

氮杂环并二氢嘧啶及嘧啶衍生物的合成及生物活性评价

张平竹 王晓芬 郑雪阳 连平平 魏超 李小六*

(河北大学化学与环境科学学院 河北省化学生物学重点实验室 河北大学药物化学与分子诊断教育部重点实验室 保定 071002)

摘要 利用微波促进,以芳香醛、乙酰乙酸乙酯、2-氨基咪唑或 3-氨基-1,2,4-三唑为原料,通过 Knoevenagel 缩合反应和 Atwal 改进的 Biginelli 反应串联,简便、高效地合成了系列新型芳基取代咪唑(三唑)并二氢嘧啶衍生物。对所合成化合物进一步芳构化,得到系列氮杂环并嘧啶类化合物,为此类嘧啶化合物的合成提供一条简便的途径。对所合成的部分化合物进行了体外肿瘤细胞(Hela 和 A549)的细胞毒性及苹果树腐烂病菌的抑制活性测试。

关键词 Knoevenagel 缩合反应; Biginelli 反应; 咪唑并二氢嘧啶; 三唑并二氢嘧啶; 氮杂环并嘧啶

Synthesis and Biological Activity of Azaclozodihydropyrimidine and Pyrimidine Derivatives

Zhang, Pingzhu Wang, Xiaofen Zheng, Xueyang Lian, Pingping
Wei, Chao Li, Xiaoliu*

(Key Laboratory of Chemical Biology of Hebei Province, Key Laboratory of Medicinal Chemistry and Molecular Diagnosis of Ministry of Education, School of Chemistry and Environmental Science, Hebei University, Baoding 071002)

Abstract A series of novel aryl-substituted imidazo[1,2-*a*]pyrimidine and triazolo[1,5-*a*]pyrimidine were synthesized by the tandem reaction of Knoevenagel and Atwal modified Biginelli, following by aromatization. Some of their cytotoxic activities against Hela and A549 cells and inhibition for apple tree canker were preliminarily evaluated.

Keywords Knoevenagel reaction; Biginelli reaction; imidazo[1,2-*a*]dihydropyrimidine; imidazo[1,2-*a*]pyrimidine; triazolo[1,5-*a*]pyrimidine

二氢嘧啶和嘧啶为非常重要的含氮化合物,广泛存在于自然界中,其衍生物具有重要的生物活性。杂环并二氢嘧啶及杂环并嘧啶类化合物分子中同时具有如吡唑、咪唑、三唑等杂环和二氢嘧啶或嘧啶两种重要的活性结构单元,具有广泛生物活性及药效性^[1~6],如钙通道阻滞剂、抗高血压、抗癌、抗病毒(HIV)、抗菌和抗结核等,因而在医药和农药界备受关注,设计合成新型二氢嘧啶衍生物以及进行生物活性研究,对发现新型药物先导化合物进而进行药物开发具有重要意义。

目前,二氢嘧啶类衍生物所采用的合成方法主要有两种(图 1):一种是传统的酸催化下 1,3-二羰基化合物、

芳香醛、脲或硫脲的 Biginelli^[7]三组分一锅法缩合反应,该方法经近些年的不断改进及开发日趋成熟^[8~11],广泛用于二氢嘧啶酮类化合物的合成,但在收率及合成结构的多样性上仍有所欠缺。另一种是 Atwal 改进的 Biginelli 反应^[12~14],即烯酮与取代的脲或硫脲在弱碱性条件下的环缩合反应,虽然该方法需首先合成烯酮而使反应步骤不如前一种简单,但由于该方法反应的可靠性、合成结构的多样性及应用广泛性,同样备受关注^[9]。氮杂环并二氢嘧啶酮类化合物一般采用第二类方法在 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)中加热,所需时间较长且收率较低^[15~17]。

* Corresponding author. E-mail: lixl@hbu.cn

Received April 11, 2018; revised July 19, 2018; published online August 14, 2018.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21572044, 21372060, 21172051), Hebei Natural Science Foundation (No. B2016201031) and Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (No. IRT-15R43), the Colleges and Universities Science Technology Research Project of Hebei Province (No. QN2017015).

国家自然科学基金(Nos. 21572044, 21372060, 21172051)、河北省自然科学基金(No. B2016201031)、教育部长江学者创新团队发展计划(No. IRT_15R43)、河北省高等学校科学技术研究(No. QN2017015)资助项目。

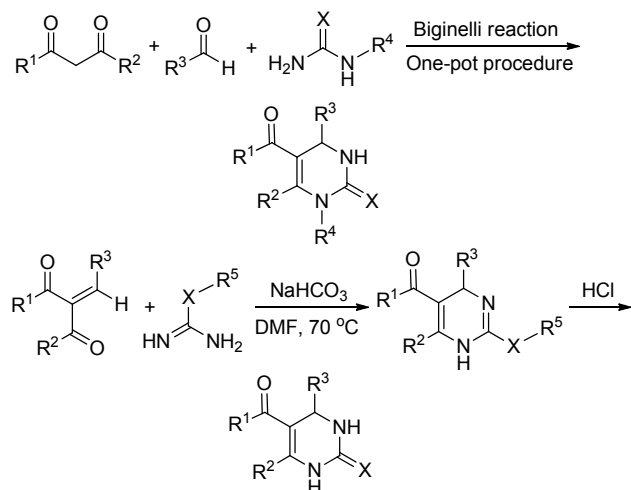


图1 Biginelli 反应和 Atwal 改进的 Biginelli 反应.

Figure 1 Biginelli reaction and Atwal modification Biginelli reaction

微波促进的有机化学反应, 由于具有反应时间短、收率高、副反应少、操作简便及环境友好等优点. 近年来在有机合成尤其是杂环化合物的合成中得到广泛应用^[7], 本文利用微波促进的方法, 以芳香醛、乙酰乙酸乙酯、2-氨基咪唑(3-氨基-1,2,4-三唑)为原料, 通过 Knoevenagel 缩合反应及 Atwal 改进的 Biginelli 缩环反应, 设计并简便、高效地合成了系列咪唑(三唑)并嘧啶类衍生物. 对部分目标化合物的苹果树腐烂病菌的抑制活性及抗肿瘤活性进行了初步测试.

