

# 新的药根碱三唑的合成与抗菌以及乙酰胆碱酯酶抑制活性评价

蒋小飞<sup>1,2\*</sup>, 张伟<sup>3</sup>, 熊南茜<sup>1</sup>

<sup>1</sup>贵州师范学院化学与生命科学学院, 贵阳 550018; <sup>2</sup>重庆三峡学院化学与环境工程学院, 重庆 404000;

<sup>3</sup>贵州师范学院地理与旅游学院, 贵阳 550018

**摘要:** 通过有机合成手段合成了四个新的含三唑的药根碱衍生物, 利用<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR 和 MS 确认了目标化合物的结构, 对合成的化合物进行了抗菌和抑制乙酰胆碱酯酶 (AChE) 和丁酰胆碱酯酶 (BuChE) 的活性测试。目标化合物显示具有较好的抗菌活性, 抗菌结果显示所制备的化合物抗菌 MIC 范围从 1 到 64 μg/mL, 对一些敏感菌的活性和阳性药物罗红霉素相当。对乙酰胆碱酯酶 (AChE) 的抑制也表现出较好的活性, IC<sub>50</sub> 值从 0.46 μM 到 0.86 μM, 但这些化合物对丁酰胆碱酯酶 (BuChE) 表现出较弱的活性 IC<sub>50</sub> > 100 μM。药根碱三唑具有较好的抑制乙酰胆碱酯酶的活性, 且具有较好的选择性, 同时具有较好的抗菌活性而且拓展了抗菌谱, 可能成为一种新型的抗菌和治疗老年痴呆的先导化合物。

**关键词:** 合成; 药根碱; 药根碱三唑; 抗菌活性; 乙酰胆碱酯酶抑制剂

中图分类号: R914.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.4.001

## Synthesis and Biological Evaluation of Novel Jatrorrhizine Triazoles as Potential Antimicrobial Reagents and Acetylcholinesterase Inhibitor

JIANG Xiao-fei<sup>1,2\*</sup>, ZHANG Wei<sup>3</sup>, XIONG Nan-qian<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School of Chemistry and life sciences, Guizhou University of Education 550018, P. R. China;

<sup>2</sup>College of Chemical and Environmental Engineering, Chongqing Three Gorges University 404000, P. R. China;

<sup>3</sup>School of Geography and Tourism, Guizhou Education University 550018, P. R. China

**Abstract:** Four new jatrorrhizine triazoles were designed and synthesized by means of organic synthesis with expectation of increasing the antimicrobial activity and inhibitory activity on acetylcholinesterase, their structures were characterized by <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, and MS spectra data. All target compounds were evaluated for antimicrobial activities *in vitro* and their biological activities as inhibitors of both acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) were evaluated. The results of antimicrobial activities indicated that the prepared compounds exhibited potent antibacterial with low MIC values ranging from 1 to 64 μg/mL, which were comparable to or even better than those of the reference drug Roxithromycin. Additionally, All target compounds were found to be potent inhibitor of AChE, with low IC<sub>50</sub> values ranging from 0.46 μM to 0.86 μM. These compounds demonstrated poor (BuChE) inhibitory activity with IC<sub>50</sub> > 100 μM for butyrylcholinesterase (BuChE), Jatrorrhizine triazoles exhibited the good activity of inhibiting acetylcholinesterase, in the meantime exhibited higher selectivity for AChE over BuChE, it is suggested that Jatrorrhizine triazoles might become agents for Alzheimer's disease (AD). at the same time Jatrorrhizine triazoles show good antibacterial activity and expand the antibacterial spectrum, Jatrorrhizine triazoles maybe apotential antibacterial agents.

