

吡嗪并[6,1-*b*]喹唑啉酮类化合物的合成及其生物活性王淑琴^a 黄婉云^{*,a} 张小蓉^a 张晓婷^a 潘成学^b^(a) 桂林医学院药学院 广西桂林 541004^(b) 广西师范大学化学与药学学院 药用资源化学与药物分子工程国家重点实验室 广西桂林 541004

摘要 通过将两个优势结构单元的组合设计了一个含氮杂环新骨架吡嗪并[6,1-*b*]喹唑啉酮,并发展了一条以 2-氨基苯甲酸酯等为原料,以分子内酰胺跟酯基的分子内缩合反应为关键步骤,经 4 步反应来合成吡嗪并[6,1-*b*]喹唑啉酮衍生物的路线。14 个目标化合物 **4a**~**4n** 被合成,其结构经 ¹H NMR, ¹³C NMR 和 HRMS 表征和确认。采用噻唑蓝(MTT)法测试了目标化合物对人肿瘤细胞 SK-OV-3, CNE-2, MGC-803, NCI-H460 和人正常肝细胞 LO2 的体外细胞毒活性,发现 2 个化合物具有很强的抗肿瘤活性,其中 2-(4-溴苯基)-4-羟基-10*H*-吡嗪并[6,1-*b*]喹唑啉-10-酮(**4b**)对人鼻咽癌细胞 CNE-2 和 2-(3-氯苯基)-4-羟基-10*H*-吡嗪并[6,1-*b*]喹唑啉-10-酮(**4d**)对人肺癌细胞 NCI-H460 的 IC₅₀ 值分别为 2.31 和 0.85 μmol/L,远强于阳性对照药顺铂,与抗肿瘤天然药物喜树碱相当。用紫外光谱法、荧光滴定法进一步研究了化合物与 DNA 的相互作用,证实化合物可通过嵌入 DNA 的方式与 DNA 相互作用。活性强而且毒性低的化合物 **4d** 还可以剂量依赖性关系将人肺癌细胞 NCI-H460 的细胞周期阻滞在 G1 期,并显著诱导细胞发生凋亡,而毒性高的化合物 **4b** 则可诱导细胞的双链 DNA 发生断裂。

关键词 喹唑啉酮; 吡嗪衍生物; 抗肿瘤活性; 与 DNA 相互作用

Synthesis and Bioactive Evaluation of Pyridazino-[6,1-*b*]quinazolinones DerivativesWang, Shuqin^a Huang, Wanyun^{*,a} Zhang, Xiaorong^aZhang, Xiaoting^a Pan, Chengxue^b^(a) College of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin 541004^(b) State Key Laboratory for Chemistry and Molecular Engineering of Medicinal Resources, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004

Abstract Novel nitrogen-containing heterocyclic scaffold pyridazino[6,1-*b*]quinazolinones were designed by the combination of two privileged structure units. Then a scheme for the synthesis of pyridazino[6,1-*b*]quinazolinone derivatives in 4 steps starting from methyl 2-aminobenzoate was developed in which the intramolecular condensation of acylhydrazone with ester was a key step transformation. 14 pyridazino[6,1-*b*]quinazolinone derivatives were synthesized and their structures were characterized and confirmed by ¹H NMR, ¹³C NMR and HRMS. Their *in vitro* cytotoxic activities against a panel of human tumor cell lines (SK-OV-3, CNE-2, MGC-803, NCI-H460) and normal liver cell LO2 were evaluated via methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The result indicated that 2-(4-bromophenyl)-4-hydroxy-10*H*-pyridazino[6,1-*b*]quinazolin-10-one (**4b**) and 2-(3-chlorophenyl)-4-hydroxy-10*H*-pyridazino[6,1-*b*]quinazolin-10-one (**4d**) exhibited very potent cytotoxic activity. The IC₅₀ value of **4b** against CNE-2 and **4d** against NCI-H460 cell line lowered to 0.85 and 2.31 μmol/L, respectively, far potent than the positive control cisplatin and almost equivalent to the natural anticancer medicine camptothecin. Ultraviolet spectrometry and fluorescence titration assay were carried out to evaluate the ability of the compound to interact with DNA. The result indicated that they were able to intercalate in to DNA. Compound **4d**, which demonstrated potent antitumor activity while less cytotoxicity against the normal liver cell LO2, could arrest cell cycle at G1 phase and significantly induce apoptosis on NCI-H460 cell in a dose-dependent manner, while **4b** which exhibit potent cytotoxicity against LO2, could result in significant DNA double strand break when treated with the cell.

Keywords quinazolinones; pyridazine; antitumor; interaction with DNA

* Corresponding author. E-mail: hwygxnu@163.com

Received September 10, 2019; revised November 27, 2019; published online December 11, 2019.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21362007).

国家自然科学基金(No. 21362007)资助项目。

发现药物新骨架是药物化学研究中的核心问题之一^[1~4], 新骨架的发现, 不仅有助于开发出结构新颖的具有自主知识产权的新药, 还有可能发现新的药物作用机制, 从而发现更好的治疗药物. 优势结构(Privileged structures)是指那些对多种药物靶标具有高亲和作用的分子骨架, 或者具有不同药理活性的药物分子之间所共有的分子结构片段^[5~8]. 优势结构的概念首先由哈佛大学的有机化学和药物化学大师 Evans 提出^[9]. 目前已经成为药物设计的重要理论指导^[10]. 由于优势结构单元类药性好, 且易于与生物体内的多种受体或蛋白等产生高亲和作用, 因此在药物化学研究中, 优势结构单元常常被用来作为药物或生物活性分子设计的起点.

喹啉酮^[11~15]是非常重要的含氮杂环, 广泛存在于天然生物碱及生物活性分子中, 其中包括许多具有六元杂环并喹啉酮母核结构的喹啉酮衍生物(图 1). 比如含有母核结构 I 的天然产物 mackinazolinone, leucomidines C 等, 含有母核结构 II 的天然产物 fumiquinazoline A, fumiquinazoline C, fumiquinazoline F, fumiquinazoline Q, cottoquinazoline A, prelapatin B, protuboxepin E 和 glyantrypine 等^[16,17]. 此外, 含有六元杂环并喹啉酮的具有代表性的生物活性化合物还包括图 1 中的化合物 A~C^[18]. 另外, 哒嗪也是药物分子设计中一个非常重要的优势结构单元(图 1), 广泛存在各种抗肿瘤、抗炎、抗病毒、抗菌及抗心血管等药物分子中^[19~21], 其衍生物的合成及活性研究也一直吸引着众多的有机化学和药物化学研究工作者.

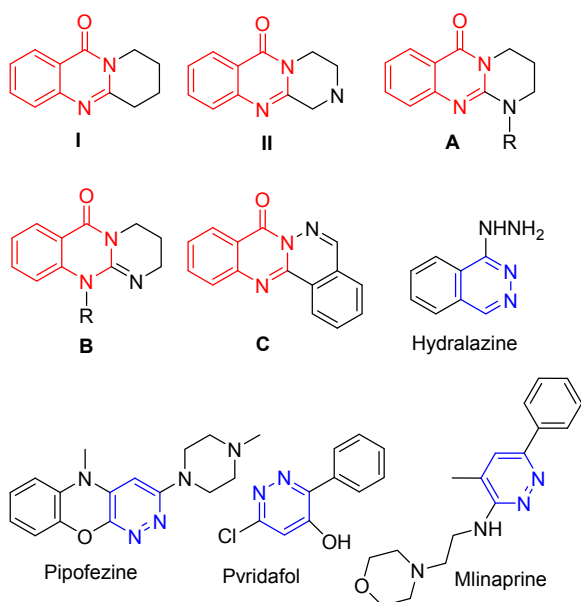
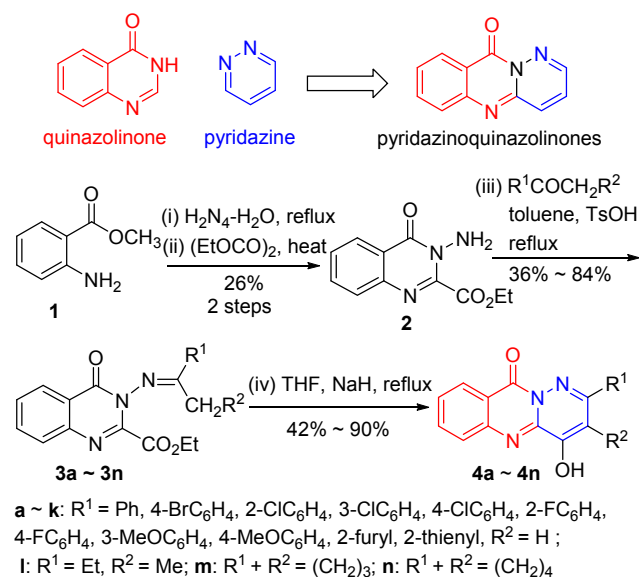


