

含取代吡唑新型苯甲酰胺类化合物的合成及抗真菌活性研究

王伟^a 武复冉^a 马一丹^a 徐丹^{*,b,c} 徐功^{*,a,c}^(a) 西北农林科技大学植物保护学院 陕西杨凌 712100^(b) 西北农林科技大学化学与药学院 陕西杨凌 712100^(c) 西北农林科技大学旱区作物逆境生物学国家重点实验室 陕西杨凌 712100

摘要 为了找寻新的杀菌剂,运用活性片段拼接策略,通过亚胺键将苯甲酰胺类衍生物和吡唑环连接起来,设计并合成了一系列共计 32 个新型吡唑-5-基-苯甲酰胺类衍生物,其结构经过 NMR、HRMS 分析确认,并评估了它们的抗真菌活性.生物测定数据显示,大多数化合物表现出良好的抑制活性.4-氯-*N*-(2-((1-甲基-3-(三氟甲基)-1*H*-吡唑-5-基)氨基)苯基)苯甲酰胺(**14**)对油菜菌核病菌和烟草赤星病菌表现出较好的体外活性,EC₅₀ 值分别为 11.21 和 16.70 mg/L;对于苹果腐烂病菌,化合物 **14** (EC₅₀=11.67 mg/L)活性明显高于阳性对照药剂氟唑菌酰胺(EC₅₀=16.49 mg/L).分子对接模拟表明,化合物 **14** 通过氢键和 p- π 作用力与琥珀酸脱氢酶(SDH)的 TYR 58 和 ARG 43 相互作用,这可以解释化合物 **14** 与靶蛋白作用的可能机制.以上结果表明,化合物 **14** 可能是潜在的 SDH 抑制剂,并为进一步研究提供有价值的参考.

关键词 吡唑; 苯甲酰胺; 抗真菌活性; 构效关系

Study on Synthesis and Antifungal Activity of Novel Benzamides Containing Substituted Pyrazole Unit

Wang, Wei^a Wu, Furan^a Ma, Yidan^a Xu, Dan^{*,b,c} Xu, Gong^{*,a,c}^(a) College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100^(b) College of Chemistry & Pharmacy, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100^(c) State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100

Abstract To promote the discovery and development of new fungicides, a series of novel 1-methyl-pyrazol-5-yl-amino-phenyl-benzamide derivatives were designed and synthesized by active fragment splicing strategy, and the benzamide and pyrazole ring were connected together by imine bond. All of the target compounds were identified by NMR and high resolution mass spectrometry (HRMS), and evaluated for their antifungal activities. The bioassay data revealed that 4-chloro-*N*-(2-((1-methyl-3-(trifluoromethyl)-1*H*-pyrazol-5-yl)amino)phenyl)benzamide (**14**) exhibited an excellent *in vitro* activity against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Alternaria alternariae* with EC₅₀ value of 11.21 and 16.70 mg/L, respectively. For *Valsa mali*, compound **14** (EC₅₀=11.67 mg/L) showed a significantly higher activity than the control of fluxapyroxad (EC₅₀=16.49 mg/L). The molecular docking simulation revealed that compound **14** interacted with TYR 58 and ARG 43 of the succinate dehydrogenase (SDH) through hydrogen bond and p- π interaction, which could explain the probable mechanism of the action between compound **14** and target protein. These results indicate that compound **14** may be a potential SDH inhibitor and provide a valuable reference for further research.

Keywords pyrazole; benzamide; antifungal activity; structure-activity relationships

随着人口的持续增长和全球经济的高速发展,人们对农作物的产量和质量有了更高的要求^[1]. 农药是农作物生产过程中重要的生产资料,对于保证农作物高产稳

产具有至关重要的作用.据统计,植物致病真菌感染导致每年全球农作物产量减少 20%,且收获后再减少 10%^[2-3],这不仅给农民带来巨大的经济损失,而且严重

* Corresponding authors. E-mail: danxu@nwfau.edu.cn; gongxu@nwfau.edu.cn

Received August 7, 2021; revised September 18, 2021; published online October 9, 2021.

Project supported by the Natural Science Basic Research Program of Shaanxi Province (No. 2021JQ-157), the Key Research and Development Program of Shaanxi Province (No. 2021NY-140), and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (Nos. 2452019189, 2452018318).

陕西省自然科学基金研究计划(No. 2021JQ-157)、陕西省重点研发计划(No. 2021NY-140)及中央高校基本科研业务费专项资金(Nos. 2452019189, 2452018318)资助项目.

威胁了全球的粮食生产安全^[4]. 杀菌剂的应用是目前防治植物致病真菌最有效的措施, 使用杀菌剂每年可挽回大量损失^[5-6].

在商用杀菌剂中, 琥珀酸脱氢酶(SDH)抑制剂因其广谱性和优异的抗真菌活性近年来备受关注^[7-11]. 从1996年到2021年, 已有24种SDH抑制剂上市, 其中含有吡唑环的占比高达50% (12/24); 苯甲酰胺类抑制剂占比12.50% (3/24)(图1). 然而, SDH抑制剂几十年来的滥用导致真菌产生较为严重的抗药性^[12]. 杀菌剂抗性行动委员会(FRAC)已将SDH抑制剂列为中高抗性风险杀菌剂^[13-14]. 因此, 开发新型SDH抑制剂迫在眉睫.

为了解决真菌的耐药性问题, 多年来抗真菌药物研发的实践证实了如下一种行之有效的方法: 在保留现有抗真菌剂的核心骨架的基础上, 改变骨架上的基团, 可在不降低其有效性的前提下达到克服耐药菌的目的^[15]. 在过去的几年里, 本课题组主要从事琥珀酸脱氢酶抑制剂(SDHIs)的研究, 并发现了一些具有良好抗真菌活性的化合物^[16]. 基于此, 在本工作中, 我们以亚胺键为“桥梁”, 将前期工作中发现的高活性先导化合物中重要的活性片段吡唑环巧妙地连接在苯甲酰胺类SDHIs上, 以期发现具有优异抗真菌活性的化合物(图2).

