

圆柚酮生物碱衍生物的合成及其抗乳腺癌转移活性

刘璐¹, 张翔雨¹, 李晓磊¹, 江笑¹, 陈莹¹, 秦楠¹, 段宏泉^{1,2*}

1. 天津医科大学药学院, 天津 300070

2. 天津医科大学基础医学研究中心, 天津 300070

摘要: **目的** 设计并合成圆柚酮生物碱衍生物, 筛选具有抗乳腺癌转移活性的化合物。**方法** 以圆柚酮为起始原料, 通过氯化反应、氧化反应、亲核取代和还原胺化得到目标化合物。通过 MDA-MB-231 细胞的抗迁移实验检测化合物抗肿瘤转移活性。**结果** 共合成 11 个圆柚酮生物碱衍生物, 化合物 **2e**、**4b**、**4d** 抗乳腺癌转移活性较强。**结论** 合成了具有抗肿瘤转移作用的圆柚酮生物碱衍生物, 为乳腺癌转移药物的开发提供了依据。

关键词: 圆柚酮; 生物碱衍生物; 合成; 抗迁移实验; 抗乳腺癌转移

中图分类号: R914 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2025)03-0604-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.03.009

Synthesis and anti-metastatic activity against breast cancer of nootkatone alkaloid derivatives

LIU Lu¹, ZHANG Xiangyu¹, LI Xiaolei¹, JIANG Xiao¹, CHEN Ying¹, QIN Nan¹, DUAN Hongquan^{1,2}

1. School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

2. Basic Medical Research Center, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: Objective To design and synthesize nootkatone alkaloid derivatives, and screen compounds with anti-metastatic activity against breast cancer. **Methods** Starting from nootkatone, the target compounds were obtained through chlorination reaction, oxidation reaction, nucleophilic substitution, and reductive amination. The anti-tumor metastasis activity of the compound through anti-migration experiments on MDA-MB-231 cells was performed. **Results** A total of 11 nootkatone alkaloid derivatives were synthesized, and compounds **2e**, **4b**, and **4d** showed strong anti-migration activity against breast cancer cells. **Conclusion** The nootkatone alkaloid derivatives with anti-tumor metastasis activity are synthesized, which can provided a basis for the development of breast cancer metastasis drugs.

Key words: nootkatone; alkaloid derivative; synthesis; anti-migration test; anti-metastatic activity against breast cancer

天然紫罗兰酮在植物界中分布广泛, 具有抗癌、抗炎、抗氧化、抗锥虫、驱虫等多种活性^[1]。本课题组前期在土家族民间草药转筋草中发现抗肿瘤细胞转移活性成分转筋草碱 A, 进一步衍生合成研究发现紫罗兰酮生物碱衍生物 **11g** (图 1) 具有较强的抗乳腺癌转移活性^[2]。该类衍生物结构中有 1 个手性中心 (6-*R* 构型), 无论手性拆分还是手性合成都会很大程度上增加生产成本, 成药性较差, 而且光学纯度较低。前期研究显示, 化合物 3-羰基-4-烯结构和 6 位手性中心是维持衍生物抗肿瘤转移活

性的必需基团^[3-4]。圆柚酮 (又称香柏酮) 的结构特征与 3-羰基紫罗兰酮骨架类似。因此, 本研究将紫罗兰酮生物碱衍生物母核替换为具有天然手性且廉价易得的圆柚酮, 设计并合成圆柚酮生物碱衍生物, 结合分子活性筛选发现结构新颖的抗肿瘤转移活性化合物, 为抗肿瘤转移药物的开发提供参考。

1 仪器与试剂

AV400 核磁共振波谱仪器 (德国布鲁克公司); LTQ-Orbitrap 高分辨质谱仪 (美国 Thermo Fisher 公司); SHB-III 循环水式多用真空泵 (巩义市瑞德仪

收稿日期: 2024-11-05

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81673310)

作者简介: 刘璐 (1999—) 女, 山西大同人, 硕士研究生, 从事天然产物结构改造及肿瘤活性研究。E-mail: li13835212982@163.com

*通信作者: 段宏泉, 男, 教授, 研究方向为活性天然产物衍生合成和作用机制。E-mail: duanhq@tmu.edu.cn

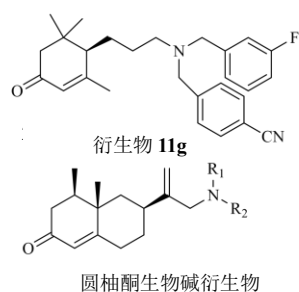


图 1 紫罗兰酮生物碱衍生物 11g 和圆柚酮生物碱衍生物化学结构式

Fig. 1 Chemical structures of ionone alkaloid derivative 11g and nootkatone alkaloid derivative

器设备有限公司); DLSB-5/20 低温冷却液循环泵(上海翔雅仪器设备有限公司); DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器; DZX-3 型真空干燥箱; EYELA PSL-1810 型低温反应器(日本东京理化株式会社); 柱色谱和薄层色谱用硅胶均系青岛海洋化工厂生产; SYNER HTX 全自动酶标板分析仪(美国 Bio-Rad 生物有限公司); H1850R 台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); 371 二氧化碳细胞培养箱(美国 Thermometer Scientific 公司)。