1 结果与讨论

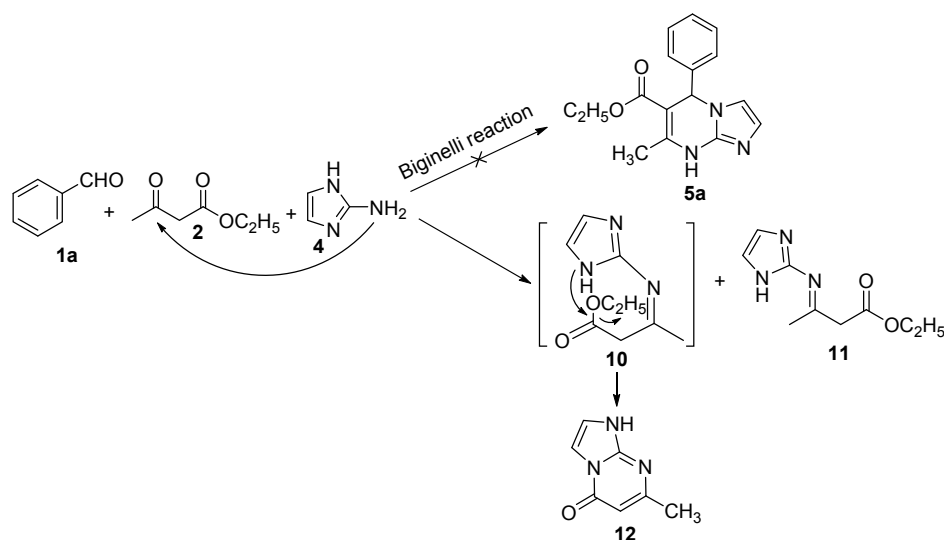
1.1 化合物的合成

首先设计以芳香醛、乙酰乙酸乙酯、2-氨基咪唑在

路易斯酸催化下经 Biginelli 反应三组分一锅法合成咪唑并二氢嘧啶衍生物, 利用传统方法及微波促进方法进行了化合物的合成, 结果未得到预期产物 **5a**, 产物结构经 NMR 及质谱分析, 确证为化合物 **11** 和 **12** (Scheme 1), 生成两化合物比例随反应条件的不同而有所变化. 从实验条件及实验结果分析, 反应过程应为: 在路易斯酸催化下, 氨基咪唑首先与乙酰乙酸乙酯进行羰基的亲核加成反应, 然后脱水生成顺、反异构体亚胺 **10** 和 **11**, 化合物 **10** 随即经酯的氨解、并环、异构得到化合物 **12**, 而苯甲醛未参与反应, 如 Scheme 1 所示. 对此经实验验证, 即在相同条件下, 反应体系中只加入化合物 **2** 和 **4**, 不加苯甲醛(**1a**), 所得产物为化合物 **11** 和 **12**. 说明在所采用的酸性条件下, 该三组分不能进行 Biginelli 反应. 碱催化下则反应较为复杂, 虽能得到目标产物 **5a**, 但收率很低. 采用 Atwal 改进的 Biginelli 反应对化合物的合成进行了探讨, 首先利用苯甲醛与乙酰乙酸乙酯通过 Knoevenagel 缩合反应合成芳香基 α,β -不饱和二羰基化合物, 然后将该合成产物与氨基咪唑在微波促进下进行 Atwal 改进的 Biginelli 反应. 合成了系列二氢嘧啶类化合物 **5** 和 **7**, 如 Scheme 2 所示. 然后选择氧化剂将化合物 **5** 和 **7** 进行芳构化, 如 Scheme 3 所示, 合成系列咪唑并嘧啶及咪唑并三唑类化合物 **8** 和 **9**.

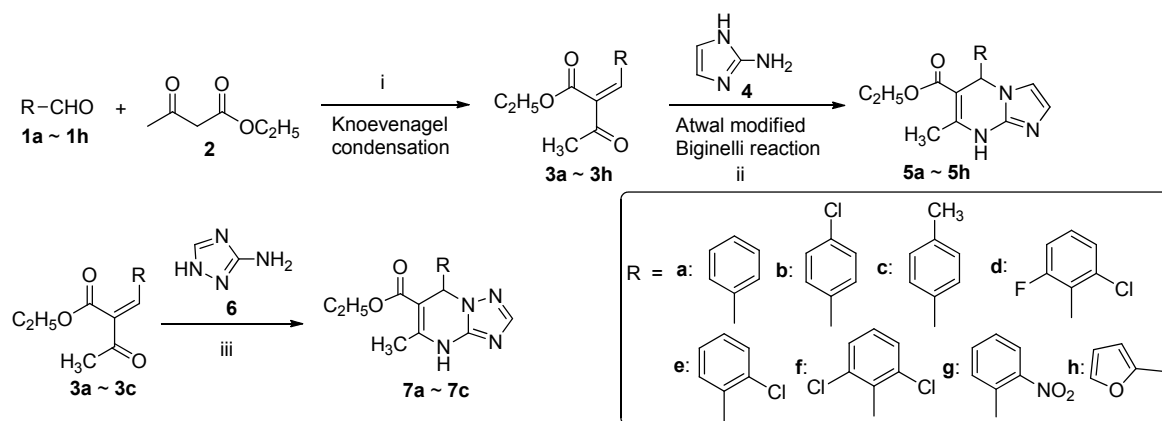
1.1.1 化合物 **3** 的合成

利用芳香醛和乙酰乙酸乙酯碱性条件下的 Knoevenagel 缩合反应合成芳香基 α,β -不饱和二羰基化合物. 研究表明, 催化剂、溶剂及反应温度等对该反应有明显的影响, 参考有关芳香醛的 Knoevenagel 缩合反应文献^[15,22], 以苯甲醛(**1a**)为原料, 探讨了微波辐射下, 反应温度、时间、原料配比及催化剂用量等对反应的影



