

胆碱酯酶抑制剂萘酰亚胺衍生物的合成与聚集诱导发光性质

赵永梅^a 穆叶舒^b 罗 稳^{*,b} 田智勇^{*,c}^(a) 河南应用技术职业学院 制药工程学院 河南开封 475004^(b) 河南大学天然药物与免疫工程重点实验室 河南开封 475004^(c) 河南大学药学院 河南开封 475004

摘要 阿尔茨海默症(Alzheimer's disease, AD)是一种神经退行性疾病,严重影响老年人的生活质量,目前治疗 AD 的药物主要是胆碱酯酶抑制剂,如多奈哌齐、卡巴拉汀等。本文基于多奈哌齐结构,设计合成了一系列新的萘酰亚胺衍生物并进行了活性评价。结果表明,所合成的化合物均对乙酰胆碱酯酶(AChE)有选择性抑制,其中 2-((1-(3-甲氧基苄基)哌啶-4-基)甲基)-1*H*-苯并异喹啉-1,3(2*H*)-二酮(**4k**)的抑制活性最强,IC₅₀ 值为 4.43 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,优于对照药物卡巴拉汀。酶动力学及分子对接表明 **4k** 能够同时作用于 AChE 的催化活性位点和外周结合位点,并且 **4k** 对 SH-SY5Y 和 PC12 细胞毒性较低。此外,这些化合物均显示出典型的聚集诱导发光(AIE)性质,可能与萘酰亚胺分子内旋转受阻机制有关。

关键词 萘酰亚胺;胆碱酯酶;聚集诱导发光

Synthesis of Naphthalimide Derivatives as Cholinesterase Inhibitors with Aggregation Induced Emission Properties

Zhao, Yongmei^a Mu, Yesu^b Luo, Wen^{*,b} Tian, Zhiyong^{*,c}^(a) Pharmaceutical Engineering Department, Henan Vocational College of Applied Technology, Kaifeng, Henan 475004^(b) Key Laboratory of Natural Medicine and Immuno-Engineering, Henan University, Kaifeng, Henan 475004^(c) School of Pharmacy, Henan University, Kaifeng, Henan 475004

Abstract Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized by impaired cognitive and memory function, which seriously affects the quality of life of the elderly. At present, the main drugs for the treatment of AD are cholinesterase inhibitors, such as donepezil and rivastigmine. In this paper, a series of novel naphthalimide derivatives were designed, synthesized and evaluated based on the structure of donepezil. The results showed that all of the tested compounds were acetylcholinesterase (AChE) selective inhibitors, 2-((1-(3-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)methyl)-1*H*-benzo[de]isoquinoline-1,3(2*H*)-dione (**4k**) exhibited the strongest inhibition to AChE with an IC₅₀ value of 4.43 $\mu\text{mol/L}$, which was better than the control rivastigmine. Kinetic and molecular modeling studies indicated that **4k** targeted both the catalytic active site (CAS) and the peripheral anionic site (PAS) of AChE. In addition, **4k** didn't show obvious cytotoxicity against SH-SY5Y and PC12 cell lines. Besides, these compounds exhibited typical aggregation induced emissions (AIE) properties, which might be controlled by mechanism of restriction of intramolecular rotations.

Keywords naphthalimide; cholinesterase; aggregation induced emission

阿尔茨海默症(Alzheimer's disease, AD)是一种发病机制复杂的神经退行性疾病,多发于 60 岁以上的老年人。据最新人口普查结果显示,我国 60 岁以上的人口达到 2.64 亿,老龄化程度进一步加深^[1]。随着老龄化趋势的日趋严峻,AD 已经成为影响我国经济发展和人民健康的重大疾病之一^[2]。AD 患者的临床表现主要为记忆丧

失、认知功能障碍、性格改变、抑郁等症状。AD 的发病机理目前还未完全阐明,但患者脑中低的乙酰胆碱水平、 β -淀粉样蛋白(β -amyloid, A β)的异常增加与沉积、 τ -蛋白过度磷酸化以及氧化损伤等在发病机理中扮演着重要的角色^[3]。

美国食品与药品管理局(FDA)批准用于治疗 AD 的

* Corresponding authors. E-mail: luowen83@163.com; tzy2005@163.com

Received July 30, 2021; revised October 12, 2021; published online November 17, 2021.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. U1704176), the Science and Technology Planning Project of Henan Province (No. 212102311030), and the Program of Henan Vocational College of Applied Technology (No. 2020-HJ-22).

国家自然科学基金(No. U1704176)、河南省科技计划(No. 212102311030)和河南应用技术职业学院(No. 2020-HJ-22)资助项目。

药物主要是乙酰胆碱酯酶(AChE)抑制剂, 如他克林(已退市)、多奈哌齐(图 1, **A**)、卡巴拉汀和加兰他敏^[4]. 我国自主研发的石杉碱甲^[5], 是从石杉科植物千层塔中提取出来的天然生物碱, 也是 AChE 抑制剂. 这些药物通过抑制 AChE 的活性, 提高患者脑内乙酰胆碱的水平, 从而改善患者的记忆认知功能.

哺乳动物体内存在两种胆碱酯酶(ChEs), AChE 和丁酰胆碱酯酶(BChE)^[6]. AChE 主要存在于中枢神经系统, 而 BChE 主要存在于外周系统^[7], 同时抑制两种胆碱酯酶, 可能会对机体产生外周副作用, 如恶心、呕吐等消化道反应, 而选择性的 AChE 抑制剂则更有利于靶向脑部, 从而减少外周副作用的发生.

萘酰亚胺是一类重要的功能小分子, 最早用于染料领域^[8], 具有量子产率高、耐光漂白、稳定性好、易于修饰等优点, 因此对其结构改造的研究非常活跃^[9,10]. 近年来, 随着化学生物学的发展, 萘酰亚胺类的生物活性逐渐引起大家的兴趣^[11]. 例如安奈菲特、米托萘胺和依利奈法德(图 1, **B~D**)作为潜在的抗肿瘤试剂, 都曾进入到临床试验阶段, 其中安奈菲特近期再次进入了 III 期临床试验, 用于治疗继发性急性髓细胞白血病^[12]. 其他课题组也设计合成了结构多样的萘酰亚胺类衍生物, 并从中得到了一些活性较好的先导物^[13-15]. 另外, 随着聚集诱导发光(AIE)现象被报道以来^[16], 科研工作者们发现了萘酰亚胺类的 AIE 性质, 开发出了丰富多样的探针并成功应用于生物、材料等领域^[17-20](图 1, **E~G**), 成为当前的研究热点. 目前, 对萘酰亚胺类衍生物

的活性研究主要集中在抗肿瘤方面, 其他生物活性报道较少, 其中胆碱酯酶抑制活性的文献报道仅有 3 篇(图 1, **H~J**)^[21-23].

本课题组从事萘酰亚胺衍生物的合成与评价多年, 前期我们报道了一些靶向亚细胞器的萘酰亚胺类诊疗剂及其抗肿瘤活性^[24-25]. 由于萘酰亚胺具有平面三环结构, 有利于和生物大分子内的芳香氨基酸残基相互作用, 同时其含有羰基结构, 与多奈哌齐的苯并环戊酮片段有一定的相似性. 因此, 本文基于胆碱酯酶抑制剂多奈哌齐结构, 用萘酰亚胺替换苯并环戊酮, 设计合成了一系列新的衍生物, 对其进行活性评价并探讨构效关系, 同时我们意外的发现了其 AIE 效应, 这些结果为此类化合物的进一步设计提供参考.

萘酰亚胺衍生物的合成路线如 Scheme 1 所示. 中间体 **2a** 和 **2b** 的合成是从 1,8-二萘甲酸酐和 1-叔丁氧羰基-4-氨基哌啶为起始原料, 在无水乙醇中加热回流得到, 产率较高^[26]. 中间体 **2a** 和 **2b** 与稀盐酸反应脱保护生成仲胺 **3a** 和 **3b**, 简单提纯后与含不同取代基的苄溴反应, 生成目标化合物 **4a~4k** 和 **5a~5d**. 所有目标化合物均为新化合物, 未见报道, 结构通过 ¹H NMR、¹³C NMR 及 HRMS 确证, 纯度通过 HPLC 测定.

