

3-芳基-2-亚胺-苯并[e]-1,3-噁嗪-4-醇衍生物的合成及活性评价

廖楚婕^{a,b} 阮洪瑶^{a,b} 姜峻峰^{a,b} 罗伦^{*,a,b} 胡扬根^{*,a,b}^(a) 湖北医药学院药学院 湖北十堰 442000)^(b) 湖北医药学院 武当特色中药研究湖北省重点实验室 湖北十堰 442000)

摘要 苯并噁嗪是一类重要的稠合杂环,其衍生物具有不同的生物活性而被广泛地应用于医药、农药等领域。本研究在温和的条件下,以简单易得的原料,应用 *aza-wittig* 反应高效地合成了 3-芳基-2-亚胺-苯并[e]-1,3-噁嗪-4-醇衍生物 **4a~4k**,其结构通过 ¹H NMR, ¹³C NMR 和高分辨质谱确认。通过单晶 X 射线衍射对 3-苯基-2-(3,4-二乙氧基羰基-5-甲基-呋喃-2-亚胺)-苯并[1,3]噁嗪-4-醇(**4a**)进行了结构分析,确认了化合物结构中碳氮双键(C=N)为 *Z* 式构型。运用 CCK8 方法对目标化合物 **4a~4k** 进行了体外抗肿瘤活性评价,其中 3-(4-氟-苯亚胺-2-(3,4-二乙氧基羰基-5-甲基-呋喃-2-亚胺)-6-氯-苯并[1,3]噁嗪-4-醇(**4e**)浓度为 0.01 mg/mL 时对 HepG2 和 Hela 两种细胞系的抑制率分别为 45.83%和 42.76%,略低于对照药物吉非替尼(68.56%和 79.76%),表现出潜在的抗肿瘤活性。通过 1,1-二苯基-2-三硝基苯胍(DPPH)自由基裂解法测试了目标化合物的抗氧化性,结果显示 3-苯基-2-(3,4-二乙氧基羰基-5-甲基-呋喃-2-亚胺)-6-硝基-苯并[1,3]噁嗪-4-醇(**4d**)、**4e** 和 3-苯基-2-(3,4-二乙氧基羰基-5-甲基-呋喃-2-亚胺)-6,8-二氯-苯并[1,3]噁嗪-4-醇(**4j**)的自由基的清除率 IC₅₀ 值分别为 0.294、0.255 和 0.338 mmol/L,与对照抗坏血酸的 IC₅₀ 值稍大。

关键词 苯并[e]-1,3-噁嗪-4-醇; 合成; *aza*-Wittig 反应; 抗肿瘤; 抗氧化性

Synthesis and Activity Evaluation of 3-Aryl-2-imino-benzo[e][1,3]-oxazin-4-ol Derivatives

Liao, Chujie^{a,b} Ruan, Hongyao^{a,b} Jiang, Junfeng^{a,b} Luo, Lun^{*,a,b} Hu, Yanggen^{*,a,b}^(a) School of Pharmaceutical Sciences, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000)^(b) Hubei Key Laboratory of Wudang Local Chinese Medicine Research, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000)

Abstract Benzoxazines are important heterocycles bearing remarkable biological activities, which widely used in medicine, pesticide and other fields. In this study, 3-aryl-2-imino-benzo[e][1,3]-oxazin-4-ol derivatives **4a~4k** were efficiently synthesized by *aza*-Wittig tandem reaction with simple and easy materials under mild conditions, and their structures were confirmed by ¹H NMR, ¹³C NMR and HRMS. X-Ray structure analysis of diethyl (Z)-2-((4-hydroxy-3-phenyl-3,4-dihydro-2H-benzo[e]-[1,3]oxazin-2-ylidene)amino)-5-methylfuran-3,4-dicarboxylate (**4a**) verified that the carbon-nitrogen (C=N) assigned *Z*-configuration to the compound structure. *In vitro*, the antitumor activities of compounds **4a~4k** were analyzed with CCK8 standard method. The results indicated that most of the compounds showed potential antitumor activities. Among them, the inhibitory rate of the most active compound diethyl (Z)-2-((4-hydroxy-6-methyl-3-phenyl-3,4-dihydro-2H-benzo[e][1,3]oxazin-2-ylidene)amino)-5-methyl-furan-3,4-dicarboxylate (**4e**) against HepG2 and HeLa cell lines at the concentration of 0.01 mg/mL were 45.83% and 42.76%, respectively, which were weaker than the commercial gefitinib. Furthermore, their antioxidant properties were detected via 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging assay. The results showed that the IC₅₀ values of free radical scavenging rates of diethyl (Z)-2-((4-hydroxy-3-phenyl-3,4-dihydro-2H-benzo[e][1,3]oxazin-2-ylidene)amino)-5-methylfuran-3,4-dicarboxylate (**4d**), **4e** and diethyl (Z)-2-((6,8-dichloro-4-hydroxy-3-phenyl-3,4-dihydro-2H-benzo[e][1,3]oxazin-2-ylidene)amino)-5-methylfuran-3,4-dicarboxylate (**4j**) were 0.294, 0.255 and 0.338 mmol/L, respectively, which slightly higher than that of the control ascorbic acid.

* Corresponding authors. E-mail: luolun@hbmhu.edu.cn; huyg@hbmhu.edu.cn

Received July 27, 2022; revised August 23, 2022; published online October 10, 2022.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81773746), the Advantages Discipline Group (Biology and Medicine) Project in Higher Education of Hubei Province (2021-2025, No. 2022BMXKQY7), Cultivating Project for Young Scholar at Hubei University of Medicine (No. 2018QDJZR13) and the Innovative Research Program for College Students of Hubei University of Medicine (Nos. 202110929006, S202110929008 and YSRTP202104).

国家自然科学基金(No. 81773746)、湖北医药学院“十四五”省级优势特色学科群(生物与医药)2022年(No. 2022BMXKQY7)、湖北医药学院人才启动金资助计划(No. 2018QDJZR13)和湖北医药学院大学生创新创业训练计划(Nos. 202110929006, S202110929008 和 YSRTP202104)资助项目。

Keywords benzo[e][1,3]oxazin-4-ol; synthesis; *aza*-Wittig reaction; antitumor; antioxidant

苯并噁嗪类杂环衍生物因其具有不同的生物活性,被广泛地应用于医药和农药等不同领域,如一些苯并噁嗪酮类化合物显示出良好的杀菌^[1-2]、除草^[3]、抗阿尔茨海默症^[4]、抗惊厥^[5]、抗肿瘤^[6-7]和单酰甘油脂肪酶抑制剂^[8]等生物活性.因此,苯并噁嗪类杂环在药物设计中通常被引入到药物分子结构中,有许多苯并噁嗪酮类杂环的合成及活性研究文献被报道^[9-11].然而,苯并噁嗪醇类衍生物由 Strube 等^[12]在 1967 年报道以来,后续相关的报道较少,且未见 3-芳基-2-亚胺苯并[e]-1,3-噁嗪-4-醇衍生物.

