

吡嗪酰胺类似物的设计、合成及杀菌活性

王刚, 梁爽, 单忠刚, 英君伍, 吕亮, 李斌, 杨辉斌

(沈阳中化农药化工研发有限公司, 新农药创制与开发国家重点实验室, 农药国家工程研究中心, 沈阳 110021)

摘要 以取代吡嗪酸和2-甲基-3-硝基苯酚为原料, 经4步反应合成了16个吡嗪酰胺类似物(化合物1~16), 其结构经核磁共振波谱(^1H NMR和 ^{13}C NMR)及高分辨质谱(HRMS)确证. 杀菌活性测试结果表明, 吡嗪酰胺类似物浓度为6.25 mg/L时对玉米锈病具有优异的杀菌活性, 其中化合物4, 5, 7, 8, 15和16对玉米锈病的杀菌活性为100%. 分子对接模拟结果显示, 化合物16通过氢键与琥珀酸脱氢酶(SDH)的TRP-173相互作用, 这可以解释化合物16与目标蛋白之间可能的作用机制. 研究结果表明, 化合物16是一种具有潜在前景的杀菌剂候选物, 为进一步研究提供了参考.

关键词 吡嗪酰胺; 合成; 杀菌活性; 分子对接

中图分类号 O626

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20240369

Design, Synthesis and Fungicidal Activity of Pyrazinamide Analogs

WANG Gang, LIANG Shuang, SHAN Zhonggang, YING Junwu,

LYU Liang, LI Bin, YANG Huibin*

(National Engineering Research Center of Pesticide, State Key Laboratory of the Discovery and Development of Novel Pesticide, Shenyang Sinochem Agrochemicals R&D Co., Ltd., Shenyang 110021, China)

Abstract Pyraziflumid was a novel pyrazinamide analog fungicide developed by Nihon Nohyaku Co. In this work, 16 pyrazinamide analogs were synthesized using substituted pyrazine acid and 2-methyl-3-nitrophenol as initial materials through 4 steps. The structures of the target compounds were confirmed by nuclear magnetic resonance (^1H NMR, ^{13}C NMR) and high resolution mass spectrometer (HRMS). The results of fungicidal activity at greenhouse showed that pyrazinamide analogs had excellent fungicidal activities against corn rust at 6.25 mg/L. Among them, the fungicidal activities of compounds 4, 5, 7, 8, 15 and 16 against corn rust at 6.25 mg/L were 100%. Molecular docking simulations revealed that compound 16 interacted with TRP-173 of succinate dehydrogenase (SDH) through hydrogen bonding, which could explain the probable mechanism of action between compound 16 and the target protein. These results indicated that compound 16 might be a promising fungicide candidate and provide valuable reference for further investigation.

Keywords Pyrazinamide; Synthesis; Fungicidal activity; Molecular docking

由于可耕地减少和人口增加, 导致全球粮食供应无法满足当前需求. 由各种植物病原真菌引起的植物疾病每年使全球主要粮食作物和经济作物的产量减少20%^[1-4], 这不仅直接或间接地造成巨大的经济损失^[5], 而且威胁到全球粮食安全和人类健康^[6-11]. 由病原真菌引起的植物疾病的后果可能是灾难性的^[12]. 一些真菌能产生霉菌毒素, 对人类和动物的健康构成严重威胁^[13].

大多数情况下, 化学杀菌剂仍然是控制真菌病害的最经济有效的手段, 因此化学杀菌剂保护仍然

收稿日期: 2024-07-28. 网络首发日期: 2024-08-21.

联系人简介: 杨辉斌, 男, 博士, 正高级工程师, 主要从事新农药创制研发方面的研究. E-mail: yanghuibin@yangnongchem.com

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(批准号: 2011BAE06B01-05)资助.

Supported by the “12th Five Year Plan” National Science and Technology Support Project, China(No.2011BAE06B01-05).

是作物保护中最广泛使用的控制方法。目前,世界各大农药公司已开发和推出了各种化学杀菌剂^[14-17]。由于商业化杀菌剂的频繁和过度使用,病原真菌已对现有杀菌剂产生了严重的抗药性^[18]。因此,迫切需要设计和开发具有新颖作用模式、对非目标生物高度安全、高效、低毒和广谱杀菌性的新型杀菌剂^[19,20]。

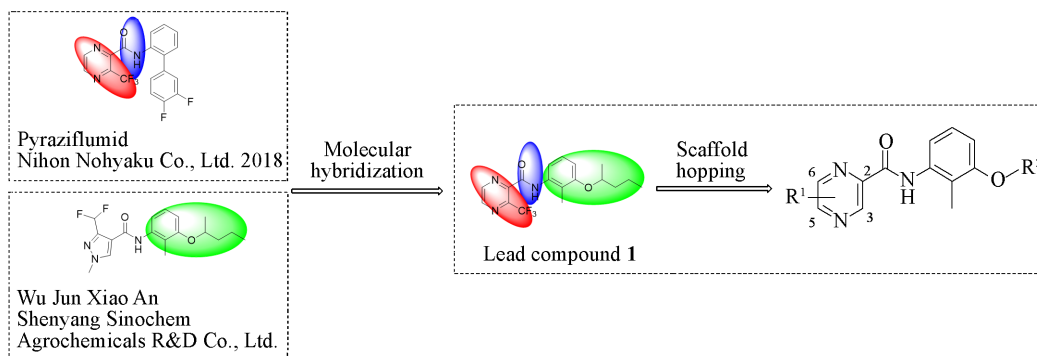
琥珀酸脱氢酶抑制剂(SDHI)杀菌剂属于病原真菌的呼吸抑制剂,其通过干扰呼吸电子传递链复合体II上的三羧酸循环来抑制线粒体的功能,从而阻断病原真菌的生长^[21,22],被杀菌剂抗性行动委员会(FRAC)分为第7组。

