光学纯脱氢枞胺杂环衍生物与 DNA 作用及初步细胞毒活性

屠双燕^a 徐武双^a 齐 芬^d 何卫江^{*,d} 费宝丽^{*,a,b,c}^(a) 南京林业大学 江苏省生物质绿色燃料与化学品重点实验室 南京 210037^(b) 广西师范大学 省部共建药用资源化学与药物分子工程国家重点实验室 广西桂林 541006^(c) 南京林业大学 林业资源高效加工利用协同创新中心 南京 210037^(d) 南京大学化学化工学院 南京 210037

摘要 根据活性叠加原理,在天然产物松香的改性产品光学纯脱氢枞胺(**1**)的 B 环和 C 环中引入不同的芳香杂环,合成了三个光学纯脱氢枞胺杂环衍生物,乙酰脱氢枞胺-6,7-(3-巯基)-1,2,4-三嗪(**5**)、乙酰脱氢枞胺-6,7-吡啶(**7**)和 12-(2-氨基噻唑)乙酰脱氢枞胺(**10**)。荧光光谱和圆二色谱分析证明,化合物 **5**、**7** 和 **10** 均能够与 DNA 发生作用,且作用强度为 **5**>**10**>**7**。凝胶电泳实验结果表明,**5**、**7** 和 **10** 都能够对 pBR 322 质粒 DNA 进行单链切割且 **5** 的切割能力最强。另外,脱氢枞胺及化合物 **5**、**7** 和 **10** 与氯化铜的复配物(32 μmol/L)对人乳腺癌肿瘤细胞 MCF-7 的增殖抑制率,分别为 86.0% (**1**), 86.7% (**5**), 34.4% (**7**)和 0 (**10**)。

关键词 脱氢枞胺; 杂环化合物; DNA; 生物活性

Interaction of Optically Pure Dehydroabietylamine Heterocyclic Derivatives with DNA and Preliminary Cytotoxic Activity

Tu, Shuangyan^a Xu, Wushuang^a Qi, Fen^d He, Weijiang^{*,d} Fei, Baoli^{*,a,b,c}^(a) Jiangsu Key Laboratory of Biomass-based Green Fuels and Chemicals, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037^(b) State Key Laboratory for Chemistry and Molecular Engineering of Medicinal Resources, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541006^(c) Collaborative Innovation Center for Efficient Processing and Utilization of Forestry Resources, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037^(d) College of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210037

Abstract Three optically pure dehydroabietylamine derivatives, acetyldehydroabietylamine-6,7-(3-mercapto)-1,2,4-triazine (**5**), acetyldehydroabietylamine-6,7-indole (**7**) and 12-(2-aminothiazole)-acetyldehydroabietylamine (**10**), were obtained by introducing different aromatic heterocycles into the B and C rings of optically pure dehydroabietylamine, which is derived from natural product of rosin, according to superposition principle of activity groups. The results of fluorescence spectroscopy and circular dichroism studies indicate that **5**, **7** and **10** could interact with DNA, and the binding ability followed the order **5**>**10**>**7**. Gel electrophoresis experiments suggest that **5**, **7** and **10** could scissor pBR 322 plasmid DNA into single strands and **5** was the strongest cutter. In addition, the inhibitory rates of dehydroabietylamine and its derivatives **5**, **7** and **10** combined with copper chloride (32 μmol·L⁻¹) on the proliferation of human breast cancer cells MCF-7 were 86.0% (**1**), 86.7% (**5**), 34.4% (**7**) and 0 (**10**), respectively.

Keywords dehydroabietylamine; heterocyclic compounds; DNA; biological activity

脱氢枞胺是天然产物松香的重要改性产品之一^[1], 是含有三个手性碳原子的菲结构^[2], 其衍生物具有抗

菌、抗炎、抗病毒和抗肿瘤等生物活性^[3~6]。对脱氢枞胺进行改性并拓展其应用领域, 一直是林产化学与工业

* Corresponding authors. E-mail: hgfb1@njfu.edu.cn; hewej69@nju.edu.cn

Received April 2, 2019; revised June 28, 2019; published online July 17, 2019.

Project supported by the Major Projects of Natural Science Research in Jiangsu Higher Education Institutions (No. 18KJA150006), and State Key Laboratory for Chemistry and Molecular Engineering of Medicinal Resources, Guangxi Normal University (No. CMEMR2018-B13).

江苏省高等学校自然科学研究重大项目(No. 18KJA150006)、广西师范大学省部共建药用资源化学与药物分子工程国家重点实验室(No. CMEMR2018-B13)资助项目。

的前沿研究课题. 含 N 杂环化合物在药物的研究领域举足轻重^[7], 例如三嗪类化合物具有抗结核、抗病毒、抗菌和抗炎等活性^[8]; 吡啶作为自然界中广泛分布的杂环之一, 具有广泛的药理功能^[9]. 2-氨基噻唑及其各种衍生物经常被用来合成各种生物活性分子的前体^[10]. 因此, 根据活性叠加原理, 将脱氢枞胺和上述含氮杂环进行拼接, 可能会获得生物活性良好的化合物.

