白杨素衍生物的合成及体外抗弓形虫活性研究

尚凡凡 金 澜 张海滨 朴莲荀* 全哲山*

(延边大学药学院 延吉 133002)

摘要 设计并合成了 18 个未见报道的白杨素类衍生物, 采用噻唑蓝(MTT)比色法对所有化合物进行体外抗弓形虫活性测定, 其化学结构均经过 ^1H NMR, ^{13}C NMR 以及 HRMS 的联合确证。结果显示, 7-甲氧基-8-(*N,N*-双(二乙羟基)-磺酰胺基)-白杨素(D2)的选择性指数为 1.76, 其抗弓形虫活性明显强于先导化合物白杨素及阳性对照药磺胺嘧啶, 具有深入的研究价值。

关键词 白杨素类衍生物; 合成; 抗弓形虫活性; 体外; 选择性指数

Synthesis and Anti-toxoplasma Activity *in Vitro* of Chrysin Derivatives

Shang, Fanfan Jin, Lan Zhang, Haibin Piao, Lianxun* Quan, Zheshan*

(College of Pharmacy, Yanbian University, Yanji 133002)

Abstract In this paper, 18 novel chrysin derivatives were designed and synthesized. All target compounds were tested for anti-Toxoplasma activity by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) colorimetric method. The chemical structures were characterized by ^1H NMR, ^{13}C NMR and HRMS spectra. The selectivity index of 5-hydroxy-7-methoxy-4-oxo-*N*,2-diphenyl-4*H*-chromene-8-sulfonamide (D2) was 1.76, indicating that the anti-toxoplasma activity of compound D2 was significantly higher than that of the lead compound chrysin and the positive control drug sulfadiazine.

Keywords chrysin derivatives; synthesis; toxoplasma activity; *in vitro*; selectivity index

弓形虫(*Toxoplasma gondii*)是专性细胞内寄生虫^[1], 其宿主种类繁多, 包括人类、牲畜、海洋哺乳动物等, 可引起人畜共患的弓形虫病^[2]。免疫功能正常的人感染后无明显症状; 可免疫功能不全或者低下者感染后可导致广泛的病理损害, 严重时甚至可导致死亡; 孕妇感染后可造成流产、早产、死胎、畸胎等^[3]。弓形虫还可感染猪、牛、羊等家畜, 在狗、猫、兔等伴侣动物中感染较为普遍, 在给畜牧业带来巨大经济损失的同时, 为食品安全和人类健康也埋下了巨大隐患^[4]。目前, 弓形虫病的主要治疗手段仍旧是药物治疗, 抗弓形虫药物合理、正确的使用虽然取得了一定的疗效, 但也有不少问题值得关注, 例如, 抗弓形虫药物在使用过程中常伴随着一些不良反应, 如过敏、骨髓抑制以及肝肾并发症风险增加等^[5], 并且所有的药物都不适用于孕妇^[6]。因此, 开发具有高效、低毒的抗弓形虫药物显得尤为迫切。

白杨素是一种从紫葳科植物木蝴蝶中提取的黄酮类化合物, 广泛存在于蜂蜜和蜂胶中, 具有诸多药理活

性^[7,8], 如抗氧化^[9]、抗病毒^[10]、降血糖^[11]、抗焦虑^[12]等, 此外, 白杨素亦被报道具有抗弓形虫活性^[13]。磺胺类药物(Sulfonamides)是一类广谱的抗微生物药物, 其化学结构与弓形虫叶酸代谢中的对氨基苯甲酸类似, 可竞争性的结合二氢叶酸合成酶从而抑制其活性, 导致叶酸代谢异常, 达到抑制或杀灭弓形虫的作用^[14]。基于上述研究发现, 设想在白杨素化合物 C-8 位引入一系列磺酰胺类基团, 期望得到抗弓形虫活性更好的新型白杨素衍生物(图 1)。

1 结果与讨论

1.1 目标化合物的合成

目标化合物的合成路线如 Scheme 1 所示, 以白杨素为起始原料, 用碘甲烷对 C-7 位的酚羟基进行甲基化反应, 得到化合物 1^[16]。化合物 1 再与氯磺酸进行磺酰化反应, 得到在 C-8 位含氯磺酰基的甲基化白杨素

* Corresponding authors. E-mail: zsqun@ybu.edu.cn; lxpiao@ybu.edu.cn

Received January 11, 2019; revised February 28, 2019; published online March 21, 2019.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21662036, 81660344).

