

含 1-[4-二(4-氟苯)甲基]哌嗪基团的异噁唑的设计合成及
抗肿瘤活性研究

丁 勇 李清寒* 赵志刚 杨学军 陈 峰

(西南民族大学化学与环境保护工程学院 成都 610041)

摘要 以 1-[二(4-氟苯)甲基]哌嗪、溴丙炔及氯代肟为原料以 21%~76% 的收率制得了 12 个含有 1-[4-二(4-氟苯)甲基]哌嗪单元的异噁唑衍生物 **5a~5l**。合成的 12 个目标化合物通过熔点测定和质谱、红外光谱、元素分析及核磁共振氢谱和碳谱分析对其结构进行确证。经体外抗肿瘤活性测试表明, 在 20 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度下, 有 10 个化合物对细胞周期分裂蛋白 25B (CDC25B) 具有较好的抑制活性, 其抑制率为 64.15%~97.96%, IC_{50} 为 35.62~13.67 $\mu\text{g/mL}$ 。在 40 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度下, 其中四个化合物对白血病 HL-60 细胞的 IC_{50} 为 36.51~15.25 $\mu\text{g/mL}$, 2-(2-氟苯基)-5-(1-(二(4-氟苯)甲基)哌嗪)甲基异噁唑 (**5g**), 2-(2-氟苯基)-5-(1-(二(4-氟苯)甲基)哌嗪)甲基异噁唑 (**5h**) 对肺癌 A-549 肿瘤细胞的 IC_{50} 分别为 21.09 和 35.36 $\mu\text{g/mL}$ 。

关键词 1-[二(4-氟苯)甲基]哌嗪; 异噁唑; 有机合成; 抗肿瘤活性

Design, Synthesis and Anti-tumor Activity Evaluation of a Novel Series of Isoxazoles Bearing (1-Bi(4-fluorophenyl)methyl)-piperazine Unit

Ding, Yong Li, Qinghan* Zhao, Zhigang Yang, Xuejun Chen, Feng

(College of Chemistry and Environmental Protection Engineering, Southwest Minzu University, Chengdu 610041)

Abstract Twelve novel isoxazoles containing (1-bi(4-fluorophenyl)methyl)piperazine unit were prepared in two steps starting from propargyl bromide, (1-bi(4-fluorophenyl)methyl)piperazine and hydroxymoyl chlorides with moderate yield (21%~76%). The structures of the new compounds were characterized by IR, MS, ^1H NMR, ^{13}C NMR and elemental analysis, and their *in vitro* anti-tumor activity was screened. The bioactive assay for the newly prepared compounds manifested that ten newly isoxazole derivatives exhibited good to excellent inhibitory activity against CDC25B in 20 $\mu\text{g/mL}$ with inhibition of 64.15%~95.87% and IC_{50} of 35.62~13.67 $\mu\text{g/mL}$. Four isoxazoles exhibited good to excellent inhibitory activity against Leukemia cell HL-60 in 40 $\mu\text{mol/L}$ (IC_{50} : 36.51~15.25 $\mu\text{g/mL}$), 2-(2-fluorophenyl)-5-(1-(bi(4-fluorophenyl)methyl)piperazine)methylisoxazole (**5g**) and 2-(4-fluorophenyl)-5-(1-(bi(4-fluorophenyl)methyl)piperazine)methylisoxazole (**5h**) exhibited good to excellent inhibitory activity against Lung cancer cell A-549 (IC_{50} value up to 21.09 and 35.36 $\mu\text{g/mL}$, respectively).

Keywords 1-[bi(4-fluorophenyl)methyl]piperazine; isoxazole; organic synthesis; anti-tumor activity

癌症是世界上危害人类健康最严重的疾病之一^[1,2]。根据国际癌症研究机构的报告, 从 1975 年到 2000 年, 全球癌症病例增加了一倍, 到 2020 年将再翻一番, 而到 2030 年全球癌症病例将增加近三倍^[3]。然而, 绝大多数临床药物用于肿瘤治疗的疗效表现不佳, 如具有高毒性、选择性低、耐药严重等缺点^[4]。因而, 对开发预防和

治疗恶性肿瘤的药物小分子仍然是人们热衷的研究课题。

异噁唑及其衍生物是一类非常重要的杂环化合物, 它们可作为具有强大的克隆人类多巴胺 D4 受体的选择性激动剂^[5], GABAA 拮抗剂^[6], 具有抑制 COX-2 的作用^[7,8]。同时, 他们还具有镇痛^[9]、抗炎、抗菌^[10,11]和抗

* Corresponding author. E-mail: lqhchem@163.com

Received July 2, 2017; revised August 19, 2017; published online September 15, 2017.

Project supported by the Sichuan Provincial Department of Science and Technology Support Program (No. 2015NZ0033).

四川省科技厅科技支撑计划(No. 2015NZ0033)资助项目。

癌^[12,13]等活性。因此, 新型异噁唑及衍生物的合成最近已经吸引了很多药物化学家的关注。目前人们已经认识到含氟药物对疾病的治疗效果要明显好于无氟的类似药物, 而含氟化合物的合成和生物活性研究已成为有机氟化学和药物化学的重要研究领域^[14~16]。而人们所熟知的 1-[二-(4-氟苯)甲基]哌嗪便是一种含氟的非常重要的药物中间体, 其许多衍生物均具有非常良好的抗肿瘤^[17,18]、钙拮抗剂^[19]、抗氧化和抗高血压^[20]的作用。

