡喃酮类化合物哥纳香甲素, 通过不饱和双键的修饰, 设计合成了化合物 **5**, **6** 和 **8**. 利用噻唑蓝(MTT)法评价了目标化合物对人肝癌细胞(7721)、人肺癌细胞(A549)、人食管癌细胞(EC-109)、人胃癌细胞(MGC-803)的细胞增殖抑制活性. 通过和阳性药物的对比发现, 除了 4-(2,3,4,5-四氟)苯甲酰氨基-3-甲基-6-苄氧甲基-5,6-二氢-吡喃-2-酮(**6d**), 所合成化合物的肿瘤细胞增殖抑制活性均消失. 结果表明, 在 5,6-二氢-6-烷基吡喃酮类化合物结构中, 不饱和双键起着至关重要的作用, 对其进行适当的修饰, 在保留其活性的同时, 具有潜在改善其因共价键结合引起毒性的可能性.

关键词 α,β 不饱和 δ 内酯; 合成; 肿瘤; 抑制活性

Design, Synthesis and Anti-proliferative Activity of Novel 5,6-Dihydro-6-alkyl-2-pyrone Analogues

Xu, Haiwei^{*,b} Jia, Shilong^{a,b} Xie, Xiaoping^b Luo, Jiao^b Wang, Shu^{*,a}

(^a Department of Pharmacy, Hebei North University, Zhangjiakou 075000)

(^b School of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001)

Abstract In order to investigate whether the modification at the double bonds in the pyrone skeleton would affect their biological activity. Based on the 5,6-dihydro-6-alkyl-2-pyrone goniotalamin, a series of new compounds **5**, **6** and **8** were designed and synthesized, which were obtained by modification at the unsubstituted double bonds. Their cell proliferation inhibition activities against human liver cancer (7721), human lung cancer (A549), human esophageal cancer (EC-109), human gastric cancer (MGC-803) cell lines were assessed by thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) method. Most of synthetic compounds lost their bioactivities via a comparison with positive control but 6-(benzyloxy)methyl-3-methyl-4-(2,3,4,5-tetrafluorobenzamino)-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one (**6d**). The results indicate that the unsaturated double bond is a key functional group for the bioactivity of these compounds and it is possible to keep their anti-cancer proliferation activity and reduce their toxicity by modification of the unsaturated double bond in 5,6-dihydro-6-alkyl-2-pyrones.

Keywords α,β -unsaturated δ -lactone; synthesis; cancer; antiproliferative activity

α,β -不饱和- δ -内酯是一类重要的天然产物, 如福司曲星(Fostriecin)^[1,2]、哥纳香甲素(Goniotalamin)^[3]、Cytostatin^[2]、Leptomycin B^[4]、Anguinomycin^[2]、Piro-netin^[5-10]等(图 1). 该类化合物具有广泛的生物活性, 包括细胞增殖抑制活性、免疫抑制活性、不同酶抑制活性、特殊磷酸蛋白的抑制活性. 它们的共同特征是都具有一个 α,β 不饱和 δ 内酯结构, 在体内与氨基或者巯基发生

Micheal 加成, 形成共价键^[4,8], 在发挥作用的同时, 也表现出了很强的毒性. 有研究表明, 包含有甲基取代的 Spliceostatin E(图 1), 在体内不会发生 Micheal 加成反应, 但是其仍然保持着对 N87(胃癌细胞)、BT474(乳腺癌细胞)良好的细胞增殖抑制活性. 但是, α,β -不饱和- δ -内酯双键上修饰的研究报道较少^[11,12].

上述研究结果提示, 在吡喃环不饱和结构上引入取

* Corresponding author. E-mail: xhwei01@126.com

Received December 2, 2016; revised December 30, 2016; published online January 17, 2017.

Project supported by the Program for Science & Technology Innovation Talents of Henan Province (No. 14HASTIT0031).

河南省高校科技创新人才计划(No. 14HASTIT0031)资助项目.