国家自然科学基金(Nos. 21662036, 81660344)资助项目。

图1 含磺酰基具有体外抗弓形虫作用的化合物

Figure 1 Compound containing sulfonyl group for anti-toxoplasmosis *in vitro*

(2)^[17]. 化合物 2 以二氯甲烷为溶剂, 与各种苯胺类、苯胺类、脂肪胺类以及杂环类化合物于 $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下反应^[17], 得到目标化合物 A1~A5、B1~B7、C1~C2、D1~D4, 总收率 53.4%~72.4%.

1.2 生物学活性分析

采用噻唑蓝(MTT)比色法对所有化合物在不同浓度下($500\sim 0.01\text{ }\mu\text{mol/L}$)对宿主细胞(RAW 264.7 细胞)的细胞毒性和体外抗速殖子(*T. gondii*, RH Strain)活性进行测试. 根据不同浓度下的抑制率, 计算各个化合物对弓形

虫感染的 RAW 264.7 细胞的 IC_{50} 值(抑制 50%弓形虫感染的 RAW 264.7 细胞生长的药物浓度值)与 RAW 264.7 细胞的 CC_{50} 值(抑制 50%细胞生长的药物浓度值)以及选择性指数(SI), 选择性指数(SI)指的是药物对正常 RAW 264.7 细胞的半数抑制浓度与对弓形虫感染 RAW 264.7 细胞的半数抑制浓度之间的比值, 此数值的大小可以间接反映药物对细胞感染率的影响^[15].

本实验设计并合成了 4 个系列(A1~A5, B1~B7, C1~C2, D1~D4)共 18 个未见报道的白杨素衍生物. 在体外实验中, 不同受试化合物的抗弓形虫活性我们用选择性指数(SI)来表达^[15]. 由以上实验数据可知先导物白杨素的 SI 值(0.82)略小于阳性对照药磺胺嘧啶的 SI 值(0.91), 这表明白杨素具有一定的抗弓形虫活性, 但其疗效略低于磺胺嘧啶. 而在对其进行结构修饰后的这些衍生物中, 所有化合物的体外抗速殖子能力(IC_{50} in *T. gondii*)与阳性对照药相比均有显著的提升, 其中, 14 个化合物的抗速殖子能力优于先导物白杨素.

化合物的构效关系: 化合物 A 系列为引入不同取代的苯胺基团, 所有化合物均有着很强的抗速殖子能力,

图式1 目标化合物的合成路线
Scheme 1 Synthesis of target compounds

表 1 化合物的体外抗弓形虫活性数据
Table 1 *In vitro* anti-toxoplasma activity of compounds

Compd.	R	CC ₅₀ /($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in RAW 264.7 cells	IC ₅₀ /($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in <i>T. gondii</i>	Selectivity index
A1	4-H	0.12	0.85	0.14
A2	4-Cl	3.25	5.08	0.64
A3	3,4-Cl ₂	0.80	0.97	0.83
A4	4-Br	0.35	0.47	0.74
A5	4-CH ₃	0.06	0.08	0.67
B1	4-H	1.14	1.62	0.70
B2	4-F	25.31	31.16	0.81
B3	2-Cl	2.67	3.18	0.84
B4	4-Cl	18.38	20.16	0.89
B5	2-Br	14.34	16.46	0.87
B6	4-Br	6.39	10.14	0.63
B7	4-OCH ₃	0.66	0.84	0.78
C1	H	45.33	55.29	0.82
C2	CH ₃	32.31	44.00	0.73
D1		435.00	674.00	0.65
D2		647.69	368.50	1.76
D3		147.03	192.31	0.77
D4		101.17	141.35	0.72
Chrysin	—	54.68	66.37	0.82
Sulfadiazine	—	1702.67	1865.67	0.91

但其对宿主细胞的毒性亦有所提升。化合物 **A3** 的选择性指数略高于先导物白杨素, 表现出较强的抗弓形虫活性。在该系列化合物中, 其构效关系如下: 3,4-Cl₂ > 4-Br > 4-CH₃ > 4-Cl > H。一定程度上表明, 苯环上引入较多的吸电子基团其抗弓形虫活性提高。化合物 **B** 系列引入不同取代的苯胺基团。其中, 化合物 **B3**, **B4**, **B5** 的选择性指数优于先导物白杨素, 构效关系表明, 苯环上引入卤素这类的吸电子基团其抗弓形虫活性优于供电子基团。化合物 **C** 系列引入不同的咪唑, 遗憾的是, 除 **C1** 外, 其他化合物的抗弓形虫能力与白杨素相比有所降低。一定程度上, 苯环与咪唑上引入供电子基团抗弓形虫能力下降。化合物 **D** 系列引入不同的脂肪胺类官能团, 其中, 化合物 **D2** 表现出超强的抗弓形虫能力, 其 SI 值为 1.76, 显著高于白杨素及磺胺嘧啶。通过构效关系推断, 很可能两个醇羟基增加了先导物的水溶性, 并且, 其氧原子作为氢键受体或者羟基的氢原子作为氢键供体与弓形虫代谢相关酶牢固结合, 抑制了其表达。

