

苦参碱缩氨基脒类化合物的合成及其体外抗肿瘤活性研究

庞盼杏^{†,a} 宁蓉^{†,a} 祝创^a 黄文洁^a 马献力^a
蒋彩娜^a 李芳耀^{*,a} 周小群^{*,b}^(a) 桂林医学院药学院 广西桂林 541004)^(b) 桂林医学院人文与管理学院 广西桂林 541004)

摘要 为了寻找高效低毒的新型抗肿瘤化合物,设计并合成了一系列新型的苦参碱缩氨基脒类化合物.采用噻唑蓝(MTT)法测定目标化合物对人肺癌细胞(A549)、人肝癌细胞(HepG2)、人宫颈癌细胞(Hela)、人胃癌细胞(MGC803)细胞株及人正常肝细胞株(L-O2)的细胞毒活性.结果表明,大多数衍生物对肿瘤细胞的细胞毒性明显高于母体化合物.其中14-甲酰基-15-氯-苦参碱缩 *N*-(3-氯苯基)氨基脒(**6c**)和14-甲酰基-15-氯-苦参碱缩 *N*-(3-硝基苯基)氨基脒(**6f**)对人肺癌A549细胞株表现出良好的抑制活性,IC₅₀值分别为(11.70±0.25)和(15.61±0.07) μmol/L,活性优于阳性对照药喜树碱.同时,对人胃癌MGC803细胞株IC₅₀值分别为(11.32±1.07)和(9.27±2.03) μmol/L,并且对人正常肝细胞株(L-O2)表现出较低的细胞毒性.流式细胞术及线粒体膜电位检测表明,化合物**6f**能够剂量依赖性地诱导MGC803细胞凋亡,并降低线粒体膜电位.上述研究为苦参碱的结构修饰提供了思路.

关键词 苦参碱;缩氨基脒;合成;体外抗肿瘤活性

Synthesis and *in Vitro* Antitumor Activity of Matrine Semicarbazide DerivativesPang, Panxing^{†,a} Ning, Rong^{†,a} Zhu, Chuang^a Huang, Wenjie^a Ma, Xianli^a
Jiang, Caina^a Li, Fangyao^{*,a} Zhou, Xiaoqun^{*,b}^(a) School of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541004)^(b) College of Humanities and Management, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541004)

Abstract In order to search for novel antitumor drugs with high efficiency and low toxicity, matrine semicarbazide derivatives were designed and synthesized. The antiproliferative activities of target compounds in four human cancer cell lines of A549 (lung), HepG2 (liver), Hela (epithelial cervical), MGC-803 (gastric) and a human normal cell of L-O2 (liver) were evaluated by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. Biological screening results demonstrated that most of the derivatives exhibited more potent cytotoxicity against tumor cell lines superior to parent compound matrine. Among them, compounds of 14-formyl-15-chloro-matrine *N*-(3-chlorophenyl) semicarbazide (**6c**) and 14-formyl-15-chloro-matrine *N*-(3-nitrophenyl) semicarbazide (**6f**) displayed better antiproliferative activity with IC₅₀ values of (11.70±0.25) and (15.61±0.07) μmol/L toward A549 cells compared with camptothecin, and with IC₅₀ values of (11.32±1.07) and (9.27±2.03) μmol/L against MGC-803 cells. Moreover, they exhibited lower cytotoxicity against human normal liver cell line L-O2. Flow cytometry and JC-1 mitochondrial membrane potential detection showed that compound **6f** could induce apoptosis of MGC803 cells and reduce the mitochondrial membrane potential. It would provide a new idea for the structural modification of matrine.

Keywords matrine; semicarbazide; synthesis; *in vitro* antitumor activity

癌症是威胁人类健康的最严重的疾病之一,据报道,2020年全球新发癌症病例1929万,癌症死亡病例

* Corresponding authors. E-mail: lifangyao2006@163.com; zhouxqgy@163.com

Received September 30, 2022; revised December 11, 2022; published online January 11, 2023.

Project supported by the National Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students (No. 202010601021), the Guangxi Young and Middle-Aged Scientific Research Basic Ability Improvement Project for Colleges and Universities (No. 2019KY051), the Natural Science Foundation of Guangxi Province (No. 2018GXNSFAA281200) and the Project for Science Research and Technology Development of Guilin City (No. 20210227-1).

国家级大学生创新创业训练计划(No. 202010601021)、广西高校中青年科研基础能力提升(No. 2019KY051)、广西自然科学基金(No. 2018GXNSFAA281200)及桂林市科学研究与技术开发计划(No. 20210227-1)资助项目.

[†] 共同第一作者(These authors contributed equally to this work).

996 万, 而胃癌是一种全世界的重要癌症, 在全球发病率和死亡率中排名第五和第四^[1-2]. 化疗是目前临床治疗癌症的重要方法, 但大多数抗肿瘤药物对癌细胞和人体正常细胞的选择性不大, 毒副作用较大且易产生耐药性. 因此, 寻找高活性、低毒性的抗肿瘤药物一直是研究的热点和难点.

缩氨基脲属于席夫碱类结构, 有着良好的药理作用和生物活性, 常作为过渡化合物. 缩氨基脲类化合物具有抗惊厥、抗真菌、抗菌、抗炎、抗寄生虫、抑制单胺氧化酶及杀虫等广泛的生物活性^[3-12], 尤其是在抗肿瘤活性方面具有较大开发潜力, Ma 等^[13]合成了一系列以缩氨基脲为连接剂的新型苯并噻唑衍生物, 其中大多数化合物对 HT29、H460、A549 和 MDA-MB-231 4 种肿瘤细胞系表现出中等至优异的活性, 其中化合物 **a**(图 1) 对四种细胞系的 IC₅₀ 值分别为 0.015、0.28、1.53 和 0.68 $\mu\text{mol/L}$, 最具潜力. Jia 等^[14]将小白菊内酯与氨基脲结构缩合, 得到了一系列戊烷内酯缩氨基脲化合物, 这些化合物对 5 种人类肿瘤细胞均表现出中等显著的抗肿瘤活性, 且大部分体外抗肿瘤活性比小白菊内酯强, 其中化合物 **b**(图 1) 在体内具有良好的抗小鼠结肠肿瘤活性, 且对免疫系统副作用小. Afrasiabi 等^[15]对化合物 **c**(邻萘醌缩氨基脲)(图 1) 及其 Ni(II) 配合物进行了研究, 两者均对人乳腺癌 MCF-7 细胞有着潜在的抗肿瘤活性(IC₅₀ 值分别为 4.94 和 2.28 $\mu\text{mol/L}$). 缩氨基脲类化合物是许多研究构效关系的先导结构, 其体内抗肿瘤活性及其抗肿瘤机制仍需进一步研究.

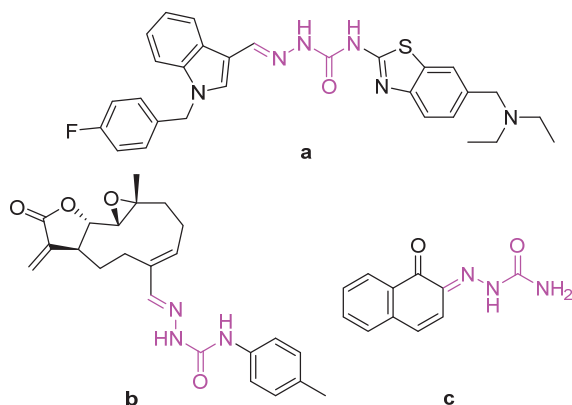


图 1 具有抗肿瘤活性的缩氨基脲化合物

Figure 1 Semicarbazone derivatives with antitumor activity

天然产物具有广泛的结构多样性和多效性, 是新药候选药物和先导分子的丰富来源^[16-17]. 据报道, 大约 60% 的临床使用的抗肿瘤药物来源于天然产物^[18]. 苦参碱(Matrine, 图 2) 是从豆科植物苦参或苦豆子等传统的中药材中提取分离得到的主要活性成分之一^[19], 是一种四环喹诺里西啶类生物碱, 具有良好的抗菌、抗病毒、

抗炎、杀虫及免疫调节等药理活性^[20-24], 尤其是抗肿瘤活性, 已成为苦参碱生物活性研究的热点之一. 近几十年来苦参碱作为含氮低分子化合物, 因拥有较高生物活性而被广泛开发, 对结直肠癌, 苦参碱可逆转多重耐药性, 增强化疗效果^[25]; 对卵巢癌, 苦参碱可克服卵巢癌获得性化疗耐药性, 延缓癌症相关细胞传导, 有望成为卵巢癌细胞的靶向药物^[26]; 对胃癌, 苦参碱抑制胃肿瘤细胞的增殖和迁移, 并显著抑制 miR-93-5p 的表达, 通过抑制胃癌细胞的功能来影响胃癌的进展^[27]. 随着对苦参碱的深入研究, 苦参碱的多种抗肿瘤机制也被证实. 大量的研究证实, 苦参碱可以抑制多种肿瘤细胞的存活、增殖、分化、迁移、代谢及耐药等生物学效应^[28-31]. 但苦参碱较大的毒性和较低的生物利用度, 限制了其临床应用, 于是研究者们对苦参碱进行了改造和修饰.

