

• 实验研究 •

川芎嗪查尔酮类化合物的合成及其体外抗乳腺癌活性研究

卢颖洁^{1,2}, 岳方^{3*}

1. 武汉市第一医院 检验科, 湖北 武汉 430022
2. 武汉大学 生命科学学院, 湖北 武汉 430072
3. 武汉大学 化学与分子科学学院, 湖北 武汉 430070

摘要: **目的** 设计、合成川芎嗪查尔酮类化合物并研究其抗乳腺癌活性。**方法** 以盐酸川芎嗪为原料, 通过酸碱中和、单氧化、重排、水解和醇羟基氧化制得重要中间体 3,5,6-三甲基吡嗪-2-甲醛, 再与芳乙酮发生 Claisen-Schmidt 羟醛缩合反应合成川芎嗪查尔酮类化合物, 接着用 BBr_3 进行脱甲基得到了川芎嗪羟基查尔酮, 并采用 MTT 法对目标化合物进行体外抗乳腺癌活性研究。**结果** 合成了 21 个川芎嗪查尔酮类化合物, 其结构均通过 $^1\text{H-NMR}$ 和 MS 确证。生物活性结果测试表明, 目标化合物对乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞均有较强抑制活, 并对 MDA-MB-231 细胞有更强的选择抑制。其中查尔酮单元为二茂铁的衍生物 **9t** 对 MCF-7 和 MDA-MB-231 展现出了最强的抑制活性; 同时, 这些川芎嗪查尔酮类化合物对正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 均没有毒性。**结论** 查尔酮是一个重要的抗肿瘤药效团, 能够提高川芎嗪的抗肿瘤活性, 为今后发展新型、高效、低毒的具有抗肿瘤活性的川芎嗪衍生物提供了新思路。

关键词: 川芎嗪查尔酮类化合物; 二茂铁衍生物; 抗乳腺癌活性

中图分类号: R914.2; R966 文献标志码: A 文章编号: 1674 - 5515(2018)06 - 1295 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2018.06.003

Synthesis of ligustrazine-chalcone derivatives and their anti-breast cancer activities *in vitro*

LU Ying-jie^{1,2}, YUE Fang³

1. Department of Clinical Laboratory, Wuhan NO.1 Hospital, Wuhan 430022, China
2. College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China
3. College of Chemistry and Molecular Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China

Abstract: Objective To design and synthesis of ligustrazine-chalcone derivatives and investigate their anti-breast cancer activities *in vitro*. **Methods** Ligustrazine hydrochloride was used as starting material to synthesize the important intermediate 3, 5, 6-trimethylpyrazine-2-formaldehyde through acid base neutralization, monooxidation, rearrangement, hydrolysis and hydroxyl oxidation reaction. Ligustrazine-chalcone derivatives were obtained underwent Claisen-Schmidt Aldol condensation by treatment of intermediate 3, 5, 6-trimethylpyrazine-2-formaldehyde with aromatic acetone, then the methoxyl of ligustrazine-chalcone derivatives were converted into hydroxylated ligustrazine-chalcone derivatives through application of demethylating reagent BBr_3 . The anti-breast cancer activities were determined by MTT assays. **Results** Twenty-one ligustrazine-chalcone derivatives were synthesized and the structures have been confirmed by $^1\text{H-NMR}$ and MS spectra. The biological results showed that all synthesized ligustrazine-chalcone derivatives showed selective anti-breast cancer activity that has more potent against MDA-MB-231 cells than MCF-7. Specifically, ferrocenyl ligustrazine-chalcone compound **9t** exhibited the greatest potency against both MCF-7 and MDA-MB-231. Moreover, these ligustrazine-chalcone derivatives were not toxic to normal cells. **Conclusion** Chalcone unit is a kind of important anti-tumor pharmacophore, which can enhance the anti-tumor effect of ligustrazine, and this study provides a new idea for the development of

收稿日期: 2018-04-24

作者简介: 卢颖洁, 女, 研究方向为临床新药与检验研究。E-mail: ly51678@126.com

*通信作者 岳方, 讲师, 研究方向为抗肿瘤药物设计与合成。E-mail: yf48655@163.com

new, high-efficient and low-toxic ligustrazine derivatives with anti-tumor activity.

Key words: ligustrazine-chalcone derivatives; ferrocenyl derivative; anti-breast cancer activity

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 占所有恶性肿瘤的 23%, 发病率正呈逐年增加的趋势, 每年新增病例近 130 万, 并渐趋于年轻化^[1]。目前在临床上主要采用内分泌治疗, 他莫昔芬是临床上使用最为广泛的一线药物^[2-3]。但是, 患者长期使用容易产生副作用和耐药性, 并增加患其他癌症的风险如子宫内膜癌^[4]; 此外, 约 15% 患者是非荷尔蒙依赖型乳腺癌, 内分泌治疗无效^[5]。因此, 寻找新型、高效、低毒的抗乳腺癌药物能有效地减少乳腺癌患者的死亡率。近年来从天然产物中寻找先导化合物已成为新药研发的一个热点。我国临床疗效的中药资源丰富、天然有效成分多种多样, 是先导化合物的重要来源之一。如川芎的活性成分川芎嗪具有抗炎、抗血小板、抗血栓等多种药理活性^[6-7]。近年来研究证明川芎嗪还具有抗肿瘤活性包括抗乳腺癌^[8-11], 现已成为抗肿瘤的先导化合物被广泛的进行研究。此外, 查尔酮是甘草、红花等中药的主要活性成分^[12], 也是一类重要的天然先导化合物。其结构中的 α 、 β -不饱和酮具有较好的柔性, 能与多种受体结合, 因此呈现出抗肿瘤、抗溃疡、抗真菌等多种药理活性^[13-15], 特别是其抗肿瘤活性研究更为广泛^[16-17]。如从自然界中分离出来的查尔酮天然产物紫柳因就展现了良好的抗乳腺癌活性^[18]; 此外, 对查尔酮进行结构修饰能够得到抗乳腺癌活性强于他莫昔芬的查尔酮衍生物^[19]。

