

## 他克林-苯酚-联苯双酯杂合物的合成、胆碱酯酶抑制活性及肝毒性评价

洪琛<sup>1</sup>, 赵永梅<sup>2\*</sup>, 郭卉艳<sup>3</sup>, 罗稳<sup>3\*</sup>

(1. 河南大学淮河医院, 河南 开封 475004; 2. 河南应用技术职业学院制药工程学院, 河南 开封 475004;  
3. 河南大学天然药物与免疫工程重点实验室, 河南 开封 475004)

**摘要:** 本文设计合成了一系列他克林-苯酚-联苯双酯杂合物 (**7a**~**7e**, **8a**~**8e**) 作为胆碱酯酶抑制剂, 并对其进行了肝毒性活性评价。结果表明, 这些化合物具有较强的胆碱酯酶抑制活性, 半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 值达到纳摩级, 部分化合物优于对照药物他克林, 其中 **8d** 对乙酰胆碱酯酶 (AChE) 的抑制活性最强,  $IC_{50}$  值为  $156.39 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , **7b** 对丁酰胆碱酯酶的活性最强,  $IC_{50}$  值为  $16.33 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。酶动力学及分子对接表明化合物 **8d** 能够同时作用于 AChE 的催化活性位点和外周结合位点。另外, 这些化合物对肝细胞的体外毒性较低, **8d** 没有明显增加 HepG2 细胞内活性氧水平。

**关键词:** 他克林; 胆碱酯酶; 肝毒性; 阿尔茨海默症

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)09-2759-08

## Synthesis, cholinesterase inhibition and hepatotoxicity of tacrine-phenol-bifendate hybrids

HONG Chen<sup>1</sup>, ZHAO Yong-mei<sup>2\*</sup>, GUO Hui-yan<sup>3</sup>, LUO Wen<sup>3\*</sup>

(1. Huaihe Hospital, Henan University, Kaifeng 475004, China; 2. Pharmaceutical Engineering Department, Henan Vocational College of Applied Technology, Kaifeng 475004, China; 3. Key Laboratory of Natural Medicine and Immuno-Engineering, Henan University, Kaifeng 475004, China)

**Abstract:** A series of tacrine-phenol-bifendate hybrids (**7a**–**7e**, **8a**–**8e**) were designed, synthesized and evaluated as inhibitors of cholinesterases (ChEs) with low hepatotoxicity. All the compounds had potent ChEs inhibitory activity with half-inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) values at the nanomolar range. Compound **8d** exhibited the strongest inhibition to acetylcholinesterase (AChE) with an  $IC_{50}$  value of  $156.39 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  and compound **7b** showed the most potent inhibition for butyrylcholinesterase with  $IC_{50}$  value of  $16.33 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Kinetic and molecular modeling studies showed that **8d** targeted both the catalytic active site and the peripheral anionic site of AChE. In addition, these compounds showed low toxicity to hepatocytes, and compound **8d** did not increase the level of reactive oxygen species in HepG2 cells.

**Key words:** tacrine; cholinesterase; hepatotoxicity; Alzheimer's disease

收稿日期: 2022-04-18; 修回日期: 2022-05-13.

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目 (2018020333); 河南省重点研发与推广专项 (212102311030); 河南应用技术职业学院项目 (2020-HJ-22).

\*通讯作者 Tel: 18737850712, E-mail: zhaoyongmei\_2004@163.com;

Tel: 15225477220, E-mail: luowen83@henu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0437

阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD) 是一种伴随着认知障碍、记忆丧失的神经退行性疾病<sup>[1]</sup>, 是引起老年性痴呆最常见的原因, 大约 50%~75% 的痴呆由此引发。据统计, 目前全球大约有 5 000 万 AD 患者, 随着世界人口老龄化进程加快, AD 患者人数将逐年上升, 预计到 2050 年可能达到 1.15 亿<sup>[2]</sup>。目前的治疗药

物只能缓解病情,不能根治,长期的护理和医疗保健的费用十分巨大,AD已经成为一个严重影响人类健康和全球经济发展的重大疾病!

虽然众多国际制药巨头和科研机构在AD发病机制和治疗方法上投入了大量的时间和精力,迄今为止其发病机制仍然没有完全阐明,但是许多研究结果表明,患者脑中低的乙酰胆碱水平、 $\beta$ -淀粉样蛋白( $\beta$ -amyloid, A $\beta$ )的异常聚集、 $\tau$ -蛋白过度磷酸化及氧化损伤等在发病过程中扮演着重要的角色<sup>[3]</sup>。近两年AD药物研发取得重大进展,获批了两个新药:我国批准的靶向脑-肠轴的GV-971<sup>[4]</sup>和美国FDA批准的A $\beta$ 单抗aducanumab<sup>[5]</sup>,虽然已经获批,但仍存在较大争议,治疗效果还有待于临床上的验证。因此目前临床上用于治疗AD的药物仍然以胆碱酯酶抑制剂为主,如多奈哌齐、利斯的明、加兰他敏及我国的石杉碱甲,它们通过抑制胆碱酯酶的活性,提高患者脑内的乙酰胆碱水平从而改善患者的记忆认知功能<sup>[6]</sup>。

人的中枢神经系统中存在着乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)和丁酰胆碱酯酶(butyrylcholinesterase, BChE),这两种酶对乙酰胆碱都具有调节作用<sup>[7]</sup>。当AD发展到中后期,AChE水平减少,而BChE的水平会增加,从而补偿了对乙酰胆碱的水解<sup>[8]</sup>,因此BChE也是一个重要的治疗靶点<sup>[9]</sup>,并且研究表明同时作用于两种胆碱酯酶的抑制剂对AD患者可能更为有利<sup>[10]</sup>。

他克林(tacrine)是FDA批准的第一个用于治疗AD的胆碱酯酶抑制剂,但它会引起肝毒性,导致50%左右的患者转氨酶升高<sup>[11]</sup>,已经退出了临床使用。但“多靶点/多功能小分子”的提出使他克林又重新成为药物化学家们关注的焦点。首先,他克林具有很强的胆碱酯酶抑制活性,半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)值在纳摩尔范围;其次,它的化学结构简单,易于修饰,可以方便地与其他活性片段连接,从而生成多功能的胆碱酯酶抑

