新型(3-取代苯基-2-丙烯-1-亚基)-苯甲酰肼类化合物的
设计、合成及生物活性研究

徐焱 雷鹏 凌云 王圣文 杨新玲*

(中国农业大学理学院应用化学系 农业部农药化学及应用重点开放实验室 北京 100193)

摘要 为了发现具有高杀菌活性的先导化合物, 通过活性亚结构拼接方法, 将具有生物活性的肉桂醛与苯甲酰肼进行拼接, 设计合成了一系列新型(3-取代苯基-2-丙烯-1-亚基)-酰肼类化合物. 该类化合物以取代的苯甲酸为原料, 经 3 步反应制得, 结构经 ^1H NMR, IR 及元素分析确证. 离体生测结果表明部分化合物对蘑菇酪氨酸酶及小麦赤霉病、黄瓜灰霉病和黄瓜炭疽病表现出一定的抑制活性, 并对化合物进行了初步构效关系分析, 其中化合物 **5r** 表现出与多氧霉素 B 相当的杀菌活性.

关键词 肉桂醛; 苯甲酰肼; 合成; 酪氨酸酶; 杀菌活性

Design, Synthesis and Biological Activity of Novel (3-Substituted phenyl-2-propen-1-ylidene)-benzoylhydrazones

Xu, Yan Lei, Peng Ling, Yun Wang, Shengwen Yang, Xinling*

(Key Laboratory of Pesticide Chemistry and Application, Ministry of Agriculture, Department of Applied Chemistry, College of Science, China Agricultural University, Beijing 100193)

Abstract To find new lead compound with high fungicidal activity, a series of novel (3-substituted phenyl-2-propen-1-ylidene)-benzoylhydrazones were designed via the method of linking active sub-structures which were cinnamaldehyde and benzoylhydrazine. The target compounds were synthesized from substituted benzoic acid in three steps. Their structures were confirmed by ^1H NMR, IR spectra and elemental analysis. The *in vitro* bioassay results indicated that some target compounds showed obvious inhibitory activities against mushroom tyrosinase compared with lead cinnamaldehyde. Besides, some target compounds exhibit certain fungicidal activity against *Fusarium graminearum*, *Botrytis cinerea* and *Colletotrichum lagenarium*. Compound **5r** exhibited equivalent fungicidal activities to polyoxin B at a concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$. The preliminary structure-activity relationship was also analyzed for further optimization.

Keywords cinnamaldehyde; benzoylhydrazone; synthesis; tyrosinase; antifungal activity

酪氨酸酶(tyrosinase)又称酚氧化酶(phenoloxidase), 广泛存在于动物、植物及微生物中. 它是生物体内黑色素合成的关键酶^[1]. 而黑色素在生物体中具有重要的生理功能, 如引起人体雀斑、褐斑等黑色素过度沉积等疾病^[2], 影响昆虫的蜕皮和伤口愈合^[3,4], 以及果蔬的酶促褐化^[5], 因此, 研究酪氨酸酶抑制剂具有很重要的意义. 近年来的研究表明高等植物中分离出醛类可作为酪氨酸酶抑制剂^[6,7,8], 其中肉桂醛^[8]对蘑菇酪氨酸酶表现出良好的抑制活性($\text{IC}_{50}=0.98 \text{ mmol/L}$), 其抑制动力学的

研究结果表明其为非竞争性抑制剂. 而且, 肉桂醛还被报道具有抗真菌^[9]、抗细菌^[10]和抗癌^[11]等活性. 由于肉桂醛本身易挥发, 且不稳定易被氧化, 因此需要对肉桂醛进行结构改造, 以期发现具有更好稳定性和活性的结构衍生物.

Schiff 碱类化合物在农药和医药研究领域具有重要的地位, 良好的配合作用使其能与生物体内多种酶系的活性金属离子中心形成稳定配合物, 从而能与某些酶的活性金属中心整合而达到抑制酶活性的作用^[12]. 本课

* E-mail: yangxl@cau.edu.cn; Tel.: 86-10-62732223

Received January 20, 2014; revised February 19, 2014; published online March 12, 2014.

Project supported by the National Basic Research Program of China (No. 2010CB126104) and the National "Twelfth Five-Year" Plan for Science & Technology (No. 2011BAE06B05-5).