因此, 为了寻找一类新的、具有潜在抗肿瘤活性的含氟异噁唑小分子化合物, 鉴于不同活性的基团在同一分子中聚集能明显改善化合物的生物活性这一特性, 本工作在已有研究的基础上^[18,21~27], 应用药物设计中的活性亚结构拼接原理, 将 1-[(4-氟苯基)甲基]哌嗪结构单元引入异噁唑类化合物中, 合成一系列新型的含 1-[(4-氟苯基)甲基]哌嗪官能团的异噁唑衍生物, 以期实现活性的叠加, 这不仅具有一定学术价值, 同时也具有潜在的应用前景。而这方面的研究还未见文献报道。合成的目标化合物通过熔点测定和质谱、红外光谱、元素分析及核磁共振氢谱和碳谱分析对其结构进行确证, 合成路线见 Scheme 1。

1 结果与讨论

1.1 氯代肟对目标物制备的影响

3-[4-(二-(4-氟苯)甲基)哌嗪基]-1-丙炔与氯代肟的反应是一类典型的[3+2]环化反应。实验结果表明: 氯代肟的苯环上所连取代基的电性效应、空间效应均会影响目标产物 **5** 的收率, 当连有吸电子基团如 F, Br, 或是供电子基团如 CH₃, CH₃O 时, 不论取代基是在对位还是邻位, 环化反应均容易进行, 可以 43%~76% 的中等收率得到目标化合物 **5c**~**5d** 及 **5g**~**5i**(表 1, Entries 3~5, 7~9)。当硝基(NO₂)在苯环的间位时, 相应目标物的收率可达 47%(表 1, Entry 10), 然而当硝基在邻位时, 其对应目标物的收率只有 22%(表 1, Entry 11), 这可能是由于邻位硝基(NO₂)可以与氯代肟的羟基(-OH)形成氢键。不过可喜的是当使用脂肪醛形成的氯代肟进行环化

反应时, 能以 58% 的收率得到目标物 **5a**(表 1, Entry 1)。

1.2 目标化合物 **5** 的谱图分析

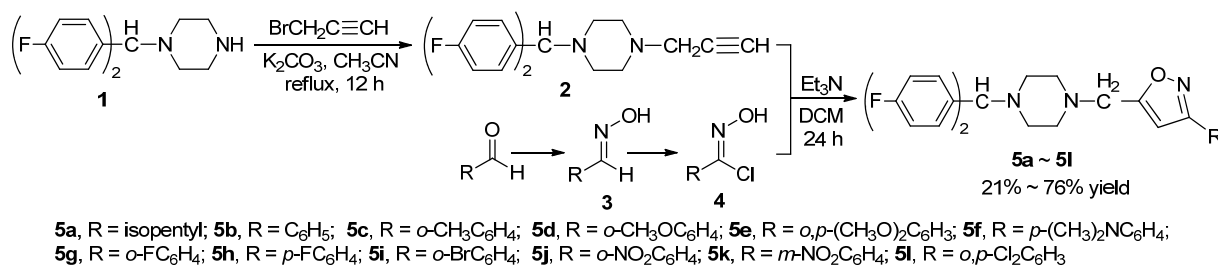
化合物 **5** 的 IR 谱图中, 在 2990~3200 cm⁻¹ 有强的吸收峰, 为苯环的 ν_{C-H} 的伸缩振动。在 1560~1410 cm⁻¹ 处的吸收峰为苯环的特征性红吸收峰。在 1160~1170 cm⁻¹ 处的吸收峰为 ν_{C-F} 的吸收峰。¹H NMR 谱图中, 在 δ 5.97~6.66 左右出现的单峰为目标化合物中异噁唑环上的 C=CH 氢质子的吸收峰, 在 δ 6.70~8.60 范围内的多重峰为芳环上的质子吸收峰。在 δ 4.19~4.27 左右出现的单峰为目标化合物中 Ar₂CH 上的氢的位移, 在 δ 2.40~2.47 和 δ 2.58~2.64 左右出现的宽而矮的峰为哌嗪环上 NCH₂CH₂NCH₂CH₂ 中氢的信号。¹³C NMR 谱图中, 在 δ 160.7 及 163.1 左右出现高度一致的相邻两单峰, 其偶合常数为 $J=244$ Hz, 为目标化合物 **5** 中苯环上与 F 原子相连的碳原子的信号峰。化合物的 MS 谱图中, 所得的目标化合物均给出分子离子峰和离子碎片峰, 与相应的分子式一致。因此, 化合物 **5** 为目标化合物。

1.3 目标化合物的抗肿瘤活性

CDC25B 是 CDC25 磷酸酯酶家族的一员, CDC25B 激活细胞周期蛋白依赖激酶 CDC2, 是有丝分裂必需的, CDC25B 在分裂的 M 和 G1 期存在于细胞核中, 而到 S 期和 G2 期转移到细胞质中, CDC25B 具有原癌基因性质, 通过初步测试化合物对细胞周期分裂蛋白 25B (CDC25B) 增殖的抑制率, 可寻找到特异高效的抑制剂对癌症研究提供新的工具和手段。因此, 抗肿瘤活性采用测试化合物对细胞周期分裂蛋白 25B (CDC25B) 增殖的抑制率进行初步评价, 然后再测试化合物对白血病 HL-60 及肺癌 A-549 肿瘤细胞的抑制率。

1.3.1 化合物对细胞周期分裂蛋白 25B (CDC25B) 增殖的抑制活性

其方法是: 采用荧光底物邻甲基荧光磷酸酯 (OMFP), 经 CDC25B 去磷酸化后得到的产物甲基荧光素(OMF)在被 485 nm 激发光激发后可发射出波长为 535 nm 的可检测的荧光信号, 从而观察酶的活性变化以及



