天然 stilbene 导向的取代苯乙烯基噻唑化合物的合成和生物活性

章俊辉^a 朱亚波^a 翁建全^{*,a} 余茜^{*,b} 袁静^c 陈杰^{*,c}^(a) 浙江工业大学化学工程学院 杭州 310032)^(b) 广东药科大学临床药学院(整合药学院、整合药学研究院) 广州 510006)^(c) 浙江农林大学绿色农药协同创新中心 杭州 311300)

摘要 为了寻找新型结构的药物先导化合物, 基于天然 stilbenes 骨架结构, 将含氟苯基噻唑环结构与其相杂合, 设计合成了一系列新型取代苯乙烯基噻唑类化合物。所有目标化合物结构均经 ¹H NMR、¹³C NMR 和 ESI-HRMS 表征确证。离体真菌抑制活性结果表明, 在 100 mg/L 浓度下部分化合物对小麦赤霉病菌、玉米小斑病菌和黄瓜蔓枯病菌表现出中等抑制活性, 其中(*E*)-5-溴-4-(2,6-二氟苯基)-2-(4-三氟甲基苯乙烯基)噻唑(**6p**)对小麦赤霉病菌的抑制率达到 86.7%; 采用 Top1 介导的 DNA 松散实验测试了化合物对拓扑异构酶 I (Top1)的抑制活性, 结果表明在 50 μmol·L⁻¹ 浓度下, 所有化合物对 Top1 均表现出一定程度的抑制活性, 其中(*E*)-5-溴-4-(2,6-二氟苯基)-2-(2-氯苯基)噻唑(**6k**)的抑制活性较好, 其在 0.2 μmol·L⁻¹ 浓度下仍对 Top1 呈现出一定程度的抑制活性。

关键词 二苯乙烯; 苯乙烯基噻唑; 合成; 生物活性

Synthesis and Biological Activity of Natural Stilbene-Inspired Substituted Styrylthiazole Derivatives

Zhang, Junhui^a Zhu, Yabo^a Weng, Jianquan^{*,a} Yu, Qian^{*,b}Yuan, Jing^c Chen, Jie^{*,c}^(a) College of Chemical Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032)^(b) Clinical Pharmacy (School of Integrative Pharmacy, Institute of Integrative Pharmaceutical Research), Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006)^(c) Collaborative Innovation Center of Green Pesticide, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300)

Abstract In order to find novel drug leads, a series of natural stilbene-inspired substituted styrylthiazole derivatives were designed and synthesized by hybridization of the structures of both bioactive 2,6-difluorophenylthiazole moiety and stilbene. The structures of the title compounds were confirmed by ¹H NMR, ¹³C NMR and ESI-HRMS. The *in vitro* antifungal bioassay results indicated that some compounds showed moderate inhibition activity against *FusaHum graminearum*, *Helminthosporium maydis* and *Mycosphaerella melonis* at 100 μg/mL, and the inhibition rate of (*E*)-5-bromo-4-(2,6-difluorophenyl)-2-(4-trifluoromethylstyryl)thiazole (**6p**) against *FusaHum graminearum* reached 86.7%. These compounds were also screened for their topoisomerase I inhibitory activity using Top1-mediated relaxation assay. The results showed that all of them exhibited certain Top1 inhibitory activity at 50 μmol·L⁻¹, and amongst them (*E*)-5-bromo-4-(2,6-difluorophenyl)-2-(2-chlorostyryl)thiazole (**6k**) displayed promising Top1 inhibitory activity, which still remained certain activity at 0.2 μmol·L⁻¹.

Keywords stilbene; styrylthiazole; synthesis; biological activity

以天然产物为先导进行结构修饰与改造是创制新药物的重要途径之一^[1]。天然产物 stilbenes, 即二苯乙烯化合物, 是植物受到病虫害侵害或其他不利刺激时产生的应急产物, 在自然界中广泛存在。大量研究表明,

二苯乙烯及其衍生物具有广泛的抗癌^[2]、抗氧化^[3]、抗炎^[4]、抗白血病^[5]、抗血小板凝集^[6]和血管舒张^[7]等生物生理功能, 在医药、保健品等领域受到人们广泛关注, 其中白藜芦醇(Resveratrol)、紫檀芪(Pterostilbene)已具有

* Corresponding authors. E-mail: jqweng@zjut.edu.cn; yuxi024@163.com; chenjie@zafu.edu.cn

Received October 18, 2019; revised November 13, 2019; published online December 2, 2019.

Project supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No. LY17C140003).

浙江省自然科学基金(No. LY17C140003)资助项目。

很大的市场需求, 且与日剧增. 相对其医药活性而言, 二苯乙烯化合物的农药活性研究较少, 文献报道其具有杀虫^[8]、杀菌^[9]、杀线虫^[10]和抑藻^[11]等活性. 本课题组研究工作^[12]也表明, 部分 3,5-二甲氧基二苯乙烯化合物具有良好的杀蚊和抑菌活性. 鉴于其广谱的生物活性, 基于天然二苯乙烯骨架为先导进行生物活性结构的发展和优化越来越受到研究者的关注^[13,14].

