4-烷基-6-芳基-1,3-噻嗪的合成与生物活性

李婉^a 胡艾希^{*,a} 刘艾林^{*,b} 彭俊梅^a 夏林^a 谭卫清^a^(^a 湖南大学化学化工学院 长沙 410082)^(^b 中国医学科学院药物研究所 北京 100050)

摘要 以芳香醛为原料,经缩合、环化等合成了16种1,3-噻嗪化合物1a~1p,并对其进行了体外神经氨酸酶(NA)和5-羟色胺转运体(SERT)抑制活性测试,测试结果显示部分化合物对神经氨酸酶和5-羟色胺转运体有抑制活性.其中化合物1i在40 μg/mL浓度下对神经氨酸酶的抑制率达68.91%,10 μg/mL浓度下,1d,1e和1f对5-羟色胺转运体的抑制率分别为99.5%,99.6%和99.8%.

关键词 合成;1,3-噻嗪;神经氨酸酶抑制剂;5-羟色胺转运体抑制剂

Synthesis and Biological Activities of 4-Alkyl-6-aryl-1,3-thiazines

Li, Wan^a Hu, Aixi^{*,a} Liu, Ailin^{*,b} Peng, Junmei^a Xia, Lin^a Tan, Weiqing^a^(^a College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha 410082)^(^b Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050)

Abstract A series of 1,3-thiazine derivatives 1a~1p were designed and synthesized by the reaction of aromatic aldehyde via condensation and cyclization, and their inhibitory activity of neuraminidase (NA) and serotonin reuptake (SERT) were evaluated *in vitro*. The pharmacological results showed that compound 1i exhibits good activity of NA with the inhibitory rate of 68.91% at the concentration of 40 μg/mL, which is similar to oseltamivir (inhibitory rate is 72.6%), moreover, at the concentration of 10.0 μg/mL, compounds 1d, 1e and 1f exhibit good serotonin reuptake inhibitory activity with inhibitory rates of 99.5%, 99.6% and 99.8%, respectively.

Keywords synthesis; 1,3-thiazine; neuraminidase inhibitors; serotonin transporter inhibitors

流行性感冒是一种由流感病毒引起的急性呼吸道感染疾病,具有传染性强、流行面广、发病率高特点,能感染人类和其他动物.近年来流行的H5N1, H1N1使得流感成为全球性的首要卫生问题之一.神经氨酸酶(NA)是流感病毒表面的一种糖蛋白,在流感病毒的复制和感染中起着重要作用,因其在流感病毒变异过程中具有相对的保守性而成为抗流感病毒药物研究的重要靶标^[1-3].目前上市的NA抑制剂有奥司米韦(Oseltamivir),扎那米韦(Zanamivir)以及帕拉米韦(Peramivir).奥司米韦是第一个口服有效的NA抑制剂,商品名“达菲”,但随着奥司米韦的广泛使用,世界各地陆续出现了其耐药病毒株^[4,5].扎那米韦活性很好,但生物利用度低,只能口服吸入或滴鼻给药,且价格昂贵,合成路线复杂较难获得^[6,7].因此,研究开发新的NA抑制剂显得尤为重要.

抑郁症是目前被医学界公认的一种常见精神疾病.2002年,世界卫生组织将抑郁症确定为世界第四大疾病,仅仅过了10年时间,抑郁症现已上升为世界第二大疾病.目前,中国抑郁症的患病率约为6%,抑郁症患者估计有3600万人.抗抑郁药按其作用靶点来分析,可分为去甲肾上腺素重摄取抑制剂(新三环类抗抑郁药),单胺氧化酶抑制剂和5-羟色胺(5-HT)重摄取抑制剂^[8].去甲肾上腺素重摄取抑制剂显效慢,大多数患者在使用一周后才能观察到疗效.单胺氧化酶抑制剂药物含肼的结构复杂,毒性大,副作用多,限制了临床上的应用.5-HT重摄取抑制剂选择性强,安全性大,副作用低,口服吸收好,生物利用度高,是临床应用最多最广的一线抗抑郁药^[9-12].

