

烷氧基取代的嘧啶水杨酸衍生物的设计、合成及生物活性研究

曲仁渝^{†,a} 蔡卓梅^{†,a} 杨景芳^a 刘玉超^a
陈琼^a 牛聪伟^b 席真^b 杨光富^{*,a}

(^a 华中师范大学化学学院 农药与化学生物学教育部重点实验室
智能生物传感技术与健康国际联合研究中心 武汉 430079)

(^b 南开大学 元素有机化学国家重点实验室 天津 300071)

摘要 为寻找新型乙酰羟酸合成酶(EC 2.2.1.6, AHAS)抑制剂以克服由靶标突变(P197L 突变)所引起的杂草抗性, 利用“构象柔性度分析”策略设计、合成了一系列烷氧基取代的嘧啶水杨酸衍生物。其中, 9 个化合物对 P197L 突变型 AHAS 的抗性倍数(RF 值)均小于等于 1, 在酶水平上具有良好的反抗性。特别是 2-((4,6-二甲氧基嘧啶-2-基)氧基)-6-(2-氟乙氧基)苯甲酸(**5l**), 被进一步确定为该系列最有效的反抗性 AHAS 抑制剂(RF=0.31), 不仅与氯磺隆(RF=2060)和双草醚(RF=4.57)相比抗性程度大幅降低, 并且对野生型 *At*AHAS 和 P197L 突变体的抑制活性均达到了亚微摩尔水平, 优于双草醚。此外, 在 150 g ai/ha 的施用剂量下, 2-((4,6-二甲氧基嘧啶-2-基)氧基)-6-(2-(甲氧基)乙氧基)苯甲酸(**5a**)、2-((4,6-二甲氧基嘧啶-2-基)氧基)-6-(3-(甲氧基)丙氧基)苯甲酸(**5f**)、2-((4,6-二甲氧基嘧啶-2-基)氧基)-6-(2-氟乙氧基)苯甲酸(**5l**)和 2-((4,6-二甲氧基嘧啶-2-基)氧基)-6-(2,2-二氟乙氧基)苯甲酸(**5m**)对敏感型和抗性(P197L-AHAS)播娘蒿同时表现出优异的除草活性。值得注意的是, 即使在最低剂量 37.5 g ai/ha 下, 化合物 **5l** 对这两种杂草的除草防效仍超过 85%, 表现出良好的活体反抗性, 具有深入研究的价值。

关键词 乙酰羟酸合成酶; P197L 突变体; 反抗性; 构象柔性; 抗性杂草

Design, Synthesis and Biological Activity of Pyrimidyl-Salicylate Derivatives Containing Alkoxy Moiety

Qu, Renyu^{†,a} Cai, Zhuomei^{†,a} Yang, Jingfang^a Liu, Yuchao^a Chen, Qiong^a
Niu, Congwei^b Xi, Zhen^b Yang, Guangfu^{*,a}

(^a Key Laboratory of Pesticide & Chemical Biology of Ministry of Education, International Joint Research Center for Intelligent Biosensor Technology and Health, College of Chemistry, Central China Normal University, Wuhan 430079)

(^b State Key Laboratory of Elemento-organic Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract In an attempt to search new antiresistance acetohydroxyacid synthase (AHAS, EC 2.2.1.6) inhibitors to combat weed resistance associated with AHAS mutation (P197L), a series of pyrimidyl-salicylate derivatives containing alkoxy side chain were designed via the strategy of “conformational flexibility analysis” and then synthesized. Nine compounds showed excellent antiresistance property against P197L mutant. Their resistance factor (RF) values ranged from 0.31 to 1.00. Especially, 2-((4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)oxy)-6-(2-fluoroethoxy)benzoic acid (**5l**) was further identified as the most promising antiresistance AHAS inhibitor due to quite low RF value (RF=0.31) and sub-micromolar inhibition toward both wild-type *At*AHAS and P197L mutant. Furthermore, 2-((4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)oxy)-6-(2-methoxyethoxy)benzoic acid (**5a**), 2-((4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)oxy)-6-(3-methoxypropoxy)benzoic acid (**5f**), 2-((4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)oxy)-6-(2-fluoroethoxy)benzoic acid (**5l**), and 2-(2,2-difluoroethoxy)-6-((4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)oxy)benzoic acid (**5m**) also

* Corresponding author. E-mail: gfyang@mail.ccnu.edu.cn

Received March 20, 2020; revised April 12, 2020; published online April 23, 2020.

Dedicated to the 40th anniversary of Chinese Journal of Organic Chemistry

Project supported by the National Key Research and Development Program (No. 2018YFD0200100), the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21837001, 21772058, 31901910) and the China Postdoctoral Science Foundation (No. 2018M642880).

国家重点研发项目基金(No. 2018YFD0200100)、国家自然科学基金(Nos. 21837001, 21772058, 31901910)和中国博士后科学基金(No. 2018M642880)资助项目。

[†] 共同第一作者(These authors contributed equally to this work).

exhibited potent herbicidal activities against sensitive and resistant (P197L-AHAS) *Descurainia sophia* at 150 g of active ingredient (ai)/ha. Even at the dosage as low as 37.5 g ai/ha, compound **5l** still maintained over 85% weed control toward the above two weeds, which has the great potential to be developed as new lead to control herbicide-resistant weeds caused by P197L mutation.

Keywords acetohydroxyacid synthase; P197L mutant; antiresistance; conformation flexibility; resistant weed

在过去的一个世纪,合成除草剂的应用已经为防治杂草和保障全球粮食产量做出了巨大贡献^[1].但与此同时,合成除草剂在近年来的过度和不合理使用使得杂草对除草剂的抗性日益突出^[2].在实际应用中,研究人员已经采取了多作物轮作、不同类型除草剂的交替使用以及苗前封闭等措施来防治抗性杂草^[3].尽管如此,这些宏观杂草管理措施仍难以阻止或减弱抗性杂草迅猛的发展势头.因此,创制具有新作用机制或新骨架的除草剂被认为是解决杂草抗性问题的最佳方案之一^[4].

乙酰羟酸合成酶(EC 2.2.1.6, AHAS)作为植物体内一种关键功能酶,在亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸的生物合成途径中发挥了极为关键的作用.一旦抑制了 AHAS 的生物活性,则可以有效阻断上述三种关键支链氨基酸的生成,从而影响植物蛋白质合成以及植物的正常生长^[5].因此, AHAS 被认为是一种重要的除草剂靶标.截止目前,已有超过 55 种 AHAS 抑制剂被成功商业化,按结构类型划分, AHAS 抑制剂主要分为磺酰胺类(SU)、咪唑啉酮类(IMI)、三唑并嘧啶磺酰胺类(TP)、嘧啶苯甲酸类(PTB)和三唑啉酮类(SCT)五大类^[6].然而,这些靶向 AHAS 的除草剂的持续和过量施用引起了相关抗性杂草的大面积爆发.20 世纪以来,已经有接近 160 种杂草生物型对 AHAS 类除草剂产生了不同程度的抗性^[7].因此,为了克服目前的抗性,开发具有反抗性的 AHAS 抑制剂已成为当务之急.