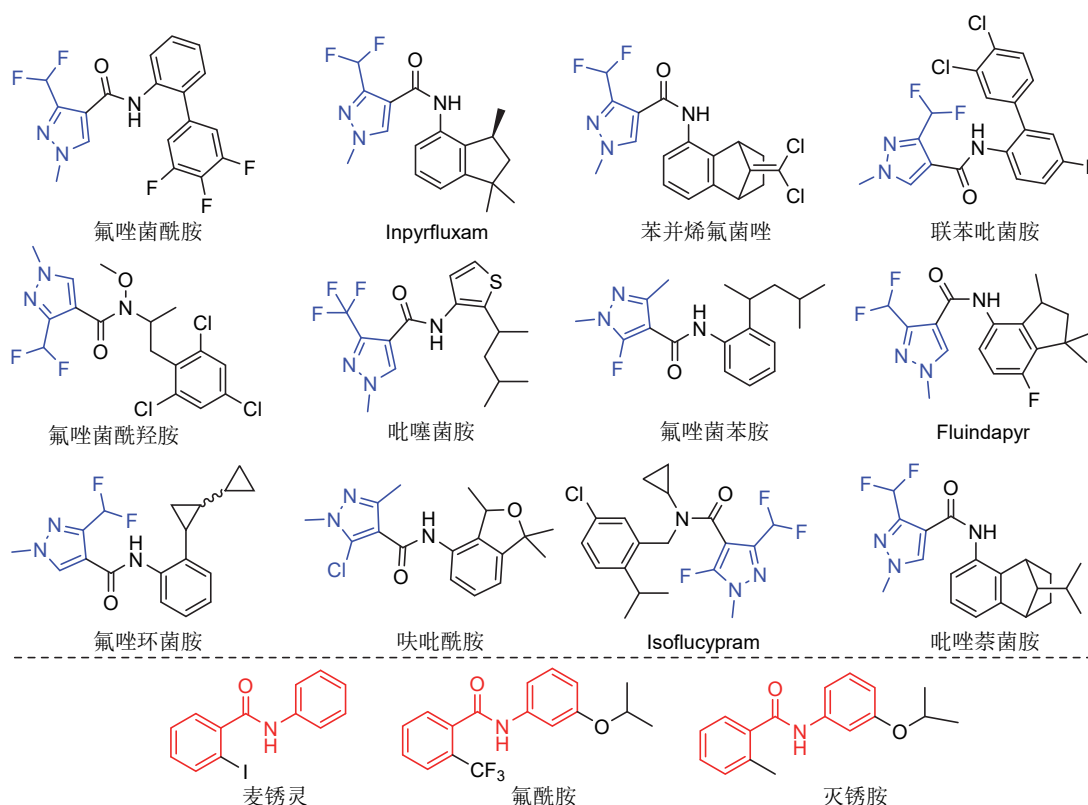


图1 含吡唑环或苯甲酰胺类琥珀酸脱氢酶抑制剂(SDHIs)的结构

Figure 1 Succinate dehydrogenase inhibitors (SDHIs) with pyrazole or benzamide chemical structure