图1 具有增殖抑制活性的 α,β -不饱和 δ -内酯类天然产物Figure 1 α,β -Unsaturated δ -lactone natural compounds with antiproliferative activity

代基团, 有可能降低该类化合物的毒性, 而保持其原有生物活性。因此, 本文以哥纳香甲素基本骨架为基础, 首先参考文献设计合成了哥纳香甲素类似物 **1**, 其具有与哥纳香甲素相当的肿瘤细胞增殖抑制活性。在此基础上, 设计合成一系列未见文献报道的 5,6-二氢-6-烷基吡喃酮类化合物 **5**, **6** 和 **8** (Scheme 1), 利用噻唑蓝(MTT)法评价了目标化合物对人肝癌细胞(7721)、人肺癌细胞(A549)、人食管癌细胞(EC-109)、人胃癌细胞(MGC-803)

的细胞增殖抑制活性。研究吡喃酮结构中不饱和双键的修饰对该类化合物生物活性的影响。

1 结果与讨论

1.1 目标化合物的合成

天然的吡喃环结构中, 手性碳的构型为 *R* 型^[13], 因此, 我们选择了用 *S* 构型环氧氯丙烷合成 *R* 构型的目标化合物, 合成路线见 Scheme 1。以化合物 **2** 为起始原料,

Reagents and conditions: (a) NaOH, H_2O , TBAB, r.t., 12 h; (b) $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, **KCN**, H_2O , r.t., 2 h; (c) $\text{R}^2\text{CHBrCOOEt}$, Zn, I_2 , TFA, THF, 70 $^\circ\text{C}$, 2 h; (d) R^3COCl , TEA, DCM, 0 $^\circ\text{C}$, 1 h; (e) TiCl_4 , DCM, 0 $^\circ\text{C}$, 12 h; (f) Cinnamoyl chloride or cinnamic acid, TEA, DCM, 0 $^\circ\text{C}$, 1 h

图式1 目标化合物的合成

Scheme 1 Synthetic route of the target compounds

通过取代、开环、blaise 关环反应、脱苄基、酰化合成 10 个新型 5,6-二氢-6-烷基-2-吡喃酮衍生物, 结构经过 ^1H NMR, ^{13}C NMR 和 HRMS 的确证。

在目标化合物合成过程中, Blaise 关环和脱苄基是关键的两步反应。对于 Blaise 关环反应^[14-16], 大部分文献报道, 在活化的锌粉作用下, 即能发生反应, 但是该条件不适于我们的底物, 未能获得目标化合物。通过大量实验探索发现, 碘粒可以活化 α -溴丙酸乙酯, 使反应能顺利地进行获得目标化合物。通常情况下 Blaise 关环反应的产物为羟基产物, 但是在该条件下先得到的是氨基产物。以化合物 **6a** 为例, 其 ^1H NMR 中, 在 δ 7.8 有酰胺氢的宽信号峰, 同时其 HRMS 分析表明其分子量为 290.1393, 分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

脱苄基反应, 尝试了 Pd/C 加氢^[17,18], 发现化合物 **6** 双键易被还原, 且产率较低。于是分别筛选了无水三氯化铁^[19]和四氯化钛等路易斯酸催化脱苄基。结果发现用四氯化钛^[20,21]催化搅拌过夜, 可以得到目标化合物。

哥纳香甲素类似物 **1** 的合成参考文献方法合成^[2]。

1.2 目标化合物的肿瘤细胞增殖抑制活性研究

以五氟尿嘧啶和化合物 **1** 为对照, 采用 MTT 法, 对所合成目标化合物的肿瘤细胞增殖抑制活性进行了评价。结果表明, 大部分化合物的活性明显降低, 甚至消失(表 1)。其中化合物 **6d** 对人肝癌细胞(7721)、肺癌细胞(A549)、食管癌细胞(EC-109)、胃癌细胞(MGC-803)的 IC_{50} 值分别达到 11、19、37、13 $\mu\text{mol/L}$, 表现出了与阳性对照相当的活性。上述结果表明, α,β 不饱和 δ 内酯双键对此类化合物的细胞增殖抑制活性起着至关重要的作用, 其不饱和和双键的修饰能够明显影响目标化合物的活性。同时化合物 **6d** 表现出的肿瘤细胞增殖活性表明, 通过适当的修饰也可以保留对肿瘤细胞的增殖抑制活性, 而不形成共价键, 避免不可逆的毒性。