在大多数情况下,杂草对 AHAS 抑制型除草剂的抗性形成主要与靶标酶中关键氨基酸残基的单个突变有关.据野外调查,至今已有超过 20 种基因突变被鉴定,且主要集中在 8 个与抑制剂结合相关的氨基酸位点上,即 P197、W574、S653、D376、A122、A205、G654、R377(按照拟南芥 AHAS 残基编号)^[8].根据杂草抗性委员会(HRAC)的统计,P197L 突变是抗 AHAS 类除草剂杂草中分布最为广泛的突变类型之一^[7b],并且此类抗性杂草对大多数 AHAS 类除草剂已经产生了高倍的交互抗性(抗性倍数>100 倍),例如 SU 类、IMI 类、TP 类以及 SCT 类 AHAS 抑制剂^[9].然而,这种基因突变的杂草却对 PTB 类 AHAS 抑制剂仅能产生低倍抗性(抗性倍数<10 倍),这种反差引起了我们极大的兴趣.在先前对 AHAS 抑制剂抗性机制的研究工作中,我们发现 SU、IMI、TP 和 SCT 类 AHAS 抑制剂由于其分子桥链的固有刚性无法有效调整分子在突变体中的结合构象,从而

失去了关键的相互作用力,致使高倍抗性的产生;而 PTB 类抑制剂结构中关键的氧桥使得该类分子具有一定的构象柔性,致使 PTB 类抑制剂分子在 AHAS 发生突变后可以在一定程度上适应突变体的结合腔,且形成了新的相互作用力,从而可以维持与突变体良好的结合亲和力.基于此,提出了一种基于“构象柔性度分析”(Conformational Flexibility Analysis, CFA)的反抗性分子设计策略^[10].

近年来,基于作用靶标的三维结构开展农药分子设计已经成为绿色农药创制研究的前沿与热点^[11].为了寻找在克服抗性杂草方面具有潜在应用价值、高活性且反抗性的新型 AHAS 抑制剂,并延续我们的研究工作,本研究将以代表性 PTB 类 AHAS 抑制剂双草醚为先导,利用 CFA 策略进一步增加分子的柔性,期望在维持高抑制活性的同时,实现对 P197L 突变体的反抗性.从图 1 所显示的结合模式发现,双草醚由于分子柔性使其在突变体中的结合构象相对于在野生型 *At*AHAS 中的构象发生了偏转,但由于位阻原因,双草醚一侧的嘧啶环与 L197 之间仍存在一定的立体冲突,导致抑制活性降低,这是其具有弱抗性的主要原因.鉴于此,我们保留双草醚的药效团,在其侧链引入柔性更大且体积更小的烷基链,以此规避与 L197 残基之间的立体冲突,设计了一类侧链烷氧基取代的嘧啶水杨酸衍生物 **5a~5p**,并评价了其对于野生型 *At*AHAS 和 P197L 突变体的抑制活性.另外,考虑到所设计的抑制剂有可能成为可以同时防治田间敏感型和 P197L-AHAS 突变的抗性杂草的候选除草剂,测试了所有目标化合物对敏感型和抗性(P197L-AHAS)播娘蒿的除草活性.所设计的目标分子结构均经过 ¹H NMR, ¹³C NMR 以及高分辨质谱表征确定.

1 结果与讨论

1.1 目标化合物的合成

本研究以 2,6-二羟基苯甲酸(**1**)为初始原料,首先在 SOCl₂ 和 4-二甲氨基吡啶(DMAP)作用下与丙酮发生环化反应,对原料的羧基和其中的一个羟基进行缩醛保护生成中间体 **2**^[12],以便增加后续反应的区域选择性.然后在碳酸钾作碱和四氢呋喃作溶剂的条件下,将中间体 **2** 裸露的羟基与取代烷基卤代物发生亲核取代反应,生成相对应的关键中间体 **3**.随后在同一反应容器中加入 2 mol/L NaOH 溶液进行回流反应,发生脱缩醛保护

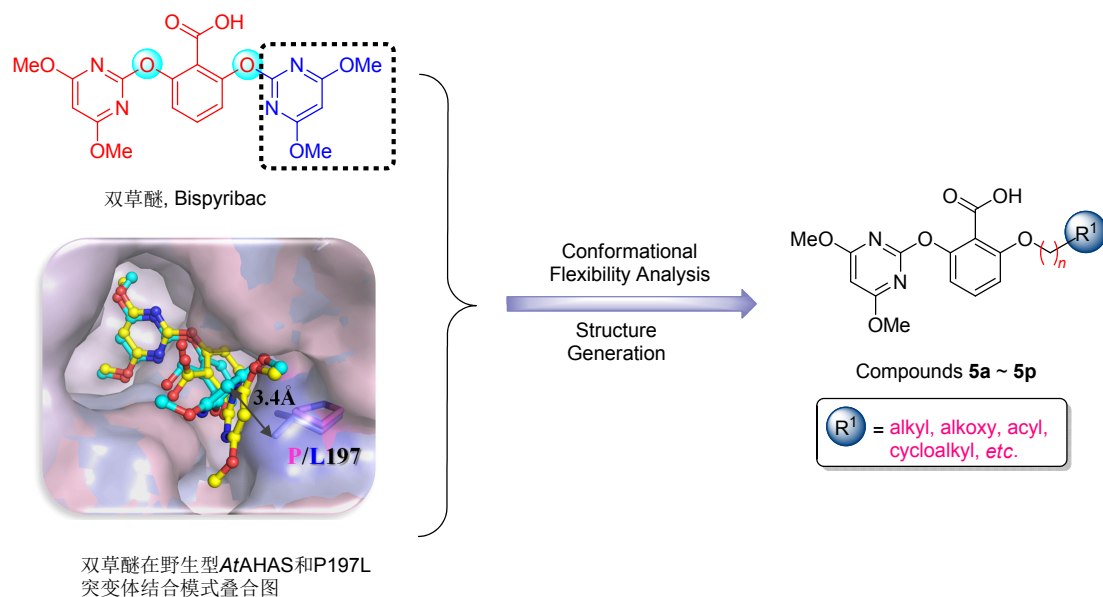
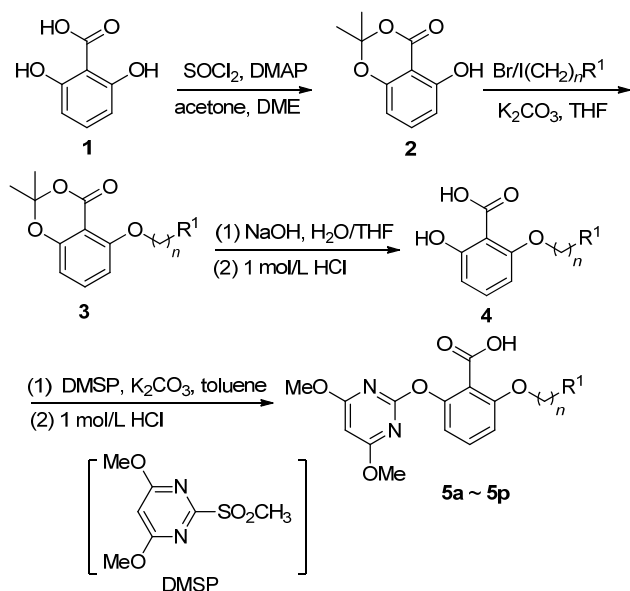


图1 目标化合物5a~5p的分子设计示意图及商品化PTB类抑制剂双草醚在野生型AtAHAS (PDB ID: 5K2O)和P197L突变体中结合模式的叠合图

Figure 1 Diagram of molecular design of title compounds 5a~5p and the superposition map of the binding models of commercial PTB inhibitor bispyribac with wild-type AtAHAS (PDB ID:5K2O) and P197L mutant

Yellow stick structure represents the binding conformation of the molecule in wild-type AtAHAS, blue-green stick structure represents the binding conformation of the molecule in P197L mutant, residue P197 showed as rose-bengal, residue L197 showed as blue

反应, 然后经盐酸酸化可以得到对应水杨酸中间体4。最后在碱作用下将中间体4和4,6-二甲氧基-2-甲磺基嘧啶(DMSP)进行 S_NAr 亲核取代反应, 随后经酸化处理即可得到所需目标分子5a~5p (Scheme 1)。