图式 1 化合物 **5a**~**5l** 的合成路线
Scheme 1 Synthetic route of compounds **5a**~**5l**

表 1 异噁唑化合物 5a~5l 的合成^a

Table 1 Synthesis of isoxazoles 5a~5l

$ \begin{array}{c} \text{(F-C}_6\text{H}_4\text{)}_2\text{CH-N(CH}_2\text{)}_2\text{N-CH}_2\text{C}\equiv\text{CH} + \text{R-C(=O)Cl} \xrightarrow[\text{24 h}]{\text{Et}_3\text{N, DCM}} \text{(F-C}_6\text{H}_4\text{)}_2\text{CH-N(CH}_2\text{)}_2\text{N-CH}_2\text{-C}_5\text{H}_3\text{N}_2\text{-R} \\ \text{2} \qquad \qquad \qquad \text{4} \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \text{5a~5l} \end{array} $				
Entry	R	Product	5	Yield ^b /%
1			5a	58
2			5b	63
3			5c	58
4			5d	43
5			5e	53
6			5f	32
7			5g	76
8			5h	62
9			5i	52
10			5j	21
11			5k	47
12			5l	33

^a 1.0 mmol of 2, 1.0 mmol of 4, 1.1 mmol of NaN₃, 2 mL of DCM; ^b Isolated yield.化合物对其的抑制情况. 实验中 CDC25B 所采用的阳性 参照化合物为 Na₃VO₄, 阴性参照物为二甲基亚砜

(DMSO). 测试结果如表 2 所示, 除化合物 **5a**, **5e** 外, 化合物 **5b~5d** 以及 **5f~5l** 均显示出中等至优异的抑制 CDC25B 增殖的活性, 其抑制率为 64.15%~95.87%, IC_{50} 可达 13.67 $\mu\text{g/mL}$. 同时可以看出当苯环上连有供电子基和吸电子基时, 目标化合物都能表现出良好的对 CDC25B 增殖的抑制活性.

表 2 化合物 **5a~5l** 对 CDC25B 增殖的抑制活性^a

Table 2 Inhibition and IC_{50} of compounds **5a~5l** derivatives for CDC25B *in vitro*

Compd.	Inhibition/%	$IC_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
5a	48.27	—
5b	67.41	20.69
5c	83.74	16.91
5d	80.12	15.77
5e	28.80	—
5f	94.12	13.96
5g	70.94	16.68
5h	64.15	35.62
5i	94.06	17.10
5j	95.10	13.67
5k	86.53	17.19
5l	95.87	14.46
Na_3VO_4^b	100	0.33

^a CDC25B: cell division cycle 25 homolog B (S. pombe), 20 $\mu\text{g/mL}$. Inhibition > 50%, there are inhibitory effect. ^b Reference compound.

1.3.2 化合物对对白血病 HL-60 及肺癌 A-549 肿瘤细胞生长的抑制活性

在初步评价化合物对细胞周期分裂蛋白 25B (CDC25B)增殖的抑制率基础上, 我们采用[3-(4,5-二甲基吡啶-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑](MTS)法测试了化合物对白血病 HL-60 及肺癌 A-549 肿瘤细胞的抑制作用, 实验中所采用的阳性参照化合物为顺铂和紫杉醇, 阴性参照物为二甲基亚砜(DMSO). 首先将 **5b~5d** 和 **5f~5l** 共 10 种化合物配制成 $2\times\text{PPC}$ (血浆峰值浓度)的药物浓度, 各加入 100 μL 入 96 孔平底细胞培养板中(药物浓度为 $1\times\text{PPC}$), 每孔中再加入 100 μL 肿瘤细胞悬浮液(使细胞量为 $1\times 10^4/\text{孔}$), 每种药物均做复孔, 在 CO_2 培养箱内 37 $^\circ\text{C}$ 共同孵育 48 h 后中止培养, 加入 MTS/PMS(酚嗪硫酸甲酯)液 40 μL , 再继续孵育 4 h 后, 用酶联免疫检测仪在 490 nm 波长下进行 OD 比色, 根据公式: $\text{OD}(\text{对照}) - \text{OD}(\text{加药}) / \text{OD}(\text{对照}) \times 100\%$, 计算出每种化合物对肿瘤细胞的抑制率. 然后测试活性与剂量的依赖关系, 通过计算软件 Graphpad Prism 对二者进行非线性拟和得到半抑制浓度(IC_{50})值.

结果见表 3 所示, 在浓度为 40 $\mu\text{g/mL}$ 时, 化合物 **5b**, **5h**, **5j**, **5k** 对白血病 HL-60 肿瘤细胞生长均有抑制作用, 其中化合物 **5h** 的 IC_{50} 达 15.25 $\mu\text{g/mL}$, 不过均弱于对照药物顺铂和紫杉醇. 令人高兴的是化合物 **5g** 及 **5h**

对肺癌 A-549 肿瘤细胞生长也均有抑制作用, 其 IC_{50} 可达 21.09 $\mu\text{g/mL}$, 并且从 IC_{50} 的值可以看出, 化合物 **5g** 对肺癌 A-549 肿瘤细胞生长的抑制率比对照药物顺铂要好, 而且从总的结果也可初步看出, 当苯环的邻位或间位或对位上带有强吸电子基如 NO_2 、F 基团时, 有利于化合物对肿瘤细胞的抑制作用. 因此这类化合物值得进一步研究.

表 3 化合物 **5b~5d** 及 **5f~5l** 对白血病 HL-60 及肺癌 A-549 肿瘤细胞的抑制活性^a

Table 3 IC_{50} of compounds **5b~5d** and **5f~5l** for Leukemia cell HL-60 and Lung cancer cell A-549

Compd.	$IC_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	
	Leukemia cell HL-60	Lung cancer cell A-549
5b	22.90	>40
5c	>40	>40
5d	>40	>40
5f	>40	>40
5g	>40	21.09
5h	15.25	35.36
5i	>40	>40
5j	19.66	>40
5k	36.51	>40
5l	>40	>40
Cisplatin ^b	5.48	31.14
Paclitaxel ^b	<0.008	<0.008

^a Inhibition > 50%, there are inhibitory effect; ^b Standard drug.

