取代苯丙醛缩氨基硫脲类化合物的合成及其对棉铃虫酪氨酸酶的生物活性研究

徐焱^a 王振^a 凌云^a 董玮^b 邢静^b
梁沛^b 杨新玲^{*,a}^(a) 中国农业大学理学院 农业部农药化学与应用重点开放实验室 北京 100193)^(b) 中国农业大学农学与生物技术学院 北京 100193)

摘要 酪氨酸酶在昆虫体内起着很重要的生理作用, 是一个潜在的农药作用靶标. 为了发现新的农药先导化合物, 在前期工作基础之上, 设计了一系列取代苯丙醛缩氨基硫脲类化合物, 以取代苯甲醛为起始原料, 经 5 步反应合成了 15 个目标化合物, 其结构通过红外、核磁共振、质谱及元素分析确认. 生物活性测试结果表明, 该系列化合物对棉铃虫酪氨酸酶活性均优于商品化药剂托酚酮.

关键词 苯丙醛; 缩氨基硫脲; 酪氨酸酶; 生物活性

Synthesis of Substituted Phenylpropyl Aldehyde Thiosemicarbazone Compounds and Their Bioactivity on Tyrosinase of Cotton Bollworm

Xu, Yan^a Wang, Zhen^a Ling, Yun^a Dong, Wei^b Xing, Jing^b
Liang, Pei^b Yang, Xinling^{*,a}^(a) Key Laboratory of Pesticide Chemistry and Application, Ministry of Agriculture, College of Science, China Agricultural University, Beijing 100193)^(b) College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193)

Abstract Tyrosinase played an important biological function in insect and might be a potent target for pest control. In order to find new lead of pesticide, a series of substituted phenylpropyl aldehyde thiosemicarbazone compounds were designed based on our previous work. The title compounds were synthesized from the starting material of substituted benzaldehyde in 5 steps. Their structures were characterized by IR, ¹H NMR, MS techniques and elemental analysis. The bioassay result showed that all of the title compounds exhibited higher inhibitory effect than commercial reagent tropolone on the tyrosinase of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*.

Keywords phenylpropyl aldehyde; thiosemicarbazone; tyrosinase; biological activity

酪氨酸酶(tyrosinase)又称多酚氧化酶(phenoloxidase), 广泛存在于动物、植物及微生物中. 它能催化两种截然不同的黑色素合成反应: 一是通过单酚酶催化酪氨酸酶的羟基化作用, 二是由 *L*-DOPA 通过双酚酶催化变为 *o*-多巴醌的氧化反应^[1]. 因此酪氨酸酶在生物体中具有重要的生理功能. 而在昆虫体内, 它参与昆虫的体壁鞣化、骨化及黑化等过程, 是昆虫新表皮形成所不可

缺少的关键酶. 酪氨酸酶还是昆虫免疫系统的重要组成部分, 在抵御侵入昆虫体内的病原菌、有毒化合物及促进伤口愈合等过程中起着重要作用. 因此, 调节酪氨酸酶的活性可起到控制昆虫生长发育的作用. 酪氨酸酶是二价铜离子(Cu²⁺)与酶蛋白相结合的一种金属酶, 在其活性中心一对铜原子与六个组氨酸残基相结合. Thomas 等^[2]研究了与酪氨酸酶具有相似活性中心的儿茶酚酶与

* E-mail: yangxl@cau.edu.cn; Tel.: 010-62732223.

Received November 18, 2011; revised December 17, 2011; published online March 22, 2012.

Project supported by the National Scientific and Technology Supporting Program of China (No. 2011BAE06B05-5), the National Key Project for Basic Research (No. 2010CB126104) and the National High Technology Research and Development Program (No. 2006AA10A201).

国家“十二五”科技支撑计划课题(No. 2011BAE06B05-5)、国家 973 计划(No. 2010CB126104)及国家高技术研究发展计划(“863”计划)(No. 2006AA10A201)资助项目.

苯基硫脲(A)的结合情况(Scheme 1, A), 发现硫原子与两个铜原子有键连作用, 同时 Ile241, His244, Phe261 侧链形成的疏水空腔与 PTU 的芳环存在范德华力作用. 刘春艳等^[3]通过实验研究发现, 苯基硫脲对家蝇酪氨酸酶有明显抑制作用($IC_{50}=0.15 \mu\text{mol/L}$). 随后, 薛超彬等^[4]发现苯甲醛缩氨基硫脲及其衍生物 B 对菜青虫酪氨酸酶有较高的抑制活性($IC_{50}=0.84 \mu\text{mol/L}$), 并指出碳氮双键处增加疏水性基团对活性提高有利. 刘进兵等^[5]在苯基硫脲和烷基硫脲的基础上进行改造, 合成了一系列 1-(1-芳基亚乙基)氨基硫脲类衍生物 C, 发现它们对蘑菇酪氨酸酶的活性均高于对照药剂 4-甲氧基丙烯酸和熊果苷. 之后, 他们又设计合成了亚烷基氨基硫脲类化合物 D 和 4-苯基-*O*- β -D-糖苷类化合物 E^[6], 发现所有化合物对蘑菇酪氨酸酶的活性均高于对照药剂熊果苷, 并且认为缩氨基硫脲基团有利于活性提高(Scheme 1). Ramadan^[7]以缩氨基硫脲为原料, 合成了 [4-(4-溴苯基)-2-噻唑]脲类化合物及其 D-乳糖衍生物, 发现该类化合物还具有抗菌活性.

