新型二茂铁基 1,2,4-三唑 Mannich 碱的合成及其 Cdc25B 抑制活性

张成路* 王 雪 国 阳 吴一非 高丽娜 孙丽杰
柴金华 朱长安

(辽宁省生物与制药重点实验室 辽宁师范大学化学化工学院 大连 116029)

摘要 以 5 种二茂铁基三唑席夫碱为原料, 分别与吗啉、哌嗪和 *N*-甲基哌嗪等进行曼尼希反应, 首次设计合成了 15 个新型 3-二茂铁基-1,2,4-均三唑曼尼希碱(3a~3e、4a~4e 和 5a~5e)。通过 IR、¹H NMR 和 HRMS 等测试方法对目标化合物结构进行了表征, 并对代表目标化合物 3b 进行 X-ray 单晶衍射测试。研究了目标产物对 Cdc25B 的抑制活性, 结果发现, 13 个目标化合物表现出良好的抑制活性, 其中 3c、4a、5b、5c 和 5e 等 5 个化合物的 IC₅₀ 值小于阳性参照物正矾酸钠(1.86±0.24 μg·mL⁻¹), 分别为 0.91±0.18、0.62±0.13、1.10±0.33、0.44±0.04 和 0.67±0.13 μg·mL⁻¹, 对比 PTP1B 抑制活性筛选结果, 目标化合物对 Cdc25B 有选择性的抑制作用, 可以作为潜在的 Cdc25B 抑制剂。

关键词 二茂铁; 1,2,4-三唑; 曼尼希碱; Cdc25B 抑制剂

Synthesis and Inhibitory Activity of Novel Ferrocenyl 1,2,4-Triazole Mannich Bases

Zhang, Chenglu* Wang, Xue Guo, Yang Wu, Yifei Gao, Lina
Sun, Lijie Chai, Jinhua Zhu, Chang'an

(Liaoning Provincial Key Laboratory of Biotechnology and Drug Discovery, College of Chemistry and Chemical Engineering, Liaoning Normal University, Dalian 116029)

Abstract 15 novel 3-ferrocenyl-1,2,4-triazole Mannich bases (3a~3e, 4a~4e and 5a~5e) were designed and synthesized for the first time by Mannich reaction from five 3-ferrocenyl-1,2,4-triazole Schiff bases, which reacted with morpholine, 1-methylpiperazine and piperazine, respectively. The structures of 3, 4 and 5 were characterized by IR, ¹H NMR and HRMS. The X-ray single crystal diffraction of 3b was obtained. The results showed that the target compounds were successfully synthesized. The target products were evaluated for their Cdc25B inhibitory activities. The test results indicated that 13 of 15 Mannich bases exhibited good inhibitory activity, wherein IC₅₀ values of 3c, 4a, 5b, 5c and 5e were lower than the positive control compound Na₃VO₄ (1.86±0.24 μg·mL⁻¹) with 0.91±0.18, 0.62±0.13, 1.10±0.33, 0.44±0.04 and 0.67±0.13 μg·mL⁻¹, respectively. Compared with PTP1B inhibition activity results, the target products have a selective inhibitory effect on Cdc25B.

Keywords ferrocene; 1,2,4-triazole; Mannich base; Cdc25B inhibitor

细胞分裂周期 25 (Cell division cycle 25, 缩写 Cdc25)磷酸酯酶属于高保守双位点磷酸酯酶, 它通过对 CDK (Cyclin-dependent kinase)复合物某些磷酸化位点去磷酸化来活化它, 促进细胞过渡到下一个周期, 从而参与了细胞周期调控, 同时它是损伤修复通路中的重要组成部分, 对于遗传信息的稳定起着重要作用。CDK-cyclin 复合物是目前已知的 Cdc25 唯一底物。细胞蛋白

络氨酸磷酸化是主要的蛋白质翻译后修饰方式之一, 也是细胞内信号传导的调控方式之一。络氨酸磷酸化是可逆的, 由蛋白质络氨酸激酶 (Protein tyrosin kinase, PTKs) 和蛋白络氨酸酯酶 (Protein tyrosin phosphatase, PTPs) 共同调控, 前者催化络氨酸残基磷酸化, 后者使其去磷酸化。细胞蛋白络氨酸磷酸化和去磷酸化, 参与调控细胞生长、分化、代谢、细胞周期、细胞间通讯、

* E-mail: zhangchenglu@lnnu.edu.cn

Received May 10, 2014; revised July 14, 2014; published online July 17, 2014.

Project supported by the Technology Research Program of Liaoning Provincial Department of Education (No. 2009A426).

辽宁省教育厅科学技术(No. 2009A426)资助项目。

基因转录、离子通道活性及免疫反应等一系列细胞活动。络氨酸磷酸化异常, 会引发癌症等多种疾病^[1]。在人类细胞中, Cdc25 蛋白络氨酸酯酶已经确定了其三种亚型, Cdc25A、Cdc25B 和 Cdc25C。Cdc25B 磷酸酯酶作为一类双特异性磷酸酯酶, 能够给 CDK1 上的 14、15 络氨酸去磷酸, 活化 CDK1-cyclin B 复合物, 从而起到起始有丝分裂的作用。在大量的人类肿瘤(乳腺癌、结肠癌、食道癌等)细胞系中存在 Cdc25B 的过度表达^[2,3], 过度表达的 Cdc25B 会引起细胞周期阻滞, 从而抑制细胞增殖, 会导致细胞快速地从 S 期或 G2 期进入到分裂期, 从而导致 DNA 复制不完全^[4]。Cdc25B 至少是两个致癌基因(Raf1, c-Myc)的潜在靶点, 可以和其他致癌基因共同作用, 可能对肿瘤的发展起促进作用, 并且 Cdc25B 磷酸酯酶底物特异性高并且催化机制专一, 是有丝分裂信号通路和周期的联系点, 从而被认为是细胞转换的重要因素而成为新的理想的抗肿瘤靶点^[5]。迄今已有许多 Cdc25 抑制剂被报道^[6,7], 已被证实能够抑制肿瘤细胞增殖, 甚至有些能作用于体内的肿瘤组织, 如一种由吡唑啉酮衍生的 Cdc25 混合型抑制剂对 Cdc25B 具有很好的选择性^[8], 所以小分子 Cdc25B 抑制剂极有希望成为一种新的有效治疗癌症的药物。

