

哌嗪取代 3-芳基-5-呋喃基-4,5-二氢吡唑酰胺衍生物的 合成及其生物活性评价

毛泽伟^{†,*}, 刘 蓓[†], 朱 萍^a 张丽君^a 朱加洪^a
伍林泽^a 万春平^{*,b}

(^a 云南中医学院中药学院 昆明 650500)

(^b 云南中医学院第一附属医院中心实验室 昆明 650021)

摘要 吡唑是一类具有优良生物活性的五元杂环化合物。以 4-氟苯乙酮和 2-呋喃甲醛为原料出发, 经 Aldol 缩合、取代、环化和酰化等反应, 合成得到 16 个未见文献报道的新型哌嗪取代的 3-芳基-5-呋喃基-4,5-二氢吡唑酰胺衍生物。采用小鼠巨噬细胞 Raw264.7 模型和噻唑蓝(MTT)法分别测试了目标化合物的体外抗炎活性和抗肿瘤活性(A549、Hela 和 SGC7901)。研究结果发现, 二氢吡唑类化合物能有效抑制炎症因子 NO 的生成, 并对肿瘤细胞株表现出选择性的抑制活性。其中 3 个化合物与地塞米松活性相当, 能有效抑制 NO 的生成; 3 个化合物对肿瘤细胞株的体外选择性抑制活性与 5-氟尿嘧啶(5-FU)相当, 均可做进一步构效关系研究。

关键词 二氢吡唑; 酰胺; 抗炎活性; 抗肿瘤活性

Synthesis and Biological Evaluation of Piperazine Substituted 3-Aryl-5-furanyldihydropyrazole Amide Derivatives

Mao, Zewei^{†,*}, Liu, Bei[†], Zhu, Ping^a Zhang, Lijun^a Zhu, Jiahong^a
Wu, Linze^a Wan, Chunping^{*,b}

(^a College of Pharmaceutical Science, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500)

(^b Central laboratory, The NO.1 Affiliated Hospital of Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650021)

Abstract Pyrazole is a five-membered heterocyclic molecule with a broad range of biological activities. In this study, a series of new 3-aryl-5-furanyl-4,5-dihydropyrazole derivatives have been designed and synthesized by the general principle of molecular hybridization. The structures were characterized by ¹H NMR, ¹³C NMR and HRMS. We screened *in vitro* anti-inflammatory in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW-264.7 macrophages and anticancer activity against 3 strains human tumor cell lines (A549, Hela and SGC7901) by the methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The result indicated that dihydropyrazole compounds showed good inhibitory effect on the generation of NO and selective cytotoxic activity against tumor cell lines, and the acyl moieties of amides had an obvious influence on biological activities. Especially, 3 compounds were found to be similar anti-inflammatory to positive control dexamethasone, and 3 compounds displayed similar selective anti-tumor activity to positive control 5-fluorouracil (5-FU), which were to be lead compounds for further SAR research.

Keywords dihydropyrazole; amide; anti-inflammatory activity; anticancer activity

吡唑(Parazole)是一类非常重要的含氮五元杂环化合物, 其衍生物具有优良的生物活性, 如抗肿瘤、抗炎、杀虫除草和抗菌等^[1-4], 在医药和农药等方面都有着广泛的应用。目前临床上使用的吡唑啉药物有很多, 如广

谱抗菌药磺胺苯吡唑(Sulfaphenazole), 解热镇痛药安替比林(Phenazone), 中枢神经系统药 SLV-330, 骨关节炎药 E-6087 等, 见图 1。由于吡唑衍生物有着独特的五元杂环结构, 能够在杂环上引入不同的取代基, 从而

* Corresponding authors. E-mail: maozw@ynutcm.edu.cn, wanchunping1012@163.com

Received February 6, 2018; revised March 27, 2018; published online April 27, 2018.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81460624) and the Yunnan Provincial Science and Technology Department-Applied Basic Research Joint Special Funds of Yunnan University of Traditional Chinese Medicine (No. 2017FF117(-023)).

国家自然科学基金(No. 81460624)和云南省科学技术厅-云南中医学院应用基础研究联合专项(No. 2017FF117(-023))资助项目。

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

改变它的结构与性质,因此在生物和非生物领域均受到越来越多的关注,国内外对不同的吡唑杂环体系的研究也日益增多^[5-8].据文献报道,3-芳基-5-呋喃基二氢吡唑酰胺衍生物普遍具有良好的抗炎和抗肿瘤活性,如 Scheme 1 所示,呋喃取代的二氢吡唑类化合物 **A** 具有很好的抗炎活性和镇痛活性,且活性与药物吲哚美辛和曲马多相当^[9];化合物 **B** 对肿瘤细胞具有显著地抑制活性^[10].

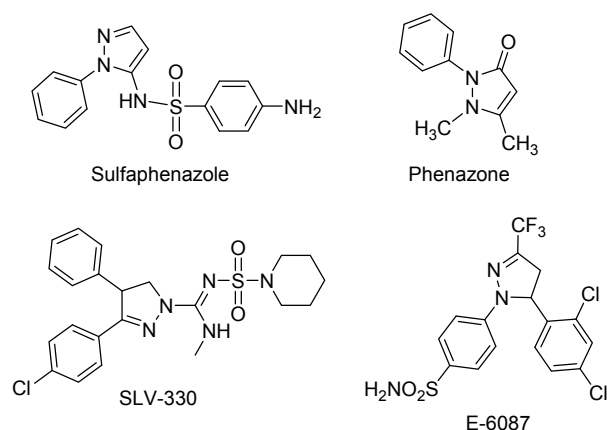


图 1 代表性吡唑/二氢吡唑类药物

Figure 1 Structures of some drugs containing pyrazole/pyrazoline

N-芳基哌嗪片段具有较好的生物活性和低毒性的特点,常用于药物分子的设计.含有该结构单元的临床药物有很多,如喹诺酮类抗菌药环丙沙星和诺氟沙星,镇咳药左羟丙哌嗪等.在前期研究中,本课题组也对 *N*-芳基哌嗪取代的类天然产物进行了研究,结果发现含有哌嗪片段的苯并呋喃和查尔酮类化合物均表现出较好的抗炎和抗肿瘤活性.如苯并呋喃类化合物 **C** 表现出

