

一类新型小檗碱衍生物的合成与生理活性

蒋小飞¹, 刘九辉¹, 李虎¹, 张伟², 骆衡^{3*}

(1. 贵州师范学院 化学与材料学院, 贵阳 551088;

2. 贵州师范学院 地理与旅游环境学院, 贵阳 551088;

3. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵阳 550014)

[摘要] 目的: 以具有多种生理活性的小檗碱为原料合成新型衍生物, 并研究其细胞增殖抑制作用, 抑制乙酰胆碱酯酶和丁酰胆碱酯酶的活性。方法: 运用药效团整合策略将具有多种生理活性的小檗碱与抑制组蛋白去乙酰化酶的药效团异羟肟酸、邻苯二胺、巯基进行拼合, 通过有机合成手段得到了7个文献未见报道的小檗碱新型衍生物, 通过核磁共振氢谱(¹H-NMR), 碳谱(¹³C-NMR)和质谱(MS)进行结构表征, 并采用噻唑蓝(MTT)比色法检测了7种小檗碱衍生物对人结肠癌细胞(HCT116), 人肝癌细胞(HepG2), 人宫颈癌细胞(HeLa), 人急性淋巴白血病细胞(CCRF-CEM)的增殖活性, 采用Ellman法对乙酰胆碱酯酶(AChE)和丁酰胆碱酯酶(BuChE)抑制活性进行了测试。结果: 含甲基酮的小檗碱衍生物同时具有较好细胞增殖抑制作用, 抑制乙酰胆碱酯酶的活性, 化合物**5b**对CCRF-CEM细胞株的抑制浓度(IC₅₀)达到了1.48 μmol·L⁻¹, 对乙酰胆碱酯酶的抑制活性IC₅₀为(0.38 ± 0.004) μmol·L⁻¹, 明显高于先导化合物小檗碱。结论: 目标化合物的合成路线为此类生物碱衍生物的合成与活性研究提供了参考, 其中化合物**5b**细胞增殖抑制作用和乙酰胆碱酯酶抑制活性较强, 后续值得进一步研究。

[关键词] 小檗碱; 合成; 衍生物; 抗肿瘤; 乙酰胆碱酯酶

[中图分类号] R914.5; R284.2; R289; R22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)23-0156-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20192115

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190718.1354.005.html>

[网络出版时间] 2019-07-18 17:38

Synthesis and Physiological Activity of Novel Berberine Derivatives

JIANG Xiao-fei¹, LIU Jiu-hui¹, LI Hu¹, ZHANG Wei², LUO Heng^{3*}

(1. School of Chemistry and Materials Science, Guizhou Education University, Guiyang 551018, China;

2. School of Geography and Tourism, Guizhou Education University, Guiyang 551018, China;

3. Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Guiyang Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550014, China)

[Abstract] **Objective:** TO synthesize novel berberine derivatives with a variety of physiological activities, and study their antitumor activity and acetylcholinesterase inhibitory activity. **Method:** Berberines with a variety of physiological activities were pieced together isohydroxamic acid, *o*-phenylenediamine, and sulfhydryl pharmacophore with effects in inhibiting histones and removing acetylases. Totally 7 novel berberine derivatives were obtained by means of organic synthesis. The structures of these derivatives were characterized and confirmed by ¹H-NMR, ¹³C-NMR and MS spectral data. Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) method was used in the determination of the cytotoxic activity of HCT116, HepG2, HeLa and CCRF-CEM human cancer cell lines *in vitro*. Ellman method was used to reveal the inhibitory activities of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase.

[收稿日期] 20190619(010)

[基金项目] 贵州省自然科学基金项目([2015]2123, [2015]2127); 贵州省教育厅科技拔尖人才支持项目(黔教合 KY 字[2016084])

[第一作者] 蒋小飞, 博士, 副教授, 从事天然产物提取分离结构修饰与生理活性研究, Tel:0851-85816647, E-mail:jxf1104@163.com

[通信作者] * 骆衡, 博士, 副研究员, 从事抗肿瘤重要小分子药理研究, Tel:0851-39671868, E-mail:359223910@qq.com

Result: The results showed that the berberine derivatives containing methyl ketone had good antitumor and acetylcholinesterase inhibitory activities. The results demonstrated that compound **5b** had the highest anti-proliferative activity against CCRF-CEM cell line and the acetylcholinesterase inhibitory activities, with $IC_{50} = 1.48 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and $IC_{50} = 0.38 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. **Conclusion:** This paper provides a reference for the synthesis and biological evaluation of this kind of alkaloid derivatives. Compound **5b** is a promising candidate drug and worth further study.

[**Key words**] berberine; synthesis; derivatives; anti-tumour; acetylcholinesterase

从中医经典方药中发现先导化合物的研究思路,引起越来越多学者的关注^[1],小檗碱是中药材黄连的主要成分,具有抗肿瘤,抑制乙酰胆碱酯酶(AChE),丁酰胆碱酯酶(BuChE),抗人类免疫缺陷病毒(HIV),降糖,降脂等多种生物活性,还有低毒低成本等特点(图1)^[2-7]。前期的文献报道了在小檗碱的8位,9位,13位进行结构修饰,讨论了小檗碱衍生物抗肿瘤以及抑制乙酰胆碱酯酶等多种生理活性的构效关系^[8]。组蛋白去乙酰化酶抑制剂(HDACI)可以使染色质组蛋白乙酰化水平提高,导致特定基因表达激活,相应地导致细胞末端分化或癌细胞的凋亡,组蛋白去乙酰化酶已成为抗肿瘤药物的重要靶标^[9],另外有研究表明通过抑制 HDACI 表达,提高组蛋白乙酰化水平,进而上调 P75NTR 表达,减少阿尔茨海默病(AD)患者脑内 $A\beta$ 沉积,改善认知功能,同时 HDAC 已成为一种治疗 AD 的潜在靶点^[10-11]。文献报道常见的组蛋白去乙酰酶抑制剂主要有短链脂肪酸类、邻苯二胺、异羟肟酸类、硫醇类、亲电酮类^[12]。HDAC 抑制剂其基本骨架的药效团模型由 3 部分组成,①表面识别部分(Surface recognition domain);②锌离子螯合基团(zinc binding group, ZBG),如羧酸、异羟肟酸、邻苯二胺、巯基和硼酸等;③Linker 部分,用于连接疏水性环和锌离子螯合基团,如 HDAC 抑制剂 SAHA 药效团模型(图2),由于 HDAC 抑制剂药效团模型的表面识别区(Cap)具有较强的基团容忍度,在一定范围内改变 HDAC 抑制剂的表面识别区(Cap)不会显著降低 HDAC 的抑制活性^[13],将具有生理活性的天然小分子化合物,采用分子杂合策略靶向设计合成成为新药开发过程中的重要手段之一^[14]。结合前期文献报道小檗碱具有抗肿瘤和抑制乙酰胆碱酯酶活性的报道,本文采用药效团拼合策略,利用 HDAC 抑制剂药效团模型,将小檗碱作为表面识别区的疏水部分,杂合 HDAC 抑制剂的有效药效团,优化了合成方法和路线,合成了含有邻苯二胺、异羟肟酸、甲基酮和硫醇的 7 个新的小檗碱衍生物,对其

