研究论文

8-羟基喹啉类选择性铜离子螯合剂的合成及其体外抗肿瘤活性

关颖祯[1]，何　燕[2]，刘　艳[1,3]*，MEUNIER Bernard[1,4]

（1. 广东工业大学轻工化工学院，广东广州 510006；2. 广东工业大学生物医药学院，广东广州 510006；
3. 广东省植物资源生物炼制重点实验室，广东广州 510006；4. Lab. de Chimie de Coordination du CNRS，法国图卢兹 31400）

摘要：肿瘤与人体内铜离子稳态失衡密切相关。为了开发高效低毒的新型铜离子螯合剂类抗肿瘤化合物，以 2- 甲基 -8- 羟基喹啉为起始物，经过 C-2 位羟醛缩合、消除反应、迈克尔加成等反应合成 5 种 8- 羟基喹啉衍生物。通过紫外滴定法研究目标化合物的铜离子螯合能力和选择性；通过 MTT 法测定其对人黑色素瘤细胞（A375 细胞和 Colo829 细胞）、人肺癌细胞（A549 细胞）、人肝癌细胞（HepG2 细胞）、人宫颈癌细胞（HeLa 细胞）及人永生化角质形成细胞（HaCaT 细胞）的细胞毒性。最终，得到安全性高于阳性对照品氟尿嘧啶（5-FU）的 TDMQ51 和 TDMQ53 这 2 个化合物，对铜和锌的络合常数相差达 13 个数量级，且对多种肿瘤细胞具有良好抑制活性，在提高抗肿瘤活性上具有改造潜力，可作为先导化合物进行深入研究。

关键词：8- 羟基喹啉；体外抗肿瘤活性；铜离子螯合剂；选择性

中图分类号：R96；TQ460.6　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2023)11-1578-08

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.11.006

Synthesis and *in vitro* Antitumor Activity of 8-Hydroxyquinoline-based Selective Copper Chelators

GUAN Yingzhen[1], HE Yan[2], LIU Yan[1,3]*, MEUNIER Bernard[1,4]

(*1. School of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006; 2. School of Biomedical and Pharmaceutical Sciences, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006; 3. Guangdong Provincial Key Lab. of Plant Resources Biorefinery, Guangzhou 510006; 4. Lab. de Chimie de Coordination du CNRS, Toulouse 31400*)

ABSTRACT: Tumor is closely related to the copper disorder in human body. In order to discover new copper ion chelating antitumor compounds, five 8-hydroxyquinoline derivatives were synthesized by C-2 aldol condensation, elimination and Michael reaction with 2-methyl-8-hydroxyquinoline as the starting material. The copper ion chelating ability and selectivity were studied by ultraviolet titration. And their cytotoxicity against human melanoma cells (A375 cells and Colo829 cells), human lung cancer cells (A549 cells), human liver cancer cells (HepG2 cells), human cervical cancer cells (HeLa cells) and human immortalized keratinocytes (HaCaT cells) was determined by MTT assay. Finally, two compounds TDMQ51 and TDMQ53 showed higher safety than the positive control fluorouracil (5-FU), while the complexation constants for copper and zinc differed by 13 orders of magnitude. These two compounds could be studied intensively as lead compounds owing to the good inhibitory activity to a wide variety of tumor cells.

Key Words: 8-hydroxyquinoline; *in vitro* antitumor activity; copper ion chelating agent; selectivity

肿瘤的发生发展与人体内铜离子代谢密切相关。患者体内肿瘤组织及血清中的铜离子显著升高，可促进血管生成、细胞增殖、肿瘤生长及转移[1]。喹啉衍生物作为铜离子螯合剂，通过阻断细胞周期、诱导细胞凋亡、抑制血管生长、阻止细胞迁移、激活免疫反应等多种机制，表现出良好的抗肿瘤效

收稿日期：2023-04-05

基金项目：国家自然科学基金项目(21977019)、广东省植物资源生物炼制重点实验室项目(2021B1212040011)、深圳市科技计划基金项目(2020N116)

作者简介：关颖祯(1997—)，女，硕士，从事新型铜离子螯合剂的合成以及作用机制研究。

通信作者：刘　艳(1980—)，女，教授，从事基于靶点的药物设计合成、药效评价和作用机制研究。

E-mail：yanliu@gdut.edu.cn

果[2]。其中，铜离子螯合剂氯碘羟喹和氯喹（图 1）曾作为抗肿瘤候选药物进入多项临床试验，因缺乏对铜离子的专一性，产生严重不良反应，已被淘汰。人体必需的金属元素有 14 种，其中锌元素是人体内最丰富的非氧化还原活性金属离子，参与了体内接近 25%的金属蛋白生理过程，发挥着物质转换和能量交换的作用[3—4]。由此可见，理想的铜离子螯合剂类抗肿瘤药物，对体内其他重要金属离子，尤其是锌离子，应不产生影响。因此，亟需新思路进行药物设计和结构优化，以获得低毒高效的苗头化合物。

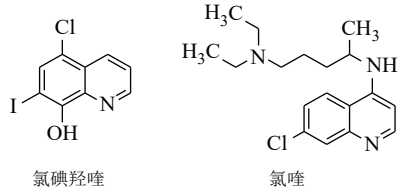
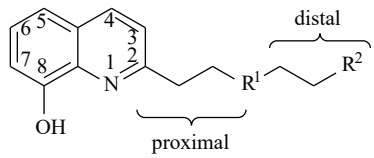


