含脒结构单元的氨基嘧啶衍生物的合成与生物活性研究

何海峰^b 夏 芹^a 贺红武^{*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 武汉 430079)^(b) 江西科技师范大学化学化工学院 南昌 330046)

摘要 丙酮酸脱羧酶是连接糖酵解与三羧酸循环的关键酶,目前尚无以丙酮酸脱羧酶(PDHc-E1)为靶标的杀菌剂。拟通过设计针对微生物 PDHc-E1 的抑制剂来获得具有杀菌活性的化合物。以课题组前期发现的 *E. coli* PDHc-E1 抑制剂 L 为先导化合物进行结构修饰,通过肼与醛的缩合反应合成了 14 个新型含脒结构单元的氨基嘧啶衍生物 I 作为潜在的 PDHc-E1 抑制剂。发现 2-甲基-4-氨基-5-(4-溴苯脒)-嘧啶(I-6)不仅对 *E. coli* PDHc-E1 显示较好的活性(IC₅₀=26.45 μmol/L),同时对真菌花生褐斑(EC₅₀ 14.11 μg/mL)和苹果轮纹(EC₅₀ 0.64 μg/mL)显示了高效活性,具有进一步研究的价值。由此,通过对先导结构 2-甲基-4-氨基嘧啶衍生物 L 中的桥键进行结构修饰,获得了对 *E. coli* PDHc-E1 具有抑制作用的高效杀菌活性的化合物。

关键词 丙酮酸脱羧酶; 杀菌剂; 先导化合物; 2-甲基-4-氨基嘧啶衍生物

Synthesis and Biological Evaluation of Pyrimidine Derivatives Containing Hydrazine Structural Unit

He, Haifeng^b Xia, Qin^a He, Hongwu^{*a}^(a) Key Laboratory of Pesticide and Chemical Biology of Ministry of Education, College of Chemistry, Central China Normal University, Wuhan 430079)^(b) School of Chemistry and Chemical Engineering, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013)

Abstract Pyruvate dehydrogenase multienzyme complex (PDHc) is a key enzyme linking glycolysis and the tricarboxylic acid cycle. Currently, there is no fungicide targeting pyruvate decarboxylase (PDHc-E1), the purpose of this study was to obtain compounds with bactericidal activity by designing inhibitors against PDHc-E1. On the basis of lead compound L, fourteen novel aminopyrimidine derivatives I were designed and synthesized by the condensation reaction of hydrazine and aldehydes as potential PDHc-E1 inhibitors. The most effective 5-((2-(4-bromophenyl)hydrazono)methyl)-2-methylpyridin-4-amine (I-6) with good *E. coli* PDHc-E1 enzyme inhibitory activity (IC₅₀=26.45 μmol/L) exhibited most powerful inhibitory potency against *Cercospora arachidicola* Hori (EC₅₀ 14.11 μg/mL) and *Physalospora piricola* Nose (EC₅₀ 0.64 μg/mL). Therefore it could obtain the compound with antifungal activity against microorganism PDHc-E1 enzyme by modifying the bridged linkage in lead structure 2-methyl-4-amino-pyrimidine derivatives L.

Keywords PDHc-E1; fungicide; lead compound; 2-methyl-4-amino-pyrimidine derivatives

杀菌剂的应用和杀虫剂及除草剂一样,已在全球范围内成为保护农作物丰收不可缺少的手段之一,在世界范围内杀菌剂新品种层出不穷,然而,植物病菌是极易产生抗性的一类微生物,因此,为了防止杀菌剂的抗性发展,研发作用机理独特、广谱高效的杀菌剂已成为国际上研究开发的重点。在目前人们正在努力探索的杀

菌剂靶标酶中,丙酮酸脱氢酶复合物(pyruvate dehydrogenase complex, PDHc)是一个令人关注的作用靶标。PDHc 是连接糖酵解与三羧酸循环的关键酶,也是生物体内能量代谢过程的关键酶^[1,2](图 1)。PDHc 主要是由三种酶高度组合而成,其中包括丙酮酸脱羧酶 E1 组分^[3~6](pyruvate dehydrogenase complex E1 component, PDHc-

* Corresponding author. E-mail: he1208@mail.ccnu.edu.cn

Received March 27, 2019; revised May 12, 2019; published online June 6, 2019.

Dedicated to the 100th anniversary of the birth of Professor Ruyi Chen.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21877047, 21867011) and the Project of Science Fund of Jiangxi Education Office (No. GJJ170672).

国家自然科学基金(Nos. 21877047, 21867011)、江西省教育厅基金(No. GJJ170672)资助项目。

图1 丙酮酸脱氢酶复合体的催化作用机制

Figure 1 Catalytic mechanism of pyruvate dehydrogenase complex

E1, EC 1.2.4.1), 二氢硫辛酸转乙酰基酶 E2 (dihydrolipoyl transacetylase, PDHc-E2, EC 2.3.1.12) 和二氢硫辛酸脱氢酶 E3 (dihydrolipoyl dehydrogenase, PDHc-E3, EC 1.8.1.4)。如果PDHc活性受到抑制, 将导致产生的乙酰辅酶 A 减少, 使三羧酸循环不能正常进行, 从而干扰生物体的正常代谢, 最终导致生物体死亡^[7], 其中丙酮酸脱氢酶(PDHc-E1)是 PDHc 催化反应的起始酶, 其催化的第一步反应是唯一的不可逆反应。前期的理论研究表明, 如果针对 PDHc-E1 设计抑制剂, 干扰第一步关键反应的正常进行, 将高效导致有害生物体的死亡^[8]。杀菌剂克菌丹为目前唯一报道的对 PDHc 有抑制作用的广谱杀菌剂, 但无研究表明克菌丹是针对 PDHc-E1 的抑制剂^[9]。由于温血动物中的 PDHc 与微生物中的 PDHc 的组成结构及同源性存在显著的差异性, 为设计合成高选择性 PDHc 抑制剂提供了可行性。因此, 针对国内外未见 PDHc E1 抑制剂类杀菌剂的研究空白, 开展以 PDHc E1 为靶标的杀菌剂的合理设计, 探索发现具有高效高选择的PDHc E1 抑制剂或高效杀菌活性化合物, 具有很好的研究价值和应用价值。