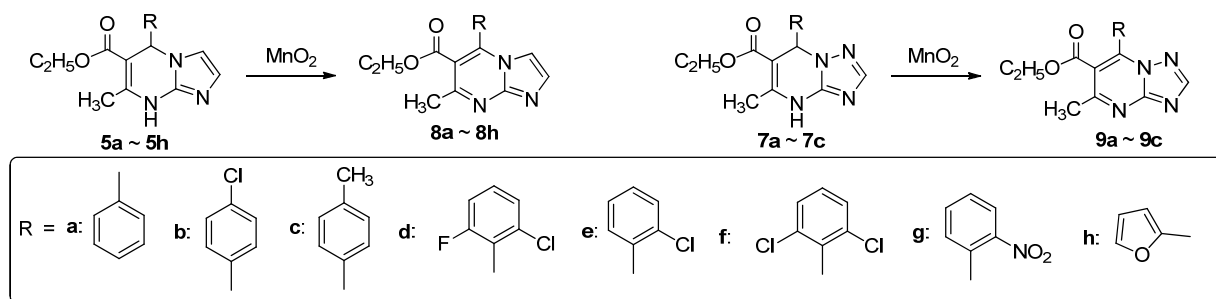
图式1 苯甲醛、乙酰乙酸乙酯和氨基咪唑的三组分一锅法反应

Scheme 1 Three-component one-pot Biginelli reaction



Reagents and conditions: (i) pyridine, piperidine (1 equiv.), AcOH (0.5 equiv.), M.W.; (ii) DMF, AcONa (1.5 equiv.), M.W., 130 °C; (iii) DMF, M.W., 160 °C

图式 2 化合物 5 和 7 的合成
Scheme 2 Synthesis of compounds 5 and 7



图式 3 化合物 8 和 9 的合成
Scheme 3 Synthesis of compounds 8 and 9

响, 并对反应条件进行了优化. 操作为: 在 10 mL 微波反应管中依次加入一定量的苯甲醛、乙酰乙酸乙酯、溶剂、催化剂及粉末分子筛, 在微波辐射下反应, 部分结果列于表 1.

该反应为芳香醛与 β -二羰基类化合物的活性亚甲基的羟醛缩合, 然后失水生成 α,β -不饱和二羰基化合物. 一般采用非质子溶剂, 因质子性溶剂抑制消除反应即失水步骤的进行; 常用催化剂有: 一、二、三级胺及其相应的盐、路易斯酸与三级胺组合物(如 $\text{TiCl}_4/\text{Et}_3\text{N}$)、KF 或其它无机化合物等; 分子筛等除水剂的加入可促进反应的进行. 故选用对反应原料溶解性较好的吡啶作为溶剂, 加入醋酸, 利用吡啶及其醋酸盐作为催化剂, 分子筛为除水剂. 但从反应情况看, 催化效果并不理想, 加入适量哌啶使反应效率得到明显提高; 从表 1 可以看出, 在相同条件下, 温度对反应有明显的影响. 随着温度的升高, 反应转化率不断提高, 收率不断提高, 当温度升到 70 °C, 反应 10 min, 原料基本反应完全, 收率 71%. 进一步提高温度, 则因副反应增多而使收率降低; 在相同的反应条件下, 随反应时间的延长, 收率提高, 当反应时间达到 10 min 后, 进一步延长反应时间, 收率无明

表 1 化合物 3a 合成条件探讨
Table 1 Condition of the synthesis of compound 3a

Entry	2/equiv.	Piperidine/acetic acid (equiv./equiv.)	Reaction condition ^a	Yield/% of 3a
1	1.0	0/0	50 °C, 10 min	40
2	1.0	0/0	60 °C, 10 min	43
3	1.0	0/0	70 °C, 10 min	46
4	1.0	0/0	80 °C, 10 min	44
5	1.0	0/0.3	70 °C, 10 min	60
6	1.0	0/0.3	70 °C, 15 min	61
7	1.0	0/0.5	70 °C, 10 min	60
8	1.0	0.5/0.3	70 °C, 10 min	68
9	1.0	1.0/0.3	70 °C, 10 min	70
10	1.0	1.5/0.3	70 °C, 10 min	66
11	1.0	1.0/0	70 °C, 10 min	62
12	1.2	1.2/0.3	70 °C, 10 min	71
13	1.5	1.0/0.3	70 °C, 10 min	68
14	1.2	1.0/0.3	65 °C, 10 min	87
16	1.2	1.0/0.3	75 °C, 10 min	86
17	1.2	1.0/0.3	80 °C, 10 min	60
18	1.2	1.0/0.3	80 °C, 5 min	60
19	1.2	1.0/0.3	70 °C, 5 min	81
20	1.2	1.0/0.3	70 °C, 15 min	91

^a Solvent: pyridine; dehydrant: zeolite, M.W.

显变化. 因此, 选择微波辐射下 70 °C 反应 10 min 进行其它条件的探讨. 在实验中发现, 当醛、乙酰乙酸乙酯的物质的量比为 1.0 : 1.0 的时候收率不是特别理想 (71%), 当乙酰乙酸乙酯的物质的量比由 1.0 增加到 1.2 时, 收率提高到 90%, 进一步增加乙酰乙酸乙酯的量, 收率基本无变化. 因此, 选用 1.2 equiv. 的乙酰乙酸乙酯即表 1 中的 Entry 15 为参考条件进行芳香基 α,β -不饱和二羰基化合物(3)的合成. 利用薄层色谱(TLC)监测反应, 相似反应条件下, 较高收率得到除 3g 外的化合物 3, 结果见表 2. 在化合物 3g 的合成中由于 2-硝基的强吸电子作用, 使得 2-硝基苯甲醛的反应活性很高, 70 °C 时, 反应较为复杂, 与其它芳香醛比较副反应明显增多, 收率较低, 只有 50%, 调整反应温度, 40 °C 时收率最高, 为 91%.

1.1.2 化合物 5 的合成

Atwal 改进的 Biginelli 反应, 通常在弱碱作为催化剂的 DMF 溶液中加热进行, 反应时间较长(通常 12 h 以上). 本文利用 Knoevenagel 缩合反应制备的苯基 α,β -不饱和二羰基化合物(3a)与 2-氨基咪唑硫酸盐(4)在醋酸钠催化下, 进行了微波促进反应条件的探讨. 醋酸钠的作用一是将 2-氨基咪唑从其硫酸盐中游离出来, 二是提供碱性条件, 实验结果列于表 2. 从表 2 可以看出, 在相同条件下, 温度对反应有明显的影响. 80 °C 反应 15 min, 收率为 40%, 其余为未反应的原料. 当温度升高到 130 °C 时, 收率达 71%, 原料基本反应完全. 进一步提高温度(150 °C), 副反应增多, 收率降低. 在相同的反应条件下, 随反应时间的延长, 收率提高, 当反应时间达到 15 min 后, 进一步增加反应时间, 收率基本无变化. 因此, 本实验选择在微波辐射下 130 °C 反应 15 min. 同样对原料配比进行了探讨, 当 3a 与 2-氨基咪唑的物质的量比为 1.0 : 1.0 时收率为 71%, 当 2-氨基咪唑的物质的量比由 1.0 增加到 1.2 时收率提高至 78%, 继续增加至 1.5 时, 收率为 78%, 再继续增加时收率则无明显变化, 因此, 选用 1.2 equiv. 的 2-氨基咪唑. 经以上反应条件的优化, 得到较理想条件(表 2, Entry 9), 参照该条件进行系列目标产物 5 的合成. 均以较高收率(53~91%)得到目标产物 5.

