

# 新型环化小檗碱衍生物的设计合成及抗 MRSA 活性研究

范田运, 胡欣欣, 汪燕翔, 唐 胜, 游雪甫, 宋丹青\*

(中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京市抗感染重点实验室, 北京 100050)

**摘要:** 本课题组前期工作中首次发现全新结构骨架 9-乙酰氧基环化小檗碱 (**1**) 具有独特的抗对甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌 (MSSA)/耐甲氧西林金黄色葡萄球菌活性 (MRSA), MIC 为  $1\sim 16\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。本研究以 **1** 为先导物, 以抗菌活性为导向, 针对分子中多个结构片段设计合成了 14 个不同类型的环化小檗碱 (CBBR) 衍生物, 包括小檗碱与白屈菜红碱衍生物。构效关系分析表明: ① E 环为活性必需片段; ② 移除 B 环后, 抗 MRSA 活性有所降低, 但对 VRE 活性提高; ③ 9-位引入适当的刚性基团有利于活性提高。其中, 化合物 **9a** 对标准与临床分离的 MSSA/MRSA 菌株的活性明显优于先导物 **1**, MIC 值介于  $0.5\sim 1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  之间, 提示其作用机制可能与临床抗菌药不同。另外, **9a** 的体外药代稳定性优于先导物 **1**, 值得进一步研究。研究结果为此类化合物发展成一类新型抗 MRSA 候选物提供了关键的科学数据。

**关键词:** 环化小檗碱; 白屈菜红碱; 抗菌活性; MRSA; 耐药; 构效关系

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 06-0887-08

## Design, synthesis and anti-MRSA activities of cycloberberine derivatives with a novel chemical scaffold

FAN Tian-yun, HU Xin-xin, WANG Yan-xiang, TANG Sheng, YOU Xue-fu, SONG Dan-qing\*

(Beijing Key Laboratory of Antimicrobial Agents, Institute of Medicinal Biotechnology,  
Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract:** 9-Acetoxy-cycloberberine (**1**) with a unique skeleton was first identified to display a potent antimicrobial profile against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with MIC values of  $1\sim 16\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Taking the compound as a lead, 14 target cycloberberine analogues with diverse structures, such as berberine and chelerythrine derivatives, were synthesized and evaluated for their anti-bacterial activities. Analysis of the structure-activity relationship revealed that: ① ring E was essential for the activity; ② the removing of ring B decreased the activity against MRSA. However, the antimicrobial activity against vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) was improved; ③ the introduction of a suitable rigid substituent at the 9-position was beneficial for the activity. Among them, compound **9a** showed the most potential activity against methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) and MRSA isolates with MIC values of  $0.5\sim 1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , suggesting a different mechanism from clinical drugs. It displayed higher stability in blood. Therefore, we consider **9a** worthy of further investigation. The results provide key scientific evidence for development of such compounds into a new type of anti-MRSA candidates.

**Key words:** cycloberberine; chelerythrine; antibacterial; MRSA; drug resistance; structure-activity relationship

收稿日期: 2018-02-07; 修回日期: 2018-03-01.

基金项目: 国家自然科学基金中瑞合作项目 (81361138020); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程资助项目 (2017-12M-1-012); 北京市自然科学基金资助项目 (7172136).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63165268, E-mail: songdanqingsdq@hotmail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0141

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 是严重威胁人类健康的主要病原菌之一, 是导致化脓性脓肿的罪魁祸首<sup>[1]</sup>。耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 是院内获得性感染首要致病菌, 可引起社区性大流行<sup>[2]</sup>; 该类菌株感染可遍及全身并有高发病率及高死亡率特点, 给家庭及社会带来严重的经济负担<sup>[3–6]</sup>。2017年2月, 世界卫生组织发布了首份急需新型抗生素的重点病原体清单, MRSA 被列为第二类重点十分重要栏。我国是 MRSA 感染大国, 2016年全国细菌耐药检测报告显示: 全国平均检出率高达 34.4%。MRSA 还具有多重耐药性特点, 对临床使用抗生素包括青霉素、头孢菌素、氨基糖苷、四环素、大环内酯、恶唑烷酮以及喹诺酮等均产生不同程度耐药<sup>[7–12]</sup>。万古霉素 (vancomycin) 被认为抵御 MRSA 的“最后一道防线”, 然而, 过去 20 年间, 中介耐万古霉素金黄色葡萄球菌 (vancomycin intermediate-resistant *S. aureus*, VISA) 以及耐万古霉素金黄色葡萄球菌 (vancomycin-resistant *S. aureus*, VRSA) 相继被报道<sup>[13–15]</sup>。2017年7月, G20 启动了国际抗生素耐药性十年研发计划。因此, 寻找结构类型新颖、作用机制独特的抗 MRSA 药物成为全球科学家致力于攻关的科学难题。

本课题组长期致力于从我国生物碱天然产物中寻找化学结构新颖、作用机制独特的创新药物, 由此构建了一个由天然产物衍生、自主创新的化合物库<sup>[16–24]</sup>。为了寻找结构新颖的抗菌候选物, 对此化合物库开展了表型抑菌高通量筛选, 并幸运地发现了本课题组首先构建的环化小檗碱 (CBBR) 衍生物——9-乙酰氧基环化小檗碱氯化物 **1** (图 1), 显示出较强的抗革兰阳性菌活性, 对甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌 (methicillin-susceptible *S. aureus*, MSSA) 与 MRSA、尤其对 VISA 均显示较好的抑制活性 (表 1), 最小抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 介于 1~16  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 提示其抑菌作用机制可能不同于临床使用抗菌药物。但此化合物中 9-乙酰氧

基极易被体内酯酶水解, 存在药代不稳定的缺陷。

鉴于化合物 **1** 独特的化学结构以及抗 MRSA 活性, 本研究以其为先导物, 以抗菌活性为导向, 针对分子中的 E 环、B 环以及 9-位侧链开展了结构修饰与优化, 旨在探讨此类化合物的抗菌构效关系 (structure-activity relationship, SAR) 的同时, 克服酯基容易被酯酶水解的缺欠, 由此获得抗菌活性强、药代稳定的新型抗 MRSA 候选物。由此设计合成了 14 个 CBBR 衍生物, 包括 4 个小檗碱衍生物、4 个白屈菜红碱衍生物以及 6 个 9-取代 CBBR 衍生物, 并对代表性化合物开展了体外药代稳定性与初步安全性评价。