在 PDHc-E1 催化的过程中需要辅酶 ThDP 的参与才能进行, 因此目前获得 PDHc-E1 抑制剂的研究策略之一是通过设计辅酶 ThDP 的类似物来占据 ThDP 的活性空腔, 以达到抑制 PDHc-E1 活性的目的^[10,11]。在 20 世纪 80 年代国外就已有通过对辅酶 ThDP 的结构修饰来获得 PDHc-E1 抑制剂的研究报道^[12~15], 但无 PDHc-E1 抑制剂作为杀菌剂研究应用的报道。对 ThDP 的结构修饰大部分是集中在噻唑环, 保留焦磷酸结构部分。该类抑制剂虽然对 PDHc-E1 具有很好的抑制活性, 但存在结构复杂、不易合成、选择性差以及焦磷酸结构部分的多电荷使细胞吸收和生物利用度差等诸多问题, 导致实用性差^[16]。2012 年, 本课题组贺军波^[17]首次通过三步合成获得了对大肠杆菌(*E. coli*) PDHc-E1 具有抑制活性的 2-甲基-4-氨基-5-(取代-1*H*-1,2,3-三唑基)甲基嘧啶衍生物 **L**, 但其杀菌活性却较差(图 2)。本课题组长期致力于丙酮酸脱氢酶抑制剂的研究, 为本研究奠定了实验基础^[18~24]。

图2 辅酶 ThDP 的结构修饰

Figure 2 Structural modification of coenzyme ThDP

脞类化合物是由脞与醛或酮缩合而成的一类 Schiff 碱类化合物, 许多此类化合物表现出良好的生物活性、较强的配位能力和多样的配位方式, 因此在医药、农药等方面具有广泛的应用^[25]。例如许多脞类农药已实现商品化, 如杀菌剂酞脞(Benquinox)、噻脞(Ferimzone)、玉米田苗后除草剂氟吡草脞(Diflufenzopyr)、肠内杀菌剂硝呋齐特(Nifuroxazide)、化合物 **A** 对立枯丝核菌具有很好的抑制活性等^[26]。此类化合物共同的特点是含有 NHN=活性亚结构单元(图 3)。

图3 含脞结构单元药物

Figure 3 Drugs containing structural units of hydrazone

分析了先导结构 **L** 在大肠杆菌 PDHc-E1 活性空腔中的作用模式(图 4), 分子模拟分析发现先导结构中的

醚键(图 4 红色方框所示)与周围氨基酸残基并无相互作用,三唑环结构单元与活性空腔中的氨基酸残基 His640 和 Glu522 有较弱的相互作用,基于 N 的电负性比 O 的电负性弱,因此 N 比 O 对核外电子的束缚能力差,这样有利于 N 核外电子与周围的氨基酸残基形成氢键,因此本文利用含孤对电子的活性亚结构单元——胍取代先导结构 **L** 中的桥键设计出了目标化合物 **I**。期望获得以 *E. coli* PDHc-E1 为靶标具有杀菌活性的化合物,同时考察桥键的结构变化对其 *E. coli* PDHc-E1 的抑制活性,以及杀菌活性的影响。其设计思路如 Scheme 1 所示。合成路线见 Scheme 2。

图 4 抑制剂在大肠杆菌 PDHc-E1 中的结合模式

Figure 4 Optimal binding model for inhibitor into the active site of *E. coli* PDHc-E1

图式 1 目标化合物的设计

Scheme 1 Design of target compounds

图式 2 目标化合物的合成路线

Scheme 2 Synthetic route of the target compound

1 结果与讨论

1.1 化合物的合成

1.1.1 中间体 2-甲基-4-氨基-5-甲醛嘧啶(M2)的合成

目标化合物 **I** 的合成路线中,化合物 **M2** 是最重要的中间体。为了高收率获得中间体 **M2**,在合成过程中需要注意以下几点:(1)制备乙醇钠时,应该在冰浴下加入钠,以免温度过高造成体系变黄,影响下一步收率;(2)加入乙氧基亚甲基丙二腈时,应该用机械搅拌,并且保证有足够的乙醇,因为反应开始后体系中有大量的固体析出产生凝固,难以搅拌;(3)还原过程中使用的雷尼镍应该回收循环利用,母液应该用水合肼进行中和后柱层析,否则产物难以分离。中间体 **M2** 的氢谱显示,嘧啶环上的氨基氢不是单峰,而是裂分为两重峰,原因是其中一个氢与羰基上氧成了氢键,如 Eq. 1 所示。

1.1.2 目标化合物 **I** 的合成

目标化合物 **I** 未见文献报道。根据含胍类似物合成的相关文献报道,胍主要是肼与醛在加热条件下脱去一分子水而生成。利用此原理来合成目标化合物 **I** 过程中,发现肼与醛的投料比对反应有很大的影响。本文合成目标化合物 **I** 所用到的醛为 2-甲基-4-氨基-5-甲醛嘧啶(**M2**),其在乙醇中的溶解性较好,而肼在乙醇中溶解性较差。为了使肼反应完全,本文采用醛与肼的投料比为 1.1:1 来合成 **I**,反应冷却后有白色固体直接析出,未反应的醛溶解在乙醇中,无杂质析出。反应完成后的体系可直接加水使目标化合物析出并抽滤,并且杂质可通过简单的抽滤而除去,得到的目标化合物再用适量的乙醇洗去未反应的醛或其它杂质,即可得到较纯的目标化合物 **I**。此方法操作简单,无需复杂的后处理程序。

1.2 目标化合物 **I** 对 *E. coli* PDHc-E1 酶抑制活性

为了筛选发现具有高效杀菌活性的 PDHc-E1 抑制剂,本文将重点考察所合成的目标化合物 **I** 对 *E. coli* PDHc-E1 的酶抑制活性及其杀菌活性,总结目标化合物 **I** 的结构与活性之间的关系,同时也可探讨目标化合物的设计思想的合理性。

