

精细化工[®]

FINE CHEMICALS

- ✔ 入选中国科技期刊卓越行动计划
- ✔ EI、CSCD、中文核心、北大核心等权威数据库收录
- ✔ 国内精细化工行业创刊最早的权威期刊
- ✔ 中国化工学会精细化工专业委员会会刊

知网首发

稿件一经录用，中国知网可查询，并由编辑部与知网共同出具网络首发证书。

报道范围

涵盖当代中国精细化工科学与工业的众多新兴领域。如：功能材料、能源化工、生物工程、中药现代化技术、环境保护、食品化学品、油田化学品、表面活性剂、医药与日化原料等。



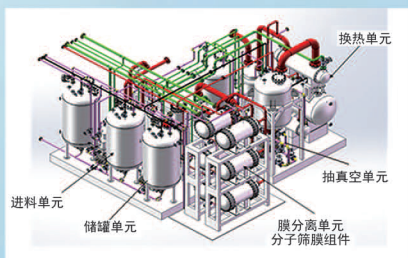
扫描二维码关注我们

《精细化工[®]》编辑部



浙江汇甬新材料有限公司

微波合成第二代脱水膜

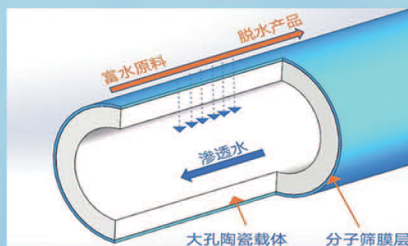


国家自然科学基金二等奖 成果转化

I ChemE全球 创新产品冠军

微波分子筛膜 脱水性能遥遥领先

共沸体系、热敏体系、含水有机物脱水精制换代技术



收率高、能耗低、连续脱水、无需再生

在如下领域的有机物脱水精制已有工业化应用

锂电池电解液溶剂及NMP生产、回收

BDO产业链、煤化工、石油化工精细化学品

制药行业、溶媒回收、燃料乙醇、超纯溶剂

广泛适用于醇类、醚类、酯类、酮类、苯系物、卤代烃的脱水精制



固定电话：0574-87648996

电话：13396592011

网址：www.hymater.com

地址：浙江省宁波市江北高新园区庆丰路联东U谷国际港56号楼

异海松酸基杂环酰胺衍生物的制备及抗癌活性

刘娟娟, 张 珺, 杨韶平*

(贵州中医药大学 药学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 为了获得结构新颖的抗肿瘤药物分子, 以天然产物异海松酸 (I) 为母体结构, 合成了 9 个异海松酸基杂环酰胺化合物 (II a~II i), 其结构经 FTIR、¹HNMR、¹³CNMR 和 TOF-MS 确证。抗肿瘤活性测试结果表明, 除 II f 外, 其余目标化合物的抗肿瘤活性均比母体化合物异海松酸的活性高, 尤其是含有吡嗪杂环的化合物异海松酸基(2-氨基吡嗪)酰胺 (II d) 对人黑色素瘤 (A375) 细胞显示出显著的增殖抑制活性, 其半抑制浓度 (IC₅₀) 为 13.34 μmol/L, 有望通过进一步结构修饰来提高活性, 成为异海松酸类抗癌先导化合物。

关键词: 异海松酸; 杂环化合物; 合成; 抗癌活性; 增殖抑制; 医药原料

中图分类号: TQ463 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2024) 04-0890-05

Preparation and anticancer activity of isopimaric acid heterocyclic amide derivatives

LIU Juanjuan, ZHANG Jun, YANG Shaoping*

(School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, Guizhou, China)

Abstract: In order to develop antitumor drugs with new molecular structure, nine heterocyclic amide compounds (II a~II i) were synthesized from natural product isopimaric acid (I), and characterized by FTIR, ¹HNMR, ¹³CNMR and TOF-MS. Data from anti-tumor performance analysis revealed that except for II f, all the other target compounds showed higher anti-tumor activities than the natural isopimaric acid. Especially compound isopimaric acyl-(2-aminopyrazine)amide (II d) containing pyrazine heterocycle exhibited significant cell proliferation inhibitory activity against A375 human melanoma cells, with a half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of 13.34 μmol/L. Therefore, compound II d is expected for antitumor activity improvement through further structural modification and become a leading anti-tumor compound of isopimaric acid.