**Key words:** synthesis; jatrorrhizine; jatrorrhizine triazoles; antimicrobial activity; acetylcholinesterase (AChE) inhibitor

黄连是中国的传统中药, 广泛分布在中国南方。药根碱 (Fig. 1) 是黄连一种重要的异喹啉类原小檗

碱型生物碱, 是黄连的重要化学成分之一<sup>[1]</sup>。药根碱具有广泛的生理活性如降糖<sup>[2]</sup>、抗菌<sup>[3]</sup>、抗氧化<sup>[4]</sup>等生理活性。对小檗碱 (Fig. 2) 药理活性及其衍生物构效关系的研究很多, Iwasa 等<sup>[5]</sup>合成了一系列小檗碱衍生物, 研究其结构与抗菌活性的关系, 杨勇<sup>[6]</sup>对 C-8 烷基小檗碱同系物进行了抗菌、调脂

收稿日期: 2017-11-07

接受日期: 2018-01-16

基金项目: 国家自然科学基金 (41573081); 重庆市教委基金资助项目 (KJ131120); 贵州省自然科学基金 (3001433)

\* 通信作者 Tel: 86-851-5816647 E-mail: jxf1104@163.com

的构效关系研究,丁阳平在 C-8 烷基小檗碱基础上在 3 位引入卤素表现出较好的抗肿瘤活性<sup>[7]</sup>,药根碱与小檗碱同属于原小檗碱型生物碱,而文献有关的药根碱的结构修饰和生理活性研究很少报道,根据小檗碱和药根碱已经报道的生理活性和以及小檗碱先前的结构修饰和构效关系研究,设计合成一类含三唑环的药根碱衍生物,分别进行了抗菌和对乙酰胆碱酯酶和丁酰胆碱酯酶的抑制活性研究。

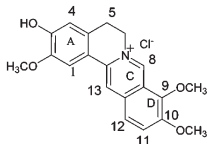


图1 药根碱化学结构

Fig. 1 The chemical structures of jatrorrhizine

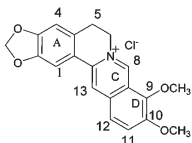


图2 小檗碱化学结构

Fig. 2 The chemical structures of berberine

## 1 仪器和试剂

主要实验仪器:旋转蒸发仪型号为 EyelaN-1001, Eyela Aspirator A-35 型循环水真空泵, Tokyo rikakai Co. Ltd 生产。质谱用 VG Autospec-300 型质谱仪测定;核磁共振谱用 Bruker AM-400 核磁共振光谱仪测定, TMS 为内标。SHZ-D (III) 循环水式真空泵, YP6000N 电子天平, R2002 旋转蒸发仪, Bio-Rad 酶标仪, TOMY SS325 高压灭菌锅

供试菌株:大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、痢疾杆菌 (*Shigella dysenteriae*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* Rosenbach); 白色念珠菌, (*Candida albicans*): 培养基:牛肉浸膏蛋白胨培养基, 阳性对照:红霉素 (Erythromycin); 氟康唑 (Fluconazole)。

Tris-HCl 缓冲液: pH 8.0, 0.05 mol/L; 底物对-碘代硫代乙酰胆碱 (1.0 mg/mL 用缓冲液配置); 显色剂: 5,5-二硫代双 2-硝基苯甲酸 (1.5 mg/mL, 用缓冲液配置); 对-碘代硫代丁酰胆碱 (1.0 mg/mL, 用缓冲液配置), 乙酰胆碱酯酶, 丁酰胆碱酯酶: Sigma 公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 药根碱三唑的设计

2.1.1 前期的文献报道药根碱具有抗菌作用和小檗碱具有抑制乙酰胆碱酯酶 (AChE) 的活性, 黎兴术<sup>[8]</sup>等报道了一类含三唑的小檗碱衍生物并研究了对乙酰胆碱和丁酰胆碱酯酶的抑制活性。三唑类化合物具有广泛的抗菌作用, 因此在药根碱上引入三唑类药效团, 可能会使合成的药根碱三唑提高药根碱抗菌和抑制乙酰胆碱的酯酶活性的双重功能。