1.2.1 *E. coli* PDHc-E1 酶抑制活性测试方法

通过本课题组对测活方法及酶动力学条件的系统研究,表明采用 2,6-二氯吡啶酚(DCIP)法^[17,18]具有便于操作、实验数据相对稳定、且试剂价格便宜等优点,因此选择 DCIP 法来测定化合物 **I** 对 *E. coli* PDHc-E1

(Cx-ace)活性的影响。

实验原理: 丙酮酸在 PDHc-E1 的催化作用下生成的羟乙基-ThDP 能够还原 2,6-DCIP, 而 2,6-DCIP 在 600 nm 处有光的吸收, 因此可通过测定 600 nm 处吸光度值的减少量来反映 2,6-DCIP 被还原的量, 进而表示酶活。吸光度值减少的量越少说明化合物对 PDHc-E1 的抑制活性越好。

通过上述酶活测试原理来检测化合物对酶活的抑制作用, 由此来筛选高效的 PDHc-E1 抑制剂, 初筛待测化合物的终浓度设定为 100 $\mu\text{mol/L}$ 。具体筛选方法如下。

置 95 μL 反应混合液: 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ PDHc-E1, 50 mmol/L K_3PO_4 ($\text{pH}=6.4$), 50 $\mu\text{mol/L}$ ThDP, 0.4 mmol/L DCIP, 100 $\mu\text{mol/L}$ 用 DMSO 溶解的待测化合物(对照组加等量的 DMSO), 其余用水补齐, 共配置 4 倍量的反应液于 2 mL 的 EP 管中, 放置在 37 $^\circ\text{C}$ 水浴锅中温育 3 min。

酶促反应: 分别取 95 μL 温育后的反应液加入到 96 孔酶标板的 3 个孔中, 迅速加入 5 μL 1 mmol/L 的底物丙酮酸钠开启反应, 置于酶标仪中测 600 nm 处的吸光度值, 反应 0 min 时测定 $\text{OD}_{0\text{ min}}$, 37 $^\circ\text{C}$ 酶标仪中反应 5 min 后, 测定 $\text{OD}_{5\text{ min}}$, 然后求 5 min 内的吸光度值改变量 $\Delta\text{OD}_{600} = \text{OD}_{0\text{ min}} - \text{OD}_{5\text{ min}}$ 。每次测定均做溶剂 DMSO 的对照实验, 每组实验做 3~5 个平行。

(3) 数据处理: 化合物引起的吸光度值的改变需扣除溶剂 DMSO 的影响, 100 $\mu\text{mol/L}$ 待测化合物的抑制率的计算公式如下:

$$\text{抑制率}(\%) = [(\Delta\text{OD}_{\text{对照}} - \Delta\text{OD}_{\text{实验}}) / \Delta\text{OD}_{\text{对照}}] \times 100\%$$

1.2.2 目标化合物 I 对 *E. coli* PDHc-E1 酶抑制活性

如表 1 所示, 部分化合物在 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下对 *E. coli* PDHc-E1 酶显示一定的抑制活性, 如化合物 I-1、I-3、I-4、I-6、I-9、I-11 的抑制率均大于 60%, 选择部分化合物进一步测试了它们的抑制作用 IC_{50} 。如表 2 所示, 除 I-1 的抑制活性优于相应的先导化合物 L-1 外, 其它化合物对 *E. coli* PDHc-E1 酶的抑制活性较相应的先导化合物 L 有所下降, 如化合物 I-3、I-4、I-5。可能是结构修饰后 I 的分子链长过短, 造成苯环结构单元难以到达对应的活性位点, 虽然修饰后的目标化合物对 *E.*

表 1 目标化合物 I 对 *E. coli* PDHc-E1 的抑制率(%)

Table 1 Structure and inhibitory activity (%) of title compounds I

化合物	R	抑制率/%	化合物	R	抑制率 ^a /%
I-1	H	62.60	I-8	2,4,6-Cl ₃	37.10
I-2	3-I	31.56	I-9	4-CF ₃	84.52
I-3	4-NO ₂	68.25	I-10	3-Cl	34.00
I-4	4-Cl	66.67	I-11	3-Br	76.89
I-5	2,4-Cl ₂	0	I-12	2-Br	39.78
I-6	4-Br	70.93	I-13	3-NO ₂	31.44
I-7	2,4-F ₂	23.81	I-14	2-NO ₂	16.44

coli PDHc-E1 的抑制活性较对应的部分先导化合物 L 有所降低(表 2), 但此类化合物仍然是以 *E. coli* PDHc-E1 为靶标的抑制剂, 为后续发现高效 PDHc-E1 酶抑制剂奠定了实验基础。

表 2 目标化合物 I 对 *E. coli* PDHc-E1 的 IC_{50}

Table 2 IC_{50} of title compounds I against *E. coli* PDHc-E1

化合物	R	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	化合物	R	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$
I-1	H	29.33	I-5	2,4-Cl ₂	>100
L-1	H	55.15	L-5	2,4-Cl ₂	18.74
I-3	4-NO ₂	30.46	I-6	4-Br	26.45
L-3	4-NO ₂	8.80	I-9	4-CF ₃	19.22
I-4	4-Cl	32.65	I-11	3-Br	22.56
L-4	4-Cl	26.44			

1.3 目标化合物的分子模拟研究

为了进一步从分子水平理解化合物 I 与 *E. coli* PDHc-E1 作用靶点的结合模式。本文借助计算机辅助药物设计软件 Sybyl7.3 进行了分子对接模拟研究。在此研究中是选取 ThDP/PDHc-E1 复合物的晶体结构 (PDB:1L8A)^[27] 作为研究的分子对接模型, *E. coli* PDHc-E1 的辅因子 ThDP 分子占据的位点为分子对接活性腔。为了理解抑制剂与靶标 PDHc-E1 相互作用模式, 本文选择对 *E. coli* PDHc-E1 抑制活性最高的化合物 I-9 进行了分子对接研究。其分子对接的结果如图 5 所示。