圆柚酮(批号 N159076, 质量分数 98%)购于阿拉丁试剂有限公司。3-氟苄胺(批号 0CECF28008, 质量分数 98%)、4-哌啶基哌啶(批号 Q5D7RRDS, 质量分数 98%)、4-溴苯甲醛(批号 B79605DHZ0, 质量分数 98%)均购于安耐吉科技有限公司; *N,N*-二甲基甲酰胺(批号 9FEXXR BX, 分析纯)购于天津市化学试剂二厂; 4-二甲氨基吡啶(批号 SP3EAKT, 质量分数 99%)、4-氟苯甲醛(批号 HR4REQ9X, 质量分数 98%)、4-甲基苯甲醛(批号 A0252489, 质量分数 99%)、4-甲氧基苯甲醛(批号 LS40I16, 质量分数 98%)均购于天津希恩思生化科技有限公司; 人乳腺癌细胞系(MDA-MB-231)购自中国科学院上海细胞库, 使用 RPMI 1640 培养基。实验所使用的溶剂均为生物级溶剂。纯水均为 Milli-Q 处理所得的超纯水。

2 方法与结果

2.1 合成路线

以圆柚酮为原料, 以圆柚酮为起始原料, 通过氯化反应、氧化反应、亲核取代和还原胺化得到目标化合物, 合成路线见图 2。

2.2 化合物的合成

2.2.1 化合物 1 的合成

取三氯化铯七水合物($\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 853.21 mg, 2.29 mmol, 0.5 eq), 在 0°C 冰浴下, 分散在 30 mL 二氯甲烷中。取圆柚酮(1000 mg, 4.58 mmol, 1.0 eq), 加入反应液中, 再滴加有效氯质量分数为 6% 的次氯酸钠水溶液(10.5 mL, 18.32 mmol, 4.0 eq), 保持 0°C 下搅拌 2 h, TLC 监测反应完成。称取亚硫酸钠加入反应液中, 搅拌 30 min 淬灭反应, 加入 50 mL 水, 分层后分离有机相, 水相再用 10 mL 二氯甲烷萃取 3 次, 合并有机相后再用饱和食盐水 10 mL 萃取 2 次, 合并有机相后用无水硫酸镁干燥, 滤过, 旋干滤液, 得化合物 1 粗品。经硅胶柱石油醚-醋酸乙酯(15:1~10:1)洗脱纯化后得淡黄色油状液体 832.39 mg, 即化合物 1, 产率为 71.88%。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.78 (s, 1H), 5.20 (s, 1H), 5.01 (s, 1H), 4.12 (s, 2H), 2.64~2.52 (m, 2H), 2.43~2.21 (m, 4H), 2.10~1.99 (m, 3H), 1.42~1.32 (m, 1H), 1.19~1.11 (m, 4H), 0.98 (d, $J=6.8$ Hz, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 199.43, 169.75, 148.75, 124.87, 113.94, 47.80, 44.25, 42.03, 40.38, 39.43, 35.74, 32.93, 31.97, 16.75, 14.93。以上波谱数据与文献报道^[5]基本一致。

2.2.2 化合物 3 的合成 在室温下, 将醋酸(2.86 μL , 0.05 mmol, 0.1 eq)滴加入 3 mL 乙腈中稀释, 依次加入二氧化硒(55.48 mg, 0.5 mmol, 1.0 eq)和叔丁基过氧化氢水溶液(1.3 mL, 70%水溶液, 5 mmol, 10.0 eq), 保持搅拌, 加入圆柚酮(109.17 mg, 0.5 mmol, 1.0 eq)转移至 50°C 油浴, 加热 6 h。TLC 监测反应, 展开剂为石油醚-醋酸乙酯(4:1)。冷却反应液至室温, 加入 315.1 mg 亚硫酸钠, 搅拌 30 min 后向反应液中加入 25 mL 醋酸乙酯稀释, 用 10 mL 水 5 萃取次, 干燥有机相, 旋干溶剂, 得粗品, 用硅胶柱石油醚-醋酸乙酯(10:1)分离, 可得浅黄色油状液体 28.45 mg, 即为化合物 3, 产率为 24.5%。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 9.55 (s, 1H), 6.25 (s, 1H), 6.03 (s, 1H), 5.78 (s, 1H), 2.96 (t, $J=12.5$ Hz, 1H), 2.65~2.56 (m, 1H), 2.43~2.20 (m, 3H), 2.03~1.91 (m, 3H), 1.42~1.31 (m, 1H), 1.18 (s, 3H), 1.09 (t, $J=12.5$ Hz, 1H), 0.95 (d, $J=6.8$ Hz, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 199.48, 194.31, 169.65, 153.74, 133.35, 124.92, 43.77, 42.02, 40.35, 39.49, 32.82, 31.41, 31.00, 16.64, 14.90。以上波谱数据与文献报道^[6]基本一致。

