1,3,4-噻二唑三氮烯酰胺衍生物的合成及抗肿瘤活性研究

陈彦君^a 张明千^b 李子秋^b 罗德福^b 李龙辉^b
俞婷婷^c 龙跃^{*,b}

(^a 焦作大学化学与环境工程学院 河南焦作 454003)

(^b 郑州大学化学与分子工程学院 郑州 450001)

(^c 郑州大学药学院 郑州 450001)

摘要 把三氮烯结构与 1,3,4-噻二唑、酰胺相拼接, 合成了 14 个未见报道的 1,3,4-噻二唑三氮烯酰胺衍生物, 并用核磁共振谱(NMR)、红外光谱(IR)和高分辨质谱(HRMS)等方法对化合物结构进行表征. 通过以典型三氮烯药物达卡巴嗪作参照, 对人食管癌细胞(EC109)、人胃癌细胞(MGC803)和人前列腺癌细胞(PC-3)做活性检测, 结果显示化合物 **8a**, **8h**, **8i**, **8k**, **8l** 对人前列腺癌细胞(PC-3)的抑制活性最好, 其 IC₅₀ 值分别为 33.02, 34.05, 7.71, 4.82, 23.84 μmol·L⁻¹, 远低于对照药达卡巴嗪(IC₅₀ 值为 146.43 μmol·L⁻¹).

关键词 三氮烯; 1,3,4-噻二唑; 酰胺; 人食管癌细胞; 人胃癌细胞; 人前列腺癌细胞

Synthesis and Antitumor Activities of 1,3,4-Thiadiazole Triazene Amide Derivatives

Chen, Yanjun^a Zhang, Mingqian^b Li, Ziqiu^b Luo, Defu^b Li, Longhui^b
Yu, Tingting^c Long, Yue^{*,b}

(^a Department of Chemical and Environmental Engineering, Jiaozuo University, Jiaozuo, Henan 454003)

(^b College of Chemistry and Molecular Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001)

(^c School of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001)

Abstract By splicing the triazene structure with 1,3,4-thiadiazole and amide, fourteen unreported 1,3,4-thiadiazole triazene amide derivatives were synthesized. The structures of these compounds were characterized by nuclear magnetic resonance (NMR), infrared spectroscopy (IR) and high-resolution mass spectrometry (HRMS). By using the typical triazene drug dacarbazine as a reference, the activity detections of human esophageal cancer cells (EC109), human gastric cancer cells (MGC803) and human prostate cancer cells (PC-3) were carried out. The results showed that compounds **8a**, **8h**, **8i**, **8k**, and **8l** had the best inhibitory activity against human prostate cancer cells (PC-3). And their IC₅₀ values were 33.02, 34.05, 7.71, 4.82, 23.84 μmol·L⁻¹, which were far lower than the control drug their IC₅₀ values were 33.02, 34.05, 7.71, 4.82, 23.84 μmol·L⁻¹, which were far lower than the control drug dacarbazine (146.43 μmol·L⁻¹).

Keywords triazene; amide; human esophageal cancer cells; human gastric cancer cells; human prostate cancer cells

三氮烯类化合物又称重氮氨基化合物, 指含有 N=N 结构的一类化合物. 三氮烯结构具有较好的抗癌活性, 已作为药物应用于临床, 如达卡巴嗪(DTIC)和替莫唑胺(TMZ), 但该类物质主要用于黑色素瘤的治疗且伴随着嗜睡、呕吐、头痛、疲劳等副作用, 所以三氮烯类药物还在不断地研究和改进^[1~3]. 已报道其作用机制

为, 三氮烯结构在 P450 酶氧化、分解、重排后脱氮变为甲基碳正离子, 然后作用于 DNA 碱基片段, 阻止基因的复制和表达, 因此三氮烯类药物属于烷基化试剂^[4]. 1,3,4-噻二唑是结构中含有两个氮原子和一个硫原子的芳杂环, 噻二唑环独特的富电性结构使得该类衍生物在抗菌^[5]、抗癌^[6]、抗氧化^[7]、抗炎^[8]等方面表现出广泛的

* Corresponding author. E-mail: longyue@zzu.edu.cn

Received May 14, 2019; revised June 18, 2019; published online July 17, 2019.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. J1210060), the Science and Technology Planning Project of Henan Province (No. 0624420031) and the Basic Research Development Program of Henan Province (No. 022463001).

