

异海松酰(胺)基硫脲类衍生物的合成及其生物活性评价

刘娟娟^a 卢言菊^{a,b} 王 婧^{a,b} 毕良武^{a,b} 赵振东^{*,a,b}^(a) 中国林业科学研究院林产化学工业研究所 生物质化学利用国家工程实验室 国家林业局林产化学工程重点开放性实验室 江苏省生物质能源与材料重点实验室 南京 210042)^(b) 中国林业科学研究院林业新技术研究所 北京 100091)

摘要 为了开发具有较高生物活性的异海松酸类衍生物, 将硫脲结构拼接到异海松酸骨架上, 设计合成了 15 个未见报道的异海松酰(胺)基硫脲类化合物, 其结构经 FT-IR、¹H NMR、¹³C NMR 和 HRMS 或元素分析确证。对化合物进行了初步的抑菌和抗癌活性测试, 大多数化合物对白色念珠菌表现出显著的抑制活性, 且活性高于异海松酸。在浓度为 100 μmol/L 时, 部分化合物对人黑色素瘤(A375)和前列腺癌(PC-3)癌细胞具有明显的增殖抑制作用, 尤其化合物 *N*-异海松酰基-*N'*-(3-甲基苯基)硫脲(**3c**)和 *N*-异海松酰基-*N'*-(4-氟苯基)硫脲(**6b**)对癌细胞的抑制率达到 90% 以上。

关键词 异海松酸; 酰基硫脲; 抑菌活性; 抗癌活性; 构效关系

Synthesis and Bioactivity Evaluation of Acylthiourea Derivatives Based on Isopimaric Acid

Liu, Juanjuan^a Lu, Yanju^{a,b} Wang, Jing^a Bi, Liangwu^{a,b} Zhao, Zhendong^{*,a,b}^(a) Institute of Chemical Industry of Forest Product, Chinese Academy of Forestry, National Engineering Laboratory for Biomass Chemical Utilization, Key and Open Laboratory on Forest Chemical Engineering State Forestry Administration, Key Laboratory of Biomass Energy and Material, Nanjing 210042)^(b) Research Institute of Forestry New Technology, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091)

Abstract To develop isopimaric acid derivatives with high bioactivity, fifteen acyl (amide) thiourea derivatives containing isopimaric acid skeleton were synthesized and confirmed by FT-IR, ¹H NMR, ¹³C NMR and HRMS or elemental analysis. All the compounds were evaluated for their antibacterial and anticancer activity. Most of the compounds showed significant inhibitory activity which was higher than that of isopimaric acid against the *Candida Albicans*. At the concentration of 100 μmol/L, many compounds exhibited pronounced inhibitory effects on human melanoma cells (A375) and prostatic carcinoma (PC-3) cell lines, especially compounds *N*-isopimaric acyl-*N'*-(3-methylphenyl)sulfoarea (**3c**) and *N*-isopimaric acylamino-*N'*-(4-fluorophenyl)sulfoarea (**6b**) have the best anticancer activity, both with the inhibitory rate of over 90%.

Keywords isopimaric acid; acylthiourea; antibacterial activity; anticancer activity; structure-activity relationship

异海松酸(Isopimaric acid, IPA)是来源于天然产物松香中的一种重要的海松酸型二萜树脂酸, 其本身表现出多种优良的生物活性。关于异海松酸的生物活性研究报道较多的是其活化大型钙离子激活的钾离子(BK)通道的活性^[1,2]。进一步研究表明, 异海松酸作为 BK 通道的活化剂可以调控初级成骨细胞的生长和矿化^[3], 并降低小鼠听觉神经网络自发活动的多动症和改善患阿尔茨海默病小鼠的认知功能, 从而对神经活性多动症和阿

尔茨海默病具有潜在的治疗效果^[4,5]。其次, 异海松酸对结核病毒具有显著的疗效^[6], 并对爱博斯坦-巴尔病毒也显示出抑制效果^[7]。此外, 异海松酸对 12-*O*-佛波酯-13-醋酸(TPA)诱导的鸟氨酸脱羧酶(一种促进癌症发生的酶)^[8]、5-脂氧酶(5-LOX, 一种催化产生炎症的媒介)^[9]、鼠尾草种子发芽^[10]、棉红铃虫幼虫生长^[11]及多种细菌、真菌^[12,13]等具有明显的抑制作用, 并对舞毒蛾觅食表现出阻碍作用^[14]。因异海松酸本身具有广泛的生

* Corresponding author. E-mail: zdzhao@189.cn

Received October 12, 2016; revised December 7, 2016; published online December 21, 2016.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31370575).

国家自然科学基金(No. 31370575)资助项目。

物活性, 且异海松酸的化学结构中含有可反应的官能团羧基及双键, 因此可将其作为化工中间体或以其骨架结构作为药理活性中心, 开发具有生物活性的新型异海松酸类衍生物。

酰基硫脲和酰胺基硫脲化合物是两类重要的硫脲类衍生物, 也是重要的有机硫化合物。这两类硫脲类衍生物都具有广泛的生物活性, 如植物生长调节^[15]、抗病毒^[16]、抗菌^[17,18]和抗癌^[19,20]等, 因此备受研究者关注, 成为医药和农药领域研究的热点。

本文在异海松酸的生物活性基础上, 根据活性叠加原理, 通过活性亚结构拼接的方法, 将同样具有生物活性的硫脲结构引入到异海松酸分子中, 同时为了研究构效关系, 设计合成了 15 种未见报道的具有不同取代基和取代位置的酰(胺)基硫脲衍生物 **3a~3l**, **5** 和 **6a~6b**, 以期寻找更广谱、高效、低毒的异海松酸类生物活性制剂。合成的 15 种目标化合物的化学结构经 FT-IR, ¹H NMR, ¹³C NMR 和 TOF-MS 进行了分析鉴定, 并首次对这 15 种化合物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和白色念珠菌的抑菌活性, 以及对人黑色素瘤(A375)和前列腺癌(PC-3)两种癌细胞的细胞毒活性进行了测试。目标化合物的合成路线如 Scheme 1 所示。