近十几年来,我们^[13-17]致力于 *aza*-Wittig 反应应用于稠合氮杂环的合成,已合成咪唑啉酮、喹啉酮及噻吩并噁啉酮、呋喃并噁啉杂环,部分化合物能够显著地抑制肿瘤细胞的生长,显示出潜在的抗肿瘤活性.*aza*-Wittig 反应因其原料易得、操作简便、收率高等优点,已成为一种合成杂环的有效手段^[18-19].2016 年,武静等^[20]从易得的叠氮化物出发,经连续的 Staudinger/*aza*-Wittig/成环反应,一锅制备了新型的喹啉并[3,4-*a*]-3,1-苯并噁嗪.这里我们进一步报道应用 *aza*-Wittig 反应一锅合成 3-芳基-2-亚胺苯并[e]-1,3-噁嗪-4-醇衍生物,并测试了目标化合物的抗肿瘤和抗氧化性等生物活性,为其深入研究奠定一定的基础.

1 结果与讨论

1.1 中间体膦亚胺的合成

参考文献方法^[13],在三乙胺催化下,等物质的量的 α -氯乙酸乙酯和氰乙酸乙酯反应,制备了呋喃氨基酯 **1**.**1**与六氯乙烷、三苯基膦、三乙胺反应制备了膦亚胺 **2**.

1.2 3-芳基-2-亚胺苯并[e]-1,3-噁嗪-4-醇衍生物 **4a**~**4k** 的合成

在氮气保护和 5~10 °C 条件下,膦亚胺 **2** 与芳基异氰酸酯反应 20 h 生成碳二亚胺 **3**.在无水碳酸钾存在下,碳二亚胺 **3** 与不同水杨醛反应得到了未见文献报道的 3-芳基-2-亚胺苯并[e]-1,3-噁嗪-4-醇衍生物 **4a**~**4k** (Scheme 1).值得注意的是,不论 R² 为吸电子基(NO₂),还是给电子基(CH₃),**4** 的分离效果、收率、纯度都很好.

1.3 3-芳基-2-亚胺-苯并[e]-1,3-噁嗪-4-醇衍生物 **4a**~**4k** 的波谱特征及其反应机制

3-芳基-2-亚胺-苯并[e]-1,3-噁嗪-4-醇衍生物 **4a**~**4k** 的结构经过 ¹H NMR, ¹³C NMR, HRMS 分析确认.¹H NMR 谱图显示,化合物 **4a**~**4k** 的芳环上氢的化学位移在 δ 6.90~8.23 之间呈现出多重峰;芳环和呋喃环上甲

基都在 δ 2.33 左右显示单峰或是重合单峰;呋喃环两个乙氧基羰基的甲基峰在 δ 1.10 和 1.32 分别呈现三重峰,但其两个亚甲基在 δ 4.20~4.27 之间表现出多重峰和 δ 3.90~4.10 之间裂分为两个多重峰或多重峰,这可能是由于呋喃环旋转受阻和邻近原子或原子团的电子效应等因素所导致.噁嗪环次亚甲基 OCHN 因电负性大的 N、O 原子的屏蔽效应移向低场,在 δ 5.80~5.95 之间显示双重峰;4-位羟基随着临近苯环上不同取代基的电负性不同,在 δ 3.90~5.00 区域内表现为双重峰或宽单重峰.**4a**~**4k** 的碳谱显示苯环、呋喃环和 C=O 的共振峰在 δ 113.6~164.2 之间,其它碳的共振峰都与目标分子结构相一致.

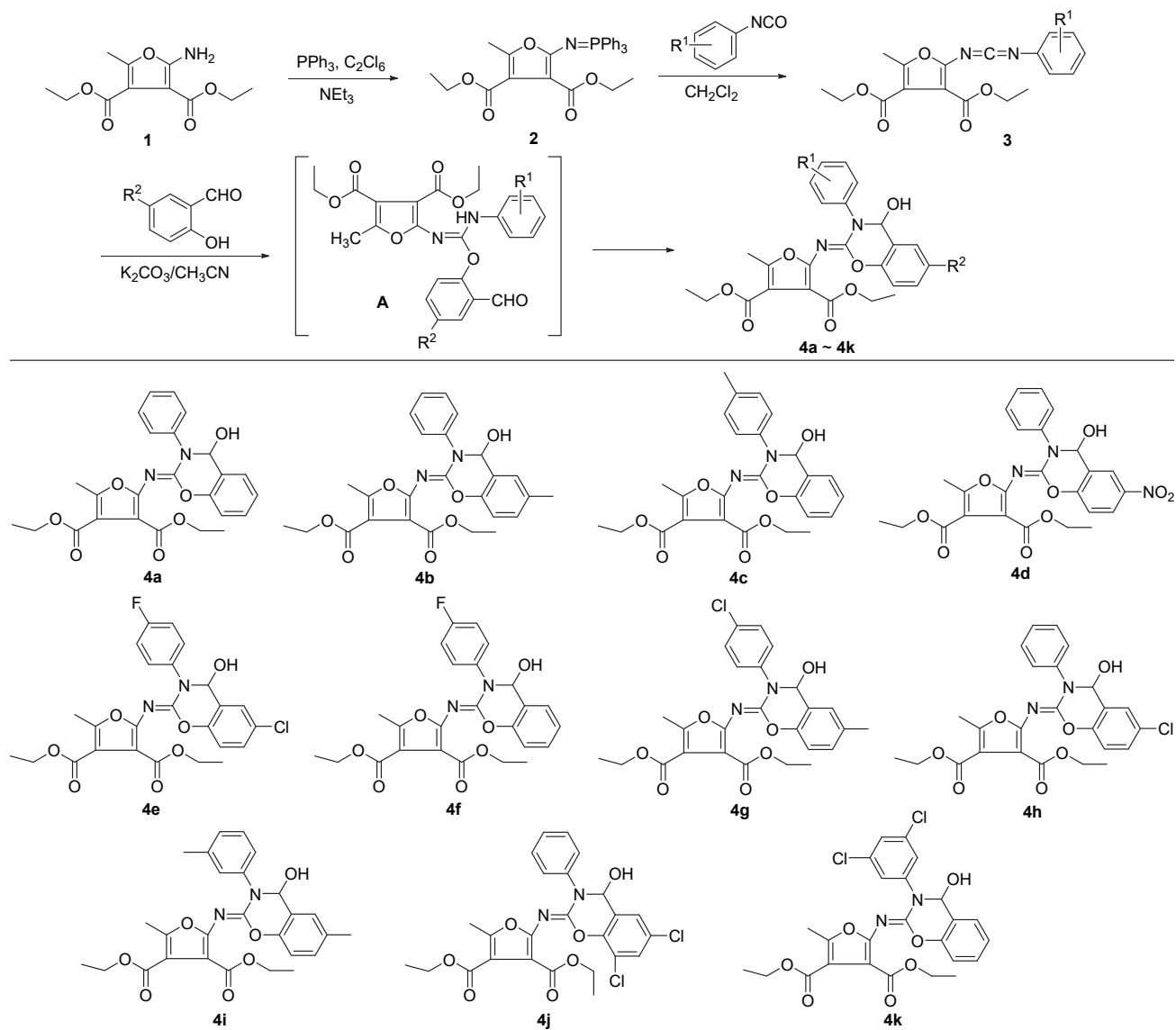
碳二亚胺 **3** 与酚羟基反应可以生成两种互变异构体 **A** 和 **B**,**A** 和 **B** 的亚氨基 NH 与醛基(CHO)发生亲核加成反应生成目标化合物 **4** 或 **4'** (Scheme 2),且化合物 **4** 或 **4'** 的碳氮双键(C=N)具有 *Z* 式或 *E* 式两种构型.为了确认其构型,目标化合物 **4a** 通过 X 射线晶体衍射分析,结果证实碳-氮双键呈现稳定的 *Z* 式构型,**4a** 的分子结构和分子间 O—H...O 氢键作用堆积图如图 1 所示,一些典型的键长和键角数据见辅助材料.基于前期研究基础^[12],推测该反应的选择性可能主要是由苯环、呋喃环的芳香性差异性导致碳二亚胺的两个碳氮双键(C=N)的不等电性主要经过中间体 **A**,再进一步分子内关环生成目标化合物 **4**.