DNA 是抗肿瘤药物的重要作用靶点之一. 抗肿瘤药物通过与肿瘤细胞的 DNA 作用, 抑制 DNA 复制, 引起 DNA 损伤, 进而阻断细胞分裂并最终导致细胞死亡. 以顺铂为代表的靶向 DNA 的铂类金属基抗肿瘤药物在临床上获得了极大的成功^[11]. 相比于金属配合物与 DNA 作用的机理研究取得的巨大进步, 作为抗肿瘤药物重要组成部分的有机小分子与 DNA 相互作用的研究还没有得到足够的重视, 需要大力地研究以明确其抗肿瘤机理.

据统计, 1940~2014 间批准上市的抗肿瘤药物, 质量分数约为 37% 的抗肿瘤药物来自于天然产物及其衍生物^[12]. 以文卡生物碱、紫杉碱、鬼臼毒素和喜树碱为

代表的抗肿瘤药物, 使得植物成为抗肿瘤制剂的重要来源.

综上所述, 本文对脱氢枞胺的环 B 与 C 进行了改性, 设计、合成了如 Scheme 1 所示的 3 个光学纯含氮脱氢枞基杂环化合物, 乙酰脱氢枞胺-6,7-(3-巯基)-1,2,4-三嗪(**5**)、乙酰脱氢枞胺-6,7-吡啶(**7**)和 12-(2-氨基噻唑)-乙酰脱氢枞胺(**10**). 并采用荧光光谱、圆二色光谱及 DNA 凝胶电泳实验, 探讨了标题脱氢枞胺杂环衍生物 **5**、**7**、**10** 与 DNA 作用的模式. 通过噻唑蓝(MTT)法测试了它们及其协同氯化铜对 MCF-7 肿瘤细胞的增殖抑制作用. 本研究将为新型脱氢枞胺衍生物的设计、合成及生物活性研究提供理论参考和实验数据.

1 结果与讨论

1.1 化合物 **5**、**7**、**10** 的合成

以提纯后的光学纯脱氢枞胺(**1**)为母体, 经过乙酰化、氧化、溴代得到乙酰脱氢枞胺-6-溴-7-酮(**4**), 然后与硫代氨基脲在 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)中反应得到目标产物乙酰脱氢枞胺-6,7-(3-巯基)-1,2,4-三嗪(**5**). 中间

图式 1 目标化合物的合成路线
Scheme 1 Synthesis route of target compounds

体乙酰脱氢枞胺-7-酮(**3**)与苯胍盐酸盐在乙醇溶液中经催化、闭环可得到乙酰脱氢枞胺-6,7-吡啶(**7**)。乙酰脱氢枞胺(**2**)经催化、溴代、闭环可得到 12-(2-氨基噻唑)-乙酰脱氢枞胺(**10**)。最后经柱层析提纯,得到的产物产率适中。化合物 **5**, **7** 和 **10** 均保留了 **1** 的手性中心。

1.2 化合物 5、6、7、10 与 DNA 作用的荧光光谱

溴化乙锭(EB)是具有共轭芳香环的平面荧光分子,在溶液中会发生荧光猝灭。DNA 本身没有荧光,当溶液中形成 DNA-EB 复合物时,EB 由于插入了 DNA 碱基对之间,受到疏水性保护从而使其荧光增强。因此,EB 常作为研究小分子与 DNA 相互作用模式的荧光探针。在 EB-DNA-小分子化合物体系中,如果小分子也能与 DNA 发生类似于 EB 的插入作用,EB 与 DNA 的结合位点会被小分子占据,就有 EB 分子游离出来,体系的荧光强度减弱。化合物 **5**、**6**、**7**、**10** 对鲑鱼精 DNA-EB 体系荧光光谱的影响如图 1 所示。DNA-EB 体系的荧光强

度随着化合物浓度的增加而减弱,表明化合物与 DNA 发生了作用^[13]。根据 Stern-Volmer 方程 $F_0/F = 1 + K_{SV}C_Q$, 可以计算出化合物对 DNA-EB 体系的荧光猝灭常数 K_{SV} ; 以 F_0/F 对 C_Q 作图,其线性拟合斜率即为 K_{SV} 。化合物 **5**、**6**、**7**、**10** 的 K_{SV} 值分别为 1.32×10^5 、 9.68×10^4 、 1.08×10^5 、 $1.25 \times 10^5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 这些数值提示作用模式可能是插入作用^[14], 且作用强度依次是 **5** > **10** > **7** > **6**。

1.3 化合物 5、6、7、10 与 DNA 作用的 CD 光谱

DNA 是手性生物大分子,其 CD 光谱在 278 nm 左右的特征正峰是由于 DNA 碱基对的 π - π 堆积作用产生的,在 249 nm 左右的特征负峰是由 DNA 的右手螺旋结构引起的^[15]。CD 光谱是探测 DNA 构象变化的有效手段,小分子化合物与 DNA 发生作用后,会影响 DNA 的构象,从而使得 DNA 的 CD 光谱发生变化。一般来说,静电和沟槽作用对 DNA 正负吸收峰影响较小或没有影响,而插入作用对正负吸收峰影响较大^[16], CD 光谱的变化

图 1 化合物对鲑鱼精 DNA-EB 体系的荧光光谱的影响

Figure 1 Effects of compounds on fluorescence spectra of salmon sperm DNA-EB system
 $c_{\text{DNA}} = 1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_Q = 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

