Aspernigerin 类似物的合成及生物活性研究

吴清来^a 李永强^b 杨新玲^a 凌云^{*,a}^(a) 中国农业大学理学院应用化学系 农业部农药化学与应用重点开放实验室 北京 100193)^(b) 南开大学元素有机化学国家重点实验室 天津 300071)

摘要 以天然产物 Aspernigerin 为先导, 将 Aspernigerin 结构中的一个 1,2,3,4-四氢喹啉基团以芳胺类化合物替代, 设计合成了 15 个未见文献报道的 Aspernigerin 类似物, 结构均经过 ¹H NMR, IR 和元素分析确证。初步生物活性测试表明, 大部分目标化合物均表现出了一定的杀虫和杀菌活性, 其中化合物 **2n** 在 200 μg/mL 的浓度下对小菜蛾仍表现出 100% 的杀虫活性, 优于先导 Aspernigerin 和对照药剂噻虫嗪; 化合物 **2d**, **2e**, **2j**, **2k** 表现出对黄瓜灰霉病优于先导 Aspernigerin 的抑制活性。

关键词 Aspernigerin; 类似物; 合成; 1,2,3,4-四氢喹啉; 芳胺; 生物活性

Synthesis and Bioactivity of Aspernigerin Analogues

Wu, Qinglai^a Li, Yongqiang^b Yang, Xinling^a Ling, Yun^{*,a}^(a) Key Laboratory of Pesticide Chemistry and Application, Ministry of Agriculture, Department of Applied Chemistry, College of Science, China Agricultural University, Beijing 100193)^(b) State Key Laboratory of Elemento-Organic Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract Using natural product aspernigerin as the lead compound, fifteen new compounds were designed and synthesized by replaced one 1,2,3,4-tetrahydroquinoline group of aspernigerin with aromatic amine. Those structures were confirmed by ¹H NMR, IR spectra and elemental analysis. The preliminary bioassay showed that most of the compounds exhibited certain fungicidal activities and insecticidal activities. In particular, compound **2n** showed the most potent bioactivity against *Plutella xylostella* with the rate of 100% at the concentration of 200 μg/mL, better than aspernigerin and commercial insecticide thia-methoxam, and compounds **2d**, **2e**, **2j**, **2k** showed higher inhibition effects against *Botrytis cinerea* than aspernigerin.

Keywords aspernigerin; analogues; synthesis; 1,2,3,4-tetrahydroquinoline; aromatic amine; bioactivity

Aspernigerin 是由申丽等^[1,2]于 2006 年首次从狗牙根内生菌 *Aspergillus niger* IFB-E003 的固体培养物提取液中分离得到的, 其结构经确证发现是一个骨架新颖的生物碱类次生代谢产物。进一步的体外细胞毒活性测试发现, Aspernigerin 对人的口腔表皮样癌细胞 KB、宫颈癌细胞 HeLa、结肠癌细胞 SW1116 表现出较强的细胞毒活性, 其 IC₅₀ 值分别为 22, 46 和 35 μmol/L。阳性对照 5-氟尿嘧啶(5-FU)对这三株癌细胞株的 IC₅₀ 值分别为 14, 115 和 42 μmol/L。

本课题组在前期的工作中, 首次对 Aspernigerin 进行农药生物活性测试, 结果表明, Aspernigerin 具有一定的杀菌、杀虫活性, 尤其是对小菜蛾表现出较好的生物

活性, 在 600 和 200 μg/mL 的浓度下对小菜蛾的杀虫活性分别为 100% 和 75%, 略低于对照药剂噻虫嗪。因此, Aspernigerin 是一个具有优良活性的潜在药物分子或先导化合物。

本工作以 Aspernigerin 为先导化合物进行结构改造与修饰, 将 Aspernigerin 结构中的一个 1,2,3,4-四氢喹啉

* E-mail: lyun@cau.edu.cn

Received October 9, 2011; revised November 16, 2011; published online December 9, 2011.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21072222) and the National Basic Research Program of China (973 Program, No. 2010CB126104).

国家自然科学基金(No. 21072222)和国家 973 计划(No. 2010CB126104)资助项目。

基团用胺类化合物替代, 设计合成了 15 个 Aspernigerin 类似物, 以期发现具有更好生物活性的化合物, 并为下一步开展 Aspernigerin 类化合物的构效关系, 指明该类结构改造与修饰的方向奠定了基础. 目标化合物的合成如 Scheme 1 所示.

2a: Ar=C₆H₅, R=H; **2b:** Ar=4-F-3-NO₂C₆H₃, R=H; **2c:** Ar=C₆H₅CHCH₃, R=H; **2d:** Ar=4-NO₂-3-CF₃C₆H₃, R=H; **2e:** Ar=2-NO₂C₆H₄, R=H; **2f:** Ar=2,6-(CH₃)₂C₆H₃, R=H; **2g:** Ar=4,6-(CH₃O)₂C₆H₃, R=H; **2h:** Ar=4-NO₂-2-CF₃C₆H₃, R=H; **2i:** Ar=C₆H₅, R=C₆H₅; **2j:** Ar=2,6-F₂C₆H₃, R=H; **2k:** Ar=4-CH₃OC₆H₄, R=H; **2l:** Ar=4-CH₃C₆H₄, R=H; **2m:** Ar=4-CF₃-2-NO₂C₆H₃, R=H; **2n:** Ar=3-NO₂C₆H₄, R=H; **2o:** Ar=C₆H₅, R=CH₃.

Scheme 1

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

熔点测定仪: Yanagimoto MFG, 温度计未校正; 核磁共振仪: Bruker Avance DPX300, 以 TMS 为内标, 氘代氯仿为溶剂; 红外光谱仪: Shimadzu IR-435(采用液膜法); 元素分析仪: ST-Carloerba.Co(采用 Flash EA 1112 法); HPLC: 岛津 LC-10A PDA, 色谱柱: Agilent Extend C18, 250 mm×4.6 mm, 5 μm.

所用的药品均为市售的分析纯或化学纯, 除特别注明外, 未经进一步处理.