图式1 目标分子5a~5p的合成路线

Scheme 1 Synthetic route of title compounds 5a~5p

1.2 目标化合物对野生型和P197L突变型AtAHAS的酶抑制活性以及抗性机制研究

以野生型AtAHAS和P197L突变体作为测试酶, 利

用前期已构建的抑制剂活性筛选体系^[10], 对新合成的目标化合物5a~5p进行了酶抑制常数(K_i)的测定, 测试结果如表1所示。同时为量化所测试化合物对P197L突变体的抗性程度, 定义化合物对P197L突变体和野生型AtAHAS抑制活性(K_i 值)的比值作为其分子水平的精确抗性倍数(RF, resistance factor)。选取代表性的商品化AHAS抑制剂氯磺隆(SU类)和双草醚(PTB类)作为阳性对照。经过测试发现, 对照药剂氯磺隆和双草醚对野生型AtAHAS均表现出亚微摩尔级别甚至纳摩尔级别的抑制活性($K_{i, \text{wild-type}}$ 分别为0.05和0.54 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 但它们对P197L突变体的抑制活性却有不同程度的下降($K_{i, \text{P197L}}$ 分别为103和2.47 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 经计算, 两组阳性对照对P197L突变体的抗性倍数分别为2060倍(高抗水平)和4.57倍(低抗水平), 也进一步验证了前文提及的分子构象柔性和抗性倍数的紧密关联性。

本研究中新合成的目标分子是在双草醚结构基础上, 在侧链部分引入了柔性更大的烷氧基链以期保持高抑制活性强度(亚微摩尔级别)的同时, 实现反抗性($\text{RF} < 1$)。考虑到双草醚分子结构中原有侧链部分含多个极性基团(如嘧啶环上的N原子以及OMe), 可以与周围氨基酸形成关键的氢键作用^[13], 因此增加分子侧链柔性的同时优先在烷氧基链上引入了OMe, 以期降低抗性倍数的同时, 可以维持与靶标的结合亲和力。通过分析表1中的 K_i 值发现, 化合物5a ($n=2$, $R^1=\text{OMe}$)对野生型AtAHAS的抑制活性为0.62 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 与阳性对

表 1 化合物 5a~5p 对野生型 AtAHAS 和 P197L 突变体的酶水平抑制活性数据及其对应抗性倍数

Table 1 Inhibitory activities of compounds 5a~5p against wild-type AtAHAS and P197L mutant, and their corresponding resistance factor

Compd.	<i>n</i>	<i>R</i> ¹	<i>AtAHAS</i> inhibition constant <i>K_i</i> /($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)		
			P197L mutant	Wild-type <i>AtAHAS</i>	Resistance factor (RF) ^a
5a	2	OMe	0.71 ± 0.25	0.62 ± 0.26	1.15
5b	2	di-OMe	2.14 ± 0.30	2.26 ± 0.23	0.95
5c	2	SMe	18.70 ± 1.80	6.95 ± 0.51	2.69
5d	2	SO ₂ Me	29.10 ± 5.50	4.24 ± 0.26	6.86
5e	2	OCF ₃	16.10 ± 9.90	22.10 ± 11.20	0.73
5f	3	OMe	1.24 ± 0.14	0.99 ± 0.14	1.25
5g	1	OMe	0.54 ± 0.09	1.46 ± 0.07	0.37
5h	1	COOEt	4.49 ± 0.25	4.49 ± 0.24	1.00
5i	1	COMe	5.54 ± 0.31	1.99 ± 0.18	2.78
5j	2	Cl	0.99 ± 0.11	1.12 ± 0.22	0.88
5k	2	Br	2.22 ± 0.21	2.32 ± 0.21	0.96
5l	2	F	0.11 ± 0.01	0.36 ± 0.02	0.31
5m	2	di-F	1.45 ± 0.12	1.39 ± 0.26	1.04
5n	2	tri-F	1.61 ± 0.15	1.21 ± 0.26	1.33
5o	1		1.11 ± 0.18	1.42 ± 0.20	0.78
5p	1		4.45 ± 0.29	7.12 ± 0.62	0.63
Chlorsulfuron ^b			103.00 ± 14.00	0.05 ± 0.01	2060
Bispyribac ^b			2.47 ± 0.41	0.54 ± 0.06	4.57

^a RF, Resistance factor = $K_{i, \text{P197L}}/K_{i, \text{wild-type}}$; ^b Positive control: commercial AHAS inhibitor.

照双草醚活性相当;与此同时,该化合物对 P197L 突变体的 K_i 值也达到了 $0.71 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 相比于双草醚对 P197L 突变体的抑制活性有超过 3 倍的提高($K_{i, \text{P197L}} = 2.47 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 初步说明上述分子设计的可行性。但稍显遗憾的是, 该化合物的抗性倍数 RF 值为 1.15, 仍未达到预期(RF < 1)。为此在进一步的结构优化中, 尝试在 *R*¹ 位置引入了双“OMe”, 发现对应化合物 5b 对 P197L 突变体的抗性倍数 RF 为 0.94, 较阳性对照双草醚(RF = 4.57)和氯磺隆(RF = 2060)抗性倍数分别下降了 4.86 倍和 2191 倍, 满足反抗性条件。继续观察其 K_i 值发现, 化合物 5b 对野生型 AtAHAS 和 P197L 突变体的抑制活性仅达到微摩尔水平($K_{i, \text{P197L}} = 2.14 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $K_{i, \text{wild-type}} = 2.26 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 较阳性对照双草醚和化合物 5a 的总体抑制活性仍有一定的差距。此外, 在 *R*¹ 位置(保持 *n* = 2)引入体积更大的基团, 如 SMe, SO₂Me, OCF₃ 等基团, 相应衍生物 5c~5e 抑制活性结果表明: 这些基团的引入对于化合物的总体抑制活性均不利, 特别是对 P197L 突变体的 K_i 值超过了 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。上述的构效关系初步说明: 在 *R*¹ 位置较 OMe 相比体积更大的基团不利于分子总体活性的提高。因此在 OMe 作为优势基团的基础上, 进一步讨论了母核结构侧链链长对活性和化合物抗性倍数的影响。通过表 1 的结果分析, 当 *n* = 3 时, 对应化合物 5f 对 P197L 突变体和野生型 AtAHAS

的抑制活性($K_{i, \text{P197L}} = 1.24 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $K_{i, \text{wild-type}} = 0.99 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)略逊于化合物 5a (*n* = 2), 且抗性倍数不降反升(RF = 1.25); 而当链长缩短至 1 个碳时(*n* = 1), 化合物 5g 对 P197L 突变体的抑制活性较化合物 5a 相比有所提高, $K_{i, \text{P197L}}$ 值达到了 $0.54 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 远远优于阳性对照双草醚和氯磺隆对该突变体的抑制强度, 更为突出的是, 化合物 5g 对 P197L 突变体的抗性倍数 RF 仅为 0.37 倍, 说明该化合物具有高活性的同时, 也表现出了良好的反抗性。由此初步判断, 分子侧链过长不利于活性和分子反抗性能力的提高, 碳链整体保持在 1~2 碳原子长度可能更利于寻找具有更高活性的反抗性 AHAS 抑制剂。

在上述构效关系的指导下, 尝试在 *R*¹ 位置引入其他类型的极性基团, 例如卤素、羰基或酯基。通过对相应化合物的活性评价首先发现酯基的引入使得分子维持了良好的反抗性(RF = 1), 但该化合物(5h)对 P197L 突变体和野生型 AtAHAS 的抑制活性均未达到亚微摩尔级别。进一步观察, *R*¹ 位置含羰基的化合物(5i)的总体抑制活性强度和抗性倍数均未达到预期。但令人欣喜的是, 单 F 取代的化合物 5l 对 P197L 突变体表现出极为优异的抑制活性($K_{i, \text{P197L}} = 0.11 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 明显优于 Cl 和 Br 取代的化合物 5j 和 5k。此外, 在 *R*¹ 处引入更多的 F 原子时, 相应化合物 5m 和 5n 对 P197L 突变体的总体酶

