

医药与日化原料

## 吴茱萸次碱衍生物的合成及抑菌活性

郭现翠<sup>1</sup>, 王奇志<sup>2</sup>, 徐曙<sup>2</sup>, 单宇<sup>2</sup>, 印敏<sup>2</sup>,  
冯煦<sup>2</sup>, 罗金岳<sup>1\*</sup>, 刘飞<sup>2\*</sup>

[1. 南京林业大学 化学工程学院, 江苏 南京 210037; 2. 江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 江苏 南京 210014]

**摘要:** 以吴茱萸次碱为原料, 通过硫代反应以 54.5%~87.6% 的收率合成了硫代吴茱萸次碱及其 5 种 *N*-取代衍生物(II、IVa~e), 采用 HRMS、FTIR、<sup>1</sup>HNMR 和 <sup>13</sup>CNMR 对产物进行了结构表征; 分析了质量浓度为 10 mg/L 的样品对 9 种植物病原菌的抑菌活性。结果表明: 合成的 6 种化合物(II、IVa~e) 对植物病原真菌几乎没有抑制作用, 化合物 IVa、IVb 及 IVd 对细菌[水稻白叶枯病菌, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Ishiyama)] 具有较明显的抑菌活性, 其中 *N*-苄基硫代吴茱萸次碱(IVb) 和 *N*-(4-甲基苄基)-硫代吴茱萸次碱(IVd) 的抑制率分别为 81.84% 和 59.95%。通过细胞毒活性实验发现合成的化合物(II、IVa~e) 对人体正常细胞(人肺成纤维细胞, HFL1) 几乎没有毒性(IC<sub>50</sub> > 80 μmol/L)。

**关键词:** 吴茱萸次碱; 硫代吴茱萸次碱; 抑菌活性; 农药

中图分类号: TQ455.47; O629.3 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214(2018)06-1015-07

## Synthesis and Antifungal Activity of Rutaecarpine Derivatives

GUO Xian-cui<sup>1</sup>, WANG Qi-zhi<sup>2</sup>, XU Shu<sup>2</sup>, SHAN Yu<sup>2</sup>,  
YIN Min<sup>2</sup>, FENG Xu<sup>2</sup>, LUO Jin-yue<sup>1\*</sup>, LIU Fei<sup>2\*</sup>

(1. College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China; 2. Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing Botanical Garden Mem. Sun Yat-Sen, Nanjing 210014, Jiangsu, China)

**Abstract:** Thiorutaecarpine (II) and its five *N*-substituted derivatives (IVa~e) in yields of 54.5%~87.6% were synthesized from rutaecarpine by thionation. These products were confirmed by HRMS, FTIR, <sup>1</sup>HNMR and <sup>13</sup>CNMR. The antifungal activities of the six compounds (10 mg/L) against nine plant pathogens were analyzed. The results showed that the synthesized six compounds had almost no inhibitory effects on the plant pathogenic fungi. However, compounds IVa, IVb and IVd exhibited obvious antifungal activities against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Ishiyama). The inhibitory rates of *N*-benzyl thiorutaecarpine (IVb) and *N*-(4-methyl benzyl) thiorutaecarpine (IVd) were 81.84% and 59.95%, respectively. In addition, the thiorutaecarpine derivatives were found to be almost non-toxic (IC<sub>50</sub> > 80 μmol/L) towards human normal cells (HFL1) by cytotoxicity assay.

**Key words:** rutaecarpine; thiorutaecarpine; antifungal activity; pesticide

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31570359, 31470425); Social Development Project of Jiangsu Province Science and Technology Department (BE2016753); Youth Fund of Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences (SQ201402)

在现代农业生产中, 农药占据着不可替代的位置。农药不仅用于防治病虫害、杂草以及各种病原

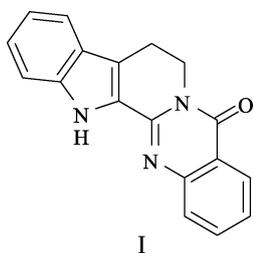
收稿日期: 2017-07-25; 定用日期: 2018-01-22; DOI: 10.13550/j.jxhg.20170603

基金项目: 国家自然科学基金(31570359, 31470425); 江苏省社会发展项目(BE2016753); 江苏省中国科学院植物研究所青年基金(SQ201402)

作者简介: 郭现翠(1991—), 女, 硕士生。联系人: 罗金岳, 教授, 电话: 025-85427635, E-mail: luojinyue@njfu.com.cn; 刘飞, 助理研究员, 电话: 025-84347159, liufeiseu@163.com。

菌等引起的农业生物灾害,而且在促进农业增产方面发挥着重要的作用。但是过量、不合理使用化学农药,不仅易使有害生物产生抗性,而且易造成农产品质量安全危害,同时大量有毒有害物质残留于土壤、水体和空气中,造成严重的环境污染问题<sup>[1-2]</sup>。植物源农药是从植物中提取有杀虫或抗菌等作用的活性物质,直接或间接加工获得的农药<sup>[3]</sup>。从植物中寻找结构新颖、作用机理独特的农用活性先导化合物,对其化学结构进行优化,从中发现更高活性的化合物,是创制新农药的一条重要途径<sup>[4]</sup>。植物源农药具有在环境中生物降解快,多靶点且靶标特殊,对人畜及对非靶标生物毒性低,活性成分作用机制独特,不易产生抗药性等特点<sup>[5-7]</sup>,符合现代农业环保、健康、持续发展的时代要求,越来越受到重视<sup>[8-9]</sup>。