1.2 合成实验

1.2.1 *N*-氯乙酰-1,2,3,4-四氢喹啉的合成

于 500 mL 三口烧瓶中, 加入 26.6 g (0.2 mol) 1,2,3,4-四氢喹啉和 300 mL 二氯甲烷, 冰盐浴降温至 -5~0 °C. 缓慢滴加 25.0 g (0.22 mol) 氯乙酰氯和 100

mL 二氯甲烷配成的溶液, 滴加完毕, 搅拌反应 10 min, 然后缓慢滴加 21.2 g (0.21 mol) 三乙胺, 滴加完毕后, 保温于 -5~5 °C 反应 5~8 h, 薄层硅胶色谱板监控确定反应终点. 反应完全后, 加入 50 mL 5% 的盐酸水溶液, 搅拌 30 min, 静置分层, 分出有机层, 再用 100 mL 5% 的盐酸水溶液洗涤一遍, 分出有机层, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液先常压蒸馏脱出溶剂, 然后, 油泵减压蒸馏, 收集 162~164 °C/130 Pa 的馏分 38.8 g, 即为 *N*-氯乙酰-1,2,3,4-四氢喹啉, 收率 92.8%. m.p. 52~53 °C(文献值^[3]: 53~54 °C); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.88~1.97 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 2.71 (t, *J*=6.6 Hz, 2H, ArCH₂), 3.71 (t, *J*=6.3 Hz, 2H, NCH₂), 4.55 (s, 2H, CH₂Cl); EI-MS, *m/z* (%): 209 (M⁺, 48), 174 (42), 132 (100), 77 (26).

1.2.2 *N*-(1,2,3,4-四氢喹啉基)-*N*-甲酰甲基)哌嗪的合成

于 500 mL 三口烧瓶中, 加入 36.2 g (0.42 mol) 哌嗪、42.0 g (0.3 mol) 无水碳酸钾和 100 mL *N,N*-二甲基甲酰胺, 搅拌, 加热保温于 80~100 °C 之间. 滴加 44.0 g (0.21 mol) *N*-氯乙酰-1,2,3,4-四氢喹啉和 50 mL *N,N*-二甲基甲酰胺配成的溶液, 滴加完毕后, 保温于 80~100 °C 反应 4~6 h, 薄层硅胶色谱板监控确定反应终点. 反应完全后, 降温至室温, 抽滤, 除去固体盐类物质, 滤液水泵减压蒸馏, 蒸出 *N,N*-二甲基甲酰胺, 残留物加入 100 mL 三氯甲烷, 加热回流 10 min 使溶解完全, 然后降至室温, 于铺有硅胶的砂芯漏斗中抽滤, 然后用乙酸甲酯淋洗硅胶, 滤液脱溶剂, 得到 *N*-(1,2,3,4-四氢喹啉基)-*N*-甲酰甲基)哌嗪粗品. 粗品进一步柱层析 [*V*(乙酸甲酯): *V*(石油醚)=1:2] 纯化得 *N*-(1,2,3,4-四氢喹啉基)-*N*-甲酰甲基)哌嗪 39.3 g, 收率 72.0%, HPLC 分析归一含量为 ≥98%. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.86~1.95 (m, 2H, 6-H), 2.62 (brs, 4H, pip-H), 2.65 (t, *J*=10.2 Hz, 2H, 5-H), 2.95 (brs, 4H, pip-H), 3.27 (s, 2H, 8-H), 6.42 (s, 1H, NH) 7.06~7.14 (m, 3H, ArH), 7.62 (brs, 1H, 3-H); ESI-MS *m/z* (%): 260 (M⁺, 100). Anal. calcd for C₁₅H₂₁N₃O: C 69.47, H 8.16, N 16.20; found C 69.28, H 8.18, N 16.31.

1.2.3 氯乙酰取代芳胺的合成

氯乙酰取代芳胺参照文献[4]方法合成. 于 500 mL 三口烧瓶中, 加入 0.1 mol 取代芳胺和 200 mL 二氯甲烷, 冰盐浴降温至 -5~0 °C. 缓慢滴加 12.5 g (0.11 mol) 氯乙酰氯和 100 mL 二氯甲烷配成的溶液, 滴加完毕, 搅拌反应 10 min, 然后缓慢滴加 11.0 g (0.11 mol) 三乙胺, 滴加完毕后, 保温于 -5~5 °C 反应 5~8 h, 薄层硅胶色谱板监控确定反应终点. 反应完全后, 加入 50

mL 5%的盐酸水溶液, 搅拌 30 min, 静置分层, 分出有机层, 再用 100 mL 5%的盐酸水溶液洗涤一遍, 分出有机层, 用无水硫酸钠干燥、过滤, 滤液脱溶, 用甲醇重结晶, 过滤烘干, 得氯乙酰基取代芳胺化合物。

1.2.4 目标化合物 *N*-(1,2,3,4-四氢喹啉基)-*N*-甲酰甲基)-*N'*-(取代芳胺基)-*N*-甲酰甲基)哌嗪的合成

以目标化合物 **2a** 为例: 于 500 mL 三口烧瓶中, 加入 *N*-(1,2,3,4-四氢喹啉基)-*N*-甲酰甲基)哌嗪 1.3 g (0.01 mol)、三乙胺 1.2 g (0.012 mol)和 50 mL 三氯甲烷, 加热

至回流, 缓慢滴加 0.012 mol 氯乙酰取代芳胺和 50 mL 三氯甲烷配成的溶液, 滴加完毕, 回流反应 2~3 h, 薄层硅胶色谱板监控确定反应终点。反应完全后, 降温至室温, 于铺有硅胶的砂芯漏斗中抽滤, 然后用三氯甲烷淋洗硅胶, 滤液脱溶剂得目标产物粗品。粗品进一步柱层析 [*V*(乙酸甲酯): *V*(石油醚)=1:9]纯化得目标产物纯品, HPLC 分析归一含量为 ≥99%。采用同样的方法合成了化合物 **2b**~**2o**, 化合物的理化、元素分析、核磁和 IR 数据分别见表 1 和表 2。

