4- ,6- 或 7- 位取代苯基亚胺次甲基香豆素的合成及其抗癌活性

徐 嵩 , 徐世平* , 李兰敏

(中国医学科学院 、中国协和医科大学药物研究所 ,北京 100050)

摘要 : 目的 设计合成一系列香豆素西佛碱化合物并进行抗癌筛选。方法 合成了 21 个取代的 4- ,6- 或 7- 位苯基亚胺次甲基香豆素 ,其结构经 MS , HNMR 和元素分析确证 ,并对其进行体外抗癌筛选。结果 12 个化合物(**3c ,3d , 3e ,3f ,3g ,3h ,3j ,3k ,3 m ,3o ,3p ,3q**) 分别对 KB , HCT-8 , Bel7402 细胞株有效。结论 该类化合物有一定抗癌活性 ,值得进一步研究 。

关键词 : 香豆素 ; 西佛碱 ; 抗癌活性

中图分类号 : R916 .4 ; R962 .1 文献标识码 : A 文章编号 : 0513 - 4870(2002) 02 - 0113 - 04

香豆素类化合物有抑制癌细胞 、增强免疫 、诱导细胞凋亡等生理活性[1] 。前文[2,3] 报道取代的 4- ,6- 或 7- 位苯乙烯基香豆素(A 类) 具有一定的抑癌活性 ,在此基础上 ,本文根据药物设计的电子等排原理 ,以 N 原子代替 = CH 原子团 ,将乙烯基 CH = CH 换成其电子等排体 CH = N ,设计合成了取代的 4- ,6- 或 7- 位苯基亚胺次甲基香豆素(西佛碱 , B 类 ,图 1) ,并考察了 B 类的抑癌活性 。

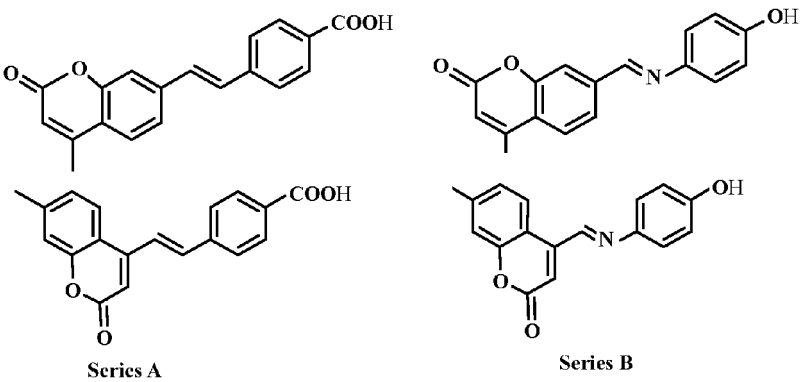


Figure 1 Structures of compounds series A and B

4- 甲酰基香豆素[4] 由不同取代的 4- 甲基香豆素用二氧化硒氧化制备 ,由于 2- 位羰基拉电子作用使 4- 位甲基被选择性氧化 ,苯环上的甲基不被氧化。6- 或 7- 甲酰基香豆素由另一条路线 ,用 NBS 溴化香豆素 6- 或 7- 位甲基后 ,经六次甲基四胺氧化制得[5,6] ,4- 位甲基不被溴化- 氧化 。

西佛碱的合成系采用 4- ,6- 或 7- 甲酰基香豆素和不同取代的苯胺 ,以冰醋酸催化 ,在乙醇中回流的条件下进行 。生成的西佛碱在乙醇中的溶解度较原料小 ,从溶液中析出 。但是 ,由于该反应是可逆的 ,产物在质子性溶剂中加热会分解为原料 ,所以只能用非质子性溶剂丙酮重结晶 。合成路线见 Scheme 1 。

该反应的收率和产物的稳定性由醛基和氨基的反应活性决定 :(1) 苯胺的邻 、对位有推电子取代基如羟基时 ,通过共轭效应使氨基亲核性增强 ,收率高 ,产物在溶液中较稳定 ;苯环上有吸电子取代基如羧基时 ,收率低 ,产物在溶剂中不稳定 ,易分解为原料 。(2) 4- 甲酰基香豆素反应活性稍高 ,在本文实验条件下可以和对氨基苯甲酸及其乙酯反应 ;但与间氨基苯酚 、邻或间氨基苯甲酸反应只能得到产物与原料的混合物 ,且难以纯化 ;不与对氨基苯磺酸反应 。(3) 6- 或 7- 甲酰基香豆素反应活性较低 ,只与邻或对氨基苯酚反应 ;与间氨基苯酚 ,邻 、间或对氨基苯甲酸反应只能得到产物与原料的混合物 。

我们合成了 21 个新化合物 ,理化数据和元素分

收稿日期 : 2001-06-07 .

