

· 快递论文 ·

超声辅助合成新型二氢嘧啶-2(1H)-硫酮衍生物及其生物活性研究

周 伟, 陈斯琴, 刘进兵*

(邵阳学院 食品与化学工程学院, 湖南 邵阳 422000)

摘要: 以苯乙酮与取代苯甲醛(**1a**~**1e**)为起始原料,在碱性条件下制得中间体查尔酮(**2a**~**2e**);在超声辅助下,合成了一系列硫代嘧啶酮类化合物(**3a**~**3e**),其中**3a**、**3d**和**3e**为新化合物,其结构经¹H NMR, ¹³C NMR, IR和MS(ESI)表征。研究了**3a**~**3e**对酪氨酸酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制活性及抗氧化活性。结果表明:4-(2-甲氧基苯基)-6-苯基-3,4-二氢嘧啶-2(1H)-硫酮(**3b**)抑制酪氨酸酶活性最好,IC₅₀为0.676 mmol·L⁻¹,与阳性对照曲酸相当。以**3b**为例进行了抑制酪氨酸酶动力学与分子对接研究。结果表明:**3b**为竞争型抑制剂,苯环可能为其活性基团。

关键词: 超声辅助; 嘧啶硫酮; 合成; 抗氧化活性; 抑制酪氨酸酶活性; 抑制 α -葡萄糖苷酶活性; 分子对接
中图分类号: O626.415 文献标志码: A DOI: 10.15952/j.cnki.cjsc.1005-1511.19222

Ultrasound-assisted Synthesis and Biological Activities of Novel Dihydropyrimidine-2(1H)-thione Derivatives

ZHOU Wei, CHEN Si-qin, LIU Jin-bing*

(School of Food and Chemical Engineering, Shaoyang University, Shaoyang 422000, China)

Abstract: Chalcones(**2a**~**2e**) were obtained from acetophenone and substituted benzaldehyde (**1a**~**1e**) under alkaline conditions. Then pyrimidine thione derivatives(**3a**~**3e**) were synthesized by ultrasound-assisted synthesis method from **2a**~**2e**. Among them, **3a**, **3d** and **3e** were novel compounds. The structures were characterized by ¹H NMR, ¹³C NMR, IR and MS(ESI). Inhibitory tyrosinase activities, inhibitory α -glucosidase activities and antioxidant activities of **3a**~**3e** were investigated. The results showed that 4-(2-methoxyphenyl)-6-phenyl-3,4-dihydropyrimidine-2(1H)-thione(**3b**) exhibited best inhibition on mushroom tyrosinase with IC₅₀ of 0.676 mmol·L⁻¹. The inhibitory kinetics and molecular docking were studied using **3b** as sample. Kinetic results showed that **3b** was a competitive inhibitor. Molecular docking results indicated that benzene ring might be an active group.

Keywords: ultrasound-assistance; pyrimidinone; synthesis; antioxidant activity; anti-tyrosinase activity; anti- α -glucosidase activity; molecular docking

酪氨酸酶是一种含铜离子的多酚氧化酶,具有独特的双重催化功能^[1-2]。人体黑色素的形成与酪氨酸酶有密切联系,黑色素过多会导致多种

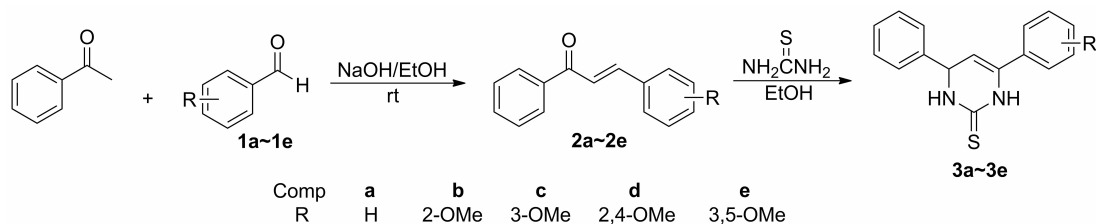
疾病,如人体皮肤色素障碍性疾病、神经衰弱类疾病等。此外,黑色素细胞异常与白癜风的形成也有很大关系^[3-4]。酪氨酸酶抑制剂主要用于食品

收稿日期: 2019-05-30; 修订日期: 2019-07-05

基金项目: 湖南省教育厅重点项目(15A172); 邵阳学院研究生科研创新项目(CX2018SY048)

