

含羧基或酯基的 N-甲基异噁唑啉盐的合成及其对细胞分裂周期 25B 磷酸酯酶和蛋白酪氨酸磷酸酶 1 的体外抗癌活性

穆赫塔尔·伊米尔艾山* 萨提瓦力迪·海力力 麦麦提依明·马合木提

(新疆大学化学与化工学院 乌鲁木齐 830046)

摘要 以硫酸二甲酯作为 *N*-甲基化试剂, 与相应的异噁唑啉 **1a~1g** 或 **3a~3g** 反应, 并在盐酸中以三氯化铁作为阴离子交换试剂, 合成了 14 个未见文献报道的 2-甲基-3-乙氧基羧基-5-芳基-3a,6a-二氢-4,6-二氧代氮杂茂并[3',4'-d]异噁唑四氯化铁酸盐衍生物 **2a~2g** 和 2-甲基-3-羧基-5-芳基-3a,6a-二氢-4,6-二氧代氮杂茂并[3',4'-d]异噁唑四氯化铁酸盐衍生物 **4a~4g**, 其结构经 ¹H NMR, IR 和元素分析确证, 并进行了初步药物活性筛选。化合物 **2** 和 **4** 显示了不同程度的抗癌活性。体外抗癌活性试验表明, 当样品浓度为 20 μg/mL 时, 化合物 **2a~2g** 和 **4a~4g** 对细胞分裂周期 25B 磷酸酯酶(Cdc25B)的抑制率分别在 97.32%~99.94%之间和 97.45%~99.92%之间。化合物 **2a~2g** 和 **4d~4g** 对含 SH2 结构域蛋白酪氨酸磷酸酯酶-1 (SHP1)具有良好的抑制活性, 其抑制率分别在 52.18%~97.15% 和 86.66%~99.45%之间。只有 **4a~4c** 的抑制率在 15.21%~47.11%之间 ($IC_{50} < 0.5 \mu\text{mol/L}$)。在此基础上, 初步讨论了该类化合物的构效关系。

关键词 羧基; 酯基; *N*-甲基异噁唑四氯化铁酸盐; 合成; 体外抗癌活性

Synthesis and *in vitro* Anticancer Activity of *N*-Methylisoxazolinium-Salts with Carboxyl or Ester Groups against Cell Division Cycle 25B Phosphatase and Protein Tyrosine Phosphatase-1

Imerhasan, Mukhtar* Helil, Setiwaldi

Mahmud, Muhammed Amin

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Xinjiang University, Urumqi 830046)

Abstract Fouteen 2-methyl-3-ethylcarboxy-5-aryl-3a,6a-dihydro-4,6-dioxopyrrolino[3',4'-d]-isoxazoliniumtetrachloroferrate derivatives **2a~2g** and 2-methyl-3-carboxyl-5-aryl-3a,6a-dihydro-4,6-dioxopyrrolino[3',4'-d]-isoxazolinium-tetrachloroferrate derivatives **4a~4g** were synthesized by using dimethylsulfate as a *N*-methylation reagent and ferric(III)-chloride as anion exchange reagent in hydrochloric acid. The structures of the target compounds **2** and **4** were characterized by ¹H NMR, IR spectra and elemental analysis. The preliminary *in vitro* anticancer activity on the compounds showed that most compounds possess anti-cancer activity at some extent. At the test concentration of 20 μg/mL, compounds **2a~2g** and **4a~4g** showed inhibition activities in the range of 97.32%~99.94% and 97.45%~99.92% against cell division cycle 25B phosphatase (Cdc25B), respectively. At the test concentration of 20 μg/mL, compounds **2a~2g** and **4d~4g** showed inhibition activities in the range of 52.18%~97.15% and 86.66%~99.45% against SH2-containing protein tyrosine phosphatase-1 (SHP1), respectively. Compounds **4a~4c** only have the inhibition activities in the range of 15.21%~47.11%, which is lower than IC_{50} against SHP1. Preliminary discussion was carried out on the structure-activity relationship of the target compounds.

Keyword carboxyl; estergroup; *N*-methylisoxazolinium-tetrachloroferrate; synthesis; *in vitro* anticancer activity

异噁唑啉具有较弱的碱性和 *N*-亲核性, 易与较强的甲基化试剂反应生成 *N*-甲基异噁唑啉盐, 异噁唑啉

盐在有机合成中表现出潜在的多功能中间体^[1~8]的作用, 引起了科学工作者的广泛关注。有关异噁唑阳离子

* Corresponding author. E-mail: imerhasan@yahoo.com

Received April 15, 2016; revised July 12, 2016; published online September 6, 2016.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21462043, 21062019).