2.1.2 氟康唑是一类临床广泛使用的抗真菌药物, 而对细菌的抗菌作用表现不明显, 而药根碱对阴性和阳性菌都有一定的抑制作用, 保持现有的氟康唑现有的结构, 使其中的一个 1,2,4 三唑用药根碱取代, 旨在扩目标化合物的抗菌谱, 文献报道了一类小檗碱三唑的对乙酰胆碱酯酶的抑制活性, 对乙酰胆碱酯酶的抑制活性其  $IC_{50}$  值为 0.44  $\mu\text{M}$ 。在药根碱 3 位引入三唑, 希望能筛选出较好的对乙酰胆碱酯酶抑制活性较好的化合物。

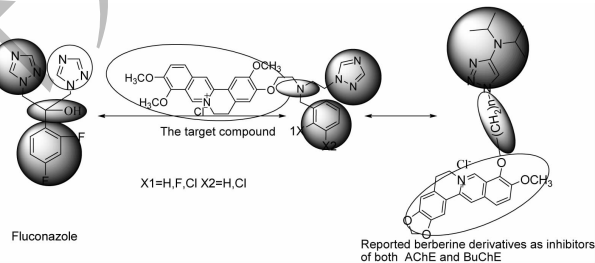


图3 药根碱三唑的设计策略示意图

Fig. 3 Design strategy for target compounds

### 2.2 药根碱三唑的合成

试剂和反应条件: (a)  $\text{CH}_3\text{CN}$ , diethanolamine,  $50\text{ }^\circ\text{C}$ , 10 ~ 12 h; (b)  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{PBr}_3$ , refluxed, 2 h; (c) 1,2,4-triazole,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , rt to  $50\text{ }^\circ\text{C}$ , 12 h; (d) DMF,  $110\text{ }^\circ\text{C}$ , 20 h; (e)  $\text{AgCl}$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ,  $40\text{ }^\circ\text{C}$ , 0.5 h。

目标产物的获得通过以各种苄氯、二乙醇胺、三溴化磷、三唑为原料通过四步反应得到关键中间体 4, 再和药根碱反应得到 5, 最后进行阴离子交换得到目标化合物 6。

### 2.3 目标化合物 6a 制备的一般流程

#### 2.3.1 中间体 3a 的制备

中间体 3a 的制备参考文献<sup>[9]</sup>介绍的方法制备, 在 100 mL 烧瓶中加入二乙醇胺 (6.31 g, 0.06 mol) 和化合物 2-氯苄氯 (0.05 mol) 在 50 mL 乙腈中在

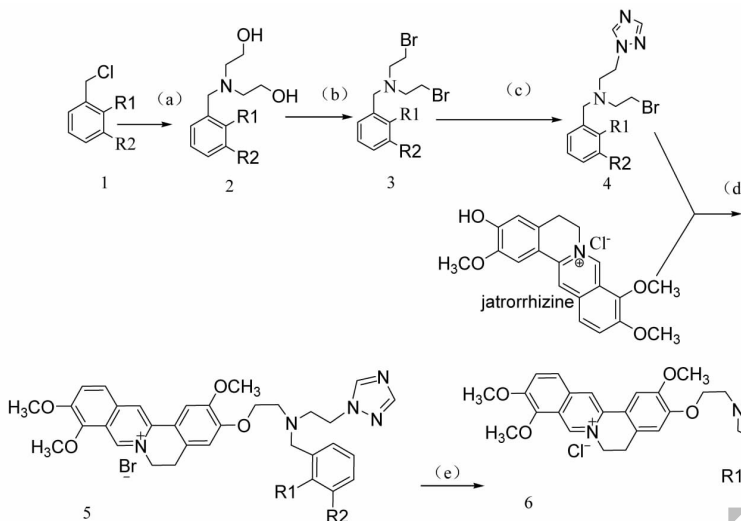


图4 新的药根碱三唑盐酸盐的合成路线

Fig. 4 The synthetic routes of novel jatrorrhizine triazoles hydrochloride

注: 1-6 a; R1 = Cl, R2 = H; b; R1 = Cl R2 = Cl; c; R1 = H R2 = H; d; R1 = F R2 = H