表 1 化合物 **2a**~**2o** 的元素分析及物理性质数据

Table 1 Physical data and elemental analysis of compounds **2a**~**2o**

Compd.	Formula	m.p./°C	Appearance	Yield/%	Elemental analysis (calcd.)		
					C	H	N
2a	C ₂₃ H ₂₈ N ₄ O ₂	43~45	Yellow solid	69.5	70.12 (70.38)	7.18 (7.19)	14.31 (14.27)
2b	C ₂₃ H ₂₆ FN ₅ O ₄	134~135	Yellow solid	66.0	60.46 (60.65)	5.87 (5.75)	15.08 (15.38)
2c	C ₂₅ H ₃₂ N ₄ O ₂	36~38	Yellow solid	75.8	71.43 (71.40)	7.76 (7.67)	13.22 (13.32)
2d	C ₂₄ H ₂₆ F ₃ N ₅ O ₄	60~62	Yellow solid	71.6	56.91 (57.03)	5.26 (5.18)	13.76 (13.85)
2e	C ₂₃ H ₂₇ N ₅ O ₄	126~127	Yellow solid	66.8	63.19 (63.14)	6.18 (6.22)	15.88 (16.01)
2f	C ₂₅ H ₃₂ N ₄ O ₂	38~39	Yellow solid	68.6	71.18 (71.40)	7.79 (7.67)	13.45 (13.32)
2g	C ₂₃ H ₃₀ N ₆ O ₄	34~35	Yellow solid	70.5	60.55 (60.78)	6.46 (6.65)	18.81 (18.49)
2h	C ₂₄ H ₂₆ F ₃ N ₅ O ₄	152~154	Brown solid	78.2	56.98 (57.03)	5.24 (5.18)	13.61 (13.85)
2i	C ₂₉ H ₃₂ N ₄ O ₂	35~36	Yellow solid	68.0	74.21 (74.33)	6.94 (6.88)	11.83 (11.96)
2j	C ₂₃ H ₂₆ F ₂ N ₄ O ₂	115~117	White solid	66.5	64.20 (64.47)	6.12 (6.18)	12.89 (13.08)
2k	C ₂₄ H ₃₀ N ₄ O ₃	53~55	Yellow solid	73.0	68.43 (68.22)	7.18 (7.16)	13.09 (13.26)
2l	C ₂₄ H ₃₀ N ₄ O ₂	47~49	Yellow solid	82.6	70.68 (70.91)	7.65 (7.44)	13.55 (13.78)
2m	C ₂₄ H ₂₆ F ₃ N ₅ O ₄	110~112	White solid	68.8	57.05 (57.03)	5.31 (5.18)	13.72 (13.85)
2n	C ₂₃ H ₂₇ N ₅ O ₄	115~117	White solid	65.5	63.22 (63.14)	6.20 (6.22)	15.99 (16.01)
2o	C ₂₄ H ₃₀ N ₄ O ₂	100~102	White solid	61.0	71.23 (70.91)	7.25 (7.44)	13.64 (13.78)

表 2 化合物 **2a**~**2o** 的 ¹H NMR 和 IR 分析数据

Table 2 ¹H NMR and IR spectral data of compounds **2a**~**2o**

Compd.	¹ H NMR δ	IR ν/cm ⁻¹
2a	1.86~1.90 (m, 2H, 6-H), 2.35 (brs, 8H, pip-H), 2.62 (t, <i>J</i> =6.3 Hz, 2H, 5-H), 3.12 (s, 2H, NHCOCH ₂), 3.36 (s, 2H, 8-H), 3.79 (t, <i>J</i> =6.2 Hz, 2H, 7-H), 7.08~7.21 (m, 4H, ArH), 7.30 (t, <i>J</i> =8.1 Hz, 2H, ArH), 7.42 (brs, 1H, 3-H), 7.54 (d, <i>J</i> =8.1 Hz, 2H, ArH), 9.10 (s, 1H, NH)	3256, 2936, 2821, 1699, 1650, 1521, 760
2b	1.99~2.01 (m, 2H, 6-H), 2.66 (brs, 8H, pip-H), 2.71 (t, <i>J</i> =6.3 Hz, 2H, 5-H), 3.16 (s, 2H, NHCOCH ₂), 3.38 (s, 2H, 8-H), 3.80 (t, <i>J</i> =6.2 Hz, 2H, 7-H), 7.10~7.29 (m, 4H, ArH), 7.41 (brs, 1H, 3H), 7.94 (t, <i>J</i> =8.1 Hz, 1H, ArH), 7.20 (d, <i>J</i> =8.1 Hz, 1H, ArH), 9.33 (s, 1H, NH)	3268, 2942, 2821, 1697, 1649, 1537, 760
2c	1.47 (d, <i>J</i> =7.5 Hz, 3H, CH ₃), 1.95~1.99 (m, 2H, 6-H), 2.52 (brs, 8H, pip-H), 2.71 (t, <i>J</i> =6.3 Hz, 2H, 5-H), 2.98 (d, <i>J</i> =6.2 Hz, 2H, NHCOCH ₂), 3.31 (s, 2H, 8-H), 3.78 (t, <i>J</i> =6.2 Hz, 2H, 7-H), 5.12~5.17 (m, 1H, CH), 7.08~7.19 (m, 3H, ArH), 7.23~7.36 (m, 6H, ArH), 7.40 (d, <i>J</i> =8.1 Hz, 1H, NH)	3271, 2939, 2820, 1701, 1650, 1539, 763
2d	1.98~2.00 (m, 2H, 6-H), 2.70 (brs, 8H, pip-H), 2.70 (t, <i>J</i> =6.3 Hz, 2H, 5-H), 3.23 (s, 2H, NHCOCH ₂), 3.37 (s, 2H, 8-H), 3.79 (t, <i>J</i> =6.2 Hz, 2H, 7-H), 7.13~7.22 (m, 3H, ArH), 7.26 (brs, 1H, 3H), 7.85 (d, <i>J</i> =8.7 Hz, 1H, ArH), 8.52 (s, 1H, ArH), 9.08 (d, <i>J</i> =9.0 Hz, 1H, ArH), 12.10 (s, 1H, NH)	3269, 2938, 2821, 1711, 1656, 1516, 750
2e	1.99~2.01 (m, 2H, 6-H), 2.69 (brs, 8H, pip-H), 2.70 (t, <i>J</i> =6.3 Hz, 2H, 5-H), 3.21 (s, 2H, NHCOCH ₂), 3.38 (s, 2H, 8-H), 3.79 (t, <i>J</i> =6.2 Hz, 2H, 7-H), 7.16~7.19 (m, 4H, ArH), 7.26 (brs, 1H, 3H), 7.68 (t, <i>J</i> =0.9 Hz, 1H, ArH), 8.21 (d, <i>J</i> =8.4 Hz, 1H, ArH), 8.85 (d, <i>J</i> =8.7 Hz, 1H, ArH), 11.86 (s, 1H, NH)	3240, 2939, 2823, 1698, 1656, 1500, 745