1.1.3 化合物 7 的合成

对三唑并二氢嘧啶类化合物 7 的合成进行了反应条件的探讨. 氨基三唑的反应活性低于 2-氨基咪唑, 需要较高的反应温度及较长的反应时间. 实验发现, 直接使用过量氨基三唑为原料同时提供碱性条件比另外加入碱醋酸钠为催化剂效果更佳, 故选择在含过量三唑(1.2 equiv.)的 DMF 溶液中, 160 °C 微波促进反应进行三唑并二氢嘧啶类化合物 7 的合成, 收率为 55~78%.

表 2 化合物 5a 合成条件优化

Table 2 Condition of the synthesis of compound 5a

Entry	4/NaOAc (equiv./equiv.)	Reaction condition ^a	Yield/% of 5a
1	1.0/1.2	80 °C, 15 min	40
2	1.0/1.2	100 °C, 15 min	45
3	1.0/1.2	120 °C, 15 min	61
4	1.0/1.2	130 °C, 15 min	71
5	1.0/1.2	140 °C, 15 min	68
6	1.0/1.2	150 °C, 15 min	56
7	1.0/1.0	130 °C, 15 min	38
8	1.2/1.2	130 °C, 15 min	57
9	1.2/1.5	130 °C, 15 min	78
10	1.2/1.5	130 °C, 10 min	61
11	1.2/1.5	130 °C, 20 min	78
12	1.5/1.8	130 °C, 15 min	78
13	2.0/2.4	130 °C, 15 min	78

^a The reactions were done in DMF solven under microwave irradiation.

1.1.4 化合物 8 的合成

以化合物 5a 为例, 对其芳构化条件进行了探讨. 部分条件列于表 3, 结果表明, 以 1,2-二氯乙烷为溶剂, 二氧化锰为氧化剂, 分子筛(4Å MS)作用下, 80 °C 下微波反应 10 min 为最佳(表 3, Entry 3). 参照此反应条件, 对化合物 5b~5h 分别进行了芳构化反应, 收率为 10%~17%.

表 3 化合物 5a 芳构化条件探讨

Table 3 Condition of the aromatization of compound 5a

Entry	m(4Å MS)/ m(5a)	Oxidizer (equiv.)	Time/min	Reaction condition	Yield/% of 8a
1	0	MnO ₂ (10)	10	M.W., 100 °C	11
2	10	MnO ₂ (10)	10	M.W., 100 °C	12
3	5	MnO ₂ (10)	10	M.W., 80 °C	15
4	10	MnO ₂ (10)	10	M.W., 70 °C	12
5	20	MnO ₂ (10)	10	M.W., 70 °C	10
6	5	NBS	10	M.W., 80 °C	0
8	5	TCBQ	10	M.W., 80 °C	3

1.1.5 化合物 9 的合成

对化合物 7a 的芳构化反应进行了探讨, 部分条件列于表 4. 结果表明, 以 1,2-二氯乙烷为溶剂, 二氧化锰为芳构化试剂, 150 °C 下微波反应 10 min 为最佳(表 4, Entry 6). 参照此反应条件, 对化合物 7b 和 7c 分别进行了芳构化反应, 得化合物 9, 收率分别为 62%和 84%.

1.2 化合物的细胞毒性

利用 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)^[23]法, 以 Fluorouracil 为阳性对照, 对所合成目标化合物 5 和 7 分别进行了体外抑制宫颈癌 Hela 和肺癌 A549 肿瘤细胞的活性测试. 从活性数据(见辅助材料, 表 S1)看, 化合物 5 和 7 对所测肿瘤细胞 A549 和 Hela 均无明显抑制作用, 但对数据分析可以发现, 对化合物

表 4 化合物 7a 芳构化条件探讨
Table 4 Condition of the aromatization of compound 7a

Entry	Solvent	Oxidizer (equiv.)	Time/min	Reaction condition	Yield/% of 9a
1	C ₆ H ₅ Cl	TCBQ (2)	15	M.W., 150 °C	10
2	C ₆ H ₅ Cl	DDQ (2)	15	M.W., 150 °C	0
3	C ₆ H ₅ Cl	NBS (2)	15	M.W., 150 °C	0
4	C ₆ H ₅ Cl	MnO ₂ (10)	15	M.W., 150 °C	63
5	DCM	MnO ₂ (10)	15	M.W., 115 °C	50
6	ClCH ₂ CH ₂ Cl	MnO ₂ (10)	10	M.W., 150 °C	64
8	ClCH ₂ CH ₂ Cl	MnO ₂ (5)	10	M.W., 150 °C	56

5 而言, 在苯环上引入取代基可增强化合物对肿瘤细胞 A549 的抑制作用, 其中邻位双氯代效果最为明显, 其次为单氯代, 而对位氯代则效果较不明显. 而对 Hela 而言, 除邻位双氯代可以增加化合物对其抑制作用, 其它取代基的引入均对其抑制作用无增进效果. 三唑并二氢嘧啶对肿瘤细胞 A549 的抑制作用优于相应结构的咪唑并二氢嘧啶化合物.

1.3 化合物对苹果树腐烂病菌有抑制作用

采用生长速率法, 以 45%代森铵为阳性对照品, 测试了化合物 5 和 7 抑苹果树腐烂病菌活性. 测试结果显示(见辅助材料, 表 S2)所测大部分化合物对苹果树腐烂病菌有一定的抑制作用, 呋喃杂环取代的咪唑并二氢嘧啶化合物, 活性较好, 与阳性对照药物 45%代森铵相当. 在苯基取代的咪唑并二氢嘧啶结构中, 苯环上取代基的引入, 可明显提高其抑制效果. 苯环 1,6-位同时被取代的具有较好的生物活性, 对位有取代基的化合物活性优于 1,6-位只有一个位置有取代基的化合物.