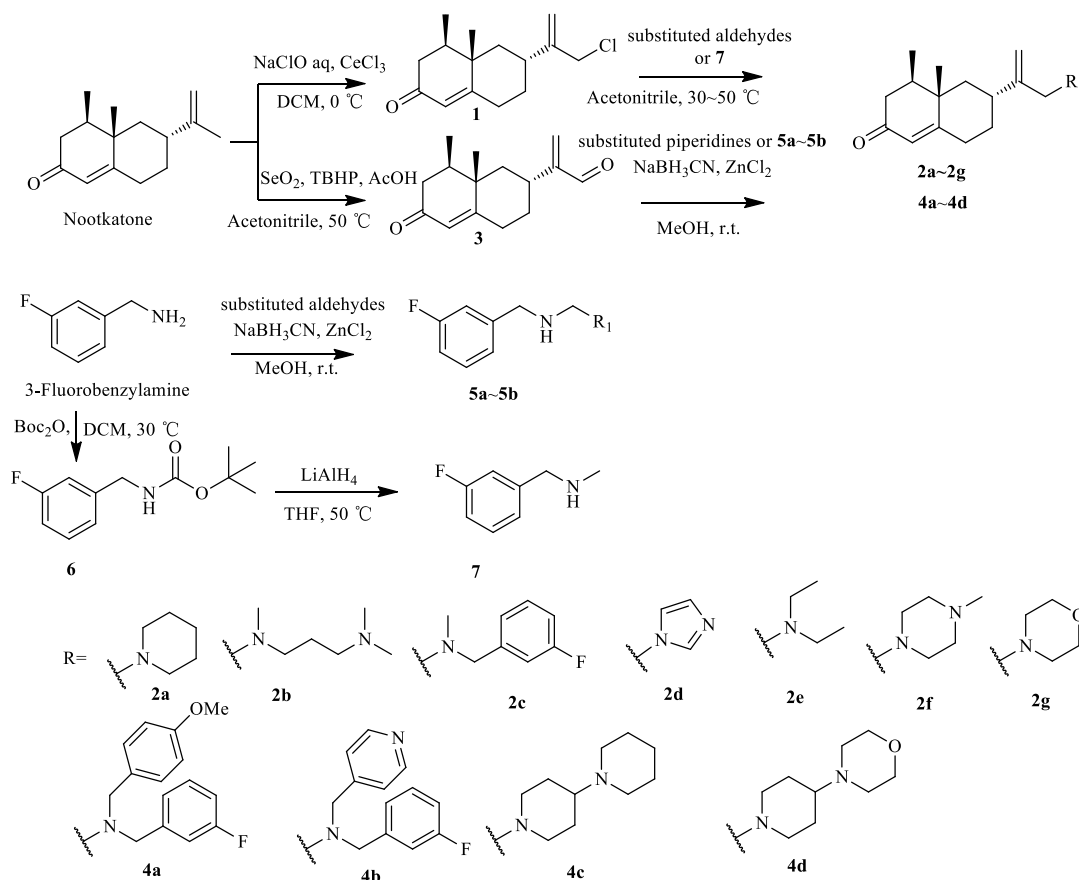


图 2 圆柚酮生物碱衍生物的合成路线

Fig. 2 Synthetic routes of the nootkatone alkaloidal derivatives

2.2.3 化合物 6 的合成: 冰水浴 0 °C 下, 将 KHCO_3 (500.6 mg, 5 mmol, 2.5 eq) 加入 20 mL 二氯甲烷中搅拌分散至混悬状, 保持搅拌, 滴加 3-氟苄胺 (250.3 mg, 2 mmol, 1 eq), 搅拌 5 min 后加入二羰基二叔丁酯 (480.15 mg, 2.2 mmol, 1.1 eq), 在 0 °C 下搅拌 30 min 后转移至 30 °C 油浴, 搅拌过夜。TLC 监测反应, 加入 20 mL 二氯甲烷稀释反应液停止反应, 用 10 mL 水萃取 3 次, 取有机相用无水硫酸镁干燥, 滤过, 旋干得白色固体, 即为化合物 10。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.30~7.25 (m, 1H), 7.05~6.92 (m, 3H), 4.31 (d, $J=6.04$ Hz, 2H), 1.46 (s, 9H)。以上波谱数据与文献报道^[7]基本一致。

2.2.4 化合物 7 的合成 将化合物 6 (450.52 mg, 2 mmol, 1 eq) 溶解于 20 mL 四氢呋喃中, 缓慢分批加入四氢铝锂 (265.66 mg, 7 mmol, 0.5 eq)。油浴加热反应液至 50 °C, 5 h 后 TLC 监测反应完成。缓慢滴加 4 mol/L NaOH 水溶液 6 mL, 至反应液中无气泡产生, 滴加 1 mol/L 酒石酸钾钠水溶液 6 mL, 剧烈搅拌 15 min 后加入 40 mL 醋酸乙酯稀

释溶液, 加入 20 mL 水分层, 置分液漏斗中萃取, 保留有机相再用 10 mL 水萃取 4 次, 合并有机相后用无水硫酸镁干燥, 滤纸抽滤, 旋干, 经硅胶柱、石油醚-醋酸乙酯 (30:1) 纯化得 195.84 mg 黄色固体, 即为化合物 11。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.32~7.25 (m, 1H), 7.09~7.03 (m, 2H), 6.96~6.92 (m, 1H), 3.75 (s, 2H), 2.45 (s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 163.00 (d, $J=244.26$ Hz), 142.79 (d, $J=6.57$ Hz), 129.82 (d, $J=8.06$ Hz), 123.67 (d, $J=2.94$ Hz), 114.93 (d, $J=21.12$ Hz), 113.83 (d, $J=21.11$ Hz), 55.43 (d, $J=2.01$ Hz), 35.92。以上波谱数据与文献报道^[8]基本一致。

2.2.5 化合物 2a 的合成 取化合物 1 (151.33 mg, 0.1978 mmol, 1.0 eq) 溶于 10 mL 乙腈中, 加入哌啶 (48.65 mg, 0.4945 mmol, 2.5 eq), 30 °C 油浴下搅拌 48 h。TLC 监测反应到达限度。反应液中加入 15 mL 醋酸乙酯稀释使反应停止, 用 10 mL 水萃取 3 次, 保留有机相, 加入无水硫酸镁干燥后, 滤过, 旋干。反应处理所得粗品, 用硅胶柱石油醚-醋酸