续表

Compd.	$^1\text{H NMR } \delta$	IR ν/cm^{-1}
2f	1.98~2.00 (m, 2H, 6-H), 2.21 (s, 6H, CH ₃), 2.68 (brs, 8H, pip-H), 2.71 (t, $J=6.3$ Hz, 2H, 5-H), 3.19 (s, 2H, 8-H), 3.35 (s, 2H, 8-H), 3.79 (t, $J=6.2$ Hz, 2H, 7-H), 7.08~7.18 (m, 6H, ArH), 7.26 (brs, 1H, 3H), 8.64 (s, 1H, NH)	3241, 2939, 2819, 1668, 1654, 1492, 764
2g	1.98~2.00 (m, 2H, 6-H), 2.66 (brs, 8H, pip-H), 2.70 (t, $J=6.3$ Hz, 2H, 5-H), 3.19 (s, 2H, NHC(=O)CH ₂), 3.35 (s, 2H, 8-H), 3.79 (t, $J=6.2$ Hz, 2H, 7-H), 3.95 (s, 6H, CH ₃), 5.80 (s, 1H, Py-H), 7.12~7.19 (m, 3H, ArH), 7.26 (brs, 1H, 3H), 9.39 (s, 1H, NH)	3312, 2937, 2822, 1676, 1654, 1514, 763
2h	1.97~2.01 (m, 2H, 6-H), 2.68 (brs, 8H, pip-H), 2.72 (t, $J=6.3$ Hz, 2H, 5-H), 3.21 (s, 2H, NHC(=O)CH ₂), 3.34 (s, 2H, 8-H), 3.80 (t, $J=6.2$ Hz, 2H, 7-H), 7.13~7.22 (m, 3H, ArH), 7.27 (brs, 1H, 3H), 8.43 (d, $J=9.0$ Hz, 1H, ArH), 8.52 (d, $J=2.7$ Hz, 1H, ArH), 8.83 (d, $J=9.0$ Hz, 1H, ArH), 10.40 (s, 1H, NH)	3306, 2942, 2826, 1716, 1654, 1511, 749
2i	1.91~1.96 (m, 2H, 6-H), 2.52 (brs, 8H, pip-H), 2.67 (t, $J=6.3$ Hz, 2H, 5-H), 3.06 (s, 2H, NHC(=O)CH ₂), 3.24 (s, 2H, 8-H), 3.75 (t, $J=6.2$ Hz, 2H, 7-H), 7.08~7.14 (m, 4H, ArH), 7.16~7.34 (m, 10H, ArH)	2926, 2810, 1667 1491, 750
2j	1.87~1.93 (m, 2H, 6-H), 2.50 (brs, 8H, pip-H), 2.70 (t, $J=6.3$ Hz, 2H, 5-H), 3.12 (s, 2H, NHC(=O)CH ₂), 3.35 (s, 2H, 8-H), 3.69 (t, $J=6.2$ Hz, 2H, 7-H), 7.12~7.18 (m, 5H, ArH), 7.36~7.40 (m, 1H, ArH), 7.58 (brs, 1H, 3H), 9.42 (s, 1H, NH)	3276, 2940, 2821, 1713, 1654, 1513, 1011, 763
2k	1.97~1.99 (m, 2H, 6-H), 2.64 (brs, 8H, pip-H), 2.71 (t, $J=6.3$ Hz, 2H, 5-H), 3.11 (s, 2H, NHC(=O)CH ₂), 3.35 (s, 2H, 8-H), 3.79 (s, 3H, CH ₃), 3.79 (t, $J=6.2$ Hz, 2H, 7-H), 6.85~6.88 (m, 2H, ArH), 7.16~7.22 (m, 3H, ArH), 7.45 (d, $J=9.0$ Hz, 2H, ArH), 8.97 (s, 1H, NH)	3300, 2937, 2822, 1715, 1654, 1514, 1245, 763
2l	1.98~2.00 (m, 2H, 6-H), 2.31 (s, 3H, CH ₃), 2.64 (brs, 8H, pip-H), 2.7 (t, $J=6.3$ Hz, 2H, 5-H), 3.11 (s, 2H, NHC(=O)CH ₂), 3.35 (s, 2H, 8-H), 3.79 (s, 3H, CH ₃), 3.79 (t, $J=6.2$ Hz, 2H, 7-H), 7.11~7.16 (m, 5H, ArH), 7.42 (d, $J=8.1$ Hz, 2H, ArH), 9.02 (s, 1H, NH)	3301, 2937, 2820, 1708, 1655, 1521, 750
2m	1.96~2.00 (m, 2H, 6-H), 2.67 (brs, 8H, pip-H), 2.73 (t, $J=6.3$ Hz, 2H, 5-H), 3.18 (s, 2H, NHC(=O)CH ₂), 3.39 (s, 2H, 8-H), 3.79 (t, $J=6.2$ Hz, 2H, 7-H), 7.13~7.22 (m, 3H, ArH), 7.26 (brs, 1H, 3H), 7.96~8.02 (m, 3H, ArH), 9.58 (s, 1H, NH)	3298, 2936, 2822, 1709, 1657, 1521, 1324, 1275, 750
2n	1.98~2.02 (m, 2H, 6-H), 2.67 (brs, 8H, pip-H), 2.71 (t, $J=6.3$ Hz, 2H, 5-H), 3.16 (s, 2H, NHC(=O)CH ₂), 3.38 (s, 2H, 8-H), 3.80 (t, $J=6.2$ Hz, 2H, 7-H), 7.13~7.22 (m, 3H, ArH), 7.26 (brs, 1H, 3H), 7.48~7.52 (m, 1H, ArH), 7.96 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, ArH), 8.01 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, ArH), 8.3 (d, $J=1.8$ Hz, 1H, ArH), 9.38(s, 1H, NH)	3302, 2938, 2821, 1702, 1649, 1529, 750
2o	1.93~1.97 (m, 2H, 6-H), 2.52 (brs, 8H, pip-H), 2.68 (t, $J=6.3$ Hz, 2H, 5-H), 2.91 (s, 2H, NHC(=O)CH ₂), 3.25 (s, 5H, 8-H, CH ₃), 3.76 (t, $J=6.3$ Hz, 2H, 7-H), 7.09~7.20 (m, 5H, ArH), 7.33~7.43 (m, 4H, ArH)	2921, 2810, 1655, 1494, 1275, 1260, 750