国家重点基础研究发展计划(No. 2010CB126104)和国家“十二五”科技支撑计划课题(No. 2011BAE06B05-5)资助项目.

课题组曾合成取代苯甲醛缩氨基硫脲(脲、硝基脲)类化合物, 对小菜蛾酪氨酸酶具有明显的抑制活性^[13], 取代苯丙醛缩氨基硫脲类化合物, 对棉铃虫酪氨酸酶具有很高抑制活性^[14], 以及 5-取代苯基-2-呋喃酰胺类化合物, 具有较高的活体杀菌活性^[15]. 因此, 我们将取代肉桂醛与同样具有生物活性的苯甲酰肼进行拼接, 形成含 Schiff 碱结构片段 $\text{CH}=\text{N}$ 的目标化合物 **5** (Scheme 1), 通过测试该类化合物对蘑菇酪氨酸酶, 以及对多种真菌病原菌的抑制作用, 期望发现具有高杀菌活性的先导化合物. 目标化合物的合成路线如 Scheme 2 所示.

1 结果与讨论

1.1 合成方法

以取代苯甲酸为起始原料, 经酯化得取代苯甲酸乙酯, 再与水合肼反应获得取代苯甲酰肼, 最后与取代肉桂醛反应, 即可制得目标化合物 **5**. 在合成目标化合物 **5** 时, 苯环上不同取代基以及是否加入路易斯酸进行催化对于反应速率和反应物的转化率没有明显的影响, 但当 R' 为不同位置的取代时, 对于目标化合物的溶解性有影响, 其中 R' 为 2-位取代时, 化合物在乙醇中的溶解性变大, 因此收率偏低. 此外, 三步反应的溶剂均为乙醇, 相比于其他有机溶剂, 更为清洁、安全.

1.2 图谱分析

目标化合物的 ^1H NMR 谱: 以化合物 **5b** 为例, 苯甲酰基苯环上甲基的氢原子在 δ 2.38 处显示为单峰, 苯环上两组氢原子化学位移值分别在 δ 7.61 和 7.78, 裂分为对称双重峰, 偶合常数均为 8.0 Hz. 肉桂基苯环上与氯

原子相邻的两个氢原子同样裂分为双重峰, 因受诱导效应影响, 化学位移移向低场 δ 7.66, 与 δ 7.45 处的双重峰对称, 偶合常数均为 8.5 Hz. 碳氮双键上的氢原子受氮原子的影响移向低场 δ 8.23, 碳碳双键上相邻两个氢原子的化学位移在 δ 7.00~7.15, 由于距离接近, 无法判断其相关性, 但根据文献^[19]可以推断该系列化合物的碳氮双键、碳碳双键均为反式构型.

目标化合物的 IR 谱: 化合物 **5b** 在 3214 cm^{-1} 为 $\text{N}-\text{H}$ 振动吸收峰, 3037 cm^{-1} 附近为不饱和碳(双键或苯环)的 $\text{C}-\text{H}$ 伸缩振动吸收峰; 1650 cm^{-1} 附近为典型的 $\text{C}=\text{N}$ 的吸收峰, 以及 $\text{C}=\text{O}$ 的吸收峰, 因此强度最大, 而 $1544, 1509\text{ cm}^{-1}$ 附近为 $\text{C}=\text{C}$ 双键的伸缩振动吸收峰, 979 cm^{-1} 附近为反式 $\text{C}=\text{C}$ 上 $\text{C}-\text{H}$ 的面外弯曲振动吸收峰, 814 cm^{-1} 附近为 1,4-二取代苯环上 $\text{C}-\text{H}$ 的面外弯曲振动吸收峰.

1.3 生物活性

表 1 离体蘑菇酪氨酸酶抑制活性测定结果显示, 在 $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ 测试浓度下, 目标化合物 **5a**~**5r** 对蘑菇酪氨酸酶均表现出抑制活性, 除化合物 **5j**, **5m** 和 **5p** 外, 其余化合物的活性均高于或与先导肉桂醛相当. 初步构效关系分析发现, 肉桂基上 R 为氯取代的化合物(**5a**~**5i**)活性普遍高于甲氧基取代的化合物(**5j**~**5r**). 当 R 为氯取代, 苯甲酰基上 R' 为 4-位取代时(**5b**, **5c**, **5d**), 活性高于 R' 为 2-位取代(**5f**, **5i**), 而当 R' 都为 4-位取代时, 活性又呈现出硝基(**5c**)>卤素(**5d**)>给电子基团(**5b**)的规律. 当 R 为甲氧基取代时, R' 的变化使活性呈现出给电子基团(**5k**, **5q**, **5r**)>硝基(**5l**)>卤素(**5m**, **5n**, **5o**)的规律.