作者简介: 周伟(1994-),男,汉族,湖南邵阳人,硕士研究生,主要从事食品质量与安全 and 有机合成的研究。

通信联系人: 刘进兵,博士,副教授, E-mail: syulijb@163.com



Scheme 1

保鲜、医疗保健以及农业病虫害防护等领域^[5]。市售酪氨酸酶抑制剂存在实际疗效低、毒副作用严重等问题^[6]。因此开发廉价高效低毒的酪氨酸酶抑制剂,成为化学合成工作者关注的焦点之一。

查尔酮具有广泛的生物活性,如抗糖尿病、抗逆转录病毒、抗炎、抗组胺、抑制和清除氧自由基、抗疟疾和抑制酪氨酸酶活性等^[7-9]。嘧啶酮类化合物的生物活性也较显著,如抗病毒、抗菌、抗癌、抗高血压、抗氧化等^[10]。Lam 等^[11]合成了一系列硫酮衍生物,该类化合物对酪氨酸酶有强抑制效果,IC₅₀ 为 0.87 ~ 1.49 μmol · L⁻¹。Robert 等^[12-13]为改善康普瑞汀的水溶性,设计并合成了一系列多甲氧基硫代嘧啶酮,发现此类化合物对白血病细胞、黑色素瘤细胞,以及抗原生物均有良好的抑制活性。

本文在前期研究的基础上,以苯乙酮与取代苯甲醛(**1a~1e**)为起始原料,在碱性条件下制得中间体查尔酮(**2a~2e**);在超声辅助下,合成了一系列硫代嘧啶酮类化合物(**3a~3e**, Scheme 1),其中 **3a**、**3d** 和 **3e** 为新化合物,其结构经 ¹H NMR, ¹³C NMR, IR 和 MS (ESI) 表征。研究了 **3a~3e** 对酪氨酸酶和 α-葡萄糖苷酶的抑制活性及抗氧化活性。以 **3b** 为例进行了抑制酪氨酸酶动力学与分子对接研究。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

WPX-4 型显微熔点仪;UV-1780 型紫外可见分光光度计;Bruker Ascend 400 MHz 型核磁共振仪(CDCl₃ 为溶剂, TMS 为内标);VECTOR 22 型红外光谱仪(KBr 压片);LCMS-2010 型质谱仪。

酪氨酸酶、α-葡萄糖苷酶、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 (ABTS), Sigma-Aldrich 公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH), Alfa Aesar 公司;其余所用试剂均为分析纯。

1.2 合成

(1) **2a~2e** 的合成通法^[14]

将苯乙酮 1.20 g (10 mmol) 和 **1a~1e** 10 mmol 溶于 15 mL 无水乙醇中,冰浴冷却,搅拌下缓慢滴加 10% NaOH 溶液 10 mL,滴毕,反应至终点(TLC 检测,展开剂:A = EA/PE = 1/4, V/V)。移入冰箱,静置,析出大量淡黄色固体,抽滤,滤饼用冷乙醇-水混合溶液洗涤,经 95% 乙醇重结晶,真空干燥得 **2a~2e**。

(2) **3a~3e** 的合成通法^[15]

在圆底烧瓶中加入 **2a~2e** 5 mmol 和硫脲 0.38 g (5 mmol),加入无水乙醇 30 mL 和氢氧化钠 0.5 g (12.5 mmol),于室温超声反应 20 min (TLC 检测,展开剂:A = 1/2)。蒸除部分溶剂,残余物用稀盐酸调至 pH = 7,移入冰箱,静置,析出固体,抽滤,固体用 95% 乙醇重结晶,真空干燥得 **3a~3e**。

4,6-二苯基-3,4-二氢嘧啶-2 (1*H*)-硫酮 (**3a**): 黄色固体 1.067 g, 收率 80.2%, m. p. 180 ~ 183 °C; ¹H NMR δ: 7.68 (s, 1H, NH), 7.47 ~ 7.36 (m, 10H, ArH), 6.81 (s, 1H, NH), 5.33 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, =CH), 5.23 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, CH); ¹³C NMR δ: 174.3, 142.4, 134.0, 133.3, 129.6, 129.1, 129.0, 128.6, 127.0, 125.3, 100.8, 57.2; IR ν: 3174, 1643, 1565, 1483, 1187 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z*: 267 [M⁺].