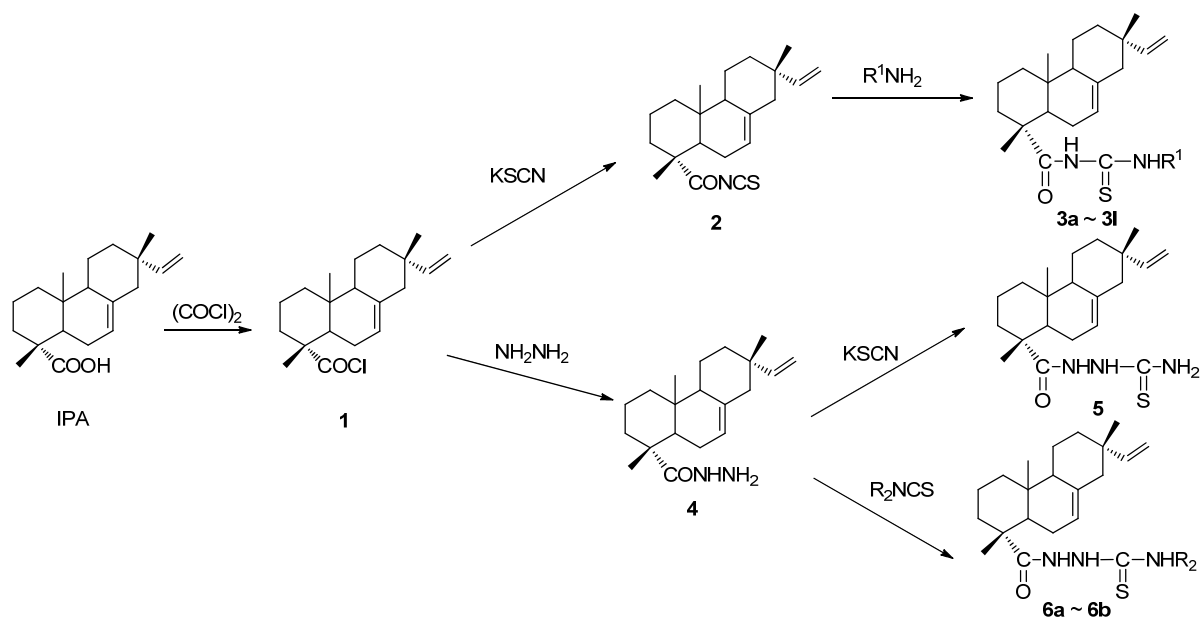
1 结果与讨论

1.1 波谱分析

目标化合物 **3a~3l**, **5** 和 **6a~6b** 的 FT-IR 光谱图中, 出现在 3135~3432 cm⁻¹ 之间的较强的吸收峰为 N—H 伸缩振动吸收峰。吸收峰在 1668~1679 cm⁻¹ 的单峰为

C=O 的伸缩振动吸收峰, 在 1637 cm⁻¹ 附近的弱吸收峰为异海松基骨架上的 C=C 吸收峰, 在 1242~1299 和 1134~1185 cm⁻¹ 出现的强吸收峰为 C=S 吸收峰, 该峰也证实了目标产物酰胺的形成。另外, 化合物 **3e**、**3f** 和 **3g** 在 643, 657 和 653 cm⁻¹ 处出现了属于 Ph—Br 的吸收峰; 化合物 **3h** 和 **3i** 在 652, 669 和 676 cm⁻¹ 左右出现的中等强度的吸收峰是 Ph—Cl 的伸缩振动吸收峰; 化合物 **3j** 在 1311 和 1512 cm⁻¹ 出现的两个较强的单峰为 Ph—NO₂ 的伸缩振动吸收峰。

¹H NMR 谱图中, δ 值在 12.26~14.12 和 10.42~11.18 的两个单峰归属于 CONHCSNH 和 CONHCSNH 上的质子峰, 因羰基氧与 CONHCSNH 上质子的氢键作用产生的去屏蔽效果, 使得 CONHCSNH 质子位移出现在低场^[21]。当 R 为噻唑基(Th)时, NH 质子位移比 R 为苯基(Ph)时位移要大; Ph 或 Th 上连有供电子取代基时, NH 化学位移移向高场; 连有吸电子取代基时, 则 NH 化学位移移向低场^[22]。在化合物 **3a~3g** 中, 苯环上质子化学位移出现在 δ 7.07~8.26。化合物 **3k** 和 **3l** 中, 噻唑环上质子位移出现在 δ 7.30~8.63。异海松酸骨架上的 CH=CH₂ 和 C=CH 质子化学位移分别出现在 δ 5.84~5.87 (dd), 5.31~5.36 (brd), 4.95~4.99 (dd) 和 4.88~4.92 (dd) 处, 与文献[23]报道一致; 三个 CH₃ 质子化学位移分别在 δ 1.27、0.86 和 0.82 附近; 异海松酸骨架上饱和氢化学位移在 δ 2.00 以下。此外, 在化合物 **3b~3d** 和 **3l** 中, δ 2.30~2.37 出现的单峰为 PhCH₃ 和 ThCH₃ 的质子化学位移峰。



图式 1 异海松酰(胺)基硫脲衍生物的合成
Scheme 1 Synthesis of isopimaric acylthiourea derivatives

^{13}C NMR 谱图中, CSNH 和 CONH 的碳原子的化学位移分别在 δ 180.86~181.79 和 179.08~180.63 处, 同样由于分子内氢键的作用使得 CSNH 的碳原子的化学位移出现在低位. 苯环、噻唑环及异海松基骨架上不饱和碳的化学位移在 δ 108.92~176.33 处. 异海松基骨架上饱和碳原子化学位移在 δ 51.88 以下. 此外, 在化合物 **3b**~**3d** 和 **3l** 中, 还出现了 PhCH_3 和 ThCH_3 碳原子的化学位移, 分别在 δ 21 和 11.53 左右.

HRMS 分析结果显示 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 、 $[\text{M}-\text{H}]^+$ 或元素分析的实测值与理论计算值均在合理的误差范围内, 说明实测值与理论值是相符的.

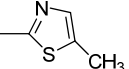
上述分析结果表明, 所合成的化合物与目标化合物的化学结构一致.

1.2 抑菌活性

标题化合物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和白色念珠菌的抑制活性结果如表 1 所示. 结果表明, 目标化合物对两种细菌(金黄色葡萄球菌和大肠杆菌)的抑制活性普遍低于母体化合物异海松酸, 没有达到预期的目的, 可能是由于合成的化合物的分子结构变大, 使得目标化合物难以穿透细菌细胞壁到达细胞膜, 从而降低其抑菌效果. 但化合物 **3i** 和 **3l** 则对大肠杆菌表现出较强的抑制活性, 最低抑菌浓度均为 15.63 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 除了化合物 **3c**, **3f** 和 **6a** 抑制真菌白色念珠菌的活性与异海松酸相当, 其余化合物则都表现出高于异海松酸的抑菌活性, 这说

表 1 异海松酰(胺)基硫脲衍生物的抑菌活性

Table 1 Antibacterial activity of isopimaric acylthiourea derivatives

Compd.	R^1/R^2	MIC/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$		
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
3a	Ph	>500	>500	31.25
3b	<i>p</i> - $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4$	>500	>500	31.25
3c	<i>m</i> - $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4$	>500	>500	62.5
3d	<i>o</i> - $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4$	>500	>500	31.25
3e	<i>p</i> - BrC_6H_4	>500	>500	31.25
3f	<i>m</i> - BrC_6H_4	>500	>500	62.5
3g	<i>o</i> - BrC_6H_4	>500	>500	31.25
3h	<i>p</i> - ClC_6H_4	>500	>500	15.63
3i	<i>m</i> - ClC_6H_4	>500	15.63	31.25
3j	<i>p</i> - $\text{O}_2\text{NC}_6\text{H}_4$	>500	>500	31.25
3k		>500	>500	31.25
3l		>500	15.63	7.81
5		125	125	31.25
6a	Ph	>500	500	62.5
6b	<i>p</i> - FC_6H_4	125	125	15.63
异海松酸		31.25	125	62.5

明硫脲结构的引入有利于提高母体化合物异海松酸对白色念珠菌的抑制活性. 初步构效关系研究发现, 异海松酰基硫脲衍生物 **3a**~**3j** 苯环上取代基相同时, 邻对位取代化合物抑制白色念珠菌的活性大于间位取代, 且不受吸电子和供电子基团的影响, 说明苯环上邻对位取代更有利于增强化合物的抑菌活性; 苯环对位取代时, Cl 原子取代对提高抑菌活性更为有利. 异海松酰基硫脲衍生物 **3k**~**3l** 的噻唑环上无取代基的化合物 **3k** 对白色念珠菌的抑制活性略高于异海松酸; CH_3 取代化合物 **3l** 的抑菌活性有较大改善, 表现出最好的抑菌活性, 其最低抑菌浓度(MIC)值为 7.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 异海松酰胺基硫脲衍生物 **5**, **6a**~**6b** 中, 苯环上无取代基的化合物 **6a** 对白色念珠菌的抑制活性低于无苯环的化合物 **5**; 而 *p*-F 取代的化合物 **6b** 的抑菌活性高于 **5**, 说明苯环上取代基的引入对化合物抑制真菌的活性有重要影响.