表 1 初步离体杀菌活性测定结果表明, 在 100 $\mu\text{g/mL}$ 测试浓度下, 目标化合物 **5a**~**5r** 对小麦赤霉病菌、黄瓜灰霉病菌和黄瓜炭疽病菌均表现出抑制活性, 部分化合物对水稻纹枯病菌、番茄早疫病菌和烟草赤星病菌也表现出一定的抑制活性. 其中 **5r** 对小麦赤霉病菌和番茄早疫病菌的抑制活性与对照药剂多氧霉素 B 相当, 对黄瓜炭疽病菌的抑制活性略高于多氧霉素 B. 初步构效关系分析发现, 当 R' 为 2-位取代时(**5f**, **5i**, **5r**), 对多种真菌表现出抑制, 其中 **5r** 的活性均高于 **5i**, 这说明 R 为甲氧基时对活性提高更为有利. 因此, 对于该系列化合物可以从在肉桂醛苯环引入不同位置和数量的给电子基团, 以及在苯甲酰肼苯环的 2-位引入不同给电子基团进行结构优化. 化合物 **5r** 既表现出良好的酪氨酸酶抑制活性, 又表现出杀菌活性, 推测可能是通过抑制真菌的酪氨酸酶活性从而表现出杀菌活性.

2 结论

本文利用活性亚结构拼接的方法设计合成了一系列新型(3-取代苯基-2-丙烯-1-亚基)-苯甲酰肼类化合物 **5a**~**5r**. 初步生测结果表明, 目标化合物表现出较好的酪氨酸酶抑制活性, 多数化合物的活性高于先导化合物肉桂醛, 同时该系列化合物具有一定的杀菌活性, 尤其是化合物 **5r** 表现出较明显的杀菌活性, 可作为先导进一步研究, 这对于新型杀菌剂的创制具有一定的指导意

义.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

X-4 精密显微熔点测定仪; Bruker Advance DPX 300 MHz 核磁共振仪(以 TMS 为内标, DMSO- d_6 为溶剂); NEXUS-470 FTIR (Nicolet) 智能傅立叶红外光谱仪; Vario EL III 型元素分析仪(Flash EA1112 分析方法); Lambda 35 紫外分光光度计. 蘑菇酪氨酸酶(50KU)购于 Sigma 公司, 所用化学试剂为国产分析纯或化学纯试剂.

3.2 实验方法

3.2.1 化合物的合成

中间体取代苯甲酸乙酯(**2**)的制备. 按照文献[12]的方法, 向 50 mL 三口烧瓶中加入 1.22 g (0.01 mol) 苯甲酸(**1**), 1 mL 二氯亚砷和 20 mL 无水乙醇, 搅拌, 加热升温至 78 $^{\circ}\text{C}$ 回流反应. 待反应物 **1** 反应完全, 停止反应. 反应液减压蒸馏, 得粗产物 1.41 g, 收率 94%.

中间体取代苯甲酰肼(**3**)的制备. 按照文献[16]的方法, 向 50 mL 三口烧瓶中加入 1.50 g (0.01 mol) 苯甲酸乙酯(**2**), 1 mL 80% 水合肼和 20 mL 无水乙醇, 搅拌, 加热升温至 78 $^{\circ}\text{C}$ 回流反应. 待反应物 **2** 反应完全, 停止反应, 反应液析出固体. 抽滤, 用少量乙醇洗涤固体, 得白色固体 1.14 g, 收率 84%, m.p. 113~114 $^{\circ}\text{C}$.

