

橙酮衍生物的合成及初步抗肿瘤活性研究

黄新炜^{a,b} 王 征^a 陈巧利^a 孙艳妮^a 王翠玲^a
刘竹兰^a 刘建利^{*,a}

(^a 西北大学生命科学学院 西部资源生物与现代生物技术省部共建教育部重点实验室 西安 710069)

(^b 西安文理学院化学与化学工程学院 西安 710065)

摘要 橙酮是黄酮类化合物中的重要一类, 具有广泛的生物活性和药理作用, 如抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抗菌和对昆虫的拒食活性等. 由于其在自然界分布较少, 且在植物体内的含量都很低, 致使其提取分离成本高, 较难大规模获得. 为了解决这一问题, 同时进一步研究构效关系, 以苯氧乙酸、2,3,5-三甲基苯酚、4-氯-3,5-二甲苯酚、氯乙酸以及各种芳香醛为原料, 通过三步反应设计合成了 A 环无取代橙酮、5-氯-4,6-二甲苯橙酮及 4,6,7-三甲基橙酮三种类型共 25 个橙酮衍生物, 并通过熔点, ¹H NMR, ¹³C NMR, ESI-MS 和元素分析对目标化合物进行了结构表征, 其中 9 个化合物 (2h~2m, 5a~5c) 未见文献报道. 通过四甲基偶氮唑盐(MTT)法对目标化合物的抑制人宫颈癌细胞 Hela 活性进行了体外评价, 结果表明: 化合物 2b, 5b, 2s 和 2g 的半数抑制浓度 IC₅₀ 为 44.3, 31.1, 43.8 和 41.9 μmol/L.

关键词 橙酮衍生物; 合成; 抗肿瘤活性; 构效关系

Synthesis and Preliminary Antitumor Activities of Aurone Derivatives

Huang, Xinwei^{a,b} Wang, Zheng^a Chen, Qiaoli^a Sun, Yanni^a Wang, Cuiling^a
Liu, Zhulan^a Liu, Jianli^{*,a}

(^a Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education,
School of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069)

(^b School of Chemistry and Chemical Engineering, Xi'an University of Arts and Science, Xi'an 710065)

Abstract Aurones are an important type of flavonoids with broad biological activities and pharmacological effects, such as anti-tumor, anti-inflammatory, antioxidant, antibacterial, insect antifeedant *etc.* They are less common and not widely distributed in nature. The low contents in nature lead to high cost of extraction and separation. In order to extend the compounds diversity and study structure activity relationship, phenoxyacetic acid, 2,3,5-trimethylphenol, 4-chlorol-3,5-dimethylphenol, chloroacetic acid and various aromatic aldehydes are used as starting materials to synthesize three types of aurone derivatives. Their structures were characterized by melting point, ¹H NMR, ¹³C NMR, ESI-MS and elemental analysis. Nine of twenty five synthetic compounds 2h~2m, 5a~5c were unreported in the literature. All the target compounds were evaluated for antitumor activities against Hela human cervical carcinoma cell lines by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method. The results showed that compounds 2b, 5b, 2s and 2g exhibited potentially high activity against Hela human cervical carcinoma cell lines with IC₅₀ value of 44.3, 31.1, 43.8 and 41.9 μmol/L.

Keywords aurone derivatives; synthesis; antitumor activities; structure activity relationship

橙酮又称噢啉类, 是植物体内的次生代谢产物, 属稀有黄酮类化合物, 从结构看为苯并呋喃酮衍生物. 其基本结构为(Z)-苯亚甲基-3-(2H)-苯并呋喃酮[2-(phenyl-methylene)-3-(2H)-benzofuranone]. 橙酮在自然界中的

分布比较有限, 大多存在于玄参科、菊科、苦苣苔科以及单子叶植物中的莎草科, 在海洋中也偶尔能见到橙酮的身影. 橙酮类化合物具有广泛的生物活性和药理作用, 如抗肿瘤和细胞毒性^[1-3]、抗炎和抑菌^[4]、乙酰胆碱

* E-mail: jlliu@nwu.edu.cn

Received May 20, 2013; revised July 10, 2013; published online August 12, 2013.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 20872118, 30070905), the Key Laboratory Fund of Shaanxi Province of China (Nos. 2010JS097, 11JS090, 12JS110) and the Foundation of the Education Department of Shaanxi Province (No. 12JK1010).

国家自然科学基金(Nos. 20872118, 30070905)、陕西省重点实验室基金(Nos. 2010JS097, 11JS090, 12JS110)和陕西省教育厅基金(No. 12JK1010)资助项目.

酯酶抑制剂^[5]、白细胞介素-5 抑制剂^[6]、抑制 NO 和 PGE₂ 产生^[7]、SIRT1 抑制剂^[8]、ABCG2 抑制剂^[9,10]、17 β -HSD1 抑制剂^[11]、抗氧化^[12]和对昆虫的拒食活性^[13]等。人们对其它类型黄酮化合物的生物活性研究的较多,相比之下,橙酮类化合物的生物活性研究仍处于起步阶段,目前的研究主要集中在医用方面,在农用方面仅有拒食活性的报道。

橙酮的化学合成主要有两种方法:以苯并二氢呋喃-3-酮为关键中间体或 2'-羟基查尔酮的氧化环合制备。在第一种合成方法中,苯并二氢呋喃-3-酮作为关键中间体,可以先通过酚和卤代乙腈的傅-克酰化,然后水解成相应的 α -卤代苯乙酮,并在碱催化下环合得到;还可以直接由相应的邻羟基苯乙酮经 α 位卤代形成卤化物后再与邻位羟基环合制备。苯并二氢呋喃-3-酮与苯甲醛衍生物在酸^[7,14]或碱^[15~17]催化下缩合得橙酮类化合物。