Key words: isopimaric acid; heterocyclic compounds; synthesis; anticancer activity; proliferation inhibition; drug materials

异海松酸 (IPA) 是从天然产物松香中分离出来的一种结构特殊的树脂酸, 属于二萜类化合物, 其化学结构中含有 1 个三环菲骨架、2 个非共轭双键及 1 个羧基, 这种独特的化学结构使 IPA 与大多数萜类化合物一样具有多种生物活性, 同时又具有一些特殊的生物活性, 如对结核杆菌表现出显著的抑制活性^[1], 是抗癆药物中的主要活性成分之一。文献报道的 IPA 的生物活性多集中在其作为 K⁺ 和 Ca²⁺

通道的开启剂来参与机体多项功能调节, 对高血压^[2]、疼痛^[3]、心房颤动^[4]、心律失常^[5]和阿尔茨海默病^[6-7]具有潜在的治疗作用。此外, 还有抗癌^[8]和抑酶^[9]等生物活性。鉴于 IPA 具有广泛的生物活性, 以其为母体骨架开发生物活性更好的 IPA 衍生物近年来也有报道^[10-12], 但 IPA 及其衍生物本身的药理活性未被很好地开发。因此, 开展 IPA 类生物活性分子设计及活性研究具有较大的发展空间。

收稿日期: 2023-04-21; 定用日期: 2023-07-26; DOI: 10.13550/j.jxhg.20230332

基金项目: 贵中医博士启动基金项目 ([2020]70)

作者简介: 刘娟娟 (1984—), 女, 博士生, E-mail: jiliu2017@163.com。联系人: 杨韶平 (1976—), 男, 副教授, E-mail: yangshaoping220@gzy.edu.cn。

杂环化合物是指分子中含有除碳以外的原子(如氮、硫、氧等)构成的环状有机化合物,其结构丰富多样,在富含生物活性的天然产物结构中占主导地位,显示出广泛的生理学和药理学性质,包括抗癌、抗菌、抗感染、抗病毒以及降低胆固醇等^[13],至今仍是药物领域关注的热点。当前,关于开发杂环化合物生物活性的研究有诸多报道,如金秋彤等^[14]设计合成的6-(哌嗪-1-基)-去氢骆驼蓬碱酰胺类杂环化合物对棉花枯萎病菌表现出良好的抑菌活性;HE等^[15]设计合成的苯并[d]噻唑类杂环化合物对COX-1和COX-2表现出优异的抑制活性,具有镇痛和抗炎的作用;唐玉婷等^[16]设计的*N*-(4-叔丁基-5-苄基噻唑-2-基)氨基乙酰胺类杂环化合物对肺癌细胞(A549)、宫颈癌细胞(Hela)和乳腺癌细胞(MCF-7)具有抑制活性;WANG等^[17]设计合成的2,4-二取代噻唑啉类杂环化合物对甲型流感病毒具有较强的细胞毒活性等。

基于此,本研究拟采用活性拼接的方式,通过酰胺键将杂环结构引入到IPA母体上,合成9个含N/S杂原子的IPA类杂环化合物,并对目标化合物的生物活性进行研究,以期发现具有高活性的IPA类衍生物,为抗肿瘤药物的开发提供新的分子结构类型。

1 实验部分

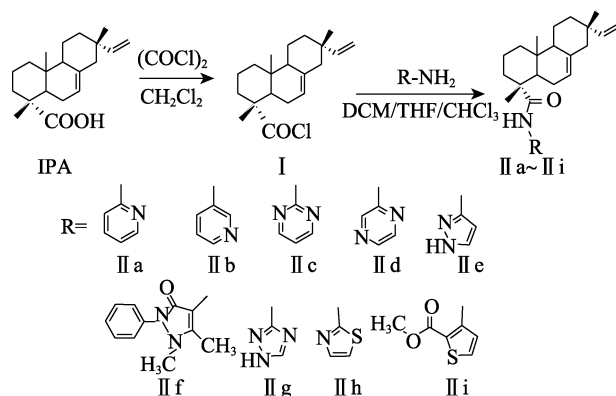
1.1 试剂与仪器

IPA,自制^[18],GC纯度93.8%;2-氨基吡啶、3-氨基吡啶、2-氨基嘧啶、2-氨基吡嗪、3-氨基吡啶、4-氨基安替吡啉、2-氨基三唑、2-氨基噻唑和3-氨基-2-噻吩甲酸甲酯和草酰氯[(COCl)₂],分析纯,阿拉丁试剂(上海)有限公司;二甲基亚砜(DMSO),细胞级,美国Sigma试剂公司;二氯甲烷(DCM)、三氯甲烷、四氢呋喃(THF)、三乙胺、石油醚、乙酸乙酯,分析纯,贵阳四面体化工有限公司;人喉癌(Hep2)、人黑色素瘤(A375),江苏凯基生物技术有限公司。