作者简介 : 徐世平(1935 -) ,男 ,研究员 ,硕士生导师 .

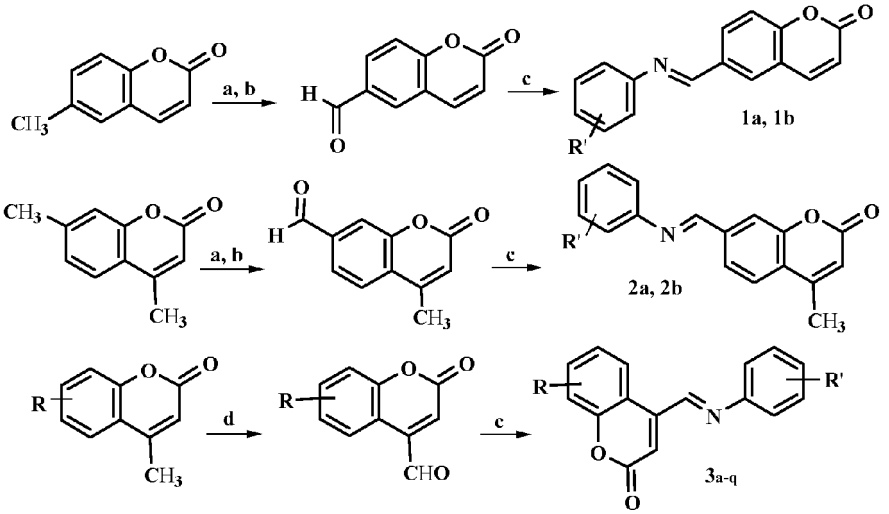
* 通讯作者 Tel :(010) 63165247 , Fax :(010) 63017757 ,

E- mail :xusp @imm .ac .cn

析见表 1 ,经核磁共振氢谱 质谱确证其结构(表 2) 。

核磁氢谱显示该类化合物碳氮双键上的氢出现在低场 ,6-位取代物的CH = N氢化学位移在 δ 8.65 ~ 8.70 ,7-位 6-位取代物的CH = N氢化学位移在 δ 8.67 ~ 8.76 ,4-位CH = N氢化学位移在 δ 8.81 ~ 9.03 。质谱均显示分子离子峰 ,且多为基峰 ,表明这些化合物还是相当稳定的 。

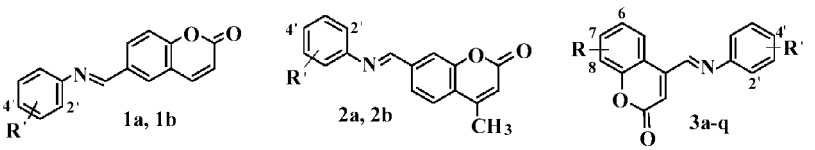
所合成的 21 个化合物进行了体外抑制癌细胞活性筛选 ,所用瘤株为人早幼粒白血病细胞 HL-60 ,人口腔上皮癌细胞 KB ,人结肠癌细胞 HCT-8 ,人肝癌细胞 Bel-7402 。其中 12 个化合物对 KB , HCT-8 和 Bel-7402 细胞有效(表 3) 。



a. NBS/c-Hexane,reflux; b. $(CH_2)_6N_4$/HOAc, then HCl/H_2O, reflux
c. R'$C_6H_4NH_2$/HOAc/EtOH, reflux; d. SeO_2/Xylene, reflux

Scheme 1 Route of synthysis of compounds **1** , **2** and **3**

Table 1 Physical constants and elemental analysis of compounds 1a ~ b , 2a ~ b and 3a ~ q