含氮杂环化合物由于其类似生物体内生物碱结构, 具有对靶标专一性高、环境相容性好等特点, 已成为新药创制的主流研究领域. 作为一个经典的含氮杂环, 噻唑杂环及其衍生物已经被发现具有抗癌^[15]、镇痛^[16]、抗炎^[17]、抗菌^[18]、杀虫^[19]和除草^[20]等广谱的生物活性. 其中, 很多噻唑类化合物已在医药和农药等领域商品化应用, 比如消炎药物美洛昔康、抗癌药物达沙替尼、杀虫剂噻虫胺和杀菌剂苯噻菌胺等. 据文献^[21]报道以及本课题组^[22]研究结果表明, 一些 4-(2,6-二氟苯基)噻唑衍生物具有良好的抑菌和杀虫活性.

由上可知, 二苯乙烯类和噻唑类化合物均具有广泛的医药和农药活性. 为了继续寻找具有良好生物活性的新型杂环药物先导化合物, 本课题组在前期工作^[23~26]基础上, 利用活性亚结构杂合策略, 将二苯乙烯骨架中的一个苯环用 4-(2,6-二氟苯基)噻唑环替换, 设计合成了一系列未见报道的取代苯乙烯基噻唑类化合物(图 1), 同时测试了其抗菌活性和 Top1 抑制活性. 目标化合物的结构均经 ¹H NMR, ¹³C NMR 和 HRMS 表征确证, 合成路线如 Scheme 1 所示.

1 结果与讨论

1.1 合成与波谱

以 2,6-二氟苯乙酮为起始原料, 与溴化铜反应进行 α -溴化后, 再与硫代乙酰胺环合制得到 4-(2,6-二氟苯基)-2-甲基噻唑(2), 中间体 2 的噻唑环 5-位和苄位在不同的条件下相继被溴化得到 5-溴-2-(溴甲基)-4-(2,6-二

图 1 目标化合物的设计策略

Figure 1 Design strategy of title compounds

氟苯基)噻唑(4). 在中间体 4 的制备过程中, 由于 5-位反应活性高于苄位, 5-位优先被溴化, 因此难以通过单步苄位溴化反应得到单一苄位溴化的产物. 同时, 将中间体 2 与过量的 NBS 进行一锅法溴化反应, 仅仅得到少量的二溴中间体 4. 因此, 中间体 4 的制备采取分步溴化, 首先中间体 2 的 5-位首先通过亲核取代机理被 NBS 溴化, 随后得到的中间体 3 进一步在光照条件下与 NBS 发生苄位自由基溴化, 得到二溴中间体 4. 中间体 4 和亚磷酸三乙酯发生 Arbuzov 反应得到膦酸酯 5, 不经分离直接与取代苯甲醛在碱性条件下通过 Wittig-Horner 反应得到目标产物 6a~6p, 收率为 47.4%~66.3%. 目标化合物结构均经 ¹H NMR, ¹³C NMR 和 ESI-HRMS 表征确证. 从 ¹H NMR 数据可以看出, 与噻唑环相连的烯烃 CH 化学位移为 δ 7.14~7.37, 而与苯环相连的烯烃 CH 化学位移出现为 δ 7.31~7.74, 均呈现双重峰, 其偶合常数 $J=16.00$ Hz 或 16.50 Hz, 说明了目标化合物中烯烃双键为 *E* 构型^[12]. 在 ESI-HRMS 图谱中可以看出, 所有目标化合物均显示出了较强的 $[M+H]^+$ 峰.

1.2 目标化合物的杀菌活性

采用含药马铃薯琼脂培养基(PDA)法测试了目标化

图式 1 目标化合物的合成路线

Scheme 1 Synthetic route of title compounds

合物对小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*), 玉米小斑病菌(*Helminthosporium maydis*), 黄瓜蔓枯病菌(*Mycosphaerella melonis*)和水稻纹枯病菌(*Thanatephorus cucumeris*)四种菌体的抑制活性, 药剂质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$. 以咪菌酯(Azoxystrobin)为对照药剂, 以无菌水为空白对照(CK), 测试结果见表 1.

初步杀菌活性测试结果表明, 大部分目标化合物在 100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下对小麦赤霉病菌、玉米小斑病菌和黄瓜蔓枯病菌均呈现出一定的抑制活性, 但对水稻纹枯病菌基本没有抑制活性. 在 100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下, 部分化合物表现出中等及以上抑制活性, 如化合物 **6a**、**6j**、**6k**、**6l**、**6m**、**6n** 和 **6p** 对小麦赤霉病菌的抑制率均超过 50%, 其中 **6j**、**6k** 和 **6p** 的抑制率分别为 67.6%、71.6% 和 86.7%, 且总体上当在苯环上引入吸电子基团(如卤素或三氟甲基)时, 化合物活性比在苯环上引入供电子基团(如烷基或甲氧(硫)基)时要好. 测试了化合物 **6j**、**6k** 和 **6p** 在 20 和 4 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下对小麦赤霉病菌的抑制活性, 发现其抑制活性随浓度降低而下降较快, 在 20 $\mu\text{g/mL}$ 时其活性基本消失. 此外, 在 100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下化合物 **6e**、**6g**

和 **6o** 对玉米小斑病菌的抑制率均超过 50%, 其中 **6o** 的抑制率为 66.2%, 化合物 **6d**、**6f** 和 **6p** 对黄瓜蔓枯病菌的抑制率也超过 50%, 其活性与结构之间未表现出明显规律性.

