6-(烷胺酰肼基)-1-氮杂苯并蒽酮衍生物的合成及生物活性研究

钟书明 卫沈旗 刘 允 唐 煌*

(广西师范大学化学化工学院 药用资源化学与药物分子工程教育部重点实验室 桂林 541004)

摘要 以对氯苯乙胺和邻苯二甲酸酐为原料, 设计合成了一系列新的 6 位取代的 1-氮杂苯并蒽酮衍生物. 并对所合成衍生物的抑制乙酰胆碱酯酶、丁酰胆碱酯酶和乙酰胆碱酯酶诱导的 A β 聚集活性进行了评价. 合成的衍生物表现出中等的胆碱酯酶抑制活性, 大部分化合物的抑制 IC₅₀ 值处于微摩尔浓度水平. 动力学研究表明, 衍生物对乙酰胆碱酯酶的抑制类型属于非竞争性抑制. 所有化合物表现出有意义的乙酰胆碱酯酶诱导的 A β 聚集抑制活性, 其抑制率在 35.2%~62.2%之间. 而且, 合成的 18 个新衍生物中有 11 个化合物能够透过血脑屏障进入中枢神经系统.

关键词 1-氮杂苯并蒽酮衍生物; 合成; β -淀粉样蛋白; 乙酰胆碱酯酶抑制剂; 血脑屏障

Synthesis and Biological Evaluation of 6-[(Alkylamino)-hydrazide-yl]-1-azabenzanthrone Derivatives

Zhong, Shuming Wei, Shenqi Liu, Yun Tang, Huang*

(Key Laboratory for the Chemistry and Molecular Engineering of Medicinal Resources of Ministry of Education, School of Chemistry & Chemical Engineering, Guangxi Normal University, Guilin 541004)

Abstract A series of novel 6-substituted 1-azabenzanthrone derivatives have been designed and synthesized from 4-chlorophenethylamine and phthalic anhydride. Their abilities to inhibit acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BChE) and AChE-induced β -amyloid (A β) aggregation were also tested. The synthetic compounds exhibited moderate cholinesterase inhibitory activity with IC₅₀ values in the micromolar range in most cases. Non-competitive inhibition was found for these derivatives to AChE by the graphical analysis of steady-state inhibition data. Moreover, all compounds exhibited significant inhibitory activity on AChE-induced A β aggregation with inhibitory potency from 35.3% to 62.2%. Finally, eleven out of eighteen synthetic compounds were predicted to be able to cross the blood-brain barrier (BBB) to reach their targets in the central nervous system (CNS) according to a parallel artificial membrane permeation assay.

Keywords 1-azabenzanthrone derivative; synthesis; β -amyloid; acetylcholinesterase inhibitor; blood-brain barrier

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种以进行性认知功能障碍和记忆力衰退为主要特征的中枢神经系统不可逆的退行性疾病, 俗称老年痴呆(Senile Dementia). 目前, 全球阿尔茨海默病患者约为 3000 万^[1], 其发病率在 65 岁以上老年人中约为 10%^[2]. 据统计, 2013 年我国老年人口数量将突破 2 亿, 达到 2.02 亿, 老龄化水平达到 14.8%. 随着人口老龄化的加剧, 我国 AD 发病率、致死率将逐年提高, 成为严重威胁老年人生命健康和生存质量的主要疾病之一. AD 致病因复杂, 被认为是多种分子机制、多种因素相互作用的结果. 临床上

用于治疗 AD 的药物多属于针对单靶标的化合物, 这类化合物可缓解 AD 症状, 但未能从根本上改善疾病状态或终止疾病的进程. 因为 AD 的发病机制很复杂, 被认为是多种分子机制、多种因素相互作用的结果. 所以, 针对 AD 多机制、多因素特点的多靶点治疗策略便成了 AD 治疗药物研发的热点和趋势^[3~8].

所有氧化异阿朴菲类生物碱的共同特点就是拥有一个 1-氮杂苯并蒽酮(1-azabenzanthrone)结构(图 1), 其结构骨架具有平面芳香稠环的结构特征, 与碘化丙啶 Propidium 的菲环结构相似. 可以通过 π - π 堆积作用与乙

* E-mail: hyhth@163.com

Received May 25, 2013; revised September 13, 2013; published online September 25, 2013.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81260471), the Natural Science Foundation of Guangxi Province (No. 2013GXNSFAA019038) and the Key Laboratory for the Chemistry and Molecular Engineering of Medicinal Resources, Ministry of Education (No. CMEMR2012-A05).

国家自然科学基金(Nos. 81260471)、广西自然科学基金(No. 2013GXNSFAA019038)、药用资源化学与药物分子工程教育部重点实验室(No. CMEMR2012-A05)资助项目.

酰胆碱酯酶(AChE)的外周阴离子位点 PAS 部位结合,起到抑制AChE和AChE诱导的A β 聚积的协同作用^[9,10],是一类非常有前景的抗AD先导化合物.本工作基于AChE分子靶标的“双中心”理论,在1-氮杂苯并蒽酮的6-位引入不同链长的胺基烷基链,设计合成了18个新的衍生物(Scheme 1).体外生物活性筛选结果表明,合成的化合物不仅具有较强的AChE抑制活性和抗AChE诱导的A β 聚集能力,而且大部分的衍生物能够透过血脑屏障(BBB)进入中枢神经系统(CNS).

图1 1-氮杂苯并蒽酮的结构
Figure 1 Structure of 1-azabenzanthrone

1 结果与讨论

1.1 化合物的合成

以对氯苯乙胺和邻苯二甲酸酐为原料,经过Bradsher和傅克酰基化关环^[11,12],得到6-氯-1-氮杂苯并

蒽酮 **3**,在正戊醇的反应体系中,6-氯-1-氮杂苯并蒽酮被胍取代得到6-胍基-1-氮杂苯并蒽酮(**4**),化合物**4**与卤代烷基酰卤反应,最后与各种仲氨结合,得到不同链长的共18个新的氧化异阿朴菲衍生物,合成路线和衍生物的结构如Scheme 1所示.

不同链长的化合物**5**,**6**和**7**与胺反应的活性有较大的差别.化合物**8a**~**8h**的合成温度不宜超过50℃,否则反应副产物复杂难以纯化、产率低;化合物**9a**~**9h**的合成以乙醇作为溶剂,在回流的条件下反应效果较好;当 $n=3$ 时,化合物**7**发生分子内取代反应得到产物**10a**和**10b**^[13].

1.2 化合物的生物活性筛选

1.2.1 衍生物对AChE和丁酰胆碱酯酶(BChE)抑制能力评价

采用改进的Ellman方法^[14]研究了所合成的衍生物对AChE和BChE的抑制能力,结果如表1所示.所有衍生物对AChE和BChE的抑制能力强于先导化合物**4**,所有衍生物对AChE的抑制 IC_{50} 值处于微摩尔浓度水平;衍生物对AChE抑制能力最强的化合物**9e**的 IC_{50} 值为8.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;化合物对BChE的抑制 IC_{50} 值在

Reagent and conditions: (a) $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ (reflux); (b) anhydrous AlCl_3 (220℃); (c) concentrated H_2SO_4 (260℃); (d) $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}/1\text{-pentanol}$ (reflux); (e) $\text{COCl}(\text{CH}_2)_n\text{Cl}$, r.t., 36 h; (f) **8a**~**8h**: $\text{R}_2\text{NH}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{NaI}$ (35℃); **9a**~**9h**: $\text{R}_2\text{NH}/\text{EtOH}/\text{NaI}$, reflux; **10a**, **10b**: $\text{R}_2\text{NH}/\text{CH}_3\text{CN}$ or EtOH/NaI (35℃)