Compd.	Formula	R*	R′*	Yield/ %	MP/ ℃	Elemental analysis Calculated C	H	N	Measured C	H	N
1a	$C_{16}H_{11}NO_3$		4′-OH	74.6	237	72.44	4.18	5.28	72.94	4.20	5.46
1b	$C_{16}H_{11}NO_3$		2′-OH	75.4	147	72.44	4.18	5.28	71.91	4.21	5.26
2a	$C_{17}H_{13}NO_3$		4′-OH	62.8	224	73.11	4.69	5.02	73.00	4.74	5.25
2b	$C_{17}H_{13}NO_3$		2′-OH	67.6	197	73.11	4.69	5.02	73.02	4.75	5.18
3a	$C_{17}H_{13}NO_3$	7-CH_3	4′-OH	98.7	211	73.11	4.69	5.02	72.85	4.51	4.92
3b	$C_{17}H_{13}NO_3 \cdot H_2O$	7-CH_3	2′-OH	70.9	164	68.68	5.09	4.71	68.57	4.57	4.75
3c	$C_{18}H_{15}NO_3 \cdot H_2O$	6-CH_3 ,7-CH_3	4′-OH	83.6	214	69.44	5.51	4.50	69.52	5.41	4.88
3d	$C_{18}H_{15}NO_3$	6-CH_3 ,7-CH_3	2′-OH	76.8	215	73.70	5.16	4.78	73.62	5.34	4.97
3e	$C_{17}H_{13}NO_4 \cdot 1/2H_2O$	7-OCH_3	4′-OH	86.5	190	67.10	4.64	4.60	67.05	4.53	4.38
3f	$C_{17}H_{13}NO_4 \cdot 2/3H_2O$	7-OCH_3	2′-OH	62.3	169	66.44	4.70	4.60	67.05	4.53	4.38
3g	$C_{18}H_{15}NO_4$	7-OCH_3	4′-OCH_3	87.4	167	69.89	4.89	4.53	70.00	4.94	4.63
3h	$C_{18}H_{13}NO_5$	7-OCH_3	4′-COOH	41.0	290	66.87	4.05	4.33	66.75	4.22	4.30
3i	$C_{20}H_{17}NO_5$	7-OCH_3	4′-COOEt	78.5	188	68.37	4.88	3.99	68.33	4.79	4.29
3j	$C_{18}H_{15}NO_5$	7 ,8-OCH_3	4′-OH	82.1	214	66.45	4.65	4.31	66.66	4.72	4.18
3k	$C_{18}H_{15}NO_5$	7 ,8-OCH_3	2′-OH	72.5	192	66.45	4.65	4.31	66.23	4.51	4.20
3l	$C_{23}H_{25}NO_4 \cdot 1/3H_2O$	6-n-Hex ,7-OCH_3	4′-OH	64.9	172	71.67	6.71	3.63	71.74	6.85	3.52
3m	$C_{23}H_{25}NO_4$	6-n-Hex ,7-OCH_3	2′-OH	76.8	215	73.62	5.34	4.97	73.70	5.16	4.78
3n	$C_{18}H_{15}NO_4$	7-OCH_3 ,8-CH_3	4′-OH	82.1	218	69.89	4.89	4.53	69.73	4.91	4.52
3o	$C_{18}H_{15}NO_4$	7-OCH_3 ,8-CH_3	2′-OH	91.5	233	69.89	4.89	4.53	69.66	4.88	4.82
3p	$C_{18}H_{13}NO_5 \cdot H_2O$	7-OAc	4′-OH	57.6	182	63.34	4.43	4.10	63.44	4.11	3.97
3q	$C_{18}H_{13}NO_5$	7-OAc	2′-OH	59.4	152	66.87	4.05	4.33	67.06	4.26	4.44

* If not noted , R or R′ = all H

Table 2 Data of ^{1}HNMR Spectroscopy and EI-MS of compounds 1a ~ b, 2a ~ b and 3a ~ q