1,3-噻嗪类化合物作为重要的杂环化合物,广泛应

* E-mail: axhu@hnu.edu.cn; liuailin@imm.ac.cn

Received December 17, 2012; revised March 2, 2013; published online March 6, 2013

Project supported by the Ph.D. Programs Foundation of Ministry of Education of China (No. 20040532002).

国家教育部博士点专项基金(No. 20040532002)资助项目.

用于医药中,可作为抗高血压、利尿、抗精神病和抗过敏等药物使用,最近研究报道其还有麻醉和抗疲劳等功效^[13~18]。鉴于 1,3-噻嗪类化合物的广泛生物活性,本文以 1,3-噻嗪环为母核,针对神经氨酸酶组一中新发现的 430-loop 和 150-loop^[19~21],设计合成了一系列 4-叔丁基-6-芳基-2-氨基-1,3-噻嗪化合物。以噻嗪环为连接基团,疏水性芳环和叔丁基分别与 430-loop 和 150-loop 作用。另外,1,3-噻嗪母环上的氨基也能与唾液酸(SA)活性位点中极性氨基酸结合。本文以芳香醛为原料,经缩合、环化反应合成了 16 个 1,3-噻嗪类化合物(**1a~1p**, Scheme 1),对其进行了体外 NA (H1N1)抑制活性测试。同时发现该系列化合物对 5-羟色胺转运体(SERT)也有很好的抑制活性。

a: R = 3-NO₂; b: R = 3-C₆H₅CH₂O-4-MeO; c: R = 2-Cl-5-NO₂; d: R = 4-Me; e: R = 4-F; f: R = 2-EtO; g: R = 3,5-(CF₃)₂; h: R = 4-NO₂; i: R = 3,4-(MeO)₂; j: R = 4-MeO; k: R = 2-Cl; l: R = 4-Cl; m: R = 2,4-Cl₂; n: R = 2-MeO; o: R = 3-CF₃; p: R = H

Scheme 1

1 结果与讨论

以结构简单的芳香醛和频哪酮为原料,经 Adol 缩

合得到了中间体 4,4-二甲基-1-芳基-1-烯基-3-戊酮(**2a~2p**)^[22],反应收率较高(79%~95%)。**2a~2p** 与硫脲经“Atwal”反应,环合得到 4-叔丁基-6-芳基-2-氨基-1,3-噻嗪盐酸盐 **1a~1p**,用 ¹H NMR 和 MS 确认了化合物结构,并对化合物 **1l** 和 **2l** 进行了单晶 X 射线衍射^[23,24]。

化合物 **1a~1p** 对 NA 和 SERT 的体外抑制活性见表 1。从表 1 可以看出,在 40 μg/mL 的浓度下,化合物 **1a~1p** 中部分化合物对 NA 的抑制率较高。其中,6-位芳环上带供电子基团的化合物 **1f**, **1j**, **1i** 和 **1n** 的活性要高于带吸电子基团的化合物 **1a**, **1g**, **1k** 和 **1l**; 6-位芳环上带甲氧基的化合物的活性要高于其它化合物。化合物 **1i** 的活性最好,其抑制率和 IC₅₀ 分别为 68.91% 和 23.54 μmol/mL(同等浓度下阳性对照物奥司米韦的抑制率为 72.6%)。推其原因噻嗪环 6-位苯环上的 3,4-位甲氧基使得化合物疏水作用增强,与 430-loop 和 150-loop 结合较好。

化合物 **1a~1p** 中部分化合物对 SERT 抑制活性较好。其中,6-位芳环上邻位和对位取代的化合物的活性高于间位取代的化合物; 6-位芳环上间位取代的化合物活性高于 6-位芳环上二取代的化合物。在 10.0 μg/mL 的浓度下, **1d**, **1e** 和 **1f** 抑制率分别为 99.5%, 99.6% 和 99.8%。

2 结论

芳香醛与频哪酮缩合得到了中间体 4,4-二甲基-1-芳基-1-烯基-3-戊酮(**2a~2p**),收率在 79%~95%之间。

表 1 化合物 **1a~1p** 对 NA 和 SERT 的抑制活性Table 1 The inhibitory activities of compounds **1a~1p** to NA and SERT

