

• 研究论文 •

N-(5'-溴-4'-取代嘧啶-2'-基)苯磺酰脲化合物的合成和生物活性

班树荣^{*.a} 牛聪伟^b 陈文彬^b 李青山^a 席真^{*.b}

(^a山西医科大学药学院 太原 030001)

(^b南开大学化学生物学系 元素有机化学国家重点实验室 天津 300071)

摘要 乙酰羟基酸合成酶(Acetohydroxyacid synthase, AHAS, EC 4.1.3.18)是植物和微生物中亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸合成途径的一个关键酶, 以 AHAS 为靶标的磺酰脲类除草剂具有高效、高选择性和对环境友好的特点。通过 2-氨基-4-甲基嘧啶溴代反应以及进一步的衍生、磺酰基异氰酸酯的胺解, 合成了一系列含有 5-溴嘧啶基的新磺酰脲。其结构经¹H NMR、质谱和元素分析确定。生物活性测试表明目标化合物在离体水平对大肠杆菌乙酰羟基酸合成酶同工酶AHASII 表现出了与市售除草剂苯磺隆相当甚至更优的抑制活性, 而盆栽除草活性低于苯磺隆。

关键词 磺酰脲; 2-氨基-4-甲基嘧啶; 溴代; 乙酰羟基酸合成酶抑制剂; 除草活性

Synthesis and Bioactivity of N-(5'-Bromo-4'-substituted pyrimidin-2'-yl)phenyl Sulfonlurea

Ban, Shurong^{*.a} Niu, Congwei^b Chen, Wenbin^b Li, Qingshan^a Xi, Zhen^{*.b}

(^a School of Pharmaceutical Science, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001)

(^b State Key Laboratory of Elemento-Organic Chemistry, Department of Chemical Biology,
Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract Acetohydroxy acid synthase (AHAS) catalyzes the key reactions in the biosynthesis pathways of branched-chain amino acids (valine, isoleucine and leucine) in plants and microorganisms, and sulfonylurea herbicides are inhibitors of AHAS, characterized by high herbicidal activity, high degree of selectivity, and excellent environmental safety. A series of 5-bromopyrimidinyl-containing new sulfonylureas have been synthesized through bromination of 2-amino-4-methyl pyrimidine, followed by further modification and then coupled with sulfonyl isocyanate. Their structures were confirmed by ¹H NMR, MS techniques and elemental analysis. Preliminary bioassay of sulfonylureas showed that the title compounds exhibited good *in vitro* activities against *E. coli* acetohydroxy acid synthase isoenzyme AHASII but showed lower herbicidal activities *in vivo*, compared with commercial herbicide tribenuron-methyl.

Keywords sulfonylurea; 2-amino-4-methyl pyrimidine; bromination; inhibitors of AHAS; herbicidal activity

乙酰羟基酸合成酶(Acetohydroxyacid synthase, [AHAS], EC 4.1.3.18)是支链氨基酸生物合成途径中的第一个关键性的酶。以乙酰羟基酸合成酶为靶标的除草剂是活性最好的除草剂之一^[1~3], 并且以它为靶标设计

开发新型超高效除草剂已经成为当前除草剂化学中一个最重要的研究领域^[4,5]。在这类除草剂中, 磺酰脲类是最早开发的除草剂, 是农药发展史上的一个重要里程碑, 它打破了传统除草剂的用药界限, 让人们第一次领

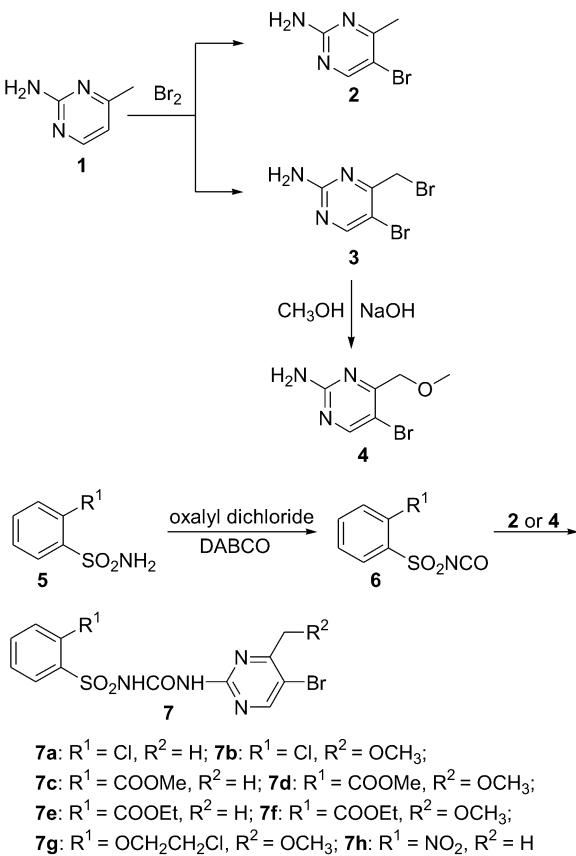
* E-mail: shurongban@syn.nankai.edu.cn; Tel.: 0351-4690071.