2'-羟基查尔酮也可以在硝酸铈(III)^[18]、胺^[19]催化下转化为橙酮。Bose 等^[20]报道了 2'-羟基查尔酮转化为橙酮的一个更简便的方法:2'-乙酰氧基查耳酮与四丁基三溴化铵(TBATB)发生溴化反应,首先得到加成产物,然后在氢氧化钾醇溶液的作用下环合生成橙酮。Detsi 等^[12]还报道了一种用 Hg(OAc)₂ 氧化环化合成橙酮的方法。他们以邻羟基苯乙酮与取代的苯甲醛在 20% 氢氧化钾醇溶液中缩合得到相应的查尔酮化合物,然后在 Hg(OAc)₂ 和 pyridine 存在下回流就会得到相应的橙酮化合物。该方法是分步进行的,而且必须要用到易造成污染的 Hg(OAc)₂,步骤较长,而且对环境有危害。

除了以上方法外, Harkat 等^[21]报道了一种金催化环合三步合成橙酮的新方法,该方法的关键步骤是 2-(1-羟丙基-2-炔基)酚在金催化下的环合,该步具有很高的区域和立体选择性。关键中间体可以通过水杨醛的衍生物制备。最后在活性二氧化锰作用下氧化相应的烯丙醇结构成橙酮。Yu 等^[22]报道了一种以取代水杨醛与端基炔的环化反应两步合成橙酮的方法。首先取代水杨醛与端基炔在水相中以二异丙基乙基胺为碱,在 AgCl 配合物催化下加热得到相应的苯并呋喃醇类化合物,然后再在活性二氧化锰的作用下氧化烯丙醇得到相应的橙酮,与 Harkat 方法不同的是用银催化。

另外, Kraus 等^[23]还报道了通过偶联的方法利用底物不同的选择性合成橙酮和黄酮的反应。他们以取代酚、芳基硼酸和卤代共轭烯酸为原料,根据取代卤素的不同,得到不同的产物。如果共轭烯酸上取代的卤素是 Cl, 会生成黄酮;是 Br 则得到橙酮。

由于上述方法中所用试剂都不容易获得,有些毒性较大,因此仍需要研究新的合成方法。本文以廉价易得

的苯氧乙酸、取代酚及苯甲醛衍生物为原料,通过三步反应设计合成了三种不同类型的橙酮衍生物,为该化合物的进一步生物活性研究奠定了一定基础。

1 实验部分

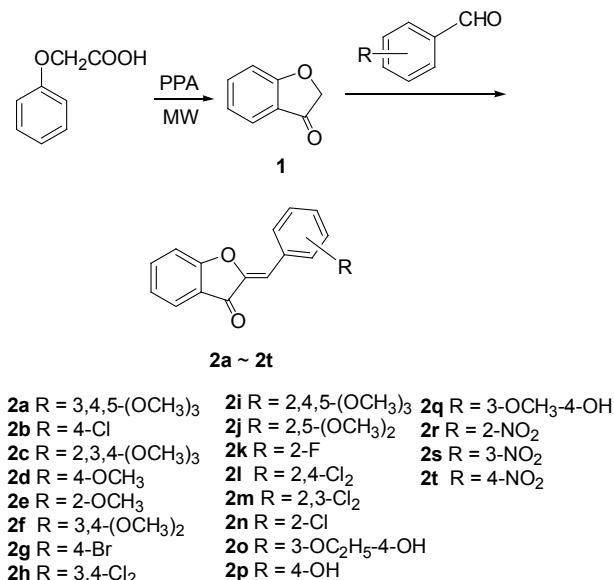
1.1 仪器与试剂

WF-4000 微波快速反应系统(上海屹尧分析仪器有限公司); X-5 显微熔点测定仪(未校准,北京泰克仪器有限公司); Bruker Avance-400 MHz 核磁共振仪(TMS 作内标, CDCl₃ 为溶剂, 瑞士 Bruker 公司); LTQ-XL 电喷雾电离质谱(美国 Thermo Finnigan 公司); Vario ELIII 型元素分析仪(德国 Elementar 公司); EL311 型酶标免疫检测仪(美国 Bio Tek 公司); 3164 型水套式 CO₂ 孵箱(美国 Forma Scientific 公司); IX71 型倒置荧光相差显微镜(日本 Olympus 公司); 四甲基偶氮唑盐(MTT)购于瑞士 Fluka 公司; RPMI-1640 培养基购于美国 HyClone 公司; 所用醛均购于阿拉丁试剂公司, 均为分析纯。

实验所用人宫颈癌细胞株 Hela 由第四军医大学惠赠。

1.2 A 环无取代橙酮衍生物的合成

以苯氧乙酸、多聚磷酸、苯甲醛衍生物为原料, 通过两步反应制备 A 环无取代橙酮衍生物, 如 Scheme 1 所示。



Scheme 1

1.2.1 苯并二氢呋喃-3-酮(1)的合成

称取 10.0 g (0.066 mol) 苯氧乙酸置于 250 mL 锥形瓶中, 加入 30 mL 多聚磷酸, 充分搅拌调成糊状, 设置温度 90 °C, 功率 800 W, 微波辐射 3 min, 得到棕色粘稠液体。冷却至室温, 加入适量冰块, 搅拌使其充分水