Scheme 1

表 1 1-氮杂苯并蒽酮衍生物的抗 AD 活性筛选结果
Table 1 Result of anti-Alzheimer's disease activity of 1-azabenzanthrone derivatives

Compd.	IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹)		Inhibition of AChE-induced Aβ aggregation ^b /%	PAMPA-BBB assay		lg P
	AChE ^a	BChE ^b		P _e × 10 ⁻⁶ /(cm·s ⁻¹)	Prediction ^d	
4	>100	>100	N.d. ^e	N.d. ^e	N.d. ^e	N.d. ^e
8a	54.4 ± 0.5	14.7 ± 0.2	43.7	5.1 ± 0.2	CNS+	1.55
9a	31.9 ± 0.5	5.43 ± 0.03	46.6	5.2 ± 0.1	CNS+	2.08
8b	42.9 ± 0.3	15.3 ± 0.1	45.9	5.8 ± 0.2	CNS+	1.44
9b	19.3 ± 0.4	9.10 ± 0.03	51.3	3.3 ± 0.3	CNS+/-	1.01
8c	49.7 ± 0.3	12.0 ± 0.4	41.9	6.1 ± 0.3	CNS+	1.20
9c	18.6 ± 0.4	4.62 ± 0.02	35.3	4.8 ± 0.2	CNS+	1.15
8d	34.3 ± 0.1	10.9 ± 0.4	46.1	4.0 ± 0.1	CNS+/-	0.79
9d	25.3 ± 0.4	5.12 ± 0.01	52.9	2.8 ± 0.2	CNS+/-	1.05
8e	23.5 ± 0.3	18.8 ± 0.3	48.5	6.9 ± 0.4	CNS+	1.22
9e	8.3 ± 0.2	4.25 ± 0.02	62.2	4.7 ± 0.3	CNS+	1.75
8f	53.2 ± 0.2	21.1 ± 0.5	42.2	0.8 ± 0.1	CNS-	0.51
9f	43.7 ± 0.5	>100	55.7	0.5 ± 0.2	CNS-	0.72
8g	65.2 ± 0.3	>100	60.7	4.6 ± 0.3	CNS+	2.41
9g	55.8 ± 0.1	>100	52.0	3.5 ± 0.1	CNS+/-	1.04
8h	58.2 ± 0.2	>100	56.1	8.1 ± 0.5	CNS+	2.27
9h	25.2 ± 0.4	3.92 ± 0.02	25.8	9.5 ± 0.4	CNS+	2.75
10a	69.3 ± 0.2	>100	4.4	3.7 ± 0.1	CNS+/-	0.75
10b	26.4 ± 0.5	16.2 ± 0.1	54.3	13.3 ± 0.3	CNS+	1.37
Tacrine	0.049 ± 0.001	0.0071 ± 0.0001	3.1	N.d. ^e	N.d. ^e	N.d. ^e
Propidium iodide	N.d. ^g	N.d. ^e	82.6	N.d. ^e	N.d. ^e	N.d. ^e

^a IC₅₀: 50% inhibitory concentration (means ± SEM of three experiments); ^b Co-aggregation inhibition of Aβ (1~40) and AChE 0.06 U was detected by ThT assay. The data (%) showed that the test compounds inhibited the co-aggregation at 100 μmol·L⁻¹; ^c Data are the mean ± SD (n=3); ^d 'CNS+' (high BBB permeation predicted): P_e (10⁻⁶ cm·s⁻¹) > 4.2; 'CNS-' (low BBB permeation predicted): P_e (10⁻⁶ cm·s⁻¹) < 2.5; 'CNS+/-' (BBB permeation uncertain): P_e (10⁻⁶ cm·s⁻¹) from 2.5 to 4.2; ^e Not determined.

3.92~21.1 μmol·L⁻¹之间, 总体上强于对 AChE 的抑制。从化合物的结构上分析, 在先导化合物 **4** 上引入胺基烷基侧链后, 能有效地提高衍生物的水溶性, 因此, 一定程度上提升了衍生物对 AChE 和 BChE 的抑制能力。同时, 不同末端基团结构对 AChE 抑制能力的影响较大。侧链末端结构为六元 N 杂环的衍生物对 AChE 的抑制能力最强, 这与我们课题组以前的研究结论相一致^[9,10]。但在末端基团六元 N 杂环的对位引入 N, O, S 三种杂原子后, 衍生物对 AChE 的抑制能力降低了 3~7 倍, 比末端结构为五元 N 杂环的衍生物还要差。末端为链烷基胺基时, 随着基团的体积增加, 其空间位阻也相应增大, 有利于衍生物对 AChE 和 BChE 的抑制^[15]。最后, 从表 1 可知, 增长碳链使得衍生物对酶的抑制能力呈现出增强的趋势。可见, 适当地增长衍生物的侧链有利于加强侧链末端基团与酶活性中心的结合, 从而增强整个分子与酶的结合。但是过长的侧链会导致侧链末端基团的扰动性增加, 反而降低化合物与酶的结合能力。相比于 9 位上的 1-氮杂苯并蒽酮衍生物 4 个原子的最佳的链长^[9,10], 6 位取代的衍生物在具有相同链长的情况下, 其对胆碱酯酶的抑制能力比 9 位取代的相差近 2000 倍, 这说明在 1-氮杂苯并蒽酮母环的不同位点引入侧链会直接导致

其与酶结合时的空间取向的改变, 造成不同位点取代衍生物与酶的结合能力的巨大差别。

图 2A 为衍生物 **9e** 与 AChE 作用的动力学 Lineweaver-Bruk 曲线图, 所有的直线都交于坐标轴的 X 轴, 表明此类衍生物对 AChE 的抑制类型属于非竞争性抑制。从动力学研究的结果和 1-氮杂苯并蒽酮母体的结构特点推断, 所合成的衍生物很可能作用于 AChE 的 PAS 部位。由于与乙酰胆碱酯酶的 PAS 部位结合的乙酰胆碱酯酶抑制剂(AChEIs)可以有效地阻止 AChE 诱导的 Aβ 聚集^[16~18], 因此我们推测衍生物很可能具有抗 AChE 诱导的 Aβ 聚集的能力。图 2B 为衍生物 **9e** 与 BChE 抑制作用的动力学曲线图, 所有的直线都交于坐标轴的 Y 轴, 表明此类衍生物对 BChE 的抑制类型属于竞争性抑制。化合物主要作用于 BChE 的活性中心。

1.2.2 衍生物抑制 AChE 诱导 Aβ 聚集能力评价

采用硫黄素-T (Thioflavin T, ThT)荧光分析法^[19,20]研究了所合成的衍生物对 AChE 诱导的 Aβ(1-40)聚积的抑制作用。体外研究证实, AChE 能直接促使 β-Amyloid 单体发生聚集形成 Aβ 寡聚纤维体和 AChE-Aβ 的复合物^[21], Aβ 聚集形成纤维后可与 ThT 发生特异性结合, ThT 的荧光强度与淀粉样纤维的量成正比, 从而反映

图2 化合物 9e 与 AChE 作用的动力学曲线(A)和化合物 9e 与 BChE 作用的动力学曲线(B)

Figure 2 Kinetic curves of compound 9e and AChE (A), and the kinetic curves of compound 9e and BChE (B)

$A\beta$ 聚集的程度, 荧光强度值越高, 说明 $A\beta$ 聚集的量越多. 如果化合物具有抑制 AChE 诱导的 $A\beta$ 聚集能力, 那么就会使 ThT 的荧光强度值降低.