2 结论

本文通过药物化学拼合原理设计共合成了 18 个未

见报道的目标化合物。所有目标化合物结构均经过核磁共振谱、核磁碳谱以及高分辨质谱的确证。目标化合物 **D2** 表现出最强的体外抗弓形虫活性, 具备一定的新药开发价值。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

熔点用毛细管法测定, 温度计未经校正; ¹H NMR 和 ¹³C NMR 使用 BRUKER AV-300 型核磁共振仪器测定 (TMS 为内标, CDCl₃ 或 DMSO-*d*₆ 为溶剂); HRMS 数据来源于 Thermo Scientific LTQ Orbitrap XL 型质谱仪; 本实验所用试剂均为分析纯或化学纯。

3.2 实验方法

3.2.1 中间体的合成

中间体 **1** 的合成参照文献[16]方法制备, 中间体 **2** 的合成参照文献[17]方法制备。

3.2.2 化合物 **A1**~**A5**, **B1**~**B7**, **C1**~**C2**, **D1**~**D4** 的合成通法

50 mL 三口烧瓶中加入 10 mL 二氯甲烷、三乙胺

(0.42 g, 4.2 mmol)、不同种类的胺(1.4 mmol), 冰盐浴 -10°C 下搅拌, 将中间体 **2** (0.5 g, 1.4 mmol) 用适量二氯甲烷溶解后通过恒温滴液漏斗加至反应瓶中. 薄层色谱 (TLC) 监测反应, 6~10 h 反应完全, 反应液用 10% 的盐酸溶液调至酸性, 再加入二氯甲烷萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 抽滤, 减压旋蒸, 经硅胶色谱柱分离[展开剂 $V(\text{石油醚}):V(\text{丙酮})=5:1\sim 2:1$] 得不同取代的目标化合物^[17].

7-甲氧基-8-(*N*-(1-苯基)-磺酰胺基)-白杨素(**A1**): 类白色固体, 收率 65.3%. m.p. $222\sim 224^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 14.00 (s, 1H, ArOH), 10.19 (s, 1H, SO₂NH), 8.39~8.36 (m, 2H, ArH), 7.67~7.59 (m, 3H, ArH), 7.26 (s, 1H, ArH), 7.17~7.09 (m, 4H, ArH), 6.95 (t, $J=6.7$ Hz, 1H, ArH), 6.62 (s, 1H, ArH), 3.97 (s, 3H, ArOCH₃); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 182.63, 165.90, 164.70, 163.81, 156.06, 138.45, 133.05, 130.58, 129.65 (2C), 129.54 (2C), 127.55 (2C), 124.16, 119.51 (2C), 106.38, 105.69, 104.79, 96.59, 57.97; ESI-HRMS calcd for C₂₂H₁₈NO₆S [M + H]⁺ 424.0849, found 424.0848.

7-甲氧基-8-(*N*-(4-氯苯基)-磺酰胺基)-白杨素(**A2**): 类白色固体, 收率 67.1%. m.p. $242\sim 244^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 14.04 (s, 1H, ArOH), 10.40 (s, 1H, SO₂NH), 8.37 (d, $J=6.6$ Hz, 2H, ArH), 7.67~7.60 (m, 3H, ArH), 7.28~7.24 (m, 3H, ArH), 7.16~7.13 (m, 2H, ArH), 6.63 (s, 1H, ArH), 3.97 (s, 3H, ArOCH₃); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 182.09, 165.54, 164.21, 163.18, 155.66, 136.96, 132.53, 130.05, 129.13 (2C), 129.05 (2C), 127.62, 127.02 (2C), 120.43 (2C), 105.51, 105.21, 104.37, 96.07, 57.50; ESI-HRMS calcd for C₂₂H₁₇ClNO₆S [M + H]⁺ 458.0460, found 458.0461.