Compd.	R	NA		SERT
		Inhibitory rate/% (40 μg/mL)	IC ₅₀ /(μg•mL ⁻¹)	Inhibitory rate/% (10.0 μg/mL)
1a	3-NO ₂	11.7		50.2
1b	3-C ₆ H ₅ CH ₂ O-4-MeO	4.2		—0.2
1c	2-Cl-5-NO ₂	6.0		—21.0
1d	4-Me	0.7		99.5
1e	4-F	—4.2		99.6
1f	2-EtO	13.8		99.8
1g	3,5-(CF ₃) ₂	—2.0		21.4
1h	4-NO ₂	—0.5		29.3
1i	3,4-(MeO) ₂	68.9	23.54	17.2
1j	4-MeO	9.9		85.9
1k	2-Cl	2.6		37.4
1l	4-Cl	—0.9		16.1
1m	2,4-Cl ₂	19.4		24.8
1n	2-MeO	31.5		16.2
1o	3-CF ₃	7.8		20.4
1p	H	17.2		8.5
Oseltamivir		72.6	0.434	
Fluoxetine				55.0 (2.3 μg/mL)

2a~2p 与硫脲发生“Atwal”反应, 得到目标化合物 **1a~1p**, 收率在 30%~92%之间, 反应条件温和, 操作简单。

合成的 4-叔丁基-6-芳基-2-氨基-1,3-噻嗪盐酸盐 **1a~1p**。经体外 NA 抑制活性测试, 发现部分化合物对 NA 有良好的抑制活性, 在 40 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度下, 化合物 **1i** 活性最好(抑制率为 68.91%)。

化合物 **1a~1p** 中部分化合物对 SERT 的抑制活性较好; 在 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度下, **1d~1f** 抑制率分别为 99.5%, 99.6%和 99.8%。活性好的化合物值得进一步的研究。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

RY-1 熔点仪未校正(天津天分仪器厂); 薄层层析硅胶板(烟台市芝罘黄务硅胶开发试剂厂); 三用紫外仪(上海安亭仪器厂)显色; VARIAN INOVA-400 核磁共振仪(美国), ^1H NMR 核磁共振频率为 399.970 MHz, TMS 为内标; VARIO EL III 元素分析仪(德国); Bruker SMART APEX-CCD 探测器 X 射线单晶衍射仪(德国); 连续光谱酶标测试仪(spectramax M5) (美国)。溶剂和试剂均为市售分析纯或化学纯。

3.2 化合物的合成

3.2.1 4,4-二甲基-1-芳基-1-烯基-3-戊酮(**2a~2p**)的合成

按文献[22]方法合成化合物 **2a~2p**, 收率为 79%~95%。

3.2.2 4-叔丁基-6-芳基-2-氨基-1,3-噻嗪盐酸盐(**1a~1p**)的合成

4-叔丁基-6-(3-硝基苯基)-2-氨基-1,3-噻嗪盐酸盐(**1a**)的合成: 3.25 g (0.015 mmol) 4,4-二甲基-(3-硝基苯基)-1-烯基-3-戊酮(**2a**), 1.37 g (0.018 mol)硫脲及 50 mL 乙醇, 1.5 mL 浓盐酸催化反应, TLC 监测反应, 回流反应 8 h, 减压蒸去大部分溶剂, 浓缩物置冰箱中, 析出黄色固体, 抽滤, 干燥得 **1a**, 收率 55%。m.p. 137~138 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.23 (s, 9H, $\text{CH}_3 \times 3$), 4.89 (d, $J=6.8$ Hz, 1H, 噻嗪环 5-H), 5.35 (d, $J=6.8$ Hz, 1H, 噻嗪环 6-H), 7.51~8.16 (m, 4H, C_6H_4), 9.53, 10.29 (2s, 2H, NH_2), 11.50 (s, 1H, N^+H); EI-MS m/z : 291 (M^+)。Anal. calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{O}_2\text{S}$: C 51.29, H 5.53, N 12.82; found C 51.19, H 5.55, N 12.79。

化合物 **1b~1e** 合成方法同 **1a**; **1f~1p** 按中国授权专利[25, 26]方法合成。 **1b~1p** 合成的反应时间、收率、熔点和谱图数据如下:

4-叔丁基-6-(3-苄氧苯基-4-甲氧基)-2-氨基-1,3-噻嗪

盐酸盐(**1b**): 反应 7 h, 收率 78%。m.p. 145~146 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.30 (s, 9H, $\text{CH}_3 \times 3$), 3.89 (s, 3H, OCH_3), 4.92 (q, $J=4.4$ Hz, 1H, 噻嗪环 5-H), 5.16 (s, 2H, CH_2), 5.20 (q, $J=4.4$ Hz, 1H, 噻嗪环 6-H), 6.82~6.83 (m, 3H, C_6H_3), 7.29~7.43 (m, 5H, C_6H_5), 8.52, 10.35 (2s, 2H, NH_2), 11.66 (s, 1H, N^+H)。Anal. calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$: C 63.07, H 6.50, N 6.69; found C 63.17, H 6.55, N 6.65..

4-叔丁基-6-(2-氯-5-硝基苯基)-2-氨基-1,3-噻嗪盐酸盐(**1c**): 反应 8 h, 收率 80%。m.p. 248~250 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.41 (s, 9H, $\text{CH}_3 \times 3$), 5.20 [s, 2H, 噻嗪环 5,6- H_2], 7.00 (q, $J=9.2$ Hz, 1H, C_6H_3 -3-H), 8.02 (s, 1H, C_6H_3 -6-H), 8.25 (q, $J=9.2$ Hz, 1H, C_6H_3 -4-H), 10.72, 11.93 (2s, 2H, NH_2)。Anal. calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$: C 46.42, H 4.73, N 11.60; found C 46.28, H 4.75, N 11.56。

4-叔丁基-6-(4-甲基苯基)-2-氨基-1,3-噻嗪盐酸盐(**1d**): 反应 8 h, 收率 58%。m.p. 200~201 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.28 (s, 9H, $\text{CH}_3 \times 3$), 2.35 (s, 3H, CH_3), 4.96 (q, $J=4.4$ Hz, 1H, 噻嗪环 5-H), 5.19 (q, $J=4.4$ Hz, 1H, 噻嗪环 6-H), 7.16~7.21 (m, 4H, C_6H_4), 9.16, 10.15 (2s, 2H, NH_2), 11.45 (s, 1H, N^+H); EI-MS m/z : 260 (M^+)。Anal. calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{ClN}_2\text{S}$: C 60.69, H 7.13, N 9.44; found C 60.54, H 7.15, N 9.42。

4-叔丁基-6-(4-氟苯基)-2-氨基-1,3-噻嗪盐酸盐(**1e**): 反应 7 h, 收率 89%。m.p. 223~225 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.30 (s, 9H, $\text{CH}_3 \times 3$), 5.03, 5.20 [2s, 2H, 噻嗪环 5,6- H_2], 7.05~7.33 (m, 4H, C_6H_4), 9.15, 10.22 (2s, 2H, NH_2), 11.51 (s, 1H, N^+H)。Anal. calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{ClFN}_2\text{S}$: C 55.90, H 6.03, N 9.31; found C 55.75, H 6.05, N 9.28。

4-叔丁基-6-(2-乙氧基苯基)-2-氨基-1,3-噻嗪盐酸盐(**1f**): 收率 30%。m.p. 162~164 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.35 (s, 9H, $\text{CH}_3 \times 3$), 1.45~1.46 (m, 3H, CH_3), 4.07~4.13 (m, 2H, OCH_2), 5.17 (d, $J=6.4$ Hz, 1H, 噻嗪环 5-H), 5.26 (d, $J=6.4$ Hz, 1H, 噻嗪环 6-H), 6.88 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, C_6H_4 -3-H), 7.30 (t, $J=7.6$ Hz, 1H, C_6H_4 -4-H), 6.94 (t, $J=7.8$ Hz, 1H, C_6H_4 -5-H), 7.13 (d, $J=7.6$ Hz, 1H, C_6H_4 -6-H), 7.65, 10.45 (2s, 2H, NH_2), 11.75 (s, 1H, N^+H); EI-MS m/z : 290 (M^+)。Anal. calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$: C 58.79, H 7.09, N 8.57; found C 58.69, H 7.12, N 8.55。