SDHI杀菌剂的常见结构主要由三部分组成,包括1个疏水尾部、1个极性部分及作为连接体的酰胺键^[23]。近年来,通过对SDHI杀菌剂的深入研究发现,超过一半的商业化SDHI杀菌剂均含有吡唑-4-羧酰胺片段。但仍有一些其它杂环酰胺被开发出来,如联苯吡嗪菌胺是由Nihon Nohyaku公司于2018年开发的吡嗪酰胺类杀菌剂。作为SDHIs的极性部分,吡嗪环不仅增强了杀菌剂与病原体之间的亲和力,而且有助于改善杀菌剂在植物体内的传导性和分布,从而增强其抗真菌效果。

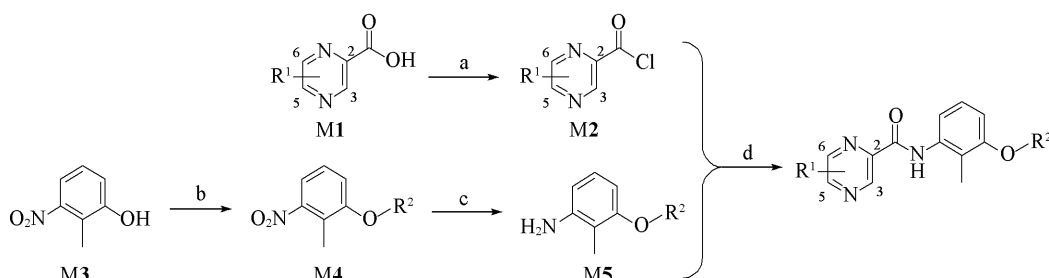
研究证实,将柔性酰胺侧链引入酰胺结构是开发SDHI杀菌剂的有效策略^[24-32]。因此,基于酰胺侧链结构优化的新型SDHI杀菌剂的发现将是一个重要研究方向。

基于分子杂交,将两个或多个具有生物活性骨架的药效团组合起来,是发现新型农药和药物的最成功策略之一^[33-39]。另一种广泛采用的设计方法,即骨架跃迁策略(如生物等排替换和插入),为已知先导化合物的修饰提供了方法,从而可高效率地设计含新颖结构的化合物^[40-48]。

为了寻找新型SDHI,本文将联苯吡嗪菌胺与戊菌酰胺杂交结合作为先导化合物(化合物15)^[49],并尝试通过骨架跃迁用扩展的取代苯胺替换先导化合物15中的2-戊氧基苯(Scheme 1)。通过一种简单的合成方法,设计合成了一系列新型吡唑-4-羧酰胺衍生物(Scheme 2),评估了目标化合物对玉米锈病的杀菌活性,并讨论了其构效关系(SARs)。



Scheme 1 Design strategy of target compounds



- 1: R¹=3-Me, R²=Me; 2: R¹=3-Me, R²=Et; 3: R¹=3-Me, R²=*i*-Pr; 4: R¹=3-Me, R²=*s*-Bu; 5: R¹=3-Me, R²=*s*-Pent; 6: R¹=3-Me, R²=*s*-s-Pent; 7: R¹=3-Me, R²=*R*-*s*-Pent; 8: R¹=3-Me, R²=*s*-Hex; 9: R¹=H, R²=*s*-Pent; 10: R¹=H, R²=*s*-Hex; 11: R¹=5-Me, R²=*s*-Pent; 12: R¹=5-Me, R²=*s*-Hex; 13: R¹=6-Me, R²=*s*-Pent; 14: R¹=6-Me, R²=*s*-Hex; 15: R¹=3-CF₃, R²=*s*-Pent; 16: R¹=3-CF₃, R²=*s*-Hex

Scheme 2 General synthetic route for target compounds

Reagents and conditions: a. SOCl₂, toluene, r. t. to 80 °C; b. R²-X (X=Br, I), K₂CO₃, DMF, r. t. to reflux; c. hydrazine hydrate(85%), CH₃CH₂OH, r. t. to reflux.; d. Et₃N, CH₂Cl₂, 0 °C to r. t.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

不同取代的吡嗪-2-羧酸、2-甲基-3-硝基苯酚、卤代烷 R^2-X 和 10% (质量分数) 钯碳, 纯度均为 98%, 南京协尊医药科技有限公司; N,N -二甲基甲酰胺 (DMF)、85% (质量分数) 水合肼, 二氯甲烷、三乙胺、氯化亚砷、乙醇、甲苯、碳酸钾、无水硫酸镁、乙酸乙酯和石油醚, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。

JNM-ECZ600R 型核磁共振波谱仪 (1H NMR 和 ^{13}C NMR), 日本 JEOL 公司; M-565 型熔点仪, 瑞士 Buchi 公司; Q Exactive focus LC/MS/MS 型高分辨质谱仪 (HRMS), 美国 Thermo Fisher 公司; ZF-20D 型暗箱式紫外分析仪, 巩义市予华仪器有限公司。

1.2 实验过程

1.2.1 中间体 **M2** 的制备 向反应瓶中加入 1.04 mmol 不同取代的吡嗪-2-甲酸、30 mL 甲苯和 2 mL 氯化亚砷, 回流反应 4 h, 旋转蒸发除去多余的氯化亚砷和溶剂, 将残余物溶于 10 mL 二氯甲烷溶液中备用。

1.2.2 中间体 **M4** 的制备 向反应瓶中依次加入 12.25 g (80.00 mmol) 2-甲基-3-硝基苯酚 和 88.00 mmol R^2-X , 将其溶于 80 mL DMF 中, 加入 13.27 g (96.00 mmol) 碳酸钾后加热升温至 80 $^{\circ}C$, 保温反应 2 h 后, 用薄层色谱 (TLC) 监测至反应完成。将反应液倾入冰水中, 有大量白色固体或浅黄色固体析出, 经抽滤、干燥, 得到中间体 **M4**。

1.2.3 中间体 **M5** 的制备 向反应瓶中加入 50.00 mmol 中间体 **M4**, 将其溶于 50 mL 乙醇中, 随后加入 0.5 g 10% 钯碳, 冰浴搅拌下滴加 20.02 g (400.00 mmol) 质量分数为 85% 的水合肼溶解, 滴加完毕后升温至室温, 反应 4 h, 用 TLC 监测至反应完成。过滤反应液除去钯碳, 旋转蒸发除去溶剂乙醇后, 用乙酸乙酯 (500 mL \times 2) 和水 (250 mL) 萃取, 有机层经饱和食盐水洗涤, 以无水硫酸镁干燥, 减压浓缩, 残余物经柱色谱提纯 [V (乙酸乙酯): V (石油醚) = 1:3], 得到中间体 **M5**。