化合物对 AChE 诱导的 $A\beta(1-40)$ 聚集抑制结果如表 1 所示. 大部分衍生物具有较强的 AChE 诱导的 $A\beta(1-40)$ 聚集抑制作用, 其抑制率在 40%~60% 之间, 其中抑制作用最强的化合物 9e 抗 $A\beta(1-40)$ 聚集抑制率为 62.2%. 其原因可能是 1-氮杂苯并蒽酮母环的平面芳香稠环能通过 π - π 堆积作用与 AChE 的 PAS 部位结合, 特别是与 PAS 部位的 Trp 279 氨基酸残基具有较强的结合能力^[9].

1.2.3 衍生物的油水分配系数和血脑屏障透过能力评价

药物分子对血脑屏障的透过能力是决定其能否通过 BBB 到达 CNS 从而产生药效的关键性因素, 直接决定着化合物开发成为抗 AD 候选药物的潜力. 我们采用猪脑磷脂提取物模拟人脑内磷脂膜建立平行人工膜透过性测试(PAMPA-BBB)模型, 通过检测 9 个市售的药物的血脑屏障透过率(表 2)与文献值^[22]对比, 得到相关性方程: $y = 0.866x + 0.7068$ ($R^2 = 0.9408$). 根据相关性方

程和 Di 等^[22]建立的评价条件, 我们对化合物的血脑屏障透过能力可作如下定义:

(a) ‘CNS+’ (能够透过血脑屏障): P_e ($10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$) > 4.2 ;

(b) ‘CNS-’ (不能够透过血脑屏障): P_e ($10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$) < 2.5 ;

(c) ‘CNS+/-’ (无法确定是否能够透过血脑屏障): P_e ($10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$) $= 2.5 \sim 4.2$.

表 2 9 个市售药物的 PAMPA-BBB 实验数据和文献值

Table 2 Experimental and literature data in the PAMPA-BBB assay for nine commercial drugs

Compound	Bibliography ^a	Experiment ^b
Imipramine	13	11.5
Desipramine	12	10.1
Promazine	8.8	8.2
Chlorpromazine	6.5	8.7
Clonidine	5.3	6.3
Hydrocortisone	1.9	2.3
Enoxacin	0.9	0.5
Caffeine	1.3	1.4
Cimetidine	0	0.4

^a Taken from Ref. [22]; ^b Data are the mean of three independent experiments.

我们采用 PAMPA-BBB 模型^[23,24]评估了所合成的衍生物对 BBB 的透过能力, 结果显示大部分的化合物具有很好的血脑屏障透过能力. 如表 1 所示: 所有化合物的有效透过系数 P_e 值在 $0.5 \times 10^{-6} \sim 13.3 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 之间, 其中化合物 10b 对血脑屏障的透过能力最强. 化合物 8f 和 9f 的血脑屏障透过能力较差, P_e 值小于 $1.0 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 即无法透过血脑屏障. 化合物 9h, 8h, 8e 和 8c 等对 BBB 具有较强的透过能力, 预测结果有 11 个衍生物能够透过血脑屏障.

药物的油水分配系数也是反映药物经生物膜转运的重要物理参数. 药物在体内的溶解、吸收、分布、转运等均与油水分配系数有关. 通过对合成衍生物的油水分配系数($\lg P$)测定, 所有化合物的 $\lg P$ 值在 0.51~2.75 之间. 从表 1 中我们发现, 衍生物的血脑屏障透过能力与其油水分配系数呈现出较好的相关性. $\lg P$ 值较小的化合物其血脑屏障透过能力较差. 这说明, 脂溶性越好的化合物具有更强的血脑屏障透过能力.

2 结论

近年来, 我们课题组一直致力于氧化异阿朴菲类生物碱的结构改造和抗 AD 活性研究, 1-氮杂苯并蒽酮的 9 位和 10 位衍生物对胆碱酯酶和 $A\beta$ 聚集有极强的抑制能力^[9,10,25,26]. 由于 1-氮杂苯并蒽酮的可取代位点较多, 在不同位点取代将直接影响衍生物在与酶结合时的空间取向. 所以在本工作中, 我们设计、合成了 18 个新的 6-

取代-1-氮杂苯并蒽酮衍生物. 结果表明, 所合成的化合物对 AchE, BChE 和 AChE 诱导的 $\text{A}\beta$ 聚集抑制能力低于 9 位和 10 位取代的衍生物. 其原因可能在于 9, 10 位取代的衍生物的侧链末端能够进入 AChE 的活性中心部位, 而 6 位取代衍生物在与酶结合时, 具有与 9, 10 位取代完全不同的空间取向, 导致末端基团不能进入酶的活性中心部位, 进而降低了其抑制能力. 但是化合物对酶的非竞争性抑制类型以及化合物表现出较强的抗 AChE 诱导的 $\text{A}\beta$ 聚集活性说明, 6 取代衍生物仍然可以与 AChE 的 PAS 部位结合.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

X-4 型熔点仪(北京泰克, 温度计未校正); 德国布鲁克道尔顿公司的 ESQUIRE HTC 型质谱仪; 瑞士 Bruker 公司的 AVANCE AV 500MHz 型超导核磁共振仪(溶剂为 CDCl_3 或 $\text{DMSO}-d_6$, 内标 TMS); M1000 型多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司); PB-10 pH 计(德国 Sartorius 公司); ELX 808 型多功能酶标仪(美国 Bio-Tek 公司). 其他试剂除了对氯苯乙胺(CR), 均为市售分析纯.

3.2 化合物的合成

3.2.1 2-[2-(4'-氯苯基)-乙基]-异吲哚-1,3-二酮(**1**)的制备

将 35.0 g (0.236 mol)邻苯二甲酸酐和 36.8 g (0.236 mol)对氯苯乙胺溶于 250 mL 甲苯, 搅拌回流 6 h, 趁热抽滤, 冷却结晶, 抽滤, 得到 47.5 g 化合物 **1**, 为白色结晶, 产率 71%. m.p. 145~147 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 7.82~7.84 (m, 2H), 7.70~7.72 (m, 2H), 7.39 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 7.12 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 3.90 (t, $J=7.5$ Hz, 2H), 2.95 (t, $J=7.4$ Hz, 1H); ESI-MS m/z : 286 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.2.2 6-氯-1-氮杂苯并蒽酮(**3**)的制备

将 52.0 g (0.390 mol)无水三氯化铝和 10.0 g (0.171 mol)氯化钠置于 1000 mL 三孔圆底烧瓶中混合加热至 140 °C 熔融, 向其分批缓慢加入 47.5 g (0.166 mol)化合物 **1**, 原料加入完毕后, 升温至 220 °C, 电动搅拌反应 3 h, 乘热倒入研钵中, 冷却, 研碎; 分批加入到 80 °C 的 150 mL 浓硫酸中, 加完后升温至 260 °C, 搅拌反应 2.5 h, 冷却, 倒入到约 400 mL 的冰水中, 用 NaOH 调节其 pH 值约 2~3, 有大量固体析出, 抽滤, 得到粗产品. 粗产品经甲苯重结晶, 120 °C 真空干燥 48 h, 得到 6-氯-1-氮杂苯并蒽酮 14.2 g^[27], 产率 32%. m.p. 193~195 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 7.48 (d, $J=9.1$ Hz, 1H),

7.68 (d, $J=5.4$ Hz, 1H), 7.78 (t, $J=8.1$ Hz, 1H), 7.82 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 8.04 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 8.56 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 8.78 (d, $J=5.3$ Hz, 1H), 8.96 (d, $J=8.3$ Hz, 1H); ESI-MS m/z : 267 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.2.3 6-胍基-1-氮杂苯并蒽酮(**4**)的合成