1.3 抗癌活性

采用噻唑蓝(MTT)法测定了目标化合物对人体黑色素瘤(A375)和前列腺癌(PC-3)两种癌细胞的增殖抑制活性, 并与母体化合物异海松酸的抑制效果进行对比, 实验结果如图 1 所示. 由图 1 可知, 母体化合物异海松酸在 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时, 对两种癌细胞增殖几乎无抑制活性; 在 50 和 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时, 对细胞增殖的抑制作用有所改善, 但仍然较弱. 目标化合物在 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时, 对两种癌细胞的增殖抑制作用也微乎其微, 与母体异海松酸差别不大; 在 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时, 对细胞增殖的抑制作用增强, 其中部分化合物的抗癌活性有较大改善; 随着化合物浓度继续增加到 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时, 化合物的细胞增殖抑制效果进一步提高, 多数化合物表现出高于异海松酸的抗癌活性, 如化合物 **3c**, **3f**, **3i**~**3l**, **5**, **6a** 和 **6b** 对 A375 细胞的增殖抑制作用高于异海松酸, 尤其 **3c** 和 **6b**, 抑制率均达 90% 以上; 除 **3a**, **3d** 和 **5** 外, 其余化合物对 PC-3 细胞的抑制效果均高于异海松酸, 尤其 **6b**, 其抑制率也高于 90%. 上述分析说明, 目标化合物的抗癌活性与化合物剂量有关, 且硫脲结构的引入有利于提高异海松酸的抗癌活性.

因目标化合物在 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时基本无抗癌活性, 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时抗癌活性有部分改善, 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时抗癌活性最好, 因此以 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 化合物对应的抗癌活性为依据对构效关系进行初步考察. 由图 1 可知, 异海松酰基硫脲衍生物 **3a**~**3l** 中苯环上无取代基的 **3a** 对 A375 细胞近乎无增殖抑制作用, 对 PC-3 细胞也仅表现出较弱的活性; 苯环上有取代基时, 部分化合物的细胞增殖抑制作用明显增强. 对 A375 细胞而言, 化合物苯环上取代基相同($\text{CH}_3/\text{Br}/\text{Cl}$)时, 苯环间位取代对化合物的抗癌活性贡献较大, 是改善该类化合物抗癌活性的一个关键因

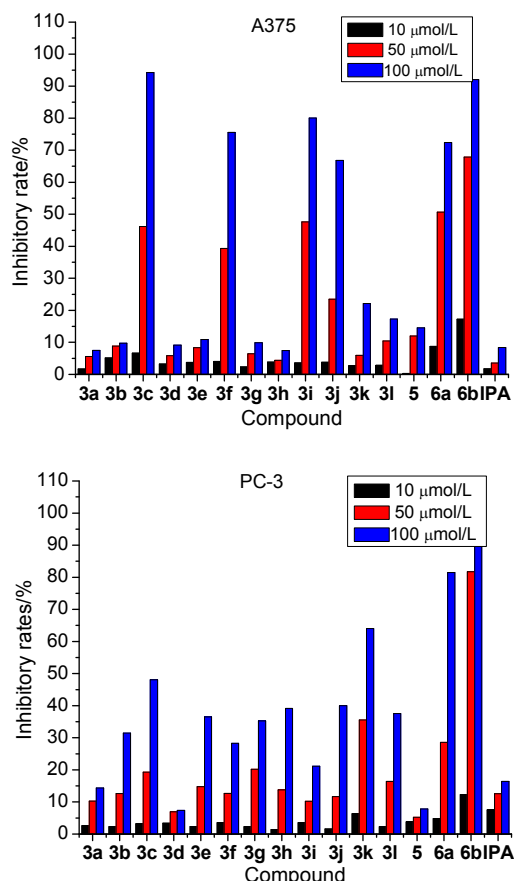


图1 异海松酰(胺)基硫脲衍生物的抗癌活性

Figure 1 Anticancer activity of isopimaric acylthiourea derivatives

素,且不受供电子和吸电子基团的影响;苯环对位和邻位取代的影响较小,且基本无差别。化合物苯环间位为卤素时,则抗癌活性 $3i$ (Cl) > $3f$ (Br); 苯环对位为吸电子基团时,则抗癌活性 $3j$ (NO₂) >> $3e$ (Br) > $3h$ (Cl)。对 PC-3 细胞而言,苯环上 CH₃ 取代时,化合物的抗癌活性 $3c$ (*m*-) > $3b$ (*p*-) > $3d$ (*o*-); Br/Cl 取代时,则抗癌活性 $3e$ (*p*-) ≈ $3g$ (*o*-) > 3 (*m*-)/ $3h$ (*p*-) > $3i$ (*m*-),说明苯环上供电子基团取代时,间位取代对活性起关键作用;而吸电子基团取代时,则对位和邻位取代起关键作用。化合物苯环对位为吸电子基团取代时,NO₂、Cl 和 Br 取代化合物的抗癌活性差别不大。异海松酰基硫脲化合物 $3k$ 和 $3l$ 对 A375 细胞的抑制作用较弱,而对 PC-3 细胞的抑制作用明显,且噻唑环上无取代基的化合物 $3k$ 的抑制效果高于甲基取代化合物 $3l$ 的效果。异海松酰胺基硫脲衍生物 5 , $6a$ 和 $6b$ 中不含苯环的化合物 5 对 A375 细胞具有较弱的抑制活性,对 PC-3 细胞基本无抑制作用;含有苯环的化合物 $6a$ 和 $6b$ 表现出较显著的抗癌活性,且苯环对位上引入 F 原子的化合物 $6b$ 的抗癌活性最好。

2 结论

本文以异海松酸为原料,将具有生物活性的硫脲结构拼接到异海松酸结构上,设计合成了 15 种未见报道的异海松酰(胺)基硫脲衍生物。初步抗菌活性表明,绝大部分化合物对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑制效果较弱,但化合物 $3i$ 和 $3l$ 对大肠杆菌表现出显著的抑制活性;多数化合物对白色念珠菌的抑制活性高于异海松酸。抗癌实验表明,部分化合物在 50 和 100 μmol/L 时对 A375 和 PC-3 癌细胞表现出明显的抑制效果。异海松酰基硫脲衍生物的苯环间位取代对化合物抑制 A375 癌细胞增殖起关键作用,苯环对位 NO₂ 取代对提高化合物抑制 PC-3 细胞增殖的活性更为有利。另外,异海松酰胺基硫脲衍生物结构中有引入芳基时抗癌活性增强。上述研究结果,对指导下一步合成高活性的异海松酸衍生物具有一定的参考价值。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