1.2.4 目标化合物的制备 向反应瓶中加入 1.04 mmol 中间体 **M5**, 用 10 mL 二氯甲烷溶解后加入 1 mL 三乙胺。将第一步制备的酰氯的二氯甲烷滴入反应液中, 于室温反应 2 h。将反应液倒入 50 mL 水中, 用二氯甲烷萃取 (100 mL \times 2), 合并有机层, 用无水硫酸镁干燥, 经抽滤, 减压蒸除溶剂。残余物通过柱色谱提纯 [V (乙酸乙酯): V (石油醚) = 1:5], 得到目标化合物。

目标化合物的理化数据及高分辨质谱数据列于表 1, 1H NMR and ^{13}C NMR 数据列于表 2。

Table 1 Physical properties of compounds 1—16

Compd.	Appearance	Yield (%)	m. p./ $^{\circ}C$	HRMS (ESI)
1	White solid	73	153—154	Calcd. for $C_{14}H_{16}N_3O_2$ $[M+H]^+$: 258.1164, found: 258.1234
2	White solid	73	123—125	Calcd. for $C_{15}H_{18}N_3O_2$ $[M+H]^+$: 272.1321, found: 272.1391
3	White solid	79	117—119	Calcd. for $C_{16}H_{20}N_3O_2$ $[M+H]^+$: 286.1477, found: 286.1548
4	Yellow solid	84	76—77	Calcd. for $C_{17}H_{22}N_3O_2$ $[M+H]^+$: 300.1634, found: 300.1703
5	Brown oil	78	52—54	Calcd. for $C_{18}H_{24}N_3O_2$ $[M+H]^+$: 314.1790, found: 314.1859
6	Yellow solid	75	59—61	Calcd. for $C_{18}H_{24}N_3O_2$ $[M+H]^+$: 314.1790, found: 314.1860
7	White solid	76	59—60	Calcd. for $C_{18}H_{24}N_3O_2$ $[M+H]^+$: 314.1790, found: 314.1859
8	Light yellow oil	76		Calcd. for $C_{19}H_{26}N_3O_2$ $[M+H]^+$: 328.1947, found: 328.2016
9	Black solid	84	67—69	Calcd. for $C_{17}H_{22}N_3O_2$ $[M+H]^+$: 300.1634, found: 300.1703
10	Red oil	70		Calcd. for $C_{18}H_{24}N_3O_2$ $[M+H]^+$: 314.1790, found: 314.1860
11	Brown solid	63	68—70	Calcd. for $C_{18}H_{24}N_3O_2$ $[M+H]^+$: 314.1790, found: 314.1860
12	Red oil	66		Calcd. for $C_{19}H_{26}N_3O_2$ $[M+H]^+$: 328.1947, found: 328.2015
13	Red solid	71	70—71	Calcd. for $C_{18}H_{24}N_3O_2$ $[M+H]^+$: 314.1790, found: 314.1859
14	Red solid	50	43—45	Calcd. for $C_{19}H_{26}N_3O_2$ $[M+H]^+$: 328.1947, found: 328.2018
15	White solid	69	109—111	Calcd. for $C_{18}H_{21}F_3N_3O_2$ $[M+H]^+$: 368.1508, found: 368.1580
16	White solid	74	91—93	Calcd. for $C_{19}H_{23}F_3N_3O_2$ $[M+H]^+$: 382.1664, found: 382.1734