天然产物是药物的重要来源,从天然产物中发现具有生物活性的先导化合物,是创新药物研究的重要前提。吴茱萸(*Evodia rutaecarpa*)是芸香科落叶灌木或小乔木植物吴茱萸〔*Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth〕、石虎〔*Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang〕或梳毛吴茱萸〔*Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *bodinieri* (Dode) Huang〕的干燥近成熟果实,是一种传统中药,其生物碱成分具有多种生物活性<sup>[10-11]</sup>。国内左国营<sup>[12]</sup>研究发现吴茱萸中提取的吲哚喹啉生物碱(如吴茱萸次碱, I, 结构如下所示)是一类有抗真菌活性的植保素,具有显著的抗稻瘟病菌作用,并初步分析了构效关系。国外 Lee<sup>[13]</sup>等发现吴茱萸次碱是一种可以从多种医药植物中提取到的生物碱,具有广泛的生理活性,如抗癌、抗痢疾、杀虫、杀菌、消炎以及体温调节等作用<sup>[14-18]</sup>。本课题组的王奇志<sup>[10,19]</sup>等从吴茱萸中分离得到了十余种吲哚喹啉生物碱,研究了其抗肿瘤、抗菌等活性;本课题组前期针对吴茱萸碱、吴茱萸次碱等吲哚喹啉生物碱的结构修饰发现,吲哚 N 原子位置的修饰可以提高其抗肿瘤、抑菌活性。近年来,有机硫类化合物因其具有特殊的化学结构,且具有相对于有机磷类化合物的低毒性,而受到关注<sup>[20-21]</sup>。本文以吴茱萸次碱为原料,通过硫代反应合成硫代吴茱萸次碱及其 5 种 N-取代衍生物,研究其对植物病原菌的抑菌活性,为吴茱萸吲哚喹啉生物碱在农业中的应用提供借鉴。



## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

溴代异丁烷、对甲基苄溴、溴化苄、石油醚(PE)、乙酸乙酯(EtOAc)、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)、二氯甲烷( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ),国药集团化学试剂有限公司;吴茱萸次碱,南京春秋生物工程有限公司;劳森试剂〔2,4-双(4-甲氧苯基)-1,3-二硫代-2,4-二磷-2,4-硫醚〕,北京百灵威科技有限公司;1,5-二溴戊烷、碘代正丁烷,上海晶纯生化科技股份有限公司;NaH,天津市化学试剂研究所;NaCl,南京化学试剂有限公司; $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,西陇化工股份有限公司; $\text{CaCl}_2$ ,上海久亿化学试剂有限公司;二甲亚砜(DMSO),成都市科龙化工试剂厂;MTT〔3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基溴化四唑〕,美国 Biosharp 公司。以上试剂均为 AR。

85-II 型恒温加热磁力搅拌器,上海司乐仪器有限公司;DZF-6020 真空干燥箱,上海一恒科学仪器有限公司;ZNHV-II 恒温控制仪,郑州长城科工贸有限公司;METTLER AE240 分析天平,梅特勒-托利多仪器公司;RE-3000 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;Aglient1260-6500 Q-TOF 液质联用仪,美国 Aglient 公司;Nicolet 380 FTIR 红外光谱仪,美国赛默飞世尔科技公司;Bruker 300 MHz、Bruker 500 MHz 核磁共振仪,瑞士 Bruker 公司;Thermo-6500  $\text{CO}_2$  培养箱、ThermoNapflow 超净工作台,美国 Thermo 公司;Infinite M200 酶标仪,瑞士 TECAN 公司;MS3 digital 定时微量振荡器,德国 IKA 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 硫代吴茱萸次碱及其衍生物的合成

##### 1.2.1.1 硫代吴茱萸次碱(II)的合成

在配有温度计和冷凝管的三口烧瓶中,分别加入吴茱萸次碱(0.50 g, 1.74 mmol),劳森试剂(1.06 g, 2.61 mmol,以 100 mL 甲苯溶解),于 110 °C 下搅拌反应 6 h,薄层色谱〔展开剂  $V(\text{PE}):V(\text{EtOAc})=5:1$ 〕监测反应。反应结束后旋转蒸发除去溶剂,硅胶柱层析〔洗脱条件  $V(\text{PE}):V(\text{EtOAc})=2:1$ 〕分离纯化得到产物 II。

产物收率按下式计算:

$$\text{收率}/\% = \frac{m_1}{m_0} \times 100$$

式中: $m_0$  为产物的理论产量, g;  $m_1$  为分离纯化后得到的产物质量, g。

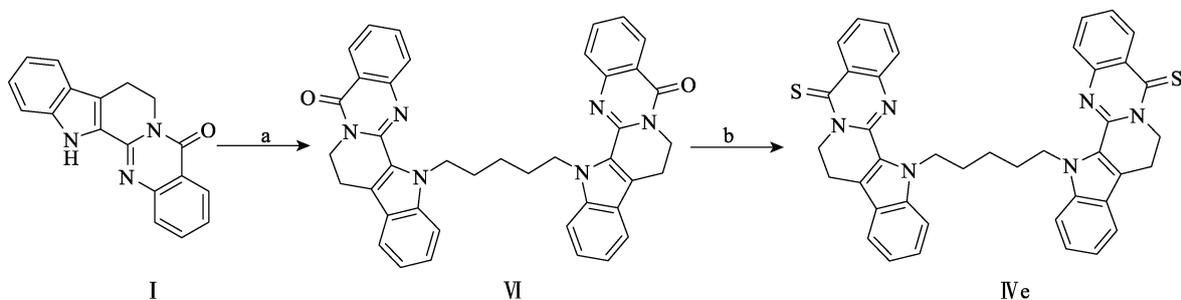
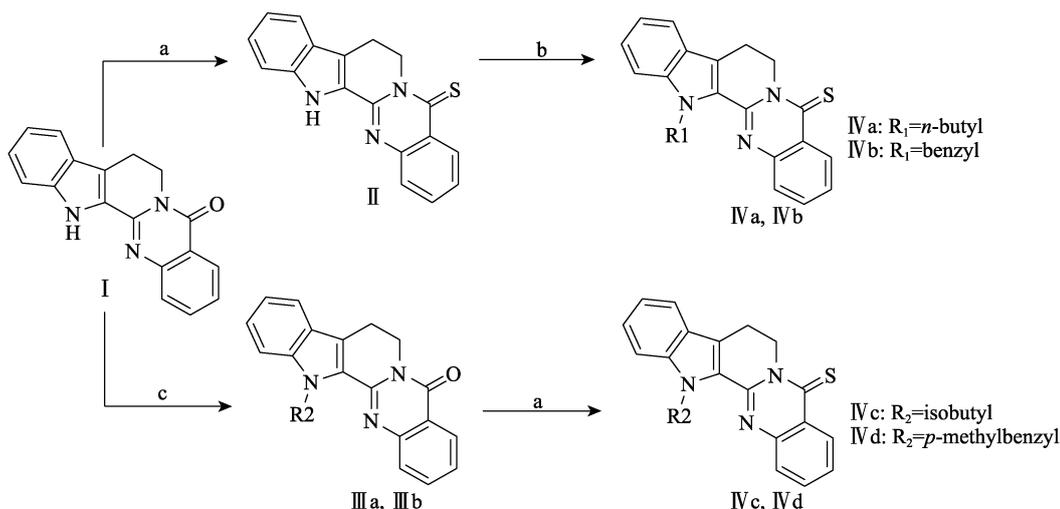
##### 1.2.1.2 N-取代硫代吴茱萸次碱(IV a~e)的合成