进行肿瘤细胞增殖和抑制乙酰胆碱酯酶以及丁酰胆碱酯酶的活性测试(图3)。

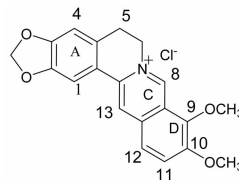


图 1 小檗碱结构
Fig.1 Structure of berberine

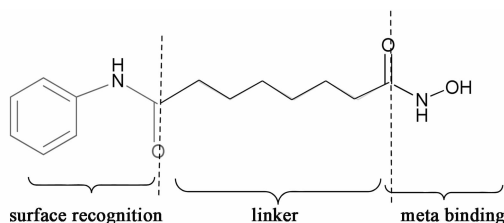


图 2 HDAC 抑制剂 SAHA 药效团模型
Fig.2 Pharmacophore model of HDAC inhibitor SAHA

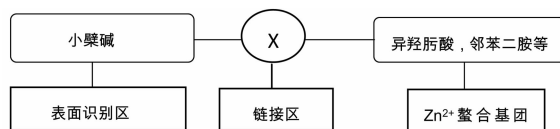


图 3 新型小檗碱衍生物的设计
Fig.3 Design of novel berberine derivatives

1 材料

EyelaN-1001 型旋转蒸发仪, Eyela Aspirator A-35 型循环水真空泵(Tokyo Rikakai Co. Ltd.); VG Auto spec-300 型质谱仪(英国 VG); Bruker AM-400 核磁共振光谱仪测定,(TMS 为内标,德国 Bruker)。SHZ-D(III) 循环水式真空泵, YP6000N 电子天平, R2002 旋转蒸发仪, Bio-Rad 酶标仪, 96 孔板(Corning 公司)。

小檗碱(南京泽朗医药科技有限公司,批号 B24910679,纯度 98%);1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDCI,批号 E1726035,纯度 98.0%),1-羟基苯并三唑(HOBT,批号 C1702039,纯度 $\geq 97.0\%$),硫代乙酸钾(批号 E1610023,纯度

98.0%)、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB, 货号 D105559, 纯度 ≥99.0%), 碘化硫代乙酰胆碱(货号 A100869, 纯度 ≥99.0%), 碘化硫代丁酰胆碱(货号 B100871, 纯度 ≥99.0%), 均购于上海阿拉丁生物科技有限公司; 乙酰胆碱酯酶(货号 M0136-1), 丁酰胆碱酯酶(批号 078K7015), 购于 Sigma 公司; 噻唑蓝(MTT, Genview 公司, 批号 81119010250), 二甲基亚砜(DMSO, Invitrogen 公司); HCT116,

HepG2, HeLa, CCRF-CEM 细胞由盛世华康生物科技有限公司提供。三氯甲烷、甲醇、四氢呋喃、无水 K_2CO_3 (贵州亿晶升贸易有限公司)。其他合成所用试剂购于上海鹰谷科技有限公司, 均为化学纯。