Nicolet iS10 傅里叶变换红外光谱仪,美国Nicolet公司;WRS-1B型数字熔点仪,上海申光仪器仪表有限公司;Bruker AV-300/500核磁共振波谱仪,德国Bruker公司;Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS质谱仪,美国Agilent公司;RE5203型真空旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;EL-x800酶标仪,美国BioTek仪器有限公司。

1.2 方法

IPA类衍生物的合成路线如下所示:



1.2.1 异海松酸酰氯(I)的合成

将IPA 1.5 g (5 mmol)和10 mL DCM加入到50 mL三口烧瓶中,待IPA完全溶解后,将0.51 mL (6 mmol)(COCl)₂溶于5 mL DCM,并置于分液漏斗中,在0~5 °C下缓慢滴加到上述溶液中,滴加完毕后升温到25 °C,TLC〔V(石油醚):V(乙酸乙酯)=6:1〕跟踪反应进度。待原料IPA反应完全,反应液经减压蒸除溶剂和过量的草酰氯,得到异海松酸酰氯(I),黄色黏稠液体,产率93.0%,GC纯度98.8%。

1.2.2 异海松酸基杂环酰胺(II a~II i)的合成

以II a的合成为例,将2-氨基吡啶0.47 g (5 mmol)和5 mL DCM(或THF、三氯甲烷)置于50 mL三口烧瓶中,在冰浴下加入三乙胺0.83 mL (6 mmol)。将化合物I 1.90 g (6 mmol)溶于5 mL DCM(或THF、三氯甲烷)并置于分液漏斗中,缓慢滴加到上述混合液中,滴加完毕,于25 °C反应2 h〔TLC跟踪反应,展开剂V(石油醚):V(乙酸乙酯)=3:1~1:1〕。反应结束,过滤除去沉淀,滤液减压蒸除溶剂得到粗产物。粗品经硅胶柱层析〔V(石油醚):V(乙酸乙酯)=6:1~3:1〕分离纯化,得到目标产物异海松酸基(2-氨基吡啶)酰胺(II a)。用3-氨基吡啶、2-氨基嘧啶、2-氨基吡嗪、3-氨基吡啶、4-氨基安替吡啉、2-氨基三唑、2-氨基噻唑和3-氨基-2-噻吩甲酸甲酯替换2-氨基吡啶,按照上述步骤合成异海松酸基酰胺衍生物II b~II i。

异海松酸基(2-氨基吡啶)酰胺(II a):白色固体粉末,产率83.3%,熔点85.4~85.8 °C。IR(KBr), ν/cm^{-1} : 3433 (N—H), 2925 (C—H), 1670 (C=O), 1640 (C=C), 1429 (C—N); ¹HNMR (300 MHz, CDCl₃), δ : 8.25 (s, 1H, NH), 8.15 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, Ar—H), 7.70 (t, *J* = 10.5 Hz, 1H, Ar—H), 7.03 (t, 1H, Ar—H), 5.85~5.75 (dd, *J* = 10.5、17.4 Hz, 1H, C=CH—), 5.29~5.27 (brd, 1H, C=CH—), 4.95~4.85 (m, 2H, C=CH₂), 2.01~1.77 (m, 8H), 1.68~1.56 (m, 6H), 1.43 (s, 3H, CH₃), 1.27~1.07 (m, 2H), 0.95 (s, 3H, CH₃), 0.86 (s, 3H, CH₃); ¹³CNMR (75 MHz, CDCl₃), δ :

177.8, 152.1, 150.7, 148.0, 138.8, 136.1, 121.2, 120.1, 114.4, 109.8, 52.5, 47.9, 46.6, 46.4, 39.2, 37.7, 37.2, 36.4, 35.7, 25.4, 21.9, 20.4, 18.6, 17.9, 15.7。TOF-MS, m/Z : $C_{25}H_{35}N_2O$ $[M+H]^+$ 理论值 379.2749, 实测值 379.2752。