化合物 IV a~b 的合成:按照 1.2.1.1 小节合成硫代吴茱萸次碱,在配有温度计和冷凝管的三口烧瓶中,

加入硫代吴茱萸次碱(0.20 g, 0.66 mmol)、NaH 及 DMF (10 mL, 4A 分子筛除水), 室温下搅拌 20 min, 缓慢加入卤代烃(0.99 mmol)。50 °C 下搅拌反应, 薄层色谱〔展开剂  $V(\text{PE}) : V(\text{EtOAc}) = 5 : 1$ 〕监测反应。反应结束后进行后处理: 加水(10 mL)淬灭 NaH, 以乙酸乙酯萃取(20 mL)3次, 合并有机相, 饱和食盐水洗涤2次, 无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥2h, 抽滤, 旋转蒸发除去溶剂, 硅胶柱层析分离纯化得到产物 IV a~b。

IV c~e 的合成: 在配有温度计和冷凝管的三口烧瓶中, 加入吴茱萸次碱 I (0.50 g, 1.74 mmol)、NaH

及 DMF (20 mL, 4A 分子筛除水), 室温下搅拌 20 min, 缓慢加入卤代烷烃(7.00 mmol), 80 °C 下搅拌反应, 薄层色谱〔展开剂  $V(\text{PE}) : V(\text{EtOAc}) = 5 : 1$ 〕监测反应。反应结束后按上述化合物 IV a~b 的合成进行后处理。在甲苯(10 mL)中, 加入卤代烃取代的吴茱萸次碱(0.50 mmol), 加入劳森试剂(0.30 g, 0.75 mmol), 于 110 °C 反应 6 h 后, 薄层色谱〔展开剂  $V(\text{PE}) : V(\text{EtOAc}) = 5 : 1$ 〕监测反应, 硅胶柱层析分离得到纯净产物。IV a~e 的反应式如下所示:



### 1.2.2 抑菌活性实验

采用菌丝生长速率法(真菌)以及浊度法(细菌)对9种植物病原菌进行室内毒力初步测定。将各菌株在 PDA(真菌)平板上或 NB(细菌)培养液中活化培养, 对于真菌, 使用 5 mm 口径的打孔器在菌落边缘打取菌碟, 将供试杀菌剂用 DMSO 溶解制成母液(质量浓度为 10 g/L), 然后加入培养基中制成的硫代吴茱萸次碱及其衍生物终质量浓度为 10 mg/L 的 PDA 含药平板, 将各病原菌菌碟接种至平板上, 以等体积 DMSO 为对照, 每个样品进行 3 次重复实验; 对于细菌, 将菌液稀释到一定浊度后加入硫代吴茱萸次碱及其衍生物终质量浓度为 10 mg/L 的 NB 液体培养基中, 以无菌水为对照, 每

个样品重复处理 3 次; 25 °C 培养箱培养至对照接近长满板(真菌)或 28 °C 摇床培养至对照对数生长期(细菌), 十字交叉法测定菌落直径(真菌)或浊度仪测定浊度(细菌), 并计算抑制率。以无菌水作为空白实验(溶剂抑制率)。其中抑制率按下式计算:  
菌落直径/cm=菌落直径平均值-0.5(菌碟直径)  
菌丝生长抑制率/%=(对照菌落生长直径-处理菌落生长直径)/对照菌落生长直径×100

### 1.3 产品结构鉴定方法

对得到的吴茱萸次碱衍生物以液质联用、红外光谱、核磁共振氢谱、核磁共振碳谱进行分析及结构鉴定。液质联用仪条件<sup>[22]</sup>: 二极管阵列检测器 DAD190~400 nm, 色谱柱: Zorbax SB-C<sub>18</sub> 柱, 4.6 mm×

100 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ , 含质量分数 0.1 % 甲酸的  $\text{H}_2\text{O}$  为流动相 A,  $\text{CH}_3\text{OH}$  为流动相 B, 洗脱条件: 0~15 min, 流动相 B (体积分数 70%~100%), 15~30 min, 流动相 B (体积分数 100%), 流速: 0.3 mL/min, 柱温 35  $^\circ\text{C}$ ; 色谱柱流出组分进入电喷雾质谱仪的流速为 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 正离子质谱 (ESI<sup>+</sup>/MS) 条件: 毛细管电压: 4.0 kV, 干燥气温度: 350  $^\circ\text{C}$ , 雾化器压力:  $3.4 \times 10^5$  Pa, 化合物纯度测定: 紫外检测波长取 254 nm, 面积归一法定量; IR: 溴化钾压片; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz 或 500 MHz) 及 <sup>13</sup>C NMR 谱 (75 MHz 或 125 MHz),  $\text{CDCl}_3$  为溶剂, 四甲基硅烷 (TMS) 做内标。