图 1 一些具有六元杂环并喹啉酮母核结构及哒嗪药物代表化合物

Figure 1 Representatives of bioactive compound with six-membered-fused quinazolinone nucleus or pyridazine drugs

鉴于这两个优势结构单元在生物活性分子设计上的重要应用及其衍生物的广泛生物活性, 我们拟将这两个优势结构单元进行组合, 获得一个具有六元杂环并喹啉酮的含氮杂环新骨架哒嗪并[6,1-*b*]喹啉酮, 然后再进一步研究具有这个含氮杂环新骨架的衍生物的生物活性, 拟从中发现药物新化学实体. 为此我们发展了以邻氨基苯甲酸甲酯及酮类化合物等为主要原料, 以酰胺 α 位的碳负离子与酯基的分子内缩合反应为关键步骤, 共经 4 步反应合成得到了 14 个具有哒嗪并[6,1-*b*]喹啉酮骨架的化合物 4a~4n (Scheme 1), 并对这些化合物的抗肿瘤活性、与 DNA 的相互作用等进行了研究.



图式 1 目标化合物的合成
Scheme 1 Synthesis of the target compounds

1 结果与讨论

1.1 目标化合物的合成

酰胺 2 的合成参考文献[22]报道的方法进行了改动, 将草酸二乙酯的用量由原来的 1 equiv. 增加到 1.2 equiv. 在 2 与酮类化合物的缩合反应中, 我们以苯乙酮跟 2 的缩合为模型反应, 分别尝试了乙醇、乙酸、二氧六烷及甲苯等 4 种不同的溶剂在乙酸或对甲苯磺酸催化下进行缩合反应. 薄层色谱(TLC)对反应的检测结果表明: 在乙醇及乙酸中反应基本不能进行, 而在二氧六烷中反应进行很慢, 最后确定以甲苯为溶剂对甲苯磺酸为催化剂在回流分水条件下反应效果最好, 以 36%~84% 的收率得到了缩合产物. 当酮类化合物是邻氟、邻氯或间甲氧基苯乙酮时, NMR 谱图数据显示缩合产物为顺反异构体的混合物.

酰胺 3 在碱性条件下发生缩合环化成化合物 4 是这一合成路线中的关键转化步骤. 尝试了乙醇钠、叔丁醇钾及氢化钠三种不同的碱分别在无水乙醇、甲苯、*N,N*-

二甲基甲酰胺(DMF)和四氢呋喃(THF)中进行化合反应. 薄层色谱(TLC)对反应的检测结果显示, 以氢氧化钠为碱在 DMF 或 THF 中进行环化, **4a** 的产率分别达到了 88% 和 90%. 以 DMF 为溶剂时, 反应的后处理比较麻烦. 最后用氢氧化钠为碱, THF 为溶剂来制备目标化合物 **4**.

1.2 化合物的细胞毒活性

我们用噻唑蓝(MTT)法测试了化合物 **4** 对四种人源肿瘤细胞株(卵巢癌细胞 SKOV-3, 鼻咽癌细胞 CNE-2, 胃癌细胞 MGC-803, 肺癌细胞 NCI-H460)和人正常肝细胞 LO2 的体外细胞毒活性, 喜树碱(CPT)和顺铂(Cisplatin)为阳性对照, 测试结果见表 1.

从表 1 可看出, 化合物 **4b** 和 **4d** 表现出非常强的细胞毒活性, 它们对人鼻咽癌细胞 CNE-2 及人肺癌细胞 NCI-H460 的 IC_{50} 值分别达到 0.85 和 2.31 $\mu\text{mol/L}$, 与抗肿瘤天然产物喜树碱(CPT)的活性相当, 远高于抗肿瘤药物顺铂. 值得注意的是, **4b** 的细胞毒活性虽然总体上略强于 **4d**, 但其对正常肝细胞 LO2 的毒性也很大, 达到了 1.49 $\mu\text{mol/L}$, 而 **4d** 则总体上表现出对肿瘤细胞具有良好的选择性, 其对正常肝细胞 LO2 的细胞毒性仅为 30.9 $\mu\text{mol/L}$, 具有发展成抗肿瘤候选化合物的前景及进一步深入研究的价值. 而另外 12 个目标化合物中, **4c**, **4h**, **4i**, **4l**, **4m** 和 **4n** 细胞毒活性较低, 其它的 6 个化合物则显示中等强度的细胞毒活性.

从构效关系看, 当 R^1 为芳基, R^2 为 H 时, 目标化合物的细胞毒活性要比 R^1 , R^2 均为烷基时(**4l**, **4m**, **4n**)要强得多. 当 R^1 为芳基, 芳基上取代基的种类与位置均对化合物的细胞毒活性有显著影响. 就取代基种类而言, 总

体上是 $\text{Br} > \text{Cl} > \text{F} > \text{H}$, 当取代基变为 OCH_3 时, 不管是在邻位(**4h**)还是对位(**4i**), 化合物将几乎不显示细胞毒活性; 就芳基上的取代基位置而言, 间位取代(**4d**)与对位取代(**4e**)差别不大, 但如果取代基是在芳基的邻位(**4c**), 则化合物的细胞毒活性将会大幅降低. 如果将芳基由苯环变为噻吩(**4k**)或呋喃环(**4j**), 则目标化合物依然维持中等的细胞毒活性, 其中以噻吩环优于呋喃环.

1.3 光谱法研究 **4b**, **4d** 与 DNA 的相互作用

DNA 是非常重要的生物大分子, 也是很多药物分子的作用靶标, 特别是各种抗肿瘤药物. 紫外吸收光谱法及荧光探针法是光谱法研究小分子化合物与 DNA 相互作用的两种最常用的方法. 根据小分子化合物的作用模式, 一般可分为 DNA 嵌入剂、沟区结合剂和烷化剂三大类^[23]. 而具有多芳环骨架的小分子通常可以与 DNA 发生嵌入作用, 此时由于小分子的芳环骨架与 DNA 碱基对发生 π - π 堆积、 π -正电荷等相互作用, 会引起化合物或 DNA 的吸收谱带的最大吸波长和(或)吸收强度发生红移或蓝移及增色或减色等变化, 并以此来初步判断小分子与 DNA 相互作用的模式及强弱^[24]. 而荧光探针法则是用来进一步确定小分子化合物与 DNA 作用模式的简便方法, 其中最常用的荧光探针为溴化乙锭(EB). EB 可嵌入 DNA 并能够使 EB-DNA 体系的荧光显著增强. 当小分子加入到 EB-DNA 体系后, 如果小分子也容易跟 DNA 发生嵌入作用, 就会与 EB 竞争结合到 DNA, 使 EB-DNA 体系荧光强度发生猝灭, 从而可说明化合物与 DNA 发生嵌入作用, 而荧光的淬灭程度可反应出小分子与 DNA 相互作用的强弱^[24].