2 结论

以 1-[二-(4-氟苯)甲基]哌嗪、3-溴丙炔和氯代脒为原料, 以二氯甲烷(DCM)作溶剂, Et_3N 为催化剂, 在室温经环化反应合成了 12 个新的含 1-[4-(二-(4-氟苯)甲基)哌嗪官能团的异噁唑类衍生物 **5a~5l**. 经体外生物活性测试表明, 在 20 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度下, 有 10 个化合物对 CDC25B 增殖具有抑制作用, 其抑制率可达 95.87%, IC_{50} 可达 13.67 $\mu\text{g/mL}$; 在 40 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度下, 化合物 **5b**, **5h**, **5j**, **5k** 对白血病 HL-60 及化合物 **5g**, **5h** 对肺癌 A-549 肿瘤细胞生长均具有较好的抑制作用, 其 IC_{50} 分别高达 15.25 及 21.09 $\mu\text{g/mL}$. 由于测试的模型有限, 尚需在今后的研究中进一步扩展模型进行抗肿瘤活性研究, 深入探讨其结构与生物活性之间的关系. 因此, 含 1-[4-(二-(4-氟苯)甲基)哌嗪官能团的异噁唑类衍生物可以作为抗肿瘤药物的先导分子进行进一步的研究.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

^1H NMR 由 Varian 400 MHz 核磁共振仪(Me_4Si 为内标, CDCl_3 为溶剂)测定; 化合物质谱分析由 Finnigan-MAT4510 型质谱仪测定(离子源为 ESI); PE-2400 型元素

分析仪; FT-IR169 型红外光谱仪(固体用 KBr 压片, 液体用液膜法); 薄层层析(TLC)硅胶板使用 GF-254 硅胶; 柱层析硅胶使用 200~400 目的中性硅胶; 中间体 **1** 按照文献[16]合成; 中间体 **3** 和 **4** 按照文献[28]合成; 其它所用试剂均为市售化学纯或分析纯, 除特别说明外, 未经进一步处理。

3.2 中间体 2 的合成

称取 2.88 g (10 mmol) 中间体 **1**、1.38 g (10 mmol) 碳酸钾、0.166 g (1 mmol) 碘化钾、0.86 mL (10 mmol) 3-溴丙炔加入到 100 mL 圆底烧瓶中, 加入 30 mL 乙腈, 回流反应 7 h, 冷却至室温, 过滤后旋干溶剂, 加水 20 mL, 乙酸乙酯萃取(100 mL×3), 合并有机相, 用无水硫酸钠干燥, 蒸去溶剂, 粗产品经 300~400 目硅胶柱层析提纯[洗脱剂: *V*(石油醚): *V*(乙酸乙酯)=4:1]得到中间体 3-(1-(4-二(4-氟苯基)甲基)哌嗪)丙炔(**2**), 棕色粘稠状固体, 收率 68%。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 7.34 (t, *J*=6.8 Hz, 4H, ArH), 6.96 (t, *J*=6.4 Hz, 4H, ArH), 4.22 (s, 1H, Ar₂C-H), 3.30 (d, *J*=2.4 Hz, 2H, CH₂), 2.59 (br, 4H, pip), 2.42 (br, 4H, pip), 2.30 (s, 1H, C≡C-H); IR (KBr) ν : 3011 (=C-H, Ar), 1610, 1517, 1451, 1425 (C=C, Ar), 1157 (C-F) cm⁻¹; ESI-MS *m/z*: 326.21 (M⁺).

3.3 目标化合物 5 的合成

称取中间体 **2** (1.0 mmol), 中间体 **4** (2.0 mmol), 加入 3 mL 的 DCM 和 0.3 mL 的 Et₃N (1.5 mmol), 在氩气下室温反应 24 h, 反应结束后, 有机层用饱和食盐水洗涤, 然后用乙酸乙酯萃取(15 mL×3), 再用饱和食盐水洗 2 次, 倒去水层, 收集有机层, 用无水硫酸钠干燥, 减压除去有机溶剂, 得到粗品, 然后经柱层析提纯, 得到相应的目标化合物 **5a**~**5l**, 收率 21%~76%。

3-异丁基-5-{1-[(4-二(4-氟苯基)甲基)哌嗪]甲基}异噁唑(**5a**): 油状液体, 收率 58%。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 7.29 (t, *J*=7.2 Hz, 4H, ArH), 6.90 (t, *J*=6.4 Hz, 4H, ArH), 5.97 (s, 1H, isoxazole), 4.19 (s, 1H, Ar₂CH), 3.62 (s, 2H, NCH₂), 2.51 (br, 4H, pip), 2.47 (br, 4H, pip), 2.49~2.46 (m, 2H, CH₂), 1.93~1.89 (m, 1H, Me₂C-H), 0.90 (d, *J*=6.4 Hz, 4H, ArH); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 168.6, 163.1, 161.8 (d, *J*=244 Hz), 138.1 (d, *J*=4 Hz), 129.1 (d, *J*=8 Hz), 115.3 (d, *J*=21 Hz), 103.4, 74.3, 53.1, 53.0, 51.5, 39.9, 28.0, 22.4; IR (KBr) ν : 2993 (=C-H, Ar), 2826 (C-H, CH₂), 1611, 1513, 1465, 1367 (C=C, Ar), 1228, 1158 (C-F) cm⁻¹; ESI-MS *m/z*: 426.22 (M⁺+1). Anal. calcd for C₂₅H₂₉F₂N₃O: C 70.57, H 6.87, N 9.88; found C 70.56, H 6.85, N 9.86.