#### 1.4 细胞毒活性测试

对合成的吴茱萸次碱衍生物采用 MTT 法对人体正常细胞 (HFL1) 进行细胞毒性测试的体外实验。将人体正常细胞 (HFL1) 接种于 96 孔培养板上, 密度为每孔 100  $\mu\text{L}$  含有细胞 5000 个, 培养过夜, 次日用质量浓度为 100 mg/L 的待测样品进行处理, 在温度为 37  $^\circ\text{C}$ 、 $\varphi(\text{CO}_2) = 5\%$  的培养箱中孵育。72 h 后, 向各孔中加入 10  $\mu\text{L}$  MTT (5 mg/L, PBS), 继续在培养箱中孵育, 4 h 后, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  DMSO, 振荡 5 min, 用酶标仪在波长 570 nm 的条件下测定每孔的吸光度并按下式计算细胞生长抑制率:

抑制率/% =  $[A_{(\text{对照组})} - A_{(\text{用药组})}] / [A_{(\text{对照组})} - A_{(\text{调零孔})}] \times 100$   
式中: A 为吸光度。

阳性对照为紫杉醇, 浓度为 0.1 mmol/L。设置 5 个质量浓度梯度: 20、10、5、2.5、1.25 mg/L, 同上法检测吸光度。

采用改良寇氏法计算  $\text{IC}_{50}$  值, 计算公式为:

$$\text{IC}_{50} = \lg^{-1} [X_m - i(\sum P - 0.5)]$$

式中:  $X_m$  为设计的最大的浓度的对数值;  $i$  为相邻两组浓度对数值;  $\sum P$  为各组生长抑制率之和, %; 0.5 为经验常数。

## 2 结果与讨论

### 2.1 吴茱萸次碱衍生物的合成

以吴茱萸次碱为原料, 合成硫代吴茱萸次碱衍生物过程中, 涉及以劳森试剂为底物的硫代反应及吴茱萸次碱衍生物的 *N*-取代反应。首先对这两个反应进行了初步的工艺优化。

以硫代吴茱萸次碱 (II) 的合成为例, 考察了劳森试剂物质的量对硫代吴茱萸次碱及其衍生物收率的影响, 结果见表 1。

如表 1 所示, 当劳森试剂的物质的量不足时 [ $n$  (劳森试剂) /  $n$  (吴茱萸次碱) = 0.9], 产物 II 的收率较低, 仅为 32.4%; 将劳森试剂的物质的量提高, 产物的收率随之提高, 当劳森试剂物质的量为吴茱萸次碱的 1.5 倍时, 产物收率达到 54.5%, 薄层色谱

表 1 劳森试剂的物质的量对产物 II 收率的影响

Table 1 Effect of mole ratio of Lawesson's reagent to rutaecarpine on the yield of compound II

	$n$ (劳森试剂) / $n$ (吴茱萸次碱)						
	0.9	1.1	1.3	1.5	1.7	1.9	2.1
II 收率/%	32.4	39.7	45.2	54.5	53.5	54.0	54.3

分析发现此时仍有一定量的吴茱萸次碱未反应完全; 进一步提高劳森试剂的物质的量, 经薄层色谱分析发现, 硅胶板经碘显色后, 原料点与之前相比颜色变浅, 产物点颜色深度几乎不变, 且产物点附近又发现一新点, 可以推断, 未反应的吴茱萸次碱的量减少, 但产物收率几乎不变, 此时反应的副产物增加。因此, 选定适宜的劳森试剂物质的量为吴茱萸次碱的 1.5 倍。

以吴茱萸次碱与溴代异丁烷为反应底物 (合成 III a), 考察了 NaH 的物质的量对合成 *N*-取代吴茱萸次碱衍生物反应的影响, 结果见表 2。

表 2 NaH 物质的量对产物 III a 收率的影响

Table 2 Effect of mole ratio of NaH to rutaecarpine on the yield of compound III a

	$n$ (NaH) / $n$ (吴茱萸次碱)						
	0.9	1.0	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5
III a 收率/%	65.1	70.3	73.2	75.6	82.0	80.9	81.1

如表 2 所示, 当  $n(\text{NaH})/n(\text{吴茱萸次碱}) = 0.9$ , 产物 III a 的收率仅为 65.1%; 提高 NaH 的物质的量, 产物的收率明显提高, 当 NaH 的物质的量为吴茱萸次碱的 1.3 倍时, 产物收率达到最高, 为 82.0%; 进一步提高 NaH 的物质的量, 会造成产物的过度还原, 产物会进一步脱氢, 而收率不再增加。通过液质联用分析发现, 产物准分子离子峰为 344 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 脱氢产物准分子离子峰为 342, 增加 NaH 的物质的量时, 在总离子流图中可见脱氢产物峰面积增加, 即副产物——脱氢产物增加, 产物收率不再增加。因此选定适宜的 NaH 用量为吴茱萸次碱的物质的量的 1.3 倍。