异海松酸基(3-氨基吡啶)酰胺(II b): 白色固体粉末, 产率 85.5%, 熔点 83.2~83.7 °C。IR (KBr), ν/cm^{-1} : 3433 (N—H), 2925 (C—H), 1670 (C=O), 1640 (C=C), 1429 (C—N); 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ : 8.60 (s, 1H, —NH), 7.40 (s, 1H, Ar—H), 7.28 (s, 1H, Ar—H), 6.98 (s, 2H, Ar—H), 5.80 (dd, $J = 17.5$ 、10.5 Hz, 1H, C=CH—), 5.29 (brd, 1H, C=CH—), 4.90 (d, $J = 17.5$ Hz, 1H), 4.86 (d, 10.5 Hz, 1H), 2.70~2.46 (m, 2H), 2.05~1.84 (m, 6H), 1.63~1.55 (m, 4H), 1.47 (s, 3H, CH_3), 1.42~1.25 (m, 4H), 0.97 (s, 3H, CH_3), 0.87 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$), δ : 177.5, 150.1, 145.0, 141.6, 135.7, 134.9, 127.7, 123.4, 120.6, 109.2, 52.0, 47.3, 46.9, 45.8, 38.6, 37.2, 36.7, 36.0, 35.2, 24.9, 21.4, 19.9, 18.1, 17.5, 15.2。TOF-MS, m/Z : $C_{25}H_{35}N_2O$ $[M+H]^+$ 理论值 379.2749, 实测值 379.2752。

异海松酸基(2-氨基嘧啶)酰胺(II c): 淡黄色固体粉末, 产率 50.8%, 熔点 69.8~70.4 °C。IR (KBr), ν/cm^{-1} : 3445 (N—H), 1669 (C=O), 1637 (C=C), 1426 (C—N); 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ : 8.62 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H), 8.28 (s, 1H, CONH), 7.01 (t, $J = 4.8$ Hz, 1H), 5.80 (dd, $J = 10.5$ 、17.4 Hz, 1H, C=CH—), 5.28~5.26 (brd, 1H, C=CH—), 4.95~4.84 (m, 2H, C=CH₂), 1.97~1.74 (m, 8H), 1.62~1.47 (m, 6H), 1.43 (s, 3H, CH_3), 1.37~0.98 (m, 2H), 0.94 (s, 3H, CH_3), 0.85 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ : 176.7, 158.7(2C), 158.1, 150.6, 136.0, 121.2, 117.1, 109.7, 52.5, 48.4, 46.4(2C), 39.1, 37.6, 37.1, 36.4, 35.7, 25.4, 21.9, 20.4, 18.6, 17.9, 15.7。TOF-MS, m/Z : $C_{24}H_{34}N_3O$ $[M+H]^+$ 理论值 380.2696, 实测值 380.2680。

异海松酸基(2-氨基吡嗪)酰胺(II d): 白色固体粉末, 产率 50.2%, 熔点 71.2~72.2 °C。IR (KBr), ν/cm^{-1} : 3445 (N—H), 1672 (C=O), 1639 (C=C), 1301 (C—N); 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ : 9.60 (s, 1H, NH), 8.33 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, Ar—H), 8.22 (s, 1H, Ar—H), 8.05 (s, 1H, Ar—H), 5.80 (dd, $J = 10.7$ 、17.5 Hz, 1H, C=CH—), 5.29~5.28 (brd, 1H, C=CH—), 4.92 (d, $J = 16.5$ Hz, 1H, C=CH₂), 4.86 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H, C=CH₂), 2.07~1.79 (m, 8H), 1.70~1.58 (m, 6H), 1.45 (s, 3H, CH_3), 1.41~1.37 (m, 2H), 0.96 (s, 3H, CH_3), 0.86 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$), δ : 177.3, 150.2, 148.3, 141.8, 140.1, 137.2, 135.9, 120.6, 109.3, 52.1, 47.5, 46.0(2C), 38.7, 37.4, 36.8, 36.0, 35.3, 25.0, 21.5, 20.0, 18.2, 17.6, 15.3。TOF-MS, m/Z : $C_{24}H_{34}N_2O$ $[M+H]^+$ 理论值 380.2693, 实测值 380.2684。