研究表明, 仅靠络氨酸磷酸酯并不能高亲和力和地结合 PTPs, 催化结构域周边的结构可作为增强抑制剂亲和性及选择性的靶点^[9]。通过将非水解络氨酸磷酸酯类似物结合到特异、理想的模板上, 模拟磷酸基团与酶活性部位的结合, 同时使模板上其它基团与催化结构域周边的结构域结合, 两方面共同作用, 有望获得作用强、

选择性高的 Cdc25 抑制剂^[6,7]。二茂铁及其衍生物因其特殊的结构已被证实具有抗白血病和抗肿瘤等活性^[10,11], 同时含 1,2,4-三唑结构单元的小分子对 Cdc25B 具有良好的抑制活性和良好选择性, 吗啉和哌嗪等活性组块, 具有较好的生物活性, 如抗菌、抗真菌、消炎、止痛、抗癌、抗疟以及杀虫等^[12~15], 因此, 根据活性亚结构拼接和活性叠加原理, 我们设想以二茂铁(Ferrocene, 缩写为 Fc)作为模板, 在其结构上引入可能与酶活性部位形成氢键的杂环 1,2,4-三唑、吗啉和哌嗪等, 将它们构筑于同一分子中, 以期发现活性更强、选择性更好的 Cdc25B 抑制剂。合成路线如 Scheme 1。

1 结果与讨论

1.1 目标化合物的合成与表征

本课题组首先自行合成了 5 个 Schiff 碱衍生物 **2**^[16], 为实现活性叠加, 将 **2** 分别与吗啉、N-甲基哌嗪和哌嗪进行 Mannich 反应, 首次构筑了 15 个 Mannich 碱衍生物 **3a~3e**、**4a~4e** 和 **5a~5e**。在 Schiff 碱衍生物的合成中, 首先按照文献方法^[17]进行合成, 但因其需要用乙酸作溶剂, 回流温度较高, 使二茂铁基团发生碳化, 反应产率普遍很低。我们经进一步探究, 选择用乙醇作溶剂, 温度降低至 78 °C; 以浓硫酸作催化剂, 因为浓硫酸可作为脱水剂和吸水剂, 反应过程中加入少量浓硫酸, 有利于反应的正向进行, 结果使 Schiff 碱衍生物收率最高达到 85.0%; 在合成 Mannich 碱衍生物时, 根据反应机理, 按照先加入 Schiff 碱, 37% 甲醛溶液, 回流溶解, 最

Scheme 1

后加入吗啉(*N*-甲基哌嗪或哌嗪)的投料顺序进行反应,效果最佳,收率最高可达 86%。

通过 IR, ^1H NMR 和 HRMS 等分析方法对所合成的化合物进行了表征。IR 谱图中,目标化合物在 1400 和 490 cm^{-1} 左右出现的吸收峰为二茂铁的特征吸收峰,在 3100 和 2900 cm^{-1} 左右出现的峰为苯环上 C—H 的吸收峰,1650 和 1500 cm^{-1} 左右出现的峰分别为 C=N 和 C=C 的吸收峰,在 1280 cm^{-1} 左右出现的峰为 C=S 的吸收峰,在 1150 和 1100 cm^{-1} 左右的峰分别为 C—O 和 C—N 的吸收峰; ^1H NMR 谱图中,HC=N 上的质子信号在 δ 10.0 左右处,在 δ 7.0~8.0 处为芳环的质子信号,二茂铁环上的质子信号在 δ 4.0~5.0 左右处,在 δ 5.2 左右处出现的为 NCH_2N 中亚甲基的质子信号,吗啉环的质子信号在 δ 2.8 和 3.7 左右,*N*-甲基哌嗪环的质子信号在 δ 2.4 和 2.9 左右, δ 2.3 左右为 NCH_3 的质子信号,哌嗪环的质子信号在 δ 5.2 左右;HRMS 谱图中,所有的化合物均出现了 $[\text{M}+1]^+$ 峰。

为了进一步研究 Mannich 碱衍生物的结构,以二氯甲烷为溶剂,在室温的条件下,采用缓慢挥发的方法,获得了代表性目标产物 **3b** 的单晶,采用 X-ray 单晶射线衍射仪对单晶进行了测定。相关分子结构如图 1 所示。单晶结构测试采用 Mo K α 射线($\lambda=0.71073$ Å),以 ω 扫描方式收集。利用 SAINT 程序对所收集的衍射点进行数据还原,用 SADABS 程序进行数据校正。基于全角最小二乘的方法,利用 SHELXTL 5.1 程序包,用直接法在差值傅里叶图上找出全部非氢原子的坐标,将所有的非氢原子都采用各项异性精修。其它 H 原子的坐标是通过理论加氢法得到所有氢原子的坐标。目标产物 **3b** 的 CCDC 1008773。结果显示:氢原子 H(22)和硫原子 S(1)之间存在空间位阻,呋喃环和 1,2,4-均三唑平面之间的夹角为 42.2°;二茂铁环和 1,2,4-均三唑间夹角为 18.4°,处于非共平面;呋喃环和均三唑环处于 C=N 双键相反的位置, N(1)N(5)C(22)C(18)之间的扭曲角等于 178.4°,说明 C=N 双键为 *E* 构型。