制剂,如他克林-阿魏酸、他克林-水飞蓟宾、他克林-白藜芦醇、他克林-黄酮杂合物等(图1, A~D)<sup>[12-15]</sup>。然而这些工作大多聚焦于增效作用,对减毒作用关注较少。本课题组前期曾针对他克林的肝毒性,设计合成了一些他克林-联苯双酯杂合物(图1, E),它们显示出了比他克林更低的肝毒性<sup>[16]</sup>。因此,在前期基础上,本文合成了一系列他克林-苯酚-联苯双酯杂合物,以易断裂的酯键相连,希望其能发挥协同作用,即联苯双酯的肝保护作用和他克林-苯酚片段的胆碱酯酶抑制及抗氧化活性。

目标化合物7a~7e和8a~8e均为新化合物,未见文献报道,其结构通过<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR、及HR-MS确证,纯度通过HPLC测定,化合物9~11的合成参考文献<sup>[17]</sup>报道,作为对照化合物以探讨构效关系,化合物的合成见合成路线1。

## 结果与讨论

### 1 目标化合物的合成

中间体2以联苯双酯为起始原料,经过碱水解、酞酐脱水 and 醇解三步反应得到<sup>[18]</sup>,产率较高。中间体2与二氯亚砷在DMF和二氧六环的混合液中反应生成酰氯3,3易水解不宜久置,新制后立即与3-羟基苯甲醛或4-羟基苯甲醛反应,得到中间体4a、4b。曾用中间体2直接与羟基苯甲醛反应制备4a、4b,以二环己基碳二亚胺(DCC)和4-二甲氨基吡啶(DMAP)联合催化室温搅拌,但产物难以提纯,因此未用此法。中间体6a~6e的合成路线比较成熟,以化合物5为起始原料<sup>[19]</sup>,在正戊醇中KI催化下与过量的二胺反应,产率大于50%<sup>[20]</sup>。值得注意的是,在后处理中,过量的二胺应尽量蒸除,另外柱色谱分离时洗脱剂中需要加入少量氨水防止拖尾。目标产物7a~7e和8a~8e的合成是将醛4a、4b与胺6a~6e缩合生成希夫碱,然后经NaBH<sub>4</sub>还原得到,两步均为室温反应,连续进行,条件

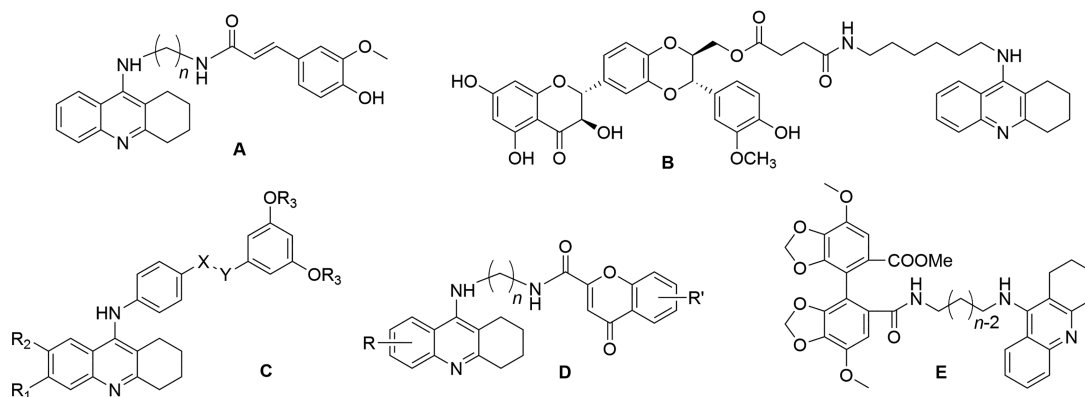
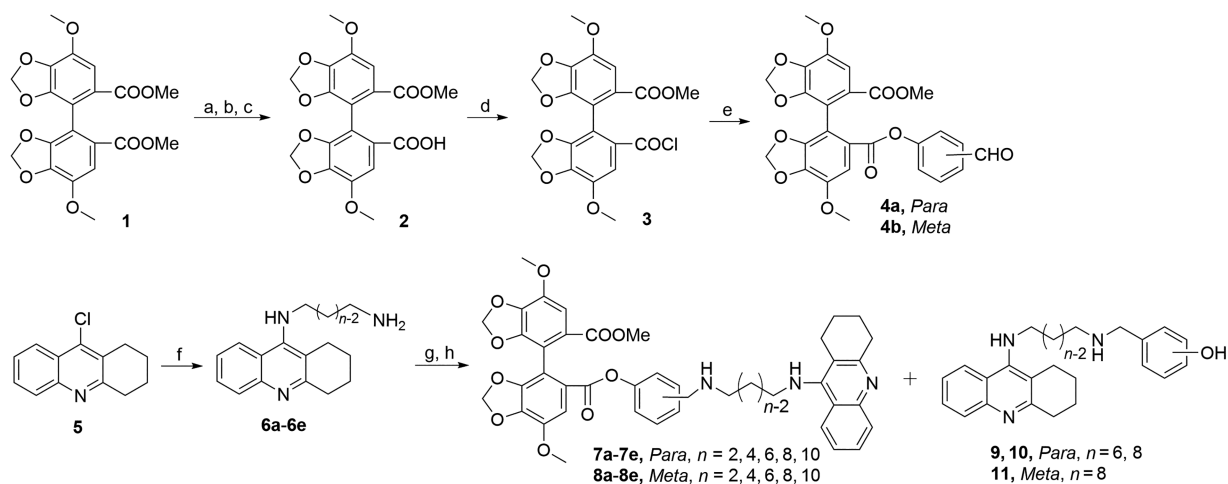


Figure 1 Structures of the reported tacrine derivatives



Reagents and conditions: (a) 5% KOH, reflux, 6 h; (b) (Ac)<sub>2</sub>O, reflux 12 h; (c) MeOH, reflux, 9 h; (d) SOCl<sub>2</sub>, 1,4-dioxane, DMF (one drop), 115 °C, 2 h; (e) 3-Hydroxybenzaldehyde or 4-hydroxybenzaldehyde, CHCl<sub>3</sub>, Et<sub>3</sub>N, rt, 24 h; (f) Diamine, KI, 1-pentanol, 160 °C, 10 h; (g) MeOH, 4a-4b or benzaldehyde, rt, 8 h; (h) NaBH<sub>4</sub>, MeOH, overnight