## 结果与讨论

### 1 化合物的合成

首先, 以市售盐酸小檗碱为起始原料, 在高温负压条件下, 选择性脱除 9-位甲基得 **2**, 随后以吡啶为缚酸剂, 与相应的酰氯反应得到 9-位酯取代小檗碱衍生物 **3a~3d** (合成路线 1)。其次, 以盐酸白屈菜红碱为起始原料, 在高温负压条件下, 选择性脱除甲基得到化合物 **4**, 其与相应的酰氯在三乙胺作用下反应得到 7-位酯取代白屈菜红碱化合物 **5a~5c** (合成路线 2)。最后, 以小檗碱为原料经还原、取代、环化等反应得到关键中间体 CBBR, 其中环化反应为 CBBR 合成的关键反应。用体积比为 1:3 的浓盐酸与甲醇代替本课题组之前报道的 2% 盐酸<sup>[23]</sup>为环化条件, 不仅时间大为缩短, 而且收率由原来的 38% 提高到 67%。随后高温负压条件下, 对 CBBR 选择性脱除 9-位甲基, 进而而在三乙胺作用下, 与相应的酰氯反应得到 9-位酯类化合物 **9a~9f** (合成路线 3)。其中所合成的白屈菜红碱与 CBBR 衍生物均为全新结构化合物, 所有目标化合物结构经 <sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 以及 HR-MS 分析确证。目标化合物的收率、理化参数和波谱数据见表 1。

### 2 抗阳性菌活性 SAR 研究

本论文评价了所有目标物对革兰阳性菌, 包括

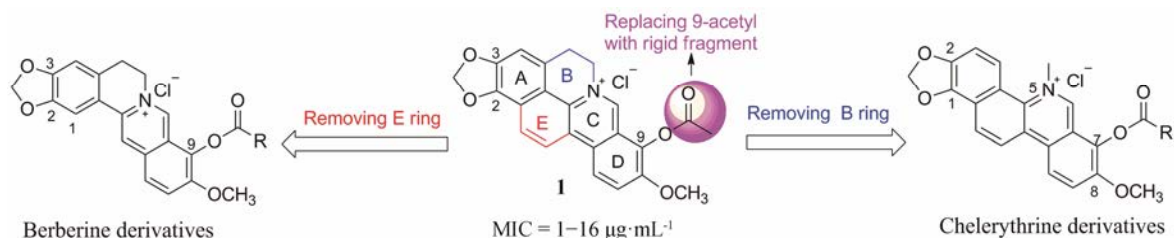
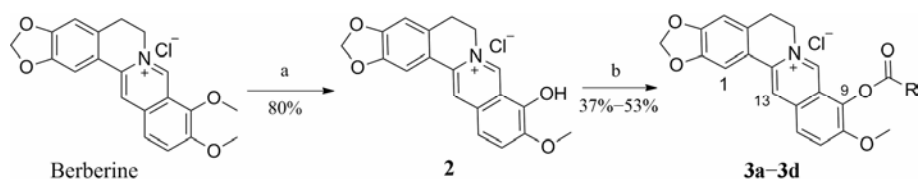


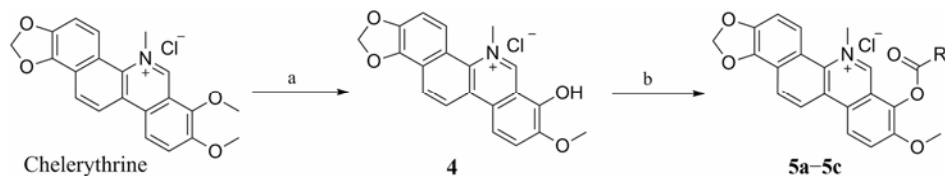
Figure 1 Chemical structure of **1**, and its structure modification strategy