2 小檗碱衍生物的合成方法

2.1 小檗碱衍生物的合成路线 含甲基酮以及硫醇小檗碱衍生物的合成路线, 含邻苯二胺类小檗碱合成路线, 含异羟肟酸类小檗碱合成路线(图 4~6)。

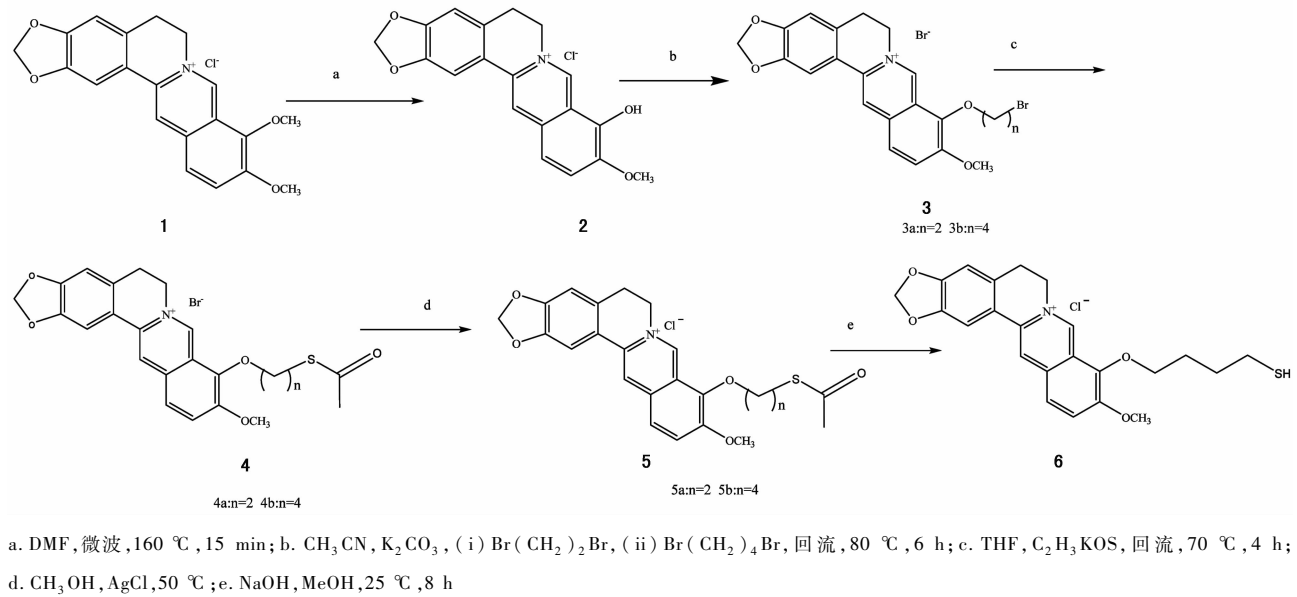


图 4 目标化合物 6 合成路线

Fig. 4 Synthetic route of target compound 6

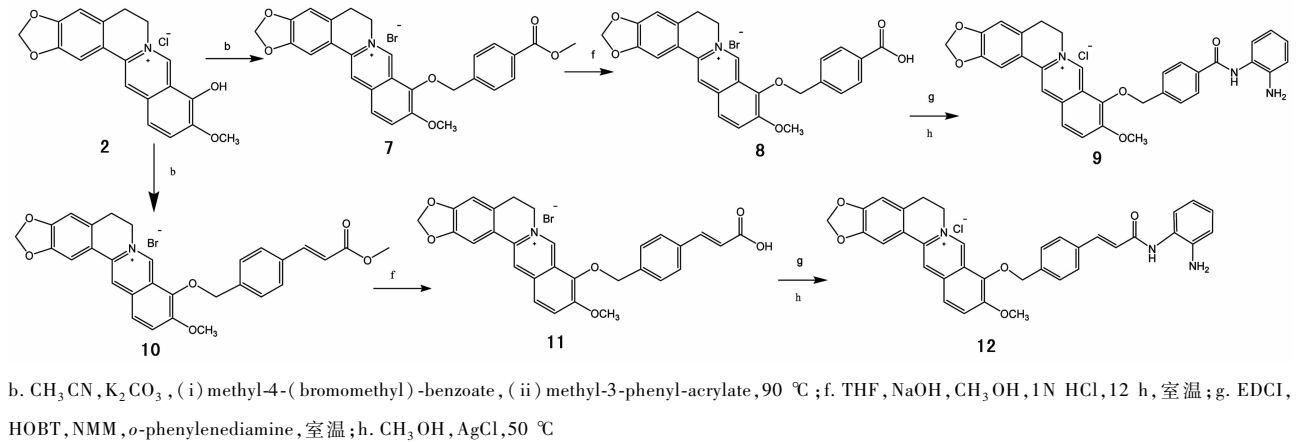


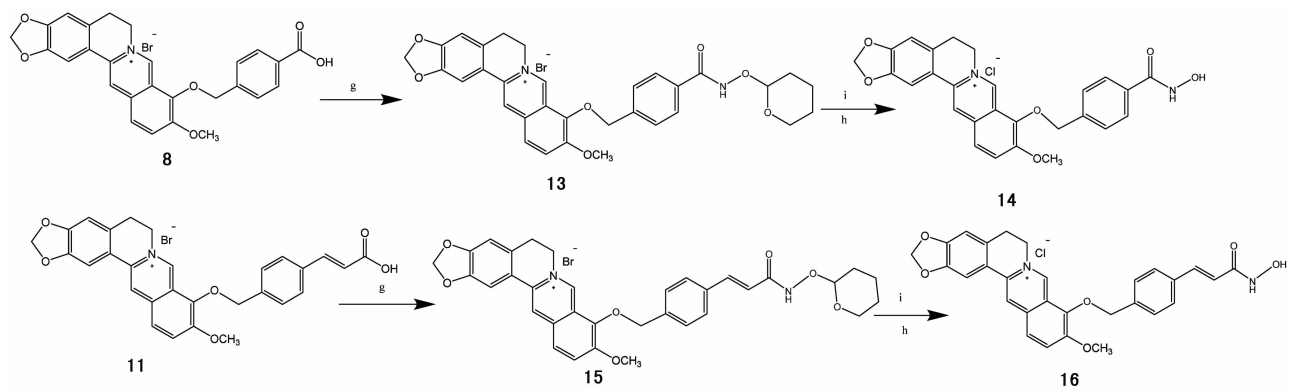
图 5 目标化合物 9 和 12 合成路线

Fig. 5 Synthetic route of target compounds 9 and 12

2.2 含甲基酮和硫醇小檗碱衍生物的合成

2.2.1 中间体 2 小檗红碱的合成 根据文献[15]在制备小檗红碱的方法, 称取 11.80 g (0.05 mol) 小檗碱在真空环境中于 190 ~ 200 °C 下搅拌加热 15 min, 三氧化二铝柱色谱, 三氯甲烷-甲醇(9:1)洗

脱, 此方法产率为 50% 左右, 而后处理需要三氯甲烷-甲醇(9:1)为洗脱剂进行柱色谱, 对环境造成污染, 对文献提供的方法笔者进行了改进, 称取干燥的盐酸小檗碱 11.50 g, 加入 *N,N*-二甲基甲酰胺 300 mL 溶解, 微波加热控制温度为 160 °C, 回流



g. EDCl, HOBT, THP-O-NH₂ (o-phenylenediamine), NMM, DMF, 室温过夜; i. HCl/dioxane, 室温, 4 h; h. CH₃OH, AgCl, 50 °C

图 6 目标化合物 14 和 16 合成路线

Fig. 6 Synthetic route of target compounds 14 and 16

15 min, 放置室温, 0 °C 下重结晶, 过滤即得小檗红碱, 产率 69%。对于油浴加热而言, 微波反应的产率更高。油浴加热反应的产品不纯, 必须要通过色谱柱分离提纯, 而微波反应产品只需重结晶就能得到纯品。

2.2.2 中间体 3a 合成 根据文献[16]称取干燥的小檗红碱(1.61 g, 5 mmol)溶解在乙腈里, 再加入碳酸钾(1.38 g, 10 mmol)和 1,2-二溴乙烷(2.16 g, 10 mmol), 加热控制温度 85 °C 回流 6 h。之后过滤除去碳酸钾, 浓缩得到粗品。三氧化二铝柱色谱, 三氯甲烷-甲醇(9:1)洗脱得到中间体(3), 为黄色固体。产率 80%, 薄层色谱条件甲苯-乙酸乙酯-异丙醇-甲醇-氨水(6:3:1.5:1:0.5)。