4-(2-甲氧基苯基)-6-苯基-3,4-二氢嘧啶-2 (1*H*)-硫酮 (**3b**): 淡黄色固体 1.054 g, 收率 71.2%, m. p. 192 ~ 194 °C; ¹H NMR δ: 7.55 (s, 1H, NH), 7.52 ~ 7.49 (m, 2H, ArH), 7.47 ~ 7.44 (m, 3H, ArH), 7.39 ~ 7.32 (m, 2H, ArH), 7.04 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H, ArH), 6.96 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, ArH), 6.90 (s, 1H, NH), 5.69 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H, =CH), 5.32 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H, CH), 3.84 (s, 3H, OCH₃); ¹³C NMR δ: 175.3,

156.2, 135.1, 133.6, 129.7, 129.6, 129.5, 129.0, 127.6, 125.3, 121.2, 110.6, 99.0, 55.5, 50.9; IR ν : 3149, 1556, 1482, 1186 cm^{-1} ; MS(ESI) m/z : 297 [M^+].

4-(3-甲氧基苯基)-6-苯基-3,4-二氢嘧啶-2(1H)-硫酮(**3c**): 淡黄色固体 0.980 g, 收率 66.2%, m. p. 191 ~ 194 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR δ : 7.66(s, 1H, NH), 7.43 ~ 7.41(m, 5H, ArH), 7.37(t, J = 7.4 Hz, 1H, ArH), 6.99(d, J = 7.0 Hz, 1H, ArH), 6.92 ~ 6.89(m, 2H, ArH), 6.77(s, 1H, NH), 5.29(d, J = 5.3 Hz, 1H, =CH), 5.24(d, J = 5.3 Hz, 1H, CH), 3.84(s, 3H, OCH_3); ^{13}C NMR δ : 160.2, 143.8, 134.0, 133.3, 130.3, 129.6, 129.0, 125.2, 119.1, 114.0, 112.6, 100.6, 57.2, 55.4; IR ν : 3175, 1670, 1575, 1487, 1195 cm^{-1} ; MS(ESI) m/z : 297 [M^+].

4-(2,4-二甲氧基苯基)-6-苯基-3,4-二氢嘧啶-2(1H)-硫酮(**3d**): 淡黄色固体 0.835 g, 收率 51.1%, m. p. 165 ~ 168 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR δ : 7.55(s, 1H, NH), 7.51 ~ 7.49(m, 2H, ArH), 7.47 ~ 7.43(m, 3H, ArH), 7.27(d, J = 7.2 Hz, 1H, ArH), 6.85(s, 1H, NH), 6.53(d, J = 6.5 Hz, 1H, ArH), 6.51(s, 1H, ArH), 5.61(d, J = 5.6 Hz, 1H, =CH), 5.28(d, J = 5.6 Hz, 1H, CH), 3.89(s, 3H, OCH_3), 3.84(s, 3H, OCH_3); ^{13}C NMR δ : 175.3, 156.2, 135.1, 133.6, 129.7, 129.6, 129.5, 129.0, 127.6, 125.3, 121.2, 110.6, 99.0, 55.5, 50.9; IR ν : 1554, 1476, 1176 cm^{-1} ; MS(ESI) m/z : 327 [M^+].

4-(3,5-二甲氧基苯基)-6-苯基-3,4-二氢嘧啶-2(1H)-硫酮(**3e**): 类白色固体 0.820 g, 收率 50.2%, m. p. 220 ~ 223 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR δ : 7.64(s, 1H, NH), 7.46 ~ 7.42(m, 5H, ArH), 6.72(s, 1H, NH), 6.53(d, J = 6.5 Hz, 1H, ArH), 6.46(t, J = 6.5 Hz, 1H, ArH), 5.25(d, J = 5.6 Hz, 1H, =CH), 5.22(d, J = 5.6 Hz, 1H, CH), 3.89(s, 3H, OCH_3), 3.82(s, 6H, 2OCH_3); ^{13}C NMR δ : 175.1, 161.4, 144.5, 134.1, 133.3, 129.6, 129.0, 125.2, 104.9, 100.5, 100.3, 57.3, 55.5; IR ν : 3170, 1566, 1489, 1194 cm^{-1} ; MS(ESI) m/z : 327 [M^+].

