

双分子 γ -咔啉衍生物的合成及其对胆碱酯酶的抑制活性研究

陶雪芬¹, 朱江伟², 金银秀¹, 王玉新¹ (1.台州职业技术学院, 浙江 台州 318000; 2.浙江永太科技股份有限公司, 浙江 台州 317016)

摘要: 目的 合成双分子 γ -咔啉衍生物并研究其抑制乙酰胆碱酯酶的活性。方法 以 *N*-乙酰基-3-溴-4-哌啶酮和苯肼为原料, 经 Fischer 法一步合成关键中间体 γ -咔啉, γ -咔啉在 NaH 作用下与二溴代物发生亲核取代反应生成双分子 N_5 - γ -咔啉系列衍生物, 后者进一步在丙酮中经碘甲烷甲基化得到相应的季铵盐。用改良的 Ellman 法测定化合物的乙酰胆碱酯酶抑制活性。结果 合成了 7 个新的双分子 γ -咔啉衍生物, 其化学结构经 IR、¹H-NMR、¹³C-NMR、ESI-MS 确证。药理实验研究表明, 所有目标化合物对乙酰胆碱酯酶均具有一定的抑制活性, 化合物 **4g** 显示出与阳性对照多奈哌齐较为接近的抑制活性。结论 双分子 γ -咔啉衍生物对乙酰胆碱酯酶具有抑制活性, 连接链的长度对活性有影响, 链长为 8 个碳原子时活性最佳, 结构中的叔氮季铵化有利于提高活性。

关键词: 阿尔茨海默病; 乙酰胆碱酯酶; 抑制活性; 双分子 γ -咔啉衍生物; 合成

中图分类号: R914.5

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2023)19-2665-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20224278

引用本文: 陶雪芬, 朱江伟, 金银秀, 等. 双分子 γ -咔啉衍生物的合成及其对胆碱酯酶的抑制活性研究[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(19): 2665-2668.

Synthesis and Acetylcholinesterase Inhibition Activity of Bivalent γ -Carboline Derivatives

TAO Xuefen¹, ZHU Jiangwei², JIN Yinxiu¹, WANG Yuxin¹ (1. Taizhou Vocational & Technical College, Taizhou 318000, China; 2. Zhejiang Yongtai Technology Co., Ltd., Taizhou 317016, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To synthesize bivalent γ -carboline derivatives and determine their acetylcholinesterase inhibition activity. **METHODS** The key intermediate γ -carboline was synthesized by Fischer method using *N*-acetyl- 3-bromo-4-piperidone and phenylhydrazine as starting materials. The γ -carboline synthesized was then reacted with ω,ω' - dibromoalkanes in the presence of NaH to form bivalent γ -carboline derivatives. Methylation of γ -carboline derivative with iodomethane in methanol yielded its quaternary ammonium salt. The acetylcholinesterase activity was measured by Ellman method with slight modification. **RESULTS** Seven novel carboline derivatives were synthesized and their structures were characterized by IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR and ESI-MS. The results of pharmacological experiments indicated that all the target compounds showed inhibition activity against the acetylcholinesterase. Compound **4g** exhibited inhibitory activity similar to that of the positive control donepezil. **CONCLUSION** Bivalent γ -carboline derivatives have inhibition activity against the acetylcholinesterase. The length of the connecting chain has an impact on the activity. It shows the best activity with chain length of eight carbon atoms, and the quaternization of tertiary nitrogen in the structure is beneficial for raising the inhibitory activity.