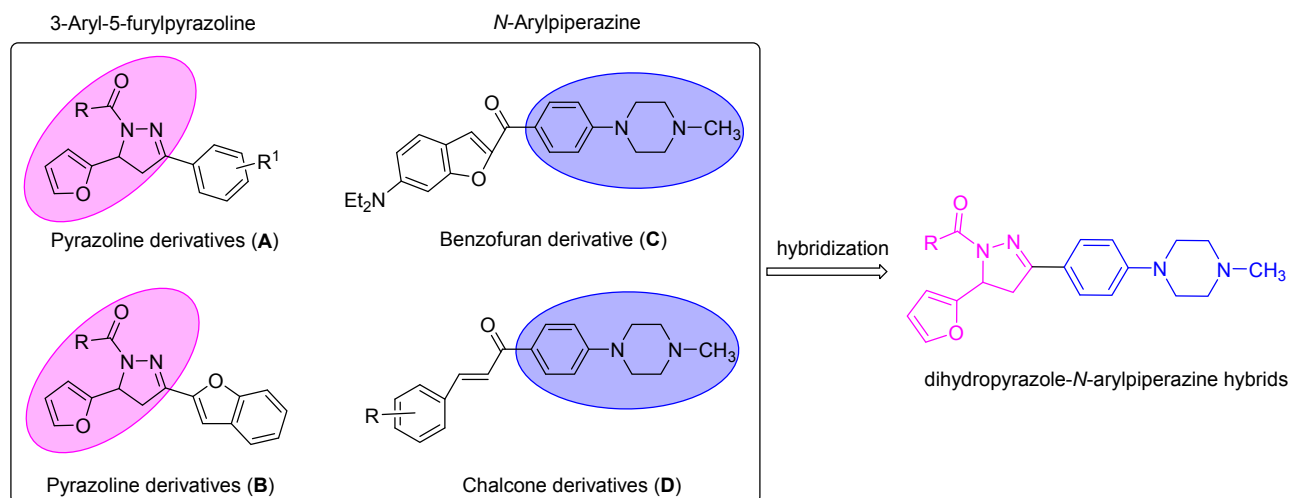
较好的抗炎和抗肿瘤活性^[11];查尔酮类化合物 **D** 不仅能抑制炎症因子 NO 的生成,还能显著抑制肿瘤细胞 A549 和 Hela 的增殖^[12,13].基于此,我们采用活性亚结构拼合方法,将呋喃环和 *N*-芳基哌嗪片段引入到二氢吡唑分子中,以期得到具有更优生物活性的化合物,如 Scheme 1 所示.

本研究采用活性亚结构拼接的方法,以 2-呋喃甲醛和 4-氟苯乙酮为原料,经 Aldol 缩合得到 4-氟呋喃查尔酮(**1**)后,与 *N*-甲基哌嗪取代、水合肼环化缩合生成关键中间体 3-芳基-5-呋喃基-4,5-二氢吡唑(**3**),最后吡唑啉环上的 NH 基团与酰氯反应,得到 16 个未见文献报道的哌嗪取代 3-芳基-5-呋喃基-4,5-二氢吡唑啉酰胺衍生物 **4~19**,结构经 ¹H NMR、¹³C NMR 和 HRMS 确证.以地塞米松为阳性对照,采用小鼠巨噬细胞 Raw264.7 模型测试了化合物的体外抗炎活性;以 5-氟尿嘧啶(5-FU)为阳性对照,以人肺癌细胞(A549)、人宫颈癌细胞(Hela)和人胃癌细胞(SGC-7901)为待测肿瘤细胞株,采用噻唑蓝(MTT)法对化合物的体外抗肿瘤活性进行了测试.研究结果发现,酰胺不同酰基对化合物的生物活性有较大影响,为该类化合物进一步的构效关系研究提供了参考.

1 结果与讨论

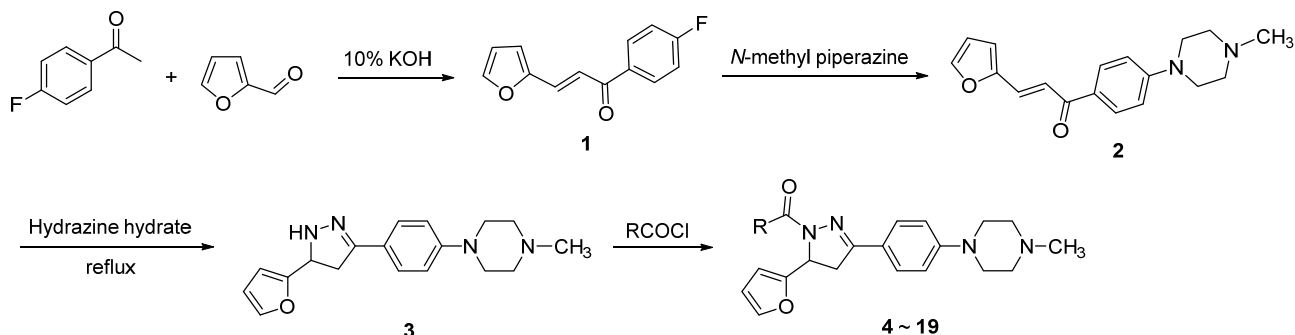
1.1 目标化合物的合成

目标化合物 **4~19** 的合成路线如 Scheme 2 所示.以 4-氟苯乙酮和 2-呋喃甲醛为起始原料,参照文献[14]的方法制备得到化合物 **2** 后,再与水合肼经加成和缩合反应生成关键中间体 3-芳基-5-呋喃基-4,5-二氢吡唑啉(**3**),最后与酰氯反应得到目标产物.所有反应条件均很温