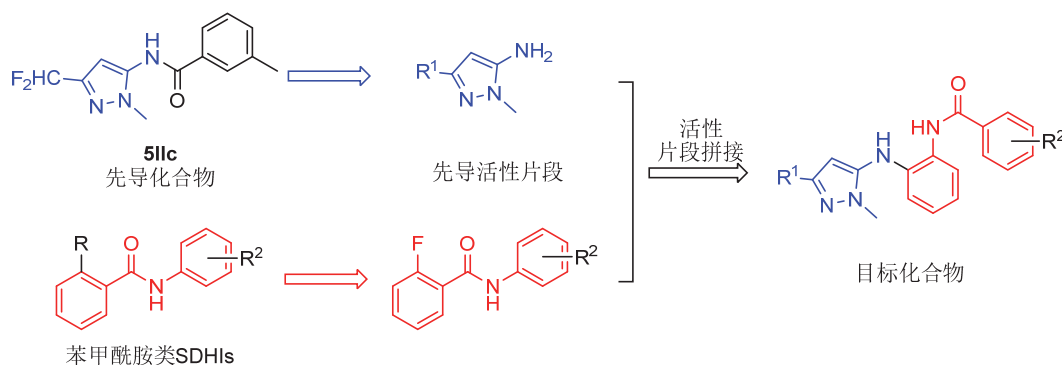


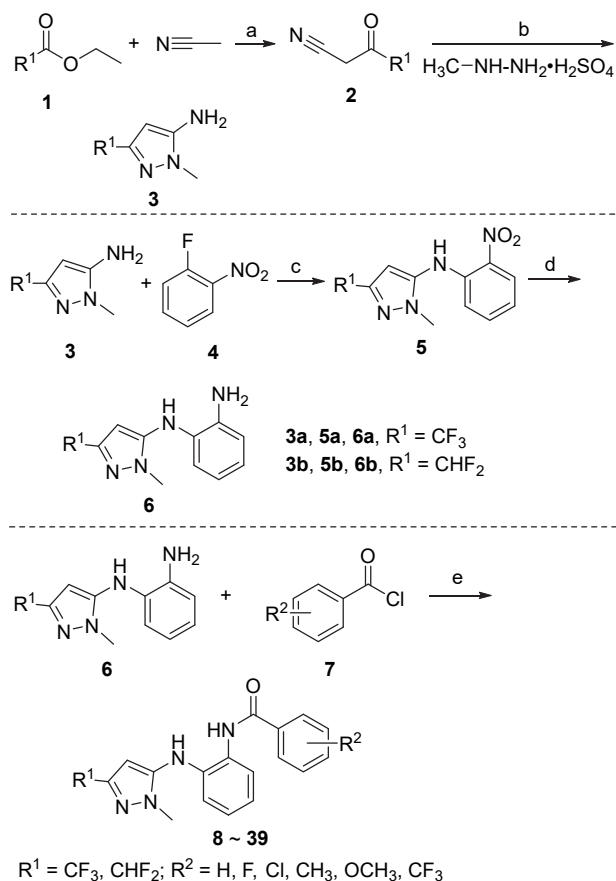
图2 设计策略

Figure 2 Design strategy for the target compounds

1 结果与讨论

1.1 化合物的合成

目标化合物的合成路线如 Scheme 1 所示, 首先以三氟乙酸乙酯或二氟乙酸乙酯(**1**)为原料, 在碱性条件下与乙腈发生亲核取代反应生成酮腈 **2**, 再与甲基胍发生关环反应得到吡唑胺中间体 **3**, 吡唑胺再与邻氟硝基苯(**4**)反应得到中间体 **5**, 最终中间体 **5** 的硝基被还原为胺后, 与酰氯反应得到目标化合物 **8~39**。



Reagents and conditions: (a) NaH, THF, 80 °C; (b) EtOH, 80 °C; (c) *t*-BuOK, THF, 0 °C; (d) 10% Pd/C, H₂, 25 °C; (e) Et₃N, DCM, 0 °C

图式 1 目标化合物的合成路线

Scheme 1 Synthetic route of the target compounds

1.2 化合物的波谱分析

以目标化合物 **8** 的核磁共振氢谱与碳谱为例进行说明, 化合物 **8** 的编号如图 3 所示, 在核磁氢谱中, 化学位移在 δ 3.70 处的峰为 7 位甲基氢的吸收峰, 酰胺键 15 位氢的化学位移为 δ 9.92, 化学位移在 δ 6.29 处的峰为 6 位氢的吸收峰, 化学位移在 δ 7.68 处的峰为 8 位氢的吸收峰, 化学位移在 δ 7.42~6.82 处的峰为 10~13 位苯环氢的吸收峰, 化学位移在 δ 8.00~7.96 处的峰为 19、23 位苯环氢的吸收峰, 化学位移在 δ 7.60~7.57 处的峰为

21 位苯环氢的吸收峰, 化学位移在 δ 7.53~7.50 处的峰为 20、22 位苯环氢的吸收峰. 在核磁共振碳谱中, 化学位移在 δ 166.0 处的吸收峰为 16 位碳的信号峰, 化学位移在 δ 139.5、139.1、138.8、138.4 为 2 位碳的信号峰, 化学位移在 δ 125.5、122.8、120.2、117.5 为 1 位碳的信号峰, 6 位碳的信号峰化学位移为 δ 94.7, 7 位甲基碳的信号峰化学位移为 δ 35.7. 在 ESI-HRMS 谱图中, 该化合物的分子离子峰([M+H]⁺)测定值与计算值绝对误差在 0.003 以内。

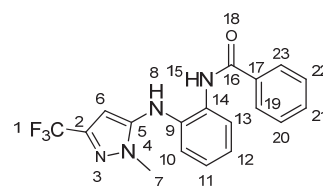


图 3 化合物 **8** 的化学结构式

Figure 3 Chemical structure of compound **8**

1.3 杀菌活性

测试目标化合物对供试真菌的抑制作用, 初筛抑菌活性结果见表 1. 由表 1 可知, 在 50 mg/L 的浓度下, 大多数化合物对 5 种真菌均表现出一定的抑制活性, 化合物 **9**、**10**、**12**、**13**、**14**、**15**、**20**、**29**、**30**、**32**、**36** 对油菜菌核病菌表现出较好的抑制活性, 但低于氟唑菌酰胺和先导化合物 **5IIc**. 化合物 **13**、**14**、**20** 对苹果腐烂病菌的抑制率都超过 80%, 且化合物 **13** (82.38%) 和化合物 **14** (86.72%) 的活性优于阳性对照氟唑菌酰胺(81.30%), 但低于先导化合物 **5IIc**. 对烟草赤星病菌, 仅有化合物 **9**、**11**、**12**、**13** 的抑制率超过 60%, 其中化合物 **14** (66.25%) 的抑制率最高. 遗憾的是, 对玉米弯孢病菌所测化合物的抑制率均小于 60%. 对于葡萄灰霉病菌, 仅有化合物 **28**、**29**、**32** 的抑制率超过 70%. 总体上, 化合物 **13**、**14** 对多种病原菌表现出较高的抑制活性, 是值得深入研究的 SDHI 类先导化合物。

为了进一步探究构效关系, 选取了针对每个真菌活性较好的化合物进行 EC₅₀ 值的测试, 其结果见表 2. 结果表明, 在所有供试化合物中, 化合物 **14** 对油菜菌核病菌和烟草赤星病菌均表现出优异的抗真菌活性, 其 EC₅₀ 分别为 11.21 和 16.70 mg/L, 但都比阳性对照氟唑菌酰胺差. 对苹果腐烂病菌, 化合物 **13** 和 **14** 的 EC₅₀ 值相近, 分别为 11.17 和 11.67 mg/L, 且都优于阳性对照氟唑菌酰胺(16.49 mg/L).