国家自然科学基金(Nos. 21462043, 21062019)资助项目。

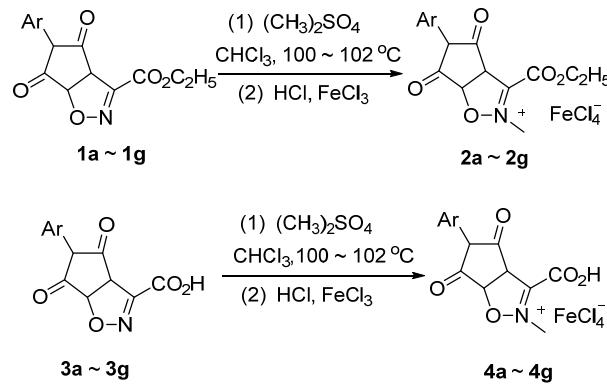
反应的首次研究信息从早期的文献中找到, Mumm 的系列研究证明 *N*-甲基-5-苯基异噁唑啉离子与醋酸根离子很容易发生反应^[9]. Kohler 等^[10,11]很早就提出 3-位未取代的异噁唑盐与亲核试剂的反应, 经过模拟碱中间体, 如氢氧根离子进攻异噁唑盐 3-位碳发生反应, Feinstein 等^[12]经过异噁唑盐对蛋白质羧酸侧链的改性研究证明了 *N*-烷基-5-苯基异噁唑盐是激活胰蛋白酶羧酸侧链的合适试剂. 异噁唑盐分子中正电荷中心与阴离子间的静电作用增强了整个分子的极性, 这有利于异噁唑盐分子与酶分子活性结构域的作用. 在过去几十年中, *N*-甲基异噁唑盐在有机合成、药物开发、大分子等领域显示出越来越广泛的应用前景. 本课题组以硫酸二甲酯作为甲基化试剂, 在盐酸中以三氯化铁作为阴离子交换试剂, 由相应的异噁唑制备的 2-甲基-3-(1',2'-*O*-环亚己基二氧乙基)-5-芳基-3*a*,6*a*-二氢-4,6-二氧化氮杂茂并[3',4'-*d*]异噁唑四氯化铁酸盐衍生物显示了较强的体外抗癌活性和体外白细胞共同抗原活性^[13]. 本文由反应的经济性出发, 将廉价、对环境友好的甲基化试剂硫酸二甲基扩展到含有亲水性基团的稠杂异噁唑啉环 **1a~1g** 或 **3a~3g** 的 *N*-甲基化反应, 合成了 14 个 2-甲基-3-乙氧基羰基-5-芳基-3*a*,6*a*-二氢-4,6-二氧化氮杂茂并[3',4'-*d*]异噁唑四氯化铁酸盐衍生物 **2a~2g** 和 2-甲基-3-羧基-5-芳基-3*a*,6*a*-二氢-4,6-二氧化氮杂茂并[3',4'-*d*]异噁唑四氯化铁酸盐衍生物 **4a~4g**, 并对化合物 **2** 和 **4** 进行了初步药物活性筛选, 期望基于异噁唑啉盐分子的高度正电性、羧基、酯基等取代基的亲水性、强极性的协同作用所导致的分子极性的增大, 不仅提高分子的稳定性, 且引起电性的变化, 从而增强盐分子中异噁唑啉环或羧基、酯基与细胞 DNA 分子活性结构域的结合, 通过活性筛选, 获得高活性的前提化合物. 研究证实, 细胞分裂周期 25B 磷酸酯酶(Cdc25B, cell division cycle 25B phosphatase)是有效的抗癌药物靶点, 这为解释肿瘤细胞周期紊乱、生长旺盛、过度增殖提供了证据^[14]. 文献报道, 含 SH2 结构域蛋白酪氨酸磷酸酯酶-1 (SHP1, SH2-containing protein tyrosine phosphatase-1) 在前列腺细胞的增殖和前列腺癌的发生中起作用. SHP1 的缺失和白血病以及淋巴瘤的发生紧密相关. 抗 SHP1 抑制剂的研制为治疗前列腺和白血病的靶向治疗提供了新的手段^[15]. 化合物 **2** 和 **4** 合成路线见 Scheme 1.

1 结果与讨论

1.1 合成

1.1.1 原料化合物的合成

5-芳基-3*a*,6*a*-二氢-4,6-二氧化氮杂茂并[3',4'-*d*]-异噁唑-3-甲酸乙酯衍生物 **1a~1g** 和 5-芳基-3*a*,6*a*-二氢-



Ar=C₆H₅ (**a**), *p*-CH₃C₆H₄ (**b**), *p*-CH₃OC₆H₄ (**c**), *p*-ClC₆H₄ (**d**), *p*-NO₂C₆H₄ (**e**), *p*-CO₂HC₆H₄ (**f**), *p*-BrC₆H₄ (**g**)

图式 1 目标化合物的合成

Scheme 1 Synthetic route of the target compounds

4,6-二氧化氮杂茂并[3',4'-*d*]-异噁唑-3-甲酸衍生物 **3a~3g** 参照文献[16], 在三乙胺的作用下, 分别以 *a*-氯代肟基乙酸乙酯和 *a*-氯代肟基乙酸产生的氧化腈为偶极体, *N*-芳基马来酰亚胺为亲偶极体, 通过 1,3-偶极环加成反应获得, 并对上述化合物 Cdc25B 磷酸酯酶的抑制活性和人白血病细胞生长的抑制活性进行了体外抗癌活性筛选.

1.1.2 目标化合物的合成

以反应的经济性出发, 根据异噁唑啉的弱碱性和 *N*-亲核性, 将廉价并对环境友好的(CH₃)₂SO₄ 作为稠杂异噁唑啉的 *N*-甲基化试剂, 得到的 *N*-甲基异噁唑啉甲硫酸盐在盐酸中用阴离子交换试剂 FeCl₃•6H₂O 处理, 转化为 *N*-甲基异噁唑四氯化铁酸盐衍生物 **2** 和 **4**. 化合物 **2a~2g** 的反应结果显示, 芳环上含溴原子的异噁唑啉盐较含氯原子的异噁唑啉盐产率略高. 芳环上带有推电子基团的甲基异噁唑啉盐中, 产率 *p*-CH₃OC₆H₄>*p*-CH₃C₆H₄>C₆H₅, *p*-BrC₆H₄>*p*-ClC₆H₄, 芳环上连有 NO₂, CO₂H 等吸电子基团的异噁唑啉盐与其它异噁唑啉盐相比, 其溶解性都很低, 这是由于 NO₂, CO₂H 等基团的极性导致整个分子的极性的增高, 从而降低了溶解性. 基团体积大小也会影响反应时间和产率, 如 *p*-COOH, *p*-NO₂ 等体积较大的基团的异噁唑啉的 *N*-甲基化, 所需反应时间较长、产率也较低.