图式 1 二氢吡唑啉衍生物的设计策略

Scheme 1 Synthetic strategy of dihydropyrazole derivatives



4: R = Methyl, 90%; 5: R = chloromethyl, 85%; 6: R = chloroethyl, 82%; 7: R = methyl acetate, 80%; 8: R = benzyl, 86%; 9: R = styryl, 74%; 10: R = phenyl, 88%; 11: R = 4-fluorophenyl, 80%; 12: R = 2-chlorophenyl, 78%; 13: R = 3,5-dichlorophenyl, 83%; 14: R = 4-methylphenyl, 82%; 15: R = 4-trifluoromethylphenyl, 75%; 16: R = 3-trifluoromethylphenyl, 72%; 17: R = 2-naphthyl, 86%; 18: R = 3-fluoro-4-bromophenyl, 67%; 19: R = 2,4-dichlorophenoxymethyl, 74%

图式 2 二氢吡唑衍生物的合成

Scheme 2 Synthesis of dihydropyrazole derivatives

表 1 目标化合物结构

Table 1 Structures of title compounds

Compd.	R	Compd.	R	Compd.	R	Compd.	R
4	CH ₃	8		12		16	
5	ClCH ₂	9		13		17	
6	ClCH ₂ CH ₂	10		14		18	
7		11		15		19	

和, 且反应收率较高。

1.2 抗炎活性

以地塞米松(Dexamethasone)为阳性对照药, 采用细菌脂多糖诱导小鼠巨噬细胞炎症模型(LPS-RAW264.7)测试目标化合物的体外抗炎活性, 结果见表 2。从表中可以看出, 化合物 3、4、7 和 9 具有一定的抗炎活性(IC₅₀值与地塞米松相当)。从化合物的结构来看, 化合物 3 能够显著抑制 NO 的生成(IC₅₀=6.46 μmol/L), 而当二氢吡唑啉环上的 NH 基团被酰化后, 其抗炎活性降低(化合物 9 除外)。另外, 不同酰基对化合物活性影响较大, 特别是酰基电子云密度较大时能增强目标化合物的抗炎活性, 如化合物 4 (IC₅₀=8.24 μmol/L)、化合物 7 (IC₅₀=10.62 μmol/L)和化合物 9 (IC₅₀=5.08 μmol/L); 而芳基酰胺化合物抑制 NO 生成的活性均较弱, 如化合物 8、10~

18。在所有芳香酰胺化合物中, 芳环上的取代基对化合物活性的影响不大, 如卤素、供电子基团或吸电子基团等; 另外, 芳环上取代基的数目和位置对化合物的活性没有明显作用, 如化合物 12、13、15 和 16。在所有化合物中, 共轭酰胺化合物 9 的体外抗炎活性最强, IC₅₀值为 5.08 μmol·L⁻¹。由此可以看出, 富电子基团和共轭结构均能增加该类化合物抑制 NO 生成的活性。

1.3 抗肿瘤活性

以 5-氟尿嘧啶(5-FU)为对阳性对照药, 采用 MTT 法测试了二氢吡唑衍生物对肿瘤细胞株(人肺癌细胞 A549、人宫颈癌细胞 Hela 和人胃癌细胞 SGC7901)的体外抑制活性, 结果如表 3 所示。从活性结果可以看出, 化合物 5、9 和 13 对肿瘤细胞株表现出良好的选择性细胞毒活性, 且与阳性对照药 5-氟尿嘧啶活性相当。其中,

表 2 目标化合物的体外抗炎活性[IC₅₀/(μmol·L⁻¹)]Table 2 *In vitro* anti-inflammatory activities of title compounds [IC₅₀/(μmol·L⁻¹)]

Compd.	NO generation	Compd.	NO generation
3	6.46	12	>40
4	8.24	13	>40
5	28.15	14	27.66
6	35.31	15	30.02
7	10.62	16	>40
8	>40	17	37.34
9	5.08	18	>40
10	>40	19	26.84
11	>40	Dexamethasone	10.80

表 3 目标化合物的体外抗肿瘤活性[IC₅₀/(μmol·L⁻¹)]Table 3 *In vitro* anticancer activities of title compounds [IC₅₀/(μmol·L⁻¹)]

Compd.	A549	Hela	SGC7901
4	>40	18.42	24.18
5	16.28	1.42	2.06
6	8.25	13.82	19.15
7	>40	>40	>40
8	>40	30.84	>40
9	10.22	23.16	12.62
10	>40	>40	>40
11	29.43	>40	>40
12	>40	28.42	22.16
13	11.56	23.34	8.14
14	>40	>40	>40
15	16.64	26.14	11.25
16	20.40	22.18	15.37
17	>40	>40	>40
18	>40	26.65	>40
19	19.52	30.34	26.08
5-FU	10.55	10.72	11.96

化合物 5 对肿瘤细胞 Hela 和 SGC7901 表现出选择性的抑制活性, IC₅₀ 值分别为 1.42 和 2.06 μmol/L; 化合物 9 对肿瘤细胞 A549 和 SGC7901 具有选择性的细胞毒活性, IC₅₀ 值分别为 10.22 和 12.62 μmol/L; 化合物 13 对 A549 和 SGC7901 显示出选择性的抑制活性, IC₅₀ 值分别为 11.56 和 8.14 μmol/L. 除此之外, 化合物 6 和 15 分别对 A549 和 SGC7901 还具有与 5-FU 相当的细胞毒活性.

从化合物结构上看, 在二氢吡唑酰胺分子中, 吡唑环上酰胺基团对化合物的抗肿瘤活性有明显的影响. 当酰基含有卤素或共轭结构时, 抗肿瘤活性较好, 如化合物 5、9 和 13; 当含有其它取代基时, 细胞毒活性较弱. 另外, 卤素取代的化合物中, 氯原子取代的衍生物活性要优于氟原子, 且随着氯原子个数增加而增强, 如化合物 12 和 13. 由此, 我们推测除母核结构因素外, 酰基上的取代基也是目标化合物抗肿瘤活性的关键因素, 特别是

氯原子表现出潜在的研究前景.