国家自然科学基金(No. J1210060)、河南省科技攻关计划(No. 0624420031)、河南省基础研究基金(No. 022463001)资助项目.

生物活性。酰胺类化合物在材料、工业溶剂、药物、蛋白质等的应用非常广泛,大多数药物含有酰胺结构,酰胺有抗菌^[9]、杀虫^[10]、抗癌^[11]等活性。由于低毒性和低残留等优点^[12],酰胺结构在药物合成中广泛应用。阮祥辉等^[13]以杨梅素为先导化合物,通过结构修饰得到一系列含哌嗪酰胺类的杨梅素衍生物,通过活性检测发现大多数含哌嗪酰胺的杨梅素衍生物对 MDA-MB-231 细胞表现出较好的抑制活性。本课题组^[14]之前将三氮烯和 1,3,4-噻二唑结构拼接,发现该类化合物对人胃癌细胞(MGC803)和人前列腺癌细胞(PC-3)活性明显强于对照药达卡巴嗪,在此基础上尝试与酰胺结构拼接,以期得到活性更好的化合物。

为了设计一类新型广谱抗癌活性的三氮烯类衍生物,本文将三氮烯结构和 1,3,4-噻二唑、酰胺结构拼接,合成了 14 个新型的 1,3,4-噻二唑三氮烯酰胺衍生物(Scheme 1),并测试了该类化合物对人食管癌细胞(EC109)、人胃癌细胞(MGC803)和人前列腺癌细胞(PC-3)的抑制作用。

图式 1 1,3,4-噻二唑三氮烯酰胺类衍生物的合成

Scheme 1 Synthesis of 1,3,4-thiadiazole triazene acidamide derivatives

1 结果与讨论

1.1 合成

中间体化合物 5 的合成在该路线中至关重要,不同于参考文献[14]的是,该方法采用硫酸环合法,产率较低,通常只有 17%~35%^[15]。在条件筛选中,发现反应温度、时间、后处理以及原料化合物 4 中碱残余对该反应产率影响很大。由于该反应过程中会释放大量的热量,需要使用冰浴维持 0 °C 左右的反应温度;反应不到 4 h 时,体系浑浊,反应不完全,但超过 4 h 后体系颜色明显加深,生成大量副产物。后处理须先用冰水稀释反应液,再低温下用碱中和酸液至 pH 约为 5,化合物 5 才能以固体形式析出来。如果原料化合物 4 未干燥或者含有少量氢氧化钾,会使反应大量放热导致产生副产物。条件优化后,产率可以达到 82%。该反应机理如 Scheme 2。

图式 2 1,3,4-噻二唑的形成反应机理

Scheme 2 Reaction mechanism of 1,3,4-thiadiazole

1.2 化合物的抗肿瘤活性

选用三氮烯药物达卡巴嗪(DTIC)作对照,测试该类化合物对人食管癌细胞(EC109)、人胃癌细胞(MGC803)和人前列腺癌细胞(PC-3)三种癌细胞的抑制作用。其 IC₅₀ 值见表 1。

从表 1 可以看出,大多数化合物都可以对人胃癌细胞(MGC803)和人前列腺癌细胞(PC-3)表现出较好的抑制活性,一些化合物可以对人食管癌细胞(EC109)表现出较好的抑制活性。与药物达卡巴嗪(DTIC)相比,化合物 8a、8b、8h~8n 对人前列腺癌细胞(PC-3)有较强抑制作用,其中化合物 8k 和 8l 对三种癌细胞的 IC₅₀ 值都低于达卡巴嗪(DTIC),尤其对于人前列腺癌细胞(PC-3)和人食管癌细胞(EC109)效果最为明显。活性对比发现,该系列化合物苯环上邻位取代比对位取代抑制活性强,带吸电子取代基的抑制作用要强于供电子基,与文献[16]相类似。对比 8j、8m 和 8n 对人食管癌细胞(EC109)的抑制作用,发现对位取代基吸电性越弱,抑制作用就越强。化合物 8h、8i、8j、8k、8l 对人前列腺癌细胞(PC-3)

表 1 1,3,4-噻二唑三氮烯类衍生物的抗癌活性 [$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$]

Table 1 Anticancer activity of 1,3,4-thiadiazole triazene derivatives [$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$]