也可以作为判断化合物与 DNA 结合模式的依据之一。在 $c_{\text{DNA}}=0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 结合比率 $r=c_{\text{化合物}}/c_{\text{DNA}}=0.12$ 的条件下, 化合物 **5**、**6**、**7**、**10** 对鲑鱼精 DNA 溶液 CD 光谱的影响如图 2 所示。化合物 **5**、**6**、**7**、**10** 均能使 DNA 溶液在 278 nm 处的正峰强度降低, 且降低幅度 $5>10>7>6$, 其中 **5** 和 **10** 分别使 DNA 的正峰发生了 2 和 1 nm 的红移。**7**、**10** 使负峰的强度降低且变化幅度 $10>7$; **5**、**6** 使负峰的强度增强且变化幅度 $5>6$ 。并且 **5** 和 **7** 分别使负峰发生了 1 nm 的蓝移和红移。这些数据表明 **5**、**6**、**7**、**10** 都能够使 DNA 的构型发生一定的变化^[16]。

图 2 化合物对鲑鱼精 DNA 溶液 CD 光谱的影响

Figure 2 Effects of compounds on CD spectra of salmon Sperm solution

1.4 凝胶电泳实验研究化合物 **5**、**6**、**7**、**10** 切割质粒 pBR 322 DNA 的作用

pBR 322 质粒 DNA 通常有三种构型: 闭环超螺旋型(Form I), 单链开环缺刻型(Form II), 双链断裂线型(Form III)。不同构型的 DNA 分子量与空间结构紧密程度不同, 导致它们在凝胶电泳中的迁移速率 $\text{Form I}>\text{Form III}>\text{Form II}$ ^[17]。图 3 为不同浓度的化合物 **5**、**6**、**7**、**10** 切割 pBR 322 DNA 的凝胶电泳图。

图 3 化合物切割 pBR 322 质粒 DNA 的凝胶电泳图谱

Figure 3 Gel electrophoresis patterns of compounds cleaved pBR 322 plasmid DNA

Lane 1: DNA; Lane 2: DNA+50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ compounds **5**, **6**, **7** and **10**; Lane 3: DNA+100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ compounds **5**, **6**, **7** and **10**; Lane 4: DNA+150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ compounds **5**, **6**, **7** and **10**

从图 3 可以看出, 化合物 **5**、**7**、**10** 都能对 DNA 进

行切割, 特别是化合物 **5** 在高浓度时对 DNA 的切割活性显著增强, 缺刻型的 Form II DNA 浓度不断增加, 超螺旋型的 Form I DNA 持续减少^[18]。对于化合物 **6** 而言, 即使增加浓度, 也不会产生任何 Form II 或 Form III DNA。因此, 化合物 **6** 不具备切割 DNA 的活性。凝胶电泳实验结果表明, 化合物 **5** 对 pBR 322 DNA 的切割活性最高, 化合物 **7** 与 **10** 的切割活性相似, 而化合物 **6** 则没有切割活性。这一结果和荧光光谱的结果一致。另外, 芳香杂环的结构及存在与否, 对脱氢枞基衍生物切割 pBR 322 质粒 DNA 的活性影响很大。

1.5 初步的细胞毒活性

采用噻唑蓝(MTT)法^[19]测定了化合物 **5**、**7**、**10** 及其与 CuCl_2 按 1:1 的物质的量比进行研磨得到的复合物对人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖的抑制作用(24 h), 以临床用药顺铂 ($\text{IC}_{50}=6.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)为阳性对照。结果表明, 化合物 **5**、**7** 和 **10** 没有细胞毒活性; 在浓度为 32 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 化合物 **1** 和 CuCl_2 对 MCF-7 细胞增殖的抑制率分别为 86.0%和 5.9%, 化合物 **5** 和 **7** 与铜形成的复合物对 MCF-7 细胞的抑制率分别为 86.7%和 34.4%, 而化合物 **10** 的铜复合物则没有对 MCF-7 细胞的增殖产生抑制作用。另外, 化合物 **1** 和 **5** 的铜复合物对 MCF-7 细胞的半致死量 IC_{50} 值分别为 3.7 和 13.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。与氯化铜进行复配, 显著地提高了化合物 **1**、**5**、**7** 的细胞毒活性, 说明金属铜离子能够加强此类化合物杀伤肿瘤细胞的能力, 二者发生协同作用的原因, 很有可能是它们发生了配位作用, 这非常值得进行后续的深入研究。

2 结论

荧光光谱和圆二色光谱研究表明, 依据活性叠加原理设计、制备的 3 个新型的脱氢枞胺芳香杂环衍生物 **5**、**7** 和 **10** 与鲑鱼精 DNA 发生了作用, 且作用能力 $5>10>7$ 。凝胶电泳实验证明化合物 **5**、**7**、**10** 能够单链切割 DNA, 切割能力与荧光光谱研究结果相吻合。MTT 实验结果表明, 与氯化铜的协同作用大大增强了化合物 **5** 和 **7** 对 MCF-7 细胞的增殖抑制作用; 化合物 **5** 的铜复合物对 MCF-7 细胞的细胞毒活性远高于 **7** 的铜复合物。本研究表明在脱氢枞胺 B 环和 C 环上引入芳香杂环, 可以获得具有良好生物活性的脱氢枞胺衍生物, 并且化合物的生物活性与改性后的结构关系密切。另外, 与铜离子复配能够显著改善化合物的细胞毒活性。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

Avance DRX-600 核磁共振仪; Ls-55 荧光光谱仪; 6310 Ionn Trap LC/MS; Jasco J-810 型圆二色谱仪; Ele-

mentar Vario Micro 型元素分析仪; DYY2-C-核酸电泳仪; PCR 梯度仪; Bio-rad Universal Hood II S.N.76S 凝胶成像仪; 恒温培养振荡器; Versa max 型酶标仪; Thermo-3111 二氧化碳培养箱; AllegraX-15R 离心机; Olympus 倒置荧光显微镜; Esco 洁净工作台.