Scheme 1

我们^[8]针对酪氨酸酶的结构特点, 曾设计合成了含噻唑环乙二酰胺类化合物 F, 对小菜蛾酪氨酸酶的抑制活性不明显, 推测原因可能是芳香环位阻效应阻碍了氧原子与酶活性中心的铜离子的结合. 同时, 又研究比较了取代苯甲醛缩氨基硫脲(脲、硝基脲)类化合物对小菜蛾酪氨酸酶的抑制活性^[9], 结果表明硫脲类化合物对小菜蛾酪氨酸酶的抑制活性明显高于脲类和胍类化合物, 说明硫脲结构的存在对化合物的活性有利. 为了进一步发现具有新型农药活性的先导化合物, 我们在前期工作的基础上, 通过保留硫脲活性结构, 增加硫脲和芳香环之间的距离, 设计合成了一系列取代苯丙醛缩氨基硫脲类化合物 6. 通过测试该类化合物对棉铃虫酪氨酸酶的

抑制作用, 期望发现对酪氨酸酶具有抑制活性的新型先导化合物, 为新型昆虫生长调节剂的开发提供依据. 目标化合物的合成路线如 Scheme 2 所示.

R = H, 4-F, 4-Cl, 2-Cl, 2,4-Cl₂, 4-OCH₃, 2-OCH₃, 3-OCH₃, 4-OC₂H₅, 4-NO₂, 2-NO₂, 4-CH₃, 4-*i*-Pr, 3-Br, 2,4-(OCH₃)₂

Scheme 2

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

熔点仪: Cole-Parmer 熔点仪(温度计未校正); 核磁共振仪: Bruker Advance DPX (300 MHz), TMS 为内标, DMSO-*d*₆ 为溶剂; 红外光谱仪: NEXUS-470 FTIR (Nicolet)智能傅立叶红外光谱仪; 液相色谱-质谱联用分析仪: Waters Alliance2695-2487-ZQ4000; 元素分析仪: ST-Carloerba.Co.

实验中所用试剂均为市售 AR 或 CP 级试剂, 重要试剂丙二酸于真空干燥箱中 90 °C 干燥 12 h; 吡啶用氢氧化钾干燥 12 h 后重蒸备用; 哌啶用氢氧化钾干燥 12 h 后重蒸备用; 二氯甲烷用氯化钙干燥 24 h 后重蒸备用.

1.2 化合物合成

1.2.1 中间体 3-(2,4-二氯苯基)-丙烯酸(2)的制备

在装有温度计的 50 mL 三口烧瓶中, 加入 3.56 g (0.0342 mol)丙二酸和 5 mL 无水吡啶, 再向其中加入 0.5 mL 无水哌啶, 室温搅拌 0.5 h. 然后升温至 80 °C 时, 分批加入 4 g (0.0228 mol) 2,4-二氯苯甲醛. 继续控温至 2,4-二氯苯甲醛反应完全, 停止反应. 冰浴降温至 0 °C 以下, 滴加 10% 的盐酸溶液至 pH=1, 析出大量固体, 抽滤, 水洗, 干燥后得白色固体^[10] 4.5 g, 收率 91%, m.p. 229~232 °C(文献值^[11]: 232~233 °C).

1.2.2 中间体 3-(2,4-二氯苯基)-丙烯酸乙酯(3)的制备

向 50 mL 三口烧瓶中加入 2.17 g (0.01 mol) 3-(2,4-二氯苯基)-丙烯酸(2), 1 mL 二氯亚砷和 10 mL 无水乙醇, 搅拌, 加热升温至回流. 待反应物 2 反应完全, 停止反应. 反应液减压蒸馏, 浓缩后析出白色固体, 再用乙醇重结晶, 得白色絮状固体^[12], 收率 82%, m.p. 45~50 °C.