图 1 化合物 **3b** 的单晶结构
Figure 1 structure of compound **3b**

1.2 生物活性测试

目标化合物生物活性测试由国家新药筛选中心完成。在 5 $\mu\text{g/mL}$ 浓度条件下,对样品的活性进行初筛测试。选择抑制率大于 50%的化合物进行复筛,得出 IC_{50} 值,筛选实验方法按照参考文献[18~20]的方法进行。

测试结果如表 2 所示。除 **3a** 和 **5a** 外,其余目标化合物对 Cdc25B 均显示抑制活性,在 5 $\mu\text{g/mL}$ 浓度条件下,抑制率为 65.12%~99.62%; IC_{50} 值为 $(0.44 \pm 0.04) \sim (5.57 \pm 1.28)$ $\mu\text{g/mL}$,其中 **3c**、**4a**、**5b**、**5c** 和 **5e** 低于阳性参照物 Na_3VO_4 (1.86 ± 0.24 $\mu\text{g/mL}$)。通过对比吗啉系列、*N*-甲基哌嗪系列和哌嗪系列目标产物测试结果,结合产物构效关系分析发现,具有对称结构、含有哌嗪药效团的目标化合物 (**5a** 除外)抑制活性较高,分析原因可能是化合物 **5** 中含有两个三唑席夫碱活性基团,产生了活性叠加效果。另据已有报道可知,分子结构中含有肉桂基、呋喃基元、吡啶基元、对氟苯基和对氯苯基等结构的化合物普遍具有较好生物活性^[21~24],本文在所设计的分子中将上述药效基团引入,同样证实了这些基团在生物活性中发挥的作用,更为重要的是,具有吡啶组块的分子均具有更为优良生物活性,对 Cdc25B 表现出最优的抑制活性,其中 **5c** 的 IC_{50} 值达到最低 0.44 ± 0.04 $\mu\text{g/mL}$,有望成为潜在的抗肿瘤新药。

另一方面,为了更好地探究目标产物针对 Cdc25B 抑制活性的选择性,我们还选取了对 Cdc25B 抑制活性较好的 13 个化合物,对其测试了蛋白酪氨酸磷酸酯酶 1B (protein tyrosine phosphatase 1B, 缩写 PTP1B)的抑制活性,进行选择评价,因为 PTP1B 与 Cdc25B 同是 PTPs 家族的一员,测试结果如表 3 所示。结果发现,即使在浓度较高的 20 $\mu\text{g/mL}$ 浓度条件下,13 个化合物对 PTP1B 仍没有抑制活性,显示了其对 Cdc25B 较好的选择性抑制。

2 结论

首次以二茂铁为模板,引入 1,2,4-三唑、席夫碱和吗啉或哌嗪等药效基团,首次设计合成了 15 个新型的二茂铁曼尼希碱衍生物。活性测试结果表明,13 个目标化合物对 Cdc25B 均具有较强的抑制作用,其中 **3c**、**4a**、**5b**、**5c** 和 **5e** 抑制活性均高于阳性参照物正钒酸钠,有望成为潜在的新型抗癌新药。13 个目标产物对相关的 PTP1B 均无抑制活性,表明目标化合物对 Cdc25B 的抑制具有一定的选择性。

构效关系分析结果表明,将 1,2,4-三唑、席夫碱、吗啉和哌嗪构筑于同一分子中时,对 Cdc25B 具有较好的抑制活性,说明该类型分子的研究具有重要的意义;其次,含有哌嗪药效基团的 V 型分子 **5** 产生了生物活性

表 2 目标化合物对 Cdc25B 的抑制活性
Table 2 Inhibition of target compounds against Cdc25B

Compd.	Inhibition rate ^a /%	IC ₅₀ /(μg·mL ⁻¹)	Compd.	Inhibition rate ^a /%	IC ₅₀ /(μg·mL ⁻¹)
3a	26.36±6.01	NA	4d	94.01±0.40	3.04±0.54
3b	69.27±3.75	5.47±1.13	4e	97.85±0.30	2.65±0.25
3c	99.62±0.40	1.10±0.33	5a	22.35±3.88	NA
3d	94.29±2.29	2.81±0.36	5b	97.11±1.48	0.62±0.13
3e	74.16±5.83	5.57±1.28	5c	96.33±0.39	0.44±0.04
4a	91.67±1.39	0.91±0.18	5d	79.11±5.50	5.39±1.03
4b	65.12±3.80	3.26±1.03	5e	97.82±0.34	0.67±0.13
4c	85.50±0.71	3.02±0.57	正矾酸钠 ^b	—	1.86±0.24

^a Values tested at 5 μg/mL concentration; ^b Na₃VO₄ as a positive control.

表 3 目标化合物对相关 PTP (PTP1B) 的抑制活性[IC₅₀/(μg·mL⁻¹)]
Table 3 Inhibition rate [IC₅₀/(μg·mL⁻¹)] of target compounds against related PTP (PTP1B)

Compd.	3b	3c	3d	3e	4a	4b	4c
Cdc25B ^a	5.47±1.13	1.10±0.33	2.81±0.36	5.57±1.28	0.91±0.18	3.26±1.03	3.02±0.57
PTP1B ^b	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Compd.	4d	4e	5b	5c	5d	5e	
Cdc25B ^a	3.04±0.54	2.65±0.25	0.62±0.13	0.44±0.04	5.39±1.03	0.67±0.13	
PTP1B ^b	NA	NA	NA	NA	NA	NA	

^a Values tested at 5 μg/mL concentration; ^b values tested at 20 μg/mL concentration.