歧化松香胺(广西桂林松泉林化工业有限公司, 含脱氢枞胺 70%), 经纯化后使用^[20], $[\alpha]_D^{20} + 45$ (*c* 0.10, CHCl₃); 乙酸酐(上海阿拉丁试剂有限公司, 分析纯); 氨基硫脲, 硫脲, 苯肼盐酸盐(国药集团化学试剂有限公司); pBR 322 质粒 DNA、鲑鱼精 DNA(南京都莱生物科技有限公司), 其余试剂均为市售分析纯.

3.2 实验方法

3.2.1 乙酰脱氢枞胺(2)的合成

在 100 mL 反应瓶中, 将 **1** (14.50 g, 50 mmol) 溶解在乙酸(30 mL)中, 将乙酸酐(28 mL, 296 mmol)加入, 在室温下搅拌 3 h 后, 用氯仿(100 mL×3)萃取. 萃取液用水洗至中性后, 用无水硫酸钠干燥, 滤液经减压蒸馏后得到粘稠状的 **2** 粗品, 经过硅胶柱层析纯化得 14.22 g 淡黄色油状物, 产率 87%. $[\alpha]_D^{20} + 31$ (*c* 0.50, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 1.03 (s, 3H), 1.31~1.33 (m, 9H), 1.48~1.54 (m, 3H), 1.74~1.87 (m, 3H), 1.99 (t, *J*=7.8 Hz, 1H), 2.06 (s, 3H), 2.13 (d, *J*=2.4 Hz, 1H), 2.38 (d, *J*=12.6 Hz, 1H), 2.90~2.99 (m, 3H), 3.17 (q, 1H), 3.34 (q, 1H), 6.14 (s, 1H), 6.99 (s, 1H), 7.10 (d, *J*=7.8 Hz, 1H), 7.26~7.27 (d, *J*=8.4 Hz, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ : 18.7, 18.8, 19.0, 21.0, 23.4, 24.0, 25.3, 30.2, 33.5, 37.4, 37.5, 38.4, 45.2, 49.9, 123.8, 124.2, 126.9, 134.8, 145.6, 147.2, 170.7; MS (70 eV) *m/z*: 328.3 [M+H]⁺. Anal. calcd for C₂₂H₃₃NO: C 80.52, H 10.05, N 4.21; found C 80.68, H 10.16, N 4.28.

3.2.2 乙酰脱氢枞胺-7-酮(3)的合成

在 100 mL 反应瓶中, 将 **2** 溶解在(23.90 g, 70 mmol)乙酸(30 mL)中, 将 15 mL 三氧化铬溶液(12.00 g, 120 mmol)加入, 在 0 °C 条件下搅拌 4 h 后, 用氯仿(100 mL×3)萃取. 萃取液用水洗至中性后, 用无水硫酸钠干燥, 滤液减压蒸馏后得到粘稠状的 **3** 粗品. 经过硅胶柱层析纯化得 14.67 g 黄色油状产物, 产率 86%. $[\alpha]_D^{20} + 51$ (*c* 0.10, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 1.03 (s, 3H), 1.32 (t, *J*=7.2 Hz, 9H), 1.48~1.55 (m, 3H), 1.75 (d, *J*=13.8 Hz, 1H), 1.85 (t, *J*=13.2 Hz, 1H), 2.04 (s, 3H), 2.11 (s, 1H), 2.38 (d, *J*=12.6 Hz, 1H), 2.90~2.95 (m, 2H), 3.14 (q, 1H), 3.34 (q, 1H), 6.43~6.45 (t, *J*=5.4 Hz, 1H), 6.99 (s, 1H), 7.09 (d, *J*=7.8 Hz, 1H), 7.27 (d, *J*=8.4 Hz, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ : 19.1, 21.0, 23.3, 24.1, 25.4, 33.5, 36.2, 37.4, 37.5, 38.4, 45.2, 50.0, 123.9,

124.2, 126.9, 134.9, 145.6, 147.3, 170.6; IR (KBr) ν : 3373, 3073, 2937, 1721, 1685, 1625, 1562, 1436, 1238 cm⁻¹; MS (70 eV) *m/z*: 342.19 [M+H]⁺. Anal. calcd for C₂₂H₃₁NO₂: C 77.42, H 9.38, N 4.11; found C 77.54, H 9.46, N 4.02.

3.2.3 乙酰脱氢枞胺-6-溴-7-酮(4)的合成

方法一: 在 100 mL 反应瓶中, 将 **3** (1.67 g, 5 mmol) 溶解在乙醇(30 mL)中, 再加入溴化铜固体(2.78g, 12.5 mmol), 所得混合物在搅拌条件下回流 12 h. 然后, 将反应液倒入水(200 mL)中, 用乙酸乙酯(100 mL×3)萃取. 有机相用无水硫酸钠干燥后, 经减压蒸馏得到红棕色膏状的 **4**. 经过硅胶柱层析纯化得 0.97 g 黄色油状产物, 产率 46%.