Compd.	EC109	MGC803	PC-3
8a	>300	>300	33.02±1.85
8b	>300	263.58±0.54	125.23±1.85
8c	>300	179.24±1.17	>300
8d	>300	>300	171.43±1.37
8e	>300	277.53±0.54	152.79±1.04
8f	>300	>300	>300
8g	>300	>300	>300
8h	180.70±0.28	112.59±6.76	34.05±4.31
8i	215.94±5.26	197.83±1.00	7.71±0.06
8j	218.72±3.24	203.06±2.57	52.81±2.35
8k	57.17±2.90	90.77±3.20	4.82±0.71
8l	59.32±0.38	92.12±0.54	23.84±4.78
8m	205.28±7.17	280.58±3.06	84.36±2.28
8n	279.04±0.36	285.03±0.86	81.45±5.28
DTIC	108.1±1.2	99.6±4.1	146.4±5.1

的 IC_{50} 值为 34.05、7.71、52.81、4.82、23.84 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 远低于对照药达卡巴嗪(DTIC)。对比 8j 和 8n, 氯原子取代活性优于氟原子, 而且间位和对位同时被氯取代(8k)活性要优于单个氯取代(8i 和 8j)活性, 与文献[17]报道的结果相一致。

2 结论

以对氨基苯甲酸甲酯和取代基苯胺为原料, 合成了 14 个新型的 1,3,4-噻二唑三氮烯酰胺衍生物, 并对其抗癌活性做出活性筛选。结果表明该类化合物对人食管癌细胞(EC109)、人胃癌细胞(MGC803)和人前列腺癌细胞(PC-3)都有较好的抑制作用。对比文献[14], 接入酰胺结构后, 该类化合物对人前列腺癌细胞(PC-3)的抑制活性有明显提高, 其中化合物 8a, 8h, 8i, 8k, 8l 要大大优于对照药达卡巴嗪(DTIC), 化合物 8k 和 8l 对三种癌细胞都有很好的抑制活性。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

ZF7 三用紫外分析仪(巩义市予华仪器有限责任公司); CP214 电子天平(奥豪斯仪器有限公司); Q-TOF Micro 高分辨质谱测定仪(离子源为 ESI, 美国 Waters 公司); DPX-400FT 超导核磁共振仪(美国 Bruker 公司); Vector 22 傅里叶变换红外光谱仪(美国 Bruker 公司)。所用试剂均为市售分析纯, 使用前按常规方法处理。实验所用的肿瘤细胞: 人食管癌细胞(EC109)、人胃癌细胞(MGC803)和人前列腺癌细胞(PC-3)由郑州大学基础医学院药理系提供。4-(3,3-二甲基三氮烯-1-基)苯甲

酸甲酯(2)参考文献[14]合成, 4-(3,3-二甲基三氮烯-1-基)苯甲酰胺(3)参考文献[14]合成, 4-(3,3-二甲基三氮烯-1-基)苯甲酰胺二硫代羧酸钾(4)参考文献[3]合成, *N*-芳基-2-氯乙酰胺(7a~7n)参考文献[20]合成。

3.2 实验方法

3.2.1 2-巯基-5-[4-(3,3-二甲基三氮烯-1-基)苯基]-1,3,4-噻二唑(5)的合成

在 50 mL 圆底烧瓶中加入 10 mL 浓硫酸, 冰浴搅拌冷却后, 将干燥的化合物 4 (3.11 mmol, 1.00 g)缓慢加入反应瓶中, 保持冰浴下搅拌 4 h, 立即将反应液倒入冰水中, 用浓氨水调 pH 至 5, 有大量黄色固体生成。抽滤, 水洗, 干燥得 2-巯基-5-[4-(3,3-二甲基三氮烯-1-基)苯基]-1,3,4-噻二唑(5), 黄色固体, 产率 82%。m.p. 197~198 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 14.66 (s, 1H), 7.77~7.62 (m, 2H), 7.44 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 3.54 (s, 3H), 3.19 (s, 3H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 151 MHz) δ : 187.23, 159.98, 152.89, 127.42, 124.78, 120.67, 43.07, 36.03; IR (KBr) ν : 3098, 2873, 1598, 1482, 1280 cm^{-1} ; HRMS calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{S}_2$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 266.0529, found 266.0529.