乙酯 (20:1~6:1) 洗脱分离, 可得淡黄色油状液体 54.23 mg, 即为 **2a**, 产率为 90.94%。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 5.76 (s, 1H), 4.94 (s, 1H), 4.84 (s, 1H), 2.89 (s, 2H), 2.58~2.43 (m, 2H), 2.39~2.19 (m, 7H), 2.07~1.92 (m, 3H), 1.55 (m, 4H), 1.45~1.24 (m, 6H), 1.12 (m, 4H), 0.96 (d, $J=6.8$ Hz, 3H)。HR-ESI MS m/z 302.248 2 [M+H]⁺, calcd for C₂₀H₃₁NO 302.247 9。

2.2.6 化合物 2b 的合成 取化合物 **1** (148.72 mg, 0.192 7 mg, 1.0 eq) 溶于 10 mL 乙腈中, 加入 *N,N,N'*-三甲基丙二胺 (59.50 mg, 0.481 8 mmol, 2.5 eq), 30 °C 油浴下搅拌 48 h。反应液中加入 15 mL 醋酸乙酯稀释使反应停止, 用 10 mL 水萃取 3 次, 保留有机相, 合并水相后用 2 mL 二氯甲烷萃取, 合并 2 次萃取的有机相后加入无水硫酸镁干燥, 滤过, 旋干。所得粗品用硅胶柱二氯甲烷-甲醇 (20:1~8:1) 洗脱纯化得黄色油状液体 34.37 mg, 即为 **2b**, 产率为 53.64%。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 5.77 (s, 1H), 4.95 (s, 1H), 4.85 (s, 1H), 3.46 (m, 2H), 2.91 (m, 2H), 2.58~2.44 (m, 2H), 2.40~2.33 (m, 5H), 2.29~2.24 (m, 8H), 2.15 (m, 3H), 2.04~1.93 (m, 3H), 1.73~1.65 (m, 2H), 1.41~1.30 (m, 1H), 1.15~1.08 (m, 4H), 0.97 (d, $J=6.8$ Hz)。¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 199.78, 170.96, 150.83, 124.59, 111.11, 63.30, 57.81, 55.57, 45.27, 44.44, 42.04, 40.40, 39.47, 36.14, 33.23, 32.05, 25.35, 16.81, 14.94。HR-ESI MS m/z 333.290 6 [M+H]⁺, calcd for C₂₁H₃₆N₂O 333.290 1。

2.2.7 化合物 2c 的合成 取化合物 **1** (210.00 mg, 1 mmol, 1.0 eq) 溶于 10 mL 乙腈中, 加入化合物 **7** (139.17 mg, 1 mmol, 1.0 eq), 反应液置于 30 °C 油浴下搅拌 48 h, TLC 监测反应。反应液中加入 15 mL 醋酸乙酯稀释使反应停止, 用 10 mL 水萃取 4 次, 保留有机相, 合并水相后用 5 mL 二氯甲烷萃取 2 次, 合并 2 次萃取得有机相, 用无水硫酸镁干燥后, 抽滤, 旋干。所得粗品用硅胶柱石油醚-醋酸乙酯 (30:1) 洗脱纯化, 得淡黄色油状液体 64.93 mg, 即为 **2c**, 产率为 20.76%。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.29~7.24 (m, 1H), 7.10~7.08 (m, 2H), 6.96~6.91 (m, 1H), 5.79 (s, 1H), 5.00 (s, 1H), 4.87 (s, 1H), 3.46 (m, 2H), 3.00 (d, $J=13.1$ Hz, 1H), 2.87 (d, $J=13.1$ Hz, 1H), 2.58~2.49 (m, 2H), 2.39~2.23 (m, 4H), 2.17 (s, 3H),

2.05~1.88 (m, 4H), 1.42~1.26 (m, 4H), 1.13 (m, 4H), 0.91 (d, $J=6.9$ Hz, 3H); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 199.68, 170.81, 162.97 (d, $J=243.6$ Hz), 150.84, 142.49 (d, $J=7.0$ Hz), 129.63 (d, $J=8.2$ Hz), 124.62, 124.24 (d, $J=2.8$ Hz), 115.41 (d, $J=21.1$ Hz), 113.81 (d, $J=21.0$ Hz), 111.53, 62.67, 61.54, 44.36, 42.50, 42.09, 40.41, 39.48, 35.89, 33.22, 32.00, 16.79, 14.88。¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃) δ : -113.65。HR-ESI MS m/z 356.239 0 [M+H]⁺, calcd for C₂₃H₃₀FNO 356.238 5。