Compd.	^{1}HNMR(DMSO-d_6)	EI-MS
1a	6.45(d,1H,J=9 Hz,3-H),6.69(d,2H,J=8 Hz,3′,5′-H),7.14(d,2H,J=8 Hz,2′,6′-H), 7.40(d,1H,J=8 Hz,8-H),8.03(dd,1H,J=8/2 Hz,7-H),8.06(d,1H,J=9 Hz,4-H), 8.12(d,1H,J=2 Hz,5-H),8.65(s,1H,CH=N),9.37(s,1H,OH)	265(100%,M^+),264,236,120
1b	6.50(d,1H,J=9 Hz,3-H),6.79 ~ 7.23(m,4H,Ar′-H),7.45(d,1H,J=8 Hz,8-H),8.07(d,1H, J=9 Hz,4-H),8.13(dd,1H,J=8/2 Hz,7-H),8.28(d,1H,J=2 Hz,5-H),8.70(s,1H,CH=N)	265(100%,M^+),264,236,120
2a	2.45(s,3H,4-CH_3),6.20(s,1H,3-H),6.75(d,2H,J=8 Hz,3′,5′-H),7.23(d,2H,J=8 Hz, 2′,6′-H),7.75 ~ 7.83(m,3H,5,6,8-H),8.67(s,1H,CH=N),9.51(s,1H,OH)	265(M^+),262,250,234,174, 120(100%)
2b	2.44(s,3H,4-CH_3),6.38(s,1H,3-H),6.79 ~ 7.23(m,4H,Ar′-H), 7.75 ~ 8.00(m,3H,5,6,8-H),8.76(s,1H,CH=N),8.99(s,1H,OH)	279(M^+),262,250,234,174, 120(100%)
3a	2.41(s,3H,7-CH_3),6.78(s,1H,3-H),6.79(d,2H,J=8 Hz,3′,5′-H),7.10(d,1H,J=2 Hz, 8-H),7.15(dd,1H,J=8/2 Hz,6-H),7.34(d,2H,J=8 Hz,2′,6′-H),8.68(d,1H,J=8 Hz,5-H), 8.83(s,1H,CH=N),9.67(s,1H,OH)	279(100%,M^+),262,250,236, 224,187,132,120
3b	2.44(s,3H,7-CH_3),6.72 ~ 7.41(m,7H,3,6,8,Ar′-H),8.60(d,1H,J=8 Hz,5-H), 8.96(s,1H,CH=N),9.67(s,1H,OH)	279(100%,M^+),262,250,234, 120
3c	2.31(s,6H,6-,7-CH_3),6.77(s,1H,3-H),6.82(d,2H,J=8 Hz,3′,5′-H), 7.19(s,1H,8-H),7.37(d,2H,J=8 Hz,2′,6′-H),8.50(s,1H,5-H), 8.87(s,1H,CH=N),9.72(s,1H,OH)	293(100%,M^+),278,276,265, 264,250,237,188,146,120
3d	2.31,2.34(each s,6H,6,7-CH_3),6.87 ~ 7.44(m,6H,3,8,Ar′-H),8.46(s,1H,5-H), 9.03(s,1H,CH=N),9.39(s,1H,OH)	293(100%,M^+),278,276,265, 264,248,186,120
3e	3.87(s,3H,7-OCH_3),6.72(d,1H,J=2 Hz,8-H),6.83(d,2H,J=8 Hz,3′,5′-H), 7.02(s,1H,3-H),6.99(dd,1H,J=8/2 Hz,6-H),7.38(d,2H,J=8 Hz,2′,6′-H), 8.80(d,1H,J=8 Hz,5-H),8.85(s,1H,CH=N),9.75(s,1H,OH)	295(100%,M^+),278,267,266, 252,148,120
3f	3.87(s,3H,7-OCH_3),6.86 ~ 7.37(m,7H,3,6,8,Ar′-H),8.71(d,1H,J=8 Hz,5-H), 8.85(s,1H,CH=N),9.36(s,1H,OH)	295(100%,M^+),278,267,266, 250,148,120
3g	3.81,3.87(each s,6H,7-,4′-OCH_3),6.73(d,1H,J=2 Hz,8-H),6.99(d,3H,J=8 Hz, 6,3′,5′-H),7.00(s,1H,3-H),7.44(d,2H,J=8 Hz,2′,6′-H),8.77(d,1H,J=8 Hz, 5-H),8.84(s,1H,CH=N)	309(100%,M^+),294,292,281, 266,250,238,148,120