Scheme 1 Synthetic route of the target compounds 7a-7e, 8a-8e and 9-11

温和, 操作简单。

## 2 胆碱酯酶抑制活性

采用 Ellman 法<sup>[21]</sup>对化合物进行了胆碱酯酶抑制活性测试, 他克林作为对照药物, 结果见表1。由表可以看出, 所有化合物对两种胆碱酯酶均显示出了较强的抑制活性, IC<sub>50</sub>值在纳摩尔范围, 通过分析化合物的结构和活性, 可以得出以下构效关系:

① 当取代基的位置相同时, 链长 ( $n$ ) 对间位取代化合物 (8a~8e) 胆碱酯酶抑制活性的影响大于对位取代化合物 (7a~7e)。例如 8a~8e 对 AChE 的 IC<sub>50</sub> 值为 156~1 072 nmol·L<sup>-1</sup>, 而 7a~7e 为 200~400 nmol·L<sup>-1</sup>; 8a~8e 对 BChE 的 IC<sub>50</sub> 值随着链长的增加而减小, 而 7a~7e 的 IC<sub>50</sub> 值 (除了 7b) 变化不明显, 为 60~70 nmol·L<sup>-1</sup>。8a~8e 对 AChE 的抑制活性, 随着链长的增加先增后减, 其中 8d ( $n = 8$ ) 活性最强, IC<sub>50</sub> 值为 156.39 nmol·L<sup>-1</sup>; 而 8a~8e 对 BChE 的抑制活性随着链长的增加显著增强, 最强的为 8e ( $n = 10$ ), IC<sub>50</sub> 值为 21.45 nmol·L<sup>-1</sup>。

② 当链长相同但取代基位置不同时, 对位取代的化合物 (7a~7c 和 7e) 的 AChE 抑制活性均强于相同链长的间位取代化合物 (8a~8c 和 8e)。对于 BChE, 7a~7c ( $n = 2, 4, 6$ ) 的抑制活性强于 8a~8c, 其中 7b ( $n = 4$ ) 活性最强, IC<sub>50</sub> 值为 16.33 nmol·L<sup>-1</sup>, 但当  $n$  超过 6 时, 7d 和 7e 的抑制活性弱于 8d 和 8e。这是由于链长增加, 化合物 8 对 BChE 抑制活性逐渐增强造成的。

③ 通常他克林杂合物中的他克林部分作用在 AChE 的催化活性位点 (catalytic active site, CAS), 另一部分作用在周边阴离子 (peripheral anionic site, PAS) 位点, 这样的双位点结合模式能够增强抑制活

性。苯酚-联苯双酯片段连接后, 抑制活性比他克林的确有所提高, 但比仅连接了苯酚片段的化合物 (9~11) 活性弱, 表明体积太大的基团并不利于增强 AChE 抑制活性。另外, 未联接苯双酯片段的化合物 9~11 中, 10 ( $n = 8$ ) 对两种胆碱酯酶的抑制活性最强, 11 ( $n = 8$ ) 活性略弱, 9 ( $n = 6$ ) 的抑制活性最低。

## 3 酶动力学研究

目标化合物中活性最好的代表化合物为 8d, 对其 AChE 抑制动力学进行了研究。图 2A 中所有直线交

Table 1 Inhibitory activity of cholinesterases, selectivity index, and oxygen radical absorbance capacity (ORAC). <sup>a</sup>IC<sub>50</sub> values are mean of the three independent experiments; <sup>b</sup>AChE from electric eel; <sup>c</sup>BChE from equine serum; <sup>d</sup>SI = Selectivity index (IC<sub>50</sub> AChE/IC<sub>50</sub> BChE); <sup>e</sup>Data are expressed as (μmol trolox)/(μmol tested compound); <sup>f</sup>Compounds 9-11 were synthesized according to literature report<sup>[17]</sup>

Compd.	Subst.	$n$	IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup> <sup>a</sup>		SI <sup>d</sup>	ORAC <sup>e</sup>
			AChE <sup>b</sup>	BChE <sup>c</sup>		
7a	Para	2	202.81 ± 19.05	76.24 ± 1.50	2.7	< 0.2
7b	Para	4	243.68 ± 7.04	16.33 ± 1.74	14.9	< 0.2
7c	Para	6	282.15 ± 5.99	63.36 ± 1.10	4.5	< 0.2
7d	Para	8	254.35 ± 17.84	61.52 ± 4.99	4.1	< 0.2
7e	Para	10	390.49 ± 14.62	75.97 ± 7.25	5.2	< 0.2
8a	Meta	2	1 071.56 ± 63.86	96.39 ± 2.27	10.6	< 0.2
8b	Meta	4	322.89 ± 22.49	88.13 ± 4.19	3.7	< 0.2
8c	Meta	6	475.66 ± 32.35	78.63 ± 2.48	6.1	< 0.2
8d	Meta	8	156.39 ± 24.41	24.58 ± 2.05	6.4	< 0.2
8e	Meta	10	403.37 ± 35.6	21.45 ± 3.14	18.9	< 0.2
9 <sup>f</sup>	Para	6	26.52 ± 1.07	8.41 ± 0.47	3.2	1.9 ± 0.2
10 <sup>f</sup>	Para	8	6.84 ± 0.25	5.16 ± 0.38	1.3	1.6 ± 0.2
11 <sup>f</sup>	Meta	8	17.16 ± 1.33	6.71 ± 0.54	2.5	1.7 ± 0.1
Tacrine	-	-	192.60 ± 4.15	27.08 ± 1.16	7.1	< 0.2
Curcumin	-	-	-	-	-	2.8 ± 0.2

于坐标轴的第二象限,这是典型的混合型抑制作用类型,表明**8d**可能同时作用在AChE竞争性位点和非竞争性位点,即CAS和PAS。

#### 4 分子对接研究

为了进一步确证化合物**8d**与AChE的作用模式,采用AUTODOCK模拟软件进行了分子对接研究,AChE的蛋白编码为1ACJ,结果见图2B。在**8d**-TcAChE复合物中,**8d**占据了酶的可及腔、中间狭长通道和PAS部位。其中他克林部分以 $\pi$ - $\pi$ 相互作用夹在Trp84和Phe330之间,他克林上的氮原子与His440残基上的氧原子有氢键作用,距离为3.4 Å。联苯双酯部分通过疏水作用与PAS部位结合,其中氧原子与Ser286残基上的羟基有氢键作用,距离为3.3 Å。对接结果与酶动力学一致,表明化合物**8d**能够与AChE的双位点结合。