1.3 目标化合物的 Top1 抑制活性

DNA 拓扑异构酶(topoisomerase)是抗肿瘤药物的主要靶点. 本实验以拓扑异构酶 I (Top1)作靶标酶, 采用 DNA 松散实验测试了 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下目标化合物 **6a**~**6p** 对 Top1 的抑制活性, 以喜树碱(CPT)为阳性对照药剂. 所得数据相对于 CPT 抑制活性, 半定量表达如下: +++表示 80%以上的活性; ++表示 40%~79%; +表示 10%~39%; 表示小于 10%的活性. 每个实验至少重复两次. 测试结果见表 2. 从表中可以看出, 在 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下, 所有化合物对 Top1 均表现出一定程度的抑制活性, 其中化合物 **6c**、**6e**、**6j**、**6l**、**6m**、**6n** 和 **6p** 的抑制活性为++, 化合物 **6k** 的抑制活性显示为+++. 选取活性较好的化合物 **6k** ($R=2\text{-Cl}$)进行了 125~0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度梯度的活性测试, 结果

表 1 目标化合物 **6a**~**6p** 的杀菌活性(抑制率/%)^a
Table 1 Antifungal activities of compounds **6a**~**6p** (inhibition rate/%)

Compd.	R	小麦赤霉病菌			玉米小斑病菌			黄瓜蔓枯病菌	水稻纹枯病菌
		100 $\mu\text{g/mL}$	20 $\mu\text{g/mL}$	4 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$
6a	H	51.2	—	—	48.3	30.6	11.0		
6b	2-CH ₃	43.6	—	—	19.2	19.8	0.0		
6c	3-CH ₃	27.3	—	—	25.7	21.1	6.8		
6d	4-CH ₃	20.0	—	—	5.6	57.2	13.4		
6e	4- <i>tert</i> -C ₄ H ₉	19.7	—	—	58.1	41.8	7.8		
6f	2-OCH ₃	35.4	—	—	12.2	50.7	9.3		
6g	3-OCH ₃	11.9	—	—	63.5	17.6	8.7		
6h	4-OCH ₃	33.5	—	—	20.3	25.6	12.5		
6i	4-SCH ₃	27.0	—	—	30.0	20.0	0.0		
6j	4-F	67.6	0	0	28.1	22.4	10.9		
6k	2-Cl	71.6	16.7	0	13.6	42.3	14.6		
6l	4-Cl	51.1	—	—	38.4	34.9	14.0		
6m	2,4-Cl ₂	58.3	—	—	0.0	39.7	0.0		
6n	2-Br	52.9	—	—	40.7	27.5	0.0		
6o	3-Br	48.1	—	—	66.2	23.7	10.4		
6p	4-CF ₃	86.7	21.6	0	32.1	56.7	18.7		
Control	Azoxystrobin	94.4	87.0	45.4	79.2	91.7	90.0		
CK	Water		0		0.0	0	0.0		

^a — refers to "not tested".

表 2 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下化合物 **6a**~**6p** 的 Top1 抑制活性
Table 2 Top1 inhibitory activities of compounds **6a**~**6p** at 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

Compd.	Relaxation assay	Compd.	Relaxation assay	Compd.	Relaxation assay	Compd.	Relaxation assay
6a	+	6e	++	6i	+	6m	++
6b	+	6f	+	6j	++	6n	++
6c	++	6g	+	6k	+++	6o	+
6d	+	6h	+	6l	++	6p	++

见图 2。从图中可以看出, 化合物 **6k** 对 Top1 的抑制作用呈现剂量依赖性, 浓度越低抑制活性越差, 但当测试浓度降至 $0.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时仍呈现出一定程度的抑制活性。

图 2 125~0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度梯度下化合物 **6k** 抑制 Top1 介导的 DNA 松散实验

Figure 2 Top1-mediated relaxation assay of compound **6k** at 125~0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

Lane 1, pBR322 DNA alone; Lane 2, pBR322 DNA and Top1 without compound; Lanes 3~7, pBR322 DNA, Top1 and compounds at 0.2, 1, 5, 25, 125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. R, relaxed DNA; Sc, supercoiled DNA

2 结论

基于天然 stilbenes 骨架结构, 采用活性亚结构杂合策略将其与含氟苯基噻唑环结构相杂合, 设计合成了 16 个未见文献报道的新型取代苯乙烯基噻唑类化合物。目标化合物结构均经 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 和 ESI-HRMS 确证。初步生物活性测试结果表明, 在 100 mg/L 浓度下部分化合物对若干病原真菌表现出中等抑制活性, 其中化合物 **6p** 对小麦赤霉病菌的抑制率为 86.7%; 同时, 所有化合物在 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下均具有一定的 Top1 抑制活性, 其中化合物 **6k** 在 $0.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下仍呈现出一定程度的 Top1 抑制活性, 结果表明上述新型取代苯乙烯基噻唑结构具有进一步优化的潜在价值。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

Bruker AVANCE III 500 MHz 核磁共振仪(以 CDCl_3 为溶剂, TMS 为内标), Shimadzu LCMS-IT-TOF 质谱仪 (ESI), X-4 型数字显示熔点测定仪(温度计未校正)。本实验所用试剂均为市售分析纯。中间体 2-溴-1-(2,6-二氟苯基)乙酮(**1**)参照文献[27]合成, 收率 92.6%; 中间体 4-(2,6-二氟苯基)-2-甲基噻唑(**2**)参照文献[28]合成, 收率 90.9%。