7-甲氧基-8-(*N*-(3,4-二氯)-苯基-磺酰胺基)-白杨素(**A3**): 淡黄色固体, 收率 64.7%. m.p. $238\sim 240^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 14.05 (s, 1H, ArOH), 10.68 (s, 1H, SO₂NH), 8.35 (dd, $J=6.9, 0.6$ Hz, 2H, ArH), 7.67~7.58 (m, 3H, ArH), 7.44 (d, $J=9.0$ Hz, 1H, ArH), 7.35 (d, $J=2.1$ Hz, 1H, ArH), 7.27 (s, 1H, ArH), 7.10 (dd, $J=9.0, 2.1$ Hz, 1H, ArH), 6.63 (s, 1H, ArH), 3.96 (s, 3H, ArOCH₃); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 182.15, 165.82, 164.29, 163.34, 155.78, 138.36, 132.62, 131.32, 131.23, 130.08, 129.22 (2C), 127.05 (2C), 125.28, 119.66, 118.39, 105.38, 105.24, 104.43, 96.29, 57.63; ESI-HRMS calcd for C₂₂H₁₆Cl₂NO₆S [M + H]⁺ 492.0069, found 492.0069.

7-甲氧基-8-(*N*-(4-溴苯基)-磺酰胺基)-白杨素(**A4**):

淡黄色固体, 收率 59.6%. m.p. $240\sim 242^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 14.01 (s, 1H, ArOH), 10.38 (s, 1H, SO₂NH), 8.34 (d, $J=6.6$ Hz, 2H, ArH), 7.67~7.58 (m, 3H, ArH), 7.36 (d, $J=8.7$ Hz, 2H, ArH), 7.23 (s, 1H, ArH), 7.08 (d, $J=8.7$ Hz, 2H, ArH), 6.60 (s, 1H, ArH), 3.95 (s, 3H, ArOCH₃); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 182.06, 165.54, 164.24, 163.19, 155.65, 137.37, 132.53, 131.92 (2C), 130.02, 129.12 (2C), 127.00 (2C), 120.83 (2C), 115.70, 105.53, 105.19, 104.36, 96.05, 57.49; ESI-HRMS calcd for C₂₂H₁₇BrNO₆S [M + H]⁺ 501.9955, found 501.9954.

7-甲氧基-8-(*N*-(4-甲基)-磺酰胺基)-白杨素(**A5**): 类白色固体, 收率 60.3%. m.p. $220\sim 222^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 14.00 (s, 1H, ArOH), 10.04 (s, 1H, SO₂NH), 8.39~8.36 (m, 2H, ArH), 7.67~7.60 (m, 3H, ArH), 7.25 (s, 1H, ArH), 7.05~6.95 (m, 4H, ArH), 6.63 (s, 1H, ArH), 4.00 (s, 3H, ArOCH₃), 2.13 (s, 3H, ArOCH₃); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 182.63, 165.83, 164.68, 163.79, 156.01, 135.74, 133.43, 133.04, 130.57, 129.97 (2C), 129.65 (2C), 127.54 (2C), 119.98 (2C), 106.38, 105.65, 104.78, 96.58, 57.96, 20.69; ESI-HRMS calcd for C₂₃H₂₀NO₆S [M + H]⁺ 438.1006, found 438.1006.

7-甲氧基-8-(*N*-(1-苄基)-磺酰胺基)-白杨素(**B1**): 淡黄色固体, 收率 57.3%. m.p. $216\sim 218^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 13.92 (s, 1H, ArOH), 8.38 (d, $J=9.0$ Hz, 2H, ArH), 7.98 (t, $J=6.0$ Hz, 1H, SO₂NH), 7.63~7.61 (m, 3H, ArH), 7.23 (s, 1H, ArH), 7.18~7.07 (m, 5H, ArH), 6.50 (s, 1H, ArH), 4.14 (d, $J=6.0$ Hz, 2H, NHCH₂), 3.94 (s, 3H, ArOCH₃); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 182.15, 164.76, 164.06, 163.01, 154.12, 137.02, 132.41, 130.20, 129.07 (2C), 127.74 (2C), 127.69 (2C), 127.06 (2C), 126.89, 108.33, 104.88, 104.15, 95.87, 57.28, 46.57; ESI-HRMS calcd for C₂₃H₂₀NO₆S [M + H]⁺ 438.1006, found 438.1005.