#### 5 抗氧化活性

采用氧自由基吸收能力(ORAC)测定法<sup>[22]</sup>,以姜黄素作为对照,水溶性维生素E类似物trolox为定量标准,测试了化合物的抗氧化能力(表1)。化合物**7a**~**7e**和**8a**~**8e**并未显示出抗氧化能力,ORAC值均小于0.2。而含羟基的前体化合物**9**~**11**的ORAC值分别为1.9、1.6和1.7,显示出了一定的抗氧化能力,但弱于对照姜黄素。由于抗氧化活性的分子能够减轻肝细

胞的氧化损伤,具有肝保护作用<sup>[23]</sup>,因此化合物**7a**~**7e**和**8a**~**8e**的酯键如能在体内分解,可能对他克林造成的肝毒性具有一定的保护作用。

#### 6 肝细胞毒性

采用了溴化噻唑蓝四氮唑(MTT)法测试了化合物对肝癌细胞HepG2和正常肝细胞HL-7702的体外毒性,他克林和米托蒽醌(mitoxantrone)作为对照药物,结果见表2。由表可以看出,他克林在 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下对两种细胞株的抑制率均大于30%,显示出一定的细胞毒性,与文献<sup>[24]</sup>相符。细胞毒药物米托蒽醌在 $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下对两种细胞株的抑制率>20%。相比之下,目标化合物**7a**~**7e**和**8a**~**8e**在低浓度下( $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),对两种细胞的抑制率小于10%,在高浓度下( $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )抑制率均小于25%。以上数据表明,目标化合物对两种肝细胞的体外毒性较低,因此在有效的胆碱酯酶抑制浓度下(纳摩尔级),不会显示出明显的毒性。

#### 7 细胞内ROS

通过2,7-二氯二氢-荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)测定了化合物**8d**和他克林对HepG2细胞内ROS的影响,不加化合物为空白对照(100%),结果见图3。相比于对照,他克林处理后的HepG2细胞内荧光强度随着

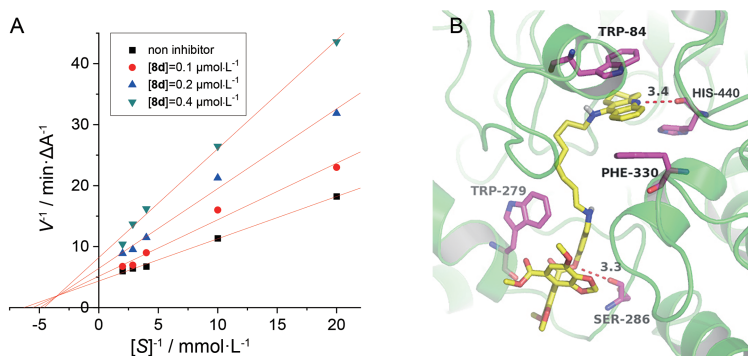


Figure 2 Lineweaver-Burk plots (A) and docking model (B) for **8d** with TcAChE

Table 2 Inhibition rate of the target compounds for HepG2 and HL-7702 cell lines. <sup>a</sup>Data are represented as mean  $\pm$  SD; <sup>b</sup>Tac: Tacrine; <sup>c</sup>Mito: Mitoxantrone

Compd.	HepG2/% <sup>a</sup>			HL-7702/% <sup>a</sup>		
	$1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
<b>7a</b>	$0.25 \pm 0.04$	$4.50 \pm 1.05$	$18.34 \pm 3.30$	$0.21 \pm 0.02$	$7.59 \pm 0.87$	$14.60 \pm 1.83$
<b>7b</b>	$1.37 \pm 0.26$	$6.42 \pm 0.35$	$15.56 \pm 2.47$	$0.86 \pm 0.09$	$6.64 \pm 1.85$	$19.16 \pm 3.23$
<b>7c</b>	$0.54 \pm 0.12$	$9.24 \pm 1.31$	$18.05 \pm 2.15$	$0.92 \pm 0.03$	$8.72 \pm 1.51$	$21.88 \pm 2.62$
<b>7d</b>	$0.40 \pm 0.06$	$7.50 \pm 0.68$	$21.29 \pm 3.18$	$0.24 \pm 0.03$	$4.19 \pm 0.74$	$20.62 \pm 1.53$
<b>7e</b>	$0.47 \pm 0.12$	$3.28 \pm 1.14$	$13.86 \pm 3.17$	$0.33 \pm 0.11$	$4.20 \pm 1.38$	$16.81 \pm 2.15$
<b>8a</b>	$1.61 \pm 0.10$	$6.67 \pm 1.42$	$20.48 \pm 2.45$	$2.63 \pm 0.44$	$2.92 \pm 1.23$	$15.32 \pm 1.13$
<b>8b</b>	$0.62 \pm 0.04$	$2.45 \pm 0.32$	$19.52 \pm 1.73$	$3.17 \pm 0.01$	$6.69 \pm 0.94$	$13.27 \pm 2.68$
<b>8c</b>	$1.85 \pm 0.35$	$8.63 \pm 0.66$	$24.19 \pm 2.91$	$0.74 \pm 0.03$	$3.43 \pm 1.06$	$13.88 \pm 2.67$
<b>8d</b>	$0.32 \pm 0.10$	$3.96 \pm 0.38$	$16.44 \pm 2.16$	$2.32 \pm 0.22$	$5.74 \pm 0.62$	$14.25 \pm 1.32$
<b>8e</b>	$1.63 \pm 0.26$	$9.53 \pm 1.48$	$21.18 \pm 2.16$	$0.85 \pm 0.16$	$9.08 \pm 1.67$	$23.08 \pm 2.96$
Tac <sup>b</sup>	$3.74 \pm 0.27$	$19.16 \pm 1.95$	$39.57 \pm 4.52$	$2.84 \pm 0.17$	$16.30 \pm 2.64$	$32.56 \pm 4.31$
Mito <sup>c</sup>	$45.23 \pm 4.11$	$86.53 \pm 5.92$	$96.26 \pm 3.92$	$20.03 \pm 2.40$	$78.68 \pm 6.41$	$89.11 \pm 4.62$