合成异噁唑盐衍生物 **4a~4g** 的反应结果显示, 芳环无取代的异噁唑啉比芳环取代的异噁唑啉产率低. 芳环上连有强吸电子基团 NO₂ 的异噁唑啉盐产率不仅小于芳环上连有推电子基团的异噁唑啉盐, 而且还小于带吸电子基团 CO₂H 的异噁唑啉盐; 芳环上连有 NO₂, CO₂H 等吸电子基团的异噁唑啉在弱极性溶剂(如 CHCl₃)中的溶解性比其它异噁唑啉都差. 是因 NO₂, CO₂H 这一类的基团的极性导致整个分子的极性的增

高, 从而降低了溶解性。由于异噁唑啉和异噁唑啉盐的极性差异大, 有利于产物的分离和纯化。

1.2 波谱数据分析

通过光谱数据对以上化合物的结构进行了表征, 在 ^1H NMR 谱中, 化合物 **2a~2g** 在 δ 4.28~4.92 和 1.29~1.37 处分别出现了酯基中亚甲基和甲基的峰, 偶合常数分别为 6.4~7.2 和 6.8~7.2 Hz 之间; 在 δ 3.06~3.25 处出现 NCH_3 上质子的核磁信号; 在 δ 5.31~6.77 和 4.03~4.83 处出现了由桥头 $6a$ -H 和 $3a$ -H 的相互偶合而产生的两个双重峰, 偶合常数分别为 6.8~10.0 和 6.0~8.6 Hz 之间; 在 δ 6.96~8.40 处出现芳环的吸收峰, 化合物 **2f** 羧基中的质子的化学位移值在 δ 10.52 处。由于芳环上羧基的存在, 化合物 **2f** 中 NCH_3 质子的化学位移在 δ 3.25 处出现。由于分子中 X, NO_2 , CO_2H 和酯基等较强吸电子基团的存在, 双杂环骈合环系中桥头 $6a$ -H 和 $3a$ -H 的化学位移较 **2a** 中稍向低场位移, 移动范围分别为 δ 0.07~1.35 和 0.34~0.80, 当芳环上连有 NO_2 时两个桥头氢的位置显著地向低场移动。在 IR 谱中, 化合物 **2a~2g** 中 O—N 键的特征吸收峰分别出现在 637~769 和 1375~1395 cm^{-1} , Ar—O—C 键的特征吸收峰出现在 1057~1290 cm^{-1} , 苯环的骨架吸收峰出现在 1443~1499 cm^{-1} , $\nu_{\text{C}=\text{N}^+}$ 的吸收峰出现在 1609~1638 cm^{-1} , 酰胺的 $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ 的伸缩振动出现在 1713~1721 cm^{-1} , 芳氢的吸收峰出现在 3038~3100 cm^{-1} , 饱和碳氢的伸缩振动出现在 2834~2961 cm^{-1} 。化合物 **2f** 羧基中羟基的宽吸收峰在 3482 cm^{-1} 。

在 ^1H NMR 谱中, 化合物 **4a~4g** 分别在 δ 3.69~4.86 和 3.39~4.28 处出现了由桥头 $6a$ -H 和 $3a$ -H 的相互偶合而产生的两个双重峰, 偶合常数分别为 6.4~8.4 和 2.4~13.6 Hz 之间, 在 δ 6.83~8.38 处出现芳环的吸收峰, 羧基中的质子的吸收峰在 δ 13.2~9.92 处出现, 化合物 **4f** 羧基中的质子的化学位移值在 δ 13.2 处出现, 在 δ 3.23~3.24 处出现 NCH_3 上氢的核磁共振信号。由于分子中 X, NO_2 , CO_2H 和酯基等较强吸电子基团的存在, 双杂环骈合环系中桥头 $6a$ -H 的位置比 **4a** 稍微向低场移, 移动范围为 δ 0.04~0.51, $3a$ -H 的位置稍微地向高场移动 δ 0.06~0.12, 当芳环上连有 CO_2H 时两个桥头氢的位置稍微地向高场移动。在 IR 谱中, 化合物 **4a~4g** 中 O—N 键的特征吸收峰分别在 638~773 cm^{-1} 和 1380~1396 cm^{-1} 范围内, 在 1450~1599 cm^{-1} 范围内出现了苯环的骨架振动吸收峰, 在 1536~1613 cm^{-1} 范围内出现了 $\nu_{\text{C}=\text{N}}$ 的吸收峰, 在 1063~1303 cm^{-1} 范围内出现了 $\nu_{\text{O}-\text{C}}$ 的伸缩振动, 在 1013~1036 cm^{-1} 范围内出现了 $\nu_{\text{N}-\text{C}}$ 的伸缩振动, 在 1709~1718 cm^{-1} 范围内出现了酰胺的 $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ 的伸缩振动, 在 1780~1825 cm^{-1} 范围内出现了

了羧基的 $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ 的伸缩振动, 在 3067~3108 cm^{-1} 范围内出现了芳氢的吸收峰, 在 2839~2961 cm^{-1} 范围内出现了饱和碳氢的吸收峰, 在 3339~3484 cm^{-1} 范围内出现了羧基中 $\nu_{\text{O}-\text{H}}$ 的吸收峰。

1.3 实验材料和方法

化合物 **2a~2g** 和 **4a~4g** 对 Cdc25B 和 SHP1 酶活性的抑制率参照文献[13], 采用实验材料和方法, 按照公式(1)和(2)进行计算。