图 1 氯碘羟喹和氯喹的化学结构式

Fig.1 Chemical Structures of Clioquinol and Chloroquine

本课题组在前期研究中已开发了系列喹啉类小分子螯合剂[5—10]，表现出良好的潜力：①对铜离子螯合能力强，对体内其他金属离子的络合能力较弱；②不影响体内载铜蛋白和其他重要金属蛋白的功能。在此基础上，根据铜离子的配位特点和软硬酸碱（HSAB）理论，以 8- 羟基喹啉为母核，通过在 C-2 位引入柔性侧链及配位原子，设计合成了 5 个新型、具有 4 配位螯合作用的 TDMQ（Tetra-Dentate-Mono-Quinolines）系列喹啉衍生物 TDMQ51 ～ TDMQ55（化学结构如图 2 所示）。铜离子易与氮、硫原子配位，因此在螯合剂中引入氮、硫原子，可提高其对铜离子的螯合能力。

TDMQ51 ～ TDMQ55 的合成路线如图 3 所示。以 2- 甲基 -8- 羟基喹啉（**1**）为原料，在正丁基锂作用下与多聚甲醛进行羟醛缩合反应，得到 2-（2- 羟乙基）-8- 羟基喹啉（**2**）。**2** 的 C-2 侧链羟基与甲磺酰氯发生磺酰化反应，在碱性条件下进一步发生消除反应，得 2- 乙烯基 -8- 羟基喹啉（**3**）[10]。**3** 与 2-



TDMQ51 R^1=S R^2=$N(CH_3)_2$
TDMQ52 R^1=S R^2=NH_2
TDMQ53 R^1=NH R^2=SCH_3
TDMQ54 R^1=S R^2=SCH_3
TDMQ55 R^1=S R^2=SH

图 2 TDMQ 系列目标化合物的化学结构式

Fig.2 Chemical Structures of TDMQ Target Compounds

二甲基氨基乙硫醇[11]进行迈克尔加成反应，得到 TDMQ51。由于 TDMQ51 呈油状、水溶性差，进一步与盐酸成盐，得淡黄色固体，即 TDMQ51 盐酸盐。采用相似的方法，将 **3** 分别与 2- 氨基乙硫醇、2-（甲硫基）乙胺、2-（甲硫基）乙硫醇[12]、1,2- 乙二硫醇反应，合成了 TDMQ52 ～ TDMQ55。TDMQ51 ～ TDMQ55 均经 ^{1}H NMR、^{13}C NMR、IR 和 HRMS 进行了结构确证。

参照文献[5—10]，测定 TDMQ51 ～ TDMQ55 与 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 络合的化学计量比。

以 TDMQ51 为例，向 TDMQ51（15 μmol/L）中分别加入不同当量的铜离子，使其发生快速络合反应。TDMQ51 与铜离子络合的紫外 - 可见光谱吸收及其吸收光谱变化规律如图 4A 所示。TDMQ51 在 245 nm 处有特征吸收，随着铜离子量的增加，该处的吸光值不断减弱。当加入 1.0 当量的铜离子时，TDMQ51 与铜离子的络合达到平衡，245 nm 处的吸光值不再变化。此外，Cu^{2+}-TDMQ51 络合物的特征吸收波长在 262、329 和 375 nm 处，随着铜离子的增加，这 3 处的吸光度不断增强。当铜离子的量超过 1.0 当量时，262、329 和 375 nm 处的吸光度不再变化。通过作出在 375 nm 波长处 Cu^{2+} 与 TDMQ51 的物质的量比值和紫外吸光度值的变化（图 4A）可知，TDMQ51 与铜离子配位的化学计量比为 1 ∶ 1。

向 TDMQ51（15 μmol/L）中分别加入不同当量的锌离子，TDMQ51 与锌离子络合的紫外 - 可见光吸收光谱及光谱变化规律如图 4B 所示。TDMQ51

在 245 nm 处的特征吸收峰随着锌离子量的增加而不断减弱。此外，Zn^{2+}-TDMQ51 络合物的特征吸收波长为 262 和 372 nm，随着锌离子的加入，这 2 处的吸光值不断增强。当锌离子的量达到 30.0 当量时，络合物的吸光值趋于稳定，TDMQ51 与锌离子配位的化学计量比大于 1 ∶ 30，表明 TDMQ51 与锌离子的络合能力较弱。

同法测得 TDMQ52 ～ TDMQ55 与铜离子的络合比分别为 1 ∶ 1、1 ∶ 1、1 ∶ 1 和 2 ∶ 1；TDMQ52 ～ TDMQ55 与锌离子的络合比分别为 1 ∶ 30、1 ∶ 5、1 ∶ 30 和 1 ∶ 1。