为了进一步说明反应的选择性,以化合物 **4b** 为例进行了结构优化及能量计算,结果显示碳二亚胺 **3** 两个碳氮(C=N)双键氮原子电荷分别为 -0.369e 和 -0.382e,与上述推测的一致,该反应主要是区位选择性地经过中间体 **A** 得到目标化合物 **4**.另外,从能量角度看,**4b** (-98.45 kJ/mol)比 **4'b** (-87.15 kJ/mol)低了 11.30 kJ/mol,说明 **4b** 比 **4'b** 更稳定(图 2).因此,目标化合物 **4** 的形成可能主要是区位选择性和热力学因素控制.

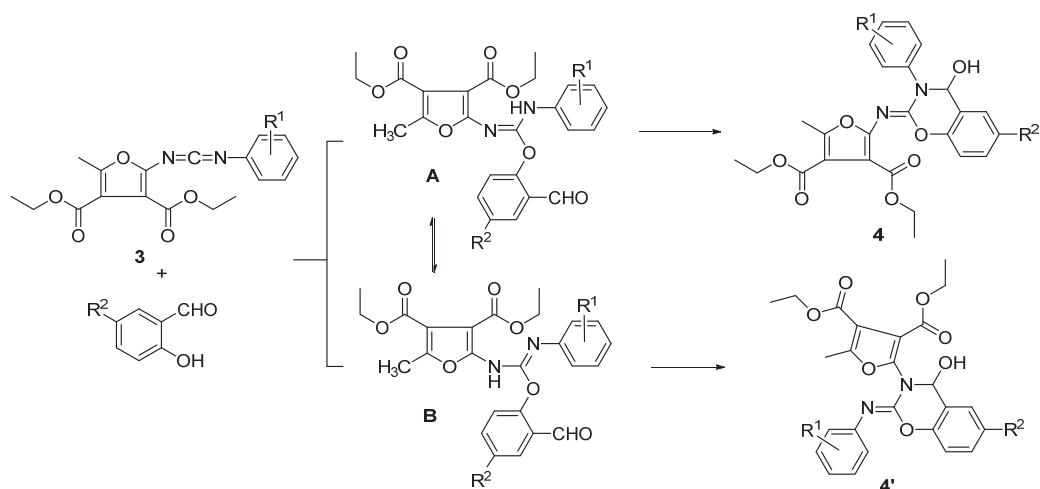
1.5 3-芳基-2-亚胺苯并[e]-1,3-噁嗪-4-醇衍生物 **4a**~**4k** 的抗氧化性

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)在乙醇溶液中呈紫色,在 517 nm 波长处有最大吸收,吸光度与浓度呈线性关系.当加入自由基清除剂时,溶液颜色变浅,在 517 nm 检测样品清除自由基的效果,计算抗氧化能力.以抗坏血酸为标准化合物,对 3-芳基-2-亚胺苯并[e]-1,3-噁嗪-4-醇衍生物 **4a**~**4k** 进行自由基清除活性评价.抗氧化性测试结果见表 1.

抗氧化测试结果显示 **4a**~**4k** 均具有一定的自由基清除活性,当原子团 CHOH 邻近苯环上有硝基或卤素



图式 1 3-芳基-2-亚胺苯并[e]-1,3-噁嗪-4-醇衍生物 4a~4k 的合成路线
Scheme 1 Synthetic route of 3-aryl-2-imino-benzo[e][1,3]-oxazin-4-ol derivatives 4a~4k