研究构效关系发现, R¹ 为三氟甲基的活性要优于二氟甲基, 例如, 化合物 **13** (R¹=CF₃, R²=3-Cl) 对三种真菌的 EC₅₀ 值分别为 15.09, 11.17 和 25.89 mg/L, 均优于化合物 **29** (R¹=CHF₂, R²=3-Cl) 17.96, 16.01 和 37.16 mg/L, 同样的, 化合物 **14** 均优于化合物 **30**. 这一规律在

表1 目标化合物在 50 mg/L 下对 5 种植物病原菌菌丝生长的抑制作用(抑制率%)^a
Table 1 Inhibitory effect (inhibition rate%) of target compounds against four pathogenic fungi *in vitro* at 50 mg/L

化合物	R ¹	R ²	油菜菌核病菌	苹果腐烂病菌	烟草赤星病菌	玉米弯孢病菌	葡萄灰霉病菌
8	CF ₃	H	52.08±1.71	50.72±3.17	56.57±2.11	42.25±1.03	38.13±7.11
9	CF ₃	2-F	81.22±3.54	64.31±6.88	73.68±0.86	45.42±1.42	58.52±2.44
10	CF ₃	3-F	71.73±1.99	62.84±1.41	59.21±0.41	41.27±1.17	52.86±3.33
11	CF ₃	4-F	67.96±5.25	60.68±4.58	65.45±1.04	41.28±2.74	47.90±4.21
12	CF ₃	2-Cl	80.70±1.16	68.91±4.56	61.52±0.93	38.14±3.43	54.97±5.46
13	CF ₃	3-Cl	87.99±1.96	82.38±1.30	64.47±0.66	47.21±0.53	68.82±3.08
14	CF ₃	4-Cl	89.72±2.72	86.72±0.61	66.25±0.73	49.60±1.20	55.60±2.15
15	CF ₃	2-CF ₃	81.86±1.14	70.58±1.24	59.54±0.13	46.44±4.25	66.72±3.98
16	CF ₃	3-CF ₃	35.08±4.33	31.68±5.21	20.39±1.38	13.35±2.49	37.88±2.83
17	CF ₃	4-CF ₃	29.35±2.67	25.63±6.12	17.76±0.57	25.88±1.08	38.67±6.48
18	CF ₃	2-CH ₃	61.85±3.47	54.59±5.01	48.03±0.28	36.23±4.24	48.50±1.02
19	CF ₃	3-CH ₃	35.24±4.23	28.28±3.35	21.70±0.91	23.53±3.60	22.73±6.60
20	CF ₃	4-CH ₃	82.80±1.40	89.95±0.63	58.22±1.45	50.38±1.98	55.41±2.72
21	CF ₃	2-OCH ₃	65.30±2.03	54.53±4.30	51.98±0.75	24.39±1.32	36.47±3.42
22	CF ₃	3-OCH ₃	64.64±3.29	60.27±5.18	54.28±0.59	39.25±2.33	33.06±1.46
23	CF ₃	4-OCH ₃	75.43±1.04	79.72±1.55	55.19±1.53	47.05±3.34	50.42±3.87
24	CHF ₂	H	62.64±3.40	32.89±5.39	35.85±0.75	47.75±3.03	33.47±4.14
25	CHF ₂	2-F	41.09±2.11	40.10±7.63	48.04±1.57	37.02±3.65	33.66±2.53
26	CHF ₂	3-F	60.73±7.33	36.71±6.59	39.15±1.27	25.37±1.05	51.45±8.28
27	CHF ₂	4-F	44.79±0.80	44.55±3.40	38.82±1.45	24.77±0.65	48.46±3.99
28	CHF ₂	2-Cl	55.77±1.94	56.96±4.78	50.98±0.48	35.40±1.87	72.36±3.68
29	CHF ₂	3-Cl	84.94±0.83	72.29±2.17	58.22±0.41	45.61±0.45	70.42±6.84
30	CHF ₂	4-Cl	83.42±0.36	73.18±2.35	52.31±1.06	47.56±0.67	51.88±4.87
31	CHF ₂	2-CF ₃	49.10±0.68	46.60±5.94	41.11±0.52	32.65±0.33	32.28±6.58
32	CHF ₂	3-CF ₃	80.02±1.48	66.90±3.16	56.58±0.14	33.15±3.38	73.25±3.92
33	CHF ₂	4-CF ₃	30.49±4.19	31.32±5.49	25.00±2.40	14.43±1.23	63.35±7.24
34	CHF ₂	2-CH ₃	43.27±5.48	42.28±2.61	41.77±1.17	32.05±0.54	54.95±7.68
35	CHF ₂	3-CH ₃	44.09±2.12	59.53±2.66	46.71±0.91	27.71±1.23	25.06±0.81
36	CHF ₂	4-CH ₃	70.16±1.97	55.18±2.34	44.74±0.60	43.86±2.85	28.40±4.13
37	CHF ₂	2-OCH ₃	63.44±1.42	58.43±1.58	56.25±0.73	37.29±2.16	36.51±3.80
38	CHF ₂	3-OCH ₃	63.48±1.50	38.35±3.45	42.76±0.60	44.24±3.42	24.84±6.94
39	CHF ₂	4-OCH ₃	46.79±4.29	44.15±3.47	45.73±1.55	36.98±3.94	25.32±4.76
5IIc ^c	CHF ₂	3-CH ₃	100	95.00±0.41	67.62±2.24	52.42±1.34	89.33±1.92
氟唑菌酰胺 ^b			100	81.30±2.70	95.07±0.65	100	63.16±1.24

^a Average of three replicates. ^b Used as a positive control. ^c Lead compound.