参照文献[5—10]，以紫外滴定法研究并测定 TDMQ52 ～ TDMQ55 与铜离子、锌离子的络合能力和选择性。

以 TDMQ51 为例，当加入竞争性螯合剂 EDTA 后，部分铜离子会被竞争性螯合剂夺

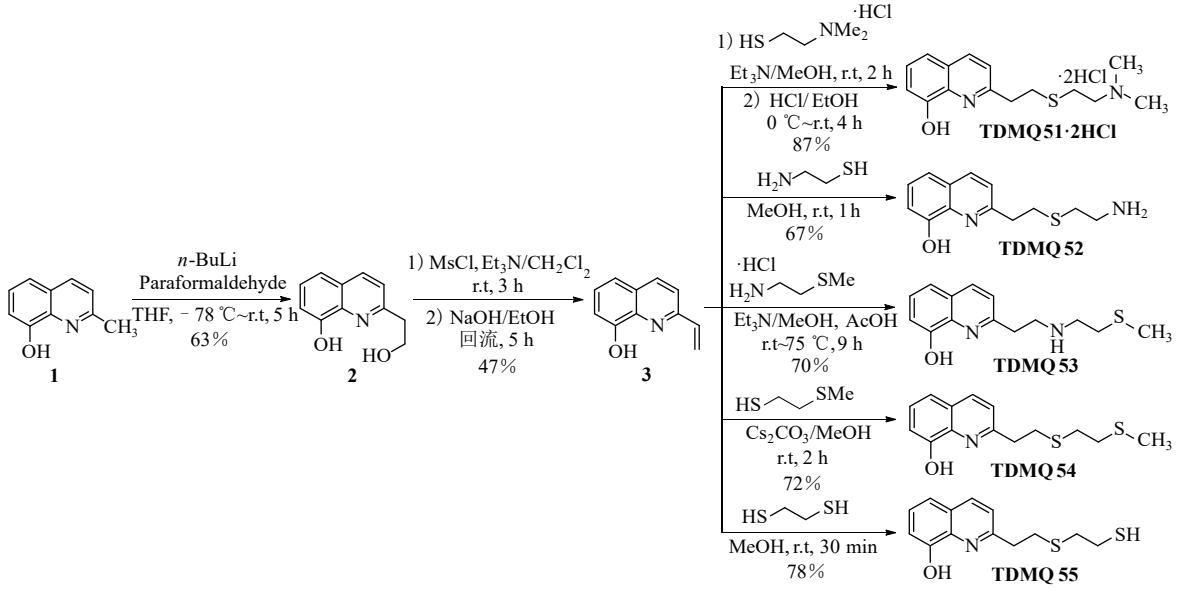


图 3　TDMQ51 ～ TDMQ55 的合成路线

Fig.3　Synthetic Routes of TDMQ51 - TDMQ55

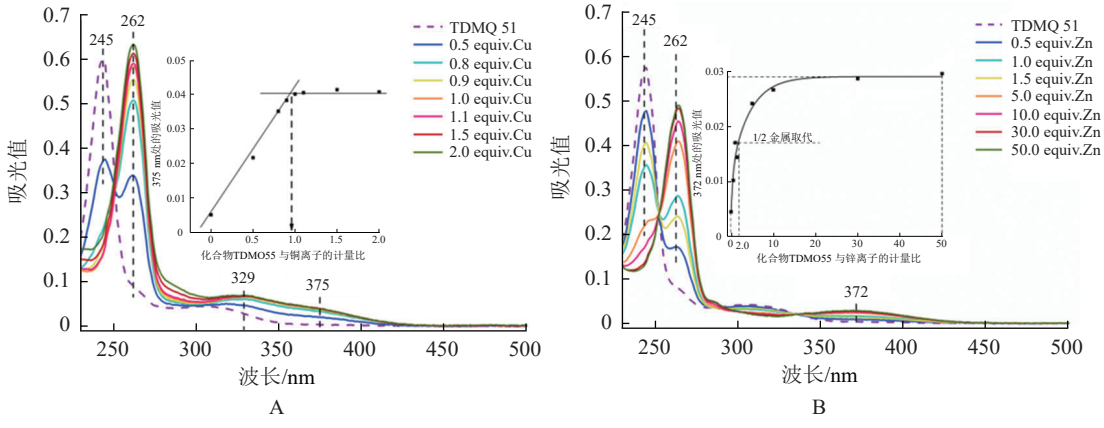


图 4　紫外 - 可见光谱法测试化合物 TDMQ51 与铜离子（A）和锌离子（B）的计量比

Fig.4　The Stoichiometry of TDMQ51 with Cu^{2+} and Zn^{2+} by UV-Vis Spectroscopy

走。当 TDMQ51、Cu、EDTA 的物质的量比约为 1 ∶ 1 ∶ 1 时，达到平衡。在 332 nm 处，测得 58 % 的铜离子与 TDMQ51 络合，EDTA 夺取了 42 % 的铜离子（图 5）。参照文献[5]计算，TDMQ51 与铜离子的络合常数（log K_{app}）为 16.2。

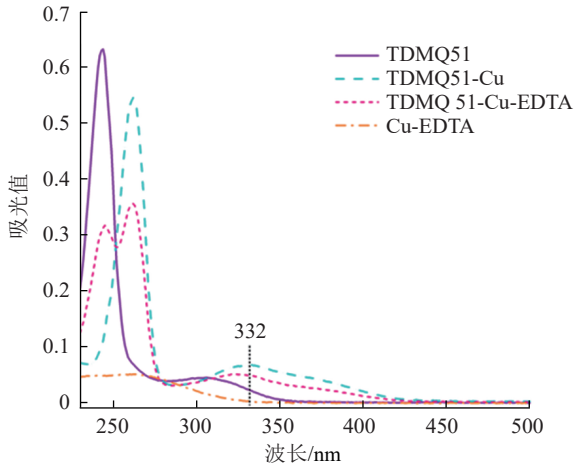


图 5 紫外 - 可见光谱法确定化合物 TDMQ51 与铜离子的络合常数（logK_{app}）

Fig.5 Determination of Complexation Constant (logK_{app}) of Cu^{2+}-TDMQ51 by UV-Vis Spectroscopy