4-叔丁基-6-[3,5-二(三氟甲基)苯基]-2-氨基-1,3-噻嗪盐酸盐(**1g**): 收率 63%。m.p. 176~178 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.27 (s, 9H, $\text{CH}_3 \times 3$), 5.03 (d, $J=5.6$ Hz, 1H, 噻嗪环 5-H), 5.21 (d, $J=5.6$ Hz, 1H, 噻嗪环

6-H), 6.85~6.92 (m, 3H, C₆H₃), 9.33, 10.09 (2s, 2H, NH₂), 11.40 (s, 1H, N⁺H). Anal. calcd for C₁₆H₁₇ClF₆N₂S: C 45.88, H 4.09, N 6.69; found C 45.74, H 4.07, N 6.68.

4-叔丁基-6-(4-硝基苯基)-2-氨基-1,3-噻嗪盐酸盐 (**1h**): 收率 93%. m.p. 198~200 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.3 (s, 9H, CH₃×3), 5.19 (d, *J*=5.6 Hz, 1H, 噻嗪环 5-H), 5.28 (d, *J*=5.6 Hz, 1H, 噻嗪环 6-H), 7.61~8.22 (m, 4H, C₆H₄), 9.30, 10.27 (2s, 2H, NH₂), 11.52 (s, 1H, N⁺H); EI-MS *m/z*: 291 (M⁺). Anal. calcd for C₁₄H₁₈ClN₃O₂S: C 51.29, H 5.53, N 12.82; found C 51.35, H 5.55, N 12.80.

4-叔丁基-6-(3,4-二甲氧基苯基)-2-氨基-1,3-噻嗪盐酸盐 (**1i**): 收率 42%. m.p. 191~193 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.29 (s, 9H, CH₃×3), 3.88 (s, 6H, CH₃), 5.00 (d, *J*=5.6 Hz, 1H, 噻嗪环 5-H), 5.19 (d, *J*=5.6 Hz, 1H, 噻嗪环 6-H), 6.85~6.92 (m, 3H, C₆H₃), 9.33, 10.09 (2s, 2H, NH₂), 11.40 (s, 1H, N⁺H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 28.08 (3C, CH₃×3), 35.1 (1C, CH₃×3), 56.0, 56.1 (2C, OCH₃×2), 43.0 (1C, 噻嗪环 6-C), 100.7 (1C, 噻嗪环 5-C), 110.9, 111.5 (2C, C₆H₃-2,5-C), 120.4 (1C, C₆H₃-6-C), 130.1 (1C, C₆H₃-1-C), 146.7 (1C, 噻嗪环 4-C), 149.4, 149.6 (2C, C₆H₃-3,4-C), 167.8 (1C, 噻嗪环 4-C); EI-MS *m/z*: 306 (M⁺). Anal. calcd for C₁₆H₂₃ClN₂O₂S: C 56.05, H 6.76, N 8.17; found C 55.94, H 6.78, N 8.19.

4-叔丁基-6-(4-甲氧基苯基)-2-氨基-1,3-噻嗪盐酸盐 (**1j**): 收率 77%. m.p. 167~170 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.33 (s, 9H, CH₃×3), 3.87 (s, 3H, CH₃), 5.15 (d, *J*=5.6 Hz, 1H, 噻嗪环 5-H), 5.26 (d, *J*=5.6 Hz, 1H, 噻嗪环 6-H), 6.90 (d, *J*=7.6 Hz, 2H, C₆H₄-3,5-H), 7.32 (d, *J*=7.6 Hz, 2H, C₆H₄-2,6-H), 8.24, 10.21 (2s, 2H, NH₂), 11.55 (s, 1H, N⁺H). Anal. calcd for C₁₅H₂₁ClN₂OS: C 57.59, H 6.77, N 8.95; found C 57.39, H 6.79, N 8.93.