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{\nu_{\text{DMSO}} - \nu_{\text{Sample}}}{\nu_{\text{DMSO}}} \times 100\% \quad (1)$$

ν_{Sample} 表示加药组的初速度, ν_{DMSO} 表示 DMSO 组(即不加药组)的初速度。

$$\text{Inhibition (\%)} = \text{Bottom} + \frac{\text{Top} - \text{Bottom}}{1 + 10^{(\log IC_{50} - X)h}} \quad (2)$$

h 代表 Hill 系数。

SHP1 可以影响生长激素抑制素(SS)在前列腺的作用。这种酶在前列腺细胞的增殖和前列腺癌的发生中起作用。因此它的存在可以决定了 SS 作为潜在的治疗前列腺的方法。有研究发现 SHP1 的缺失和白血病以及淋巴瘤的发生紧密相关。SHP1 过表达导致细胞中磷蛋白间变性淋巴瘤激酶的磷酸化降低, 同时减少了细胞增殖和癌细胞的发生, SHP1 可能是间变性大细胞淋巴瘤(ki-1 淋巴瘤)生物学中一个重要的酶, 也是一个潜在的治疗靶点。通过小干扰 RNA(siRNA)技术可以明显的减少心肌梗塞的体积。通过 SHP1 可以与细胞因子受体连接, 使 Jak 去磷酸化, SHP1 结构域缺陷的小鼠, 各类血细胞异常。说明胞质酪氨酸磷酸酶与血细胞分化有关。

1.4 生物活性和构效关系

国家新药筛选中心对化合物 **2** 和 **4** 分别进行了体外 Cdc25B 磷酸酯酶抑制活性筛选和 SHP1 抑制活性筛选, 测试数据见表 1。从表 1 中可以看出, 正钒酸钠(Na_3VO_4)是蛋白酪氨酸磷酸酶的广谱抑制剂, 以它作为阳性对照, 分别进行了化合物 **2** 和 **4** 对 Cdc25B 磷酸酯酶和 SHP1 活性抑制试验。当样品浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 被筛选的化合物 **2a~2g** 和 **4a~4g** 对 Cdc25B 磷酸酯酶活性的抑制率分别为 97.32%~99.94% 和 97.45%~99.92%。化合物 **2** 和 **4** 对 SHP1 活性均有一定的抑制作用, 其抑制率分别为 52.18%~97.15% 和 15.21%~99.45%。根据初步体外抗癌和抗前列腺疾病活性测试结果, 可得出化合物 **2a~2g** 中, 一个较强吸电子性基团 NO_2 若在苯环上时, 衍生物对 Cdc25B 和 SHP1 的抑制作用小于其他对位取代衍生物; 同一个模型的测试中较强供电子基团如 CH_3 或 Br 在苯环时, 衍生物对 Cdc25B 或对 SHP1 的抑制活性最大。化合物 **4a~4g** 中, 同一个模型的测试中

表 1 化合物 2 和 4 对 Cdc25B 磷酸酯酶和 SHP-1 抑制率^a
Table 1 Inhibition rate of target compounds 2 and 4 against Cdc25B phosphatase and SHP-1

Compound	Inhibition rate/%		Compound	Inhibition rate/%	
	Cdc25B	SHP-1		Cdc25B	SHP-1
2a	99.857	55.88	4a	99.436	47.11
2b	99.942	75.72	4b	97.451	15.21
2c	99.918	90.36	4c	99.924	29.52
2d	99.832	71.66	4d	99.194	99.45
2e	97.316	52.18	4e	99.844	98.97
2f	99.935	88.91	4f	99.917	99.21
2g	98.591	97.15	4g	99.872	83.66

^a 阳性对照物为正钒酸钠(Na₃VO₄), 其 IC₅₀ 分别为(1.86±0.16)和(14.16±1.32) μmol/mL. 化合物 2a~2g 和 4a~4g 抑制 Cdc25B 磷酸酯酶和 SHP-1 的浓度均为 20 μg/mL.

较强供电子基团如 OCH₃ 或 Cl 在苯环时, 衍生物对 Cdc25B 或对 SHP1 的抑制活性最大.

曾经对原料化合物 1 和 3 分别进行了体外 Cdc25A 磷酸酯酶抑制活性筛选和体外人白血病细胞株(HL-60) 抑制活性筛选. 化合物 1a, 1d, 1e 和化合物 3d, 3e 对 Cdc25A 磷酸酯酶具有不同程度的抑制作用: 当质量浓度为 20 μg/mL 时, 化合物 1a, 1d 和 1e 的抑制率分别为 18.92%, 22.49% 和 56.43%, 化合物 3d, 3e 的抑制率分别为 61.47%, 66.23%.

研究结果表明 Cdc25 的基因产物 Cdc25 磷酸酯是一种双特异性酪氨酸磷酸酯酶, 有 Cdc25A, Cdc25B 和 Cdc25C 等 3 种同源物, 在氨基酸序列水平上大约有 50% 的同源性, 最高的同源性在它们的催化区域内. Cdc25A 和 Cdc25B 在多种癌症中过表达, 但 Cdc25C 与癌症发生的相关性不大^[17]. 由此, 对目标化合物 2 和 4 进行了 Cdc25B 磷酸酯酶系抑制活性进行筛选, 测试结果与原料化合物 1 和 3 比较并提出了初步的结论. 结果表明, 同样的测试条件下, 即当样品浓度为 20 μg/mL 时, 在化合物 1a~1g 中, 除 1e 对 Cdc25A 磷酸酯酶活性的抑制率为 56.43% 外, 其余化合物对 Cdc25A 磷酸酯酶活性的抑制率都小于 50%. 化合物 2a~2g 对 Cdc25B 磷酸酯酶活性的抑制效果普遍大于其化合物 1a~1g. 化合物 4a~4g 对 Cdc25B 磷酸酯酶活性的抑制率在 97.45%~99.92% 之间, 大于其原料化合物 3a~3g, 这是由于异噁唑环中的 N 原子被甲基化后, 异噁唑环的电子密度下降, 正电荷分散, 有利于分子稳定性的提高, 并且异噁唑盐分子中正电荷中心与阴离子间的静电作用增强了整个分子的极性. 另外, 稠杂异噁唑环上的羧基、酯基等亲水性基团具有较强的氢键性, 有利于异噁唑盐分子与 Cdc25B 磷酸酯酶和 SHP1 活性结构域的作用.

