

2,6-二氟苄酰胺类生物碱的合成及抑菌活性研究

辛振强¹, 余小青², 张田勇², 李雪松², 舒亚平², 冯宝军², 谢天培¹, 钱勇^{1*}

(1. 上海诗丹德生物技术有限公司, 上海 201203; 2. 上海诗丹德标准技术服务有限公司, 上海 201203)

摘要 [目的]在苄基酰胺核心骨架上进行结构修饰,设计、合成新型辣椒碱类似物,并对其抑菌活性进行测定。[方法]以2,6-二氟苄胺为原料,通过N-酰化反应合成13个氟苄酰胺类生物碱(3a~3m),并通过质谱和核磁共振氢谱分析对其结构进行了表征。[结果]抑菌活性测定结果表明,化合物3a、3d、3e和3f对白菜软腐病菌具有明显的抑制作用,其抑菌圈直径分别为15、16、11和18 mm。[结论]苄基酰胺作为一种抑菌活性先导化合物,具有一定的潜力。

关键词 氟苄酰胺;生物碱;合成;抑菌活性

中图分类号 S48 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)25-0129-03

Study on the Synthesis and Antibacterial Activity of 2,6-Difluorobenzylamide Alkaloids

XIN Zhen-qiang¹, YU Xiao-qing², ZHANG Tian-yong² et al (1 Shanghai Standard Biotechnology Co., Ltd, Shanghai 201203; 2. Shanghai Standard Technology Co., Ltd, Shanghai 201203)

Abstract [Objective] To design and synthesize new capsaicinoids by structural modification on core framework of benzylamide, and evaluate their antibacterial activity. [Method] Taking 2,6-difluoro-benzylamine as materials, 13 fluorobenzylamine alkaloids (3a~3m) were synthesized by N-acylation reaction. Their structures were characterized by MS and ¹H NMR analysis. [Result] The determination results of antibacterial activity showed that compounds 3a, 3d, 3e and 3f had obvious inhibitory effects on *Erwinia carotorora*, and the diameter of their bacteriostatic circles were 15, 16, 11 and 18 mm, respectively. [Conclusion] As a kind of antibacterial active leading compound, benzyl amide has certain potential.

Key words Fluorobenzylamide; Alkaloid; Synthesis; Antibacterial activity

辣椒碱是茄科植物辣椒中含有的一种香草酰胺类化合物,在医药和农药领域具有广泛的用途。在医药领域,辣椒碱具有镇痛^[1]、抗癌^[2-3]、减肥^[4-5]等药理活性;在农药领域,辣椒碱表现出杀虫^[6-7]、抗菌^[8-10]等农用活性。作为生物农药,辣椒碱具有药效高、对环境和非靶标生物安全等优点,但从辣椒中直接提取的辣椒碱价格昂贵,且难以满足工业化生产的需求。辣椒碱的全合成早在20世纪30年代就有报道^[11],但目前价格仍然非常昂贵,不具有产业化前景。辣椒碱是由4-羟基-3-甲氧苄基胺和8-甲基-6-烯壬酸缩合形成的苄基酰胺结构,以此为先导化合物,文献中有合成与辣椒碱结构类似的苄基酰胺衍生物的报道^[12]。日本曹达公司开发的农用杀菌剂环氟菌胺(Cyflufenamid)也含有苄基酰胺结构,环氟菌胺主要通过抑制白粉病生活史(即发病过程)中菌丝分生吸器的形成和生长,次生菌丝的生长和附着器的形成,对多种白粉病不仅具有良好的保护兼治疗作用,而且具有良好的持效性和耐雨水冲刷性^[13]。从辣椒碱及环氟菌胺的分子结构来看,苄基酰胺是其共同的结构片段。笔者在苄基酰胺核心骨架上进行结构修饰,设计、合成新型辣椒碱类似物,并对其抑菌活性进行测定。以2,6-二氟苄胺为原料,通过N-酰化反应设计并合成了13个氟苄酰胺类化合物(3a~3m),并通过质谱及核磁共振分析鉴定了其化学结构,测定了化合物对白菜软腐病菌的抑菌活性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器与试剂。①仪器:WPR熔点仪(温度未校正,购