3.2 化合物的合成

3.2.1 5-溴-4-(2,6-二氟苯基)-2-甲基噻唑(**3**)的合成

将 4-(2,6-二氟苯基)-2-甲基噻唑(**2**) (2.11 g, 10 mmol)和 *N*-溴代丁二酰亚胺(NBS) (1.96 g, 11 mmol)溶于 20 mL 乙酸乙酯中, 然后加热至回流反应 3 h。冷却至室温, 水洗, 有机相干燥, 减压脱溶, 所得固体用无水

乙醇重结晶得到黄色固体 5-溴-4-(2,6-二氟苯基)-2-甲基噻唑(**3**) 2.44 g, 收率 84.0%。m.p. 71~72 °C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.46~7.33 (m, 1H), 7.00 (t, $J=7.50$ Hz, 2H), 2.73 (s, 3H)。其熔点及核磁数据与文献[28]值一致。

3.2.2 中间体 5-溴-2-(溴甲基)-4-(2,6-二氟苯基)噻唑(**4**)的合成

将中间体 **3** (2.90 g, 10 mmol)和 NBS (1.96 g, 11 mmol)溶于 20 mL 乙腈中, 15 W LED 灯(波长 $\lambda=450\sim465$ nm)照射下常温搅拌反应。薄层色谱(TLC)检测反应进程, 约 4 h 后反应完毕。加入 50 mL 乙酸乙酯, 依次用饱和碳酸氢钠和水洗涤, 有机相干燥, 减压脱溶, 所得固体用无水乙醇重结晶得到黄色固体 5-溴-2-(溴甲基)-4-(2,6-二氟苯基)噻唑(**4**) 2.81 g, 收率 76.1%。m.p. 85~86 °C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.48~7.34 (m, 1H), 7.02 (dd, $J=8.50, 7.50$ Hz, 2H), 4.72 (s, 2H)。其熔点及核磁数据与文献值[28]一致。

3.2.5 二乙基((4-(2,6-二氟苯基)噻唑-2-基)甲基)膦酸酯(**5**)的合成

将中间体 **4** (3.70 g, 10 mmol)和亚磷酸三乙酯(3.34 g, 20 mmol)溶于 20 mL 甲苯中, 加热至回流反应 2 h。反应结束, 减压脱去溶剂及过量亚磷酸三乙酯, 得到深棕色油状液体, 即中间体膦酸酯 **5** 粗品, 不经提纯直接进入下一步反应。

3.2.6 目标化合物(*E*)-5-溴-4-(2,6-二氟苯基)-2-取代苯乙烯基噻唑(**6**)的合成

将上步所得膦酸酯 **5**、取代苯甲醛(12 mmol)和 NaOH (0.48 g, 12 mmol)溶于 20 mL DMF 中, 室温下搅拌反应, TLC 检测反应过程。反应结束, 加入 50 mL 水, 继续搅拌 30 min, 然后用 CHCl_3 萃取(30 mL $\times$ 3), 有机层合并, 无水硫酸钠干燥、过滤、减压脱溶, 残余物用柱层析[*V*(石油醚):*V*(乙酸乙酯)=5:1]纯化得到目标化合物 **6a~6p**。

(*E*)-5-溴-4-(2,6-二氟苯基)-2-苯乙烯基噻唑(**6a**): 黄色固体, 收率 53.2%。m.p. 103~105 °C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.54 (d, $J=7.50$ Hz, 2H), 7.49~7.33 (m, 5H), 7.27 (d, $J=16.50$ Hz, 1H), 7.09~7.00 (m, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 167.2, 160.7 (dd, $J=250.00, 6.25$ Hz), 144.3, 135.5, 135.3, 131.1 (t, $J=10.00$ Hz), 129.3, 128.9, 127.2, 121.1, 111.7 (dd, $J=20.00, 5.00$ Hz), 111.2 (t, $J=18.75$ Hz), 109.0。HRMS (ESI) calcd $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{BrF}_2\text{NS}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 377.9765, found 377.9759。

(*E*)-5-溴-4-(2,6-二氟苯基)-2-(2-甲基苯乙烯基)噻唑(**6b**): 黄色固体, 收率 49.7%。m.p. 128~130 °C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.64~7.58 (m, 2H), 7.43 (m,

1H), 7.30~7.16 (m, 4H), 7.08~7.01 (m, 2H), 2.47 (s, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 167.5, 160.7 (dd, $J=250.00$, 6.25 Hz), 144.3, 136.7, 134.3, 133.3, 131.1 (t, $J=10.00$ Hz), 130.8, 129.1, 125.5, 124.8, 122.3, 111.7 (dd, $J=20.00$, 5.00 Hz), 111.1 (t, $J=20.00$ Hz), 108.9, 19.9. HRMS (ESI) calcd $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{BrF}_2\text{NS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 391.9915, found 391.9912.

(*E*)-5-溴-4-(2,6-二氟苯基)-2-(3-甲基苯乙烯基)噻唑 (**6c**): 黄色固体, 收率 65.3%. m.p. 68~70 °C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.47~7.39 (m, 1H), 7.37~7.32 (m, 3H), 7.31~7.24 (m, 2H), 7.17 (d, $J=7.50$ Hz, 1H), 7.04 (dd, $J=8.50$, 7.5 Hz, 2H), 2.39 (s, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 167.2, 160.7 (dd, $J=250.00$, 6.25 Hz), 144.2, 138.5, 135.6, 135.2, 131.0 (t, $J=10.00$ Hz), 130.1, 128.8, 127.9, 124.3, 120.8, 111.6 (dd, $J=20.00$, 5.00 Hz), 111.1 (t, $J=20.00$ Hz), 108.8, 21.3. HRMS (ESI) calcd $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{BrF}_2\text{NS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 391.9915, found 391.9928.