2 结论

利用微波促进的方法, 以哌啶、醋酸为催化剂, 吡啶为溶剂, 在 70 °C 封管中反应 10 min, 由芳香醛或杂环醛和乙酰乙酸乙酯通过 Knoevenagel 缩合合成了化合物 3a~3h, 进一步与 2-氨基咪唑或氨基三氮唑微波促进下进行 Atwal 改进的 Biginelli 反应, 高收率得到系列咪唑并二氢嘧啶、三唑并二氢嘧啶类化合物, 得到了利用微波促进, 简便、高效制备咪唑并二氢嘧啶类化合物的方法. 对所合成的新化合物进行了抗肿瘤及抗菌活性测试, 结果表明, 部分化合物对苹果树腐烂病菌具一定的抑制活性, 所有化合物对肿瘤细胞 A-549 和 Hela 均无明显的抑制作用.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

Bruker AC-P600 型核磁共振仪(600 MHz), 四甲基硅烷(TMS)为内标; FTICR-MS(Ionspec 7.0T)型质谱仪,

ESI 离子源; Discover S-Class 微波化学合成系统(美国 CEM 公司); SGW-1 X-4 显微熔点仪(温度计未校正), 上海精密科学仪器有限公司; 柱层析用硅胶(200~300 目)及 GF254 薄层层析硅胶为青岛海洋化工厂产品. 所用试剂和溶剂均为国产或进口(Aldrich 和 TCI 等公司)分析纯或化学纯试剂, 无水试剂均按常规方法处理.

3.2 实验方法

3.2.1 化合物 5 的合成

于 10 mL 微波管中加入芳香醛(1) (1.0 mmol)、乙酰乙酸乙酯(1.2 mmol, 156 mg)、哌啶(1.0 mmol, 85 mg)、吡啶(3 mL)、醋酸(0.3 mmol, 18 mg)及粉末分子筛. 微波辐射下, 70 °C 封管反应 10 min, 冷却至室温, 减压浓缩, 残留物用二氯甲烷萃取, 水洗, 饱和食盐水洗, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 旋蒸蒸除溶剂, 得化合物 3 粗品. 将所得化合物 3 粗品、2-氨基咪唑硫酸盐(1.2 mmol, 158 mg)、无水醋酸钠(1.2 mmol, 98 mg)及 DMF (3 mL)加入到 10 mL 微波管中, 微波辐射下 120 °C 封管反应 10 min, 冷却至室温, 减压浓缩, 残留物用异丙醚重结晶得化合物 5, 收率 53~91%.

7-甲基-5-苯基-6-乙氧甲酰基-5,8-二氢咪唑并[1,2-a]嘧啶(5a): 产率 78%, 淡黄色固体. m.p. 187.1~188.5 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ: 7.22~7.31 (m, 5H, ArH), 6.73 (d, *J*=1.8 Hz, 1H, CH), 6.47 (d, *J*=1.2 Hz, 1H, CH), 6.20 (s, 1H, CH), 4.01~4.08 (m, 2H, CH₂), 2.56 (s, 3H, CH₃), 1.14 (t, *J*=7.2 Hz, 3H, CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ: 14.1, 19.0, 37.5, 44.7, 62.5, 71.0, 110.8, 120.5, 123.2, 128.7, 129.1, 129.3, 152.4, 172.1, 196.4; HRMS calcd for C₁₆H₁₇N₃O₂ 283.1321, found 283.1325.

7-甲基-5-(4-氯苯基)-6-乙氧甲酰基-5,8-二氢咪唑并[1,2-a]嘧啶(5b): 产率 91%, 淡黄色固体. m.p. 192.3~193.7 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ: 7.22~7.26 (m, 4H, ArH), 6.74 (d, *J*=1.8 Hz, 1H, ArH), 6.44 (s, 1H, ArH), 6.18 (s, 1H, ArH), 4.02~4.10 (m, 2H, CH₂), 2.55 (s, 3H, CH₃), 1.16 (t, *J*=7.2 Hz, 3H, CH₃); HRMS calcd for C₁₆H₁₆ClN₃O₂ 317.0931, found 317.0927.

7-甲基-5-(4-甲氧基)-6-乙氧甲酰基-5,8-二氢咪唑并[1,2-a]嘧啶(5c): 产率 83%, 淡黄色固体. m.p. 200.0~200.5 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ: 7.21 (d, *J*=6.0 Hz, 1H, ArH), 7.11 (d, *J*=6.0 Hz, 1H, ArH), 6.49 (s, 1H, CH), 6.19 (s, 1H, CH), 4.07 (d, *J*=5.4 Hz, 2H, CH₂), 2.57 (s, 3H, CH₃), 2.33 (s, 3H, CH₃), 1.19 (t, *J*=6.6 Hz, 3H, CH₃); HRMS calcd for C₁₇H₁₉N₃O₂ 297.1477, found 297.1472.

7-甲基-5-(2-氟-6-氯苯基)-6-乙氧甲酰基-5,8-二氢咪

唑并[1,2-*a*]嘧啶(**5d**): 产率 80%, 淡黄色固体. m.p. 238.5~239.2 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ: 7.17~7.18 (m, 2H, ArH), 6.91~6.94 (m, 2H, ArH, CH), 6.75 (d, *J*=1.8 Hz, 1H, CH), 6.47 (s, 1H, CH), 4.02~4.04 (m, 2H, CH₂), 2.55 (s, 3H, CH₃), 1.10 (t, *J*=7.2 Hz, 3H, CH₃); HRMS calcd for C₁₆H₁₅ClFN₃O 335.0837, found 335.0843.

7-甲基-5-(2-氯苯基)-6-乙氧甲酰基-5,8-二氢咪唑并[1,2-*a*]嘧啶(**5e**): 产率 87%, 淡黄色固体. m.p. 236.8~236.9 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ: 7.28~7.39 (m, 2H, ArH), 7.18~7.23 (m, 2H, ArH), 6.81 (s, 1H, CH), 6.73 (d, *J*=1.2 Hz, 1H, CH), 6.70 (d, *J*=1.2 Hz, 1H, CH), 3.97~4.05 (m, 2H, CH₂), 2.63 (s, 3H, CH₃), 1.08 (t, *J*=7.2 Hz, 3H, CH₃); HRMS calcd for C₁₆H₁₆ClN₃O₂ 317.0931, found 317.0927.