上海申光仪器公司产 WRS-1B 型数字熔点仪 (Shanghai Shengguang Instrument, China), 使用前温度未经校正; 美国 Thermo Scientific Nicolet IS10 型傅里叶变换红外光谱仪, 采用 KBr 压片法; 德国 Bruker Avance III 500 型核磁共振仪, TMS 为内标, DMSO-*d*₆ 为溶剂; 英国 Waters Q-TOF MicroTM 型质谱仪 (Waters, England); 美国 PE 公司 PE-2400 型元素分析仪; 江苏净化 SW-CJ-1FD 型超净工作台; 中国菲利普斯 IX51 型生物倒置显微镜; 美国 Bio Tek Instruments EL-x800 型酶标仪; 日本 SANYO XD-101 型 CO₂ 培养箱。

异海松酸, 参照专利方法制备^[24], MTT 由 Gibco 公司购得; DMSO 由 Sigma 公司购得; 人黑色素瘤细胞 (A375) 和前列腺癌细胞 (PC-3) 均由江苏凯基生物技术有限公司提供。其余所用试剂均为市售分析纯, 使用前未经处理。

3.2 实验方法

3.2.1 异海松酰基硫脲衍生物 $3a\sim 3l$ 的合成

将 1 g (3.3 mmol) 异海松酸溶于 10 mL 二氯甲烷中, 冷却至 0 °C。然后, 将溶于 10 mL 二氯甲烷中的 0.35 mL (4 mmol) 草酰氯滴加到上述溶液中。在 N₂ 保护下, 常温搅拌反应 3 h。反应结束后, 将溶剂和过量的草酰氯减压旋蒸除去, 得到红棕色的异海松酰氯(1)。再将溶于 10 mL 乙腈中的异海松酰氯, 滴加到溶有 0.32 g (3.3 mmol) KSCN 的 15 mL 乙腈溶液中, 75 °C 回流反应 2 h, 冷却至室温, 过滤除去 KCl 沉淀, 得到亮黄色的异海松酰基异硫氰酸酯(2)的乙腈溶液。随后, 向异海松酰基异

硫氰酸酯的乙腈溶液中加入 3 mmol 的取代芳胺、取代噻唑胺, 回流反应, TLC 跟踪反应进度, 待原料点消失停止反应, 脱除溶剂, 粗产物用乙醇重结晶或柱层析(石油醚/乙醇酸乙酯)提纯, 得到异海松酰基硫脲 **3a**~**3l** 纯品。

N-异海松酰基-*N'*-苯基硫脲(**3a**): 白色固体, 收率 82.7%. m.p. 112.8~113.6 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 12.62 (s, CSNH), 10.48 (s, 1H, CONH), 7.64 (d, $J=9.0$ Hz, 2H, PhH), 7.41 (t, $J=8.0$ Hz, 1H, PhH), 7.26 (t, $J=8.0$ Hz, 2H, PhH), 5.84 (dd, $J=11.0, 18.0$ Hz, 1H, 15-H), 5.34 (brd, $J=5.5$ Hz, 1H, 7-H), 4.96 (dd, $J=1.0, 17.5$ Hz, 1H, 16-H), 4.89 (dd, $J=1.5, 11.0$ Hz, 1H, 16-H), 2.09 (dd, $J=3.0, 13.5$ Hz, 1H), 1.97~1.85 (m, 5H), 1.74 (d, $J=13.5$ Hz, 2H), 1.62~1.53 (m, 4H), 1.48~1.33 (m, 4H), 1.27 (s, 3H, 19-Me), 0.88 (s, 3H, 17-Me), 0.83 (s, 3H, 20-Me); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ : 181.01, 179.80, 150.23, 138.35, 135.78, 129.08, 126.74, 124.86, 121.16, 110.24, 51.29, 47.84, 46.15, 44.06, 37.24, 36.83, 36.03, 35.21, 35.16, 24.94, 21.75, 19.94, 18.37, 17.16, 15.53; IR (KBr) ν : 3432, 3294, 1679, 1637, 1242, 1152 cm⁻¹; HR(ToF)MS calcd for C₂₇H₃₆N₂ONaS 459.2446, found 459.2454.

N-异海松酰基-*N'*-(4-甲基苯基)硫脲(**3b**): 白色固体, 收率 78.4%. m.p. 56.8~57.9 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 12.59 (s, CSNH), 10.46 (s, 1H, CONH), 7.49 (d, $J=9.5$ Hz, 1H, PhH), 7.23 (t, $J=8.0$ Hz, 2H, PhH), 5.87 (dd, $J=11.0, 18.0$ Hz, 1H, 15-H), 5.36 (brd, $J=6.0$ Hz, 1H, 7-H), 4.99 (dd, $J=1.0, 17.5$ Hz, 1H, 16-H), 4.92 (dd, $J=1.5, 11.0$ Hz, 1H, 16-H), 2.33 (s, 3H, PhMe), 2.12 (dd, $J=4.0, 12.5$ Hz, 1H), 1.99~1.87 (m, 5H), 1.76 (d, $J=13.5$ Hz, 2H), 1.64~1.49 (m, 4H), 1.43~1.33 (m, 4H), 1.30 (s, 3H, 19-Me), 0.91 (s, 3H, 17-Me), 0.86 (s, 3H, 20-Me); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ : 180.99, 179.54, 150.20, 136.03, 135.75, 129.48, 124.34, 121.15, 110.19, 51.45, 48.03, 46.04, 43.82, 37.24, 36.88, 36.01, 35.18, 35.12, 24.92, 21.75, 21.03, 19.92, 18.26, 17.18, 15.54; IR (KBr) ν : 3432, 1671, 1637, 1245, 1135 cm⁻¹. Anal. calcd for C₂₈H₃₈N₂OS: C 74.11, H 8.28, N 6.25; found C 74.62, H 8.50, N 6.22.

N-异海松酰基-*N'*-(3-甲基苯基)硫脲(**3c**): 白色固体, 收率 84.5%. m.p. 113.3~114.0 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 12.61 (s, CSNH), 10.42 (s, 1H, CONH), 7.64 (d, $J=9.0$ Hz, 2H, PhH), 7.43 (s, 1H, PhH), 7.28 (t, $J=8.0$ Hz, 1H, PhH), 7.07 (d, $J=9.0$ Hz, 1H, PhH), 5.84 (dd, $J=11.0, 18.0$ Hz, 1H, 15-H), 5.33 (brd, $J=5.5$ Hz, 1H, 7-H),

4.96 (dd, $J=1.0, 17.5$ Hz, 1H, 16-H), 4.89 (dd, $J=1.5, 11.0$ Hz, 1H, 16-H), 2.31 (s, 3H, Ph-Me), 2.08 (dd, $J=3.5, 12.5$ Hz, 1H), 1.97~1.85 (m, 5H), 1.74 (d, $J=13.5$ Hz, 2H), 1.62~1.53 (m, 4H), 1.48~1.33 (m, 4H), 1.27 (s, 3H, 19-Me), 0.88 (s, 3H, 17-Me), 0.83 (s, 3H, 20-Me); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ : 181.01, 179.45, 150.22, 138.45, 138.22, 135.78, 128.81, 127.30, 125.01, 121.63, 121.24, 110.19, 51.39, 47.98, 45.99, 43.76, 37.16, 36.81, 35.94, 35.12, 35.09, 24.85, 21.68, 21.27, 19.86, 18.19, 17.11, 15.47; IR (KBr) ν : 3432, 1672, 1637, 1261, 1134 cm⁻¹; HR (TOF) MS calcd for C₂₈H₃₇N₂OS 449.2627, found 449.2637.