Received August 3, 2009; revised September 23, 2009; accepted November 30, 2009.

国家自然科学基金(No. 20432010)、国家重点基础研究发展计划(973 计划, No. 2003CB114403)、科技部国际合作(2008DFA30770)、教育部科学技术研究重点(重大)(No. 104189)和山西省青年科学基金(No. 2009021041-1)资助项目。

略到真正的超高效除草剂^[6~8].

磺酰脲类除草剂在土壤和水中存在一定残留危害, 经常发生由土壤残留引起的后茬作物药害事故, 故开发高效而低残留的磺酰脲类除草剂是除草剂化学领域的研究热点之一。碳卤键和醚键在一定条件下可以降解, 因此我们在磺酰脲母体结构的嘧啶环部分中引入溴原子取代基, 并在环外引入醚键, 以期在不降低其除草活性的前提下加快磺酰脲的降解。本文从2-氨基-4-甲基嘧啶出发, 合成了一系列2-氨基-5-溴-4-取代甲基嘧啶衍生物, 采用磺酰基异氰酸酯胺解的方法合成了一系列N-(5'-溴-4'-取代嘧啶-2'-基)苯磺酰脲(合成路线见Scheme 1), 考察了目标化合物与乙酰羟基酸合成酶的相互作用, 测得了表观抑制常数 K_i^{app} , 最后进行了初步的除草活性研究。AHAS存在于多种原核生物和酵母中, 大肠杆菌(*Escherichia coli*)具有不同的AHAS同工酶, 可以通过测试磺酰脲与大肠杆菌乙酰羟基酸合成酶同工酶AHASII的相互作用来考察化合物的离体除草活性^[9,10]。我们课题组即利用大肠杆菌AHASII进行了磺酰脲化合物的离体活性筛选。



Scheme 1

初步的离体生物活性测试表明本文合成的新磺酰脲类化合物对大肠杆菌AHASII表现出良好的抑制活性, 说明目标化合物与靶标酶的相互作用是比较强烈的。而

盆栽法实验结果显示目标化合物除草活性较低, 其原因可能是此类磺酰脲化合物在测试条件下发生了水解或其它失活代谢^[8], 确切证据需要进一步实验说明。

1 实验部分

1.1 仪器和药品

X-4 数字显示显微熔点测定仪(北京泰克仪器有限公司, 温度计未校正); Bruker ACP-200MHz, Bruker Avance-300MHz 和 Varian Mercury Vx300MHz 核磁共振仪(DMSO- d_6 或 CDCl_3 为溶剂, TMS 为内标); Thermo Finnigan LCQ Advantage 型 LC-MS/ESI; Thermo Finnigan Polaris-Q 型 GC-MS; Shimadzu IR-435 红外光谱仪(KBr 压片法); Elementar Vario EL 元素分析仪。试剂均为市售分析纯, 甲苯和乙腈经过无水处理。

1.2 目标化合物的合成

1.2.1 2-氨基-5-溴-4-甲基嘧啶(2)的合成

2-氨基-4-甲基嘧啶(1) 1.09 g(约 0.01 mol)溶解在 40 mL 冰醋酸中, 再向其中加入 0.25 mL(约 0.005 mol)液溴, 反应液呈棕红色。室温搅拌 1 h, 用饱和碳酸氢钠溶液处理至反应液的 pH 值为 7~8, 再用二氯甲烷萃取 3 次, 每次用 50 mL, 合并有机层, 用无水硫酸钠干燥。经过柱色谱分离(甲醇, 二氯甲烷体系)得白色固体产品 1.37 g, 产率 73%, m.p. 170~173 °C(与文献值^[8]一致); ^1H NMR (200 MHz, CD_3Cl) δ : 2.41 (s, 3H, CH_3), 5.00 (br s, 2H, NH_2), 8.19 (s, 1H, H-Pyrimidine); GC-MS m/z (%): 188.25 ($\text{M}^+, 8.55$), 190.08 ($\text{M}^+ + 2, 7.13$)。