7-甲基-5-(2,6-二氯苯基)-6-乙氧甲酰基-5,8-二氢咪唑并[1,2-*a*]嘧啶(**5f**): 产率 84%, 淡黄色固体. m.p. 268.4~269.8 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ: 7.37 (d, *J*=8.4 Hz, 1H, ArH), 7.25 (d, *J*=8.4 Hz, 1H, ArH), 7.16 (d, *J*=6.6 Hz, 1H, ArH), 7.15 (d, *J*=7.8 Hz, 1H, ArH), 6.77 (d, *J*=1.8 Hz, 1H, ArH), 6.41 (d, *J*=1.8 Hz, 1H, ArH), 3.97~4.06 (m, 2H, CH₂), 2.54 (s, 3H, CH₃), 1.07 (t, *J*=7.2 Hz, 3H, CH₃); HRMS calcd for C₁₆H₁₅Cl₂N₃O₂ 351.0541, found 351.0545.

7-甲基-5-(2-硝基苯基)-6-乙氧甲酰基-5,8-二氢咪唑并[1,2-*a*]嘧啶(**5g**): 产率 80%, 黄色固体. m.p. 256.5~258.0 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ: 7.79 (d, *J*=7.2 Hz, 1H, ArH), 7.49~7.53 (m, 2H, ArH), 7.36~7.39 (m, 1H, ArH), 6.93 (d, *J*=1.8 Hz, 1H, CH), 6.86 (s, 1H, CH), 6.78 (d, *J*=1.8 Hz, 1H, CH), 3.94~4.01 (m, 2H, CH₂), 2.60 (s, 3H, CH₃), 1.03 (t, *J*=7.2 Hz, 3H, CH₃); HRMS calcd for C₁₆H₁₆N₄O₄ 328.1172, found 328.1176.

7-甲基-5-(2-呋喃基)-6-乙氧甲酰基-5,8-二氢咪唑并[1,2-*a*]嘧啶(**5h**): 产率 53%, 土黄色固体. m.p. 197.1~198.4 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ: 7.29 (s, 1H, CH), 6.75 (s, 1H, CH), 6.70 (s, 1H, CH), 6.30 (s, 1H, CH), 6.25 (s, 1H, CH), 6.17 (s, 1H, CH), 4.05~4.17 (m, 2H, CH₂), 2.57 (s, 3H, CH₃), 1.17 (t, *J*=7.2 Hz, 3H, CH₃); HRMS calcd for C₁₄H₁₅N₃O₃ 273.1113, found 273.1108.

3.2.2 化合物 7 的合成

将化合物 **3** (1.0 mmol)、3-氨基-1,2,4-三唑(1.2 mmol, 101 mg)及 DMF (3 mL)加入到 10 mL 微波管中, 微波辐射下, 160 °C 封管反应 15 min, 冷却至室温, 减压浓缩, 残余物用异丙醚重结晶得化合物 **7**, 收率 53~91%.

5-甲基-7-苯基-6-乙氧甲酰基-4,7-二氢[1,2,4]三唑并

[1,5-*a*]嘧啶(**7a**): 产率 78%, 白色固体. m.p. 201.1~204.5 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ: 7.62 (s, 1H, CH), 7.34 (d, *J*=7.2 Hz, 2H, ArH), 7.32 (d, *J*=7.2 Hz, 2H, ArH), 7.26 (d, *J*=1.8 Hz, 1H, ArH), 6.43 (s, 1H, CH), 4.02~4.11 (m, 2H, CH₂), 2.58 (s, 3H, CH₃), 1.12 (t, *J*=7.2 Hz, 3H, CH₃); HRMS calcd for C₁₅H₁₆N₄O₂ 284.1273, found 284.1269.

5-甲基-7-(4-氯苯基)-6-乙氧甲酰基-4,7-二氢[1,2,4]三唑并[1,5-*a*]嘧啶(**7b**): 产率 55%, 白色固体. m.p. 256.1~257.4 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ: 7.65 (s, 1H, CH), 7.29~7.32 (m, 4H, ArH), 6.43 (s, 1H, CH), 4.08~4.12 (m, 2H, CH₂), 2.61 (s, 3H, CH₃), 1.17 (t, *J*=7.2 Hz, 3H, CH₃); HRMS calcd for C₁₅H₁₅ClN₄O₂ 318.0884, found 318.0880.

5-甲基-7-(4-甲苯基)-6-乙氧甲酰基-4,7-二氢[1,2,4]三唑并[1,5-*a*]嘧啶(**7c**): 产率 68%, 淡黄色固体. m.p. 213.1~217.8 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ: 7.65 (s, 1H, CH), 7.28~7.30 (m, 1H, ArH), 7.24 (d, *J*=7.8 Hz, 2H, ArH), 7.13 (d, *J*=7.8 Hz, 2H, ArH), 6.41 (s, 1H, CH), 4.09 (q, *J*=7.2 Hz, 2H, CH₂), 2.59 (s, 3H, CH₃), 2.32 (s, 3H, CH₃), 1.17 (t, *J*=7.2 Hz, 3H, CH₃); HRMS calcd for C₁₆H₁₈N₄O₂ 298.1430, found 298.1426.

3.2.3 化合物 8 的合成

于 5 mL 微波管中加入 281 mg (1 mmol)化合物 **5a**, 870 mg (10 mmol)二氧化锰, 3 mL 1,2-二氯乙烷, 415 mg 粉末分子筛, 微波辅助下 80 °C 反应 10 min. 过滤, 旋蒸蒸除溶剂, 剩余物经柱层析分离[*V*(石油醚): *V*(乙酸乙酯)=2:1]得化合物 **8a**. 参照此方法可得化合物 **8b**~**8h**, 收率 10~17%.