Table 2 ^1H NMR and ^{13}C NMR data of compounds 1—16

Compd.	^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ	^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ
1	9.87(s, 1H), 8.56(d, $J=2.5$ Hz, 1H), 8.35(d, $J=2.5$ Hz, 1H), 7.72(d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.14(t, $J=8.2$ Hz, 1H), 6.64(d, $J=8.2$ Hz, 1H), 3.77(s, 3H), 3.00(s, 3H), 2.18(s, 3H)	162.22, 157.82, 156.04, 146.17, 142.64, 139.97, 136.52, 126.66, 117.36, 114.57, 107.13, 55.72, 24.05, 9.79
2	9.90(s, 1H), 8.63(d, $J=2.5$ Hz, 1H), 8.42(d, $J=2.2$ Hz, 1H), 7.74(d, $J=8.1$ Hz, 1H), 7.17(t, $J=8.3$ Hz, 1H), 6.69(d, $J=8.3$ Hz, 1H), 4.03(q, $J=6.9$ Hz, 2H), 3.04(s, 3H), 2.23(s, 3H), 1.82(s, 1H), 1.41(t, $J=7.0$ Hz, 3H)	162.29, 157.28, 156.17, 146.17, 142.80, 140.00, 136.52, 126.65, 117.77, 114.57, 108.43, 64.10, 24.08, 15.04, 9.89
3	9.86(s, 1H), 8.56(d, $J=2.5$ Hz, 1H), 8.35(d, $J=2.5$ Hz, 1H), 7.71(d, $J=8.2$ Hz, 1H), 7.12(t, $J=8.2$ Hz, 1H), 6.67(d, $J=8.2$ Hz, 1H), 4.47(hept, $J=6.1$ Hz, 1H), 3.00(s, 3H), 2.18(s, 3H), 1.29(d, $J=6.2$ Hz, 6H)	162.18, 156.26, 156.03, 146.15, 142.70, 139.97, 136.73, 126.51, 118.80, 114.48, 110.50, 70.85, 24.06, 22.32, 10.09
4	9.87(s, 1H), 8.57(d, $J=2.6$ Hz, 1H), 8.36(d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.70(d, $J=8.2$ Hz, 1H), 7.12(t, $J=8.1$ Hz, 1H), 6.67(d, $J=8.3$ Hz, 1H), 4.26(h, $J=6.1$ Hz, 1H), 3.01(s, 3H), 2.20(s, 3H), 1.72(dp, $J=14.3, 7.2$ Hz, 1H), 1.61(dq, $J=13.8, 7.0$ Hz, 1H), 1.25(d, $J=6.2$ Hz, 3H), 0.95(t, $J=7.6$ Hz, 3H)	162.20, 156.47, 156.05, 146.15, 142.73, 139.98, 136.70, 126.51, 118.72, 114.37, 110.18, 75.69, 29.36, 24.06, 19.44, 10.06, 9.85
5	9.89(s, 1H), 8.61(d, $J=2.6$ Hz, 1H), 8.40(d, $J=2.5$ Hz, 1H), 7.72(d, $J=8.1$ Hz, 1H), 7.15(t, $J=8.2$ Hz, 1H), 6.70(d, $J=8.3$ Hz, 1H), 4.35(h, $J=6.1$ Hz, 1H), 3.03(s, 3H), 2.21(s, 3H), 1.78—1.68(m, 1H), 1.59—1.50(m, 1H), 1.52—1.43(m, 1H), 1.45—1.35(m, 1H), 1.27(d, $J=6.1$ Hz, 3H), 0.92(t, $J=7.3$ Hz, 3H)	162.24, 156.52, 156.13, 146.16, 142.79, 139.99, 136.69, 126.54, 118.78, 114.40, 110.18, 74.36, 38.86, 24.09, 19.96, 18.85, 14.21, 10.10
6	9.89(s, 1H), 8.61(d, $J=2.6$ Hz, 1H), 8.40(d, $J=2.5$ Hz, 1H), 7.72(d, $J=8.5$ Hz, 1H), 7.15(t, $J=8.2$ Hz, 1H), 6.70(d, $J=8.3$ Hz, 1H), 4.35(h, $J=6.1$ Hz, 1H), 3.04(s, 3H), 2.21(s, 3H), 1.78—1.69(m, 1H), 1.59—1.35(m, 3H), 1.27(d, $J=6.1$ Hz, 3H), 0.92(t, $J=7.4$ Hz, 3H)	162.24, 156.52, 156.13, 146.16, 142.79, 139.99, 136.69, 126.54, 118.79, 114.41, 110.18, 74.37, 38.86, 24.09, 19.96, 18.85, 14.21, 10.11
7	9.88(s, 1H), 8.58(s, 1H), 8.37(t, $J=3.2$ Hz, 1H), 7.71(d, $J=7.7$ Hz, 1H), 7.13(t, $J=8.2$ Hz, 1H), 6.68(d, $J=8.3$ Hz, 1H), 4.34(q, $J=6.2$ Hz, 1H), 3.02(s, 3H), 2.20(s, 3H), 1.72(ddd, $J=16.2, 8.7, 5.0$ Hz, 1H), 1.53(dq, $J=14.5, 5.3$ Hz, 1H), 1.45(t, $J=6.5$ Hz, 1H), 1.43—1.35(m, 1H), 1.26(d, $J=6.1$ Hz, 3H), 0.91(t, $J=7.2$ Hz, 3H)	162.21, 156.50, 156.07, 146.14, 142.75, 139.98, 136.70, 126.52, 118.73, 114.37, 110.14, 74.33, 38.85, 24.06, 19.94, 18.84, 14.20, 10.09
8	9.90(s, 1H), 8.64(d, $J=2.4$ Hz, 1H), 8.43(d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.72(t, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.17(t, $J=8.2$ Hz, 1H), 6.71(d, $J=8.3$ Hz, 1H), 4.35(h, $J=6.1$ Hz, 1H), 3.05(s, 3H), 2.23(d, $J=3.2$ Hz, 3H), 1.80—1.63(m, 2H), 1.58(ddt, $J=14.7, 10.8, 5.2$ Hz, 1H), 1.44(ddd, $J=16.4, 8.7, 4.2$ Hz, 1H), 1.41—1.31(m, 2H), 1.28(d, $J=6.1$ Hz, 3H), 0.91(dt, $J=18.3, 7.4$ Hz, 3H)	162.26, 156.54, 156.20, 146.17, 142.85, 139.99, 136.68, 126.53, 118.83, 114.43, 110.23, 74.67, 36.40, 24.11, 19.99, 18.74, 14.29, 10.12, 9.63
9	9.67(s, 1H), 9.43(s, 1H), 8.69(d, $J=2.6$ Hz, 1H), 8.50(d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.73(d, $J=8.1$ Hz, 1H), 7.11(t, $J=8.2$ Hz, 1H), 6.66(d, $J=8.3$ Hz, 1H), 4.32(h, $J=6.1$ Hz, 1H), 2.19(s, 3H), 1.74—1.65(m, 1H), 1.52(ddd, $J=14.3, 10.6, 5.5$ Hz, 1H), 1.48—1.32(m, 2H), 1.24(d, $J=6.2$ Hz, 3H), 0.89(t, $J=7.2$ Hz, 3H)	160.63, 156.48, 147.52, 144.75, 144.62, 142.55, 136.31, 126.62, 118.55, 114.29, 110.28, 74.33, 38.82, 19.91, 18.82, 14.19, 9.97
10	9.69(s, 1H), 9.46(s, 1H), 8.74(d, $J=2.6$ Hz, 1H), 8.54(s, 1H), 7.76(t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.15(t, $J=8.2$ Hz, 1H), 6.69(d, $J=8.0$ Hz, 1H), 4.33(h, $J=6.0$ Hz, 1H), 2.23(d, $J=4.4$ Hz, 3H), 1.78—1.61(m, 2H), 1.56(ddt, $J=14.6, 10.4, 5.0$ Hz, 1H), 1.42(td, $J=11.0, 10.5, 5.5$ Hz, 1H), 1.40—1.24(m, 5H), 0.88(t, $J=6.9$ Hz, 3H)	160.66, 156.50, 147.54, 144.81, 144.70, 142.55, 136.30, 126.66, 118.57, 114.31, 110.34, 74.65, 36.36, 19.96, 18.72, 14.30, 9.99, 9.61
11	9.64(s, 1H), 9.34(s, 1H), 8.41(s, 1H), 7.78(d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.16(t, $J=8.2$ Hz, 1H), 6.70(d, $J=8.3$ Hz, 1H), 4.35(h, $J=6.1$ Hz, 1H), 2.64(s, 3H), 2.22(s, 3H), 1.78—1.69(m, 1H), 1.59—1.51(m, 1H), 1.51—1.35(m, 2H), 1.27(d, $J=6.1$ Hz, 3H), 0.92(t, $J=7.3$ Hz, 3H)	161.01, 157.41, 156.50, 143.66, 142.32, 142.14, 136.45, 126.64, 118.46, 114.27, 110.22, 74.40, 38.85, 21.93, 19.95, 18.85, 14.20, 9.97
12	9.63(s, 1H), 9.32(s, 1H), 8.39(s, 1H), 7.76(t, $J=7.7$ Hz, 1H), 7.14(t, $J=8.2$ Hz, 1H), 6.68(d, $J=7.9$ Hz, 1H), 4.33(h, $J=6.0$ Hz, 1H), 2.62(s, 3H), 2.21(s, 2H), 1.78—1.61(m, 2H), 1.56(dp, $J=15.0, 5.1$ Hz, 1H), 1.42(td, $J=11.3, 10.3, 5.9$ Hz, 1H), 1.40—1.28(m, 3H), 1.26(d, $J=6.0$ Hz, 3H), 0.88(q, $J=6.9, 5.9$ Hz, 3H)	160.98, 157.40, 156.48, 143.63, 142.31, 142.12, 136.46, 126.62, 118.42, 114.24, 110.20, 74.64, 36.37, 21.90, 19.96, 18.72, 14.29, 9.97

