

· 论 著 ·

2-(4-三氟甲基苯基)-4-乙基-呋喃-3-酰胺衍生物的设计、合成及其抗肿瘤活性研究

张 涛,王甜甜,张一凯,牛春娟,李令振,李 科(第二军医大学药学院药物化学教研室,上海 200433)

[摘要] 目的 设计、合成新型抗肿瘤的 2-(4-三氟甲基苯基)-4-乙基-呋喃-3-酰胺衍生物。方法 以对三氟甲基苯甲醛和丙二酸二乙酯为起始原料,经缩合、环合、酰氯化及胺解等 4 步反应,合成系列目标化合物。结果 设计合成了 15 个目标化合物,并对其进行了 4 种肿瘤细胞 A549、QGY、HeLa 和 SW480 的活性测试。结论 显示出较好的抗肿瘤活性,化合物 5b 显示出最优的高效、广谱抗肿瘤活性,值得深入研究。

[关键词] 呋喃衍生物;化学合成;抗肿瘤;构效关系

[中图分类号] R914.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2014)02-0098-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2014.02.006

Design, synthesis and anti-tumor activities of 2-(4-trifluoromethylphenyl)-4-ethyl-furan-3-amide derivatives

ZHANG Tao, WANG Tiantian, ZHANG Yikai, NIU Chunjuan, LI Lingzhen, LI Ke (Department of Medical Chemistry, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To study the designing, synthesis and anti-tumor activities of the novel 2-(4-trifluoromethylphenyl)-4-ethyl-furan-3-amide derivatives. **Methods** 4-(trifluoromethyl) benzaldehyde and diethyl malonate were used as the starting materials to synthesize a series of target compounds through a multi-step reaction. **Results** 15 compounds were synthesized and their anti-tumor activities were tested against A549, QGY, HeLa and SW480 cell lines. **Conclusion** Target compounds showed good anti-tumor activities, compound 5b showed best broad spectrum activities, which was worth to continued study.

[Key words] furan derivatives; chemical synthesis; anti-tumor; structure-activity relationship

肿瘤特别是恶性肿瘤严重威胁人类健康。恶性肿瘤的预后差、患者痛苦、治疗费用高,病死率超过 30%,全球每年约有 700 万人死于恶性肿瘤,我国每年因肿瘤死亡患者超过 160 万人。由于环境污染及不良生活习惯,近年来肿瘤尤其是恶性肿瘤的发病率逐年上升,且逐渐呈现出年轻化的趋势。化疗是临床抗肿瘤的主要手段之一。因此,抗肿瘤药物是药物研发的重要方向。

目前上市的抗肿瘤药物主要有以氟尿嘧啶、甲氨蝶呤等为代表的抗代谢药物,以阿霉素、博来霉素等为代表的抗肿瘤抗生素,以及以紫杉醇、长春碱等为代表的抗肿瘤植物药及其他抗肿瘤药物。诸多应用于临床的抗肿瘤药物普遍存在对实体瘤疗效差、毒副作用较大、容易产生多药耐药等缺点。因此,研发更为高效、低毒的新型抗肿瘤药仍是新药研究的

热点之一。

呋喃是非常重要的杂环有机化合物,广泛存在于各种结构的天然产物中,不仅是抗菌、抗病毒、抗肿瘤的天然产物的骨架和重要组成部分,如 Sumiki's acid, acetyl Sumiki's acid, perillene, furfuryl thiol 等,更是雷尼替丁(ranitidine)和呋喃西林(nitrofurazone)等上市药物不可或缺的药效团^[1-4]。

香榧为裸子植物红豆杉科榧属植物榧(*Torreya grandis*)的干燥成熟种子,中药以其假种皮入药。香榧中含有多种可在人体中产生药理作用的活性成分,周大铮等^[5-6]从香榧假种皮中分离得到 11 个化合物,其中 8 个二萜、3 个木质素、1 个全新 2-芳基-4-苄基四氢呋喃木质素化合物(TG-10)。体外活性测试发现,TG-10 具有一定的抗 HIV 病毒作用以及较好的抗肿瘤活性。TG-10 结构复杂、合成困难、抗癌谱较窄。笔者以 TG-10 为先导化合物,对其进行结构改造和修饰,以对三氟甲基苯甲醛和丙二酸二乙酯为起始原料,经缩合、环合、酰氯化及胺解等 4 步反应,设计合成了系列 2-(4-三氟甲基苯基)-4-乙