图式 2 化合物 4 的形成
Scheme 2 Formation of compound 4

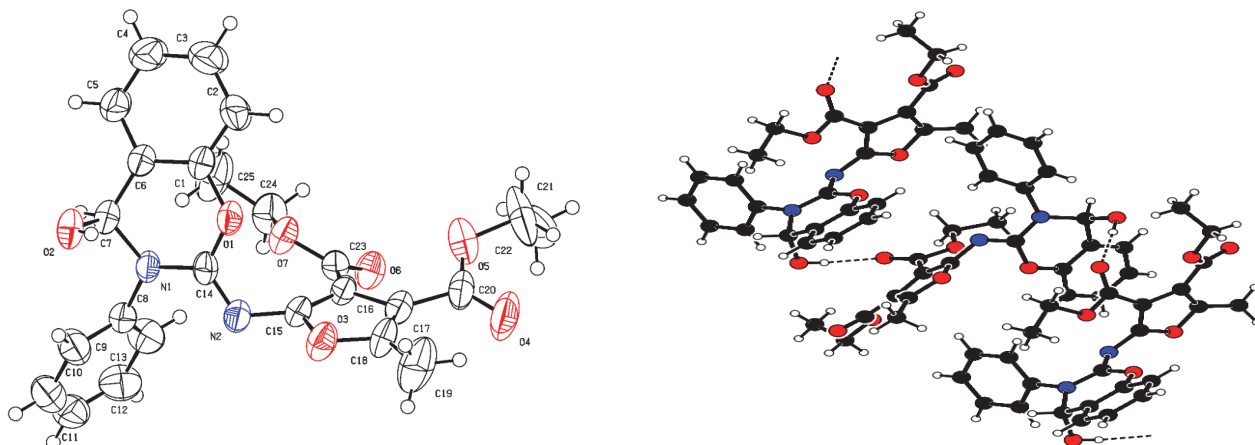


图1 化合物4a的晶体结构和分子间O—H...O氢键堆积图

Figure 1 Crystal structure and intermolecular O—H...O hydrogen bonding packing diagram of the compound 4a

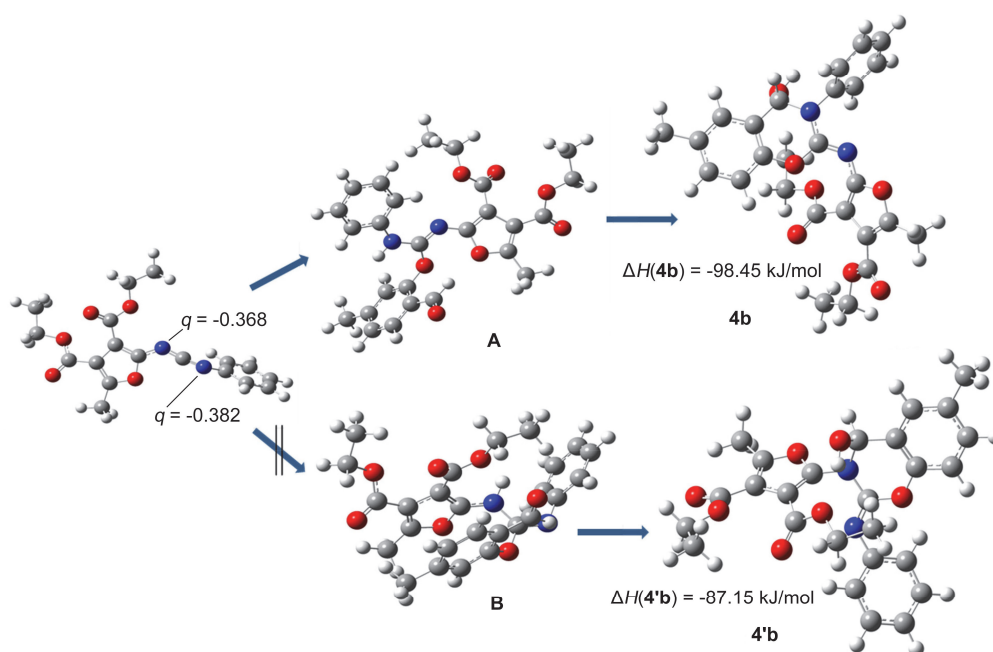


图2 化合物4b和4'b的结构优化及能量

Figure 2 Optimized structures and energy of compounds 4b and 4'b

表1 3-芳基-2-亚胺-苯并[e]-1,3-噁嗪-4-醇衍生物4a~4k的抗氧化活性(30 min)

Table 1 Anti-oxidant activity (30 min) of 3-aryl-2-iminobenzo-[e][1,3]-oxazin-4-ol derivatives 4a~4k

Compd.	IC ₅₀ /(mmol·L ⁻¹)	Compd.	IC ₅₀ /(mmol·L ⁻¹)
4a	1.958	4g	6.629
4b	5.078	4h	0.764
4c	0.842	4i	9.534
4d	0.294	4j	0.338
4e	0.255	4k	1.226
4f	2.555	Ascorbic acid	96.32% ^a
		(cont.)	0.103 (lit. ^[21]) ^b

^a Free radical scavenging rate when ascorbic acid concentration was 0.10 mg/mL; ^b The IC₅₀ literature value of ascorbic acid free radical scavenging rate.

存在, 如化合物4d、4e和4j的抗氧化性较好, 其自由基的清除活性IC₅₀值分别为0.294、0.255和0.338 mmol/L, 与标准抗坏血酸的IC₅₀值稍大(文献值^[21]: IC₅₀值0.103 mmol/L). 同时, 进一步测试发现化合物4d、4e、4h和4k自由基的清除率随时间的延长清除率增大, 2.0 h以后趋于稳定(图3).

1.5 3-芳基-2-亚胺苯并[e]-1,3-噁嗪-4-醇衍生物4a~4k的抗肿瘤活性

采用CCK8方法, 以人肝癌HeGp2细胞系和宫颈癌Hela细胞系对4a~4k进行了体外抑制细胞增殖活性评价(表2). 测试结果显示4a~4k具有一定的抗肿瘤活性, 如4e对所选两种肿瘤细胞均有较好的抑制作用, 在

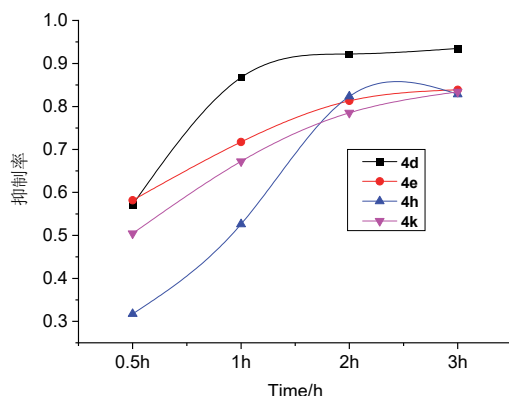


图3 浓度均为0.2 mg/mL时化合物4d、4e、4h和4k自由基的清除率随时间的变化

Figure 3 Variation with time of free radical scavenging rate of compounds 4d, 4e, 4h and 4k when the concentration was 0.2 mg/mL, respectively

相同质量浓度下抑制作用略低于标准对照药吉非替尼(Gefitinib). 从结构上看, 当苯并[e]-1,3-噁嗪的苯环上有氟原子, 3-位苯环上连有氯原子有利于活性的提高, 如4e, 4h和4j; 当苯并[e]-1,3-噁嗪的苯环和3-位苯环上同时有甲基取代时也有利于活性的提高, 如4i. 具体活性结果见表2.