2 结论

本文以廉价、环境友好的硫酸二甲酯作为异噁唑啉

的 N-甲基化试剂, 并在盐酸中三氯化铁作为阴离子交换试剂, 合成了 14 个分别含有羧基、酯基的 N-甲基异噁唑四氯化铁酸盐衍生物 2a~2g 和 4a~4g, 其合成操作简便、试剂廉价、环境友好、易处理等特点. 所合成的目标化合物中除了 4a~4c 对前列腺疾病低活性外, 其余化合物显示了较强的体外抗癌和抗前列腺疾病活性, 通过比较得知异噁唑啉盐对 Cdc25B 磷酸酯酶活性的抑制效果普遍大于其相应的原料化合物异噁唑啉.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

熔点仪用 X-6 精密显微熔点测定仪(温度计未经校正); BRUKER EQUINOX55 型红外光谱仪(KBr 压片); Varian Inova-400 型核磁共振谱仪(TMS 为内标, DMSO-d₆ 为溶剂); Perkin-Elmer 2400CHN 型元素分析仪. TLC: 薄层板用青岛海洋化工厂生产的硅胶 GF₂₅₄ 加 0.5% CMC 自制, 凉干后不经活化直接使用, 于紫外灯下观察. 柱层析硅胶 100~200 目, 展开剂 V(二氯甲烷): V(甲醇)=8:2. 5-芳基-3a,6a-二氢-4,6-二氧代氮杂茂并[3',4'-d]-异噁唑-3-甲酸乙酯衍生物 1a~1g 和 5-芳基-3a,6a-二氢-4,6-二氧代氮杂茂并[3',4'-d]-异噁唑-3-甲酸衍生物 3a~3g 参照文献[16]方法制备; 硫酸二甲酯用前重蒸处理, 其它试剂及溶剂均为市售分析纯.

3.2 2-甲基-3-乙氧基羰基-5-芳基-3a,6a-二氢-4,6-二氧代氮杂茂并[3',4'-d]-异噁唑四氯化铁酸盐衍生物 2a~2g 的合成

在 50 mL 圆底烧瓶中加入 3.04 mmol 5-芳基-3a,6a-二氢-4,6-二氧代氮杂茂并[3',4'-d]-异噁唑-3-甲酸乙酯衍生物 1a~1g, 7.60 mmol 硫酸二甲酯和 2~5 mL 的 CHCl₃(或 DMF), 在温度 100~102 °C 条件下搅拌 24~29 h. 用薄层色谱[展开剂为 V(二氯甲烷): V(甲醇)=4:1]监测反应. 反应完毕后, 蒸除 CHCl₃ 后, 依次加 6~12 equiv. 1 mol·L⁻¹ HCl 和 4.56 mmol FeCl₃·6H₂O. 剧烈振荡 5 min, 静置过夜, 移去水层, 固体用 H₂O 洗到

滤液至中性，晾干，烘干，粗产物用少量 CH_2Cl_2 溶解，硅胶柱层析纯化，洗脱剂为 $V(\text{CH}_2\text{Cl}_2) : V(\text{CH}_3\text{OH}) = 4 : 1$ ，收集 R_f 为 0.56~0.70 的组分，浓缩得纯化合物 **2a~2g**。

2-甲基-3-乙氧基羰基-5-苯基-3a,6a-二氢-4,6-二氧代氮杂茂并[3',4'-d]异噁唑四氯化铁酸盐(2a): 浅棕红色固体，产率 31%。m.p. 167~168 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.50~6.99 (m, 5H, ArH), 5.42 (d, $J=7.6$ Hz, 1H, 6a-H), 4.46 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 4.03 (d, $J_{3a,6a}=6.4$ Hz, 1H, 3a-H), 1.33 (t, $J=6.8$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 2.97 (s, 3H, NCH₃); IR (KBr) ν : 3093, 2935, 1717, 1682, 1598, 1505, 1384, 1179, 1112, 750, 688, 650 cm^{-1} . Anal. calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_7\text{FeCl}_4$: C 35.96, H 3.02, N 5.59; found C 36.07, H 3.17, N 5.67.

2-甲基-3-乙氧基羰基-5-对甲苯基-3a,6a-二氢-4,6-二氧代氮杂茂并[3',4'-d]异噁唑四氯化铁酸盐(2b): 棕色固体，产率 52%。m.p. 118~119 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.95~6.96 (m, 4H, ArH), 5.46 (d, $J=7.0$ Hz, 1H, 1H, 6a-H), 4.30 (q, $J=7.4$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 4.06 (d, $J_{3a,6a}=7.2$ Hz, 1H, 3a-H), 3.06~3.16 (m, 6H, ArCH₃ and NCH₃), 1.37 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH_2CH_3); IR (KBr) ν : 3038, 2957, 1715, 1514, 1447, 1391, 1204, 1057, 762, 665 cm^{-1} . Anal. calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_5\text{FeCl}_4$: C 37.32, H 3.33, N 5.44; found C 37.59, H 3.45, N 5.48.