3.2.2 2-((5-(4-(3,3-二甲基三氮烯-1-基)苯基)-1,3,4-噻二唑-2-基)巯基)-*N*-芳基乙酰胺(8a~8n)的合成

在 100 mL 圆底烧瓶中加入化合物 5 (2.04 mmol, 0.54 g)、化合物 7a~7n (2.10 mmol)、三乙胺(4.94 mmol, 0.50 g)、无水乙醇 30 mL, 加热回流 2 h, 反应结束后低压蒸除溶剂, 加水 and 乙酸乙酯萃取, 无水硫酸镁干燥有机相, 柱层析分离, 洗脱剂为乙酸乙酯-二氯甲烷(体积比 1:10), 得化合物 8a~8n。

2-((5-(4-(3,3-二甲基三氮烯-1-基)苯基)-1,3,4-噻二唑-2-基)巯基)-*N*-苯基乙酰胺(8a): 黄色固体, 产率 80%。m.p. 179~180 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 10.40 (s, 1H), 7.86 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.60 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.46 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.34~7.32 (m, 2H), 7.08 (t, $J=7.4$ Hz, 1H), 4.36 (s, 2H), 3.53 (s, 3H), 3.19 (s, 3H); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 151 MHz) δ : 169.66, 166.12, 164.79, 153.53, 137.95, 128.94, 128.58, 125.81, 124.40, 121.24, 119.92, 43.25, 37.56, 36.03; IR (KBr) ν : 3300, 1661, 1444, 1375, 1086, 757 cm^{-1} ; HRMS calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_6\text{OS}_2$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 399.1056, found 399.1055.

2-((5-(4-(3,3-二甲基三氮烯-1-基)苯基)-1,3,4-噻二唑-2-基)巯基)-*N*-(2-甲基苯基)乙酰胺(8b): 黄色固体, 产率 93%。m.p. 171~172 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 9.73 (s, 1H), 7.87 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.47 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.42 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 7.22 (d, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.17 (t, $J=7.7$ Hz, 1H), 7.10 (t, $J=7.4$ Hz, 1H), 4.37 (s, 2H), 3.54 (s, 3H), 3.19 (s, 3H), 2.22 (s, 3H); ^{13}C NMR

(CDCl₃, 151 MHz) δ : 169.55, 166.38, 164.59, 153.52, 135.91, 130.48, 129.26, 128.55, 126.57, 125.86, 125.11, 122.62, 121.22, 43.28, 37.25, 35.99, 18.10; IR (KBr) ν : 3266, 1661, 1442, 1376, 1086, 759 cm⁻¹; HRMS calcd for C₁₉H₂₁N₆O₂S₂ [M+H]⁺ 413.1213, found 413.1211.

2-((5-(4-(3,3-二甲基三氮烯-1-基)苯基)-1,3,4-噻二唑-2-基)硫基)-*N*-(3-甲基苯基)乙酰胺(**8c**): 黄色固体, 产率 93%. m.p. 156~157 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ : 10.32 (s, 1H), 7.86 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.49~7.43 (m, 3H), 7.38~7.36 (m, 1H), 7.20 (t, *J*=7.8 Hz, 1H), 6.90 (d, *J*=7.5 Hz, 1H), 4.34 (s, 2H), 3.53 (s, 3H), 3.19 (s, 3H), 2.28 (s, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 151 MHz) δ : 169.62, 166.06, 164.70, 153.50, 138.84, 137.83, 128.76, 128.57, 125.84, 125.26, 121.23, 120.55, 117.09, 43.28, 37.66, 36.01, 21.48; IR (KBr) ν : 3309, 1679, 1551, 1366, 1067, 840 cm⁻¹; HRMS calcd for C₁₉H₂₁N₆O₂S₂ [M+H]⁺ 413.1213, found 413.1212.

2-((5-(4-(3,3-二甲基三氮烯-1-基)苯基)-1,3,4-噻二唑-2-基)硫基)-*N*-(4-甲基苯基)乙酰胺(**8d**): 黄色固体, 产率 95%. m.p. 199~200 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ : 10.31 (s, 1H), 7.86 (d, *J*=8.6 Hz, 2H), 7.47 (dd, *J*=8.6, 7.4 Hz, 4H), 7.13 (d, *J*=8.3 Hz, 2H), 4.33 (s, 2H), 3.54 (s, 3H), 3.19 (s, 3H), 2.25 (s, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 151 MHz) δ : 169.60, 165.96, 164.77, 153.50, 135.36, 134.03, 129.43, 128.58, 125.83, 121.22, 119.96, 43.26, 37.53, 35.96, 20.91; IR (KBr) ν : 3256, 1661, 1444, 1368, 1095, 842 cm⁻¹; HRMS calcd for C₁₉H₂₁N₆O₂S₂ [M+H]⁺ 413.1213, found 413.1211.