Li 等^[32]设计合成了一系列新的 14-(N-取代-2-吡咯亚甲基)苦参碱衍生物, 其中化合物 **d**(图 2) 对 SMMC-7721、A549 和 CNE2 三种人肿瘤细胞株表现出优于母体苦参碱和阳性对照顺铂的显著抗癌活性, 并使 SMMC-7721 和 CNE2 细胞的周期阻滞在 G2/M 期; Wei 等^[33]引入噻吩基团合成的 14-亚甲基硫代苦参碱衍生物 **e**(图 2), 在体内和体外都与顺铂具有协同抑制 CNE2/CDDP 细胞增殖的作用; Sun 等^[34]对苦参碱进行修饰, 得到的化合物 **f**(图 2) 通过诱导肝癌细胞凋亡、阻断细胞周期在 G0/G1 期及抑制 PI3K/AKT 信号通路等途径抑制肝癌细胞的增殖. 从学者们的研究中可以发现, 在苦参碱的 C-13 位或 C-14 位引入适当的取代基, 可以提高抗癌活性^[27]. 由此可见, 苦参碱是进行进一步结构修饰和优化的理想先导化合物.

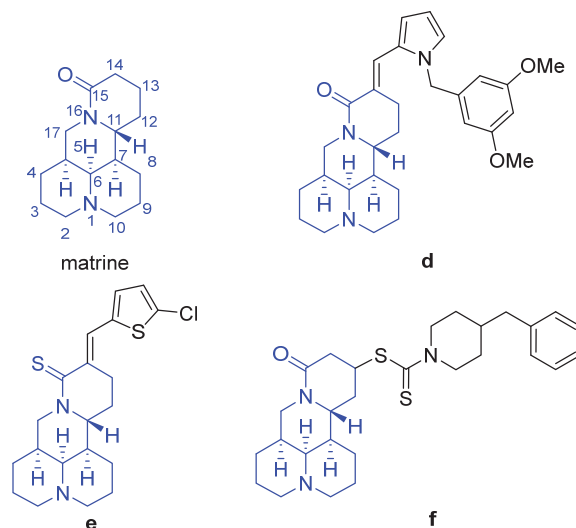


图 2 苦参碱与具有抗肿瘤活性的苦参碱衍生物

Figure 2 Matrine and matrine derivatives with antitumor activity

分子杂合是开发新型抗肿瘤活性化合物的有效策略,本课题组在前期的工作中,采用分子杂合设计合成了多个系列的具有抗肿瘤活性的杂合分子^[36-42].基于缩氨基脲结构和苦参碱结构均有一定的抗肿瘤活性,本工作利用药效团拼合原理,在苦参碱的骨架中 C-14 位引入缩氨基脲活性结构片段,合成了 15 个新型的苦参碱缩氨基脲类化合物 **6a~6o**,利用噻唑蓝(MTT)法对目标化合物进行了初步体外抗肿瘤活性评价.同时,采用线粒体膜电位法和流式细胞术对体外抗肿瘤机制进行了初步研究.

1 结果与讨论

1.1 目标化合物的合成

新型的苦参碱缩氨基脲类化合物的合成路线见 Scheme 1.以苦参碱 **1** 为原料,通过 Vilsmeier-Haack 反应得到中间体化合物 **2**^[43].以取代苯胺 **3a~3o** 与氯甲酸苯酯进行取代反应,制得取代苯胺基甲酸苯酯 **4a~4o**^[44-45].以 **4a~4o** 与水合肼为原料,通过取代反应获得 *N*-(取代)苯基联氨甲酰胺 **5a~5o**^[44-45].**5a~5o** 与中间体 **2** 通过缩合反应获得化合物 **6a~6o**.所有化合物结构都经 ¹H NMR、¹³C NMR 和 HRMS 技术进行了确证.

1.2 化合物 **6a** 的 X 射线单晶衍射测定

通过产物 **6a** 的单晶培养以及 X 射线单晶衍射实验,进一步确定了目标化合物的立体结构,该化合物主要晶体结构数据列于表 1,晶体结构图如图 3 所示,所合成目标化合物的 C=N 双键为反式构型.

1.3 目标化合物的体外抗增殖活性

采用 MTT 法测试目标产物的体外抗肿瘤活性,以喜树碱作为阳性药,实验结果如表 2 所示.从表 2 可以看出,当在苦参碱的 C-14 位接上缩氨基脲取代基后,

表 1 **6a** 的晶体结构数据

Table 1 Crystal data and structure refinement for **6a**

Complex	6a
Empirical formula	C ₂₃ H ₂₈ ClN ₅ O
Formula weight (<i>M_r</i>)	425.95
Crystal system	Orthorhombic
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
<i>a</i> /nm	0.52876(1)
<i>b</i> /nm	1.53224(3)
<i>c</i> /nm	2.68038(5)
<i>V</i> /nm ³	2.17161(7)
<i>Z</i>	4
<i>F</i> (000)	904
<i>D_x</i> /(Mg·m ⁻³)	1.303
Cu Kα radiation (λ)/nm	0.154184
μ/mm ⁻¹	1.75
<i>T</i> /K	293
Measured reflections	16468
Independent reflections	4367
Reflections with <i>I</i> > 2(<i>I</i>)	3707
<i>R_{int}</i>	0.052

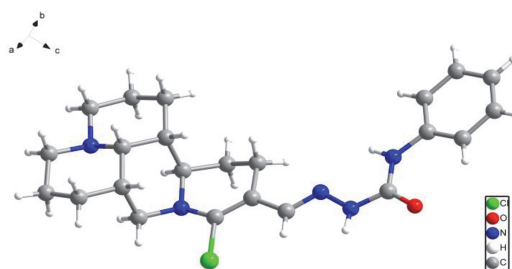
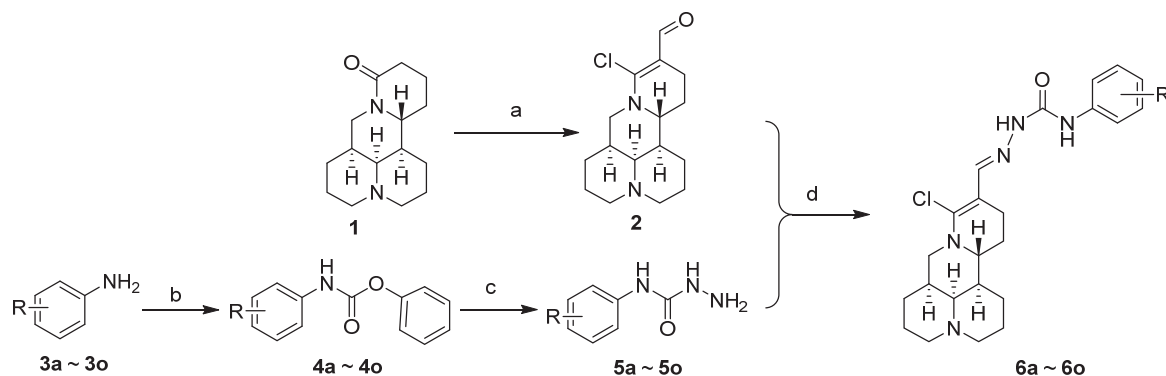


图 3 化合物 **6a** 的晶体结构图
Figure 3 Crystal structure of **6a**

与母体苦参碱相比,绝大多数目标化合物对所测试的 4 株肿瘤细胞系活性都有所提升.当缩氨基脲的苯环上连接给电子基团 CH₃ 时,其对 MGC803、Hela 的抗肿瘤细胞活性较好,且对位取代活性优于间位和邻位,同时对



Reagents and conditions: (a) (1) CH₂Cl₂, DMF, POCl₃, 0 °C, 1 h; (2) mix, r.t., 8 h; (3) hydrolysis, 60 °C, 2 h, pH 8~9. (b) Phenyl chloroformate, anhydrous acetone, dehydrated molecular sieve, 0~5 °C, 5.5 h. (c) Dioxane, NH₂NH₂·H₂O (*ω*=80%), 102 °C, 6 h; (d) ethanol, reflux 12 h, 80 °C.