表 1 化合物 **4** 的体外抗肿瘤活性
Table 1 Anticancer activity *in vitro* of **4**

Compd.	$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})^a$				
	SK-OV-3	CNE-2	MGC-803	NCI-H460	LO2
4a	21.24 $\pm$ 1.72	13.71 $\pm$ 1.07	13.56 $\pm$ 3.39	19.90 $\pm$ 1.29	60.68 $\pm$ 4.86
4b	5.34 $\pm$ 0.93	0.85 $\pm$ 0.11	3.37 $\pm$ 1.28	6.13 $\pm$ 2.41	1.49 $\pm$ 0.40
4c	35.85 $\pm$ 2.03	36.32 $\pm$ 2.81	> 100	25.61 $\pm$ 4.10	> 100
4d	16.08 $\pm$ 2.06	5.49 $\pm$ 1.96	7.53 $\pm$ 1.32	2.31 $\pm$ 0.16	30.90 $\pm$ 1.36
4e	9.52 $\pm$ 1.04	4.10 $\pm$ 0.73	9.63 $\pm$ 1.02	18.56 $\pm$ 2.36	18.78 $\pm$ 1.07
4f	21.47 $\pm$ 3.37	> 100	21.58 $\pm$ 2.49	21.96 $\pm$ 1.96	> 100
4g	20.18 $\pm$ 2.33	16.94 $\pm$ 0.89	15.72 $\pm$ 2.11	16.58 $\pm$ 1.78	> 100
4h	> 100	85.97 $\pm$ 8.94	44.54 $\pm$ 3.24	56.24 $\pm$ 4.72	45.18 $\pm$ 5.56
4i	50.11 $\pm$ 4.17	> 100	22.77 $\pm$ 6.05	54.47 $\pm$ 4.01	> 100
4j	14.91 $\pm$ 1.09	33.54 $\pm$ 4.60	27.25 $\pm$ 4.47	25.52 $\pm$ 2.18	> 100
4k	16.34 $\pm$ 1.73	13.07 $\pm$ 4.35	11.05 $\pm$ 3.68	28.36 $\pm$ 2.13	> 100
4l	> 100	> 100	65.89 $\pm$ 2.09	> 100	> 100
4m	25.47 $\pm$ 1.80	> 100	24.61 $\pm$ 1.71	> 100	> 100
4n	27.96 $\pm$ 2.57	> 100	25.40 $\pm$ 0.94	> 100	> 100
CPT	1.16 $\pm$ 0.11	1.94 $\pm$ 0.21	4.52 $\pm$ 0.74	2.32 $\pm$ 0.18	5.37 $\pm$ 1.02
Cisplatin	12.86 $\pm$ 1.85	16.09 $\pm$ 2.08	12.42 $\pm$ 1.23	16.91 $\pm$ 2.86	32.81 $\pm$ 3.01

^a Results were expressed as means $\pm$ SD (standard deviation) from triplicate assay in a single experiment, $P < 0.05$.

由于化合物 **4b** 与 **4d** 均具有一个多芳环骨架, 因此首先分别用紫外光谱法和荧光光谱法研究了化合物 **4b**、**4d** 与小牛胸腺 DNA 的相互作用, 其结果如图 2 所示. 由图 2A 和 2B 可知, 黑色虚线表示 ct-DNA 在缓冲液中的紫外吸收光谱, 其在约 215 nm 附近有较强吸收峰, 在 280 nm 附近有弱吸收峰. 随着 **4b** 或 **4d** 的加入, DNA 在 280 nm 附近的吸收峰会随着化合物浓度的增加而显著增强, 同时发生明显的蓝移现象, 其在 215 nm 附近的吸收强度也随着化合物浓度的增加逐步增加. 表明化合物 **4b** 和 **4d** 可与 DNA 发生相互作用. 而由图 2C 和 2D 可知, 黑色虚线表示没有加入 **4b** 或 **4d** 的 EB-DNA 体系的荧光发射光谱, 该体系在大约 660 nm 处有强的荧光发射. 随着 **4b** 或 **4d** 的加入, DNA-EB 体系的荧光强度逐渐减弱, 发生明显的荧光淬灭现象, 表明 **4b** 和 **4d** 均可通过嵌入方式与 DNA 作用, 其中化合物 **4d** 导致荧光淬

灭的程度明显强于 **4b**, 说明 **4d** 表现出更强的 DNA 嵌入作用. 由于总体上 **4b** 的细胞毒要稍微强于 **4d**, 因此这也预示着这个化合物骨架的细胞毒, 可能不是直接源于与 DNA 的相互作用, 或者至少不是只来自于化合物与 DNA 的相互作用.

1.4 免疫印迹法研究 **4b** 与 **4d** 对 LO2 细胞的双链 DNA 的断裂作用

由于 **4b** 虽然总体上表现出比 **4d** 更强的抗肿瘤效果, 但其对人的正常肝细胞 LO2 也表现出很强的细胞毒. 为了初步探索这一现象, 用免疫印迹法研究了 **4b** 与 **4d** 对 LO2 细胞的 DNA 损伤的作用情况. γ H2AX 是 DNA 损伤的标志物, 它的形成意味着 DNA 双链断裂的发生. 由图 3 可知, **4b** 作用于 LO2 细胞后, 其 γ H2AX 的表达出现了明显的上调, 并显示出明显的浓度依赖性, 而在相同浓度下 **4d** 对 γ H2AX 的表达并没有明显影响. 表明

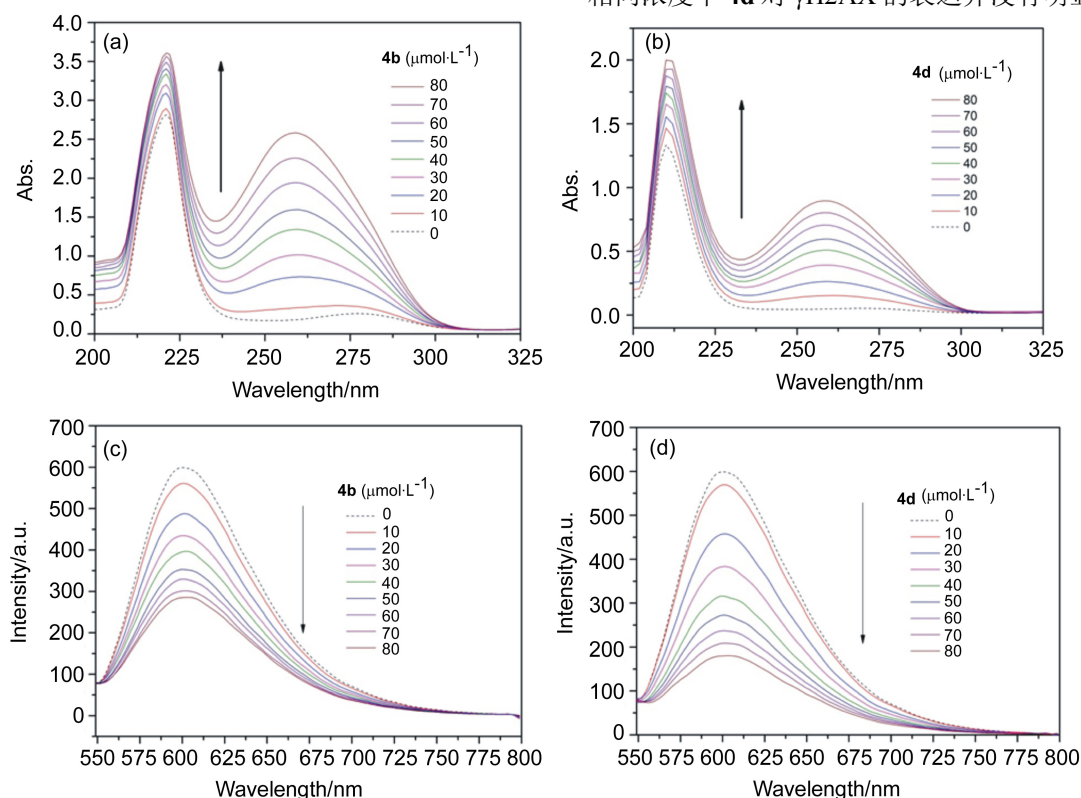


图 2 光谱法研究化合物 **4b** 和 **4d** 与 DNA 的相互作用

Figure 2 Spectroscopy to investigate the interaction of **4b** and **4d** with DNA

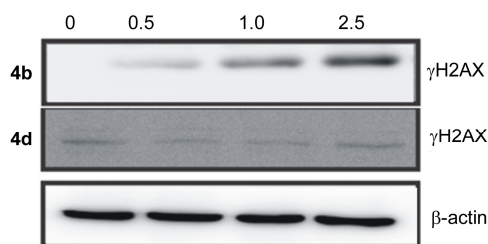


图 3 与 **4b** 或 **4d** 孵育后 LO2 细胞中 γ H2AX 的表达量

Figure 3 Level of γ H2AX in LO2 cell treated with **4b** or **4d**

4b 可引起细胞 LO2 中双链 DNA 的断裂, 这可能是其对正常肝细胞 LO2 具有强的细胞毒作用的主要原因之一.