KEYWORDS: Alzheimer's disease; acetylcholinesterase; inhibition activity; bivalent γ -carboline derivatives; synthesis

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种进行性记忆和认知功能缺损的神经退行性疾病。目前, 全球 AD 患者达 5 200 余万人, 且呈爆发性增长趋势, 中国约有 1 000 万 AD 患者, 预计到 2050 年将突破 4 000 万, 因此, 对防治 AD 药物的研究是新药研发的热点之一^[1]。

“胆碱能缺失学说”认为 AD 患者认知障碍的发病机制可能与胆碱能神经传递的功能低下有关, 患者大多表现为大脑皮层和海马区乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)浓度较低。乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)在突触间隙使 ACh 水

解成乙酸和胆碱, 从而终止神经递质对突触后膜的兴奋作用^[2]。AChE 抑制剂可选择性抑制 AChE 的活性, 有利于 ACh 在突触处的累积, 延长并增加 AD 患者脑内 ACh 的作用, 对减轻 AD 患者认知能力下降有较好的疗效, 是当前研究较多、疗效明确、应用较为广泛的抗早老症药物^[3]。目前利伐司替明、多奈哌齐、加兰他敏和他克林等 AChE 抑制剂已上市销售。但是, 临床研究表明, 此类 AChE 抑制剂因存在外周胆碱能系统不良反应、半衰期短等缺点, 限制了其在临床上的推广应用。

AChE 的 X-衍射晶体结构表明其活性空腔为

基金项目: 台州职业技术学院培育项目(2021PY04)

作者简介: 陶雪芬, 女, 博士, 副教授 E-mail: txfzjyh@sina.com

一个狭窄的“芳香峡谷”，在谷的底部是活性催化位点，在谷的入口处，还有一个外周阴离子位点。因此，笔者设想通过设计一些双分子体或杂合体，如将他克林分子、多奈哌齐中的 *N*-苄基哌啶结构片段等 2 个相同或不同药效团通过一定的方式进行连接，使所设计的候选化合物能同时与 AChE 的中心催化位点和外周阴离子位点结合，有望提高其抑制活性^[4-5]。同时笔者也观察到单分子 γ -咔啉几乎没有 AChE 酶抑制活性，而双分子 γ -咔啉显示出纳摩尔级的 AChE 抑制活性。另据文献报道^[6]，Dimebon 具有微弱的抑制 ACh 的活性和神经保护作用，其活性可能来源于结构中的 γ -四氢咔啉稠环与 AChE 的外周位点结合，结构式见图 1。

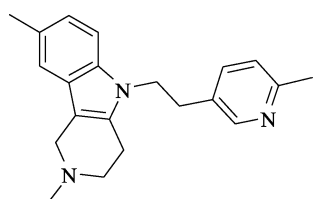


图 1 Dimebon 结构式
Fig. 1 Structure of Dimebon

考虑到 γ -四氢咔啉作为重要的药效团，常见于中枢神经系统药物的结构中，本课题组拟以前期合成的 γ -咔啉为先导化合物，设计并合成双分子 γ -咔啉衍生物，化学结构式见图 2，考察该双分子体之间连接链长度、链接方式及结构中引入阳离子对其 AChE 抑制活性的影响，为进一步将该类化合物设计开发成防治 AD 的候选药物提供理论基础。

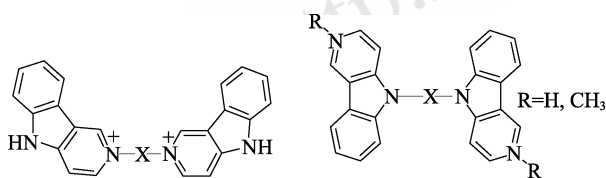


图 2 双分子 γ -咔啉衍生物的化学结构式
Fig. 2 Structure of bivalent γ -carboline derivatives

1 合成实验

1.1 仪器与试剂

Avance III 500 型、AM 400 型核磁共振仪均来自德国 Bruker 公司；Esquire-LC-00075 液质联用仪(美国布鲁克·道尔顿公司)；B-540 型熔点仪(温度计未经校正)(瑞士 Buchi 公司)。

N-乙酰基-3-溴-4-哌啶酮(上海阿拉丁生化科

技股份有限公司，批号：D104628)；苯肼(上海阿拉丁生化科技股份有限公司，批号：P108563)；NaH(广东翁江化学试剂有限公司，批号：WA00319)；1,10-二溴癸烷(上海阿拉丁生化科技股份有限公司，批号：D103590)；DMF(上海麦克林生蚝科技股份有限公司，批号：N1307505)；碘甲烷(上海吉至生化科技有限公司，批号：I16620)；乙酸(上海麦克林生蚝科技股份有限公司，批号：A801296)；1,4-二溴丁烷(上海阿拉丁生化科技股份有限公司，D105749)。