2 结论

本文采用活性亚结构单元拼合的原理, 设计合成了 16 个未见文献报道的新型哌嗪取代 3-芳基-5-呋喃基-4,5-二氢吡唑酰胺衍生物 4~19. 分别采用小鼠巨噬细胞 Raw264.7 模型和 MTT 法测试了化合物的体外抗炎活性和抗肿瘤活性. 从活性结果看出, 该类化合物具有较好的抑制 NO 生成和抑制肿瘤细胞增殖的作用. 特别是化合物 4、7 和 9 的抗炎活性与地塞米松活性相当, 化合物 5、9 和 13 对肿瘤细胞株的体外细胞毒活性与 5-FU 相当.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

Bruker AM 400 核磁共振波谱仪, TMS 为内标; YANACO 显微熔点仪, 温度未校正; AutoSpec Premier P776 型双聚焦三扇型磁质谱仪; 二氧化碳培养箱(美国 Thermo-fisher); Epoch 连续波长酶标仪(美国 Bio-Tek 公司). 所有试剂与溶剂均为市售分析纯.

3.2 实验方法

3.2.1 4'-(N-甲基-1-哌嗪基)呋喃查尔酮(2)的合成

按照参考文献[14]的方法制备化合物 2, 两步收率 58%. m.p. 153~155 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.00 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 7.59 (d, *J*=15.3 Hz, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.49 (d, *J*=15.4 Hz, 1H), 6.91 (d, *J*=9.1 Hz, 2H), 6.66 (d, *J*=3.4 Hz, 1H), 6.48~6.49 (dd, *J*=1.8, 1.8 Hz, 1H), 3.39 (t, *J*=5.0 Hz, 4H), 2.56 (t, *J*=5.2 Hz, 4H), 2.34 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 187.5, 154.1, 152.1, 144.5, 130.6, 129.3, 128.3, 119.6, 115.3, 113.6, 112.6, 54.8, 47.3, 46.1.

3.2.1 3-[4-(N-甲基-1-哌嗪基)]苯基-5-(2-呋喃基)-4,5-二氢吡唑(3)的合成

称取化合物 2 (2.82 g, 10 mmol)和水合肼(2 mL)于 50 mL 圆底烧瓶中, 加入 40 mL 无水乙醇加热回流反应 6 h. 薄层色谱(TLC)检测反应完成后, 冷却, 将反应物倒入 100 mL 水中, 并用二氯甲烷(DCM)萃取(20 mL×3). 有机相经无水硫酸钠干燥后真空浓缩, 残余物经异丙醇重结晶得到淡黄色固体 2.14 g, 收率 64%. 无需进一步纯化, 直接进行下一步反应.

3.2.2 化合物 4~19 的合成

称取 90 mg (0.3 mmol)化合物 3 于 25 mL 圆底烧瓶中, 依次加入 10 mL 无水 DCM, 138 mg (1 mmol) K₂CO₃ 和 0.5 mmol 酰氯, 于室温下反应 3~5 h. TLC 检测反应

完成后, 加 10 mL 5% NaOH 水溶液搅拌 30 min. DCM 萃取(10 mL×3), 有机相经无水硫酸钠干燥后真空浓缩, 残余物经柱层析(以 2% CH₃OH/DCM 为洗脱剂)分离得到目标化合物。

1-乙酰基-3-[4-(*N*-甲基-1-哌嗪基)]苯基-5-(2-呋喃基)-4,5-二氢吡唑(**4**): 黄色固体, m.p. 150~152 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.65 (d, *J*=8.9 Hz, 2H), 7.28 (s, 1H), 6.92 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 6.30 (s, 2H), 5.63~5.67 (dd, *J*=4.6, 4.6 Hz, 1H), 3.49~3.56 (dd, *J*=11.5, 11.5 Hz, 1H), 3.36~3.41 (dd, *J*=4.6, 4.6 Hz, 1H), 3.33 (t, *J*=5.0 Hz, 4H), 2.62 (t, *J*=5.1 Hz, 4H), 2.37 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 168.8, 154.3, 152.6, 52.5, 141.9, 128.0, 121.9, 115.0, 110.6, 107.4, 54.8, 53.2, 48.0, 46.1, 38.4, 22.0; HRMS-ESI calcd for C₂₀H₂₄N₄O₂Na (M+Na)⁺ 375.1791, found 375.1789.

1-氯乙酰基-3-[4-(*N*-甲基-1-哌嗪基)]苯基-5-(2-呋喃基)-4,5-二氢吡唑(**5**): 淡褐色粘稠状。 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.65 (d, *J*=8.9 Hz, 2H), 7.29 (s, 1H), 6.93 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 6.37 (d, *J*=3.3 Hz, 1H), 6.31 (d, *J*=1.8 Hz, 1H), 5.63~5.67 (dd, *J*=4.9, 4.8 Hz, 1H), 4.55 (d, *J*=6.5 Hz, 2H), 3.52~3.59 (dd, *J*=11.4, 11.3 Hz, 1H), 3.42~3.47 (dd, *J*=4.9, 4.9 Hz, 1H), 3.33 (t, *J*=5.0 Hz, 4H), 2.63 (t, *J*=5.1 Hz, 4H), 2.36 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 163.8, 155.7, 152.9, 151.4, 142.2, 128.3, 121.0, 114.8, 110.7, 108.2, 54.9, 53.8, 47.9, 46.2, 42.5, 38.2; HRMS-ESI calcd for C₂₀H₂₄N₄O₂Cl (M+H)⁺ 387.1582, found 387.1580.