1.3 生物活性测试
按文献^[16-17]方法测定酪氨酸酶与 α -葡萄糖苷酶抑制活性。参考 Blois^[18] 方法测试 DPPH 清除活性,参考 Pellegrini^[19] 方法测试 ABTS⁺ 清除活性。参考 Ismaya^[20] 方法,以化合物 **3b** 为例,采用 Discovery Studio 软件进行分子对接研究。

2 结果与讨论

2.1 合成
合成了一系列硫代嘧啶酮类衍生物,其收率为 50.2% ~ 80.2%。当苯环上无取代基时,收率最高(**3a**, 80.2%)。当苯环 3-位和 5-位被甲氧基取代时,收率最低(**3e**, 50.2%)。初步推测:苯环上的取代基会降低底物的反应活性;对于甲氧基取代,邻位取代收率高于间位取代;甲氧基数目增多,收率降低。

2.2 酪氨酸酶抑制活性与 α -葡萄糖苷酶抑制活性

表 1 为化合物 **3a** ~ **3e** 对酪氨酸酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制活性。由表 1 可见,化合物 **3a** 与化合物 **3b** 具有一定的酪氨酸酶抑制活性,其 IC_{50} 分别为 1.097 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 0.676 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,与阳性对照药曲酸接近。其余化合物的抑制活性均弱于曲酸,说明 2-位甲氧基取代可能有利于提高抑制活性,但甲氧基取代基位置和数目增加对抑制活性不利,这可能与甲氧基的共轭效应与位阻效应有关。由表 1 还可见,所有化合物均具有一定的抑制 α -葡萄糖苷酶活性,**3e** 的抑制活性最高(54.8%)。

表 1 3a ~ 3e 对酪氨酸酶与 α -葡萄糖苷酶的抑制活性
Table 1 Tyrosinase and alpha glucosidase inhibitory activities of 3a ~ 3e

Comp	酪氨酸酶抑制活性 ^a	α -葡萄糖苷酶抑制活性 ^a
3a	79.82% ^b (IC_{50} = 1.097 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	35.47% ^b
3b	87.15% ^b (IC_{50} = 0.676 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	23.38% ^b
3c	56.24% ^b	7.31% ^b
3d	56.90% ^b	31.65% ^b
3e	46.28% ^b	54.80% ^b
曲酸	IC_{50} = 0.625 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	—

^a3 次试验平均值; ^b10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的抑制率。

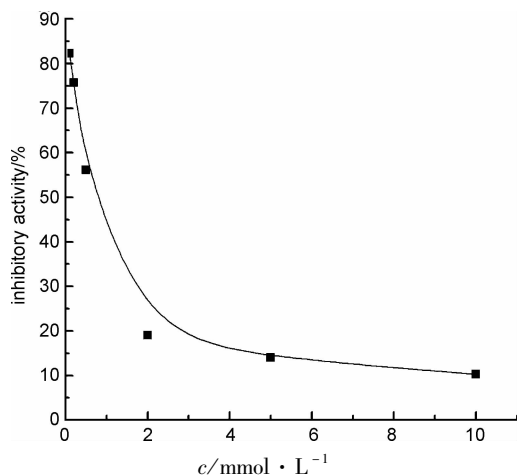
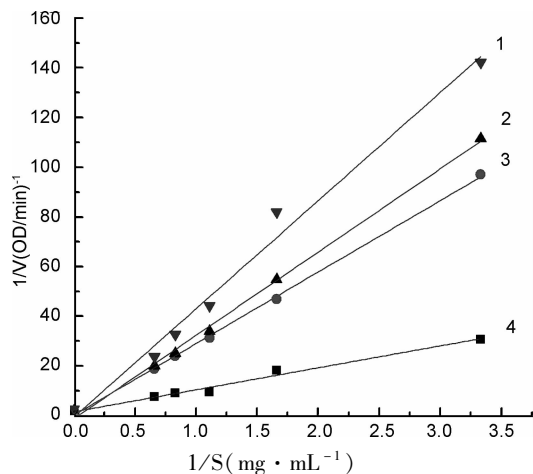
图1 化合物**3b**对酪氨酸酶的抑制作用曲线Figure 1 Inhibitory activity curve of **3b** on tyrosinase图2 化合物**3b**对酪氨酸酶的抑制动力学曲线Figure 2 Inhibitory kinetics curve of **3b** on tyrosinase

图1为化合物**3b**对酪氨酸酶的抑制作用曲线。由图1可见,随着**3b**浓度的增加,酪氨酸酶的活性降低。

表2 化合物**3a~3e**的抗氧化活性Table 2 Antioxidant activities of the **3a~3e**

Compounds	IC ₅₀ /mmol · L ⁻¹	
	DPPH · 清除活性	ABTS ⁺ 清除活性
3a	15.20	0.58
3b	8.30	0.23
3c	12.03	0.46
3d	15.90	0.32
3e	10.24	0.68