4-叔丁基-6-(2-氯苯基)-2-氨基-1,3-噻嗪盐酸盐 (**1k**): 收率 65%. m.p. 149~150 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.33 (s, 9H, CH₃×3), 5.19 (d, *J*=5.6 Hz, 1H, 噻嗪环 5-H), 5.36 (d, *J*=6.0 Hz, 1H, 噻嗪环 6-H), 7.27~7.43 (m, 4H, C₆H₄), 9.03, 10.23 (2s, 2H, NH₂), 11.59 (s, 1H, N⁺H); EI-MS *m/z*: 280 (M⁺). Anal. calcd for C₁₄H₁₈Cl₂N₂S: C 53.00, H 5.72, N 8.83; found C 52.85, H 5.75, N 8.81.

4-叔丁基-6-(4-氯苯基)-2-氨基-1,3-噻嗪盐酸盐 (**1l**): 收率 87%. m.p. 228~230 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.23 (s, 9H, CH₃×3), 5.05 (d, *J*=6.0 Hz, 1H, 噻嗪环 5-H), 5.17 (d, *J*=6.0 Hz, 1H, 噻嗪环 6-H), 7.26 (d, *J*=

6.8 Hz, 2H, C₆H₄-2,6-H), 7.35 (d, *J*=6.8 Hz, 2H, C₆H₄-3,5-H), 9.74, 9.99 (2s, 2H, NH₂), 11.30 (s, 1H, N⁺H); ESI-MS *m/z*: 292 (M⁺). Anal. calcd for C₁₄H₁₈Cl₂N₂S: C 53.00, H 5.72, N 8.83; found C 52.93, H 5.74, N 8.81.

4-叔丁基-6-(2,4-二氯苯基)-2-氨基-1,3-噻嗪盐酸盐 (**1m**): 收率 52%. m.p. 105 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.32 (s, 9H, CH₃×3), 5.17 (d, *J*=5.2 Hz, 1H, 噻嗪环 5-H), 5.30 (d, *J*=4.4 Hz, 1H, 噻嗪环 6-H), 7.20~7.44 (m, 3H, C₆H₃), 9.28, 10.20 (2s, 2H, NH₂), 11.54 (s, 1H, N⁺H); EI-MS *m/z*: 315 (M⁺). Anal. calcd for C₁₄H₁₇Cl₃N₂S: C 47.81, H 4.87, N 7.96; found C 47.64, H 4.89, N 7.94.

4-叔丁基-6-(2-甲氧基苯基)-2-氨基-1,3-噻嗪盐酸盐 (**1n**): 收率 61%. m.p. 140~142 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.33 (s, 9H, CH₃×3), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 5.17 (d, *J*=6.4 Hz, 1H, 噻嗪环 5-H), 5.26 (d, *J*=6.4 Hz, 1H, 噻嗪环 6-H), 6.88 (d, *J*=7.8 Hz, 2H, C₆H₄-3-H), 7.30 (t, *J*=7.6 Hz, 2H, C₆H₄-4-H), 6.94 (t, *J*=7.8 Hz, 2H, C₆H₄-5-H), 7.13 (d, *J*=7.6 Hz, 2H, C₆H₄-6-H), 7.65, 10.45 (2s, 2H, NH₂), 11.75 (s, 1H, N⁺H); EI-MS *m/z*: 276 (M⁺). Anal. calcd for C₁₅H₂₁ClN₂OS: C 57.59, H 6.77, N 8.95; found C 57.47, H 6.79, N 8.94.

4-叔丁基-6-[3-(三氟甲基)苯基]-2-氨基-1,3-噻嗪盐酸盐 (**1o**): 收率 52%. m.p. 186~187 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.29 (s, 9H, CH₃×3), 5.16, 5.19 [2s, 2H, 噻嗪环 5,6-H₂], 7.52~7.66 (m, 4H, C₆H₄), 9.78, 10.11 (2s, 2H, NH₂), 11.32 (s, 1H, N⁺H); EI-MS *m/z*: 314 (M⁺). Anal. calcd for C₁₅H₁₈ClF₃N₂S: C 51.35, H 5.17, N 7.98; found C 51.23, H 5.19, N 7.99.