表2 3-芳基-2-亚胺苯并[e]-1,3-噁嗪-4-醇衍生物4a~4k的抗肿瘤活性

Table 2 Antitumor activity of 3-aryl-2-imino-benzo[e][1,3]-oxazin-4-ol derivatives 4a~4k

Compd.	Inhibitory rate ^a /%	
	Hela	HepG2
4a	6.84	-9.64
4b	19.55	-4.00
4c	12.37	7.54
4d	11.77	-4.77
4e	45.83	42.76
4f	16.21	0.40
4g	24.10	5.28
4h	31.43	26.27
4i	42.54	23.48
4j	41.85	5.53
4k	35.73	17.90
Gefitinib	79.76	68.56

^a c=0.01 mg/mL.

2 结论

本研究从易得的膦亚胺2为基本原料, 利用 *aza*-Wittig 串联反应一锅制备了3-芳基-2-亚胺-苯并[e]-1,3-噁嗪-4-醇衍生物4a~4k. 通过体外CCK8试验, 测定了化合物4a~4k对HeGp2和Hela两种细胞系抑制增长试验, 测试结果表明化合物4a~4k具有潜在的抗肿瘤活性. 同时, 以抗坏血酸为标准对照化合物, 评价了

4a~4k对DPPH自由基清除率, 显示化合物4d、4e和4j具有良好的抗氧化性.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

熔点用北京第三光学仪器厂生产的X4型熔点仪测定, 温度计未经校正; ¹H NMR和¹³C NMR用Bruker Avance 400 MHz核磁共振仪测定, TMS为内标; Oxford diffraction Gemini E型单晶衍射仪; Agilent 1290-6540 UHPLC Q-ToF型质谱仪. 所用试剂为国产(或进口)化学纯或分析纯.

3.2 实验方法

3.2.1 中间体碳二亚胺3的制备

参照文献方法^[13]制备氨基呋喃酯1和膦亚胺2. 10 mmol的氰乙酸乙酯加入50 mL无水乙醇中, 在室温和搅拌下慢慢滴加等物质的量的三乙胺30 min后, 再滴加10 mmol的α-氯乙酰乙酸乙酯. 滴加完毕, 在此条件下继续反应2 h后, 冰水浴冷却析出白色固体, 抽滤、干燥即得中间体氨基呋喃酯1. 在冰水浴条件下, 5 mmol氨基呋喃酯1、10 mmol三苯基膦和10 mmol六氯乙烷混合, 加入60 mL乙腈, 滴加15 mmol三乙胺, 反应2 h后, 将混合物倒入碎冰中搅拌析出固体, 抽滤、用乙醇冲洗, 干燥即得膦亚胺2. 在氮气保护下, 3 mmol膦亚胺2和等物质的量的芳基异氰酸酯混合在10 mL二氯甲烷中, 5~10 °C静止反应20 h, 得到碳二亚胺3的二氯甲烷混合溶液. 该混合溶液不加处理, 直接用于后续反应.

3.2.2 3-芳基-2-亚胺苯并[e]-1,3-噁嗪-4-醇衍生物4a~4k的制备

在碳二亚胺3 (3.0 mmol)二氯甲烷的混合溶液中, 加入3.5 mmol的水杨醛和催化量碳酸钾(0.3 mmol), 室温下反应2 h, 减压脱除大部分二氯甲烷溶剂, 加入10 mL乙腈, 再继续在50 °C条件下完成反应[薄层色谱(TLC)监测], 脱去溶剂, 残余物用二氯甲烷和乙醇重结晶得到3-芳基-2-亚胺苯并[e]-1,3-噁嗪-4-醇衍生物4a~4k.

3-苯基-2-(3,4-二乙氧基羰基-5-甲基-呋喃-2-亚胺)-苯并[e]-1,3-噁嗪-4-醇(4a): 白色固体, 产率88% (1.20 g). m.p. 156~158 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 1.11 (t, J=8.0, 3H, CH₃), 1.33 (t, J=8.0, 3H, CH₃), 2.34 (s, 3H, CH₃), 3.92~4.11 (m, 3H, CH₂, OH), 4.26 (q, J=8.0, 3H, CH₃), 5.93 (s, 1H, OCHN), 7.06~7.23 (m, 2H, ArH), 7.29~7.43 (m, 5H, ArH), 7.56~7.59 (m, 2H, ArH); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ: 13.0, 14.2, 14.3, 60.1, 60.5,

80.6, 99.2, 113.9, 116.3, 121.5, 125.0, 126.8, 127.0, 127.7, 129.3, 130.8, 141.3, 148.1, 149.4, 150.3, 156.2, 164.0, 164.1; HR-ESI-MS calcd for $C_{25}H_{24}N_2NaO_7$ ($M+Na$)⁺ 487.1481, found 487.1484.

3-苯基-2-(3,4-二乙氧基羰基-5-甲基-呋喃-2-亚胺)-6-甲基-苯并[1,3]噁嗪-4-醇(**4b**): 白色固体, 产率 86% (1.10 g). m.p. 153~156 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 1.10 (t, $J=8.0$ Hz, 3H, CH₃), 1.32 (t, $J=8.0$ Hz, 3H, CH₃), 2.33 (s, 3H, CH₃), 2.34 (s, 3H, CH₃), 3.91~4.08 (m, 3H, OCH₂, OH), 4.26 (q, $J=8.0$ Hz, 2H, OCH₂), 5.88 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, OCHN), 6.96 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.11 (s, 1H, ArH), 7.18 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.29~7.33 (m, 1H, ArH), 7.41 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, ArH), 7.57 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, ArH); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 13.0, 14.2, 14.3, 20.8, 60.1, 60.5, 80.7, 99.1, 113.8, 116.0, 121.1, 126.9, 126.9, 127.6, 129.3, 131.4, 134.8, 141.4, 146.0, 149.6, 150.2, 156.3, 163.9, 164.1; HR-ESI-MS calcd for $C_{26}H_{26}N_2NaO_7$ ($M+Na$)⁺ 501.1638, found 501.1631.