1.3 目标化合物 2a~2o 的生物活性测定

1.3.1 对小菜蛾(*Plutella xylostella*)的生物活性测定(浸叶法)

采用国际抗性行动委员会(IRAC)提出的浸叶法. 用直头眼科镊子夹取甘蓝叶片浸渍到配制好的待测药液中, 时间3~5 s, 甩掉余液. 每次1片, 每个样品共3片. 按样品标记顺序依次放在处理纸上. 待药液干后, 放入具有标记的10 cm长的直型管内, 接入2龄小菜蛾幼虫30头, 用纱布盖好管口. 将试验处理置于标准处理室内, 96 h 检查结果以拨针轻触虫体, 不动者为死亡. 计算死亡率, 实验做3次重复, 取平均值. 采用空白对照, 并采用商品化杀虫剂噻虫嗪和吡虫啉作为对照药剂.

1.3.2 对甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)的生物活性测定(浸叶法)

采用国际抗性行动委员会(IRAC)提出的浸叶法. 用直头眼科镊子夹取甘蓝叶片浸渍到配制好的待测药液中, 时间3~5 s, 甩掉余液. 每次1片, 每个处理共3片. 按样品标记顺序依次放在处理纸上. 待药液干后, 放入具有标记的60 cm长的培养皿内, 接入3龄甜菜夜蛾幼虫30头, 盖好盖子. 将试验处理置于标准处理室内, 96 h 检查结果以拨针轻触虫体, 不动者为死亡. 计算死亡率, 实验做3次重复, 取平均值. 采用空白对照, 并采用商品化杀虫剂噻虫嗪和吡虫啉作为对照药剂.

1.3.3 对粘虫(*Mythimna separate*)的生物活性测定(浸叶法)

将样品用丙酮配制成不同浓度的溶液, 浸渍苗期玉米叶, 晾干后放入 7 cm 培养皿中, 接入 4 龄幼虫, 重复 2~4 次. 对照用丙酮溶液浸渍玉米叶饲养幼虫. 24 h 后随时添加新鲜的玉米叶片. 在 24, 48, 72, 96 h 观察试验结果, 直至对照幼虫正常蜕皮变成 5 龄. 以粘虫幼虫完全死亡, 即触之不动为幼虫的死亡标准. 计算死亡率, 实验做 3 次重复, 取平均值. 采用空白对照, 并采用商品化杀虫剂噻虫嗪和吡虫啉作为对照药剂.

1.3.4 对玉米螟(*Pyrausta nubilalis*)的生物活性测定(浸虫法)

将样品用丙酮配制成不同浓度的溶液, 将适龄试虫放于浸虫器内于药液中浸渍 3~5 s, 放入加有人工饲料的十孔养虫盒内放于恒温养虫室中饲养. 处理后 72 h 检查死、活虫数, 计算死亡率, 实验做 3 次重复, 取平均值. 采用空白对照, 并采用商品化杀虫剂噻虫嗪和吡虫啉作为对照药剂.

1.3.5 对棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)生物活性测定(微量点滴法)

采用 FAO 推荐微量点滴法, 用丙酮将原药稀释成 4~5 个系列浓度, 选取发育一致的试虫用 Robbins Scientific 微量点滴器将药液点滴到幼虫的胸部背板, 3 龄幼虫每头 0.5 μL , 4 龄幼虫每头 1.0 μL , 处理后 72 h 检查死、活虫数, 计算死亡率, 实验做 3 次重复, 取平均值. 采用空白对照, 并采用商品化杀虫剂噻虫嗪和吡虫啉作为对照药剂.

1.3.6 对蚊幼虫(*Culex pipiens pallens* Coquillett)的生物活性测定

将样品用丙酮配制成一定浓度的母液, 在 100 mL 的烧杯内加入 90 mL 脱氯水(自来水静置 15 d 以上), 分别加入不同量的样品母液, 再加 10 mL 含有 10 头 4 龄蚊幼虫(2 日龄, 虫体腹部变粗)的饲养水. 处理后每天添加少许饲料, 直到蚊幼虫全部化蛹或死亡. 处理室温度 $(28 \pm 2)^\circ\text{C}$. 随时将化的蛹吸走, 观察时间为 8 d, 计算死亡率, 实验做 3 次重复, 取平均值. 采用空白对照, 并采用商品化杀虫剂噻虫嗪和吡虫啉作为对照药剂.