解, 150 mL CHCl_3 萃取 3 次, 分出有机层, 得到黄色透明溶液。用 10% NaHCO_3 100 mL 洗涤 3 次后, 无水硫酸镁干燥过夜, 旋蒸除去溶剂得粗产物, 经硅胶柱色谱分离, 氯仿与石油醚梯度洗脱, 得 5.09 g 橙黄色固体。产率 57.6%。m.p. 103~106 °C (文献值^[24] 101 °C); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.69 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.62 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.15 (d, $J=8$ Hz, 1H), 7.10 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 4.64 (s, 2H)。

1.2.2 2a~2n 的合成

以 3,4,5-三甲氧基苯甲醛为例说明。在 50 mL 圆底烧瓶中加入 0.10 g (0.7 mmol) 苯并二氢呋喃-3-酮, 0.22 g (1.1 mmol) 3,4,5-三甲氧基苯甲醛和 0.56 g (10 mmol) 氢氧化钾, 再加入 10 mL 甲醇和 1 mL 水, 室温搅拌反应, 薄层色谱(TLC)监测反应进程, 待原料点样处蓝色荧光点消失, 停止反应, 析出黄色晶体, 过滤, 甲醇洗涤后, 干燥得产物。

(Z)-3',4',5'-三甲氧基橙酮(2a): 黄色晶体, 产率 68.2%。m.p. 173~175 °C (Lit.^[25]: 174~176 °C); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.82 (dd, $J=8.0$, 1.2 Hz, 1H), 7.66 (td, $J=7.2$, 1.2 Hz, 1H), 7.32 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.24 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.20 (s, 2H), 6.84 (s, 1H, =CH), 3.96 (s, 6H, 2 $\times$ OCH₃), 3.93 (s, 3H, OCH₃)。

(Z)-4'-氯橙酮(2b): 淡黄色固体, 产率 61.1%。m.p. 163~164 °C (Lit.^[12]: 162~163 °C); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.86 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.82 (dd, $J=7.6$, 1.2 Hz, 1H), 7.68 (t, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.43 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.35 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.24 (t, $J=7.2$ Hz, 1H), 6.85 (s, 1H, =CH)。

(Z)-2',3',4'-三甲氧基橙酮(2c): 亮黄色固体, 产率 63.6%。m.p. 143~145 °C (Lit.^[26]: 142~144 °C); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 8.10 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.82 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.64 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.30~7.33 (m, 2H), 7.22 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.81 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 3.98 (s, 3H, OCH₃), 3.94 (s, 3H, OCH₃), 3.90 (s, 3H, OCH₃)。

(Z)-4'-甲氧基橙酮(2d): 黄色固体, 产率 76.9%。m.p. 135~137 °C (Lit.^[21]: 135 °C); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.91 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 7.82 (dd, $J=8.0$, 2.0 Hz, 1H), 7.65 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.34 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.22 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.00 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 6.90 (s, 1H, =CH), 3.89 (s, 3H, OCH₃)。

(Z)-2'-甲氧基橙酮(2e): 黄色固体, 产率 65.1%。m.p. 166~168 °C (Lit.^[13]: 167~170 °C); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 8.32 (dd, $J=8.0$, 1.6 Hz, 1H), 7.82 (dd, $J=8.0$, 1.6 Hz, 1H), 7.65 (td, $J=8.0$, 1.6 Hz, 1H), 7.49 (s, 1H, =CH), 7.38 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.33 (d, $J=8.0$ Hz, 1H),

7.22 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.08 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.94 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 3.91 (s, 3H, OCH₃)。

(Z)-3',4'-二甲氧基橙酮(2f): 黄色固体, 产率 65.9%。m.p. 157~159 °C (Lit.^[12]: 160~162 °C); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.82 (dd, $J=8.0$, 2.0 Hz, 1H), 7.66 (td, $J=8.0$, 2.0 Hz, 1H), 7.55 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 7.52 (dd, $J=8.0$, 2.0 Hz, 1H), 7.32 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.23 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.96 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.89 (s, 1H, =CH), 3.99 (s, 3H, OCH₃), 3.96 (s, 3H, OCH₃)。

(Z)-4'-溴橙酮(2g): 淡黄色固体, 产率 71.4%。m.p. 170~173 °C (Lit.^[27]: 172 °C); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.82 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.79 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 7.68 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 7.34 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.25 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.83 (s, 1H, =CH)。

(Z)-3',4'-二氯橙酮(2h): 淡黄色固体, 产率 65.0%。m.p. 186~188 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 8.05 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 7.82 (dd, $J=8.0$, 2.0 Hz, 1H), 7.69~7.73 (m, 2H), 7.53 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.37 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.26 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.77 (s, 1H, =CH); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 184.5, 166.1, 147.4, 137.3, 133.8, 133.1, 132.5, 132.3, 130.8, 130.4, 124.8, 123.8, 121.3, 113.0, 110.0; ESI-MS m/z (%): 314 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100)。Anal. calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_8\text{O}_2\text{Cl}_2$: C 61.86, H 2.75; found C 61.62, H 2.64。

(Z)-2',4',5'-三甲氧基橙酮(2i): 亮黄色固体, 产率 54.5%。m.p. 191~193 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.94 (s, 1H), 7.83 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.64 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.48 (s, 1H, =CH), 7.30 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.22 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 6.53 (s, 1H), 3.98 (s, 3H, OCH₃), 3.97 (s, 3H, OCH₃), 3.92 (s, 3H, OCH₃); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 184.2, 166.4, 155.2, 152.3, 145.7, 143.2, 136.1, 124.5, 123.1, 122.2, 114.4, 113.0, 112.7, 107.9, 96.2, 56.5, 56.4, 56.0; ESI-MS m/z (%): 335 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100)。Anal. calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_5$: C 69.23, H 5.13; found C 69.38, H 4.98。