异海松酸基(3-氨基吡唑)酰胺(II e): 白色固体粉末, 产率 50.2%, 熔点 76.5~77.2 °C。IR (KBr), ν/cm^{-1} : 3464, 3366 (N—H), 1664 (C=O), 1639 (C=C), 1232 (C—N); 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ : 8.82 (s, 1H, NH), 8.04 (s, 1H, Ar—H), 5.83~5.78 (m, 3H, C=CH—), 5.33~5.28 (brd, 1H, C=CH—), 4.92 (d, $J = 16.5$ Hz, 1H, C=CH₂), 4.86 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, C=CH₂), 2.09~1.75 (m, 7H), 1.68~1.55 (m, 4H), 1.47 (s, 3H, CH_3), 1.43~1.26 (m, 5H), 0.96 (s, 3H, CH_3), 0.87 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$), δ : 183.7, 150.4, 135.7, 135.4, 132.7, 121.7, 109.0, 91.4, 52.2, 46.2, 46.0, 45.6, 38.2, 37.1, 36.1, 35.2, 34.3, 25.3, 21.5, 18.0, 18.7, 16.6, 15.6。TOF-MS, m/Z : $C_{23}H_{33}N_3ONa$ $[M+Na]^+$ 理论值 390.2538, 实测值 390.2523。

异海松酸基(4-氨基安替吡啉)酰胺(II f): 淡黄色固体粉末, 产率 43.6%, 熔点 121.0~121.6 °C。IR (KBr), ν/cm^{-1} : 3291 (N—H), 1675 (C=O), 1642 (C=C), 1231 (C—N); 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ : 7.50 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H, Ar—H), 7.44 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H, Ar—H), 7.35 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H, Ar—H), 7.22 (s, 1H, NH), 5.82 (dd, $J = 10.5$ 、17.5 Hz, 1H, C=CH—), 5.36~5.35 (brd, 1H, C=CH—), 4.96 (d, $J = 17.5$ Hz, 1H, C=CH₂), 4.90 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H, C=CH₂), 3.09 (s, 3H, CH_3), 2.30 (s, 3H, CH_3), 2.21 (s, 2H, CH_2), 2.08~1.80 (m, 6H), 1.72~1.52 (m, 4H), 1.46 (s, 3H, CH_3), 1.42~1.19 (m, 4H), 0.99 (s, 3H, CH_3), 0.91 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ : 178.3, 162.2, 150.8, 149.2, 136.0, 135.2, 129.7(2C), 127.27, 124.3(2C), 121.4, 109.9, 109.8, 52.5, 47.4, 46.5, 46.3, 39.2, 38.0, 37.2, 36.8, 36.5, 35.64, 25.5, 21.9, 20.4, 18.6, 18.0, 14.7, 13.2。TOF-MS, m/Z : $C_{31}H_{41}N_3O_2Na$ $[M+Na]^+$ 理论值 510.3096, 实测值 510.3102。

异海松酸基(2-氨基三唑)酰胺(II g): 白色固体粉末, 产率 32.0%, 熔点 87.1~87.9 °C。IR (KBr), ν/cm^{-1} : 3453 (N—H), 2909, 2862 (CH_2 , CH_3), 1669 (C=O), 1637 (C=C), 1383 (C—N); 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ : 8.69 (s, 1H, NH), 7.28 (s, 1H, Ar—H), 6.98 (s, 1H, Ar—H), 5.80 (dd, $J = 10.7$ 、17.5 Hz, 1H, C=CH—), 5.29 (brd, 1H, C=CH—), 4.92 (d, $J = 14.1$ Hz, 1H, C=CH₂), 4.86 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H, C=CH₂), 2.07~2.46 (m, 2H), 2.06~1.84 (m, 6H), 1.66~1.55 (m, 4H), 1.47 (s, 3H, CH_3), 1.41~1.25 (m, 4H), 0.97 (s, 3H, CH_3), 0.87 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$), δ : 179.9, 159.8, 150.4, 148.7, 135.8, 120.9, 109.3, 52.0, 49.9, 46.0, 42.7, 38.0, 36.8, 36.1, 35.2, 34.0, 25.2, 21.5, 20.0, 18.3, 18.1, 15.4。TOF-MS, m/Z : $C_{22}H_{32}N_4ONa$ $[M+Na]^+$ 理论值 391.2563, 实测值 391.2574。

异海松酸基(2-氨基噻唑)酰胺(II h): 淡黄色固体粉末, 产率 69.3%, 熔点 82.5~84.1 °C。IR (KBr), ν/cm^{-1} : 3224 (N—H), 2909, 2862 (CH_2 , CH_3), 1669