本文尝试了两种方法合成硫代吴茱萸次碱衍生物: 方法一 (合成化合物 IV a~b 的路线) 中首先以劳森试剂进行硫代反应, 再与卤代烃进行取代反应; 方法二 (合成化合物 IV c~e 的路线) 则与方法一相反, 首先以吴茱萸次碱为原料, 获得 *N*-取代吴茱萸次碱, 再与劳森试剂反应获得产物。实验中发现: 方法一, 硫代吴茱萸次碱 (化合物 II) 的分离提纯较困难 (与吴茱萸次碱难以分离), 但硫代吴茱萸次碱与卤代烃反应后较容易进行分离提纯; 方法二的问题同样在于第二步反应 (*N*-取代吴茱萸次碱与劳森试剂反应) 后产物分离困难。两种方法的困难之

处都在于硫代产物难以分离, 分析原因推测是硫和氧同属于第七主族, 化学性质十分相似, 碳硫键与碳氧键相比极性改变不大, 且薄层色谱分析发现两者的  $R_f$  值相差小于 0.1, 两种方法均可行。

## 2.2 产品的结构确证

硫代吴茱萸次碱(II): 黄色结晶, 0.29 g, 收率: 54.5%, 产物色谱纯度: 99.9%; m.p.: 216~218 °C, 产物  $R_f$  值为 0.52, 硅胶柱层析分离纯化, 洗脱条件  $V(\text{PE}) : V(\text{EtOAc}) = 2 : 1$ ; FTIR(KBr),  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 3445( $\nu_{\text{C-H}}$ , Ar—H), 3051( $\nu_{\text{C-H}}$ , CH<sub>3</sub>), 2920( $\nu_{\text{C-H}}$ , CH<sub>2</sub>), 2898( $\nu_{\text{C-H}}$ , CH), 1617( $\nu_{\text{C=O}}$ , N—C=O), 1595( $\nu_{\text{C=C}}$ ), 1471( $\delta_{\text{C-H}}$ , CH<sub>2</sub>), 1317( $\delta_{\text{C-H}}$ , CH<sub>3</sub>), 765( $\delta_{\text{C-H}}$ , Ar—H)。<sup>1</sup>HNMR(CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz),  $\delta$ : 3.27~3.32 (2H, t,  $J = 6.90$  Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 5.18~5.22 (2H, t,  $J = 6.87$  Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 7.16~7.19 (1H, m, Ar—H), 7.31~7.34 (1H, t,  $J = 7.45$  Hz, Ar—H), 7.40~7.44 (3H, m, Ar—H), 7.68~7.71 (1H, t,  $J = 6.95$  Hz, Ar—H), 9.24 (1H, s, NH); <sup>13</sup>CNMR(CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz),  $\delta$ : 19.90, 49.14, 112.14, 120.26, 120.80, 125.42, 125.92, 127.18, 127.52, 128.9, 129.08, 131.98, 134.58, 138.62, 188.82。HRMS: C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>S [M+H]<sup>+</sup>理论值: 304.0830, 实际值: 304.0864。

*N*-正丁基硫代吴茱萸次碱(IVa): 黄色结晶, 0.20 g, 收率: 87.6%, 产物色谱纯度: 99.9%; m.p.: 163~165 °C; 产物  $R_f$  值为 0.24, 硅胶柱层析分离纯化, 洗脱条件  $V(\text{PE}) : V(\text{EtOAc}) = 2 : 1$ ; FTIR(KBr),  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 3063( $\nu_{\text{C-H}}$ , Ar—H), 1742( $\nu_{\text{C=O}}$ , N—C=O), 1659( $\nu_{\text{C=C}}$ ), 1500( $\delta_{\text{C-H}}$ , CH<sub>2</sub>), 1404( $\delta_{\text{C-H}}$ , CH<sub>3</sub>), 743( $\delta_{\text{C-H}}$ , Ar—H)。<sup>1</sup>HNMR(CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz),  $\delta$ : 0.97~1.02 (3H, t,  $J = 7.38$  Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.29~1.26 (2H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.85~1.95 (2H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.21~3.26 (2H, t,  $J = 6.66$  Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4.81~4.86 (2H, t,  $J = 7.65$  Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 5.18~5.22 (2H, t,  $J = 6.72$  Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 7.16~7.25 (1H, t,  $J = 6.93$  Hz, Ar—H), 7.35~7.48 (3H, m, Ar—H), 7.63~7.67 (2H, d,  $J = 8.34$  Hz, Ar—H), 7.70~7.76 (1H, m, Ar—H), 8.22~8.85 (1H, q, Ar—H); <sup>13</sup>CNMR(CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz),  $\delta$ : 13.97, 19.87, 20.31, 32.54, 45.09, 49.11, 110.59, 119.56, 120.16, 123.86, 124.73, 125.39, 126.60, 127.51, 127.71, 128.43, 131.93, 134.36, 140.30, 142.32, 144.60, 188.91。HRMS: C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>S [M+H]<sup>+</sup>理论值: 360.1456, 实际值: 360.1490。

*N*-苄基-硫代吴茱萸次碱(IVb): 黄色黏稠固体, 0.17 g, 收率: 64.1%, 产物色谱纯度: 99.9%; 产物  $R_f$  值为 0.52, 硅胶柱层析, 洗脱条件  $V(\text{PE}) : V(\text{EtOAc}) = 30 : 1$ ; FTIR(KBr),  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 2963( $\nu_{\text{C-H}}$ , Ar—H), 2920( $\nu_{\text{C-H}}$ , CH<sub>3</sub>), 2853( $\nu_{\text{C-H}}$ , CH<sub>2</sub>), 1590( $\nu_{\text{C=O}}$ , N—C=O), 1468( $\delta_{\text{C-H}}$ , CH<sub>2</sub>), 797( $\delta_{\text{C-H}}$ , Ar—H)。<sup>1</sup>HNMR(CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz),  $\delta$ : 3.26~3.30 (2H, t,  $J =$