如图 5 所示, I-9 在 PDHc-E1 活性腔处的结合方式与本课题组前期研究表明的先导化合物 L 或 ThDP 在 PDHc-E1 活性腔处的结合方式相似, 以“V”型构象结合, 可分为三部分进行分析。在“V”型构象的右半部分, I-9 嘧啶环上的氨基与 Val192 形成一个氢键, 氨基嘧啶

图5 抑制剂 **I-9** 在大肠杆菌 PDHc-E1 中的结合模式

Figure 5 Optimal binding model for inhibitor **I-9** into the active site of *E. coli* PDHc-E1

环上的两个氮分别与 Met194 和 Glu571 形成两个氢键。“V”型构象的中间部分，脲结构单元上的氮可以与 Glu522 形成氢键作用。以上氢键作用与先导结构一样，但是先导结构中的苯环上的取代基与氨基酸残基发生了氢键作用，而本文化合物中的苯环上取代基与周围氨基酸残基无氢键作用，有可能是碳链过短造成苯环部分不能到达活性位点，这也很好地解释了本文设计的化合物中苯环上有取代基的抑制活性较先导差，而苯环上无取代基的抑制活性较先导高。如 **I-3** ($R=4\text{-NO}_2$)、**I-4** ($R=4\text{-Cl}$)和 **I-5** ($R=2,4\text{-Cl}_2$)对 *E. coli* PDHc-E1 的抑制活性均比对应的先导化合物 **L-3**、**L-4**、**L-5** 低，而苯环上无取代的 **I-1** ($R=H$)对 *E. coli* PDHc-E1 的抑制活性比对应的先导化合物 **L-1** 高。为进一步设计高效 *E. coli* PDHc-E1 抑制剂指明了方向。

1.4 目标化合物的杀菌活性

选择 *E. coli* PDHc-E1 为微生物的模式靶酶，其研究目的是试图通过设计 *E. coli* PDHc-E1 的高效抑制剂，并从中筛选发现对农业病害具有杀菌活性的化合物。上述研究结果表明所设计的部分化合物 **I** 对微生物大肠杆菌 PDHc-E1 具有不同程度的抑制作用，但是否具有杀菌活性则成为本文关注的问题。因此，本文选择了农业上常见的 9 种病害为测试靶标，如代表性真菌：黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum.sp.cucumebrium* Owen)、花生褐斑病菌(*Cercospora arachidicola* Hori)、苹果轮纹病菌(*Physalospora piricola* Nose)、小麦赤霉病菌(*Gibberella zeae*)、油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de-Bary)、黄瓜灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)。测试浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ ，用十字交叉法测量菌落直径，每个培养基测量三次，取其平均值为菌落的平均直径，并通过以下公式计算抑制率，测试结果如表 3 所示[对照药剂为百菌清]。

菌落扩散直径 = 菌落平均直径 - 菌饼直径

抑制率(%) = (对照菌落扩散直径 - 处理菌落扩散直径) / (对照菌落扩散直径) $\times$ 100%

表3 目标化合物 **I** 对真菌的抑制活性(%)

Table 3 Inhibition rate (%) of title compounds **I** against fungus

化合物	黄瓜枯萎病菌	花生褐斑病菌	苹果轮纹病菌	小麦赤霉病菌	油菜菌核病菌	黄瓜灰霉病菌	水稻纹枯病菌
I-1	50.0	54.5	73.1	38.1	70.8	50.0	50.0
I-2	38.9	18.2	42.3	71.4	77.1	50.0	87.5
I-3	16.7	18.2	26.9	19.0	29.2	28.6	78.1
I-4	61.1	63.6	73.1	76.2	83.3	64.3	84.4
I-5	22.2	36.4	42.3	14.3	35.4	42.9	59.4
I-6	66.7	100.0	100.0	76.2	91.7	85.7	81.3
I-7	38.9	100.0	100.0	66.7	68.8	85.7	68.8
I-8	27.8	36.4	42.3	71.4	35.4	42.9	56.3
I-9	66.7	63.6	84.6	81.0	68.8	75.0	90.6
I-10	50.0	72.7	76.9	81.0	70.8	60.7	84.4
I-11	54.5	53.3	62.5	62.5	48.3	78.8	74.1
I-12	22.2	36.4	38.5	47.6	33.3	42.9	65.6
I-13	27.8	27.3	34.6	33.3	14.6	7.1	40.6
I-14	11.1	18.2	19.2	28.6	35.4	7.1	12.5
百菌清	83.3	75.0	92.3	73.1	96.4	96.1	96.1

通过表 3 可以看出，在 50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下，部分 **I** 系列化合物对花生褐斑、苹果轮纹、小麦赤霉、油菜菌核与水稻纹枯表现出中等至较好的杀菌活性，其中化合物 **I-6** ($R=4\text{-Br}$)对小麦赤霉和油菜菌核病菌；**I-9** ($R=4\text{-CF}_3$)对小麦赤霉和水稻纹枯；**I-10** 对小麦赤霉的抑制活性与商品化杀菌剂百菌清相当。而本课题组前期文献报道的先导化合物 **L** 对上述菌种显示较弱的抑制活性，大部分化合物在 100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下的抑制率小于 60%^[17]。

特别是化合物 **I-6** 与 **I-7** 对花生褐斑与苹果轮纹抑制活性为 100%，优于百菌清的抑制活性，具有进一步研究的价值。因此我们选择化合物 **I-6** 与 **I-7** 进一步测试了对花生褐斑与苹果轮纹的 EC_{50} 值，结果总结如表 4 和表 5 所示。

表4 **I-6** 和 **I-7** 对花生褐斑病菌的 EC_{50} ^a

Table 4 EC_{50} of **I-6** and **I-7** against *Cercospora arachidicola* Hori

化合物	$y=a+bx$	$\text{EC}_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	R
I-6	$y=1.1356x+3.6945$	14.1125	0.9736
I-7	$y=0.8014x+4.1105$	12.8793	0.9937
百菌清	$y=1.3220x+3.5711$	12.0476	0.9565

^a 杀菌活性数据由南开大学生测室提供。

表 5 I-6 和 I-7 对苹果轮纹病菌的 EC_{50} ^a
Table 5 EC_{50} of I-6 and I-7 against *Physalospora piricola* Nose

化合物	$y=a+bx$	$EC_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	R
I-6	$y=0.5755x+5.1106$	0.6425	0.9884
I-7	$y=0.7254x+5.0720$	0.7956	0.9836
百菌清	$y=1.3890x+3.7981$	7.3342	0.9862

^a 杀菌活性数据由南开大学生测室提供.