图式 1 化合物 **6a~6o** 的合成
Scheme 1 Synthesis of compounds **6a~6o**

表2 目标化合物对四种肿瘤细胞系及正常细胞的体外抗增殖活性
Table 2 Antiproliferative activity in four tumor and one normal cell lines of target compounds

Compd.	R	IC ₅₀ ^a /(μmol·L ⁻¹)				
		L-O2	MGC803	HeLa	A549	Hepg2
6a	H	30.46±0.12	17.41±1.52	24.86±0.70	46.53±0.40	83.93±1.30
6b	2-Cl	76.50±2.82	11.66±1.31	17.30±2.04	25.48±2.72	>100
6c	3-Cl	27.45±2.47	11.32±1.07	16.94±1.97	11.70±0.25	35.82±1.93
6d	4-Cl	12.77±1.87	14.36±2.99	15.47±1.24	45.48±1.11	46.75±1.59
6e	2-NO ₂	31.46±0.98	17.47±2.58	32.51±0.14	33.31±0.03	>100
6f	3-NO ₂	63.99±2.71	9.27±2.03	50.84±0.91	15.61±0.07	27.59±2.02
6g	4-NO ₂	33.24±0.74	21.70±1.89	30.21±1.71	63.74±1.21	>100
6h	2-Br	45.85±1.47	23.63±0.22	38.34±0.65	71.39±4.84	59.82±2.85
6i	4-Br	12.36±2.64	13.73±1.57	16.34±1.87	20.72±0.49	>100
6j	2-F	32.90±0.36	14.16±2.35	30.09±2.69	49.90±1.70	>100
6k	3-F	26.70±1.64	16.46±1.99	23.50±2.87	62.73±2.42	38.64±4.47
6l	4-F	11.94±1.85	17.28±1.27	15.94±1.41	41.49±1.46	31.40±2.31
6m	2-CH ₃	27.49±2.22	20.84±0.11	21.34±2.36	56.86±1.57	56.90±2.43
6n	3-CH ₃	33.48±2.23	19.73±1.04	25.35±0.19	45.11±1.32	53.94±2.67
6o	4-CH ₃	18.02±2.13	13.81±0.23	21.21±0.60	53.44±2.18	92.76±3.05
苦参碱		>100	>100	>100	>100	>100
喜树碱 ^b		4.44±2.54	8.13±2.13	2.00±0.8	20.34±1.53	2.30±1.19

^a Data represent the means ± S.D. from three independent experiments. ^b Used as a positive control.

正常细胞的毒性也大。当缩氨基脲的苯环上连接吸电子基团 NO₂、F、Cl 或 Br 时, 部分化合物对肿瘤细胞表现出较好的细胞毒性, 但是取代基的吸电子能力强弱与细胞毒性之间并没有呈现规律性。总体而言, 化合物对 HepG2 细胞毒性整体较弱, IC₅₀ 值均在 25 μmol/L 以上; 对 MGC803 细胞表现出较强细胞毒性, IC₅₀ 值均在 25 μmol/L 以下, 其中 NO₂、Cl 的对位取代化合物 **6c** 和 **6f** 对 MGC803 细胞 IC₅₀ 值分别为 11.32 和 9.27 μmol/L, 与阳性对照药喜树碱相当; 同时, 化合物 **6c** 和 **6f** 对 A549

细胞也表现出较强毒性, 其 IC₅₀ 值分别为 11.70 和 15.61 μmol/L, 但 NO₂ 对位取代化合物 **6f** 对正常细胞的毒性明显低于 Cl 的对位取代化合物 **6c**。

1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡实验

为了研究化合物 **6f** 是否通过诱导肿瘤细胞凋亡的机制而产生抗肿瘤活性, 采用 Annexin V-FITC/PI 双染法对 **6f** 诱导 MGC803 细胞凋亡情况进行了检测。MGC803 细胞与 **6f** (10、15 和 20 μmol/L) 共同孵化 48 h 后经流式细胞仪检测, 结果如图 4 所示, MGC-803 细胞

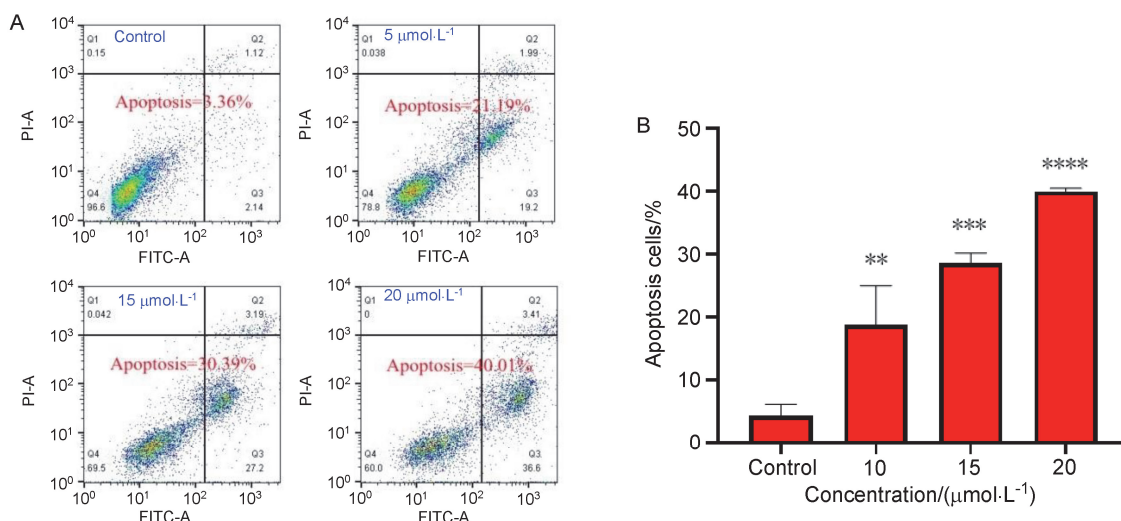


图4 化合物 **6f** 对 MGC-803 细胞凋亡的影响

Figure 4 Effects of **6f** on apoptosis of gastric cancer MGC-803 cells

(A) Apoptosis rate of MGC-803 cells was determined by flow cytometry with Annexin V/PI staining. MGC-803 cells were incubated with 10, 15, and 20 μmol/L **6f** for 48 h. (B) Quantitative analysis of apoptotic cells in A. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001 compared with the control group.

的凋亡率分别为 21.19%、30.39%和 40.01%，而空白对照组的细胞凋亡率为 3.36%，与对照组相比，化合物 **6f** 呈剂量依赖性显著促进 MGC-803 细胞的凋亡(图 4B, $p < 0.05$)。

1.5 瘤细胞凋亡形态学

通过肿瘤细胞形态观察确证 **6f** 对 MGC803 细胞的凋亡诱导活性。将胃癌细胞 MGC803 与 **6f** (10、15 和 20 $\mu\text{mol/L}$) 共同孵化 48 h 后，结果如图 5 所示，细胞形态发生显著变化，如皱缩、细胞体积变小和裂解等。这与流式细胞术的检测结果一致，该结果进一步证明了化合物 **6f** 能够诱导 MGC803 细胞凋亡。

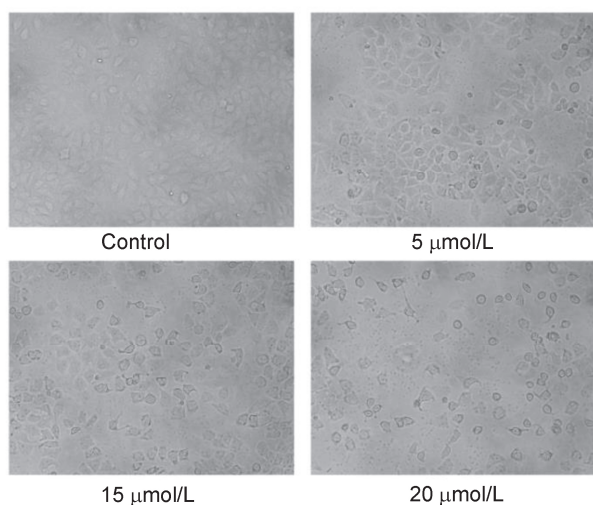


图 5 胃癌 MGC-803 细胞在化合物 **6f** 作用下的形态学变化
Figure 5 Morphological changes of gastric cancer MGC-803 cells treated with compound **6f**

1.6 线粒体膜电位检测实验

线粒体跨膜电位(Mito-chondrial membrane potential, MMP)的降低是细胞凋亡早期的不可逆事件^[46]，因此，我们进一步研究化合物 **6f** 对 MGC803 细胞线粒体膜电位的影响。MGC-803 细胞与 **6f** (10、15 和 20 $\mu\text{mol/L}$) 共同孵化 48 h 后，以 JC-1 作为荧光探针，细胞在荧光显微镜下观察拍照。实验结果如图 6 所示，没有给药的细胞中，JC-1 在线粒体内聚集形成多聚体发射出红色荧光；细胞给药后，随着药物浓度增加，细胞的线粒体膜电位也随之下降，线粒体中 JC-1 逐渐分散以发射绿色荧光的单体形式存在，细胞从红色荧光向绿色荧光转变，且 JC-1 逆转为单体的数量随着药物浓度增加而增加($p < 0.05$, 图 6B)，表明化合物 **6f** 能够通过线粒体途径诱导 MGC-803 细胞凋亡。

2 结论

基于药物拼合原理，采用引入活性基团的方法设计

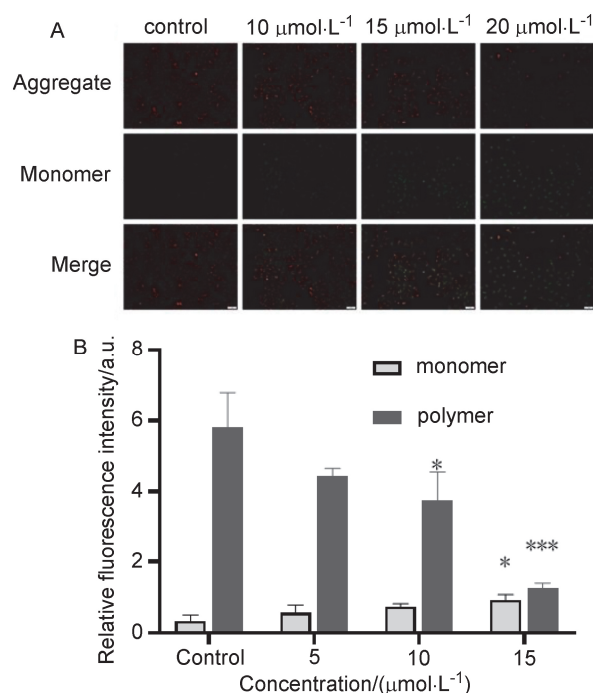


图 6 化合物 **6f** 对胃癌细胞 MGC-803 线粒体膜电位的影响
Figure 6 Effects of **6f** on mitochondrial membrane potential (MMP) of gastric cancer MGC-803 cells

(A) Representative pictures of mitochondrial membrane potential of MGC-803 cells treated with **6f** for 48 h. (B) Quantitative analysis of A. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with the control group.