(Z)-2',5'-二甲氧基橙酮(2j): 亮黄色固体, 产率 70.0%。m.p. 146~147 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.90 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 7.82 (dd, $J=8.0$, 1.5 Hz, 1H), 7.65 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.45 (s, 1H, =CH), 7.32 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.22 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.95 (dd, $J=8.0$, 2.0 Hz, 1H), 6.87 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 3.87 (s, 6H, OCH₃); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 184.6, 165.9, 153.6, 153.4, 146.9, 136.6, 124.6, 123.3, 121.9, 121.8, 117.0, 116.7, 112.9, 111.7, 107.1, 56.2, 55.8; ESI-MS m/z (%): 305

($[M+Na]^+$, 100). Anal. calcd for $C_{17}H_{14}O_4$: C 72.34, H 4.96; found C 72.18, H 4.83.

(Z)-2'-氟橙酮(**2k**): 淡黄色固体, 产率 65.5%. m.p. 144~146 °C; 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 8.35 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.84 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.69 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.40 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.36 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.15 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.23 (s, 1H, =CH), 7.20~7.31 (m, 2H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 184.6, 166.2, 163.1, 160.5, 147.7, 137.2, 132.0, 131.6, 124.8, 123.8, 121.6, 120.7, 115.8, 113.1, 104.2; ESI-MS m/z (%): 263 ($[M+Na]^+$, 100). Anal. calcd for $C_{15}H_9O_2F$: C 75.01, H 3.75; found C 74.86, H 3.61.

(Z)-2',4'-二氯橙酮(**2l**): 淡黄色固体, 产率 73.5%. m.p. 209~211 °C; 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 8.31 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.83 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.68 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.49 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 7.37 (dd, $J=8.0, 2.0$ Hz, 1H), 7.33 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.26 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.28 (s, 1H, =CH); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 184.4, 166.1, 147.7, 137.2, 136.4, 135.8, 132.8, 129.9, 129.0, 127.5, 124.9, 123.9, 121.4, 112.9, 105.7; ESI-MS m/z (%): 314 ($[M+Na]^+$, 100). Anal. calcd for $C_{17}H_8O_2Cl_2$: C 61.86, H 2.75; found C 61.72, H 2.63.

(Z)-2',3'-二氯橙酮(**2m**): 淡黄色固体, 产率 63.7%. m.p. 206~209 °C; 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 8.27 (dd, $J=8.0, 2.0$ Hz, 1H), 7.84 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.68 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.49 (dd, $J=8.0, 1.2$ Hz, 1H), 7.34 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.31 (s, 1H, =CH), 7.31~7.35 (m, 2H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 184.5, 166.2, 147.9, 137.3, 133.9, 132.5, 131.1, 130.3, 127.3, 124.9, 123.9, 121.3, 113.0, 112.8, 107.8; ESI-MS m/z (%): 314 ($[M+Na]^+$, 100). Anal. calcd for $C_{17}H_8O_2Cl_2$: C 61.86, H 2.75; found C 61.69, H 2.88.

(Z)-2'-氯橙酮(**2n**): 淡黄色固体, 产率 66.7%. m.p. 139~141 °C; 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 8.15 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.62 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.58 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.47 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.26 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.33 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.35 (s, 1H, =CH), 7.22~7.26 (m, 2H); ESI-MS m/z (%): 280 ($[M+Na]^+$, 100).

1.2.3 2o~2q 的合成

以乙基香兰素为例说明. 在 50 mL 圆底烧瓶中加入 0.10 g (0.7 mmol) 苯并二氢呋喃-3-酮, 0.18 g (1.1 mmol) 乙基香兰素和 10 mL 冰醋酸, 再滴加 4 滴浓盐酸, 室温搅拌反应, 薄层色谱(TLC) 监测反应进程, 待原料点样处苯并二氢呋喃-3-酮的蓝色荧光消失, 停止反应. 将反应液倒入冰水中, 过滤, 用水洗涤后, 经硅胶柱色谱分

离得到产物.

(Z)-3'-乙氧基-4'-羟基橙酮(**2o**): 黄色晶体, 产率 65.0%. m.p. 123~125 °C (Lit.^[13]: 121~123 °C); 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 7.82 (dd, $J=8.0, 1.4$ Hz, 1H), 7.65 (td, $J=8.0, 1.3$ Hz, 1H), 7.47 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 7.45 (dd, $J=9.0, 2.0$ Hz, 1H), 7.01 (d, $J=9.0$ Hz, 1H), 7.32 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.21 (td, $J=8.0, 1.4$ Hz, 1H), 6.84 (s, 1H, =CH), 6.09 (s, 1H, OH), 4.24 (q, $J=7.0$ Hz, 2H), 1.52 (t, $J=7.0$ Hz, 3H).

(Z)-4'-羟基橙酮(**2p**): 亮黄色固体, 产率 64.7%. m.p. 263~265 °C (Lit.^[28]: 261~263 °C); 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 9.07 (s, 1H, OH), 7.94 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.78~7.81 (m, 2H), 7.50 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.33 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.00 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 6.85 (s, 1H, =CH).

(Z)-3'-甲氧基-4'-羟基橙酮(**2q**): 黄色固体, 产率 63.2%. m.p. 209~211 °C (Lit.^[29]: 206~208 °C); 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 7.84 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.67 (t, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.51~7.54 (m, 2H), 7.34 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.25 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.03 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 6.89 (s, 1H, =CH), 5.99 (s, 1H, OH), 4.02 (s, 3H, OCH_3).