1.2.3 中间体 3-(2,4-二氯苯基)-丙醇(4)的制备

向 100 mL 三口烧瓶中加入 2.61 g (0.0106 mol) 3-(2,4-二氯苯基)-丙烯酸乙酯(3), 53 mL PEG400 和 1.15 g (0.032 mol) NaBH₄. 搅拌并升温至 65 °C, 保温反应至反应物 3 反应完全. 反应液冷却至室温, 滴加 10% 的盐酸溶液至酸性. 用无水乙醚萃取(30 mL×4), 合并有机相, 无水硫酸镁干燥. 抽滤, 滤液浓缩得粗产物. 然后经柱层析纯化[梯度洗脱: (1) *V*(石油醚): *V*(乙酸乙酯)=8:1; (2) *V*(石油醚): *V*(乙酸乙酯)=4:1], 得浅黄色透明液体^[13] 1.78 g, 收率 82%.

1.2.4 中间体 3-(2,4-二氯苯基)-丙醛(5)的制备

向 50 mL 三口烧瓶中加入 1.3 g (0.006 mol) PCC 和 20 mL 无水二氯甲烷, 室温搅拌 0.5 h. 滴加含 0.8 g (0.0039 mol) 3-(2,4-二氯苯基)-丙醇(4)的 5 mL 二氯甲烷溶液. 滴毕, 继续反应至反应物 4 反应完全, 加入适量助滤剂搅拌, 抽滤, 并用少量乙酸乙酯洗涤固体, 得到无色透明液体, 浓缩得黄色液体^[14] 0.22 g, 收率 28%.

1.2.5 目标物 3-(2,4-氯苯基)-丙醛缩氨基硫脲(6d)的制备

向 50 mL 三口烧瓶中加入 0.22 g (91.09 mmol) 3-(2,4-二氯苯基)-丙醛(5), 10 mL 乙醇和 0.11 g (1.2 mmol)氨基硫脲, 滴加 2 滴冰醋酸, 加热回流. 待反应物 5 反应完全, 停止反应. 冷却后析出白色固体. 抽滤, 用少量乙醇洗涤固体^[15], 干燥得 0.2 g, 收率 66%.

同法制备目标物 6a~6o.

3-苯基-丙醛缩氨基硫脲(6a): 白色固体, 收率 53%. m.p. 125~126 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ : 2.47~2.54 (m, 2H, CH₂), 2.81 (t, *J*=7.95 Hz, 2H, CH₂), 7.16~7.31 (m, 5H, ArH), 7.43~7.47 (m, 2H, CH=N+NH₂), 7.98 (s, 1H, NH₂), 11.08 (s, 1H, NH); IR (KBr) ν : 3413, 3159, 1596, 1279 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z*: 207.8 [*M*+H]⁺. Anal. calcd for C₁₀H₁₃N₃S: C 57.94, H 6.32, N 20.27; found C 58.13, H 6.42, N 20.38.

3-(2-氯苯基)-丙醛缩氨基硫脲(6b): 黄色固体, 收率 65%. m.p. 137~139 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ : 2.47~2.54 (m, 2H, CH₂), 2.93 (t, *J*=7.89 Hz, 2H, CH₂), 7.23~7.31 (m, 2H, ArH), 7.36~7.48 (m, 4H,

CH=N+ArH+NH₂), 7.98 (s, 1H, NH₂), 11.10 (s, 1H, NH); IR (KBr) ν : 3420, 3151, 1595, 1289, 1101 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z*: 241.9 [*M*+H]⁺. Anal. calcd for C₁₀H₁₂ClN₃S: C 49.68, H 5.00, N 17.38; found C 49.86, H 4.99, N 17.32.

3-(4-氯苯基)-丙醛缩氨基硫脲(6c): 白色固体, 收率 82%. m.p. 181~182 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ : 2.47~2.53 (m, 2H, CH₂), 2.81 (t, *J*=7.74 Hz, 2H, CH₂), 7.25~7.28 (m, 2H, ArH), 7.31~7.36 (m, 2H, ArH), 7.44 (t, *J*=4.89 Hz, 1H, CH=N), 7.47 (s, 1H, NH₂), 7.98 (s, 1H, NH₂), 11.08 (s, 1H, NH); IR (KBr) ν : 3412, 3158, 1604, 1276, 1083 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z*: 241.8 [*M*+H]⁺. Anal. calcd for C₁₀H₁₂ClN₃S: C 49.68, H 5.00, N 17.38; found C 49.69, H 5.00, N 17.19.

3-(2,4-二氯苯基)-丙醛缩氨基硫脲(6d): 白色固体, 收率 66%. m.p. 188~189 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ : 2.46~2.53 (m, 2H, CH₂), 2.92 (t, *J*=7.80 Hz, 2H, CH₂), 7.35~7.48 (m, 4H, ArH+NH₂+CH=N), 7.57~7.59 (m, 1H, ArH), 7.99 (s, 1H, NH₂), 11.10 (s, 1H, NH); IR (KBr) ν : 3415, 3145, 1600, 1279, 1100 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z*: 275.9 [*M*+H]⁺. Anal. calcd for C₁₀H₁₁Cl₂N₃S: C 43.49, H 4.01, N 15.21; found C 43.60, H 4.04, N 15.21.