表 1 目标化合物体外抗肿瘤活性^a

Table 1 Antiproliferative activity of target compound

Compd.	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$			
	7721	A549	EC-109	MGC-803
5a	>128	>128	>128	>128
5b	>128	>128	>128	>128
5c	>128	>128	>128	>128
5d	>128	>128	>128	>128
5e	>128	>128	>128	>128
6a	>128	>128	>128	>128
6b	>128	>128	>128	>128
6c	>128	>128	>128	28 $\pm$ 2
6d	11 $\pm$ 1	19 $\pm$ 1	37 $\pm$ 2	13 $\pm$ 1
8	>128	>128	>128	>128
1	14 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	20 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1
5-Fu	14 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1

^a Do not calculate IC_{50} value which is bigger than 128 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

2 结论

本文以哥纳香甲素为参照, 结合 α,β 不饱和 δ 内酯环与受体的作用机理, 设计并合成了 10 个新型的 5,6-二氢-6-烷基吡喃酮衍生物。通过体外细胞增殖活性评价研究发现, 对 α,β 不饱和 δ 内酯双键适当地修饰, 可以保留对肿瘤细胞的增殖抑制活性, 而不形成共价键, 避免不可逆的毒性。上述结果为后期继续研究新型 5,6-二氢-6-烷基-吡喃酮类抗肿瘤药奠定了良好的基础。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

瑞典 Bruker DPX-400 超导核磁共振仪; Q-ToF Mico TM 质谱仪(Waters Micromass 公司); Thermo Varioskan Flash 全波长多功能酶标仪等主要仪器。

合成目标化合物所用原料均为市售分析纯, 必要时做常规处理; 用于分离纯化的试剂为重蒸的工业试剂。

3.2 化合物的合成

3.2.1 化合物 **1** 的合成

6-苯氧甲基-5,6-二氢-吡喃-2-酮(**1**)参考文献[2]合成, 0.35 g 白色针晶, 产率 65%。m.p. 83~84 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.44~7.29 (m, 2H), 7.12~6.80 (m, 4H), 6.11 (ddd, $J=9.7, 2.6, 1.1$ Hz, 1H), 4.92~4.72 (m, 1H), 4.37~4.06 (m, 2H), 2.79~2.49 (m, 2H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 101 MHz) δ : 163.32, 158.15, 144.66, 129.60, 121.50, 121.37, 114.58, 75.53, 68.46, 26.31. HRMS calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{NaO}_3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 227.0684, found 227.0682.

3.2.2 中间体 **3** 的合成

将水(50 mL)和氢氧化钠(8.5 g, 212.5 mmol)置于 250 mL 圆底烧瓶中, 搅拌下加入苯酚(10 g, 106.4 mmol)和四丁基溴化铵(TBAB) (1.7 g, 5.28 mmol), 冰浴条下用恒压滴液漏斗缓慢滴加环氧氯丙烷(14.8 g, 159.1 mmol), 0.5 h 之内滴加完毕。室温条件下反应约 12 h, 反应完毕后, 加入 200 mL 水, 用乙酸乙酯萃取(50 mL $\times$ 3), 有机相无水硫酸钠干燥, 抽滤, 减压蒸馏, 柱层析 [V (石油醚): V (乙酸乙酯)=8:1]得到化合物 **3a** 14.36 g, 产率 90%。

3.2.3 中间体 **4** 的合成

将水(20 mL)和乙醇(10 mL)置于 150 mL 的圆底烧瓶中, 然后加入 **3a** (10 g, 66.7 mmol)搅拌混匀, 最后加入氰化钾(6.5 g, 100 mmol), 反应约 2 h。反应完毕, 加入 100 mL 水使体系澄清, 减压蒸馏除去乙醇, 乙酸乙酯萃取(50 mL $\times$ 3), 有机相无水硫酸钠干燥, 抽滤, 减压浓缩, 柱层析 [V (石油醚): V (乙酸乙酯)=4:1]得到

化合物 **4a** 10.0 g, 产率 85%.