基于川芎嗪和查尔酮展现出的优秀抗肿瘤活性, 根据活性亚结构拼接和活性叠加原理, 本课题组拟合成川芎嗪查耳酮类化合物, 以期得到抗肿瘤活性较好的衍生物。首先, 通过酸碱中和、单氧化、重排、水解和醇羟基氧化这 5 步反应制得重要中间体 3,5,6-三甲基吡嗪-2-甲醛的合成^[20-21]; 然后将其与取代苯乙酮发生 Claisen-Schmidt 羟醛缩合反应合成川芎嗪查耳酮类化合物 (9a~9s), 其中川芎嗪甲氧基查耳酮类 9c、9d 和 9i 用 BBr_3 进行脱甲基得到了川芎嗪类羟基查耳酮 9f~9g 和 9n。随后的生物活性研究中发现这些目标化合物对荷尔蒙依赖型乳腺癌细胞 MCF-7 和非荷尔蒙依赖型乳腺癌细胞 MDA-MB-231 均也有较好的作用。为了提高抗乳腺癌活性, 将具有优秀抗乳腺癌活性的二茂铁基团^[22-24]引入到川芎嗪类查耳酮中得到了化合物

9t; 同时为了研究构效关系合成了化合物 9t 的酰胺类衍生物 (8)。目标化合物的合成路线见图 1。

1 仪器和试剂

1.1 仪器

Bruker AM-400Hz 型核磁共振仪; DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器 (河南巩义市予华仪器有限责任公司); Agilent 6120 型液-质联用仪 (美国 Agilent 公司); JJ224BC 型电子天平 (美国双杰 G&G 电子天平有限公司); 超净工作台 (北京半导体设备一厂); CKX31 型倒置显微镜 (奥林巴斯公司); BB16/BB5060 仪器 CO_2 培养箱 (上海力创科学仪器有限公司); ELx800 通用酶标仪 (美国 BioTek 公司)。

1.2 试剂

盐酸川芎嗪、芳醛 (质量分数 > 98%, 伊诺凯科技有限公司); 二茂铁甲醛、氨基二茂铁 (质量分数 > 98%, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 其他试剂均为市售分析纯 (质量分数 \geq 98%); GF254 硅胶薄层板、200~300 目柱色谱硅胶 (青岛海洋化工厂); 水为蒸馏水; DMEM 培养基、胎牛血清购自 Hyclone 公司; 乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞株购自武汉大学细胞典藏中心, 本实验室冻存使用。

2 方法与结果

2.1 合成部分

2.1.1 川芎嗪 (1) 的合成 将盐酸川芎嗪 (5.269 g, 25.2 mmol) 溶于 30 mL 水中, 加入 NaOH (15.0 g, 0.1 mol) 后室温反应 2 h, 用醋酸乙酯 (30 mL \times 3) 萃取, 合并有机层, 无水 Na_2SO_4 干燥, 减压脱溶, 得到白色固体 3.377 g, 收率 98.4%。ESI-MS m/z : 137.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, acetone- d_6) δ : 2.71 (s, 12H, $\text{CH}_3 \times 4$)。

2.1.2 川芎嗪单氮氧化物 (2) 的合成 将化合物 1 (3.311 g, 22.8 mmol) 溶于 15 mL 冰醋酸中, 加入 30% H_2O_2 (5.5 mL, 45.6 mmol), 加热至 70 $^\circ\text{C}$ 反应 8 h, 冷却至室温后用 50% NaOH 溶液调节 pH 值至 10, 用醋酸乙酯 (30 mL \times 3) 萃取, 合并有机层, 无水 Na_2SO_4 干燥, 减压脱溶, 得到白色固体 2.911 g, 收率 83.9%。ESI-MS m/z : 153.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, acetone- d_6) δ : 2.68 (s, 12H, $\text{CH}_3 \times 4$)。