1.3.7 目标化合物的杀菌活性测定

采用离体平皿法^[5], 以四种常见植物病原菌水稻纹枯菌(*Thanatephorus cucumeris*)、黄瓜灰霉菌(*Botrytis cinerea*)、小麦赤霉菌(*Fusarium graminearum*)、番茄早疫病(*Tomato Early Blight*)、烟草赤星病(*Alternaria alternata* (Fries) Keissler)、黄瓜炭疽病菌(*Colletotrichum acutatum*)为对象, 对所合成的化合物进行杀菌活性测定. 药液以 *N,N*-二甲基甲酰胺为溶剂, 实验终浓度为 50

$\mu\text{g/mL}$. 将配制好的药液各取 1 mL 于已灭菌的培养皿中, 再取冷却到 45°C 左右的 PDA 培养基 9 mL 倒入培养皿, 充分混匀, 置平板使凝固. 然后用打孔器移接菌饼, 菌面向下接于含毒培养基中心, 每皿一块, 放于恒温箱中, 培养 2 d 后测量菌落直径, 通过以下公式计算抑制率.

抑制率% = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) $\div$ 对照菌落直径 $\times 100\%$

每个样品重复 3 次, 以加入无菌水的培养基为对照, 分别采用 70% 甲基托布津 WP, 40% 菌核净 WP, 75% 百菌清 WP 和 50% 多菌灵 WP 为对照药剂.

2 结果与讨论

2.1 Aspernigerin 类似物的合成

2.1.1 目标化合物 2 合成路线的选择

针对目标化合物 2 的结构特点, 不难发现其结构是一类以哌嗪环为中心的对称性化合物. 因此, 在目标化合物的合成路线设计上, 我们有两种选择: 一是参考谭仁祥课题组合成 Aspernigerin 的方法^[1,2], 以哌嗪为原料, 由中心逐步向外合成的方法(Scheme 2), 该方法路线较长, 操作较为繁琐, 收率较低, 仅为 47.3%, 产物纯化困难, 尤其是在合成中间体 I 和 II 时, 因其氨基酰氯结构, 很不稳定, 且是以盐酸盐的形式存在, 难以进行纯化, 只能一步合成到目标产物 2 后再来进行纯化. 二是根据我们前期工作中完成的 Aspernigerin 全合成新方法, 采用由外及里的合成方法, 先合成氯乙酰基-1,2,3,4-四氢喹啉和氯乙酰基芳胺片段, 再与哌嗪中心对接, 不但步骤简便, 而且每步中间体都易于纯化(Scheme 1). 经过两种方法的探索, 最后, 我们选定 Scheme 1 所示路线作为目标化合物 2 的最终合成路线.

2.1.2 中间体 *N*-氯乙酰-1,2,3,4-四氢喹啉的合成

参照文献[6, 7]方法合成中间体 *N*-氯乙酰-1,2,3,4-四氢喹啉时, 中间体是不经过纯化直接用于下一步合成的. 但是, 当我们用不经过纯化的 *N*-氯乙酰-1,2,3,4-四氢喹啉直接用于后一步反应时, 发现产物很复杂, 而且不好纯化, 需要通过多次柱层析纯化才能得到纯度较好的产品, 收率很低, 而用纯化好的 *N*-氯乙酰-1,2,3,4-四氢喹啉作原料后, 反应副产物大大减少. 为此, 我们针对中间体 *N*-氯乙酰-1,2,3,4-四氢喹啉的纯化进行了细致的研究, 首先, 我们采用柱层析的方法进行纯化, 可以获得较高纯度的 *N*-氯乙酰-1,2,3,4-四氢喹啉, 但是收率较低, 一次得到的中间体量较少. 而后, 我们发现纯的 *N*-氯乙酰-1,2,3,4-四氢喹啉在常温下是液体, 尝试性地高真空减压蒸馏, 收集 $162 \sim 164^\circ\text{C}/130\text{ Pa}$ 的主要馏分, 经结构鉴定即为产物, 不但纯度高, 而且收率较

Scheme 2

柱层析也有较大提高, 操作简便, 能一次性得到大量的 *N*-氯乙酰-1,2,3,4-四氢喹啉。

2.1.3 *N*-(1,2,3,4-四氢喹啉基)-*N*-甲酰甲基)哌嗪的合成

在合成 *N*-(1,2,3,4-四氢喹啉基)-*N*-甲酰甲基)哌嗪的反应过程中, 容易发生产物和 *N*-氯乙酰-1,2,3,4-四氢喹啉进一步反应生成 *Aspernigerin* 的副反应, 而原料哌嗪的过量可抑制该副反应的发生, 过量越多, 副产物就越少, 但是到了一定程度后, 增加哌嗪的量对抑制副产物的作用就越小, 且原料哌嗪的回收困难, 损失也大大增加。实验证明, 在摩尔投料比上哌嗪为 *N*-氯乙酰-1,2,3,4-四氢喹啉的 2 倍左右为宜。

反应溶剂的选择, 该反应原理上是氮上的亲核取代反应, 根据文献[8~10]报道的常用溶剂, 我们重点针对无水乙醇、*N,N*-二甲基甲酰胺和甲苯做了筛选实验, 以点板监控 *N*-氯乙酰-1,2,3,4-四氢喹啉消失为反应终点, 结果如表 3 所示。

表 3 反应溶剂对收率的影响

Table 3 Influence of reaction solvent on the yield

反应溶剂	<i>T</i> /°C	<i>t</i> /h	产物收率/%
无水乙醇	80	4.0	46.6
<i>N,N</i> -二甲基甲酰胺	80	4.0	72.0
甲苯	80	6.0	36.2

从表 3 可以看出, 以非极性溶剂甲苯作溶剂的不但反应时间长, 而且收率很低, 主要是因为反应原料哌嗪在甲苯中的溶解度较差, 生成的产物容易 *N*-氯乙酰-1,2,3,4-四氢喹啉进一步反应生成副产物 *Aspernigerin*; 以无水乙醇作溶剂的反应收率要比 *N,N*-二甲基甲酰胺的反应收率低, 主要是因为质子化的溶剂存在参与竞争的烷氧基负离子, 消耗了一部分原料, 导致收率下降, 最终确定该步反应溶剂为 *N,N*-二甲基甲酰胺。