[基金项目] 国家自然科学基金(81173559)。

[作者简介] 张 涛,男,硕士研究生。Tel:(021)81871352, E-mail:lanmozhibei_000@126.com。

[通讯作者] 李 科。Tel:(021)81871237, E-mail:proflike@sina.com。

基-咪唑-3-酰胺目标化合物。采用 MTT 法, 对所设计合成的新化合物进行 A549、QGY、HeLa 和 SW480 4 种肿瘤细胞活性测试。结果显示, 所设计合成的

新型化合物对受试肿瘤株均有较好的抗肿瘤活性, 其中 5b 显示出最优的高效、广谱抗肿瘤活性, 值得继续研究。详见图 1 和图 2。

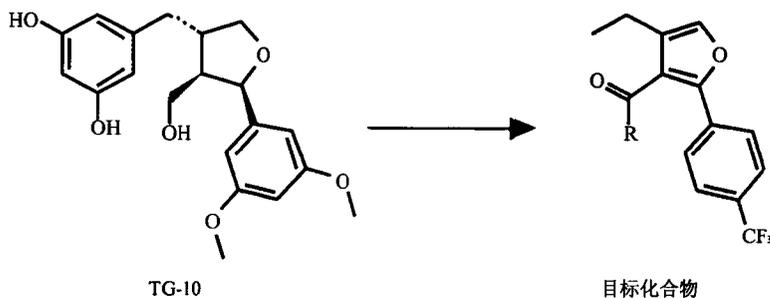


图 1 TG-10 和目标化合物的结构

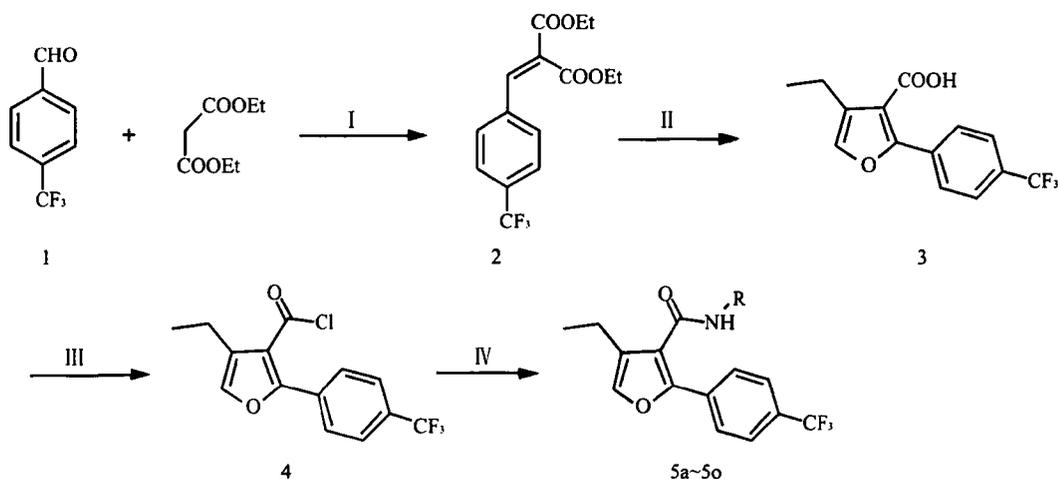


图 2 目标化合物的合成路线

1 合成路线

熔点用 RY-2 型熔点仪测定, 温度未经校正; 核磁共振用 Bruker AC-300P 型仪器, 300 MHz 测定, CDCl_3 及 d_6 -DMSO 为溶剂, TMS 为内标; 质谱采用 Q-TOF Micro YA019 质谱仪测定; 红外光谱采用 Bruker Bector22 型红外光谱仪, KBr 压片; 抗肿瘤活性经酶标仪 ELX800 测定; 柱层析在硅胶 H (10~40 μm) 上进行; 薄层层析在 HSGF254 型硅胶板 (青岛海洋化工厂) 上进行; 所有试剂均为分析纯。