1.2.2 2-氨基-5-溴-4-溴甲基嘧啶(3)的合成

2-氨基-4-甲基嘧啶(1) 10.9 g(约 0.1 mol)溶解在 400 mL 冰醋酸中, 再向其加入 7.6 mL(约 0.15 mol)液溴, 反应液呈棕红色。室温搅拌 1 h, 向其加入 1600 mL 水, 立即析出白色沉淀。抽滤后用少量甲醇洗涤, 二氧六环-甲醇溶剂进行重结晶。真空干燥, 得白色固体约 4 g, 产率 15%, m.p. 184 °C(分解, 与文献值^[8]一致); ^1H NMR (200 MHz, CD_3Cl) δ : 4.36 (s, 2H, CH_2), 5.09 (br s, 2H, NH_2), 8.31 (s, 1H, H-Pyrimidine); GC-MS m/z (%): 265.12 ($\text{M}^+ - 2, 38.80$), 267.01 ($\text{M}^+, 75.44$), 268.98 ($\text{M}^+ + 2, 38.05$)。

1.2.3 2-氨基-5-溴-4-溴甲基嘧啶(4)的合成

20 mL 甲醇中加入 21 mg(约 0.52 mmol) NaOH , 再加入 0.1 g(约 0.37 mmol) 2-氨基-5-溴-4-溴甲基嘧啶(3), 超声波反应 1 h, 柱层析分离得白色固体 60 mg, 产率 73%, m.p. 211~215 °C(与文献值^[8]一致); ^1H NMR (300 MHz, CD_3Cl) δ : 3.53 (s, 3H, CH_3), 4.51 (s, 2H, CH_2), 5.20 (br s, 1H, NH_2), 8.258 (s, 1H, H-Pyrimidine); GC-MS m/z (%): 218.03 ($\text{M}^+, 2.0$), 218.06 ($\text{M}^+ + 2$)。

1.2.4 2-取代苯磺酰基异氰酸酯(6)的合成

参照文献[11]. 在装有干燥管、尾气吸收的回流冷凝管和温度计的 100 mL 三口烧瓶中加入 20 mmol 2-取代苯磺酰胺, 50 mL 无水甲苯. 加热到 60 °C 后加入 6 mL 草酰氯, 并在搅拌下加 112 mg DABCO(三乙烯二胺)作催化剂. 在 60~65 °C 之间保持 6 h 后, 在缓慢升温至 110 °C, 反应 10~12 h. 冷却至室温, 过滤除去固体, 减压脱去甲苯和过量的草酰氯得棕色或褐色的油状异氰酸酯粗品, 不经纯化可直接用于下一步反应. 加入 50 mL 无水乙腈稀释, 准备下一步反应.

1.2.5 目标化合物 *N*-(5'-溴-4'-取代嘧啶-2'-基)苯磺酰脲(7a~7h)的合成

在 10 mL 圆底烧瓶中加入 1 mmol 的化合物 2 或 4, 无水乙腈 2 mL, 再加入前述的异氰酸酯乙腈溶液 4 mL, 室温下搅拌过夜, 滤得固体, 并用少量乙腈、石油醚洗涤, 干燥得磺酰脲 7. 化合物 7 经 ¹H NMR、元素分析和 LC-MS 确认, 其数据分别参见表 1、表 2 和表 3. 部分化合物进一步经红外确证. 例如: 化合物 7c IR (KBr) ν : 2955, 2850, 1734, 1294, 1697, 1578, 1501, 1460, 1361, 1165, 756 cm⁻¹.