通过对 I-6 和 I-7 以及对照药剂百菌清对花生褐斑病的毒力曲线测定, 结果发现, 化合物 I-6 和 I-7 对花生褐斑病菌的 EC_{50} 值分别为 14.11 和 12.88 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 化合物 I-7 对花生褐斑病菌的防治效果较 I-6 好, 并与对照药剂百菌清活性相当(EC_{50} 值为 12.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

通过对 I-6 和 I-7 以及对照药剂百菌清对花生褐斑病的毒力曲线测定, 结果发现, 化合物 I-6 和 I-7 对苹果轮纹病的 EC_{50} 值分别为 0.64 和 0.80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 化合物 I-6 对花生褐斑病的防治效果较 I-7 好, 两者都显著优于百菌清. 其活性是对照药剂百菌清活性(EC_{50} 值为 7.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 9 倍以上.

综上所述, I 系列的化合物不仅对 *E. coli* PDHc-E1 具有一定的抑制活性, 而且其杀真菌活性显著优于先导化合物 L, 因此, 该结构 I 具有进一步优化的研究价值, 也表明本文通过设计以微生物中的 PDHc-E1 为靶标的抑制剂, 可以获得具有杀菌活性的化合物, 本文进一步测试了这类化合物的除草及杀虫活性. 测试结果表明此类化合物完全无除草及杀虫活性, 化合物 I 对虫草菌中的菌具有特定的选择性抑制活性, 符合本文以大肠杆菌 PDHc-E1 为靶标设计杀菌活性化合物的预期设想.

2 结论

以课题组前期发现的微生物 PDHc-E1 抑制剂 L 为先导化合物, 根据 L 在活性空腔中的作用模式, 在其嘧啶环与苯环之间引入脲结构单元替代三唑结构单元, 设计并合成了 14 个新型氨基嘧啶衍生物 I. 目标化合物均通过 ^1H NMR、 ^{13}C NMR、质谱和元素分析进行了结构表征. 丰富了丙酮酸脱氢酶抑制剂的化合物类型.

生物活性研究发现 I 系列的化合物不仅对 *E. coli* PDHc-E1 具有一定的抑制活性, 而且杀真菌活性显著优于先导化合物, 如 I-6 ($R=4\text{-Br}$) 与 I-7 ($R=2,4\text{-F}_2$) 对花生褐斑的 EC_{50} 值分别为 14.11, 12.88 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 与商品化杀菌剂百菌清(12.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$)相近或相当, 对苹果轮纹的 EC_{50} 值分别为 0.64 和 0.80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 是商品化杀菌剂百菌清抑制效果(7.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 9 倍以上. 特别是 I-6 不仅对 *E. coli* PDHc-E1 显示较好的抑制活性($IC_{50}=26.45 \mu\text{mol}/\text{L}$), 同时对真菌花生褐斑和苹果轮纹显示高效活性, 具有进一步研究的价值. 以上结果表明通过修饰先导结构 L 中的桥键可以获得不仅对 *E. coli* PDHc-E1 靶

酶具有抑制作用, 而且对农业中的有害真菌靶标也具有显著抑制活性(显著优于先导化合物)的化合物, 达到了结构优化的目的.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱用 Varian VNMR 400 MHz 核磁共振仪(氘代二甲亚砜为溶剂); 质谱用 QTRAP 液质联用仪或 Finnigan Trace Ms 质谱仪; 元素分析用 Vario ELIII CHNSO 型元素分析仪; 熔点采用上海精密科学仪器有限公司的 WRS-IB 型熔点仪测定(温度未经校正). 德国 Heidolph 公司生产的 MR3001 型恒温磁力搅拌器, Buchi R-200 型旋转蒸发仪, Sartorius 电子天平, ZF-200 暗箱式紫外分析仪, DLSB 低温冷却循环泵, 70-1 型远红外干燥箱等仪器.

盐酸乙脒、雷尼镍、取代苯胺、无水乙醇、氯化亚锡均为分析纯.

3.2 实验方法

3.2.1 中间体 2-甲基-4-氨基-5-甲醛嘧啶(M2)的合成

参照文献方法^[28]. 在 100 mL 单口瓶中加入 50 mL 乙醇, 冰盐浴下加入钠(4.6 g, 0.2 mol)、盐酸乙脒(18.8 g, 0.2 mol)、乙氧基亚甲基丙二腈(24.4 g, 0.2 mol), 反应 0.5 h 过滤得 2-甲基-4-氨基-5-甲腈嘧啶 M1.

在 250 mL 三口瓶中加入 M1 (20.1 g, 0.15 mol), 冰乙酸 75 mL, 雷尼镍 5 g, 加热反应, 薄层色谱(TLC)跟踪反应直至反应完全, 过滤除去雷尼镍, 减压蒸馏除去乙酸, 柱层析(洗脱剂为: 石油醚/乙酸乙酯, $V:V=1:1$)以 75%收率得到黄色固体 M2. m.p. 197~198 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 2.41 (s, 3H, CH_3), 7.91 (s, 1H, NH), 8.17 (s, 1H, NH), 8.65 (s, 1H, py-H), 9.82 (s, 1H, CHOH).