1.1 4-三氟甲基苯基次甲基丙二酸二乙酯的合成
三颈瓶中加入对三氟甲基苯甲醛 (20 g, 0.115 mol)、丙二酸二乙酯 (19.32 g, 0.121 mol)、冰乙酸 (0.34 g, 0.006 mol)、哌啶 (0.29 g, 0.003 mol) 和干燥的甲苯 200 ml, 搅拌回流反应, 过夜。冷凝回流, 分出反应过程中产生的水, 减压蒸去甲苯, 得固体产物, 加入

50 ml 甲醇重结晶。过滤烘干得白色固体 34.52 g, 收率 95.03%, 熔点: 51.3~51.7 $^{\circ}\text{C}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 8.35 (s, 1H), 7.74 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.65 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 4.26 (m, 4H), 1.31 (m, 6H)。ESIMS: m/z (%): 315.07 [M-H] $^-$ 。
1.2 2-(4-三氟甲基苯基)-4-乙基-咪唑-3-羧酸的合成
三颈瓶中加入 200 ml 无水四氢咪唑和 1,4-丁二醇 (8.17 g, 0.095 mol), 然后加入 NaH (7.59 g, 0.190 mol), 室温搅拌至无氢气放出, 依次加入 4-三氟甲基苯基次甲基丙二酸二乙酯 (20 g, 0.063 mol)、碘化亚铜 (1.20 g, 0.006 mol), 60 $^{\circ}\text{C}$ 反应 16 h。反应完全后, 加入适量的水将反应停止, 调节 pH 值至 2~3。减压蒸去四氢咪唑, 加入适量的水稀释, 二氯甲烷萃取 3 次, 合并二氯甲烷相, 减压浓缩, 200~300 目硅胶柱层析, PE:EA = 10:1~2:1 洗脱, 减压蒸去洗脱液得白色固体, 收率 85.00%, 熔点: 159.9~161.0 $^{\circ}\text{C}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO): δ

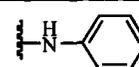
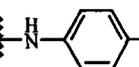
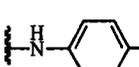
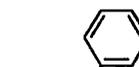
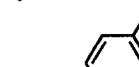
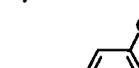
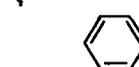
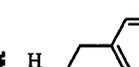
12.02(s, 1H), 7.95(d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.75(d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.63(s, 1H), 2.57(q, $J=7.5$ Hz, 2H), 1.15($J=7.5$ Hz, 3H)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO): δ 165.3, 159.7, 156.0, 138.5, 129.5, 128.6, 126.6, 113.5, 113.0, 55.2, 17.8, 13.9。ESIMS: m/z (%): 283.10 [M-H]⁻。IR(cm^{-1}): 2974, 2942, 2882, 2678, 2633, 2583, 2526, 1683, 1620, 1594, 1549, 1507, 1449, 1427, 1384, 1332, 1227, 1170, 1132, 1080, 1064, 1017, 931, 847, 805, 763, 713。

1.3 2-(4-三氟甲基苯基)-4-乙基-咪唑-3-酰胺的合成 三颈瓶中加入 60 ml 无水二氯甲烷、2-(4-三氟

甲基苯基)-4-乙基-咪唑-3-羧酸(1 g, 0.004 mol)、氯化亚砷(0.62 g, 0.005 mol)回流反应 8 h, 减压蒸去二氯甲烷, 用无水二氯甲烷带走过量的氯化亚砷后制得 2-(4-三氟甲基苯基)-4-乙基-咪唑-3-酰氯(4), 制得的酰氯用 50 ml 的无水二氯甲烷溶解后, 与不同取代的苄胺、苯胺、苯乙胺及哌嗪衍生物反应, 加入无水吡啶作缚酸剂。反应完成后, 调节 pH 值至弱酸性, 加入适量的水稀释, 二氯甲烷萃取 3 次, 合并二氯甲烷相, 减压浓缩后, PE:EA = 10:1 结晶, 得目标化合物 5a~5o。