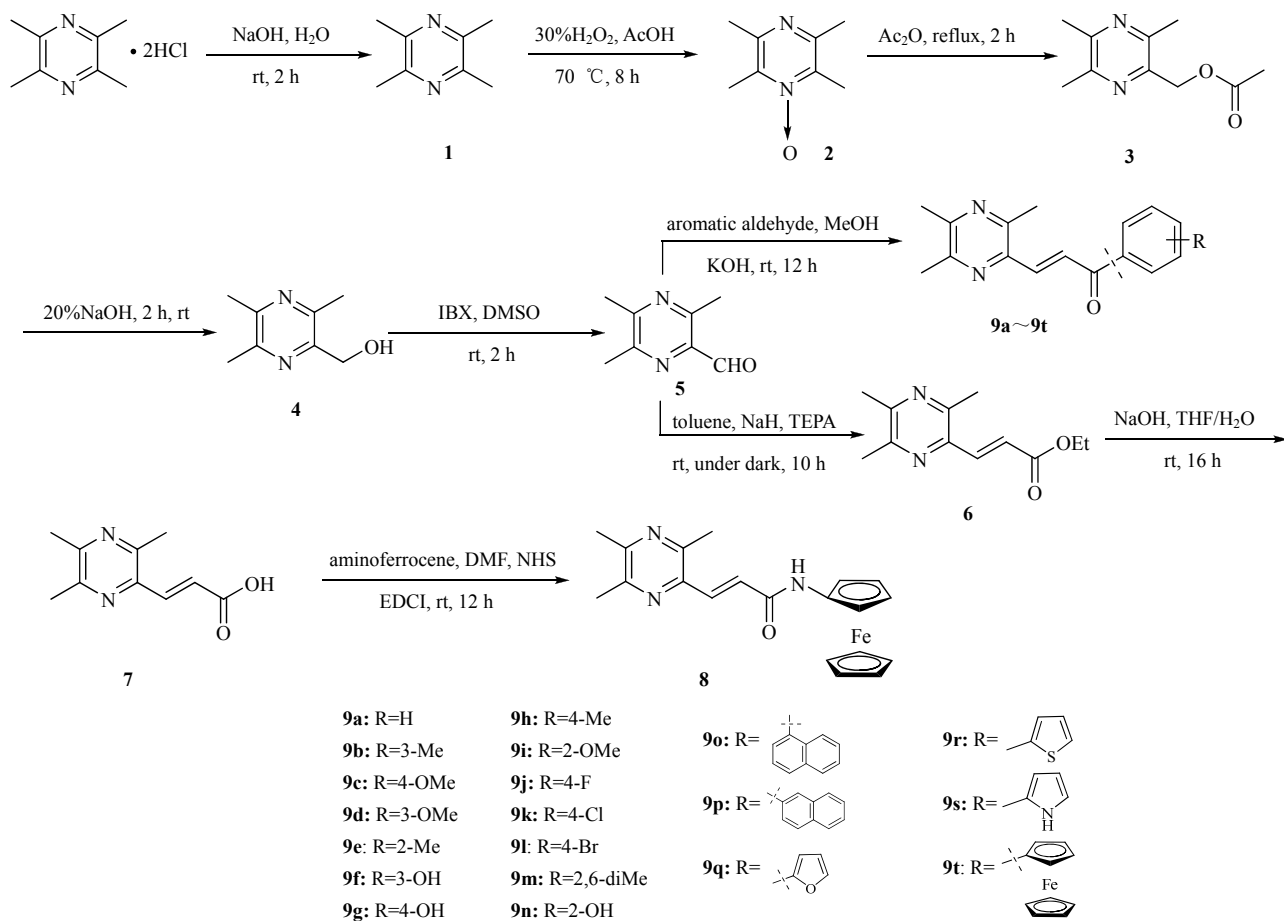


图1 目标化合物的合成路线

Fig. 1 Synthetic route of target compounds

2.1.3 (3,5,6-三甲基吡啶-2-基) 乙酸甲酯 (**3**) 的合成 将化合物 **2** (2.891 g, 19.0 mmol) 溶于 7 mL 乙酸酐, 加热回流 2 h 后减压除去过量乙酸酐, 得到黑色油状物 3.177 g, 收率 86.1%。ESI-MS m/z : 195.1 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.21 (s, 2H, CH_2), 2.61 (s, 3H, CH_3), 2.55 (s, 3H, CH_3), 2.46 (s, 3H, CH_3), 2.23 (s, 3H, CH_3)。

2.1.4 2-羟甲基-3, 5, 6-三甲基吡啶 (**4**) 的合成 称取化合物 **3** (3.108 g, 16.0 mmol) 溶于 20%NaOH 溶液 (60 mL) 中, 室温反应 12 h 后用醋酸乙酯 (50 mL \times 3) 萃取, 合并有机层, 无水 Na_2SO_4 干燥, 减压脱溶, 粗产物用石油醚重结晶, 得到淡黄色固体 1.887 g, 收率 77.5%。ESI-MS m/z : 153.2 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (400 MHz, $acetone-d_6$) δ : 4.68 (d, $J=4.0$ Hz, 2H, CH_2), 4.29 (t, $J=4.4$ Hz, 1H, OH), 2.57 (s, 3H, CH_3), 2.51 (s, 3H, CH_3), 2.42 (s,

3H, CH_3)。

2.1.5 3,5,6-三甲基吡啶-2-甲醛 (**5**) 的合成 在 Ar 保护下, 称取化合物 **4** (1.811 g, 11.9 mmol) 溶于无水 DMSO 中, 加入 2-碘酰基苯甲酸 (IBX, 5.012 g, 17.9 mmol), 室温反应 0.5 h 后向反应液中加入 100 mL 水, 用醋酸乙酯 (50 mL \times 3) 萃取, 水洗 3 次, 无水 Na_2SO_4 干燥, 减压脱溶, 得到粗产物经柱色谱纯化, 石油醚 - 醋酸乙酯 (3 : 1) 洗脱得到白色固体 1.610 g, 收率 90.1%。ESI-MS m/z : 151.1 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (400 MHz, $acetone-d_6$) δ : 2.64 (s, 3H, CH_3), 2.58 (s, 3H, CH_3), 2.49 (s, 3H, CH_3)。

2.1.6 川芎嗪查尔酮类化合物 (**9a~9e**, **9h~9m**, **9o~9t**) 的合成 将化合物 **5** (120 mg, 0.8 mmol) 和相应的苯乙酮 (0.8 mmol) 溶于 30 mL 甲醇中, 室温搅拌 10 min 后将反应液置于冰浴中冷却, 缓慢

加入 KOH (224 mg, 4.0 mmol) 后室温继续反应 12 h, 部分川芎嗪-查耳酮化合物以沉淀析出, 滤过, 滤饼在真空干燥箱中干燥; 如未能以沉淀析出则用醋酸乙酯 (25 mL×3) 萃取, 合并有机层, 无水 Na₂SO₄ 干燥, 减压脱溶, 得到粗产物经柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯 (4:1→1:1) 洗脱得到化合物 **9a**~**9p**。