2-甲基-3-乙氧基羰基-5-对甲氧基苯基-3a,6a-二氢-4,6-二氧代氮杂茂并[3',4'-d]异噁唑四氯化铁酸盐(2c): 浅棕黄色固体，产率 62%。m.p. 137~138 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.95~6.90 (m, 4H, ArH), 5.31 (d, $J_{6a,3a}=6.8$ Hz, 1H, 6a-H), 4.28 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 4.05 (d, $J_{3a,6a}=7.6$ Hz, 1H, 3a-H), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 3.06 (s, 3H, NCH₃), 1.29 (t, $J=7.6$ Hz, 3H, CH_2CH_3); IR (KBr) ν : 3081, 2959, 2841, 1783, 1713, 1609, 1514, 1443, 1395, 1254, 1199, 1060, 761, 665 cm^{-1} . Anal. calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_6\text{FeCl}_4$: C 36.19, H 3.23, N 5.28; found C 36.43, H 3.16, N 5.50.

2-甲基-3-乙氧基羰基-5-对氯苯基-3a,6a-二氢-4,6-二氧代氮杂茂并[3',4'-d]异噁唑四氯化铁酸盐(2d): 棕黄色固体，产率 56%。m.p. 74~75 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.32~6.96 (m, 4H, ArH), 5.79 (d, $J_{6a,3a}=10.0$ Hz, 1H, 6a-H), 4.92 (d, $J_{6a,3a}=10.0$ Hz, 1H, 3a-H), 4.37 (q, $J=6.8$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 1.32 (t, $J=6.8$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 3.17 (s, 3H, NCH₃); IR (KBr) ν : 3100, 2961, 1721, 1598, 1539, 1494, 1389, 1201, 1090, 761, 687 cm^{-1} . Anal. calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5\text{FeCl}_5$: C 33.65, H 2.64, N 5.23; found C 33.46, H 2.67, N 5.31.

2-甲基-3-乙氧基羰基-5-对硝基苯基-3a,6a-二氢-4,6-二氧代氮杂茂并[3',4'-d]异噁唑四氯化铁酸盐(2e): 反应溶剂为 DMF, 棕黄色固体, 产率 29%。m.p. 151~152 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.40~7.62 (m, 4H, ArH), 6.77 (d, $J_{6a,3a}=9.6$ Hz, 1H, 6a-H), 4.33 (q, $J=6.8$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 4.73 (d, $J_{3a,6a}=8.6$ Hz, 3a-H), 1.37 (t, $J=6.8$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 2.12 (s, 3H, NCH₃); IR (KBr) ν : 3093, 2935, 1717, 1682, 1598, 1505, 1384, 1179, 1112, 750, 688, 650 cm^{-1} . Anal. calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_7\text{FeCl}_4$: C 33.00, H 2.58, N 7.70; found C 33.11, H 2.66, N 7.91.

2-甲基-3-乙氧基羰基-5-对羧基苯基-3a,6a-二氢-4,6-二氧代氮杂茂并[3',4'-d]异噁唑四氯化铁酸盐(2f): 反应溶剂为 DMF, 淡黄色固体, 产率 43%。m.p. 200~201 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.52 (bs, 1H, CO₂H), 8.10~7.13 (m, 4H, ArH), 4.76 (d, $J_{6a,3a}=9.2$ Hz, 1H, 6a-H), 4.34 (q, $J=6.4$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 3.89 (d, $J_{3a,6a}=10.4$ Hz, 1H, 3a-H), 1.32 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 3.25 (s, 3H, NCH₃); IR (KBr) ν : 3482, 3040, 2957, 1717, 1607, 1512, 1437, 1382, 1284, 1181, 1019, 769, 699, 637 cm^{-1} . Anal. calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_7\text{FeCl}_4$: C 35.26, H 2.77, N 5.14; found C 35.33, H 2.90, N 5.35.

2-甲基-3-乙氧基羰基-5-对溴苯基-3a,6a-二氢-4,6-二氧代氮杂茂并[3',4'-d]异噁唑四氯化铁酸盐(2g): 棕红色固体, 产率 57%。m.p. 143~144 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.32~6.96 (m, 4H, ArH), 6.30 (d, $J_{6a,3a}=8.2$ Hz, 1H, 6a-H), 4.92 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 4.01 (d, $J_{3a,6a}=6.8$ Hz, 1H, 3a-H), 1.32 (t, $J=6.8$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 3.17 (s, 3H, NCH₃); IR (KBr) ν : 3096, 2957, 1719, 1541, 1491, 1387, 1208, 1095, 1070, 768, 664 cm^{-1} . Anal. calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5\text{BrFeCl}_4$: C 31.07, H 2.43, N 4.83; found C 31.21, H 2.53, N 4.94.

3.3 2-甲基-3-羧基-5-芳基-3a,6a-二氢-4,6-二氧代氮杂茂并[3',4'-d]异噁唑四氯化铁酸盐衍生物 4a~4g 的合成

在 50 mL 圆底烧瓶中加入 2.47 mmol 2-甲基-5-芳基-3a,6a-二氢-4,6-二氧代氮杂茂并[3',4'-d]异噁唑-3-甲酸衍生物 **3a~3g**, 6.18 mmol (2.5 equiv.) 硫酸二甲酯和 2~5 mL 的 CHCl₃, 在 100~102 °C 下搅拌 23~27 h. 用薄层色谱[展开剂为: $V(\text{二氯甲烷}) : V(\text{甲醇}) = 9.2 : 0.8$] 鉴测反应. 反应完毕后, 蒸除 CHCl₃ 后, 依次加 6~12 equiv. 1 mol·L⁻¹ HCl 和 3.69 mmol FeCl₃·6H₂O. 静置过夜, 移去水层, 固体用 H₂O 洗到滤液至中性, 晾干, 烘干, 粗产物用少量 CH_2Cl_2 溶解, 硅胶柱层析纯化, 洗脱剂为 $V(\text{CH}_2\text{Cl}_2) : V(\text{CH}_3\text{OH}) = 9 : 1$, 收集 R_f 为 0.52~0.67 的组分, 浓缩得到化合物 **4a~4g**.