目标化合物的化学结构、熔点、收率、含量及光谱数据见表 1。

表 1 目标化合物的化学结构、熔点、收率、含量及光谱数据

目标化合物编号	化学结构式	熔点(°C)	收率(%)	含量(%)	$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ ppm
5a		137.7 ~ 138.5	92.9	95.71	8.55(b, 1H), 7.82(m, 1H), 7.39(m, 6H), 7.19(m, 1H), 2.65(m, 2H), 1.25(m, 3H)
5b		183.1 ~ 183.9	92.2	97.99	8.56(m, 1H), 7.80(m, 1H), 7.65(m, 2H), 7.45(m, 3H), 7.01(m, 2H), 2.65(m, 2H), 1.25(m, 3H)
5c		160.2 ~ 161.1	92.5	97.68	8.41(b, 1H), 7.62(m, 4H), 7.39(m, 3H), 7.11(m, 2H), 2.68(m, 2H), 2.42(m, 3H), 1.25(m, 3H)
5d		144.8 ~ 145.0	91.7	99.62	7.69(d, 2H), 7.53(d, 2H), 7.30(m, 6H), 6.02(b, 1H), 4.57(m, 2H), 2.55(m, 2H), 1.25(m, 3H)
5e		188.0 ~ 188.3	91.3	99.11	7.67(d, 2H), 7.53(d, 2H), 7.26(m, 2H), 7.00(m, 2H), 6.12(b, 1H), 4.52(m, 2H), 2.55(m, 2H), 1.25(m, 3H)
5f		134.5 ~ 135.1	93.3	95.88	7.59(m, 4H), 7.13(m, 5H), 6.01(b, 1H), 4.50(m, 2H), 2.49(m, 5H), 1.25(m, 3H)
5g		168.8 ~ 169.8	93.5	95.12	7.61(m, 4H), 7.25(m, 2H), 7.02(m, 3H), 6.07(b, 1H), 4.51(m, 2H), 2.55(m, 2H), 1.25(m, 3H)
5h		140.3 ~ 140.9	93.6	97.45	7.61(m, 2H), 7.49(m, 2H), 7.39(m, 2H), 7.15(m, 1H), 7.05(m, 1H), 6.13(b, 1H), 4.61(m, 2H), 2.55(m, 2H), 1.25(m, 3H)
5i		101.6 ~ 101.7	92.9	95.87	7.69(d, 2H), 7.59(d, 2H), 7.15(m, 6H), 5.89(b, 1H), 3.72(m, 2H), 2.90(m, 2H), 2.55(m, 2H), 1.25(m, 3H)

续表 1

目标化合物编号	化学结构式	熔点(°C)	收率(%)	含量(%)	¹ H-NMR(300 MHz, CDCl ₃) δppm
5j		125.0 ~ 125.5	92.4	98.28	7.70 (m, 4H), 7.44 (m, 1H), 7.00(m, 4H), 5.72(b, 1H), 3.72 (m, 2H), 2.86 (m, 2H), 2.49 (m, 2H), 1.25(m, 3H)
5k		123.5 ~ 124.4	91.8	98.89	7.71(d, 2H), 7.59(d, 2H), 7.19 (m, 2H), 7.02(m, 3H), 5.89(b, 1H), 3.72 (m, 2H), 2.93 (m, 2H), 2.49 (m, 2H), 1.25 (m, 3H)
5l		147.5 ~ 148.0	92.9	95.02	7.69(d, 2H), 7.50(d, 2H), 7.29 (m, 5H), 5.77(b, 1H), 3.71(m, 2H), 2.88 (m, 2H), 2.49 (m, 2H), 1.25(m, 3H)
5m		170.3 ~ 170.9	93.9	94.49	7.69(m, 4H), 7.28 (m, 1H), 4.09(m, 1H), 3.91 (m, 1H), 3.71 (m, 3H), 3.36 (m, 2H), 3.01 (m, 1H), 2.80 (m, 1H), 2.41 (m, 2H), 1.25(m, 3H)
5n		109.3 ~ 109.8	91.5	98.68	7.75(d, 2H), 7.63(m, 2H), 7.40 (s, 1H), 7.22(m, 2H), 6.79(m, 3H), 6.85 (m, 2H), 4.00 (m, 2H), 3.49 (m, 2H), 3.29 (m, 2H), 2.85 (m, 2H), 2.50 (m, 2H), 1.23(t, 3H)
5o		86.1 ~ 86.7	93.6	94.17	7.70 (m, 4H), 7.19 (m, 4H), 4.00(m, 2H), 3.43 (m, 2H), 3.10(m, 2H), 2.92 (m, 1H), 2.68 (m, 1H), 2.50(m, 2H), 1.23(t, 3H)