1 结果与讨论

1.1 目标化合物的合成

中间体 **2a** 和 **2b** 的合成是一步反应, 操作方便, 处

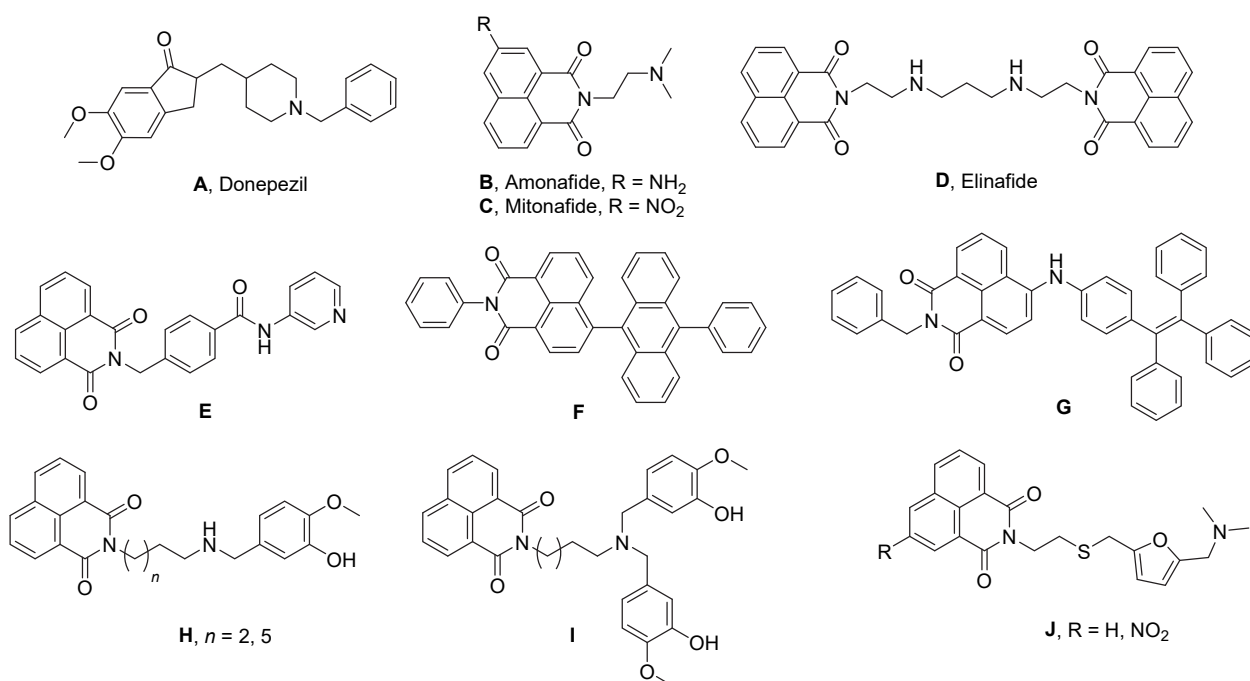
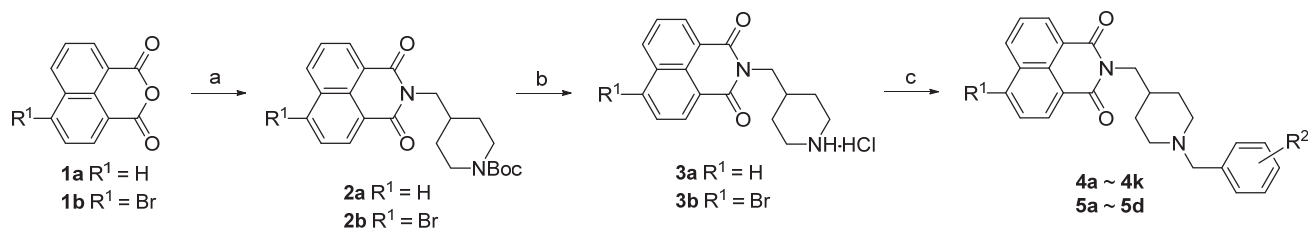


图 1 多奈哌齐和萘酰亚胺衍生物的结构式

Figure 1 Chemical structures of donepezil and naphthalimide derivatives



Reagents and conditions: (a) 1-Boc-4-(aminomethyl)piperidine, EtOH, reflux, 5 h; (b) HCl, EtOH, r.t., 12 h; (c) Benzyl bromide, CH₃CN, 60 °C, 6 h

图式 1 目标化合物的合成

Scheme 1 Synthesis of the target compounds

理简单. **2a** 为白色固体, 粗产率 85%, **2b** 为棕色固体, 粗产率 76%, 不用提纯直接用于下一步反应. 中间体 **2a** 和 **2b** 脱保护生成盐酸盐 **3a** 和 **3b**, 均为黄色固体, 产率分别为 82% 和 78%, 快速柱层析后可得到纯品. **3a** 和 **3b** 与含有不同取代基的苄溴反应, 经柱层析分离得到目标化合物.

1.2 胆碱酯酶抑制活性

采用 Ellman 法^[27]对合成的目标化合物进行了体外胆碱酯酶抑制活性测试, 卡巴拉汀和多奈哌齐作为对照药物, 结果如表 1 所示. 从表中可以看出, 所有化合物对 AChE 具有选择性抑制, IC₅₀ 值均在微摩尔级. 其中 **4e** 和 **4k** 对 AChE 的抑制活性最强, IC₅₀ 值分别为 4.66 和 4.43 μmol·L⁻¹, 优于对照药物卡巴拉汀(7.25 μmol·L⁻¹), 但弱于多奈哌齐(0.027 μmol·L⁻¹). 对于 BChE, 除了 **5c** 外, 其他化合物在测试浓度下基本没有抑制活性.

结构优化起始于裸环的 **4a**, 将 **4a** 的苯环用吡啶(**4b**)取代后, AChE 抑制活性增强了 1/3; 当 **4a** 苯环对位用甲基取代后(**4c**), 活性增加了 1 倍, 继续增大对位取代基的体积, 得到叔丁基取代产物 **4d**, 活性却比 **4c** 有所降低. 同样, 较大体积的氰基(**4f**)和硝基(**4g**)取代也没有继续增强活性; 反而体积小的氟原子取代后(**4e**)显著增强了抑制活性, 表明苯环对位取代基的体积和电子效应对活性有所影响, 体积较大的基团不利于活性的提高. 另一方面, 苯环间位用不同的基团取代后, 供电子基甲氧基取代的 **4k** 活性最强, 体积较小的吸电子基氯原子取代(**4h**)活性次之, 体积稍大的吸电子基溴原子和硝基取代(**4i** 和 **4j**)活性较弱, 表明间位供电子基有利于提高活性. 然而, 在另一端的萘酰亚胺 4-位用溴原子取代时, 抑制活性并没有提高, 如 **5a** 和 **4a** 活性相当, **5b**、**5c** 和 **5d** 的活性弱于相对应的 **4e**、**4g** 和 **4k**.

如上所述, 总结出以下构效关系: 苯环上的取代基有利于增强 AChE 抑制活性, 合适的取代基能够大大提高抑制活性; 萘酰亚胺上的溴原子不利于活性提高. 另外, 许多文献报道含有富电子(如甲氧基)基团的芳香化合物能够与 AChE 的 PAS 位点结合, 有利于增强活

性^[28-30], 与我们的实验结果相符合. 因此, 今后的工作可以聚焦于富电子基团取代对 AChE 抑制活性的影响.

1.3 分子对接

为了研究化合物与 AChE 作用的模式, 选择活性最好的化合物 **4k** 作为代表, 采用 Autodock 对接程序与 PyMOL 观测程序进行了分子对接, AChE 文件从 PDB 网站下载(编码: 1EVE), 结果如图 2 所示. 在 **4k**-TcAChE 复合物中(图 2A), **4k** 的苯环部分与 Trp84 通过 π-π 堆积作用结合在 CAS 部位, Tyr130 上的酚羟基与 **4k** 的苯环上的甲氧基有弱的氢键作用, 氢键的长度为 0.40 nm. **4k** 的萘酰亚胺部分则作用在 PAS 部位, 与 Trp279 发生 π-π 堆积作用, 同时两个羰基分别与 Try121 和 Phe288 上的酚羟基和胺基有氢键作用, 长度分别为 0.38 和 0.37 nm. 结果表明化合物 **4k** 与 AChE 的作用模式是双位点结合, 与对照药多奈哌齐的构象(图 2B)相似. 1EVE 的晶体结构中, 多奈哌齐的双甲氧基朝向溶剂区域, 可与 PAS 附近氨基酸残基发生疏水作用, 且甲氧基延长了其分子长度, 构象更加舒展, 更有利于与酶的双位点发生相互作用. 与多奈哌齐相比, **4k** 的萘酰亚胺环上缺少甲氧基, 分子长度较短, 构象也没有多奈哌齐舒展, 可能是导致其抑制活性弱于多奈哌齐的原因. 因此延长目标化合物的分子长度, 可能会增强 AChE 抑制活性.