Continued

Compd.	¹ H NMR(600 MHz, CDCl ₃), δ	¹³ C NMR(151 MHz, CDCl ₃), δ
13	9.73(s, 1H), 9.23(s, 1H), 8.58(s, 1H), 7.74(d, J=8.2 Hz, 1H), 7.12(t, J=8.2 Hz, 1H), 6.67(d, J=8.2 Hz, 1H), 4.33(h, J=6.1 Hz, 1H), 2.59(s, 3H), 2.20(s, 3H), 1.75—1.64(m, 1H), 1.57—1.49(m, 1H), 1.49—1.33(m, 2H), 1.25(d, J=6.1 Hz, 3H), 0.90(t, J=7.5 Hz, 3H)	160.84, 156.49, 152.09, 147.48, 143.62, 141.37, 136.41, 126.60, 118.51, 114.23, 110.25, 74.38, 38.83, 21.54, 19.93, 18.82, 14.19, 9.91
14	9.74(s, 1H), 9.23(s, 1H), 8.59(s, 1H), 7.74(t, J=7.9 Hz, 1H), 7.12(t, J=8.2 Hz, 1H), 6.67(d, J=8.3 Hz, 1H), 4.31(h, J=6.1 Hz, 1H), 2.60(s, 3H), 2.21(d, J=5.6 Hz, 3H), 1.77—1.60(m, 2H), 1.56(ddt, J=14.6, 10.4, 5.1 Hz, 1H), 1.45—1.36(m, 1H), 1.38—1.24(m, 5H), 0.91—0.84(m, 3H)	160.85, 156.49, 152.09, 147.48, 143.63, 141.38, 136.41, 126.61, 118.52, 114.23, 110.26, 74.64, 36.36, 21.55, 19.95, 18.71, 14.29, 9.92, 9.59
15	9.38(s, 1H), 8.79(s, 1H), 8.76(s, 1H), 7.67(d, J=8.2 Hz, 1H), 7.15(t, J=8.2 Hz, 1H), 6.72(d, J=8.3 Hz, 1H), 4.36(h, J=6.1 Hz, 1H), 2.21(s, 3H), 1.74(ddt, J=15.8, 11.5, 5.7 Hz, 1H), 1.56(ddt, J=14.4, 10.8, 5.6 Hz, 1H), 1.52—1.36(m, 2H), 1.28(d, J=6.2 Hz, 3H), 0.93(t, J=7.5 Hz, 3H)	159.47, 156.57, 145.30, 145.04, 144.80, 136.00, 126.65, 121.92, 120.10, 119.18, 114.71, 110.72, 74.42, 38.82, 19.88, 18.82, 14.17, 10.04
16	9.39(s, 1H), 8.82(d, J=2.5 Hz, 1H), 8.78(d, J=2.5 Hz, 1H), 7.69(d, J=7.8 Hz, 1H), 7.16(t, J=8.2 Hz, 1H), 6.73(d, J=7.8 Hz, 1H), 4.35(h, J=6.1 Hz, 1H), 2.22(d, J=4.7 Hz, 3H), 1.80—1.63(m, 2H), 1.59(ddq, J=14.6, 10.5, 5.4 Hz, 1H), 1.43(tq, J=12.1, 6.6, 6.2 Hz, 1H), 1.40—1.32(m, 2H), 1.34—1.23(m, 3H), 0.91(dt, J=18.6, 7.0 Hz, 3H)	159.42, 156.56, 145.33, 145.03, 144.74, 136.00, 126.67, 119.10, 114.68, 110.72, 74.70, 36.35, 27.81, 22.78, 19.92, 18.72, 14.27, 10.06, 9.58

1.3 分子对接

从蛋白质数据库(<https://www.rcsb.org>)下载琥珀酸脱氢酶(PDB 编码为 2FBW)的晶体结构, 采用 StarDrop(2024)程序的 SeeSAR 模块进行对接模拟研究.

2 结果与讨论

2.1 杀菌活性测定(活体保护活性实验)

采用盆栽幼苗测定法进行实验. 选择生长一致的两叶期盆栽玉米幼苗作为玉米锈病的实验寄主植物. 用目标化合物按照设计浓度进行叶面喷雾处理; 另设喷清水的空白对照, 重复 3 次, 处理后第二天进行病害接种. 接种后, 将植物放在人工气候室中保湿培养(温度: 昼 25 °C, 夜 20 °C; 相对湿度: 95%~99%). 实验材料培养 24 h 后, 于温室中培养, 将无需保湿培养的植物直接在温室中接种并培养. 待对照样本充分发病后(通常为 7 d 时间)进行化合物防病效果评估. 结果调查参照美国植病学会编写的《A Manual of Assessment Keys for Plant Diseases》进行, 用 100~0 表示, 以“100”级代表无病, “0”级代表最严重的发病程度.