3.2.2 中间体取代苯胍(M3)的合成

参照文献方法^[29], 以苯胍 M3-1 的合成为例. 在 100 mL 三口瓶中加入 30%的盐酸 3 mL、水 2 mL、对硝基苯胺(1.38 g, 0.01 mol), 降温至 0~5 $^{\circ}\text{C}$, 从液面下的导管滴加亚硝酸钠(0.70 g, 0.0101 mol)和 2 mL 水配成的溶液. 加完搅拌 30 min 得橙黄色透明重氮液. 在 8 $^{\circ}\text{C}$ 以下, 将氯化亚锡的盐酸溶液滴加到上述重氮液中, 继续反应 2 h. 将反应混合物进行抽滤, 得到淡粉色固体对硝基苯胍盐酸盐. 在 100 mL 的烧杯中加入上述对硝基苯胍盐酸盐, 适量水, 搅拌 30 min, 滴加 30%的氢氧化钠溶液至 pH=7 得苯胍 M3-1. 直接用于下一步. 用同样的方法可以制备 M3 其余的中间体.

3.2.3 目标化合物 **I** 的合成通法

25 mL 的单颈圆底烧瓶中分别加入中间体 **M2** (0.29 g, 2.2 mmol) 和各种取代苯胍 **M3** (2 mmol) 并溶于 10 mL 无水乙醇。油浴加热至回流 3 h, 有白色固体析出, TLC 检测反应完全, 将反应液倒入冷水中, 搅拌有固体析出。抽滤, 滤饼用少量二氯甲烷洗, 干燥即得目标化合物 **I**。

2-甲基-4-氨基-5-(甲基苯胍)-嘧啶(**I-1**): 淡黄色固体, 产率 85%, m.p. 249~251 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 2.37 (s, 3H, CH_3), 6.75 (s, 1H, ArH), 6.91 (d, $J=7.1$ Hz, 2H, ArH), 7.22 (s, 2H, ArH), 7.75 (s, 2H, NH_2), 7.90 (s, 1H, pyrimidine-H), 8.16 (s, 1H, $\text{CH}=\text{N}$), 11.22 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 164.95, 163.16, 159.19, 155.65, 144.85, 136.37, 129.35, 119.04, 108.45, 25.42; ESI-MS m/z : 228.2 $[\text{M}+1]^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_5$: C 63.42, H 5.77, N 30.82; found C 63.35, H 5.69, N 30.59.

2-甲基-4-氨基-5-(甲基-3-碘苯胍)-嘧啶(**I-2**): 淡黄色固体, 产率 79%, m.p. 242~243 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 2.37 (s, 3H, CH_3), 6.95~7.10 (m, 3H, ArH), 7.25 (d, $J=1.8$ Hz, 1H, ArH), 7.73 (s, 2H, NH_2), 7.95 (s, 1H, pyrimidine-H), 8.20 (s, 1H, $\text{CH}=\text{N}$), 10.59 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 165.33, 159.19, 156.20, 146.28, 137.77, 131.33, 127.27, 119.87, 111.19, 108.15, 95.58, 25.50; ESI-MS m/z : 354.1 $[\text{M}+1]^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{IN}_5$: C 40.81, H 3.42, N 19.83; found C 40.81, H 3.52, N 19.91.

2-甲基-4-氨基-5-(甲基-4-硝基苯胍)-嘧啶(**I-3**): 红色固体, 产率 76%, m.p. >260 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 2.37 (s, 3H, CH_3), 7.01 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.70 (s, 2H, NH_2), 8.03 (s, 1H, pyrimidine-H), 8.09 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, ArH), 8.23 (s, 1H, $\text{CH}=\text{N}$), 11.22 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 166.24, 159.31, 157.50, 149.94, 141.71, 138.45, 126.29, 111.05, 107.48, 25.55; ESI-MS m/z : 273.4 $[\text{M}+1]^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_6\text{O}_2$: C 52.94, H 4.44, N 30.87; found C 52.63, H 4.31, N 30.71.

2-甲基-4-氨基-5-(甲基-4-氯苯胍)-嘧啶(**I-4**): 黄色固体, 产率 71%, m.p. 240~241 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 2.37 (s, 3H, CH_3), 6.93 (d, $J=8.7$ Hz, 2H, ArH), 7.27 (d, $J=8.6$ Hz, 2H, ArH), 7.73 (s, 2H, NH_2), 7.92 (s, 1H, pyrimidine-H), 8.20 (s, 1H, $\text{CH}=\text{N}$), 10.49 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 165.27, 159.20, 156.13, 143.79, 137.36, 129.14, 122.24, 113.22, 108.24, 25.49; ESI-MS m/z : 262.3 $[\text{M}+1]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{ClN}_5$: C 55.07, H 4.62, N 26.76; found C 55.00,

H 4.41, N 26.37.

2-甲基-4-氨基-5-(甲基-2,4-二氯苯胍)-嘧啶(**I-5**): 淡黄色固体, 产率 69%, m.p. 239~241 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 2.38 (s, 3H, CH_3), 7.26 (s, 1H, ArH), 7.31 (s, 1H, Ar-H), 7.47 (s, 1H, ArH), 7.73 (s, 2H, NH_2), 8.17 (s, 1H, pyrimidine-H), 8.37 (s, 1H, $\text{CH}=\text{N}$), 10.03 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 165.86, 159.34, 156.81, 141.39, 140.15, 128.83, 128.22, 122.44, 117.02, 114.28, 107.89, 25.53; ESI-MS m/z : 296.3 $[\text{M}+1]^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{N}_5$: C 48.67, H 3.74, N 23.65; found C 48.75, H 3.85, N 23.61.

2-甲基-4-氨基-5-(甲基-4-溴苯胍)-嘧啶(**I-6**): 黄色固体, 产率 77%, m.p. 237~238 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 2.37 (s, 3H, CH_3), 6.89 (d, $J=7.8$ Hz, 2H, Ar-H), 7.38 (d, $J=7.8$ Hz, 2H, ArH), 7.75 (s, 2H, NH_2), 7.93 (s, 1H, pyrimidine-H), 8.20 (s, 1H, $\text{CH}=\text{N}$), 10.51 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 165.14, 163.29, 159.27, 155.80, 144.14, 137.35, 131.96, 113.75, 108.29, 25.38; ESI-MS m/z : 306.2 $[\text{M}+1]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{BrN}_5$: C 47.08, H 3.95, N 22.87; found C 47.00, H 4.15, N 22.55.