3-苯基-5-{1-[(4-二(4-氟苯基)甲基)哌嗪]甲基}异噁唑(**5b**): 白色固体, 收率 63%。m.p. 105~107 °C; ¹H

NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 7.78 (q, *J*=8.0 Hz, 2H, ArH), 7.44~7.42 (m, 3H, ArH), 7.31 (q, *J*=7.2 Hz, 2H, ArH), 6.94 (t, *J*=6.4 Hz, 4H, ArH), 6.47 (s, 1H, isoxazole), 4.22 (s, 1H, Ar₂C-H), 3.75 (s, 2H, N-CH₂), 2.60 (br, 4H, pip), 2.41 (br, 4H, pip); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 169.7, 162.3, 161.8 (d, *J*=244 Hz), 138.1 (d, *J*=3 Hz), 130.0, 129.1 (t, *J*=12 Hz), 128.9, 126.8, 115.5, 115.3, 101.4, 74.3, 53.1, 53.0, 51.5. IR (KBr) ν : 3129 (=C-H, Ar), 2821 (C-H, CH₂), 1610, 1511, 1454, 1413, 1355 (C=C, Ar), 1228, 1157 (C-F) cm⁻¹; ESI-MS *m/z*: 446.51 (M⁺+1). Anal. calcd for C₂₇H₂₅F₂N₃O: C 72.79, H 5.66, N 9.43; found C 72.76, H 5.64, N 9.45.

3-(2-甲基苯基)-5-{1-[(4-二(4-氟苯基)甲基)哌嗪]甲基}异噁唑(**5c**): 白色固体, 收率 58%。m.p. 73~76 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 7.53 (d, *J*=6.8 Hz, 1H, ArH), 7.37 (t, *J*=8.0 Hz, 4H, ArH), 7.33~7.28 (m, 3H, ArH), 6.99 (t, *J*=6.4 Hz, 4H, ArH), 6.39 (s, 1H, isoxazole), 4.27 (s, 1H, Ar₂-CH), 3.79 (s, 2H, N-CH₂), 2.64 (br, 4H, pip), 2.51 (s, 3H, CH₃), 2.47 (br, 4H, pip); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 168.9, 162.9, 161.7 (d, *J*=244 Hz), 138.2 (d, *J*=3 Hz), 136.8, 131.1, 129.4 (q, *J*=12 Hz), 128.8, 126.0, 115.5, 115.3, 104.0, 74.3, 53.2, 53.1, 53.0, 51.6, 21.2; IR (KBr) ν : 3142, 2976, 2826 (C-H, CH₂), 1742, 1610, 1512, 1460, 1413, 1350 (C=C, Ar), 1228, 1156 (C-F) cm⁻¹; ESI-MS *m/z*: 460.23 (M⁺+1). Anal. calcd for C₂₈H₂₇F₂N₃O: C 73.18, H 5.92, N 9.14; found C 73.21, H 5.94, N 9.12.

3-(2-甲氧基苯基)-5-{1-[(4-二(4-氟苯基)甲基)哌嗪]甲基}异噁唑(**5d**): 黄色固体, 收率 43%。m.p. 131~134 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 7.89 (d, *J*=8.8 Hz, 1H, ArH), 7.39 (t, *J*=6.8 Hz, 1H, ArH), 7.39 (q, *J*=6.8 Hz, 4H, ArH), 7.02 (q, *J*=6.8 Hz, 2H, ArH), 6.95 (t, *J*=6.8 Hz, 4H, ArH), 6.67 (s, 1H, isoxazole), 4.21 (s, 1H, Ar₂C-H), 3.87 (s, 3H, OCH₃), 3.75 (s, 2H, NCH₂), 2.59 (br, 4H, pip), 2.41 (br, 4H, pip); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 168.2, 162.8 (d, *J*=244 Hz), 159.9, 138.1 (d, *J*=3 Hz), 131.2, 129.4, 129.2 (t, *J*=12 Hz), 120.9, 117.5, 115.3 (d, *J*=21 Hz), 111.4, 105.0, 74.3, 55.5, 53.2, 53.1, 53.0, 51.6; IR (KBr) ν : 2997 (=C-H, Ar), 2824 (C-H, CH₂), 1609, 1513, 1478, 1413, 1350 (C=C, Ar), 1228, 1141 (C-F) cm⁻¹; ESI-MS *m/z*: 476.22 (M⁺+1). Anal. calcd for C₂₈H₂₇F₂N₃O: C 70.72, H 5.72, N 8.84; found C 70.74, H 5.70, N 8.81.

3-(2,4-二甲氧基苯基)-5-{1-[(4-二(4-氟苯基)甲基)哌嗪]甲基}异噁唑(**5e**): 白色固体, 收率 53%。m.p. 128~

130 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.40 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, ArH), 7.31 (t, $J=6.8$ Hz, 4H, ArH), 7.28~7.25 (m, 1H, ArH), 6.96~6.86 (m, 5H, ArH), 6.43 (s, 1H, isoxazole), 4.21 (s, 1H, $\text{Ar}_2\text{C-H}$), 3.93 (s, 3H, OCH_3), 3.91 (s, 3H, OCH_3), 3.73 (s, 2H, NCH_2), 2.59 (br, 4H, pip), 2.41 (br, 4H, pip); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 169.5, 162.0, 161.8 (d, $J=244$ Hz), 150.5, 149.2, 138.0, 129.2 (d, $J=8$ Hz), 121.7, 119.8, 115.3 (d, $J=21$ Hz), 110.9, 109.1, 101.3, 74.3, 56.0, 55.91, 53.2, 53.0, 51.5; IR (KBr) ν : 3119 ($=\text{C-H}$, Ar), 2826 (C-H , CH_2), 1614, 1512, 1474, 1437, 1350 (C=C , Ar), 1225, 1155 (C-F) cm^{-1} ; ESI-MS m/z : 506.22 ($\text{M}^+ + 1$). Anal. calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_3$: C 68.90, H 5.78, N 8.31; found C 68.92, H 5.76, N 8.29.