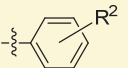
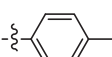
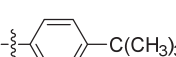
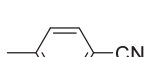
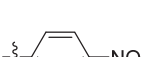
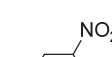
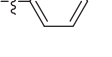
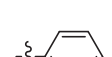
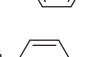
1.4 酶动力学研究

为了进一步确证 **4k** 与 AChE 作用的模式, 进行了酶抑制动力学研究. 图 3 中 **4k** 的直线相交于坐标轴的第二象限, 这是典型的混合型抑制作用类型. 当小分子与 AChE 的催化活性位点(CAS)结合时, 属于竞争性抑制; 当小分子作用于 AChE 的外周结合位点(PAS)时, 属于非竞争性抑制; 当小分子同时作用于 CAS 和 PAS 位点时, 属于混合抑制. 因此, 可以证明 **4k** 同时与 AChE 的 CAS 和 PAS 发生了相互作用, 与分子对接结论一致.

1.5 AIE 性质

萘酰亚胺类化合物具有强荧光, 常作为报告基团用于环境和生物检测, 因此测试了代表化合物 **4k** 的紫外

表 1 化合物的体外胆碱酯酶抑制活性
Table 1 *In vitro* ChEs inhibitory activity of the target compounds

Compd.	R ¹		IC ₅₀ /(μmol•L ⁻¹) for AChE ^a	IC ₅₀ /(μmol•L ⁻¹) for BChE ^b	SI ^c
4a	H		18.43 ± 1.96	> 100	< 0.18
4b	H		12.28 ± 1.79	> 100	< 0.12
4c	H		9.15 ± 0.55	> 100	< 0.09
4d	H		11.19 ± 1.13	> 100	< 0.11
4e	H		4.66 ± 0.54	> 100	< 0.05
4f	H		12.98 ± 1.78	> 100	< 0.13
4g	H		8.86 ± 1.05	> 100	< 0.09
4h	H		7.43 ± 0.71	> 100	< 0.07
4i	H		12.72 ± 1.92	> 100	< 0.13
4j	H		11.57 ± 1.06	> 100	< 0.12
4k	H		4.43 ± 0.45	> 100	< 0.04
5a	Br		17.14 ± 1.69	> 100	< 0.17
5b	Br		14.52 ± 0.75	> 100	< 0.15
5c	Br		9.58 ± 0.81	41.36 ± 2.23	0.23
5d	Br		14.30 ± 1.30	> 100	< 0.14
Riv. ^d	—	—	7.25 ± 0.34	1.85 ± 0.21	3.92
Dpz. ^e	—	—	0.027 ± 0.003	1.155 ± 0.03	0.023

^a AChE from *electric eel*. ^b BuChE from *equine serum*. ^c Selectivity Index = IC₅₀(AChE)/IC₅₀(BChE). ^d Rivastigmine. ^e Donepezil.

和荧光光谱, 结果见图 4. 由图 4 可以看出, 室温下 **4k** 在不同溶剂中的最大吸收波长在 340 nm 左右, 最大发

射波长在 400 nm 左右, 肉眼可见蓝紫色荧光(辅助材料, Figure S1), 且水中的荧光强度远远高于有机溶剂, 不同

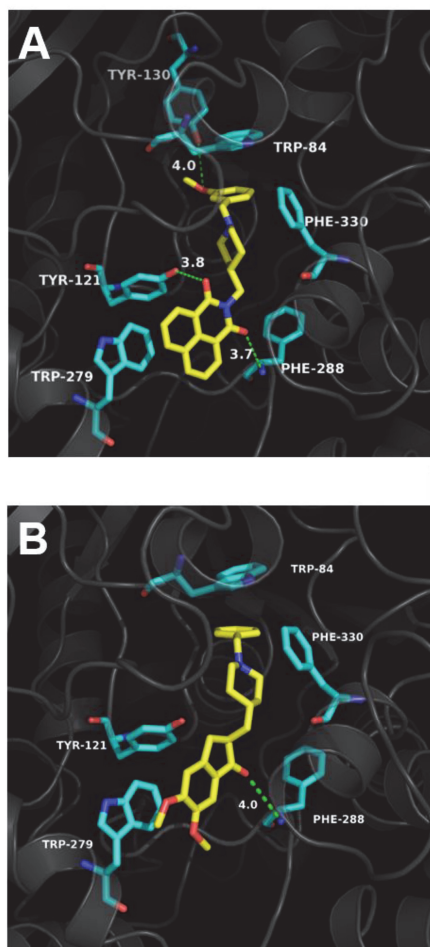


图2 **4k** 的分子对接模型(A)与 1EVE 蛋白晶体的 3D 结构(B)
Figure 2 Docking model of **4k** with 1EVE (A) and 3D model of 1EVE (B)

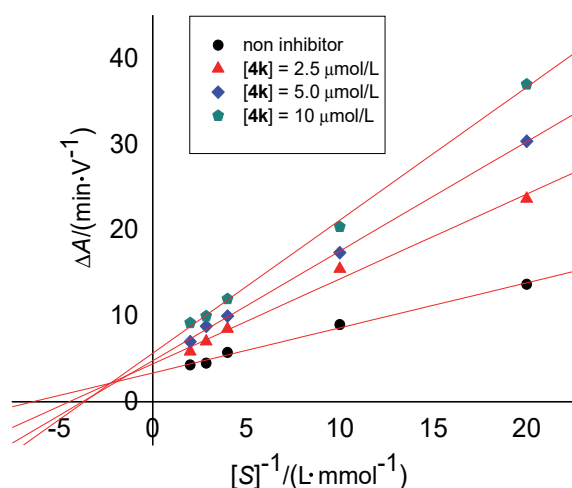


图3 化合物 **4k** 与 TcAChE 的酶动力学曲线
Figure 3 Lineweaver-Burk plots for compound **4k** with TcAChE

溶剂中(石油醚, 四氢呋喃, 氯仿, 乙腈, 乙醇, 水) **4k** 的荧光量子产率分别为 0.02%, 0.03%, 0.04%, 0.02%, 0.03%和 0.35%(以硫酸奎宁为标准, $\Phi_F=0.55\%$), 固态荧

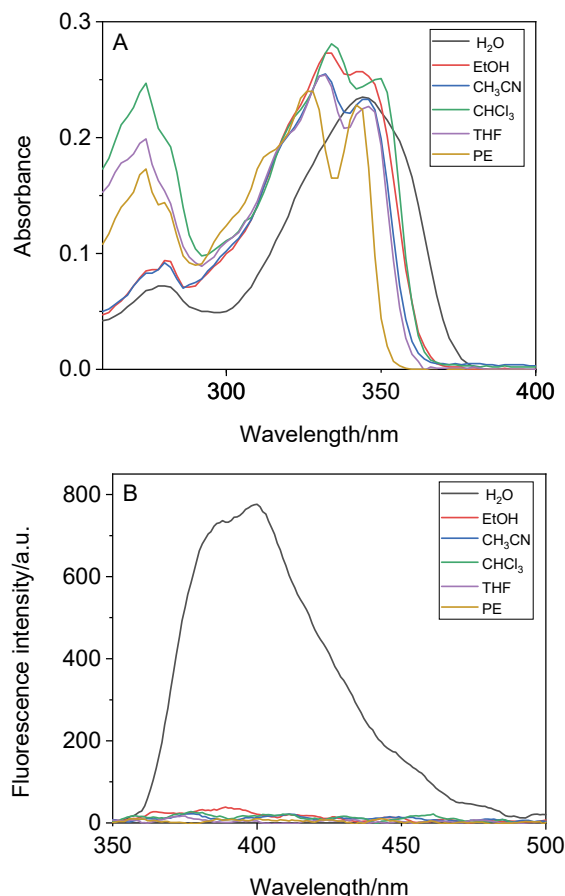


图4 化合物 **4k** (20 $\mu\text{mol/L}$)在不同溶剂中的紫外(A)和荧光光谱(B)