同样，采用紫外滴定法研究并测定 TDMQ51 ～ TDMQ55 与锌离子的络合能力。试验结果表明，TDMQ51 ～ TDMQ54 对锌离子的络合能力较弱，参考文献[5]计算得 log K_{app} 为 4.4 ～ 5.8；但 TDMQ55 与锌离子的络合常数为 12.6。推测原因是 TDMQ55 与锌离子配位的模式不同，配位的化学计量比为 1 ∶ 1，属于强络合导致的。

比较 TDMQ51 ～ TDMQ55 与铜离子、锌离子的络合常数，以及络合选择性［Cu^{2+}/Zn^{2+} 络合选择性 =logK_{app}(Cu^{2+}-TDMQ) - logK_{app}(Zn^{2+}-TDMQ)］，结果如表 1 所示。

表 1 TDMQ51 ～ TDMQ 55 对铜离子或锌离子的络合常数及络合选择性

Tab.1 Complexation Constants with Cu^{2+} or Zn^{2+} and Complexation Selectivity of TDMQ51 - TDMQ55

化合物代号	R^1	R^2	logK_{app}[M^{2+}-L]		络合选择性
			M=Cu^{2+}	M=Zn^{2+}	
TDMQ51	S	$N(CH_3)_2$	16.2	4.4	11.8
TDMQ52	S	NH_2	15.6	5.5	10.1
TDMQ53	NH	SCH_3	18.4	5.8	12.6
TDMQ54	S	SCH_3	9.2	4.5	4.7
TDMQ55	S	SH	21.5	12.6	8.9

由表 1 可知，TDMQ54 与铜离子的络合常数为 9.2，对锌离子的络合常数则为 4.5，只相差 5 个数量级。TDMQ55 与铜离子的络合常数为 21.5，对锌离子的为 12.6，对 2 种金属都有较强的络合能力，作为铜离子螯合剂使用时可能会导致锌离子紊乱。而 TDMQ51 ～ 53，与铜离子的络合常数为 15.6 ～ 18.4（络合较强），同时与锌离子则为 4.4 ～ 5.8（络合较弱），展现出对铜离子较强的选择性螯合作用，有望开发成铜离子特异性螯合的小分子药物。

采用 MTT 法，以氟尿嘧啶（5-FU）为阳性对照药，测定 5 种目标化合物（TDMQ51 ～ TDMQ55）对人黑色素瘤细胞（A375 细胞和 Colo829 细胞）、人肺癌细胞（A549 细胞）、人肝癌细胞（HepG2 细胞）、人宫颈癌细胞（HeLa 细胞）及人永生化角质形成细胞（HaCaT 细胞）作用 48 h 后的细胞生长抑制活性，IC_{50} 结果如表 2 所示。

表 2 TDMQ51 ～ TDMQ 55 对 5 种肿瘤细胞系及 1 种正常细胞的体外抗增殖活性[1)]

Tab.2 Anti-proliferative Activity of TDMQ51 - TDMQ55 against Five Cancer and One Normal Cell Lines

化合物代号	R^1	R^2	IC_{50}/(μmol·L^{-1})					
			A375细胞	A549细胞	Colo829细胞	HeLa细胞	HepG2细胞	HaCaT细胞
TDMQ51	S	$N(CH_3)_2$	>100	52.1±2.9	30.6±5.9	28.2±1.6	>100	86.0±1.6
TDMQ52	S	NH_2	>100	>100	>100	87.6±8.8	>100	50.6±3.0
TDMQ53	NH	SCH_3	49.8±5.3	>100	70.2±3.3	76.9±9.0	>100	70.2±6.7
TDMQ54	S	SCH_3	74.1±2.5	>100	>100	>100	>100	81.0±6.0
TDMQ55	S	SH	12.4±2.1	30.5±1.7	16.3±3.0	>100	48.9±2.8	14.8±1.1
5-FU			68.5±4.0	72.6±10.0	48.7±0.7	20.3±4.6	46.7±4.7	30.0±2.7

注：[1)]IC_{50} 为至少 3 组独立试验的平均值。

由表 2 可知，TDMQ51 ～ TDMQ54 对 HaCaT 细胞的毒性均低于 5-FU，具有较好的安全性。TDMQ51 对 A549 细胞、Colo829 细胞和 HeLa 细胞表现出良好的体外抑制活性，且对 A549 细胞和 Colo829 细胞的抑制均优于 5-FU。将 TDMQ51 的 C-2 位柔性侧链 R^2 位置上的二甲基氨基转换为氨基、甲硫基所得的 TDMQ52 和 54，其抗肿瘤增殖活性均显著下降。TDMQ52 仅对 HeLa 细胞有活性且明显弱于 5-FU，TDMQ54 仅对 A375 细胞有活性且弱于 5-FU。表明侧链末端的二甲基氨基对于提高化合物的细胞毒性具有重要作用。将 TDMQ51 侧链近端的硫原子转换为氮原子、远端的二甲基氨基改造为甲硫基所得到的 TDMQ53，对多种肿瘤细胞株具有抗增殖活性，对 A375 细胞的抑制活性优于 5-FU。将 TDMQ51 的远端二甲基氨基替换为巯基所得到的 TDMQ55，对 A375 细胞、Colo829 细胞、A549 细胞和 HepG2 细胞的抑制活性均显著提高，表明端基位置的巯基有利于增强细胞毒性。然而，巯基的引入使得化合物对于正常的 HaCaT 细胞的毒性也增加。