1.2.4 2r~2t 的合成

以邻硝基苯甲醛为例说明. 在 50 mL 圆底烧瓶中加入 0.10 g (0.7 mmol) 苯并二氢呋喃-3-酮, 0.17 g (1.1 mmol) 邻硝基苯甲醛, 2 g 碱性三氧化二铝和 15 mL 二氯甲烷, 室温搅拌反应, 薄层色谱(TLC)监测反应进程, 待原料点样处苯并二氢呋喃-3-酮的蓝色荧光消失, 停止反应. 过滤, 用二氯甲烷充分洗涤后, 滤液减压浓缩后得粗产品, 经硅胶柱色谱分离得到产物.

(Z)-2'-硝基橙酮(**2r**): 黄色固体, 产率 57.9%. m.p. 205~207 °C; 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 8.27 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 8.04 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.83 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.73 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.67 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.54 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.31 (s, 1H, =CH), 7.24~7.29 (m, 2H); ESI-MS m/z (%): 290 ($[M+Na]^+$, 100).

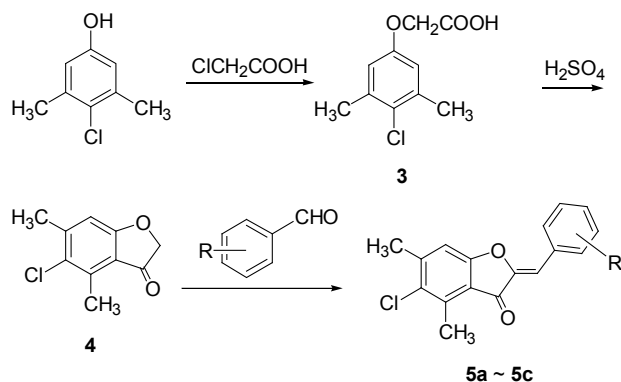
(Z)-3'-硝基橙酮(**2s**): 黄色固体, 产率 63.2%. m.p. 195~198 °C; 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 8.84 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 8.26 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 8.16 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.85 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.73 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.65 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.42 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.29 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.90 (s, 1H, =CH); ESI-MS m/z (%): 290 ($[M+Na]^+$, 100).

(Z)-4'-硝基橙酮(**2t**): 黄色固体, 产率 73.7%. m.p. 210~212 °C (Lit.^[27]: 206~208 °C); 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 8.31 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 8.07 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.84 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.72 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.38 (d,

$J=8.0$ Hz, 1H), 7.29 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.88 (s, 1H, =CH).

1.3 5-氯-4,6-二甲基橙酮衍生物的合成

以 4-氯-3,5-二甲基苯酚、氯乙酸、浓硫酸、苯甲醛衍生物为原料, 通过三步反应制备 5-氯-4,6-二甲基橙酮衍生物, 如 Scheme 2 所示。



Scheme 2

1.3.1 4-氯-3,5-二甲基苯氧乙酸(3)的合成

称取 8.4 g (0.21 mol) NaOH 溶于 50 mL 水中, 然后加入 9.4 g (0.06 mol) 4-氯-3,5-二甲基苯酚, 搅拌溶解后, 再加入 11.5 g (0.12 mol) 氯乙酸, 溶液为黄色, 混合物在 100 °C 加热反应 4 h, 冰浴冷却, 再用浓盐酸调节溶液的 pH 值为 2 左右, 搅拌 30 min 后, 过滤得粗品, 用乙醇重结晶得 9.73 g 白色针状晶体, 产率 75.4%. m.p. 104~106 °C (文献值^[30] 100~103 °C); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 6.68 (s, 2H), 4.66 (s, 2H), 2.36 (s, 6H).

1.3.2 5-氯-4,6-二甲基苯并二氢呋喃-3-酮(4)的合成

称取 12.3 g (0.057 mol) 4-氯-3,5-二甲基苯氧乙酸, 溶于 150 mL 浓 H_2SO_4 中, 在 90~95 °C 油浴中反应 15 min, 溶液变为樱桃红色, 冷却至室温, 倒入 500 mL 冰水中, 析出淡黄色固体, 过滤后水洗, 得粗品, 甲醇重结晶后得 8.24 g 浅黄色固体, 产率 73.4%. m.p. 136~139 °C (文献值^[31] 137~140 °C).

1.3.3 5a~5c 的合成

以对溴苯甲醛为例说明. 在 50 mL 圆底烧瓶中加入 0.14 g (0.7 mmol) 5-氯-4,6-二甲基苯并二氢呋喃-3-酮, 0.20 g (1.1 mmol) 对溴苯甲醛, 2 g 碱性三氧化二铝和 15 mL 二氯甲烷, 室温搅拌反应, 薄层色谱(TLC)监测反应进程, 待原料点样处 5-氯-4,6-二甲基苯并二氢呋喃-3-酮的蓝色荧光消失, 停止反应. 过滤, 用二氯甲烷充分洗涤后, 滤液减压浓缩后得粗产品, 经硅胶柱色谱分离得到产物。