Figure 4 Absorption (A) and FL spectra (B, $\lambda_{\text{ex}}=340$ nm, slit: 2.5/5 nm) of **4k** (20 $\mu\text{mol/L}$) in different solvents

光量子产率为 2.19%(辅助材料, Figure S2). 由于 **4k** 在有机溶剂中溶解良好, 水中溶解性较差, 为了验证 **4k** 具有 AIE 性质, 采用四氢呋喃-水体系测试了 **4k** 的紫外和荧光光谱, 结果见图 5 和图 6. 随着体系含水量逐渐增高, 化合物 **4k** 的紫外吸收变宽且红移, 表明发生电子跃迁需要的能量减小, 是分子间距变小共轭程度增加造成的. 同时在 275 nm 处的紫外吸收逐渐减弱, 表明体系中溶解的 **4k** 逐渐减少, 可能发生了聚集. 另外, 394 nm 处的荧光强度随着水的含量增高而明显增强, 这些现象符合 AIE 分子的特征. 其他化合物表现出与 **4k** 相同的现象(辅助材料, Figure S3).

由于 **4k** 在四氢呋喃(THF)-水体系中可能发生团聚形成纳米颗粒, 因此其溶液应该具有丁达尔现象. 用激光笔透过含水量不同的 **4k** 溶液发现, 图 7 中纯水溶液中具有一条明亮的绿色光带, 随着含水量减少, 绿色光带逐渐变细变弱, THF 溶液中光带基本消失. 其他化合物也具有相同的现象(辅助材料, Figure S3). 以上现象表明这些化合物在 THF-水体系中聚集形成了纳米颗粒. 通过激光粒度仪测试, **4k** 在纯水中的平均粒径为 232.0

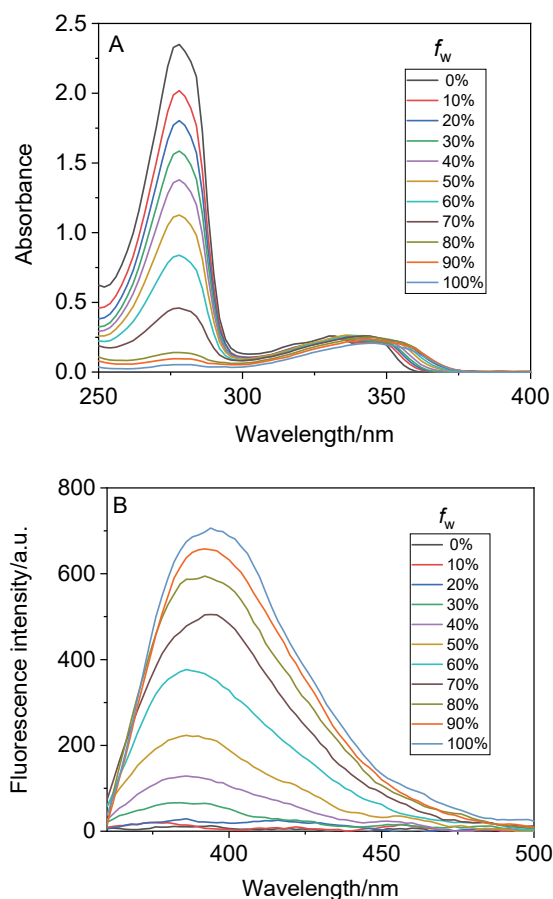


图 5 化合物 **4k** (20 $\mu\text{mol/L}$) 在四氢呋喃/水混合液中的紫外 (A) 和荧光光谱 (B)

Figure 5 Absorption (A) and FL spectra (B, $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$, slit: 2.5/5 nm) of **4k** (20 $\mu\text{mol/L}$) in THF/water mixtures

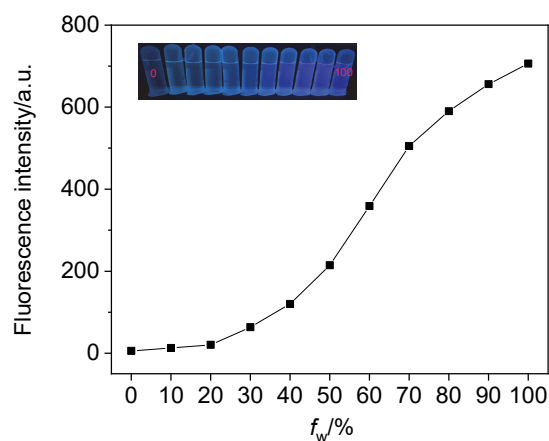


图 6 化合物 **4k** (20 $\mu\text{mol/L}$) 的荧光强度 (394 nm) 随含水量的变化图

Figure 6 Changes of FL peak intensities at 394 nm vs the water fraction in the THF/water mixtures

Inset: FL photographs under the illumination of a UV lamp (365 nm)

nm (辅助材料, Figure S4).

通常情况下, AIE 分子的浓度越大, 分子间距离越

小, 从而导致分子内旋转键受限, 受到激发后荧光更强. 用 THF 配置了少量 (90 μL) 不同浓度的 **4k** 溶液, 并在紫外灯下 (365 nm) 进行肉眼观察, 结果见图 8. 化合物 **4k** 的浓度在 1 $\mu\text{mol/L} \sim 1 \text{ mmol/L}$ 时荧光较弱, 当浓度到达 10 和 100 mmol/L 时, 肉眼可见亮度明显增强. 浓度达到 125 mmol/L 时, 溶液有不溶物出现浑浊, 此时溶液最亮. 另外, **4k** 的固体粉末在紫外灯下也发出淡蓝色荧光 (辅助材料, Figure S5).

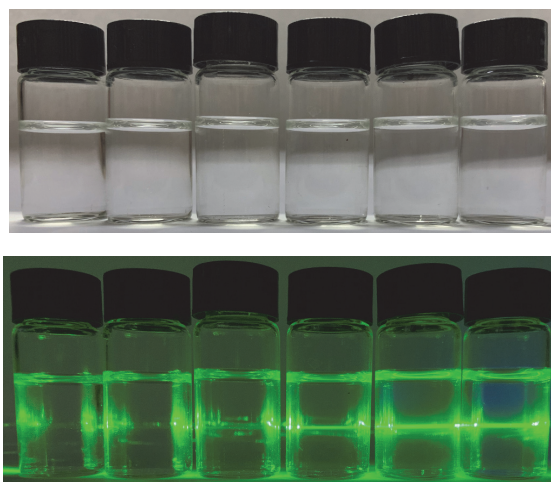


图 7 化合物 **4k** (20 $\mu\text{mol/L}$) 在 THF/水混合液中的丁达尔现象 (水的比例: 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100%)

Figure 7 Tyndall effect of **4k** (20 $\mu\text{mol/L}$) in different fraction THF/water mixtures (f_w : 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100%)



图 8 不同浓度的 **4k** THF 溶液在紫外灯下 (365 nm) 的照片

Figure 8 Photograph of different concentrations of **4k** in THF under UV lamp (365 nm)

Left to right: 1 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$, 100 $\mu\text{mol/L}$, 1 mmol/L , 10 mmol/L , 100 mmol/L , 125 mmol/L

AIE 分子在粘度较大的体系中由于旋转键受限, 荧光会增强. 在甲醇-甘油体系中, 随着甘油含量逐渐增高, 体系粘度逐渐增大, 化合物 **4k** 在 394 nm 处的荧光逐渐增强 (图 9B), 符合 AIE 分子的特征, 同时表明 **4k** 的 AIE 性质与分子内旋转键受限有关. 通常 AIE 发光存在两种机理: 分子内键旋转受阻 (RIR) 和分子内振动受阻 (RIV). 针对化合物 **4k**, 其 AIE 发光的机理可能主要与 RIR 相关. 由于分子结构中存在萘酰亚胺与哌嗪环之间的单键, 以及苯环与哌嗪环之间的单键旋转, 这些单键旋转受制于 RIR 机制.