7-甲氧基-8-(*N*-(4-氟苄基)-磺酰胺基)-白杨素(**B2**): 类白色固体, 收率 70.5%. m.p. $236\sim 238^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 13.93 (s, 1H, ArOH), 8.37 (d, $J=7.2$ Hz, 2H, ArH), 7.99 (t, $J=6.3$ Hz, 1H, SO₂NH), 7.67~7.58 (m, 3H, ArH), 7.24 (s, 1H, ArH), 7.17 (dd, $J=8.4, 5.7$ Hz, 2H, ArH), 6.93 (t, 2H, $J=9.0$ Hz, ArH), 6.52 (s, 1H, ArH), 4.12 (d, $J=6.3$ Hz, 2H, NHCH₂), 3.94 (s, 3H, ArOCH₃); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 182.11, 164.82, 163.51 (d, $J=83.16$ Hz, 2C), 162.83, 159.61, 154.06, 133.30, 133.26, 129.70 (d, $J=8.16$ Hz, 2C),

129.05 (2C), 127.05 (2C), 114.42 (d, $J=21.21$ Hz, 2C), 108.32, 104.89, 104.11, 95.84, 57.30, 45.81; ESI-HRMS calcd for $C_{23}H_{19}FNO_6S$ $[M+H]^+$ 456.0911, found 456.0912.

7-甲氧基-8-(*N*-(2-氯苄基)-磺酰胺基)-白杨素(**B3**): 类白色固体, 收率 64.7%. m.p. 206~206 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 13.94 (s, 1H, ArOH), 8.37 (d, $J=6.3$ Hz, 2H, ArH), 8.06 (t, $J=6.3$ Hz, 1H, SO_2NH), 7.65~7.57 (m, 3H, ArH), 7.41~7.38 (m, 1H, ArH), 7.23 (s, 1H, ArH), 7.18~7.10 (m, 3H, ArH), 6.47 (s, 1H, ArH), 4.28 (d, $J=6.3$ Hz, 2H, $NHCH_2$), 3.93 (s, 3H, $ArOCH_3$); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 182.12, 164.86, 164.10, 163.01, 154.14, 134.33, 132.39, 132.11, 130.38, 130.18, 129.04 (2C), 128.83, 128.66, 127.08 (2C), 126.54, 107.91, 104.90, 104.10, 95.73, 57.20, 43.81; ESI-HRMS calcd for $C_{23}H_{19}ClNO_6S$ $[M+H]^+$ 472.0616, found 472.0616.

7-甲氧基-8-(*N*-(4-氯苄基)-磺酰胺基)-白杨素(**B4**): 淡黄色固体, 收率 64.3%. m.p. 252~254 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 13.96 (s, 1H, ArOH), 8.39~8.32 (m, 2H, ArH), 8.01 (t, $J=6.3$ Hz, 1H, SO_2NH), 7.67~7.57 (m, 3H, ArH), 7.24 (s, 1H, ArH), 7.15 (s, 4H, ArH), 6.54 (s, 1H, ArH), 4.13 (d, $J=6.6$ Hz, 2H, $NHCH_2$), 3.96 (s, 3H, $ArOCH_3$); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 182.12, 164.91, 164.02, 162.97, 154.02, 136.02, 132.40, 131.74, 130.18, 129.54 (2C), 129.07 (2C), 127.63 (2C), 127.05 (2C), 108.30, 104.90, 104.12, 95.87, 57.34, 45.87; ESI-HRMS calcd for $C_{23}H_{19}ClNO_6S$ $[M+H]^+$ 472.0616, found 472.0619.

7-甲氧基-8-(*N*-(2-溴苄基)-磺酰胺基)-白杨素(**B5**): 类白色固体, 收率 62.9%. m.p. 208~210 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 13.95 (s, 1H, ArOH), 8.36 (d, $J=6.3$ Hz, 2H, ArH), 8.07 (t, $J=6.3$ Hz, 1H, SO_2NH), 7.66~7.56 (m, 3H, ArH), 7.43 (dd, $J=7.5, 1.5$ Hz, 1H, ArH), 7.37 (dd, $J=7.8, 0.9$ Hz, 1H, ArH), 7.23~7.22 (m, 1H, ArH), 7.20~7.17 (m, 1H, ArH), 7.07 (td, $J=7.5, 1.5$ Hz, 1H, ArH), 5.76 (s, 1H, ArH), 4.27 (d, $J=6.3$ Hz, 2H, $NHCH_2$), 3.94 (s, 3H, $ArOCH_3$); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 182.15, 164.89, 164.16, 163.03, 154.22, 136.11, 132.40, 131.98, 130.30, 130.20, 129.05 (3C), 127.18, 127.12 (2C), 122.40, 107.92, 104.96, 104.17, 95.80, 57.26, 46.25; ESI-HRMS calcd for $C_{23}H_{19}BrNO_6S$ $[M+H]^+$ 516.0111, found 516.0114.