1.5 **4d** 对 NCI-H460 肿瘤细胞的细胞周期阻滞作用

由于化合物 **4d** 不仅对肿瘤细胞具有很强的细胞毒作用, 特别是对人肺癌细胞 NCI-H460 的 IC_{50} 值分别达到 2.31 μ mol/L, 与 CPT 相当, 远高于抗肿瘤药物顺铂, 而且其对正常细胞的毒性也很低, 具有良好的发展成为抗肿瘤先导化合物的前景, 因此我们进一步用流式细胞

术研究了 **4d** 对肿瘤细胞的细胞周期阻滞作用, 从图 4 可以看出, 当化合物浓度由 0 增加到 1 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, G1 期细胞的百分数从 61.94% 增加到 66.91% 及

76.69%, 而 G2 期分别由 5.5% 减小到 4.99% 和 1.30%, S 期的细胞则从 32.54 减小到 28.10% 和 22.01%, 表明化合物 **4d** 可将 NCI-H460 细胞阻滞在 G1 期。

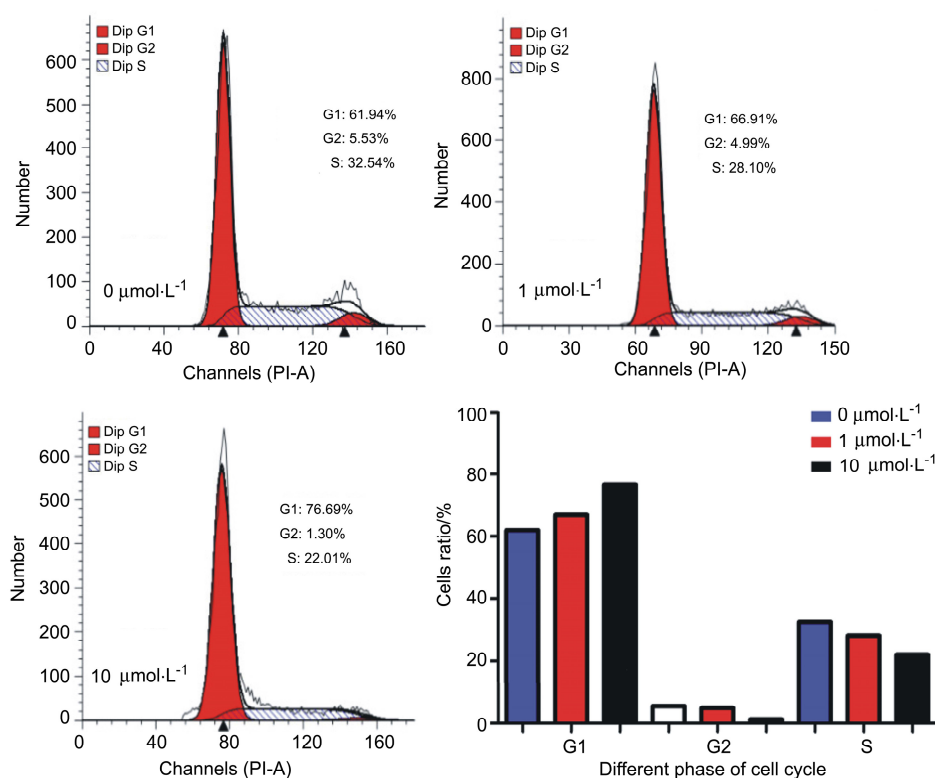


图 4 **4d** 对 NCI-H460 细胞的细胞周期阻滞作用

Figure 4 Inhibitory effects of **4d** on cell cycle of NCI-H460 cell

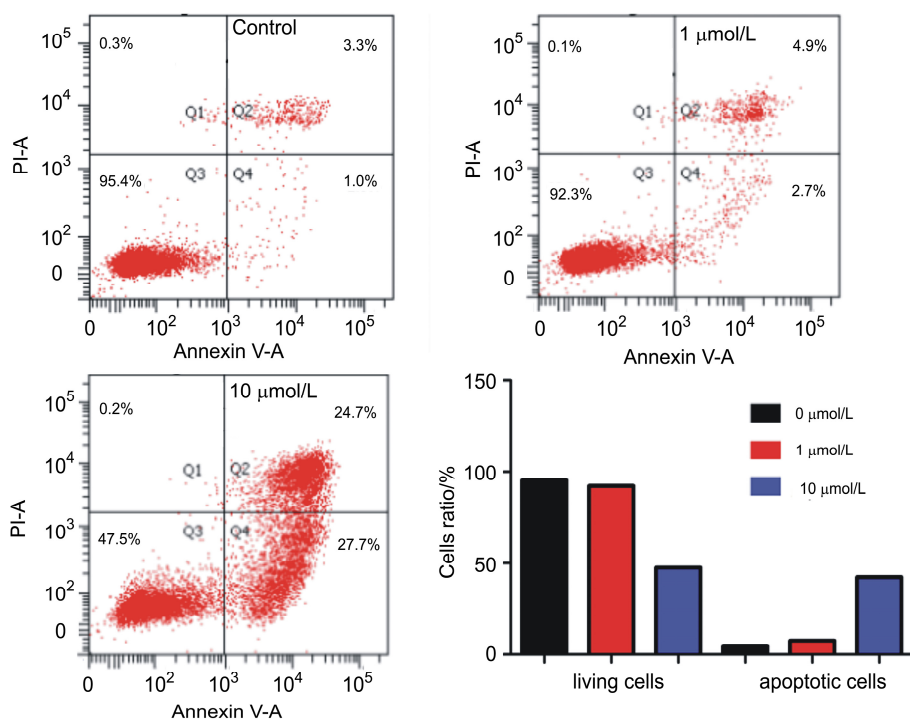


图 5 化合物 **4d** 对 NCI-H460 细胞的凋亡结果

Figure 5 Apoptosis induction of **4d** on NCI-H460 cells

1.6 4d 诱导 NCI-H460 肿瘤细胞发生凋亡

证实了 **4d** 可以引起肿瘤细胞的细胞周期阻滞, 接下来我们又研究了 **4d** 诱导肿瘤细胞凋亡的情况. 由图 5 可知, 当 **4d** 的浓度由 0 增加到 1 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, NCI-H460 细胞发生凋亡的比例由 4.3% 依次增加到 7.6% 和 52.1%, 特别是浓度由 1 增加到 10 $\mu\text{mol/L}$, 凋亡细胞的比例发生了显著的增加, 确定了 **4d** 确实具有很强的诱导肿瘤细胞凋亡的作用.

2 结论

根据药物分子设计的优势结构等理论, 设计并合成得到了 14 个具有哒嗪并[6,1-*b*]喹唑啉酮骨架的系列化合物. 用 ^1H NMR, ^{13}C NMR 和 HRMS 对它们的结构进行了表征和确认. 这 14 个化合物对人肿瘤细胞 SK-OV-3, CNE-2, MGC-803, NCI-H460 和人正常肝细胞 LO2 的体外细胞毒活性结果表明: 化合物 **4b** 对人鼻咽癌细胞 CNE-2 和 **4d** 对人肺癌细胞 NCI-H460 的 IC_{50} 值分别达到了 0.85 和 2.31 $\mu\text{mol/L}$. 化合物与 DNA 的相互作用研究表明, **4b** 和 **4d** 均可通过嵌入 DNA 的方式与 DNA 相互作用. **4d** 还可以将人肺癌细胞 NCI-H460 的细胞周期阻滞在 G1 期, 并显著诱导肿瘤细胞发生凋亡. 研究还发现化合物 **4b** 可直接引起 LO2 细胞的 DNA 双键发生断裂, 这可能是其对正常肝细胞 LO2 显示出强毒性的主要原因. 而化合物 **4d** 则表现出活性强毒性低的特点, 具有良好的进一步深入研究的价值.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

超导核磁共振仪: Bruker AV 400 MHz, Bruker AV 500 MHz(内标: TMS); 高分辨质谱仪: ESQUIRE HCT 型(美国, 布鲁克·道尔顿公司); 熔点仪: XT4A 熔点测定仪(北京科仪电光仪器厂); M1000 多功能酶标仪(Tecan 公司); 流式细胞仪(BD 公司); 硅胶和硅胶板均产自青岛海洋化工集团公司. 实验所用的各种化学试剂均为市售的国产化学纯或分析纯试剂. 生物测试所用的各种生物试剂及试剂盒主要购自 Solarbio 公司, Sigma 公司及 TaKaRa 公司.

3.2 实验方法

3.2.1 化合物 **2** 的合成

将邻氨基苯甲酸甲酯(10 g)和 50 mL 的水合肼(80%)加入到的圆底烧瓶中, 氮气保护下搅拌回流约 4 h (TLC 监测, 展开剂: $V_{\text{乙酸乙酯}}/V_{\text{石油醚}}=2/1$). 待反应完成后, 室温冷却后进一步用冰水冷却, 使得固体产物尽量析出, 抽滤, 冰水洗涤后烘干, 得白色肼解产物 7.2 g, 收率 72%.