将 3.6 g (0.0135 mol) 6-氯-1-氮杂苯并蒽酮和 15 mL 正戊醇加入到 250 mL 圆底烧瓶中, 加热回流至原料完全溶解; 向其加入 80 mL 80%水合胍, 回流反应 4 h, 趁热抽滤, 粗产品用 N,N -二甲基甲酰胺/甲醇(体积比 1:2)重结晶, 80 °C 真空干燥, 得到化合物 **4** 为黄色的固体 3.2 g, 产率 91%. m.p. 253~255 °C; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz) δ : 5.34 (s, 2H), 7.76 (t, $J=7.3$ Hz, 1H), 7.86 (d, $J=5.2$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J=5.1$ Hz, 1H), 8.11 (d, $J=9.5$ Hz, 1H), 8.18 (d, $J=9.5$ Hz, 1H), 8.49 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 8.71 (d, $J=5.0$ Hz, 1H), 8.99 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 12.61 (s, 1H); ESI-MS m/z : 262 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.2.4 6-(2-氯乙酰胍基)-1-氮杂苯并蒽酮(**5**)的合成

将 2.5 g (0.00958 mol) 6-胍基-1-氮杂苯并蒽酮和 20 mL 氯乙酰氯置于 50 mL 圆底烧瓶中, 混合室温搅拌反应 20 h, 用砂芯漏斗抽滤, 无水乙醚洗涤, 60 °C 真空干燥, 得到化合物 **5** 为红色粉末 3.2 g, 产率 100 %. m.p. 242~244 °C; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz) δ : 4.39 (s, 2H), 7.75 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 7.83 (t, $J=7.3$ Hz, 1H), 7.95 (t, $J=7.3$ Hz, 1H), 8.05 (d, $J=4.8$ Hz, 1H), 8.37 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 8.49 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 8.80 (d, $J=4.9$ Hz, 1H), 9.03 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 11.26 (s, 1H), 12.43 (s, 1H); ESI-MS m/z : 339 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.2.5 6-(3-氯丙酰胍基)-1-氮杂苯并蒽酮(**6**)的合成

将 2.5 g (0.00958 mol) 6-胍基-1-氮杂苯并蒽酮和 20 mL 氯丙酰氯置于 50 mL 圆底烧瓶中, 混合室温搅拌反应 24 h, 用砂芯漏斗抽滤, 无水乙醚洗涤, 60 °C 真空干燥, 得到化合物 **6** 为红色粉末 3.0 g, 产率 89%. m.p. 201~203 °C; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz) δ : 2.90 (d, $J=6.2$ Hz, 2H), 3.95 (t, $J=6.2$ Hz, 2H), 7.77 (d, $J=9.3$ Hz, 1H), 7.83 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.94 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 8.07 (d, $J=5.3$ Hz, 1H), 8.37 (d, $J=9.3$ Hz, 1H), 8.46 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 8.76 (d, $J=5.3$ Hz, 1H), 9.05 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 11.12 (s, 1H), 12.49 (s, 1H); ESI-MS m/z : 353 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.2.6 6-(4-氯丁酰胍基)-1-氮杂苯并蒽酮(**7**)的合成

将 2.5 g (0.00958 mol) 6-胍基-1-氮杂苯并蒽酮和 20 mL 氯丁酰氯置于 50 mL 圆底烧瓶中, 混合室温搅拌反应 24 h, 用砂芯漏斗抽滤, 无水乙醚洗涤, 60 °C 真空干燥, 得到化合物 **7** 为红色粉末 2.7 g, 产率 77%. m.p. 189~191 °C; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz) δ : 2.08~

2.13 (m, 2H), 2.55 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 3.76 (t, $J=6.5$ Hz, 2H), 7.76 (d, $J=9.4$ Hz, 1H), 7.83 (t, $J=7.3$ Hz, 1H), 7.94 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 8.07 (d, $J=5.3$ Hz, 1H), 8.33 (d, $J=9.4$ Hz, 1H), 8.47 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 8.76 (d, $J=5.3$ Hz, 1H), 9.05 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 10.92 (s, 1H), 12.47 (s, 1H); ESI-MS m/z : 367 $[M+H]^+$.

3.2.7 6-(2-氨基乙酰肼基)-1-氮杂苯并蒽酮 **8a~8h** 的合成

将 0.4 g (1.18 mmol) 化合物 **5**、0.35 g NaI 和 40 mL 乙腈置于 100 mL 圆底烧瓶中, 搅拌升温至 35 °C; 缓慢滴加入 10 mL 含相应胺(3.54 mmol)的乙腈溶液, TLC 追踪反应; 停止反应后减压除去溶剂, 得到的残余物溶于适量的氯仿, 并用蒸馏水洗涤, 氯仿层无水 Na_2SO_4 干燥, 用硅胶柱层析(氯仿/甲醇)纯化得到化合物 **8a~8h**.

6-(2-二甲氨基乙酰肼基)-1-氮杂苯并蒽酮(**8a**): 硅胶柱层析(氯仿/甲醇, $V:V=100:3$)纯化得到化合物 **8a** 为红色粉末 0.2 g, 产率 48%. m.p. 141~142 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 2.52 (s, 6H), 3.29 (s, 2H), 7.40 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J=5.1$ Hz, 1H), 7.71 (t, $J=7.3$ Hz, 1H), 7.85 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 8.54 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 8.72 (d, $J=5.1$ Hz, 1H), 9.04 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 12.39 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125.75 MHz) δ : 48.3 (2C), 55.9, 102.9, 120.3, 121.9, 123.0, 124.8, 126.3, 129.2, 129.6, 132.3, 132.7, 135.4, 136.5, 141.9, 142.8, 152.3, 167.8, 180.6; ESI-MS m/z : 347 $[M+H]^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2$: C 69.35, H 5.24, N 16.17; found C 69.01, H 5.46, N 15.85.

6-(2-二乙氨基乙酰肼基)-1-氮杂苯并蒽酮(**8b**): 硅胶柱层析(氯仿/甲醇, $V:V=100:2$)纯化得到化合物 **8b** 为红色粉末 0.24 g, 产率 54.5%. m.p. 151~154 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 1.24 (t, $J=7.1$ Hz, 6H), 2.81 (q, $J=7.1$ Hz, 4H), 3.41 (s, 2H), 7.44 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 7.62 (d, $J=5.1$ Hz, 1H), 7.70 (t, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.84 (t, $J=7.7$ Hz, 1H), 7.94 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 8.55 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 8.73 (d, $J=5.2$ Hz, 1H), 9.04 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 12.46 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125.75 MHz) δ : 12.2 (2C), 49.0 (2C), 56.6, 105.5, 117.8, 119.9, 121.0, 123.0, 124.7, 126.5, 129.1, 129.2, 129.3, 132.5, 135.9, 136.3, 141.8, 144.7, 154.3, 183.7; ESI-MS m/z : 375 $[M+H]^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_2$: C 70.57, H 5.92, N 14.96; found C 70.71, H 6.20, N 14.62.

6-(2-二丙氨基乙酰肼基)-1-氮杂苯并蒽酮(**8c**): 硅胶柱层析(氯仿/甲醇, $V:V=100:1$)纯化得到化合物 **8c** 为黄色粉末 0.18 g, 产率 38.3%. m.p. 191~192 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 1.03 (t, $J=7.3$ Hz, 6H),

1.61~1.68 (m, 4H), 2.64 (t, $J=7.3$ Hz, 4H), 3.40 (s, 2H), 7.44 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 7.64 (d, $J=5.1$ Hz, 1H), 7.71 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.85 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.96 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 8.56 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 8.74 (d, $J=5.1$ Hz, 1H), 9.04 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 12.42 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125.75 MHz) δ : 11.8 (2C), 20.5 (2C), 57.6 (2C), 58.0, 105.6, 117.7, 121.0, 123.0, 124.7, 126.5, 129.1, 129.3, 132.4, 132.5, 135.9, 136.3, 141.8, 144.7, 154.4, 170.7, 183.8; ESI-MS m/z : 403 $[M+H]^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_2$: C 71.62, H 6.51, N 13.92; found C 71.87, H 6.84, N 13.86.