表 1 目标化合物的离体杀菌活性^a及酪氨酸酶抑制活性^b

Table 1 Fungicidal activity and anti-tyrosinase activity *in vitro* of target compounds

Compd.	R	R'	Inhibitory rate/%						Mushroom tyrosinase
			<i>F. g</i>	<i>R. s</i>	<i>B. c</i>	<i>A. s</i>	<i>A. a</i>	<i>C. l</i>	
5a	4-Cl	H	18	0	65	0	0	43	52
5b	4-Cl	4-CH ₃	20	0	61	24	0	41	59
5c	4-Cl	4-NO ₂	16	0	44	21	0	39	72
5d	4-Cl	4-F	12	0	43	36	0	31	70
5e	4-Cl	3-Cl	20	0	39	26	0	39	55
5f	4-Cl	2-Cl	20	0	60	51	26	47	45
5g	4-Cl	4-OCH ₃	29	0	54	45	0	43	38
5h	4-Cl	4-OCH ₂ CH ₃	29	0	42	0	0	27	47
5i	4-Cl	2-OCH ₂ CH ₃	46	26	40	25	0	27	28
5j	4-OCH ₃	H	18	0	51	26	0	37	22
5k	4-OCH ₃	4-CH ₃	18	0	64	51	0	51	47
5l	4-OCH ₃	4-NO ₂	27	0	61	40	0	39	35
5m	4-OCH ₃	4-F	26	0	59	26	0	53	24
5n	4-OCH ₃	3-Cl	31	0	53	0	0	39	30
5o	4-OCH ₃	2-Cl	31	0	62	0	0	31	31
5p	4-OCH ₃	4-OCH ₃	27	0	65	0	0	45	27
5q	4-OCH ₃	4-OCH ₂ CH ₃	41	0	51	32	0	47	42
5r	4-OCH ₃	2-OCH ₂ CH ₃	64	28	47	72	62	76	70
肉桂醛	—	—	—	—	—	—	—	—	30
Polyoxin B	—	—	57	63	85	77	94	63	/

^a 浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$. ^b 浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$. 表中 *F. g*: *Fusarium graminearum*, *R. s*: *Rhizoctonia solani*, *A. s*: *Alternaria solani*, *B. c*: *Botrytis cinerea*, *A. a*: *Alternaria alternate*, *C. l*: *Colletotrichum lagenarium*.

目标化合物的制备. 向 50 mL 三口烧瓶中加入 40 mL 乙醇和 0.68 g (0.005 mol) 苯甲酰肼(**3**), 1.00 g (0.006 mol) 4-氯肉桂醛(**4**), 加热至 78 °C 回流反应. 待反应物 **3** 反应完全, 停止反应. 反应液析出固体. 抽滤, 用少量乙醇洗涤固体, 干燥得 1.19 g 黄色固体, 即目标化合物 **5a**. 收率 85%, m.p. 234.2~236.0 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 7.02~7.15 (m, 2H, C=CH), 7.45 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.5$ Hz, 2H, ArH), 7.50~7.62 (m, 3H, ArH), 7.67 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.5$ Hz, 2H, ArH), 7.90 (d, $^3J_{\text{HH}}=7.2$ Hz, 2H, ArH), 8.24 (d, $^3J_{\text{HH}}=7.3$ Hz, 1H, CH=N), 11.77 (s, 1H, NH); IR (KBr) ν : 3219, 3058, 1662, 1545, 1489, 979, 812, 692 cm^{-1} . Anal. calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}$: C 67.49, H 4.60, N 9.84; found C 67.08, H 4.43, N 9.52.

同法制备目标化合物 **5b**~**5r**.

5b: 白色固体, 产率 78%. m.p. 235.0~237.0 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 2.38 (s, 3H, CH_3), 7.00~7.15 (m, 2H, C=CH), 7.33 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.0$ Hz, 2H, ArH), 7.45 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.5$ Hz, 2H, ArH), 7.66 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.5$ Hz, 2H, ArH), 7.81 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.0$ Hz, 2H, ArH), 8.23 (d, $^3J_{\text{HH}}=7.8$ Hz, 1H, CH=N), 11.69 (s, 1H, NH); IR (KBr) ν : 3214, 3037, 1650, 1544, 1509, 979, 814 cm^{-1} . Anal. calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}$: C 68.34, H 5.06, N 9.38; found C 68.57, H 4.98, N 9.47.

5c: 黄色固体, 产率 95%. m.p. 242.2~243.8 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 7.11~7.13 (m, 2H, C=CH), 7.46 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.5$ Hz, 2H, ArH), 7.68 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.5$ Hz, 2H, ArH), 8.14 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.9$ Hz, 2H, ArH), 8.37 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.9$ Hz, 2H, ArH), 8.24~8.27 (m, 1H, CH=N), 12.04 (s, 1H, NH); IR (KBr) ν : 3266, 3074, 1658, 1531, 1492, 1345, 983, 809 cm^{-1} . Anal. calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{ClN}_3\text{O}_3$: C 58.28, H 3.67, N 12.74; found C 58.12, H 3.56, N 12.74.