3.2.4 目标化合物 **5** 的合成

将锌粉(1.02 g, 15.7 mmol)和无水四氢呋喃(10 mL)置于 50 mL 的圆底烧瓶中, 搅拌条件下快速加入三氟乙酸(179 mg, 1.57 mmol), 室温搅拌 10 min, 升高温度至 70 °C 回流, 等体系稳定后, 向体系中加入化合物 **4a** (2 g, 11 mmol) 和 3 粒碘单质, 最后将称好的 2-溴丙酸乙酯(2.17 g, 12 mmol) 用 5 mL 无水四氢呋喃稀释, 缓慢加入到体系中(约 4 h), 滴加完毕反应约 2 h, 此时体系颜色呈暗绿色. 反应完毕, 向体系倒入 5% 稀盐酸终止反应, 搅拌 0.5 h 抽滤, 滤液减压蒸馏除去四氢呋喃, 乙酸乙酯萃取(20 mL×3), 有机相无水硫酸钠干燥, 抽滤, 减压浓缩, 柱层析 [*V*(石油醚): *V*(乙酸乙酯)=8:1] 得到 4-氨基-3-甲基-6-苯氧甲基-5,6-二氢-吡喃-2-酮(**5a**) 2.16 g, 产率 82%. 白色针晶, m.p. 145~146 °C; $[\alpha]_D^{30} + 6.7$ (*c* 0.005, CH₃COCH₃); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 7.46~7.18 (m, 2H), 7.06~6.87 (m, 3H), 6.45 (s, 2H), 4.53 (dq, *J*=12.7, 4.5 Hz, 1H), 4.12 (d, *J*=4.8 Hz, 2H), 2.61 (ddd, *J*=16.7, 12.3, 1.7 Hz, 1H), 2.41 (dd, *J*=16.5, 3.7 Hz, 1H), 1.62 (s, 3H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 101 MHz) δ : 167.68, 158.67, 156.07, 130.01, 121.30, 114.93, 87.59, 72.36, 69.17, 29.56, 10.11.

4-氨基-3-乙基-6-苯氧甲基-5,6-二氢-吡喃-2-酮(**5b**): 2.35 g, 产率 84%. 白色针晶, m.p. 146~147 °C; $[\alpha]_D^{30} + 7.7$ (*c* 0.005, CH₃COCH₃); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 7.32 (t, *J*=7.7 Hz, 2H), 6.97 (t, *J*=9.1 Hz, 3H), 4.66 (dd, *J*=11.5, 5.5 Hz, 1H), 4.16 (s, 2H), 2.75 (dd, *J*=17.1, 12.1 Hz, 2H), 2.21 (q, *J*=7.4 Hz, 2H), 0.93 (d, *J*=7.5 Hz, 3H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 101 MHz) δ : 167.67, 165.47, 158.60, 130.01, 121.37, 114.94, 104.13, 72.71, 68.90, 29.68, 16.82, 13.83.

4-氨基-3-甲基-6-苄氧甲基-5,6-二氢-吡喃-2-酮(**5c**): 2.21 g, 产率 85%. 淡黄色油状物. $[\alpha]_D^{31} + 8.3$ (*c* 0.005, CH₃COCH₃); ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 7.48~7.30 (m, 5H), 4.70~4.43 (m, 3H), 4.35 (s, 2H), 3.70 (qd, *J*=10.3, 5.1 Hz, 2H), 2.73 (ddd, *J*=16.5, 12.1, 1.7 Hz, 1H), 2.30 (ddd, *J*=16.5, 3.8, 1.0 Hz, 1H), 1.77 (dd, *J*=1.7, 0.8 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ : 168.05, 152.91, 137.77, 128.45, 127.84, 127.75, 92.23, 73.66, 73.14, 71.00, 30.26, 9.15. HRMS calcd for C₁₄H₁₇NNaO₃ [*M*+Na]⁺ 270.1106, found 270.1102.

4-氨基-3-丁基-6-(4-甲氧基)苄氧甲基-5,6-二氢-吡喃-2-酮(**5d**): 2.45 g, 产率 85%. 淡黄色油状物. $[\alpha]_D^{31} + 7.9$ (*c* 0.005, CH₃COCH₃); ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 7.35~7.22 (m, 2H), 6.92~6.83 (m, 2H), 4.53~4.50 (m,

2H), 4.47~4.41 (m, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.64 (qd, *J*=10.2, 5.0 Hz, 2H), 2.68 (dd, *J*=16.5, 12.1 Hz, 1H), 2.34~2.23 (m, 2H), 2.15 (ddd, *J*=14.5, 8.6, 6.0 Hz, 1H), 1.53~1.24 (m, 4H), 0.91 (t, *J*=7.0 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ : 167.92, 159.34, 153.01, 129.88, 129.43, 113.85, 97.19, 73.26, 73.13, 70.69, 55.30, 30.41, 30.23, 24.02, 22.77, 14.06.