6-(2-吡咯基乙酰肼基)-1-氮杂苯并蒽酮(**8d**): 硅胶柱层析(氯仿/甲醇, $V:V=100:3$)纯化得到化合物 **8d** 为红色粉末 0.15 g, 产率 34%. m.p. 185~187 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 2.00 (s, 4H), 2.98 (s, 4H), 3.55 (s, 2H), 7.53 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J=5.1$ Hz, 1H), 7.68 (t, $J=7.4$ Hz, 1H), 7.82 (t, $J=7.4$ Hz, 1H), 7.87 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 8.53 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 8.70 (d, $J=5.1$ Hz, 1H), 9.01 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 12.76 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125.75 MHz) δ : 24.1 (2C), 55.0 (2C), 58.6, 105.1, 118.3, 121.0, 123.1, 124.7, 126.4, 129.2, 129.4, 132.3, 132.6, 135.9, 136.1, 141.7, 144.5, 153.6, 171.2, 183.2; ESI-MS m/z : 373 $[M+H]^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2$: C 70.95, H 5.41, N 15.04; found C 70.61, H 5.56, N 14.76.

6-(2-哌啶基乙酰肼基)-1-氮杂苯并蒽酮(**8e**): 硅胶柱层析(氯仿/甲醇, $V:V=100:2$)纯化得到化合物 **8e** 为黄色粉末 0.17 g, 产率 37%. m.p. 189~192 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 1.56 (s, 2H), 1.72~1.74 (m, 4H), 2.70 (t, $J=7.2$ Hz, 4H), 3.32 (s, 2H), 7.46 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 7.63 (d, $J=5.1$ Hz, 1H), 7.71 (t, $J=7.3$ Hz, 1H), 7.84 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.95 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 8.55 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 8.74 (d, $J=5.1$ Hz, 1H), 9.04 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 12.42 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125.75 MHz) δ : 23.5, 26.0 (2C), 55.3 (2C), 61.6, 105.5, 117.8, 121.0, 122.9, 124.7, 126.5, 129.1, 129.3, 132.4, 132.5, 135.9, 136.2, 141.8, 144.7, 154.3, 169.6, 183.7; ESI-MS m/z : 387 $[M+H]^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_2$: C 71.48, H 5.74, N 14.50; found C 71.73, H 5.69, N 14.24.

6-(2-吗啉基乙酰肼基)-1-氮杂苯并蒽酮(**8f**): 硅胶柱层析(氯仿/甲醇, $V:V=100:2$)纯化得到化合物 **8f** 为黄色粉末 0.2 g, 产率 43%. m.p. 245~247 °C; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz) δ : 2.59 (s, 4H), 3.25 (s, 2H), 3.67~3.69 (m, 4H), 7.64 (d, $J=9.3$ Hz, 1H), 7.79 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.92 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.96 (d, $J=5.0$ Hz, 1H), 8.30 (d, $J=9.3$ Hz, 1H), 8.48 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 8.78 (d, $J=$

5.0 Hz, 1H), 9.00 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 12.39 (s, 1H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125.75 MHz) δ : 53.8 (2C), 60.6, 66.5 (2C), 103.9, 119.5, 122.1, 122.6, 124.8, 126.5, 129.2, 129.9, 132.4, 133.0, 135.7, 137.4, 142.3, 143.5, 154.9, 169.2, 182.4; ESI-MS m/z : 389 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$: C 65.01, H 5.46, N 13.78; found C 65.17, H 5.58, N 13.47.

6-(2-硫代吗啉基乙酰肼基)-1-氮杂苯并蒽酮(**8g**): 硅胶柱层析(氯仿/甲醇, $V:V=100:1$ 体积比)纯化得到化合物 **8g** 为暗黄色粉末 0.2 g, 产率 42%. m.p. 262~265 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 2.72~2.74 (m, 4H), 2.84~2.86 (m, 2H), 3.28 (s, 4H), 7.63 (d, $J=9.4$ Hz, 1H), 7.79 (t, $J=7.3$ Hz, 1H), 7.92 (t, $J=7.4$ Hz, 1H), 7.96 (d, $J=5.1$ Hz, 1H), 8.29 (d, $J=9.3$ Hz, 1H), 8.48 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 8.78 (d, $J=5.1$ Hz, 1H), 9.00 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 12.39 (s, 1H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125.75 MHz) δ : 27.4 (2C), 55.1, 61.0 (2C), 103.9, 119.5, 122.1, 122.6, 124.8, 126.5, 129.2, 129.9, 132.4, 133.0, 135.7, 137.4, 142.3, 143.5, 154.9, 169.5, 182.4; ESI-MS m/z : 405 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$: C 65.33, H 4.98, N 13.85; found C 65.70, H 5.31, N 13.43.

6-(2-哌嗪基乙酰肼基)-1-氮杂苯并蒽酮(**8h**): 硅胶柱层析(氯仿/甲醇, $V:V=100:5$)纯化得到化合物 **8h** 为暗红色粉末 0.2 g, 产率 43%. m.p. 182~185 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 2.63 (t, $J=4.7$ Hz, 4H), 2.89 (t, $J=4.8$ Hz, 4H), 3.19 (s, 2H), 7.76 (t, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.81 (d, $J=9.5$ Hz, 1H), 7.86~7.89 (m, 2H), 8.12 (d, $J=9.5$ Hz, 1H), 8.49 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 8.72 (d, $J=5.0$ Hz, 1H), 9.00 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 13.23 (s, 1H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125.75 MHz) δ : 45.0 (2C), 53.2 (2C), 61.4, 102.9, 120.5, 121.8, 123.1, 124.7, 126.3, 129.3, 129.5, 132.2, 132.7, 135.3, 136.3, 141.9, 142.7, 152.0, 168.5, 180.2; ESI-MS m/z : 388 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_2$: C 68.20, H 5.46, N 18.08; found C 67.84, H 5.78, N 18.19.

3.2.8 6-(3-胺基丙酰肼基)-1-氮杂苯并蒽酮 **9a~9h** 的合成

将 0.5 g (1.42 mmol) 化合物 **6**、0.2 g NaI 和 40 mL 无水乙醇置于 100 mL 圆底烧瓶中, 搅拌升温回流; 缓慢滴加入 10 mL 含相应的胺(4.26 mmol)的乙醇溶液, TLC 追踪反应; 停止反应后冷却, 减压除去溶剂; 得到的残余物溶于适量的氯仿, 并用蒸馏水洗涤, 氯仿层无水 Na_2SO_4 干燥, 用硅胶柱层析(氯仿/甲醇)纯化得到化合物 **9a~9h**.

6-(3-二甲胺基丙酰肼基)-1-氮杂苯并蒽酮(**9a**): 硅

胶柱层析(氯仿/甲醇, $V:V=100:4$)纯化得到化合物 **9a** 为红色粉末 0.28 g, 产率 55%. m.p. 179~181 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 2.42 (s, 6H), 2.63 (t, $J=6.1$ Hz, 2H), 2.75 (t, $J=6.2$ Hz, 2H), 7.44 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 7.55 (d, $J=5.2$ Hz, 1H), 7.67 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.80 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.87 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 8.52 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 8.68 (d, $J=5.0$ Hz, 1H), 8.98 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 12.55 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125.75 MHz) δ : 31.6, 44.5 (2C), 54.7, 105.0, 117.9, 120.9, 123.0, 124.7, 126.5, 129.0, 129.2, 132.3, 132.5, 135.8, 136.2, 141.7, 144.5, 153.9, 171.1, 183.4; ESI-MS m/z : 361 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2$: C 69.98, H 5.59, N 15.55; found C 70.12, H 5.66, N 15.20.