3-(2-硝基苯基)-丙醛缩氨基硫脲(6e): 白色固体, 收率 85%. m.p. 178~180 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ : 2.54~2.59 (m, 2H, CH₂), 3.06 (t, *J*=7.80 Hz, 2H, CH₂), 7.45~7.56 (m, 4H, ArH+NH₂), 7.64~7.70 (m, 1H, CH=N), 7.92~7.95 (m, 1H, ArH), 8.00 (s, 1H, NH₂), 11.12 (s, 1H, NH); IR (KBr) ν : 3403, 3158, 1607, 1282 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z*: 274.9 [*M*+Na]⁺. Anal. calcd for C₁₀H₁₂N₄O₂S: C 47.61, H 4.79, N 22.21; found C 47.61, H 4.83, N 22.39.

3-(4-硝基苯基)-丙醛缩氨基硫脲(6f): 黄色固体, 收率 89%. m.p. 210 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ : 2.54~2.60 (m, 2H, CH₂), 2.99 (t, *J*=7.62 Hz, 2H, CH₂), 7.45 (t, *J*=4.62 Hz, 1H, CH=N), 7.48 (s, 1H, NH₂), 7.54 (d, *J*=8.73 Hz, 2H, ArH), 8.00 (s, 1H, NH₂), 8.13~8.18 (m, 2H, ArH), 11.10 (s, 1H, NH); IR (KBr) ν : 3406, 3168, 1610, 1276 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z*: 274.1 [*M*+Na]⁺. Anal. calcd for C₁₀H₁₂N₄O₂S: C 47.61, H 4.79, N 22.21; found C 47.81, H 4.86, N 22.08.

3-(3-溴苯基)-丙醛缩氨基硫脲(6g): 白色固体, 收率 48%. m.p. 131~133 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ : 2.48~2.54 (m, 2H, CH₂), 2.82 (t, *J*=7.71 Hz, 2H, CH₂), 7.24~7.28 (m, 2H, ArH), 7.36~7.47 (m, 4H, ArH+CH=N+NH₂), 8.00 (s, 1H, NH₂), 11.10 (s, 1H, NH); IR (KBr) ν : 3407, 3152, 1600, 1272 cm⁻¹; MS (ESI)

m/z : 285.9 $[M+H]^+$. Anal. calcd for $C_{10}H_{12}BrN_3S$: C 41.97, H 4.23, N 14.68; found C 41.69, H 4.46, N 14.60.

3-(4-氟苯基)-丙醛缩氨基硫脲(**6h**): 白色固体, 收率 44%. m.p. 155~157 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 2.46~2.52 (m, 2H, CH_2), 2.80 (t, $J=7.74$ Hz, 2H, CH_2), 7.06~7.15 (m, 2H, ArH), 7.24~7.30 (m, 2H, ArH), 7.44 (t, $J=4.92$ Hz, 1H, $CH=N$), 7.49 (s, 1H, NH_2), 8.00 (s, 1H, NH_2), 11.10 (s, 1H, NH); IR (KBr) ν : 3429, 3271, 1603, 1278 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 225.9 $[M+H]^+$. Anal. calcd for $C_{10}H_{12}FN_3S$: C 53.31, H 5.37, N 18.65; found C 53.48, H 5.37, N 18.70.

3-(2-甲氧基苯基)-丙醛缩氨基硫脲(**6i**): 淡黄色固体, 收率 58%. m.p. 119~121 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 2.41~2.48 (m, 2H, CH_2), 2.75 (t, $J=7.68$ Hz, 2H, CH_2), 3.78 (s, 3H, CH_3), 6.84~6.96 (m, 2H, ArH), 7.14~7.21 (m, 2H, ArH), 7.43 (t, $J=5.16$ Hz, 1H, $CH=N$), 7.44 (s, 1H, NH_2), 7.96 (s, 1H, NH_2), 11.07 (s, 1H, NH); IR (KBr) ν : 3409, 3152, 1598, 1242 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 237.9 $[M+H]^+$. Anal. calcd for $C_{11}H_{15}N_3OS$: C 55.67, H 6.37, N 17.71; found C 55.68, H 6.20, N 17.73.