Note: 1-6 a; R1 = Cl, R2 = H; b; R1 = Cl R2 = Cl; c; R1 = H R2 = H; d; R1 = F R2 = H

50 °C 下加热反应 6 h, 薄层检测 (石油醚: 二氯乙烷 (20:1)) 待反应物反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 残留物用氯仿溶解, 用饱和碳酸氢钠洗, 随后用饱和食盐水洗, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液浓缩得到粗产品, 石油醚: 二氯乙烷 20:1, 硅胶柱层析得到 **2a**。将化合物 **2a** 溶于干燥的氯仿中, 在恒压滴液漏斗中缓慢滴加 PBr<sub>3</sub>。室温下反应两个小时, 随后加热到 60 °C 回流 1 h 直到反应完全, 薄层检测条件, 石油醚: 二氯甲烷 (10:1)。反应混合物投入到冰浴中, 随后饱和碳酸氢钠溶液洗涤, 氯仿萃取, 合并有机相用饱和氯化钠洗涤, 加入无水硫酸钠干燥, 石油醚: 二氯甲烷 (10:1) 硅胶柱层析得到化合物 **3a**。

**3a**: 黄色油状, ESI-MS  $m/z$ : 356.1 [M + 1]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ: 87.49 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 1H, Ph 3-H), 7.42-7.34 (m, 1H, Ph 5-H), 7.22-7.17 (m, 2H, Ph 4, 6-H), 3.79 (s, 2H, PhCH<sub>2</sub>), 3.30 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.95 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)。

### 2.3.2 中间体 **4a** 的制备

中间体 **4a** 的制备: 在 100 mL 圆底烧瓶中, 加入 1,2,4 三唑 (700 mg, 10 mmol), 无水碳酸钾 (2.76 g, 20 mmol) 和乙腈 (20 mL), 搅拌升温至 60 °C 反应 1 h, 再在冰水浴冷却条件下加入原料 **3a** (3.55 g, 10 mmol), 室温反应, 用薄层色谱 (TLC) 监测反应进度, 反应完成后, 溶剂减压浓缩除去, 用乙酸乙酯萃

取, 饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 以体积比石油醚: 乙酸乙酯 (3:1) 混合液为洗脱剂, 硅胶柱层析即得中间体 **4a**。

**4a**: 油状液体; 产率: 38.2%。ESI-MS  $m/z$ : 343.3 [M + 1]<sup>+</sup>, 345.3 [M + 3]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ: 8.47 (s, 1H, Tri 3-H), 7.69 (s, 1H, Tri 5-H), 7.18-7.30 (m, 4H, Ph-H), 4.29 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 2H, Tri-CH<sub>2</sub>), 3.82 (s, 2H, PhCH<sub>2</sub>), 3.39 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 2H, Br-CH<sub>2</sub>), 2.96 ~ 3.04 (m, 4H, Tri-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, Br-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)。

### 2.3.3 终产物 **6a** 的制备

在 50 mL 圆底烧瓶中, 加入药根碱 (338 mg, 1 mmol) 和 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) (5 mL), 搅拌升温至 110 °C, 缓慢滴加中间体 **4a** 的 DMF 溶液, 加毕保温 110 °C 反应, 用 TLC 监测反应进度; 反应完成后, 过滤, 浓缩, 固体用氯仿萃取, 饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 柱层析纯化氯仿: 甲醇 8:1 混合液为洗脱剂, 得到中间体 **5a**, **5a** 用甲醇溶解, 加入 AgCl, 60 °C 搅拌 0.5 h 进行氯离子交换, 过滤, 收集滤液, 再减压蒸馏除去溶剂, 即得化合物 **6a**。

**6a**: 黄色固体, 产率: 38%, 熔点: 205 ~ 206 °C。ESI-MS  $m/z$ : 599.7 [M]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ: 9.73 (s, 1H, 8-H), 8.78 (s, 1H, 13-H), 8.61 (s, 1H, Tri 3-H), 8.04 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H, 11-