1.2 合成方法

通过文献调研，设计合成双分子 γ -咔啉系列衍生物 **4a~4g** 的路线如下：以 *N*-乙酰基-3-溴-4-哌啶酮和苯肼为原料，经 Fischer 法合成 γ -咔啉(化合物 **3**)，后者在 NaH 作用下与二溴代物发生亲核取代反应生成双分子 N_5 - γ -咔啉系列衍生物 **4a~4e**； γ -咔啉和 1,10-二溴癸烷在 DMF 中回流得到化合物 **4f**；化合物 **4d** 在丙酮中经碘甲烷甲基化得到目标化合物 **4g**。具体合成路线见图 3。

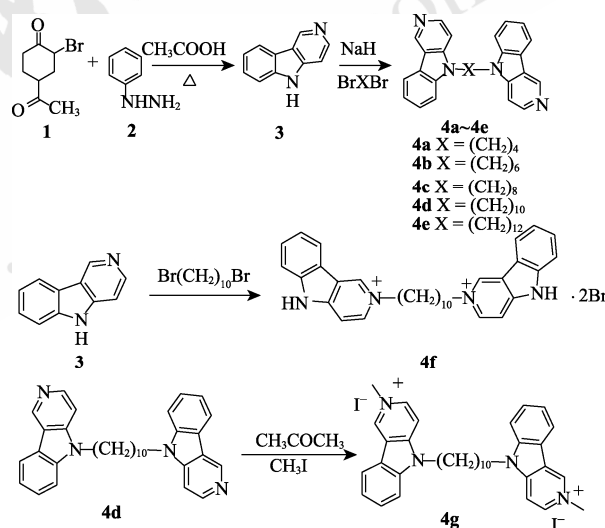


图 3 分子 γ -咔啉衍生物的合成路线
Fig. 3 Synthesis of bivalent γ -carboline derivatives

通过上述合成路线，共合成 7 个双分子 γ -咔啉系列衍生物，化学结构经 IR、¹H-NMR 和 ESI-MS 确证，均为新化合物。

1.2.1 化合物 3 的制备^[7-8] 将苯肼(**2**)(6 mmol)和 *N*-乙酰基-3-溴-4-哌啶酮(**1**)(4 mmol)、乙酸(20 mmol)加入反应瓶中，加热回流 12 h。反应液冷却后加入饱和 NaHCO₃ 中和至弱碱性，用乙酸乙酯萃取 3 次，每次 80 mL，合并有机层，无水 MgSO₄

干燥过夜, 过滤, 减压回收溶剂, 硅胶柱层析, 得到白色固体 **3**, 熔点: 218~221 °C(文献值^[7]: 214~215 °C)。

1.2.2 化合物 4a~4e 的制备 以 **4a** 为例, 在三颈瓶中加入 123 mg(0.66 mmol) 5H-吡啶并[4,3-b]吡啶和 4 mL 无水 DMF, 冰浴冷却下加入 34 mg(0.84 mmol) 60%的 NaH, 搅拌反应 40 min, 加入 66 mg(0.3 mmol) 1,4-二溴丁烷, 薄层色谱跟踪反应结束后, 加入 10 mL 水淬灭反应, 转移至分液漏斗, 乙酸乙酯萃取, 饱和 NaCl 溶液洗涤, 无水 MgSO₄ 干燥, 减压回收溶剂, 硅胶柱层析, 得到淡黄色固体。