(Z)-5-氯-4,6-二甲基-4'-溴橙酮(5a): 黄色固体, 产

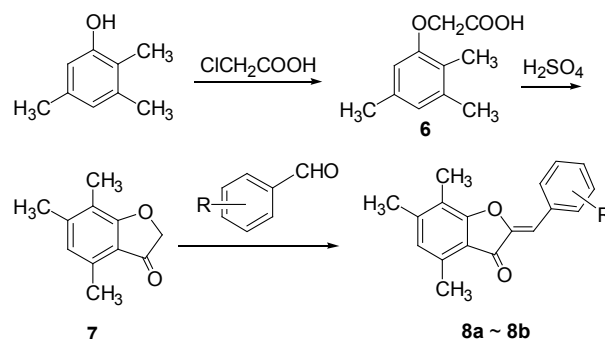
率 68.4%. m.p. 229~231 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.75 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.57 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.06 (s, 1H), 6.75 (s, 1H, =CH), 2.73 (s, 3H, CH_3), 2.51 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 184.3, 164.2, 147.5, 142.6, 135.2, 131.8, 131.3, 131.1, 130.4, 128.9, 128.6, 122.6, 118.4, 115.1, 112.5, 22.5, 15.3; ESI-MS m/z (%): 387 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100). Anal. calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_2\text{ClBr}$: C 56.12, H 3.31; found C 56.26, H 3.17.

(Z)-5-氯-4,6-二甲基-3'-硝基橙酮(5b): 黄色固体, 产率 62.7%. m.p. 242~245 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 8.81 (s, 1H), 8.24 (dd, $J=8.0, 2.0$ Hz, 1H), 8.11 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.63 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.16 (s, 1H), 6.82 (s, 1H, =CH), 2.74 (s, 3H, CH_3), 2.53 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 184.1, 164.4, 148.6, 148.3, 146.7, 137.8, 136.6, 134.0, 130.7, 129.8, 125.4, 123.8, 118.2, 112.1, 109.0, 22.6, 15.0; ESI-MS m/z (%): 353 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100). Anal. calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{NO}_4\text{Cl}$: C 61.91, H 3.64, N 4.25; found C 61.78, H 3.49, N 4.12.

(Z)-5-氯-4,6-二甲基-2',4'-二氯橙酮(5c): 黄色固体, 产率 65.3%. m.p. 239~243 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 8.25 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.48 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 7.35 (dd, $J=8.0, 2.0$ Hz, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.07 (s, 1H, =CH), 2.74 (s, 3H, CH_3), 2.51 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 184.2, 164.3, 148.1, 146.5, 142.0, 136.4, 135.3, 131.6, 130.5, 129.2, 126.7, 125.3, 118.0, 114.4, 112.6, 22.3, 15.2; ESI-MS m/z (%): 377 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100). Anal. calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{O}_2\text{Cl}_3$: C 57.71, H 3.11; found C 57.58, H 3.22.

1.4 4,6,7-三甲基橙酮衍生物的合成

以 2,3,5-三甲基苯酚、氯乙酸、浓硫酸、苯甲醛衍生物为原料, 通过三步反应制备 4,6,7-三甲基橙酮衍生物, 如 Scheme 3 所示。



Scheme 3

1.4.1 2,3,5-三甲基苯氧乙酸(6)的合成

称取 8.4 g (0.21 mol) NaOH 溶于 50 mL 水中, 然后

加入 8.2 g (0.06 mol) 2,3,5-三甲基苯酚, 搅拌溶解后, 再加入 11.5 g (0.12 mol) 氯乙酸, 溶液为黄色, 混合物在 100 °C 加热反应 4 h, 冰浴冷却, 再用浓盐酸调节溶液的 pH 值为 2 左右, 搅拌 30 min 后, 过滤得粗品, 用乙醇重结晶得 8.33 g 白色针状晶体, 产率 71.6%. m.p. 131~133 °C (文献值^[32] 130~131 °C); ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 6.69 (s, 1H), 6.45 (s, 1H), 4.67 (s, 2H), 2.28 (s, 3H, CH₃), 2.24 (s, 3H, CH₃), 2.17 (s, 3H, CH₃).

1.4.2 4,6,7-三甲基苯并二氢呋喃-3-酮(7)的合成

称取 11.1 g (0.057 mol) 2,3,5-三甲基苯氧乙酸, 溶于 150 mL 浓 H₂SO₄ 中, 在 90~95 °C 油浴中反应 15 min, 溶液变为樱桃红色, 冷却至室温, 倒入 500 mL 冰水中, 析出淡黄色固体, 过滤后水洗, 得粗品, 甲醇重结晶后得 6.68 g 白色固体, 产率 66.6%. m.p. 90~93 °C (文献值^[32] 88~90 °C); ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 6.65 (s, 1H), 4.59 (s, 2H), 2.54 (s, 3H, CH₃), 2.32 (s, 3H, CH₃), 2.18 (s, 3H, CH₃).

1.4.3 橙酮衍生物 8a~8b 的合成

在 50 mL 圆底烧瓶中加入 0.12 g (0.7 mmol) 4,6,7-三甲基苯并二氢呋喃-3-酮, 0.15 g (1.1 mmol) 2-甲氧基苯甲醛、2 g 碱性三氧化二铝和 15 mL 二氯甲烷, 室温搅拌反应, 薄层色谱(TLC) 监测反应进程, 待原料点样处 4,6,7-三甲基苯并二氢呋喃-3-酮的蓝色荧光消失, 停止反应. 过滤, 用二氯甲烷充分洗涤后, 滤液减压浓缩后得粗产品, 经硅胶柱色谱分离得到产物.

(Z)-4,6,7-三甲基-2'-甲氧基橙酮(8a): 黄色固体, 产率 66.7%. m.p. 219~221 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 8.30 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.35 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.07 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.76 (s, 1H), 6.93 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 3.91 (s, 3H, OCH₃), 2.61 (s, 3H, CH₃), 2.35 (s, 3H, CH₃), 2.32 (s, 3H, CH₃); ESI-MS m/z (%): 317 ([M+Na]⁺, 100).