自上海精科仪器有限公司);LCQ Advantage离子阱液质联用仪(美国ThermoFisher公司);Bruker Avance III核磁共振仪(以TMS为内标,CDCl₃为溶剂,¹H NMR 500 MHz,瑞士Bruker BioSpin公司)。②试剂均为市售分析纯。二氯甲烷用五氧化二磷干燥,三乙胺用氢氧化钾干燥。对照药剂硫酸链霉素购自上海思域化工有限公司,纯度98.0%。

1.1.2 供试病原菌。白菜软腐病菌(*Erwinia carotorora*),由西北农林科技大学农药研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 目标化合物3a~3m的合成。目标化合物的合成路线如图1所示。以N-[(2,6-二氟-苄基)]辛酰胺(3j)为例。在50 mL梨形瓶中加入0.143 g化合物2,6-二氟苄胺和20 mL干燥的二氯甲烷,搅拌后加入0.2 mL三乙胺(1.4 mmol),0~5 °C下缓慢滴加溶于5 mL二氯甲烷的辛酰氯(0.178 g),滴加完毕后在室温下电磁搅拌30 min,使其充分反应,TLC跟踪[V(石油醚):V(乙酸乙酯)=2:1]直至原料反应完毕。依次用饱和碳酸氢钠、水和饱和食盐水各20 mL洗涤3次,无水硫酸钠干燥。硅胶柱层析[V(石油醚):V(乙酸乙酯)=3:1]纯化得到白色结晶3j 0.174 g,产率为65%。

1.2.2 目标化合物的抑菌活性测定。采用滤纸片法测定目标化合物的抑菌活性。将待测药剂配制成浓度10 mg/mL的丙酮溶液,用微量注射器吸取上述丙酮溶液2.0 μL,置于直径4.0 mm的滤纸片上(20 μg/片)。硫酸链霉素用经灭菌的去离子水配制,滤纸片载药量同样为20 μg/片。待溶剂挥干后,将滤纸片置于带菌牛肉膏培养基平板上,置于4 °C冰箱中30 min后,将平板于37 °C恒温箱中培养5~8 h,采用十字交叉法测量抑菌圈直径,每个处理重复3次,计算出抑菌圈平均直径。

基金项目 上海市科委科研项目(16142200200)。

作者简介 辛振强(1979—),男,山西新绛人,从事天然产物化学研究。
*通讯作者,高级工程师,硕士,从事天然产物化学研究。

收稿日期 2018-04-23;修回日期 2018-07-18

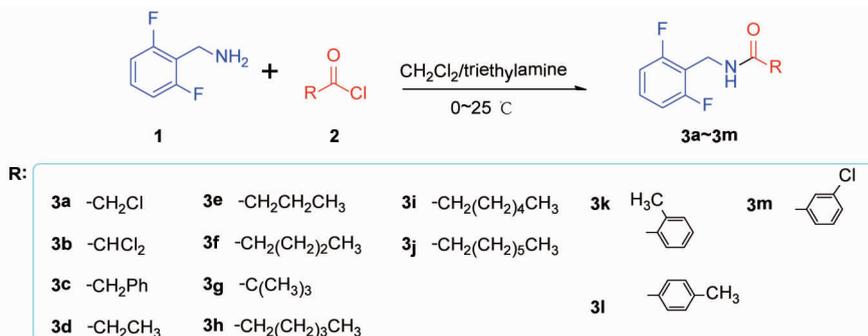


图1 目标化合物的合成路线

Fig. 1 Synthetic route of target compounds

2 结果与分析

2.1 目标化合物的性质与结构表征 化合物 3a (2-chloro-*N*-(2,6-difluorobenzyl) acetamide): 产率 65%, 白色固体, 熔点 84.1 ~ 84.8 °C。ESI/MS (negative mode), m/z 218 [M-H]⁻。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS), δ : 7.26 ~ 7.29 (m, 1H), 6.91 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 6.85 (br, 1H, NH), 4.60 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 4.05 (s, 2H)。

化合物 3b (2,2-dichloro-*N*-(2,6-difluorobenzyl) acetamide): 产率 54%, 白色固体, 熔点 111.8 ~ 112.3 °C。ESI/MS (negative mode), m/z 252 [M-H]⁻。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS), δ : 7.26 ~ 7.36 (m, 1H), 6.93 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 6.85 (br, 1H, NH), 5.93 (s, 1H), 4.62 (d, J = 5.5 Hz, 2H)。