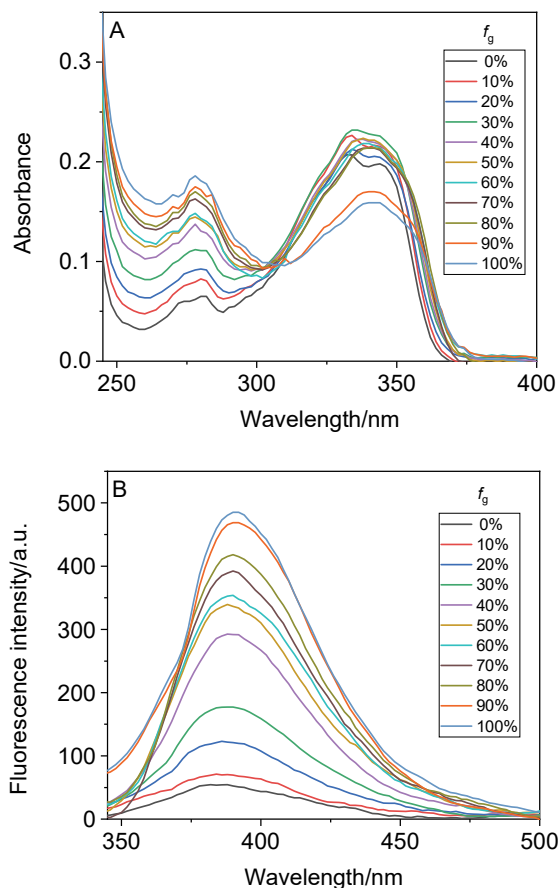


图9 化合物 **4k** (20 $\mu\text{mol/L}$) 在甲醇/甘油混合液中的紫外(A)和荧光光谱(B)

Figure 9 Absorption (A) and FL spectra (B, $\lambda_{\text{ex}}=340$ nm, slit: 2.5/5 nm) of **4k** (20 $\mu\text{mol/L}$) in MeOH/glycerin mixtures

1.5 细胞毒性

采用噻唑蓝(MTT)法测试了化合物 **4k** 对神经细胞株 SH-SY5Y 和 PC12 体外生存能力的影响(图 10), 结果显示, **4k** 在 6.25 和 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下作用 48 h 后, 两种细胞的生存率均超过 90%, 25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下为生存率分别为 69.9%和 62.1%, 50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下生存率也都超过了 50%, 表明 **4k** 在测试浓度下对细胞的生存率影响较小. 值得注意的是, 100 $\mu\text{mol/L}$ 的化合物与细胞一起孵育时, 显微镜下发现细胞外出现许多细小针状晶体, 可能是由于 **4k** 无法完全溶解而析出, 析出的晶体颗粒无法进入细胞, 导致其细胞毒性比 50 $\mu\text{mol/L}$ 的更低.

2 结论

综上所述, 本文设计合成了一系列新的萘酰亚胺衍生物作为胆碱酯酶抑制剂, 并进行了活性评价和光谱学研究. 结果显示化合物 **4k** 对 AChE 的抑制活性最强, 优于对照药物卡巴拉汀. 酶动力学和分子对接研究表明化

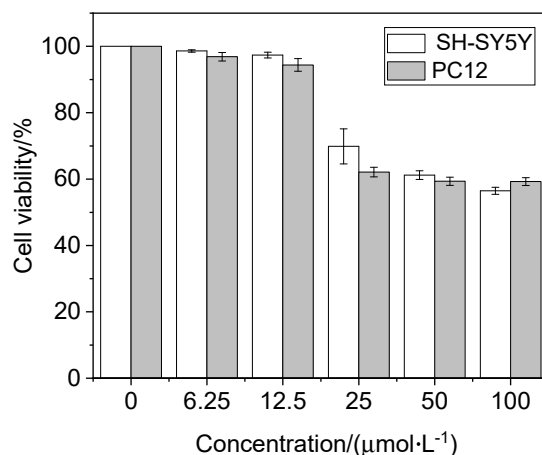


图10 化合物 **4k** 对 SH-SY5Y 和 PC12 细胞株生存能力的影响

Figure 10 Effect of compound **4k** on viability of SH-SY5Y and PC12 cell lines

合物 **4k** 可同时作用在 AChE 的 CAS 和 PAS 位点, 并且对 SH-SY5Y 和 PC12 细胞毒性较低. 另外, 这些化合物显示出明显的 AIE 效应, 在水相中荧光较强, 具有潜在的应用价值. 以上结果为进一步设计萘酰亚胺类的双位点 AChE 抑制剂或 AIE 荧光探针提供了重要参考.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

^1H NMR、 ^{13}C NMR 使用 Bruker DPX-300 型超导核磁共振仪测定, TMS 为内标; 质谱使用 Esquire3000 型质谱仪测定; 化合物纯度使用岛津 LC-20AB 高效液相色谱仪测定; 熔点使用 X-6 型显微熔点仪测定; WFH2204B 型手提式紫外灯. 薄层层析板和硅胶(300 目~400 目)购自青岛海洋硅胶厂; 其他试剂均为市售分析纯.

3.2 化合物的制备

3.2.1 化合物 **2a**~**2b** 的合成

将萘二甲酸酐(**1a**~**1b**, 2 mmol)与 1-叔丁氧羰基-4-氨基哌啶(0.43g, 2 mmol)加入到 30 mL 无水乙醇中, 80 $^{\circ}\text{C}$ 加热回流 5 h, 待反应停止, 冷至室温, 蒸干溶剂. 加入 50 mL 氯仿, 用 2 mol/L 的稀盐酸洗涤三次, 每次 30 mL. 有机相用无水硫酸钠干燥, 蒸干溶剂, 得中间体 **2a**~**2b**.

4-((1,3-二氧代-1*H*-苯并异喹啉-2(3*H*)-基)甲基)哌啶-1-羧酸叔丁酯(**2a**)为白色固体, 0.67 g, 产率 85%. 4-((6-溴-1,3-二氧代-1*H*-苯并异喹啉-2(3*H*)-基)甲基)哌啶-1-羧酸叔丁酯(**2b**)为棕色固体, 0.72 g, 产率 76%. **2a**~**2b** 不用进一步提纯, 直接用于下一步反应.

3.2.2 化合物 **3a**~**3b** 的合成

将上述中间体 **2a**~**2b** (2 mmol) 加入到 10 mL 无水乙醇中, 冰浴下加入 4 mol/L 的盐酸乙醇溶液 5 mL, 搅拌 1 h 后撤去冰浴, 自然升至室温继续搅拌 12 h. 反应完全后, 减压蒸除溶剂, 硅胶柱层析(二氯甲烷/甲醇, $V:V=50:1$) 得中间体 **3a**~**3b**.

2-((1-(4-基甲基)-1*H*-苯并异喹啉-1,3(2*H*)-二酮(**3a**)): 为白色固体, 0.48 g, 产率 82%. m.p. 190.7~192.7 °C; ^1H NMR (300 MHz, D_2O) δ : 7.67 (s, 2H), 7.64 (s, 2H), 7.22 (t, $J=7.8$ Hz, 2H), 3.55 (d, $J=6.6$ Hz, 2H), 3.39 (d, $J=12.9$ Hz, 2H), 2.90 (t, $J=12.6$ Hz, 2H), 1.89~1.74 (m, 3H), 1.51~1.38 (m, 2H); HRMS calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 295.1447, found 295.1461.

6-溴-2-((1-(4-基甲基)-1*H*-苯并异喹啉-1,3(2*H*)-二酮(**3b**)): 白色固体, 0.58 g, 产率 78%. m.p. 187.3~189.2 °C; ^1H NMR (300 MHz, D_2O) δ : 7.86 (t, $J=6.9$ Hz, 2H), 7.56 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.49 (d, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.34 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 3.69 (d, $J=6.3$ Hz, 2H), 3.31 (d, $J=12.6$ Hz, 2H), 2.82 (t, $J=11.7$ Hz, 2H), 1.88 (s, 1H), 1.78 (d, $J=14.1$ Hz, 2H), 1.49~1.34 (m, 2H); HRMS calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{BrN}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 373.0552, found 373.0564.