将合成的的酰肼 1.51 g (1 mmol)、草酸二乙酯 1.22 g (1.2 mmol)和 10 mL 乙酸加入到圆底烧瓶中, 在氮气保护下回流反应约 1 h (TLC 监测, 展开剂: $V_{\text{乙酸乙酯}}/V_{\text{石油醚}}=1/4$). 待反应完成后, 冷却至室温. 减压除去大部分乙酸, 然后加入 30 mL NaHCO_3 溶液, DCM 萃取(30 mL $\times$ 5). 合并有机层, 30 mL NaHCO_3 溶液洗涤, 无水 Na_2SO_4 干燥, 浓缩, 柱层析提纯(洗脱剂: $V_{\text{乙酸乙酯}}/V_{\text{石油醚}}=1/4$)得化合物 **2**, 白色固体, 收率 36%. m.p. 133~134 $^{\circ}\text{C}$ (文献值^[22] 133~135 $^{\circ}\text{C}$).

3.2.2 化合物 **3** 的合成

以化合物 **3a** 为例. 依次将化合物 **2** (1 mmol, 0.335 g), 甲苯(5 mL), 苯乙酮(2 mmol, 0.180 g)和对甲苯磺酸(0.06 mmol, 10 mg)加入到 50 mL 的圆底烧瓶中, 置于油浴锅中, 安装分水器加热回流分水, 反应约 5 h (用 TLC 监测反应, 展开剂: $V_{\text{乙酸乙酯}}:V_{\text{石油醚}}=1:6$). 待反应完成后, 减压除去甲苯, 柱层析提纯(洗脱剂: $V_{\text{乙酸乙酯}}:V_{\text{石油醚}}=1:6$), 得化合物 **3a** 白色固体 0.332 g, 收率 69%. 利用同样的方法可合成化合物 **3b**~**3n**.

3-(2-苯基)乙亚胺基喹唑啉-4-酮-2-甲酸乙酯(**3a**): 白色固体, m.p. 102~104 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.35 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 7.95 (d, $J=7.9$ Hz, 2H), 7.87~7.83 (m, 2H), 7.82~7.57 (m, 2H), 7.54~7.45 (m, 2H), 4.38 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 2.37 (s, 3H), 1.30 (t, $J=7.1$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 178.06, 160.35, 155.70, 145.74, 144.95, 135.42, 134.10, 131.58, 128.27, 127.94, 127.88, 127.34, 126.86, 122.19, 62.61, 17.51, 13.67.

3-[2-(4-溴苯基)]乙亚胺基喹唑啉-4-酮-2-甲酸乙酯(**3b**): 白色固体, 收率 71%. m.p. 133~135 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.35 (dd, $J=7.6, 0.5$ Hz, 1H), 7.87~7.80 (m, 4H), 7.62~7.57 (m, 3H), 4.38 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 2.34 (s, 3H), 1.30 (t, $J=7.1$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 176.50, 159.92, 155.23, 145.30, 144.38, 133.88, 133.85, 131.21, 128.48, 127.64, 126.52, 126.15, 121.77, 62.30, 17.02, 13.36.

3-[2-(2-氯苯基)]乙亚胺基喹唑啉-4-酮-2-甲酸乙酯(**3c**): 白色固体, 收率 69%. NMR 谱图数据显示存在顺反异构体, 比例约为 1:5. 含量较多的异构体的核磁共振数据: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.35 (dd, $J=7.8, 1.2$ Hz, 1H), 7.89 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.85~7.82 (m, 2H), 7.61~7.57 (m, 1H), 7.43 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 4.39 (q, $J=7.2$ Hz, 2H), 2.35 (s, 3H), 1.30 (t, $J=7.2$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 177.05, 160.60, 155.89, 145.97, 145.12, 138.26, 134.52, 134.10, 129.70, 129.01, 128.90, 128.84, 128.28, 127.18, 126.61, 122.45, 62.96,

17.72, 14.05.

3-[2-(3-氯苯基)]乙亚胺基喹啉-4-酮-2-甲酸乙酯 (**3d**): 白色固体, 收率 54%. m.p. 123~124 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.35 (dd, *J*=7.8, 1.2 Hz, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.95~7.80 (m, 3H), 7.61~7.57 (m, 2H), 7.43~7.39 (m, 1H), 4.40 (q, *J*=7.4 Hz, 2H), 2.35 (s, 3H), 1.32 (t, *J*=7.4 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 176.96, 160.58, 155.82, 145.95, 145.01, 137.44, 134.79, 134.53, 131.82, 129.87, 128.33, 128.32, 127.74, 127.21, 125.82, 122.43, 63.03, 17.92, 14.03.

3-[2-(4-氯苯基)]乙亚胺基喹啉-4-酮-2-甲酸乙酯 (**3e**): 白色固体, 收率 60%. m.p. 135~136 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.35 (dd, *J*=7.6, 1.0 Hz, 1H), 7.96~7.95 (m, 1H), 7.86~7.81 (m, 3H), 7.62~7.58 (m, 2H), 7.44~7.40 (m, 1H), 4.42 (q, *J*=7.4 Hz, 2H), 2.36 (s, 3H), 1.33 (t, *J*=7.4 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 177.02, 160.65, 155.88, 146.01, 145.07, 137.50, 134.85, 134.59, 131.88, 129.93, 128.39, 128.38, 127.80, 127.27, 125.88, 122.48, 63.09, 17.98, 14.08.

3-[2-(2-氟苯基)]乙亚胺基喹啉-4-酮-2-甲酸乙酯 (**3f**): 白色固体, 收率 48%. NMR 谱图数据显示存在顺反异构体, 比例约为 1 : 4. 含量较多的异构体的核磁共振数据: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.34 (dd, *J*=7.6, 1.0 Hz, 1H), 7.85~7.82 (m, 2H), 7.72~7.68 (m, 2H), 7.61~7.57 (m, 1H), 7.45~7.43 (m, 1H), 7.24 (d, *J*=2.4 Hz, 1H), 4.39 (q, *J*=7.2 Hz, 2H), 2.36 (s, 3H), 1.31 (t, *J*=7.2 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 177.30, 177.27, 162.50 (d, *J*=247.3 Hz, C—F), 160.88, 156.15, 146.26, 145.98, 145.34, 138.18, 138.11, 134.83, 134.56, 130.54, 130.47, 128.62, 128.61, 128.40, 128.34, 127.50, 127.38, 123.81, 123.78, 122.74, 122.69, 121.86, 121.83, 119.27, 119.06, 117.21, 114.94, 114.71, 113.66, 113.43, 63.47, 63.31, 26.06, 14.35, 14.31.

3-[2-(4-氟苯基)]乙亚胺基喹啉-4-酮-2-甲酸乙酯 (**3g**): 白色固体, 收率 52%. m.p. 98~99 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.34 (dd, *J*=8.0, 1.0 Hz, 1H), 8.00~7.96 (m, 2H), 7.85~7.82 (m, 2H), 7.61~7.51 (m, 1H), 7.17~7.13 (m, 2H), 4.40 (q, *J*=7.2 Hz, 2H), 2.36 (s, 3H), 1.31 (t, *J*=7.2 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 177.30, 165.45 (d, *J*=254.3 Hz, C—F), 160.97, 156.34, 146.35, 145.48, 134.81, 130.33, 130.24, 128.62, 128.60, 127.51, 122.80, 116.18, 115.96, 63.27, 18.04, 14.34.

3-[2-(3-甲氧苯基)]乙亚胺基喹啉-4-酮-2-甲酸乙酯 (**3h**): 白色固体, 收率 46%. NMR 谱图数据显示存在顺反异构体, 比例约为 1 : 1. ¹H NMR (400 MHz,

CDCl₃) δ: 8.35~7.00 (m, 16H, ArH), 4.51 (q, *J*=7.2 Hz, 2H), 4.37 (q, *J*=7.2 Hz, 2H), 2.58 (s, 3H), 2.34 (s, 3H), 1.50 (t, *J*=7.2 Hz, 3H), 1.28 (t, *J*=7.2 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 180.84, 178.54, 161.22, 160.89, 159.89, 159.39, 156.22, 155.41, 146.28, 146.02, 145.47, 145.40, 137.48, 137.29, 134.69, 134.38, 129.88, 129.83, 128.50, 128.47, 128.22, 128.13, 127.41, 127.31, 122.74, 120.55, 118.41, 118.29, 116.13, 112.70, 111.10, 63.34, 63.17, 55.62, 55.44, 26.06, 18.18, 14.30, 14.27.