(C=O), 1637 (C=C), 1272 (C—N); $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ : 9.49 (s, 1H, NH), 7.46 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, Ar—H), 6.99 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H, Ar—H), 5.80 (dd, $J = 10.5$ 、17.4 Hz, 1H, C=CH—), 5.26 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H, C=CH—), 4.96~4.85 (m, 2H, C=CH₂), 2.05~1.67 (m, 8H), 1.63~1.47 (m, 6H), 1.41 (s, 3H, CH₃), 1.37~1.09 (m, 2H), 0.94 (s, 3H, CH₃), 0.85 (s, 3H, CH₃); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3), δ : 177.1, 159.5, 150.6, 137.5, 136.2, 121.0, 114.1, 109.7, 52.4, 47.3, 46.4, 46.3, 39.0, 37.6, 37.2, 36.4, 35.6, 25.4, 21.9, 20.4, 18.4, 17.6, 15.7。TOF-MS, m/z : $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 385.2308, 实测值 385.2286。

异海松酸基(3-氨基-2-噻吩甲酸甲酯)酰胺(II i): 白色固体粉末, 产率 45.4%, 熔点 112.3~112.7 °C。IR (KBr), ν/cm^{-1} : 3139 (N—H), 1692 (C=O), 1643 (C=C), 1208 (C—N); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3), δ : 10.63 (s, 1H, NH), 8.17~8.16 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H, Ar—H), 7.45 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H, Ar—H), 5.80 (dd, $J = 10.8$ 、17.5 Hz, 1H, C=CH—), 5.27 (brd, 1H, C=CH—), 4.94~4.85 (m, 2H, C=CH₂), 3.90 (s, 3H, CH₃), 2.03~1.87 (m, 7H, CH 和 CH₂), 1.78~1.57 (m, 7H), 1.48 (s, 3H, CH₃), 1.43~1.36 (m, 2H), 0.96 (s, 3H, CH₃), 0.86 (s, 3H, CH₃); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3), δ : 176.8, 165.3, 150.5, 146.2, 136.8, 136.7, 131.6, 122.6, 120.9, 110.2, 109.3, 52.1, 52.0, 47.4, 47.0, 46.1, 38.8, 37.3, 36.8, 36.1, 35.3, 25.0, 21.6, 18.2, 17.5, 15.4。TOF-MS, m/z : $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{NO}_3\text{SNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 理论值 464.6326, 实测值 464.6331。

1.3 抗癌活性测试

采用四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 比色法测试目标化合物对人喉癌 (HeP2) 和人黑色素瘤 (A375) 的抗肿瘤活性。待测细胞经消化、计数, 配制细胞悬液(体积分数 90%胎牛血清+10% DMSO, 3.5×10^7 个/L), 96 孔细胞培养板中每孔加入 100 μL 细胞悬液, 置于 37 °C, CO_2 体积分数为 5% 的培养箱中培养过夜; 待测化合物首先溶于 DMSO 中配成不同浓度溶液, 然后加入到 96 孔板的每个微孔中, 每孔 100 μL , 同时设立阳性对照组, 并设置 5 个平行孔; 96 孔细胞培养板置于 37 °C, CO_2 体积分数为 5% 的培养箱中培养 72 h 后, 每孔加入 20 μL 质量浓度为 5 g/L 的 MTT 溶液, 继续培养 4 h, 弃去上清液, 每孔加入 150 μL DMSO 溶解, 摇床振荡 10 min 混匀, 用酶标仪测定溶液在 490 nm 处的吸光度 (OD)。根据式 (1) 计算样品的抑制率 (平行 5 次实验的平均值):

$$\text{抑制率}/\% = \frac{\text{阳性对照组OD值} - \text{实验组OD值}}{\text{阳性对照组OD值}} \times 100 \quad (1)$$

然后以各药物浓度对数值对各浓度下的抑制率作线性回归, 从所得剂量-效应方程计算出供试化合物对实验细胞的半数抑制浓度 (IC_{50})。

2 结果与讨论

2.1 波谱分析

酰胺化合物的红外光谱中, 3139~3445 cm^{-1} 为 N—H 的伸缩振动吸收峰; 1760 cm^{-1} 处为羧酸的 C=O 吸收峰; 当羧酸转变成酰胺后, C=O 吸收峰受—NH₂ 的影响向低波数移动, 出现在 1670 cm^{-1} 附近; 1637~1642 cm^{-1} 为 C=C 的特征吸收峰; 1231~1429 cm^{-1} 为 C—N 伸缩振动吸收峰。 $^1\text{H NMR}$ 中, δ 7.22~9.59 处单峰为 NH—质子峰; δ 6.98~8.62 处峰为苯环上 C—H 质子峰; δ 4.85~5.87 处峰为 IPA 母体骨架上的—HC=CH₂ 质子峰; 其余为 IPA 母体骨架上的其他质子峰。 $^{13}\text{C NMR}$ 中, δ 177.1~178.3 处峰归属于 C=O 键; δ 109.7~162.2 处峰归属于杂环及 IPA 母体结构上不饱和碳; 其余为 IPA 母体骨架上的其他碳。HRMS 检测结果表明, 目标化合物的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 或 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 实测值与理论值相当。综上分析, 证实所合成的化合物即为目标化合物。