抑制活性却明显弱于单 F 取代的化合物 **5l**。基于上述结果, R^1 位置卤素取代对化合物抑制活性(针对 P197L 突变体)影响的构效关系可总结为: $F > Cl > di-F > tri-F > Br$ 。当继续研究化合物 **5j**~**5n** 的抗性程度和对野生型 AtAHAS 的抑制活性时进一步发现, 单取代卤素(Cl, Br, F)的引入有利于抑制剂反抗性能力的提高, 特别是化合物 **5l** (F 取代)的 RF 值仅为 0.31, 且对野生型 AtAHAS 的抑制活性 K_i 值($K_{i,wild-type} = 0.36 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)也同样优于阳性对照双草醚($K_{i,wild-type} = 0.54 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 以此说明化合物 **5l** 相比于上述筛选得到的化合物 **5g** 是总体抑制活性更优的反抗性抑制剂。为了继续丰富 R^1 位置的取代基类型, 我们还将酯基或含氧原子的环烷基引入到分子末端, 但是对应化合物 **5o** 和 **5p** 的测试结果却不尽如人意, 未能表现出进一步优化的价值。

至此, 在综合考虑新合成化合物的总体抑制活性强度和抗性倍数后认为, 化合物 **5l** 符合我们设计之初的预期, 其对 P197L 突变体和野生型 AtAHAS 的抑制活性均达到了亚微摩尔级别, 明显优于对照药剂双草醚。更为重要的是, 该化合物实现了分子水平上的反抗性, 其抗性倍数相比于阳性对照氯磺隆和双草醚分别下降了大约 6645 倍和 15 倍, 可作为新的反抗性先导化合物进行深入研究。为了更好地阐明该反抗性抑制剂的分子机制, 我们利用分子模拟和 MM-PBSA 计算对该化合物进行研究。通过分析化合物 **5l** 分别在野生型 AtAHAS 和 P197L 突变体的结合模式(图 2A, 2B)发现, 分子在两个

体系中存在一些共性相互作用力, 例如: 其嘧啶环可以与两个活性腔中的 W574 形成紧密的 π - π 堆积相互作用, 该环上的其中一个 OMe、中间苯环上的羧基以及末端 F 原子则可以与 S653, R377 和 K256 形成强氢键相互作用, 这些相互作用是 **5l** 对野生型 AtAHAS 和 P197L 突变体同时具有强抑制作用的分子基础。进一步观察化合物 **5l** 在两个活性腔中结合构象叠合图(图 2C)发现, 当 P197 突变为 L197 时, 残基体积变大, 而配体 **5l** 本身具有强的构象柔性, 使得分子苯甲酸片段向活性腔内部稍有偏移, 而末端单氟乙基的构象则明显地向下偏转, 这种构象变化使分子避免了与 L197 之间的立体冲突, 与前文分子设计的猜想相一致。构象偏转直接导致了化合物 **5l** 末端 F 原子与野生型 AtAHAS 中 S653 之间的氢键相互作用的丢失以及羧基与 K256 之间氢键作用的减弱。但使该分子与 P197L 突变体形成了多个新的相互作用, 如分子的羧基与 R377 形成了两组氢键作用(与野生型 AtAHAS 中的 R377 仅有一组氢键), 末端的 F 原子与 P197L 突变体中的 R377 形成了新的强氢键作用。这些新的氢键作用大大提高了化合物 **5l** 在突变体中的静电贡献($\Delta\Delta E_{ele} = \Delta E_{ele,P197L} - \Delta E_{ele,wild-type} = -28.13 \text{ kJ/mol}$, 并且静电能的增加对于最终配体结合自由能的改变占据了主导地位(表 2), 使分子在 P197L 突变体的结合亲和力优于其在野生型 AtAHAS 中的结合亲和力($\Delta\Delta G_{cal} = \Delta G_{cal,P197L} - \Delta G_{cal,wild-type} = -5.02 \text{ kJ/mol}$), 该结果很好地解释了化合物 **5l** 在分子水平上的反抗性机制。

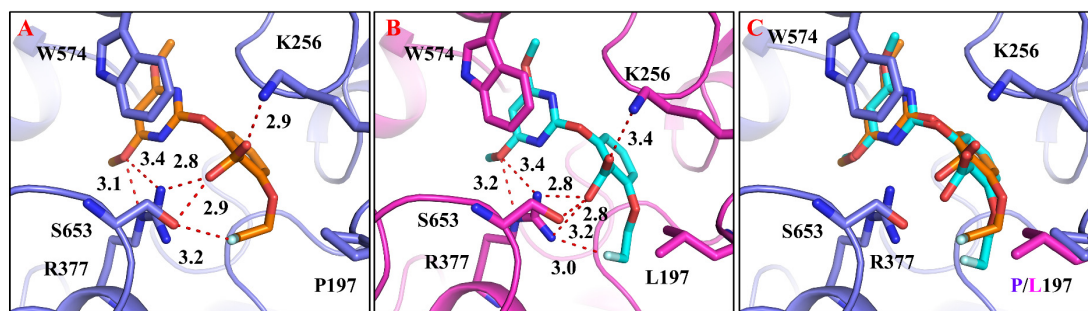


图 2 化合物 **5l** 与(A)野生型 AtAHAS 及(B) P197L 突变体的结合模式示意图和(C)化合物 **5l** 与野生型 AtAHAS(配体为橙色, 蛋白为蓝色)和 P197L 突变体(配体为蓝绿色, 蛋白为玫红色)结合模式的叠合图

Figure 2 Binding mode of compound **5l** with (A) wild-type AtAHAS, (B) P197L mutant and (C) the superposition of the binding models of compound **5l** with wild-type AtAHAS (ligand showed as orange and protein showed as blue) and P197L mutant (ligand showed as cyan and protein showed as magenta)

表 2 化合物 **5l** 分别在野生型 AtAHAS 和 P197L 突变体中的结合自由能以及各能量分项(kJ/mol)

Table 2 Binding free energy and energy component analysis (kJ/mol) of compound **5l** in wild-type AtAHAS and P197L mutant, respectively

AHAS	ΔE_{ele}	$\Delta\Delta E_{ele}$	ΔE_{VDW}	ΔE_{GAS}	ΔE_{PBSOL}	ΔH	$-T\Delta S$	ΔG_{cal}^a	$\Delta\Delta G_{cal}^b$
Wild-type	-302.09	0	-222.23	-524.28	334.53	-189.74	84.64	-105.11	0
P197L	-330.22	-28.13	-214.90	-545.08	354.08	-191.00	80.87	-110.13	-5.02

^a Results were determined by the MM/PBSA calculation; ^b $\Delta\Delta = \Delta_{P197L} - \Delta_{wild-type}$.

1.3 化合物 5a~5p 的温室盆栽除草活性测定

我们采用温室盆栽法对新合成的化合物进行除草剂活性测试, 选择播娘蒿作为测试杂草, AHAS 未突变的播娘蒿为敏感型, P197L-AHAS 突变的播娘蒿^[14]为抗性生物型, 并选择双草醚作为阳性对照, 结果如表 3 所示. 经测试, 在 150 g ai/ha 的剂量下, 双草醚对敏感型杂草播娘蒿表现出了 100% 的抑制作用, 而对于抗性播娘蒿的抑制率下降到 80%; 当剂量降低至 37.5 g ai/ha, 其对抗性播娘蒿仅表现出 40% 的除草活性, 而对敏感型播娘蒿仍维持了 90% 以上的抑制作用, 说明双草醚确实对 P197L-AHAS 突变的杂草表现出一定的抗药性, 这与分子水平计算得到的抗性倍数结果相一致.