综上所述，TDMQ51 和 TDMQ53 这 2 个化合物具有良好的铜离子选择性，对特定肿瘤细胞具有高于阳性对照品（5-FU）的体外增殖抑制活性，且安全性显著，因此在提高抗肿瘤活性上具有改造潜力，可作为先导化合物进行深入研究。

实验部分

AVANCE Ⅲ HD 型 400 MHz 超导核磁共振仪［德国布鲁克（Bruker）光谱仪器公司］；Q Exactive 型静电场轨道阱质谱仪、Nicolet 6700 型红外光谱仪和 Evolution 300 型紫外可见分光光度计（美国赛默飞世尔科技公司）；vario EL cube 型元素分析仪［德国元素（Elementar）公司］；JH 30 型熔点仪（上海佳航仪器仪表有限公司）；SpectraMax Paradigm 型酶标仪（美国美谷分子仪器有限公司）。

A375 细胞、A549 细胞、HeLa 细胞、HepG2 细胞和 Hacat 细胞［中国科学院细胞库（中国武汉）］；Colo829 细胞（美国模式培养物集存库）。

2-（2- 羟乙基）-8- 羟基喹啉（2）

－ 78 ℃在氩气保护下，将 1.6 mol/L 正丁基锂的正己烷溶液（23.5 mL，37.5 mmol）滴加到 2- 甲基 -8- 羟基喹啉（2 g，12.5 mmol）的四氢呋喃溶液（30 mL）中，剧烈搅拌 2 h 后，加入多聚甲醛（1.5 g，50.0 mmol），继续搅拌 3 h；然后升至室温，用饱和氯化铵水溶液淬灭反应。所得混合物用二氯甲烷（50 mL×3）萃取，有机相经无水硫酸钠干燥后过滤，滤液减压浓缩得白色油状物，即粗品，经硅胶柱色谱［洗脱剂：二氯甲烷和甲醇（体积比 60 ∶ 1）］分离纯化，得白色固体 **2**（1.5 g，63％）。^{1}H NMR（400 MHz, $CDCl_3$）δ: 8.04（d, *J*=8.4 Hz, 1H），7.38（t, *J*=7.9 Hz, 1H），7.29（t, *J*=8.4 Hz, 2H），7.16（d, *J*=7.6 Hz, 1H），4.13（t, *J*=6.0 Hz, 2H），3.20（t, *J*=6.0 Hz, 2H）。

2- 乙烯基 -8- 羟基喹啉（3）

0 ℃下依次将三乙胺（10.2 mL，75.0 mmol）和甲磺酰氯（3.5 mL，45.0 mmol）加至 **2**（2.8 g，15.0 mmol）的二氯甲烷（30 mL）溶液中，搅拌反应 3 h 后减压浓缩，将剩余物溶于乙醇（15 mL）中，加入 4 mol/L 氢氧化钠水溶液（3.8 mL），升温至回流搅拌反应 5 h，降至室温后用 1 mol/L 盐酸调至 pH 7 左右，用二氯甲烷（50 mL×3）萃取，有机相经无水硫酸钠干燥后过滤，滤液减压浓缩得淡黄色油状物，即粗产物，经硅胶柱色谱［洗脱剂：二氯甲烷和正己烷（体积比 1 ∶ 80）］分离纯化，得白色固体 **3**（1.2 g，47％）。^{1}H NMR（400 MHz, $CDCl_3$）δ: 8.10（d, *J*=8.4 Hz, 1H），7.58（d, *J*=8.4 Hz, 1H），7.41（t, *J*=7.6 Hz, 1H），7.30（dd, *J*=8.0、1.2 Hz, 1H），7.16（dd, *J*=7.6、1.2 Hz, 1H），7.00（dd, *J*=17.6、10.8 Hz, 1H），6.32（dd, *J*=17.6、0.8 Hz, 1H），5.65（dd, *J*=10.8、0.8 Hz, 1H）。

［2-［2-（二甲胺基）乙基］硫乙基］-8- 羟基喹啉（TDMQ51）

将 2- 二甲基氨基硫乙醇盐酸盐[11]（410 mg，2.90 mmol）、三乙胺（400 μL）和甲醇（1 mL）混合，滴加含 **3**（100 mg，0.58 mmol）的甲醇溶液（3 mL），反应 2 h。反应液用二氯甲烷（50 mL×3）萃取，有机相经无水硫酸钠干燥后过滤，滤液减压浓缩得淡黄色油状物，即粗产物，经硅胶柱色谱［洗脱剂：二氯甲烷和甲醇（体积比 50 ∶ 1）］分离纯化，得白色油状物 TDMQ51（140 mg，87％）。

^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ: 8.20 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 7.45 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 7.33 ～ 7.39 (m, 2H), 7.07 (dd, *J*=6.8、2.0 Hz, 1H), 3.20 (t, *J*=7.2 Hz, 2H), 3.08 (t, *J*=7.6 Hz, 2H), 2.62 (t, *J*=6.8 Hz, 2H), 2.41 (t, *J*=8.0 Hz, 2H), 2.12 (s, 6H)；^{13}C NMR (DMSO-d_6, 100 MHz) δ: 158.5, 152.6, 137.7, 136.2, 127.3, 126.7, 122.3, 117.5, 111.0, 59.0, 44.8, 38.2, 30.5, 29.0。