并合成了 15 个新型的苦参碱缩氨基脲类化合物。体外抗肿瘤活性结果显示，部分目标产物对所测肿瘤细胞株表现出良好的活性，其中化合物 **6c** 和 **6f** 对 A549 细胞株的 IC_{50} 值分别为 (11.70 ± 0.25) 和 (15.61 ± 0.07) $\mu\text{mol/L}$ ，优于阳性对照药喜树碱，化合物 **6f** 对 MGC-803 细胞株抑制活性最强， IC_{50} 值为 9.27 $\mu\text{mol/L}$ 。初步的机制研究表明，**6f** 能够通过线粒体途径诱导 MGC-803 细胞凋亡。同时，肿瘤细胞形态观察确证 **6f** 能够诱导 MGC-803 细胞发生皱缩、细胞体积变小和裂解等显著变化。综上所述，化合物 **6f** 可能是一种有价值的抗肿瘤先导化合物。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

DF-101S 集热式磁力加热搅拌器(金坛市医疗器械厂)、OSB-Z 100 水油浴锅(上海泉杰仪器有限公司)、SHZ-D(III)循环水式真空泵(河南省予华仪器有限公司)、ZF-2 型三用紫外仪(上海市安亭电子仪器厂)、RE-52 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)、电子天平型号 BT-224S(北京赛多利斯仪器系统有限公司)、AVANCE AV400 核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司)、Waters Xevo G2-XS QTOF 高分辨质谱仪、Bruker ultraflexxtreme MAL-DI-TOF 质谱仪(德国 Bruker 公司)、OLYMPUSBX51 型荧

光倒置显微镜(OLYMPUS 公司)、ELX 酶标仪(Bio-Tek 公司)、Bruker Smart 1000 CCD X 射线衍射仪(德国 Bruker 公司)、Anton Paar MCP150 旋光仪、上海精科仪电物光 SGWX-4 显微熔点仪。

苦参碱(AR, 陕西昂盛生物医药科技有限公司)、苯胺类化合物[AR, 阿拉丁试剂(上海)有限公司]、氯甲酸苯酯(AR, 西陇科学股份有限公司)、三氯氧磷(AR, 西陇科学股份有限公司)、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF, AR, 西陇科学股份有限公司)、80%水合肼(CP, 西陇科学股份有限公司)、5 Å 分子筛, 其它试剂均为分析纯。

A549 人肺癌细胞、HepG2 人肝癌细胞、Hela 人宫颈癌细胞、MGC803 人胃癌细胞及 L-O2 人正常肝细胞均由桂林第一附属医院实验室提供。

3.2 实验方法

3.2.1 14-甲酰基-15-氯-苦参碱(2)的合成

参考文献[43], 取苦参碱(1, 1.24 g, 5 mmol)溶解在 10 mL 的二氯甲烷中, 另取圆底烧瓶加入 DMF (15 mmol, 1.15 mL), 然后加入 5 mL 二氯甲烷混合, 随后在 0 °C 下, 将 POCl₃ (1.4 mL, 5 mmol)缓慢加入到混合溶液中, 然后在低温下搅拌反应 1 h, 在混合液变至灰色黏稠状后, 将上述苦参碱混合液缓慢滴入。加入后, 将反应温度缓慢提高至室温, 并通过薄层色谱分析对反应过程进行追踪。8 h 后反应完毕, 将混合物浓缩, 并加入 20 mL 冰水。首先用饱和 NaHCO₃ 调节混合物的 pH 值至 6, 再用质量分数为 30% 的 NaOH 水溶液进一步将 pH 值调为 8~9。最后将混合物在 60 °C 水解 2 h, 冷却后将淡黄色沉淀过滤干燥, 得到中间体化合物 2。淡黄色粉末, 产率 83%, m.p. 114.3~114.8 °C; HRMS calcd for C₂₃H₃₀ClN₅O [M+H]⁺ 294.1499, found 295.1573. 表征数据与文献[43]一致。

3.2.2 取代苯胺基甲酸苯酯 4a~4o 的合成

参考文献[44, 45], 将取代苯胺 3a~3o (10 mmol)置于反应瓶中, 然后加入无水丙酮(30 mL)和 3~4 粒脱水分子筛, 保持在 0~5 °C, 加氯甲酸苯酯(1.88 mL, 15 mmol), 缓慢滴加完毕后, 再加温至室温反应 5.5 h, 薄层色谱(TLC)监测反应至完全。减压浓缩, 用石油醚洗涤过滤, 干燥得到固体化合物 4a~4o。苯胺基甲酸苯酯(4a): 白色粉末, 产率 85.3%. m.p. 122.0~122.05 °C; HRMS calcd for C₁₃H₁₁NO₂ [M+H]⁺ 214.0790, found 214.0869. 表征数据与文献[45]一致。

3.2.3 *N*-(取代)苯基联氨甲酰胺 5a~5o 的合成

参考文献[44, 45], 将化合物 4a~4o (8 mmol)置于反应瓶中, 向瓶中加入 1,4-二氧六环(20 mL), 再加入 80%水合肼(10 mL)。猛烈搅拌, 102 °C 下回流 6 h, TLC

监测反应至完全, 停止反应, 冷却至室温。在减压下蒸发除去大部分溶剂, 冷却至 0 °C 后出现白色固体。过滤, 沉淀用水洗涤, 干燥得到化合物 5a~5o。*N*-苯基联氨甲酰胺(5a): 白色絮状固体, 产率 78%. m.p. 120.6~121.1 °C; HRMS calcd for C₇H₉N₃O [M+H]⁺ 152.0746, found 152.0821. 表征数据与文献[45]一致。

3.2.4 目标化合物 6a~6o 的合成

取化合物 2 (0.29 g, 1 mmol)置于反应瓶中, 加乙醇 (3 mL)超声溶解, 随后加入化合物 5a~5o (1.5 mmol), 80 °C 回流 12 h, TLC 监测反应至完全。停止反应, 冷却至室温后, 过滤沉淀并干燥, 得到粗产物 6a~6o。粗产物提纯使用微量重结晶的方法, 称取产物 100 mg 逐滴加入二氯甲烷至刚好完全溶解, 再加入等体积的乙醇, 然后静置挥干二氯甲烷, 即有晶体析出(保证浸润在溶剂中), 然后过滤抽干表面溶剂即得到高纯度目标化合物 6a~6o。

14-甲酰基-15-氯-苦参碱缩 *N*-苯基氨基脒(6a): 白色针状晶体, 产率 35.7%. [α]_D²⁰ -84 (c 0.2, DMSO); m.p. 229.5~229.8 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.41 (s, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.47 (d, *J*=7.9 Hz, 2H), 7.25~7.19 (m, 2H), 6.97 (t, *J*=7.4 Hz, 1H), 3.87 (s, 1H), 3.78 (dd, *J*=13.2, 4.1 Hz, 1H), 3.40 (t, *J*=12.8 Hz, 1H), 2.77 (dd, *J*=18.5, 10.3 Hz, 2H), 2.38 (s, 2H), 2.10 (s, 1H), 1.92 (d, *J*=13.9 Hz, 3H), 1.84 (d, *J*=13.8 Hz, 1H), 1.75 (dd, *J*=13.7, 5.7 Hz, 2H), 1.68 (s, 3H), 1.56 (d, *J*=11.3 Hz, 2H), 1.49 (d, *J*=13.5 Hz, 1H), 1.40 (d, *J*=12.6 Hz, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 153.7, 143.7, 140.6, 138.6, 129.0, 123.0, 119.4, 103.0, 64.0, 57.4, 57.3, 55.6, 50.0, 38.1, 36.0, 27.9, 26.4, 23.0, 21.5, 21.0, 20.0; HRMS calcd for C₂₃H₃₀ClN₅O [M+H]⁺ 428.2217, found 428.2218.