2.2.3 化合物 5a, 5b 的合成 参考文献[17-18]称取中间体 3a(10 mmol)4.28 g 于 100 mL 烧瓶里, 加入四氢呋喃使其溶解, 再加入硫代乙酸钾(12 mmol), 加热至 70 °C 回流 4 h。TLC 检测反应结束, 减压浓缩, 残渣用三氯甲烷-甲醇(9:1)50 mL 超声溶解, 用饱和食盐水(3 × 10 mL)洗涤, 合并有机层, 用无水硫酸镁干燥, 过滤去除干燥剂。滤液真空浓缩, 三氧化二铝柱色谱, 三氯甲烷-甲醇(10:1)洗脱得到中间体 4a, 为黄色固体。将 4a 3.3 mmol 溶于甲醇 50 mL, 加入 AgCl 3.3 mmol, 回流 30 min, 过滤, 浓缩得到盐酸盐 5a, 1.18 g, 产率 28%。薄层展开条件为甲苯-乙酸乙酯-异丙醇-甲醇-氨水(6:3:1.5:1:0.5)。黄色固体, 产率 28%, mp 199 ~ 200 °C。MS *m/z* 424.1 [M - Cl]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.80 (s, 1H), 8.73 (s, 1H), 8.18 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.98 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.09 (s, 1H), 6.16 (s, 2H), 4.94 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 4.38 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 4.04 (s,

3H, OCH₃), 3.40 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.21 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.38 (s, 3H, SCOCH₃)。 ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 195.61 (C = O), 150.71 (C-10), 150.34 (C-9), 148.18 (C-3), 145.81 (C-2), 142.47 (C-8), 138.02 (C-12a), 133.43 (C-14), 131.18 (C-8a), 127.09 (C-14a), 124.18 (C-13), 121.95 (C-11), 120.90 (C-4a), 120.67 (C-12), 108.92 (C-4), 105.91 (C-1), 102.58 (O-CH₂-O), 72.64 (O-CH₂), 57.55 (C-6), 55.83 (OCH₃), 31.09 (CH₂-S), 28.93 (CH₃-C = O), 26.80 (C-5)。

按照以上相同的方法, 利用中间体 3b 合成小檗碱衍生物 5b 产率 32%。mp 203 ~ 204 °C。MS *m/z* 452.2 [M - Cl]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 9.72 (s, 1H), 8.71 (s, 1H), 8.11 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 8.01 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.67 (s, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.11 (s, 2H), 4.97 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 4.43 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 4.11 (s, 3H, OCH₃), 3.29 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.00 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.32 (s, 3H, OCH₃), 1.95 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.85 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H)。

2.2.4 含巯基小檗碱衍生物 6 的合成 称取中间体 5b(0.3 mmol)0.135 mg 用甲醇 10 mL 溶解, 在冰浴下缓慢加入 0.3 mol·L⁻¹ NaOH 溶液 4 mL, 室温反应 8 h。反应完后, 加入稀 HCl 调节 pH 至 7, 减压浓缩除掉多余的溶剂甲醇, 再用三氯甲烷溶解, 蒸馏水洗涤(30 mL × 3 次), 有机相无水硫酸钠干燥, 过滤去除干燥剂, 滤液浓缩后用 Al₂O₃ 拌样, Al₂O₃ 柱色谱分离, 洗脱剂为三氯甲烷-甲醇(10:1)。得到终产物 6 为淡黄色固体。薄层色谱条件硅胶 G 制板展开剂为甲苯-乙酸乙酯-异丙醇-甲醇-氨水(6:3:1.5:1:0.5)。产率 70%。mp 162 ~ 163 °C。MS

m/z 409.8 [M - Cl]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.78 (s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.22 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 8.01 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.19 (s, 2H), 4.97 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 4.31 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 4.06 (s, 3H, OCH₃), 3.21 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.88 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.94 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.91 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H). 1.26 (s, 1H). ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 150.86 (C-10), 150.29 (C-9), 148.14 (C-3), 145.68 (C-2), 143.13 (C-8), 137.87 (C-12a), 133.42 (C-14), 131.11 (C-8a), 127.03 (C-14a), 123.90 (C-13), 122.04 (C-11), 120.86 (C-4a), 120.70 (C-12), 108.87 (C-4), 105.87 (C-1), 102.58 (O-CH₂-O), 79.66 (O-CH₂), 57.48 (C-6), 55.73 (OCH₃), 37.90 (CH₂), 28.73 (CH₂), 26.78 (C-5), 25.55 (CH₂-SH)。

2.3 含邻苯二胺小檗碱衍生物的合成方法

2.3.1 中间体 7 的合成 根据文献[19],取中间体 2(5.0 mmol)1.61 g 于 50 mL 圆底烧瓶中,溶于 35 mL 乙腈中,无机碱 K₂CO₃ (1.378 g, 10.0 mmol) 做催化剂,加入对溴甲基苯甲酸甲酯 (2.29 g, 10.0 mmol),在 75 °C 下,搅拌回流 6 h, TLC 检测至反应基本完全。待反应完毕后,冷却,将反应液抽滤除去 K₂CO₃,将下层溶液减压浓缩得到粗品,将粗品用 100 ~ 200 目硅胶拌样,用 CH₃Cl-CH₃OH (8:1) 洗脱,三氧化二铝柱色谱,薄层条件为甲苯-乙酸乙酯-异丙醇-甲醇-氨水 (6:3:2:2:0.5) 浓缩得到中间体 7 (0.93 g),黄色固体,产率 39.6%。mp 210 ~ 211 °C。MS m/z 470.2 [M - Cl]⁺, ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD), δ : 9.64 (s, 1H, 8-H), 8.71 (s, 1H, 13-H), 8.15 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, 11-H), 8.04 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, 12-H), 8.02 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, Ph-H), 7.69 (s, 1H, 1-H), 7.65 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, Ph-H), 6.96 (s, 1H, 4-H), 6.11 (s, 2H, O-CH₂-O), 5.53 (s, 2H, O-CH₂), 4.63 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, 6-H), 4.30 (s, 3H, OCH₃), 3.90 (s, 3H, OCH₃), 3.21 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, 5-H)。

2.3.2 中间体 8 的合成 根据文献[20],取中间体 7 (0.564 g, 1.2 mmol) 于 50 mL 圆底烧瓶,加入四氢呋喃 25 mL,将其超声形成悬浊物,再加入甲醇 8 mL,氢氧化钠 (1 g 溶于蒸馏水 20 mL),室温搅拌过夜, TLC 检测至反应基本完全。待反应完毕后,浓缩旋干,将固体用蒸馏水 25 mL 超声形成混悬液, 1 mol·L⁻¹ 浓盐酸调节 pH 至 1 ~ 2, 过滤, 得到中间