[2-[2-(二甲胺基)乙基]硫乙基]-8-羟基喹啉盐酸盐 (TDMQ51·2HCl)

0 ℃下向 TDMQ51 (140 mg，0.5 mmol) 中加入 10 mol/L 氯化氢的乙醇溶液 (2.5 mL，2.5 mmol)，搅拌 4 h 后，升至室温。反应液经无水硫酸钠干燥后过滤，滤液减压浓缩得淡黄色固体 TDMQ51·2HCl (120 mg，76%)。mp 138 ～ 140 ℃。^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ: 11.86 (s, 1H), 11.06 (s, 1H), 8.93 (d, *J*=8.8 Hz, 1H), 8.05 (d, *J*=8.8 Hz, 1H), 7.64 ～ 7.70 (m, 2H), 7.54 (d, *J*=6.0 Hz, 1H), 3.58 (t, *J*=7.2 Hz, 2H), 3.25 ～ 3.30 (m, 2H), 3.11 (t, *J*=7.6 Hz, 2H), 3.00 (t, *J*=8.4 Hz, 2H), 2.76 (d, *J*=4.8 Hz, 6H)；^{13}C NMR (DMSO-d_6, 100 MHz) δ: 158.7, 148.7, 144.8, 129.5, 128.3, 123.4, 118.2, 116.0, 55.5, 41.8, 33.8, 29.7, 24.4；IR (KBr) ν/cm^{-1}: 3 376, 3 030, 2 882, 2 779, 1 639, 1 608, 1 598, 1 464, 1 405, 1 388, 1 309, 1 153, 1 021, 851, 758；HRMS (*m*/*z*): 277.137 5[M+H]$^+$。元素分析 ($C_{15}H_{20}N_2OS·2HCl·0.8H_2O$) 实测值 (理论值，%): C 49.42 (49.53), H 6.62 (6.54), N 7.54 (7.70)。

2-[2-(2-胺基乙基)硫乙基]-8-羟基喹啉 (TDMQ52)

室温向含 **3** (100 mg，0.58 mmol) 的甲醇溶液 (2 mL) 加入 2-氨基乙硫醇 (44.8 mg，1.17 mmol) 的甲醇溶液 (1 mL)，搅拌反应 1 h。反应液用二氯甲烷 (50 mL×3) 萃取，有机相经无水硫酸钠干燥后过滤，滤液减压浓缩得棕色油状物，即粗产物，经硅胶柱色谱 [洗脱剂：二氯甲烷和甲醇 (体积比 50 ∶ 1)] 分离纯化，得到棕色固体 TDMQ52 (97 mg，67%)。mp 110 ～ 112 ℃。^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ: 8.22 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 7.47 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 7.33 ～ 7.40 (m, 2H), 7.06 (dd, *J*=6.8、2.0 Hz, 1H), 3.20 (t, *J*=7.6 Hz, 2H), 3.06 (t, *J*=8.4 Hz, 2H), 2.72 (t, *J*=6.8 Hz, 2H), 2.60 (t, *J*=6.8 Hz, 2H)；^{13}C NMR (DMSO-d_6, 100 MHz) δ: 158.7, 152.5, 137.8, 136.4, 127.4, 126.8, 122.4, 117.7, 111.1, 41.3, 38.3, 34.9, 30.1；IR (KBr) ν/cm^{-1}: 3 376, 3 303, 3 046, 2 960, 2 923, 2 851, 1 597, 1 567, 1 504, 1 464, 1 437, 1 378, 1 338, 1 318, 1 263, 1 245, 1 197, 1 089, 1 072, 1 040, 849, 835, 802, 749, 722；HRMS (*m*/*z*): 249.105 6[M+H]$^+$。

2-[2-[2-(甲硫基)乙胺基]乙基]-8-羟基喹啉 (TDMQ53)

室温下，向 2-(甲硫基)乙胺盐酸盐 (448 mg，3.51 mmol) 的甲醇溶液 (2 mL) 中，滴加三乙胺 (0.5 mL，4.21 mmol) 的甲醇溶液 (3 mL)，搅拌反应 2 h 后，滴加含 **3** (200 mg，1.17 mmol) 的甲醇溶液 (5 mL) 和乙酸 (35 μL)，于 75 ℃反应 7 h。反应液用二氯甲烷 (50 mL×3) 萃取，有机相经无水硫酸钠干燥后过滤，滤液减压浓缩得棕色油状物，即粗产物，经硅胶柱色谱 [洗脱剂：二氯甲烷和甲醇 (体积比 30 ∶ 1)] 分离纯化，得黄色固体 TDMQ53 (210 mg，70%)。mp 188 ～ 190 ℃。^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ: 8.26 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 7.47 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 7.36 ～ 7.42 (m, 2H), 7.11 (dd, *J*=6.8、1.6 Hz, 1H), 3.52 (t, *J*=6.8 Hz, 2H), 3.35 (t, *J*=6.8 Hz, 2H), 3.15 (t, *J*=7.2 Hz, 2H), 2.82 (t, *J*=8.0 Hz, 2H), 2.10 (s, 3H)；^{13}C NMR (DMSO-d_6, 100 MHz) δ: 156.5, 152.6, 137.5, 136.6, 127.5, 126.9, 122.3, 117.7, 111.6, 46.1, 45.2, 33.7, 29.2, 14.5；IR (KBr) ν/cm^{-1}: 3 383, 2 996, 2 947, 2 918, 2 786, 2 661, 2 451, 1 573, 1 509, 1 470, 1 450, 1 436, 1 333, 1 302, 1 267, 1 235, 1 197, 1 176, 1 144, 994, 831, 756, 748, 638；HRMS (*m*/*z*): 263.121 3[M+H]$^+$。