4-氨基-3-甲基-6-(2-甲氧基)苄氧甲基-5,6-二氢-吡喃-2-酮(**5e**): 2.13 g, 产率 85%. 淡黄色油状物. $[\alpha]_D^{31} + 8.7$ (*c* 0.005, CH₃COCH₃); ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 7.44~7.21 (m, 2H), 7.01~6.84 (m, 2H), 4.63 (s, 2H), 4.55 (s, 2H), 4.51~4.44 (m, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.79~3.62 (m, 2H), 2.80~2.60 (m, 1H), 2.32 (dd, *J*=16.5, 3.7 Hz, 1H), 1.75 (s, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ : 168.43, 157.10, 153.67, 129.05, 128.95, 126.10, 120.42, 110.25, 91.49, 73.20, 71.25, 68.40, 55.35, 30.20, 9.15.

3.2.5 目标化合物 **6** 的合成

将化合物 **5c** (2 g, 8.1 mmol) 和二氯甲烷(8 mL)置于 25 mL 的圆底烧瓶中, 之后加入三乙胺(1.22 g, 12 mmol), 在冰浴条件下缓慢滴加乙酰氯(0.959 g, 12 mmol), 约 0.5 h 滴加完毕. 反应约 1 h, 将体系倒入 100 mL 的锥形瓶中, 加入 50 mL 水淬灭反应. 用二氯甲烷萃取(20 mL×3), 有机相无水硫酸钠干燥, 抽滤, 减压浓缩, 柱层析 [*V*(石油醚): *V*(乙酸乙酯)=10:1] 得到 4-乙酰氨基-3-甲基-6-苄氧甲基-5,6-二氢-吡喃-2-酮(**6a**) 2.17 g, 产率 93%. 淡黄色油状物. $[\alpha]_D^{29} + 0.4$ (*c* 0.005, CH₃COCH₃); ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 7.56 (td, *J*=12.2, 6.2 Hz, 1H), 7.48~7.29 (m, 5H), 4.59 (s, 2H), 4.49 (dq, *J*=12.6, 4.4 Hz, 1H), 3.68 (d, *J*=4.6 Hz, 2H), 3.45~3.29 (m, 1H), 3.05~2.86 (m, 1H), 2.18 (s, 3H), 1.91~1.79 (m, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ : 169.03, 167.19, 147.16, 137.64, 128.46, 127.83, 127.75, 106.60, 74.81, 73.61, 70.90, 28.20, 24.70, 10.61. HRMS calcd for C₁₆H₂₀NO₄ [*M*+H]⁺ 290.1392, found 290.1393.

4-氯乙酰氨基-3-甲基-6-苄氧甲基-5,6-二氢-吡喃-2-酮(**6b**): 2.49 g, 产率 95%. 淡黄色油状物. $[\alpha]_D^{29} + 1.9$ (*c* 0.005, CH₃COCH₃); ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 8.30 (s, 1H), 7.48~7.29 (m, 5H), 4.67~4.50 (m, 3H), 4.18 (s, 2H), 3.72 (d, *J*=4.6 Hz, 2H), 3.39 (ddd, *J*=18.3, 3.8, 1.3 Hz, 1H), 3.03 (ddq, *J*=18.7, 12.0, 2.4 Hz, 1H), 1.94 (dd, *J*=2.4, 1.1 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ : 166.26, 164.11, 145.18, 137.63, 128.47, 127.85, 127.77, 108.68, 74.71, 73.67, 70.75, 43.05, 27.60, 10.38. HRMS calcd for C₁₆H₁₈ClNNaO₄ [*M*+Na]⁺ 346.0822, found 346.0818.

4-(2,2,2-三甲基)乙酰氨基-3-甲基-6-苄氧甲基-5,6-二氢-吡喃-2-酮(**6c**): 2.47 g, 产率 92%. 淡黄色油状物. $[\alpha]_D^{29} + 2.4$ (c 0.005, CH_3COCH_3); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.47~7.29 (m, 6H), 4.61 (s, 2H), 4.51 (dq, $J=12.7, 4.4$ Hz, 1H), 3.70 (d, $J=4.6$ Hz, 2H), 3.41 (dd, $J=18.3, 3.7$ Hz, 1H), 3.10~2.92 (m, 1H), 1.88 (t, $J=1.5$ Hz, 3H), 1.30 (s, 9H); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 101 MHz) δ : 176.31, 166.19, 146.74, 138.05, 128.24, 127.48, 112.59, 74.23, 72.36, 70.64, 39.17, 29.19, 26.92, 12.08. HRMS calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{NNaO}_4$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 354.1681, found 354.1685.