2-((5-(4-(3,3-二甲基三氮烯-1-基)苯基)-1,3,4-噻二唑-2-基)硫基)-*N*-(2-甲氧基苯基)乙酰胺(**8e**): 黄色固体, 产率 65%. m.p. 154~155 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ : 9.66 (s, 1H), 8.00 (d, *J*=6.4 Hz, 1H), 7.87 (d, *J*=8.6 Hz, 2H), 7.47 (d, *J*=8.6 Hz, 2H), 7.10~7.08 (m, 1H), 7.05 (d, *J*=6.8 Hz, 1H), 6.93~6.90 (m, 1H), 4.40 (s, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.54 (s, 3H), 3.19 (s, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 151 MHz) δ : 169.64, 166.16, 164.72, 160.08, 153.51, 139.13, 129.62, 128.58, 125.79, 121.22, 112.18, 110.34, 105.57, 55.33, 43.37, 37.64, 35.95; IR (KBr) ν : 3237, 1685, 1541, 1266, 1084, 759 cm⁻¹; HRMS calcd for C₁₉H₂₁N₆O₂S₂ [M+H]⁺ 429.1162, found 429.1163.

2-((5-(4-(3,3-二甲基三氮烯-1-基)苯基)-1,3,4-噻二唑-2-基)硫基)-*N*-(3-甲氧基苯基)乙酰胺(**8f**): 黄色固体, 产率 63%. m.p. 122~123 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ : 10.40 (s, 1H), 7.83 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.45 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.32 (s, 1H), 7.23 (t, *J*=8.1 Hz, 1H), 7.15

(dd, *J*=7.8, 1.9 Hz, 1H), 6.66 (dd, *J*=8.3, 2.5 Hz, 1H), 4.36 (s, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.52 (s, 3H), 3.18 (s, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 151 MHz) δ : 169.19, 165.85, 163.77, 153.40, 148.46, 128.44, 127.74, 126.10, 124.07, 121.22, 120.82, 119.96, 110.07, 55.72, 43.26, 37.32, 36.00; IR (KBr) ν : 3286, 1672, 1595, 1365, 1086, 766 cm⁻¹; HRMS calcd for C₁₉H₂₁N₆O₂S₂ [M+H]⁺ 429.1162, found 429.1163.

2-((5-(4-(3,3-二甲基三氮烯-1-基)苯基)-1,3,4-噻二唑-2-基)硫基)-*N*-(4-甲氧基苯基)乙酰胺(**8g**): 黄色固体, 产率 72%. m.p. 177~178 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ : 10.26 (s, 1H), 7.86 (d, *J*=8.3 Hz, 2H), 7.51 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 7.46 (d, *J*=8.6 Hz, 2H), 6.90 (d, *J*=8.9 Hz, 2H), 4.32 (s, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.53 (s, 3H), 3.19 (s, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 151 MHz) δ : 169.59, 165.84, 164.70, 156.47, 153.49, 131.10, 128.56, 125.83, 121.65, 121.22, 114.10, 55.46, 43.28, 37.50, 36.00; IR (KBr) ν : 3257, 1656, 1508, 1342, 1090, 835 cm⁻¹; HRMS calcd for C₁₉H₂₁N₆O₂S₂ [M+H]⁺ 429.1162, found 429.1160.

2-((5-(4-(3,3-二甲基三氮烯-1-基)苯基)-1,3,4-噻二唑-2-基)硫基)-*N*-(2-氯苯基)乙酰胺(**8h**): 黄色固体, 产率 47%. m.p. 161~162 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ : 9.96 (s, 1H), 7.87 (d, *J*=8.6 Hz, 2H), 7.78 (dd, *J*=8.1, 1.6 Hz, 1H), 7.51 (dd, *J*=8.0, 1.5 Hz, 1H), 7.47 (d, *J*=8.6 Hz, 2H), 7.34 (td, *J*=7.8, 1.5 Hz, 1H), 7.21 (td, *J*=7.8, 1.6 Hz, 1H), 4.42 (s, 2H), 3.54 (s, 3H), 3.19 (s, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 151 MHz) δ : 169.45, 166.22, 163.48, 153.42, 134.75, 129.20, 128.57, 127.45, 125.98, 125.06, 123.76, 122.15, 121.17, 43.26, 37.25, 35.99; IR (KBr) ν : 3304, 1675, 1593, 1372, 1052, 839 cm⁻¹; HRMS calcd for C₁₈H₁₈ClN₆O₂S₂ [M+H]⁺ 433.0667, found 433.0666.