表 3 目标化合物 5a~5p 对敏感生物型播娘蒿以及抗性播娘蒿的除草活性

Table 3 Herbicidal activities of compounds 5a~5p against sensitive and resistant *Descurainia sophia*

Compd.	Dosage/ (g ai·ha ⁻¹)	Sensitive <i>Des- curainia sophia</i>	Resistant <i>Des- curainia sophia</i> ^a
5a	150	100	100
5a	75	90	85
5a	37.5	70	70
5b	150	70	30
5c	150	50	50
5d	150	30	60
5e	150	50	60
5f	150	95	90
5f	75	70	70
5f	37.5	50	40
5g	150	50	60
5h	150	30	0
5i	150	50	30
5j	150	80	50
5k	150	70	60
5l	150	100	95
5l	75	90	90
5l	37.5	85	85
5m	150	90	80
5m	75	80	70
5m	37.5	70	30
5n	150	50	60
5o	150	0	0
5p	150	50	30
Bispyribac ^b	150	100	80
Bispyribac	75	95	50
Bispyribac	37.5	90	40

^a AHAS mutation site P197L; ^b Positive control: commercial AHAS inhibitor.

对于新合成的化合物 5a~5p, 在 150 g ai/ha 剂量下, 大部分化合物对抗性播娘蒿表现出一定的抑制作用, 化合物 5a、5d、5e、5f、5g、5k、5l、5m 以及 5n 的杂草抑制率超过 60%, 具有深入研究的价值. 进一步对比这些化合物对敏感型播娘蒿的活性数据发现, 化合

物 5d、5e、5g 和 5n 对敏感型杂草的除草活性低于 50%, 因而不列入活体反抗性的范畴内. 与此相反的是, 化合物 5a、5f、5k、5l 以及 5m 对敏感型播娘蒿具有 70% 以上的抑制作用. 综合考虑对两种播娘蒿总体的除草防效, 进一步观察到 5a、5f、5l 和 5m 对敏感型和抗性播娘蒿的杂草控制作用均超过了 80%, 说明这四个 AHAS 抑制剂在活体水平具有良好反抗性的同时也兼备优异的除草活性. 值得一提的是, 尽管化合物 5o 具有良好的酶抑制活性和反抗性属性, 但其对敏感型和抗性播娘蒿却均未表现出防治作用. 我们推测产生这种巨大差异的主要原因可能是化合物 5o 侧链的环氧乙烷片段在杂草体内稳定性不足, 容易被快速代谢, 从而无法被杂草吸收和传导进入预期靶标.

为了在活体水平筛选出该系列最具潜力的先导化合物, 对上述四个有希望的化合物进行了降低浓度的测试. 当剂量降低至 75 g ai/ha 时, 化合物 5a 和 5l 对敏感型和抗性播娘蒿的除草抑制率仍然维持在 85% 以上, 而 5f 和 5m 则对这两种播娘蒿的抑制率降低至 70%~80%. 在最低施用剂量 37.5 g ai/ha 下, 化合物 5a 的总体除草活性依然超过 70%. 更为突出的是, 化合物 5l 在该浓度下对两种测试杂草的除草防效维持在 85% 左右, 相比于该系列其他化合物表现出更优的除草活性, 并且可以与双草醚对敏感型播娘蒿的除草活性(抑制率为 90%)相媲美. 同时, 该化合物不仅实现了酶水平的高活性与反抗性之间的平衡, 并且在活体水平上也兼备了高除草活性和反抗性. 综合而言, 化合物 5l 作为一种反抗性抑制剂具有非常大的开发潜力, 可以用于防除 P197L-AHAS 突变的抗性杂草.

2 结论

以低抗性 AHAS 抑制剂双草醚为先导, 利用“构象柔性度分析”反抗性分子设计策略, 将柔性更大的烷氧基链引入分子侧链, 设计了一类新型嘧啶水杨酸类衍生物. 评价了其野生型 *AtAHAS* 和 P197L 突变体的抑制活性, 讨论了其结构与活性、结构与抗性倍数之间的关系, 测试结果表明, 大部分化合物对这两种测试酶表现出了良好的抑制作用, 其中以化合物 5g 和 5l 为代表的抑制剂表现出了良好的反抗性(RF≤1), 并且化合物 5l 对野生型 *AtAHAS* 和 P197L 突变体的抑制活性均达到亚微摩尔水平, 实现了本工作设计之初的预期目标. 更进一步地, 利用分子模拟对新筛选得到的反抗性抑制剂先导 5l 进行了分子机制的研究, 发现分子构象柔性使得抑制剂在 P197L 突变体中避免了与 L197 之间的立体冲突, 同时可以与突变体形成新的相互作用, 使其在突变体的结合能优于其在野生型 *AtAHAS* 的结合能, 因而具有反

抗性;同时,末端F原子产生的强氢键作用是该化合物在本系列化合物中总体酶抑制活性最优的主要原因之一。在后续盆栽除草活性筛选中发现,化合物**5a**、**5f**、**5l**和**5m**在150 g ai/ha的测试浓度下对抗性(P197L-AHAS 突变)播娘蒿表现出优异的除草防效,明显优于对照药剂双草醚。更为突出的是,在最低剂量 37.5 g ai/ha 下,化合物**5l**对敏感型和抗性播娘蒿的除草活性仍然超过 85%,实现了活体水平的高活性和抗性。综上所述,该系列目标化合物的设计为今后发现更多对P197L突变体具有抗性的新型AHAS抑制剂先导奠定了坚实的基础。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

Büchi M-545 数字熔点仪(Flawil, Switzerland, 未校准); Varian VNMR 400 和 600 MHz 核磁共振波谱仪(Varian, Palo Alto, CA), TMS 为内标, DMSO- d_6 作溶剂; Agilent 6224 TOF 高分辨质谱分析仪(Santa Clara, CA); WS70-1 型远红外线干燥箱; ZF-20D 型暗箱紫外分析仪; Büchi R-200 型旋转蒸发仪(Flawil, Switzerland); Heidolph Hei-Tec 加热型磁力搅拌器(Darmstadt, German); Sartorius 万分之一电子天平。

所有使用的分析纯或化学纯溶剂均购自于国药集团化学试剂有限公司,如无特殊说明均经标准操作干燥处理。所有合成原料购买于阿拉丁化学试剂公司、百灵威科技有限公司或上海毕得医药科技有限公司。

3.2 实验方法

3.2.1 5-羟基-2,2-二甲基-4H-苯并[d][1,3]二噁英-4-酮(中间体**2**)的合成的合成

在500 mL三颈瓶中,将50 mmol的2,6-二羟基苯甲酸(**1**)、4.75 mL 丙酮和0.5 mmol DMAP溶于100 mL 无水乙二醇二甲醚溶剂(DME)中,接着氮气保护下并控温于 $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$,逐滴向上述体系中加入5.25 mL SOCl_2 和30 mL DME 混合溶液,后移入室温并反应约2 d,薄层色谱(TLC)监测反应直至原料消失,随后减压脱干溶剂,大量固体析出,用饱和 NaHCO_3 溶液对析出固体进行洗涤,最后再用正己烷/乙酸乙酯对残渣进行重结晶得到关键中间体**2**^[12],表征数据与文献[12]一致。