3-(4-甲基苯基)-2-(3,4-二乙氧基羰基-5-甲基-呋喃-2-亚胺)-苯并[1,3]噁嗪-4-醇(**4c**): 白色固体, 产率 87% (1.10 g). m.p. 132~134 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 1.06 (t, $J=8.0$ Hz, 3H, CH₃), 1.31 (t, $J=8.0$ Hz, 3H, CH₃), 2.31 (s, 3H, CH₃), 2.34 (s, 3H, CH₃), 3.89~4.04 (m, 2H, OCH₂), 4.19~4.26 (m, 2H, OCH₂), 4.51 (d, $J=12.0$ Hz, 1H, OH), 5.86 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, OCH), 7.04 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.18 (m, 3H, ArH), 7.26~7.29 (m, 1H, ArH), 7.34~7.38 (m, 1H, ArH), 7.42 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, ArH); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 13.0, 14.1, 14.2, 21.2, 60.1, 60.5, 80.5, 99.0, 113.8, 116.2, 121.5, 124.9, 126.8, 126.8, 129.9, 130.6, 137.5, 138.7, 148.0, 149.5, 150.3, 156.4, 164.0, 164.2; HR-ESI-MS calcd for $C_{26}H_{27}N_2O_7$ 479.1818, found 479.1814.

3-苯基-2-(3,4-二乙氧基羰基-5-甲基-呋喃-2-亚胺)-6-硝基-苯并[1,3]噁嗪-4-醇(**4d**): 白色固体, 产率 89% (1.20 g). m.p. 159~161 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 1.12 (t, $J=4.0$ Hz, 3H, CH₃), 1.31 (t, $J=8.0$ Hz, 3H, CH₃), 2.32 (s, 3H, CH₃), 3.95~4.07 (m, 2H, OCH₂), 4.20~4.27 (m, 2H, OCH₂), 5.00 (s, 1H, OH), 5.98 (d, $J=4.0$ Hz, 1H, OCH), 7.18 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.32~7.35 (m, 1H, ArH), 7.42 (t, $J=8.0$ Hz, 2H, ArH), 7.53 (d, $J=4.0$ Hz, 2H, ArH), 8.24~8.26 (m, 2H, ArH); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 13.0, 14.2, 14.2, 60.3, 60.8, 79.8, 99.7, 113.8, 117.3, 122.5, 123.2, 126.2, 126.9, 128.1, 129.5, 140.6, 144.3, 148.0, 150.7, 152.2, 155.3, 163.9,

164.1; HR-ESI-MS calcd for $C_{25}H_{23}N_3NaO_9$ ($M+Na$)⁺ 532.1332, found 532.1326.

3-(4-氟-苯基)-2-(3,4-二乙氧基羰基-5-甲基-呋喃-2-亚胺)-6-氯-苯并[1,3]噁嗪-4-醇(**4e**): 白色固体, 产率 85% (1.10 g). m.p. 160~162 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 1.14 (t, $J=8.0$ Hz, 3H, CH₃), 1.33 (t, $J=4.0$ Hz, 3H, CH₃), 2.34 (s, 3H, CH₃), 3.96~4.08 (m, 2H, OCH₂), 4.22~4.28 (m, 2H, OCH₂), 4.39 (d, $J=12.0$ Hz, 1H, OH), 5.84 (d, $J=12.0$ Hz, 1H, OCH), 7.02 (d, $J=12.0$ Hz, 1H, ArH), 7.10 (t, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.31~7.37 (m, 2H, ArH), 7.51~7.54 (m, 2H, ArH); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 13.0, 14.2, 14.2, 60.2, 60.6, 80.1, 99.3, 113.8, 116.3 (d, $J_{C-F}=23.0$ Hz), 117.8, 122.7, 126.7, 129.0 (d, $J_{C-F}=9.0$ Hz), 130.2, 130.9, 136.9 (d, $J_{C-F}=4.0$ Hz), 146.5, 149.0, 150.5, 155.8, 161.0 (d, $J_{C-F}=79.0$ Hz), 164.0, 164.1; HR-ESI-MS calcd for $C_{25}H_{22}N_2NaO_7ClF$ ($M+Na$)⁺ 539.0997, found 539.0992.

3-(4-氟-苯基)-2-(3,4-二乙氧基羰基-5-甲基-呋喃-2-亚胺)-苯并[1,3]噁嗪-4-醇(**4f**): 白色固体, 产率 86% (1.10 g). m.p. 156~158 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 1.09 (t, $J=8.0$ Hz, 3H, CH₃), 1.31 (t, $J=8.0$ Hz, 3H, CH₃), 2.33 (s, 3H, CH₃), 3.92~4.05 (m, 2H, OCH₂), 4.21~4.26 (m, 2H, OCH₂), 4.40 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, OH), 5.87 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, OCH), 7.07 (q, $J=8.0$ Hz, 3H, ArH), 7.21 (t, $J=4.0$ Hz, 1H, ArH), 7.31 (d, $J=4.0$ Hz, 1H, ArH), 7.37~7.41 (m, 1H, ArH), 7.52~7.56 (m, 2H, ArH); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 13.0, 14.1, 14.2, 60.1, 60.6, 80.6, 99.1, 113.8, 116.0, 116.2 (d, $J_{C-F}=1.0$ Hz), 121.3, 125.1, 126.8, 129.0 (d, $J_{C-F}=9.0$ Hz), 130.8, 137.2 (d, $J_{C-F}=3.0$ Hz), 147.9, 149.4, 150.4, 156.1, 161.7 (d, $J_{CF}=246.0$ Hz), 164.0, 164.1; HR-ESI-MS calcd for $C_{25}H_{23}N_2NaO_7F$ ($M+Na$)⁺ 505.1387, found 505.1382.

3-(4-氯-苯基)-2-(3,4-二乙氧基羰基-5-甲基-呋喃-2-亚胺)-6-甲基-苯并[1,3]噁嗪-4-醇(**4g**): 白色固体, 产率 86% (1.30 g). m.p. 140~142 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 1.11 (t, $J=8.0$ Hz, 3H, CH₃), 1.32 (t, $J=8.0$ Hz, 3H, CH₃), 2.33 (d, $J=4.0$ Hz, 6H, 2×CH₃), 3.96~4.07 (m, 2H, OCH₂), 4.20~4.28 (m, 3H, OCH₂, OH), 5.83 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, OCH), 6.94 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.11 (s, 1H, ArH), 7.18 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.37 (d, $J=12.0$ Hz, 2H, ArH), 7.52 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, ArH); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 13.0, 14.2, 14.2, 20.8, 60.1, 60.5, 80.6, 99.2, 113.8, 116.0, 120.9, 126.9, 128.3, 129.4, 131.5, 133.3, 135.0, 140.0, 145.8, 149.4, 150.4, 156.1, 164.0, 164.1; HR-ESI-MS calcd for $C_{26}H_{26}N_2NaO_7Cl$

$(M+Na)^+$ 535.1248, found 535.1243.