表 1 化合物 7a~7h 的 ¹H NMR 数据
Table 1 ¹H NMR spectral data of compounds 7a~7h

Compd.	¹ H NMR (300 MHz or 200 MHz, CDCl ₃) δ
7a	2.63 (s, 3H, CH ₃), 7.45~7.60 (m, 4H, Ph, NH-Pyrimidine), 8.31~8.34 (m, 1H, Ph), 8.54 (s, 1H, H-Pyrimidine), 12.50 (br s, 1H, NHSO ₂)
7b	3.59 (s, 2H, CH ₃), 4.62 (s, 2H, CH ₂), 7.48~7.55 (m, 3H, Ph), 8.31~8.34 (m, 1H, Ph), 8.51 (br s, 1H, NH-Pyrimidine), 8.62 (s, 1H, H-Pyrimidine), 12.68 (s, 1H, NHSO ₂)
7c	2.55 (s, 3H, CH ₃), 3.83 (s, 3H, CH ₃ O), 7.76~7.83 (m, 3H, Ph), 8.13~8.16 (m, 1H, Ph), 8.79 (s, 1H, H-Pyrimidine), 10.82 (s, 1H, NH-Pyrimidine)
7d	3.42 (s, 3H, CH ₃ O), 3.80 (s, 3H, CH ₃ OOC), 4.58 (s, 2H, CH ₂), 7.60~7.80 (m, 3H, Ph), 8.12~8.15 (m, 1H, Ph), 8.83 (s, 1H, H-Pyrimidine), 10.94 (s, 1H, NH-Pyrimidine), 12.43 (s, 1H, NHSO ₂)
7e	1.41 (t, $J=7.54$ Hz, 3H, CH ₃), 2.70 (s, 3H, CH ₃), 4.41 (q, $J=7.54$ Hz, 2H, OCH ₂), 7.64~7.72 (m, 3H, Ph), 8.33 (br s, 1H, NH-Pyrimidine), 8.37~8.40 (m, 1H, Ph), 8.59 (s, 1H, H-Pyrimidine), 12.42 (s, 1H, NHSO ₂)
7f	1.39 (t, $J=7.54$ Hz, 3H, CH ₃), 3.55 (s, 3H, OCH ₃), 4.41 (q, $J=7.54$ Hz, 2H, OCH ₂), 4.64 (s, 2H, CH ₂), 7.76~7.64 (m, 3H, Ph), 8.11 (br s, 1H, NH-Pyrimidine), 8.38~8.41 (m, 1H, Ph), 8.62 (s, 1H, H-Pyrimidine), 12.25 (s, 1H, NHSO ₂)
7g	3.61 (s, 3H, CH ₃), 3.81~3.84 (t, $J=5.28$ Hz, 2H, ClCH ₂), 4.32~4.36 (t, $J=6.03$ Hz, 2H, OCH ₂), 4.64 (s, 2H, CH ₂), 6.97~6.99 (d, $J=9.04$ Hz, 1H, Ph), 7.14~7.19 (t, $J=8.29$ Hz, 1H, Ph), 7.56~7.61 (m, 1H, Ph), 8.19~8.16 (m, 1H, Ph), 8.62 (br s, 2H, H-Pyrimidine, NH-Pyrimidine), 12.33 (s, 1H, NHSO ₂)
7h	2.30 (s, 3H, CH ₃), 7.81~7.86 (m, 3H, Ph), 8.01~8.04 (m, 1H, Ph), 8.20 (s, 1H, H-Pyrimidine)

表 2 化合物 7a~7h 的物理常数和元素分析值
Table 2 Physical constants and elemental analysis of compounds 7a~7h

Compd.	Formula	Yield/%	m.p./°C	Elemental analysis, calcd (found)		
				C	H	N
7a	C ₁₂ H ₁₀ BrClN ₄ O ₃ S	83	210	35.53 (35.22)	2.48 (2.57)	13.81 (13.70)
7b	C ₁₃ H ₁₂ BrClN ₄ O ₄ S	69	177~178	35.84 (35.50)	2.78 (2.89)	12.86 (13.32)
7c	C ₁₄ H ₁₃ BrN ₄ O ₅ S	23	187~188	39.17 (39.24)	3.05 (2.91)	13.05 (12.90)
7d	C ₁₅ H ₁₅ BrN ₄ O ₆ S	54	188~189	39.23 (39.06)	3.29 (2.36)	12.20 (11.90)
7e	C ₁₅ H ₁₅ BrN ₄ O ₅ S	62	179~181	40.64 (40.22)	3.41 (3.10)	12.64 (12.27)
7f	C ₁₆ H ₁₇ BrN ₄ O ₆ S	33	174~175	40.60 (40.40)	3.62 (3.48)	11.64 (11.96)
7g	C ₁₅ H ₁₆ BrClN ₄ O ₅ S	56	172~174	37.55 (37.51)	3.36 (3.35)	11.68 (11.85)
7h	C ₁₂ H ₁₀ BrN ₅ O ₅ S	42	223~224	34.63 (34.41)	2.42 (2.38)	16.83 (17.06)