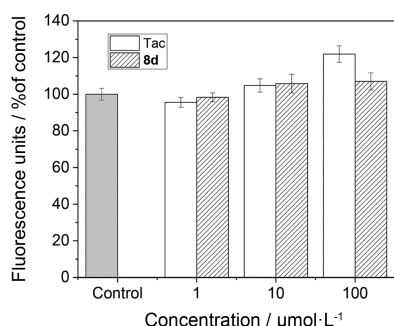


Figure 3 Measurement of intracellular ROS generation

浓度增加而明显增强, 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度下荧光强度为对照的 122%, 表明他克林诱导了细胞内 ROS 的产生, 而化合物 **8d** 处理后细胞内荧光强度未见明显增强, 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度下荧光强度为对照的 107%, 表明化合物 **8d** 并没有使细胞内 ROS 水平升高。

## 结论

综上所述, 本文合成了一系列新的他克林-苯酚-联苯双酯杂合物作为胆碱酯酶抑制剂并进行了肝毒性活性评价。结果表明, 所合成的化合物均显示出了较强的胆碱酯酶抑制活性, 其中化合物 **8d** 对 AChE 的抑制活性最强, 酶动力学和分子对接结果表明 **8d** 可以与 AChE 的 CAS 和 PAS 两个位点发生作用。另外, 这些化合物的肝细胞毒性较弱, **8d** 对 HepG2 细胞内 ROS 的产生影响不大。化合物的肝毒性较低可能与分子中的联苯双酯和苯酚片段有关, 其机制需要更加深入的药理实验证实。以上结果为进一步设计低毒的他克林类抗 AD 药物提供了重要依据。

## 实验部分

核磁共振氢谱、碳谱采用 DPX-400 型核磁共振仪测定 (瑞士布鲁克公司), TMS 为内标; 高分辨质谱采用 1260-6230 型高精度飞行时间质谱仪测定 (美国安捷伦公司); 化合物纯度使用 LC-20AB 高效液相色谱仪测定 (日本岛津公司), XB-C18 反相柱 4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 流动相为甲醇/水, 比例为 30:70~40:60; WFH2204B 型手提式紫外灯 (上海精科公司)。

薄层色谱硅胶 GF<sub>254</sub> 购于青岛海洋化工厂; 联苯双酯购于南京康满林化工实业有限公司; AChE (E.C. 3.1.1.7, 来源于电鳗)、丁酰胆碱酯酶 (BChE, E.C. 3.1.1.8, 来源于马血清)、硫代乙酰胆碱 (acetylthiocholine, ATC)、硫代丁酰胆碱 (butylthiocholine, BTC)、5,5'-二硫代双 (2-硝基苯甲酸) (DTNB)、盐酸他克林和米托蒽醌购于 Sigma-Aldrich 公司, 其他试剂均为市售分析纯, 未做

进一步处理。

## 1 化合物的合成

**1.1 中间体 4a、4b 的合成** 将中间体 **2** (1.0 mmol)、SOCl<sub>2</sub> (10 mmol)、DMF (0.2 mL) 和二氧六环 (4 mL) 加入到圆底烧瓶中, 115  $^{\circ}\text{C}$  加热搅拌 2 h, 冷却后蒸干, 得到白色固体 **3**。向烧瓶中加入氯仿 (10 mmol), 冰浴下加入 3-羟基苯甲醛或 4-羟基苯甲醛 (1.0 mmol) 和三乙胺 (0.5 mL), 自然升至室温搅拌 24 h。反应完毕, 蒸干溶剂, 加入 30 mL 氯仿, 分别用水和饱和食盐水洗涤 3 次, 取有机层, 无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 蒸除溶剂, 柱色谱纯化得中间体 **4a** 和 **4b**。

**4a** 白色固体, 产率 46%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.95 (s, 1H), 7.87 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.57 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.17 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 6.04 (s, 2H), 6.01 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H), 5.98 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H), 4.01 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 3.71 (s, 3H)。MS (ESI)  $m/z$ : 510.1 [M+H]<sup>+</sup>。

**4b** 白色固体, 产率 58%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.78 (s, 1H), 7.80~7.69 (m, 3H), 7.62 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 6.04 (s, 2H), 6.01 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H), 5.97 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H), 4.01 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.72 (s, 3H)。MS (ESI)  $m/z$ : 510.2 [M+H]<sup>+</sup>。

**1.2 目标化合物 7a~7e, 8a~8e 的合成通法** 在圆底烧瓶中加入 **4a** 或 **4b** (1.0 mmol), 用 15 mL 无水甲醇溶解, 加入相应的 **6a~6e** (1.0 mmol), 室温搅拌 8 h, 蒸干溶剂, 冰浴冷却下, 加入无水甲醇, 分批加入硼氢化钠 (0.23 g, 6.0 mmol), 升至室温, 搅拌过夜。反应完毕, 蒸干溶剂, 加水 20 mL, 乙酸乙酯萃取 3 次, 每次 20 mL, 合并有机相, 无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 蒸干溶剂, 柱色谱 (氯仿/甲醇/氨水 = 30:1:0.5%) 纯化得到目标化合物。

**7a** 淡黄色油状液体, 产率 46%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.99 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.90 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.53 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.33 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 7.29 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 6.96 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 6.03 (s, 2H), 5.99 (d,  $J = 10.4$  Hz, 2H), 5.00 (s, 1H), 4.00 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 3.78 (s, 2H), 3.70 (s, 3H), 3.54 (s, 2H), 3.12~3.02 (m, 2H), 2.92~2.83 (m, 2H), 2.73 (t,  $J = 5.8$  Hz, 2H), 1.94~1.85 (m, 4H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  166.3, 164.5, 158.5, 151.1, 149.9, 147.4, 147.2, 142.6, 142.5, 138.8, 138.3, 137.5, 129.1, 128.6, 128.3, 123.6, 123.3, 122.9, 122.8, 121.5, 120.4, 116.3, 112.7, 112.1, 111.7, 111.2, 102.5, 102.4, 56.7, 56.6, 52.9, 52.00, 49.2, 48.3, 34.00, 29.7, 24.9, 23.1, 22.9。纯度 97.8% (HPLC)。HR-MS (ESI):  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> (C<sub>41</sub>H<sub>39</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>) 计算值 734.271 4, 测量值