3.2.2 2-烷氧基取代水杨酸衍生物(中间体**4**)的合成

在100 mL茄形瓶中,将2 mmol中间体**2**和4 mmol K_2CO_3 溶于10 mL 四氢呋喃溶剂中,室温搅拌10 min后向反应体系中缓慢加入2.1 mmol对应的烷基溴化物或碘化物,于 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下反应约3 h, TLC 实时监测反应进程,待原料消失后再向体系中加入4 mmol 氢氧化钠以及10

mL 水,仍将反应温度维持在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, TLC 实时监测反应进程,当中间体**3**完全转化后,将体系冷却至室温,减压脱除溶剂,往残留物中缓慢滴加1 mol/L HCl,观察到大量固体析出,低温静置后抽滤,滤饼经冰水多次洗涤,红外灯烘干即可得到相应的中间体**4**^[13],无需进一步提纯可直接进行下一步反应。

3.2.3 目标化合物**5a**~**5p**的合成

在100 mL茄形瓶中,将2 mmol中间体**4**和8 mmol 无水碳酸钾溶解在30 mL 重蒸甲苯溶剂中,于室温下搅拌约1 h,再向反应体系中加入2.1 mmol DMSP,然后升温回流, TLC 监测反应进程,待中间体**4**反应完全后将体系冷却至室温,再加入40 mL 1 mol/L HCl 溶液淬灭反应,乙酸乙酯(20 mL $\times$ 3)萃取水相,合并有机相,无水硫酸钠干燥有机相,减压蒸馏,残留物经柱层析分离纯化[V(石油醚): V(乙酸乙酯)=20:10]得到所需目标化合物。

2-((4,6-二甲氧基嘧啶-2-基)氧基)-6-(2-(甲氧基)乙氧基)苯甲酸(**5a**): 产率 84%, 白色固体, m.p. $121\sim 122\text{ }^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.96 (s, 1H), 7.40 (dd, $J=8.4, 8.4\text{ Hz}$, 1H), 6.99 (d, $J=8.4\text{ Hz}$, 1H), 6.89 (d, $J=8.4\text{ Hz}$, 1H), 6.00 (s, 1H), 4.17 (t, $J=6.0\text{ Hz}$, 2H), 3.77 (s, 6H), 3.65 (t, $J=6.0\text{ Hz}$, 2H), 3.31 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 172.3, 165.3, 163.1, 155.5, 149.1, 130.0, 118.5, 114.9, 109.2, 83.9, 70.2, 68.3, 58.4, 54.3; HRMS-ESI calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{NaO}_7$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ 373.1006, found 373.1017.

2-((4,6-二甲氧基嘧啶-2-基)氧基)-6-(2,2-(二甲氧基)乙氧基)苯甲酸(**5b**): 产率 59%, 白色固体, m.p. $110\sim 111\text{ }^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.95 (s, 1H), 7.40 (dd, $J=8.4, 8.4\text{ Hz}$, 1H), 7.01 (d, $J=8.4\text{ Hz}$, 1H), 6.90 (d, $J=8.4\text{ Hz}$, 1H), 5.99 (s, 1H), 4.64 (t, $J=5.4\text{ Hz}$, 1H), 4.04 (d, $J=5.4\text{ Hz}$, 2H), 3.77 (s, 6H), 3.35 (s, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 172.7, 165.5, 163.4, 155.5, 149.4, 130.2, 118.8, 115.2, 109.6, 101.9, 84.0, 68.7, 54.3, 54.1; HRMS-ESI calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{NaO}_8$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ 403.1117, found 403.1134.

2-((4,6-二甲氧基嘧啶-2-基)氧基)-6-(2-(甲硫基)乙氧基)苯甲酸(**5c**): 产率 81%, 白色固体, m.p. $109\sim 110\text{ }^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.96 (s, 1H), 7.39 (dd, $J=8.4, 8.4\text{ Hz}$, 1H), 6.99 (d, $J=8.4\text{ Hz}$, 1H), 6.88 (d, $J=8.4\text{ Hz}$, 1H), 5.98 (s, 1H), 4.21 (t, $J=6.0\text{ Hz}$, 2H), 3.76 (s, 6H), 2.81 (t, $J=6.0\text{ Hz}$, 2H), 2.15 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 172.7, 165.7, 163.4, 155.6, 149.4, 130.2, 118.7, 115.3, 109.4, 84.0, 68.7, 54.3, 32.2, 15.5. HRMS-ESI calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{NaO}_6\text{S}$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$

389.0778, found 389.0793.

2-((4,6-二甲氧基嘧啶-2-基)氧基)-6-(2-(甲磺基)乙氧基)苯甲酸(**5d**): 产率 79%, 白色固体, m.p. 139~140 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 13.09 (s, 1H), 7.44 (dd, $J=8.4$, 8.4 Hz, 1H), 7.05 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.95 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 5.99 (s, 1H), 4.42 (t, $J=4.4$ Hz, 2H), 3.77 (s, 6H), 3.62 (t, $J=4.4$ Hz, 2H), 3.06 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 172.7, 165.6, 163.4, 155.0, 149.5, 130.6, 118.4, 115.7, 109.0, 84.0, 63.2, 54.3, 53.5, 42.4; HRMS-ESI calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{NaO}_8\text{S}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 421.0676, found 421.0687.

2-((4,6-二甲氧基嘧啶-2-基)氧基)-6-(2-(三氟甲氧基)乙氧基)苯甲酸(**5e**): 产率 39%, 白色固体, m.p. 105~106 °C; ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.93 (s, 1H), 7.42 (dd, $J=8.4$, 8.4 Hz, 1H), 7.01 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.92 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 5.99 (s, 1H), 4.38 (t, $J=4.8$ Hz, 2H), 4.33 (t, $J=4.8$ Hz, 2H), 3.77 (s, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 172.6, 165.4, 163.4, 155.3, 149.5, 130.2, 121.3 (q, $J=253.4$ Hz), 118.9, 115.6, 109.6, 84.0, 66.7, 66.5, 54.2; HRMS-ESI calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 405.0904, found 405.0892.

2-((4,6-二甲氧基嘧啶-2-基)氧基)-6-(3-(甲氧基)丙氧基)苯甲酸(**5f**): 产率 78%, 白色固体, m.p. 84~85 °C; ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.93 (s, 1H), 7.40 (dd, $J=8.4$, 8.4 Hz, 1H), 6.98 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.88 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.00 (s, 1H), 4.09 (t, $J=6.0$ Hz, 2H), 3.78 (s, 6H), 3.46 (t, $J=6.0$ Hz, 2H), 3.24 (s, 3H), 1.98~1.85 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 172.3, 165.4, 163.1, 155.6, 149.0, 130.0, 118.4, 114.7, 109.1, 83.9, 68.2, 65.4, 57.9, 54.3, 28.9; HRMS-ESI calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{NaO}_7$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 387.1163, found 387.1178.

2-((甲氧基)甲氧基)-6-((4,6-二甲氧基嘧啶-2-基)氧基)苯甲酸(**5g**): 产率 72%, 白色固体, m.p. 78~79 °C; ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 13.06 (s, 1H), 7.40 (dd, $J=8.4$, 8.4 Hz, 1H), 7.07 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.95 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.01 (s, 1H), 5.26 (s, 2H), 3.78 (s, 6H), 3.39 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 172.7, 165.7, 163.5, 153.9, 149.4, 130.2, 119.7, 116.0, 111.7, 94.3, 84.0, 55.9, 54.4; HRMS-ESI calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{NaO}_7$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 359.0850, found 359.0866.

2-((4,6-二甲氧基嘧啶-2-基)氧基)-6-(2-乙氧基-2-氧代乙氧基)苯甲酸(**5h**): 产率 88%, 白色固体, m.p. 123~124 °C; ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.99 (s, 1H), 7.38 (dd, $J=8.4$, 8.4 Hz, 1H), 6.92 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.86 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.00 (s, 1H), 4.86 (s, 2H), 4.18 (q,

$J=7.2$ Hz, 2H), 3.77 (s, 6H), 1.22 (t, $J=7.2$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 172.6, 168.3, 165.4, 163.4, 155.0, 149.5, 130.1, 118.7, 115.6, 109.3, 84.0, 65.5, 60.7, 54.3, 14.0; HRMS-ESI calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{NaO}_8$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 401.0961, found 401.0964.