表 3 化合物 7a~7h 的质谱数据
Table 3 ESI-MS data of compounds 7a~7h

Compd.	M_w	ESI-MS m/z (%)
7a	405.70	403.05 (90.10), 405.07 (100.00), 406.02 (22.29), 407.13 (39.41)
7b	435.70	433.24 (32.09), 434.32 (4.81), 435.18 (46.33), 436.25 (8.33)
7c	429.25	427.31 (97.41), 428.35 (17.50), 429.21 (100.00), 430.23 (16.65)
7d	459.27	457.10 (75.48), 458.08 (8.16), 459.09 (100.00), 460.05 (10.44)
7e	443.30	441.12 (100.00), 442.18 (11.05), 443.10 (94.05), 444.00 (16.89)
7f	473.30	471.09 (90.12), 472.07 (15.11), 473.13 (100.00), 474.20 (15.21)
7g	479.73	477.08 (75.74), 478.22 (5.15), 479.07 (100.00), 480.05 (13.85)
7h	416.20	414.10 (77.18), 415.33 (9.18), 416.13 (71.96), 417.10 (8.05)

1.3 生物活性

1.3.1 目标化合物 7 与大肠杆菌 AHASII 的相互作用

根据文献[10, 11]报道的方法考察了化合物 7 与大肠杆菌 AHASII 的相互作用，并测得了抑制常数 K_i^{app} ，实验结果见表 4。

表 4 化合物 7a~7h 与大肠杆菌 AHASII 的相互作用

Table 4 Interaction between *E. coli* AHAS II and compounds 7a~7h

Compd.	R ¹	R ²	$K_i^{\text{app}}/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$
7a	Cl	H	(2.92±0.73)×10 ⁻⁷
7b	Cl	OCH ₃	(2.17±0.40)×10 ⁻⁶
7c	COOMe	H	(5.70±1.72)×10 ⁻⁹
7d	COOMe	OCH ₃	(2.14±0.23)×10 ⁻⁸
7e	COOEt	H	(4.83±0.39)×10 ⁻⁹
7f	COOEt	OCH ₃	(2.00±0.24)×10 ⁻⁷
7g	OCH ₂ CH ₂ Cl	OCH ₃	(6.74±0.36)×10 ⁻⁷
7h	NO ₂	H	(2.92±0.37)×10 ⁻⁶
苯磺隆			(7.88±2.25)×10 ⁻⁷

1.3.2 目标化合物 7 的除草活性

根据文献[12, 13]报道的方法，我们对化合物 7 进行了双子叶杂草和单子叶杂草的除草活性测试，处理剂量为 1.5 kg/ha，实验结果见表 5。

2 结果与讨论

2.1 中间体 2 和 3 的合成

合成中间体 2 和 3 是本文工作中的难点，主要是在对化合物 1 溴化反应时副产物比较多、分离提纯比较困难。我们发现随着液溴与化合物 1 用量比的增大，化合物 1 的溴化程度也增大。当液溴与化合物 1 的物质的量的比为 0.5 时，主要溴化产物是化合物 2；当液溴与化合物 1 的物质的量的比 1.5 时主要溴化产物是化合物 3。

表 5 化合物 7a~7h 的除草活性(抑制率%)^a

Table 5 Herbicidal activities (inhibition rate %) of compounds 7a~7h

Compd.	苗后茎叶处理		苗前土壤处理	
	油菜	稗草	油菜	稗草
7a	49.3	11.2	24.5	0
7b	17.4	5.3	0	6.6
7c	81.7	29.7	28.5	60
7d	7.9	6.51	0	0
7e	29.8	0	30.4	0
7f	29.1	9.0	58.0	57
7g	11.6	10.2	13.3	0
7h	8.7	7.9	37.0	53
苯磺隆	100	69.0	100	65.1

^a Dosage (activity ingredient) for each compound was 1.5 kg/ha.