14-甲酰基-15-氯-苦参碱缩 *N*-(2-氯苯基)氨基脒(6b): 白色针状晶体, 产率 41%. [α]_D²⁰ -146 (c 0.2, DMSO); m.p. 236.5~236.9 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.87 (s, 1H), 8.41 (dd, *J*=8.3, 1.5 Hz, 1H), 8.23 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.34 (dd, *J*=8.0, 1.5 Hz, 1H), 7.26~7.21 (m, 1H), 6.94 (td, *J*=7.7, 1.6 Hz, 1H), 3.92 (dt, *J*=10.2, 4.9 Hz, 1H), 3.83 (dd, *J*=13.2, 4.1 Hz, 1H), 3.45 (t, *J*=12.8 Hz, 1H), 2.84 (d, *J*=11.3 Hz, 1H), 2.79 (d, *J*=11.5 Hz, 1H), 2.50~2.41 (m, 2H), 2.15 (s, 1H), 2.00 (d, *J*=11.8 Hz, 2H), 1.97~1.88 (m, 2H), 1.87~1.78 (m, 1H), 1.72 (d, *J*=8.1 Hz, 2H), 1.68~1.50 (m, 4H), 1.44 (d, *J*=13.1 Hz, 2H), 1.36 (dd, *J*=14.0, 4.2 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 153.3, 143.7, 140.8, 135.7, 129.0, 127.8, 122.9, 122.2, 120.0, 103.0, 64.0, 57.5, 57.3, 55.7,

49.7, 38.2, 36.1, 27.9, 26.4, 23.0, 21.5, 20.9, 20.0; HRMS calcd for $C_{23}H_{29}Cl_2N_5O$ $[M+H]^+$ 462.1827, found 462.1824.

14-甲酰基-15-氯-苦参碱缩 *N*-(3-氯苯基)氨基脒 (**6c**): 白色针状晶体, 产率 38%. $[\alpha]_D^{20} -147$ (*c* 0.2, DMSO); m.p. 232.5~232.8 °C; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.72 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.66 (t, *J*=2.1 Hz, 1H), 7.36 (dt, *J*=8.2, 1.1 Hz, 1H), 7.20 (t, *J*=8.1 Hz, 1H), 6.99 (ddd, *J*=8.0, 2.1, 1.0 Hz, 1H), 3.93 (dt, *J*=10.3, 4.8 Hz, 1H), 3.84 (dd, *J*=13.2, 4.1 Hz, 1H), 3.46 (t, *J*=12.8 Hz, 1H), 2.85 (d, *J*=11.2 Hz, 1H), 2.79 (d, *J*=11.3 Hz, 1H), 2.42 (q, *J*=4.6 Hz, 2H), 2.15 (s, 1H), 2.02 (s, 1H), 1.99~1.94 (m, 2H), 1.89 (d, *J*=13.6 Hz, 1H), 1.85~1.79 (m, 1H), 1.75~1.67 (m, 3H), 1.65 (s, 1H), 1.60 (s, 1H), 1.54 (dt, *J*=13.4, 4.7 Hz, 1H), 1.45 (d, *J*=13.5 Hz, 2H), 1.41~1.34 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ : 153.5, 144.3, 140.9, 139.9, 134.6, 129.9, 122.9, 119.1, 117.1, 102.8, 64.0, 57.4, 57.3, 55.6, 49.7, 38.2, 36.1, 27.9, 26.4, 22.8, 21.5, 20.9, 20.2; HRMS calcd for $C_{23}H_{29}Cl_2N_5O$ $[M+H]^+$ 462.1827, found 462.1816.

14-甲酰基-15-氯-苦参碱缩 *N*-(4-氯苯基)氨基脒 (**6d**): 白色针状晶体, 产率 41%. $[\alpha]_D^{20} -147$ (*c* 0.2, DMSO); m.p. 224.2~224.5 °C; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.70 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.47 (d, *J*=2.1 Hz, 1H), 7.46 (d, *J*=2.2 Hz, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.22 (d, *J*=2.2 Hz, 1H), 3.93 (s, 1H), 3.84 (d, *J*=12.9 Hz, 1H), 3.46 (s, 1H), 2.82 (s, 2H), 2.49~2.35 (m, 2H), 2.15 (s, 1H), 1.97 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 1.88 (d, *J*=12.0 Hz, 1H), 1.84~1.79 (m, 1H), 1.77 (t, *J*=5.7 Hz, 1H), 1.72 (s, 2H), 1.62 (d, *J*=13.4 Hz, 2H), 1.55 (d, *J*=13.9 Hz, 2H), 1.47 (s, 2H), 1.37 (s, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ : 153.6, 144.2, 140.8, 137.3, 128.9, 127.8, 120.5, 102.8, 64.0, 57.4, 57.3, 55.6, 49.7, 38.2, 36.1, 27.8, 26.4, 22.9, 21.5, 20.9, 20.2; HRMS calcd for $C_{23}H_{29}Cl_2N_5O$ $[M+H]^+$ 462.1827, found 462.1831.

14-甲酰基-15-氯-苦参碱缩 *N*-(2-硝基苯基)氨基脒 (**6e**): 红色针状晶体, 产率 41%. $[\alpha]_D^{20} -217$ (*c* 0.2, DMSO); m.p. 253.7~260 °C; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 11.29 (s, 1H), 8.85 (dd, *J*=8.7, 1.3 Hz, 1H), 8.22 (dd, *J*=8.5, 1.6 Hz, 1H), 8.17 (d, *J*=6.5 Hz, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.60 (ddd, *J*=8.7, 7.1, 1.7 Hz, 1H), 7.07 (ddd, *J*=8.5, 7.1, 1.3 Hz, 1H), 3.96~3.89 (m, 1H), 3.84 (dd, *J*=13.1, 4.1 Hz, 1H), 3.47 (t, *J*=12.8 Hz, 1H), 2.84 (d, *J*=11.4 Hz, 1H), 2.79 (d, *J*=10.9 Hz, 1H), 2.58 (t, *J*=6.5 Hz, 2H), 2.15 (s, 1H), 2.03 (dd, *J*=9.3, 2.8 Hz, 1H),

1.97 (dd, *J*=12.0, 2.8 Hz, 2H), 1.94~1.89 (m, 1H), 1.83 (dd, *J*=13.8, 5.9 Hz, 1H), 1.72 (d, *J*=3.6 Hz, 2H), 1.69 (d, *J*=3.9 Hz, 1H), 1.64 (s, 3H), 1.54 (dt, *J*=13.4, 4.7 Hz, 1H), 1.44 (d, *J*=14.0 Hz, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ : 153.2, 144.5, 141.1, 136.4, 136.0, 135.9, 125.9, 121.6, 121.2, 103.3, 64.0, 57.5, 57.3, 55.9, 49.7, 38.5, 36.2, 27.9, 26.5, 23.2, 21.5, 20.9, 20.1; HRMS calcd for $C_{23}H_{29}ClN_6O_3$ $[M+H]^+$ 473.2068, found 473.2065.

14-甲酰基-15-氯-苦参碱缩 *N*-(3-硝基苯基)氨基脒 (**6f**): 红色针状晶体, 产率 41%. $[\alpha]_D^{20} -225$ (*c* 0.2, DMSO); m.p. 239.1~239.4 °C; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 9.15 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.32 (s, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.93 (dd, *J*=8.2, 2.2 Hz, 1H), 7.87 (dd, *J*=8.2, 2.2 Hz, 1H), 7.44 (t, *J*=8.2 Hz, 1H), 3.98~3.91 (m, 1H), 3.86 (dd, *J*=13.2, 4.1 Hz, 1H), 3.47 (t, *J*=12.7 Hz, 1H), 2.85 (d, *J*=10.3 Hz, 1H), 2.79 (d, *J*=10.9 Hz, 1H), 2.44 (s, 2H), 2.15 (s, 1H), 1.98 (d, *J*=8.6 Hz, 2H), 1.92 (s, 1H), 1.90~1.80 (m, 2H), 1.73 (s, 4H), 1.62 (d, *J*=13.9 Hz, 2H), 1.54 (d, *J*=13.5 Hz, 1H), 1.45 (d, *J*=13.5 Hz, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ : 153.5, 148.6, 144.8, 141.1, 139.9, 129.6, 124.6, 117.3, 113.6, 102.4, 63.8, 57.3, 57.2, 55.5, 49.6, 38.1, 36.0, 27.7, 26.3, 22.7, 21.4, 20.8, 20.1; HRMS calcd for $C_{23}H_{29}ClN_6O_3$ $[M+H]^+$ 473.2068, found 473.2065.