1-(3-氯乙酰基)-3-[4-(*N*-甲基-1-哌嗪基)]苯基-5-(2-呋喃基)-4,5-二氢吡唑(**6**): 淡黄色固体, m.p. 157~159 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.65 (d, *J*=8.9 Hz, 2H), 7.29 (s, 1H), 6.93 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 6.30~6.33 (m, 2H), 5.63~5.67 (dd, *J*=4.7, 4.7 Hz, 1H), 3.89 (t, *J*=7.3 Hz, 2H), 3.51~3.58 (dd, *J*=11.6, 11.5 Hz, 1H), 3.36~3.43 (dd, *J*=4.7, 4.7 Hz, 1H), 3.35 (t, *J*=4.9 Hz, 4H), 3.27 (t, *J*=7.0 Hz, 2H), 2.64 (t, *J*=5.0 Hz, 4H), 2.40 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 167.6, 154.9, 152.6, 152.1, 142.1, 128.1, 121.7, 115.0, 110.6, 107.7, 54.8, 53.5, 47.9, 46.0, 39.7, 38.3, 37.5; HRMS-ESI calcd for C₂₁H₂₆N₄O₂Cl (M+H)⁺ 401.1739, found 401.1736.

1-(2-羧酸甲脂乙酰基)-3-[4-(*N*-甲基-1-哌嗪基)]苯基-5-(2-呋喃基)-4,5-二氢吡唑(**7**): 黄色固体, m.p. 144~146 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.61 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 7.30 (s, 1H), 6.91 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 6.37 (d, *J*=3.3 Hz, 1H), 6.30~6.31 (dd, *J*=1.8, 1.8 Hz, 1H), 5.64~5.68 (dd, *J*=4.6, 4.6 Hz, 1H), 3.86 (d, *J*=15.8 Hz, 1H),

3.76 (d, *J*=15.9 Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.52~3.59 (dd, *J*=11.4, 11.4 Hz, 1H), 3.39~3.45 (dd, *J*=4.6, 4.6 Hz, 1H), 3.32 (t, *J*=5.0 Hz, 4H), 2.59 (t, *J*=5.1 Hz, 4H), 2.36 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 168.5, 163.7, 155.1, 152.7, 151.8, 142.1, 128.1, 121.3, 114.9, 110.7, 107.7, 54.9, 53.5, 52.3, 48.0, 46.2, 42.1, 38.6; HRMS-ESI calcd for C₂₂H₂₇N₄O₄ (M+H)⁺ 411.2027, found 411.2025.

1-苯乙酰基-3-[4-(*N*-甲基-1-哌嗪基)]苯基-5-(2-呋喃基)-4,5-二氢吡唑(**8**): 褐色固体, m.p. 152~154 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.64 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 7.37 (d, *J*=7.3 Hz, 2H), 7.27 (d, *J*=7.2 Hz, 1H), 7.25 (d, *J*=7.8 Hz, 2H), 7.19 (d, *J*=7.3 Hz, 1H), 6.90 (d, *J*=8.9 Hz, 2H), 6.24 (t, *J*=3.2 Hz, 1H), 6.20 (d, *J*=3.2 Hz, 1H), 5.56~5.60 (dd, *J*=4.9, 4.8 Hz, 1H), 4.16 (d, *J*=14.0 Hz, 1H), 4.02 (d, *J*=14.0 Hz, 1H), 3.39~3.46 (dd, *J*=11.4, 11.0 Hz, 1H), 3.29~3.36 (dd, *J*=4.9, 5.0 Hz, 1H), 3.29 (t, *J*=4.9 Hz, 4H), 2.56 (t, *J*=5.0 Hz, 4H), 2.33 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 168.8, 154.3, 152.4, 141.7, 135.6, 129.5, 128.3, 127.9, 126.5, 121.6, 114.8, 110.5, 107.4, 54.7, 53.4, 47.8, 46.0, 41.1, 38.2; HRMS-ESI calcd for C₂₆H₂₉N₄O₂ (M+H)⁺ 429.2285, found 429.2283.

1-肉桂酰基-3-[4-(*N*-甲基-1-哌嗪基)]苯基-5-(2-呋喃基)-4,5-二氢吡唑(**9**): 淡黄色固体, m.p. 171~173 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.76 (d, *J*=16.0 Hz, 1H), 7.71 (d, *J*=8.9 Hz, 2H), 7.61 (d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.60 (d, *J*=16.0 Hz, 1H), 7.33~7.37 (m, 3H), 7.29 (d, *J*=1.0 Hz, 1H), 6.94 (d, *J*=8.9 Hz, 2H), 6.37 (d, *J*=3.2 Hz, 1H), 6.30~6.31 (dd, *J*=1.8, 1.9 Hz, 1H), 5.76~5.80 (dd, *J*=4.6, 4.6 Hz, 1H), 3.52~3.59 (dd, *J*=11.5, 11.4 Hz, 1H), 3.39~3.45 (dd, *J*=4.7, 4.7 Hz, 1H), 3.33 (t, *J*=4.9 Hz, 4H), 2.60 (t, *J*=5.0 Hz, 4H), 2.36 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 163.6, 154.6, 52., 152.3, 142.1, 142.0, 135.6, 129.6, 128.8, 128.2, 128.1, 121.8, 118.7, 115.0, 110.6, 107.6, 54.8, 53.7, 47.9, 46.1, 38.1; HRMS-ESI calcd for C₂₇H₂₉N₄O₂ (M+H)⁺ 441.2285, found 441.2284.

1-苯甲酰基-3-[4-(*N*-甲基-1-哌嗪基)]苯基-5-(2-呋喃基)-4,5-二氢吡唑(**10**): 黄色固体, m.p. 152~154 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.02 (d, *J*=7.1 Hz, 2H), 7.61 (d, *J*=8.9 Hz, 2H), 7.42~7.46 (m, 1H), 7.41 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.31 (d, *J*=1.0 Hz, 1H), 6.89 (d, *J*=8.9 Hz, 2H), 6.39 (d, *J*=2.6 Hz, 1H), 6.30~6.32 (dd, *J*=1.8, 1.9 Hz, 1H), 5.86~5.90 (dd, *J*=5.0, 5.0 Hz, 1H), 3.52~3.59 (dd, *J*=11.5, 11.5 Hz, 1H), 3.39~3.45 (dd, *J*=5.1, 5.1 Hz, 1H), 3.30 (t, *J*=5.0 Hz, 4H), 2.58 (t, *J*=5.1 Hz, 4H), 2.34 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 166.2, 155.0,

152.5, 152.4, 142.0, 134.5, 130.9, 130.2, 128.1, 127.6, 121.7, 114.9, 110.6, 107.7, 54.8, 54.6, 47.9, 46.1, 37.6; HRMS-ESI calcd for $C_{25}H_{27}N_4O_2$ ($M+H$)⁺ 415.2129, found 415.2128.