3-(3-甲氧基苯基)-丙醛缩氨基硫脲(**6j**): 白色固体, 收率 62%. m.p. 132~134 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 2.46~2.53 (m, 2H, CH_2), 2.78 (t, $J=7.80$ Hz, 2H, CH_2), 3.73 (s, 3H, CH_3), 6.73~6.81 (m, 3H, ArH), 7.19 (t, $J=7.98$ Hz, 1H, ArH), 7.44 (t, $J=5.04$ Hz, 1H, $CH=N$), 7.48 (s, 1H, NH_2), 7.98 (s, 1H, NH_2), 11.09 (s, 1H, NH); IR (KBr) ν : 3446, 3169, 2971, 1592, 1255 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 237.8 $[M+H]^+$. Anal. calcd for $C_{11}H_{15}N_3OS$: C 55.67, H 6.37, N 17.71; found C 55.75, H 6.31, N 17.68.

3-(4-甲氧基苯基)-丙醛缩氨基硫脲(**6k**): 白色固体, 收率 70%. m.p. 148~149 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 2.43~2.49 (m, 2H, CH_2), 2.74 (t, $J=7.83$ Hz, 2H, CH_2), 3.71 (s, 3H, OCH_3), 6.82~6.86 (m, 2H, ArH), 7.14 (d, $J=8.61$ Hz, 2H, ArH), 7.41~7.44 (m, 2H, $CH=N$), 7.95 (s, 1H, NH_2), 11.05 (s, 1H, NH); IR (KBr) ν : 3412, 3159, 1600, 1268, 1026 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 237.9 $[M+H]^+$. Anal. calcd for $C_{11}H_{15}N_3OS$: C 55.67, H 6.37, N 17.71; found C 55.63, H 6.37, N 17.91.

3-(2,4-二甲氧基苯基)-丙醛缩氨基硫脲(**6l**): 白色固体, 收率 64%. m.p. 120~122 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 2.36~2.43 (m, 2H, CH_2), 2.67 (t, $J=7.62$ Hz, 2H, CH_2), 3.73 (s, 3H, CH_3), 3.76 (s, 3H, CH_3), 6.44 (d, $J=8.25$ Hz, 1H, ArH), 6.51 (s, 1H, ArH), 7.04 (d, $J=8.25$ Hz, 1H, ArH), 7.41 (t, $J=5.19$ Hz, 1H, $CH=N$), 7.45

(s, 1H, NH_2), 7.96 (s, 1H, NH_2), 11.05 (s, 1H, NH); IR (KBr) ν : 3415, 3148, 2985, 1599, 1289 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 268.0 $[M+H]^+$. Anal. calcd for $C_{12}H_{17}N_3O_2S$: C 53.91, H 6.41, N 15.72; found C 53.73, H 6.33, N 15.67.

3-(4-乙氧基苯基)-丙醛缩氨基硫脲(**6m**): 黄色固体, 收率 42%. m.p. 142~144 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 1.30 (t, $J=6.99$ Hz, 3H, CH_3), 2.42~2.49 (m, 2H, CH_2), 2.73 (t, $J=7.77$ Hz, 2H, CH_2), 3.97 (q, $J=6.99$ Hz, 2H, CH_2), 6.83 (d, $J=8.58$ Hz, 2H, ArH), 7.12 (d, $J=8.52$ Hz, 2H, ArH), 7.42 (t, $J=4.98$ Hz, 1H, $CH=N$), 7.46 (s, 1H, NH_2), 7.98 (s, 1H, NH_2), 11.07 (s, 1H, NH); IR (KBr) ν : 3409, 3150, 2974, 2872, 2923, 1602, 1263 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 251.9 $[M+H]^+$. Anal. calcd for $C_{12}H_{17}N_3OS$: C 57.34, H 6.82, N 16.72; found C 57.28, H 6.80, N 16.68.

3-(4-甲基苯基)-丙醛缩氨基硫脲(**6n**): 淡黄色固体, 收率 45%. m.p. 111~112 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 2.25 (s, 3H, CH_3), 2.44~2.51 (m, 2H, CH_2), 2.75 (t, $J=7.83$ Hz, 2H, CH_2), 7.06~7.14 (m, 4H, ArH), 7.43 (t, $J=5.07$ Hz, 1H, $CH=N$), 7.48 (s, 1H, NH_2), 7.99 (s, 1H, NH_2), 11.08 (s, 1H, NH); IR (KBr) ν : 3437, 3297, 2974, 1591, 1265 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 221.9 $[M+H]^+$. Anal. calcd for $C_{11}H_{15}N_3S$: C 59.69, H 6.83, N 18.99; found C 59.72, H 6.89, N 18.95.

3-(4-异丙基苯基)-丙醛缩氨基硫脲(**6o**): 淡黄色固体, 收率 40%. m.p. 135~136 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 1.18 (d, $J=6.90$ Hz, 6H, CH_3), 2.47~2.51 (m, 2H, CH_2), 2.76 (t, $J=8.01$ Hz, 2H, CH_2), 2.81~2.86 (m, 1H, CHC), 7.14~7.17 (m, 4H, ArH), 7.44 (t, $J=4.98$ Hz, 1H, $CH=N$), 7.47 (s, 1H, NH_2), 7.98 (s, 1H, NH_2), 11.08 (s, 1H, NH); IR (KBr) ν : 3417, 3149, 2955, 1598, 1285 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 250.0 $[M+H]^+$. Anal. calcd for $C_{13}H_{19}N_3S$: C 62.61, H 7.68, N 16.85; found C 62.57, H 7.63, N 16.84.