1-苯基-3-(3,5,6-三甲基吡嗪基)-2-丙烯酮 (**9a**) 为由苯乙酮制备得到的黄色固体, 收率 91.4%, mp 132~134 °C。ESI-MS *m/z*: 253.1 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.04 (d, *J*=7.6 Hz, 2H), 7.76 (d, *J*=15.6 Hz, 1H), 7.54 (d, *J*=15.6 Hz, 1H), 7.41 (m, 3H), 2.61 (s, 3H, CH₃), 2.48 (s, 3H, CH₃), 2.43 (s, 3H, CH₃)。

1-(3-甲基苯基)-3-(3,5,6-三甲基吡嗪基)-2-丙烯酮 (**9b**) 为由 3-甲基苯乙酮制备得到的黄色固体, 收率 94.5%, mp 128~131 °C。ESI-MS *m/z*: 267.3 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.79 (d, *J*=16.4 Hz, 1H), 7.61 (t, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.36 (d, *J*=15.6 Hz, 1H), 6.99 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 6.61 (m, 1H), 2.56 (s, 3H, CH₃), 2.45 (s, 3H, CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃), 2.32 (s, 3H, CH₃)。

1-(4-甲氧基苯基)-3-(3,5,6-三甲基吡嗪基)-2-丙烯酮 (**9c**) 为由 4-甲氧基苯乙酮制备得到的黄色固体, 收率 93.9%, mp 144~145 °C。ESI-MS *m/z*: 283.3 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.83 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.81 (d, *J*=15.6 Hz, 1H), 7.43 (d, *J*=15.2 Hz, 1H), 7.17 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 2.57 (s, 3H, CH₃), 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃)。

1-(3-甲氧基苯基)-3-(3,5,6-三甲基吡嗪基)-2-丙烯酮 (**9d**) 为由 3-甲氧基苯乙酮制备得到的黄色固体, 收率 96.1%, mp 133~136 °C。ESI-MS *m/z*: 283.3 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.79 (d, *J*=15.2 Hz, 1H), 7.72 (t, *J*=6.8 Hz, 1H), 7.47 (d, *J*=15.6 Hz, 1H), 7.37 (m, 2H), 7.21 (m, 1H), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 2.54 (s, 3H, CH₃), 2.46 (s, 3H, CH₃), 2.43 (s, 3H, CH₃)。

1-(2-甲基苯基)-3-(3,5,6-三甲基吡嗪基)-2-丙烯酮 (**9e**) 为由 2-甲基苯乙酮制备得到的黄色固体, 收率 91.8%, mp 125~128 °C。ESI-MS *m/z*: 267.3 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.76 (d, *J*=16.0 Hz,

1H), 7.32 (d, *J*=15.2 Hz, 1H), 7.07 (t, *J*=6.8 Hz, 1H), 7.03 (m, 2H), 6.54 (m, 1H), 2.58 (s, 3H, CH₃), 2.46 (s, 3H, CH₃), 2.44 (s, 3H, CH₃), 2.19 (s, 3H, CH₃)。

1-(4-甲基苯基)-3-(3,5,6-三甲基吡嗪基)-2-丙烯酮 (**9h**) 为由 4-甲基苯乙酮制备得到的黄色固体, 收率 94.5%, mp 136~139 °C。ESI-MS *m/z*: 267.3 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.89 (d, *J*=7.2 Hz, 2H), 7.71 (d, *J*=15.2 Hz, 1H), 7.49 (d, *J*=15.6 Hz, 1H), 7.33 (d, *J*=8.0 Hz, 2H), 2.58 (s, 3H, CH₃), 2.46 (s, 3H, CH₃), 2.44 (s, 3H, CH₃), 2.34 (s, 3H, CH₃)。

1-(2-甲氧基苯基)-3-(3,5,6-三甲基吡嗪基)-2-丙烯酮 (**9i**) 为由 2-甲氧基苯乙酮制备得到的黄色固体, 收率 95.2%, mp 128~131 °C。ESI-MS *m/z*: 283.3 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.71 (d, *J*=15.2 Hz, 1H), 7.65 (t, *J*=6.8 Hz, 1H), 7.47 (d, *J*=15.6 Hz, 1H), 7.34 (m, 2H), 7.02 (m, 1H), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 2.62 (s, 3H, CH₃), 2.53 (s, 3H, CH₃), 2.46 (s, 3H, CH₃)。

1-(4-氟苯基)-3-(3,5,6-三甲基吡嗪基)-2-丙烯酮 (**9j**) 为由 4-氟苯乙酮制备得到的黄色固体, 收率 82.9%, mp 131~133 °C。ESI-MS *m/z*: 271.3 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.72 (d, *J*=14.8 Hz, 1H), 7.54 (d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.39 (d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.18 (d, *J*=15.6 Hz, 1H), 2.54 (s, 3H, CH₃), 2.45 (s, 3H, CH₃), 2.43 (s, 3H, CH₃)。

1-(4-氯苯基)-3-(3,5,6-三甲基吡嗪基)-2-丙烯酮 (**9k**) 为由 4-氯苯乙酮制备得到的黄色固体, 收率 89.2%, mp 142~144 °C。ESI-MS *m/z*: 287.7 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.79 (d, *J*=15.2 Hz, 1H), 7.52 (d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.31 (d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.08 (d, *J*=15.6 Hz, 1H), 2.56 (s, 3H, CH₃), 2.46 (s, 3H, CH₃), 2.42 (s, 3H, CH₃)。