1-(4-氟苯甲酰基)-3-[4-(*N*-甲基-1-哌嗪基)]苯基-5-(2-呋喃基)-4,5-二氢吡唑(**11**): 褐色固体, m.p. 157~159 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.06~8.09 (dd, *J*=5.6, 5.6 Hz, 2H), 7.61 (d, *J*=8.9 Hz, 2H), 7.31 (s, 1H), 7.11 (t, *J*=8.7 Hz, 2H), 6.91 (d, *J*=8.9 Hz, 2H), 6.40 (d, *J*=3.2 Hz, 1H), 6.31~6.32 (dd, *J*=1.8, 1.8 Hz, 1H), 5.85~5.89 (dd, *J*=5.1, 5.1 Hz, 1H), 3.52~3.60 (dd, *J*=11.5, 11.5 Hz, 1H), 3.40~3.46 (dd, *J*=5.2, 5.1 Hz, 1H), 3.35 (t, *J*=5.0 Hz, 4H), 2.67 (t, *J*=5.0 Hz, 4H), 2.40 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 165.0, 155.2, 152.5, 152.3, 142.1, 132.8, 132.7, 128.2, 121.8, 115.0, 114.9, 114.5, 110.7, 107.8, 54.6, 54.5, 47.7, 45.7, 37.6; HRMS-ESI calcd for $C_{25}H_{26}N_4O_2F$ ($M+H$)⁺ 433.2034, found 433.2032.

1-(2-氯苯甲酰基)-3-[4-(*N*-甲基-1-哌嗪基)]苯基-5-(2-呋喃基)-4,5-二氢吡唑(**12**): 淡褐色固体, m.p. 161~163 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.49 (d, *J*=8.9 Hz, 2H), 7.41~7.44 (dd, *J*=2.1, 2.1 Hz, 1H), 7.37~7.39 (dd, *J*=1.4, 1.2 Hz, 1H), 7.27~7.33 (m, 3H), 6.83 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 6.46 (d, *J*=3.2 Hz, 1H), 6.33~6.34 (dd, *J*=1.8, 1.8 Hz, 1H), 5.82~5.86 (dd, *J*=4.5, 4.6 Hz, 1H), 3.56~3.63 (dd, *J*=11.4, 11.4 Hz, 1H), 3.42~3.48 (dd, *J*=4.6, 4.6 Hz, 1H), 3.26 (t, *J*=4.9 Hz, 4H), 2.54 (t, *J*=5.0 Hz, 4H), 2.32 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 165.0, 155.5, 152.6, 151.8, 142.0, 136.2, 131.5, 130.2, 129.3, 129.1, 128.1, 126.3, 121.4, 114.8, 110.6, 107.8, 54.8, 53.9, 47.9, 46.1, 38.4; HRMS-ESI calcd for $C_{25}H_{26}N_4O_2Cl$ ($M+H$)⁺ 449.1739, found 449.1735.

1-(3,5-二氯苯甲酰基)-3-[4-(*N*-甲基-1-哌嗪基)]苯基-5-(2-呋喃基)-4,5-二氢吡唑(**13**): 黄色固体, m.p. 149~151 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.93 (s, 2H), 7.61 (d, *J*=8.9 Hz, 2H), 7.44 (s, 1H), 7.32 (d, *J*=1.1 Hz, 1H), 6.92 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 6.40 (d, *J*=3.1 Hz, 1H), 6.32~6.33 (dd, *J*=1.8, 1.9 Hz, 1H), 5.82~5.86 (dd, *J*=5.0, 5.0 Hz, 1H), 3.54~3.61 (dd, *J*=11.4, 11.4 Hz, 1H), 3.42~3.48 (dd, *J*=5.1, 5.0 Hz, 1H), 3.34 (t, *J*=5.0 Hz, 4H), 2.62 (t, *J*=5.0 Hz, 4H), 2.37 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 163.1, 156.0, 152.7, 151.8, 142.2, 137.2, 134.3, 130.7, 128.8, 128.3, 121.2, 114.9, 110.7, 108.1, 54.7, 47.8, 46.0, 37.6; HRMS-ESI calcd for $C_{25}H_{25}N_4O_2Cl_2$ ($M+H$)⁺ 483.1349, found 483.1353.

1-(4-甲基苯甲酰基)-3-[4-(*N*-甲基-1-哌嗪基)]苯基-5-(2-呋喃基)-4,5-二氢吡唑(**14**): 淡红色粘稠状. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.96 (d, *J*=8.1 Hz, 2H), 7.62 (d, *J*=8.9 Hz, 2H), 7.31 (s, 1H), 7.23 (d, *J*=8.0 Hz, 2H), 6.90 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 6.39 (d, *J*=3.2 Hz, 1H), 6.30~6.32 (dd, *J*=1.8, 1.9 Hz, 1H), 5.86~5.90 (dd, *J*=5.0, 5.0 Hz, 1H), 3.52~3.59 (dd, *J*=11.5, 11.5 Hz, 1H), 3.39~3.44 (dd, *J*=5.1, 5.1 Hz, 1H), 3.32 (t, *J*=5.0 Hz, 4H), 2.61 (t, *J*=5.1 Hz, 4H), 2.40 (s, 3H), 2.37 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 166.3, 154.7, 152.6, 152.5, 142.0, 141.3, 131.7, 130.4, 128.4, 128.2, 122.0, 115.0, 110.7, 107.7, 54.8, 54.7, 48.0, 46.1, 37.6, 21.6; HRMS-ESI calcd for $C_{26}H_{29}N_4O_2$ ($M+H$)⁺ 429.2285, found 429.2288.