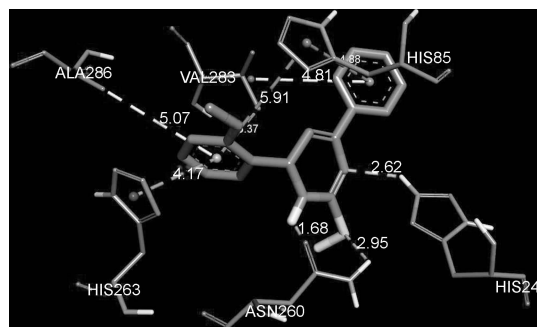
2.3 抗氧化活性

表2为**3a~3e**的抗氧化活性。由表2可见,所有化合物均具有一定的DPPH ·、ABTS⁺清除

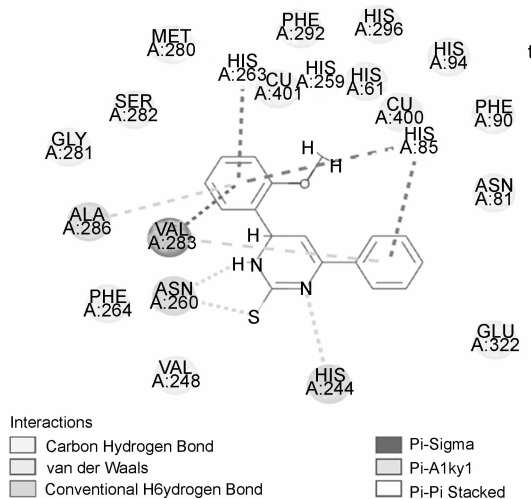
活性,其中化合物**3b**的抗氧化活性最好,说明抑制酪氨酸酶活性与抗氧化活性可能存在相关性。

2.4 抑制动力学

以**3b**为例,研究了抑制动力学(图2)。由图2可知,化合物**3b**为竞争性抑制剂。



A: 分子对接三维图



B: 分子对接二维图

图3 **3b**与酪氨酸酶的对接模拟Figure 3 The docking simulation of tyrosinase and **3b**

2.5 分子对接

化合物**3b**与2Y9X的自由结合能为 $-28.01 \text{ Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$,说明该化合物与酪氨酸酶有稳定的结合构象。图3A为化合物**3b**与2Y9X氨基酸残基的对接图,由图3A可知,苯环与VAL(283)以 π 键方式结合,其键长为 $4.81 \text{ \AA}$,与氨基酸HIS(263)以及HIS(85)以 $\pi-\pi$ 键方式结合,其键长分别为 $4.17 \text{ \AA}$ 和 $4.88 \text{ \AA}$,与ALA(286)以及VAL(283)形成烷基,以 π 键方式结合,其键长分别为 $5.07 \text{ \AA}$ 和 $3.37 \text{ \AA}$;苯环上的甲氧基与HIS(259)HIS(85)以氢键方式结合,其键长分别为 $3.37 \text{ \AA}$ 和 $5.91 \text{ \AA}$;嘧啶环上的氮原子和硫原子与氨基酸ASN以及HIS形成氢键,其键长分别为 $2.95 \text{ \AA}$ 、

1.68 Å 和 2.62 Å。图 3B 为分子对接二维图。由图 3B 可见,苯环与铜离子 401 和铜离子 400 之间存在作用力。由此可推测:来源于醛的苯环可能为该类化合物抑制酪氨酸酶活性的必需片段。

3 结论

以苯乙酮与取代苯甲醛为起始原料,在超声辅助下,合成了一系列硫代嘧啶酮类化合物(3a~3e)。研究了 3a~3e 对酪氨酸酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制活性及抗氧化活性。结果表明:4-(2-甲氧基苯基)-6-苯基-3,4-二氢嘧啶-2(1H)-硫酮(3b)抑制酪氨酸酶活性最好,IC₅₀ 为 0.676 mmol · L⁻¹,与阳性对照曲酸相当。以 3b 为例进行了抑制酪氨酸酶动力学与分子对接研究。结果表明:3b 为竞争型抑制剂,苯环可能为活性基团。

参考文献

[1] FABIAN M, SONJA S, MARKUS G, *et al.* Mushroom tyrosinase-based enzyme inhibition assays are not suitable for bioactivity-guided fractionation of extracts[J]. J Nat Prod, 2019, **82**(1):136–147.