叠加的效果, 这无疑为更多具有对称结构的 V 型分子进一步探究发展了一条新思路; 第三, 含有吡啶药效基团的目标分子均表现出优良的活性, 说明在药物分子中引入吡啶基团有望更好地提高化合物的生物活性。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

AVANCE 500 MHz NMR 核磁共振波谱仪; SMART APEX II 单晶衍射仪; Xevo Q-TOF MS 液相色谱-质谱联用仪; TENSOR 27 傅立叶变换红外光谱仪; X-5 型显微熔点测定仪, 未经校正; WFH-203B 型三用紫外分析仪。所用试剂均为分析纯。

3.2 实验方法

3.2.1 3-二茂铁基-4-氨基-5-巯基-4H-1,2,4-均三唑(1)和 Schiff 碱 2 的合成

于 50 mL 的圆底烧瓶中, 加入 2-二茂铁甲酰基胍基二硫代甲酸盐(3.6 mmol), 溶解于 10 mL 的乙醇溶液中, 再加入 80%水合肼, 升温至 80 °C; 回流 12 h 后, 反应液用稀盐酸调节 pH 至 5, 有黄色固体产生。乙醇重结晶, 得黄色片状固体 1。于 50 mL 的圆底烧瓶中, 加入 1 (1.0 mmol) 和 10 mL 乙醇, 加热搅拌, 加入芳香醛(1.2 mmol), 回流至全部溶解, TLC 监测反应完全后, 冷却至室温, 过滤得粗产品, 乙醇重结晶, 得 Schiff 碱产物 2。

3.2.2 Mannich 碱 3 的合成通法

于 50 mL 的圆底烧瓶中, 加入 Schiff 碱 2 (0.5 mmol)

和乙醇 5 mL, 加热至回流后, 加入 0.06 mL 37%甲醛 (0.6 mmol), 搅拌 10 min 后, 加入吗啉(0.6 mmol); TLC 检测反应完全后, 降至室温, 过滤得粗产品, 乙醇重结晶, 得目标化合物 3。

1-(吗啉甲基)-3-二茂铁基-4-[(3-苯烯丙叉)氨基]-1H-1,2,4-均三唑-5(4H)-硫酮(3a): 淡黄色固体, 收率 59%。m.p. 185~186 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ: 2.86 (t, *J*=4.0 Hz, 4H, CH₂OCH₂), 3.71 (t, *J*=4.2 Hz, 4H, CH₂NCH₂), 4.16 (s, 5H, Fc), 4.42 (t, *J*=1.8 Hz, 2H, Fc), 4.97 (t, *J*=1.8 Hz, 2H, Fc), 5.17 (s, 2H, NCH₂N), 7.12 (dd, *J*=9.4, 16.0 Hz, 1H, CH=CPh), 7.31 (d, *J*=16.0 Hz, 1H, C=CHPh), 7.40~7.45 (m, 3H, Ph), 7.60 (dd, *J*=1.3, 7.9 Hz, 2H, Ph), 9.75 (d, *J*=9.5 Hz, 1H, N=CH); IR (KBr) ν: 3047 (C—H), 2938 (C—H), 1634 (C=N), 1590 (ArC=C), 1450 (FcC=C), 1284 (C=S), 1154 (C—O), 1072 (C—N), 744 (C—H), 508 (C—Fe) cm⁻¹; HRMS calcd for C₂₆H₂₇FeN₅OS (M+1)⁺ 513.1286, found 514.1270。

4-(呋喃-2-甲烯基氨基)-1-(吗啉甲基)-3-二茂铁基-1H-1,2,4-均三唑-5(4H)-硫酮(3b): 黄色固体, 收率 65%。m.p. 170~171 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ: 2.85 (t, *J*=4.7 Hz, 4H, CH₂OCH₂), 3.69 (t, *J*=4.7 Hz, 4H, CH₂NCH₂), 4.17 (s, 5H, Fc), 4.41 (t, *J*=1.9 Hz, 2H, Fc), 4.98 (t, *J*=1.9 Hz, 2H, Fc), 5.13 (s, 2H, NCH₂N), 6.62 (q, *J*=1.7, 3.5 Hz, 1H, furan), 7.10 (d, *J*=3.5 Hz, 1H, furan), 7.73 (d, *J*=1.8 Hz, 1H, furan), 10.18 (s, 1H, N=CH); IR (KBr) ν: 3124 (C—H), 2952 (C—H), 1654 (C=N), 1612

(ArC=C), 1406 (FcC=C), 1277 (C=S), 1167 (C—O), 1097 (C—N), 831, 772 (C—H), 488 (C—Fe) cm^{-1} ; HRMS calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{FeN}_5\text{O}_2\text{S}$ ($M+1$)⁺ 477.0922, found 478.0937.