化合物 3c (*N*-(2,6-difluorobenzyl)-2-phenylacetamide): 产率 71%, 白色固体, 熔点 114.0 ~ 115.9 °C。ESI/MS (negative mode), m/z 260 [M-H]⁻。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS), δ : 7.20 ~ 7.34 (m, 6H), 6.85 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 5.82 (br, 1H, NH), 4.50 (d, J = 5.5 Hz, 2H), 3.57 (s, 2H)。

化合物 3d (*N*-(2,6-difluorobenzyl) propionamide): 产率 82%, 白色固体, 熔点 105.0 ~ 105.9 °C。ESI/MS (negative mode), m/z 198 [M-H]⁻。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS), δ : 7.22 ~ 7.25 (m, 1H), 6.88 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 5.79 (br, 1H, NH), 4.54 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 2.19 (q, J = 7.5 Hz, 2H), 1.14 (t, J = 7.5 Hz, 3H)。

化合物 3e (*N*-(2,6-difluorobenzyl) butyramide): 产率 85%, 白色固体, 熔点 70.1 ~ 80.0 °C。ESI/MS (negative mode), m/z 212 [M-H]⁻。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS), δ : 7.22 ~ 7.25 (m, 1H), 6.88 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 5.79 (br, 1H, NH), 4.54 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 2.15 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.64 (q, J = 7.5 Hz, 2H), 0.91 (t, J = 7.5 Hz, 3H)。

化合物 3f (*N*-(2,6-difluorobenzyl) pentanamide): 产率 77%, 白色固体, 熔点 64.4 ~ 65.6 °C。ESI/MS (negative mode), m/z 226 [M-H]⁻。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS), δ : 7.22 ~ 7.26 (m, 1H), 6.88 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 5.80 (br, 1H, NH), 4.54 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 2.34 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.58 ~ 1.61 (m, 2H), 1.29 ~ 1.37 (m, 2H), 0.88 (t, J = 7.5 Hz, 3H)。

化合物 3g (*N*-(2,6-difluorobenzyl) pivalamide): 产率 69%, 白色固体, 熔点 93.5 ~ 94.3 °C。ESI/MS (negative

mode), m/z 218 [M-H]⁻。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS), δ : 7.22 ~ 7.25 (m, 1H), 6.89 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 5.96 (br, 1H, NH), 4.54 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 1.18 (s, 9H)。

化合物 3h (*N*-(2,6-difluorobenzyl) hexanamide): 产率 79%, 白色固体, 熔点 55.7 ~ 56.3 °C。ESI/MS (negative mode), m/z 240 [M-H]⁻。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS), δ : 7.22 ~ 7.26 (m, 1H), 6.89 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 5.77 (br, 1H, NH), 4.54 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 2.16 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.60 ~ 1.63 (m, 2H), 1.26 ~ 1.32 (m, 4H), 0.87 (t, J = 7.5 Hz, 3H)。

化合物 3i (*N*-(2,6-difluorobenzyl) heptanamide): 产率 75%, 白色固体, 熔点 50.8 ~ 51.0 °C。ESI/MS (negative mode), m/z 254 [M-H]⁻。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS), δ : 7.21 ~ 7.28 (m, 1H), 6.89 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 5.76 (br, 1H, NH), 4.54 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 2.16 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.61 ~ 1.64 (m, 2H), 1.26 ~ 1.29 (m, 6H), 0.86 (t, J = 7.5 Hz, 3H)。

化合物 3j (*N*-(2,6-difluorobenzyl) octanamide): 产率 80%, 白色固体, 熔点 51.8 ~ 52.2 °C。ESI/MS (negative mode), m/z 268 [M-H]⁻。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS), δ : 7.22 ~ 7.25 (m, 1H), 6.88 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 5.79 (br, 1H, NH), 4.54 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 2.16 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.61 ~ 1.64 (m, 2H), 1.25 ~ 1.26 (m, 8H), 0.86 (t, J = 7.5 Hz, 3H)。