1.3 目标化合物对酶活力的抑制测定

1.3.1 酶液制备

向冰水混合物中预冷的玻璃匀浆器中加入 1 头 5 龄棉铃虫幼虫, 1 mL 0.1 mol/L, pH 值为 6.5 的磷酸盐缓冲液, 充分匀浆, 在离心机中以 10800 转的速度离心 15 min, 抽滤后, 取上清液冰浴备用.

1.3.2 测试样品的配制

用 1 mL DMSO 溶解, 将目标物配制成 40 mg/mL 的溶液作为母液, 再用水稀释至原母液的 100 倍, 备用. 以托酚酮为对照药剂.

1.3.3 酶活性抑制试验

反应体系为 1 mL. 加 0.1 mol/L, pH=6.5 的磷酸缓冲液 0.84 mL, 酶液 0.05 mL, 样品溶液 0.01 mL, 0.1 mol/L 邻苯二酚 0.10 mL, 于比色皿中, 在 420 nm 下用时间驱动程序测其在 2 min 内的 OD(光密度)值变化. 重复 2 次, 计算抑制率. 以加入 0.01 mL 有机溶剂的磷酸缓冲液为空白对照. 抑制率用以下公式计算:

$$\text{抑制率}\% = (\Delta OD_n - \Delta OD_i) / \Delta OD_n \times 100\%$$

其中, ΔOD_n 为空白对照光密度值变化值, ΔOD_i 为抑制剂处理后光密度值变化值.

抑制中浓度(IC₅₀)的测定: 分别测定不同浓度下的目标化合物对棉铃虫酪氨酸酶的抑制率, 以浓度对数对抑制率做回归曲线, 最后求得 IC₅₀ 值^[16].

2 结果与讨论

2.1 合成部分

针对目标物 **6** 的结构特点, 本文设计了 Scheme 2 所示的合成路线, 以取代苯甲醛为起始原料, 通过 5 步反应制得 15 个目标物 **6**, 其中 14 个未见文献报道, 结构通过红外、核磁氢谱、质谱及元素分析确认. 在目标化合物的合成过程中, 我们还对两个关键中间体 **3** 和 **4** 的制备条件进行了探索和优化.

2.1.1 中间体取代苯丙烯酸乙酯(**3**)的制备

关于中间体取代苯丙烯酸乙酯(**3**)的制备, 有文献^[17]采用浓硫酸催化酸合成酯的方法, 但一般需要加入苯或甲苯作为带水剂进行合成. Kumar 等^[10]报道用二氯亚砷作为催化剂室温进行反应, 操作简单, 产率也高. 本文分别尝试用浓硫酸和二氯亚砷催化反应, 反应结果如表 1 所示. 因二氯亚砷室温反应耗时过长, 我们通过改进反应温度, 最终采用加热二氯亚砷催化的方法制备中间体 **3**. 实验结果表明, 苯环上的取代基由于电子效应影响反应时间, 当为卤素等吸电子基取代时, 羰基因为缺电子而有利于与醇的亲核反应, 反应时间减少, 一般为 0.5~1 h, 而当为甲氧基等给电子基取代时, 反应时间较长, 为 2~4 h.

2.1.2 中间体取代苯丙醇 **4** 的制备

中间体取代苯丙醇 **4** 的制备主要是通过由相应的肉桂酸或肉桂酸酯还原而得. 在还原反应中, LiAlH₄ 是一种既能还原碳碳双键又能还原羧基的强还原剂, 但本文

通过制备中间体 **4** 的实验研究发现, 当苯环上有吸电子基取代时, 即使严格控制无水无氧条件, 醇的产率只能达到 10%~20%. 同时, 由于 LiAlH₄ 较昂贵且本身易潮解, 本文在制备中间体 **4** 时最终没有采用 LiAlH₄ 作为还原剂的方法. Enzo 等^[11]研究发现, 在 65 °C 时, NaBH₄ 和 PEG400 所形成的烷基氧-硼氢化物([BH₂(OR)₂]⁻)具有很高的还原活性, 能将乙酯还原成醇, 同时在还原肉桂酸时发现能得到单一的产物苯丙醇. 我们借鉴 Enzo 的研究方法, 选用相对温和的 NaBH₄ 来还原酯制备相应的中间体 **4**, 实验结果表明无论苯环上是吸电子还是给电子基取代基, 对于还原的结果都无影响, 收率都在 70% 以上.