7-甲氧基-8-(*N*-(4-溴苄基)-磺酰胺基)-白杨素(**B6**): 淡黄色固体, 收率 72.4%. m.p. 244~246 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 13.96 (s, 1H, ArOH), 8.40~8.33

(m, 2H, ArH), 8.00 (t, $J=6.6$ Hz, 1H, SO_2NH), 7.67~7.56 (m, 3H, ArH), 7.29 (s, 1H, ArH), 7.26 (s, 1H, ArH), 7.24 (s, 1H, ArH), 7.12~7.01 (m, 2H, ArH), 6.54 (s, 1H, ArH), 4.11 (d, $J=6.6$ Hz, 2H, $NHCH_2$), 3.96 (s, 3H, $ArOCH_3$); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 182.13, 164.94, 164.01, 162.97, 153.99, 136.40, 132.40, 130.57 (2C), 130.19, 129.89 (2C), 129.07 (2C), 127.05 (2C), 120.25, 108.32, 104.92, 104.13, 95.87, 57.35, 45.95; ESI-HRMS calcd for $C_{23}H_{19}BrNO_6S$ $[M+H]^+$ 516.0111, found 516.0111.

7-甲氧基-8-(*N*-(4-甲氧基苄基)-磺酰胺基)-白杨素(**B7**): 类白色固体, 收率 58.2%. m.p. 222~224 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 13.92 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, ArOH), 8.39 (d, $J=7.8$ Hz, 2H, ArH), 7.83 (t, $J=6.3$ Hz, 1H, SO_2NH), 7.67~7.59 (m, 3H, ArH), 7.23 (brs, 1H, ArH), 6.99 (d, $J=9.0$ Hz, 2H, ArH), 6.57 (dd, $J=8.7, 2.1$ Hz, 2H, ArH), 6.48 (d, $J=1.8$ Hz, 1H, ArH), 4.08 (d, $J=6.3$ Hz, 2H, $NHCH_2$), 3.95 (s, 3H, $ArOCH_3$), 3.61 (d, $J=2.4$ Hz, 3H, $ArOCH_3$); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 182.13, 164.67, 164.00, 162.96, 158.29, 153.82, 132.39, 130.24, 129.07 (4C), 128.51, 127.06 (2C), 112.89 (2C), 108.68, 104.83, 104.10, 95.83, 57.29, 54.86, 46.27; ESI-HRMS calcd for $C_{24}H_{22}NO_7S$ $[M+H]^+$ 468.1112, found 468.1113.

7-甲氧基-8-(*1H*-咪唑-1-基)磺酰胺基)-白杨素(**C1**): 淡黄色固体, 收率 73.1%. m.p. 200~202 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 14.38 (s, 1H, ArOH), 8.35~8.29 (m, 3H, ArH), 7.67~7.60 (m, 4H, ArH), 7.35 (s, 1H, ArH), 7.09 (d, $J=9.0$ Hz, 1H, ArH), 6.70 (s, 1H, ArH), 3.90 (s, 3H, $ArOCH_3$); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 182.24, 167.66, 164.58, 164.23, 155.55, 137.84, 132.62, 131.50, 129.99, 129.80, 129.16 (3C), 128.63, 105.60, 104.77, 103.59, 96.41, 57.71; ESI-HRMS calcd for $C_{19}H_{15}N_2O_6S$ $[M+H]^+$ 399.0645, found 399.0649.

7-甲氧基-8-(*2*-甲基-*1H*-咪唑-1-基)磺酰胺基)-白杨素(**C2**): 类白色固体, 收率 62.5%. m.p. 184~186 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 14.39 (s, 1H, ArOH), 8.34 (dd, $J=7.5, 1.2$ Hz, 2H, ArH), 7.67~7.60 (m, 4H, ArH), 7.37 (s, 1H, ArH), 6.87 (d, $J=1.8$ Hz, 1H, ArH), 6.72 (s, 1H, ArH), 3.89 (s, 3H, $ArOCH_3$), 2.39 (s, 3H, ArH); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 182.15, 167.68, 164.40, 164.09, 155.48, 145.20, 132.65, 129.95, 129.22 (2C), 126.97 (2C), 126.32, 120.73, 105.85, 104.83, 103.65, 96.56, 57.73, 14.55; ESI-HRMS calcd for $C_{20}H_{17}N_2O_6S$ $[M+H]^+$ 413.0801, found 413.0804.

7-甲氧基-8-(*N,N*-二乙基-磺酰胺基)-白杨素(**D1**):

淡黄色固体, 收率 53.4%. m.p. 158~160 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 13.99 (s, 1H, ArOH), 8.35 (d, $J=6.6$ Hz, 2H, ArH), 7.67~7.58 (m, 3H, ArH), 7.24 (s, 1H, ArH), 6.70 (s, 1H, ArH), 4.01 (s, 3H, ArOCH₃), 3.30~3.27 (m, 4H, CH₂NCH₂), 1.09 (t, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₃, 6H, CH₂CH₃); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 182.25, 164.94, 164.22, 163.21, 155.11, 132.45, 130.21, 129.07 (2C), 127.07 (2C), 108.48, 105.09, 104.54, 96.19, 57.31, 42.20 (2C), 14.58 (2C); ESI-HRMS calcd for C₂₀H₂₂NO₆S [M+H]⁺ 404.1162, found 404.1163.