方法二: 在 100 mL 反应瓶中, 将 **3** (1.67 g, 5 mmol) 溶解在乙酸(40 mL)中, 加入液溴(1.00 g, 6.25 mmol), 所得混合物在室温下搅拌过夜. 反应结束后, 将反应液倒入饱和碳酸氢钠水溶液中, 用乙酸乙酯(100 mL×3)萃取. 有机相用无水硫酸钠干燥后, 经减压蒸馏得到红棕色膏状的 **4** 粗品. 经过硅胶柱层析纯化得 1.53 g 黄色油状产物, 产率 73%. $[\alpha]_D^{20} + 64$ (*c* 0.10, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 1.15 (s, 3H), 1.21~1.25 (m, 9H), 1.41 (s, 2H), 1.49 (d, *J*=5.7 Hz, 1H), 1.52 (d, *J*=5.7 Hz, 1H), 1.67~1.72 (m, 3H), 1.96 (s, 3H), 2.91~2.96 (m, 1H), 3.23~3.27 (m, 2H), 3.54 (q, 1H), 4.72 (d, *J*=8.7 Hz, 1H), 6.15 (s, 1H), 7.21 (d, *J*=8.1 Hz, 1H), 7.43 (m, 1H), 7.63 (d, *J*=2 Hz, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ : 19.4, 23.0, 23.5, 23.7, 25.0, 33.5, 36.2, 36.4, 38.6, 39.2, 41.8, 51.4, 60.3, 121.8, 125.8, 131.3, 147.0, 147.7, 170.9, 194.4; IR (KBr) ν : 3421, 2960, 1686, 1652, 1558, 1388 cm⁻¹; MS (70 eV) *m/z*: 420.08 [M]⁺. Anal. calcd for C₂₂H₃₀BrNO₂: C 62.86, H 7.38, N 3.33; found C 62.77, H 7.21, N 3.37.

3.2.4 乙酰脱氢枞胺-6,7-(3-巯基)-1,2,4-三嗪(5)的合成

在 50 mL 反应瓶中, 将 **4** (2.10 g, 5 mmol) 溶解在 DMF (20 mL) 中, 加入硫代氨基脲固体(0.55 g, 6 mmol), 在 60 °C 下搅拌 4 h 后, 用乙酸乙酯(100 mL×3)萃取. 有机相用无水硫酸钠干燥后, 经减压蒸馏得到黄色膏状的 **5** 粗品. 经过硅胶柱层析纯化得 1.12 g 黄色固体产物, 产率 58%. m.p. 183.1~184.2 °C; $[\alpha]_D^{20} - 181$ (*c* 0.10, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 1.11 (d, *J*=5.4 Hz, 6H), 1.25~1.28 (m, 6H), 1.42 (d, *J*=18.6 Hz, 1H), 1.49 (d, *J*=2.8 Hz, 1H), 1.54~1.58 (m, 1H), 1.69 (q, 1H), 1.75~1.77 (m, 2H), 1.95 (s, 3H), 2.51 (q, 1H), 3.16 (m, 1H), 3.32 (m, 1H), 5.64 (s, 1H), 6.66 (s, 1H), 7.23~7.28 (m, 3H), 7.45 (s, 1H), 7.76 (d, *J*=4 Hz, 1H), 9.37 (s, 1H);

^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ : 18.6, 23.3, 23.5, 24.1, 24.5, 33.7, 36.4, 36.8, 37.7, 42.3, 45.8, 49.6, 122.8, 123.0, 128.4, 129.9, 146.6, 148.9, 149.8, 170.7; IR (KBr) ν : 3427, 3278, 2957, 2925, 2867, 1649, 1685, 1572, 1494, 1421, 1287 cm^{-1} ; MS (70 eV) m/z : 413.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 847.2 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_5$: C 66.83, H 8.00, N 13.56; found C 66.69, H 7.91, N 13.37.

3.2.5 乙酰脱氢枞胺-(5,6-烯)-7-酮(6)的合成

在 50 mL 反应瓶中, 将 **4** (2.10 g, 5 mmol) 溶解在乙醇 (20 mL) 中, 然后加入氢氧化钾溶液, 控制 $\text{pH}=10$, 在 60 $^\circ\text{C}$ 条件下搅拌 4 h 后, 用氯仿 (100 mL $\times$ 3) 萃取. 有机相用无水硫酸钠干燥后, 经减压蒸馏得到黄色膏状的 **6** 粗品. 经过硅胶柱层析纯化得 1.42 g 黄色油状产物, 产率 84%. $[\alpha]_D^{20} +52$ (c 0.10, CHCl_3); ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ : 1.28~1.30 (m, 6H), 1.38 (s, 3H), 1.54 (s, 3H), 1.62~1.65 (m, 4H), 1.84~1.87 (m, 1H), 1.95 (s, 3H), 2.51 (d, $J=16.2$ Hz, 1H); 2.95~2.99 (m, 1H), 3.34 (q, 1H), 3.68 (q, 1H), 5.67 (s, 1H), 6.29 (s, 1H), 7.41 (s, 2H), 7.98 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ : 18.7, 23.4, 24.0, 24.1, 25.3, 33.4, 36.1, 37.3, 38.3, 45.2, 49.9, 123.8, 124.1, 126.9, 132.6, 134.8, 145.6, 147.2, 153.5, 170.4, 199.2; IR (KBr) ν : 3360, 2960, 1632, 1607, 1545, 1492, 1276 cm^{-1} ; MS (70 eV) m/z : 340.22 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 357.00 $(\text{M}+\text{NH}_4)^+$, 362.28 $(\text{M}+\text{Na})^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{NO}_2$: C 77.65, H 8.82, N 4.12; found C 77.75, H 8.89, N 4.05.