6-(3-二乙胺基丙酰肼基)-1-氮杂苯并蒽酮(**9b**): 用硅胶柱层析(氯仿/甲醇, $V:V=100:3$)纯化得到化合物 **9b** 为暗黄色粉末 0.2 g, 产率 36%. m.p. 134~136 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 1.20 (t, $J=7.0$ Hz, 6H), 2.71 (t, $J=5.6$ Hz, 2H), 2.80 (q, $J=7.0$ Hz, 4H), 2.94 (t, $J=5.8$ Hz, 2H), 7.56 (d, $J=9.0$ Hz, 1H), 7.61 (d, $J=5.0$ Hz, 1H), 7.69 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.82 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.93 (d, $J=8.9$ Hz, 1H), 8.56 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 8.72 (d, $J=5.1$ Hz, 1H), 9.03 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 12.70 (s, 1H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125.75 MHz) δ : 11.1 (2C), 30.7, 48.8 (2C), 56.3, 103.6, 120.0, 122.1, 122.8, 124.9, 126.5, 129.3, 129.9, 132.5, 132.9, 135.7, 137.1, 142.2, 143.4, 154.0, 170.4, 181.9; ESI-MS m/z : 389 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$: C 67.96, H 6.45, N 13.78; found C 67.68, H 6.56, N 13.64.

6-(3-二丙胺基丙酰肼基)-1-氮杂苯并蒽酮(**9c**): 硅胶柱层析(氯仿/甲醇, $V:V=100:2$)纯化得到化合物 **9c** 为暗黄色粉末 0.3 g, 产率 51%. m.p. 180~181 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 0.95 (t, $J=7.35$ Hz, 6H), 1.58~1.62 (m, 4H), 2.58~2.51 (m, 4H), 2.65 (t, $J=6.1$ Hz, 2H), 2.89 (t, $J=6.1$ Hz, 2H), 7.51 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J=5.1$ Hz, 1H), 7.67 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.80 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.93 (d, $J=9.3$ Hz, 1H), 8.54 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 8.70 (d, $J=5.3$ Hz, 1H), 9.00 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 12.59 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125.75 MHz) δ : 11.9 (2C), 19.43 (2C), 31.3, 49.9, 55.1 (2C), 105.0, 118.1, 120.9, 123.1, 124.7, 126.5, 129.0, 129.2, 132.3, 132.5, 135.8, 136.2, 141.7, 144.6, 154.0, 171.1, 183.4; ESI-MS m/z : 417 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_2$: C 72.09, H 6.78, N 13.45; found C 71.95, H 6.97, N 13.12.

6-(3-吡咯基丙酰肼基)-1-氮杂苯并蒽酮(**9d**): 硅胶柱层析(氯仿/甲醇, $V:V=100:4$)纯化得到化合物 **9d**

为紫红色粉末 0.3 g, 产率 54%. m.p. 178~180 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 1.88~1.91 (m, 4H), 2.67 (t, $J=6.0$ Hz, 2H), 2.75 (t, $J=5.6$ Hz, 4H), 2.94 (t, $J=6.2$ Hz, 2H), 7.48 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J=5.2$ Hz, 1H), 7.67 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.80 (t, $J=7.4$ Hz, 1H), 7.89 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 8.54 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 8.69 (d, $J=5.0$ Hz, 1H), 8.99 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 12.66 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125.75 MHz) δ : 23.5 (2C), 32.7, 51.4, 53.4 (2C), 104.7, 117.9, 120.9, 122.9, 124.6, 126.4, 128.9, 129.1, 132.2, 132.4, 135.7, 136.1, 141.6, 144.3, 153.5, 170.8, 183.1; ESI-MS m/z : 387 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_2$: C 71.48, H 5.74, N 14.50; found C 71.75, H 5.86, N 14.25.

6-(3-哌啶基丙酰肼基)-1-氮杂苯并蒽酮(9e): 硅胶柱层析(氯仿/甲醇, $V:V=100:2$)纯化得到化合物 9e 为浅黄色粉末 0.35 g, 产率 61%. m.p. 185~188 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 1.52 (s, 2H), 1.67~1.69 (m, 4H), 2.63~2.68 (m, 6H), 2.77~2.79 (m, 2H), 7.48 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J=5.2$ Hz, 1H), 7.67 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.80 (t, $J=7.4$ Hz, 1H), 7.89 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 8.54 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 8.69 (d, $J=5.0$ Hz, 1H), 8.99 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 12.66 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125.75 MHz) δ : 24.0, 25.9 (2C), 30.7, 53.8 (2C), 54.0, 104.9, 117.9, 120.9, 123.1, 124.7, 126.5, 129.0, 129.2, 132.3, 132.5, 135.8, 136.2, 141.6, 144.5, 153.6, 170.7, 183.3; ESI-MS m/z : 401 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_2$: C 71.98, H 6.04, N 13.99; found C 72.12, H 6.36, N 13.67.

6-(3-吗啉基丙酰肼基)-1-氮杂苯并蒽酮(9f): 硅胶柱层析(氯仿/甲醇, $V:V=100:1$)纯化得到化合物 9f 为红色粉末 0.34 g, 产率 60%. m.p. 196~198 °C; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz) δ : 2.49~2.52 (m, 6H), 2.67 (t, $J=6.6$ Hz, 2H), 3.67 (t, $J=4.4$ Hz, 4H), 7.79 (d, $J=7.4$ Hz, 1H), 7.83 (d, $J=9.35$ Hz, 1H), 7.92 (t, $J=7.4$ Hz, 1H), 7.98 (d, $J=5.1$ Hz, 1H), 8.32 (d, $J=9.3$ Hz, 1H), 8.47 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 8.78 (d, $J=5.0$ Hz, 1H), 8.99 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 12.34 (s, 1H); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 125.75 MHz) δ : 31.7, 53.6 (2C), 54.7, 66.7 (2C), 103.9, 119.7, 122.1, 122.6, 124.8, 126.5, 129.3, 129.9, 132.3, 133.0, 135.7, 137.3, 142.3, 143.5, 155.0, 171.0, 182.5; ESI-MS m/z : 403 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$: C 68.64, H 5.51, N 13.92; found C 68.56, H 5.70, N 13.54.

6-(3-硫代吗啉基丙酰肼基)-1-氮杂苯并蒽酮(9g): 硅胶柱层析(氯仿/甲醇, $V:V=100:2$)纯化得到化合物 9g 为红色粉末 0.3 g, 产率 51%. m.p. 224~225 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 2.70~2.75 (m, 10H), 3.31 (s,

2H), 7.78~7.81 (m, 2H), 7.92 (t, $J=7.4$ Hz, 1H), 7.99 (t, $J=5.1$ Hz, 1H), 8.30 (d, $J=9.3$ Hz, 1H), 8.47 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 8.79 (d, $J=5.1$ Hz, 1H), 8.99 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 12.36 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125.75 MHz) δ : 27.7 (2C), 31.6, 54.8 (2C), 54.9, 103.9, 119.7, 122.1, 122.6, 124.8, 126.5, 129.2, 129.9, 132.3, 133.1, 135.7, 137.3, 142.3, 143.5, 154.9, 171.1, 182.5; ESI-MS m/z : 419 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}\cdot\text{H}_2\text{O}$: C 63.28, H 5.54, N 12.83; found C 63.41, H 5.88, N 12.52.