3-苯基-2-(3,4-二乙氧基羰基-5-甲基-咪唑-2-亚胺)-6-氯-苯并[1,3]噁嗪-4-醇(**4h**): 白色固体, 产率 85% (1.20 g). m.p. 150~152 °C; 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 1.11 (t, $J=8.0$ Hz, 3H, CH_3), 1.31 (t, $J=4.0$ Hz, 3H, CH_3), 2.32 (s, 3H, CH_3), 3.93~4.07 (m, 2H, OCH_2), 4.19~4.27 (m, 2H, OCH_2), 4.69 (s, 1H, OH), 5.85 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, OCH), 7.00 (d, $J=12.0$ Hz, 1H, ArH), 7.29~7.34 (m, 3H, ArH), 7.40 (t, $J=8.0$ Hz, 2H, ArH), 7.54 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, ArH); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 12.9, 14.2, 14.2, 60.1, 60.5, 80.1, 99.4, 113.9, 117.8, 123.0, 126.6, 126.9, 127.8, 129.3, 130.1, 130.7, 141.1, 146.7, 148.8, 150.3, 155.8, 163.9, 164.0; HR-ESI-MS calcd for $C_{25}H_{23}N_2NaO_7Cl$ ($M+Na$) $^+$ 521.1091, found 521.1094.

3-(间甲基苯基)-2-(3,4-二乙氧基羰基-5-甲基-咪唑-2-亚胺)-6-甲基-苯并[1,3]噁嗪-4-醇(**4i**): 白色固体, 产率 88% (1.20 g). m.p. 127~129 °C; 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 1.09 (t, $J=8.0$ Hz, 3H, CH_3), 1.31 (t, $J=8.0$ Hz, 3H, CH_3), 2.32 (s, 6H, $2\times CH_3$), 2.35 (s, 3H, CH_3), 3.91~4.06 (m, 2H, OCH_2), 4.21~4.26 (m, 2H, OCH_2), 4.37 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, OH), 5.83 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, OCH), 6.93 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.07~7.17 (m, 3H, ArH), 7.27 (t, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.33~7.36 (m, 2H, ArH); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 13.0, 14.2, 14.2, 20.8, 21.5, 60.1, 60.5, 80.6, 99.0, 113.8, 115.9, 121.2, 124.1, 126.9, 127.4, 128.5, 129.0, 131.2, 134.7, 139.2, 141.3, 146.0, 149.7, 150.2, 156.5, 164.0, 164.2; HR-ESI-MS calcd for $C_{27}H_{29}N_2O_7Cl$ 493.1975, found 493.1982.

3-苯基-2-(3,4-二乙氧基羰基-5-甲基-咪唑-2-亚胺)-6,8-二氯-苯并[1,3]噁嗪-4-醇(**4j**): 白色固体, 产率 85% (1.30 g). m.p. 146~148 °C; 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 1.13 (t, $J=8.0$ Hz, 3H, CH_3), 1.32 (t, $J=4.0$ Hz, 3H, CH_3), 2.30 (s, 3H, CH_3), 4.01~4.07 (m, 2H, OCH_2), 4.23~4.28 (m, 2H, OCH_2), 4.98 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, OH), 5.84 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, OCH), 7.17 (s, 1H, ArH), 7.26~7.32 (m, 1H, ArH), 7.37~7.41 (m, 3H, ArH), 7.53 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, ArH); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 12.8, 14.1, 14.2, 60.1, 60.6, 80.1, 99.4, 114.0, 122.6, 124.3, 125.1, 126.8, 127.8, 129.3, 129.9, 130.8, 140.8, 143.0, 148.5, 149.9, 156.2, 163.8, 164.3; HR-ESI-MS calcd for $C_{25}H_{22}N_2NaO_7Cl_2$ ($M+Na$) $^+$ 555.0702, found 555.0703.

3-(3,4-二氯-苯基)-2-(3,4-二乙氧基羰基-5-甲基-咪唑-2-亚胺)-苯并[1,3]噁嗪-4-醇(**4k**): 白色固体, 产率 82% (1.20 g). m.p. 128~1130 °C; 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 1.11 (t, $J=8.0$ Hz, 3H, CH_3), 1.31 (t, $J=4.0$ Hz,

3H, CH_3), 2.34 (s, 3H, CH_3), 3.93~4.07 (m, 2H, OCH_2), 4.20~4.25 (m, 2H, OCH_2), 4.63 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, OH), 5.87 (s, 1H, OCH), 7.05 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.20~7.27 (m, 1H, ArH), 7.32~7.46 (m, 4H, ArH), 7.75 (s, 1H, ArH); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 13.0, 14.1, 14.2, 60.2, 60.6, 80.4, 99.4, 113.8, 116.2, 121.2, 125.3, 126.5, 126.8, 128.6, 130.7, 130.9, 131.6, 132.9, 140.7, 147.8, 149.0, 150.7, 155.6, 164.0, 164.1; HR-ESI-MS calcd for $C_{25}H_{22}N_2NaO_7Cl_2$ ($M+Na$) $^+$ 555.0702, found 555.0693.

3.2.3 3-芳基-2-亚胺苯并[e]-1,3-噁嗪-4-醇衍生物 **4a~4k** 的抗氧化性

参考文献[21]方法对目标化合物 **4a~4k** 淬灭 DPPH•性能进行测试. 将化合物 **4a~4k** 用 DMSO 配制 10.0 mg/mL 的贮备液, 再用乙醇稀释至 0.1、0.2、0.4、0.8、1.0 mg/mL 等不同质量浓度测试其抗氧化性. DPPH 配置 1×10^{-4} mol/L 的乙醇溶液. 分别吸取 100 μ L 化合物 **4a~4k** 稀释浓度和 100 μ L 的 DPPH 乙醇溶液于 96 孔板中混匀, 每个浓度设立 4 个复孔, 在室温下避光反应 30~180 min, 利用酶标仪于 517 nm 处测定吸光值 A . 对照组以体积分数为 10% 的 DMSO 的乙醇代替样品溶液, 空白组以体积分数为 10% 的 DMSO 的乙醇溶液代替 DPPH 溶液, 分别测定在 517 nm 处的吸光度 A_0 和 B , 并以抗坏血酸为阳性对照, 按如下公式计算各样品对 DPPH 自由基的清除率.

$$\text{清除率}(\%) = (1 - (A - B)/A_0) \times 100\%$$

式中: A_0 为对照组吸光值, A 为样品组吸光值, B 为空白组吸光值.