H), 8.01 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, 12-H), 7.72 (s, 1H, Tri 5-H), 7.61 (s, 1H, 1-H), 7.21-7.23 (m, 1H, Ph-H), 7.13-7.16 (m, 3H, Ph-H), 6.95 (s, 1H, 4-H), 4.92 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H, 6-H), 4.30 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, Tri-CH<sub>2</sub>), 4.18 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.13 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H, -OCH<sub>2</sub>-), 4.04 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.98 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.77 (s, 2H Ph-CH<sub>2</sub>), 3.23 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H, 5-H), 3.03 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H, Tri-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.94 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 152.89 (Tri-C-3), 151.91 (C-10), 151.59 (C-3), 150.92 (C-2), 146.37 (C-9), 146.10 (C-8), 139.84 (Tri-C-5), 137.63 (C-12a), 135.21 (Ph-C), 135.12 (Ph-C), 133.13 (C-13a), 132.11 (Ph-C), 130.4 (Ph-C), 129.89 (C-4a), 129.52 (8a), 127.91 (Ph-2C, overlapped), 124.45 (C-13b), 123.20 (C-13), 121.32 (C-11), 120.40 (C-12), 112.80 (C-4), 109.71 (C-1), 68.31 (C-OCH<sub>3</sub>), 62.56 (C-OCH<sub>3</sub>), 57.63 (C-OCH<sub>3</sub>), 7.40 (C-CH<sub>2</sub>-), 57.30 (C-6), 56.93 (C-CH<sub>2</sub>-), 54.61 (C-CH<sub>2</sub>-), 54.46 (2C-CH<sub>2</sub>-, overlapped), 27.80 (C-5)。

### 2.3.4 终产物 **6b**、**6c**、**6d** 的制备

按照上述合成 **6a** 的通用方法, 合成目标化合物 **6b**、**6c**、**6d** 并进行结构确认。

**6b**: 黄色固体; 产率 44.82%。熔点: 184 ~ 185 °C。ESI-MS  $m/z$ : 634.1 [M]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 9.77 (s, 1H, 8-H), 8.84 (s, 1H, 13-H), 8.84 (s, 1H, Tri 3-H), 8.14 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, 11-H), 8.04 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, 12-H), 7.74 (s, 1H, Tri 5-H), 7.69 (s, 1H, 1-H), 7.29 (s, 1H, Ph-H), 7.08-7.14 (m, 2H, Ph-H), 6.99 (s, 1H, 4-H), 4.93 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H, 6-H), 4.33 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, Tri-CH<sub>2</sub>), 4.21 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.18 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H, -OCH<sub>2</sub>-), 4.11 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 4.01 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.77 (s, 2H Ph-CH<sub>2</sub>), 3.26 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H, 5-H), 3.07 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H, Tri-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.95 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 152.89 (Tri-C-3), 151.91 (C-10), 151.59 (C-3), 150.92 (C-2), 146.37 (C-9), 146.10 (C-8), 139.84 (Tri-C-5), 136.74 (C-12a), 135.74 (Ph-C), 135.31 (Ph-C), 134.21 (Ph-C), 133.10 (13a), 129.99 (C-4a), 129.89 (C-8a), 28.12 (Ph-C), 127.97 (Ph-C), 124.45 (C-13b), 123.30 (C-13), 121.32 (C-11), 120.98 (C-12),

120.50 (C-12), 112.80 (C-4), 109.76 (C-1), 68.21 (C-OCH<sub>3</sub>), 62.53 (C-OCH<sub>3</sub>), 57.66 (C-OCH<sub>3</sub>), 57.36 (C-6), 56.81 (2C-CH<sub>2</sub>-, overlapped), 54.61 (C-CH<sub>2</sub>-), 54.47 (2C-CH<sub>2</sub>-, overlapped), 27.80 (C-5)。