中间体 2 的分离纯化相对简便：调节反应液 pH 值为 7~8 后用二氯甲烷萃取，然后柱色谱分离即可。但是我们发现中间体 3 却不能有效地按照相同方法纯化。由于中间体 3 在一般溶剂中溶解性不好，通过柱层析并不能有效地将其分离。经过反复摸索，我们找到了比较快捷方便的纯化方法，即：当溴化反应结束后，直接向反应体系中加入水，析出固体后再经二氯六环-甲醇混合溶剂重结晶即可。这一方法虽然处理简单，但是也有产率低的缺陷。

2.2 目标化合物的生物活性

目标化合物 7a~7h 与大肠杆菌 II 相互作用时表现出了良好的离体的活性，与苯磺隆活性相当，个别化合物(7c, 7d 和 7e)的活性要优于苯磺隆，说明此类磺酰脲类化合物与靶标酶的相互作用比较强烈，嘧啶环上引入溴原子没有引起其靶向的变化。另外，嘧啶环 4-位取代基 R² 对化合物的离体活性有显著影响：R² 是甲基时活性高，为甲氧甲基时活性较低。

我们对目标化合物进行了除草活性测试。从实验数据中可以发现：(1)除草活性的高低顺序基本与离体活性

测试一致; (2)双子叶杂草较单子叶杂草敏感, 这与一般磺酰脲类除草剂的特点一致; (3)目标化合物的除草活性较低, 与苯磺隆相比有明显差距, 初步分析是由于嘧啶环上溴原子以及环外醚键的引入使得化合物在土壤中降解或在植物体内发生失活代谢。我们组采用其它方法合成了此类化合物可能的水解产物 *N*-(5'-溴-4'-羟甲基嘧啶-2'-基)苯磺酰脲磺酰脲, 发现其活性明显低于水解前化合物^[8]。分子对接研究显示, 水解后产物中的羟甲基指向 AHASII 中 464 位色氨酸的吲哚环, 明显地削弱了磺酰脲嘧啶环与 464 位色氨酸之间的疏水作用^[8]。

References

- 1 Singh, B. K.; Shane, D. L. *Plant Cell* **2001**, 7, 935.
- 2 Stidham, M. A. *Weed Sci.* **1991**, 39, 428.
- 3 Schloss, J. V.; Ciskanik, L. M.; VanDyk, D. E. *Nature* **1988**, 331, 360.
- 4 Guo, W.-C.; Ma, Y.; Li, Y.-H.; Wang, S.-H.; Li, Z.-M. *Acta Chim. Sinica* **2009**, 67, 569 (in Chinese).
(郭万成, 马翼, 李永红, 王素华, 李正名, 化学学报, **2009**, 67, 569.)
- 5 Abell, L. M.; Hanna, W. S.; Kunitsky, J. K.; Kerschen, J. A. *Pestic. Sci.* **1995**, 44, 89.
- 6 Ban, S.-R.; Niu, C.-W.; Chen, W.-B.; Ren, X.-B.; Yu, Z.-H.; Xi, Z. *Chem. J. Chin. Univ.* **2007**, 28, 543 (in Chinese).
(班树荣, 牛聪伟, 陈文彬, 任晓白, 余志红, 席真, 高等学校化学学报, **2007**, 28, 543.)
- 7 Yang, G.-F.; Yang, H.-Z. *Acta Chim. Sinica* **2001**, 59, 447 (in Chinese).
(杨光富, 杨华铮, 化学学报, **2001**, 59, 447.)
- 8 Ban, S.-R.; Niu, C.-W.; Chen, W.-B.; Yu, Z.-H.; Wu, S.; Wang, C.; Xi, Z. *Chin. Chem Lett.* **2007**, 18, 205.
- 9 Xi, Z.; Niu, C.-W.; Li, Q.-X. *Chin. J. Pestic. Sci.* **2005**, 7, 215 (in Chinese).
(席真, 牛聪伟, 李庆霞, 农药学学报, **2005**, 7, 215.)
- 10 Westerfeld, W. W. *J. Biol. Chem.* **1945**, 161, 495.
- 11 Li, P.-F.; Ma, N.; Wang, B.-L.; Li, Z.-M.; Wang, S.-H.; Li, Y.-H. *Chem. J. Chin. Univ.* **2005**, 26, 1459 (in Chinese).
(李鹏飞, 马宁, 王宝雷, 李正名, 王素华, 李永红, 高等学校化学学报, **2005**, 26, 1459.)
- 12 Wang, Q.-M.; Sun, H.-K.; Cao, H.-Y.; Cheng, M.-R.; Huang, R.-Q. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 5030.
- 13 Kluth, J.; Santel, H. J.; Schmidt, R. R. US 4832733, **1989** [*Chem. Abstr.* **1989**, 108, 145450].

(Y0908031 Li, L.; Zheng, G.)