体 7a (0.32 g), 黄色固体, 产率 58.5%, mp 154 ~ 155 °C。MS m/z 456.2 [M - Cl]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 9.30 (s, 1H, 8-H), 8.63 (s, 1H, 13-H), 8.16 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, 11-H), 8.03 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, 12-H), 7.87 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, Ph-H), 7.61 (s, 1H, 1-H), 7.43 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, Ph-H), 6.96 (s, 1H, 4-H), 6.10 (s, 2H, O-CH₂-O), 5.48 (s, 1H, O-CH₂), 4.75 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, 6-H), 4.18 (s, 3H, OCH₃), 3.90 (s, 3H, OCH₃), 3.25 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, 5-H)。

2.3.3 终产物 9 的合成 根据文献[21],取中间体 8 (1.0 mmol) 0.456 g, EDCI (1.2 mmol) 0.230 g 及 HOBT (1.2 mmol) 0.162 g, 加入到 25 mL 圆底烧瓶中,加入干燥的 *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 15 mL, 室温搅拌活化反应 1 h。取邻苯二胺 (2 mmol) 0.216 g 和 *N*-甲基吗啡啉 (NMM) (2 mmol) 0.203 g 于 50 mL 圆底烧瓶中,溶于 20 mL 干燥的 DMF 中,室温搅拌下,将上述活化的中间体缓慢加入烧瓶内,室温反应过夜, TLC 检测至反应基本完全。反应完全后,将上述反应液倒入 100 mL 的分液漏斗中,依次用饱和碳酸氢钠和食盐水洗涤,再用无水硫酸钠干燥有机层,然后过滤出无水硫酸钠,再将滤液浓缩旋干得到粗品,将粗品用 100 ~ 200 目硅胶拌样, 300 ~ 400 目三氧化二铝柱色谱,用 CH₃Cl-CH₃OH (8:1) 洗脱,薄层条件为甲苯-乙酸乙酯-异丙醇-甲醇-氨水 (6:3:2:2:0.5), 浓缩得到纯品终产物 e (0.18 g), 在热的甲醇 AgCl 溶液中转化为相应的盐酸盐得终产物 9, 黄色固体, 产率 33.0%。mp 180.1 ~ 181.7 °C; MS m/z 546.3 [M - Cl]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.80 (s, 1H, CONH), 9.76 (s, 1H, 8-H), 8.93 (s, 1H, 13-H), 8.23 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, 11-H), 8.00 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, 12-H), 8.03 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, Ph-H), 7.78 (s, 1H, 1-H), 7.72 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, Ph-H), 7.15 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, Ph-H), 7.08 (s, 1H, 4-H), 6.97 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, Ph-H), 6.77 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, Ph-H), 6.59 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, Ph-H), 6.16 (s, 2H, O-CH₂-O), 5.44 (s, 2H, O-CH₂), 4.95 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, 6-H), 4.91 (s, 2H, NH₂), 4.08 (s, 3H, OCH₃), 3.21 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, 5-H); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 165.01 (C = O), 150.64 (C-10), 149.92 (C-9), 147.75 (C-3), 145.36 (C-2), 143.25 (C-8), 141.87 (Ph-C-NH₂), 139.84 (Ph-CH₂O), 137.53 (C-12a), 134.45 (Ph-C), 132.98 (C-14), 130.76 (C-8a),

128. 37 (overlap) (Ph-C), 127. 96 (overlap) (Ph-C), 126. 83 (C-14a), 126. 63 (overlap) (Ph-C), 123. 90 (C-13), 123. 27 (Ph-C-NH), 121. 80 (C-12), 120. 46 (C-11), 120. 32 (C-4a), 116. 34 (Ph-C), 116. 24 (Ph-C), 108. 50 (C-4), 105. 50 (C-1), 102. 16 (O-CH₂-O), 74. 77 (O-CH₂), 57. 13 (C-6), 55. 40 (OCH₃), 26. 40 (C-5)。

2.3.4 根据终产物 **9** 合成的方法合成终产物 **12** 中间体 **10** 黄色固体, 产率 78%。mp 233 ~ 234 °C, MS *m/z* 482. 1 [M - Cl]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9. 78 (s, 1H, 8-H), 8. 92 (s, 1H, 13-H), 8. 20 (d, *J* = 8. 8 Hz, 1H, 11-H), 7. 99 (d, *J* = 8. 8 Hz, 1H, 12-H), 7. 74 (m, 3H, Ph-H, CH = CH), 7. 61 (s, 1H, 1-H), 7. 65 (d, *J* = 9. 1 Hz, 2H, Ph-H), 7. 08 (s, 1H, 4-H), 6. 67 (d, *J* = 9. 1 Hz, 1H), 6. 16 (s, 2H, O-CH₂-O), 5. 37 (s, 2H, O-CH₂), 4. 93 (t, *J* = 6. 0 Hz, 2H, 6-H), 4. 07 (s, 3H, OCH₃), 3. 71 (s, 3H, OCH₃), 3. 18 (t, *J* = 6. 0 Hz, 2H, 5-H)。

中间体 **11** 黄色固体, 产率 68%。mp 207 ~ 208 °C。MS *m/z* 482. 1 [M - Cl]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12. 32 (s, 1H, COOH), 9. 78 (1H, 8-H), 8. 93 (s, 1H, 13-H), 8. 22 (d, *J* = 8. 8 Hz, 1H, 11-H), 8. 01 (d, *J* = 8. 8 Hz, 1H, 12-H), 7. 78 (s, 1H, 1-H), 7. 71 (m, 3H, Ph-H), 7. 60 (d, *J* = 8. 8 Hz, 2H, Ph-H), 7. 08 (s, 1H, 4-H), 6. 53 (d, *J* = 9. 1 Hz, 1H), 6. 16 (s, 2H, O-CH₂-O), 5. 37 (s, 2H, O-CH₂), 4. 93 (t, *J* = 6. 0 Hz, 2H, 6-H), 4. 07 (s, 3H, OCH₃), 3. 17 (t, *J* = 6. 0 Hz, 2H, 5-H)。