3h	3.86(s,3H,7-OCH_3),6.81(d,1H,J=2 Hz,8-H),6.97(dd,1H,J=8/2 Hz,6-H), 7.02(s,1H,3-H),7.41(d,2H,J=8 Hz,3′,5′-H),8.00(d,2H,J=8 Hz,2′,6′-H), 8.72(d,1H,J=8 Hz,5-H),8.83(s,1H,CH=N),12.30(s,1H,COOH)	323(100%,M^+),306,295,294, 267,250,190,148,120
3i	1.35(t,3H,J=7 Hz,Et-CH_3),3.87(s,3H,7-OCH_3),4.25(q,2H,J=7 Hz,Et-CH_2-), 6.85(d,1H,J=2 Hz,8-H),7.00(dd,1H,J=8/2 Hz,6-H),7.06(s,1H,3-H), 7.47(d,2H,J=8 Hz,3′,5′-H),8.04(d,2H,J=8 Hz,2′,6′-H), 8.76(d,1H,J=8 Hz,5-H),8.87(s,1H,CH=N)	351(100%,M^+),334,323,306, 295,278,250,234,148(100%), 120
3j	3.80,3.90(each s,6H,7,8-OCH_3),6.70(s,1H,3-H),6.81(d,2H,J=8 Hz,3′,5′-H), 7.08(d,1H,J=8 Hz,6-H),7.34(d,2H,J=8 Hz,3′,5′-H),8.54(d,1H,J=8 Hz,5-H), 8.81(s,1H,CH=N),9.72(s,1H,OH)	325(100%,M^+),310,297,282, 254,120
3k	3.84,3.94(each s,6H,7-,8-OCH_3),6.88 ~ 7.40(m,6H,3,6,Ar′-H), 8.53(d,1H,J=8 Hz,5-H),8.98(s,1H,CH=N),9.39(s,1H,OH)	325(100%,M^+),310,296,282, 266,218,120
3l	0.84(t,3H,J=7,Hex-CH_3),1.30 ~ 1.64(m,8H,Hex-4CH_2),2.58(t,2H,6-CH_2-), 3.96(s,3H,7-OCH_3),6.64(s,1H,3-H),6.76(s,1H,8-H),6.83(d,2H,J=8 Hz,3′,5′-H), 7.35(d,2H,J=8 Hz,3′,5′-H),8.55(s,1H,5-H),8.81(s,1H,CH=N),9.72(s,1H,OH)	379(100%,M^+),362,351,308, 294,280,252,120
3m	0.84(t,3H,J=7,Hex-CH_3),1.20 ~ 1.65(m,8H,Hex-4CH_2),2.57(t,2H,6-CH_2-), 3.89(s,3H,7-OCH_3),6.88 ~ 7.41(m,6H,3,8,Ar′-H),8.54(d,1H,J=8 Hz,5-H), 9.01(s,1H,CH=N)	379(100%,M^+),362,351,308, 294,280,265,120
3n	2.19(s,3H,8-CH_3),3.90(s,3H,7-OCH_3),6.66(s,1H,3-H),6.81(d,2H,J=8 Hz,3′,5′-H), 7.01(d,1H,J=8 Hz,6-H),7.35(d,2H,J=8 Hz,3′,5′-H),8.63(d,1H,J=8 Hz,5-H), 8.81(s,1H,CH=N),9.68(s,1H,OH)	309(100%,M^+),294,292,281, 266,238,204,162,120
3o	2.21(s,3H,8-CH_3),3.92(s,3H,7-OCH_3),6.86 ~ 7.40(m,6H,3,6,Ar′-H), 8.60(d,1H,J=8 Hz,5-H),8.98(s,1H,CH=N),9.38(s,1H,OH)	309(100%,M^+),294,292,281, 280,266,252,238,120
3p	2.31(s,3H,7-$OCOCH_3$),6.74(s,1H,3-H),6.80(d,2H,J=8 Hz,3′,5′-H),7.14(d,1H, J=2 Hz,8-H),7.27(dd,1H,J=2/8 Hz,6-H),7.00(d,2H,J=8 Hz,3′,5′-H), 8.89(d,1H,J=8 Hz,5-H),8.96(s,1H,CH=N)	323(M^+),281,280,264,253, 252,134,120,43(100%)
3q	2.31(s,3H,7-$OCOCH_3$),6.87 ~ 7.47(m,7H,3,6,8,Ar′-H),8.87(d,1H,J=8 Hz,5-H), 9.00(s,1H,CH=N),9.42(s,1H,OH)	323(M^+),295,281,264,252, 120(100%)