N-异海松酰基-*N'*-(2-甲基苯基)硫脲(**3d**): 白色固体, 收率 79.1%. m.p. >300 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 12.26 (s, CSNH), 10.53 (s, 1H, CONH), 7.55 (d, $J=9.5$ Hz, 1H, PhH), 7.29~7.27 (m, 1H, PhH), 7.24~7.18 (m, 2H, PhH), 5.85 (dd, $J=11.0, 18.0$ Hz, 1H, 15-H), 5.35 (brd, $J=7.5$ Hz, 1H, 7-H), 4.96 (dd, $J=1.5, 17.5$ Hz, 1H, 16-H), 4.89 (dd, $J=2.0, 11.0$ Hz, 1H, 16-H), 2.20 (s, 3H, PhMe), 2.11 (dd, $J=4.5, 12.5$ Hz, 1H), 1.99~1.84 (m, 5H), 1.74 (d, $J=13.0$ Hz, 2H), 1.62~1.52 (m, 4H), 1.48~1.30 (m, 4H), 1.28 (s, 3H, 19-Me), 0.89 (s, 3H, 17-Me), 0.83 (s, 3H, 20-Me); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ : 180.98, 180.63, 150.28, 137.37, 135.85, 133.68, 130.79, 127.42, 127.02, 126.51, 121.24, 110.22, 51.41, 48.05, 46.01, 43.77, 37.20, 36.88, 36.01, 35.19, 35.16, 24.96, 21.76, 19.90, 18.27, 18.06, 17.22, 15.52; IR (KBr) ν : 3427, 3135, 1668, 1639, 1248, 1146 cm⁻¹; HR (TOF) MS calcd for C₂₈H₃₈N₂ONaS 473.2586, found 473.2591.

N-异海松酰基-*N'*-(4-溴苯基)硫脲(**3e**): 淡黄色固体, 收率 82.4%. m.p. 56.8~57.9 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ : 12.67 (s, CSNH), 8.67 (s, 1H, CONH), 7.65 (d, $J=8.5$ Hz, 2H, PhH), 7.55 (d, $J=8.5$ Hz, 2H, PhH), 5.88 (dd, $J=11.0, 17.5$ Hz, 1H, 15-H), 5.37 (brd, $J=4.0$ Hz, 1H, 7-H), 4.50 (dd, $J=1.0, 17.5$ Hz, 1H, 16-H), 4.93 (dd, $J=1.0, 10.5$ Hz, 1H, 16-H), 2.11~1.90 (m, 6H), 1.85~1.79 (m, 2H), 1.73~1.61 (m, 6H), 1.56~1.45 (m, 2H), 1.43 (s, 3H, 19-Me), 0.99 (s, 3H, 17-Me), 0.91 (s, 3H, 20-Me); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ : 180.08, 178.27, 150.09, 136.72, 136.11, 131.94, 125.35, 120.30, 119.85, 109.44, 52.11, 47.81, 46.01, 45.76, 38.53, 37.17, 36.77, 35.99, 35.30, 25.08, 21.54, 20.02, 17.97, 17.12, 15.34; IR (KBr) ν : 3430, 1672, 1637, 1244, 1136 cm⁻¹. Anal. calcd for C₂₇H₃₅BrN₂OS: C 63.75, H 6.80, N 5.17; found C 62.90, H 6.84, N 5.43.

N-异海松酰基-*N'*-(3-溴苯基)硫脲(**3f**): 淡黄色固体, 收率 75.9%. m.p. 68.7~70.2 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 12.71 (s, CSNH), 8.67 (s, 1H, CONH), 7.99 (s, 1H, PhH), 7.56 (d, $J=9.5$ Hz, 1H, PhH), 7.67 (d, $J=8.5$ Hz, 2H, PhH), 7.42 (t, $J=2.5$ Hz, 1H, PhH), 5.88 (dd, $J=11.0$, 17.5 Hz, 1H, 15-H), 5.37 (brd, $J=4.0$ Hz, 1H, 7-H), 5.00 (dd, $J=1.0$, 17.5 Hz, 1H, 16-H), 4.93 (dd, $J=1.0$, 10.5 Hz, 1H, 16-H), 2.10~1.90 (m, 6H), 1.85~1.79 (m, 2H), 1.73~1.61 (m, 6H), 1.59~1.45 (m, 2H), 1.43 (s, 3H, 19-Me), 0.99 (s, 3H, 17-Me), 0.91 (s, 3H, 20-Me); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 180.10, 178.33, 150.16, 138.91, 136.99, 130.05, 129.67, 126.68, 122.35, 122.24, 120.30, 109.45, 52.10, 47.82, 46.01, 45.76, 38.52, 37.16, 36.77, 36.00, 35.30, 25.08, 21.54, 20.02, 17.97, 17.12, 15.35; IR (KBr) ν : 3429, 1672, 1637, 1243, 1136 cm^{-1} . Anal. calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{BrN}_2\text{OS}$: C 62.75, H 6.79, N 5.50; found C 62.90, H 6.84, N, 5.43.

N-异海松酰基-*N'*-(2-溴苯基)硫脲 (**3g**): 淡黄色固体, 收率 78.5%. m.p. 80.2~81.5 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 12.61 (s, CSNH), 8.75 (s, 1H, CONH), 8.28 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, PhH), 7.68 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, PhH), 7.42 (t, $J=8.0$ Hz, 2H, PhH), 7.20 (t, $J=8.0$ Hz, 1H, PhH), 5.88 (dd, $J=10.5$, 17.5 Hz, 1H, 15-H), 5.37 (brd, $J=3.5$ Hz, 1H, 7-H), 5.00 (dd, $J=1.0$, 17.5 Hz, 1H, 16-H), 4.93 (dd, $J=1.0$, 11.0 Hz, 1H, 16-H), 2.12~1.93 (m, 6H), 1.89~1.83 (m, 2H), 1.76~1.62 (m, 6H), 1.60~1.48 (m, 2H), 1.45 (s, 3H, 19-Me), 1.00 (s, 3H, 17-Me), 0.92 (s, 3H, 20-Me); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 179.57, 179.09, 150.13, 136.54, 135.97, 132.90, 128.12, 127.47, 127.03, 120.40, 118.50, 109.42, 52.00, 47.82, 46.00, 45.74, 38.49, 37.14, 36.76, 36.02, 35.32, 25.08, 21.55, 20.00, 17.99, 17.16, 15.33; IR (KBr) ν : 3429, 1672, 1637, 1243, 1136 cm^{-1} . Anal. calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{BrN}_2\text{OS}$: C 63.07, H 6.63, N 5.37; found C 62.90, H 6.84, N 5.43.