7-甲基-5-苯基-6-乙氧甲酰基咪唑并[1,2-*a*]嘧啶(**8a**): 产率 15%, 白色固体. m.p. 110.2~111.7 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ: 7.73 (d, *J*=1.2 Hz, 1H, ArH), 7.58~7.63 (m, 3H, ArH), 7.52 (dd, *J*=1.8, 7.8 Hz, 2H, ArH), 7.25 (d, *J*=1.8 Hz, 1H, ArH), 4.08 (q, *J*=7.2 Hz, 1H, CH₂), 2.74 (s, 3H, CH₃), 0.95 (t, *J*=7.2 Hz, 3H, CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ: 17.8, 22.2, 65.3, 120.2, 121.8, 123.0, 123.0, 133.2, 123.3, 130.9, 132.8, 132.9, 154.7, 168.4, 171.5, 196.0; HRMS calcd for C₁₆H₁₅N₃O₂ 281.1164, found 281.1160.

7-甲基-5-(4-氯苯基)-6-乙氧甲酰基咪唑并[1,2-*a*]嘧啶(**8b**): 产率 11%, 白色固体. m.p. 88.7~90.3 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ: 7.72 (s, 1H, ArH), 7.60 (d, *J*=8.4 Hz, 1H, ArH), 7.54 (t, *J*=7.2 Hz, 1H, ArH), 7.45 (t, *J*=7.8 Hz, 1H, ArH), 7.35 (d, *J*=7.8 Hz, 1H, ArH), 6.94 (s, 1H, ArH), 4.06 (q, *J*=7.2 Hz, 1H, CH₂), 2.77 (s, 3H,

CH₃), 0.94 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH₃); HRMS calcd for C₁₆H₁₄ClN₃O₂ 315.0775, found 315.0779.

7-甲基-5-(4-甲苯基)-6-乙氧甲酰基咪唑并[1,2-*a*]嘧啶(**8c**): 产率 12%. ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 7.72 (d, $J=1.2$ Hz, 1H, ArH), 7.41 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.39 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.27 (d, $J=1.2$ Hz, 1H, ArH), 4.11 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, CH₂), 2.72 (s, 3H, CH₃), 2.49 (s, 3H, CH₃), 1.01 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH₃); HRMS calcd for C₁₇H₁₇N₃O₂ 295.1321, found 295.1326.

7-甲基-5-(2-氟-6-氯苯基)-6-乙氧甲酰基咪唑并[1,2-*a*]嘧啶(**8d**): 产率 14%, 白色固体. m.p. 119.4~120.8 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 7.79 (d, $J=1.8$ Hz, 1H, ArH), 7.56~7.60 (m, 1H, ArH), 7.45 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, ArH), 7.25 (t, $J=8.4$ Hz, 1H, ArH), 7.00 (s, 1H, CH), 4.14~4.19 (m, 2H, CH₂), 2.86 (s, 3H, CH₃), 1.03 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH₃); HRMS calcd for C₁₆H₁₃ClFN₃O₂ 333.0680, found 333.0685.

7-甲基-5-(2-氯苯基)-6-乙氧甲酰基咪唑并[1,2-*a*]嘧啶(**8e**): 产率 12%, ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 7.66 (s, 1H, ArH), 7.54 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, ArH), 7.49 (t, $J=8.4$ Hz, 1H, ArH), 7.39 (t, $J=7.8$ Hz, 1H, ArH), 7.29 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, ArH), 4.00 (q, $J=7.2$ Hz, 1H, CH₂), 2.72 (s, 3H, CH₃), 0.86 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH₃); HRMS calcd for C₁₆H₁₄ClN₃O₂ 315.0775, found 315.0771.

7-甲基-5-(2,6-二氯苯基)-6-乙氧甲酰基咪唑并[1,2-*a*]嘧啶(**8f**): 产率 10%, 白色固体. m.p. 134.6~135.8 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 7.80 (d, $J=1.8$ Hz, 1H, ArH), 7.50~7.56 (m, 3H, ArH), 6.93 (d, $J=1.2$ Hz, 1H, CH), 4.16 (q, $J=7.2$ Hz, 1H, CH₂), 2.88 (s, 3H, CH₃), 1.01 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH₃); HRMS calcd for C₁₆H₁₃Cl₂N₃O₂ 349.0385, found 349.0381.

7-甲基-5-(2-硝基苯基)-6-乙氧甲酰基咪唑并[1,2-*a*]嘧啶(**8g**): 产率 12%, 白色固体. m.p. 129.5~130.2 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 8.41 (t, $J=1.2$ Hz, 1H, ArH), 7.87~7.89 (m, 1H, ArH), 7.83~7.86 (m, 1H, ArH), 7.74 (d, $J=1.8$ Hz, 1H, ArH), 7.44 (t, $J=1.2$ Hz, 1H, ArH), 7.28 (s, 1H, ArH), 6.84 (d, $J=1.2$ Hz, 1H, ArH), 4.00~4.06 (m, 2H, CH₂), 2.80 (s, 3H, CH₃), 0.94 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH₃); HRMS calcd for C₁₆H₁₄N₄O₄ 326.1015, found 326.1012.

7-甲基-5-(2-呋喃基)-6-乙氧甲酰基咪唑并[1,2-*a*]嘧啶(**8h**): 产率 17%, 白色固体. m.p. 124.3~125.6 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 7.88 (s, 1H, ArH), 7.84 (s, 1H, ArH), 7.74 (d, $J=1.2$ Hz, 1H, ArH), 7.12 (d, $J=4.8$ Hz, 1H, ArH), 6.72 (dd, $J=1.2$ Hz, 3.6 Hz, 1H, ArH), 4.36 (q,

$J=7.2$ Hz, 1H, CH₂), 2.69 (s, 3H, CH₃), 1.29 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH₃); HRMS calcd for C₁₄H₁₃N₃O₃ 271.0957, found 271.0963.

3.2.4 化合物 9 的合成

于 5 mL 微波管中加入 318 mg (1 mmol) 化合物 **7a**, 870 mg (10 mmol) 二氧化锰, 3 mL 1,2-二氯乙烷, 微波辅助下 150 °C 反应 20 min. 过滤, 旋转蒸除溶剂, 剩余物经柱层析分离[*V*(石油醚):*V*(乙酸乙酯) = 3:1] 得化合物 **9a**. 利用类似方法得到化合物 **9b** 和 **9c**, 收率 62%~84%.

5-甲基-7-苯基-6-乙氧甲酰基-[1,2,4]三唑并[1,5-*a*]嘧啶(**9a**): 产率 64%, 白色固体. m.p. 109.2~109.6 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 8.46 (s, 1H, ArH), 7.66 (d, $J=7.8$ Hz, 2H, ArH), 7.56~7.63 (m, 3H, ArH), 4.14 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, CH₂), 2.80 (s, 3H, CH₃), 0.99 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH₃); HRMS calcd for C₁₅H₁₄N₄O₂ 282.1117, found 282.1123.