1-(吗啉甲基)-3-二茂铁基-4-(吡啶-2-甲烯基氨基)-1*H*-1,2,4-均三唑-5(4*H*)-硫酮(**3c**): 橘黄色固体, 收率 70%. m.p. 169~170 °C; ¹H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 2.87 (t, $J=4.7$ Hz, 4H, CH_2OCH_2), 3.70 (t, $J=4.7$ Hz, 4H, CH_2NCH_2), 4.15 (s, 5H, Fc), 4.44 (t, $J=1.9$ Hz, 2H, Fc), 4.98 (t, $J=1.9$ Hz, 2H, Fc), 5.18 (s, 2H, NCH_2N), 7.45 (dddd, $J=1.0$, 4.9 Hz, 7.5, 12.4 Hz, 1H, Py), 7.89 (ddd, $J=1.6$, 7.8, 15.5 Hz, 1H, Py), 8.24 (d, $J=7.9$ Hz, 1H, Py), 8.79 (d, $J=4.6$ Hz, 1H, Py), 10.37 (s, 1H, N=CH); IR (KBr) ν : 3115 (C—H), 2928 (C—H), 1654 (C=N), 1612 (ArC=C), 1406 (FcC=C), 1277 (C=S), 1158 (C—O), 1106 (C—N), 815 (C—H), 488 (C—Fe) cm^{-1} ; HRMS calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{FeN}_6\text{OS}$ ($M+1$)⁺ 488.1082, found 489.1096.

4-(4-氟苯基氨基)-1-(吗啉甲基)-3-二茂铁基-1*H*-1,2,4-均三唑-5(4*H*)-硫酮(**3d**): 黄色固体, 收率 75%. m.p. 154~155 °C; ¹H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 2.86 (t, $J=4.4$ Hz, 4H, CH_2OCH_2), 3.70 (t, $J=4.4$ Hz, 4H, CH_2NCH_2), 4.15 (s, 5H, Fc), 4.44 (s, 2H, Fc), 4.96 (s, 2H, Fc), 5.17 (s, 2H, NCH_2N), 7.23 (t, $J=8.8$ Hz, 2H, Ph), 7.97 (q, $J=5.5$ Hz, 8.5 Hz, 2H, Ph), 10.06 (s, 1H, N=CH); IR (KBr) ν : 3124 (C—H), 2926 (C—H), 1648 (C=N), 1600 (ArC=C), 1407 (FcC=C), 1277 (C=S), 1164 (C—O), 1109 (C—N), 841 (C—H), 496 (C—Fe) cm^{-1} ; HRMS calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{FFeN}_5\text{OS}$ ($M+1$)⁺ 505.1035, found 506.1057.

4-(4-氯苯基氨基)-1-(吗啉甲基)-3-二茂铁基-1*H*-1,2,4-均三唑-5(4*H*)-硫酮(**3e**): 橘黄色固体, 收率 69%. m.p. 175~176 °C; ¹H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 2.86 (t, $J=4.6$ Hz, 4H, CH_2OCH_2), 3.70 (t, $J=4.6$ Hz, 4H, CH_2NCH_2), 4.14 (s, 5H, Fc), 4.44 (t, $J=1.8$ Hz, 2H, Fc), 4.95 (t, $J=1.8$ Hz, 2H, Fc), 5.17 (s, 2H, NCH_2N), 7.53 (d, $J=8.5$ Hz, 2H, Ph), 7.90 (d, $J=8.5$ Hz, 2H, Ph), 10.15 (s, 1H, N=CH); IR (KBr) ν : 3133 (C—H), 3030 (Ar—H), 2855 (C—H), 1663 (C=N), 1621 (ArC=C), 1402 (FcC=C), (1287 C=S), 1115 (C—O), 1072 (C—N), 873, 815 (C—H), 505 (C—Fe) cm^{-1} ; HRMS calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{ClFeN}_5\text{OS}$ ($M+1$)⁺ 521.0740, found 522.0729.

3.2.3 Mannich 碱 **4** 的合成通法

于 50 mL 的圆底烧瓶中, 加入 Schiff 碱 **2** (0.5 mmol) 和乙醇 5 mL, 加热至回流后, 加入 0.06 mL 37% 甲醛

(0.6 mmol), 搅拌 10 min 后, 加入 *N*-甲基哌嗪 (0.6 mmol); TLC 检测反应完全后, 降至室温, 过滤得粗产品, 乙醇重结晶, 得目标化合物 **4**.

1-[(4-甲基哌嗪-1-基)甲基]-3-二茂铁基-4-[(3-苯烯丙叉)氨基]-1*H*-1,2,4-均三唑-5(4*H*)-硫酮(**4a**): 橘黄色固体, 收率 72%. m.p. 186~187 °C; ¹H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 2.26 (s, 3H, NCH_3), 2.44 (s, 4H, CH_2NCH_2), 2.91 (s, 4H, CH_2NCH_2), 4.16 (s, 5H, Fc), 4.41 (s, 2H, Fc), 4.93 (s, 2H, Fc), 5.18 (s, 2H, NCH_2N), 7.12 (dd, $J=9.6$, 16.0 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CPh}$), 7.30 (d, $J=16.0$ Hz, $\text{C}=\text{CHPh}$), 7.40~7.43 (m, 3H, Ph), 7.60 (d, $J=6.8$ Hz, 2H, Ph), 9.72 (d, $J=9.3$ Hz, 1H, N=CH); IR (KBr) ν : 3123 (C—H), 2939 (C—H), 1664 (C=N), 1610 (ArC=C), 1407 (FcC=C), 1170 (C—N), 806 (C—H), 493 (C—Fe) cm^{-1} ; HRMS calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{FeN}_6\text{S}$ ($M+1$)⁺ 526.1602, found 527.1627.