734.269 1。

**7b** 淡黄色油状液体，产率 59%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.84 (t, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.43 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.21 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.15 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.83 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 5.92 (s, 2H), 5.88 (d, *J* = 11.4 Hz, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.62 (s, 2H), 3.59 (s, 3H), 3.41 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.98~2.93 (m, 2H), 2.57 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 2.53 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.81~1.76 (m, 4H), 1.62~1.57 (m, 2H), 1.52~1.46 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166.3, 164.5, 158.0, 151.1, 149.8, 147.3, 147.2, 146.8, 142.6, 142.5, 138.8, 138.3, 137.7, 129.0, 128.6, 128.2, 123.7, 123.3, 122.9, 122.9, 121.4, 120.0, 115.6, 112.7, 112.1, 111.7, 111.2, 102.5, 102.4, 56.7, 56.6, 53.4, 52.0, 49.3, 48.8, 33.6, 29.5, 27.5, 24.8, 23.0, 22.7。纯度 98.3% (HPLC)。HR-MS (ESI): *m/z* [M+H]<sup>+</sup> (C<sub>43</sub>H<sub>43</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>) 计算值 762.302 7, 测量值 762.303 1。

**7c** 淡黄色油状液体，产率 63%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.97 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.56~7.50 (m, 2H), 7.33 (s, 1H), 7.30 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.28 (s, 2H), 6.91 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.00 (s, 2H), 5.97 (s, 1H), 5.94 (s, 1H), 4.45 (s, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.73 (s, 2H), 3.67 (s, 3H), 3.53 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.05 (s, 2H), 2.64 (s, 2H), 2.57 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.89~1.84 (m, 4H), 1.65 (p, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.49 (p, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.39~1.30 (m, 4H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166.3, 164.5, 156.8, 151.9, 149.8, 147.3, 147.2, 145.5, 142.5, 142.5, 138.7, 138.3, 137.2, 129.2, 129.2, 126.9, 123.9, 123.3, 123.2, 122.9, 121.4, 119.3, 114.8, 112.7, 112.1, 111.7, 111.2, 102.5, 102.4, 56.7, 56.6, 53.2, 52.0, 49.2, 49.0, 32.8, 31.5, 29.6, 27.0, 26.8, 24.6, 22.8, 22.3。纯度 99.2% (HPLC)。HR-MS (ESI): *m/z* [M+H]<sup>+</sup> (C<sub>45</sub>H<sub>47</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>) 计算值 790.334 0, 测量值 790.332 4。

**7d** 淡黄色油状液体，产率 55%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.95 (t, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.56~7.50 (m, 2H), 7.34 (s, 1H), 7.30 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.27 (t, *J* = 4.4 Hz, 2H), 6.91 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 5.99 (s, 2H), 5.97 (s, 1H), 5.94 (s, 1H), 4.27 (s, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.72 (s, 2H), 3.67 (s, 3H), 3.50 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.05 (s, 2H), 2.65 (s, 2H), 2.56 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.87 (s, 4H), 1.63 (p, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.50~1.43 (m, 2H), 1.35~1.24 (m, 8H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166.3, 164.5, 157.4, 151.5, 149.7, 147.3, 147.2, 146.2, 142.5, 142.5, 138.7, 138.3, 137.6, 129.1, 128.8,

127.5, 123.8, 123.3, 123.1, 122.9, 121.3, 119.6, 115.1, 112.7, 112.1, 111.7, 111.3, 102.5, 102.4, 56.7, 56.6, 53.3, 51.9, 49.4, 49.3, 33.2, 31.7, 29.9, 29.4, 29.3, 27.2, 26.8, 24.6, 22.9, 22.5。纯度 97.4% (HPLC)。HR-MS (ESI): *m/z* [M+H]<sup>+</sup> (C<sub>47</sub>H<sub>51</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>) 计算值 818.365 3, 测量值 818.363 4。

**7e** 淡黄色油状液体，产率 43%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.96 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.90 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.55~7.51 (m, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.35~7.31 (m, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.93 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.02 (s, 2H), 6.00 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 5.97 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 3.99 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 3.73 (s, 2H), 3.69 (s, 3H), 3.48 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.06 (s, 2H), 2.70 (s, 2H), 2.58 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.94~1.89 (m, 4H), 1.68~1.62 (m, 2H), 1.47 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.40~1.27 (m, 12H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166.3, 164.5, 158.4, 150.9, 149.7, 147.5, 147.3, 147.2, 142.6, 142.5, 138.7, 138.3, 138.0, 129.0, 128.7, 128.3, 123.6, 123.3, 122.9, 121.3, 120.2, 115.8, 112.7, 112.2, 111.6, 111.2, 102.5, 102.4, 56.7, 56.6, 53.5, 52.0, 49.6, 49.5, 34.0, 31.8, 30.1, 29.5, 29.5, 29.4, 27.4, 27.0, 24.8, 23.1, 22.8。纯度 98.4% (HPLC)。HR-MS (ESI): *m/z* [M+H]<sup>+</sup> (C<sub>49</sub>H<sub>55</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>) 计算值 846.396 6, 测量值 846.394 6。

**8a** 淡黄色油状液体，产率 69%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.99 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.51 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.31 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.15 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.02 (s, 1H), 6.89 (dd, *J* = 8.0, 1.4 Hz, 1H), 6.02 (s, 2H), 5.96 (dd, *J* = 6.0, 1.2 Hz, 2H), 5.16 (brs, 1H), 3.98 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.79 (s, 2H), 3.69 (s, 3H), 3.55 (s, 2H), 3.05 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.89~2.83 (m, 2H), 2.69 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 1.91~1.81 (m, 4H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166.3, 164.5, 157.8, 151.4, 151.0, 147.3, 147.2, 146.6, 142.5, 142.5, 141.8, 138.8, 138.3, 129.4, 128.6, 127.9, 125.4, 123.7, 123.2, 123.0, 122.7, 121.2, 120.2, 119.9, 115.8, 112.7, 112.1, 111.6, 111.1, 102.5, 102.4, 56.6, 56.5, 52.9, 52.0, 49.0, 48.1, 33.5, 24.7, 23.0, 22.6。纯度 99.0% (HPLC)。HR-MS (ESI): *m/z* [M+H]<sup>+</sup> (C<sub>41</sub>H<sub>39</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>) 计算值 734.271 4, 测量值 734.270 8。

**8b** 淡黄色油状液体，产率 47%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.93 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 7.89 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.53 (t, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.39~7.30 (m, 2H), 7.27 (s, 2H), 7.12 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz), 6.98 (s, 1H),