3.2.3 目标化合物 **4a**~**4k** 和 **5a**~**5d** 的合成

将中间体 **3a**~**3b** (1 mmol)、溴化苄(1.1 mmol) 和无水碳酸钾(3 mmol) 加入到 30 mL 乙腈中, 升温至 60 °C 搅拌 6 h. 反应结束后抽滤, 滤饼用乙腈洗涤 3 次, 每次 5 mL. 将滤液蒸干, 剩余物用硅胶柱层析(二氯甲烷/甲醇, $V:V=20:1$) 提纯得到目标化合物.

2-((1-(苄基)哌啶-4-基)甲基)-1*H*-苯并异喹啉-1,3(2*H*)-二酮(**4a**): 淡黄色粉末, 收率 74%. m.p. 175.3~177.3 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.58 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 8.20 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.74 (t, $J=7.8$ Hz, 2H), 7.31~7.21 (m, 5H), 4.13 (d, $J=6.9$ Hz, 2H), 3.52 (s, 2H), 2.90 (d, $J=11.4$ Hz, 2H), 2.04~1.88 (m, 3H), 1.70 (d, $J=12.0$ Hz, 2H), 1.61~1.49 (m, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 164.5, 133.9, 131.6, 131.3, 129.3, 128.2, 127.1, 127.0, 122.6, 63.0, 53.2, 45.3, 35.0, 30.0; HRMS calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 385.1916, found 385.1922. Purity: 95.1% by HPLC.

2-((1-(吡啶-4-基甲基)哌啶-4-基)甲基)-1*H*-苯并异喹啉-1,3(2*H*)-二酮(**4b**): 淡黄色粉末, 收率 74%. m.p. 184.7~186.7 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.60 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 8.52 (d, $J=4.8$ Hz, 2H), 8.21 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.76 (t, $J=7.8$ Hz, 2H), 4.15 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 3.48 (s, 2H), 2.85 (d, $J=11.4$ Hz, 2H), 2.07~1.91 (m, 3H), 1.73~1.68 (m, 2H), 1.61~1.50 (m, 2H); ^{13}C NMR

(75 MHz, CDCl_3) δ : 164.5, 149.7, 148.0, 134.0, 131.6, 131.4, 128.2, 127.0, 123.8, 122.6, 61.8, 53.5, 45.3, 34.9, 30.1; HRMS calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 386.1869, found 386.1874. Purity: 97.8% by HPLC.

2-((1-(4-甲基苄基)哌啶-4-基)甲基)-1*H*-苯并异喹啉-1,3(2*H*)-二酮(**4c**): 白色粉末, 收率 75%. m.p. 136.3~137.2 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.57 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 8.18 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.73 (t, $J=7.8$ Hz, 2H), 7.18 (d, $J=7.8$ Hz, 2H), 7.09 (d, $J=7.8$ Hz, 2H), 4.12 (d, $J=6.9$ Hz, 2H), 3.45 (s, 2H), 2.87 (d, $J=11.4$ Hz, 2H), 2.31 (s, 3H), 1.92 (t, $J=10.8$ Hz, 3H), 1.65~1.60 (m, 2H), 1.58~1.48 (m, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 164.5, 136.5, 135.3, 133.90, 131.6, 131.3, 129.1, 128.8, 128.2, 127.0, 122.6, 62.9, 53.3, 45.4, 35.2, 30.2, 21.2; HRMS calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 399.2073, found 399.2083. Purity: 99.0% by HPLC.

2-((1-(4-(叔丁基)苄基)哌啶-4-基)甲基)-1*H*-苯并异喹啉-1,3(2*H*)-二酮(**4d**): 白色固体, 收率 38%. m.p. 63.2~64.7 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.57 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 8.19 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.73 (t, $J=7.8$ Hz, 2H), 7.33 (s, 2H), 7.24 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 4.13 (d, $J=6.9$ Hz, 2H), 3.50 (s, 2H), 2.92 (d, $J=11.1$ Hz, 2H), 2.06~1.86 (m, 3H), 1.73~1.67 (m, 2H), 1.62~1.49 (m, 2H), 1.30 (s, 9H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 164.47, 149.99, 133.93, 131.56, 131.31, 129.03, 128.16, 126.96, 125.10, 122.59, 62.66, 53.17, 45.27, 35.03, 34.49, 31.43, 29.94; HRMS calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 441.2542, found 441.2553. Purity: 98.8% by HPLC.

2-((1-(4-氟苄基)哌啶-4-基)甲基)-1*H*-苯并异喹啉-1,3(2*H*)-二酮(**4e**): 淡黄色固体, 收率 58%. m.p. 128.1~129.9 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.57 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 8.19 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.73 (t, $J=7.8$ Hz, 2H), 7.24 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 6.95 (t, $J=8.7$ Hz, 2H), 4.12 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 3.42 (s, 2H), 2.84 (d, $J=11.4$ Hz, 2H), 1.91 (t, $J=11.1$ Hz, 3H), 1.68 (d, $J=12.3$ Hz, 2H), 1.56~1.42 (m, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 164.5, 163.5, 160.3, 134.20, 133.9, 131.6, 130.9, 130.5, 128.2, 127.0, 122.6, 115.1, 114.8, 62.35, 53.3, 45.3, 35.1, 30.1; HRMS calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{FN}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 403.1822, found 403.1829. Purity: 97.9% by HPLC.

2-((1-(4-苄基)哌啶-4-基)甲基)-1*H*-苯并异喹啉-1,3(2*H*)-二酮(**4f**): 白色固体, 收率 44%. m.p. 190.5~192.5 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.57 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 8.20 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.74 (t, $J=7.8$ Hz, 2H), 7.57 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.42 (d, $J=7.8$ Hz, 2H), 4.12 (d,

$J=7.2$ Hz, 2H), 3.49 (s, 2H), 2.80 (d, $J=11.4$ Hz, 2H), 1.95 (t, $J=11.1$ Hz, 3H), 1.68 (d, $J=12.0$ Hz, 2H), 1.56~1.46 (m, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 164.5, 144.8, 134.0, 132.0, 131.6, 131.4, 129.4, 128.2, 127.0, 122.6, 119.1, 110.6, 62.6, 53.5, 45.3, 35.0, 30.2, 29.7; HRMS calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 410.1869, found 410.1870. Purity: 95.0% by HPLC.

2-((1-(4-硝基苄基)哌啶-4-基)甲基)-1H-苯并异喹啉-1,3(2H)-二酮(**4g**): 淡黄色固体, 收率 42%. m.p. 219.6~220.2 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.60 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 8.22 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 8.15 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.76 (t, $J=7.8$ Hz, 2H), 7.51 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 4.15 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 3.57 (s, 2H), 2.84 (d, $J=11.1$ Hz, 2H), 1.98 (d, $J=10.2$ Hz, 3H), 1.71 (d, $J=11.1$ Hz, 2H), 1.60~1.49 (m, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 164.6, 147.1, 134.0, 131.6, 131.4, 129.4, 128.2, 127.0, 123.5, 122.6, 62.3, 53.5, 45.3, 34.9, 30.1; HRMS calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 430.1767, found 430.1754. Purity: 97.8% by HPLC.

2-((1-(3-氯苄基)哌啶-4-基)甲基)-1H-苯并异喹啉-1,3(2H)-二酮(**4h**): 白色固体, 收率 53%. m.p. 155.9~157.6 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.58 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 8.20 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.80~7.70 (m, 2H), 7.30 (s, 1H), 7.20~7.17 (m, 3H), 4.13 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 3.43 (s, 2H), 2.84 (d, $J=11.4$ Hz, 2H), 1.91 (t, $J=11.4$ Hz, 3H), 1.70~1.65 (m, 2H), 1.58~1.47 (m, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 164.5, 141.0, 134.1, 133.9, 131.6, 131.3, 129.4, 128.9, 128.2, 127.1, 127.0, 127.0, 122.6, 62.6, 53.4, 45.4, 35.1, 30.2; HRMS calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{ClN}_2\text{O}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 419.1526, found 419.1539. Purity: 96.1% by HPLC.