4-(呋喃-2-甲烯基氨基)-3-二茂铁基-1-[(4-甲基哌嗪-1-基)甲基]-1*H*-1,2,4-均三唑-5(4*H*)-硫酮(**4b**): 橘黄色固体, 收率 59%. m.p. 174~175 °C; ¹H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 2.26 (s, 3H, NCH_3), 2.44 (s, 4H, CH_2NCH_2), 2.91 (s, 4H, CH_2NCH_2), 4.17 (s, 5H, Fc), 4.41 (t, $J=1.8$ Hz, 2H, Fc), 4.97 (t, $J=1.8$ Hz, 2H, Fc), 5.17 (s, 2H, NCH_2N), 6.63 (q, $J=1.7$, 3.4 Hz, 1H, furan), 7.10 (d, $J=3.4$ Hz, 1H, furan), 7.74 (d, $J=1.8$ Hz, 1H, furan), 10.18 (s, 1H, N=CH); IR (KBr) ν : 3124 (C—H), 2925 (C—H), 1654 (C=N), 1605 (ArC=C), 1406 (FcC=C), 1063 (C—N), 763 (C—H), 445 (C—Fe) cm^{-1} ; HRMS calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{FeN}_6\text{OS}$ ($M+1$)⁺ 490.1238, found 491.1221.

1-[(4-甲基哌嗪-1-基)甲基]-3-二茂铁基-4-(吡啶-2-甲烯基氨基)-1*H*-1,2,4-均三唑-5(4*H*)-硫酮(**4c**): 黄色固体, 收率 62%. m.p. 194~195 °C; ¹H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 2.27 (s, 3H, NCH_3), 2.45 (s, 4H, CH_2NCH_2), 2.92 (s, 4H, CH_2NCH_2), 4.15 (s, 5H, Fc), 4.42 (t, $J=1.9$ Hz, 2H, Fc), 4.94 (t, $J=1.9$ Hz, 2H, Fc), 5.20 (s, 2H, NCH_2N), 7.44 (dddd, $J=0.9$, 4.9 Hz, 7.5, 12.3 Hz, 1H, Py), 7.88 (ddd, $J=1.5$, 7.7, 15.5 Hz, 1H, Py), 8.23 (d, $J=7.9$ Hz, 1H, Py), 8.79 (d, $J=4.6$ Hz, 1H, Py), 10.35 (s, 1H, N=CH); IR (KBr) ν : 3140 (C—H), 2928 (C—H), 1663 (C=N), 1605 (ArC=C), 1406 (FcC=C), 1277 (C=S), 1131 (C—N), 822 (C—H), 488 (C—Fe) cm^{-1} ; HRMS calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{FeN}_7\text{S}$ ($M+1$)⁺ 501.1398, found 502.1423.

4-(4-氟苯基氨基)-1-[(4-甲基哌嗪-1-基)甲基]-3-二茂铁基-1*H*-1,2,4-均三唑-5(4*H*)-硫酮(**4d**): 黄色固体, 收率 73%. m.p. 169~170 °C; ¹H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 2.29 (s, 3H, NCH_3), 2.48 (s, 4H, CH_2NCH_2), 2.94

(s, 4H, CH₂NCH₂), 4.14 (s, 5H, Fc), 4.42 (t, $J=1.9$ Hz, 2H, Fc), 4.92 (t, $J=1.9$ Hz, 2H, Fc), 5.19 (s, 2H, NCH₂N), 7.23 (t, $J=8.6$ Hz, 2H, Ph), 7.97 (q, $J=5.5, 8.7$ Hz, 2H, Ph), 10.02 (s, 1H, N=CH); IR (KBr) ν : 3124 (C—H), 2928 (C—H), 1648 (C=N), 1605 (ArC=C), 1397 (FcC=C), 1277 (C=S), 1167 (C—N), 831 (C—H), 478 (C—Fe) cm⁻¹; HRMS calcd for C₂₅H₃₇FFeN₆S (M+1)⁺ 528.2134, found 529.2126.

4-(4-氯苯基氨基)-1-[4-(4-甲基哌嗪-1-基)甲基]-3-二茂铁基-1*H*-1,2,4-均三唑-5(4*H*)-硫酮(**4e**): 橘黄色固体, 收率 50%. m.p. 180~181 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ : 2.27 (s, 3H, NCH₃), 2.45 (s, 4H, CH₂NCH₂), 2.92 (s, 4H, CH₂NCH₂), 4.14 (s, 5H, Fc), 4.42 (s, 2H, Fc), 4.92 (s, 2H, Fc), 5.19 (s, 2H, NCH₂N), 7.25 (s, 2H, Ph), 7.98 (s, 2H, Ph), 10.03 (s, 1H, N=CH); IR (KBr) ν : 3133 (C—H), 2931 (C—H), 3133 (C—H), 1663 (C=N), 1596 (ArC=C), 1406 (FcC=C), 1287 (C=S), 1167 (C—N), 840, 831 (C—H), 488 (C—Fe) cm⁻¹; HRMS calcd for C₂₅H₂₇Cl-FeN₆S (M+1)⁺ 534.1056, found 535.1069.

3.2.4 Mannich 碱 **5** 的合成通法

于 50 mL 的圆底烧瓶中, 加入 Schiff 碱 **2** (0.5 mmol) 和乙醇 5 mL, 加热至回流后, 加入 0.06 mL 37% 甲醛 (0.6 mmol), 搅拌 10 min 后, 加入哌嗪 (0.3 mmol); TLC 检测反应完全后, 降至室温, 过滤得粗产品, 乙醇重结晶, 得目标化合物 **5**.