2-((5-(4-(3,3-二甲基三氮烯-1-基)苯基)-1,3,4-噻二唑-2-基)硫基)-*N*-(3-氯苯基)乙酰胺(**8i**): 黄色固体, 产率 82%. m.p. 170~171 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ : 10.60 (s, 1H), 7.86 (d, *J*=8.6 Hz, 2H), 7.84~7.78 (m, 1H), 7.47~7.45 (m, 3H), 7.37 (t, *J*=8.1 Hz, 1H), 7.15 (dd, *J*=7.9, 2.1 Hz, 1H), 4.37 (s, 2H), 3.54 (s, 3H), 3.19 (s, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 151 MHz) δ : 169.77, 166.30, 164.79, 153.59, 139.13, 134.59, 129.88, 128.58, 125.71, 124.39, 121.25, 119.93, 117.90, 43.29, 37.64, 36.01; IR (KBr) ν : 3290, 1658, 1520, 1375, 1071, 843 cm⁻¹; HRMS calcd for C₁₈H₁₈ClN₆O₂S₂ [M+H]⁺ 433.0667, found 433.0668.

2-((5-(4-(3,3-二甲基三氮烯-1-基)苯基)-1,3,4-噻二唑-2-基)硫基)-*N*-(4-氯苯基)乙酰胺(**8j**): 黄色固体, 产率

59%. m.p. 210~211 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 10.54 (s, 1H), 7.85 (dd, $J=8.7, 2.5$ Hz, 2H), 7.63 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.46 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.39 (d, $J=8.9$ Hz, 2H), 4.35 (s, 2H), 3.54 (s, 3H), 3.19 (s, 3H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 151 MHz) δ : 168.08, 165.30, 163.73, 152.76, 137.63, 128.71, 128.36, 127.16, 125.46, 120.76, 120.71, 43.01, 38.23, 36.00; IR (KBr) ν : 3286, 1653, 1525, 1368, 1078, 841 cm^{-1} ; HRMS calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{ClN}_6\text{OS}_2$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 433.0667, found 433.0666.

2-((5-(4-(3,3-二甲基三氮烯-1-基)苯基)-1,3,4-噻二唑-2-基)硫基)-*N*-(3,4-二氯苯基)乙酰胺(**8k**): 黄色固体, 产率 62%. m.p. 166~167 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 10.71 (s, 1H), 7.98 (d, $J=2.5$ Hz, 1H), 7.86 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.59 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.49 (dd, $J=8.8, 2.5$ Hz, 1H), 7.46 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 4.36 (s, 2H), 3.54 (s, 3H), 3.19 (s, 3H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 151 MHz) δ : 168.13, 165.73, 163.57, 152.77, 138.73, 131.08, 130.75, 128.35, 125.45, 125.09, 120.76, 120.35, 119.20, 43.01, 38.18, 35.97; IR (KBr) ν : 3272, 1692, 1598, 1474, 1081, 824 cm^{-1} ; HRMS calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{OS}_2$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 467.0277, found 467.0276.

2-((5-(4-(3,3-二甲基三氮烯-1-基)苯基)-1,3,4-噻二唑-2-基)硫基)-*N*-(2-溴苯基)乙酰胺(**8l**): 黄色固体, 产率 64%. m.p. 141~142 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 9.92 (s, 1H), 7.87 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.70~7.66 (m, 2H), 7.47 (d, $J=7.5$ Hz, 2H), 7.39 (t, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.15 (t, $J=7.7$ Hz, 1H), 4.40 (s, 2H), 3.54 (s, 3H), 3.19 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl $_3$, 151 MHz) δ : 169.45, 166.09, 163.24, 153.42, 135.80, 132.48, 128.58, 128.10, 126.00, 125.67, 122.65, 121.18, 114.22, 43.27, 37.23, 35.98; IR (KBr) ν : 3271, 1659, 1532, 1438, 1071, 843 cm^{-1} ; HRMS calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{BrN}_6\text{OS}_2$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 477.0161, found 477.0163.