4-(2,3,4,5-四氟)苯甲酰氨基-3-甲基-6-苄氧甲基-5,6-二氢-吡喃-2-酮(**6d**): 3.08 g, 产率 90%. 淡黄色油状物. $[\alpha]_D^{30} + 5.6$ (c 0.005, CH_3COCH_3); ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ : 10.16 (s, 1H), 7.74 (dddd, $J=10.7, 8.3, 5.8, 2.5$ Hz, 1H), 7.46~7.28 (m, 5H), 4.70~4.51 (m, 3H), 3.68 (d, $J=4.5$ Hz, 2H), 3.01~2.80 (m, 2H), 1.78 (s, 3H); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 101 MHz) δ : 166.57, 160.31, 146.01, 138.52, 128.76, 127.98, 112.60, 74.76, 72.85, 71.03, 29.08, 12.49. HRMS calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{F}_4\text{NNaO}_4$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 446.0991, found 446.0993.

3.2.6 中间体 7 的合成

将化合物 **6a** (2 g, 7 mmol)和二氯甲烷(30 mL)置于 100 mL 圆底烧瓶中, 在冰浴条件下向体系中快速加入四氯化钛(5 mL), 反应约 12 h. 反应完毕后, 在 500 mL 锥形瓶中加入水(200 mL), 将反应体系倒入该锥形瓶, 用二氯甲烷萃取(50 mL $\times$ 3), 有机相无水硫酸钠干燥, 抽滤, 减压浓缩, 柱层析 [V (石油醚): V (乙酸乙酯) = 3:1], 得到 4-乙酰氨基-3-甲基-6-羟甲基-5,6-二氢-吡喃-2-酮(**7**) 1.01 g, 产率 73%. 白色针晶, m.p. 147~148 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_D^{29} + 3.9$ (c 0.005, CH_3COCH_3); ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ : 9.40 (s, 1H), 5.04 (t, $J=5.8$ Hz, 1H), 4.26 (dt, $J=12.7, 4.2$ Hz, 1H), 3.70~3.45 (m, 2H), 3.05~2.61 (m, 2H), 2.07 (s, 3H), 1.75 (d, $J=2.0$ Hz, 3H); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 101 MHz) δ : 169.58, 167.16, 147.75, 108.14, 76.55, 62.76, 28.84, 24.27, 11.98. HRMS calcd for $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{NNaO}_4$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 222.0742, found 222.0745.

3.2.7 目标化合物 8 的合成

将化合物 **7** (1 g, 5 mmol)和无水二氯甲烷(5 mL)置于 25 mL 的圆底烧瓶中, 冰浴搅拌条件下加入三乙胺(0.757 g, 7.5 mmol), 之后将用 3 mL 无水二氯甲烷稀释好的肉桂酰氯(1.25 g, 7.5 mmol)用恒压滴定漏斗缓慢加入体系, 约 0.5 h 滴加完毕. 反应约 1 h. 反应完毕后, 将体系倒入 100 mL 的锥形瓶中, 加入 50 mL 水淬灭反应.

然后用二氯甲烷萃取(20 mL $\times$ 3), 有机相无水硫酸钠干燥, 抽滤, 减压浓缩, 柱层析 [V (石油醚): V (乙酸乙酯) = 4:1]得到 4-乙酰氨基-3-甲基-6-肉桂酰氧甲基-5,6-二氢-吡喃-2-酮(**8**), 1.54 g, 产率 93%. 白色针晶, m.p. 144~145 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_D^{29} + 0.7$ (c 0.005, CH_3COCH_3); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.75 (d, $J=16.1$ Hz, 1H), 7.64~7.37 (m, 5H), 7.15 (s, 1H), 6.48 (d, $J=16.1$ Hz, 1H), 4.69~4.63 (m, 1H), 4.44 (qd, $J=12.0, 4.8$ Hz, 2H), 3.57~3.41 (m, 1H), 2.99 (dd, $J=18.2, 12.4$ Hz, 1H), 2.22 (s, 3H), 1.91 (s, 3H); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 101 MHz) δ : 169.15, 166.14, 165.87, 146.86, 145.15, 133.88, 130.57, 128.88, 128.44, 117.49, 107.76, 72.95, 64.49, 28.10, 23.78, 11.51. HRMS calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{NNaO}_5$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 352.1161, found 352.1161.