14-甲酰基-15-氯-苦参碱缩 *N*-(4-硝基苯基)氨基脒 (**6g**): 红色针状晶体, 产率 41%. $[\alpha]_D^{20} -224$ (*c* 0.2, DMSO); m.p. 238.1~238.5 °C; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.95 (s, 1H), 8.45 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.69 (d, *J*=9.2 Hz, 2H), 3.96 (dt, *J*=10.4, 4.9 Hz, 1H), 3.86 (dd, *J*=13.2, 4.1 Hz, 1H), 3.48 (t, *J*=12.8 Hz, 1H), 2.85 (d, *J*=11.3 Hz, 1H), 2.79 (d, *J*=11.0 Hz, 1H), 2.42 (q, *J*=4.9 Hz, 2H), 2.16 (s, 1H), 2.02 (s, 1H), 1.98 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 1.88 (d, *J*=13.8 Hz, 1H), 1.82 (dd, *J*=13.7, 5.7 Hz, 1H), 1.71 (d, *J*=9.9 Hz, 3H), 1.63 (d, *J*=13.0 Hz, 2H), 1.58~1.53 (m, 1H), 1.45 (d, *J*=13.8 Hz, 2H), 1.42~1.34 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ : 153.1, 145.1, 144.8, 142.6, 141.4, 125.3, 118.2, 102.3, 63.9, 57.4, 57.3, 55.7, 49.8, 38.3, 36.2, 27.8, 26.4, 22.8, 21.5, 20.9, 20.1; HRMS calcd for $C_{23}H_{29}ClN_6O_3$ $[M+H]^+$ 473.2068, found 473.2066.

14-甲酰基-15-氯-苦参碱缩 *N*-(2-溴苯基)氨基脒 (**6h**): 白色针状晶体, 产率 32%. $[\alpha]_D^{20} -121$ (*c* 0.2, DMSO); m.p. 201.3~201.6 °C; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.88 (s, 1H), 8.40 (dd, *J*=8.3, 1.6 Hz, 1H), 8.36~8.22 (m, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.51 (dd, *J*=8.0, 1.5 Hz,

1H), 7.33~7.26 (m, 1H), 6.88 (td, $J=7.7$, 1.6 Hz, 1H), 3.91 (ddd, $J=10.4$, 6.1, 4.0 Hz, 1H), 3.83 (dd, $J=13.2$, 4.1 Hz, 1H), 3.45 (t, $J=12.8$ Hz, 1H), 2.84 (d, $J=11.3$ Hz, 1H), 2.79 (d, $J=11.3$ Hz, 1H), 2.55~2.36 (m, 2H), 2.14 (t, $J=3.0$ Hz, 1H), 2.04~1.97 (m, 2H), 1.96~1.93 (m, 1H), 1.90 (d, $J=16.6$ Hz, 1H), 1.80 (dd, $J=13.8$, 5.9 Hz, 1H), 1.77~1.68 (m, 4H), 1.68~1.58 (m, 2H), 1.54 (dt, $J=13.5$, 4.7 Hz, 1H), 1.48~1.41 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 153.3, 143.7, 140.7, 136.8, 132.1, 128.3, 123.3, 120.2, 112.7, 103.0, 63.9, 57.3, 57.2, 55.6, 49.5, 38.2, 36.0, 27.8, 26.3, 23.0, 21.4, 20.8, 20.0; HRMS calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{ClBrN}_5\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 506.1322, found 506.1321, 508.1302.

14-甲酰基-15-氯-苦参碱缩 *N*-(4-溴苯基)氨基脒 (**6i**): 白色针状晶体, 产率 35%. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -125 (c 0.2, DMSO); m.p. 236.1~236.4 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.69 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.46~7.41 (m, 2H), 7.41~7.35 (m, 2H), 3.97~3.90 (m, 1H), 3.84 (dd, $J=13.2$, 4.1 Hz, 1H), 3.47 (t, $J=12.7$ Hz, 1H), 2.85 (d, $J=10.7$ Hz, 1H), 2.79 (d, $J=10.7$ Hz, 1H), 2.46~2.38 (m, 2H), 2.15 (s, 1H), 2.04~1.99 (m, 1H), 1.96 (s, 1H), 1.92 (d, $J=14.6$ Hz, 1H), 1.87~1.81 (m, 1H), 1.78 (d, $J=5.8$ Hz, 1H), 1.74 (d, $J=11.5$ Hz, 2H), 1.70~1.66 (m, 1H), 1.65 (s, 1H), 1.61~1.51 (m, 2H), 1.45 (d, $J=13.3$ Hz, 2H), 1.41~1.33 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 153.6, 144.2, 140.8, 137.8, 131.9, 120.8, 115.3, 102.8, 64.0, 57.4, 57.3, 55.6, 49.7, 38.2, 36.1, 27.9, 26.4, 22.9, 21.5, 20.9, 20.2; HRMS calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{ClBrN}_5\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 506.1322, found 506.1325, 508.1302.

14-甲酰基-15-氯-苦参碱缩 *N*-(2-氟苯基)氨基脒 (**6j**): 白色针状晶体, 产率 49.8%. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -156 (c 0.2, DMSO); m.p. 228.9~229.2 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.39 (s, 1H), 8.30 (td, $J=8.2$, 1.7 Hz, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.13~7.04 (m, 2H), 6.99~6.93 (m, 1H), 3.92 (dt, $J=10.3$, 4.9 Hz, 1H), 3.83 (dd, $J=13.2$, 4.1 Hz, 1H), 3.46 (t, $J=12.8$ Hz, 1H), 2.85 (d, $J=10.9$ Hz, 1H), 2.79 (d, $J=11.7$ Hz, 1H), 2.43 (q, $J=4.6$ Hz, 2H), 2.15 (s, 1H), 1.98 (d, $J=11.8$ Hz, 3H), 1.81 (dd, $J=13.6$, 5.9 Hz, 1H), 1.72 (d, $J=8.1$ Hz, 3H), 1.65 (s, 2H), 1.60 (s, 1H), 1.54 (d, $J=13.5$ Hz, 1H), 1.45 (d, $J=12.9$ Hz, 2H), 1.41~1.34 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 153.3, 152.4 (d, $J=242.4$ Hz), 143.8, 140.6, 127.2 (d, $J=10.1$ Hz), 124.5 (d, $J=3.03$ Hz), 122.5 (d, $J=8.08$ Hz), 120.5, 114.6 ($J=19.19$ Hz), 102.9, 63.9,

57.3, 57.2, 55.5, 49.6, 38.1, 36.0, 27.8, 26.3, 22.8, 21.4, 20.8, 19.9; HRMS calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{ClFN}_5\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 446.2123, found 446.2121.

14-甲酰基-15-氯-苦参碱缩 *N*-(3-氟苯基)氨基脒 (**6k**): 白色针状晶体, 产率 46.8%. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -158 (c 0.2, DMSO); m.p. 220.1~220.4 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 9.15 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.32 (s, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.93 (dd, $J=8.2$, 2.2 Hz, 1H), 7.86 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 7.44 (t, $J=8.2$ Hz, 1H), 4.03~3.91 (m, 1H), 3.86 (dd, $J=13.3$, 4.1 Hz, 1H), 3.47 (t, $J=12.7$ Hz, 1H), 2.85 (d, $J=10.8$ Hz, 1H), 2.79 (d, $J=12.4$ Hz, 1H), 2.44 (q, $J=4.6$ Hz, 2H), 2.15 (s, 1H), 2.02 (s, 1H), 1.98 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 1.90 (d, $J=13.9$ Hz, 1H), 1.83 (dd, $J=13.6$, 5.8 Hz, 1H), 1.73 (s, 2H), 1.68 (s, 1H), 1.65 (s, 1H), 1.61 (s, 1H), 1.54 (d, $J=13.5$ Hz, 1H), 1.47 (s, 1H), 1.43 (s, 1H), 1.42~1.32 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 164.5, 162.1, 153.3, 144.0, 140.9, 130.0 (d, $J=9.09$ Hz), 114.5, 109.6 (d, $J=22.22$ Hz), 106.6 (d, $J=26.26$ Hz), 102.7, 64.0, 57.5, 57.3, 55.6, 49.7, 38.2, 36.1, 27.9, 26.4, 22.8, 21.5, 20.9, 20.2; HRMS calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{ClFN}_5\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 446.2123, found 446.2111.

14-甲酰基-15-氯-苦参碱缩 *N*-(4-氟苯基)氨基脒 (**6l**): 白色粉末, 产率 33.4%. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -161 (c 0.2, DMSO); m.p. 220.6~220.9 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 9.15 (s, 1H), 8.42 (t, $J=2.2$ Hz, 1H), 8.32 (s, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.93 (dd, $J=8.2$, 2.2 Hz, 1H), 7.87 (dd, $J=8.2$, 2.2 Hz, 1H), 7.44 (t, $J=8.2$ Hz, 1H), 4.04~3.91 (m, 1H), 3.86 (dd, $J=13.2$, 4.0 Hz, 1H), 3.47 (t, $J=12.7$ Hz, 1H), 2.85 (d, $J=11.1$ Hz, 1H), 2.79 (d, $J=10.3$ Hz, 1H), 2.44 (t, $J=4.4$ Hz, 2H), 2.15 (s, 1H), 1.98 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 1.92~1.86 (m, 1H), 1.83 (dd, $J=13.7$, 5.8 Hz, 1H), 1.73 (s, 3H), 1.62 (d, $J=13.9$ Hz, 2H), 1.57~1.50 (m, 1H), 1.47 (s, 1H), 1.46~1.42 (m, 1H), 1.36 (d, $J=13.9$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 160.0, 157.6, 153.7, 143.8, 140.6, 134.4 (d, $J=2.02$ Hz), 121.0 (d, $J=8.08$ Hz), 115.4 (d, $J=22.22$ Hz), 102.7, 63.9, 57.2 (d, $J=17.17$ Hz), 55.5, 49.6, 38.1, 36.0, 27.7, 26.3, 22.8, 21.4, 20.8, 20.1; HRMS calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{ClFN}_5\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 446.2123, found 446.2119.