6-(3-哌嗪基丙酰肼基)-1-氮杂苯并蒽酮(9h): 硅胶柱层析(氯仿/甲醇, $V:V=100:5$)纯化得到化合物 9h 为紫红色粉末 0.25 g, 产率 43%. m.p. 173~176 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 2.44~2.47 (m, 6H), 2.65 (t, $J=6.9$ Hz, 2H), 2.82 (t, $J=4.7$ Hz, 4H), 7.78 (t, $J=7.4$ Hz, 1H), 7.88~7.93 (m, 3H), 8.20 (d, $J=9.5$ Hz, 1H), 8.48 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 8.75 (d, $J=5.0$ Hz, 1H), 9.00 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 12.77 (s, 1H); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 125.75 MHz) δ : 32.1, 45.8 (2C), 53.9 (2C), 55.2, 103.4, 120.3, 121.9, 122.9, 124.8, 126.4, 129.3, 129.7, 132.4, 132.5, 135.5, 136.7, 142.0, 143.1, 153.3, 170.8, 181.3; ESI-MS m/z : 402 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_2$: C 68.81, H 5.77, N 17.44; found C 69.24, H 5.60, N 17.57.

3.2.9 化合物 10a 和 10b 的合成

将 0.5 g (1.37 mmol) 化合物 7、0.2 g NaI 和 40 mL 乙腈置于 100 mL 圆底烧瓶中, 搅拌升温至 35 °C; 向其缓慢滴加入 10 mL 的含胺的乙腈溶液, TLC 追踪反应, 停止反应后减压除去溶剂, 得到的残余物溶于氯仿, 并用蒸馏水洗涤, 氯仿层无水 Na_2SO_4 干燥, 用硅胶柱层析(纯氯仿)纯化得到化合物 10b 为红色粉末 0.15 g, 产率 30%; 用硅胶柱层析(氯仿/甲醇, $V:V=100:1$)纯化得到化合物 10a 为黄色粉末 0.12 g, 产率 24%.

6-[1-(2-吡咯烷酮)胺基]-1-氮杂苯并蒽酮(10a): m.p. 243~245 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 2.27~2.33 (m, 2H), 2.60 (t, $J=8.1$ Hz, 2H), 3.78 (t, $J=6.9$ Hz, 2H), 7.36 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 7.67~7.71 (m, 2H), 7.83 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 8.01 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 8.53 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 8.75 (d, $J=5.1$ Hz, 1H), 9.03 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 12.39 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125.75 MHz) δ : 23.9, 27.4, 72.6, 103.2, 119.9, 121.1, 123.2, 124.7, 126.3, 129.0, 129.3, 131.8, 132.7, 135.8, 136.8, 141.4, 145.5, 153.7, 171.4, 182.2; ESI-MS m/z : 330 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$: C 72.94, H 4.59, N 12.76; found C 73.04, H 5.22, N 12.44.

6-[3-氧代-1(2H)-哒嗪基]-1-氮杂苯并蒽酮(10b): m.p. 269~272 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 2.27~

2.33 (m, 2H), 2.84 (t, $J=7.8$ Hz, 2H), 4.59 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 7.63 (d, $J=5.2$ Hz, 1H), 7.69 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.82 (t, $J=7.7$ Hz, 1H), 7.91 (d, $J=9.4$ Hz, 1H), 8.17 (d, $J=9.4$ Hz, 1H), 8.64 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 8.72 (d, $J=5.3$ Hz, 1H), 9.08 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 14.17 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125.75 MHz) δ : 16.9, 28.8, 49.2, 106.0, 117.8, 121.1, 123.2, 124.9, 126.7, 129.4, 129.5, 132.4, 132.8, 135.9, 136.6, 141.9, 145.0, 153.8, 173.7, 184.3; ESI-MS m/z : 330 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$: C 72.94, H 4.59, N 12.76; found C 72.66, H 4.72, N 12.39.

3.3 生物活性筛选

3.3.1 对 AChE 和 BuChE 抑制能力评价

将 $10.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 抑制剂的 DMSO 储备液用 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8.0 磷酸盐缓冲溶液稀释成 7 个不同浓度的溶液, 并分别取 $20 \mu\text{L}$ 于已装有 $150 \mu\text{L}$ $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8.0 磷酸盐缓冲溶液的 96 孔酶标板中; 再分别加入 $10 \mu\text{L}$ 4 mg/mL 显色剂 DTNB 和 $10 \mu\text{L}$ 浓度为 2 units/mL 的乙酰(或丁酰)胆碱酯酶溶液, 在 37°C 的酶标仪中孵育 12 min, 立即加入 $10 \mu\text{L}$ 浓度为 2 mg/mL 硫代乙酰(或丁酰)胆碱溶液, 混匀后, 测其在 $\lambda=412 \text{ nm}$ 处的 A 值 (A_n); 参比用 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8.0 磷酸盐缓冲溶液, 用他克林作为阳性对照, 以未加样品所测得的 A_{control} 值作为 100 个活力单位:

$$\text{相对酶活力}(\%) = (A_n/A_{\text{control}}) \times 100\%$$

然后以酶的相对活力对抑制剂浓度作图, 根据抑制曲线求得化合物抑制酶活力 50% 时的浓度, 即为抑制剂的 IC_{50} 值。

3.3.2 对 AChE 的抑制动力学分析方法

将 2 mg/mL 硫代乙酰胆碱溶液用 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8.0 磷酸盐缓冲溶液稀释成 7 个不同浓度的溶液。在装有 $150 \mu\text{L}$ $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8.0 磷酸盐缓冲溶液的 96 孔酶标板中分别加入 $20 \mu\text{L}$ 一定浓度的化合物 **9e** 溶液、 $10 \mu\text{L}$ 浓度为 4 mg/mL 显色剂 DTNB 和 $10 \mu\text{L}$ 浓度为 2 units/mL 乙酰胆碱酯酶溶液, 在 37°C 的酶标仪中孵育 12 min, 加入 $10 \mu\text{L}$ 不同浓度的硫代乙酰胆碱溶液, 混匀后, 立即测其在 $\lambda=412 \text{ nm}$ 处的时间扫描曲线。曲线的斜率即为酶促反应的初速度 v , 然后以 $1/v$ 对 $1/[\text{S}]$ 作出抑制剂的动力学 Lineweaver-Bruk 曲线图, 不加抑制剂的为控制线。

3.3.3 对 AChE 诱导的 $\text{A}\beta$ 聚积抑制作用分析方法

取 $2 \mu\text{L}$ $\text{A}\beta(1-40)$ 储备液分别加入 $16 \mu\text{L}$ 的 AChE 溶液和 $2 \mu\text{L}$ 的抑制剂溶液(最终活力 AChE 为 0.06 U , 抑制剂的最终浓度为 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 混匀, 37°C 共同孵育 8 h; 然后加入 $180 \mu\text{L}$ $1.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫黄素 T 的甘氨

酸-NaOH 溶液混匀后, 立即在 446 nm 激发波长和 490 nm 发射波长下测定其荧光值; 以 $0.215 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8.0 磷酸盐缓冲溶液为参比, 并设置 $\text{A}\beta$, AChE 和 $\text{A}\beta$ +抑制剂作为空白; 存在抑制剂时荧光值为 IF_i ($\text{A}\beta$ +AChE+抑制剂), 无抑制剂下的荧光值为 IF_0 ($\text{A}\beta$ +AChE), 化合物的抑制率 $= [1 - (\text{IF}_i/\text{IF}_0)] \times 100\%$ 。