1,4-二(5H-吡啶并[4,3-b]吡啶-5-基)丁烷(**4a**): 淡黄色固体; 收率 14.8%; 熔点: 228~232 °C; IR(KBr): 3 449, 3 039, 2 931, 2 360, 1 589, 1 501, 1 462, 1 381, 1 223, 1 161, 1 107, 993, 846, 808, 740, 631 cm⁻¹; ¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃): δ 9.28(s, 2 H), 8.49(d, *J*=5.5 Hz, 2 H), 8.14(d, *J*=7.5 Hz, 2 H), 7.49(t, *J*=7.5 Hz, 2 H), 7.27~7.35(m, 4H), 7.16(d, *J*=5.5 Hz, 2 H), 4.21~4.23(m, 4 H), 1.93~1.95(m, 4 H); ESI-MS: *m/z*=391 [M+1]⁺。

1,6-二(5H-吡啶并[4,3-b]吡啶-5-基)己烷(**4b**): 淡黄色固体; 收率 15.9%; 熔点: 150~155 °C; IR(KBr): 3 449, 3 033, 2 933, 2 855, 1 713, 1 623, 1 588, 1 497, 1 462, 1 379, 1 342, 1 233, 1 166, 1 124, 1 072, 991, 808, 809, 743, 627 cm⁻¹; ¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃): δ 9.28(s, 2H), 8.48~8.50(d, *J*=5.5 Hz, 2 H), 8.13~8.15(d, *J*=7.5 Hz, 2 H), 7.48~7.51(t, *J*=7.5 Hz, 2 H), 7.30~7.36(m, 4 H), 7.19~7.20(d, *J*=5.5 Hz, 2 H), 4.20~4.23(m, 4 H), 1.78~1.84(m, 4 H), 1.18~1.23(m, 4 H); ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃): δ 149.9(2), 149.5(2), 139.7(2), 128.2(2), 127.5(2), 124.1(2), 120.9(2), 120.1(2), 118.6(2), 110.8(2), 103.5(2), 58.7(2), 28.9(2), 26.7(2); ESI-MS: *m/z*=418 [M+1]⁺。

1,8-二(5H-吡啶并[4,3-b]吡啶-5-基)辛烷(**4c**): 黄色固体; 收率 15.2%; 熔点: 110~111 °C; ¹H-NMR(500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.04(s, 2H), 8.87~8.89(m, 2 H), 8.42(d, *J*=7.0 Hz, 2 H), 8.34(m, 2 H), 7.95(d, *J*=8.0 Hz, 2 H), 7.77(d, *J*=7.0 Hz, 2 H), 7.75(m, 2H), 7.55(*t*, *J*=7.0 Hz, 2 H), 4.60(m, 4 H), 1.96(m, 4 H), 1.28(m, 8 H); *m/z*=446 [M+1]⁺。

1,10-二(5H-吡啶并[4,3-b]吡啶-5-基)癸烷

(**4d**): 淡黄色固体; 收率 16.8%; 熔点: 131~135 °C; IR(KBr): 3 448, 2 926, 2 855, 1 738, 1 594, 1 463, 1 376, 1 230, 1 167, 996, 813, 747 cm⁻¹; ¹H-NMR(500 MHz, CD₃OD): δ 9.44(d, *J*=4.0 Hz, 2 H), 8.66(d, *J*=2.0 Hz, 2 H), 8.39(*t*, *J*=8.0 Hz, 2 H), 7.68~7.79(m, 6H), 7.54(d, *J*=4.0 Hz, 2 H), 4.49(*t*, *J*=7.0 Hz, 4 H), 1.96~2.00(m, 4 H), 1.26~1.41(m, 12 H); *m/z*=474 [M+1]⁺。

1,12-二(5H-吡啶并[4,3-b]吡啶-5-基)十二烷(**4e**): 黄色液体; 收率 25.8%; ¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃): δ 9.30(s, *J*=4.0 Hz, 2 H), 8.54(d, *J*=5.5 Hz, 2 H), 8.14(d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.52(*t*, *J*=8.0 Hz, 2 H), 7.43(d, *J*=8.5 Hz, 2 H), 7.31(*t*, *J*=7.5 Hz, 2 H), 7.28(d, *J*=6.0 Hz, 2 H), 4.24~4.26(m, 4 H), 1.82~1.87(m, 4 H), 1.19~1.35(m, 16 H); *m/z*=502 [M+1]⁺。