2.1.4 目标化合物的合成

在目标化合物的合成中, 为了便于目标化合物的分离纯化, 必须确保 *N*-(1,2,3,4-四氢喹啉基)-*N*-甲酰甲基)

哌嗪反应完全, 因此, 在投料比上, 以原料氯乙酰芳胺过量为宜。为了反应快速, 便于后处理, 在缚酸剂的选择上, 我们选择了液体有机碱三乙胺作为缚酸剂, 效果非常理想。溶剂的选择上我们尝试过甲苯、三氯甲烷和 *N,N*-二甲基甲酰胺^[11,12], 甲苯因为对 *N*-(1,2,3,4-四氢喹啉基)-*N*-甲酰甲基)哌嗪的溶解性较差, 反应时间长, 副产物复杂, 分离纯化困难, 收率低; *N,N*-二甲基甲酰胺作溶剂主要存在 *N,N*-二甲基甲酰胺沸点高, 难以脱除, 且容易在产品中残留等问题; 最终我们选择了三氯甲烷作溶剂进行反应, 不但收率高, 而且后处理简单, 容易得到高纯度目标化合物。

2.2 目标化合物的图谱解析

以目标化合物 **2a** 为例, 在化合物 **2a** 的红外图谱中, 在 3256 cm^{-1} 处出现了 *N*-H 伸缩振动吸收峰, 化合物中亚甲基 CH_2 上的碳氢伸缩振动吸收峰在 2936, 2821 cm^{-1} 两处, 1699, 1651 cm^{-1} 处为典型的 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动吸收, 而在 1491 cm^{-1} 处出现的峰为 CH_2 上的碳氢弯曲振动吸收峰, $\text{C}-\text{N}$ 伸缩振动吸收峰在 1298 cm^{-1} 处。

在化合物 **2a** 的 ^1H NMR 中, 为了便于解析, 我们对化合物中的氢原子作如 Scheme 3 编号所示, 化合物中唯一的活泼氢酰胺质子的化学位移值在 δ 9.1 处显示为单峰, δ 7.5 处的两重峰和 δ 7.3 处的三重峰为苯胺芳环上氢的化学位移值, 化合物中 3 位氢的化学位移值在 δ 7.4 左右, 图谱上显示为较宽的单峰, 我们分析认为是 3 位氢受分子内酰胺羰基的影响, 形成分子内六元环结构, 由于氧原子的电负性强, 产生吸电子效应, 导致苯环上 3 位的 $\text{C}-\text{H}$ 键电子云密度降低, 不但化学位移向低场移动, 而且具有了一定的活泼氢的性质, 峰型变宽。芳环上其他的质子在化学位移 δ 7.0~7.2 处显示为多重峰。7 位质子受酰胺 *N* 原子的影响化学位移向低场移动, 并受 6 位质子的偶合裂分, 在化学位移 δ 3.7 左右显示为三重峰。8 位质子受酰胺羰基的影响化学位移向低场移动, 在化学位移 δ 3.4 处显示为单峰, 而化合物中另一个乙酰基的 CH_2 质子在化学位移 δ 3.1 处同样显示为单峰。5

位质子受苯环的影响化学位移也在相对低场为 δ 2.6 左右. 哌嗪环上的质子在化学位移 δ 2.3 处显示为较宽的单峰. 6 位质子化学位移在最高场为 δ 1.9 左右, 由于受 5, 7 位多个质子的偶合裂分, 显示为多重峰.

Scheme 3

2.3 目标化合物的生物活性

2.3.1 目标化合物的杀虫活性

分别采用浸叶法、浸渍法、浸虫法、微量点滴法测定了目标化合物 **2a**~**2o** 在 600 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度下对小菜蛾、甜菜夜蛾、蚜虫、红蜘蛛、粘虫、棉铃虫、玉米螟、蚊幼虫的生物活性, 并采用商品化杀虫剂噻虫嗪和吡虫啉作为对照药剂, 其测定结果列于表 4 中.

由表 4 中结果可知: 大部分目标化合物在 600 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度下对小菜蛾、甜菜夜蛾、粘虫、棉铃虫、玉米螟和蚊幼虫表现出了一定的杀虫活性, 其中化合物 **2n** 对小菜蛾的致死率在 600, 200 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度下对小菜蛾表现出 100% 的杀虫活性, 高于母体化合物 Aspernigerin 和对照药剂噻虫嗪. 值得关注的是, 杀虫活性普遍表明 **2o** $\geq$ **2i** $\geq$ **2a**, 说明 R 基团对杀虫活性影响是较为明显的, 具有 $\text{CH}_3 \geq \text{C}_6\text{H}_5 \geq \text{H}$ 的趋势, 因此, 在

以后的化合物设计中, 可考虑 R 基团以不同的烷基取代.

2.3.2 目标化合物的杀菌活性

采用离体平皿法^[5], 测定了目标化合物 **2a**~**2o** 在 100 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度下对植物病原菌水稻纹枯菌 (*Thanatephorus cucumeris*)、黄瓜灰霉菌 (*Botrytis cinerea*)、小麦赤霉菌 (*Fusarium graminearum*)、番茄早疫病 (Tomato Early Blight)、烟草赤星病 (*Alternaria alternata* (Fries) Keissler)、黄瓜炭疽病菌 (*Colletotrichum acutatum*) 的生物活性. 并采用商品化杀菌剂苯醚甲环唑作为对照药剂, 其测定结果列于表 5 中.

由表 5 结果可知: 化合物 **2d**~**2k** 在 100 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度下对植物病原菌小麦赤霉病、水稻纹枯菌、黄瓜灰霉病、番茄早疫病、烟草赤星病、黄瓜炭疽病菌都表现出了一定的抑制活性, 所有化合物都对黄瓜灰霉病表现出了抑制活性, 其中化合物 **2d**, **2e**, **2j**, **2k** 更是表现出了中等偏上的抑制活性, 抑制率分别为 75%, 67%, 75%, 62%, 优于母体化合物 Aspernigerin 的抑制活性, 但是都比对照药剂苯醚甲环唑的抑制活性差. 同样值得关注的是, 杀菌活性普遍表明 **2i** $\geq$ **2o** $\geq$ **2a**, 说明 R 基团对杀菌活性也有明显的影响, 具有 $\text{C}_6\text{H}_5 \geq \text{CH}_3 \geq \text{H}$ 的趋势, R 基团越大活性越高, 因此, 在以后的化合物设计中, 可考虑 R 基团以较大基团取代.