3-[2-(4-甲氧苯基)]乙亚胺基喹啉-4-酮-2-甲酸乙酯 (**3i**): 白色固体, 收率 50%. m.p. 133~135 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.35 (dd, *J*=7.6, 1.0 Hz, 1H), 7.95 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.85~7.78 (m, 2H), 7.59~7.55 (m, 1H), 6.95 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 4.36 (q, *J*=7.2 Hz, 2H), 3.87 (s, 3H), 2.32 (s, 3H), 1.27 (t, *J*=7.2 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 177.70, 163.02, 161.06, 156.59, 146.44, 145.82, 134.64, 129.86, 128.51, 128.39, 127.44, 122.84, 114.20, 63.15, 55.73, 17.61, 14.33.

3-(2-呋喃基)乙亚胺基喹啉-4-酮-2-甲酸乙酯 (**3j**): 白色粘稠状, 收率 39%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.34 (dd, *J*=8.0, 1.0 Hz, 1H), 7.80~7.85 (m, 2H), 7.64~7.56 (m, 2H), 7.16 (d, *J*=4.0 Hz, 1H), 6.58~6.57 (m, 1H), 4.39 (q, *J*=7.2 Hz, 2H), 2.30 (s, 3H), 1.31 (t, *J*=7.2 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 168.82, 160.91, 156.45, 150.37, 146.63, 146.29, 145.60, 134.75, 128.59, 128.52, 127.53, 122.73, 116.30, 112.72, 63.23, 16.82, 14.21.

3-(2-噻吩基)乙亚胺基喹啉-4-酮-2-甲酸乙酯 (**3k**): 白色固体, 收率 60%. m.p. 99~101 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.35 (d, *J*=7.6, 1H), 7.83~7.85 (m, 2H), 7.82~7.79 (m, 3H), 7.13~7.15 (m, 1H), 4.38 (q, *J*=7.2 Hz, 2H), 2.37 (s, 3H), 1.29 (t, *J*=7.2 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 172.91, 160.98, 156.55, 146.32, 145.79, 140.51, 134.75, 132.40, 131.88, 128.55, 128.48, 128.00, 127.49, 122.75, 63.28, 17.94, 14.34.

3-(2-乙基)丙亚胺基喹啉-4-酮-2-甲酸乙酯 (**3l**): 白色粘稠状, 收率 34%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.27~8.29 (m, 1H), 7.76~7.78 (m, 2H), 7.51~7.54 (m, 1H), 4.40 (q, *J*=7.2 Hz, 2H), 2.59 (q, *J*=7.2 Hz, 2H), 4.28 (q, *J*=7.6 Hz, 2H), 1.38 (t, *J*=7.2 Hz, 3H), 1.23 (t, *J*=7.6 Hz, 3H), 1.12 (t, *J*=7.2 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 190.00, 160.91, 156.49, 146.35, 145.52, 134.51, 128.33, 128.25, 127.25, 122.70, 63.06, 29.01, 26.37, 14.26, 10.59, 10.06.

3-环戊亚胺基喹啉-4-酮-2-甲酸乙酯 (**3m**): 白色

粘稠状, 收率 80%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.27~8.29 (m, 1H), 7.75~7.77 (m, 2H), 7.50~7.54 (m, 1H), 4.40 (q, $J=7.2$ Hz, 2H), 2.68 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 2.40 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 1.83~1.91 (m, 4H), 1.38 (t, $J=7.2$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 195.40, 160.34, 155.46, 145.70, 144.58, 133.98, 127.78, 127.70, 126.70, 122.37, 62.58, 33.83, 32.39, 24.32, 24.20, 13.70.

3-环己亚胺基喹啉-4-酮-2-甲酸乙酯(**3n**): 白色粘稠状, 收率 62%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.30~8.32 (m, 1H), 7.78~7.82 (m, 2H), 7.53~7.58 (m, 1H), 4.45(q, $J=7.0$ Hz, 2H), 2.60 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 2.28 (t, $J=6.0$ Hz, 2H), 1.90 (br, 2H), 1.78 (br, 2H), 1.70 (br, 2H), 1.42 (t, $J=7.0$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 178.42, 160.97, 156.40, 134.73, 134.32, 128.29, 128.24, 128.19, 127.10, 124.72, 63.10, 42.00, 35.61, 31.29, 27.03, 26.14, 13.90.

3.2.3 化合物 **4** 的合成(以化合物 **4a** 为例)

依次将化合物 **3a** (0.5 mmol, 0.167 g), 60% NaH (2 mmol, 0.077 g), 无水 THF (5 mL) 加入到 50 mL 的双口圆底烧瓶中, 置于油浴锅中, 加热至回流, 反应约 1 h(用 TLC 监测反应, 展开剂: $V_{\text{乙酸乙酯}}:V_{\text{石油醚}}=1:6$). 待反应完成后, 加入稀盐酸调 pH 至 4 左右, 抽滤, 用少量水洗滤饼即得, 得化合物 **4a** 黄色固体 0.130 g, **3a** 环化生成 **4a** 的收率为 90%. 利用同样的方法可合成化合物 **4b**~**4n**, 收率 42%~90%.

4-羟基-2-苯基-10*H*-吡嗪并[6,1-*b*]喹啉-10-酮(**4a**): 黄色固体, 收率 90%. m.p. 221~224 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.35 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 8.09~8.07 (m, 2H), 7.97~7.96 (m, 2H), 7.63~7.55 (m, 4H), 7.25 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 158.65, 158.40, 152.82, 144.36, 144.00, 135.92, 135.48, 130.74, 129.36, 127.70, 127.36, 126.59, 125.72, 118.81, 102.93. HRMS (ESI^+) calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_2\text{N}_3$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 290.0931, found 290.0923.

(4-溴苯基)-4-羟基-10*H*-吡嗪并[6,1-*b*]喹啉-10-酮(**4b**): 黄色固体, 收率 43%. m.p. >300 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.34 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 8.04 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.97 (d, $J=2.7$ Hz, 2H), 7.77 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.63~7.59 (m, 1H), 7.22 (s, 1H); ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 158.33, 151.90, 144.19, 135.61, 135.05, 132.37, 129.40, 127.87, 126.64, 125.22, 124.37, 118.48, 102.76. HRMS (ESI^+) calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{O}_2\text{N}_3\text{Br}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 368.0036, found 368.0031.

2-(2-氯苯基)-4-羟基-10*H*-吡嗪并[6,1-*b*]喹啉-10-酮(**4c**): 黄色固体, 收率 90%. m.p. >300 °C; ^1H NMR

(400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.25~8.23 (m, 1H), 8.05 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.86~7.76 (m, 1H), 7.59~7.53 (m, 2H), 7.50~7.43 (m, 3H), 5.99 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 166.89, 159.90, 155.18, 150.20, 146.94, 138.52, 133.87, 131.97, 131.52, 130.44, 130.04, 128.22, 127.67, 127.53, 126.94, 125.11, 118.63, 103.43. HRMS (ESI^+) calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{O}_2\text{N}_3\text{Cl}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 324.0542, found 324.0931.

2-(3-氯苯基)-4-羟基-10*H*-吡嗪并[6,1-*b*]喹啉-10-酮(**4d**): 黄色固体, 收率 85%. m.p. 295~296 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.34 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 8.13~8.12 (m, 1H), 8.06~8.01 (m, 1H), 7.99~7.92 (m, 2H), 7.63~7.56 (m, 3H), 7.16 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 160.02, 158.50, 151.78, 144.92, 143.93, 138.37, 135.52, 134.17, 131.26, 130.40, 127.73, 127.42, 126.95, 126.55, 126.05, 125.37, 118.59, 102.67, 99.99. HRMS (ESI^+) calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{O}_2\text{N}_3\text{Cl}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 324.0542, found 324.0527.

2-(4-氯苯基)-4-羟基-10*H*-吡嗪并[6,1-*b*]喹啉-10-酮(**4e**): 黄色固体, 收率 72%. m.p. >300 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.34 (d, $J=6.9$ Hz, 1H), 8.11 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.97 (s, 2H), 7.64~7.58 (m, 3H), 7.18 (s, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 160.21, 154.59, 146.97, 137.67, 135.94, 134.76, 134.17, 133.03, 131.91, 123.47, 123.01, 120.81, 120.57, 115.87, 109.75. HRMS (ESI^+) calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{O}_2\text{N}_3\text{Cl}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 324.05415, found 324.0525.