2 药理部分

2.1 受试药 试验时根据所设剂量组浓度用含10%胎牛血清的Tris-1640培养液配制。

2.2 阳性对照药 5-氟尿嘧啶(5-Fu,第二军医大学药学院药物化学教研室提供,4℃冰箱保存)。

2.3 测试细胞株 人肺癌细胞(A549)、人肝癌细胞(QGY)、人宫颈癌细胞(HeLa)、人结肠癌细胞(SW480)。

2.4 试验方法 MTT法检测样品对4种肿瘤细胞的毒性。取对数生长期细胞,用含10%小牛血清的Tris-1640培养液,制成单细胞悬液 1×10^6 /ml,将该悬液加到96孔板中,每孔加入100 μl。于37℃培养箱中培养24 h后,吸取上清液,分别加入各浓度的受试药物,设三复孔,继续培养24 h。吸取上清液,加入20 μl MTT溶液(5 μg/ml),继续培养4 h后,吸取上清液,加入100 μl的DMSO,充分溶解后在570 nm处测定吸光度(OD值),并计算其抑制率:抑制率(%) = (对照孔OD值 - 实验孔OD值)/对照孔OD值 × 100%, IC₅₀值由SPSS软件计算得出。实验结果见表2。

表2 目标化合物的抗肿瘤活性(IC₅₀, μm)

化合物	A549	QGY	HeLa	SW480
5a	31.3	85.1	77.5	231.0
5b	0.34	2.7	1.9	20.23
5c	32.2	>400	85.0	>400
5d	38.4	>400	43.4	110.9
5e	3.7	6.2	2.3	78.8
5f	82.0	>400	73.6	>400
5g	67.6	>400	71.2	47.8
5h	16.1	>400	14.9	>400
5i	>400	>400	10.3	>400
5j	5.8	>400	1.3	43.6
5k	>400	>400	101.8	>400
5l	24.5	>400	49.1	>400
5m	>400	57.4	>400	>400
5n	>400	50.9	>400	>400
5o	>400	41.8	>400	>400
5-Fu	5.6	14.1	16.1	15.8

3 讨论

在合成中间体3时,反应II采用一种新颖的、之前未见文献报道的[3+2] domino反应,可通过控制NaOH的量(1.2eq)、反应温度(60℃)和延长反应时(下转第120页)

并降低其活性;使纤维蛋白溶解酶原转化为活性的纤维蛋白溶酶;降低全血黏度,抑制红细胞凝集,使血管阻力下降,改善微循环,缩短红细胞通过时间起到疏通血管、溶解血栓的作用^[2]。

本研究中降纤酶治疗组总有效率93.0%明显高于对照组的83.7% ($P < 0.05$),心电图、心肌酶谱等客观指标的改善也明显优于对照组,证实在 NSTEMI 规范治疗基础上加用降纤酶可更加有效缓解症状,减轻心肌损伤,减少心力衰竭和心律失常等并发症的发生,从而更大程度上改善患者的远期预后。

C 反应性蛋白 (C-reactive protein, CRP) 是急性心肌梗死后被激活的反应早期炎症情况的一种较为敏感的指标。另外,越来越多的证据表明 CRP 不仅是炎症标志物,它本身还直接参与炎症过程,CRP 水平升高可导致系统内皮血管扩张能力迟钝,减少 NO 生成,减弱 NO 活性。它还可以增加细胞间黏附因子 (ICAM-1) 和血管黏附因子 (VCAM-1) 的水平,促进病灶内单核细胞、T 淋巴细胞活化^[3]。心肌缺血损伤促发的炎症反应,以及可刺激 CRP 升高的各类炎症刺激因子可诱发心肌重构,并最终出现心力衰竭的临床症状。CRP 在梗后几小时内开始升

高,2~4 d 达峰值,可持续几周^[4]。本研究发现在应用降纤酶的治疗组中,hs-CRP 浓度的峰值及第 14、28 天的检测值均较对照组明显降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。说明在加用降纤酶治疗后可进一步降低心肌梗死后的炎症反应、减轻心肌损伤,在一定程度上延缓心肌重构的进展。降纤酶与其他治疗 NSTEMI 的药物联合应用是安全的,值得临床推广应用。