1-(4-三氟甲基苯甲酰基)-3-[4-(*N*-甲基-1-哌嗪基)]苯基-5-(2-呋喃基)-4,5-二氢吡唑(**15**): 淡黄色固体, m.p. 161~163 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.11 (d, *J*=8.1 Hz, 2H), 7.68 (d, *J*=8.3 Hz, 2H), 7.61 (d, *J*=8.9 Hz, 2H), 7.32 (s, 1H), 6.91 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 6.42 (d, *J*=2.9 Hz, 1H), 6.33~6.34 (dd, *J*=1.8, 1.9 Hz, 1H), 5.86~5.90 (dd, *J*=5.0, 5.0 Hz, 1H), 3.56~3.63 (dd, *J*=11.5, 11.4 Hz, 1H), 3.44~3.49 (dd, *J*=5.1, 5.0 Hz, 1H), 3.35 (t, *J*=4.9 Hz, 4H), 2.67 (t, *J*=5.0 Hz, 4H), 2.40 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 165.0, 155.8, 152.6, 152.0, 142.2, 130.6, 130.0, 128.3, 124.6, 121.6, 115.0, 110.7, 108.0, 54.6, 47.7, 45.8, 37.8; HRMS-ESI calcd for $C_{26}H_{26}N_4O_2F_3$ ($M+H$)⁺ 483.2002, found 483.2000.

1-(3-三氟甲基苯甲酰基)-3-[4-(*N*-甲基-1-哌嗪基)]苯基-5-(2-呋喃基)-4,5-二氢吡唑(**16**): 褐色固体, m.p. 168~170 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.39 (s, 1H), 8.22 (d, *J*=7.8 Hz, 2H), 7.88~8.01 (dd, *J*=9.0, 8.8 Hz, 1H), 7.73 (d, *J*=7.8 Hz, 1H), 7.61 (d, *J*=8.9 Hz, 2H), 7.33 (s, 1H), 6.92 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 6.42 (d, *J*=3.0 Hz, 1H), 6.33~6.34 (dd, *J*=1.8, 1.9 Hz, 1H), 5.87~5.91 (dd, *J*=5.0, 5.0 Hz, 1H), 3.56~3.63 (dd, *J*=11.5, 11.4 Hz, 1H), 3.44~3.50 (dd, *J*=5.1, 5.1 Hz, 1H), 3.33 (t, *J*=5.0 Hz, 4H), 2.59 (t, *J*=5.2 Hz, 4H), 2.36 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 164.5, 155.8, 152.8, 152.0, 142.2, 135.2, 133.6, 128.2, 121.3, 114.9, 110.7, 108.0, 54.9, 54.8, 54.7, 48.0, 46.2, 37.7; HRMS-ESI calcd for $C_{26}H_{26}N_4O_2F_3$ ($M+H$)⁺ 483.2002, found 483.2001.

1-(2-萘甲酰基)-3-[4-(*N*-甲基-1-哌嗪基)]苯基-5-(2-呋喃基)-4,5-二氢吡唑(**17**): 淡绿色固体, m.p. 182~184 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.58 (s, 1H), 8.06~8.09 (dd, *J*=1.4, 1.4 Hz, 1H), 7.94 (d, *J*=7.8 Hz, 1H), 7.87 (d, *J*=8.2 Hz, 2H), 7.63 (d, *J*=8.9 Hz, 2H),

7.50~7.55 (m, 2H), 7.34 (s, 1H), 6.90 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 6.45 (d, $J=3.0$ Hz, 1H), 6.33~6.35 (dd, $J=1.8, 1.8$ Hz, 1H), 5.93~5.97 (dd, $J=5.1, 5.1$ Hz, 1H), 3.57~3.64 (dd, $J=11.5, 11.4$ Hz, 1H), 3.45~3.51 (dd, $J=5.2, 5.1$ Hz, 1H), 3.32 (t, $J=4.8$ Hz, 4H), 2.60 (t, $J=5.0$ Hz, 4H), 2.36 (s, 3H); HRMS-ESI calcd for $C_{29}H_{29}N_4O_2$ ($M+H$)⁺ 465.2285, found 465.2282.

1-(3-氟-4-溴苯甲酰基)-3-[4-(*N*-甲基-1-哌嗪基)]苯基-5-(2-呋喃基)-4,5-二氢吡唑(**18**): 淡黄色固体, m.p. 169~171 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.45 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.38 (t, $J=7.4$ Hz, 1H), 7.19~7.27 (m, 3H), 6.79 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 6.33 (d, $J=3.1$ Hz, 1H), 6.26 (d, $J=1.8$ Hz, 1H), 5.72~5.76 (dd, $J=4.6, 4.6$ Hz, 1H), 3.50~3.57 (dd, $J=11.5, 11.4$ Hz, 1H), 3.35~3.41 (dd, $J=4.6, 4.6$ Hz, 1H), 3.23 (t, $J=4.8$ Hz, 4H), 2.52 (t, $J=4.9$ Hz, 4H), 2.29 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 162.5, 160.7, 158.1, 155.6, 152.7, 151.8, 142.3, 131.3, 131.2, 128.2, 127.2, 121.4, 119.5, 119.3, 114.9, 110.7, 107.8, 54.8, 54.1, 47.9, 46.1, 38.5, 34.0; HRMS-ESI calcd for $C_{25}H_{25}N_4O_2FBr$ ($M+H$)⁺ 511.1139, found 511.1137.