目标化合物对防治玉米锈病的杀菌活性测定结果列于表 3. 表 3 结果表明, 合成的吡嗪酰胺类似物对玉米锈病具有优异的杀菌活性, 构效关系如 Scheme 3 所示. 当吡嗪酰胺吡嗪环上 R¹ 取代基改变时, 3 位取代优于 5 位取代和 6 位取代, 优于 H; 当固定 R² 为 2-戊基时, 活性顺序为化合物 5>化合物 11≈化合物 13>化合物 9, 2 位为吸电子基取代时优于给电子基(化合物 15>化合物 5; 化合物 16>化合物 8); 当变换苯胺部分 R² 时, 杀菌活性随着 R² 碳数的增加而增大(化合物 1≈化合物 2≈化合物 3<化合物 4≈化合物 5≈化合物 8); 当选用手性 R² 取代基时, R 构型活性大于 S 构型(化合物 7>化合物 6).

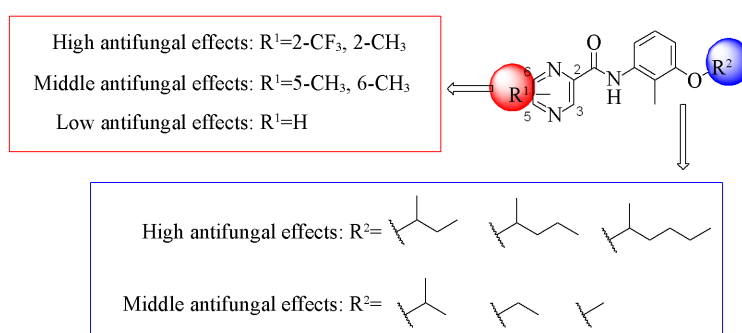
Table 3 *In vivo* antifungal effects(%) against corn rust(*Puccinia sorghi* Schw.) of all target compounds*

Compd.	Antifungal effect(%)					
	400 mg/L	100 mg/L	25 mg/L	6.25 mg/L	1.56 mg/L	0.04 mg/L
1	100	100	100	50	—	—
2	100	100	100	40	—	—
3	100	100	80	60	—	—
4	100	100	100	100	70	—
5	100	100	100	100	50	—
6	100	100	100	90	20	—

Continued

Compd.	Antifungal effect (%)					
	400 mg/L	100 mg/L	25 mg/L	6.25 mg/L	1.56 mg/L	0.04 mg/L
7	100	100	100	100	50	—
8	100	100	100	100	70	—
9	70	—	—	—	—	—
10	40	—	—	—	—	—
11	100	0	0	0	—	—
12	0	—	—	—	—	—
13	100	10	0	0	—	—
14	0	—	—	—	—	—
15	100	100	100	100	90	50
16	100	100	100	100	100	70
<i>Pyraziflumid</i>	100	100	100	95	80	20

* — means not tested.



Scheme 3 Structure-activity relationships for pyrazole-4-carboxamide derivatives

2.2 安全性测试

测试了16个目标化合物对大鼠急性经口的半数致死量(LD₅₀)值,结果表明其LD₅₀均大于500 mg/kg,因此16个化合物均为非高毒化合物。

2.3 分子对接研究

为了进一步了解目标化合物与SDH的结合模式,选择联苯吡嗪菌胺、戊菌酰胺和化合物16进行了分子对接模拟(图1~图3)。使用StarDrop软件预测了3种分子与SDH活性位点的结合模式,并选择了每种分子的最佳结合模式进行后续研究。从空间构象来看,3个分子在吡唑酸及吡嗪酸部分几乎重叠,酸上二氟取代及三氟取代区域也几乎重叠,苯胺中的苯环也几乎重叠。从H键供体和H键受体来看,3个分子的相似度也极高,且3个分子的羰基氧几乎对齐。这解释了3个分子均具有优异活性和相似分子机理的原因。

分子对接结果表明,联苯吡嗪菌胺、戊菌酰胺和化合物16的吡嗪环和吡唑环均嵌入结合口袋中,其酰胺键的O与SDH活性位点的TRP173形成氢键相互作用。联苯吡嗪菌胺和化合物16与TRP173形成的氢键长度为0.172 nm,戊菌酰胺与TRP173形成的氢键长度为0.185 nm。联苯吡嗪菌胺与氨基酸



Fig. 1 The molecular 3D space superimposition diagram(A), hydrogen bond donor diagram(B) and hydrogen bond acceptor diagram(C) of pyraziflumid, wu jun xian an and compound 16

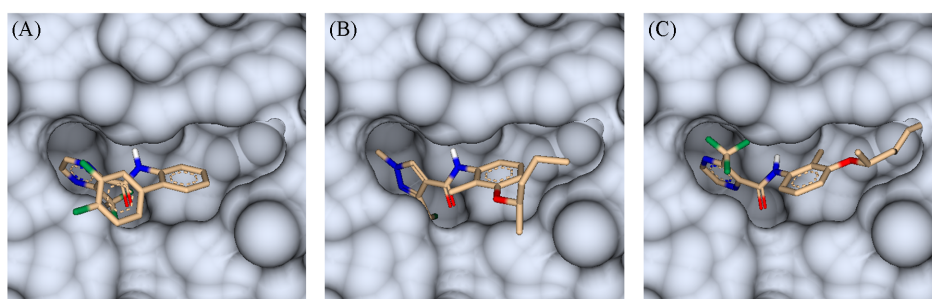


Fig. 2 Schematic diagram of molecular docking of pyraziflumid(A), wu jun xian an(B) and compound 16(C)