5d: 黄色固体, 产率 81%. m.p. 239.1~240.5 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 7.08~7.10 (m, 2H, C=CH), 7.34~7.40 (m, 2H, ArH), 7.45 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.67 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.96~8.00 (m, 2H, ArH), 8.22 (d, $^3J_{\text{HH}}=7.2$ Hz, 1H, CH=N), 11.78 (s, 1H, NH); IR (KBr) ν : 3256, 3069, 1651, 1546, 1505, 985, 807 cm^{-1} . Anal. calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{ClFN}_2\text{O}$: C 63.48, H 4.00, N 9.25; found C 63.48, H 4.20, N 9.10.

5e: 黄色固体, 产率 82%. m.p. 221.5~223.3 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 7.04~7.11 (m, 2H, C=CH), 7.45 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.54~7.59 (m, 2H, ArH), 7.68 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.87 (d, $^3J_{\text{HH}}=7.7$ Hz, 1H, ArH), 7.95 (s, 1H, ArH), 8.21~8.24 (m, 1H, CH=N), 11.77 (s, 1H, NH); IR (KBr) ν : 3209, 3059, 1652,

1546, 1490, 982, 814 cm^{-1} . Anal. calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}$: C 60.21, H 3.79, N 8.78; found C 60.06, H 3.74, N 8.84.

5f: 黄色固体, 产率 68%. m.p. 220.8~222.7 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 6.95~7.08 (m, 2H, C=CH), 7.35~7.67 (m, 8H, ArH), 7.86~7.89 (m, 1H, CH=N), 11.81 (s, 1H, NH); IR (KBr) ν : 3173, 3009, 1654, 1594, 1491, 978, 811 cm^{-1} . Anal. calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}$: C 60.21, H 3.79, N 8.78; found C 60.29, H 4.00, N 8.73.

5g: 黄色固体, 产率 79%. m.p. 222.5~224.0 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 3.84 (s, 3H, CH_3), 6.99~7.07 (m, 4H, C=CH+ArH), 7.45 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.6$ Hz, 2H, ArH), 7.66 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.6$ Hz, 2H, ArH), 7.89 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.8$ Hz, 2H, ArH), 8.22 (d, $^3J_{\text{HH}}=7.8$ Hz, 1H, CH=N), 11.64 (s, 1H, NH); IR (KBr) ν : 3215, 3032, 2963, 2936, 1647, 1542, 1509, 979, 812 cm^{-1} . Anal. calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_2$: C 64.87, H 4.80, N 8.90; found C 65.04, H 4.80, N 8.95.

5h: 白色固体, 产率 71%. m.p. 224.2~226.7 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 1.35 (t, $^3J_{\text{HH}}=7.0$ Hz, 3H, CH_3), 4.11 (q, $^3J_{\text{HH}}=7.0$ Hz, 2H, CH_2), 6.99~7.08 (m, 4H, C=CH+ArH), 7.45 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.6$ Hz, 2H, ArH), 7.66 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.6$ Hz, 2H, ArH), 7.87 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.8$ Hz, 2H, ArH), 8.21 (d, $^3J_{\text{HH}}=7.5$ Hz, 1H, CH=N), 11.63 (s, 1H, NH); IR (KBr) ν : 3251, 3045, 2975, 2935, 1648, 1609, 1546, 1509, 986, 813 cm^{-1} . Anal. calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{ClN}_2\text{O}_2$: C 65.75, H 5.21, N 8.52; found C 65.76, H 5.40, N 8.52.