1,1'-(哌嗪-1,4-二亚甲基)二[3-二茂铁基-4-(3-苯基丙叉)氨基-1*H*-1,2,4-均三唑-5(4*H*)-硫酮](**5a**): 深红色固体, 收率 86%. m.p. 232~233 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ : 2.90 (s, 8H, CH₂NCH₂), 4.16 (s, 10H, Fc), 4.41 (s, 4H, Fc), 4.95 (s, 4H, Fc), 5.15 (s, 4H, NCH₂N), 7.11 (dd, $J=9.4, 15.8$ Hz, 2H, CH=CPh), 7.29 (d, $J=15.9$ Hz, 2H, C=CHPh), 7.41~7.43 (m, 6H, Ph), 7.59 (d, $J=6.6$ Hz, 4H, Ph), 9.72 (d, $J=9.3$ Hz, 2H, N=CH); IR (KBr) ν : 3123 (C—H), 2939 (C—H), 1653 (C=N), 1610 (ArC=C), 1407 (FcC=C), 1159 (C=S), 1117 (C—N), 815 (Fc—H), 493 (C—Fe) cm⁻¹; HRMS calcd for C₄₈H₄₆Fe₂N₁₀S₂ (M+1)⁺ 938.2047, 939.2019.

1,1'-(哌嗪-1,4-二亚甲基)二[4-(呋喃-2-甲基氨基)-3-二茂铁基-1*H*-1,2,4-均三唑-5(4*H*)-硫酮](**5b**): 黄色固体, 收率 82%. m.p. 228~229 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ : 2.89 (s, 8H, CH₂NCH₂), 4.17 (s, 10H, Fc), 4.41 (t, $J=1.9$ Hz, 4H, Fc), 4.98 (s, 4H, Fc), 5.13 (s, 4H, NCH₂N), 6.62 (q, $J=3.5$ Hz, 1H, furan), 7.10 (d, $J=3.5$ Hz, 1H, furan), 7.73 (d, $J=1.8$ Hz, 1H, furan), 10.18 (s, 1H, N=CH); IR (KBr) ν : 3109 (C—H), 2942 (C—H),

1658 (C=N), 1599 (ArC=C), 1419 (FcC=C), 1266 (C=S), 1162 (C—N), 767 (Fc—H), 496 (C—Fe) cm⁻¹; HRMS calcd for C₄₀H₃₈Fe₂N₁₀O₂S₂ (M+1)⁺ 866.1319, found 867.1327.

1,1'-(哌嗪-1,4-二亚甲基)二[3-二茂铁基-4-(吡啶-2-甲烯基氨基)-1*H*-1,2,4-均三唑-5(4*H*)-硫酮](**5c**): 橘红色固体, 收率 85%. m.p. 219~220 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ : 2.89 (s, 8H, CH₂NCH₂), 4.17 (s, 10H, Fc), 4.41 (t, $J=1.9$ Hz, 4H, Fc), 4.98 (s, 4H, Fc), 5.13 (s, 4H, NCH₂N), 7.44 (dddd, $J=0.9, 4.9, 7.5, 13.3$ Hz, 2H, Py), 7.88 (ddd, $J=1.5, 7.7, 16.0$ Hz, 2H, Py), 8.23 (d, $J=7.9$ Hz, 2H, Py), 8.79 (d, $J=4.6$ Hz, 2H, Py), 10.35 (s, 2H, N=CH); IR (KBr) ν : 3124 (C—H), 2959 (C—H), 1654 (C=N), 1605 (ArC=C), 1406 (FcC=C), 1244 (C=S), 1167 (C—N), 822 (C—H), 488 (C—Fe) cm⁻¹; HRMS calcd for C₄₂H₄₀Fe₂N₁₂S₂ (M+1)⁺ 888.1639, found 889.1621.

1,1'-(哌嗪-1,4-二亚甲基)二[4-(4-氟苯基氨基)-3-二茂铁基-1*H*-1,2,4-均三唑-5(4*H*)-硫酮](**5d**): 黄色固体, 收率 81%. m.p. 235~236 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ : 2.91 (s, 8H, CH₂NCH₂), 4.14 (s, 10H, Fc), 4.42 (t, $J=1.9$ Hz, 4H, Fc), 4.93 (t, $J=1.9$ Hz, 4H, Fc), 5.16 (s, 4H, NCH₂N), 7.22 (t, $J=8.6$ Hz, 4H, Ph), 7.96 (q, $J=8.7$ Hz, 4H, Ph), 10.03 (s, 1H, N=CH); IR (KBr) ν : 3124 (C—H), 2942 (C—H), 1648 (C=N), 1596 (ArC=C), 1406 (FcC=C), 1277 (C=S), 1158 (C—N), 840 (C—H), 478 (C—Fe) cm⁻¹; HRMS calcd for C₄₄H₄₀F₂Fe₂N₁₀S₂ (M+1)⁺ 922.1546, found 923.1560.

1,1'-(哌嗪-1,4-二亚甲基)二[4-(4-氯苯基氨基)-3-二茂铁基-1*H*-1,2,4-均三唑-5(4*H*)-硫酮](**5e**): 淡黄色固体, 收率 85%. m.p. 221~222 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ : 2.95 (s, 8H, CH₂NCH₂), 4.14 (s, 10H, Fc), 4.43 (t, $J=1.6$ Hz, 4H, Fc), 4.93 (s, $J=1.7$ Hz, 4H, Fc), 5.17 (s, 4H, NCH₂N), 7.52 (d, $J=8.5$ Hz, 2H, Ph), 7.89 (d, $J=8.5$ Hz, 2H, Ph), 10.10 (s, 1H, N=CH); IR (KBr) ν : 3124 (C—H), 3029 (Ar—H), 1654 (C=N), 1406 (FcC=C), 1329 (C=S), 1124 (C—N), 822 (C—H), 494 (C—Fe) cm⁻¹; HRMS calcd for C₄₄H₄₀Cl₂Fe₂N₁₀S₂ (M+1)⁺ 954.0955, found 955.0940.