7-甲氧基-8-(*N,N*-双(二乙羟基)-磺酰胺基)-白杨素 (**D2**): 类白色固体, 收率 62.3%. m.p. 202~204 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 13.99 (brs, 1H, ArOH), 8.35 (d, $J=6.3$ Hz, 2H, ArH), 7.64~7.59 (m, 3H, ArH), 7.26 (s, 1H, ArH), 6.71 (s, 1H, ArH), 4.01 (s, 3H, ArOCH₃), 3.89 (brs, 2H, CH₂OH, CH₂OH), 3.52 (t, $J=6.0$ Hz, 4H, CH₂OH, CH₂OH), 3.32 (t, $J=6.0$ Hz, 4H, CH₂NCH₂); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 182.22, 164.92, 164.18, 163.13, 155.31, 132.45, 130.16, 129.07 (2C), 127.04 (2C), 107.95, 105.07, 104.57, 96.17, 59.94 (2C), 57.37, 51.20 (2C); ESI-HRMS calcd for C₂₀H₂₂NO₈S [M+H]⁺ 436.1060, found 436.1064.

7-甲氧基-8-(*N*-丁基-磺酰胺基)-白杨素 (**D3**): 类白色固体, 收率 57.3%. m.p. 202~204 °C; ^1H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ : 13.93 (s, 1H, ArOH), 8.22~8.18 (m, 2H, ArH), 7.59~7.51 (m, 3H, ArH), 6.82 (s, 1H, ArH), 6.48 (s, 1H, ArH), 5.11 (t, $J=6.0$ Hz, 1H, SO₂NH), 4.06 (s, 3H, ArOCH₃), 3.01 (q, $J=6.9$ Hz, 2H, NHCH₂), 1.53~1.45 (m, 2H, NHCH₂CH₂), 1.37~1.27 (m, 2H, CH₂CH₃), 0.88 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH₂CH₃); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 182.23, 164.78, 164.14, 163.04, 154.77, 132.41, 130.14, 129.02 (2C), 127.03 (2C), 107.68, 104.97, 104.43, 96.06, 57.32, 42.30, 30.97, 19.25, 13.46; ESI-HRMS m/z calcd for C₂₀H₂₂NO₆S [M+H]⁺ 404.1162, found 404.1165.

7-甲氧基-8-(*N*-(2-羟基乙基)-磺酰胺基)-白杨素 (**D4**): 淡黄色固体, 收率 69.3%. m.p. 228~230 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 13.99 (s, 1H, ArOH), 8.39~8.32 (m, 2H, ArH), 7.67~7.57 (m, 3H, ArH), 7.29 (d, $J=6.0$ Hz, 1H, ArH), 7.26 (s, 1H, ArH), 6.72 (s, 1H, ArH), 4.67 (t, $J=5.4$ Hz, 1H, CH₂OH), 4.02 (s, 3H, ArOCH₃), 3.41 (dd, $J=12.3, 6.3$ Hz, 2H, NHCH₂), 2.92 (dd, $J=12.3, 6.3$ Hz, 2H, CH₂OH); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 182.22, 164.87, 164.14, 154.75, 132.40, 130.15, 129.02 (2C), 127.03 (2C), 107.44, 105.01, 104.45,

96.13, 59.63, 57.43, 45.27; ESI-HRMS calcd for C₁₈H₁₈NO₇S [M+H]⁺ 392.0799, found 392.0792.

3.3 体外抗弓形虫实验

3.3.1 弓形虫的复苏与传代

弓形虫 RH 株保存于延边大学药学院细胞培养室液氮罐内. 实验前, 从液氮罐中取出冻存管, 立即放入 37 °C 水浴锅中快速晃动, 直至虫体悬浮液完全溶解, 经腹腔接种于雌性昆明小鼠, 3~4 d 传代 1 次, 连续传代至毒力稳定后收集腹水中的虫体, 以细胞培养液重悬, 备用.

3.3.2 RAW264.7 细胞的培养

RAW264.7 细胞为小鼠源巨噬细胞, 培养在含 10% FBS、100 $\mu\text{g/mL}$ 青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的 DMEM 培养基中, 置于 37 °C, 含 5% CO₂ 的培养箱中培养, 每隔 2~3 d 传代 1 次.