3.2.6 乙酰脱氢枞胺-6,7-吡啶(7)的合成

在 100 mL 反应瓶中, 将 **3** (1.75 g, 5 mmol) 溶解在乙醇 (30 mL) 中, 然后分别加入苯胍盐酸盐 (1.44 g, 10 mmol) 和盐酸, 控制 $\text{pH}=1\sim 2$, 在 80 $^\circ\text{C}$ 条件下搅拌 6 h 后, 用氯仿 (100 mL $\times$ 3) 萃取. 有机相用无水硫酸钠干燥后, 经减压蒸馏得到黄色油状的 **7** 粗品. 经过硅胶柱层析纯化得 1.12 g 黄色固体产物, 产率 53.7%. m.p. 169.1~170.2 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{20} +21$ (c 0.10, CHCl_3); ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ : 1.03 (s, 3H), 1.28 (t, $J=7.2$ Hz, 1H), 1.34 (q, 6H), 1.39 (d, $J=3.2$ Hz, 1H), 1.50 (s, 3H), 1.69~1.83 (m, 4H), 2.00 (s, 3H), 2.32 (d, $J=13.3$ Hz, 1H), 2.98 (m, 2H), 3.35 (d, $J=18.8$ Hz, 1H), 5.76 (s, 1H), 7.18 (m, 3H), 7.30 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 7.35 (d, $J=3.6$ Hz, 1H), 7.47 (m, 1H), 8.01 (m, 1H), 8.66 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ : 17.7, 19.9, 21.3, 23.5, 24.1, 33.8, 36.5, 37.2, 37.4, 40.0, 48.8, 51.2, 111.4, 119.0, 119.7, 121.2, 122.8, 123.6, 126.1, 126.9, 128.4, 129.2, 135.0, 137.2, 146.7, 146.8, 170.7; IR (KBr) ν : 3289, 2959, 2926, 2867, 1656, 1550, 1509, 1440, 1371 cm^{-1} ; MS (70 eV) m/z : 415.55 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 432.00

$(\text{M}+\text{NH}_4)^+$, 437.02 $(\text{M}+\text{Na})^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}$: C 80.96, H 8.43, N 6.75; found C 81.01, H 8.51, N 6.71.

3.2.7 12-乙酰脱氢枞胺(8)的合成

在 100 mL 反应瓶中, 将无水氯化铝 (3.60 g, 9 mmol) 和乙酰氯 (0.70 g, 9 mmol) 加入到二氯甲烷 (30 mL) 中, 室温搅拌 1 h 后, 向其中滴加含 **2** (1.96 g, 6 mmol) 的二氯甲烷 (15 mL) 溶液, 在室温继续反应 8 h 后, 用氯仿 (100 mL $\times$ 3) 萃取. 有机相用无水硫酸钠干燥后, 经减压蒸馏得到粘稠状的 **8** 粗品. 经过硅胶柱层析纯化得 2.26 g 淡黄色固体物, 产率 68%. m.p. 190.1~193.3 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{20} +38$ (c 0.10, CHCl_3); ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ : 0.96 (s, 3H), 1.21~1.24 (m, 9H), 1.28 (q, 1H), 1.43 (q, 4H), 1.71~1.81 (m, 4H), 1.98 (s, 3H), 2.56 (s, 3H), 2.82~2.87 (m, 1H), 2.96 (q, 1H), 3.07 (q, 1H), 3.30 (q, 1H), 3.46~3.48 (m, 1H), 5.52 (s, 1H), 7.07 (s, 1H), 7.40 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ : 18.7, 18.8, 23.4, 24.1, 24.2, 25.2, 28.7, 30.1, 30.5, 36.1, 37.3, 37.4, 38.2, 45.0, 49.8, 124.2, 127.0, 136.3, 138.8, 144.8, 146.8, 170.2, 203.4; IR (KBr) ν : 3299, 2966, 2922, 2864, 1683, 1641, 1555, 1460, 1371 cm^{-1} ; MS (70 eV) m/z : 370.19 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{NO}_2$: C 77.84, H 9.73, N 3.78; found C 77.79, H 9.69, N 3.84.

3.2.8 12-(α -溴代)-乙酰基乙酰脱氢枞胺(9)的合成

在 100 mL 反应瓶中, 将 **8** (1.85 g, 5 mmol) 溶解在乙酸 (40 mL) 中, 然后加入液溴 (1.00 g, 6.25 mmol), 在室温条件下搅拌 6 h 后, 将反应液倒入饱和碳酸氢钠水溶液中, 用氯仿 (100 mL $\times$ 3) 萃取. 有机相用无水硫酸钠干燥后, 经减压蒸馏得到红棕色膏状的 **9** 粗品. 经过硅胶柱层析纯化得 1.42 g 淡黄色油状物, 产率 63.1%. $[\alpha]_D^{20} +33$ (c 0.10, CHCl_3); ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ : 0.95 (s, 3H), 1.20~1.24 (m, 9H), 1.25~1.28 (m, 2H), 1.39~1.43 (m, 3H), 1.71~1.78 (m, 4H), 1.99 (s, 3H), 2.85~2.87 (m, 1H), 2.95~2.97 (m, 1H), 3.02~3.06 (m, 1H), 3.29~3.38 (m, 2H), 4.40 (d, $J=3.4$ Hz, 2H), 5.59 (s, 1H), 7.10 (s, 1H), 7.39 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ : 18.7, 18.8, 22.8, 23.0, 24.0, 25.2, 29.6, 30.9, 32.3, 34.4, 36.1, 37.4, 38.1, 45.0, 50.3, 120.3, 127.9, 128.4, 134.5, 143.9, 149.1, 171.4; IR (KBr) ν : 3288, 2966, 2962, 2926, 2867, 1695, 1657, 1549, 1452, 1377 cm^{-1} ; MS (70 eV) m/z (%): 450.68 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{BrNO}_2$: C 64.29, H 7.81, N 3.12; found C 64.31, H 7.86, N 3.09.