2.2 光谱解析

以化合物 **6k** 为例, 对该类化合物的谱图进行解析.

目标物 **6k** 的红外光谱图中, 3412 cm⁻¹ 为 NH₂ 的 N—H 伸缩振动吸收峰, 3159 cm⁻¹ 为 NH 的 N—H 振动吸收峰, 3032 cm⁻¹ 为苯环 C—H 伸缩振动吸收峰, 2984, 2957 cm⁻¹ 分别为 CH₃ 和 CH₂ 的伸缩吸收, 1600 cm⁻¹ 为典型的 C=N 吸收峰, 1268 cm⁻¹ 是 C=S 吸收峰, 1026 cm⁻¹ 则是 Ph—O 的吸收峰.

¹H NMR 中, 在 δ 2.43~2.49 和 2.74 的两组峰分别是 C⁴ 和 C⁵ 亚甲基上氢的裂分情况, 其中 C⁵ 上的氢受 C⁴ 氢的影响, 表现为 t 峰, 偶合常数为 7.83 Hz; C¹⁰ 上的氢由于受到氧原子诱导效应的影响, 向低场移动, 位移值是 δ 3.71; 苯环上的 4 个氢表现为两组峰, 位移值分别为 δ 6.82~6.86 和 7.14; C³ 上的氢受到相邻氮的影响, 化学位移偏向低场, 为 δ 7.41~7.44; NH₂ 上的两个氢因受到相邻的 C=S 键的影响, 表现为两个单峰, 位移值在 δ 7~8 之间; NH 的氢由于附近 C=N 键和 C=S 键的影响而偏向低场, 位移值是 δ 11.05.

2.3 目标物的生物活性

托酚酮(又称环庚三烯酚酮)一直被认为是有效的酪氨酸酶抑制剂, 在化妆品和食品行业得到应用^[18], 它也可作为对照药剂用于酪氨酸酶抑制剂的研究^[19], 因此,

表 1 两种酯化反应制备中间体 **3** 的比较

Table 1 Comparison of two esterification reaction for intermediate compound **3**

反应物	催化剂	溶剂	装置	温度/°C	后处理	收率/%
3-(2,4-二氯苯基)-丙烯酸, 乙醇	浓硫酸	甲苯	分水、回流装置	110	萃取, 水洗, 浓缩, 重结晶	60
3-(2,4-二氯苯基)-丙烯酸, 乙醇	SOCl ₂	乙醇	回流装置	76	浓缩, 重结晶	75

本文也选择托酚酮作为活性测试的对照药剂. 表 2 活性测试结果表明, 目标化合物对棉铃虫酪氨酸酶具有明显的抑制效果, 其 IC_{50} 值均低于对照药剂托酚酮, 说明本文所设计的化合物活性均优于对照药剂托酚酮. Wangsa 等^[20]曾研究托酚酮与蘑菇酪氨酸酶活性中心的结合情况, 发现环上的氧原子与活性中心的铜原子的键连作用并不明显. 因此我们推测, 本文设计的目标物比托酚酮活性更高的原因, 可能是由于目标物结构中 C=S 的硫原子比托酚酮 C=O 的氧原子更能与酶活性中心的铜原子进行螯合所致.

表 2 目标物 6a~6o 对棉铃虫酪氨酸酶的抑制活性

Table 2 Inhibiting activity of compounds 6a~6o on tyrosinase of cotton bollworm

化合物	R	$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$
6a	—	1.28
6b	2-Cl	0.87
6c	4-Cl	1.71
6d	2,4-Cl ₂	2.17
6e	2-NO ₂	0.85
6f	4-NO ₂	12.49
6g	3-Br	15.70
6h	4-F	7.39
6i	2-OCH ₃	12.56
6j	3-OCH ₃	7.36
6k	4-OCH ₃	5.49
6l	2,4-(OCH ₃) ₂	32.51
6m	4-OC ₂ H ₅	7.73
6n	4-CH ₃	9.26
6o	4-CH(CH ₃) ₂	20.95
托酚酮	—	99.87

初步构效关系分析发现, 苯环上的取代基及取代位对活性有影响, 当苯环上有吸电子基团(如 F, Cl, NO₂)取代时, 化合物活性大多高于给电子基团(如 OCH₃, CH₃)取代的化合物, 尤其是化合物 6b 和 6e 的活性最为突出, 它们的 IC_{50} 值明显低于对照托酚酮, 同时活性也高于苯环上无取代的 6a; 在苯环上的 2-位进行吸电子基的取代对活性的提高有利, 当苯环上为氯原子取代时, 化合物活性顺序是 2-Cl>4-Cl>2,4-Cl₂. 同样当苯环上为硝基取代时, 化合物活性顺序是 2-NO₂>4-NO₂, 这说明除吸电子效应外, 空间位阻对于活性也有影响. 当吸电子基团在 3, 4-位进行取代时, 增大了化合物的空间位阻, 降低了活性.