2-((1-(3-溴苄基)哌啶-4-基)甲基)-1H-苯并异喹啉-1,3(2H)-二酮(**4i**): 白色固体, 收率 57%. m.p. 160.2~161.6 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.57 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 8.18 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.73 (t, $J=7.8$ Hz, 2H), 7.45 (s, 1H), 7.33 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.21 (d, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.13 (t, $J=7.8$ Hz, 1H), 4.12 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 3.41 (s, 2H), 2.83 (d, $J=11.4$ Hz, 2H), 1.91 (t, $J=11.4$ Hz, 3H), 1.70~1.64 (m, 2H), 1.58~1.45 (m, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 164.5, 141.3, 133.9, 131.8, 131.6, 131.3, 130.0, 129.7, 128.2, 127.5, 127.0, 122.6, 122.4, 62.5, 53.4, 45.4, 35.1, 30.2; HRMS calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{BrN}_2\text{O}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 463.1021, found 463.1023. Purity: 96.6% by HPLC.

2-((1-(3-硝基苄基)哌啶-4-基)甲基)-1H-苯并异喹

啉-1,3(2H)-二酮(**4j**): 黄色固体, 收率 76%. m.p. 174.6~176.6 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.58 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 8.20 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.80 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 7.74 (t, $J=7.8$ Hz, 2H), 7.66 (d, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.51 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.35 (t, $J=7.8$ Hz, 1H), 4.11 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 3.73 (s, 2H), 2.77 (d, $J=11.7$ Hz, 2H), 1.99 (t, $J=11.4$ Hz, 2H), 1.91~1.86 (m, 1H), 1.67~1.61 (m, 2H), 1.54~1.39 (m, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 164.5, 149.6, 134.7, 134.0, 132.5, 131.6, 131.3, 130.7, 128.2, 127.6, 127.0, 124.3, 122.6, 59.1, 53.6, 45.4, 35.0, 30.3; HRMS calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 430.1767, found 430.1768. Purity: 97.3% by HPLC.

2-((1-(3-甲氧基苄基)哌啶-4-基)甲基)-1H-苯并异喹啉-1,3(2H)-二酮(**4k**): 白色固体, 收率 61%. m.p. 141.7~143.1 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.57 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 8.19 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.73 (t, $J=7.8$ Hz, 2H), 7.19 (t, $J=7.8$ Hz, 1H), 6.88 (d, $J=6.6$ Hz, 2H), 6.76 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 4.13 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.45 (s, 2H), 2.87 (d, $J=11.4$ Hz, 2H), 1.93 (t, $J=11.1$ Hz, 3H), 1.70~1.64 (m, 2H), 1.58~1.49 (m, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 164.5, 159.6, 140.3, 133.9, 131.6, 131.3, 129.1, 128.2, 127.0, 122.6, 121.4, 114.3, 112.5, 63.1, 55.2, 53.4, 45.4, 35.2, 30.2; HRMS calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 415.2022, found 415.1999. Purity: 96.8% by HPLC.

2-((1-苄基哌啶-4-基)甲基)-6-溴-1H-苯并异喹啉-1,3(2H)-二酮(**5a**): 淡黄色固体, 收率 52%. m.p. 170.1~171.7 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.61 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 8.52 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 8.36 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 8.00 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.81 (t, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.29~7.23 (m, $J=11.8$ Hz, 5H), 4.11 (d, $J=6.9$ Hz, 2H), 3.53 (s, 2H), 2.94 (d, $J=3.9$ Hz, 1H), 2.89 (d, $J=3.9$ Hz, 1H), 2.09~1.87 (m, 3H), 1.69 (d, $J=11.1$ Hz, 2H), 1.63~1.51 (m, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 163.9, 163.9, 133.3, 132.1, 131.3, 131.1, 130.6, 130.3, 129.3, 129.0, 128.3, 128.1, 127.2, 123.0, 122.1, 62.9, 53.1, 45.3, 34.9, 29.8; HRMS calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{BrN}_2\text{O}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 463.1021, found 463.1022. Purity: 95.2% by HPLC.

6-溴-2-((1-(4-氟苄基)哌啶-4-基)甲基)-1H-苯并异喹啉-1,3(2H)-二酮(**5b**): 白色固体, 收率 66%. m.p. 179.9~182.1 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.62 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 8.54 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 8.37 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 8.01 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.82 (t, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.29 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 6.97 (t, $J=8.4$ Hz, 2H), 4.11 (d, $J=6.9$ Hz, 2H), 3.49 (s, 2H), 2.89 (d, $J=11.1$ Hz, 2H), 1.97 (t, $J=10.8$ Hz, 3H), 1.68 (d, $J=11.7$ Hz, 2H), 1.60~1.47 (m,

2H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 163.9, 133.3, 132.2, 131.3, 131.1, 130.9, 130.8, 130.6, 130.3, 129.0, 128.1, 123.0, 122.1, 115.2, 114.9, 62.0, 53.0, 45.3, 34.8, 29.7; HRMS calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{BrFN}_2\text{O}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 481.0927, found 481.0923. Purity: 97.3% by HPLC.

6-溴-2-((1-(4-硝基苄基)哌啶-4-基)甲基)-1*H*-苯并异噻啉-1,3(2*H*)-二酮(**5c**): 淡黄色固体, 收率 68%. m.p. 202.2~203.8 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.64 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 8.57 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 8.40 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 8.17 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 8.04 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.88~7.81 (m, 1H), 7.56 (d, $J=7.5$ Hz, 2H), 4.13 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 3.65 (s, 2H), 2.90 (d, $J=11.4$ Hz, 2H), 2.14~1.92 (m, 3H), 1.76~1.57 (m, 4H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 164.0, 133.5, 132.3, 131.4, 131.2, 130.7, 130.5, 129.9, 129.0, 128.2, 123.6, 122.9, 122.0, 61.9, 53.3, 45.20, 29.6, 29.5; HRMS calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{BrN}_3\text{O}_4$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 510.0851, found 510.0852. Purity: 98.4% by HPLC.

6-溴-2-((1-(3-甲氧基苄基)哌啶-4-基)甲基)-1*H*-苯并异噻啉-1,3(2*H*)-二酮(**5d**): 白色固体, 收率 77%. m.p. 138.7~140.7 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.55 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 8.44 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 8.29 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.93 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.82~7.69 (m, 1H), 7.17 (t, $J=8.1$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J=6.6$ Hz, 2H), 6.74 (d, $J=6.9$ Hz, 1H), 4.08 (d, $J=6.9$ Hz, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.43 (s, 2H), 2.88 (s, 1H), 2.84 (s, 1H), 1.91 (t, $J=10.5$ Hz, 3H), 1.65 (d, $J=11.1$ Hz, 2H), 1.58~1.45 (m, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 163.8, 159.6, 140.2, 133.1, 132.1, 131.2, 131.0, 130.4, 130.2, 129.1, 128.1, 122.9, 122.0, 121.4, 114.4, 112.4, 63.1, 55.2, 53.3, 45.5, 35.1, 30.2; HRMS calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{BrN}_2\text{O}_3$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 493.1127, found 493.1120. Purity: 97.4% by HPLC.

3.3 胆碱酯酶抑制活性

采用 Ellman 法对化合物进行胆碱酯酶抑制活性测试, 在 96 孔板中选取 6 个孔, 每孔加入 10 μL 酶溶液以及 20 μL 不同浓度的待测化合物溶液, 然后加入 70 μL 浓度为 0.1 mol/L 的磷酸缓冲溶液(pH=8.0), 37 °C 孵育 15 min, 取出后用多道移液器加入 ATC (10 μL)、DTNB (10 μL)及缓冲液(80 μL)的混合液共计 100 μL , 混匀后测其在 $\lambda=412$ nm 处的吸光度 A 值(A_n), 参比用上述缓冲溶液. ATC 的自发水解为 $A_{\text{自发}}$, 以未加样品所测得的 A_{control} 值作为 100 个活力单位. 相对酶活力 = $(A_n - A_{\text{自发}})/(A_{\text{control}} - A_{\text{自发}}) \times 100$, 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的 IC_{50} 值(抑制酶活力 50%时的抑制剂浓度). 实验重复三次, 取平均值.

3.4 分子对接

采用 Autodock 4.0 分子对接程序进行化合物与 AChE 相互作用的研究. 对接之前对蛋白质与小分子的预处理, 包括蛋白质的氨基酸残基添加氢键, 赋予 Gasteiger 电荷, 对小分子进行电荷计算, 设定可旋转键. 得到的蛋白质结构是由 AUOTOGRID 为配体上的每个原子类型进行原子亲和性的格点计算, 每个网格点相距 0.0375 nm, 网格盒子分别置于酶活性的底部(AChE [2.781 64.383 67.971]), 大小设定为 5.0 nm $\times$ 5.0 nm $\times$ 5.0 nm, 包括了活性口袋所有残基. 对接计算使用了拉马克遗传算法(LGA), 随机个体群为 150, 能量评估系数为 2 500 000, 其他参数为软件默认参数.