**Table 1** Physical properties and spectra data of all synthesized compounds

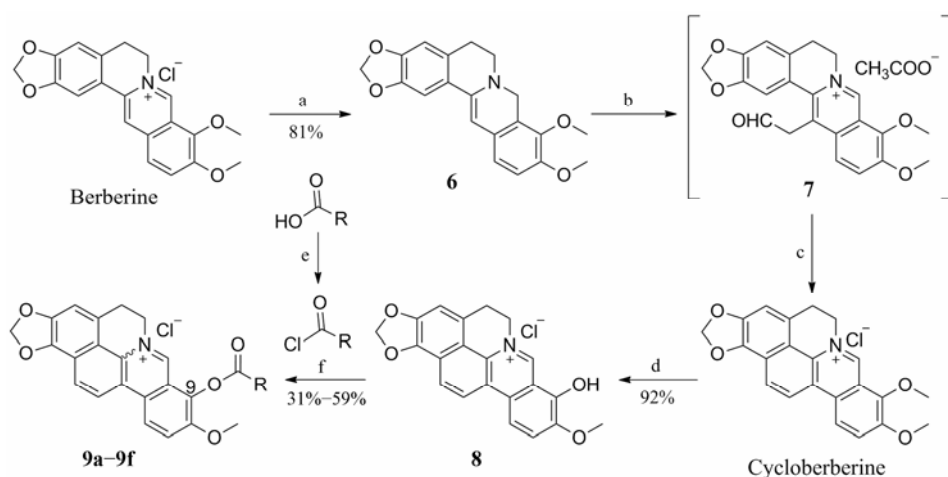
No.	Yield /%	Mp/ °C (Dec.)	<sup>1</sup> H NMR	<sup>13</sup> C NMR	HR-ESI-MS ( <i>m/z</i> )
3a	37	204–206	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 10.00 (s, 1H), 9.05 (s, 1H), 8.29 (d, <i>J</i> = 9.6 Hz, 1H), 8.21 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.10 (s, 1H), 6.18 (s, 2H), 4.96 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2H), 4.05 (s, 3H), 3.23 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2H), 2.53 (s, 3H).	<sup>13</sup> C NMR (151 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 167.9, 150.3, 149.9, 147.6, 144.4, 138.0, 133.3, 132.8, 130.7, 126.6, 125.8, 121.0, 120.4, 120.2, 108.3, 105.4, 102.0, 57.1, 55.1, 26.1, 20.5.	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>5</sub> Cl [M–Cl] <sup>+</sup> Calcd.: 364.118 0, Found: 364.116 9.
3b	44	173–175	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 10.01 (s, 1H), 9.10 (s, 1H), 8.35 (d, <i>J</i> = 9.6 Hz, 1H), 8.31–8.25 (m, 3H), 7.88–7.82 (m, 2H), 7.71 (t, <i>J</i> = 7.8 Hz, 2H), 7.09 (s, 1H), 6.19 (s, 2H), 4.91 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2H), 4.03 (s, 3H), 3.20 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2H).	<sup>13</sup> C NMR (151 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 163.3, 150.3, 149.9, 147.6, 144.4, 138.1, 134.5, 133.4, 132.9, 130.8, 130.3, 130.3, 129.0, 129.0, 127.9, 126.9, 125.8, 121.1, 120.5, 120.2, 108.3, 105.4, 102.0, 57.2, 55.1, 26.0.	C <sub>26</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>5</sub> Cl [M–Cl] <sup>+</sup> Calcd.: 426.133 6, Found: 426.132 9.
3c	53	186–188	<sup>1</sup> H NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 9.98 (s, 1H), 9.08 (s, 1H), 8.34 (d, <i>J</i> = 9.5 Hz, 1H), 8.30–8.23 (m, 2H), 7.83 (s, 1H), 7.77–7.72 (m, 1H), 7.10 (s, 1H), 6.96–6.90 (m, 1H), 6.19 (s, 2H), 4.92 (t, <i>J</i> = 5.0 Hz, 2H), 4.05 (s, 3H), 3.21 (t, <i>J</i> = 5.0 Hz, 2H).	<sup>13</sup> C NMR (126 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 154.8, 150.3, 149.9, 149.2, 147.6, 144.3, 142.1, 138.1, 132.9, 132.5, 130.8, 127.0, 125.8, 121.4, 121.1, 120.5, 120.2, 113.0, 108.3, 105.4, 102.0, 57.2, 55.2, 26.0.	C <sub>24</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>6</sub> Cl [M–Cl] <sup>+</sup> Calcd.: 416.112 9, Found: 416.112 5.
3d	47	207–209	<sup>1</sup> H NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 9.87 (s, 1H), 9.07 (s, 1H), 8.33 (d, <i>J</i> = 9.5 Hz, 1H), 8.24 (d, <i>J</i> = 9.5 Hz, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.09 (s, 1H), 6.85 (s, 1H), 6.19 (s, 2H), 4.92 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 4.02 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 3.19 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 2.38 (s, 3H).	<sup>13</sup> C NMR (126 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 158.8, 150.3, 149.9, 147.6, 144.2, 140.9, 138.7, 138.0, 133.3, 132.8, 130.8, 126.6, 125.8, 121.2, 120.5, 120.2, 109.2, 108.3, 105.4, 102.0, 57.1, 55.2, 37.0, 26.0, 10.5.	C <sub>25</sub> H <sub>22</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> Cl [M–Cl] <sup>+</sup> Calcd.: 444.155 4, Found: 444.154 7.
4	13	157–159	<sup>1</sup> H NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 11.62 (s, 1H), 10.09 (s, 1H), 8.77 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 8.49 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 8.30–8.22 (m, 2H), 8.15 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 7.75 (s, 1H), 6.34 (s, 2H), 4.93 (s, 3H), 4.08 (s, 3H).	<sup>13</sup> C NMR (126 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 150.9, 148.4, 148.4, 145.8, 145.7, 132.0, 131.1, 130.6, 127.3, 125.0, 124.4, 120.1, 118.7, 115.1, 113.7, 105.6, 104.0, 102.6, 56.8, 51.7.	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>4</sub> Cl [M–Cl] <sup>+</sup> Calcd.: 334.107 4, Found: 334.106 6.
5a	73	215–217	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 10.19 (s, 1H), 9.08 (d, <i>J</i> = 9.6 Hz, 1H), 8.90 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 8.41–8.33 (m, 3H), 7.81 (s, 1H), 6.37 (s, 2H), 5.03 (s, 3H), 4.09 (s, 3H), 2.57 (s, 3H).	<sup>13</sup> C NMR (151 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 168.0, 150.4, 149.5, 148.8, 148.7, 135.1, 132.3, 131.9, 131.3, 127.9, 125.2, 125.2, 122.6, 120.0, 119.0, 118.6, 105.8, 104.4, 102.7, 57.1, 52.5, 20.7.	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>5</sub> Cl [M–Cl] <sup>+</sup> Calcd.: 376.118 0, Found: 376.117 0.
5b	85	214–216	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 10.26 (s, 1H), 9.15 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 8.94 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 8.44 (d, <i>J</i> = 9.6 Hz, 1H), 8.38 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 8.35–8.29 (m, 3H), 7.87 (t, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.73 (t, <i>J</i> = 7.8 Hz, 2H), 6.36 (s, 2H), 4.98 (s, 3H), 4.08 (s, 3H).	<sup>13</sup> C NMR (151 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 163.4, 150.4, 149.6, 148.8, 148.7, 135.3, 134.5, 132.4, 132.0, 131.4, 130.4, 130.4, 129.0, 129.0, 128.0, 128.0, 125.2, 122.8, 120.0, 119.1, 118.7, 109.4, 105.8, 104.4, 102.7, 57.2, 52.4.	C <sub>27</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>5</sub> Cl [M–Cl] <sup>+</sup> Calcd.: 438.133 6, Found: 438.133 5.
5c	67	240–242	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 10.31 (s, 1H), 9.47 (s, 1H), 9.17 (d, <i>J</i> = 9.6 Hz, 1H), 9.03 (d, <i>J</i> = 3.6 Hz, 1H), 8.95 (d, <i>J</i> = 9.6 Hz, 1H), 8.65 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 8.45 (d, <i>J</i> = 9.6 Hz, 1H), 8.39 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 8.35 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.79 (dd, <i>J</i> = 7.8, 4.8 Hz, 1H), 6.37 (s, 2H), 4.99 (s, 3H), 4.09 (s, 3H).	<sup>13</sup> C NMR (151 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 162.3, 154.5, 150.9, 150.3, 149.6, 148.9, 148.7, 138.1, 134.7, 132.4, 132.0, 131.4, 128.0, 125.3, 125.2, 124.4, 124.2, 123.1, 120.0, 119.0, 118.7, 105.8, 104.4, 102.7, 57.3, 52.5.	C <sub>26</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> Cl [M–Cl] <sup>+</sup> Calcd.: 439.128 9, Found: 439.128 5.