3-(4-*N,N*-二甲基苯基)-5-{1-[(4-二(4-氟苯基)甲基]哌嗪}甲基异噁唑(5f): 黄色固体, 收率 32%. m.p. 159~162 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.66 (d, $J=6.8$ Hz, 2H, ArH), 7.31 (t, $J=7.2$ Hz, 4H, ArH), 6.94 (t, $J=7.2$ Hz, 4H, ArH), 6.72 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, ArH), 6.39 (s, 1H, isoxazole), 4.21 (s, 1H, $\text{Ar}_2\text{C-H}$), 3.72 (s, 2H, NCH_2), 2.59 (br, 4H, pip), 2.40 (br, 4H, pip); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 168.7, 162.3, 161.8 (d, $J=244$ Hz), 151.4, 138.1, 129.2 (d, $J=8$ Hz), 127.7, 116.4, 115.3 (d, $J=21$ Hz), 112.0, 101.1, 74.3, 53.1, 52.9, 51.5, 40.2; IR (KBr) ν : 3122 ($=\text{C-H}$, Ar), 2827 (C-H , CH_2), 1617, 1511, 1463, 1439, 1350 (C=C , Ar), 1225, 1136 (C-F) cm^{-1} ; ESI-MS m/z (%): 489.28 ($\text{M}^+ + 1$). Anal. calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}$: C 71.29, H 6.19, N 11.47; found C 71.31, H 6.21, N 11.49.

3-(2-氟苯基)-5-{1-[(4-二(4-氟苯基)甲基]哌嗪}甲基异噁唑(5g): 淡黄色固体, 收率 76%. m.p. 80~82 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 8.01 (t, $J=7.6$ Hz, 1H, ArH), 7.40 (q, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.35 (q, $J=7.2$ Hz, 4H, ArH), 7.17~7.20 (m, 2H, ArH), 6.97 (t, $J=6.4$ Hz, 4H, ArH), 6.66 (d, $J=6.8$ Hz, 1H, isoxazole), 6.43 (s, 1H, R-C=CH-), 4.25 (s, 1H, $\text{Ar}_2\text{C-H}$), 3.78 (s, 2H, NCH_2), 2.62 (br, 4H, pip), 2.44 (br, 4H, pip); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 169.5, 161.8 (d, $J=244$ Hz), 161.5, 159.0, 157.7, 138.1, 131.6 (d, $J=8$ Hz), 129.1 (d, $J=8$ Hz), 129.0 (d, $J=3$ Hz), 124.6 (d, $J=3$ Hz), 116.3 (d, $J=22$ Hz), 115.4 (d, $J=21$ Hz), 104.1 (d, $J=9$ Hz), 74.3, 53.1, 52.9, 51.5; IR (KBr) ν : 3201 ($=\text{C-H}$, Ar), 2824 (C-H , CH_2), 1609, 1512, 1477, 1340 (C=C , Ar), 1227, 1155 (C-F) cm^{-1} ; ESI-MS m/z : 464.23 ($\text{M}^+ + 1$). Anal. calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}$: C 69.97, H 5.22, N 9.07; found C 69.95, H 5.25, N 9.05.

3-(4-氟苯基)-5-{1-[(4-二(4-氟苯基)甲基]哌嗪}甲基

异噁唑(5h): 白色固体, 收率 62%. m.p. 99~102 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.77 (q, $J=6.8$ Hz, 2H, ArH), 7.31 (q, $J=7.2$ Hz, 4H, ArH), 7.12 (t, $J=8.4$ Hz, 2H, ArH), 6.97 (t, $J=6.4$ Hz, 4H, ArH), 6.43 (s, 1H, isoxazole), 4.21 (s, 1H, $\text{Ar}_2\text{C-H}$), 3.73 (s, 2H, NCH_2), 2.58 (br, 4H, pip), 2.41 (br, 4H, pip); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 167.0, 161.8 (d, $J=244$ Hz), 161.4, 138.0 (d, $J=3$ Hz), 129.2 (d, $J=8$ Hz), 128.6 (d, $J=8$ Hz), 116.1, 115.9, 115.4 (d, $J=21$ Hz), 101.3, 74.3, 53.1, 53.0, 52.0, 51.5; IR (KBr) ν : 3130 ($=\text{C-H}$, Ar), 2824 (C-H , CH_2), 1613, 1512, 1461, 1437 1340 (C=C , Ar), 1232, 1159 (C-F) cm^{-1} ; ESI-MS m/z : 464.22 ($\text{M}^+ + 1$). Anal. calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}$: C 69.97, H 5.22, N 9.07; found C 69.95, H 5.24, N 9.05.

3-(2-溴苯基)-5-{1-[(4-二(4-氟苯基)甲基]哌嗪}甲基异噁唑(5i): 棕色固体, 收率 52%. 101~103 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.64 (q, $J=6.8$ Hz, 2H, ArH), 7.36~7.31 (m, 5H, ArH), 7.27 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 6.97 (t, $J=6.4$ Hz, 4H, ArH), 6.61 (s, 1H, isoxazole), 4.22 (s, 1H, $\text{Ar}_2\text{C-H}$), 3.75 (s, 2H, NCH_2), 2.60 (br, 4H, pip), 2.42 (br, 4H, pip); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 169.5, 161.8 (d, $J=244$ Hz), 161.5, 158.7, 157.7, 138.0 (d, $J=2$ Hz), 133.5, 129.2 (d, $J=8$ Hz), 129.0 (d, $J=3$ Hz), 124.6, 116.3 (d, $J=22$ Hz), 115.4 (d, $J=21$ Hz), 104.0 (d, $J=9$ Hz), 74.3, 53.1, 53.0, 51.5; IR (KBr) ν : 3150 ($=\text{C-H}$, Ar), 2826 (C-H , CH_2), 1610, 1512, 1457, 1343 (C=C , Ar), 1228, 1157 (C-F) cm^{-1} ; ESI-MS m/z : 524.1 ($\text{M}^+ + 1$). Anal. calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{BrF}_2\text{N}_3\text{O}$: C 61.84, H 4.61, N 8.01; found C 61.86, H 4.62, N 8.03.