3.2.4 3-芳基-2-亚胺苯并[e]-1,3-噁嗪-4-醇衍生物 **4a~4k** 的抗肿瘤作用

选取对数期生长肿瘤细胞制备单细胞悬液并调整细胞浓度为 2×10^5 个/mL, 以 5000 个/孔接种于 96 孔板中, 在 37 °C, 体积分数为 5% 的 CO_2 中培养箱静置培养 24 h. 用不含血清的培养基加入含有不同浓度受试化合物的培养基, 每个浓度设立 3 个复孔, 以不加药的培养基作为阴性对照, 等浓度的 DMSO 作为溶剂对照, 以吉非替尼为阳性对照药, 培养 48 h 后移去旧培养基, 磷酸盐缓冲液(PBS)洗一次, 每孔加入含有 10 μ L CCK-8 增强型溶液的培养基, 放入培养箱中孵育, 1 h 后用酶标仪在 490 nm 处测定其吸光度.

$$\text{细胞抑制率}(\%) = (1 - A_{\text{实验}}/A_{\text{对照}}) \times 100\%.$$

辅助材料(Supporting Information) 化合物 **4a~4k** 的 1H NMR 与 ^{13}C NMR 谱图. 化合物 **4a** (CCDC 2194139) 的单晶结构数据. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Petrliková, E.; Waissner, K.; Divišová, H.; Husáková, P.; Vrabcová, P.; Kuneš, J.; Kolář, K.; Stolaříková, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 8178.
- [2] Tang, Z. L.; Xia, Z. W.; Wang, H. Q.; Wang, L.; Jiao, Y. C.; Chen, J. W. *Chin. J. Appl. Chem.* **2015**, *32*, 143 (in Chinese). (唐子龙, 夏赞稳, 王宏清, 王恋, 焦银春, 陈金文, 应用化学, **2015**, *32*, 143.)
- [3] Li, H. B.; Li, L.; Li, J. X.; Han, T. F.; He, J. L.; Zhu, Y. Q. *Pest Manage. Sci.* **2018**, *74*, 579.
- [4] Piao, Z. T.; Guan, L. P.; Zhao, L. M.; Piao, H. R.; Quan, Z. S. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 1216.
- [5] Xiao, Z.; Song, S.; Chen, D.; van Merkerk, R.; van der Wouden, P. E.; Cool, R. H.; Quax, W. J.; Poelarends, G. J.; Melgert, B. N.; Dekker, F. J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2021**, *60*, 17514.
- [6] Méndez-Rojas, C.; Quiroz, G.; Faúndez, M.; Gallardo-Garrido, C.; Pessoa-Mahana, C. D.; Chung, H.; Gallardo-Toledo, E.; Saitz-Barria, C.; Araya-Maturana, R.; Kogan, M. J.; Zúñiga-López, M. C.; Iturriaga-Vásquez, P.; Valenzuela-Gutiérrez, C.; Pessoa-Mahana, H. *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.)* **2018**, *351*, e1800024.
- [7] Ikeda, S.; Sugiyama, H.; Tokuhara, H.; Murakami, M.; Nakamura, M.; Oguro, Y.; Aida, J.; Morishita, N.; Sogabe, S.; Dougan, D. R.; Gay, S. C.; Qin, L.; Arimura, N.; Takahashi, Y.; Sasaki, M.; Kamada, Y.; Aoyama, K.; Kimoto, K.; Kamata, M. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 11014.
- [8] El-Hashash, M. A.; Ali, A. T.; Hussein, R. A.; El-Sayed, W. M. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2019**, *19*, 538.
- [9] Zheng, Y.; Dong, M.; Qu, E.; Bai, J.; Wu, X. F.; Li, W. *Chemistry* **2021**, *27*, 16219.
- [10] Safakish, M.; Hajimahdi, Z.; Vahabpour, R.; Zabihollahi, R.; Zarghi, A. *Med. Chem.* **2020**, *16*, 938.
- [11] Yang, J.; Mendowicz, R. J.; Verhelst, S. H. L. *ChemBioChem* **2021**, *22*, 1578.
- [12] Strube, R. E. *US 3296259*, **1967**.
- [13] Hu, Y. G.; Wang, Y.; Du, S. M.; Chen, X. B.; Ding, M. W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6188.
- [14] Hu, Y. G.; Gao, H. T.; Wang, G.; Wang, Y. *Chin. J. Org. Chem.* **2012**, *32*, 1468 (in Chinese). (胡扬根, 高海涛, 王刚, 王燕, 有机化学, **2012**, *32*, 1468.)
- [15] Na, H.; Man, J. H.; Wang, X. Y.; He, S. J.; Li, Q.; Hu, Y. G. *ChemistrySelect* **2019**, *4*, 4901.
- [16] Hu, Y. G.; Luo, C.; Gui, L. L.; Lu, J.; Fu, J. C.; Han, X.; Ma, J. K.; Luo, L. *Front. Chem.* **2021**, *9*, 774090.
- [17] Wang, T.; Wu, F.; Luo, L.; Zhang, Y.; Ma, J.; Hu, G. *J. Mol. Struct.* **2022**, *1256*, 132497.
- [18] Tukhtaev, H. B.; Ivanov, K. L.; Bezzubov, S. I.; Cheshkov, D. A.; Melnikov, M. Y.; Budynina, E. M. *Org. Lett.* **2019**, *21*, 1087.
- [19] Liu, N.; Chao, F.; Liu, M. G.; Huang, N. Y.; Zou, K.; Wang, L. *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 2366.
- [20] Wu, J.; Kong, H.; Ding, M. *Chin. J. Org. Chem.* **2016**, *36*, 1662 (in Chinese). (武静, 孔晗晗, 丁明武, 有机化学, **2016**, *36*, 1662.)
- [21] Zhang, X.; Jin, G.; Chen, Z.; Wang, Q.; Zhao, S.; Wu, Z.; Wan, S.; Xi, G.; Zhao, X. *Chin. J. Org. Chem.* **2021**, *41*, 2445 (in Chinese). (张晓平, 金桂勇, 陈芝飞, 王清福, 赵森森, 武志勇, 万帅, 席高磊, 赵旭, 有机化学, **2021**, *41*, 2445.)

(Cheng, F.)