9a	59	237–239	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) δ 9.85 (s, 1H), 8.74 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 8.56 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 8.18 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 8.12 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 7.43 (s, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.23 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2H), 4.07 (s, 3H), 3.66 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2H), 3.55–3.47 (m, 1H), 2.91 (t, <i>J</i> = 3.6 Hz, 1H), 2.41 (t, <i>J</i> = 3.6 Hz, 1H), 2.00–1.91 (m, 1H), 1.85–1.75 (m, 2H), 1.71–1.61 (m, 3H), 1.60–1.53 (m, 1H), 1.42–1.35 (m, 1H).	<sup>13</sup> C NMR (151 MHz, CD <sub>3</sub> OD) δ 172.4, 150.8, 147.5, 144.9, 141.7, 136.4, 129.8, 128.6, 126.1, 124.8, 123.7, 122.8, 122.0, 120.3, 119.7, 117.5, 115.9, 110.1, 103.2, 56.5, 56.0, 45.8, 40.8, 39.9, 37.0, 32.0, 28.8, 26.3, 24.2.	C <sub>29</sub> H <sub>26</sub> NO <sub>5</sub> Cl [M–Cl] <sup>+</sup> Calcd.: 468.180 6, Found: 468.181 0.
9b	47	182–184	<sup>1</sup> H NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 9.85 (s, 1H), 9.08 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 8.94 (d, <i>J</i> = 9.5 Hz, 1H), 8.39 (d, <i>J</i> = 9.5 Hz, 1H), 8.25 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 6.42 (s, 2H), 5.29 (t, <i>J</i> = 6.5 Hz, 2H), 4.08 (s, 3H), 3.64 (t, <i>J</i> = 6.5 Hz, 2H), 3.14 (t, <i>J</i> = 6.5 Hz, 1H), 2.45–2.31 (m, 4H), 2.12–2.06 (m, 2H), 2.02–1.89 (m, 2H), 1.85–1.63 (m, 4H).	<sup>13</sup> C NMR (126 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 174.6, 150.7, 147.3, 146.0, 141.5, 136.7, 130.2, 128.6, 127.2, 125.7, 123.8, 123.0, 122.8, 121.4, 120.2, 117.5, 116.4, 110.9, 103.5, 57.8, 56.8, 54.3, 47.1, 47.1, 44.2, 43.6, 43.6, 37.4, 37.4, 34.5, 26.4.	C <sub>31</sub> H <sub>28</sub> NO <sub>5</sub> Cl [M–Cl] <sup>+</sup> Calcd.: 494.196 2, Found: 494.196 9.
9c	40	226–228	<sup>1</sup> H NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 9.47 (s, 1H), 9.04 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 8.90 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 8.36 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H), 8.21 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 7.61 (s, 1H), 6.41 (s, 2H), 5.30 (s, 2H), 4.07 (s, 3H), 3.64 (s, 2H), 2.23 (s, 5H), 2.14 (s, 3H), 1.86 (s, 7H).	<sup>13</sup> C NMR (126 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 174.0, 150.0, 146.7, 145.1, 140.9, 135.9, 129.6, 128.0, 126.6, 125.2, 123.2, 122.4, 122.2, 120.8, 119.5, 116.9, 115.8, 110.3, 102.9, 57.2, 56.2, 40.9, 38.1, 38.1, 38.1, 35.8, 35.8, 35.8, 27.2, 27.2, 25.8.	C <sub>32</sub> H <sub>30</sub> NO <sub>5</sub> Cl [M–Cl] <sup>+</sup> Calcd.: 508.211 9, Found: 508.211 5.
9d	38	199–201	<sup>1</sup> H NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 9.83 (s, 1H), 9.08 (d, <i>J</i> = 9.5 Hz, 1H), 8.94 (d, <i>J</i> = 9.5 Hz, 1H), 8.39 (d, <i>J</i> = 9.5 Hz, 1H), 8.25 (d, <i>J</i> = 9.5 Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 6.42 (s, 2H), 5.29 (t, <i>J</i> = 6.5 Hz, 2H), 4.08 (s, 3H), 3.65 (t, <i>J</i> = 6.5 Hz, 2H), 2.61 (s, 2H), 2.37 (s, 2H), 2.23–2.13 (m, 8H), 1.82–1.67 (m, 2H).	<sup>13</sup> C NMR (126 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 173.0, 150.5, 147.3, 145.8, 141.5, 136.2, 130.2, 128.6, 127.2, 125.7, 123.9, 123.2, 122.8, 121.4, 120.0, 117.5, 116.4, 110.9, 103.5, 68.9, 57.8, 56.7, 47.8, 46.6, 45.3, 39.9, 37.0, 34.2, 31.0, 26.4.	C <sub>32</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>5</sub> Cl <sub>2</sub> [M–Cl] <sup>+</sup> Calcd.: 542.172 9, Found: 542.173 7.
9e	43	201–203	<sup>1</sup> H NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 9.84 (s, 1H), 9.08 (d, <i>J</i> = 9.5 Hz, 1H), 8.94 (d, <i>J</i> = 9.5 Hz, 1H), 8.39 (d, <i>J</i> = 9.5 Hz, 1H), 8.25 (d, <i>J</i> = 9.5 Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 6.42 (s, 2H), 5.30 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 4.08 (s, 3H), 3.65 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 2.82 (s, 2H), 2.42 (s, 4H), 2.32 (s, 2H), 2.27–2.17 (m, 4H), 1.79 (s, 2H).	<sup>13</sup> C NMR (126 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 173.1, 150.7, 147.5, 146.0, 141.7, 136.4, 130.4, 128.8, 127.4, 125.9, 124.1, 123.4, 123.0, 121.6, 120.2, 117.7, 116.6, 111.1, 103.7, 66.2, 58.0, 56.9, 49.4, 48.3, 45.9, 39.8, 37.2, 37.2, 34.3, 32.0, 32.0, 26.6.	C <sub>32</sub> H <sub>29</sub> BrNO <sub>5</sub> Cl [M–Cl] <sup>+</sup> Calcd.: 586.122 4, Found: 586.123 5.
9f	31	190–192	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 10.19 (s, 1H), 9.04 (d, <i>J</i> = 9.6 Hz, 1H), 8.90 (d, <i>J</i> = 9.6 Hz, 1H), 8.38 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 2H), 8.20 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 7.61 (s, 1H), 6.41 (s, 2H), 5.27 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2H), 4.09 (s, 3H), 3.64 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2H), 2.64 (s, 2H), 2.04 (s, 2H), 1.82 (s, 6H), 1.77–1.69 (m, 6H).	<sup>13</sup> C NMR (151 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 168.0, 150.2, 146.7, 145.7, 140.9, 135.4, 129.6, 128.0, 126.5, 125.2, 123.2, 122.6, 122.2, 120.8, 119.7, 116.9, 115.8, 110.3, 102.9, 56.9, 55.8, 48.0, 41.5, 41.5, 41.5, 36.2, 36.2, 36.2, 32.6, 27.9, 27.9, 27.9, 25.8.	C <sub>33</sub> H <sub>32</sub> NO <sub>5</sub> Cl [M–Cl] <sup>+</sup> Calcd.: 522.227 5, Found: 522.228 2.