3-(2-硝基苯基)-5-{1-[(4-二(4-氟苯基)甲基]哌嗪}甲基异噁唑(5j): 棕色固体, 收率 21%. m.p. 165~168 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.96 (d, $J=7.2$ Hz, 1H, ArH), 7.69~7.66 (m, 3H, ArH), 7.32 (t, $J=6.4$ Hz, 4H, ArH), 6.95 (t, $J=6.8$ Hz, 4H, ArH), 6.27 (s, 1H, isoxazole), 4.22 (s, 1H, $\text{Ar}_2\text{C-H}$), 3.76 (s, 2H, NCH_2), 2.60 (br, 4H, pip), 2.42 (br, 4H, pip); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 171.0, 161.8 (d, $J=244$ Hz), 160.6, 148.6, 138.0, 132.5, 130.8, 130.1, 129.2 (d, $J=8$ Hz), 124.6, 121.8, 115.3 (d, $J=21$ Hz), 101.3, 74.3, 53.2, 53.1, 51.5; IR (KBr) ν : 3129 ($=\text{C-H}$, Ar), 2824 (C-H , CH_2), 1609, 1542, 1513, 1472, 1355 (C=C , Ar), 1229, 1142 (C-F) cm^{-1} ; ESI-MS m/z : 491.2 ($\text{M}^+ + 1$). Anal. calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_3$: C 66.11, H 4.93, N 11.42; found C 66.13, H 4.95, N 11.40.

3-(3-硝基苯基)-5-{1-[(4-二(4-氟苯基)甲基]哌嗪}甲基异噁唑(5k): 棕色固体, 收率 47%. m.p. 129~131 °C;

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 8.60 (s, 1H, ArH), 8.29 (d, $J=2$ Hz, 1H, ArH), 8.17 (d, $J=2$ Hz, 1H, ArH), 7.66 (t, $J=7$ Hz, 1H, ArH), 7.31 (t, $J=7.2$ Hz, 4H, ArH), 6.95 (t, $J=6.4$ Hz, 4H, ArH), 6.57 (s, 1H, isoxazole), 4.22 (s, 1H, $\text{Ar}_2\text{C-H}$), 3.77 (s, 2H, NCH_2), 2.60 (br, 4H, pip), 2.42 (br, 4H, pip); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 171.0, 161.8 (d, $J=244$ Hz), 160.5, 148.6, 138.0, 132.5, 130.8, 130.1, 129.2 (d, $J=7$ Hz), 124.6, 121.8, 115.4 (d, $J=21$ Hz), 101.3, 74.3, 53.2, 53.1, 51.5; IR (KBr) ν : 3131 ($=\text{C-H}$, Ar), 2826 (C-H , CH_2), 1611, 1514, 1465, 1349 ($\text{C}=\text{C}$, Ar), 1228, 1152 (C-F) cm^{-1} ; ESI-MS m/z : 491.22 (M^++1). Anal. calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_3$: C 66.11, H 4.93, N 11.42; found C 66.12, H 4.91, N 11.43.

3-(2,4-二氯苯基)-5-{1-[(4-二(4-氟苯基)甲基]哌嗪}甲基异噁唑(5I): 棕色固体, 收率 33%. m.p. 118~121 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.72 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, ArH), 7.51 (t, $J=7.2$ Hz, 1H, ArH), 7.37~7.33 (m, 4H, ArH), 6.97 (t, $J=6.4$ Hz, 4H, ArH), 6.66 (s, 1H, isoxazole), 4.25 (s, 1H, $\text{Ar}_2\text{C-H}$), 3.78 (s, 2H, NCH_2), 2.62 (br, 4H, pip), 2.45 (br, 4H, pip); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 169.4, 161.8 (d, $J=224$ Hz), 160.0, 138.1 (d, $J=3$ Hz), 136.2, 133.5, 132.3, 130.2, 129.2 (d, $J=8$ Hz), 127.5, 126.9, 115.4 (d, $J=21$ Hz), 104.6, 74.3, 53.1, 52.8, 51.5; IR (KBr) ν : 3119 ($=\text{C-H}$, Ar), 2824 (C-H , CH_2), 1609, 1542, 1513, 1472, 1355 ($\text{C}=\text{C}$, Ar), 1229, 1142 (C-F) cm^{-1} ; ESI-MS m/z : 514.13 (M^++1). Anal. calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{23}\text{Cl}_2\text{F}_2\text{N}_3\text{O}$: C 63.04, H 4.51, N 8.17; found C 63.06, H 4.53, N 8.15.