(*E*)-5-溴-4-(2,6-二氟苯基)-2-(4-甲基苯乙烯基)噻唑 (**6d**): 黄色固体, 收率 63.4%. m.p. 144~146 °C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.46 (d, $J=8.00$ Hz, 2H), 7.44 (d, $J=16.50$ Hz, 1H), 7.37 (d, $J=16.50$ Hz, 1H), 7.35~7.31 (m, 1H), 7.21 (d, $J=8.00$ Hz, 2H), 7.02 (t, $J=8.00$ Hz, 2H), 2.39 (s, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 166.7, 160.6 (dd, $J=250.00$, 6.25 Hz), 144.1, 139.2, 134.9, 132.9, 129.7, 129.6, 129.6, 127.1, 120.6, 118.9 (t, $J=2.50$ Hz), 112.8 (t, $J=17.50$ Hz), 111.8 (dd, $J=21.25$, 5.00 Hz). HRMS (ESI) calcd $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{BrF}_2\text{NS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 391.9915, found 391.9941.

(*E*)-5-溴-4-(2,6-二氟苯基)-2-(4-叔丁基苯乙烯基)噻唑 (**6e**): 黄色液体, 收率 60.1%. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.48 (d, $J=8.50$ Hz, 2H), 7.44~7.39 (m, 3H), 7.35 (d, $J=16.50$ Hz, 1H), 7.25 (d, $J=16.50$ Hz, 1H), 7.08~7.01 (t, $J=8.50$ Hz, 2H), 1.35 (s, 9H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 167.4, 160.7 (dd, $J=250.00$, 6.25 Hz), 152.7, 144.2, 135.4, 132.5, 131.0 (t, $J=10.00$ Hz), 127.0, 125.9, 120.3, 111.7 (dd, $J=20.00$, 5.00 Hz), 111.2 (t, $J=18.90$ Hz), 108.6, 34.8, 31.2. HRMS (ESI) calcd $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{BrF}_2\text{NS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 434.0384, found 434.0411.

(*E*)-5-溴-4-(2,6-二氟苯基)-2-(2-甲氧基苯乙烯基)噻唑 (**6f**): 黄色液体, 收率 53.6%. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.42 (m, 1H), 7.36~7.28 (m, 2H), 7.26 (d, $J=16.50$ Hz, 1H), 7.12 (d, $J=8.00$ Hz, 1H), 7.09~7.00 (m, 3H), 6.91 (dd, $J=8.00$, 2.50 Hz, 1H), 3.83 (s, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 167.0, 160.7 (dd, $J=250.00$, 6.25 Hz), 159.9, 144.3, 136.6, 135.3, 131.0 (t, $J=10.00$

Hz), 129.9, 121.3, 119.9, 115.2, 112.0, 111.6 (dd, $J=20.00$, 5.00 Hz), 111.1 (t, $J=20.00$ Hz), 109.0, 55.2. HRMS (ESI) calcd $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{BrF}_2\text{NOS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 407.9864, found 407.9869.

(*E*)-5-溴-4-(2,6-二氟苯基)-2-(3-甲氧基苯乙烯基)噻唑 (**6g**): 黄色液体, 收率 47.4%. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.47~7.39 (m, 1H), 7.36~7.29 (m, 2H), 7.26 (d, $J=16.00$ Hz, 1H), 7.13 (d, $J=7.50$ Hz, 1H), 7.09~7.01 (m, 3H), 6.91 (dd, $J=8.00$, 2.50 Hz, 1H), 3.84 (s, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 166.3, 160.4 (dd, $J=300.00$, 6.30 Hz), 144.1, 137.0, 134.8, 129.9, 129.8, 129.7, 129.6, 121.7, 119.9, 119.2, 115.0, 112.6 (t, $J=17.50$ Hz), 111.8 (dt, $J=21.00$, 6.30 Hz), 55.2. HRMS (ESI) calcd $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{BrF}_2\text{NOS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 407.9864, found 407.9867.

(*E*)-5-溴-4-(2,6-二氟苯基)-2-(4-甲氧基苯乙烯基)噻唑 (**6h**): 黄色固体, 收率 66.3%. m.p. 102~103 °C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.48 (d, $J=9.00$ Hz, 2H), 7.43 (m, 1H), 7.31 (d, $J=16.00$ Hz, 1H), 7.14 (d, $J=16.00$ Hz, 1H), 7.07~7.00 (m, 2H), 6.93 (d, $J=8.50$ Hz, 2H), 3.85 (s, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 166.9, 160.6 (dd, $J=250.0$, 6.25 Hz), 160.4, 144.0, 134.6, 129.6 (t, $J=10.00$ Hz), 128.6, 128.4, 119.5, 118.6, 114.3, 112.9 (t, $J=17.50$ Hz), 111.8 (dd, $J=21.25$, 6.25 Hz), 55.3. HRMS (ESI) calcd $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{BrF}_2\text{NOS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 407.9864 found. 445.9884.