6.69 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 5.19~5.23 (2H, t,  $J = 6.81$  Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 6.16 (2, s, PhCH<sub>2</sub>N), 7.15~7.25 (6H, m, Ar—H), 7.35~7.45 (4H, m, Ar—H), 7.52~7.55 (2H, d, Ar—H), 8.79~8.81 (1H, d, Ar—H); <sup>13</sup>CNMR(CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz),  $\delta$ : 25.90, 48.55, 48.99, 110.59, 119.56, 120.16, 120.33, 123.86, 124.73, 125.39, 126.60, 127.51, 127.71, 128.43, 131.93, 134.36, 140.30, 142.32, 144.60, 188.89。HRMS: C<sub>25</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>S [M+H]<sup>+</sup>理论值: 394.1300, 实际值: 394.1333。

*N*-异丁基硫代吴茱萸次碱(IVc): 黄色结晶, 0.51 g, 收率: 82.0%, 产物色谱纯度: 98.5%; m.p.: 176~178 °C; 产物  $R_f$  值为 0.45, 硅胶柱层析, 洗脱条件:  $V(\text{PE}) : V(\text{EtOAc}) = 20 : 1$ ; FTIR(KBr),  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 3138( $\nu_{\text{C-H}}$ , Ar—H), 2959( $\nu_{\text{C-H}}$ , CH<sub>3</sub>), 2925( $\nu_{\text{C-H}}$ , CH<sub>2</sub>), 2867( $\nu_{\text{C-H}}$ , CH), 1735( $\nu_{\text{C=O}}$ , N—C=O), 1588( $\nu_{\text{C=C}}$ ), 1538( $\delta_{\text{C-H}}$ , CH<sub>2</sub>), 1397( $\delta_{\text{C-H}}$ , CH<sub>3</sub>), 736( $\delta_{\text{C-H}}$ , Ar—H)。<sup>1</sup>HNMR(CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz),  $\delta$ : 0.94~0.96 (6H, d,  $J = 6.72$  Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 2.33~2.42 (1H, m, CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 3.23~3.28 (2H, t,  $J = 6.63$  Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4.68~4.70 (2H, d,  $J = 6.62$  Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 5.19~5.23 (2H, t,  $J = 6.60$  Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 7.15~7.20 (1H, t,  $J = 7.71$  Hz, Ar—H), 7.33~7.38 (1H, t,  $J = 6.78$  Hz, Ar—H), 7.43~7.49 (2H, t,  $J = 8.19$  Hz, Ar—H), 7.63~7.66 (2H, d,  $J = 10.14$  Hz, Ar—H), 8.82~8.85 (1H, m, Ar—H); <sup>13</sup>CNMR(CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz),  $\delta$ : 19.84, 20.24, 30.13, 49.18, 52.23, 111.13, 119.77, 120.06, 120.27, 123.73, 125.32, 126.77, 127.52, 127.68, 128.43, 131.95, 134.37, 140.86, 142.20, 144.75, 188.92。HRMS: C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>S [M+H]<sup>+</sup>理论值: 360.1456, 实际值: 360.1490。

*N*-(4-甲基苄基)-硫代吴茱萸次碱(IVd): 黄色晶体, 0.56 g, 收率: 79.6%, 产物色谱纯度: 99.9%; m.p.: 208~210 °C; 产物  $R_f$  值为 0.21, 硅胶柱层析纯化, 洗脱条件  $V(\text{PE}) : V(\text{EtOAc}) = 25 : 1$ ; FTIR(KBr),  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 2963( $\nu_{\text{C-H}}$ , Ar—H), 1589( $\nu_{\text{C=O}}$ , N—C=O), 1560( $\nu_{\text{C=C}}$ ), 1458( $\delta_{\text{C-H}}$ , CH<sub>2</sub>), 1458( $\delta_{\text{C-H}}$ , CH<sub>3</sub>)。<sup>1</sup>HNMR(CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz),  $\delta$ : 2.25 (3H, s, ArCH<sub>3</sub>), 3.25~3.28 (2H, s,  $J = 6.70$  Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 5.20 (2H, s, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 6.12 (2H, s, NCH<sub>2</sub>Ar), 7.02~7.07 (4H, q,  $J = 8.15$  Hz, Ar—H), 7.17~7.20 (1H, t, Ar—H), 7.25~7.35 (1H, m, Ar—H), 7.40~7.55 (2H, m, Ar—H), 7.57~7.65 (1H, m, Ar—H), 7.66~7.69 (2H, m, Ar—H), 8.79 (1H, s, Ar—H); <sup>13</sup>CNMR(CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz),  $\delta$ : 19.94, 21.01, 48.30, 49.03, 111.07, 120.20, 120.26, 120.71, 124.13, 125.79, 126.64, 126.74, 127.56, 128.50, 129.23, 131.89, 134.34, 135.63, 136.75, 140.93, 142.17, 144.54, 188.93。HRMS: C<sub>26</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>S [M+H]<sup>+</sup>理论值: 408.1456, 实际值: 408.1490。

*N,N'*-(1,5-戊基)-双硫代吴茱萸次碱(IVe): 白色结晶, 0.58 g, 收率: 71.9%; 色谱纯度: 99.9%; m.p.:

242~244 °C; 产物  $R_f$  值为 0.25, 硅胶柱层析纯化, 洗脱条件  $V(\text{PE}) : V(\text{EtOAc}) = 20 : 1$ ; FTIR(KBr),  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 3119 ( $\nu_{\text{C-H}}$ , Ar—H), 3051 ( $\nu_{\text{C-H}}$ ,  $\text{CH}_3$ ), 2920 ( $\nu_{\text{C-H}}$ ,  $\text{CH}_2$ ), 2850 ( $\nu_{\text{C-H}}$ , CH), 1586 ( $\nu_{\text{C=O}}$ , N—C=O), 1560 ( $\nu_{\text{C=C}}$ ), 1467( $\delta_{\text{C-H}}$ ,  $\text{CH}_2$ ), 1399 ( $\delta_{\text{C-H}}$ ,  $\text{CH}_3$ ), 739 ( $\delta_{\text{C-H}}$ , Ar—H)。 $^1\text{H}$ NMR( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz),  $\delta$ : 1.26(2H, s,  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)$ ), 1.56~1.60 (4H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2$ ), 3.17~3.20 (4H, t,  $J = 6.35$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 4.81~4.84 (4H, t,  $J = 7.05$  Hz,  $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2$ ), 5.10~5.12 (4H, t,  $J = 6.45$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 7.15~7.18 (2H, t,  $J = 7.30$  Hz, Ar—H), 7.25~7.34 (4H, m, Ar—H), 7.39~7.42 (2H, t,  $J = 7.70$  Hz, Ar—H), 7.45~7.47 (2H, d,  $J = 8.00$  Hz, Ar—H), 7.52~7.55 (2H, t,  $J = 7.75$  Hz, ArH), 7.60~7.62 (2H, d,  $J = 7.95$  Hz, Ar—H), 8.78~8.80 (2H, d,  $J =$

8.20 Hz, Ar—H);  $^{13}\text{C}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz),  $\delta$ : 19.79, 24.50, 29.66, 30.42, 45.06, 48.98, 110.46, 119.65, 120.20, 120.41, 123.85, 125.45, 126.50, 127.48, 128.40, 131.96, 134.21, 140.25, 142.12, 144.52, 188.81。HRMS:  $\text{C}_{41}\text{H}_{35}\text{N}_6\text{S}_2$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  理论值: 675.2286, 实际值: 657.2320。

### 2.3 抑菌活性测试

采用菌丝生长速率法(真菌)以及浊度法(细菌)对所合成 6 种化合物以及吴茱萸次碱对 7 种植物病原真菌(水稻纹枯病菌、油菜菌核病菌、小麦赤霉病菌、黄瓜灰霉病菌、葡萄炭疽病菌、番茄早疫病菌、稻瘟病菌)、两种植物病原细菌(水稻白叶枯病菌、水稻细菌性条斑病菌)进行抑菌活性研究, 结果见表 3。

表 3 吴茱萸次碱衍生物的抑菌活性  
Table 3 Antifungal activities of rutaecarpine and its derivatives

测试菌株	抑制率/%						溶剂抑制率/%	
	I	II	IVa	IVb	IVc	IVd		IVe
水稻纹枯病菌	9.93	10.65	4.47	5.50	3.44	7.90	13.06	0.00
油菜菌核病菌	8.14	2.50	2.19	1.88	4.06	1.88	1.88	0.05
小麦赤霉病菌	5.52	1.57	1.57	1.18	0.00	0.39	6.67	0.08
黄瓜灰霉病菌	0.00	0.00	6.78	11.44	7.20	3.81	8.05	0.46
葡萄炭疽病菌	0.00	3.80	2.66	6.84	1.90	0.00	9.51	0.20
番茄早疫病菌	0.00	3.09	2.41	2.41	2.75	3.44	4.12	0.00
稻瘟病菌	0.00	3.94	7.09	16.14	3.15	3.15	11.42	0.44
水稻细菌性条斑病菌	0.00	14.48	0.00	0.00	0.00	0.00	0.47	0.15
水稻白叶枯病菌	0.00	0.00	46.31	81.84	12.50	59.95	0.00	0.18

由表 3 可见, 经过衍生化的吴茱萸次碱对真菌有一定的抑制性, 但效果不明显, 如化合物 II (硫代吴茱萸次碱) 对水稻纹枯病菌的抑制率为 10.65%, 化合物 IVb 对于黄瓜灰霉病菌、稻瘟病菌的抑制率分别为 11.44%、16.14%, 相对于吴茱萸次碱(化合物 I) 抑菌活性均有一定的提高。

对于细菌, 实验发现吴茱萸次碱对两种细菌没有活性, 所合成的吴茱萸次碱衍生物则有较好的抑制活性, 化合物 II 对水稻细菌性条斑病菌的抑制率为 14.48%, 化合物 IVa、IVb、IVd 对水稻白叶枯病菌的抑制率分别到达了 46.31%、81.84%、59.95%, 较吴茱萸次碱活性明显提高, 且芳基(苜基)取代的化合物比烷基取代的抑菌效果好; 双硫代吴茱萸次碱(IVe) 可能因其溶解性较差的原因, 几乎观察不到抑菌效果。由抑菌活性结果可知, 对于吴茱萸次碱进行硫代反应获得硫代吴茱萸次碱及其衍生物, 其活性与吴茱萸次碱相比有所提高; 对于硫代吴茱萸次碱而言, N-取代衍生物的活性有所提高, 并且芳基取代的化合物比烷基取代抑菌效果提高更加明显。由实验结果可以初步推测: 对于吴茱萸次

碱, 增加其吡啶基团 N 的疏水性有助于提高其对于植物病原细菌的活性。

### 2.4 细胞毒活性测试

研究所合成的吴茱萸次碱衍生物对人体正常细胞(HFL1)的细胞毒活性, 结果见表 4。

表 4 吴茱萸次碱衍生物的细胞毒活性  
Table 4 Cytotoxic activities of rutaecarpine derivatives

	化合物					
	II	IVa	IVb	IVc	IVd	IVe
$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol/L})$	>80	>80	>80	>80	>80	>80

由表 4 可见, 样品的  $\text{IC}_{50}$  均大于  $80 \mu\text{mol/L}$ , 所合成的化合物对正常细胞几乎没有毒性。对于正常细胞而言, 吴茱萸次碱衍生物中喹啉酮基团中羰基的改变(变为  $\text{C}=\text{S}$  键), 并不会导致其毒性增加。