2-甲基-4-氨基-5-(甲基-2,4-二氟苯胍)-嘧啶(**I-7**): 黄色固体, 产率 71%, m.p. 222~224 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 2.37 (s, 3H, CH_3), 7.02 (s, 1H, ArH), 7.22 (d, 2H, ArH, $J=8.7$ Hz), 7.74 (s, 2H, NH_2), 8.15 (s, 1H, pyrimidine-H), 8.15 (s, 1H, $\text{CH}=\text{N}$), 10.20 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 165.40, 163.15, 159.28, 156.15, 139.45, 130.07, 113.73, 111.67, 111.47, 108.12, 104.40, 104.16, 103.90, 25.43; ESI-MS m/z : 264.1 $[\text{M}+1]^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{F}_2\text{N}_5$: C 54.75, H 4.21, N 26.60; found C 54.41, H 4.39, N 26.84.

2-甲基-4-氨基-5-(甲基-2,4,6-三氯苯胍)-嘧啶(**I-8**): 淡黄色固体, 产率 79%, m.p. >260 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 2.35 (s, 3H, CH_3), 7.64 (s, 2H, Ar-H), 7.72 (s, 2H, NH_2), 8.13 (s, 1H, pyrimidine-H), 8.20 (s, 1H, $\text{CH}=\text{N}$), 9.69 (s, 1H, NH); ESI-MS m/z : 330.1 $[\text{M}+1]^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{Cl}_3\text{N}_5$: C 43.60, H 3.05, N 21.18; found C 43.73, H 2.96, N 21.31.

2-甲基-4-氨基-5-(甲基-4-三氟甲基苯胍)-嘧啶(**I-9**): 淡黄色固体, 产率 84%, m.p. 252~254 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 2.38 (s, 3H, CH_3), 7.06 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.56 (d, $J=8.5$ Hz, 2H, ArH), 7.75 (s, 2H, NH_2), 8.00 (s, 1H, pyrimidine-H), 8.24 (s, 1H, $\text{CH}=\text{N}$), 10.83 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 165.67, 159.31, 156.67, 147.77, 138.99, 126.68, 123.72,

119.17, 118.86, 118.54, 118.22, 111.48, 107.99, 25.50; ESI-MS 295.9 $[M+1]^+$. Anal. Calcd for $C_{13}H_{12}F_3N_5$: C 52.88, H 4.10, N 23.72; found C 52.63, H 4.32, N 23.53.

2-甲基-4-氨基-5-(甲基-3-氯苯胺)-嘧啶(**I-10**): 淡黄色固体, 产率 80%. m.p. 246~248 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 2.37 (s, 3H, CH_3), 6.78 (d, $J=7.7$ Hz, 1H, ArH), 6.87 (d, $J=8.3$ Hz, 1H, ArH), 7.24 (t, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.74 (s, 2H, NH_2), 7.94 (s, 1H, pyrimidine-H), 8.22 (s, 1H, $CH=N$), 10.56 (s, 1H, NH); ESI-MS m/z : 262.3 $[M+1]^+$. Anal. calcd for $C_{12}H_{12}ClN_5$: C 55.07, H 4.62, N 26.76; found C 55.04, H 4.44, N 26.54.

2-甲基-4-氨基-5-(甲基-3-溴苯胺)-嘧啶(**I-11**): 黄色固体, 产率 79%. m.p. >260 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 2.37 (s, 3H, CH_3), 6.92 (dd, $J=8.0, 2.0$ Hz, 2H, ArH), 7.06 (t, $J=2.0$ Hz, 2H, ArH), 7.19 (t, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.74 (s, 2H, NH_2), 7.94 (s, 1H, pyrimidine-H), 8.22 (s, 1H, $CH=N$), 10.55 (s, 1H, NH); ESI-MS m/z : 306.2 $[M+1]^+$. Anal. calcd for $C_{12}H_{12}BrN_5$: C 47.08, H 3.95, N 22.87; found C 47.30, H 4.00, N 22.69.

2-甲基-4-氨基-5-(甲基-2-溴苯胺)-嘧啶(**I-12**): 绿色固体, 产率 82%. m.p. >260 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 2.38 (s, 3H, CH_3), 6.77 (t, $J=7.5$ Hz, 1H, ArH), 7.23 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.33 (t, $J=7.7$ Hz, 1H, ArH), 7.52 (d, $J=7.9$ Hz, 1H, ArH), 7.77 (s, 2H, NH_2), 8.17 (s, 1H, pyrimidine-H), 8.38 (s, 1H, $CH=N$), 9.66 (s, 1H, NH); ESI-MS m/z : 306.0 $[M+1]^+$. Anal. Calcd for $C_{12}H_{12}BrN_5$: C 47.08, H 3.95, N 22.87; found C 47.03, H 3.88, N 22.97.

2-甲基-4-氨基-5-(甲基-3-硝基苯胺)-嘧啶(**I-13**): 淡黄色固体, 产率 84%. m.p. 255~257 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 2.38 (s, 3H, CH_3), 7.35 (d, $J=7.9$ Hz, 1H, ArH), 7.50 (t, 1H, Ar-H, $J=8.0$ Hz), 7.58 (d, 1H, Ar-H, $J=8.0$ Hz), 7.68 (s, 1H, Ar-H), 7.76 (s, 2H, NH_2), 8.00 (s, 1H, pyrimidine-H), 8.26 (s, 1H, $CH=N$), 10.89 (s, 1H, NH); ESI-MS m/z : 273.1 $[M+1]^+$. Anal. calcd for $C_{12}H_{12}N_6O_2$: C 52.94, H 4.44, N 30.87; found C 52.57, H 4.42, N 30.53.