(*E*)-5-溴-4-(2,6-二氟苯基)-2-(4-硫甲基苯乙烯基)噻唑 (**6i**): 黄色固体, 收率 60.1%. m.p. 102~104 °C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.49~7.38 (m, 3H), 7.31 (d, $J=16.00$ Hz, 1H), 7.28~7.16 (m, 3H), 7.04 (dd, $J=8.50$, 7.50 Hz, 2H), 2.52 (s, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 167.2, 160.7 (dd, $J=250.00$, 6.25 Hz), 144.3, 140.5, 134.8, 132.0, 131.1 (t, $J=10.00$ Hz), 127.5, 126.3, 120.2, 111.7 (dd, $J=20.00$, 5.00 Hz), 111.2 (t, $J=20.00$ Hz), 108.8, 15.3. HRMS (ESI) calcd $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{BrF}_2\text{NS}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 423.9635, found 423.9636.

(*E*)-5-溴-4-(2,6-二氟苯基)-2-(4-氟苯乙烯基)噻唑 (**6j**): 黄色固体, 收率 57.3%. m.p. 105~106 °C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.51 (dd, $J=8.50$, 5.50 Hz, 2H), 7.43 (m, 1H), 7.33 (d, $J=16.00$ Hz, 1H), 7.18 (d, $J=16.00$ Hz, 1H), 7.09 (t, $J=8.50$ Hz, 2H), 7.04 (t, $J=8.50$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 166.9, 163.3 (d, $J=251.25$ Hz), 160.7 (dd, $J=250.00$, 6.25 Hz), 144.4, 134.1, 131.6 (d, $J=3.75$ Hz), 131.1 (t, $J=11.25$ Hz), 129.0, 128.9, 120.8 (d, $J=2.50$ Hz), 116.1, 116.0, 111.7 (dd, $J=20.00$, 5.00 Hz), 111.1 (t, $J=20.00$ Hz), 109.0.

HRMS (ESI) calcd $C_{17}H_{10}BrF_3NS$ $[M+H]^+$ 395.9664, found 395.9688.

(*E*)-5-溴-4-(2,6-二氟苯基)-2-(2-氯苯乙烯基)噻唑(**6k**): 黄色固体, 收率 60.3%. m.p. 145~147 °C; 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.74 (d, $J=16.00$ Hz, 1H), 7.70~7.64 (m, 1H), 7.48~7.38 (m, 2H), 7.33~7.24 (m, 3H), 7.11~6.98 (m, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 166.9, 160.7 (dd, $J=250.00$, 6.25 Hz), 144.5, 134.1, 133.5, 131.4, 131.1 (t, $J=10.00$ Hz), 130.1, 127.2, 126.9, 123.7, 111.7 (dd, $J=20.00$, 5.00 Hz), 111.1 (t, $J=18.75$ Hz), 109.7. HRMS (ESI) calcd $C_{17}H_{10}BrClF_2NS$ $[M+H]^+$ 411.9368, found 411.9380.

(*E*)-5-溴-4-(2,6-二氟苯基)-2-(4-氯苯乙烯基)噻唑(**6l**): 黄色固体, 收率 55.1%. m.p. 117~119 °C; 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.46 (d, $J=8.50$ Hz, 2H), 7.43~7.40 (m, 1H), 7.36 (d, $J=8.50$ Hz, 2H), 7.32 (d, $J=16.00$ Hz, 1H), 7.22 (d, $J=16.00$ Hz, 1H), 7.04 (m, $J=8.50$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 166.6, 160.7 (dd, $J=250.00$, 6.25 Hz), 144.5, 135.0, 133.9, 133.8, 131.2 (t, $J=10.00$ Hz), 129.2, 128.3, 121.5, 111.7 (dd, $J=20.00$, 5.00 Hz), 111.1 (t, $J=18.75$ Hz), 109.3. HRMS (ESI) calcd $C_{17}H_{10}BrClF_2NS$ $[M+H]^+$ 411.9368, found 411.9384.

(*E*)-5-溴-4-(2,6-二氟苯基)-2-(2,4-二氯苯乙烯基)噻唑(**6m**): 黄色固体, 收率 59.3%. m.p. 99~100 °C; 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.66 (d, $J=16.50$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J=8.50$ Hz, 1H), 7.46~7.41 (m, 2H), 7.30~7.28 (m, 1H), 7.25 (d, $J=16.50$ Hz, 1H), 7.04 (t, $J=8.50$, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 165.7, 160.6 (dd, $J=250.00$, 6.25 Hz), 144.5, 134.9, 134.4, 132.5, 129.8 (t, $J=8.80$ Hz), 129.5, 127.6, 127.5, 124.5, 119.9 (t, $J=3.75$ Hz), 112.6 (t, $J=17.50$ Hz), 111.9 (dd, $J=20.00$, 5.00 Hz). HRMS (ESI) calcd $C_{17}H_9BrCl_2F_2NS$ $[M+H]^+$ 445.8986, found 445.8981.

(*E*)-5-溴-4-(2,6-二氟苯基)-2-(2-溴苯乙烯基)噻唑(**6n**): 黄色固体, 收率 51.9%. m.p. 141~143 °C; 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.70 (d, $J=16.00$ Hz, 1H), 7.66 (dd, $J=8.00$, 1.50 Hz, 1H), 7.62 (dd, $J=8.00$, 1.00 Hz, 1H), 7.43 (m, 1H), 7.35 (t, $J=7.50$ Hz, 1H), 7.27~7.17 (m, 2H), 7.04 (dd, $J=8.50$, 7.50 Hz, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 166.8, 160.7 (dd, $J=250.00$, 6.25 Hz), 144.5, 135.2, 134.0, 133.4, 131.1 (t, $J=10.00$ Hz), 130.3, 127.8, 127.1, 124.6, 123.9, 111.7 (dd, $J=20.00$, 5.00 Hz), 111.1 (t, $J=18.75$ Hz), 109.7. HRMS (ESI) calcd $C_{17}H_{10}Br_2F_2NS$ $[M+H]^+$ 455.8863, found 455.8855.