(Z)-4,6,7-三甲基-3',4'-二甲氧基橙酮(8b): 黄色固体, 产率 69.6%. m.p. 213~215 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 7.69 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 7.41 (dd, $J=8.0, 2.0$ Hz, 1H), 7.25 (s, 1H, H-1), 6.95 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.77 (s, 1H), 4.00 (s, 3H, OCH₃), 3.95 (s, 3H, OCH₃), 2.61 (s, 3H, CH₃), 2.36 (s, 3H, CH₃), 2.32 (s, 3H, CH₃); ESI-MS m/z (%): 347 ([M+Na]⁺, 100).

1.5 MTT 法体外抗肿瘤活性实验

取肿瘤细胞株, 用 RPMI-1640 培养液于 CO₂ 孵箱中 37 °C, 5% CO₂ 饱和湿度下培养, 细胞贴壁后用胰蛋白酶消化传代. 将处于对数生长期肿瘤细胞以 5×10^4 个/mL 的密度接种于 96 孔培养板中, 每孔 100 μ L. 次日, 每孔加入不同浓度受试化合物, 每药设 4 个剂量组,

每组设 3 个平行孔, 另设空白组和对照组(以紫杉醇为阳性对照). 加药完毕后于 CO₂ 孵箱中在 37 °C, 5% CO₂ 饱和湿度下培养 48 h, 然后每孔再加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 μ L, 继续培养 4 h 后, 吸弃上清液, 每孔加入 150 μ L DMSO, 振荡 10 min (60 次/min) 后, 用自动酶标仪于 490 nm 波长处测定吸光度(OD)值, 取各组平均值, 重复实验 3 次. 以浓度为横轴, 细胞存活率为纵轴绘制曲线, 用两点法计算出每个样品的 IC₅₀ 值, 结果见表 1.

细胞存活率%=(样品组平均 OD 值-空白孔)/

(对照组平均 OD 值-空白孔)×100%

2 结果与讨论

2.1 化合物的合成

以苯氧乙酸为原料进行苯并二氢呋喃-3-酮合成时, 产率不高, 主要原因是苯氧乙酸进行关环时, 反应位点较多, 既可以发生分子内关环, 也可发生分子间关环; 进行分子间关环时有可能发生在邻位, 也有可能发生在对位. 在进行 4,6,7-三甲基苯并二氢呋喃-3-酮及 5-氯-4,6-二甲基苯并二氢呋喃-3-酮的合成时, 相对苯并二氢呋喃-3-酮来说副反应少了很多, 产率也较高. 关环所用方法包括: PPA 传统加热回流法; PPA 微波辐射法; 浓硫酸室温搅拌法. 第一种方法的反应时间较长, 第二种方法可以在较短的时间完成反应(20 min 以内), 第三种方法产率太低. 最终选择第二种方法进行合成.

在进行橙酮合成时, 首先尝试了微波辐射, 虽然反应可以在较短时间内完成, 但实验操作起来比较困难, 而且反应也不容易控制, 因此采用文献报道的方法进行合成. 针对不同的醛, 共采用了三种方法: 一是甲醇作溶剂, 氢氧化钠为催化剂; 二是以冰醋酸作溶剂, 浓盐酸作催化剂; 三是以 CH₂Cl₂ 作溶剂, 碱性三氧化二铝作催化剂. 三种方法相比, 第一种的优点是后处理容易, 随着反应的进行, 产物会从反应液中析出, 缺点是对于遇碱不稳定的醛不适合, 另外碱性过强还会引起醛的歧化反应; 第二种方法的缺点是后处理较为困难, 需要进行柱色谱分离; 第三种方法比较理想, 一是碱性三氧化二铝的碱性不是很强, 不会引起醛的歧化反应, 而且反应条件温和, 室温搅拌, 后处理也较为简单, 当反应结束后, 过滤后得粗品, 用甲醇重结晶即得纯品.

2.2 生物活性

对于目标化合物 2a~2t, 5a~5c, 8a~8b, 采用四甲基偶氮唑盐(MTT)微量酶反应比色法测定了橙酮衍生物对宫颈癌细胞(Hela)的体外抗肿瘤活性^[33], 阳性对照物为抗肿瘤药物紫杉醇(Paclitaxel), 测试结果如表 1 所示. 化合物 2b, 5b, 2s 和 2g 具有较好的体外抗肿瘤活性,

半数抑制浓度 IC_{50} 分别为 44.3, 31.1, 43.8 和 41.9 $\mu\text{mol/L}$. 从表 1 可以看出, 在橙酮 B 环上引入甲氧基不利于抗肿瘤活性的提高; 在 B 环 4'-位引入卤素原子可以增强活性; 在 B 环 3'-位引入吸电子基团有利于活性提高, 详细的构效关系有待进一步深入研究.