终产物 **12** 黄色固体, 产率 38%, mp 211 ~ 212 °C。MS *m/z* 572. 5 [M - Cl]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9. 78 (s, 1H, CONH), 9. 52 (s, 1H, 8-H), 8. 93 (s, 1H, 13-H), 8. 21 (d, *J* = 8. 8 Hz, 1H, 11-H), 8. 00 (d, *J* = 8. 8 Hz, 1H, 12-H), 7. 79 (s, 1H, 1-H), 7. 65 (m, 4H, Ph-H), 7. 53 (d, *J* = 9. 1 Hz, 1H, Ph-H), 7. 35 (d, *J* = 9. 1 Hz, 1H, Ph-H), 7. 08 (s, 1H, 4-H), 6. 96 (d, *J* = 8. 8 Hz, 1H), 6. 90 (d, *J* = 8. 8 Hz, 1H, Ph-H), 6. 75 (d, *J* = 8. 8 Hz, 1H), 6. 57 (d, *J* = 9. 1 Hz, 1H, Ph-H), 6. 16 (s, 2H, O-CH₂-O), 5. 38 (s, 2H, O-CH₂), 4. 99 (s, 2H, NH₂), 4. 92 (t, *J* = 6. 0 Hz, 2H, 6-H), 4. 08 (s, 3H, OCH₃), 3. 19 (t, *J* = 6. 0 Hz, 2H, 5-H)。 ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 163. 87 (C = O), 151. 14 (C-10), 150. 34 (C-9), 148. 18 (C-3), 145. 80 (C-2), 142. 37 (C-8), 142. 03 (Ph-C-NH₂), 139. 46 (Ph-CH₂O), 138. 36 (C-12a),

137. 94 (C = C), 135. 40 (C-14), 134. 87 (C-8a), 131. 17 (Ph-C), 129. 70 (Ph-C), 128. 12 (overlap, Ph-C), 127. 02 (overlap, Ph-C), 125. 11 (overlap, Ph-C), 124. 31 (C-14a), 123. 93 (C-13), 123. 27 (Ph-C-NH), 122. 23 (C-12), 120. 88 (C-11), 120. 73 (C-4a), 116. 71 (C-C = O), 116. 47 (Ph-C), 108. 92 (C-4), 105. 91 (C-1), 102. 58 (O-CH₂-O), 75. 3 (O-CH₂), 57. 53 (C-6), 55. 80 (OCH₃), 26. 81 (C-5)。

2.4 含异羟肟酸的小檗碱衍生物的合成

2.4.1 中间体 **13** 的合成 将中间体 **8** (3. 2 mmol) 1. 5 g 加入到 DMF 40 mL 进行超声溶解, 加入 EDCI (1 mmol) 193 mg, HOBT (1 mmol) 135 mg 和 THPO-NH₂ (1 mol) 117 mg, 19. 2 mmol *N*-甲基吗啉加入到 100 mL 烧瓶中, 在室温搅拌过夜。TLC 检测到反应基本完成, 反应完毕后, 减压抽滤, 然后加入三氯甲烷-甲醇 (9 : 1) 溶液进行溶解, 分别用饱和碳酸氢钠, 饱和食盐水对其进行洗涤, 使用无水硫酸钠对有机相进行干燥, 接着进行过滤处理, 滤液减压浓缩, 最后加入三氧化二铝进行拌样, 三氧化二铝柱色谱, CH₃Cl-CH₃OH (8 : 1) 洗脱, 洗脱液浓缩, 得到黄色固体中间产物 **13**。

中间体 **13**, 黄色固体, 产率, 40%。mp 180 ~ 182 °C。MS *m/z* 546. 3 [M - Cl]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9. 78 (s, 1H, 8-H), 8. 94 (s, 1H, 13-H), 8. 21 (d, *J* = 9. 1 Hz, 1H, 11-H), 8. 01 (d, *J* = 9. 1 Hz, 1H, 12-H), 7. 78 (m, 4H, 1-H, Ph-H), 7. 61 (d, *J* = 9. 1 Hz, 2H, Ph-H), 7. 10 (s, 1H, 4-H), 6. 19 (s, 2H, O-CH₂-O), 5. 42 (s, 2H, O-CH₂), 4. 98 [t, *J* = 6. 5 Hz, 1H, O-CH(CH₂)-O], 4. 93 (t, *J* = 6. 5 Hz, 2H, 6-H), 4. 10 (s, 3H, OCH₃), 4. 02 (t, *J* = 6. 5 Hz, 2H), 3. 20 (t, *J* = 6. 5 Hz, 2H, 5-H), 1. 55 ~ 1. 73 [m, 6H, (CH₂)₃]。将反应物 **13** 固体进行烘干, 称量 0. 5 g, 然后进行反应, 在加入二氧六环氯化氢溶液 20 mL, 在室温下反应 4 h, 浓缩挥发溶剂, 乙醇重结晶得到需要的终产物的溴酸盐。将溴酸盐在热的甲醇 AgCl 溶液中转化为终产物 **14**。

终产物 **14**, 黄色固体, 产率 61%, mp 195 ~ 196 °C。MS *m/z* 471. 1 [M - Cl]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9. 80 (s, 1H, CONH), 9. 77 (s, 1H, 8-H), 8. 93 (s, 1H, 13-H), 8. 22 (d, *J* = 9. 1 Hz, 1H, 11-H), 8. 01 (d, *J* = 9. 1 Hz, 1H, 12-H), 7. 78 (m, 3H, 1-H, Ph-H), 7. 64 (d, *J* = 7. 5 Hz, 2H, Ph-H), 7. 09 (s, 1H, 4-H), 6. 16 (s, 2H, O-CH₂-O), 5. 39 (s, 2H, O-CH₂), 4. 93 (t, *J* = 6. 0 Hz, 2H, 6-H), 4. 07

(s, 3H, OCH₃), 3.18 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, 5-H)。¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 164.28 (C = O), 151.09 (C-10), 150.34 (C-9), 148.18 (C-3), 145.77 (C-2), 142.29 (C-8), 140.01 (Ph-CH₂O), 137.94 (C-12a), 133.39 (C-14), 133.07 (C-8a), 131.18 (Ph-C), 128.87 (overlap, Ph-C), 127.42 (Ph-C), 127.02 (Ph-C), 124.67 (C-14a), 124.35 (C-13), 122.19 (C-12), 120.88 (C-11), 120.73 (C-4a), 108.92 (C-4), 105.91 (C-1), 102.58 (O-CH₂-O), 75.17 (O-CH₂), 57.53 (C-6), 56.48 (OCH₃), 26.80 (C-5)。