2-((5-(4-(3,3-二甲基三氮烯-1-基)苯基)-1,3,4-噻二唑-2-基)硫基)-*N*-(4-溴苯基)乙酰胺(**8m**): 黄色固体, 产率 89%. m.p. 201~202 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 10.54 (s, 1H), 7.86 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 7.57 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.51 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.46 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 4.35 (s, 2H), 3.54 (s, 3H), 3.19 (s, 3H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 151 MHz) δ : 168.07, 165.33, 163.73, 152.76, 138.05, 131.63, 128.36, 125.46, 121.08, 120.76, 115.18, 43.03, 38.26, 36.00; IR (KBr) ν : 3287, 1653, 1524, 1368, 1079, 842 cm^{-1} ; HRMS calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{BrN}_6\text{OS}_2$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 477.0161, found 477.0164.

2-((5-(4-(3,3-二甲基三氮烯-1-基)苯基)-1,3,4-噻二唑-2-基)硫基)-*N*-(4-氟苯基)乙酰胺(**8n**): 黄色固体, 产

率 76%. m.p. 203~204 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 10.46 (s, 1H), 7.86 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 7.61 (dd, $J=8.8, 5.0$ Hz, 2H), 7.46 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 7.17 (t, $J=8.6$ Hz, 2H), 4.34 (s, 2H), 3.54 (s, 3H), 3.19 (s, 3H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 151 MHz) δ : 168.05, 165.04, 163.77, 158.94, 157.35, 152.75, 135.08 (d, $J=2.5$ Hz), 128.33, 125.47, 120.96 (d, $J=7.8$ Hz), 120.75, 115.36 (d, $J=22.3$ Hz), 42.98, 38.21, 35.96; IR (KBr) ν : 3311, 1668, 1507, 1349, 1069, 835 cm^{-1} ; HRMS calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{FN}_6\text{OS}_2$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 417.0962, found 417.0963.

3.3 抗肿瘤活性测试

测试所用的肿瘤细胞人食管癌细胞(EC109)、人胃癌细胞(MGC803)和人前列腺癌细胞(PC-3)由郑州大学基础医学院药理系提供. 所有化合物均以二甲基亚砜(DMSO)溶解配制成为浓度为 20 mmol/L 的储备液, 于 4 °C 冰箱中保存. 使用前用培养基稀释成所需浓度, 使 DMSO 的终含量不超过 0.1%. 将肿瘤细胞培养于改良的 RPMI-1640 培养基, 置于 37 °C、体积分数为 5% 的 CO $_2$ 培养箱中培养, 计数后, 配成细胞悬液. 将细胞悬液按每孔 100 μL 于 96 孔板中培养 24 h 后, 将不同浓度的药物加到 200 μL 培养基中, 培养 48 h. 取出放在超净台中操作, 每孔加入 20 μL 5 g/L 的噻唑蓝(MTT)溶液, 继续置于培养箱中培养 4 h. 取出至实验台, 移除 96 孔板中培养基, 每孔加入 150 μL 二甲基亚砜(DMSO)溶解蓝紫色的甲瓚颗粒. 摇床混匀 10 min 后用酶标仪在 490 nm 处测吸光度值 A , 对所得数值处理, 分别计算出达卡巴嗪和各化合物的平均值、标准差和存活率. 通过存活率柱状图观察不同浓度药物作用的梯度情况, 用 SPSS 软件计算每个化合物的 IC $_{50}$.

辅助材料(Supporting Information) 化合物 **5**, **8a~8n** 的 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 和 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] Carvalho, E.; Francisco, A. P.; Iley, J.; Rosa, E. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1719.
- [2] Lei, Q.; Zhang, S. Y.; Liu, M. L.; Li, J.; Zhang, X.; Long, Y. *Mol. Divers.* **2017**, *21*, 957.
- [3] Wei, G. P.; Zhang, X.; Lei, Q.; Xu, M.; Zhang, M. Q.; Long, Y. *Chin. J. Org. Chem.* **2018**, *38*, 2137 (in Chinese) (魏光璞, 张茜, 雷强, 徐淼, 张明千, 龙跃, 有机化学, **2018**, *38*, 2137.)
- [4] Carvalho, E.; Francisco, A. P.; Iley, J.; Rosa, E.; *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1719.
- [5] Wan, J. L.; Wu, S. Q.; Gan, Y. Y.; Meng, J.; Wang, Z. C.; Ouyang, G. P. *Chem. J. Chin. Univ.* **2018**, *39*, 1683 (in Chinese) (万金林, 巫受群, 甘宜远, 孟娇, 王贞超, 欧阳贵平, 高等学校化学学报, **2018**, *39*, 1683.)
- [6] Flefel, E. M.; El-Sayed, W. A.; Mohamed, A. M.; El-Sofany, W. I.;