6.87 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 6.02 (s, 2H), 5.98 (s, 2H), 3.98 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 3.74 (s, 2H), 3.69 (s, 3H), 3.48 (t, 2H,  $J = 6.8$  Hz), 3.05 (s, 2H), 2.69 (s, 2H), 2.64 (t, 2H,  $J = 6.8$  Hz), 1.89 (s, 4H), 1.72~1.67 (m, 2H), 1.62~1.55 (m, 2H), 1.25 (s, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.3, 164.5, 158.5, 151.0, 150.7, 147.5, 147.3, 147.2, 142.6, 142.5, 142.1, 138.8, 138.3, 129.3, 128.7, 128.3, 125.3, 123.7, 123.3, 122.8, 121.1, 120.3, 120.0, 116.0, 112.7, 112.1, 111.6, 111.2, 102.5, 102.4, 100.0, 56.7, 56.6, 53.6, 52.0, 49.4, 49.0, 34.1, 29.5, 27.6, 24.9, 23.1, 22.8。纯度98.5% (HPLC)。HR-MS (ESI):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  ( $\text{C}_{43}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_{10}$ ) 计算值762.3027, 测量值762.3008。

**8c** 淡黄色油状液体, 产率63%。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.94 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz), 7.89 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz), 7.56 (s, 1H), 7.52 (t, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 7.36 (s, 1H), 7.32 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 7.26 (t, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 7.12 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 6.99 (s, 1H), 6.87 (dd, 1H,  $J = 8.0, 1.2$  Hz), 6.00 (s, 2H), 5.98 (s, 2H), 3.97 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.73 (s, 2H), 3.69 (s, 3H), 3.45 (t, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 3.04 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz), 2.67 (t, 2H,  $J = 5.6$  Hz), 2.57 (t, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 1.90~1.88 (m, 4H), 1.67~1.58 (m, 2H), 1.51~1.44 (m, 2H), 1.41~1.29 (m, 4H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.3, 164.5, 158.4, 151.0, 150.8, 147.5, 147.4, 147.2, 142.5, 142.5, 142.3, 138.7, 138.3, 129.2, 128.7, 128.2, 125.3, 123.6, 123.3, 122.9, 121.1, 120.3, 119.9, 115.9, 112.7, 112.1, 111.6, 111.3, 102.5, 102.4, 56.6, 56.6, 53.6, 52.0, 49.4, 49.3, 34.1, 31.7, 30.0, 27.1, 26.9, 24.8, 23.1, 22.8。纯度99.6% (HPLC)。HR-MS (ESI):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  ( $\text{C}_{45}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{O}_{10}$ ) 计算值790.3340, 测量值790.3315。

**8d** 淡黄色油状液体, 产率48%。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.96 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz), 7.91 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz), 7.61~7.51 (m, 2H), 7.37 (s, 2H), 7.33 (t, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 7.27 (t, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 7.14 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 6.99 (s, 1H), 6.87 (dd, 1H,  $J = 8.0, 1.2$  Hz), 6.03 (s, 2H), 6.00 (q, 2H,  $J = 1.2$  Hz), 3.99 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 3.75 (s, 2H), 3.70 (s, 3H), 3.48 (t, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 3.07 (s, 2H), 2.70 (s, 2H), 2.59 (t, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 1.94~1.87 (m, 4H), 1.65 (m, 2H), 1.47 (t, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 1.39~1.26 (m, 8H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.3, 164.5, 158.3, 150.9, 147.3, 147.2, 142.5, 142.5, 142.3, 138.7, 138.3, 129.2, 128.5, 128.4, 125.3, 123.6, 123.2, 122.9, 122.8, 121.1, 120.1, 119.9, 115.7, 112.7, 112.1, 111.5, 111.1, 102.5, 102.4, 56.6, 56.5, 53.6, 52.0, 49.5, 33.9, 31.8, 30.0, 29.4, 29.3, 27.2, 26.9, 24.8, 23.0,

22.8。纯度97.3% (HPLC)。HR-MS (ESI):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  ( $\text{C}_{47}\text{H}_{51}\text{N}_3\text{O}_{10}$ ) 计算值818.3653, 测量值818.3629。

**8e** 淡黄色油状液体, 产率33%。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.91 (t, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 7.46 (s, 1H), 7.45 (t, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 7.24 (t, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 7.20 (s, 1H), 7.17 (t, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 7.05 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 6.90 (s, 1H), 6.78 (dd, 1H,  $J = 8.0, 1.2$  Hz), 5.92 (s, 2H), 5.89 (s, 2H), 4.42 (brs, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.66 (s, 2H), 3.60 (s, 3H), 3.46 (t, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 2.99 (s, 2H), 2.57 (s, 2H), 2.50 (t, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 1.79 (s, 4H), 1.61~1.54 (m, 2H), 1.44~1.36 (m, 2H), 1.26~1.15 (m, 12H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.3, 164.4, 156.8, 151.9, 150.9, 147.3, 147.2, 145.6, 142.5, 142.5, 142.0, 138.7, 138.3, 129.2, 129.1, 126.9, 125.4, 123.8, 123.3, 122.9, 121.1, 119.9, 119.3, 114.7, 112.7, 112.1, 111.6, 111.2, 102.5, 102.4, 56.6, 56.6, 53.5, 51.9, 49.5, 49.3, 32.8, 31.6, 30.0, 29.5, 29.4, 29.3, 27.3, 26.9, 24.6, 22.8, 22.4。纯度96.8% (HPLC)。HR-MS (ESI):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  ( $\text{C}_{49}\text{H}_{55}\text{N}_3\text{O}_{10}$ ) 计算值846.3966, 测量值846.3948。

## 2 胆碱酯酶抑制活性

在96孔板中选取6个孔, 每孔加入10  $\mu\text{L}$  胆碱酯酶溶液, 以及0.5、10、20、35、50  $\mu\text{L}$  待测化合物溶液, 加入0.1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{pH} = 8.0$  磷酸缓冲溶液使总体积为100  $\mu\text{L}$ , 37  $^\circ\text{C}$  孵育15 min, 加入ATC (10  $\mu\text{L}$ )、DTNB (10  $\mu\text{L}$ ) 及缓冲液 (80  $\mu\text{L}$ ) 的混合液共计100  $\mu\text{L}$ , 混匀后测其在 $\lambda = 412$  nm处的 $A$ 值 ( $A_n$ ), 参比用0.1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{pH} = 8.0$  的磷酸缓冲溶液。ATC的自发水解为 $A_{\text{自发}}$ 值, 以未加样品所测得的 $A_{\text{control}}$ 值作为100个活力单位。相对酶活力 =  $(A_n - A_{\text{自发}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{自发}}) \times 100$ , 然后以酶的相对活力对抑制剂浓度作图, 根据抑制曲线求得各种化合物的 $\text{IC}_{50}$ 值 (抑制酶活力50%时的抑制剂浓度)。实验重复3次, 取平均值。