N-异海松酰基-*N'*-(4-氯苯基)硫脲(**3h**): 淡黄色固体, 收率 76.3%. m.p. 57.2~58.6 °C; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz) δ : 12.58 (s, CSNH), 10.57 (s, 1H, CONH), 7.67 (d, $J=8.5$ Hz, 2H, PhH), 7.45 (d, $J=8.5$ Hz, 2H, PhH), 5.84 (dd, $J=11.0$, 17.5 Hz, 1H, 15-H), 5.33 (brd, $J=4.0$ Hz, 1H, 7-H), 4.96 (dd, $J=1.0$, 17.5 Hz, 1H, 16-H), 4.89 (dd, $J=1.5$, 11.0 Hz, 1H, 16-H), 2.09 (dd, $J=3.5$, 12.0 Hz, 1H), 1.96~1.84 (m, 5H), 1.73 (d, $J=12.5$ Hz, 2H), 1.61~1.53 (m, 4H), 1.48~1.31 (m, 4H), 1.27 (s, 3H, 19-Me), 0.88 (s, 3H, 17-Me), 0.83 (s, 3H, 20-Me); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz) δ : 180.95, 180.00, 150.27, 137.42,

135.73, 130.66, 128.94, 126.70, 121.37, 110.05, 51.28, 47.82, 45.89, 43.78, 37.19, 36.88, 35.99, 35.18, 35.07, 24.78, 21.73, 19.87, 18.01, 17.29, 15.46; IR (KBr) ν : 3430, 1672, 1637, 1244, 1136 cm^{-1} . Anal. calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{ClN}_2\text{OS}$: C 68.53, H 7.44, N 5.93; found C 68.84, H 7.49, N 5.95.

N-异海松酰基-*N'*-(3-氯苯基)硫脲(**3i**): 淡黄色固体, 收率 74.6%. m.p. 47.5~48.6 °C; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz) δ : 12.68 (s, CSNH), 10.63 (s, 1H, CONH), 7.93 (s, 1H, PhH), 7.56 (d, $J=10$ Hz, 1H, PhH), 7.45 (t, $J=8.5$ Hz, 2H, PhH), 7.34~7.32 (m, 1H, PhH), 5.87 (dd, $J=11.0$, 18.0 Hz, 1H, 15-H), 5.36 (brd, $J=6.0$ Hz, 1H, 7-H), 4.98 (dd, $J=1.5$, 17.5 Hz, 1H, 16-H), 4.91 (dd, $J=1.5$, 11.0 Hz, 1H, 16-H), 2.12 (dd, $J=4.0$, 12.0 Hz, 1H), 1.99~1.87 (m, 5H), 1.76 (d, $J=13.5$ Hz, 2H), 1.64~1.56 (m, 4H), 1.51~1.33 (m, 4H), 1.30 (s, 3H, 19-Me), 0.91 (s, 3H, 17-Me), 0.86 (s, 3H, 20-Me); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz) δ : 180.86, 180.05, 150.26, 139.84, 135.82, 133.11, 130.45, 126.51, 124.54, 123.56, 121.30, 110.18, 51.45, 48.07, 46.04, 43.73, 37.20, 36.87, 36.01, 35.17, 35.07, 24.99, 21.75, 19.92, 18.25, 17.19, 15.53; IR (KBr) ν : 3429, 1672, 1637, 1243, 1136 cm^{-1} . Anal. calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{ClN}_2\text{OS}$: C 69.25, H 7.47, N 5.10; found C 68.84, H 7.49, N, 5.95.

N-异海松酰基-*N'*-(4-硝基苯基)硫脲(**3j**): 棕色固体, 收率 76.8%. m.p. 74.3~75.2 °C; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz) δ : 12.92 (s, CSNH), 10.76 (s, 1H, CONH), 8.26 (d, $J=9.5$ Hz, 2H, PhH), 8.04 (d, $J=9.5$ Hz, 2H, PhH), 5.84 (dd, $J=11.0$, 18.0 Hz, 1H, 15-H), 5.33 (brd, $J=5.5$ Hz, 1H, 7-H), 4.96 (dd, $J=1.5$, 17.5 Hz, 1H, 16-H), 4.89 (dd, $J=1.0$, 10.5 Hz, 1H, 16-H), 2.11 (dd, $J=4.0$, 12.5 Hz, 1H), 1.96~1.84 (m, 5H), 1.74 (d, $J=13.5$ Hz), 1.62~1.54 (m, 4H), 1.48~1.31 (m, 4H), 1.28 (s, 3H, 19-Me), 0.88 (s, 3H, 17-Me), 0.83 (s, 3H, 20-Me); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz) δ : 180.96, 179.96, 150.27, 144.85, 144.39, 135.83, 124.65, 124.62, 121.30, 110.20, 51.45, 48.14, 46.05, 43.67, 37.15, 36.88, 35.99, 35.18, 34.99, 24.89, 21.74, 19.91, 18.23, 17.20, 15.54 cm^{-1} ; IR (KBr) ν : 3427, 1676, 1637, 1253, 1137. HR (TOF) MS calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ 480.2321, found 480.2309.

N-异海松酰基-*N'*-噻唑基硫脲(**3k**): 白色固体, 收率 60.7%. m.p. 67.1~68.0 °C; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz) δ : 14.12 (s, CSNH), 11.18 (s, 1H, CONH), 7.63 (d, $J=4.0$ Hz, 1H, Th-H), 7.33 (d, $J=4.0$ Hz, 1H, Th-H), 5.84 (dd, $J=11.0$, 18.0 Hz, 1H, 15-H), 5.32 (brd, $J=6.5$ Hz,

1H, 7-H), 4.96 (dd, $J=1.5, 17.5$ Hz, 1H, 16-H), 4.88 (dd, $J=1.5, 11.0$ Hz, 1H, 16-H), 2.10 (dd, $J=4.0, 12.5$ Hz, 1H), 1.96~1.85 (m, 5H), 1.74 (d, $J=13.0$ Hz, 2H), 1.61~1.51 (m, 4H), 1.48~1.30 (m, 4H), 1.27 (s, 3H, 19-Me), 0.88 (s, 3H, 17-Me), 0.83 (s, 3H, 20-Me); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 181.79, 179.28, 172.39, 150.27, 135.76, 121.33, 115.13, 110.21, 108.92, 51.45, 48.14, 46.05, 43.67, 37.15, 36.88, 35.99, 35.18, 34.99, 24.89, 21.74, 19.91, 18.23, 17.20, 15.54 cm^{-1} ; IR (KBr) ν : 3431, 1671, 1638, 1299, 1185. HR (TOF) MS calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{ONaS}_2$ 466.1947, found 466.1955.

N-异海松酰胺基-*N'*-(5-甲基噻唑基)硫脲(**3l**): 白色固体, 收率 69.3%. m.p. 70.5~71.6 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 13.98 (s, CSNH), 11.09 (s, 1H, CONH), 7.30 (s, 1H, Th-H), 5.84 (dd, $J=10.5, 17.5$ Hz, 1H, 15-H), 5.31 (brd, $J=6.5$ Hz, 1H, 7-H), 4.95 (dd, $J=1.5, 17.5$ Hz, 1H, 16-H), 4.88 (dd, $J=1.5, 10.5$ Hz, 1H, 16-H), 2.37 (s, 3H, Th-Me), 2.09 (dd, $J=3.5, 12.5$ Hz, 1H, 9-H), 1.95~1.84 (m, 5H), 1.73 (d, $J=13.0$ Hz, 2H), 1.60~1.53 (m, 4H), 1.48~1.30 (m, 4H), 1.26 (s, 3H, 19-Me), 0.87 (s, 3H, 17-Me), 0.82 (s, 3H, 20-Me); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 181.73, 179.96, 176.33, 150.30, 135.80, 128.06, 121.33, 112.52, 110.23, 51.45, 48.35, 46.05, 43.62, 37.14, 36.89, 36.03, 35.20, 34.90, 24.87, 21.76, 19.93, 18.17, 17.18, 15.53, 11.53 cm^{-1} . IR (KBr) ν : 3432, 1675, 1637, 1296, 1184. HR (TOF) MS calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{ONaS}_2$ 480.2119, found 480.2110.