根据以上制备终产物 **14** 的方法用中间体 **11** 为原料制备得到终产物 **16**。终产物 **16**, 黄色固体。产率 51%, mp 199 ~ 200 °C。MS *m/z* 497.1 [M - Cl]⁺, ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.81 (s, 1H, NHOH), 9.77 (s, 1H, 8-H), 8.93 (s, 1H, 13-H), 8.20 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, 11-H), 7.98 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, 12-H), 7.78 (s, 1H, 1-H), 7.75 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.58 ~ 7.61 (m, 4H, Ph-H), 7.42 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.08 (s, 1H, 4-H), 6.46 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.16 (s, 2H, O-CH₂-O), 5.36 (s, 2H, O-CH₂), 4.91 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, 6-H), 4.08 (s, 3H, OCH₃), 3.18 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, 5-H)。¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 162.59 (C = O), 150.65 (C-10), 149.88 (C-9), 147.72 (C-3), 145.35 (C-2), 141.91 (C-8), 137.81 (CH = CH), 137.71 (C-12a), 137.48 (Ph-C), 134.88 (C-14), 132.94 (C-8a), 130.71 (Ph-C), 129.20 (overlap, Ph-C), 127.49 (overlap, Ph-C), 126.57 (C-14a), 123.81 (C-13), 121.77 (C-12), 120.43 (C-11), 120.27 (C-4a), 119.55 (C-C = O), 108.46 (C-4), 105.46 (C-1), 102.13 (O-CH₂-O), 74.91 (O-CH₂), 57.07 (C-6), 55.33 (OCH₃), 26.36 (C-5)。

3 生物活性实验

3.1 抗肿瘤活性^[22] 细胞培养: HCT116, HepG2, HeLa, CCRF-CEM 细胞培养于含体积分数为 10% 的胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中。细胞培养于含体积分数为 10% 的新生牛血清的 DMEM 培养基中。所有细胞均置于 37 °C, 饱和湿度及体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱内连续培养。

MTT 比色法: 收集对数期生长的细胞, 1 × 10⁴ 个/孔接种于 96 孔板, 37 °C, 5% CO₂ 培养箱培养使细胞贴壁, 加入不同浓度的样品, 实验组每个浓度设 3 个平行孔, 37 °C, 5% CO₂ 培养箱培养 48 h, 加入

MTT 溶液 (5 g · L⁻¹, 即终浓度为 0.5% MTT) 20 μL, 继续培养 4 h, 终止培养, 吸去孔内培养液, 每孔加入 DMSO 150 μL, 置于摇床上震荡 10 min, 使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 570 nm 处。实验同时设置调零孔 (培养基, MTT, DMSO), 对照孔 (细胞, 相同浓度的药物溶解介质 DMSO, 培养液, MTT, DMSO)。

3.2 乙酰胆碱酯酶和丁酰胆碱酯酶的测定 采用 Ellman 等^[23] 对 AChE 体外抑制活性进行测试, 用碘化乙酰胆碱为底物, 化学标记的二硫硝基苯甲酸为显色剂, 在 96 孔板上样品的 AChE 抑制活性进行测试。测定时首先在 96 孔板上加入用 DMSO 溶解的样品 1 μL, 电蔓 AChE 溶液 50 μL, 使用 Bio-Rad 酶标仪, 在波长 410 nm 下, 读取每孔吸光度 *A* (样品本底的 *A*)。温度保持在 25 °C, 20 min 后, 加入底物与显色剂及磷酸缓冲液至总体积为 100 μL, 此时底物浓度为 10 μmol · L⁻¹, 显色剂浓度为 12.5 μmol · L⁻¹。20 °C 保温反应 20 min, 读取每孔的吸光度。以 0.1 mol · L⁻¹ pH 8.0 的磷酸盐缓冲溶液作参比, 以未加样品所测得的吸收 *A* (control) 作为 100 个活力单位然后以酶的相对活力对抑制剂浓度作图, 根据抑制曲线求得各种化合物的半抑制剂浓度 (IC₅₀), 丁酰胆碱酯酶抑制活性方法相同。

4 结果与讨论

4.1 合成部分 小檗红碱的合成文献传统方法为真空下加热 190 °C, 然后三氧化二铝柱色谱, 三氯甲烷甲醇混合溶剂洗脱得到小檗红碱, 笔者采用 DMF 作溶剂, 微波加热到 DMF 沸点 15 min, 冷却重结晶, 抽滤, 避免了采用真空装置和柱色谱的麻烦, 产率相对较高并且操作简单, 化合物 **4** 硫代乙酸酯的合成采用 THF 加热的方法比用 DMF 作为反应溶剂, 后处理方便, 能提高产率, 酰氨化制备中间体 **9**, **12**, **13**, **15** 的过程中文献用二氯甲烷, 由于二氯甲烷的溶解性对反应物不是很好, 收率低, 改用 DMF 作反应溶剂收率较高, 并且发现了用 *N*-甲基吗啉作为缚酸剂效果比其他文献报道的三乙胺产率高, 由于终产物小檗碱异羟肟酸 **14**, **16** 极性较大, 分离纯化困难, 最后用 HCl/dioxane 处理中间体 **13**, **15** 生成相应的异羟肟酸, 产率较高, 重结晶得到目标化合物。

4.2 生物活性部分 以星孢菌素为阳性对照选取了人结肠癌细胞 HCT116, 人肝癌细胞 HepG2, 人宫颈癌细胞 HeLa, 人急性淋巴白血病细胞 CCRF-CEM, 4 种肿瘤细胞进行了 MTT 比色法测试, 考察了 6 个化合物抗肿瘤活性 (表 1, 2)。

表 1 小檗碱衍生物的抗肿瘤活性

Table 1 Antitumor activity of berberine derivatives in cancer cells

化合物	$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$			
	HCT116	HepG2	HeLa	CCRF-CEM
STSP	0.031 5	0.119 7	0.041 9	0.008 3
1(小檗碱)	98.34	>100	80.46	14.36
5a	21.91	31.33	26.20	2.71
5b	15.40	27.56	21.50	1.48
9	>100	>100	>100	>100
12	>100	>100	>100	47.58
14	>100	>100	>100	48.29
16	>100	>100	>100	7.07
6	51.49	98.55	63.58	6.10

表 2 小檗碱衍生物对 AChE/BuChE 抑制的 IC_{50}

Table 2 In vitro inhibition IC_{50} and selectivity of berberine derivatives for AChE and BuChE

化合物	$\text{IC}_{50}(\bar{x} \pm s)$		AChE 选择性
	AChE	BuChE	
	$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		
1(小檗碱)	0.98 \pm 0.87	>100	>102
tacrine	0.223 \pm 0.003	0.052 \pm 0.009	0.23
5a	0.96 \pm 0.016	>200	>208
5b	0.38 \pm 0.004	>200	>526
9	3.18 \pm 0.016	>100	>31
12	7.91 \pm 0.011	>100	>12
14	2.21 \pm 0.012	>100	>45
16	1.30 \pm 0.023	>100	>76
6	4.71 \pm 0.041	>100	>21