致谢 活性筛选试验由国家新药筛选中心协助测定, 在此对他们的帮助表示诚挚的谢意.

辅助材料(Supporting Information) 化合物 **3b** 的晶体学数据和所有目标产物的核磁氢谱谱图. 这些材料可以

免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Tsuchiya, A.; Hirai, G.; Koyama, Y.; Oonuma, K.; Otani, Y.; Osada, H.; Sodeoka, M. *Med. Chem. Lett.* **2012**, 3, 294.
- [2] Lavecchia, A.; Giovanni, C. D.; Pesapane, A.; Montuori, N.; Ragno, P.; Martucci, N. M.; Masullo, M.; Vendittis, E. D.; Novellino, E. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 4142.
- [3] Zhang, J.; Ji, F. J.; Gu, Y.; Zhang, X. Y.; Qiao, S. X. *Pharmacol. Rep.* **2014**, 66, 515.
- [4] Park, Y. H.; Jeon, Y. H.; Kim, I. Y. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* **2012**, 1823, 2217.
- [5] Boutros, R.; Lobjois, V.; Ducommun, B. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, 7, 495.
- [6] Sarkis, M.; Tran, D. N.; Kolb, S.; Miteva, M. A.; Villoutreix, B. O.; Garbay, C.; Braud, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 7345.
- [7] Lavecchia, A.; Giovanni, C. D.; Pesapane, A.; Montuori, N.; Ragno, P.; Martucci, N. M.; Masullo, M.; Vendittis, E. D.; Novellino, E. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 4142.
- [8] Kim, K. R.; Kwon, J. L.; Kim, J. S.; No, Z.; Kim, H. R.; Cheon, H. G. *Eur. J. Pharmacol.* **2005**, 528, 37.
- [9] Bhattacharjee, H.; Sheng, J.; Ajees, A. A.; Mukhopadhyay, R.; Rosen, B. P. *Biochemistry* **2010**, 49, 802.
- [10] Yu, H. B.; Shao, L.; Fang, J. X. *J. Organomet. Chem.* **2007**, 692, 991.
- [11] Huang, X. F.; Wang, L. Z.; Tang, L.; Lu, Y. X.; Wang, F.; Song, G. Q.; Ruan, B. F. *J. Organomet. Chem.* **2014**, 749, 157.
- [12] Kerstin, S.; Tim, K.; Yusuf, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 7186.
- [13] Ram, S. U.; Jaya, K. V.; Ramakant, A. K. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 1854.
- [14] Guo, H.; Zhang, G. L.; Zhang, T. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 3662.
- [15] Ji, D.; Lu, J. R.; Xin, C. W.; Peng, C. Y.; Mu, J. B.; Li, J. F. *Chin. J. Org. Chem.* **2013**, 33, 1062 (in Chinese).
(戢丹, 卢俊瑞, 辛春伟, 彭春勇, 穆江蓓, 李建发, 有机化学, **2013**, 33, 1062.)
- [16] Zhu, C. A.; Wu, F. Y.; Wang, X.; Gao, L. N.; Weng, Q. F.; Shi, L.; Zhang, C. L. *Chin. J. Appl. Chem.* **2014**, 31, 455 (in Chinese).
(朱长安, 武飞宇, 王雪, 高丽娜, 翁前锋, 石丽, 张成路, 应用化学, **2014**, 31, 455.)
- [17] Wang, B. L.; Liu, X. H.; Zhang, X. L.; Zhang, J. F.; Song, H. B.; Li, Z. M. *Chem. Biol. Drug Des.* **2011**, 78, 42.
- [18] Sun, L. P.; Shen, Q.; Piao, H. H.; Ma, W. P.; Gao, L. X.; Zhang, W.; Nan, F. J.; Li, J.; Piao, H. R. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 3630.
- [19] Shi, L.; Yu, H. P.; Zhou, Y. Y.; Du, J. Q.; Shen, Q.; Li, J. Y.; Li, J. *Acta. Pharmacol. Sin.* **2008**, 29, 278.
- [20] Huang, W. G.; Jiang, Y. Y.; Li, Q.; Li, J.; Li, J. Y.; Lu, W.; Cai, J. C. *Tetrahedron* **2005**, 61, 1863.
- [21] Li, Q. Z.; Song, B. A.; Cai, X. J.; Zheng, Y. G.; Guo, Q. Q. *Chin. J. Org. Chem.* **2010**, 30, 569 (in Chinese).
(李黔柱, 宋宝安, 蔡学建, 郑玉国, 郭晴晴, 有机化学, **2010**, 30, 569.)
- [22] Yan, L.; Liu, F. W.; Liu, H. M. *Chin. J. Org. Chem.* **2011**, 31, 1639 (in Chinese).
(严琳, 刘丰五, 刘宏民, 有机化学, **2011**, 31, 1639.)
- [23] Dai, H.; Liu, J. B.; Miao, W. K.; Wu, S. S.; Qin, X.; Zhang, X.; Wang, T. T.; Fang, J. X. *Chin. J. Org. Chem.* **2011**, 31, 1662 (in Chinese).
(戴红, 刘建兵, 苗文科, 吴珊珊, 秦雪, 张欣, 王婷婷, 方建新, 有机化学, **2011**, 31, 1662.)
- [24] Peng, C. Y.; Lu, J. R.; Xin, C. W.; Li, J. F.; Ji, D.; Bao, X. R. *Chem. J. Chin. Univ.* **2013**, 34, 1394 (in Chinese).
(彭春勇, 卢俊瑞, 辛春伟, 李建发, 戢丹, 鲍秀荣, 高等学校化学学报, **2013**, 34, 1394.)

(Li, L.; Lu, Z.)