化合物 **20** 和 **36** 对比下再一次被印证。当 R¹ 都为三氟甲基时发现, R² 被吸电子基团取代时, 如氯原子、氟原子和三氟甲基, 其活性均有明显提升, 其中被氯元素取代的化合物 **13** 和 **14** 表现出最优异的活性。有趣的是, 当 R² 被同一取代基取代时, 如同时被氟或三氟甲基取代时, 2 号位取代的化合物的活性要优于 3 号位和 4 号位, 但当 R² 被氯原子取代时, 3 号位和 4 号位取代的化合物的活性优于 2 号位。这些结果表明目标化合物的抑菌活性由多种因素共同决定。总的来说, R¹ 为三氟甲基的活性优于二氟甲基。R² 被氯原子、氟原子和三氟甲基等吸电子基团取代有利于提高目标化合物的抗真菌活性。

1.4 分子对接研究

为解释配体化合物与琥珀酸脱氢酶受体的结合模式, 将最高活性的目标化合物 **14** 和氟唑菌酰胺对接到

琥珀酸脱氢酶的活性位点。分析对接结果发现, 这两个化合物的结合能较为相近, 分别为 -170.2 和 -163.9 kJ/mol。氟唑菌酰胺的对接结果如图 4(A, C)所示, 其吡唑环深深嵌入活性口袋, ARG(精氨酸)的 43 号残基分别与苯环和吡唑环形成一个 p- π 作用, TRP(色氨酸)的 173 号残基与酰胺键的 O 形成一个氢键(154.6°, 0.19 nm)(在 3D 图中, H 键显示为绿色虚线, p- π 相互作用显示为橘色色线)。化合物 **14** 的对接结果如图 4(B, D)所示, 该化合物的苯甲酰胺骨架深深嵌入 SDH 结合袋中, 该结合姿势表明它具有与结合口袋的适当形状具有互补性。另外, 化合物 **14** 可以通过结合位点中氨基酸残基之间形成的不同相互作用来稳定结合模式。对比氟唑菌酰胺的结合模式, 化合物 **14** 与受体形成的氢键位于酰胺键的氮原子, 而不是氧原子; 另外值得注意的是, 与化合物

表 2 部分化合物对三种真菌的 EC_{50} 值
Table 2 EC_{50} values of some compounds against three plant pathogenic fungi

真菌	化合物	R ¹	R ²	$EC_{50}/(mg \cdot L^{-1})$	95%置信区间	毒力回归方程	R ²
油菜菌核病菌	9	CF ₃	2-F	18.90	11.96~37.56	$y = -1.684 + 1.319x$	0.931
	10	CF ₃	3-F	21.58	16.37~30.82	$y = -1.289 + 0.966x$	0.932
	11	CF ₃	4-F	30.11	23.06~42.76	$y = -1.687 + 1.141x$	0.948
	12	CF ₃	2-Cl	20.07	12.49~42.19	$y = -1.772 + 1.360x$	0.929
	13	CF ₃	3-Cl	15.09	9.36~28.97	$y = -1.718 + 1.457x$	0.925
	14	CF ₃	4-Cl	11.21	7.32~18.12	$y = -1.613 + 1.537x$	0.941
	15	CF ₃	2-CF ₃	14.74	9.43~26.83	$y = -1.360 + 1.164x$	0.927
	20	CF ₃	4-CH ₃	15.99	9.72~32.97	$y = -1.492 + 1.240x$	0.920
	23	CF ₃	4-OCH ₃	21.98	13.64~47.94	$y = -1.595 + 1.188x$	0.932
	29	CHF ₂	3-Cl	17.96	11.24~35.80	$y = -1.859 + 1.482x$	0.931
	30	CHF ₂	4-Cl	18.73	11.85~37.00	$y = -1.864 + 1.464x$	0.935
	32	CHF ₂	3-CF ₃	19.49	11.86~43.08	$y = -1.639 + 1.271x$	0.921
	36	CHF ₂	4-CH ₃	23.76	18.25~33.32	$y = -1.451 + 1.055x$	0.957
氟唑菌酰胺 ^a				0.55	0.20~0.98	$y = 0.253 + 0.974x$	0.930
苹果腐烂病菌	9	CF ₃	2-F	28.46	19.88~47.86	$y = -1.150 + 0.91x$	0.926
	10	CF ₃	3-F	27.26	18.52~48.47	$y = -1.025 + 0.714x$	0.915
	11	CF ₃	4-F	28.84	19.18~53.99	$y = -0.999 + 0.684x$	0.958
	12	CF ₃	2-Cl	20.86	14.98~32.71	$y = -1.028 + 0.779x$	0.918
	13	CF ₃	3-Cl	11.17	6.91~19.58	$y = -1.249 + 1.191x$	0.918
	14	CF ₃	4-Cl	11.67	7.51~19.69	$y = -1.138 + 1.067x$	0.933
	15	CF ₃	2-CF ₃	19.23	14.12~28.78	$y = -1.059 + 0.829x$	0.928
	20	CF ₃	4-CH ₃	16.14	9.92~32.04	$y = -1.957 + 1.620x$	0.922
	23	CHF ₂	4-OCH ₃	16.23	10.87~28.38	$y = -1.423 + 1.175x$	0.939
	29	CHF ₂	3-Cl	16.01	11.98~22.91	$y = -1.019 + 0.846x$	0.940
	30	CHF ₂	4-Cl	18.86	14.56~25.99	$y = -1.277 + 1.001x$	0.946
	32	CHF ₂	3-CF ₃	20.83	16.63~27.36	$y = -1.599 + 1.212x$	0.961
	36	CHF ₂	4-CH ₃	46.72	31.92~82.28	$y = -1.528 + 0.916x$	0.974
氟唑菌酰胺 ^a				16.49	11.81~27.49	$y = -1.112 + 0.914x$	0.984
烟草赤星病菌	9	CF ₃	2-F	17.19	4.89~28.20	$y = -1.627 + 1.317x$	0.990
	10	CF ₃	3-F	39.89	26.67~73.75	$y = -1.274 + 0.796x$	0.944
	11	CF ₃	4-F	26.60	15.58~71.12	$y = -1.333 + 0.936x$	0.906
	12	CF ₃	2-Cl	31.06	21.76~51.93	$y = -1.234 + 0.827x$	0.934
	13	CF ₃	3-Cl	25.89	19.82~36.60	$y = -1.514 + 1.071x$	0.979
	14	CF ₃	4-Cl	16.70	13.64~20.91	$y = -1.162 + 0.858x$	0.959
	15	CF ₃	2-CF ₃	32.58	25.23~70.83	$y = -1.142 + 0.755x$	0.963
	20	CF ₃	4-CH ₃	34.97	3.45~62.57	$y = -1.568 + 1.016x$	0.946
	23	CF ₃	4-OCH ₃	33.02	21.90~62.36	$y = -1.088 + 0.716x$	0.938
	29	CHF ₂	3-Cl	37.16	24.82~69.89	$y = -1.383 + 0.881x$	0.948
	30	CHF ₂	4-Cl	50.71	31.21~112.50	$y = -0.984 + 0.577x$	0.993
	32	CHF ₂	3-CF ₃	46.83	30.65~90.41	$y = -1.344 + 0.804x$	0.922
氟唑菌酰胺 ^a				0.68	0.23~1.27	$y = 0.125 + 0.773x$	0.941