5i: 黄色固体, 产率 63%. m.p. 151.1~153.3 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 1.39 (t, $^3J_{\text{HH}}=7.0$ Hz, 3H, CH_3), 4.15 (q, $^3J_{\text{HH}}=7.0$ Hz, 2H, CH_2), 7.02~7.08 (m, 3H, C=CH+ArH), 7.14 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.3$ Hz, 1H, ArH), 7.43~7.51 (m, 3H, ArH), 7.60~7.64 (m, 3H, ArH), 8.05 (d, $^3J_{\text{HH}}=7.3$ Hz, 1H, CH=N), 11.36 (s, 1H, NH); IR (KBr) ν : 3284, 3080, 2980, 2932, 1649, 1552, 1490, 978, 813, 749 cm^{-1} . Anal. calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{ClN}_2\text{O}_2$: C 65.75, H 5.21, N 8.52; found C 65.59, H 5.40, N 8.34.

5j: 黄色固体, 产率 82%. m.p. 212.5~214.1 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 3.79 (s, 3H, CH_3), 6.94~6.98 (m, 4H, C=CH+ArH), 7.49~7.60 (m, 5H, C=CH+ArH), 7.89 (d, $^3J_{\text{HH}}=7.0$ Hz, 2H, ArH), 8.20 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.1$ Hz, 1H, CH=N), 11.66 (s, 1H, NH); IR (KBr) ν : 3230, 3060, 2997, 2938, 1630, 1545, 1511, 980, 815 cm^{-1} . Anal. calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$: C 72.84, H 5.75, N 9.99; found C 72.74, H 5.68, N 10.01.

5k: 黄色固体, 产率 71%. m.p. 217.2~218.9 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 2.38 (s, 3H, CH_3), 3.79 (s, 3H, CH_3), 6.92~6.97 (m, 4H, C=CH+ArH), 7.32 (d,

$^3J_{\text{HH}}=8.0$ Hz, 2H, ArH), 7.58 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.8$ Hz, 2H, ArH), 7.81 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.0$ Hz, 2H, ArH), 8.20 (d, $^3J_{\text{HH}}=7.8$ Hz, 1H, CH=N), 11.59 (s, 1H, NH); IR (KBr) ν : 3247, 3032, 2961, 2913, 1629, 1605, 1537, 1510, 978, 821 cm^{-1} . Anal. calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$: C 73.45, H 6.16, N 9.52; found C 73.51, H 6.29, N 9.46.

5l: 黄色固体, 产率 93%. m.p. 233.8~235.9 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz) δ : 3.79 (s, 3H, CH_3), 6.90~7.03 (m, 4H, C=CH+ArH), 7.60 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.8$ Hz, 2H, ArH), 8.13 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.9$ Hz, 2H, ArH), 8.22 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.8$ Hz, 1H, CH=N), 8.37 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.9$ Hz, 2H, ArH), 11.94 (s, 1H, NH); IR (KBr) ν : 3242, 3067, 2962, 1650, 1603, 1578, 1521, 988, 851 cm^{-1} . Anal. calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4$: C 62.76, H 4.65, N 12.92; found C 62.85, H 4.58, N 12.98.

5m: 黄色固体, 产率 77%. m.p. 221.2~222.9 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz) δ : 3.79 (s, 3H, CH_3), 6.93~6.98 (m, 4H, C=CH+ArH), 7.33~7.39 (m, 2H, ArH), 7.58 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.7$ Hz, 2H, ArH), 7.95~7.80 (m, 2H, ArH), 8.19 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.3$ Hz, 1H, CH=N), 11.68 (s, 1H, NH); IR (KBr) ν : 3223, 3037, 2968, 1650, 1603, 1511, 982, 813 cm^{-1} . Anal. calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{FN}_2\text{O}_2$: C 68.45, H 5.07, N 9.39; found C 68.65, H 5.20, N 9.40.

5n: 黄色固体, 产率 75%. m.p. 201.2~203.3 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz) δ : 3.80 (s, 3H, CH_3), 6.91~7.02 (m, 4H, C=CH+ArH), 7.53~7.60 (m, 3H, ArH), 7.66 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.8$ Hz, 1H, ArH), 7.86 (d, $^3J_{\text{HH}}=7.7$ Hz, 1H, ArH), 7.93 (s, 1H, ArH), 8.20 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.6$ Hz, 1H, CH=N), 11.75 (s, 1H, NH); IR (KBr) ν : 3221, 3059, 2969, 1653, 1544, 1512, 981, 815, 691 cm^{-1} . Anal. calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_2$: C 64.87, H 4.80, N 8.90; found C 64.77, H 4.56, N 8.68.