3.2.2 异海松酰胺基(**4**)的合成

将溶有 3.3 mmol 化合物 **1** 缓慢滴加到含 0.18 mL (3 mmol) 水合肼、0.5 mL (3.6 mmol) 三乙胺和 10 mL 四氢呋喃的混合溶液中, 常温反应 2 h. 反应结束后, 过滤除去沉淀, 收集有机层, 减压蒸除溶剂, 得白色固体, 不经处理, 直接用于下一步反应.

3.2.3 *N*-异海松酰胺基氨基硫脲(**5**)的合成

将 0.36 g (3.6 mmol) KSCN 加入到上述合成化合物 **4** 和 30 mL 5% 的盐酸混合溶液中, 回流反应过夜. 反应结束, 过滤收集产生的固体. 粗品经无水乙醇重结晶两次, 得 0.72 g 白色针状结晶 **5**, 收率 64.1%. m.p. 208.4~209.5 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 9.16 (s, 1H, CSNH), 5.86 (dd, $J=10.5, 17.5$ Hz, 1H, H-15), 5.34 (brd, $J=6.5$ Hz, 1H, H-7), 4.98 (dd, $J=1.5, 17.5$ Hz, 1H, H-16), 4.91 (dd, $J=1.2, 11.0$ Hz, 1H, H-16), 1.97~1.85 (m, 4H), 1.80~1.72 (m, 2H), 1.57~1.34 (m, 8H), 1.23 (s, 3H, 19-Me), 1.14~0.97 (m, 2H), 0.89 (s, 3H, 17-Me), 0.86 (s, 3H, 20-Me); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 177.29,

177.25, 150.40, 135.21, 122.04, 110.16, 51.89, 46.08, 45.55, 45.41, 38.70, 36.98, 36.89, 35.99, 35.11, 24.51, 21.79, 19.97, 18.18, 17.53, 15.61; IR (KBr) ν : 3313, 3087, 1678, 1637, 1233, 1153 cm^{-1} . HR (TOF) MS calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{ONaS}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 398.2248, found 398.2242.

3.2.4 *N*-异海松酰胺基-*N'*-(4-取代苯基)硫脲(**6a**~**6b**)的合成

将 3.3 mmol 4-取代苯基异硫氰酸和 10 mL 乙腈滴加到上述合成的化合物 **4** 和 10 mL 无水乙腈的混合溶液溶液中, 回流反应 4 h. 减压蒸除溶剂, 粗品经层析柱提纯 [$V(\text{石油醚}) : V(\text{乙酸乙酯}) = 6 : 1$], 得化合物 **6a**~**6b**.

N-异海松酰胺基-*N'*-苯基硫脲(**6a**): 淡绿色固体, 收率 70.85%. m.p. 135.3~136.2 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 9.63 (s, 1H, CONH), 9.49 (s, 1H, NHCSNH), 9.16 (s, 1H, NHCSNH), 7.50 (d, $J=6.5$ Hz, 2H, PhH), 7.37 (t, $J=8.0$ Hz, 2H, PhH), 7.18 (t, $J=7.0$ Hz, 1H, PhH), 5.86 (dd, $J=10.5, 17.5$ Hz, H-15), 5.66 (s, 2H, PhH), 5.32 (brd, $J=4.5$ Hz, 1H, H-7), 4.98 (dd, $J=1.5, 17.5$ Hz, 1H, H-16), 4.91 (dd, $J=1.2, 11.0$ Hz, 1H, H-16), 1.97~1.88 (m, 5H), 1.83~1.74 (m, 5H), 1.62~1.47 (m, 4H), 1.32 (s, 3H, 19-Me), 1.23~1.10 (m, 2H), 0.90 (s, 3H, 17-Me), 0.86 (s, 3H, 20-Me); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 177.25, 177.12, 150.34, 139.64, 135.41, 135.17, 128.66, 125.04, 121.66, 110.15, 51.94, 46.02, 45.74, 45.53, 38.71, 36.88, 36.68, 35.97, 35.16, 24.77, 21.76, 19.98, 18.02, 17.49, 15.61; IR (KBr) ν : 3285, 3079, 1636, 1237, 1152 cm^{-1} . HR (TOF) MS calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{ONaS}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 474.2562, found 474.2555.

N-异海松酰胺基-*N'*-(4-氟苯基)硫脲(**6b**): 白色固体, 收率 72.63%. m.p. 112.3~113.9 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 10.79 (s, 1H, CONH), 10.26 (s, 1H, NHCSNH), 9.21 (s, 1H, NHCSNH), 7.44 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, PhH), 7.40 (d, $J=9.0$ Hz, 2H, PhH), 5.86 (dd, $J=11.0, 17.5$ Hz, 1H, H-15), 5.27 (brd, $J=5.0$ Hz, 1H, H-7), 5.00 (dd, $J=1.0, 17.5$ Hz, 1H, H-16), 4.94 (dd, $J=1.0, 11.0$ Hz, 1H, H-16), 2.03~1.75 (m, 7H), 1.67~1.60 (m, 7H), 1.45 (s, 3H, 19-Me), 1.33~1.29 (m, 2H), 0.93 (s, 3H, 17-Me), 0.86 (s, 3H, 20-Me); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 176.10, 173.04, 150.08, 136.23, 135.84, 131.93, 129.23, 126.73, 120.26, 109.40, 51.82, 46.20, 45.90, 45.83, 38.52, 37.39, 36.66, 35.77, 35.03, 24.86, 21.44, 19.86, 17.76, 16.50, 15.32; IR (KBr) ν : 3293, 3082, 1639, 1235, 1149 cm^{-1} . HR (TOF) MS calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{FN}_3\text{ONaS}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 492.2461, found 492.2471.