该类化合物的体外抑癌活性与苯乙烯基香豆素[2,3]相近。由于氨基苯甲酸的西佛碱大多不稳定,所以制备了一些含羟基的衍生物。构效关系研究表明:有活性的化合物都是4-位西佛碱,而6-或7-位西佛碱无效;这与苯乙烯基香豆素6-或7-位衍生物活性较4-位衍生物活性较高的结果相反,可能是由于4-位衍生物与6-或7-位衍生物在空间形象上的差别造成的。有活性的4-位西佛碱4′-位为羟基时(**3e**)

抑癌活性稍强于 4′-羧基(**3h**)化合物 ,4′-位为甲氧基或 2′-位为羟基的衍生物也有活性 ,说明氨基化合物的苯环上给电子基团对活性影响较好。香豆素苯环 6-位引入脂溶性大的正己基(**3m**)对活性影响不大。

Table 3 *In vitro* **antitumor activities of the analogues MTT IC_{50} ($\mu g \cdot mL^{-1}$)**

No.	HL-60	KB	HCT-8	Bel-7402
3c	>10	6.7	3.3	6.2
3d	>10	6.3	5.9	5.9
3e	>10	5.2	6.1	6.3
3f	>10	6.6	6.2	5.7
3g	>10	6.2	7.0	7.0
3h	>10	8.6	7.7	7.8
3j	>10	>10	9.8	9.5
3k	>10	7.9	6.4	6.1
3m	>10	7.6	6.2	5.5
3o	>10	6.3	6.2	6.2
3p	>10	5.2	6.1	6.3
3q	>10	5.8	6.1	5.9

实 验 部 分

熔点用 Yanaco MP-500D 型熔点仪测定 ,温度未校正。Jeol-90 型核磁共振仪 ,TMS 为内标。质谱仪为 VG ZAB-2F 型。元素分析仪为 Carlo-Erba 1106 型。薄层色谱硅胶 GF_{254} ,柱色谱硅胶 H 为青岛海洋化工厂产品。所用试剂、溶剂均为市售。不同取代的 4-甲基香豆素[3]以及 6-甲酰基香豆素[5] ,4-甲基-7-甲酰基香豆素[6]和不同取代的 4-甲酰基香豆素[4]按文献方法制备。

6-(4′-羟基苯基)亚胺次甲基香豆素(化合物 **1a**)的合成(通法):6-甲酰基香豆素 300 mg(1.7 mmol) ,对羟基苯胺 200 mg(1.8 mmol) 溶于 95 %乙醇 50 mL ,滴入冰醋酸 1 滴 ,回流 1 h ,冷却析出黄色晶体 340 mg ,收率 74.6 %。产物用丙酮重结晶 ,熔点 237 ℃。化合物 **1b** ,**2a** ,**2b** ,**3a** ~ **q** 均用此法合成。

致谢:核磁共振、质谱、元素分析由本所仪器分析室和化学分析室代测 ,药理筛选结果由本所筛选室提供。

REFERENCES:

[1] Ebbinghaus SW, Mohler JL, Marshall ME. Renal cell carcinoma: the background, rationale and current development of coumarin as a potential therapeutic agent [A]. O′Kennedy. *Coumarin: Biology, Application and Mode of Action* [M]. England: John Wiley and Sons Press, 1997.209 - 239.

[2] XU S, XU SP, LI LM. Synthesis of 6- or 7- styrylcoumarand their anti-tumor activities [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2000 ,**35**(2) :103 - 107.

[3] XU S, XU SP, LI LM. Synthesis of substituted 4-styrylcoumarin and their anti-tumor activities [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2001 ,**36**(4) :269 - 273.

[4] Ito K, Maruyama J. Studies on stable diazoalkanes as potential flurogenic reagents I. 7-substituted-4-diazomethylcoumarins [J]. *Chem Pharm Bull*, 1983 ,**31**(9) : 3014 - 3023.

[5] Jainamma KM, Sethna S. Studies in furan derivatives. Part VII [J]. *J Indian Chem Soc*, 1973 ,**50**(9) : 790 - 792.

[6] Jainamma KM, Sethna S. Studies in some formylcoumarins [J]. *J Indian Chem Soc*, 1973 ,**50**(9) :606 - 608.

SYNTHESIS OF 4-, 6- OR 7- SUBSTITUTED PHENYLIMINOMETHYLENECOUMARINS AND THEIR ANTICANCER ACTIVITIES

XU Song, XU Shi-ping, LI Lan-min

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China*)

ABSTRACT: **AIM** A series of substituted phenyliminomethylenecoumarins derivatives was designed in order to find compounds possessing anticancer activities. **METHODS** Title compounds (**1a** ~ **b**, **2a** ~ **b** and **3a** ~ **q**) were synthesized and screened by several anticancer models *in vitro*. **RESULTS** Twenty-one new compounds (**1a** ~ **b**, **2a** ~ **b** and **3a** ~ **q**) were synthesized and screened. Structrues of the new compunds were determined by MS, HNMR and elemental analysis. Twelve compounds (**3c**, **3d**, **3e**, **3f**, **3g**, **3h**, **3j**, **3k**, **3m**, **3o**, **3p**, **3q**) showed inhibitory effects on HCT-8, KB and Bel7402 cell lines *in vitro*. **CONCLUSION** Some compounds had certain anticancer activities and were worth further studying.

KEY WORDS: coumarin; Schiff′s base; anticancer activity