2-甲基-3-羧基-5-苯基-3a,6a-二氢-4,6-二氧代氮杂茂并[3',4'-d]异噁唑四氯化铁酸盐(**4a**)：棕黄色固体，产率 44%。m.p. 113~114 °C；¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 10.32 (bs, 1H, CO₂H), 7.53~6.98 (m, 5H, ArH), 4.35 (d, J_{6a,3a}=6.4 Hz, 1H, 6a-H), 4.02 (d, J_{3a,6a}=7.6 Hz, 1H, 3a-H), 3.23 (s, 3H, NCH₃)；IR (KBr) v: 3470, 3067, 2953, 1780, 1714, 1597, 1499(s), 1457, 1386, 1290, 1190, 1072, 1028, 759, 697 cm⁻¹。Anal. calcd for C₁₃H₁₁N₂O₅FeCl₄: C 30.15, H 1.95, N 8.11; found C 30.5, H 1.67, N 8.18。

2-甲基-3-羧基-5-对甲苯基-3a,6a-二氢-4,6-二氧代氮杂茂并[3',4'-d]异噁唑四氯化铁酸盐(**4b**)：棕红色固体，产率 49%。m.p. 141~142 °C；¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 10.48 (bs, 1H, CO₂H), 7.29~7.16 (m, 4H, ArH), 3.69 (d, J_{6a,3a}=8.4 Hz, 1H, 6a-H), 3.38~3.40 (m, 1H, 3a-H), 3.23 (s, 3H, NCH₃)；IR (KBr) v: 3455, 3093, 2925, 2885, 1825, 1709, 1586, 1518, 1450, 1391, 1287, 1179, 1075, 1036, 766, 710, 685 cm⁻¹。Anal. calcd for C₁₄H₁₃N₂O₅FeCl₄: C 34.53, H 2.69, N 5.75; found C 34.07, H 2.43, N 5.93。

2-甲基-3-羧基-5-对甲氧基苯基-3a,6a-二氢-4,6-二氧代氮杂茂并[3',4'-d]异噁唑四氯化铁酸盐(**4c**)：棕黄色固体，产率 67%。m.p. 110~111 °C；¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 9.92 (bs, 1H, CO₂H), 7.42~6.89 (m, 4H, ArH), 4.55 (d, J_{6a,3a}=7.2 Hz, 1H, 6a-H), 4.03 (d, J_{3a,6a}=2.4 Hz, 1H, 3a-H), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 3.24 (s, 3H, NCH₃)；IR (KBr) v: 3468, 3081, 2959, 2839, 1782, 1713, 1609, 1514, 1443, 1395, 1254, 1199, 1060, 721, 665 cm⁻¹。Anal. calcd for C₁₄H₁₃N₂O₆FeCl₄: C 33.43, H 2.61, N 5.57; found C 33.11, H 2.83, N 5.78。

2-甲基-3-羧基-5-对氯苯基-3a,6a-二氢-4,6-二氧代氮杂茂并[3',4'-d]异噁唑四氯化铁酸盐(**4d**)：棕黄色固体，产率 55%。m.p. 57~58 °C；¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 10.7 (s, 1H, CO₂H), 7.59~7.36 (m, 4H, ArH), 4.39 (d, J_{6a,3a}=6.4 Hz, 1H, 6a-H), 4.13 (d, J_{3a,6a}=7.2 Hz, 1H, 3a-H), 3.23 (s, 3H, NCH₃)；IR (KBr) v: 3462, 2955, 2855, 1782, 1714, 1540, 1494, 1456, 1398, 1229, 1090, 1066, 1008, 773, 652 cm⁻¹。Anal. calcd for C₁₃H₁₀N₂O₅FeCl₅: C 30.78, H 1.99, N 5.52; found C 30.33, H 2.21, N 5.68。

2-甲基-3-羧基-5-对硝基苯基-3a,6a-二氢-4,6-二氧代氮杂茂并[3',4'-d]异噁唑四氯化铁酸盐(**4e**)：棕黑色固体，产率 45%。m.p. 233~234 °C；¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 10.57 (bs, 1H, CO₂H), 8.38~7.63 (m, 4H, ArH), 4.80~4.82 (m, 1H, 6a-H), 4.02 (d, J_{3a,6a}=6.4 Hz,

1H, 3a-H), 3.24 (s, 3H, NCH₃)；IR (KBr) v: 3484, 3086, 2923, 2852, 1781, 1718, 1613, 1597, 1497, 1380, 1344, 1257, 1177, 1110, 1014, 701, 689 cm⁻¹。Anal. calcd for C₁₃H₁₀N₂O₇FeCl₄: C 30.15, H 1.95, N 8.11; found C 30.5, H 1.67, N 8.18。