(*E*)-5-溴-4-(2,6-二氟苯基)噻唑-2-(3-溴苯乙烯基)噻唑(**6o**): 黄色固体, 收率 47.9%. m.p. 85~87 °C; 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.68 (t, $J=2.00$ Hz, 1H), 7.51~7.39 (m, 3H), 7.33~7.20 (m, 3H), 7.04 (dd, $J=8.50$, 7.50 Hz, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 166.3, 160.7 (dd, $J=250.00$, 6.25 Hz), 144.6, 137.5, 133.6, 132.0, 131.2 (t, $J=10.00$ Hz), 130.4, 130.0, 125.7, 123.1, 122.2, 111.7 (dd, $J=20.00$, 5.00 Hz), 111.0 (t, $J=18.75$ Hz), 109.6. HRMS (ESI) calcd $C_{17}H_{10}Br_2F_2NS$ $[M+H]^+$ 455.8863, found 455.8873.

(*E*)-5-溴-4-(2,6-二氟苯基)-2-(4-三氟甲基苯乙烯基)噻唑(**6p**): 黄色固体, 收率 65.3%. m.p. 89~91 °C; 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.70~7.59 (dd, $J=8.50$, 5.00 Hz, 4H), 7.44 (m, 1H), 7.39 (d, $J=16.50$ Hz, 1H), 7.33 (d, $J=16.50$ Hz, 1H), 7.09~7.01 (m, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 165.4, 160.6 (dd, $J=250.00$, 6.25 Hz), 144.6, 139.1, 132.9, 130.5 (d, $J=32.50$ Hz), 129.9 (t, $J=11.25$ Hz), 127.2, 125.8 (q, $J=2.50$ Hz), 123.7, 122.9, 119.9 (t, $J=2.50$ Hz), 112.6 (t, $J=16.25$ Hz), 111.9 (dd, $J=20.00$, 5.00 Hz). HRMS (ESI) calcd $C_{18}H_{10}BrF_5NS$ $[M+H]^+$ 445.9632, found 445.9643.

3.3 杀菌活性测试

杀菌活性采用含药培养基法^[29]测试: 取各 500 mg/L 化合物药液 2 mL, 加入冷却至 45 °C 的 8 mL 的 PDA 中, 制成终浓度为 100 mg/L 的含药培养基平板. 以噻菌酯(Azoxystrobin)为对照药剂, 以无菌水为空白对照(CK). 然后从培养好的试验病菌菌落边缘取 4 mm 直径菌丝块, 移至含药培养基上, 每处理 3 次重复. 处理完毕, 置于(24±1) °C 的恒温生化培养箱中培养, 72 h 后测量菌落直径, 计算生长抑制率. 计算公式如下:

$$\text{生长抑制率(\%)} = \frac{[\text{空白对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}]}{\text{空白对照菌落直径}} \times 100\%$$

3.4 Top1 抑制活性测试

采用 DNA 松散实验测试了 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下化合物对 Top1 的抑制活性, 以喜树碱(CPT)为阳性对照药剂. 对活性较好的化合物进行了 125~0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度梯度的活性测试. 具体实验过程如下:

3.4.1 初筛

反应系统(20 μL): 0.2 μg 负超螺旋型质粒 pBR322 DNA 1 μL , 0.5 U 的 Top1 1 μL , 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 待测化合物 1 μL , 缓冲溶液(20 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ Tris, pH 7.5, 0.1 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, 10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 100 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, 50 $\mu\text{g/mL}$ acetylated BSA)补足体积. 配置好样品后, 在 37 °C 下孵育 0.5 h. 孵育完毕后加入 4 μL 6 $\times$ Loading

buffer 混合, 加入 0.8% 琼脂糖凝胶的样品孔中, 4.6 V/cm 电泳 1.5 h. 电泳结束后, 将琼脂糖凝胶放入 1×gel red 的水溶液中染色 0.5 h, 照相.

3.4.2 浓度梯度

初筛活性较优的化合物分别配制成 0.2, 1, 5, 25, 125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的待测化合物. 反应系统(20 μL): 0.5 μg 负超螺旋型质粒 pBR322 DNA 1 μL , 1 U 的 Top1 1 μL , 0.2, 1, 5, 25, 125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 待测化合物 1 μL , 缓冲溶液(20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris, pH 7.5, 0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ acetylated BSA) 补足体积. 后续操作同初筛.

辅助材料(Supporting Information) 化合物 6a~6p 的 ^1H NMR, ^{13}C NMR 和 ESI-HRMS 谱图. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn>)上下载.