1-(4-溴苯基)-3-(3,5,6-三甲基吡嗪基)-2-丙烯酮 (**9l**) 为由 4-溴苯乙酮制备得到的黄色固体, 收率 85.6%, mp 147~149 °C。ESI-MS *m/z*: 271.3 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.76 (d, *J*=16.0 Hz, 1H), 7.62 (d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.34 (d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.12 (d, *J*=15.6 Hz, 1H), 2.58 (s, 3H, CH₃), 2.44 (s, 3H, CH₃), 2.42 (s, 3H,

CH₃)。

1-(2,6-二甲基苯基)-3-(3,5,6-三甲基吡嗪基)-2-丙烯酮 (**9m**) 为由 2, 6-二甲基苯乙酮制备得到的黄色固体, 收率 89.5%, mp 126~129 °C。ESI-MS m/z : 281.4 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.76 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 7.32 (d, $J=15.2$ Hz, 1H), 7.11 (t, $J=7.6$ Hz, 2H), 6.52 (m, 1H), 2.54 (s, 3H, CH₃), 2.46 (s, 3H, CH₃), 2.42 (s, 3H, CH₃), 2.31 (s, 6H, CH₃×2)。

1-(1-萘基)-3-(3,5,6-三甲基吡嗪基)-2-丙烯酮 (**9o**) 为由 1-萘苯乙酮制备得到的黄色固体, 收率 87.5%, mp 121~123 °C。ESI-MS m/z : 303.3 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.91 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.81 (d, $J=15.2$ Hz, 1H), 7.63 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.56 (m, 3H), 7.47 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.36 (d, $J=15.6$ Hz, 1H), 6.72 (m, 1H), 2.56 (s, 3H, CH₃), 2.44 (s, 3H, CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃)。

1-(2-萘基)-3-(3,5,6-三甲基吡嗪基)-2-丙烯酮 (**9p**) 为由 2-萘苯乙酮制备得到的黄色固体, 收率 91.2%, mp 126~128 °C。ESI-MS m/z : 303.3 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.82 (m, 3H), 7.79 (d, $J=15.6$ Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.51 (m, 2H), 7.42 (d, $J=15.2$ Hz, 1H), 6.69 (m, 1H), 2.57 (s, 3H, CH₃), 2.46 (s, 3H, CH₃), 2.43 (s, 3H, CH₃)。

1-呋喃基-3-(3,5,6-三甲基吡嗪基)-2-丙烯酮 (**9q**) 为由 2-呋喃苯乙酮制备得到的黄色固体, 收率 93.9%, mp 116~119 °C。ESI-MS m/z : 303.3 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.57 (d, $J=15.6$ Hz, 1H), 7.51 (d, $J=1.2$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J=15.6$ Hz, 1H), 6.69 (d, $J=3.6$ Hz, 1H), 6.59 (m, 1H), 2.56 (s, 3H, CH₃), 2.44 (s, 3H, CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃)。

1-咪唑基-3-(3,5,6-三甲基吡嗪基)-2-丙烯酮 (**9q**) 为由 2-咪唑苯乙酮制备得到的黄色固体, 收率 93.9%, mp 116~119 °C。ESI-MS m/z : 303.3 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.57 (d, $J=15.6$ Hz, 1H), 7.51 (d, $J=1.2$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J=15.6$ Hz, 1H), 6.69 (d, $J=3.6$ Hz, 1H), 6.59 (m, 1H), 2.56 (s, 3H, CH₃), 2.44 (s, 3H, CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃)。

1-噻吩基-3-(3,5,6-三甲基吡嗪基)-2-丙烯酮 (**9r**)

为由 2-噻吩苯乙酮制备得到的黄色固体, 收率 94.6%, mp 125~127 °C。ESI-MS m/z : 259.3 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.87 (d, $J=3.2$ Hz, 1H), 7.71 (d, $J=15.2$ Hz, 1H), 7.65 (d, $J=5.6$ Hz, 1H), 7.37 (d, $J=15.6$ Hz, 1H), 7.15 (m, 1H), 2.55 (s, 3H, CH₃), 2.44 (s, 6H, CH₃×2)。

1-吡咯基-3-(3,5,6-三甲基吡嗪基)-2-丙烯酮 (**9s**) 为由 2-吡咯苯乙酮制备得到的黄色固体, 收率 93.9%, mp 116~119 °C。ESI-MS m/z : 42.3 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.06 (s, 1H, NH), 7.71 (d, $J=15.2$ Hz, 1H), 7.61 (d, $J=15.2$ Hz, 1H), 7.43 (m, 1H), 7.17 (m, 1H), 6.25 (m, 1H), 2.56 (s, 3H, CH₃), 2.45 (s, 3H, CH₃), 2.43 (s, 3H, CH₃)。

1-二茂铁基-3-(3,5,6-三甲基吡嗪基)-2-丙烯酮 (**9t**) 由乙酰二茂铁制备得到的红色固体, 收率 95.2%, mp 126~128 °C。ESI-MS m/z : 240.3 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.71 (d, $J=15.2$ Hz, 1H), 7.34 (d, $J=15.6$ Hz, 1H), 4.83 (s, 2H), 4.49 (s, 2H), 4.12 (s, 5H), 2.59 (s, 3H, CH₃), 2.45 (s, 3H, CH₃), 2.43 (s, 3H, CH₃)。