化合物 3k (*N*-(2,6-difluorobenzyl)-2-methylbenzamide): 产率 54%, 白色固体, 熔点 113.7 ~ 115.1 °C。ESI/MS (negative mode), m/z 260 [M-H]⁻。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS), δ : 7.31 ~ 7.34 (m, 1H), 7.25 ~ 7.29 (m, 2H), 7.16 ~ 7.21 (m, 2H), 6.92 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 6.05 (br, 1H, NH), 4.74 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 2.42 (s, 3H)。

化合物 3l (*N*-(2,6-difluorobenzyl)-4-methylbenzamide): 产率 61%, 白色固体, 熔点 102.2 ~ 103.7 °C。ESI/MS (negative mode), m/z 260 [M-H]⁻。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS), δ : 7.66 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.24 ~ 7.27 (m, 1H), 7.21 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.91 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 6.44 (br, 1H, NH), 4.74 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 2.38 (s, 3H)。

化合物 3m (3-chloro-*N*-(2,6-difluorobenzyl) benzamide): 产率 69%, 白色固体, 熔点 94.6 ~ 95.5 °C。ESI/MS (negative mode), m/z 280 [M-H]⁻。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS), δ : 7.74 (s, 1H), 7.63 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.45

(d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.34~7.37(m, 1H), 7.27~7.29(m, 1H), 6.92(t, $J=8.0$ Hz, 2H), 6.45(br, 1H, NH), 4.74(d, $J=6.0$ Hz, 2H)。

2.2 目标化合物的抑菌活性 目标化合物对白菜软腐病菌的抑菌活性测定结果见表1。化合物3a、3d、3e和3f对白菜软腐病菌具有明显的抑菌活性,其抑菌圈直径分别为15、16、11和18 mm,阳性对照药剂硫酸链霉素的抑菌圈直径为16 mm,其余化合物在该剂量下对供试的白菜软腐病菌均未表现出明显的抑菌活性。初步的构效关系分析表明,引入较短的直链酰基对于抑菌活性较为有利,引入较大的基团(如芳酰基、支链酰基或较长的直链酰基)对于抑菌活性是不利的。

表1 目标化合物对白菜软腐病菌的抑菌圈直径

Table 1 The bacteriostatic circle diameter of target compounds on *Erwinia carotorora*

化合物 Compounds	抑菌圈直径 Diameter of bacteriostatic circle //mm	化合物 Compounds	抑菌圈直径 Diameter of bacteriostatic circle //mm
3a	15	3h	—
3b	—	3i	—
3c	—	3j	—
3d	16	3k	—
3e	11	3l	—
3f	18	3m	—
3g	—	硫酸链霉素 Strep- tomyacin sulfate	16