5o: 黄色固体, 产率 72%. m.p. 198.8~200.3 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz) δ : 3.79 (s, 3H, CH_3), 6.87~6.98 (m, 4H, C=CH+ArH), 7.40~7.59 (m, 6H, ArH), 8.02 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.6$ Hz, 1H, CH=N), 11.71 (s, 1H, NH); IR (KBr) ν : 3214, 3050, 3011, 1655, 1603, 1538, 987, 821 cm^{-1} . Anal. calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_2$: C 64.87, H 4.80, N 8.90; found C 65.05, H 4.84, N 8.84.

5p: 黄色固体, 产率 79%. m.p. 228.2~230.2 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz) δ : 3.79 (s, 3H, CH_3), 3.83 (s, 3H, CH_3), 6.92~7.01 (m, 4H, C=CH+ArH), 7.05 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.8$ Hz, 2H, ArH), 7.57 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.7$ Hz, 2H, ArH), 7.88 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.8$ Hz, 2H, ArH), 8.19 (d, $^3J_{\text{HH}}=7.5$ Hz, 1H, CH=N), 11.54 (s, 1H, NH); IR (KBr) ν : 3249, 3030, 2956, 2933, 1652, 1606, 1510, 978, 816 cm^{-1} . Anal. calcd

for $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$: C 69.66, H 5.85, N 9.03; found C 69.91, H 5.99, N 8.95.

5q: 黄色固体, 产率 74%. m.p. 217.1~218.9 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz) δ : 1.35 (t, $^3J_{\text{HH}}=7.0$ Hz, 3H, CH_3), 3.79 (s, 3H, CH_3), 4.10 (q, $^3J_{\text{HH}}=7.0$ Hz, 2H, CH_2), 6.92~6.97 (m, 4H, C=CH+ArH), 7.03 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.8$ Hz, 2H, ArH), 7.57 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.7$ Hz, 2H, ArH), 7.87 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.8$ Hz, 2H, ArH), 8.18 (d, $^3J_{\text{HH}}=7.9$ Hz, 1H, CH=N), 11.53 (s, 1H, NH); IR (KBr) ν : 3240, 3033, 2975, 2936, 1648, 1608, 1510, 981, 817 cm^{-1} . Anal. calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$: C 70.35, H 6.21, N 8.64; found C 70.34, H 6.29, N 8.54.

5r: 黄色固体, 产率 59%. m.p. 144.5~146.5 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz) δ : 1.39 (t, $^3J_{\text{HH}}=6.9$ Hz, 3H, CH_3), 3.80 (s, 3H, CH_3), 4.15 (q, $^3J_{\text{HH}}=6.9$ Hz, 2H, CH_2), 6.86~7.07 (m, 4H, C=CH+ArH), 7.14 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.2$ Hz, 2H, ArH), 7.45~7.50 (m, 1H, ArH), 7.57 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.8$ Hz, 2H, ArH), 7.61~7.64 (m, 1H, ArH), 8.02 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.2$ Hz, 1H, CH=N), 11.27 (s, 1H, NH); IR (KBr) ν : 3269, 3035, 2985, 2936, 1656, 1604, 1540, 1510, 975, 822, 759 cm^{-1} . Anal. calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$: C 70.35, H 6.21, N 8.64; found C 70.71, H 6.13, N 8.77.

3.2.2 蘑菇酪氨酸酶抑制活性测定

参照文献[17]的方法测定目标化合物对蘑菇酪氨酸酶的抑制率. 分别称取 5 mg 目标化合物、肉桂醛及 4-氯肉桂醛, 然后将样品溶于二甲亚砜, 分别定容成浓度为 5000 $\mu\text{g/mL}$ 的药液备用. 在离心管中加入 pH=6.8 的磷酸缓冲液 0.49 mL, 500U 的酪氨酸酶液 0.06 mL, 样品溶液 0.01 mL, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 20 min, 再加入 2 mmol/L L-DOPA 0.44 mL, 在 475 nm 下测定其在 5 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 DMSO 的磷酸缓冲液为空白对照. 抑制率用以下公式计算: 抑制率%=($\Delta\text{OD}_n-\Delta\text{OD}_i$)/ $\Delta\text{OD}_n\times 100\%$

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. 目标化合物的酪氨酸酶抑制活性结果见表 1.