3.2.5 抑菌活性测试

采用二倍稀释法^[25]测定了目标化合物金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和白色念珠菌的抑菌活性。待测化合物溶解在 DMSO 中, 配制成浓度为 2000 $\mu\text{g/mL}$ 的母液备用。96 孔板每孔加入灭菌肉汤 75 μL , 在第 1 和第 2 孔中分别加入 75 μL 的母液, 混匀后从第 1 孔中取出 75 μL 弃去, 第 2 孔中吸取 75 μL 到第 3 孔, 混匀后再取 75 μL 到第 4 孔, 以此类推稀释至第 11 孔, 第 12 孔不加药物, 作为阴性对照。将对数生长期的供试菌株溶于无菌水中, 配制浓度约为 10^5 CFU/mL 的菌悬液。96 孔板中每孔加入 75 μL 菌悬液, 混匀后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 24 h。观察细菌生长情况, 以肉汤透明清亮代表无细菌生长, 肉汤浑浊代表有细菌生长, 将能抑制细菌生长的有效组分最高以菌种不生长的最低浓度为该样品对该菌种的最小抑菌浓度(MIC)。

3.2.6 抗癌活性测试

采用 MTT 法^[26]初步测定了目标化合物对 A375 和 PC-3 两种癌细胞的体外细胞毒活性进行了测试。待测化合物首先溶解在 DMSO 中, 配制成浓度为 100 mmol/L 的溶液, 再用培养液和 10% 的牛血清进行稀释, 得到待测化合物浓度分别为 10, 50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液待用(最终 DMSO 含量 $<1\%$)。将两种癌细胞经常规消化、计数, 配制成浓度为 4.5×10^4 个/mL 的细胞悬浮液, 然后接种到 96 孔板中(100 μL /孔), 置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% 的 CO_2 氛围中培养 24 h。再将上述配制好的不同浓度的待测化合物溶液加入到 96 孔板中(100 μL /孔), 同时设对照组, 每孔 3 个复孔。96 孔细胞培养板置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% 的 CO_2 氛围中培养 72 h 后, 每孔加入 20 μL (5 mg/mL) 溶液, 继续培养 4 h, 弃去上清液, 每孔加入 150 μL DMSO 溶解, 摇床震荡 10 min 混匀, 用酶标仪测定 490 nm 处的吸光值(OD)。根据如下公式计算样品的抑制率:

$$\text{抑制率}/\% = \frac{\text{阴性对照组OD值} - \text{实验值OD值}}{\text{阴性对照组OD值}} \times 100\%$$

辅助材料(Supporting Information) 化合物 3a~3l、5 和 6a~6b 化合物的氢谱、碳谱和高分辨质谱图。这些材料可以免费从本刊网站(<http://siocjournal.cn>)上下载。

References

- [1] Rabergh, C. M. I.; Lilius, H.; Eriksson, J. E.; Isomaa, B. *Aquat. Toxicol.* **1999**, *46*, 55.
- [2] Nikinmaa, M.; Wickström, C.; Lilius, H.; Isomaa, B.; Rabergh, C. *Environ. Toxicol. Chem.* **1999**, *18*, 993.
- [3] Henney, N. C.; Li, B.; Elford, C.; Campbell, A. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2009**, *297*, C1397.
- [4] Wu, C.; Gopal, K. V.; Lukas, T. J.; Gross, G. W.; Moore, E. J. *Eur. J. Pharmacology* **2014**, *732*, 68.
- [5] Wang, L.; Kang, H.-C.; Li, Y.-Z.; Shui, Y.; Yamamoto, R.; Sugai, T.; Kato, N. *Neuropharmacol.* **2015**, *92*, 8.
- [6] Sharma, S.; Nagar, V.; Mehta, B. K. *Fitoterapia* **1993**, *64*, 476.
- [7] Tanaka, R.; Tokuda, H.; Ezaki, Y. *Phytomedicine* **2008**, *15*, 985.
- [8] Chang, L. C.; Song, L. L.; Park, E. J.; Luyengi, L.; Lee, K. J.; Farnsworth, N. R.; Pezzuto, J. M.; Kinqhorn, A. D. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1235.
- [9] Adamczyk, S.; Adamczyk, B.; Kitunen, V.; Smolander, A. *Soil Biol. Biochem.* **2015**, *87*, 59.
- [10] Bisio, A.; Fraternali, D.; Damonte, G.; Millo, E.; Lanteri, A. P.; Russo, E.; Romussi, G.; Parodi, B.; Ricci, D.; De Tommasi, N. *Nat. Prod. Commun.* **2009**, *4*, 1621.
- [11] Elliger, C. A.; Zinkel, D. F.; Chan, B. G.; Waiss, A. C., Jr. *Experientia* **1976**, *32*, 1364.
- [12] Perez Gutierrez, R. M.; Garcia, B. E. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2011**, *13*, 934.
- [13] Cheng, S.-S.; Chang, S.-T. *Wood Sci. Technol.* **2014**, *48*, 831.
- [14] Xie, Y. S.; Isman, M. B.; Yi, F.; Wong, A. *J. Chem. Ecol.* **1993**, *19*, 1075.
- [15] Gong, Y.-X.; Wang, Z.-Y.; Zhang, Z.-W.; Chen, C.-B.; Wang, Y.-G. *Chin. J. Org. Chem.* **2006**, *26*, 360 (in Chinese). (龚银香, 王子云, 张正文, 陈传兵, 汪炎钢, 有机化学, **2006**, *26*, 360.)
- [16] Zou, X.-J.; Jin, G.-Y.; Yang, Z. *Chem. J. Chin. Univ.* **2002**, *23*, 403 (in Chinese). (邹霞娟, 金桂玉, 杨昭, 高等学校化学学报, **2002**, *23*, 403.)
- [17] Su, G.-F.; Huo, L.-N.; Qin, J.-K.; Pan, C.-X.; Guan, Y.-F. *Chin. J. Appl. Chem.* **2008**, *25*, 803 (in Chinese). (苏桂发, 霍丽妮, 覃江克, 潘成学, 关一富, 应用化学, **2008**, *25*, 803.)
- [18] Elkholy, S. S.; Salem, H. A.; Eweis, M.; Elsabee, M. Z. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, *70*, 199.
- [19] Plutín, A. M.; Moco, R.; Alvarez, A.; Ramos, R.; Castellano, E. E.; Cominetti, M. R.; Graminha, A. E.; Ferreira, A. G.; Batista, A. A. *J. Inorg. Biochem.* **2014**, *134*, 76.
- [20] Koca, İ.; Özgür, A.; Coşkun, K. A.; Tutar, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 3859.
- [21] Wang, Y.-G.; Lu, B.-X.; Ye, W.-F.; Zhao, X.-Y.; Yang, J. *Chin. J. Org. Chem.* **2002**, *22*, 862 (in Chinese). (汪焱钢, 卢冰熙, 叶文法, 赵新筠, 杨军, 有机化学, **2002**, *22*, 862.)
- [22] Su, G.-F.; Huo, L.-N.; Chen, R.; Zhao, F.-L.; Guan, Y.-F. *Acta Chim. Sinica* **2008**, *66*, 2717 (in Chinese). (苏桂发, 霍丽妮, 陈睿, 赵丰丽, 关一富, 化学学报, **2008**, *66*, 2717.)
- [23] Ulubelen, A.; Oksüz, S.; Topcu, G.; Gören, A. C.; Bozok-Johansson, C.; Celik, C.; Kökdil, G.; Voelter, W. *Nat. Pro. Lett.* **2001**, *15*, 307.
- [24] Zhao, Z.-D.; Li, X.-D.; Bi, L.-W.; Chen, Y.-X.; Gu, Y.; Li, D.-M.; Wang, J. J. *CN 101302151*, **2008** [*Chem. Abstr.* **2008**, *150*, 5919].
- [25] Hilliard, N. J.; Duffy, L. B.; Crabb, D. M.; Waites, K. B. *J. Microbiol. Methods* **2005**, *60*, 285.
- [26] Liu, Z.-J.; Wu, S.-S.; Wang, Y.; Li, R.-J.; Wang, J.; Wang, L.-H.; Zhao, Y.-F.; Gong, P. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *87*, 782.

(Zhao, X.)