^a Used as a positive control.

14 形成氢键的是 TYR(酪氨酸)的 58 号氨基酸残基, 且其位置更加深入(角度=109.6°, 距离=0.24 nm); 除此之外, 化合物 14 的吡唑环还与 TYR(酪氨酸)的 58 号氨基酸残基形成一个 π - π 作用, 并且 ARG(精氨酸)的 43 号氨基酸残基分别与苯环和吡唑环形成一个 π - π 作用, 这一点与商用 SDH 抑制剂氟唑菌酰胺类似, 这也说明化合物 14 的作用靶点可能为琥珀酸脱氢酶。

2 结论

基于活性片段拼接策略, 设计并合成了 32 个结构新颖的含取代吡唑的苯甲酰胺类衍生物, 初筛的抑菌活性数据表明, 部分化合物对油菜菌核病菌和苹果腐烂病菌的抑制活性较强。对于苹果腐烂病菌, 化合物 14 ($EC_{50}=11.67$ mg/L)活性明显高于氟唑菌酰胺($EC_{50}=16.49$ mg/L), 化合物 14 对油菜菌核病菌和烟草赤星病

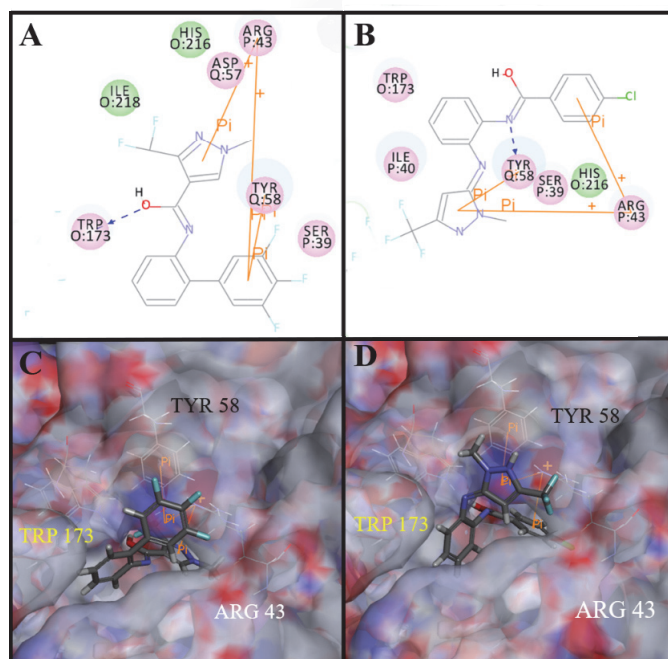


图4 氟唑菌酰胺和化合物 **14** 与 SDH 的结合模式(PDB 编号: 2FBW)

Figure 4 Binding model of compound **14** and fluxapyroxad in the active site of SDH (PDB entry: 2FBW)

菌表现出较好的体外活性, EC_{50} 值分别为 11.21 和 16.70 mg/L. 分子对接表明, 化合物 **14** 的作用靶点可能为琥珀酸脱氢酶.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

熔点经显微熔点仪测定(上海仪电物理光学仪器有限公司, 温度未校准); 核磁共振采用德国 Bruker Advance 400/500 MHz 核磁共振仪; 高分辨质谱采用 Bruker Daltonics Bio-TOF-Q III 型质谱仪(HR-ESI-MS)测定. 所有试剂均为国产市售分析纯.

3.2 化合物的合成

3.2.1 中间体吡唑胺(**3**)的合成

参考文献方法^[16], 在 250 mL 的双口瓶中先加入氢氧化钠(2.5 g, 105.5 mmol), 再加入 100 mL 的四氢呋喃, 油浴加热至 75~80 °C, 然后逐滴加入三氟乙酸乙酯(10.0 g, 70.3 mmol)和乙腈(4.3 g, 105.5 mmol)的混合溶液. 回流过夜, 薄层色谱(TLC) [V (石油醚): V (乙酸乙酯)=1:2]追踪至原料点消失或无变化. 反应结束后减压蒸馏得到混合物, 在混合物中加入乙酸乙酯(20 mL)稀释, 再加入 1 mol/L 盐酸(25 mL)酸化, pH 调至 1~4. 用乙酸乙酯萃取(15 mL×3), 合并有机相, 依次用水(10 mL×3)和饱和盐水(10 mL×3)冲洗分离有机相. 加入无水硫酸镁干燥, 抽滤, 减压浓缩得中间体 **2**, 黄色液体. 此步无需纯化, 直接投入下一步.