2-((4,6-二甲氧基嘧啶-2-基)氧基)-6-(2-氧代丙氧基)苯甲酸(**5i**): 产率 82%, 白色固体, m.p. 128~129 °C; ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 13.01 (s, 1H), 7.37 (dd, $J=7.2$, 7.2 Hz, 1H), 6.90 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 6.83 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 6.00 (s, 1H), 4.86 (s, 2H), 3.78 (s, 6H), 2.17 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 204.1, 172.7, 165.6, 163.4, 155.1, 149.5, 130.3, 118.5, 115.4, 109.8, 84.0, 72.9, 54.4, 26.3; HRMS-ESI calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 349.1030, found 349.1027.

2-((4,6-二甲氧基嘧啶-2-基)氧基)-6-(2-氯乙氧基)苯甲酸(**5j**): 产率 76%, 白色固体, m.p. 107~108 °C; ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.99 (s, 1H), 7.41 (dd, $J=7.8$, 7.8 Hz, 1H), 7.01 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 6.93 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 6.00 (s, 1H), 4.33 (t, $J=4.8$ Hz, 2H), 3.92 (t, $J=4.8$ Hz, 2H), 3.77 (s, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 172.7, 165.5, 163.5, 155.3, 149.4, 130.3, 118.9, 115.6, 109.7, 84.0, 69.0, 54.4, 42.9; HRMS-ESI calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{NaO}_6$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 377.0511, found 377.0517.

2-((4,6-二甲氧基嘧啶-2-基)氧基)-6-(2-溴乙氧基)苯甲酸(**5k**): 产率 49%, 白色固体, m.p. 113~114 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.97 (s, 1H), 7.41 (dd, $J=8.4$, 8.4 Hz, 1H), 7.00 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.92 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.00 (s, 1H), 4.39 (t, $J=4.8$ Hz, 2H), 3.77 (s, 8H); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 172.7, 165.5, 163.4, 155.3, 149.4, 130.3, 118.9, 115.6, 109.8, 84.0, 68.8, 54.4, 31.1; HRMS-ESI calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{BrN}_2\text{NaO}_6$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 421.0006, found 421.0009.

2-((4,6-二甲氧基嘧啶-2-基)氧基)-6-(2-氟乙氧基)苯甲酸(**5l**): 产率 57%, 白色固体, m.p. 92~93 °C; ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.98 (s, 1H), 7.41 (dd, $J=8.4$, 8.4 Hz, 1H), 7.00 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.92 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.00 (s, 1H), 4.72 (d, $J=48.0$ Hz, 2H), 4.32 (d, $J=30.0$ Hz, 2H), 3.77 (s, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 172.3, 165.2, 163.1, 155.2, 149.1, 129.9, 118.6, 115.2, 109.4, 83.9, 81.9 (d, $J=167.5$ Hz), 68.1 (d, $J=19.0$ Hz), 54.2; HRMS-ESI calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{FN}_2\text{NaO}_6$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 361.0806, found 361.0823.

2-((4,6-二甲氧基嘧啶-2-基)氧基)-6-(2,2-二氟乙氧基)苯甲酸(**5m**): 产率 71%, 白色固体, m.p. 109~

110 °C; ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 13.04 (s, 1H), 7.44 (dd, $J=8.4$, 8.4 Hz, 1H), 7.06 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.96 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.36 (t, $J=54.4$ Hz, 1H), 6.00 (s, 1H), 4.40 (td, $J=14.4$, 3.00 Hz, 2H), 3.77 (s, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 172.3, 165.0, 163.0, 154.5, 149.1, 130.1, 118.7, 115.9, 113.7 (t, $J=237.0$ Hz), 109.7, 83.9, 67.2 (t, $J=26.8$ Hz), 54.3; HRMS-ESI calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{F}_2\text{N}_2\text{NaO}_6$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 379.0712, found 379.0726.

2-((4,6-二甲氧基嘧啶-2-基)氧基)-6-(2,2,2-三氟乙氧基)苯甲酸(**5n**): 产率 55%, 白色固体, m.p. 113~114 °C; ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 13.12 (s, 1H), 7.46 (dd, $J=8.4$, 8.4 Hz, 1H), 7.10 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.01 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.01 (s, 1H), 4.85 (dd, $J=17.2$, 8.4 Hz, 2H), 3.77 (s, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 172.7, 165.1, 163.4, 154.1, 149.5, 130.3 (d, $J=36.6$ Hz), 123.8 (q, $J=278.2$ Hz), 119.1, 116.70 (q, $J=54.9$ Hz), 110.1 (d, $J=53.4$ Hz), 84.1 (d, $J=20.1$ Hz), 65.4 (d, $J=34.4$ Hz), 54.3; HRMS-ESI calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_2\text{NaO}_6$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 397.0623, found 397.0650.

2-((4,6-二甲氧基嘧啶-2-基)氧基)-6-(2,3-环氧丙氧基)苯甲酸(**5o**): 产率 66%, 白色固体, m.p. 95~96 °C; ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 12.99 (s, 1H), 7.40 (dd, $J=8.4$, 8.4 Hz, 1H), 6.99 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.90 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 5.99 (s, 1H), 4.41 (d, $J=11.4$ Hz, 1H), 4.00~3.90 (m, 1H), 3.77 (s, 6H), 3.34 (s, 1H), 2.83 (t, $J=5.4$ Hz, 1H), 2.73 (d, $J=4.8$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 172.7, 165.6, 163.4, 155.6, 149.4, 130.3, 118.7, 115.4, 109.6, 84.0, 69.6, 54.3, 49.7, 43.6; HRMS-ESI calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 349.1030, found 349.1016.

2-((4,6-二甲氧基嘧啶-2-基)氧基)-6-((四氢呋喃-2-基)甲氧基)苯甲酸(**5p**): 产率 63%, 白色固体, m.p. 137~138 °C; ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 12.97 (s, 1H), 7.38 (dd, $J=7.2$, 7.2 Hz, 1H), 6.97 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 6.88 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 6.00 (s, 1H), 4.15 (s, 1H), 4.02 (d, $J=7.8$ Hz, 2H), 3.77 (s, 6H), 3.66 (d, $J=3.6$ Hz, 1H), 3.36 (s, 1H), 1.96 (s, 1H), 1.89 (s, 1H), 1.80 (s, 1H), 1.75 (s, 1H); ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 172.6, 165.6, 163.4, 155.9, 149.3, 130.1, 118.6, 115.0, 109.3, 83.9, 76.2, 71.0, 67.7, 54.2, 27.4, 25.3; HRMS-ESI calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{NaO}_7$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 399.1163, found 399.1181.

3.2.5 酶抑制活性测定实验

根据先前文献中描述的方法^[10b-10f,16], 对(野生型和 P197L 突变型)AtAHAS 进行表达构建. 在抑制动力学测定中, 将合成的化合物溶于二甲基亚砜中, 配置成浓度

分别为 6000、600、60、6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的待测母液. 在启动酶反应时, 将溶液稀释至最终浓度为 200、20、2、0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 并使用 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化镁、100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 丙酮酸、10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 黄素腺嘌呤二核苷酸、1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫胺素二磷酸和 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸钾(pH=7.5)缓冲液作为最佳测试条件. 新合成化合物的制动力学常数(K_i 值)使用先前报道的方法进行测定^[10,16].