2.1.7 川芎嗪类羟基查尔酮化合物的合成 (9f~9g, 9n) 在 Ar 保护下, 称取化合物 **9c~9d** 和 **9n** (141 mg, 0.5 mmol) 溶于 25 mL 无水 CH₂Cl₂ 中, -20 °C 下缓慢滴加 BBr₃ (1.4 mL, 17.9 mmol), 继续反应 12 h, 加入 2 mL 甲醇淬灭反应, 醋酸乙酯 (40 mL×3) 萃取, 合并有机层后加入 50 mL 饱和 NaHCO₃ 溶液洗涤, 无水 Na₂SO₄ 干燥, 减压脱溶, 得到粗产物经柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯 (3:1→1:1) 洗脱得到化合物 **9f~9g** 和 **9n**。

1-(3-羟基苯基)-3-(3,5,6-三甲基吡嗪基)-2-丙烯酮 (**9f**): 黄色固体, 收率 90.6%, mp 126~129 °C。ESI-MS m/z : 283.3 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆) δ : 8.99 (s, 1H, OH), 7.79 (d, $J=15.2$ Hz, 1H), 7.47 (d, $J=15.2$ Hz, 1H), 7.23 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.03 (s, 1H), 6.85 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.77 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 2.56 (s, 3H, CH₃), 2.45 (s, 3H, CH₃), 2.42 (s, 3H, CH₃)。

1-(4-羟基苯基)-3-(3,5,6-三甲基吡嗪基)-2-丙烯酮 (**9g**): 黄色固体, 收率 93.9%, mp 144~145 °C。ESI-MS m/z : 269.1 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz,

CD₃OD) δ : 9.41 (s, 1H, OH), 7.65 (d, $J=15.6$ Hz, 1H), 7.21 (d, $J=15.6$ Hz, 1H), 7.14 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 6.89 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 2.63 (s, 3H, CH₃), 2.54 (s, 3H, CH₃), 2.46 (s, 3H, CH₃)。

1-(2-羟基苯基)-3-(3,5,6-三甲基吡嗪基)-2-丙烯酸(9q): 黄色固体, 收率 85.2%, mp 131~134 °C。ESI-MS m/z : 269.1 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆) δ : 12.46 (s, 1H, OH), 7.74 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 7.47 (d, $J=15.6$ Hz, 1H), 7.27 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.11 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.01 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.94 (m, 1H), 2.55 (s, 3H, CH₃), 2.46 (s, 3H, CH₃), 2.42 (s, 3H, CH₃)。

2.1.8 3-(3,5,6-三甲基吡嗪基)-丙烯酸乙酯(6)的合成 在 Ar 保护下, 将化合物 5(570 mg, 3.8 mmol) 溶于 20 mL 无水甲苯中, 加入 NaH (182 mg, 7.6 mmol) 和磷酸乙酸三乙酯 (852 mg, 3.8 mmol), 室温避光反应 10 h, 加入饱和 NaCl 溶液, 用醋酸乙酯 (50 mL×3) 萃取, 合并有机层, 无水 Na₂SO₄ 干燥, 减压脱溶, 得到粗产物经柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯(8:1)洗脱得到淡黄色固体 598 mg, 收率 71.5%。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.53 (d, $J=15.6$ Hz, 1H), 6.17 (d, $J=15.2$ Hz, 1H), 4.03 (m, 2H), 2.81 (s, 3H, CH₃), 2.61 (s, 6H, CH₃×2), 1.21 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH₃)。

2.1.9 3-(3,5,6-三甲基吡嗪基)-丙烯酸(7)的合成 将化合物 6 (550 mg, 2.5 mmol) 溶于 THF-水的混合溶液 (2:1, 30 mL) 中, 加入 KOH (280 mg, 5.0 mmol), 室温反应 16 h, 用 2 mol/L 盐酸调节溶液 pH 值至 4, 用醋酸乙酯 (30 mL×3) 萃取, 合并有机层, 无水 Na₂SO₄ 干燥, 减压脱溶, 得到粗产物经柱色谱纯化, 二氯甲烷-甲醇 (9:1) 洗脱得到化合物淡黄色固体 344 mg, 收率 71.5%。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.47 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 6.13 (d, $J=15.2$ Hz, 1H), 2.81 (s, 3H, CH₃), 2.65 (s, 6H, CH₃×2)。

2.1.10 1-二茂铁基-3-(3,5,6-三甲基吡嗪基)-2-丙烯酰胺(8)的合成 在 Ar 保护下, 称取化合物 7 (154 mg, 0.8 mmol) 溶于 5 mL 无水 DMF 中, 加入 NHS (184 mg, 1.6 mmol) 和 EDCI (460 mg, 2.4 mmol), 室温反应 1 h 后再加入氨基二茂铁 (852 mg, 3.8 mmol), 继续反应 12 h, 加入 100 mL 水稀释反应液, 用醋酸乙酯 (30 mL×3) 萃取, 水洗涂 3 次, 合并

有机层, 无水 Na₂SO₄ 干燥, 减压脱溶, 得到粗产物经柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯 (2:1) 洗脱得到化合物 235 mg, 产率 78.3%。mp 144~147 °C。ESI-MS m/z : 240.3 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.10 (s, 1H, NH), 7.55 (d, $J=15.6$ Hz, 1H), 7.21 (d, $J=15.2$ Hz, 1H), 4.86 (s, 2H), 4.53 (s, 2H), 4.45 (s, 5H), 2.61 (s, 3H, CH₃), 2.46 (s, 3H, CH₃), 2.45 (s, 3H, CH₃)。