在 250 mL 的双口瓶中先加入甲基胍硫酸盐(3.9 g, 26.8 mmol)、乙醇(50 mL)、氢氧化钠(2.2 g, 53.6 mmol), 室温反应 10 h. 再依次加入三氟乙酸(2.9 g, 25.53 mmol)和 **2a** (3.5 g, 25.5 mmol), 加热至 80 °C, 回流 4 h, 薄层色谱(TLC) [V (石油醚): V (乙酸乙酯)=1:2]追踪至原料点消失或无变化. 反应结束后减压蒸馏得到混合物, 在混合物中加入乙酸乙酯(20 mL)稀释, 再加入饱和氢氧化钠溶液(20 mL)碱化, pH 调至 8~9, 用乙酸乙酯萃取(15 mL×3). 合并有机相, 加入饱和盐水(10 mL×3)冲洗, 分离有机相. 无水硫酸镁干燥, 抽滤减压浓缩得粗产物. 通过柱层析法 [V (石油醚): V (乙酸乙酯)=5:1]纯化得到 1-甲基-3-(三氟甲基)-1*H*-吡唑-5-胺(**3a**): 白色固体, 产率 95%. m.p. 96.3~97.0 °C; ^1H NMR (500 MHz, Chloroform- d) δ : 5.76 (s, 1H, ArH), 3.67 (s, 3H, NCH₃), 3.58 (s, 2H, NH₂); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform- d) δ : 145.5, 140.7 (q, J =37.8 Hz), 121.3 (q, J =268.3 Hz), 89.5, 34.8; ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO- d_6) δ : -61.1; HRMS (ESI) calcd for C₅H₇F₃N₃ [M+H]⁺ 166.0587, found 166.0588.

3-(二氟甲基)-1-甲基-1*H*-吡唑-5-胺(**3b**): 黄色固体, 产率 31.6%. m.p. 29.9~32.6 °C; ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.66 (t, J =55.1 Hz, 1H, CHF₂), 5.47 (s, 1H, ArH), 5.39 (s, 2H, NH₂), 3.54 (s, 3H, CH₃); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ : 148.6, 144.2 (t, J =28.1 Hz), 112.6 (t, J =230.7 Hz), 85.3, 34.9; ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO- d_6)

δ : -110.3; HRMS (ESI) calcd for $C_5H_8F_2N_3$ $[M+H]^+$ 148.0681, found 148.0681.

化合物 **3** 为已知化合物, 表征数据与文献[16]一致.

3.2.2 中间体 1-甲基-*N*-(2-硝基苯基)-1*H*-吡唑-5-胺(**5**)的合成

参考文献方法^[17], 化合物 **3** (1.47 g, 10 mmol)溶解在无水四氢呋喃(30 mL)溶液中, 在 0 °C 下加入叔丁醇钾(2.24 g, 20 mmol, 2 equiv.)并搅拌 30 min. 在 0 °C 下用邻氟硝基苯(1.09 mL, 10 mmol)处理所得悬浮液, 缓慢升至室温并搅拌 6 h. TLC $[V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=1:2]$ 追踪至原料点消失或无变化, 反应结束后用水(30 mL)淬灭, 乙酸乙酯(20 mL $\times$ 3)萃取. 无水硫酸镁干燥有机萃取物, 减压除去溶剂. 通过硅胶柱色谱法 $[V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{石油醚})=1:4]$ 纯化粗残余物, 得到呈黄色固体状的中间体 **5**.

1-甲基-*N*-(2-硝基苯基)-3-(三氟甲基)-1*H*-吡唑-5-胺(**5a**): 黄色固体, 产率 75%. m.p. 86.2~87.3 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.35 (s, 1H, NH), 8.16 (dd, $J=8.5, 1.6$ Hz, 1H), 7.57 (ddd, $J=8.6, 7.0, 1.6$ Hz, 1H), 6.97 (ddd, $J=8.4, 7.0, 1.3$ Hz, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.76 (d, $J=1.3$ Hz, 1H), 3.75 (s, 3H, NCH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 141.4, 139.4, 138.8 (q, $J=37.5$ Hz), 136.6, 133.5, 126.2, 121.3 (d, $J=268.2$ Hz), 119.0, 116.3, 100.7 (t, $J=2.3$ Hz), 35.9; HR-ESI-MS calcd for $C_{11}H_{10}F_3N_4O_2$ $[M+H]^+$ 257.1009, found 257.1008.

3-(二氟甲基)-1-甲基-*N*-(2-硝基苯基)-1*H*-吡唑-5-胺(**5b**): 黄色固体, 产率 74%. m.p. 78.2~80.3 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.31 (s, 1H, NH), 8.15 (d, $J=9.62$ Hz, 1H), 7.56 (t, $J=7.76$ Hz, 1H), 6.95 (s, 1H), 7.09~6.80 (m, 1H), 6.72 (d, $J=8.44$ Hz, 1H), 6.54 (s, 1H), 3.69 (s, 3H, NCH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 144.3 (t, $J=28.6$ Hz), 141.7, 138.8, 136.6, 133.3, 126.2, 118.7, 116.2, 111.5 (t, $J=231.7$ Hz), 99.6, 35.5; HR-ESI-MS calcd for $C_{11}H_{10}F_2N_4ONa$ $[M+Na]^+$ 309.0570, found 309.0567.

3.2.3 中间体吡唑-苯-1,2-二胺(**6**)的合成

参考文献方法^[17], 将中间体 **5** (5 g, 17.4 mmol)和质量分数为 10%的钨/碳(500 mg)在乙酸乙酯(60 mL)中的溶液在氢气下室温搅拌 12 h. 将混合物通过碱性氧化铝和硅藻土过滤, 用乙酸乙酯洗涤, 减压浓缩滤液, 得到中间体 **6**, 为红棕色固体.