2-[2-[2-(甲硫基)乙基]硫乙基]-8-羟基喹啉 (TDMQ54)

室温将碳酸铯 (488 mg，1.50 mmol)、2-(甲硫基)乙硫醇 [12] (162 mg，1.50 mmol) 和甲醇 (0.5 mL) 混合，滴加含 2-乙烯基-8-羟基喹啉 (50 mg，0.3 mmol) 的甲醇溶液 (2 mL)，反应 2 h。反应液用二氯甲烷 (50 mL×3) 萃取，有机相经无水硫酸钠干燥后过滤，滤液减压浓缩得棕色油状物，即粗产物，经硅胶柱色谱 [洗脱剂：正己烷和乙酸乙酯 (体积比

30 ∶ 1)] 分离纯化，得黄色油状 TDMQ54(60 mg，72%)。^{1}H NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ: 8.07(d, *J*=8.4 Hz, 1H), 7.40(d, *J*=7.6 Hz, 1H), 7.28 ～ 7.33(m, 2H), 7.15(dd, *J*=7.6、1.2 Hz, 1H), 3.26(t, *J*=7.2 Hz, 2H), 3.08(t, *J*=7.2 Hz, 2H), 2.66 ～ 2.81(m, 4H), 2.12(s, 3H)；^{13}C NMR($CDCl_3$, 100 MHz) δ: 158.2, 151.9, 137.8, 136.6, 127.2, 127.1, 122.4, 117.8, 110.1, 38.6, 34.3, 32.1, 31.4, 15.8；IR(KBr) *v*/cm^{-1}: 3 394, 2 915, 1 599, 1 572, 1 561, 1 505, 1 470, 1 437, 1 366, 1 317, 1 246, 1 201, 834, 754, 723, 600, 577, 463, 419；HRMS(*m*/*z*): 280.082 4[M+H]$^+$。

2-[2-(2-巯基乙基)硫乙基]-8-羟基喹啉(TDMQ55)

室温向含 **3**(100 mg，0.58 mmol) 的甲醇溶液(2 mL) 中，加入 1,2- 乙二硫醇 (105 μL，1.17 mmol)，搅拌反应 30 min。反应液用二氯甲烷 (50 mL×3) 萃取，有机相经无水硫酸钠干燥后过滤，滤液减压浓缩得棕色油状物，即粗产物，经硅胶柱色谱 [洗脱剂：乙酸乙酯和正己烷 (体积比 1 ∶ 25)] 分离纯化，得黄色油状 TDMQ55(113 mg，78%)。^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ: 8.09(d, *J*=8.4 Hz, 1H), 7.41(dd, *J*=8.4、7.6 Hz, 1H), 7.33(d, *J*=8.0Hz, 1H), 7.30(dd, *J*=8.4、1.2 Hz, 1H), 7.16(dd, *J*=7.6、1.2 Hz, 1H), 3.24 ～ 3.28(m, 2H), 3.06 ～ 3.10(m, 2H), 2.79 ～ 2.83(m, 2H), 2.70 ～ 2.74(m, 2H), 1.72(t, *J*=7.5 Hz, 1H)；^{13}C NMR($CDCl_3$, 100 MHz) δ: 158.0, 151.8, 137.7, 136.5, 127.1, 127.1, 122.3, 117.7, 110.1, 38.5, 36.5, 31.1, 24.8；IR(KBr) *v*/cm^{-1}: 3 349, 3 046, 2 914, 2 553, 1 599, 1 572, 1 504, 1 469, 1 429, 1 420, 1 397, 1 370, 1 311, 1 242, 1 227, 1 183, 1 154, 1 133, 1 086, 1 045, 879, 833, 802, 748, 724, 690, 598, 576, 544, 495, 471, 413；HRMS(*m*/*z*): 266.066 8[M+H]$^+$。

紫外 - 可见光 (UV-Vis) 光谱法测定 TDMQ51 ～ TDMQ55 与铜、锌离子的络合能力

在 HCl(20 mmol) 的 NaCl(150 mmol) 缓冲溶液 (pH 为 7.4) 和甲醇溶液 (体积比 1 ∶ 1) 中进行。用 3 mol/L 氯化铜、3 mol/L 氯化锌溶液对 TDMQ51 ～ TDMQ55 进行紫外滴定试验，测试其与铜、锌离子的络合计量比。

① TDMQ51 ～ TDMQ54 与铜离子、TDMQ55 与锌离子的络合计量比为 1 ∶ 1，为强络合，使用竞争性螯合剂 [1,2- 环己二胺四乙酸 (CDTA)、EDTA、乙二胺 -*N*,*N*′- 二乙酸 (EDDA) 或次氮基三乙酸 (NTA)] 进行络合常数的测定[5—10]。竞争性螯合剂与铜、锌离子的络合常数根据数据库[5] 可　知：$\log K_{app(EDTA\text{-}Cu)}$=15.9，$\log K_{app(EDTA\text{-}Zn)}$=13.6，$\log K_{app(CDTA\text{-}Cu)}$=17.0，$\log K_{app(EDDA\text{-}Cu)}$=14.1，$\log K_{app(NTA\text{-}Cu)}$=10.3。