2-甲基-3-羧基-5-对羧基苯基-3a,6a-二氢-4,6-二氧代氮杂茂并[3',4'-d]异噁唑四氯化铁酸盐(**4f**)：橙红色固体，产率 62%。m.p. 195~196 °C；¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 13.2 (bs, 1H, CO₂H), 8.11~7.14 (m, 4H, ArH), 4.85~4.87 (m, 1H, 6a-H), 3.90 (d, J_{3a,6a}=13.6 Hz, 1H, 3a-H), 3.23 (s, 3H, NCH₃)；IR (KBr) v: 3476, 3102, 2958, 1781, 1712, 1603, 1514, 1420, 1383, 1289, 1175, 1063, 1033, 701, 638 cm⁻¹。Anal. calcd for C₁₄H₁₁N₂O₇FeCl₄: C 32.53, H 2.14, N 5.42; found C 33.81, H 2.56, N 5.54。

2-甲基-3-羧基-5-对溴苯基-3a,6a-二氢-4,6-二氧代氮杂茂并[3',4'-d]异噁唑四氯化铁酸盐(**4g**)：浅黄色固体，产率 67%。m.p. 222~223 °C；¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 10.5 (s, 1H, CO₂H), 7.70~7.24 (m, 4H, ArH), 4.71 (d, J_{6a,3a}=7.6 Hz, 1H, 6a-H), 3.96 (d, J_{3a,6a}=7.2 Hz, 1H, 3a-H), 3.23 (s, 3H, NCH₃)；IR (KBr) v: 3339, 3096, 2923, 2852, 1782, 1712, 1536, 1491, 1387, 1303, 1276, 1184, 1070, 1012, 719, 646 cm⁻¹。Anal. calcd for C₁₃H₁₀N₂O₅BrFeCl₄: C 28.30, H 1.83, N 5.08; found C 28.74, H 1.95, N 5.31。

致谢 本工作中化合物的体外抗肿瘤活性，与前列腺细胞增殖及前列腺癌有关的 SHP1 酶的抑制活性测试由国家新药筛选中心完成。

辅助材料(Supporting Information) 目标化合物 **2a~2g** 和 **4a~4g** 的 ¹H NMR 和 IR 原始图谱。这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载。

References

- [1] Jäger, V.; Colinas, P. A. In *Synthetic Applications of 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry toward Heterocycles and Natural Products*, Vol. 59, Eds.: Padwa, A.; Pearson, W. H., John Wiley & Sons, Inc., New York, **2002**, pp. 361~472.
- [2] Jaeger, V.; Grund, H.; Buss, W. *Bull. Soc. Chem. Belg.* **1983**, 92, 1039.
- [3] Henneböhl, M.; LeRoy, P. Y.; Jäger, V. *Z. Naturforsch.* **2004**, 59B, 451.
- [4] Frey, W.; Imerhasan, M.; Bathich, Y.; Jäger, V. *Z. Kristallogr.-New Cryst. Struct.* **2005**, 220, 151.
- [5] Bathich, Y.; Imerhasan, M.; Jäger, V. *The 6th Imminiumsalz-Tagung (ImSaT-6)*, Stimpfach-Rechenberg, Germany, **2003**, pp. 99~107.
- [6] Bathich, Y.; Henneböhl, M.; LeRoy, P. Y.; Imerhasan, M.; Jäger, V. *Organische Chemie*, Bad Nauheim, Germany, **2004**, pp. 220~227.

- [7] Frey, W.; Henneböhle, M.; Jäger, V. Z. *Kristallogr.-New Cryst. Struct.* **2005**, 220, 149.
- [8] Jäger, V.; Bathich, Y.; Shiva, S.; Li, F.; Ibrahim, M.; Henneböhle, M.; LeRoy, P. Y.; Imerhasan, M. *2nd International Conference on Heterocyclic Chemistry*, University of Rajasthan, Jaipur India, **2006**, pp. 1~15.
- [9] Llamas, K.; Owens, M.; Blakeley, R. L.; Zerner, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 5543.
- [10] Kohler, E. P.; Blatt, A. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1928**, 50, 1217.
- [11] Kohler, E. P.; Bruce, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1931**, 53, 644.
- [12] Bodlaender, P.; Feinstein, G.; Shaw, E. *Biochemistry* **1969**, 8, 4941.
- [13] Ali, T.; Imerhasan, M.; Hudabergen, A. *Chin. J. Org. Chem.* **2012**, 32, 376 (in Chinese).
(图尔麦麦提·艾力, 穆赫塔尔·伊米尔艾, 阿依努尔·胡达依别尔根, 有机化学, **2012**, 32, 376.)
- [14] Li, J.-M.; Wang, J.; Liu, H.; Guo, J.-W.; Zuo, L.-F. *Chin. J. Tumor* **2008**, 28, 586 (in Chinese).
(李金梅, 王静, 刘辉, 刘江惠, 郭建文, 左连富, 肿瘤, **2008**, 28, 586.)
- [15] Pagel, J. M.; Appelbaum, F. R.; Eary, J. F.; Rajendran, J.; Fisher, D. R.; Gooley, T.; Ruffner, K.; Nemecek, E.; Sick, E.; Durack, L.; Carreras, J.; Horowitz, M. M.; Press, O. W.; Gopal, A. K.; Martin, P. J.; Bernstein, I. D.; Matthews, D. C. *Blood* **2006**, 107, 2184.
- [16] Imerhasan, M.; Osman, K.; Muhammad, T.; Helil, S.; Haydar, G. *Chin. J. Appl. Chem.* **2008**, 25, 931 (in Chinese).
(穆赫塔尔·伊米尔艾山, 库尔班·吾斯曼, 吐尔洪·买买提, 萨提瓦尔迪·海力力, 古丽伯斯坦·阿依达尔, 应用化学, **2008**, 25, 931.)
- [17] Kristjansdottir, K.; Rudolph, J. *Chem. Biol.* **2004**, 11, 1043.

(Cheng, F.)