2.2 抗乳腺癌活性研究

选取乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞为测试细胞株, 正常的乳腺上皮细胞 MCF-10A 为对照细胞株, 采用 MTT 法对合成的川芎嗪查耳酮类化合物进行抗乳腺癌活性评价。化合物 8 和 9a~9t 用 DMSO 溶解后, 然后用 DMEM 培养基稀释成 50、20、10、5、1、0.5、0.1、0.01 μ mol/L 不同浓度。取对数生长期的测试细胞株悬浮于含 10%胎牛血清的无酚红 DMEM 培养基中, 铺至 96 孔细胞培养板中, 每孔加入 100 μ L 细胞悬液。待细胞完全贴壁后, 弃去原培养液, 加入 100 μ L 含有测试药物的培养液, 培养 3 d 后, 每孔加入 30 μ L 5 mg/mL MTT, 置 37 °C、5%CO₂ 培养箱中继续孵育 4 h, 然后每孔加入 100 μ L 二甲亚砜。使用酶标仪在 490 nm 波长测定每孔的吸光度 (*A*) 值, 所有的化合物每个浓度均平行测试 3 次, 计算被测药物对肿瘤细胞的抑制率, 采用非线性回归模型绘制 S 型剂量效应曲线, 用 OriginPro 软件计算出半数抑制浓度 (IC₅₀) 值, 见表 1。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / A_{\text{对照}}$$

化合物 8 和 9a~9t 对 MCF-7 和 MDA-MB-231 这两种乳腺癌细胞均有抑制活性, 其 IC₅₀ 值在 0.8~14 μ mol/L, 小于母体化合物川芎嗪, 川芎嗪抑制 MCF-7 和 MDA-MB-231 的 IC₅₀ 值分别为 15.8、19.3 μ mol/L; 此外, 化合物 8 和 9a~9t 以及川芎嗪对乳腺上皮细胞 MCF-10A 的 IC₅₀ 均大于 100 μ mol/L。

3 讨论

3.1 合成部分

在合成化合物 5 时, 为了缩短反应步骤, 曾尝试用二氧化硒直接氧化川芎嗪的甲基来得到醛基产物, 但是得到均是双氧化产物, 即使控制二氧化硒的量仍未得到单氧化产物。但是, 这种直接氧化法有利于制备双甲酰川芎嗪衍生物。

在合成川芎嗪类羟基查耳酮化合物 9f~9g 和 9n 时, 最初是直接使用羟基苯乙酮与化合物 5 进行

表1 目标化合物的抗乳腺癌活性

Table 1 Antiproliferative activity of target compounds

化合物	IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹)			化合物	IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹)		
	MCF-7	MDA-MB-231	MCF-10A		MCF-7	MDA-MB-231	MCF-10A
9a	8.8±0.99	5.4±0.24	>10	9l	7.1±2.57	2.3±0.67	>10
9b	7.9±0.85	5.2±0.78	>10	9m	12.4±1.68	9.9±1.94	>10
9c	8.6±1.68	2.5±0.19	>10	9n	10.3±1.33	3.6±0.57	>10
9d	9.1±1.32	4.2±0.46	>10	9o	13.8±2.07	10.5±1.62	>10
9e	11.5±2.45	7.7±1.09	>10	9p	11.7±1.48	11.8±1.33	>10
9f	5.1±0.74	2.3±0.53	>10	9q	2.7±0.32	1.1±0.16	>10
9g	4.8±0.55	1.2±0.28	>10	9r	2.0±0.17	1.4±0.28	>10
9h	6.3±1.47	3.1±0.62	>10	9s	1.5±0.43	0.9±0.11	>10
9i	10.7±1.08	6.7±0.64	>10	9t	0.8±0.24	0.5±0.15	>10
9j	5.4±1.13	2.4±0.83	>10	8	1.1±1.54	0.7±0.42	>10
9k	8.3±1.32	2.8±0.24	>10	川芎嗪	15.8±1.47	19.3±1.17	>10

Claisen-Schmidt 羟醛缩合反应合成，但是在碱性条件下，羟基转移了酮的正电中心，抑制了缩合反应，所以 9f~9g 和 9n 的收率较低 (<5%)，这不利于大规模生产。因此，采用脱甲基试剂对川芎嗪甲氧基查尔酮化合物 9c~9d 和 9i 进行脱甲基来制备羟基衍生物 9f~9g 和 9n。在选择脱甲基试剂时，对比了 HBr、乙硫醇钠、AlCl₃、吡啶盐酸盐和 BBr₃ 这些脱甲基试剂，其中 BBr₃ 脱甲基非常的彻底，生产的目标化合物也较容易纯化，并且收率高。

3.2 抗乳腺癌活性

体外抗乳腺癌活性测试结果显示，本研究合成的川芎嗪查尔酮类化合物对乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-231 的抑制活性明显地强于母体化合物川芎嗪，这些化合物的 IC₅₀ 值均小于 15.0 μmol/L，并对 MDA-MB-231 细胞展现出了更强的抑制活性。这些结果说明引入查尔酮单元能够提高抗乳腺癌活性。但是，分析化合物的构效关系可以发现查尔酮单元对活性影响较大。当查尔酮为苯基系列时 (9a~9q)，苯环上的取代基位置以 C₄ 位取代的活性强于 C₃ 位或 C₂ 位取代。如 OMe 取代在查尔酮单元 C₄ 位的化合物 9c 对 MDA-MB-231 的抑制活性明显地强于其取代在查尔酮单元 C₃ 位的化合物 9d 和 C₂ 位的化合物 9i。进一步探讨 C₄ 位取代基时发现，对苯环取代能够提高抗乳腺癌活性，其中吸电子基团 (OH、F、Cl、Br) 取代的活性要强于给电子 (Me、OMe)；但是，将查尔酮单元的苯环用空间位阻较大的基团 (2,6-二甲基苯基、1-萘基、2-萘基) 取代