3 结论

该研究设计并合成了13个氟苄酰胺类生物碱,其中部

分化合物对植物致病细菌——白菜软腐病菌具有明显的抑菌活性。苄基酰胺作为一种抑菌活性先导化合物具有一定的潜力,值得在构效关系方面展开进一步研究。

参考文献

- [1] PEPPIN J F, MAJORS K, WEBSTER L R, et al. Tolerability of NGX-4010, a capsaicin 8% patch for peripheral neuropathic pain [J]. *J Pain Res*, 2011, 4: 385-392.
- [2] CHO W H, LEE H J, CHOI Y J, et al. Capsaicin induces apoptosis in MG63 human osteosarcoma cells via the caspase cascade and the antioxidant enzyme system [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 8(6): 1655-1662.
- [3] D'ELISEO D, MANZI L, VELOTTI F. Capsaicin as an inducer of damage-associated molecular patterns (DAMPs) of immunogenic cell death (ICD) in human bladder cancer cells [J]. *Cell stress chaperones*, 2013, 18(6): 801-806.
- [4] YU Q, WANG Y L, Yu Y, et al. Expression of TRPV1 in rabbits and consuming hot pepper affects its body weight [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(7): 7583-7589.
- [5] LEUNG F W. Capsaicin as an anti-obesity drug [J]. *Prog Drug Res*, 2014, 68: 171-179.
- [6] 刘新, 林永. 辣椒碱对桃蚜的生物活性及其与几种杀虫剂的联合作用 [J]. *农药学报*, 2003, 5(2): 94-96.
- [7] 李暮春, 张静, 古丽克孜·阿日甫, 等. 辣椒碱与茶皂素对棉蚜的毒力测定及田间药效试验 [J]. *新疆农业科学*, 2010, 47(6): 1132-1136.
- [8] SOETARNO S, YULINAH E. Antimicrobial activities of the ethanol extracts of capsicum fruits with different levels of pungency [J]. *JMS*, 1997, 2(2): 57-63.
- [9] 郑立稳, 孔学, 陈贯虹, 等. 辣椒碱酰胺类似物的合成及抑菌活性研究 [J]. *湖北农业科学*, 2016, 55(3): 631-633, 637.
- [10] 吴影, 古绍彬, 张永杰. 辣椒中辣椒碱抑菌作用的研究 [J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(29): 9130-9131.
- [11] SPATH E, DARLING S F. Synthesis of capsaicin [J]. *Dtsch Chem Ges*, 1930, 63(3): 11764-11765.
- [12] 孔学, 陈贯虹, 高永超, 等. 正壬酸香草酰胺的制备与杀虫活性研究 [J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(27): 13367-13369.
- [13] 张一宾. 新杀菌剂 Cyflufenamid 的开发 [J]. *世界农药*, 2006, 28(1): 4-9.

(上接第121页)

料未能够起到显著效果,可能与施用量有直接关系。

参考文献

- [1] 王庆成, 柴兰高, 李宗新, 等. 山东省玉米的生产现状与发展策略 [J]. *玉米科学*, 2006, 14(5): 159-162.
- [2] 王洪春. 专题讲座——第二十六讲 植物抗性生理 [J]. *植物生理学通讯*, 1981(6): 72-81, 59.
- [3] 陆景陵. 植物营养学 [M]. 2版. 北京: 中国农业大学出版社, 2003: 256-267.
- [4] 田忠孝, 曹季江. 有机质改良盐碱土的初步研究 [J]. *土壤肥料*, 1993(1): 16-19.
- [5] WANG Z C, LI Q S, LI X J, et al. Sustainable agriculture development in saline-alkali soil area of Songnen Plain, Northeast China [J]. *Chinese geographical science*, 2003, 13(2): 171-174.
- [6] YU Y, LIU J, LIU C M, et al. Effect of organic materials on the chemical properties of saline soil in the Yellow River Delta of China [J]. *Frontiers*

- [7] earth science, 2015(2): 259-267.
- [7] 吴敏, 薛立, 李燕. 植物盐胁迫适应机制研究进展 [J]. *林业科学*, 2007, 43(8): 111-117.
- [8] 鲍士旦. 土壤农化分析 [M]. 3版. 北京: 中国农业大学出版社, 2000: 16-274.
- [9] 谭军利, 康跃虎, 焦艳平, 等. 滴灌条件下种植年限对大田土壤盐分及pH值的影响 [J]. *农业工程学报*, 2009, 25(9): 43-50.
- [10] 彭正萍, 孙旭霞, 刘会玲, 等. 缺磷对不同基因型玉米苗期生长及氮磷钾吸收的影响 [J]. *河北农业大学学报*, 2009, 32(6): 8-13.
- [11] BORKERT C M, BARBER S A. Effect of supplying P to a portion of the soybean root system on root growth and P uptake kinetics [J]. *Journal plant nutrition*, 1983, 6(10): 895-910.
- [12] NIESEN N E, BARBER S A. Differences among genotypes of corn in the kinetics of P uptake [J]. *Agronomy journal*, 1978, 70(5): 695-698.
- [13] 赵伯善, 翟丙年, 韩燕来. 施磷对玉米和大豆苗期生长的影响 [J]. *西北农业大学学报*, 1995, 23(2): 54-59.

本刊提示 《安徽农业科学》是全国为数不多各大数据库同时收录的农业刊物之一。面向全国,融学术性、指导性于一体,既刊登作物育种与栽培、植物保护、土壤肥料、园艺、林业、蚕桑、烟草、茶叶、畜牧兽医、水产及其他农业相关科学的研究报告、综述、研究简报;也发表农业经济、农业科技管理、农业发展战略及农业产业化等方面的研究论文、调查报告和对策性文章等。