4-叔丁基-6-苯基-2-氨基-1,3-噻嗪盐酸盐 (**1p**): 收率 53%. m.p. 137~140 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.27 (s, 9H, CH₃×3), 5.02 (q, *J*=4.8 Hz, 1H, 噻嗪环 5-H), 5.20 (q, *J*=4.8 Hz, 1H, 噻嗪环 6-H), 7.33~7.38 (m, 5H, C₆H₅), 9.66, 10.00 (2s, 2H, NH₂), 11.32 (s, 1H, N⁺H); EI-MS *m/z*: 246 (M⁺). Anal. calcd for C₁₄H₁₉ClN₂S: C 59.45, H 6.77, N 9.90; found C 59.50, H 6.79, N 9.91.

3.3 生物活性测试

3.3.1 神经氨酸酶抑制活性测试

乙酰神经氨酸(MUNANA)是神经氨酸酶的特异性底物,在神经氨酸酶作用下产生的代谢产物在 360 nm 波长激发下,可以产生 450 nm 荧光,荧光强度的变化可以灵敏地反应神经氨酸酶活性^[27~29].

在酶反应体系中,一定浓度待测样品与感病毒 NA 悬浮于反应缓冲液中(pH 6.5),加入荧光底物 MUNANA

启动反应体系, 37 °C 孵育 60 min 后, 加反应终止液终止反应. 在激发波长 360 nm 和发射波长为 450 nm 的参数条件下, 测定荧光强度值. 根据荧光强度的减少量计算化合物对 NA 活性的抑制率. 分别评价了每个样品在反应体系中浓度为 40 µg/mL 对 NA 的抑制活性.

$$\text{抑制率} = \frac{(\text{酶值} - \text{空白值}) - (\text{实验值} - \text{空白值})}{\text{酶值} - \text{空白值}} \times 100\%$$

3.3.2 5-羟色胺重摄取抑制活性测试

SERT 是 5-HT 重摄取相关的重要靶点, 现有的一线抗抑郁药物几乎均为 SERT 抑制剂. 荧光染料 ASP 是一种具有神经毒性的化合物, 可以与单胺类的转运体结合进入细胞内, 并发出黄色荧光. 当存在其他可与转运体结合化合物同 ASP 进行竞争时, 进入细胞内的 ASP 数量减少, 黄色荧光减弱, 可通过比较荧光强度的变化筛选作用于 SERT 的重摄取抑制剂. RBL-2H3 细胞是一种可以分泌组胺和 5-HT 的细胞株, 该细胞是永生化的肥大细胞^[30], 可以量子释放前述的递质. 并且具有 SERT 可以进行 5-HT 重摄取. CACO-2 细胞是来源于人小肠的腺癌细胞株, 经过培养分化该细胞可以表达多种转运体和受体, 包括 SERT 和腺苷受体等.

将 RBL 细胞悬液加入 96 孔板, 待细胞贴壁生长 10 h 以上, 加入待筛选的样品一段时间, 再按照一定浓度加入 ASP, 洗去未进入细胞的染料, 在激发波长 475 nm, 发射波长 605 nm 处读数, 进行结果统计. 将 CACO-2 细胞加入 96 孔黑色底透明培养板, 待其分化, 生长 6~7 日可见细胞界限不清, 生长微绒毛, 加入待筛选的供试品一段时间, 再按照一定浓度加入 ASP, 在激发波长 475 nm, 发射波长 605 nm 处读数, 进行结果统计. 分别评价了样品在 10 µg/mL 时对 SERT 的抑制活性.

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照值} - \text{样品值}}{\text{对照值} - \text{空白值}} \times 100\%$$