1.2.3 化合物 4f 的制备 将 336 mg(2 mmol) γ-吡啶、300 mg(1.0 mmol) 1,10-二溴癸烷置于 4 mL DMF 中, 氮气氛围保护下回流, 薄层色谱跟踪反应进程, 待反应完全后, 将反应液冷至室温, 加入 10 mL 丙酮, 析出沉淀, 抽滤得到黑色固体。

2,2'-(癸-1,10-二基)二(5H-吡啶并[4,3-b]吡啶-2-基) 溴化物(**4f**): 黑色固体; 收率 61.5%; 熔点: 298~299 °C; ¹H-NMR(500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.99(s, 2 H), 8.78(d, *J*=6.5 Hz, 2 H), 8.39(d, *J*=7.5 Hz, 2 H), 8.06(d, *J*=7.0 Hz, 2 H), 7.81(d, *J*=7.5 Hz, 2 H), 7.72(*t*, *J*=7.5 Hz, 2 H), 7.52(*t*, *J*=7.5 Hz, 2 H), 4.62(*t*, *J*=7.0 Hz, 4 H), 1.96~2.00(m, 4 H), 1.24~1.29(m, 12 H)。

1.2.4 化合物 4g 的制备 将 80 mg 化合物 **4d** 置于三颈瓶中, 加入 4 mL 丙酮, 氮气保护下加入碘甲烷 0.8 mL, 室温反应, 薄层色谱跟踪反应进程, 待反应完全后, 析出结晶, 抽滤, 滤饼用少量丙酮洗涤二次, 减压干燥, 得到灰白色固体。

5,5'-(癸-1,10-二基)二(2-甲基-5H-吡啶并[4,3-b]吡啶-2-基)碘化物(**4g**): 灰白色固体; 收率 41.6%; 熔点: 245~246 °C; ¹H-NMR(500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.85(s, 2 H), 8.77(d, *J*=7.0 Hz, 2 H), 8.40(d, *J*=8.0 Hz, 2 H), 8.29(d, *J*=7.5 Hz, 2 H), 7.95(d, *J*=8.0 Hz, 2 H), 7.78(*t*, *J*=6.5 Hz, 2 H), 7.56(*t*, *J*=7.5 Hz, 2 H), 4.60(*t*, *J*=7.0 Hz, 4 H), 4.38(s, 6 H), 1.77~1.78(m, 4 H), 1.12~1.22(m, 12 H)。

2 体外抑制 AChE 活性试验

2.1 材料

待测样品; pH7.4 的磷酸缓冲液; 大鼠皮质 5%匀浆(AChE 酶源); 多奈哌齐(济南新科科技有限公司, 批号: 160708); 四异丙基焦磷酸胺(iso-OMPA, Aladdin, 批号: T335806); 5,5'-二硫代双-(2-硝基苯甲酸)(DTNB, 宝信生物, 批号: CD4921); 碘化硫代乙酰胆碱(上海源叶生物科技有限公司, 批号: S30724); 十二烷基磺酸钠(SDS, 默克公司, 批号: V900633)。

2.2 方法

胆碱酯酶抑制活性采用 Ellman 改良法。大鼠皮质匀浆用 iso-OMPA(丁酰胆碱酯酶选择性抑制剂, $0.04 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)预孵育 5 min, 将等体积的匀浆和待测样品溶液混合, 37°C 下孵育 15 min, 加入 3% SDS 终止反应, 最后加入 0.2% DTNB, 生成 5-硫代-2-硝基苯甲酸的黄色阴离子。紫外-可见分光光度计 420 nm 下测吸光度, 计算 IC_{50} 值, 多奈哌齐为阳性对照药物。结果见表 1。

表 1 双分子 γ -咔啉衍生物的 AChE 抑制活性

Tab. 1 AChE inhibitory activity of bivalent γ -carboline derivatives

化合物	$\text{IC}_{50}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	化合物	$\text{IC}_{50}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
4a	1.290	4e	1.770
4b	0.840	4f	0.100
4c	0.183	4g	0.021
4d	0.567	多奈哌齐	0.019