- Awad, H. M. *Molecules* **2017**, *22*, 170.
- [7] Martinez, A.; Alonso, D.; Castro, A.; Aran, V. J.; Cardelus, I.; Banos, E. *Arch. Pharm.* **2010**, *332*, 191.
- [8] Foroumadi, A.; Emami, S.; Hassanzadeh, A.; Rajaei, M.; Sokhanvar, K.; Moshafi, M. H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4488.
- [9] Wei, Q. Y.; Wang, X. M.; Cheng, J. H.; Zeng, G. X.; Sun, D. W. *Food Chem.* **2018**, *268*, 220.
- [10] Buysse, A. M.; Yap, M. C. H.; Hunter, R.; Babcock, J.; Huang, X. P. *Pest Manage. Sci.* **2017**, *73*, 782.
- [11] Heller, L.; Knorrscheidt, A.; Flemming, F.; Wiemann, J.; Sommerwerk, S.; Pavel, L. Z.; Al-Harrasi, A.; Csuk, R. *Bioorg. Chem.* **2016**, *68*, 137.
- [12] Zheng, Y. G.; Guo, J. J.; Yu, Z. L.; Fu, R. K.; Huang, Y.; Wang, Y. H.; Deng, Z.; Wu, Y. *Fine Chem. Intermed.* **2015**, *45*, 1 (in Chinese).
(郑玉国, 郭晴晴, 余忠林, 付如凯, 黄勇, 王永欢, 邓钊, 吴用, 精细化工中间体, **2015**, *45*, 1.)
- [13] Ruan, X. H.; Zhao, H. J.; Zhang, C.; Chen, L. J.; Li, P.; Wang, Y. H.; He, M.; Xue, W. *Chem. J. Chin. Univ.* **2018**, *39*, 1197 (in Chinese).
(阮祥辉, 赵洪菊, 张橙, 陈丽娟, 李普, 王一会, 贺鸣, 薛伟, 高等学校化学学报, **2018**, *39*, 1197.)
- [14] Zhang, M. Q.; Liu, B. K.; Lei, Q.; Yan, J. D.; Zhao, Z. Y.; Long, Y. *Chin. J. Org. Chem.*, **2019**, *39*, 1064 (in Chinese).
(张明千, 刘斌凯, 雷强, 颜景东, 赵中玉, 龙跃, 有机化学, **2019**, *39*, 1064.)
- [15] Liu, W. W.; Liu, X. J.; Yin, L.; Cheng, F. C. *Chem. Bull.* **2016**, *79*, 929 (in Chinese).
(刘玮玮, 刘秀坚, 殷龙, 程峰昌, 化学通报, **2016**, *79*, 929.)
- [16] Hu, H. X.; Yang, L. Y.; Wu, X.; Cai, X. T.; Yan, X. Y.; Kong, L. C. *J. Zhejiang Normal Univ. (Nat. Sci.)* **2018**, *41*, 416 (in Chinese).
(胡鸿雨, 杨丽媛, 吴鑫, 蔡旭婷, 严晓阳, 孔黎春, 浙江师范大学学报(自然科学版), **2018**, *41*, 416.)
- [17] Mao, Z. W.; Liu, B.; Zhu, P.; Zhang, L. J.; Zhu, J. H.; Wu, L. Z.; Wan, C. P. *Chin. J. Org. Chem.* **2018**, *38*, 2167 (in Chinese).
(毛泽伟, 刘蓓, 朱萍, 张丽君, 朱加洪, 伍林泽, 万春平, 有机化学, **2018**, *38*, 2167.)
- [18] Farquhar, D.; Benvenuto, J. *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 1723.
- [19] Giraldo, T.; Nisi, C. *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 850.
- [20] Trapero, A.; Pacitto, A.; Singh, V.; Sabbah, M.; Coyne, A.; Mizrahi, V.; Blundell, T. L.; Ascher, D. B.; Abel, C. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 2806.

(Li, L.; Fan, Y.)