5-甲基-7-(4-氯苯基)-6-乙氧甲酰基-[1,2,4]三唑并[1,5-*a*]嘧啶(**9b**): 产率 62%, 白色固体. m.p. 77.6~78.6 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 8.46 (s, 1H, ArH), 7.63 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.56 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, ArH), 4.19 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, CH₂), 2.79 (s, 3H, CH₃), 1.08 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH₃); HRMS calcd for C₁₅H₁₃ClN₄O₂ 316.0727, found 316.0733.

5-甲基-7-(4-甲苯基)-6-乙氧甲酰基-[1,2,4]三唑并[1,5-*a*]嘧啶(**9c**): 产率 84%, 黄色液体. ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 8.42 (s, 1H, ArH), 7.55 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.36 (d, $J=7.8$ Hz, 2H, ArH), 4.15 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, CH₂), 2.76 (s, 3H, CH₃), 2.44 (s, 3H, CH₃), 1.02 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH₃); HRMS calcd for C₁₆H₁₆N₄O₂ 296.1273, found 296.1278.

3.2.5 细胞毒性实验

抗肿瘤细胞毒性采用改进的 Mosmann's MTT 染色法测定. 具体操作如下: 于 96 孔板接种细胞悬液, 90 μ L/孔, 细胞密度 2×10^4 个/mL, 37 °C, 5% CO₂ 浓度的培养箱中培养过夜, 加 10 μ L/孔相应浓度药物(100 μ mol/L), 继续培养 44 h, 加 MTT 10 μ L/孔培养 4 h, 从培养箱中取出, 移去上清液, 加 DMSO 100 μ L/孔溶解 MTT, 测量 570 nm 波长下肿瘤细胞 OD 值, 代入公式: $(OD_{\text{control}} - OD_{\text{treated}}) / OD_{\text{control}} \times 100\%$ 计算抑制率.

3.2.6 苹果树腐烂病菌的抑制活性测试

抑苹果树腐烂病菌活性测试采用生长速率法, 阳性对照品为 45% 代森铵, 抑制率计算公式: 抑制率(%) = [(对照菌落纯生长量 - 处理菌落纯生长量) / 对照纯生长量] $\times 100\%$.

辅助材料(Supporting Information) 所合成化合物的¹H NMR 谱图、¹³C NMR 谱图(**5a** 和 **8a**), 化合物 **5** 和 **7** 的体外细胞毒性见表 5, 化合物 **5** 和 **7** 的苹果树腐烂病菌活性见表 6. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Kappe, C. O. *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 879 and references cited therein.
- [2] Chen, X. D.; Xu, W. W.; Wang, K.; Mo, M. G.; Zhang, W.; Du, L. L.; Yuan, X. J.; Xu, Y. C.; Wang, Y. P.; Shen, J. H. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 8529.
- [3] Alam, O.; Khan, S. A.; Siddiqui, N.; Ahsan, W.; Verma, S. P.; Gilani, S. J. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 5113.
- [4] Trivedi, A. R.; Bhuva, V. R.; Dholariya, B. H.; Dodiya, D. K.; Kataria, V. B.; Shah, V. H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6100.
- [5] Rajanarendar, E.; Reddy, M. N.; Murthy, K. R.; Reddy, K. G.; Raju, S.; Srinivas, M.; Praveen, B.; Rao, M. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6052.
- [6] Yu, X. S.; Yu, X. M. *J. Yangtze Univ. (Nat. Sci. Ed.)* **2018**, *5*, 59 (in Chinese).
(余训爽, 余训民, 长江大学学报(自科版), **2018**, *5*, 59.)
- [7] Biginelli, P. *Ber.* **1891**, *24*, 2962.
- [8] Quan, Z. G.; Zhang, Z.; Da, Y. X.; Wang, X. C. *Chin. J. Org. Chem.* **2009**, *29*, 876 (in Chinese).
(权正军, 张彰, 达玉霞, 王喜存, 有机化学, **2009**, *29*, 876.)
- [9] Kappe, C. O. *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, *35*, 1043.
- [10] Lu, J.; Yang, B. Q.; Bai, Y. J.; Ma, H. R. *Chin. J. Org. Chem.* **2001**, *21*, 640 (in Chinese).
(路军, 杨秉勤, 白银娟, 马怀让, 有机化学, **2001**, *21*, 640.)
- [11] Kappe, C. O.; Stadler, A. *Org. React.* **2004**, *63*, 1.
- [12] Atwal, K. S.; O'Reilly, B. C.; Gougoutas, J. Z.; Malley, M. F. *Heterocycles* **1987**, *26*, 1189.
- [13] Atwal, K. S.; Rovnyak, G. C.; O'Reilly, B. C.; Schwart, J. J. *Org. Chem.* **1989**, *54*, 5898.
- [14] Atwal, K. S.; Rovnyak, G. C.; Schwart, J.; Moreland, S.; Hedberg, A.; Gougoutas, J. Z.; Malley, M. F. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1510.
- [15] Atwal, K. S.; Moreland, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1991**, *1*, 291.
- [16] Mishina, T.; Tsuda, N.; Inui, A.; Miura, Y. *JP 19860098499*, **1987**.
- [17] Atwal, K. S. *EP 211429*, **1987**.
- [18] Larhed, M.; Olofsson, K. In *Topics in Heterocyclic Chemistry*, Vol. 1, Eds.: Eycken, E. V.; Kappe, C. O., Springer-Verlag, Berlin, **2006**.
- [19] Tierney, J. P.; Lidström, P. *Microwave Assisted Organic Synthesis*, Blackwell, Oxford, **2005**.
- [20] Kappe, C. O.; Stadler, A. *Microwaves in Organic and Medicinal Chemistry*, WILEY-VCH, Weinheim, **2005**.
- [21] Niralwad, K. S.; Shingate, B. B.; Shingare, M. S. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 3616.
- [22] Wang, G. W.; Wang, B. L. *Chin. J. Org. Chem.* **2004**, *24*, 85 (in Chinese).
(王官武, 王宝亮, 有机化学, **2004**, *24*, 85.)
- [23] Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55.

(Cheng, F.)