3.3 抗肿瘤活性实验

利用 MTT 法对 10 个目标化合物进行抗肿瘤活性评价, 评价细胞有人肺癌细胞 A549、人胃癌细胞 MGC-803、人肝癌细胞 7721、人食管癌细胞 EC-109.

利用酶消化液处理处于对数生长期的肿瘤细胞, 快速离心, 取出细胞, 加入定量的含有 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基配成细胞混悬液. 置于 96 孔板中, 每孔 200 μL , 含 $4 \times 10^3 \sim 5 \times 10^3$ 个, 在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 恒温箱中培养 24 h, 用 9 个梯度浓度的目标化合物处理, 在上述培养条件下培养 72 h, 加入 MTT 溶液(5.0 mg/mL) 20 μL , 在恒温箱中继续孵育 4 h, 之后弃去上清, 每孔加入 DMSO 150 μL , 充分溶解, 用酶联免疫检测仪于 490 nm 处测得吸光度值, 计算 IC_{50} 值.

辅助材料(Supporting Information) 所有化合物的 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 谱图. 这些材料可以免费从本刊网站 (<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Jong, R.; Mulder, N.; Uges, D. *Brit. J. Cancer*. **1999**, 79, 882.
- [2] Barros, M. E.; Freitas, J. C.; Oliveira, J. M. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 76, 291.
- [3] Seyed, M. A.; Jantan, I.; Bukhari, S. N. A. *BioMed Res. Int.* **2014**, 2014, 536508.
- [4] Sun, Q. X.; Carrasco, Y. P.; Hu, Y. C. *P. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, 110, 1303.
- [5] Sandra, T. G.; Concepcion, V.; Santiago, D. O. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2015**, 348, 541.
- [6] Raju, A.; Reddy, A. Y.; Sabitha, G. *Tetrahedron Lett.* **2015**, 56, 5474.
- [7] Luiz, F. T. N.; Carolina, M. A.; Karin, J. P. R. *Chem. Med. Chem.* **2015**, 10, 1687.
- [8] Vilanova, C.; Diaz-Oltra, S.; Murga, J. J. *Med. Chem.* **2014**, 57, 10391.
- [9] Marucci, C.; Christodoulou, M. S.; Pieraccini, S. *Eur. J. Org.*

- Chem.* **2016**, *11*, 2029.
- [10] Benedekovic, G.; Kovacevic, I.; Popsavin, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 3318.
- [11] Li, X. C.; Guo, Z. Y.; Deng, Z. S. *Rec. Nat. Prod.* **2015**, *9*, 503.
- [12] He, H. Y.; Ratnayake, A. S.; Janso, J. E. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 1864.
- [13] Marco, J. A.; García-Pla, J.; Carda, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 1630.
- [14] Kim, J. H.; Lee, S. J.; *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1350.
- [15] Kim, J. H.; Shin, H.; Lee, S. G. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 1560.
- [16] Cao, X. F.; Sun, T. T.; Ke, S. Y. *Chin. J. Org. Chem.* **2010**, *30*, 1113 (in Chinese).
- (曹秀芳, 孙婷婷, 柯少勇, 有机化学, **2010**, *30*, 1113.)
- [17] Koziol, A.; Lendzion-Paluch, A.; Manikowski, A. *Org. Proc. Res. Dev.* **2013**, *17*, 869.
- [18] Zhao, J. Y.; Zheng, Z. H.; Huang, Q. F.; Deng, J. G.; Zhu, J.; Wang, Q. W. *Chin. J. Org. Chem.* **2016**, *36*, 648 (in Chinese).
(赵剑阳, 郑紫华, 黄晴菲, 邓金根, 朱槿, 王启卫, 有机化学, **2016**, *36*, 648.)
- [19] Pospisil, J.; Marko, I. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3516.
- [20] Ramesh, D.; Rajaram, S.; Peddikotla, P. *Helv. Chim. Acta* **2011**, *94*, 1226.
- [21] AnkiReddy, S.; AnkiReddy, P.; Sabitha, G. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 10487.

(Li, L.; Lu, Z.)