3.2.3 杀菌活性测定

采用菌丝生长速率法^[18]测定目标化合物对供试 6 种病原菌的抑制率. 供试菌种分别为小麦赤霉病菌、水稻纹枯病菌、番茄早疫病菌、黄瓜灰霉病菌、烟草赤星病菌、黄瓜炭疽病菌. 分别称取 100 mg 目标化合物及多氧霉素 B (Polyoxin B) 原药, 然后将样品溶于二甲亚砜, 分别定容成浓度为 10000 $\mu\text{g/mL}$ 的药液备用.

取 1 mL 备用药液与 99 mL 融化的马铃薯-葡萄糖-琼脂(PDA)培养基混匀, 制备成浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 含毒

培养基. 将其制成含毒 PDA 平板. 待皿中含毒培养基固化后, 分别接入培养好病原菌菌饼. 置于 25 °C 培养箱中培养. 以相同浓度的多氧霉素 B 为对照药剂, 二甲亚砜为溶剂对照, 同时设无菌水为空白对照, 每个样品 4 次重复, 以上操作均为无菌操作. 待空白对照中的菌落充分生长后, 以十字交叉法测量各处理的菌落直径, 取其平均值. 以校正后的空白对照和处理的菌落平均直径计算抑制率, 计算公式如下: 抑制率%=(对照药菌落直径-处理药菌落直径)/(对照药菌落直径)×100%. 实验结果见表 1.

致谢 本论文杀菌活性筛选试验由中国科学院上海有机化学研究所吕龙研究员课题组协助测试, 在此表示诚挚的谢意.

辅助材料(Supporting Information) 化合物的核磁、红外、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] Hearing, V. -J.; Tsukamoto, K. *FASEB J.* **1991**, *5*, 2902
- [2] Oetting, W.-S. *Pigm. Cell Res.* **2000**, *13*, 3205
- [3] Barrett, F.-M. *Can. J. Zool.* **1984**, *62*, 834
- [4] Sugumaran, M. *FEBS Lett.* **1991**, *293*, 4
- [5] Friedman, M. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 631
- [6] Kubo, I.; Kinst-Hori, I. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1268
- [7] Kubo, I.; Kinst-Hori, I. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 5338
- [8] Kubo, I.; Kinst-Hori, I. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4574
- [9] Lee, H.-C.; Cheng, S.-S.; Chang, S.-T. *J. Sci. Food Agric.* **2005**, *85*, 2047.
- [10] Didry, N.; Dubreuil, L.; Pinkas, M. *Pharmazie* **1993**, *48*, 301.
- [11] Imai, T.; Yasuhara, K.; Tamura, T.; Takizawa, T.; Ueda, M.; Hirose, M.; Mitsumori, K. *Cancer Lett.* **2002**, *175*, 9.
- [12] Huang, J.; Cui, Z.-N.; Li, Y.; Yang, X.-L. *Chin. J. Org. Chem.* **2008**, *28*, 598 (in Chinese). (黄娟, 崔紫宁, 李映, 杨新玲, 有机化学, **2008**, *28*, 598.)
- [13] 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.)
- [14] Xu, Y.; Wang, Z.; Ling, Y.; Dong, W.; Xing, J.; Liang, P.; Yang, X.-L. *Chin. J. Org. Chem.* **2012**, *32*, 1278 (in Chinese). (徐焱, 王振, 凌云, 董玮, 邢静, 梁沛, 杨新玲, 有机化学, **2012**, *32*, 1278.)
- [15] Cui, Z.-N.; Shi, Y.-X.; Zhang, L.; Ling, Y.; Li, B.-J.; Nishida, Y.; Yang, X.-L. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 11649
- [16] Cui, Z.-N.; Zhang, L.; Huang, J.; Ling, Y.; Yang, X.-L. *Chin. J. Org. Chem.* **2010**, *30*, 1482 (in Chinese). (崔紫宁, 张莉, 黄娟, 凌云, 杨新玲, 有机化学, **2010**, *30*, 1482.)
- [17] Hearing, V.-J. *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, **1987**, *142*, 154.
- [18] Chen, N. C. *Bioassay of Pesticides*, Beijing Agricultural University Press, Beijing, **1991**, p. 161 (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**, p. 161.)
- [19] Deng, G.-M.; Chen, Z.; Wang, C.-R.; Zhang, H. M. *Acta Crystallogr., E* **2012**, *68*, o160.

(Cheng, F.)