2.2 反应条件的考察

合成酰氯的反应中, 因 IPA 中羧基的空间位阻较大, 难以与胺直接反应得到酰胺, 因此采用典型的酰氯法合成, 即首先将 IPA 转变成活性中间体酰氯再与胺发生酰化反应, 得到酰胺化合物。制备酰氯常用的酰化试剂有二氯亚砷 (SOCl_2)、三氯氧磷 (POCl_3)、五氯化磷 (PCl_5) 和 $(\text{COCl})_2$ 等。 SOCl_2 、 POCl_3 和 PCl_5 作酰化试剂时, 需要在较高温度下回流反应, 会给原料 IPA 带来异构化的影响, 因此, 选择反应条件较温和的 $(\text{COCl})_2$ 作为活化 IPA 羧基的酰化试剂。酰氯与胺的反应中, 会有 HCl 生成, 为了使反应向正方向移动, 需要加入缚酸剂。常用的缚酸剂有无机缚酸剂 (NaOH 、 Na_2CO_3 、 NaHCO_3 、 K_2CO_3 等) 和有机缚酸剂 (吡啶和三乙胺), 因无机缚酸剂一般不溶于常用的有机溶剂, 会使反应处在非均相体系中, 不利于反应的进行, 因此选用有机缚酸剂三乙胺。实验中发现, 杂环胺由于极性太大, 在 DCM 中的溶解度不好, 与 $(\text{COCl})_2$ 的反应效果很不理想, 只有 2-氨基吡啶与 $(\text{COCl})_2$ 的反应较好。2-氨基嘧啶、2-氨基吡嗪、4-氨基安替吡啉和 3-氨基吡唑由于在 DCM 中的溶解性太差, 所以将溶剂换成 THF, 并在回流条件下才能与 $(\text{COCl})_2$ 发生较好的反应; 4-氨基安替吡啉由于结构中的位阻原因, 导致反应即使在回流条件下延长反应时间到 4 h, 反应效果也不够理想, II f 产率较低, 仅为 43.6%。3-氨基-2-噻吩甲酸甲酯、噻唑酰胺和三唑酰胺合成目标产物时采用三氯甲烷为溶剂, 回流状态下进行反应, 反应的效果也不理想, 三唑酰胺 II g 的产率仅

为 32.0%。

2.3 抗癌活性分析

以 DMSO 为溶剂, 采用 MTT 法测评了目标化合物对 Hep2 和 A375 细胞株的体外抑制作用, 并与母体化合物异海松酸和阳性对照药物紫杉醇进行对比, 测试结果见表 1。

表 1 化合物 II a~II i 对肿瘤细胞的抑制活性
Table 1 Antitumor activities of compounds II a~II i

化合物	IC ₅₀ /($\mu\text{mol/L}$)	
	Hep2	A375
II a	54.19	60.89
II b	22.24	54.36
II c	67.56	56.34
II d	32.13	13.34
II e	86.54	52.31
II f	105.28	71.68
II g	42.23	20.27
II h	37.52	43.10
II i	32.46	43.12
IPA	>100	>100
紫杉醇	5.13	106.71

从表 1 可以看出, 除化合物 II f 外, 其余 8 个目标化合物对测试细胞的增殖抑制活性均比母体化合物异海松酸的活性高, 说明对 IPA 进行结构修饰以改善其活性是可行的; 目标化合物与阳性对照药物紫杉醇的活性相比, 对 Hep2 细胞的增殖抑制活性均小于紫杉醇, 而对 A375 细胞的增殖抑制活性均大于紫杉醇。其中, 化合物 II d 和 II g 对 A375 细胞表现出显著的增殖抑制活性, IC₅₀ 分别为 13.34 和 20.27 $\mu\text{mol/L}$, 尤其是化合物 II d, 有望通过进一步结构修饰成为抗 A375 肿瘤细胞的先导化合物; 化合物 II b、II d、II h 和 II i 对 Hep2 细胞显示出明显的细胞增殖抑制活性; 化合物 II a、II c 和 II g 对 Hep2 细胞, 化合物 II a~c、II e、II h 和 II i 对 A375 细胞具有中等程度的抑制细胞增殖活性; 化合物 II f 对 2 种测试细胞的增殖抑制活性较弱。本研究所合成的目标化合物绝大部分杂环上没有其他的取代基, 基于上述活性评价结果, 预期可以进一步对其结构进行修饰, 有望得到活性更好的 IPA 杂环酰胺类抗肿瘤活性分子。