3.2.9 12-(2-氨基噻唑)-乙酰脱氢枞胺(10)的合成

在 50 mL 反应瓶中, 将 **9** (2.25 g, 5 mmol) 溶解在 DMF (20 mL) 中, 然后加入硫脲 (0.46 g, 6 mmol), 在

75 °C条件下搅拌4 h后,用乙酸乙酯(100 mL×3)萃取。有机相用无水硫酸钠干燥后,经减压蒸馏得到黄色膏状的**10**粗品。经过硅胶柱层析纯化得1.03 g米白色固体产物,产率48.3%。m.p. 122.5~123.9 °C; $[\alpha]_D^{20} +93$ (c 0.10, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 0.95 (s, 3H), 1.18 (q, 6H), 1.23 (s, 3H), 1.26~1.29 (m, 2H), 1.40~1.44 (m, 3H), 1.64~1.67 (m, 1H), 1.73~1.79 (m, 2H), 1.93 (s, 1H), 1.99 (s, 3H); 2.84~2.88 (m, 1H), 2.96 (q, 1H), 3.09 (q, 1H), 3.24~3.29 (m, 2H), 5.28 (s, 2H), 5.51 (s, 1H), 6.34 (s, 1H), 7.02 (s, 1H), 7.23 (s, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ : 18.7, 18.9, 21.0, 23.5, 24.1, 24.2, 25.1, 28.8, 29.9, 36.1, 37.3, 37.4, 38.3, 45.1, 49.8, 104.7, 125.7, 126.0, 131.6, 135.2, 144.1, 146.8, 166.6, 170.2; IR (KBr) ν : 3301, 3184, 2960, 2925, 2866, 1650, 1548, 1517, 1543, 1375 cm⁻¹; MS (70 eV) m/z : 426.29 [M+H]⁺. Anal. calcd for C₂₅H₃₅N₃OS: C 70.42, H 8.45, N 9.86; found C 70.48, H 8.51, N 9.79.

3.3 化合物和DNA作用的实验方法

3.3.1 荧光光谱

室温条件下,向样品池中加入3 mL的鲑鱼精DNA-EB(溴化乙锭)混合溶液($c_{\text{DNA}}/c_{\text{EB}}=10:1$)后,依次向样品池中加入等体积的化合物样品,使得化合物和DNA的浓度比值梯度地增加,静置5 min后,在520 nm的激发波长下测定其荧光发射谱^[21]。

3.3.2 圆二色光谱

用Tris缓冲溶液配制鲑鱼精DNA溶液和含化合物的鲑鱼精DNA溶液(结合比率 $r=c_{\text{化合物}}/c_{\text{DNA}}$),混匀后室温下静置5 min,测定其圆二色谱,测试时扣除Tris缓冲溶液和化合物的吸收^[22]。

3.3.3 琼脂糖凝胶实验

将pBR 322质粒DNA(200 μg)与浓度梯度增加的化合物在pH=7.26的TBE缓冲溶液中活化2.5 h(37 °C),用溴酚蓝-EDTA终止反应,在1%的琼脂糖凝胶上进行电泳,电泳结束后,在凝胶成像系统上成像,观察化合物对DNA的切割情况。

3.3.4 抗肿瘤活性测试

采用MTT法测试了目标化合物对MCF-7肿瘤细胞的体外细胞毒活性,以临床用药顺铂作为阳性对照。首先将待测化合物溶解于DMSO中,配制成10 mmol·L⁻¹的溶液,然后用培养液和牛血清将浓度稀释至1, 2, 4, 8, 16, 32 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (最终DMSO含量<0.5%)。将MCF-7细胞经常规消化、计数,接种到96孔板中,置于37 °C, 5%的CO₂培养箱中培养24 h。再将配制好的不同浓度的待测化合物加入96孔板中,设置对照组,每孔3个复

孔,于培养箱中培养24 h后,每孔加入20 μL 的MTT溶液,继续培养4 h。弃去上清液后每孔加入150 μL 的DMSO,摇床振荡10 min混匀,随后用酶标仪测定570 nm处的吸光值(OD)并计算抑制率,化合物作用于MCF-7细胞的抑制率达到50%时所对应的浓度定义为半数抑制浓度(IC₅₀)。

辅助材料(Supporting Information) 所合成目标化合物的核磁共振氢谱、核磁共振碳谱及高分辨质谱谱图。这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载。