**Scheme 1** Synthesis of compounds **3a-3d**. Reagents and conditions: (a) 20–30 mmHg, 195–210 °C, 40 min; (b) RCOCl, pyridine, CH<sub>3</sub>CN, 40–91 °C, 3 h



**Scheme 2** Synthesis of compounds **5a-5c**. Reagents and conditions: (a) 20–30 mmHg, 150–160 °C, 3 h; (b) RCOCl, triethylamine, CH<sub>3</sub>CN, 71 °C, 3 h, 9%–11% (over two steps)



**Scheme 3** Synthetic route for compounds **9a-9f**. Reagents and conditions: (a) NaBH<sub>4</sub>, 5% NaOH/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>OH, r.t., 3 h; (b) 40% glyoxal, HOAc/CH<sub>3</sub>CN, reflux, 6 h; (c) Methanol/HCl (3 : 1 by vol.), r.t., 24 h, 67% (over two steps); (d) 20–30 mmHg, 195–210 °C, 60 min; (e) SOCl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, reflux, 3 h; (f) Triethylamine, CH<sub>3</sub>CN, 71 °C, 3–6 h

MSSA/MRSA、VISA、甲氧西林敏感/耐药的表皮葡萄球菌 (methicillin-susceptible, -resistant *Staphylococcus epidermidis*, MSSE/MRSE)、耐万古霉素屎肠球菌 (vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, VRE) 在内的 9 株致病菌的体外抑菌活性 (表 2)。如图 1 所示, 首先, 将先导物 **1** 的 B 环移除获得白屈菜红碱骨架, 由此设计合成了 4 个白屈菜红碱衍生物 **4** 与 **5a~5c**, 它们对所有葡萄球菌活性相当或稍弱于 **1**, MIC 介于 2~8 μg·mL<sup>-1</sup> 之间; 但对 VRE 的活性明显提高, MIC 在 2~16 μg·mL<sup>-1</sup> 之间, 说明移除 B 环有利于抑菌谱的拓展。

为了克服先导物酯基极易被酯酶酶解的缺欠, 在 9-位引入体积较大的刚性基团以阻碍酯酶的进攻, 分别用 3-降金刚烷甲酰基、金刚烷甲酰基、金刚烷乙酰基等取代先导物 **1** 结构中体积较小的乙酰基, 获得 6 个 9-位刚性基团 CBBR 的酯型衍生物 **9a~9f**。其





中, 化合物 **9a**、**9b** 对测试菌株抑菌活性普遍优于先导物 **1**, MIC 介于 0.5~2 μg·mL<sup>-1</sup>, 特别是对 VISA 菌株活性是先导物的 32 倍, 是阳性对照药左氧氟沙星 (Lev) 的 16 倍。而 **9c~9f** 衍生物的活性均有所降低, 提示: 更大取代金刚烷的引入不利于保持活性。

然后, 将先导物 **1** 的 E 环移走由此得到了 4 个 9-酯取代小檗碱衍生物 **3a~3d**, 所得化合物的抑菌活性均完全丧失, MIC >64 μg·mL<sup>-1</sup>, 说明 E 环为活性必需片段。鉴于化合物 **9a**、**9b** 良好的抗 MSSA/MRSA 活性, 选两者作为代表性化合物进行下一步体外药代稳定性研究。

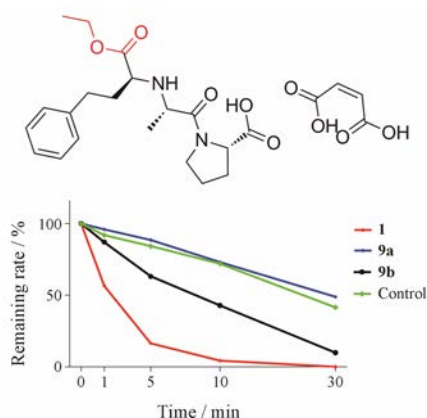
### 3 体外药代稳定性评价

选择活性较好、含刚性大基团的化合物 **9a**、**9b** 作为代表性化合物进行体外血液药代稳定性测定, 以含有酯键的降血压药物—依那普利马来酸盐 (enalapril maleate) 作为阳性对照药。取 SD 大鼠新鲜