3.3.4 对 PAMPA-BBB 透过能力的分析方法

取 $4 \mu\text{L}$ 20 mg/mL 十二烷/PBL 溶液均匀分布于 Multi-well Filter plate 的聚偏氟乙烯膜上制成磷脂膜, 然后将配好的 PBS/乙醇 ($V:V=9:1$) 溶液 $300 \mu\text{L}$ 加入到受体池中; 取 $300 \mu\text{L}$ 已配好的 $25 \mu\text{g/mL}$ 样品待测液加入到供体池中, 然后将其静置于不受干扰的地方, 再将已制备好的受体池缓慢地移至供体池内, 形成“三明治”结构^[24]; 25°C 下静于被动扩散 10 h; 扩散实验完毕后, 将受体池从供体池中取出, 并将供体池和受体池的溶液分别移至 96 孔 UV 透射板内, 然后用紫外分光光度计测定其浓度 $[\text{drug}]_{\text{Donor}}$ 和 $[\text{drug}]_{\text{Acceptor}}$; 根据 Eq. 1, 计算出化合物的 PAMPA-BBB 有效渗透率 P_e 值, 并以 9 个市售药物的实验值和文献值^[22]标定化合物 BBB 有效透过率的可靠性。

$$P_e = - \left(\frac{V_D V_A}{(V_D + V_A) A t} \right) \times \ln \left(1 - \frac{[\text{drug}]_{\text{Acceptor}}}{[\text{drug}]_{\text{equilibrium}}} \right) \quad (1)$$

其中, V_D 为供体池中化合物待测液的体积; V_A 为受体池中缓冲液的体积; A 为多孔过滤的有效面积 (cm^2); t 为扩散时间 (s); $[\text{drug}]_{\text{Acceptor}}$ 为受体池中药物的浓度; $[\text{drug}]_{\text{equilibrium}}$ 为药物的理论吸收浓度; P_e 的单位为 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

3.3.5 化合物油水分配系数的测定

参考文献[28]的方法, 精密称取一定量的化合物, 用甲醇配成 1 mg/mL 的储备液。精密吸取上述储备液稀释 20 倍后在 $200\sim 500 \text{ nm}$ 波长下扫描最大吸收波长。分别吸取不同体积的储备液稀释至不同浓度, 于各化合物的最大吸收波长下测定吸光度, 建立吸光度与质量浓度的标准曲线。取一定量化合物溶解于 25 mL 水饱和正辛醇中, 制成化合物的正辛醇溶液, 精密量取上述溶液 1 mL 置于具塞试管中, 加入被正辛醇饱和的水溶液 1 mL , 140 r/min 恒温振荡 48 h 直至平衡, 以 3000 r/min 离心 10 min, 分离上下层, 于各化合物的最大吸收波长处分别测得上层和下层溶液吸光度 A_1 和 A_2 , 计算出上层和下层对应浓度 C_1 和 C_2 。其中 C_1 为化合物在水饱和正辛醇中的浓度, C_2 为化合物在正辛醇饱和水中的浓度。按公式 $P=C_1/C_2$ 计算 P 值。

References

- [1] Special Issue: Alzheimer's Disease *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 8977.
- [2] Thies, W.; Bleiler, L. *Alzheimer's Dementia* **2011**, *7*, 208.
- [3] Csermely, P.; Agoston, V.; Pongor, S. *Trends Pharmacol. Sci.* **2005**, *26*, 178.
- [4] Shoham, S.; Bejar, C.; Kovalev, E.; Schorer-Apelbaum, D.; Weinstein, M. *Neuropharmacology* **2007**, *52*, 836.
- [5] Camps, P.; Formosa, X.; Galdeano, C.; Munoz-Torrero, D.; Ramirez, L.; Gomez, E.; Isambert, N.; Lavilla, R.; Badia, A.; Clos, M. V.; Bartolini, M.; Mancini, F.; Andrisano, V.; Arce, M. P.; Rodriguez-Franco, M. I.; Huertas, O.; Dafni, T.; Luque, F. J. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5365.
- [6] Chohan Muhammad, O.; Khatoon, S.; Iqbal, I. G.; Iqbal, K. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 3973.
- [7] Ronchetti, D.; Impagnatiello, F.; Guzzetta, M.; Gasparini, L.; Borgatti, M.; Gambari, R.; Ongini, E. *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, *532*, 162.
- [8] Bolognesi, M. L.; Cavalli, A.; Melchiorre, C. *Neurotherapeutics* **2009**, *6*, 152.
- [9] Tang, H.; Wei, Y.-B.; Zhang, C.; Ning, F.-X.; Qiao, W.; Huang, S.-L.; Ma, L.; Huang, Z.-S.; Gu, L.-Q. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 2523.
- [10] Tang, H.; Zhao, H.-T.; Zhong, S.-M.; Wang, Z.-Y.; Chen, Z.-F.; Liang, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 2257.
- [11] Iwashima, S.; Ueda, T.; Honda, H.; Tsujioka, T.; Ohno, M.; Aoki, J.; Kan, T. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1984**, 2177.
- [12] Ueda, T.; Abliz, Z.; Sato, M.; Nishimura, M.; Iwashima, S.; Aoki, J.; Kan, T.; Matsunaga, S.; Tanaka, R. *J. Mol. Struct.* **1990**, *224*, 313.
- [13] Kamal, A.; Reddy, K. S.; Khan, M. N. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 4747.
- [14] Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V. J.; Feather-Stone, R. M. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88.
- [15] Inestrosa, N. C.; Alvarez, A.; Perez, C. A.; Moreno, R. D.; Vicente, M.; Linker, C.; Casanueva, O. I.; Soto, C.; Garrido, J. *Neuron* **1996**, *16*, 881.
- [16] Rosini, M.; Simoni, E.; Bartolini, M.; Cavalli, A.; Ceccarini, L.; Pascu, N.; McClymont, D. W.; Tarozzi, A.; Bolognesi, M. L.; Minarini, A.; Tumiatti, V.; Andrisano, V.; Mellor, I. R.; Melchiorre, C. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4381.
- [17] De Ferrari, G. V.; Canales, M. A.; Shin, I.; Weiner, L. M.; Silman, I.; Inestrosa, N. C. *Biochemistry* **2001**, *40*, 10447.
- [18] Castro, A.; Martinez, A. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 4377.
- [19] Cras, P.; Kawai, M.; Lowery, D.; Gonzalez-DeWhitt, P.; Greenberg, B.; Perry, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 7552.
- [20] Bartolini, M.; Bertucci, C.; Cavrini, V.; Andrisano, V. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 407.
- [21] Beeg, M.; Stravalaci, M.; Bastone, A.; Salmona, M.; Gobbi, M. *Anal. Biochem.* **2011**, *411*, 297.
- [22] Di, L.; Kerns, E. H.; Fan, K.; McConnell, O. J.; Carter, G. T. *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, *38*, 223.
- [23] Kansy, M.; Senner, F.; Gubernator, K. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1007.
- [24] Chen, X.; Murawski, A.; Patel, K.; Crespi, C. L.; Balimane, P. V. *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 1511.
- [25] Tang, H.; Ning, F.-X.; Wei, Y.-B.; Huang, S.-L.; Huang, Z.-S.; Chan, A. S.-C.; Gu, L.-Q. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3765.
- [26] Tang, H.; Zhao, L.-Z.; Zhao, H.-T.; Huang, S.-L.; Zhong, S.-M.; Qin, J.-K.; Chen, Z.-F.; Huang, Z.-S.; Liang, H. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 4970.
- [27] Tang, H.; Wang, Z.-Y.; Liu, Y.-C. *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online* **2012**, *68*, o2004.
- [28] Wang, X.; Deng, Y.; Zhao, C.; Zhong, H.; Hao, Y.; Chen, Y. *J. Shenyang Pharm. Univ.* **2005**, *22*, 289 (in Chinese). (王秀敏, 邓英杰, 赵春杰, 钟海军, 郝艳丽, 陈妍, 沈阳药科大学学报, **2005**, *22*, 289.)

(Zhao, C.)