2.2.8 化合物 2d 的合成 取化合物 **1** (48.72 mg, 0.192 7 mg, 1.0 eq) 溶于 10 mL 乙腈中, 加入咪唑 (32.80 mg, 0.481 8 mmol, 2.5 eq), 30 °C 油浴下搅拌 48 h。反应液中加入 15 mL 醋酸乙酯稀释使反应停止, 用 10 mL 水萃取 3 次, 保留有机相, 合并水相后用 5 mL 二氯甲烷萃取 2 次, 合并后加入无水硫酸镁干燥, 滤过, 旋干。所得粗品用硅胶柱、二氯甲烷-甲醇 (15:1~6:1) 洗脱纯化得黄色油状液体 15.77 mg, 即为 **2d**, 产率为 28.77%。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.93 (s, 1H), 7.18 (d, $J=1.0$ Hz, 1H), 6.65 (d, $J=1.0$ Hz, 1H), 5.77 (s, 1H), 4.97 (s, 1H), 4.88 (s, 1H), 4.40 (s, 2H), 2.63~2.51 (m, 2H), 2.42~2.22 (m, 4H), 2.10~1.99 (m, 3H), 1.42~1.32 (m, 1H), 1.19~1.11 (m, 4H), 0.98 (d, $J=6.8$ Hz, 3H)。HR-ESI MS m/z 285.196 7 [M+H]⁺, calcd for C₁₈H₂₄N₂O 285.196 0。

2.2.9 化合物 2e 的合成 取化合物 **1** (53.35 mg, 0.197 8 mmol, 1.0 eq) 溶于 10 mL 乙腈中, 加入二乙胺 (34.71 mg, 0.435 2 mmol, 2.2 eq), 30 °C 油浴搅拌 28 h, 再在 50 °C 下搅拌 5 h。反应液中加入 15 mL 醋酸乙酯稀释使反应停止, 用 10 mL 水萃取 3 次, 保留有机相, 合并水相, 水相用 5 mL 二氯甲烷萃取 2 次, 合并 2 次萃取的有机相, 加入无水硫酸镁干燥, 滤过, 旋干。所得粗品用制备薄层硅胶板分离, 展开剂为石油醚-醋酸乙酯 (4:1), 可得黄色油状液体 45.80 mg, 即为 **2e**, 产率为 81%。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 5.76 (s, 1H), 4.98 (s, 1H), 4.85 (s, 1H), 3.06~2.96 (m, 2H), 2.60~2.19 (m, 9H), 2.09~1.93 (m, 3H), 1.41~1.30 (m, 1H), 1.12 (s, 3H), 1.04 (t, $J=7.24$ Hz, 6H), 0.97 (d, $J=6.7$ Hz, 3H)。HR-ESI MS m/z 290.248 4 [M+H]⁺, calcd for C₁₉H₃₁NO 290.248 0。

2.2.10 化合物 2f 的合成 取化合物 **1** (48.72 mg,

0.192 7 mmol, 1.0 eq) 溶于 10 mL 乙腈中, 加入 *N*-甲基哌嗪 (50.90 mg, 0.481 8 mmol, 2.5 eq), 30 °C 油浴下搅拌 48 h, TLC 监测反应。反应液中加入 15 mL 醋酸乙酯稀释使反应停止, 用 10 mL 水萃取 3 次, 保留有机相, 合并水相后用 5 mL 二氯甲烷萃取 2 次, 合并有机相, 加入无水硫酸镁干燥后滤过, 旋干。所得粗品用硅胶柱二氯甲烷-甲醇 (20:1) 洗脱纯化得淡黄色油状液体 32.50 mg, 即为 **2f**, 产率为 53.30%。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 5.77 (s, 1H), 4.97 (s, 1H), 4.88 (s, 1H), 2.94 (s, 2H), 2.57~2.20 (m, 16H), 2.05~1.92 (m, 3H), 1.45~1.26 (m, 3H), 1.58~1.09 (m, 4H), 0.97 (d, *J*=6.8 Hz, 3H)。HR-ESI MS *m/z* 317.259 3 [M+H]⁺, calcd for C₂₀H₃₂N₂O 317.259 0。

2.2.11 化合物 2g 的合成 取化合物 **1** (70.00 mg, 0.276 9 mmol, 1.0 eq) 溶于 5 mL 乙腈中, 加入三乙胺 (56.14 mg, 0.553 8 mmol, 2.0 eq) 搅拌后加入吗啉 (28.97 mg, 0.304 6 mmol, 1.1 eq), 30 °C 油浴下搅拌 24 h, TLC 监测反应。反应液中加入 15 mL 醋酸乙酯稀释使反应停止, 再用 10 mL 水萃取 3 次, 取有机相, 用无水硫酸镁干燥后, 滤过, 旋干得黄色油状液体, 为粗品。用硅胶柱石油醚-醋酸乙酯 (10:1) 洗脱分离, 可得淡黄色油状液体 86.00 mg, 即为 **2g**, 产率为 98.04%。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 5.78 (s, 1H), 4.99 (s, 1H), 4.90 (s, 1H), 3.71 (t, *J*=4.8 Hz, 4H), 2.95 (s, 2H), 2.58~2.20 (m, 10H), 2.05~1.92 (m, 3H), 1.16~1.10 (m, 4H), 0.97 (d, *J*=6.8 Hz, 3H); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 199.70, 170.67, 124.68, 67.03, 63.97, 53.65, 44.42, 42.04, 40.39, 39.43, 36.66, 33.18, 32.03, 29.68。HR-ESI MS *m/z* 304.227 7 [M+H]⁺, calcd for C₁₉H₂₉N₁O 304.226 5。