后降低了抗肿瘤活性；而用杂环 (呋喃环、噻吩环、吡咯环、二茂铁基) 取代却明显地增加了抗肿瘤活性，尤其是二茂铁化合物 9t 展现出了最强的抗乳腺癌活性；然而，继续将二茂铁化合物 9t 的查尔酮转化成酰胺化合物 8 后却降低了抗乳腺癌活性。这些结果说明，查尔酮单元是一个抗肿瘤药效团。此外，所有的目标化合物对正常的乳腺上皮细胞 MCF-10A 没有毒性。综上所述，本课题将川芎嗪和查尔酮二个活性亚单元拼接得到了抗肿瘤活性更强的化合物，为今后获得高效、低毒的川芎嗪类抗肿瘤药物提供了新的思路。

参考文献

- [1] Smith R A, Andrews K S, Brooks D, *et al.* Cancer screening in the United States, 2017: A review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening [J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(2): 100-121.
- [2] Jordan V C. Tamoxifen: a most unlikely pioneering medicine [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, 2(3): 205-213.
- [3] Ariazi E A, Ariazi J L, Cordera F, *et al.* Estrogen receptors as therapeutic targets in breast cancer [J]. *Curr Top Med Chem*, 2006, 6(3): 181-202.
- [4] van Leeuwen F E, Benraad J, Coebergh J W, *et al.* Risk of endometrial cancer after tamoxifen treatment of breast cancer [J]. *Lancet*, 1994, 343(8895): 448-452.
- [5] Xiong R, Patel H K, Gutgesell L M, *et al.* Selective human estrogen receptor partial agonists (ShERPAs) for tamoxifen-resistant breast cancer [J]. *J Med Chem*, 2016,

- 59(1): 219-237.
- [6] 姜宇懋, 王丹巧. 川芎嗪药理作用研究进展 [J]. 中国现代中药, 2016, 18(10): 1364-1370.
- [7] 张昌林, 倪小佳, 李春花, 等. 川芎嗪的结构修饰及生物活性研究进展 [J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(4): 549-556.
- [8] Zhang Y, Liu X, Zuo T, *et al.* Tetramethylpyrazine reverses multidrug resistance in breast cancer cells through regulating the expression and function of P-glycoprotein [J]. *Med Oncol*, 2012, 29(2): 534-538.
- [9] Ai Y, Zhu B, Ren C, *et al.* Discovery of new monocarbonyl ligustrazine-curcumin hybrids for intervention of drug-sensitive and drug-resistant lung cancer [J]. *J Med Chem*, 2016, 59(5): 1747-1760.
- [10] Zou Y, Zhao D, Yan C, *et al.* Novel ligustrazine-based analogs of piperlongumine potently suppress proliferation and metastasis of colorectal cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Med Chem*, 2018, 61(5): 1821-1832.
- [11] 汪林, 王鹏龙, 绪扩, 等. 川芎嗪衍生物构效关系研究进展 [J]. 中草药, 2013, 44(19): 2766-2771.
- [12] 韩龙哲, 张娟, 倪慧, 等. 胀果甘草药渣总黄酮和甘草查尔酮A的制备及其体外抗肿瘤活性研究 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(5): 668-672.
- [13] Kumar D, Maruthi Kumar N, Tantak M P, *et al.* Synthesis and identification of α -cyano bis(indolyl)chalcones as novel anticancer agents [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24(22): 5170-5174.
- [14] Sashidhara K V, Avula S R, Mishra V, *et al.* Identification of quinoline-chalcone hybrids as potential antiulcer agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2015, 89: 638-653.
- [15] Tomar V, Bhattacharjee G, Kamaluddin K A. Synthesis and antimicrobial evaluation of new chalcones containing piperazine or 2,5-dichlorothiophene moiety [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17(19): 5321-5324.
- [16] Mauricio C, Macarena S, Gabriela F, *et al.* Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral agents: biological evaluation and structure-activity relationships [J]. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15(10): 3356-3367.
- [17] Modzelewska A, Pettie C, Achanta G, *et al.* Anticancer activities of novel chalcone and bis-chalcone derivatives [J]. *Bioorg Med Chem*, 2006, 14(10): 3491-3495.
- [18] Wang Y, Chan F L, Chen S, *et al.* The plant polyphenol butein inhibits testosterone-induced proliferation in breast cancer cells expressing aromatase [J]. *Life Sci*, 2005, 77(1): 39-51.
- [19] 谭娟. 查耳酮类化合物合成及抗乳腺癌活性研究 [J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(3): 318-325.
- [20] 张阳, 杨雨, 李家明, 等. 新型川芎嗪衍生物的设计、合成及其生物活性的研究 [J]. 药学学报, 2011, 20(10): 914-918.
- [21] 刘铭, 刘伟, 蒋杰, 等. 白藜芦醇类似物的合成及其抗氧化活性 [J]. 中国新药杂志, 2016, 33(3): 318-325.
- [22] Top S, Vessières A, Leclercq G, *et al.* Synthesis, biochemical properties and molecular modelling studies of organometallic specific estrogen receptor modulators (SERMs), the ferrocifens and hydroxyferrocifens: evidence for an antiproliferative effect of hydroxyferrocifens on both hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cell lines [J]. *Chem Eur J*, 2003, 9(21): 5223-5236.
- [23] 陈善龙, 谭娟. 二茂铁查耳酮类化合物的合成及其抗乳腺癌活性 [J]. 现代药物与临床, 2015, 30(8): 913-916.
- [24] Li C H, Tang C, Hu Z Y, *et al.* Synthesis and structure-activity relationships of novel hybrid ferrocenyl compounds based on a bicyclic core skeleton for breast cancer therapy [J]. *Bioorg Med Chem*, 2016, 24(13): 3062-3074.