## 3 结论

(1) 本文以吴茱萸次碱作为反应底物, 对其进

行结构修饰合成了 6 种吴茱萸次碱衍生物, 采用多种手段对产物进行了结构确证。反应过程中由于涉及以劳森试剂参与的硫代反应, 副产物较多; 两种合成方法在分离纯化方面难易不同, 但对目标产物的收率几乎无影响。

(2) 将所得吴茱萸次碱衍生物对 7 种真菌、2 种细菌进行抑菌活性测试发现, 衍生化的吴茱萸次碱抑菌活性明显提高, 尤其对细菌有较好的抑菌作用, 其中化合物 IV a、IV b、IV d 对水稻白叶枯病菌的抑制率效果尤为突出, 芳基取代较烷基取代的硫代吴茱萸次碱在抑菌方面更占优势。

(3) 通过细胞毒实验发现本文所合成的硫代吴茱萸次碱及其衍生物对人体正常细胞 (HFL1) 几乎没有毒性, 证实本文所合成的化合物对人畜以及非靶标生物的影响可能较小, 本文对吴茱萸生物碱的开发利用及新型植物源农药的开发具有一定的借鉴意义。

#### 参考文献:

- [1] Ma Lixin (马立新), Chen Jiping (陈吉平), Guo Rongbo (郭荣波), *et al.* Study of irreversible sorption of pesticides azinphos-methyl, diuron, atrazine and prometryn on soil[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2004, 21(6): 456-460.
- [2] Casida J E, Durkin K A. Pesticide chemical research in toxicology: lessons from nature[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2017, 30: 94-104.
- [3] Jacobson M. *Botanical Pesticides*[J]. *ACS Symposium Series*, 1989: 1-10.
- [4] Qian X, Lee P W, Cao S. China: forward to the green pesticides via a basic research program[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2010, 58(5): 2613-2623.
- [5] Idowu T O, Onaminmi G O, Ogundaini A O, *et al.* Antimicrobial constituents of *Chrysophyllum albidum* seed cotyledons[J]. *Nigerian Journal of Natural Products and Medicine*, 2003, 7: 33-36.
- [6] Anjum S, Sarfraz, T, Ahmad Y, *et al.* Synthesis of an antibacterial and antifungal cinnoline derivative by rearrangement of a  $\beta$ -carboline derivative[J]. *Heterocycles*, 1996, 43(9): 1887-1892.
- [7] Morkaew T, Pinyakong O, Tachaboonyakiat W. Structural effect of quaternary ammonium chitin derivatives on their bactericidal activity and specificity[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 101: 719-728.
- [8] Zhang Xing (张兴), Ma Zhiqing (马志卿), Feng Juntao (冯俊涛), *et al.* The research progress of study on botanical pesticides[J]. *Chinese Journal of Biological Control (中国生物防治学报)*, 2015, 31(5): 685-698.
- [9] Lin Shiqing (林世清), Yang Chunlong (杨春龙), Yang Hong (杨红), *et al.* Synthesis and Antifungal Activities of 1-[2-(2, 4-Dichlorophenyl)-4-alkoxymethyl-1, 3-dioxolan-2-yl] methyl-1H-1, 2, 4-triazoles[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2005, 22(11): 862-870.
- [10] Wang Q Z, Liang J Y. Studies on the chemical constituents of *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2004, 39(8): 605-608.
- [11] Cai G X, Huang D, Li S X, *et al.* Comparative analysis of essential oil components of *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang and *Evodiarutaecarpa* (Juss.) Benth[J]. *Natural Product Research*, 2012, 26(19): 1796-1798.
- [12] Zuo Guoying (左国营). The study on chemical constituents and antifungal activity of *spodoptera littoralis*[D]. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences (中国科学院昆明植物研究所), 2001.
- [13] Lee S H, Son J K, Jeong B S, *et al.* Progress in the studies on rutaecarpine[J]. *Molecules*, 2008, 13(2): 272-300.
- [14] Khiste R H, Peepliwal A G, Jain H K. A novel synthesis route to indolopyridoquinazoline alkaloid analogues from condensed pyrimidine scaffolds[J]. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 2016, 26(7): 4055-4061.
- [15] Liang L N, An R, Huang T, *et al.* A simple approach for the syntheses of rutaecarpine and its analogs[J]. *Tetrahedron Letters*, 2015, 56(19): 2466-2468.
- [16] Ji Shiyu (及时雨), Qi Pingjian (齐平建). The effect and mechanism of rutaecarpine on blood pressure in hypertensive rats[J]. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics (中国生化药物杂志)*, 2012, 33(3): 237-240.
- [17] Li Z G, Dong G Q, Wang S Z, *et al.* Optical evodiamine derivatives: Asymmetric synthesis and antitumor activity[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2015, 26(13): 267-271.
- [18] Wang S, Fang K, Dong G, *et al.* Scaffold diversity inspired by the natural product evodiamine: Discovery of highly potent and multitargeting antitumor agents[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2015, 58: 6678-6696.
- [19] Wang Q Z, Liang J Y, Feng X. Evodiagenine and dievodiamine, two new indole alkaloids from *Evodia rutaecarpa*[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2010, 21(5): 596-599.
- [20] Wang Runren (王润润), Zhu Weiwei (朱伟伟), Wang Ali (王阿莉), *et al.* Synthesis and antifungal activity of 6,7-(methylenedioxy) benzothioopyran-4-one derivatives[J]. *Chinese Journal of Pesticide Science (农药学报)*, 2013, 15(6): 699-703.
- [21] HU Lei (胡雷). Study on synthesis and antifungal activity of novel thiochromanone derivatives[D]. Northwest A & F University(西北农林科技大学), 2013.
- [22] Wang Bin (王彬), Jia Zhengping, Ma Huiping, *et al.* Research on fragmentation pathways of rutaecarpine and its derivatives based on high resolution tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Xiangnan University (湘南学院学报)*, 2017, 38(2): 24-29.