2-(2-氟苯基)-4-羟基-10*H*-吡嗪并[6,1-*b*]喹啉-10-酮(**4f**): 黄色固体, 收率 46%. m.p. 294~296 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.34 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 8.01~7.94 (m, 2H), 7.86 (dd, $J=7.7, 1.6$ Hz, 1H), 7.65~7.57 (m, 2H), 7.45~7.38 (m, 2H), 6.94 (d, $J=2.1$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 160.34 (d, $J=250.3$ Hz, C—F), 158.44, 158.32, 150.73, 144.29, 143.67, 135.73, 132.65, 132.57, 131.23, 131.20, 127.81, 126.74, 125.44, 125.41, 125.11, 124.72, 124.60, 118.58, 117.06, 116.84, 106.18. HRMS (ESI^+) calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{O}_2\text{N}_3\text{F}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 308.0837, found 308.0822.

2-(4-氟苯基)-4-羟基-10*H*-吡嗪并[6,1-*b*]喹啉-10-酮(**4g**): 黄色固体, 收率 42%. m.p. 303~305 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.35 (d, $J=6.7$ Hz, 1H), 8.17~8.12 (m, 2H), 7.97 (s, 2H), 7.60 (s, 1H), 7.40 (t, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.21 (s, 1H). 因 **4g** 溶解性较差, 无法对其 ^{13}C NMR 进行表征. HRMS (ESI^+) calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{O}_2\text{N}_3\text{F}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 308.0836, found 308.0820.

4-羟基-2-(3-甲氧苯基)-10*H*-吡嗪并[6,1-*b*]喹啉-10-酮(**4h**): 黄色固体, 收率 43%. m.p. 256~258 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.35 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.97 (s, 2H), 7.75~7.54 (m, 3H), 7.48 (t, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.14~7.12 (m, 1H), 3.86 (s, 3H); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 160.11, 158.66, 158.38, 152.75, 144.14, 137.41, 135.55, 130.52, 127.76, 126.62, 125.51, 119.76, 118.77, 116.33, 112.79, 103.20, 55.79. HRMS (ESI⁺) calcd for C₁₈H₁₄O₃N₃ [M+H]⁺ 320.1037, found 320.1029.

4-羟基-2-(4-甲氧苯基)-10*H*-吡嗪并[6,1-*b*]喹啉-10-酮(**4i**): 黄色固体, 收率 42%. m.p. 263~265 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.33 (d, *J*=8.05 Hz, 1H), 8.05 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 7.94 (d, *J*=2.95 Hz, 2H), 7.60~7.57 (m, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.10 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 3.84 (s, 3H); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 161.54, 158.34, 158.04, 152.33, 144.45, 143.70, 135.42, 128.89, 128.03, 127.71, 126.56, 125.77, 118.89, 114.76, 102.69, 55.83. HRMS (ESI⁺) calcd for C₁₈H₁₄O₃N₃ [M+H]⁺ 320.1037, found 320.1028.

2-(呋喃-2-基)-4-羟基-10*H*-吡嗪并[6,1-*b*]喹啉-10-酮(**4j**): 黄色固体, 收率 45%. m.p. 285~287 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.32 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.99~7.97 (m, 3H), 7.64~7.60 (m, 1H), 7.31 (d, *J*=3.3 Hz, 1H), 7.05 (s, 1H), 6.77~6.75 (m, 1H); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 158.18, 149.66, 145.99, 145.46, 144.03, 135.50, 127.71, 126.70, 125.55, 118.81, 112.95, 112.36, 101.35. HRMS (ESI⁺) calcd for C₁₅H₁₀O₃N₃ [M+H]⁺ 280.0724, found 280.0717.

4-羟基-2-(噻吩-2-基)-10*H*-吡嗪并[6,1-*b*]喹啉-10-酮(**4k**): 黄色固体, 收率 48%. m.p. 297~300 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.32 (d, *J*=8.1 Hz, 1H), 7.95 (d, *J*=3.3 Hz, 2H), 7.90 (d, *J*=2.7 Hz, 1H), 7.78 (d, *J*=4.1 Hz, 1H), 7.63~7.57 (m, 1H), 7.23~7.21 (m, 2H); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 158.26, 158.03, 149.14, 144.07, 143.99, 140.11, 135.46, 130.60, 128.97, 128.62, 127.68, 126.69, 125.54, 118.83, 101.95. HRMS (ESI⁺) calcd for C₁₅H₁₀O₂N₃S [M+H]⁺ 296.0496, found 296.0484.

3-甲基-2-乙基-4-羟基-10*H*-吡嗪并[6,1-*b*]喹啉-10-酮(**4l**): 黄色固体, 收率 43%. m.p. 234~236 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.29 (d, *J*=7.9 Hz, 1H), 7.90 (d, *J*=6.3 Hz, 2H), 7.58~7.49 (m, 1H), 2.83 (q, *J*=7.4 Hz, 2H), 2.20 (s, 3H), 1.26 (t, *J*=7.4 Hz, 3H); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 158.41, 158.21, 153.06,

145.34, 142.48, 135.30, 127.62, 125.97, 125.88, 118.50, 114.61, 27.24, 12.12, 10.97. HRMS (ESI⁺) calcd for C₁₄H₁₄O₂N₃ [M+H]⁺ 256.1088, found 256.1082.

12-羟基-2,3-二氢环戊烯[3,4]吡嗪并[6,1-*b*]喹啉-6-酮(**4m**): 黄色固体, 收率 42%. m.p. >300 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.31 (d, *J*=7.92 Hz, 1H), 7.94~7.92 (m, 2H), 7.59~7.54 (m, 1H), 2.98 (t, *J*=7.6 Hz, 2H), 2.89 (t, *J*=7.28 Hz, 2H), 2.10~2.06 (m, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 164.02, 158.45, 151.80, 144.16, 143.69, 135.46, 127.71, 126.20, 125.07, 119.68, 118.05, 32.66, 27.66, 23.04. HRMS (ESI⁺) calcd for C₁₄H₁₂O₂N₃ [M+H]⁺ 254.0931, found 254.0925.

13-羟基-1,2,3,4-四氢-7*H*-喹啉并[3,2-*b*]噻吩-7-酮(**4n**): 黄色固体, 收率 47%. m.p. 286~288 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃+CD₃OD) δ: 8.50 (d, *J*=8.15 Hz, 1H), 7.89 (t, *J*=8.2 Hz, 1H), 7.85 (d, *J*=8.05 Hz, 1H), 7.55 (t, *J*=7.9 Hz, 1H), 3.01 (t, *J*=5.95 Hz, 2H), 2.86 (t, *J*=6.45 Hz, 2H), 1.93~1.88 (m, 4H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃+CD₃OD) δ: 158.15, 156.40, 141.97, 135.57, 128.27, 126.06, 123.41, 117.70, 117.22, 30.49, 22.43, 22.01, 21.38. HRMS (ESI⁺) calcd for C₁₅H₁₄O₂N₃ [M+H]⁺ 268.1088, found 268.1085.

3.2.4 化合物的细胞毒活性测试实验

采用 MTT 法, 以 CPT 和顺铂为阳性对照药, 测试了化合物 **4a**~**6d** 对四种人源肿瘤细胞株(卵巢癌细胞 KOV3, 鼻咽癌细胞 CNE-2, 胃癌细胞 MGC-803, 肺癌细胞 NCI-H460)和人正常肝细胞 LO2 的体外细胞毒活性, 具体实验过程参照文献方法^[25].

3.2.5 紫外与荧光光谱法研究 **4b** 与 **4d** 与 DNA 的相互作用实验

紫外吸收实验中, 以缓冲溶液作为空白对照液, 1 mL 比色皿中加缓冲液和 ct-DNA, DNA 浓度固定为 1.0 μg/mL, 然后向此样品池中逐次加入 **4b** 或 **4d** 溶液, 使得 **4b** 或 **4d** 的浓度分别为 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 μmol/L, 在室温下反应 5 min 后进行紫外扫描. 与 EB 的竞争试验中, 比色皿中 EB 和 DNA 的浓度分别固定为 10 和 1.0 μg/mL, 分别逐次加入 **4b** 或 **4d**, 使得 **4b** 或 **4d** 的浓度分别为 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 μmol/L. 室温反应 5 min 后, 荧光仪扫描测试荧光强度. 荧光扫描测试条件为: 激发波长 527 nm, 激发与发射狭缝宽度均为 5 nm, 扫描速度为 600 nm·min⁻¹.