3 结论

(1) 本文以异海松酸为母体骨架, 合成了 9 个含杂环类的异海松酸酰胺化合物, 并通过 FTIR、¹HNMR、¹³CNMR 和 TOF-MS 分析确证。

(2) 抗癌活性研究结果表明, 除 II f 外, 其余目标化合物的抗癌活性均高于母体化合物异海松酸, 且化合物 II d 对 A375 细胞的增殖抑制活性最为显著, IC₅₀ 为 13.34 $\mu\text{mol/L}$, 有望成为抗 A375 肿瘤细胞增殖的先导化合物。

(3) 本研究设计的目标分子结构中杂环类型比较少, 且杂环上基本没有取代基, 所以结构相对较单一。后续可通过进一步丰富杂环类型及在杂环上引入不同的取代基, 以期寻找活性更好的异海松酸类抗癌活性分子。

参考文献:

- [1] CHENG L F (程立方), CUI X J (崔秀君). Content determination of isopimaric acid in Kanglao capsule[J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy (中国医院药学杂志), 2007, 27(5): 702-703.
- [2] IMAIZUMI Y. Molecular basis of pimarane compounds as novel activators of large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel α -subunit[J]. Molecular Pharmacology, 2002, 62(4): 836-846.
- [3] RUSSO R, LOVERME J, LA R G, *et al.* Synergistic antinociception by the cannabinoid receptor agonist anandamide and the PPAR- α receptor agonist GW7647[J]. European Journal of Pharmacology, 2007, 566(1/2/3): 117-129.
- [4] SALARI S, BRASK J, EJNEBY M, *et al.* Isopimaric acid-A promiscuous ion channel modulator and a potential drug candidate against atrial fibrillation[J]. Acta Physiologica, 2017, 219(S711): 14.
- [5] SALARI S, EJNEBY M, BRASK J, *et al.* Isopimaric acid-A multi-targeting ion channel modulator reducing excitability and arrhythmicity in a spontaneously beating mouse atrial cell line[J]. Acta Physiologica, 2018, 222(1): 1-27.
- [6] FATEMA R S, ENGY M, SEHAM E H, *et al.* Chemometric-enhanced metabolic profiling of five pinus species using HPLC-MS/MS spectrometry: Correlation to *in vitro* anti-aging, anti-alzheimer and antidiabetic activities[J]. Journal of Chromatography B, 2021, 1177: 122759.
- [7] WANG L (王丽), TANG Z Q (唐佐青), JIA J (贾军), *et al.* Effects of isopimaric acid on learning and memory function and synaptic plasticity in AP P/PS1 mice[J]. Chinese Journal of Behavioral Medicine and Brain Science (中华行为医学与脑科学杂志), 2016, 25(12): 1057-1062.
- [8] REN X T (任雪童), DI Z R (狄紫蕊), FU B Q (付冰倩), *et al.* Analysis of mechanism and molecular targets of Baihe Wuyao decoction in the treatment of gastric cancer based on network pharmacology and GEO chip[J]. Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy (中医药导报), 2021, 27(3): 125-130.
- [9] CHANG C I, CHEN C C, WANG S Y, *et al.* Three new isopimaric acid diterpenoids from the bark of *Cryptomeria japonica* and their xanthine oxidase inhibitory activity[J]. Phytochemistry Letters, 2021, 46: 61-65.
- [10] LU Y J, ZHAO Z D, CHEN Y X, *et al.* Synthesis and biological activity of pyridine acylhydrazone derivatives of isopimaric acid[J]. Journal of Asian natural products research, 2021, 18(12): 950-956.
- [11] LIU J J, LU Y J, ZHAO Z D, *et al.* Synthesis and cytotoxic activity of amides from isopimaric acid[J]. Chemistry of Natural Compounds, 2018, 54(4): 695-700.
- [12] LIU J J (刘娟娟), ZHAO Z D (赵振东), LU Y J (卢言菊), *et al.* Synthesis and anticancer activity of acylhydrazone compounds from isopimaric acid[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2016, 33(10): 1195-1200.

(下转第 919 页)