**6c**: 黄色固体; 产率: 36.82% 熔点: 205 ~ 206 °C ESI-MS  $m/z$ : 566.2 [M]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 9.74 (s, 1H, 8-H), 8.81 (s, 1H, 13-H), 8.66 (s, 1H, Tri 3-H), 8.07 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, 11-H), 8.03 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, 12-H), 7.81 (s, 1H, Tri 5-H), 7.65 (s, 1H, 1-H), 7.15-7.17 (m, 3H, Ph-H), 7.06-7.08 (m, 2H, Ph-H), 6.95 (s, 1H, 4-H), 4.92 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H, 6-H), 4.32 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, Tri-CH<sub>2</sub>), 4.19 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.09 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H, -OCH<sub>2</sub>-), 4.07 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 4.00 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.68 (s, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>), 3.25 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H, 5-H), 3.02 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H, Tri-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.93 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 152.86 (Tri-C-3), 151.85 (C-10), 151.61 (C-3), 150.85 (C-2), 146.30 (C-9), 145.63 (C-8), 140.33 (Tri-C-5), 139.69 (C-12a), 135.20 (13a), 129.85 (C-4a), 129.73 (Ph-2C, overlapped), 129.25 (Ph-2C, overlapped), 128.00 (Ph-C), 127.96 (C-8a), 124.51 (C-13b), 123.22 (C-13), 121.29 (C-11), 120.98 (C-12), 120.46 (C-12), 112.93 (C-4), 109.79 (C-1), 68.85 (C-OCH<sub>3</sub>), 62.57 (C-OCH<sub>3</sub>), 60.4 (C-OCH<sub>3</sub>), 57.63 (C-CH<sub>2</sub>-), 57.35 (C-6), 56.93 (2C-CH<sub>2</sub>-, overlapped), 54.72 (C-CH<sub>2</sub>-), 54.05 (C-CH<sub>2</sub>-), 27.78 (C-5)。

**6d**: 黄色固体; 产率: 37.82%, 熔点: 205 °C ~ 206 °C ESI-MS  $m/z$ : 583.7 [M]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 9.73 (s, 1H, 8-H), 8.78 (s, 1H, 13-H), 8.61 (s, 1H, Tri 3-H), 8.04 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, 11-H), 8.01 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, 12-H), 7.72 (s, 1H, Tri 5-H), 7.61 (s, 1H, 1-H), 7.21-7.23 (m, 1H, Ph-H), 7.13-7.16 (m, 3H, Ph-H), 6.95 (s, 1H, 4-H), 4.92 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H, 6-H), 4.30 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, Tri-CH<sub>2</sub>), 4.18 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.13 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H, -OCH<sub>2</sub>-), 4.04 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.98 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.77 (s, 2H Ph-CH<sub>2</sub>), 3.23 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H, 5-H), 3.03 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H, Tri-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.94 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 164.45 (Ph-C), 162.03 (Ph-C), 152.86 (Tri-C-3), 151.87

(C-10), 151.64 (C-3), 150.87 (C-2), 146.32 (C-9), 146.08 (Ph-C), 145.67 (C-8), 139.72 (Tri-C-5), 136.34 (C-12a), 135.22 (C-13a), 131.45 (Ph-C), 131.37 (Ph-C), 129.87 (Ph-C), 128.01 (C-4a), 124.50 (C-8a), 121.31 (C-13b), 120.49 (C-13), 115.87 (C-11), 115.66 (C-12), 112.92 (C-4), 109.78 (C-1), 68.48 (C-OCH<sub>3</sub>), 62.55 (C-OCH<sub>3</sub>),

59.48 (C-OCH<sub>3</sub>), 57.63 (C-CH<sub>2</sub>-), 57.34 (C-6), 56.88 (C-CH<sub>2</sub>-), 54.58 (C-CH<sub>2</sub>-), 53.98 (2C-CH<sub>2</sub>-overlapped), 27.79 (C-5)。

### 2.3 抗菌活性实验

参照微药品微生物测试手册<sup>[10]</sup>的方法,对药根碱三唑进行抑菌实验,结果见表1。

表1 药根碱三唑对5种菌最小抑菌浓度(MIC) (μg/mL)

Table 1 MIC of jatrorrhizine triazoles against 5 kinds of microbes (μg/mL)