**Table 2** Antibacterial activities of the target compounds against drug-susceptible and drug-resistant gram-positive strains. <sup>a</sup>The American Type Culture Collection (ATCC); <sup>b</sup>Strains isolated from patients in Chinese hospitals

No.	R	MIC/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$								
		MSSE	MRSE	MSSA		MRSA		VRSA	VRE	
		ATCC12228 <sup>a</sup>	13-3 <sup>b</sup>	ATCC29213 <sup>a</sup>	13-17 <sup>b</sup>	ATCC33591 <sup>a</sup>	13-18 <sup>b</sup>	ATCC700698 <sup>a</sup>	ATCC700221 <sup>a</sup>	12-1 <sup>b</sup>
<b>1</b>		1	2	1	1	4	1	16	>64	>64
<b>3a</b>	Methyl	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64
<b>3b</b>	Phenyl	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64
<b>3c</b>	2-Furyl	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64
<b>3d</b>		>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64
<b>4</b>	H	4	2	4	2	2	2	2	8	2
<b>5a</b>	Acetyl	2	2	2	2	2	4	1	4	4
<b>5b</b>	Benzoyl	8	4	4	4	8	8	4	16	4
<b>5c</b>		4	4	4	4	4	4	2	8	4
<b>9a</b>		0.5	1	1	0.5	0.5	1	0.5	>64	>64
<b>9b</b>	3-Noradamantyl	0.5	2	2	0.5	1	1	0.5	>64	>64
<b>9c</b>	1-Adamantyl	>128	>64	4	4	4	4	4	>64	>64
<b>9d</b>	3-Cl-1-Adamantyl	16	>64	16	16	16	16	4	>64	>64
<b>9e</b>	3-Br-1-Adamantyl	32	4	32	16	16	16	16	>64	>64
<b>9f</b>		>64	0.5	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64
Lev		0.06	4	0.06	0.5	0.125	32	8	0.5	0.125

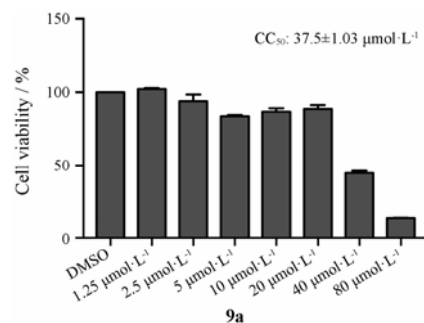
血液, 并用新鲜的血液孵育所测化合物, 5 个不同的时间点取样, LC-MS/MS 方法测定目标化合物含量。实验结果如图 2 所示, **9a**、**9b** 在体外全血孵育半小时后含量分别为 48%、9.9%, 均明显优于相应的先导物 **1** 的含量 0.4%; 尤其化合物 **9a** 的血液稳定性还优于 enalapril (42.6%)。结果提示: 化合物 **9a** 在体内拥有


**Figure 2** Structure of enalapril maleate, and the result summary of blood stability assay

相对较好的药代稳定性。

#### 4 初步安全性评价

鉴于 **9a** 具有良好的体外药代稳定性, 对 **9a** 进行了初步安全性评价, 包括对 A549 细胞的细胞毒及尾静脉急性毒性实验。细胞毒性实验结果如图 3 所示: 化合物 **9a** 对 A549 细胞株  $\text{CC}_{50}$  为  $37.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 结


**Figure 3** Cytotoxic effects of compound **9a** on A549 cells. Following pretreatment with compound **9a** at the indicated concentrations for 24 h, the cell viability of A549 cells were determined by MTT assay. Control cells were treated with 0.4% (v/v) DMSO

合其 MIC 值介于  $0.5\sim 1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $1\sim 2\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 治疗指数介于 18.7~37.5 之间。一次性给昆明小鼠尾静脉注射 (i.v.) 化合物 **9a**, 剂量分别为 0、20、30 和  $40\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 密切观察 7 天。小鼠急性毒性结果显示  $\text{LD}_{50}$  为  $30\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 说明化合物 **9a** 还具有相对较好的安全性。

## 结论

本课题组前期研究中首次发现全新结构骨架环化小檗碱衍生物 **1**, 具有独特的抗 MSSA/MRSA 活性, MIC 为  $1\sim 16\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。本研究以 **1** 为先导物, 以抗菌活性为导向, 针对分子中的 E 环、B 环以及 9-位侧链开展了结构修饰与优化, 共设计合成了 14 个不同类型的环化小檗碱衍生物, 包括小檗碱与白屈菜红碱衍生物。构效关系分析表明: ① E 环为活性必需片段; ② 移除 B 环抗 MRSA 活性有所降低, 但是抗 VRE 活性明显优于先导物, 拓宽了抑菌谱; ③ CBBR 的 9-位引入适当刚性基团有利于提高活性。其中, 化合物 **9a** 对标准与临床分离的 MSSA/MRSA 菌株的活性明显优于先导物 **1**, 尤其对临床难治的 MRSA、VISA 均显示良好活性, MIC 值介于  $0.5\sim 1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  之间, 提示该类衍生物抑菌的作用机制可能与临床使用抗菌药物不同。同时, **9a** 还具有较好的体外药代稳定性与安全性特征, 值得进一步研究。研究结果为此类化合物发展成一类新型抗 MRSA 候选物提供了关键的科学数据。

## 实验部分

熔点用 CXM-300 型精密熔点仪测定, 温度未校正;  $^1\text{H}$ NMR 和  $^{13}\text{C}$ NMR 用 Bruker Avance III 500 和 600 核磁共振仪测定, 溶剂为  $\text{DMSO}-d_6$  或  $\text{CD}_3\text{OD}$ ; HR-MS 用 Autospec Ultima-TOF 质谱测定仪测定; Flash 柱分离纯化用 Combiflash Rf 200 快速制备液相; 荧光检测用 ZF-20D 暗箱式紫外分析仪; 薄层色谱 (TLC) 采用 E-Merck 公司预铺硅胶铝箔卷; 试剂均为分析纯。