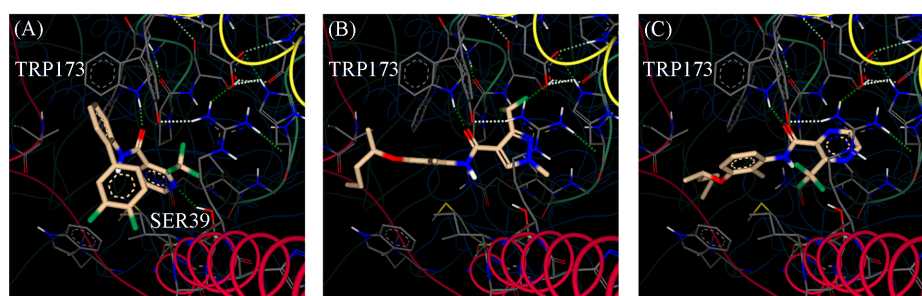


Fig. 3 Binding model of pyraziflumid(A), wu jun xian an(B) and compound 16(C) in the active site of SDH(PDB entry: 2FBW)

残基SER39也形成氢键,与SER39形成的氢键长度为0.203 nm. 在对接过程中,所有分子的羧酸部分均以相同的角度和方向进入蛋白质的活性口袋.

值得注意的是,化合物16的R²烷基部分进入了蛋白的另一个口袋,与联苯吡嗪菌胺和戊菌酰胺方向不同,这可能是造成活性差异的主要原因,也从另一个方面解释了对于R²烷基链部分,其长链活性优于短链的原因. 这种结合相互作用的差异可以解释化合物16表现出更高的活性的原因.

3 结 论

以取代吡嗪酸和2-甲基-3-硝基苯酚为起始原料,经过4步反应合成了16个吡嗪酰胺类似物,其结构均经¹H NMR, ¹³C NMR及HRMS确证. 初步活性测试结果表明,12个目标化合物在400 mg/L浓度下对玉米锈病均具有良好的防治效果,其中化合物16在1.5625 mg/L浓度下对玉米锈病的防效为100%. 另外,化合物4, 5, 7, 8, 15和16在6.25 mg/L浓度下对玉米锈病的防效为100%. 分子对接结果显示,化合物16与联苯吡嗪菌胺、戊菌酰胺在三维空间构像上高度相似,但是在蛋白嵌入结合口袋时,苯胺侧链R²部分具有明显差异,从也解释了化合物16具有优异活性的原因. 吡嗪酰胺类化合物结构新颖、杀菌活性较高,可作为先导化合物进行深入研究.

参 考 文 献

- [1] Strange R. N., Scott P. R., *Annu. Rev. Phytopathol.*, **2005**, *43*, 83—116
- [2] Fisher M. C., Hawkins N. J., Sanglard D., Gurr S. J., *Science*, **2018**, *360*(6390), 739—742
- [3] Brown G. D., Denning D. W., Gow N. A. R., Levitz S. M., Netea M. G., White T. C., *Sci. Transl. Med.*, **2012**, *4*(165), 165rv13
- [4] Xiong Z. Q., Tu X. R., Wei S. J., Huang L., Li X. H., Lu H., Tu G. Q., *Biotechnol. Lett.*, **2013**, *35*(9), 1475—1479
- [5] Patriarca A., *Curr. Opin. Food Sci.*, **2019**, *29*, 42—47
- [6] Wang Y. J., Subedi S., de Vries H., Doornenbal P., Vels A., Hensel G., Kumlehn J., Johnston P. A., Qi X. Q., Blilou I., Niks R. E., Krattinger S. G., *Nat. Plants*, **2019**, *5*(11), 1129—1135
- [7] Wang W., Wang J. H., Wu F. R., Zhou H., Xu D., Xu G., *J. Agric. Food Chem.*, **2021**, *69*(20), 5746—5754
- [8] Yang H. B., Yu H. B., Cong Y. B., Shi X. G., Hu Z. N., Wang J. F., Song Y. Q., Li B., *Advanced Agrochem*, **2023**, *2*(4), 371—375
- [9] Yu H. B., Yang H. B., Chen L., Wang G., Zhao G. M., Wang X. L., Wu H. F., Shi X. G., Dong Y., Li B., *Org. Process Res. Dev.*, **2022**, *26*(12), 3216—3225