3.5 酶动力学

在 96 孔板中选取 5 个孔, 分别加入 10 μL 的 AChE 酶溶液, 10 μL 的样品溶液以及 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液, 37 °C 孵育 15 min, 立即用多道移液器加入不同浓度的 0.01 mol $\cdot$ L $^{-1}$ ATC 溶液, 振摇均匀后测其在 $\lambda=412$ nm 处的时间扫描曲线. 曲线的斜率与反应的初速度 $[V]$ 呈正比, 然后以 $1/[V]$ 对 $[S]$ 作图, 以不加抑制剂的为控制线, 得到化合物对 AChE 的 Lineweaver-Burk 动力学曲线图.

3.6 细胞毒性

采用噻唑蓝(MTT)法对合成的化合物进行体外细胞毒活性评价. 取对数生长周期的状态良好的肿瘤细胞. 调整细胞数为 5×10^3 个/mL 加于 96 孔培养板中, 每孔 100 μL , 分样品组, 对照组和空白组, 每组 4 个复孔. 于饱和湿度, 5% CO_2 , 37 °C 条件下培养 48 h, 每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 10 μL , 继续培养 4 h 后每孔加入 DMSO 100 μL , 过夜, 于 490 nm 处测定每孔的吸光度值(A 值). 由公式: 抑制率(%) = $(A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}})/(A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$ 计算不同浓度的抑制率, 实验重复三次, 取平均值.

辅助材料(Supporting Information) 目标化合物的 ^1H NMR, ^{13}C NMR, HRMS 谱图. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] <https://finance.sina.com.cn/china/gncj/2021-05-11/doc-ikmxzfmm1763811.shtml>.
- [2] Scarpini, E.; Scheltens, P.; Feldman, H. *Lancet Neurol.* **2003**, *2*, 539.
- [3] Mimica, N.; Presečki, P. *Psychiatr. Danub.* **2009**, *21*, 108.
- [4] Du, C.-Q.; Xie, B.-H.; He, M.; Hu, Z.-Y.; Liu, Y.; He, X.; Liu, F.-Y.; Cheng, C.; Zhou, H.-B.; Huang, S.-T.; Dong, C.-E. *Chin. J. Org. Chem.* **2020**, *40*, 2035 (in Chinese).
(杜川黔, 谢宝花, 贺明, 胡志烨, 刘豫, 何雪, 刘凡玉, 程晨, 周海兵, 黄胜堂, 董春娥, 有机化学, **2020**, *40*, 2035.)

- [5] Zheng, S.-Y.; Yu, C.-H.; Shen, Z.-W. *Chin. Chin. J. Org. Chem.* **2013**, *33*, 2261 (in Chinese). (郑书岩, 郁春辉, 沈征武, 有机化学, **2013**, *33*, 2261.)
- [6] Bortolami, M.; Rocco, D.; Messori, A.; Di Santo, R.; Costi, R.; Madia, V. N.; Scipione, L.; Pandolfi, F. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2021**, *31*, 399.
- [7] Sang, Z.; Qiang, X.; Li, Y.; Xu, R.; Cao, Z.; Song, Q.; Wang, T.; Zhang, X.; Liu, H.; Tan, Z.; Deng, Y. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *135*, 307.
- [8] Xu, Z.; Xiao, Y.; Qian, X.; Cui, J.; Cui, D. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 889.
- [9] Duke, R. M.; Veale, E. B.; Pfeffer, F. M.; Kruger, P. E.; Gunnlaugsson, T. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3936.
- [10] Xie, Z.-D.; Fu, M.-L.; Yin, B.; Zhu, Q. *Chin. J. Org. Chem.* **2018**, *38*, 1364 (in Chinese). (谢振达, 付曼琳, 尹彪, 朱勃, 有机化学, **2018**, *38*, 1364.)
- [11] Tomczyk, M. D.; Walczak, K. Z. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *159*, 393.
- [12] Stone, R. M.; Mazzola, E.; Neuberg, D.; Allen, S. L.; Pigneux, A.; Stuart, R. K.; Wetzler, M.; Rizzieri, D.; Erba, H. P.; Damon, L.; Jang, J. H.; Tallman, M. S.; Warzocha, K.; Masszi, T.; Sekeres, M. A.; Egyed, M.; Horst, H. A.; Selleslag, D.; Solomon, S. R.; Venu-gopal, P.; Lundberg, A. S.; Powell, B. J. *Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 1252.
- [13] Chen, Z.; Xu, Y.; Qian, X. *Chin. Chem. Lett.* **2018**, *29*, 1741.
- [14] Tandon, R.; Luxami, V.; Kaur, H.; Tandon, N.; Paul, K. *Chem. Rec.* **2017**, *17*, 956.
- [15] Rong, R.-X.; Li, J.-M.; Li, Y.-F.; Guo, X.-Y.; Wang, C.; Li, Y.-J.; Li, J.-M.; Han, B.-J.; Cao, Z.-R.; Wang, K.-R.; Li, X.-L. *Chin. J. Org. Chem.* **2021**, *41*, 1599 (in Chinese). (戎瑞雪, 李基民, 李耀文, 郭啸宇, 王冲, 李艳军, 李金梅, 韩宝君, 曹志然, 王克让, 李小六, 有机化学, **2021**, *41*, 1599.)
- [16] Luo, J.; Xie, Z.; Lam, J. W.; Cheng, L.; Chen, H.; Qiu, C.; Kwok, H. S.; Zhan, X.; Liu, Y.; Zhu, D.; Tang, B. Z. *Chem. Commun.* **2001**, *18*, 1740.
- [17] Gopikrishna, P.; Meher, N.; Iyer, P. K. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 12081.
- [18] Ma, Y.; Zhao, L.; Li, Y.; Liu, J.; Yang, Y.; Chu, T. *Tetrahedron* **2018**, *74*, 2684.
- [19] Srivastava, A. K.; Singh, A. K.; Kumari, N.; Yadav, R.; Gulino, A.; Speghini, A.; Nagarajan, R.; Mishra, L. *J. Lumin.* **2017**, *182*, 274.
- [20] Ma, X.; Chi, W.; Han, X.; Wang, C.; Liu, S.; Liu, X.; Yin, J. *Chin. Chem. Lett.* **2021**, *32*, 1790.
- [21] Gao, J.; Midde, N.; Zhu, J.; Terry, A. V.; McInnes, C.; Chapman, J. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 5573.
- [22] Blaikie, L.; Kay, G.; Kong Thoo Lin, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, *30*, 127505.
- [23] Gao, J.; Suo, C.; Tseng, J. H.; Moss, M. A.; Terry, A. V., Jr.; Chapman, J. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3120.
- [24] Dai, F.; Li, Q.; Wang, Y.; Ge, C.; Feng, C.; Xie, S.; He, H.; Xu, X.; Wang, C. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 2071.
- [25] Li, M.; Wang, Y.; Ge, C.; Chang, L.; Wang, C.; Tian, Z.; Wang, S.; Dai, F.; Zhao, L.; Xie, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *143*, 1732.
- [26] Alonso, D.; Dorronsoro, I.; Rubio, L.; Muñoz, P.; García-Palomero, E.; Monte, M. D.; Bidon-Chanal, A.; Orozco, M.; Luque, F. J.; Castro, A.; Medina, M.; Martínez, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 6588.
- [27] Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres Jr, V.; Feather-Stone, R. M. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88.
- [28] Elsinghorst, P. W.; Tanarro, C. M.; Gutschow, M. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7540.
- [29] Mao, F.; Chen, J.; Zhou, Q.; Luo, Z.; Huang, L.; Li, X. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 6737.
- [30] Sukumaran, S. D.; Nasir, S. B.; Tee, J. T.; Buckle, M. J. C.; Othman, R.; Rahman, N. A.; Lee, V. S.; Bukhari, S. N. A.; Chee, C. F. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2021**, *36*, 130.

(Li, L.; Fan, Y.)