3.2.6 免疫印迹法研究化合物 **4b** 与 **4d** 对 LO2 细胞的双链 DNA 的断裂作用实验

所用细胞为人正常肝细胞 LO2 细胞, 化合物的浓度设 0, 0.5, 1.0 到 2.5 μmol/L 三个浓度梯度, 以 β-actin

为参照. 具体实验过程参照文献[26]方法.

3.2.7 化合物 **4d** 对肿瘤细胞的细胞周期阻滞作用实验

实验参照文献[27]方法并进行了微小调整. 将 NCI-H460 细胞接种到 6 孔板中, 孵化 24 h. 再根据组别设置加入不同浓度的培养基. 作用 48 h 后收割细胞并离心分离, 70%冰乙醇固定. 加 RNase A 孵化 30 min, 再加入 PI 染色. 用流式细胞仪检测 488 nm 处荧光值.

3.2.8 化合物 **4d** 诱导肿瘤细胞发生凋亡实验

实验主要参照文献[28]方法. 实验操作参照 ArmexinV FITC/P 工细胞凋亡检测试剂盒说明书, 取对数期 NCI-H460 肿瘤细胞消化制成细胞悬液, 加入 1 mL 密度约 4×10^5 个/mL 细胞于六孔细胞培养板内培养过夜, 然后加入化合物 **4d** (0, 1, 10 $\mu\text{mol/L}$) 孵育 24 h. 收集经不同浓度处理后的细胞, PBS 洗涤, 置 0 °C 水浴中, 加 Annexin Binding Buffer 轻轻重悬细胞, 再加入 Armexin V 和 PI, 轻轻混匀细胞, 冰浴中避光放置 10 min 后, 用流式细胞仪进行检测.

辅助材料(Supporting Information) 化合物 **3a~3n** 和 **4a~4n** 的 ^1H NMR, ^{13}C NMR 及 HRMS 谱图. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Hu, Y.; Zhao, T.; Zhang, N.; Zhang, Y.; Cheng, L. *Curr. Drug Metab.* **2019**, *20*, 209.
- [2] Regalado, E. L.; Haidar Ahmad, I. A.; Bennett, R.; D'Atri, V.; Makarov, A. A.; Humphrey, G. R.; Mangion, I.; Guilleme, D. *Acc. Chem. Res.* **2019**, *52*, 1990.
- [3] Surabhi; Singh, B. K. *J. Drug Delivery Ther.* **2018**, *8*, 504.
- [4] Flick, A. C.; Leverett, C. A.; Ding, H. X.; McInturff, E.; Fink, S. J.; Helal, C. J.; O'Donnell, C. J. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*(16), 7340.
- [5] Kim, J.; Kim, H.; Park, S. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 14629.
- [6] Kalaria, P. N.; Karad, S. C.; Raval, D. K. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *158*, 917.
- [7] Meyers, J.; Chessum, N. E. A.; Ali, S.; Mok, N. Y.; Wilding, B.; Pasqua, A. E.; Rowlands, M.; Tucker, M. J.; Evans, L. E.; Rye, C. S.; O'Fee, L.; Le Bihan, Y.-V.; Burke, R.; Carter, M.; Workman, P.; Blagg, J.; Brown, N.; van Montfort, R. L. M.; Jones, K.; Cheeseman, M. D. *ACS Med. Chem. Lett.* **2018**, *9*, 1199.
- [8] Duarte, C. D.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2007**, *7*, 1108.
- [9] Evans, B. E.; Rittle, K. E.; Bock, M. G.; DiPardo, R. M.; Freidinger, R. M.; Whitter, W. L.; Lundell, G. F.; Veber, D. F.; Anderson, P. S.; Chang, R. S. L.; Lotti, V. J.; Cerino, D. J.; Chen, T. B.; Kling, P. J.; Kunkel, K. A.; Springer, J. P.; Hirshfieldt, J. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 2235.
- [10] Patchett, A. A.; Nargund, R. P. *Annu. Rep. Med. Chem.* **2000**, *35*, 289.
- [11] Alagarsamy, V.; Chitra, K.; Saravanan, G.; Solomon, V. R.; Sulthana, M. T.; Narendhar, B. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *151*, 628.
- [12] Hameed, A.; Ali, S. A.; Arshia; Ishtiaq, M.; Khan, K. M.; Al-Rashida, M.; Uroos, M. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2018**, *28*, 281.
- [13] He, D.; Wang, M.; Zhao, S.; Shu, Y.; Zeng, H.; Xiao, C.; Lu, C.; Liu, Y. *Fitoterapia* **2017**, *119*, 136.
- [14] Cao, Q. C.; Wang, H.; Reddy, T. V. K.; Lavanya, G.; Cai, G. X.; Zhou, C. H. *Sci. Sin. Chim.* **2017**, *47*, 844 (in Chinese). (曹泉诚, 王辉, Reddy, T. V. K.; Lavanya, G.; 蔡桂鑫, 周成合, 中国科学: 化学, **2017**, *47*, 844.)
- [15] Du, H.; Fan, Z. J.; Yang, L.; Bao, X. P. *Chin. J. Org. Chem.* **2018**, *38*, 531 (in Chinese). (杜欢, 范治江, 杨岚, 鲍小平, 有机化学, **2018**, *38*, 531.)
- [16] Luo, X.; Zhou, X.; Lin, X.; Qin, X.; Zhang, T.; Wang, J.; Tu, Z.; Yang, B.; Liao, S.; Tian, Y.; Pang, X.; Kaliyaperumal, K.; Li, J. L.; Tao, H.; Liu, Y. *Nat. Prod. Res.* **2017**, *31*, 1958.
- [17] Zhang, H.; Liu, R.; Yang, J.; Li, H.; Zhou, F. *Chem. Nat. Compd.* **2017**, *53*, 802.
- [18] Motegi, M.; Nugroho, A. E.; Hirasawa, Y.; Arai, T.; Hadi, A. H. A.; Morita, H. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 1227.
- [19] Jaballah, M.; Serya, R.; Abouzid, K. *Drug Res.* **2017**, *67*, 138.
- [20] Asif, M. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 2984.
- [21] Lamberth, C. J. *Heterocycl. Chem.* **2017**, *54*, 2974.
- [22] Shemchuk, L. A.; Chernykh, V. P.; Arzumanov, P. S. *Russ. J. Org. Chem.* **2007**, *43*, 719.
- [23] Tian, T.; Xiao, H.; Weng, X. C.; Wang, S. R.; Zhou, X. *Sci. Sin. Chim.* **2012**, *42*, 1700 (in Chinese). (田涸, 肖珩, 翁小成, 王少儒, 周翔, 中国科学: 化学, **2012**, *42*, 1700.)
- [24] Liu, J.; Luo, G. A.; Wang, Y. M.; Sun, H. W. *Acta Pharm. Sin.* **2001**, *36*, 74 (in Chinese). (刘军, 罗国安, 王义明, 孙汉文, 药学报, **2001**, *36*, 74.)
- [25] Wang, Z. B.; Liu, Q. Q.; Zhang, W.; Pan, C. X.; Su, G. F. *Chin. J. Org. Chem.* **2019**, *39*, 1962 (in Chinese). (王增博, 田成, 刘晴晴, 张玮, 潘成学, 苏桂发, 有机化学, **2019**, *39*, 1962.)
- [26] Yu, Y. K.; Zhu, X. Q.; Yang, J. J. *Toxicol.* **2006**, *20*, 408 (in Chinese). (余艳柯, 朱心强, 杨军, 毒理学杂志, **2006**, *20*, 408.)
- [27] Zhang, L.; Liu, L.; Zheng, C. Y.; Wang, Y.; Wang, J.; Yao, Q. Z. *Chin. J. Org. Chem.* **2017**, *37*, 1523 (in Chinese). (张磊, 刘来, 郑诚月, 王杨, 王京, 姚其正, 有机化学, **2017**, *37*, 1523.)
- [28] Li, Y. K.; Liu, P.; Zhang, L. J.; Zhu, J. H.; Wan, C. P.; Mao, Z. W. *Chin. J. Org. Chem.* **2018**, *38*, 949 (in Chinese). (黎勇坤, 刘蓓, 张丽君, 朱加洪, 万春平, 毛泽伟, 有机化学, **2018**, *38*, 949.)

(Lu, Y.)