14-甲酰基-15-氯-苦参碱缩 *N*-(2-甲基苯基)氨基脒 (**6m**): 白色针状晶体, 产率 39.1%. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -142 (c 0.2, DMSO); m.p. 238.1~238.4 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.37 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 8.07 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.20 (t, $J=7.7$ Hz, 1H), 7.15 (d, $J=6.1$ Hz, 1H), 6.97 (t, $J=6.8$ Hz, 1H), 3.92 (s, 1H), 3.83 (dd,

$J=13.2, 4.1$ Hz, 1H), 3.45 (t, $J=12.2$ Hz, 1H), 2.90~2.73 (m, 2H), 2.45~2.38 (m, 2H), 2.29 (s, 3H), 2.15 (s, 1H), 2.04~1.94 (m, 3H), 1.89 (d, $J=13.9$ Hz, 1H), 1.81 (t, $J=5.7$ Hz, 2H), 1.75 (d, $J=12.3$ Hz, 2H), 1.61 (d, $J=11.5$ Hz, 2H), 1.54 (dd, $J=13.5, 4.7$ Hz, 1H), 1.45 (d, $J=11.8$ Hz, 2H), 1.41~1.34 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 153.7, 143.4, 140.6, 136.8, 130.3, 127.0, 126.8, 123.1, 120.5, 103.0, 64.0, 57.4, 57.3, 55.6, 49.6, 38.2, 36.0, 27.8, 26.4, 23.0, 21.5, 20.9, 20.1, 17.8; HRMS calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{ClN}_5\text{O} [\text{M}+\text{H}]^+$ 442.2374, found 442.2367.

14-甲酰基-15-氯-苦参碱缩 *N*-(3-甲基苯基)氨基脒 (**6n**): 白色针状晶体, 产率 28.5%. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -142$ (c 0.2, DMSO); m.p. 223.8~224.2 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.75 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.23 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.13 (t, $J=7.8$ Hz, 1H), 6.80 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 3.93~3.83 (m, 1H), 3.78 (dd, $J=13.2, 4.1$ Hz, 1H), 3.40 (t, $J=12.7$ Hz, 1H), 2.80 (d, $J=11.7$ Hz, 1H), 2.74 (d, $J=11.4$ Hz, 1H), 2.40 (d, $J=5.7$ Hz, 2H), 2.29 (s, 3H), 2.10 (s, 1H), 1.97 (s, 1H), 1.93 (d, $J=10.6$ Hz, 2H), 1.84 (d, $J=13.9$ Hz, 1H), 1.77 (q, $J=7.9, 6.8$ Hz, 1H), 1.73 (s, 1H), 1.68 (s, 2H), 1.62 (d, $J=14.1$ Hz, 1H), 1.53 (d, $J=15.0$ Hz, 2H), 1.40 (d, $J=13.8$ Hz, 2H), 1.36~1.27 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 153.8, 143.6, 140.5, 138.8, 138.5, 128.8, 123.8, 119.9, 116.4, 103.1, 64.0, 57.4, 57.2, 55.6, 49.6, 38.1, 36.0, 29.8, 27.8, 26.4, 22.9, 21.7, 21.5, 20.9, 20.2; HRMS calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{ClN}_5\text{O} [\text{M}+\text{H}]^+$ 442.2374, found 442.2378.

14-甲酰基-15-氯-苦参碱缩 *N*-(4-甲基苯基)氨基脒 (**6o**): 透明无色针状晶体, 产率 34.2%. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -140$ (c 0.2, DMSO); m.p. 216.1~216.4 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 9.03 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.41 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 7.09 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 3.98~3.86 (m, 1H), 3.82 (dd, $J=13.2, 4.1$ Hz, 1H), 3.44 (t, $J=12.7$ Hz, 1H), 2.84 (d, $J=11.1$ Hz, 1H), 2.78 (d, $J=11.2$ Hz, 1H), 2.42 (q, $J=5.5$ Hz, 2H), 2.29 (s, 3H), 2.14 (s, 1H), 2.01 (s, 1H), 1.94 (d, $J=11.2$ Hz, 2H), 1.88 (d, $J=13.8$ Hz, 1H), 1.81 (q, $J=7.8, 6.7$ Hz, 1H), 1.76 (d, $J=5.6$ Hz, 1H), 1.70 (d, $J=9.4$ Hz, 2H), 1.63 (d, $J=9.3$ Hz, 1H), 1.59 (s, 1H), 1.53 (dd, $J=13.5, 4.7$ Hz, 1H), 1.45 (s, 1H), 1.41 (d, $J=12.8$ Hz, 1H), 1.38~1.19 (m, 1H); ^{13}C NMR (101MHz, CDCl_3) δ : 154.1, 143.7, 140.4, 136.0, 132.3, 129.4, 119.4, 103.2, 63.9, 57.4, 57.2, 55.5, 49.6, 38.1, 36.0, 27.8, 26.3, 22.9, 21.5, 20.9, 20.9, 20.2; HRMS calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{ClN}_5\text{O} [\text{M}+\text{H}]^+$ 442.2374, found 442.2372.

3.2.5 目标化合物的抑肿瘤活性测试

采用 MTT 法测试目标产物对 A549、HepG2、Hela、MGC803 及 L-O2 细胞的体外抗增殖活性. 取对数生长期细胞消化、计数, 接种到 96 孔板中, 37 °C, CO_2 ($\phi=5\%$) 培养箱中孵化, 待细胞贴壁后孵化 12 h. 加入用培养基稀释好的药物, 即将待测样品以 100、50、25、12.5、6.25、3.125 $\mu\text{mol/L}$ 浓度加入 96 孔板中, 每个浓度设 3 个复孔, 另设空白对照组和阳性药对照组. 药物作用 48 h, 每孔入 20 μL MTT (5 mg/mL), 继续孵育 4 h, 吸去液体, 每孔加 150 μL 二甲基亚砜(DMSO), 摇匀, 酶标仪 490 nm 处检测吸光度值, 试验结果采用 SPSS18.0 软件计算 IC_{50} 值.

3.2.6 细胞凋亡实验

采用 AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒进行检测. 取对数生长期的胃癌 MGC-803 细胞消化接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁后孵化 12 h, 根据组别设置加入 **6f** (10、15 和 20 $\mu\text{mol/L}$) 培养基, 同时设立阴性对照组. 药物作用 48 h 后取出 6 孔板, 收集细胞, 加入 100 μL $1\times$ 结合缓冲液重悬细胞后加入 AnnexinV-FITC(带有荧光探针 FITC 标记的膜联蛋白)和碘化丙啶(PI)染色孵育, 用流式细胞仪分析样本.

3.2.7 瘤细胞凋亡形态学检测

取对数生长期且状态良好的 MGC-803 胃癌细胞接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁后孵化 12 h, 根据组别设置加入 **6f** (10、15 和 20 $\mu\text{mol/L}$) 培养基, 同时设立阴性对照组. 药物作用 48 h 后取出 6 孔板, 收集细胞, 荧光倒置显微镜下观察拍照并记录.

3.2.8 JC-1 染色法检测线粒体膜电位

取对数生长期的胃癌 MGC-803 细胞消化接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁后孵化 12 h, 根据组别设置加入 **6f** (10、15 和 20 $\mu\text{mol/L}$) 培养基, 同时设立阴性对照组. 药物作用 48 h 后取出 6 孔板, 收集细胞, 加入 500 μL JC-1 工作液, 在 37 °C、 CO_2 ($\phi=5\%$) 的培养箱中孵化 15 min, 清洗后于荧光倒置显微镜下观察拍照.

辅助材料(Supporting Information) 化合物 **2**、**4a**、**5a** 的 HRMS 的谱图及 **6a**~**6o** 的 ^1H NMR, ^{13}C NMR 和 HRMS 的谱图. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Bray, F.; Laversanne, M.; Weiderpass, E.; Soerjomataram, I. *Cancer* **2021**, 127, 3029.
- [2] Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. *Ca-Cancer J. Clin.* **2021**, 71, 209.
- [3] Alam, O.; Mullick, P.; Verma, S. P.; Gilani, S. J.; Khan, S. A.; Siddiqui, N.; Ahsan, W. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 2467.