3.3.3 体外抗弓形虫活性的评估

利用噻唑蓝(MTT)法收集对数生长期的 RAW264.7 细胞, 以每孔 1×10^4 个接种于 96 孔板内, 并置于 CO₂ 培养箱中培养 24 h, 获得单细胞层; 更换细胞培养液为含 10% FBS 的 DMEM 液, 并按照每孔细胞数: 弓形虫数=1:5 的比例加入弓形虫速殖子, 孵育 24 h, 然后加入不同浓度的受试药物 20 μL , 并以磺胺嘧啶与 DMSO 分别作为阳性对照及阴性对照, 每个浓度设置 3 个平行孔, 并设空白组. 于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱内培养 24 h, 每孔加入 20 μL 的 MTT 溶液, 继续孵育 4 h. 离心, 弃上清液, 每孔加 DMSO 150 μL , 在酶标仪中于波长 570 nm 处测定 OD 值(吸光度).

相同实验条件下测定受试药物的细胞毒性, 除了细胞未用弓形虫感染, 其他操作方法相同. 测定 OD 值后计算各组细胞的抑制率及 IC₅₀, 进而计算出各个药物的选择性系数(SI).

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{OD}_{\text{实验组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}}{\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}} \right) \times 100\%$$

$$\text{选择性指数(SI)} = \frac{\text{CC}_{50}}{\text{IC}_{50}}$$

辅助材料(Supporting Information) 目标化合物的核磁氢谱、核磁碳谱以及高分辨质谱. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Rostami, A.; Riahi, S. M.; Fakhri, Y.; Saber, V.; Hanifehpour, H.; Valizadeh, S.; Gholizadeh, M.; Pouya, R. H.; Gamble, H. R. *Vet. Parasitol.* **2017**, *244*, 12.
- [2] Cheng, W.; Wang, C.; Xu, T.; Liu, F.; Pappoe, F.; Luo, Q. L.; Xu, Y. H.; Lu, F. L.; Shen, J. L. *Vet. Parasitol.* **2017**, *10*, 580.

- [3] Flegr, J.; Prandota, J.; Soviková, M.; Israili, Z. H. *Plosone* **2014**, *9*, e90203.
- [4] Hill, D. E.; Dubey, J. P. *Microbiol. Spectr.* **2016**, *4*, 1.
- [5] Mui, E. J.; Jacobus, D.; Milhous, W. K.; Schiehsler, G.; Hsu, H.; Roberts, C. W.; Kirisits, M. J.; McLeod, R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 3463.
- [6] Derouin, F.; Jacqz-Aigrain, E.; Thulliez, P.; Couvreur, J.; Leport, C. *Parasitol. Today* **2002**, *16*, 254.
- [7] Sak, K. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2014**, *15*, 8007.
- [8] Feng, X.; Qin, H.; Shi, Q.; Zhang, Y.; Zhou, F. F.; Wu, H. C.; Ding, S.; Niu, Z. Y.; Lu, Y.; Shen, P. P. *Biochem. Pharmacol.* **2014**, *89*, 503.
- [9] Chan, E. C. H.; Patchareewan, P.; Owen, L.; Cardiovasc, W. J. *Pharmacol.* **2000**, *35*, 326.
- [10] Lee, J. H.; Kim, Y. S.; Lee, C. K.; Lee, H. K.; Han, S.; Saengyak Hakhoechi, S. *Chem. Chemother.* **1999**, *30*, 34.
- [11] Shin, J. S.; Kim, K. S.; Kim, M. B.; Jeong, J. H.; Kim, B. K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 869.
- [12] Zanolli, P.; Avallone, R.; Baraldi, M. *Fitoterapia* **2000**, *71*, 117.
- [13] Adeyemi, O. S.; Sugi, T.; Han, Y. M.; Kato, K. *Parasitol. Res.* **2018**, *117*, 355.
- [14] Chio, L. C.; Bolyard, L. A.; Nasr, M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 727.
- [15] Yeo, S. J.; Jin, C. M.; Kim, S. Y.; Park, H. *Korean J. Parasitol.* **2016**, *54*, 155.
- [16] Lu, K.; Chu, J.; Wang, H. M.; Fu, X. I.; Quan, D. W.; Ding, H. X.; Yao, Q. W.; Yu, P. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 6345.
- [17] Li, Y. Q.; Zhao, W. J.; Song, Q. L.; Zhang, X. F.; Li, Z. *CN 103214444*, **2015**.

(Zhao, X.)