1-(2,4-二氯苯氧乙酰基)-3-[4-(*N*-甲基-1-哌嗪基)]苯基-5-(2-呋喃基)-4,5-二氢吡唑(**19**): 淡褐色粘稠状. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.56 (d, $J=8.9$ Hz, 2H), 7.24 (d, $J=2.5$ Hz, 1H), 7.19 (s, 1H), 6.99~7.01 (dd, $J=2.5, 2.6$ Hz, 1H), 6.84 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 6.71 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 6.26 (d, $J=3.1$ Hz, 1H), 6.20~6.21 (dd, $J=1.8, 1.8$ Hz, 1H), 5.54~5.58 (dd, $J=4.9, 5.0$ Hz, 1H), 5.08 (s, 1H), 5.05 (s, 1H), 3.42~3.50 (dd, $J=11.5, 11.4$ Hz, 1H), 3.32~3.37 (dd, $J=5.0, 5.0$ Hz, 1H), 3.25 (t, $J=4.8$ Hz, 4H), 2.52 (t, $J=5.0$ Hz, 4H), 2.28 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 164.5, 155.7, 153.1, 152.7, 151.4, 142.0, 130.0, 128.2, 127.4, 126.2, 123.9, 120.9, 114.9, 114.8, 110.7, 108.2, 67.3, 54.7, 53.5, 47.7, 46.0, 37.8; HRMS-ESI calcd for $C_{26}H_{27}N_4O_3Cl_2$ ($M+H$)⁺ 513.1455, found 513.1453.

3.3 抗炎活性测试

以地塞米松(Dexamethasone)为阳性对照, 采用细菌脂多糖诱导小鼠巨噬细胞炎症模型(LPS-RAW264.7)测试目标化合物的体外抗炎活性. 将对数期生长的 RAW264.7 细胞(1×10^6 个/mL, 100 μ L/孔)接种于 96 孔培养板中, MTT 法测定各化合物(40、20、10、5、2.5、1.25 μ mol/L)的细胞毒性. 确定无毒浓度后, 取对数期生长的 RAW264.7 细胞(2×10^6 个/mL, 100 μ L/孔)接种于 96

孔培养板中, 设空白对照组, LPS 模型组(加入终浓度为 1.5 μ g/mL 的 LPS), 待测化合物组(同时加入药物和终浓度为 1.5 μ g/mL 的 LPS), 地塞米松组(终浓度为 10 μ mol/L 地塞米松和终浓度为 1.5 μ g/mL LPS), 37 °C, 5 % CO₂ 培养 24 h 后, 收集培养上清, 采用 Griess 法检测各培养上清液中 NO 含量, 并计算 IC₅₀ 值.

3.4 抗肿瘤活性测试

以 5-氟尿嘧啶(5-FU)为对阳性对照, 采用 MTT 法测定目标化合物的体外抗肿瘤活性. 取对数生长期的肿瘤细胞(5×10^4 个/mL)接种于 96 孔板中, 培养过夜后加入化合物, 设置 6 个浓度梯度, 每个浓度 3 个复孔. 作用 48 h 后, 每孔加入 20 μ L 5 mg/mL 的 MTT, 继续培养 4 h, 于 3000 rpm 离心 10 min, 弃去培养液, 加入 150 μ L DMSO, 酶标仪 570 nm 波长测定吸光度, 并计算 IC₅₀ 值.

辅助材料(Supporting Information) 所有化合物的 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 及部分 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] Chimenti, F.; Bizzarri, B.; Manna, F.; Bolasco, A.; Secci, D.; Chimenti, P.; Granese, A.; Rivanera, D.; Lilli, D.; Scaltrito, M. M.; Brenciaglia, M. I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 603.
- [2] Chimenti, F.; Fioravanti, R.; Bolasco, A.; Manna, F.; Chimenti, P.; Secci, D.; Rossi, F.; Turini, P.; Ortus, F.; Alcaro, S.; Cardia, M. C. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 2262.
- [3] Zhang, Y. P.; Tan, W.; Yang, Y. S.; Sun, S. Q.; Guo, H. S. *Chin. J. Org. Chem.* **2015**, *35*, 1985 (in Chinese). (张应鹏, 谭伟, 杨云裳, 孙世琪, 郭慧琛, 有机化学, **2015**, *35*, 1985.)
- [4] Chundawat, T. S.; Sharma, N.; Bhagat, S. *Med. Chem. Res.* **2014**, *23*, 1350.
- [5] Banday, A. H.; Shameem, S. A.; Jeelani, S. *Steroids* **2014**, *92*, 13.
- [6] Deng, H.; Yu, Z. Y.; Shi, G. Y.; Chen, M. J.; Tao, K.; Hou, T. P. *Chem. Biol. Drug Des.* **2012**, *79*, 279.
- [7] Ahmad, P.; Woo, H.; Jun, K. Y.; Kadi, A. A.; Abdel-Aziz, H. A.; Kwon, Y.; Rahman, A. F. M. M. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 1898.
- [8] Amir, M.; Ali, S.; Somakala, K. *Indian J. Chem.* **2016**, *55B*, 478.
- [9] Cetin, A.; Cansiz, A.; Digrak, M. *Heteroat. Chem.* **2003**, *14*, 345.
- [10] Manna, K.; Agrawal, Y. K. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 3831.
- [11] Ma, Y. L.; Zheng, X.; Gao, H.; Wan, C. P.; Rao, G. X.; Mao, Z. W. *Molecules* **2016**, *21*, 1684.
- [12] Mao, Z. W.; Zheng, X.; Qi, Y.; Zhang, M. D.; Huang, Y.; Wan, C. P.; Rao, G. X. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 7723.
- [13] Lin, Y. P.; Hu, C. Y.; Zheng, X.; Wang, X. L.; Wan, C. P.; Mao, Z. W. *Chin. J. Org. Chem.* **2017**, *37*, 237 (in Chinese). (林玉萍, 虎春艳, 郑喜, 王秀丽, 万春平, 毛泽伟, 有机化学, **2017**, *37*, 237.)
- [14] Li, Y. K.; Liu, B.; Zhang, L. J.; Zhu, J. H.; Wang, C. P.; Mao, Z. W. *Chin. J. Org. Chem.* **2018**, *38*, 949 (in Chinese). (黎勇坤, 刘蓓, 张丽君, 朱加洪, 万春平, 毛泽伟, 有机化学, **2018**, *38*, 949.)

(Li, L.; Fan, Y.)