化合物 Compound	枯草杆菌 <i>B. subtilis</i>	金葡菌 <i>S. aureus</i>	痢疾杆菌 <i>S. dysenteriae</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	白色念珠菌 <i>C. albicans</i>
药根碱 Jatrorrhizine	256	256	512	512	>512
红霉素 Roxithromycin	0.5	0.5	1	1	>256
氟康唑 Fluconazole	-	-	-	-	0.5
二甲基亚砜 DMSO	-	-	-	-	-
<b>6a</b>	2	4	8	8	32
<b>6b</b>	4	8	8	8	32
<b>6c</b>	8	8	16	16	64
<b>6d</b>	2	1	8	8	16

注:所示值为三次实验的平均值。“-”表示为阴性结果,二甲基亚砜作为空白对照,罗红霉素和氟康唑为阳性对照。

Note: The given values are means of three experiments. “-” showed no values given. DMSO was used as a blank, Roxithromycin and Fluconazole as positive controls.

### 2.4 乙酰胆碱和丁酰胆碱酯酶的活性测定

采用 Ellman<sup>[11]</sup>法对 AChE 体外抑制活性进行测试,用碘化乙酰胆碱为底物,化学标记的二硫硝基苯甲酸为显色剂,在 96 孔板上样品的 AChE 抑制活性进行测定。测定时,首先在 96 孔板上加入用 DMSO 溶解的样品 1 μL、电鳗 AChE 溶液 50 μL,使用 Bio-Rad 酶标仪,在波长 410 nm 下,读取每孔吸光度值(样品本底的吸光度)。温度保持在 25 °C,

20 min 后,加入底物与显色剂及磷酸缓冲液至总体积为 100 μL,此时底物浓度为 10 μmol · L<sup>-1</sup>,显色剂浓度为 12.5 μmol · L<sup>-1</sup>。20 °C 保温反应 20 min,读取每孔的吸光度值。以 0.1 mol · L<sup>-1</sup> pH 8.0 的磷酸盐缓冲溶液作参比,以未加样品所测得的吸收 A (control) 作为 100 个活力单位然后以酶的相对活力对抑制剂浓度作图,根据抑制曲线求得各种化合物的 IC<sub>50</sub> 值(抑制酶活力 50% 时的抑制剂浓度)。

表2 药根碱三唑对 AChE / BuChE 抑制的 IC<sub>50</sub> (μM)

Table 2 In vitro inhibition IC<sub>50</sub> (μM) of Jatrorrhizine derivatives for AChE and BuChE (μM)

化合物 Compound	IC <sub>50</sub> (μM) ± SEM		乙酰胆碱酯酶选择性 Selectivity for AChE <sup>c</sup>
	乙酰胆碱酯酶 AChE <sup>a</sup>	丁酰胆碱酯酶 BuChE <sup>b</sup>	
药根碱 jatrorrhizine	0.872 ± 0.074	> 100	> 114
他克林 Tacrine	0.223 ± 0.003	0.052 ± 0.009	0.23
<b>6a</b>	0.74 ± 0.014	> 100	> 135
<b>6b</b>	0.46 ± 0.091	> 100	> 217
<b>6c</b>	0.86 ± 0.063	> 100	> 116
<b>6d</b>	0.55 ± 0.012	> 100	> 181

注:<sup>a</sup> 乙酰胆碱酯酶(电鳗鱼)的半数抑制浓度,所示值为三次实验的平均值;<sup>b</sup> 丁酰胆碱酯酶(马血清)的半数抑制浓度,所示值为三次实验的平均值;<sup>c</sup> 乙酰胆碱酯酶选择性 = IC<sub>50</sub>(BuChE)/IC<sub>50</sub>(AChE)。

Note: <sup>a</sup> 50% inhibitory concentration (means ± SEM of three experiments) of AChE from electric eel; <sup>b</sup> 50% inhibitory concentration (means ± SEM of three experiments) of BuChE from equine serum; <sup>c</sup> Selectivity for AChE = IC<sub>50</sub>(BuChE)/IC<sub>50</sub>(AChE)。