3.2.6 分子模拟和结合自由能计算

首先, 从 PDB 数据库(Protein Data Bank)下载了双草醚与野生型 AtAHAS 共晶体结构的 PDB 文件(PDB ID: 5K2O)^[13]. 根据先前报道的方法^[10b-10f], 通过 SYBYL 2.0 软件, 对 P197L 突变体的 3D 结构进行了构建. 随后, 基于以上结构, 采用 AutoDock 4.2 软件对代表性化合物进行分子对接, 参考双草醚与 AtAHAS 的结合模式确认了目标化合物在野生型 AtAHAS 中的结合构象; 同时, 对基于 P197L 突变体对接得到的 256 个构象选择最优构象, 并对其进行 1~2 ns 的平衡动力学模拟. 最后, 采用分子力学泊松-玻尔兹曼表面积(MM-PBSA)方法^[17]对代表性化合物在上述两种蛋白质的结合自由能进行计算.

3.2.7 温室盆栽除草活性测定实验

供试靶标为浙江省化工研究院提供的敏感生物型播娘蒿和抗性(P197L-AHAS)播娘蒿^[14]. 使用 Tween-80 作为乳化剂, 使用二甲基亚砜作为溶剂, 将所合成的化合物配置成浓度为 100 g/L 的备用浓缩物. 施药前将其稀释至对应浓度(150、75、37.5 g ai/ha), 使用先前公布的方法^[10b-10f]对化合物 **5a**~**5p** 的除草活性(生长抑制率)进行测定和评价(结果由浙江省化工研究院提供).

辅助材料(Supporting Information) 化合物 **5a**~**5p** 的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱图. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Gianessi, L. P. *Pest Manage. Sci.* **2013**, *47*, 1099.
- [2] (a) Ruegg, W. T.; Quadranti, M.; Zoschke, A. *Weed Res.* **2007**, *47*, 271.
(b) Renton, M.; Busi, R.; Neve, P.; Thornby, D.; Vila-Aiub, M. *Pest Manage. Sci.* **2014**, *70*, 1394.
- [3] (a) Owen, M. D. *Weed Sci.* **2016**, *70*, 570.
(b) Green, J. M.; Owen, M. D. K. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 5819.
(c) Powles, S. B.; Yu, Q. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2010**, *61*, 317.
- [4] (a) Heap, I. *Pest Manage. Sci.* **2014**, *70*, 1306.
(b) Busi, R.; Vila-Aiub, M. M.; Beckie, H. J.; Gaines, T. A.; Goggin, D. E.; Kaundun, S. S.; Lacoste, M.; Neve, P.; Nissen, S. J.; Norsworthy, J. K.; Renton, M.; Shane, D. L.; Tranel, R. P. J.; Wright, T.; Yu, Q.; Powles, S. B. *Evol. Appl.* **2013**, *6*, 1218.
- [5] Bar-Ilan, A.; Balan, V.; Tittmann, K.; Golbik, R.; Vyazmensky, M.; Huebner, G.; Barak, Z.; Chipman, D. M. *Biochemistry* **2001**, *40*, 11946.

- [6] Qu, R. Y.; Liu, Y. C.; Chen, Q.; Yang, G. F. *J. Cent. China Norm. Univ. (Nat. Sci.)* **2015**, *49*, 735 (in Chinese)
(曲仁渝, 刘玉超, 陈琼, 杨光富, 华中师范大学学报(自然科学版), **2015**, *49*, 735.)
- [7] (a) Yu, Q.; Powles, S. B. *Pest Manage. Sci.* **2014**, *70*, 1340.
(b) Heap, I. *The International Survey of Herbicide-Resistant Weeds*, www.weedscience.org (accessed March 15, 2020).
- [8] Corbett, C. A. L.; Tardif, F. J. *Pest Manage. Sci.* **2006**, *62*, 584.
- [9] (a) Intanon, S.; Perez-Jones, A.; Hulting, A. G.; Mallory-Smith, C. A. *Weed Sci.* **2011**, *59*, 431.
(b) Delye, C.; Causse, R.; Michel, S. *Pest Manage. Sci.* **2016**, *72*, 89.
- [10] (a) Ji, F. Q.; Niu, C. W.; Chen, C. N.; Chen, Q.; Yang, G. F.; Xi, Z.; Zhan, C. G. *ChemMedChem* **2008**, *3*, 1203.
(b) Liu, Y. C.; Qu, R. Y.; Chen, Q.; Yang, J. F.; Niu, C. W.; Xi, Z.; Yang, G. F. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 4845.
(c) Qu, R. Y.; Yang, J. F.; Liu, Y. C.; Chen, Q.; Hao, G. F.; Niu, C. W.; Xi, Z.; Yang, G. F. *Pest Manage. Sci.* **2017**, *73*, 1373.
(d) Qu, R. Y.; Yang, J. F.; Devendar, P.; Kang, W. M.; Liu, Y. C.; Chen, Q.; Niu, C. W.; Xi, Z.; Yang, G. F. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 11170.
(e) Qu, R. Y.; Yang, J. F.; Chen, Q.; Niu, C. W.; Xi, Z.; Yang, W. C.; Yang, G. F. *Pest Manage. Sci.* **2020**, *76*, 3403.
(f) Qu, R. Y.; Yan, Y. C.; Yang, J. F.; Chen, Q.; Yang, G. F. *Chin. J. Org. Chem.* **2019**, *39*, 2303 (in Chinese)
(曲仁渝, 严耀超, 杨景芳, 陈琼, 杨光富, 有机化学, **2019**, *39*, 2303.)
(g) Li, K. J.; Qu, R. Y.; Liu, Y. C.; Yang, J. F.; Devendar, P.; Chen, Q.; Niu, C. W.; Xi, Z.; Yang, G. F. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 3773.
- [11] (a) Lin, H. Y.; Chen, X.; Chen, J. N.; Wang, D. W.; Wu, F. X.; Lin, S. Y.; Liu, J. J.; Dong, J. Q.; Zhan, C. G.; Wu, J. W.; Yang, W. C.; Yang, G. F. *Research* **2019**, 2602414.
(b) Xiong, L.; Li, Hua.; Jiang, L. N.; Ge, J. M.; Yang, W. C.; Zhu, X. L.; Yang, G. F. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 1021.
(c) 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*, 4830.
(d) Hao, G. F.; Wang, F.; Li, Hui, Zhu, X. L.; Yang, W. C.; Huang, L. S.; Wu, J. W.; Berry, E. A.; Yang, G. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11168.
- [12] (a) Qu, R. Y.; Liu, Y. C.; Wu, Q. Y.; Chen, Q.; Yang, G. F. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 8123.
(b) Hadfield, A.; Schweitzer, H.; Trova, M. P.; Green, K. *Synth. Commun.* **1994**, *24*, 1025.
- [13] Garcia, M. D.; Nouwens, A.; Lonhienne, T. G.; Guddat, L. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114*, 1091.
- [14] Cui, H. L.; Zhang, C. X.; Wei, S. H.; Zhang, H. J.; Li, X. J.; Zhang, Y. Q.; Wang, G. Q. *Weed Sci.* **2011**, *59*, 376.
- [15] (a) Souto, J. A.; Benedetti, R.; Otto, K.; Miceli, M.; Álvarez, R.; Altucci, L.; de Lera, A. R. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 1530.
(b) Ghizzoni, M.; Boltjes, A.; Graaf, C. d.; Haisma, H. J.; Dekker, F. J. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 5826.
- [16] Liu, Y. C. *Ph.D. Dissertation*, Central China Normal University, Wuhan, **2014** (in Chinese)
(刘玉超, 博士论文, 华中师范大学, 武汉, **2014**.)
- [17] Sitkoff, D.; Sharp, K. A.; Honig, B. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 1978.

(Zhao, C.)