2.2.12 化合物 4a 的合成 室温下, 保持搅拌将化合物 **3** (28.45 mg, 0.122 5 mmol, 1.0 eq) 加入 0.6 mL 甲醇中, 再加入化合物 **5a** (30.05 mg, 0.122 5 mmol, 1.0 eq), 向 ZnCl₂ (8.34 mg, 0.061 2 mmol, 0.5 eq) 中加入 0.4 mL 甲醇溶解, 将 ZnCl₂ 的甲醇溶液加入氰基硼氢化钠 (7.70 mg, 0.122 5 mmol, 1.0 eq) 中混合均匀, 将该混合物加入反应液中, 保持室温搅拌 24 h。滤纸和少量硅藻土减压过滤反应液, 用少量二氯甲烷冲洗滤饼, 收集滤液, 旋干后加入 25 mL 醋酸乙酯复溶, 用 10 mL 水萃取 5 次, 取有机相干燥, 滤过, 旋干得粗品, 呈黄色油状液

体 67.45 mg, 用硅胶柱、石油醚-丙酸 (6:1) 洗脱纯化, 可得淡黄色油状液体 28.48 mg, 即为化合物 **4a**。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.29~7.24 (m, 4H), 7.13~7.10 (m, 2H), 6.88~6.86 (m, 2H), 5.75 (s, 1H), 5.04 (s, 1H), 4.86 (s, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.55~3.35 (m, 2H), 3.04 (d, *J*=12.0 Hz, 1H), 2.92 (d, *J*=12.0 Hz, 1H), 2.61~2.43 (m, 2H), 2.35~2.18 (m, 3H), 1.96~1.90 (m, 1H), 1.87~1.82 (m, 1H), 1.77~1.72 (m, 1H), 1.12 (s, 3H), 0.85 (d, *J*=8.0 Hz, 3H); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 199.77, 170.82, 164.20, 161.76, 158.72, 150.99, 142.79, 131.30, 129.99, 129.70, 124.61, 124.30, 115.49, 115.28, 113.72, 111.82, 59.03, 57.61, 55.28, 44.06, 42.08, 40.39, 39.51, 35.49, 33.22, 31.89, 16.81, 14.89。HR-ESI MS *m/z* 462.280 8 [M+H]⁺, calcd for C₃₀H₃₆FN₂O 462.280 5。

2.2.13 化合物 4b 的合成 室温下, 保持搅拌将化合物 **3** (116.16 mg, 0.5 mmol, 1.0 eq) 加入 1.25 mL 甲醇中, 再加入化合物 **5b** (108.13 mg, 0.5 mmol, 1.0 eq)。向 ZnCl₂ (34.08 mg, 0.25 mmol, 0.5 eq) 中加入 1.25 mL 甲醇溶解, 将 ZnCl₂ 的甲醇溶液加入氰基硼氢化钠 (31.42 mg, 0.5 mmol, 1.0 eq) 中混合均匀, 将该混合物加入反应液中, 保持室温搅拌 24 h。滤纸和少量硅藻土减压过滤反应液, 用少量二氯甲烷冲洗滤饼, 收集滤液, 旋干后加入 25 mL 醋酸乙酯复溶, 用 10 mL 水萃取 5 次, 取有机相干燥, 滤过, 旋干得粗品, 呈黄色油状液体 238.69 mg, 用硅胶柱石油醚-丙酸 (6:1) 洗脱纯化, 可得淡黄色油状液体 21.10 mg, 即为化合物 **4b**。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.57 (s, 2H), 7.34~7.28 (m, 4H), 7.13~6.94 (m, 3H), 5.74 (d, *J*=15 Hz, 1H), 5.00 (s, 1H), 3.57~3.45 (m, 4H), 3.00 (d, *J*=12.0 Hz, 1H), 2.57~2.09 (m, 6H), 1.90~1.54 (m, 5H), 1.12 (s, 3H), 0.85 (d, *J*=8.0 Hz, 3H); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 199.69, 171.02, 170.17, 150.24, 149.27, 130.33, 129.90, 124.79, 124.48, 123.98, 123.74, 115.40, 115.19, 112.44, 44.17, 43.83, 42.04, 40.38, 39.77, 39.45, 39.11, 35.78, 35.25, 34.73, 34.21, 33.13, 31.94, 30.80, 26.86, 17.04, 16.84, 14.94, 14.52。HR-ESI MS *m/z* 433.265 5 [M+H]⁺, calcd for C₂₈H₃₃FN₂O 433.265 0。

2.2.14 化合物 4c 的合成 室温下, 保持搅拌将化

合物 **3** (46.46 mg, 0.2 mol, 1.0 eq) 加入 1 mL 甲醇中, 再加入 4-哌啶基哌啶 (84.14 mg, 0.2 mmol, 1.0 eq)。向 ZnCl_2 (16.63 mg, 0.1 mmol, 0.5 eq) 中加入 1 mL 甲醇溶解, 将该溶液加入氰基硼氢化钠 (12.57 mg, 0.2 mmol, 1.0 eq) 中, 混合均匀, 将该混合物加入反应液中, 保持室温搅拌 24 h。滤纸和少量硅藻土减压过滤反应液, 用少量二氯甲烷冲洗滤饼, 收集滤液, 旋干后加入 25 mL 醋酸乙酯复溶, 用 10 mL 水萃取 5 次, 取有机相干燥, 滤过, 旋干得黄色油状液体 76.40 mg, 用硅胶柱、二氯甲烷-甲醇 (25:1) 洗脱纯化, 可得淡黄色油状液体 40.10 mg, 即为化合物 **4c**。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.76 (s, 1H), 4.94 (s, 1H), 4.84 (s, 1H), 2.89 (m, 4H), 2.54~2.19 (m, 10H), 2.04~1.78 (m, 7H), 1.63~1.32 (m, 9H), 1.15~1.09 (m, 4H), 0.96 (d, $J=6.8$ Hz, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 199.68, 170.89, 150.50, 124.60, 110.80, 63.60, 62.88, 53.53, 53.43, 50.34, 44.42, 42.07, 40.40, 39.44, 36.62, 33.25, 32.05, 28.23, 28.19, 26.25, 24.72, 16.74, 14.93。HR-ESI MS m/z 385.321 9 $[\text{M}+\text{H}]^+$, calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}$ 385.321 0。