- [4] Sriram, D.; Stables, P. J.; Thirumurugan, R.; Induja, S.; Ragavendran, V. J.; Yogeeswari, P. *Med. Chem.* **2006**, *2*, 55.
- [5] Yogeeswari, P.; Sriram, D.; Veena, V.; Kavaya, R.; Rakhra, K.; Ragavendran, J. V.; Mehta, S.; Thirumurugan, R.; Stables, J. P. *Biomed. Pharmacother.* **2005**, *59*, 51.
- [6] Xu, H.; Su, X.; Liu, X.Q.; Zhang, K. P.; Hou, Z.; Guo, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019**, *29*, 23.
- [7] Hania, M. M. *E-J. Chem.* **2009**, *6*, 508.
- [8] Gopi, C.; Dhanaraju, D. M. *Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.* **2018**, *7*, 291.
- [9] Chipeleme, A.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; Chibale, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 273.
- [10] Queiroz, A. C.; Alves, M. A.; Barreiro, E. J.; Lima, L. M.; Alexandre-Moreira, M. S. *Exp. Parasitol.* **2019**, *201*, 57.
- [11] Qazi, S. U.; Naz, A.; Hameed, A.; Osra, F. A.; Jalil, S.; Iqbal, J.; Ali Shah, S. A.; Mirza, A. Z. *Bioorg. Chem.* **2021**, *115*, 105209.
- [12] Liu, Y.-B.; Peng, W.-L.; Yu, L.-J.; Xing, J.-H.; Chen, J.; Xia, X.-J.; Shen, D.-L. *Agrochemicals* **2010**, *49*, 407 (in Chinese). (刘永榜, 彭伟立, 郁林军, 邢家华, 陈杰, 夏旭建, 沈德隆, 农药, **2010**, *49*, 407.)
- [13] Ma, J. J.; Hu, G.; Xie, L. J.; Chen, L.; Xu, B. X.; Gong, P. *Chem. Res. Chin. Univ.* **2015**, *31*, 958.
- [14] Jia, X. X.; Liu, Q.; Wang, S. Y.; Zeng, B. L.; Du, G. H.; Zhang, C.; Li, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2020**, *28*, 115557.
- [15] Afrasiabi, Z.; Sinn, E.; Lin, W. S.; Ma, Y. F.; Campana, C.; Padhye, S. J. *Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 1526.
- [16] Mishra, B. B.; Tiwari, V. K. *Eur. J. Med. Chem.*, **2011**, *46*, 4769.
- [17] Mondal, S.; Bandyopadhyay, S.; Ghosh, M. K.; Mukhopadhyay, S.; Roy, S.; Mandal, C. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2012**, *12*, 49.
- [18] Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1022.
- [19] Huang, J. L.; Xu, H. *Curr. Top. Med. Chem.* **2016**, *16*, 3365.
- [20] Pan, J. L.; Hao, X.; Yao, H. W.; Ge, K. K.; Ma, L.; Ma, W. J. *For. Res.* **2019**, *30*, 1105.
- [21] Sun, N.; Zhang, H.; Sun, P. P.; Khan, A.; Guo, J. H.; Zheng, X. Z.; Sun, Y. G.; Fan, K. H.; Yin, W.; Li, H. Q. *Phytomedicine* **2020**, *77*, 153289.
- [22] Zhang, B.; Liu, Z. Y.; Li, Y. Y.; Luo, Y.; Liu, M. L.; Dong, H. Y.; Wang, Y. X.; Liu, Y.; Zhao, P. T.; Jin, F. G.; Li, Z. C. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2011**, *44*, 573.
- [23] Cheng, X. G.; He, H. Q.; Wang, W. X.; Dong, F. Y.; Zhang, H. H.; Ye, J. M.; Tan, C. C.; Wu, Y. H.; Lv, X. J.; Jiang, X. H.; Qin, X. J. *Pest Manage. Sci.* **2020**, *76*, 2711.
- [24] Zhou, S. K.; Zhang, R. L.; Xu, Y. F.; Bi, T. N. *Molecules* **2012**, *17*, 6481.
- [25] Chen, M. H.; Gu, Y. Y.; Zhang, A. L.; Sze Daniel, M. Y.; Mo, S. L.; May Brian, H. *Pharmacol. Res.* **2021**, *171*.
- [26] Zhang, X.; Hou, G. Q.; Liu, A. D.; Xu, H.; Guan, Y.; Wu, Y. S.; Deng, J.; Cao, X. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 10.
- [27] Liu, Z.-M.; Yang, X.-L.; Jiang, F.; Pan, Y.-C.; Zhang, L. *J. Cell. Biochem.* **2019**, *121*, 3.
- [28] Hu, J.; Wang, Y. *Chin. Arch. Tradit. Chin. Med.* **2021**, 171 (in Chinese). (胡锦涛, 王宇, 中华中医药学刊, **2021**, 171.)
- [29] Dai, M.; Cai, Z.; Chen, N.; Li, J.; Wen, J.; Tan, L.; Guo, D. *J. South. Med. Univ.* **2019**, *39*, 1239 (in Chinese). (戴美琴, 蔡茁, 陈娜娜, 李金州, 温嘉泳, 谭丽转, 郭丹, 南方医科大学学报, **2019**, *39*, 1239.)
- [30] Yang, J.; He, D.; Peng, Y.; Zhong, H.; Deng, Y.; Yu, Z.; Guan, C.; Zuo, Y.; Xu, Z. *OncoTargets Ther.* **2017**, *10*, 5209.
- [31] Fu, S.; Zhao, N.; Jing, G.; Yang, X.; Liu, J.; Zhen, D.; Tang, X. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *128*, 110327.
- [32] Li, Z.; Luo, M. Y.; Cai, B.; Wu, L. C.; Huang, M. T.; Rashid, H.; Jiang, J.; Wang, L. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*, 677.
- [33] Wei, J.; Liang, Y.; Wu, L. *Molecules* **2021**, *26*, 417.
- [34] Sun, X.; Zhuo, X.-B.; Hu, Y.-P.; Zheng, X.; Zhao, Q.-J. *Mol. Cell. Biochem.* **2018**, *449*, 47.
- [35] Rashid, H.; Xu, Y.; Muhammad, Y.; Wang, L.; Jiang, J. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *161*, 205.
- [36] Wang, M.; Huang, L.; Su, Y.; Xu, Y.-H.; Huang, L.-Y.; Zhou, X.-Q.; Li, F.-Y. *Chemistry* **2019**, *82*, 57 (in Chinese). (王妙, 黄琳, 苏燕, 许英红, 黄铃月, 周小群, 李芳耀, 化学通报, **2019**, *82*, 57.)
- [37] Xin, M.; Pang, F.-H.; Huang, L.; Zhou, X.-Q.; Wang, M.-D.; Li, J.-L.; Li, F.-Y. *Chin. J. Synth. Chem.* **2020**, *28*, 483 (in Chinese). (辛懋, 庞富华, 黄琳, 周小群, 王萌迪, 李金林, 李芳耀, 合成化学, **2020**, *28*, 483.)
- [38] Li, F.-Y.; Huang, L.; Li, Q.; Wang, X.; Ma, X. L.; Jiang, C. N.; Zhou, X. Q.; Duan, W. G.; Lei, F. H. *Molecules* **2019**, *24*, 4191.
- [39] Huang, L.; Huang, R.; Pang, F. H.; Li, A. K.; Huang, G. B.; Zhou, X. Q.; Li, Q.; Li, F. Y.; Ma, X. L. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 18008.
- [40] Li, F. Y.; Huang, L.; Zhou, X. Q.; Li, Q.; Ma, X. L.; Duan, W. G.; Wang, X. *Chin. J. Org. Chem.* **2020**, *40*, 2845 (in Chinese). (李芳耀, 黄琳, 周小群, 李倩, 马献力, 段文贵, 王秀, 有机化学, **2020**, *40*, 2845.)
- [41] Zheng, W. L.; Ma, X. L.; Zhou, X. Q.; Li, F. Y.; Xin, M.; Jiang, C. N. *Chem. Ind. For. Prod.* **2019**, *39*, 41 (in Chinese). (郑万里, 马献力, 周小群, 李芳耀, 辛懋, 蒋彩娜, 林产化学与工业, **2019**, *39*, 41.)
- [42] Wang, K.; Zheng, W. L.; Jiang, C. N.; Zhou, X. Q.; Li, F. Y.; Xin, M.; Ma, X. L. *Chem. Res. Appl.* **2020**, *32*, 1377 (in Chinese). (王珂, 郑万里, 蒋彩娜, 周小群, 李芳耀, 辛懋, 马献力, 化学研究与应用, **2020**, *32*, 1377.)
- [43] Huang, J. L.; Lv, M.; Xu, H. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 15997.
- [44] Xu, H.; Su, X.; Liu, X. Q.; Zhang, K. P.; Hou, Z.; Guo, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019**, *29*, 126726.
- [45] Dai, B.; Ma, X.; Tang, Y.; Xu, L.; Guo, S.; Chen, X.; Lu, S.; Wang, G.; Liu, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2021**, *29*, 115891.
- [46] Ly, J. D.; Grubb, D. R.; Lawen, A. *Apoptosis* **2003**, *8*, 115.

(Zhao, C.)