References

- [1] Sun, C. W.; Zhang, X. D.; Huang, H.; Zhou, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 8574.
- [2] Baz, M.; Abed, Y.; Boivin, G. *Antiviral Res.* **2007**, *74*, 159.
- [3] Baranovich, T.; Webster, R. G.; Govorkova, E. A. *Curr. Opin. Virol.* **2011**, *1*, 574.
- [4] Collins, P. J.; Haire, L. F.; Lin, Y. P. *Nature* **2008**, *453*, 1258.
- [5] Abed, Y.; Nehm, B.; Baz, M.; Boivin, G. *Antiviral Res.* **2008**, *77*, 163.
- [6] Mitrasinovic, P. M. *Curr. Drug. Targets* **2010**, *11*, 315.
- [7] Chand, P.; Kotian, P. L.; Morris, P. E.; Bantia, S.; Walshb, D. A.; Babu, Y. S. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 2665.
- [8] You, Q. D. *Pharmaceutical Chemistry*, Chemical Industry Press, Beijing, **2004**, pp. 145~149 (in Chinese). (尤启东, 药物化学, 化学工业出版社, 北京, **2004**, pp. 145~149.)
- [9] Christmas, D. M.; Potokar, J. P.; Davies, S. J. C. *Neurobiol. Dis. Treat.* **2011**, *7*, 431.
- [10] Akhondzadeh, S.; Jafari, S.; Raisi, F.; Nasehi, A. A.; Ghoreishi, A.; Salehi, B.; Mohebbi-Rasa, S.; Raznahan, M. *Depression Anxiety* **2009**, *26*, 607.
- [11] Francesc. A. *ACS Chem. Neurosci.* **2013**, *4*, 5.
- [12] Lynette. C. D.; Wouter. K.; Nathan. C. M. *ACS Chem. Neurosci.* **2013**, *4*, 16.
- [13] Hector, H.; Sylvain, B.; Leticia, Q.; Estibaliz, S.; Aurelio, O. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 1153.
- [14] Temple, C.; Wheeler, G. P.; Comber, R. N.; Elliot, R. D.; Montgomery, J. A. *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 1614.
- [15] Singh, U. P.; Pathak, M.; Dubey, V.; Bhat, H. R.; Gahtori, P.; Singh, R. K. *Chem. Biol. Drug Des.* **2012**, *80*, 572.
- [16] Koketsu, M.; Tanaka, K.; Takenaka, Y.; Kwong, C. D.; Ishihara, H. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2002**, *15*, 307.
- [17] Gazic, I.; Bosak, A.; Sinko, G.; Vinkovic, V.; Kovarik, Z. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *385*, 1513.
- [18] Handley, D. A.; McCullough, J. R.; Crowther, S. D.; Morley, J. *Chirality* **1998**, *10*, 262.
- [19] Landon, M. R.; Amaro, R. E.; Baron, R. *Chem. Biol. Drug Des.* **2008**, *71*, 106.
- [20] Grienke, U.; Schmidtke, M.; Kirchmair, J. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 778.
- [21] An, J. H.; Lee, D. C. W.; Law, A. H. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2667.
- [22] Wang, Y.; Hu, A. X.; Cao, G.; Li, G. X.; Zhang, J. Y.; Xia, L.; Ou, X. M.; Xu, J. B. *Chin. J. Org. Chem.* **2008**, *28*, 443 (in Chinese). (王宇, 胡艾希, 曹高, 李国希, 张建宇, 夏林, 欧晓明, 徐建兵, 有机化学, **2008**, *28*, 443.)
- [23] Wu, T. Q.; Xia, L.; Hu, A. X.; Ye, J. *Acta. Crystallogr.* **2009**, *E65*, o635.
- [24] Xia, L.; Hu, A. X.; Cao, G.; Wang, Y.; Ye, J. *Chin. J. Struct. Chem.* **2009**, *28*, 33 (in Chinese). (夏林, 胡艾希, 曹高, 王宇, 叶皎, 结构化学, **2009**, *28*, 33.)
- [25] Hu, A. X.; Xia, L. *CN 101440072*, **2009** [*Chem. Abstr.* **2009**, *151*, 78128].
- [26] Hu, A. X.; Xia, L. *CN 101570521*, **2009** [*Chem. Abstr.* **2009**, *151*, 571117].
- [27] Liu, A. L.; Cao, H. P.; Du, G. H. *Sci. China, Ser. C* **2005**, *48*, 1.
- [28] Laver, W. G.; Goleman, P. M.; Hinshaw, V. S.; Air, G. M. *Virology* **1984**, *137*, 314.
- [29] Liu, Y.; Zhang, L.; Gong, J. Z.; Fang, H.; Liu, A. L.; Du, G. H.; Xu, W. F. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2011**, *26*, 506.
- [30] Kawana, S.; Kato, Y.; Omi, T. *Clin. Exp. Dermatol.* **2010**, *35*, 835.

(Qin, X.)