本文研究表明, 保留硫脲活性结构, 用碳链增加硫脲和芳香环之间的距离, 增加了化合物疏水性, 设计合成的目标物对棉铃虫酪氨酸酶具有明显的抑制效果, 尤

其是化合物 6b 和 6e, 可以作为先导结构进行进一步优化. 在进一步结构优化时, 应考虑继续保持硫脲片段, 在芳香环上增加吸电子基团, 同时应考虑减小位阻, 或者引入其它具有生物活性的芳香环, 最终有望发现更高活性的新型昆虫生长调节剂先导化合物.

辅助材料(Supporting Information) 化合物的核磁、质谱、元素分析的原始谱图和数据. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Kim, Y. J.; Uyama, H. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 1707.
- [2] Thomas, K.; Christoph, E.; James, C. S.; Bernt, K. *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 1084.
- [3] Liu, C.-Y.; Gao, X.-W.; Liang, P.; Tang, F. *Chin. J. Pestic.* **2004**, *43*, 497 (in Chinese).
(刘春艳, 高希武, 梁沛, 汤芳, 农药, **2004**, *43*, 497.)
- [4] Xue, C.-B.; Zhang, L.; Luo, W.-C.; Xie, X.-Y.; Jiang, L.; Xiao, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 2006.
- [5] Liu, J.-B.; Yi, W.; Wan, Y.-Q. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 1096.
- [6] (a) Liu, J.-B.; Cao, R.-H.; Yi, W.; Ma, C.-M.; Wan, Y.-Q.; Zhou, B.-H.; Ma, L.; Song, H.-C. *Bioorg. Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 1773.
(b) Yi, W.; Cao, R.-H.; Wen, H.; Yan, Q.; Zhou, B.-H.; Ma, L.; Song, H.-C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6157.
- [7] Ramadan, E. S. *Chin. J. Chem.* **2010**, *28*, 594.
- [8] Wang, Z.; Xu, Y.; Dong, W.; Liang, P.; Yang, X.-L. *Chin. J. Org. Chem.* **2011**, *31*, 567 (in Chinese).
(王振, 徐焱, 董玮, 梁沛, 杨新玲, 有机化学, **2011**, *31*, 567.)
- [9] Wang, Z.; Dong, W.; Xu, Y.; Liang, P.; Yang, X.-L. *Chin. J. Pestic. Sci.* **2010**, *12*, 264 (in Chinese).
(王振, 董玮, 徐焱, 梁沛, 杨新玲, 农药学报, **2010**, *12*, 264.)
- [10] Yang, S.-X.; Kang, T.-N.; Yang, X.-L.; Sun, Y.-F.; Rui, C.-H.; Ling, Y. *Chin. J. Org. Chem.* **2010**, *12*, 1870 (in Chinese).
(杨绍祥, 康铁牛, 杨新玲, 孙玉凤, 芮昌辉, 凌云, 有机化学, **2010**, *12*, 1870.)
- [11] Kumar, D.; Sandhu, J. S. *Synth. Commun.* **2010**, *40*, 1915.
- [12] Kumar, B.; Verma, R. K. *Synth. Commun.* **1984**, *14*, 1359.
- [13] Enzo S.; Patrizia F.; Piero S. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 4584.
- [14] Carolina, M. D.; Hugo, V.; Joao, X. A. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2004**, *23*, 363.
- [15] Liu, W.-W.; Zhao, Y.-Q.; Wang, Q.-Q.; Li, N.; Tang, L.-J.; Zeng, Y.-X. *Chin. J. Org. Chem.* **2008**, *28*, 907 (in Chinese).
(刘伟伟, 赵跃强, 王钦琪, 李娜, 唐丽娟, 曾艳霞, 有机化学, **2008**, *28*, 907.)
- [16] Ishaaya, I. *Pestic. Biochem. Physiol.* **1974**, *4*, 484.
- [17] Balasubramanian, N.; Deepak, B.; Devayani, P.; Vishnukant, M.; Avinash, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, *39*, 827.
- [18] Tanuma, S.; Yoshimori, A.; Takahashi, A.; Ebizuka, S.; Kamiya, T.; Takeuchi, S. *JP 2010006732*, **2010** [*Chem. Abstr.* **2010**, *144*, 462613].
- [19] Ley, J. P.; Bertram, H. J. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 1879.
- [20] Wangsa, T. I.; Henriette, J. R.; Amrah, W.; Jurriaan, J. M.; Fabrizio, F.; Harry, J. W.; Bauke, W. D. *Biochemistry* **2011**, *50*, 5477.

(Li, L.; Fan, Y.)