以上研究结果表明, Aspernigerin 结构简单, 在医药上表现出对肿瘤细胞有较好的抑制活性^[1,2], 但在农业上的应用研究未有报道. 我们以 Aspernigerin 为母体结

表 4 Aspernigerin 的类似物杀虫活性(%)测试结果
Table 4 Insecticidal activity (%) of aspernigerin's analogues

Compd.	小菜蛾		甜菜夜蛾 ^a	粘虫 ^a	棉铃虫 ^a	玉米螟 ^a	蚊幼虫 ^b
	600 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$					
Aspernigerin	100	75	21	20	20	40	50
2a	0	0	16	30	20	40	20
2b	0	0	19	40	50	30	20
2c	0	0	24	10	30	10	20
2d	0	0	31	20	20	40	40
2e	0	0	29	30	40	20	20
2f	52	29	20	20	30	30	10
2g	0	0	17	30	20	60	20
2h	0	0	25	40	20	50	40
2i	36	14	21	20	30	30	50
2j	42	14	29	10	40	20	10
2k	38	14	27	20	50	20	30
2l	76	57	22	20	50	30	40
2m	0	0	28	50	50	20	60
2n	100	100	26	10	20	30	30
2o	58	43	24	20	20	30	50
98%噻虫嗪	100	86	42	100	100	100	100
98%吡虫啉	100	100	35	100	100	100	100

^a 测试浓度为 600 $\mu\text{g/mL}$; ^b 测试浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$.

表 5 Aspernigerin 的类似物离体杀菌活性测试结果(抑制率/%)
Table 5 Fungicidal activity (inhibition rate/%) *in vitro* of aspernigerin analogues

Compd.	小麦赤霉病	水稻纹枯病	黄瓜灰霉病	番茄早疫病	烟草赤星病	黄瓜炭疽病
Aspernigerin	33	58	51	28	0	0
2a	0	0	51	25	0	0
2b	0	0	49	0	0	0
2c	22	0	51	0	0	0
2d	49	52	75	58	47	46
2e	61	43	67	40	28	29
2f	36	0	49	35	29	25
2g	37	37	51	42	25	23
2h	36	0	43	41	24	25
2i	55	48	52	55	25	46
2j	32	35	75	58	33	50
2k	42	39	62	36	24	27
2l	0	0	52	25	0	0
2m	0	0	33	0	0	0
2n	35	0	59	38	25	25
2o	0	43	30	32	0	0
苯醚甲环唑	100	83	84	100	100	100

构, 经简单的结构改造, 发现该类化合物在杀虫活性以及杀菌活性方面都有很好表现, 此类结构化合物可能存在良好应用前景, 值得进一步研究。

References

- [1] Shen, L.; Ye, Y.-H.; Wang, X.-T.; Zhu, H.-L.; Xu, C.; Song, Y.-C.; Li, H.; Tan, R.-X. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 4393.
- [2] Shen, L. *Ph.D. Dissertation*, Nanjing University, Nanjing, **2006** (in Chinese).
(申丽, 博士论文, 南京大学, 南京, **2006**.)
- [3] Frank, D. P.; Ernest, C.; Robert, B. D.; Warren, K. *J. Med. Chem.* **1962**, *5*, 398.
- [4] Sarah, C.; Raymond, H.; Jean-Pierre, H. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3502.
- [5] Chen, N.-C. *Bioassay of Pesticides*, Beijing Agricultural University Press, Beijing, **1991**, pp. 161~162 (in Chinese).
(陈年春, 农药生物测定技术, 北京农业大学出版社, 北京, **1991**, pp. 161~162.)
- [6] Chong, J. A.; Fanger, C.; Larson, G. R.; Lumma, W. C.; Moran, M. M.; Ripka, A.; Underwood, J. D.; Weigele, M.; Zhen X. G. *US 2007213321*, **2007** [*Chem. Abstr.* **2007**, *147*, 365488].
- [7] Wang, Z.-Y.; Wang, C.-Z.; Wang, F.-X.; Yang, J. *Chin. J. Pharm.* **2005**, *36*, 261 (in Chinese).
(王志远, 王成章, 王福祥, 杨洁, 中国医药工业杂志, **2005**, *36*, 261.)
- [8] Silverman, I. R.; Ali, S. F.; Cohen, D. H.; Lyga, J. W.; Simmons, K. A.; Cullen, T. G. *WO 9726252*, **1997** [*Chem. Abstr.* **1997**, *127*, 176441].
- [9] Li, Z.-G.; Huang, R.-Q.; Shao, R.-L.; Ma, J.-A. *Chin. J. Synth. Chem.* **2000**, *8*, 130 (in Chinese).
(李在国, 黄润秋, 邵瑞链, 马君安, 合成化学, **2000**, *8*, 130.)
- [10] Beth, A. L.; James, M. R.; Thomas, C. S.; Michael, T. S.; Irene, M. M.; Jeffery, D. W. *US 2007004750*, **2007** [*Chem. Abstr.* **2007**, *146*, 121988].
- [11] Li, G.-Y.; Yan, S.-G.; Jiang, S.; Qian, X.-H.; Huang, Q.-C.; Zhang, R. *Chin. J. Org. Chem.* **2008**, *28*, 2001.
(李刚月, 阎圣刚, 蒋山, 钱旭红, 黄青春, 张蓉, 有机化学, **2008**, *28*, 2001.)
- [12] Cai, M.-Y.; Li, Z.; Fan, F.; Huang, Q.-C.; Shao, X.-S.; Song, G.-H. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 2624.

(Qin, X.)