【参考文献】

- [1] 史继学,孔繁亭. 急诊医学[M]. 3版. 北京:中国医药科技出版社,2008:145.
 - [2] 张象豫. 药物临床信息[M]. 重庆:重庆出版社,2008:856.
 - [3] Rajendran K, Devarajan N, Ganesan M, et al. Obesity, inflammation and acute myocardial infarction-expression of leptin, IL-6 and high sensitivity-CRP in chennai based population [J]. *Thromb J*, 2012, 10(1):13.
 - [4] Ghattas MH, Abo-Elmatty DM, El-Eraki AZ. C-reactive protein 1059G/C gene polymorphism, C-reactive protein levels and acute myocardial infarction[J]. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 2012, 13(11):716-719.
- [收稿日期] 2013-05-11 [修回日期] 2013-11-03
[本文编辑] 李睿旻

(上接第 101 页)

间,高选择性、高收率地得到中间体 3,从而避免四氢咪喃并[3,4-c]吡喃酮和 2,5-二氢咪喃衍生物的生成^[7]。

通过对所合成的 15 个化合物进行抗肿瘤活性测试发现,对于人肺癌细胞 A549,多数化合物显示出较好的肿瘤抑制作用。取代苯乙胺形成的酰胺衍生物的活性好于取代苄胺形成的酰胺衍生物,苯胺形成的酰胺衍生物活性最差,哌嗪及 4-取代苯基哌嗪形成的衍生物对该肿瘤细胞的抑制作用完全丧失。芳环上对位取代形成的酰胺衍生物的活性优于邻位取代形成的衍生物。化合物 5b、5j 显示出较好的抑制人肺癌细胞 A549 的活性,IC₅₀ 值分别为 0.34、3.7 μm,分别达到了阳性对照药 5-Fu 的 16.47 倍和 1.51 倍;对于人肝癌细胞 QGY,哌嗪及取代哌嗪形成的酰胺衍生物 5m、5n、5o 显示了中等的抗肿瘤活性,仅有少量的取代苯胺、取代苄胺形成的酰胺衍生物显示了一定的抗肿瘤活性,多数取代苯胺、取代苄胺和取代苯乙胺对该细胞的活性丧失;对于人宫颈癌细胞 (HeLa 细胞),取代苯乙胺形成的酰胺衍生物的活性要好于取代苄胺形成的酰胺衍生物的活性,更好于苯胺形成的酰胺衍生物的活性,而哌嗪及 4-取代哌嗪形成的酰胺衍生物的活性丧失。其中,化合物 5b、5e、5j、5h 的 IC₅₀ 值分别为 1.9、2.3、1.3、14.8 μm,达阳性对照药 5-Fu 的 8.47、7.00、12.38 和

1.09 倍;对于人结肠癌细胞 SW480,仅有少量的取代苄胺、取代苯乙胺、取代苯胺形成的酰胺衍生物显示了一定的抗肿瘤活性。值得注意的是,化合物 5b、5e、5j 显示出高效、广谱的抗肿瘤活性,远远超过阳性对照药 5-Fu,值得深入研究。

【参考文献】

- [1] Wright DL. Furan as a versatile synthon[J]. *Chem Innov*, 2001, 31(10): 17-21.
 - [2] Min BS, Yun BS, Lee HK, et al. Two novel furan derivatives from *Phellinus linteus* with anti-complement activity[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16: 3255-3257.
 - [3] Hough LB, Menge WMPB, Vande Stolpe AC, et al. Antinociceptive activity of furan-containing congeners of imoprogran and ranitidine[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17: 5715-5719.
 - [4] Zanatta N, Alves SH, Coelho HS, et al. Synthesis, antimicrobial activity, and QSAR studies of furan-3-carboxamides[J]. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15: 1947-1958.
 - [5] 周大铮, 易杨华, 毛士龙, 等. 香榧假种皮中的木脂素成分[J]. *药学学报*, 2004, 39(4): 269-271.
 - [6] 周大铮. 香榧中抗艾滋病病毒活性先导化合物的研究和结构修饰[D]. 第二军医大学, 2004.
 - [7] Wang TT, Liu J, LU ZL, et al. Efficient and mild synthesis of highly substituted 2, 5-dihydro-furan and furan derivatives via stepwise reaction[J]. *Tetrahedron*, 2011, 67(19): 3476-3482.
- [收稿日期] 2013-04-26 [修回日期] 2013-10-11
[本文编辑] 李睿旻