### 1 化学合成

#### 1.1 化合物 **3a**~**3d** 的合成

在  $195\sim 210\ ^\circ\text{C}$  负压 ( $20\sim 30\ \text{mmHg}$ ) 下, 将小檗碱 (3.71 g, 10 mmol) 加热 30 min 得紫黑色油状物, 经 5% 盐酸/乙醇酸化, 减压除去溶剂。所得固体以二氯甲烷/甲醇为流动相, 经硅胶柱分离纯化得橙红色固体 **2** (2.85 g, 80%)。随后将化合物 **2** (100 mg, 0.28

mmol) 溶于无水乙腈 (5 mL) 中, 加入吡啶 (101  $\mu\text{L}$ , 1.26 mmol) 和相应酰氯 (0.84 mmol),  $40\sim 91\ ^\circ\text{C}$  反应  $5\sim 6\ \text{h}$ 。冷却至固体完全析出, 抽滤, 滤出固体分别用水和二氯甲烷洗涤, 即可得目标化合物 **3a**~**3d**。

#### 1.2 化合物 **4** 与 **5a**~**5c** 的合成

在  $150\sim 160\ ^\circ\text{C}$  负压 ( $20\sim 30\ \text{mmHg}$ ) 下, 将白屈菜红碱 (3.84 g, 10 mmol) 加热 3 h 得棕色固体, 经 5% 盐酸/乙醇酸化, 减压除去溶剂。以二氯甲烷/甲醇为流动相, 经硅胶柱分离纯化得目标物 **4** (100 mg, 0.27 mmol) 溶于无水乙腈 (5 mL) 中, 加入三乙胺 (170  $\mu\text{L}$ , 1.22 mmol) 和相应酰氯 (0.81 mmol),  $71\ ^\circ\text{C}$  反应  $5\sim 6\ \text{h}$ 。冷却至固体完全析出, 抽滤, 滤饼分别用水和二氯甲烷洗涤, 得目标化合物 **5a**~**5c**。

#### 1.3 化合物 **9a**~**9f** 的合成

将溶有硼氢化钠 (0.83 g, 22 mmol) 的 5% 氢氧化钠溶液 10 mL 逐滴加入至含小檗碱 (7.4 g, 20 mmol) 和碳酸钾 (8.3 g, 60 mmol) 的 250 mL 甲醇溶液体系中, 室温搅拌 3 h, 抽滤收集析出的黄绿色固体, 滤饼依次用蒸馏水 (100 mL) 和 80% 乙醇 (100 mL) 洗涤, 得到黄绿色二氢小檗碱 **6** (7.1 g, 81%)。将 **6** (7.1 g, 21 mmol) 溶解在 160 mL 乙腈中, 然后分别加入 40 mL 乙酸和 3 mL 40% 乙二醛水溶液, 加热至  $85\sim 90\ ^\circ\text{C}$  回流 6 h, 将反应液浓缩, 得到未经纯化的深红色油状物 **7**, 加入体积比为 1:3 的浓盐酸与甲醇 200 mL, 室温搅拌 24 h, 将反应液浓缩, 以二氯甲烷/甲醇为流动相, 经硅胶柱分离纯化得橙红色关键中间体 CBBR (5.6 g, 67%)。

在  $195\sim 210\ ^\circ\text{C}$  负压 ( $20\sim 30\ \text{mmHg}$ ) 下, 将 CBBR (3.95 g, 10 mmol) 加热 60 min 得紫黑色固体。产物经 5% 盐酸/乙醇酸化, 减压除去溶剂, 以二氯甲烷/甲醇为流动相, 经硅胶柱分离纯化得红色固体 **8** (3.5 g, 92%)。

**1.3.1 方法一: 化合物 **9a**、**9b** 和 **9e**~**9f** 的合成** 氮气保护下, 室温将二氯亚砷 (3 mL) 滴加到溶有相应羧酸 (0.78 mmol) 的二氯甲烷 (4 mL) 溶液中,  $48\ ^\circ\text{C}$  回流 3 h, 冷却、浓缩, 向反应体系中加入 5 mL 甲苯, 浓缩, 重复操作 3 次, 得到相应的酰氯不经分离直接用于下步反应。将化合物 **8** (100 mg, 0.26 mmol) 和上步所得的产物混悬于干燥乙腈 (5 mL) 中, 加入三乙胺 (163  $\mu\text{L}$ , 1.17 mmol),  $71\ ^\circ\text{C}$  反应  $5\sim 6\ \text{h}$ 。冷却至固体完全析出, 抽滤, 滤饼分别用水和二氯甲烷洗, 得目标化合物 **9a**、**9b**、**9e**~**9f**。

**1.3.2 方法二: 化合物 **9c**、**9d** 的合成** 化合物 **8** (100 mg, 0.26 mmol) 混悬于无水乙腈 (5 mL) 中, 加入三

乙胺 (163  $\mu\text{L}$ , 1.17 mmol) 和相应酰氯 (0.78 mmol), 71  $^{\circ}\text{C}$  反应 5~6 h。冷却至固体完全析出, 抽滤, 滤饼分别用水和二氯甲烷洗, 得目标化合物 **9c**、**9d**。

## 2 生物实验

### 2.1 抗阳性菌活性 MIC 测定

参照 CLSI 标准, 采用平皿二倍稀释法 (agar dilution) 进行药敏实验。实验菌用 MH 肉汤或脑心浸液增菌, 药液用 MH 肉汤二倍稀释成各种所需浓度, 分别加适量到平皿中, MH 琼脂培养基融化后定量注入含药液的平皿内混匀。样品终浓度分别为 64、32……0.06、0.03  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。接种实验菌 (接种量为每点  $1\times 10^4$  cfu) 后置 35  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养 18 h 后观察结果, 无菌生长的平皿中所含药物最小的浓度即为 MIC。