## 3 分子对接

采用Autodock 4.2分子对接程序进行化合物**8d**与AChE相互作用的研究。对接之前对蛋白质与小分子的预处理。预处理包括蛋白质的氨基酸残基添加氢键, 赋予Gasteiger电荷; 对小分子进行电荷计算, 设定可旋转键。得到的蛋白质结构是由AUOTOGGRID为配体上的每个原子类型进行原子亲和性的格点计算, 每个网格点相距0.375  $\text{\AA}$ , 网格盒子分别置于酶活性的底部 (AChE[2.781、64.383、67.971]), 大小设定为50 $\times$ 46 $\times$ 46  $\text{\AA}$ , 包括了活性口袋所有残基。对接计算使用了拉马克遗传算法 (LGA), 随机个体群为150, 能量评估系数为2 500 000, 其他参数为软件默认参数。

#### 4 细胞实验

细胞培养、MTT 测试和细胞内 ROS 检测参考文献<sup>[20]</sup>。

**作者贡献:** 洪琛完成了化合物的合成、结构鉴定和胆碱酯酶活性评价; 赵永梅完成了分子对接并完成初稿; 郭奔艳完成了体外肝毒性活性评价; 罗稳设计指导实验和完成论文修改。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

#### References

- [1] Srivastava S, Ahmad R, Khare SK. Alzheimer's disease and its treatment by different approaches: a review [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 216: 113320.
- [2] Huang L, Zhao C, Feng X, et al. Exploration of nonclinical pharmacodynamics evaluation system of Alzheimer's disease [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 789-805.
- [3] Zhang B, Pang X, Jia H, et al. Repositioning drug discovery for Alzheimer's disease based on global marketed drug data [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 1214-1224.
- [4] Wang X, Sun G, Feng T, et al. Sodium oligomannate therapeutically remodels gut microbiota and suppresses gut bacterial amino acids-shaped neuroinflammation to inhibit Alzheimer's disease progression [J]. *Cell Res*, 2019, 29: 787-803.
- [5] <https://edition.cnn.com/2021/06/07/health/alzheimers-drug-aducanumab-fda-approved-wellness/index.html>.
- [6] Wu WY, Dai YC, Li NG, et al. Novel multitarget-directed tacrine derivatives as potential candidates for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2017, 32: 572-587.
- [7] Bortolami M, Rocco D, Messori A, et al. Acetylcholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease-a patent review (2016-present) [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2021, 31: 399-420.
- [8] Mesulam MM, Guillozet A, Shaw P, et al. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine [J]. *Neuroscience*, 2002, 110: 627-639.
- [9] Agatonovic-Kustrin S, Kettle C, Morton DW. A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: attention to butyrylcholinesterase [J]. *Curr Med Res Opin*, 2001, 17: 159-165.
- [10] Marucci G, Buccioni M, Dal Ben D, et al. Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease [J]. *Neuropharmacology*, 2021, 190: 108325.
- [11] Wagstaff AJ, McTavish D. Tacrine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in Alzheimer's disease [J]. *Drugs Aging*, 1994, 4: 510-540.
- [12] Fang L, Kraus B, Lehmann J, et al. Design and synthesis of tacrine-ferulic acid hybrids as multi-potent anti-Alzheimer drug candidates [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18: 2905-2909.
- [13] Chen X, Zenger K, Lupp A, et al. Tacrine-silibinin codrug shows neuro- and hepatoprotective effects *in vitro* and pro-cognitive and hepatoprotective effects *in vivo* [J]. *J Med Chem*, 2012, 55: 5231-5242.
- [14] Jerabek J, Uliassi E, Guidotti L, et al. Tacrine-resveratrol fused hybrids as multi-target-directed ligands against Alzheimer's disease [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 127: 250-262.
- [15] Fernández-Bachiller MI, Pérez C, Monjas L, et al. New tacrine 4-oxo-4H-chromene hybrids as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease, with cholinergic, antioxidant, and beta-amyloid-reducing properties [J]. *J Med Chem*, 2012, 55: 1303-1317.
- [16] Cen J, Guo H, Hong C, et al. Development of tacrine-bifendate conjugates with improved cholinesterase inhibitory and pro-cognitive efficacy and reduced hepatotoxicity [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 144: 128-136.
- [17] Luo W, Li YP, He Y, et al. Synthesis and evaluation of heterobivalent tacrine derivatives as potential multi-functional anti-Alzheimer agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2011, 46: 2609-2616.
- [18] Tang X, Gu X, Ren Z, et al. Synthesis and evaluation of substituted dibenzoc[e]azepine-5-ones as P-glycoprotein-mediated multidrug resistance reversal agents [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22: 2675-2680.
- [19] Carlier PR, Han YF, Chow ES, et al. Evaluation of short-tether bis-THA AChE inhibitors. A further test of the dual binding site hypothesis [J]. *Bioorg Med Chem*, 1999, 7: 351-357.
- [20] Luo W, Wang T, Hong C, et al. Design, synthesis and evaluation of 4-dimethylamine flavonoid derivatives as potential multifunctional anti-Alzheimer agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 122: 17-26.
- [21] Ellman GL, Courtney KD, Andres VJ, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity [J]. *Biochem Pharmacol*, 1961, 7: 88-95.
- [22] Choudhury AK, Raja S, Mahapatra S, et al. Synthesis and evaluation of the anti-oxidant capacity of curcumin glucuronides, the major curcumin metabolites [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2015, 4: 750-767.
- [23] Li SY, Wang XB, Xie SS, et al. Multifunctional tacrine-flavonoid hybrids with cholinergic, beta-amyloid-reducing, and metal chelating properties for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Eur J Med Chem*, 2013, 69: 632-646.
- [24] Oset-Gasque MJ, Gonzalez MP, Perez-Pena J, et al. Toxicological and pharmacological evaluation, antioxidant, ADMET and molecular modeling of selected racemic chromenotacrines{11-amino-12-aryl-8,9,10,12-tetrahydro-7H-chromeno[2,3-b]quinolin-3-ols} for the potential prevention and treatment of Alzheimer's disease [J]. *Eur J Med Chem*, 2014, 74: 491-501.