辅助材料(Supporting Information) 化合物 2 和 5a~5I 的波谱图。可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载。

References

- [1] Jemal, A.; Bray, F.; Center, M. M.; Ferlay, J.; Ward, E.; Forman, D. *Ca-Cancer J. Clin.* **2011**, 61, 69.
- [2] Murray, C. J. L.; Lopez, A. D. *Lancet* **1997**, 349, 1498.
- [3] Mathers, C. D.; Loncar, D. *PLoS Med.* **2006**, 3, e442.
- [4] Chen, H.-X.; Cleck, J. N. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2009**, 6, 465.
- [5] Rowley, M.; Broughton, H. B.; Collins, I.; Baker, R.; Emms, F.; Marwood, R.; Patel, S.; Ragan, C. I.; Freedman, S. B.; Leeson, P. D. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 1943.
- [6] Frolund, B.; Jorgensen, A. T.; Tagmose, L.; Stensbol, T. B.; Vestergaard, H. T.; Engblom, C.; Kristiansen, U.; Sanchez, C.; Krogsgaard-Larsen, P.; Liljefors, T. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 2454.
- [7] Talley, J. J.; Bertenshaw, S. R.; Brown, D. L.; Carter, J. S.; Graneto, M. J.; Kellogg, M. S.; Koboldt, C. M.; Yuan, J. H.; Zhang, Y.-Y.; Seibert, K. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 1661.
- [8] Talley, J. J.; Brown, D. L.; Carter, J. S.; Graneto, M. J.; Koboldt, C. M.; Masferrer, J. L.; Perkins, W. E.; Rogers, R. S.; Shaffer, A. F.; Zhang, Y.-Y.; Zweifel, B. S.; Seibert, K. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 775.
- [9] Giovannoni, M. P.; Vergelli, C.; Ghelardini, C.; Galeotti, N.; Bartolini, A.; Dal Piaz, V. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 1055.
- [10] Daidone, G.; Raffa, D.; Maggio, B.; Plescia, F.; Cutuli, V. M. C.; Mangano, N. G.; Caruso, A. *Arch. Pharm.* **1999**, 332, 50.
- [11] Bhatt, A. H.; Parekh, H. H.; Parikh, A. R. *Heterocycl. Commun.* **1998**, 4, 361.
- [12] Li, W.-T.; Hwang, D.-R.; Chen, C.-P.; Shen, C.-W.; Huang, C.-L.; Chen, T.-W.; Lin, C.-H.; Chang, Y.-L.; Chang, Y.-Y.; Lo, Y.-K.; Tseng, H.-Y.; Lin, C.-C.; Song, J.-S.; Chen, H.-C.; Chen, S.-J.; Wu, S.-H.; Chen, C.-T. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 1706.
- [13] Yong, J.-P.; Lu, C.-Z.; Wu, X.-Y. *Med. Chem. Commun.* **2014**, 5, 968.
- [14] Haga, T.; Fujikawa, K.; Koyanag, T.; Nakajima, T.; Hayashi, K. *Heterocycles* **1984**, 22, 117.
- [15] Yoshida, S.; Meyer, O. G. J.; Rosen, T. C.; Haufe, G.; Song, Y.; Sloan, M. J.; Kirk, K. L. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 1796.
- [16] Shelke, S. N.; Mhaske, G. R.; Bonifácio, V. D. B.; Gawande, M. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 5727.
- [17] Ge, Z.-M.; Guo, B.-G.; Wang, H.-Y.; Cheng, T.-M.; Li, R.-T. *J. Peking Univ. (Heal. Sci.)* **2001**, 33, 213 (in Chinese). (葛泽梅, 郭保国, 王红宇, 程铁明, 李润涛, 北京大学学报(医学版), **2001**, 33, 213.)
- [18] Ding, Y.; Zhang, Z.; Zhang, G.; Mo, S.; Li, Q.-H.; Zhao, Z.-G. *Res. Chem. Intermed.* **2016**, 42, 3105.
- [19] Naoki, S.; Fumihiko, A.; Shigeki, K.; Masahiko, K.; Yoshiko, S.; Haruko, Y.; Masanori, S.; Chikara, F. *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 1977.
- [20] Naoki, S.; Fumihiko, A.; Shigeki, K.; Masahiko, K.; Yoshiko, S.; Haruko, Y.; Masanori, S.; Chikara, F. S. *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 1977.
- [21] Li, Q.-H.; Ding, Y.; Yang, X.-J. *Chin. Chem. Lett.* **2014**, 25, 1296.
- [22] Li, Q.-H.; Ding, Y.; Huang, N.-W. *Chin. Chem. Lett.* **2014**, 25, 1469.
- [23] Li, Q.-H.; Zhang, G.; Ding, Y.; Chen, F.; Zhang, Z.; Mo, S. *J. Southwest Univ. Nat. (Nat. Sci. Ed.)* **2014**, 40, 826 (in Chinese). (李清寒, 张刚, 丁勇, 陈峰, 张震, 莫松, 西南民族大学学报(自然科学版), **2014**, 40, 826.)
- [24] Li, Q.-H.; Zhao, Z.-G. *Chin. J. Org. Chem.* **2009**, 29, 119 (in Chinese). (李清寒, 赵志刚, 有机化学, **2009**, 29, 119.)
- [25] Deng, J.; Li, A.-N.; Li, Q.-H.; Ding, Y.; Yang, X.-J.; Chen, F. *Chin. J. Org. Chem.* **2016**, 36, 2981 (in Chinese). (邓杰, 李爱暖, 李清寒, 丁勇, 杨学军, 陈峰, 有机化学, **2016**, 36, 2981.)
- [26] Li, Q.-H.; Ding, Y.; Zhang, G.; Zhang, Z.; Mong, S. *Chin. J. Org. Chem.* **2016**, 36, 83 (in Chinese). (李清寒, 张刚, 张震, 莫松, 有机化学, **2016**, 36, 83.)
- [27] Mo, S.; Ding, Y.; Zhang, G.; Zhang, Z.; Shao, X.-B.; Li, Q.-H.; Yang, X.-J.; Chen, F. *Chin. J. Org. Chem.* **2017**, 37, 1000 (in Chinese). (莫松, 丁勇, 张刚, 张震, 杓学蓓, 李清寒, 杨学军, 陈峰, 有机化学, **2017**, 37, 1000.)
- [28] Altug, C.; Güneş, H.; Nocentini, A.; Monti, S. M.; Buonanno, M.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, 25, 1456.

(Cheng, F.)