### 2.2 体外药代稳定性实验

实验当天取 SD 大鼠新鲜血液于 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴中保温, 选 enalapril 为阳性对照药。用 DMSO 将化合物 **9a**、**9b** 和 enalapril 配置成 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  溶液, 后用 45% MeOH/H<sub>2</sub>O 稀释到 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 取 2  $\mu\text{L}$  稀释后的上述溶液置于 98  $\mu\text{L}$  新鲜血液中, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴中都分别孵育 0、1、5、10、30 min, 到达设置孵育时间后, 迅速加入 100  $\mu\text{L}$  水和 800  $\mu\text{L}$  孵育终止液 (含 200  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  甲苯磺丁脲和 20  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  丁螺环酮乙腈溶液), 以 4000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 20 min。取 100  $\mu\text{L}$  上清液与 200  $\mu\text{L}$  水混合, 振荡 10 min, 随后取样用 LC-MS/MS 分析。

### 2.3 细胞毒性实验

取对数生长期 A549 细胞制备单细胞悬液, 以每孔  $6\times 10^3$  个细胞密度接种于 96 孔板, 每组设置 3 个复孔, 同时设空白对照 (仅加培养液)。待细胞密度达到 50% 左右, 加入相应的药物作用 24 h 后, 每孔加入 5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  MTT 溶液 20  $\mu\text{L}$ , 继续培养 4 h。每孔加入 DMSO 150  $\mu\text{L}$ , 振荡 10 min, 使紫色结晶充分溶解, 酶标仪检测各孔吸光度 ( $A_{570}$ ) 值。

### 2.4 急性毒性实验

以昆明种小鼠 (18~20 g) 为动物模型, 称重后随机分组, 每组 10 只, 雌雄各半, 分别一次性以 0、20、30 和 40  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  的剂量尾静脉注射给药, 密切观察动物 7 天内的死亡情况, 计算半数致死量 ( $\text{LD}_{50}$ )。

## References

- [1] Listed N. Classics in infectious diseases. "On abscesses". Alexander Ogston (1844-1929) [J]. Rev Infect Dis, 1984, 6: 122-128.
- [2] Kupferschmidt K. Infectious diseases. Genome study helps contain MRSA outbreak-and breeds new questions [J]. Science, 2012, 338: 1019.
- [3] Roberts S, Chambers S. Diagnosis and management of *Staphylococcus aureus* infections of the skin and soft tissue [J]. Intern Med J, 2005, 35: S97-S105.
- [4] Mitchell DH, Howden BP. Diagnosis and management of *Staphylococcus aureus* bacteraemia [J]. Intern Med J, 2005, 35: S17-S24.
- [5] Murdoch DR, Corey GR, Hoen B, et al. Clinical presentation, etiology and outcome of infective endocarditis in the 21<sup>st</sup> century: the international collaboration on endocarditis-prospective cohort study [J]. Arch Intern Med, 2009, 169: 463-473.
- [6] Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections [J]. N Engl J Med, 1998, 339: 520-532.
- [7] Levy SB. Multidrug resistance--a sign of the times [J]. N Engl J Med, 1998, 338: 1376-1378.
- [8] Neu HC. The crisis in antibiotic resistance [J]. Science, 1992, 257: 1064-1073.
- [9] Kong KF, Schneper LK. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology [J]. APMIS, 2010, 118: 1-36.
- [10] Purrello SM, Garau J, Giamarellos E, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: a review of the currently available treatment options [J]. J Glob Antimicrob Resist, 2016, 7: 178-186.
- [11] Auckland C, Teare L, Cooke F, et al. Linezolid-resistant *enterococci*: report of the first isolates in the United Kingdom [J]. J Antimicrob Chemother, 2002, 50: 743-746.
- [12] Grundmann H, Airesdesousa M, Boyce J, et al. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat [J]. Lancet, 2006, 368: 874-885.
- [13] Hidayat LK, Hsu DI, Quist R, et al. High-dose vancomycin therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: efficacy and toxicity [J]. Arch Intern Med, 2006, 166: 2138-2144.
- [14] Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility [J]. J Antimicrob Chemother, 1997, 40: 135-136.
- [15] Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin [J]. Lancet, 1997, 350: 1670-1673.
- [16] Li YH, Yang P, Kong WJ, et al. Berberine analogues as a novel class of the low-density-lipoprotein receptor up-regulators:

- synthesis, structure-activity relationships, and cholesterol-lowering efficacy [J]. *J Med Chem*, 2009, 52: 492–501.
- [17] Wang YX, Fu HG, Li YH, et al. Synthesis and biological evaluation of 8-substituted berberine derivatives as novel anti-mycobacterial agents [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2012, 2: 581–587.
- [18] Li YH, Fu HG, Su F, et al. Synthesis and structure-activity relationship of 8-substituted protoberberine derivatives as a novel class of antitubercular agents [J]. *Chem Cent J*, 2013, 7: 117.
- [19] Li YH, Liu YX, Wang YX, et al. Synthesis and biological evaluation of new 13-*n*-nonylprotoberberine derivatives as antitubercular agents [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2013, 3: 38–45.
- [20] Yang P, Song DQ, Li YH, et al. Synthesis and structure-activity relationships of berberine analogues as a novel class of low-density-lipoprotein receptor up-regulators [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18: 4675–4677.
- [21] Yao J, Kong WJ, Jiang JD. Learning from berberine: treating chronic diseases through multiple targets [J]. *Sci China Life Sci (中国科学:生命科学)*, 2015, 58: 854–859.
- [22] Heidarian E, Rafieian-Kopaei M, Khoshdel A, et al. Metabolic effects of berberine on liver phosphatidate phosphohydrolase in rats fed on high lipogenic diet: an additional mechanism for the hypolipidemic effects of berberine [J]. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2014, 4: 429–435.
- [23] Bi CW, Zhang CX, Li YB, et al. Synthesis and structure-activity relationship of cycloberberine as anti-cancer agent [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2013, 48: 1800–1806
- [24] Li YB, Zhao WL, Wang YX, et al. Discovery, synthesis and biological evaluation of cycloprotoberberine derivatives as potential antitumor agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2013, 68: 463–472.