References

- [1] Crouse, G. D. *CHEMTECH* **1998**, 28, 36.
- [2] Rimando, A. M.; Cuendet, M.; Desmarchelier, C.; Mehta, R. G.; Pezzuto, J. M.; Duke, S. O. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 3453.
- [3] Stivala, L. A.; Savio, M.; Carafoli, F.; Perucca, P.; Bianchi, L.; Maga, G.; Forti, L.; Pagnoni, U. M.; Albin, A.; Prosperi, E.; Vannini, V. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 22586.
- [4] Kimura, Y.; Okuda, H.; Arichi, S. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 834, 275.
- [5] Mannila, E.; Talvitie, A.; Kolehmainen, E. *Phytochemistry* **1993**, 33, 813.
- [6] Chung, M.-I.; Teng, C.-M.; Cheng, K.-L.; Ko, F.-N.; Lin, C.-N. *Planta Med.* **1992**, 58, 274.
- [7] Inamori, Y.; Kubo, M.; Tsujibo, H.; Ogawa, M.; Saito, Y.; Miki, Y.; Takemura, S. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1987**, 35, 887.
- [8] Kronenwerth, M.; Dauth, C.; Kaiser, M.; Pemberton, I.; Bode, H. B. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 36, 8026.
- [9] Shi, D.; An, R.; Zhang, W.-B.; Zhang, G.-L.; Yu, Z.-G. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, 65, 60.
- [10] Hu, K.-J.; Li, J.-X.; Webster, J. M. *Nematology* **1999**, 1, 457.
- [11] Mizuno, C. S.; Schrader, K. K.; Rimando, A. M. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 9140.
- [12] Weng, J.-Q.; Ali, A.; Estep, A.; Becnel, J.; Meyer, S. L. F.; Wedge, D. E.; Jacob, M.; Rimando, A. M. *Chem. Biodiversity* **2016**, 13, 1165.
- [13] Yan, J.; Guo, Y.-Y.; Wang, Y.-L.; Mao, F.; Huang, L.; Li, X.-S. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 95, 220.
- [14] Sang, K. L.; Park, E. J.; Lee, E. J.; Min, H. Y.; Kim, E. Y.; Lee, T. H.; Kim, S. H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 2105.
- [15] Mabkhot, Y. N.; Alharbi, M. M.; Al-Showiman, S. S.; Ghabbour, H. A.; Kheder, N. A.; Soliman, S. M.; Frey, W. *Chem. Cent. J.* **2018**, 12, 56.
- [16] Pember, S. O.; Mejia, G. L.; Price, T. J.; Pasteris, R. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, 26, 2965.
- [17] Kouatly, O.; Geronikaki, A.; Kamoutsis, C.; Hadjipavlou-Litina, D.; Eleftheriou, P. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, 44, 1198.
- [18] Ruan, L.-L.; Fan, R.-J.; Liu, X.-H.; Chen, J.; Weng, J.-Q. *Chin. J. Org. Chem.* **2015**, 35, 1166 (in Chinese).
(阮铃莉, 范人杰, 刘幸海, 陈杰, 翁建全, 有机化学, **2015**, 35, 1166.)
- [19] Yu, H.-B.; Qin, Z.-F.; Dai, H.; Zhang, X.; Qin, X.; Wang, T.-T.; Fang, J.-X. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, 56, 11356.
- [20] Wang, H.-L.; Ruan, L.-L.; Chen, Y.; Liu, X.-H.; Weng, J.-Q. *Chin. J. Org. Chem.* **2014**, 34, 419 (in Chinese).
(王海林, 阮铃莉, 陈勇, 刘幸海, 翁建全, 有机化学, **2014**, 34, 419.)
- [21] Yasushi, S.; Renpei, H.; Takao, I.; Daisuke, H. *WO 2004035554*, **2004** [*Chem. Abstr.* **2004**, 140, 357330].
- [22] Yang, P.; Weng, J.-Q.; Tan, C.-X.; Wang, X.-L. *Chin. J. Org. Chem.* **2009**, 29, 2000 (in Chinese).
(杨鹏, 翁建全, 谭成侠, 王秀莲, 有机化学, **2009**, 29, 2000.)
- [23] Wang, Z.-Y.; Xu, H.-J.; Zhao, J.-P.; Liu, X.-H.; Weng, J.-Q. *Chin. J. Org. Chem.* **2018**, 38, 3112 (in Chinese).
(汪洲洋, 徐涵靖, 赵建平, 刘幸海, 翁建全, 有机化学, **2018**, 38, 3112.)
- [24] Li, Q.-M.; Pang, K.-S.; Zhao, J.-P.; Liu, X.-H.; Weng, J.-Q. *Chin. J. Org. Chem.* **2017**, 37, 1009 (in Chinese).
(李倩梅, 庞凯胜, 赵建平, 刘幸海, 翁建全, 有机化学, **2017**, 37, 1009.)
- [25] Weng, J.-Q.; Tan, C.-X.; Liu, X.-H. *J. Pestic. Sci.* **2012**, 37, 164.
- [26] Weng, J.-Q.; Liu, X.-H.; Huang, H.; Tan, C.-X.; Chen, J. *Molecules* **2012**, 17, 989.
- [27] Dou, D.-F.; He, G.-J.; Li, Y.; Lai, Z.; Wei, L.-Q.; Alliston, K. R.; Lushington, G. H.; Eichhorn, D. M.; Groutas, W. C. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 1093.
- [28] Lu, Q.; Yu, Q.; Zhu, Y.-B.; Weng, J.-Q.; Yuan, J.; Hu, D.-X.; Chen, J.; Liu, X.-H.; Tan, C.-X. *J. Mol. Struct.* **2019**, 1180, 780.
- [29] Xu, M.; Zhu, Y.-B.; Wang, M.; Khan, I. A.; Liu, X.-H.; Weng, J.-Q. *Lett. Drug Des. Discovery* **2018**, 15, 347.

(Li, L.; Fan, Y.)