2.2.15 化合物 4d 的合成 室温下, 保持搅拌将化合物 **3** (46.46 mg, 0.2 mol, 1.0 eq) 加入 1 mL 甲醇中, 再加入 4-吗啉基哌啶 (34.02 mg, 0.2 mmol, 1.0 eq)。向 ZnCl_2 (16.63 mg, 0.1 mmol, 0.5 eq) 中加入 1 mL 甲醇溶解, 将 ZnCl_2 的甲醇溶液加入氰基硼氢化钠 (12.57 mg, 0.2 mmol, 1.0 eq) 中, 混合均匀, 将该混合物加入反应液中, 保持室温搅拌 24 h。滤纸和少量硅藻土减压过滤反应液, 用少量二氯甲烷冲洗滤饼, 收集滤液, 旋干后加入 25 mL 醋酸乙酯复溶, 用 10 mL 水萃取 5 次, 取有机相干燥, 滤过, 旋干得粗品, 呈黄色油状液体 74.61 mg, 用硅胶柱、二氯甲烷-甲醇 (25:1) 洗脱纯化, 可得淡黄色油状液体 46.77 mg, 即为化合物 **4d**。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.76 (s, 1H), 4.95 (s, 1H), 4.85 (s, 1H), 3.73 (m, 4H), 2.91 (m, 4H), 2.57~2.14 (m, 11H), 2.03~1.77 (m, 8H), 1.54~1.30 (m, 3H), 1.16~1.09 (m, 4H), 0.96 (d, $J=6.8$ Hz, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 199.63, 170.80, 150.34, 124.61, 110.99, 67.25, 63.53, 62.28, 53.06, 52.96, 49.97, 44.38, 42.06, 40.39, 39.43, 36.58, 33.23, 32.06, 28.51, 28.47, 16.75, 14.93。HR-ESI MS m/z 387.400 9 $[\text{M}+\text{H}]^+$,

calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_2$ 387.301 2。

2.3 体外抗乳腺癌肿瘤转移活性

2.3.1 MTT 法测定化合物细胞毒性 为了避免细胞毒性对乳腺癌细胞迁移的影响, 首先要测定抗肿瘤细胞迁移实验中的非细胞毒浓度。用 0.25% 胰蛋白酶消化液消化 MDA-MB-231 细胞, 弃去胰蛋白酶消化液后, 加入含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基终止消化, 轻轻吹打均匀消化下的细胞悬液, 计数调整细胞密度为 1×10^4 个/mL, 然后用多通道移液枪将吹打均匀的细胞悬液加入 96 孔细胞培养板中, 每孔加入 180 μL 细胞悬液, 轻轻摇晃 96 孔板使细胞均匀地铺于板底, 置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后加药。每个浓度设置 5 个复孔, 使用酶标仪在 550 nm 波长下测定各组的吸光度 (A) 值, 计算平均值, SPSS 11.5 处理数据, 计算各组的生长抑制率 (生长抑制率 = $1 - A_{\text{加药}}/A_{\text{空白}}$), 结果见表 1。在 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下, 各化合物对乳腺癌细胞生长抑制率均小于 20%, 不影响细胞迁移。因此, 本实验采用的最大的化合物测试浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 。

表 1 各化合物对 MDA-MB-231 细胞生长率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 1 Effect of each compound on proliferation rate of MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

化合物	生长抑制率/%		
	1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
2a	3.3 $\pm$ 2.2	5.3 $\pm$ 4.7	6.4 $\pm$ 5.1
2b	3.9 $\pm$ 4.8	7.1 $\pm$ 5.9	11.2 $\pm$ 6.1
2c	8.7 $\pm$ 3.9	4.3 $\pm$ 3.7	9.9 $\pm$ 6.7
2d	4.4 $\pm$ 2.1	7.7 $\pm$ 5.6	10.1 $\pm$ 6.2
2e	7.3 $\pm$ 5.4	14.3 $\pm$ 7.1	37.4 $\pm$ 6.7
2f	5.5 $\pm$ 4.1	8.1 $\pm$ 5.7	15.2 $\pm$ 6.6
2g	4.9 $\pm$ 4.1	9.4 $\pm$ 5.0	6.6 $\pm$ 4.7
4a	9.7 $\pm$ 3.9	8.7 $\pm$ 6.3	22.4 $\pm$ 7.1
4b	9.9 $\pm$ 3.7	16.3 $\pm$ 7.7	41.3 $\pm$ 6.5
4c	4.3 $\pm$ 3.5	7.3 $\pm$ 4.1	6.8 $\pm$ 4.9
4d	10.3 $\pm$ 2.2	17.7 $\pm$ 8.7	56.4 $\pm$ 7.9