② TDMQ55 对铜离子的络合计量比为 2 ∶ 1，为强络合，使用竞争性螯合剂 EDTA 进行测试[5—10]。

$$\log K_{app[Cu-(TDMQ55)_2]}=\log K_{app(Cu\text{-}EDTA)}-\log\left(\frac{(1-x)\cdot(1-2x)^2}{x^2}\cdot c_0\right)$$

式中，c_0 为体系中铜离子的起始浓度；*x* 表示体系中与化合物进行络合的铜离子的百分比，通过作出铜离子 -TDMQ55 复合物 [Cu-(TDMQ55)$_2$] 的物质的量与吸光度 (*D*) 值的关系图，得到线性关系式，再将选定波长下的 $D_{L\text{-}Cu\text{-}C}$ 带入所得的线性关系式即可知 *x*[13]。

③ TDMQ51 ～ TDM54 与锌离子为弱络合，采用紫外滴定法测定 TDMQ51 ～ TDM54 与锌离子的络合常数。

抗肿瘤活性测试

取对数生长期的 A375 细胞、Colo829 细胞、A549 细胞、HepG2 细胞、HeLa 细胞、HaCaT 细胞进行细胞消化、计数，接种到 96 孔板中 (37 ℃，5% CO_2) 孵育 24 h，待其贴壁。加入用培养基稀释好的 TDMQ51 ～ TDMQ55，即将待测样品以 100、50、25、12.5、6.25、3.125 μmol/L 的浓度加至 96 孔板中，每个浓度设 3 个复孔。另设空白对照组和阳性对照 (5-FU) 组。化合物与细胞孵育 48 h 后，每孔加入 0.5 mg/mL 的 MTT(100 μL)，继续孵育 4 h，吸弃液体，剩余物中加入 DMSO(150 μL)，摇匀，使用酶标仪测定 570 nm 下的加药孔、空白孔和对照孔的吸光度值，通过 GraphPad Prism 8 软件计算 IC_{50} 值。试验重复至少 3 次。

参考文献：

[1] LUCA A D, BARILE A, ARCIELLO M, *et al*. Copper homeostasis as target of both consolidated and innovative strategies of anti-tumor therapy [J]. *J Trace Elem Med and Biol*, 2019, **55**: 204-213.

[2] CHU X M, WANG C, LIU W, *et al*. Quinoline and quinolone dimers and their biological activities: an overview [J]. *Eur J Med Chem*, 2019, **161**: 101-117.

[3] XU L Y, XU J L, ZHU J W, *et al*. Universal anticancer Cu(DTC)2 discriminates between thiols and Zinc(Ⅱ) thiolates oxidatively [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, **58**(18): 6070-6073.

[4] SCHMALEN I, REISCHL S, WALLLACH T, *et al*. Interaction of circadian clock proteins CRY1 and PER2 is modulated by Zinc binding and disulfide bond formation [J]. *Cell*, 2014, **157**(5): 1203-1215.

[5] ZHANG W X, HUANG D Y, HUANG M J, *et al*. Preparation of tetradentate copper chelators as potential anti-alzheimer agents [J]. *ChemMedChem*, 2018, **13**(7): 684-704.

[6] LI Y Z, NGUYEN M, VENDIER L, *et al*. X-ray diffraction structure of Cu(Ⅱ) and Zn(Ⅱ) complexes of 8-aminoquinoline derivatives (TDMQ), related to the activity of these chelators as potential drugs against Alzheimer's disease [J]. *J Mol Struct*, 2022, **1251**: 132078.

[7] LIU Y, NGUYEN M, ROBERT A, *et al*. Metal ions in Alzheimer's disease: a key role or not? [J]. *Acc Chem Res*, 2019, **52**(7): 2026-2035.

[8] HUANG J, NGUYEN M, LIU Y, *et al*. Synthesis and characterization of 8-aminoquinolines, substituted by electron donating groups, as high-affinity copper chelators for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *C R Chim*, 2019, **22**(5): 419-427.

[9] HUANG D Y, LI Y Z, LIU Y, *et al*. Synthesis and chelation selectivity evaluation of 8-aminoquinoline derivatives as copper chelator [J]. *Chin J Org Chem*, 2019, **39**(2): 500-506.

[10] LI Y Z, LOUREIRO A, NGUYEN M, *et al*. Synthesis and antimalarial activities of new hybrid atokel molecules [J]. *ChemistryOpen*, 2022, **11**(5): e202200064.

[11] BERNARDES G J L, CHALKER J M, ERREY J C, *et al*. Facile conversion of cysteine and alkyl cysteines to dehydroalanine on protein surfaces: versatile and switchable access to functionalized proteins [J]. *J Am Chem Soc*, 2008, **130**(15): 5052-5053.

[12] SCHEVENELS F T, SHEN M, SNYDER S A. Alkyldisulfanium salts: isolable, electrophilic sulfur reagents competent for polyene cyclizations [J]. *Org Lett*, 2017, **19**(1): 2-5.

[13] ROGACHEV I, GUSIS V, GUSIS A, *et al*. Spectrophotometric determination of copper complexation properties of new amphiphilic dithiocarbmates [J]. *React Funct Polym*, 1999, **42**(3): 243-254.