[2] ULLAH S, PARK Y J, PARK C, *et al.* Antioxidant, anti-tyrosinase and anti-melanogenic effects of (*E*)-2, 3-diphenylacrylic acid derivatives [J]. Bioorg Med Chem, 2019, **27**(11):2192–2200.

[3] WANG Y, XU L Y, LIU X, *et al.* Artopithecins A-D, prenylated 2-arylbenzofurans from the twigs of *Artocarpus pithecolobus* and their tyrosinase inhibitory activities [J]. Chem Pharm Bull, 2018, **66**(12):1199–1202.

[4] NGUYEN H, NGUYEN N, NGUYEN M, Lee T, *et al.* Tyrosinase inhibitory activity of flavonoids from *Artocarpus heterophyllus* [J]. Chem Cent J, 2016, **10**(2):1–6.

[5] ZHANG L, ZHAO X, TAO G, *et al.* Investigating the inhibitory activity and mechanism differences between norartocarpetin and luteolin for tyrosinase A combinatory kinetic study and computational simulation analysis [J]. Food Chem, 2017, **223**:40–48.

[6] GUERRERO A, ROSELL G. Biorational approaches for insect control by enzymatic inhibition [J]. Curr Med Chem, 2005, **12**(4):461–469.

[7] 刘进兵,唐君源. 卤代查尔酮氨基硫脲席夫碱的合成及生物活性研究[J]. 化学通报, 2017, **80**(01):77–83.

[8] CHU W C, BAI P Y, YANG Z Q, *et al.* Synthesis and antibacterial evaluation of novel cationic chalcone derivatives possessing broad spectrum antibacterial ac-

tivity[J]. Eur J Med Chem, 2018, **143**:905–921

[9] 杨争,米热古丽·买买提明,木合布力·阿布力孜,等. 卤代查尔酮类衍生物的合成及其抗宫颈癌活性[J]. 合成化学, 2019, **27**(01):50–55.

[10] GUPTA R, CHAUDHARY R P. Efficient ionic liquid-catalysed synthesis and antimicrobial studies of 4,6-diaryl- and 4,5-fused pyrimidine-2-thiones[J]. J Chem Res, 2012, **36**(12):718–721.

[11] LAMK W, SYAHIDA A, ULHAO Z, *et al.* Synthesis and biological activity of oxadiazole and triazolothiadiazole derivatives as tyrosinase inhibitors [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2010, **20**(12):3755–3759.

[12] LAUREN L, RYAN D, JENNA V, *et al.* 1,2,3,4-Tetrahydro-2-thioxopyrimidine analogs of combretastatin-A4 [J]. Eur J Med Chem, 2008, **43**:2011–2015.

[13] DEREJE D, ROBERT S, LAUREN L, *et al.* 1,2,3,4-Tetrahydro-2-thioxopyrimidine analogs of combretastatin-A4 [J]. Med Chem Res, 2011, **20**:364–369.

[14] LIU J B, CHEN C, WU F, *et al.* Microwave-assisted synthesis and tyrosinase inhibitory activity of chalcone derivatives [J]. Chem Biol Drug Des, 2013, **82**(1):39–47.

[15] JAVAD S G, MOHAMMAD A G. Ultrasound-assisted synthesis of dihydropyrimidine-2-thiones [J]. J Serb Chem Soc, 2011, **76**(5):679–684.

[16] LIU J B, YI W, WAN Y Q, *et al.* 1-(1-Arylethylidene)-thiosemicarbazide derivatives: A new class of tyrosinase inhibitors [J]. Bioorg Med Chem, 2008, **16**(3):1096–1102.

[17] WANG M Y, CHENG X C, CHEN X B, *et al.* Synthesis and biological evaluation of novel *N*-aryl- ω -(benzazol-2-yl)-sulfanyllalkanamides as dual inhibitors of α -glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B [J]. Chem Biol Drug Des, 2018, **92**(3):1647–1656.

[18] BLOIS M S. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of medically important mushrooms using different solvents and chemical composition *via* GC/MS analyses [J]. Nature, 1958, **181**:1199–1200.

[19] RE R, PELLEGRINI N, PROTEGGENTE A, *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay [J]. Free Radical Bio Med, 1999, **26**(9,10):1231–1237.

[20] ISMAYA W T, ROZEBOOM H J, WEJIN A, *et al.* Crystal structure of *agaricus bisporus* mushroom tyrosinase: Identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone [J]. Biochemistry, 2011, **50**(24):5477–5486.