表 1 目标化合物 **2a~2t**, **5a~5c**, **8a~8b** 的体外抗肿瘤活性 (IC_{50} , $\mu\text{mol/L}$)

Table 1 *In vitro* antitumor activities of target compounds **2a~2t**, **5a~5c**, **8a~8b** against Hela cell line (IC_{50} , $\mu\text{mol/L}$)

Compd.	$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	Compd.	$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$
2a	>200	2n	182.6
2b	44.3	2o	135.6
2c	>200	2p	88.9
2d	169.9	2q	136.5
2e	>200	2r	193.2
2f	196.4	2s	43.8
2g	41.9	2t	>200
2h	89.9	5a	75.5
2i	>200	5b	31.1
2j	>200	5c	100.3
2k	86.9	8a	186.2
2l	97.7	8b	>200
2m	118.8	Paclitaxel	6.5

3 结论

本文以苯氧乙酸、2,3,5-三甲基苯酚、4-氯-3,5-二甲基苯酚、氯乙酸以及多种芳香醛为原料, 通过三步反应设计合成了 A 环无取代橙酮、5-氯-4,6-二甲基橙酮及 4,6,7-三甲基橙酮三种类型共 25 个橙酮衍生物, 其中 9 个是新化合物. 首次采用微波辐射法合成了制备橙酮所需的关键中间体苯并二氢呋喃-3-酮, 该方法能够大大缩短反应时间. 体外抗肿瘤活性实验表明, 部分目标化合物对宫颈癌细胞 Hela 具有较好的抑制活性.

References

- [1] Huang, W.; Liu, M. Z.; Li, Y.; Tan, Y.; Yang, G. F. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 5191.
- [2] Lawrence, N. J.; Rennison, D.; McGown, A. T.; Hadfield, J. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3759.
- [3] Lewin, G.; Aubert, G.; Thoret, S.; Dubois, J.; Cresteil, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 1231.
- [4] Bandgar, B. P.; Patil, S. A.; Korbadi, B. L.; Biradar, S. C.; Nile, S.

- N.; Khobragade, C. N. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 3223.
- [5] Sheng, R.; Xu, Y.; Hu, C. Q.; Zhang, J.; Lin, X.; Li, J. Y.; Yang, B.; He, Q. J.; Hu, Y. Z. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 7.
- [6] Thanigaimalai, P.; Yang, H. M.; Sharma, V. K.; Kim, Y.; Jung, S. H. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 4441.
- [7] Shin, S. Y.; Shin, M. C.; Shin, J. S.; Lee, K. T.; Lee, Y. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4520.
- [8] Manjulatha, K.; Srinivas, S.; Mulakayala, N.; Rambabu, D.; Prabhakar, M.; Arunasree, K. M.; Alvalla, M.; Rao, M. V. B.; Pal, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 6160.
- [9] Sim, H. M.; Wu, C. P.; Ambudkar, S. V.; Go, M. L. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *82*, 1562.
- [10] Sim, H. M.; Lee, C. Y.; Ee, P. L. R.; Go, M. L. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2008**, *35*, 293.
- [11] Starcevic, S.; Turk, S.; Brus, B.; Cesar, J.; Rizner, T. L.; Gobec, S. *J. Steroid Biochem.* **2011**, *127*, 255.
- [12] Detsi, A.; Majdalani, M.; Kontogiorgis, C. A.; Litina, D. H.; Kefalas, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 8073.
- [13] Morimoto, M.; Fukumoto, H.; Nozoe, T.; Hagiwara, A.; Komai, K. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 700.
- [14] Cheng, H. M.; Zhang, L. W.; Liu, Y. X.; Chen, S. P.; Cheng, H.; Lu, X.; Zheng, Z. X.; Zhou, G. C. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 5950.
- [15] Sim, H. M.; Loh, K. Y.; Yeo, W. K.; Lee, C. Y.; Go, M. L. *ChemMedChem* **2011**, *6*, 713.
- [16] Haudecoeur, R.; Belkacem, A. A.; Yi, W.; Fortune, A.; Brillet, R.; Belle, C.; Nicolle, E.; Pallier, C.; Pawlowsky, J. M.; Boumendjel, A. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5395.
- [17] Lee, C. Y.; Chew, E. H.; Go, M. L. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 2957.
- [18] Thakkar, K.; Cushman, M. J. *Org. Chem.* **1995**, *60*, 6499.
- [19] Donnelly, J. A.; Emerson, G. M. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 7227.
- [20] Bose, G.; Mondal, E.; Khan, A. T.; Bordoloi, M. T. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8907.
- [21] Harkat, H.; Blanc, A.; Weibel, J. M.; Pale, P. J. *Org. Chem.* **2008**, *73*, 1620.
- [22] Yu, M.; Lin, M.; Han, C. Y.; Zhu, L.; Li, C. J.; Yao, X. Q. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 6722.
- [23] Kraus, G. A.; Gupta, V. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5278.
- [24] Deshpande, A. R.; Paradkar, M. V. *Synth. Commun.* **1990**, *20*, 809.
- [25] Venkateswarlu, S.; Panchagnula, G. K.; Gottumukkala, A. L.; Subbaraju, G. V. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 6909.
- [26] Imafuku, K.; Honda, M.; McOmie, J. F. W. *Synthesis* **1987**, 199.
- [27] Litkei, G.; Patonay, T. *Acta Chim. Hung.* **1983**, *114*, 47.
- [28] Okombi, S.; Rival, D.; Bonnet, S.; Mariotte, A. M.; Perrier, E.; Boumendjel, A. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 329.
- [29] Sen, B. J. *Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 3445.
- [30] Clark, C. R.; Halfpenny, P. R.; Hill, R. G.; Horwell, D. C.; Hughes, J.; Jarvis, T. C.; Rees, D. C.; Schofield, D. J. *Med. Chem.* **1988**, *31*, 831.
- [31] Brown, J. P.; McCall, E. B. *J. Chem. Soc.* **1957**, *0*, 3875.
- [32] Smith, L. I.; Holmes, R. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 4294.
- [33] Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55.

(Qin, X.)