References

- [1] Mo, Q. J.; Duan, W. G.; Li, X. R.; Huang, D. P.; Luo, Z. J. *Chin. J. Org. Chem.* **2011**, *31*, 1114 (in Chinese). (莫启进, 段文贵, 李行任, 黄丹平, 罗湛江, 有机化学, **2011**, *31*, 1114.)
- [2] Fei, B. L.; Li, W.; Xu, W. S.; Long, J. Y.; Liu, Q. B.; Sun, W. Y.; Anson, C. E.; Powell, A. K. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2013**, *34*, 5919.
- [3] Fei, B. L.; Xu, W. S.; Gao, W. L.; Zhang, J.; Zhao, Y.; Long, J. Y.; Anson, C. E.; Powell, A. K. *J. Photochem. Photobiol. B* **2015**, *142*, 77.
- [4] Jin, X. Y.; Chen, H.; Li, D. D.; Li, A. L.; Wang, W. Y.; Gu, W. J. *Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2019**, *34*, 955.
- [5] Wang, Y. C.; Su, C. H.; Li, F. Y.; Liu, L. Z.; Pan, Y. M.; Wu, X. R.; Wang, H. S. *Spectrochim. Acta A* **2010**, *76*, 328.
- [6] Lin, G. S.; Duan, W. G.; Liu, H. Q.; Ma, Y.; Lei, F. H. *Chem. Nat. Compd.* **2018**, *54*, 56.
- [7] Akhtar, J.; Khan, A. A.; Ali, Z.; Haider, R.; Shahar Yar, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *125*, 143.
- [8] Marin-Ocampo, L.; Veloza, L. A.; Abonia, R.; Sepulveda-Arias, J. C. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *162*, 435.
- [9] Ali, I.; Mukhtar, S. D.; Hsieh, M. F.; Allothman, Z. A.; Alwarthan, A. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 37905.
- [10] Khalifa, M. E. *Acta Chim. Slov.* **2018**, *65*, 1.
- [11] Hassan, A. A.; Aly, A. A.; Mohamed, N. K.; El Shaieb, K. M.; Makhoul, M. M.; Abdelhafez, ESMN.; Brase, S.; Nieger, M.; Dalby, K. N.; Kaoud, T. S. *Bioorg. Chem.* **2019**, *85*, 585.
- [12] Marques, R. A.; Gomes, A. O. C. V.; de Briton, M. V.; dos Santos, A. L. P.; da Silva, G. S.; de Lima, L. B.; Nunes, F. M.; de Mattos, M. C.; de Oliveira, F. C. E.; Pessoa, C. D.; de Moraes, M. O.; de Fatima, A.; Franco, L. L.; Silva, M. D.; Dantas, M. D. D.; Santos, J. C. C.; Figueiredo, I. M.; da Silva, E. F.; de Aquino, T. M.; de Araujo, J. X.; de Oliveira, M. C. F.; Gunatilaka, A. A. L. *J. Photochem. Photobiol. B* **2018**, *179*, 156.
- [13] Zhang, F.; Lin, Q. Y.; Li, S. K.; Zhao, Y. L.; Wang, P. P.; Chen, M. M. *Spectrochim. Acta, A* **2012**, *98*, 436.
- [14] Niroomand, S.; Khorasani-Motlagh, M.; Noroozifar, M.; Moodi, A. *J. Photochem. Photobiol. B* **2012**, *117*, 132.
- [15] Bian, L.; Li, L. Z.; Zhang, Q. F.; Liu, H. L.; Wang, D. Q. *Acta Chim. Sin.* **2011**, *69*, 1661 (in Chinese). (边琳, 李连之, 张庆富, 刘后炉, 王大奇, 化学学报, **2011**, *69*, 1661.)
- [16] Tiwari, A. D.; Mishra, A. K.; Mishra, S. B.; Mamba, B. B.; Maji, B.; Bhattacharya, S. *Spectrochim. Acta A* **2011**, *79*, 1050.
- [17] Huang, J. T.; Zhang, Y.; Wang, X. L.; Ji, L. N.; Liu, H. Y. *Chin. J. Inorg. Chem.* **2013**, *29*, 1649 (in Chinese).

- (黄俊腾, 张阳, 王湘利, 计亮年, 刘海洋, 无机化学学报, **2013**, 29, 1649.)
- [18] Alizadeh, R.; Afzal, M.; Arjmand, F. *Spectrochim. Acta, A* **2014**, 131, 625.
- [19] Liu, J. J.; Lu, Y. J.; Wang, J.; Bi, L. W.; Zhao, Z. D. *Chin. J. Org. Chem.* **2017**, 37, 731 (in Chinese).
(刘娟娟, 卢言菊, 王婧, 毕良武, 赵振东, 有机化学, **2017**, 37, 731.)
- [20] Chen, Y. *Ph.D. Dissertation*, Nanjing Forestry University, Nanjing, **2012** (in Chinese).
(陈泳, 博士论文, 南京林业大学, 南京, **2012**.)
- [21] Feng, S. B.; Lei, Q.; Zhang, Y.; Wang, H. S.; Pan, Y. M.; Wu, Q.; Tong, B. H. *Chin. J. Org. Chem.* **2007**, 27, 1414 (in Chinese).
(冯少波, 雷茜, 张业, 王恒山, 潘英明, 吴强, 童碧海, 有机化学, **2007**, 27, 1414.)
- [22] Gan, L. S.; Zhou, C. X. *Chin. J. Org. Chem.* **2009**, 29, 849 (in Chinese).
(甘礼社, 周长新, 有机化学, **2009**, 29, 849.)
- (Li, L.; Fan, Y.)