### 3 结论

新的药根碱三唑衍生物具有较为广泛的抗菌活性,相对于先导化合物药根碱抗菌活性明显提高,不仅对阴性菌和阳性菌都有较强的作用,而且对真菌有一定的抗菌作用,化合物**6d**对金黄色葡萄球菌的MIC值为1 μg/mL,比药根碱分别提高了256倍,和阳性药物相当,药根碱对真菌的抗菌作用较弱,但合成的药根碱三唑**6d**对真菌白色念珠菌的MIC值为16 μg/mL,可能在药根碱三唑的苯环中引入F原子能提高其抗真菌活性,整体而言引入三唑后不仅提高了药根碱的抗菌活性而且拓展了抗菌谱。药根碱三唑衍生物对AChE抑制的也表现出较强的抑制活性,所有衍生物包括药根碱和阳性对照IC<sub>50</sub>都在纳摩尔级,化合物**6b**对AChE抑制的IC<sub>50</sub>为0.46 ± 0.091 μM,对乙酰胆碱脂酶的抑制作用比先导化合物药根碱的抑制活性稍微提高,但对丁酰胆碱酯酶的抑制作用较弱,说明所有的化合物对AChE / BuChE的抑制具有较强的选择性,这种选择型抑制是治疗老年痴呆所必须的,但三唑环的引入并没有明显提高药根碱的对乙酰胆碱酯酶的抑制活性,可能三唑环并不是抑制乙酰胆碱酯酶有用的药效团。

#### 参考文献

- 1 Yuan L, Tu D, Ye X, *et al.* Hypoglycemic and hypocholesterolemic effects of *Coptis chinensis* franch inflorescence [J]. *Plant Foods Human Nut*, 2006, 61: 139-144.
- 2 Grycová L, Dostál J, Marek R. Quaternary protoberberine alkaloids [J]. *Phytochemistry*, 2007, 68: 150-175.
- 3 Fu Y, Hu B, Tang Q, *et al.* Hypoglycemic activity of jatrorrhizine [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2005, 25: 491-493.

- 4 Yu Y, Yi ZB, Liang YZ. Main antimicrobial components of *Tinospora capillipes* and their mode of action against *Staphylococcus aureus* [J]. *FEBS Lett*, 2007, 581: 4179-4183.
- 5 Iwasa K, Kamigauchi M, Sugiura M, *et al.* Antimicrobial activity of some 3-alkyl substituted protoberberinium salts [J]. *Planta medica*, 1997, 63: 196-198.
- 6 Yang Y, Ye XL, Li XG, *et al.* Synthesis and antimicrobial activity of 8-alkylberberine derivatives with a long aliphatic chain [J]. *Planta Med*, 2007, 73: 602-604.
- 7 Ding YP (丁阳平), Ye XL (叶小利), Zhu JY (朱家颖), *et al.* Synthesis of 8-alkyl-13-bromo-berberine hydrochloride derivatives and their effect on proliferation of human HepG2 cell line [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2010, 41: 1765-1770.
- 8 Shi A, Huang L, Lu C, *et al.* Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of novel triazole-containing berberine derivatives as acetylcholinesterase and β-amyloid aggregation inhibitors [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2011, 19: 2298-2305.
- 9 Fang B, Zhou CH, Rao XC. Synthesis and biological activities of novel amine-derived bis-azoles as potential antibacterial and antifungal agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2010, 45: 4388-4398.
- 10 Ma XR (马绪荣). Drug microbial test handbook (药品微生物学检验手册) [M]. Beijing: People Health Publishing House, 2001: 50-53.
- 11 Ellman GL, Courtney KD, Jr AV, *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity [J]. *Biochem Pharm*, 1961, 7(2): 88-90.

致谢:对以下合作单位参与本刊的学术建设表示由衷的感谢!

广西壮族自治区药用植物园

广西科学院

重庆市药物种植研究所

昆明医科大学药学院