- [10] Yu H. B., Cheng Y., Xu M., Song Y. Q., Luo Y. M., Li B., *J. Agric. Food Chem.*, **2016**, 64(51), 9586—9591
- [11] Brauer V. S., Rezende C. P., Pessoni A. M., De Paula R. G., Rangappa K. S., Nayaka S. C., Gupta V. K., Almeida F., *Biomolecules*, **2019**, 9(10), 521
- [12] Wang H., Ren S. X., He Z. Y., Wang D. L., Yan X. N., Feng J. T., Zhang X., *Int. J. Mol. Sci.*, **2014**, 15(3), 4257—4272
- [13] Ninomiya A., Urayama S. I., Suo R., Itoi S., Fuji S., Moriyama H., Hagiwara D., *Front. Microbiol.*, **2020**, 11, 1641
- [14] Ishii H., Zhen F., Hu M. J., Li X. P., Schnabel G., *Pest Manag. Sci.*, **2016**, 72(10), 1844—1853
- [15] Umetsu N., Shirai Y., *J. Pestic. Sci.*, **2020**, 45(1/2), 54—74
- [16] Wang G., Lv L., Liu J. Y., Shan Z. G., Yang H. B., Li B., *Modern Agrochemicals*, **2017**, 16(4), 12—14(王刚, 吕亮, 刘吉永, 单中刚, 杨辉斌, 李斌. 现代农药, **2017**, 16(4), 12—14)
- [17] Wang G., Hao Z. S., Yang H. B., Shan Z. G., Chen X. M., Lv L., Li B., *Modern Agrochemicals*, **2017**, 16(5), 7—9(王刚, 郝泽生, 杨辉斌, 单忠刚, 陈宣明, 吕亮, 李斌. 现代农药, **2017**, 16(5), 7—9)
- [18] Oporto C. I., Villarreal C. A., Tapia S. M., Garcí'a V., Cubillos. F. A., *Toxins*, **2019**, 11(7), 400
- [19] Wang Q. Q., Zhang S. G., Jiao J., Dai P., Zhang W. H., *Molecules*, **2021**, 26(2), 372
- [20] Türkyılmaz M., Dönmez M., Altun Ö., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2023**, 39(6), 968—975
- [21] Li H., Wang Y. X., Zhu X. L., Yang G. F., *J. Agric. Food Chem.*, **2021**, 69(44), 13227—13234
- [22] Xie Q. Y., Zhang S., Zhang Y. H., Zhang B. W., Wan F. X., Li Y., Jiang L., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2024**, 108, 129813
- [23] Wang X. B., Wang M. Q., Han L., Jin F., Jiao J., Chen M., Yang C. L., Xue W., *J. Agric. Food Chem.*, **2021**, 69(33), 9557—9570
- [24] Zhang A. G., Yue Y., Yang J., Shi J. X., Tao K., Jin H., Hou T. P., *J. Agric. Food Chem.*, **2019**, 67(17), 5008—5016
- [25] Huang Y. H., Wei G., Wang W. J., Liu Z., Yin M. X., Guo W. M., Zhu X. L., Yang G. F., *J. Agric. Food Chem.*, **2023**, 71(47), 18292—18300
- [26] Huang Y. H., Wei G., Liu Z., Lu Q., Jiang J. J., Zhu X. L., Yang G. F., *J. Agric. Food Chem.*, **2022**, 70(45), 14480—14487
- [27] Li H., Gao M. Q., Chen Y., Wang Y. X., Zhu X. L., Yang G. F., *J. Agric. Food Chem.*, **2020**, 68(47), 14001—14008
- [28] Xiong L., Li H., Jiang L. N., Ge J. M., Yang W. C., Zhu X. L., Yang G. F., *J. Agric. Food Chem.*, **2017**, 65(5), 1021—1029
- [29] Xiong L., Zhu X. L., Gao H. W., Fu Y., Hu S. Q., Jiang L. N., Yang W. C., Yang G. F., *J. Agric. Food Chem.*, **2016**, 64(24), 4830—4837
- [30] Wei G., Huang M. W., Wang W. J., Wu Y., Mei S. F., Zhou L. M., Mei L. C., Zhu X. L., Yang G. F., *J. Agric. Food Chem.*, **2021**, 69(13), 3965—3971
- [31] Zhao Y. T., Zhang A. G., Wang X. G., Tao K., Jin H., Hou T. P., *J. Agric. Food Chem.*, **2022**, 70(42), 13464—13472
- [32] Fu W., Shao Z. L., Sun X. J., Zhou C., Xu Z. P., Zhang Y., Cheng J. G., Li Z., Shao X. S., *J. Agric. Food Chem.*, **2022**, 70(14), 4279—4290
- [33] Zhao T., Zhang J., Tao Y. C., Liao H., Zhao F. B., Liang R. P., Shi X. Y., Zhang Z. J., Ji J. B., Wu T., Pang J. X., Liu X. Y., Zhan P., *J. Med. Chem.*, **2022**, 65(5), 4218—4237
- [34] Ding M. H., Wan S. R., Wu N., Yan Y., Li J. H., Bao X. P., *J. Agric. Food Chem.*, **2021**, 69(50), 15084—15096
- [35] Wang C. F., Li J., Qu L. Z., Tang X., Song X. J., Yang F., Chen X. J., Lin Q. M., Lin W. B., Zhou Y., Tu Z. C., Chen Y. H., Zhang Z., Lu X. Y., *J. Med. Chem.*, **2022**, 65(22), 15140—15164
- [36] Sardar A., Ansari A., Gupta S., Sinha S., Pandey S., Rai D., Kumar M., Bhatta R. S., Trivedi R., Sashidhara K. V., *Eur. J. Med. Chem.*, **2022**, 244, 114813
- [37] Kadagathur M., Patra S., Devabattula G., George J., Phanindranath R., Shaikh A. S., Sigalapalli D. K., Godugu C., Nagesh N., Tangellamudi N. D., Shankaraiah N., *Eur. J. Med. Chem.*, **2022**, 238, 114465
- [38] Shi J., Ding M. H., Luo N., Wan S. R., Li P. J., Li J. H., Bao X. P., *J. Agric. Food Chem.*, **2020**, 68(36), 9613—9623
- [39] Ivasiv V., Albertini C., Goncalves A. E., Rossi M., Bolognesi M. L., *Curr. Top. Med. Chem.*, **2019**, 19(19), 1694—1711
- [40] Hu Y., Stumpfe D., Bajorath J., *J. Med. Chem.*, **2017**, 60(4), 1238—1246
- [41] Barber D. M., *J. Agric. Food Chem.*, **2022**, 70(36), 11075—11090
- [42] Callis T. B., Garrett T. R., Montgomery A. P., Danon J. J., Kassiou M., *J. Med. Chem.*, **2022**, 65(20), 13483—13504
- [43] Cao X. F., Yang H. P., Liu C., Zhang R. F., Maienfisch P., Xu X. Y., *J. Agric. Food Chem.*, **2022**, 70(36), 11042—11055
- [44] Lamberth C., *J. Agric. Food Chem.*, **2022**, 70(36), 11005—11010
- [45] Lamberth C., *J. Agric. Food Chem.*, **2022**, 70(36), 11011—11018
- [46] Maienfisch P., Lamberth C., *J. Agric. Food Chem.*, **2022**, 70(36), 10941
- [47] Li P. Y., Feng L., Li G. Y., Bai F. Q., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2023**, 39(2), 202—207
- [48] Luo B., Zhao Y. C., Zhang J., Li W., Liu M. X., Yang M. M., Wei L. L., Liu Y. J., Wen B. J., Qu L. L., *J. Agric. Food Chem.*, **2023**, 71(24), 9255—9265
- [49] Lv L., Wang G., Wu S. S., Shan Z. G., Li B., *Pesticide*, **2020**, 59(12), 871—872(吕亮, 王刚, 吴沙沙, 单中刚, 李斌. 农药, **2020**, 59(12), 871—872)

(Ed.: L, W, K)