2-甲基-4-氨基-5-(甲基-2-硝基苯胺)-嘧啶(**I-14**): 淡黄色固体, 产率 56%. m.p. 220~222 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 2.57 (s, 3H, CH_3), 7.00 (s, 1H, ArH), 7.73 (dd, $J=6.6, 8.0$ Hz, 2H, ArH), 8.12 (d, $J=8.1$ Hz, 1H, ArH), 8.57 (d, $J=6.6, 15.2$ Hz, 2H, NH_2), 8.69 (s, 1H, pyrimidine-H), 9.68 (s, 1H, $CH=N$), 11.28 (s, 1H, NH); ESI-MS m/z : 273.1 $[M+1]^+$. Anal. calcd for $C_{12}H_{12}N_6O_2$: C 52.94, H 4.44, N 30.87; found C 52.84, H 4.55, N 30.67.

辅助材料(Supporting Information) 产物的核磁共振(氢谱、碳谱)谱图. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Bates, D. L.; Danson, M. J.; Hale, G.; Hopper, E. A.; Perham, R. N. *Nature* **1977**, 268, 313.
- [2] Perham, R. N. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, 69, 961.
- [3] Wei, W.; Li, H.; Nemeria, N.; Jordan, F. *Protein Expression Purif.* **2003**, 28, 140.
- [4] Dobritzsch, D.; König, S.; Schneider, G.; Lu, G. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 20196.
- [5] Kluger, R.; Pike, D. C. *J. Am. Soc. Chem.* **1977**, 99, 4504.
- [6] Kern, D.; Kern, G.; Neef, H.; Tittmann, K.; Killenberg-Jabs, M.; Wikner, C.; Schneider, G.; Hübner, G. *Science* **1997**, 275, 67.
- [7] Nemeria, N.; Baykal, A.; Joseph, E.; Yan, S. Z.; Furey, W.; Jordan, F. *Biochemistry* **2004**, 43, 6565.
- [8] Wang, J. Y.; Dong, H.; Li, S. H.; He, H. W. *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 18664.
- [9] Tang, C. Z. *Pesticide Chemistry*, Nankai University Press, Tianjing, **2000**, The front page, p. 304 (in Chinese). (唐除痴, 农药化学, 南开大学出版社, 天津, **2000**, 头版, p. 304.)
- [10] Gutowski, J. A.; Lienhard, G. E. *J. Biol. Chem.* **1976**, 251, 2863.
- [11] Agyei-Owusu, K.; Leeper, F. J. *FEBS J.* **2009**, 276, 2905.
- [12] Lowe, P.; Leeper, F. J.; Perham, R. N. *Biochemistry* **1983**, 22, 150.
- [13] Arjunan, P.; Chandrasekhar, K.; Sax, M.; Brunskill, A.; Nemeria, N.; Jordan, F.; Furey, W. *Biochemistry* **2004**, 43, 2405.
- [14] Arjunan, P.; Sax, M.; Brunskill, A.; Chandrasekhar, K.; Nemeria, N.; Zhang, S.; Jordan, F.; Furey, W. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 15296.
- [15] Erixon, K. M.; Dabalos, C. L.; Leeper, F. J. *Chem. Commun.* **2007**, 960.
- [16] Nemeria, N.; Yan, Y.; Zhang, Z.; Brown, A. M.; Arjunan, P.; Furey, W.; Guest, J. R.; Jordan, F. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 45969.
- [17] He, J. B.; Feng, L. L.; Li, J.; Tao, R. J.; Wang, F.; Liao, X.; Sun, Q. S.; Long, Q. W.; Ren, R. L.; Wan, J.; He, H. W. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 1665.
- [18] He, J. B.; Feng, L. L.; Li, J.; Tao, R. J.; Ren, Y. L.; Wan, J.; He, H. W. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 22, 89.
- [19] Feng, L. L.; He, J. B.; He, H. F.; Zhao, L. L.; Deng, L. F.; Zhang, L.; Zhang, L.; Ren, Y. L.; Wan, J.; He, H. W. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12, 8911.
- [20] He, J. B.; He, H. F.; Zhao, L. L.; Zhang, L.; You, G. Y.; Feng, L. L.; Wan, J.; He, H. W. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23, 1395.
- [21] He, H. F.; Feng, J. T.; He, J. B.; Xia, Q.; Ren, Y. L.; Wang, F.; Peng, H.; He, H. W.; Feng, L. L. *RSC Adv.* **2016**, 6, 4310.
- [22] He, H. F.; Wang, W.; Zhou, Y.; Xia, Q.; Ren, Y. L.; Feng, J. T.; Peng, H.; He, H. W.; Feng, L. L. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, 24, 1879.
- [23] Zhou, Y.; Zhang, S. S.; He, H. W.; Jiang, W.; Hou, L. F.; Xie, D.; Cai, M.; Peng, H.; Feng, L. L. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, 26, 84.
- [24] He, H. F.; Xia, H. Y.; Xia, Q.; Ren, Y. L.; He, H. W. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, 25, 5652.
- [25] Anand, P.; Patil, V.; Sharma, V.; Khosa, R.; Masand, N. *Int. J. Drug Delivery* **2012**, 3, 851.
- [26] Kang, S. H.; Hu, D. Y.; Wu, J.; Song, B. A. *Pesticide* **2012**, 51, 238 (in Chinese). (康圣鸿, 胡德禹, 吴剑, 宋宝安, 农药, **2012**, 51, 238.)
- [27] Arjunan, P.; Nemeria, N.; Brunskill, A.; Chandrasekhar, K.; Sax, M.; Yan, Y.; Jordan, F.; Guest, J. R.; Furey, W. *Biochemistry* **2002**, 41, 5213.
- [28] Anderson, K.; Chen, Y.; Chen, Z.; Luk, K. C.; Rossman, P. L.; Sun, H. M.; Wovkulich, P. M. *US 2012/184542*, **2012**.
- [29] Fu, C. *Fine Spec. Chem.* **2004**, 12, 14 (in Chinese). (付春, 精细与专用化学品, **2004**, 12, 14.)

(Lu, Y.)