3 讨论

γ -咔啉在 NaH 作用下与二溴代物发生亲核取代反应制得 7 个双分子 γ -咔啉衍生物, 均为新化合物, 化学结构经红外光谱、氢核磁共振谱和质谱确证。初步的药理研究结果表明, 所合成的目标化合物均具有一定的体外抑制胆碱酯酶的活性。其中化合物 4g 的活性最佳, $\text{IC}_{50}=0.021 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 接近阳性对照多奈哌齐。本研究重点考察了连接 2 个咔啉基的碳链长度对化合物活性的影响, 结果显示, 当链长 <6 个碳原子时, 双分子化合物活性较弱, 如化合物 4a($\text{IC}_{50}=1.290 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); 延长碳链至 2 个咔啉基之间为 6 个碳原子($n=6$)的距离时, 活性有所提升, 4b 的 $\text{IC}_{50}=0.840 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 继续延长碳链至 8 个碳原子

($n=8$)的距离时, 化合物活性最高, 4c 的 $\text{IC}_{50}=0.183 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 而当碳链延长至 10 个碳原子($n=10$)的距离, 活性略有下降, 化合物 4d 的 IC_{50} 值为 $0.567 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 当链长延至 12 个碳原子($n=12$)的距离, 活性继续下降, 4e 的 IC_{50} 值为 $1.77 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结构中含季铵 N 正离子的 4f 和 4g 表现出较高的活性, 其中 4g 的 AChE 抑制活性为 $0.021 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 与阳性药多奈哌齐相当。其原因可能是两者与 AChE 之间具有双重结合位点: 一是 4g 结构中的 N 正离子可与 AChE 的外周阴离子位点结合, 二是 4g 结构中 γ -咔啉的芳香环与氨基酸残基芳香环之间形成 π - π 叠加作用。

综上, 本研究合成 7 个新的双分子 γ -咔啉衍生物, 体外 AChE 抑制活性测试结果表明, 目标化合物 4a~4g 均具有一定抑制 AChE 的活性, 其中化合物 4g 显示出与阳性对照多奈哌齐相当的抑制活性, 有望对其通过进一步结构修饰得到理想的 AChE 抑制剂。

REFERENCES

- [1] ATKINSON S P. Alzheimer's disease: A special collection[J]. Stem Cells Transl Med, 2017, 6(11): 1951-1955.
- [2] FRISONI G B, ALTOMARE D, THAL D R, et al. The probabilistic model of Alzheimer disease: The amyloid hypothesis revised[J]. Nat Rev Neurosci, 2022, 23(1): 53-66.
- [3] DANG L, MA H, DU H Z. Screening of inhibiting-cholinesterase active fractions from *Forsythia suspensa* leaves[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2022, 39(18): 2316-2321.
- [4] ZHANG P F, XU S T, ZHU Z Y, et al. Multi-target design strategies for the improved treatment of Alzheimer's disease[J]. Eur J Med Chem, 2019(176): 228-247.
- [5] MESITI F, CHAVARRIA D, GASPAR A, et al. The chemistry toolbox of multitarget-directed ligands for Alzheimer's disease[J]. Eur J Med Chem, 2019(181): 111572.
- [6] XU X L, LI Q, SONG L, et al. Effect of dimebon on NMDA-activated current in mice medium spiny neuron[J]. Chin J Clin Anat(中国临床解剖学杂志), 2015, 33(1): 89-92.
- [7] SHENG R, ZHU J W, HU Y Z. Mild and efficient Winterfeldt oxidation of 1, 2, 3, 4-tetrahydro- γ -carbolines for the synthesis of dihydropyrrolo[3,2-b]-quinolones and pyrrolo[3,2-b]quinolones[J]. Molecules, 2012, 17(2): 1177-1190.
- [8] CHEN J, TAO X F. Synthesis and antitumor activity study of carboline derivatives[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(3): 229-234.

收稿日期: 2022-12-26

(本文责编: 陈怡心)