2.3.2 抗迁移实验 (划痕实验) 检测化合物抗肿瘤转移活性 根据细胞毒性实验结果, 设置空白组和实验组, 将所有化合物浓度梯度设置为 0.25~20.00 $\mu\text{mol/L}$ 。用胰蛋白酶消化 MDA-MB-231 细胞, 加入培养基终止消化, 计数调整细胞密度 1×10^5 个/mL, 然后用移液枪将吹打均匀的细胞悬液加入 6 孔细胞

培养板中, 每孔加入 2 mL 细胞悬液, 置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。24 h 后, 待细胞间空隙完全融合消失时, 用 10 μL 移液枪枪头在每个孔板底轻轻划一条直线, 使板底密铺的细胞当中出现一条空白带, 没有细胞存在的伤痕。将旧培养基弃去, 空白组加入 2 mL 完全培养基, 实验组中加入 2 mL 含药完全培养基, 每个化合物浓度设置 3 个平行的复孔。将 6 孔板置于显微镜下拍照, 记录划痕 0 h 时划痕状况和划痕宽度; 在培养箱中孵育 24 h, 再置于显微镜下拍照, 记录划痕状况和划痕宽度。使用 Image J 软件进行分析, SPSS 11.5 处理数据, 计算细胞相对迁移率 (细胞相对迁移率 = 加药组愈合距离/空白组愈合距离), 计算 IC₅₀ 值, 见表 2。在非细胞毒浓度下, 化合物 **2b**、**2e**、**2f**、**4a**、**4b**、**4d** 对 MDA-MB-231 细胞迁移具有确切的抑制活性, 化合物 **2e**、**4b**、**4d** 抗乳腺癌迁移活性较强, IC₅₀ 分别为 2.89、5.83、1.59 μmol/L, 其中化合物 **4d** 最强, 接近 PI3K 抑制剂阳性对照药物 LY294002^[9-10]。

表 2 各化合物对 MDA-MB-231 细胞迁移的影响
Table 2 Effect of each compound on migration of MDA-MB-231 cells

化合物	IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹)	化合物	IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹)
2a	>20.00	4a	17.33
2b	19.03	4b	5.83
2c	>20.00	4c	>20.00
2d	>20.00	4d	1.59
2e	2.89	LY294002	1.18
2f	18.13	11g	1.04
2g	>20.00		

3 讨论

本研究通过骨架跃迁以圆柚酮替换手性紫罗兰酮骨架设计合成一系列圆柚酮衍生物, 其中化合物 **2e**、**4b** 和 **4d** 具有较强的抗乳腺癌细胞迁移活性, 表明该类化合物抗肿瘤转移活性不依赖于细胞杀伤作用, 更验证了采用骨架跃迁的化合物设计思路是可行的。本研究以圆柚酮为原料即可制备目标生物碱衍生物, 合成路线较短, 合成便捷。原料圆柚酮含有天然手性源, 整个合成步骤手性原子不参与反应, 可保持构型不变, 不会产生任何对映异构

体。合成方法不足之处在于产物带有一定的碱性, 常规纯化方法损失较多, 产率低, 还需要优化产物的制备工艺和纯化方法。构效关系显示, 当连接圆柚酮母核的氮原子存在于芳香环内时, 化合物活性消失; 当氮原子取代基团较大时, 化合物活性较高。这可能与该类化合物更能充分占据靶点相关。本研究合成了具有抗肿瘤转移作用的圆柚酮生物碱衍生物, 为乳腺癌转移药物的开发提供了依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 祝纤纤, 全涛. β-紫罗兰酮的生物活性与其衍生物的构效关系研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(8): 101-108.
- [2] 马胜男. 转筋草紫罗兰酮型生物碱的抗肿瘤转移活性及作用机制 [D]. 天津: 天津医科大学, 2013.
- [3] Fang H J, Shou X A, Liu Q, *et al.* Synthesis and anti-metastatic effects of novel chiral ionone alkaloid derivatives [J]. *Eur J Med Chem*, 2015, 101: 245-253.
- [4] Liu J J, Liu X Y, Nie J P, *et al.* Discovery of antimetastatic chiral ionone alkaloid derivatives targeting HIF-1α/VEGF/VEGFR2 pathway [J]. *Chem Med Chem*, 2021, 16(13): 2130-2145.
- [5] Yuan R G, Han M Y, Fang J P, *et al.* Development of novel (+)-nootkatone thioethers containing 1,3,4-oxadiazole/thiadiazole moieties as insecticide candidates against three species of insect pests [J]. *Agric Food Chem*, 2021, 69(51): 15544-15553.
- [6] Tateba H, Morita K, Tada M. Photochemical reaction of nootkatone under various conditions [J]. *Chem Res Synopses*, 1992, 23(37): 274.
- [7] Barberis C, Voyer N, Roby J, *et al.* Rapid access to N-boc phenylglycine derivatives via benzylic lithiation reactions [J]. *Tetrahedron*, 2001, 57(15): 2965-2972.
- [8] Sun M, Cai S, Li P, *et al.* Design, synthesis and biological activity of bicyclic carboxamide derivatives as TRK inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem*, 2020, 28(23): 115811.
- [9] Zhai H Y, Zhao C, Zhang N, *et al.* Alkaloids from *Pachysandra terminalis* inhibit breast cancer invasion and have potential for development as antimetastasis therapeutic agents [J]. *J Nat Prod*, 2012, 75(7): 1305-1311.
- [10] Zhao C, Gan C C, Jin M N, *et al.* Antitumor metastasis pregnane alkaloids from *Pachysandra terminalis* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2014, 16(5): 440-446.

[责任编辑 解学星]