从表中的数据可以看出,大部分小檗碱衍生物没有表现出较好的细胞增殖抑制作用和抑制乙酰胆碱酯酶活性,只有含甲基酮类的小檗碱衍生物同时表现出了相对较好的细胞增殖抑制作用和抑制乙酰胆碱酯酶的活性,这一测试结果虽然没有得到理想的结果,但是含甲基酮的小檗碱衍生物 **5a**,**5b** 比小檗碱的活性都有所提高,其中化合物 **5b** 对 CCRF-CEM 细胞株的 IC_{50} 达到了 $1.48 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,表现出较好的敏感性抑制,同时对乙酰胆碱酯酶的抑制活性也比小檗碱有所提高,这一结果对后期的小檗碱衍生物的设计有一定的启示作用。

本工作在前期报道的小檗碱衍生物抗肿瘤和作为乙酰胆碱酯酶抑制剂的基础上,以小檗碱为原料采用药效团拼合原理合成了含邻苯二胺,异羟肟酸,和甲基酮的小檗碱衍生物,合成过程中进行了对文

献报道的中间体和目标产物合成方法进行了某些程度的改进,提供了一条合成此类生物碱类似产物的可行参考途径,但从化合物抑制肿瘤细胞和抑制乙酰胆碱酯酶的活性结果来看没有得到十分理想的结果,但是化合物 **5a**,**5b** 的细胞增殖抑制作用和抑制乙酰胆碱酯酶的活性相对于小檗碱均有所有提高,可能含邻苯二胺和异羟肟酸的小檗碱衍生物由于链接药效团的分子柔性不够,相关药效团可能无法很好的作用于乙酰胆碱酯酶和组蛋白去乙酰化酶靶点,**5a**,**5b** 用碳链连接的甲基酮可能对乙酰胆碱酯酶和组蛋白去乙酰化酶作用相对较好,因此表现出较好的生理活性,相关的构效关系和机制研究还有待合成更多的化合物进行筛选以及进行作用机制的研究。

[参考文献]

[1] 王忠雷,张小华,杨丽燕,等. 拼合原理在降血糖新药研发中的应用设想[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(4):351-354.

[2] Grycová L, Dostá I J, Marek R. Quaternary protoberberine alkaloids [J]. *Phytochemistry*, 2006, 68(2):150-175.

[3] LIN C C, Ng L T, Hsu F F, et al. Cytotoxic effect, of *Coptis chinensis* and *Epimedium sagittatum* extracts and their major constituents (berberine, coptisine and icariin) on hepatoma and leukaemia cell growth [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2004, 31(1/2):65-69.

[4] Manfredi K P, Blunt J W, Cardellina J H, et al. Novel alkaloids from the tropical plant *Ancistrocladus abbreviatus* inhibit cell killing by HIV-1 and HIV-2 [J]. *J Med Chem*, 1991, 34(12):3402-3405.

[5] Lee S, Lim H J, Park J H, et al. Berberine-induced LDLR up-regulation involves JNK pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 362(4):853-857.

[6] YAN F, Benrong H, QIANG T, et al. Hypoglycemic activity of jatrorrhizine [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2005, 25(5):491-493.

[7] 任妍林,王定坤,董慧,等. 小檗碱治疗糖尿病肾病的研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(3):438-442.

[8] 丁阳平,叶小利,周洁,等. 小檗碱衍生物合成及生理活性研究进展 [J]. *有机化学*, 2012, 32(4):677-685.

[9] Bolden J E, Peart M J, Johnstone R W. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5(9):769-784.

[10] ZHANG L, SHENG S, QIN C. The role of HDAC6 in Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2013, 33(2):283-295.

- [11] 赵建伟,张静竹,安丽. 莱菔硫烷对阿尔茨海默病的拮抗作用及其机制研究[C]//2018 环境与健康学术会议—精准环境健康:跨学科合作的挑战论文汇编,沈阳,2018:385-386.
- [12] Patel J H, DU Y, Ard P G, et al. The c-MYC Oncoprotein Is a Substrate of the Acetyltransferases hGCN5/PCAF and TIP60 [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24 (24): 10826-10834.
- [13] Mahboobi S, Sellmer A, Winkler M, et al. Novel chimeric histone deacetylase inhibitors: a series of lapatinib hybrides as potent inhibitors of epidermal growth factor receptor (EGFR), human epidermal growth factor receptor 2(HER2), and histone deacetylase activity[J]. *J Med Chem*, 2010, 53(24) :8546-8555.
- [14] Bérubé, Gervais. An overview of molecular hybrids in drug discovery[J]. *Expert Opin Drug Dis*, 2016, 11(3) : 281-305.
- [15] 毕重文,张彩霞,李阳彪,等. 环化小檗碱类似物的合成及其抗肿瘤活性研究[J]. *药学学报*, 2013, 48(12) :1800-1806.
- [16] SHI A, HUANG L, LU C, et al. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of novel triazole-containing berberine derivatives as acetylcholinesterase and β -amyloid aggregation inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem*, 2011, 48(12) :2298-2305.
- [17] 任杰,祁燕杰,胡昆,等. 萝卜硫素衍生物及其制备方法和用途;中国, CN 102775336 A[P]. 2012.
- [18] 赵育,倪春燕,张虞婷,等. 山荷叶素异羟肟酸和硫醇衍生物的合成与抑制肿瘤细胞增殖活性[J]. *有机化学*, 2013, 33(1) :169-173.
- [19] CHEN J X, LIN W E, CHEN M Z, et al. Synthesis, characterization and potent DNA-cleaving activity of copper(II)-complexed berberine carboxylate[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22(23) :7056-7059.
- [20] CHEN L, Wilson D, Jayaram H N, et al. Dual inhibitors of inosine monophosphate dehydrogenase and histone deacetylases for cancer treatment [J]. *J Med Chem*, 2007, 50(26) :6685-6691.
- [21] GAO G, Mclean T, CHEN L, et al. Dual inhibitors of inosine monophosphate dehydrogenase and histone deacetylase based on a cinnamic hydroxamic acid core structure [J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18 (16): 5950-5964.
- [22] LI X, Inks E S, LI X, et al. Discovery of the first *N*-hydroxycinnamide-based histone deacetylase 1/3 dual inhibitors with potent oral antitumor activity[J]. *J Med Chem*, 2014, 57(8) :3324-3341.
- [23] Ellman G L, Courtney K D, Jr A V, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity[J]. *Biochem Pharmacol*, 1961, 7(2) :88-95.

[责任编辑 顾雪竹]