3-(三氟甲基)-1-甲基-*N*-(2-硝基苯基)-1*H*-吡唑-5-胺(**6a**): 红棕色固体, 产率 82%. m.p. 76.5~77.5 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.3 (s, 1H, NH), 6.9~6.8 (m, 2H), 6.7 (dd, $J=7.9, 1.6$ Hz, 1H), 6.5 (td, $J=7.5, 1.6$

Hz, 1H), 5.7 (s, 1H), 4.9 (s, 2H), 3.7 (s, 3H, NCH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 146.2, 140.9, 138.7 (q, $J=36.8$ Hz), 127.7, 124.2, 121.6 (q, $J=268.0$ Hz), 121.3, 116.7, 115.4, 89.8 (d, $J=2.4$ Hz), 35.6; HR-ESI-MS calcd for $C_{11}H_{11}F_3N_4Na$ $[M+Na]^+$ 291.0664, found 291.0668.

3-(二氟甲基)-1-甲基-*N*-(2-硝基苯基)-1*H*-吡唑-5-胺(**6b**): 红棕色固体, 产率 79%. m.p. 68.7~70.3 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.12 (s, 1H, NH), 6.94~6.63 (m, 2H), 6.72 (d, $J=7.6$ Hz, 2H), 6.52 (t, $J=7.4$ Hz, 1H), 5.68 (s, 1H), 4.88 (s, 2H), 3.67 (s, 3H, NCH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 145.5, 143.8 (t, $J=28.2$ Hz), 140.2, 128.5, 123.5, 120.2, 116.7, 115.4, 111.9 (t, $J=231.2$ Hz), 89.6, 35.3; HR-ESI-MS calcd for $C_{11}H_{13}F_2N_4$ $[M+H]^+$ 239.1103, found 239.1102.

3.2.1 目标化合物 **8**~**39** 的合成

参考文献方法^[16], 在 10 mL 反应管中加入 **6** (1 mmol)、苯甲酰氯 **7** (1 mmol)及二氯甲烷(3 mL). 然后在冰浴下加入三乙胺(0.55 mL), 室温搅拌 3 h. TLC 追踪至原料点消失或无变化. 反应结束后减压蒸馏得到粗产物. 通过柱层析法得到目标化合物.

N-(2-((1-甲基-3-(三氟甲基)-1*H*-吡唑-5-基)氨基)苯基)苯甲酰胺(**8**): 白色固体, 产率 89%. m.p. 164.1~165.2 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.92 (s, 1H, NH), 7.99 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 7.68 (s, 1H, NH), 7.59 (dd, $J=14.9, 7.5$ Hz, 1H), 7.51 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.40 (dd, $J=7.9, 1.5$ Hz, 1H), 7.17 (td, $J=7.7, 1.6$ Hz, 1H), 6.96 (td, $J=7.5, 1.4$ Hz, 1H), 6.83 (dd, $J=8.1, 1.4$ Hz, 1H), 6.29 (s, 1H), 3.71 (s, 3H, NCH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.0, 143.3, 138.9 (q, $J=37.3$ Hz), 138.6, 134.5, 131.6, 128.3 (2C), 127.9 (2C), 127.6, 127.0, 126.6, 121.5 (q, $J=268.1$ Hz), 120.8, 116.7, 94.7, 35.7; HR-ESI-MS calcd for $C_{18}H_{16}F_3N_4O$ $[M+H]^+$ 361.1271, found 361.1268.

2-氟-*N*-(2-((1-甲基-3-(三氟甲基)-1*H*-吡唑-5-基)氨基)苯基)苯甲酰胺(**9**): 白色固体, 产率 85%. m.p. 122.1~123.2 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.84 (s, 1H, NH), 7.79 (t, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.65 (s, 1H, NH), 7.58 (dd, $J=17.9, 7.3$ Hz, 2H), 7.34 (q, $J=8.2, 7.1$ Hz, 2H), 7.18 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.01 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 6.90 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.23 (s, 1H), 3.72 (s, 3H, NCH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 163.0, 159.4 (d, $J=249.6$ Hz), 143.6, 139.0 (q, $J=37.2$ Hz), 137.2, 132.9 (d, $J=8.6$ Hz), 130.5 (d, $J=2.9$ Hz), 127.0, 126.8, 126.4, 124.5 (d, $J=3.4$ Hz), 123.9 (d, $J=13.5$ Hz), 121.5 (q, $J=268.1$ Hz), 121.5, 117.8, 116.2 (d, $J=22.2$ Hz), 93.7, 35.7; HR-ESI-MS calcd for $C_{18}H_{15}F_4N_4O$ $[M+H]^+$ 379.1177, found

379.1174.

3-氟-*N*-(2-((1-甲基-3-(三氟甲基)-1*H*-吡啶-5-基)氨基)苯基)苯甲酰胺(**10**): 白色固体, 产率 90%. m.p. 172.9~173.3 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.96 (s, 1H, NH), 7.83 (d, *J*=7.8 Hz, 1H), 7.78 (d, *J*=9.7 Hz, 1H), 7.67 (s, 1H, NH), 7.57 (q, *J*=7.9 Hz, 1H), 7.43 (t, *J*=7.4 Hz, 1H), 7.37 (d, *J*=7.7 Hz, 1H), 7.17 (t, *J*=7.6 Hz, 1H), 6.95 (t, *J*=7.4 Hz, 1H), 6.82 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 6.29 (s, 1H), 3.70 (s, 3H, NCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 164.6, 161.9 (d, *J*=244.0 Hz), 143.1, 138.9 (q, *J*=37.2 Hz), 138.9, 136.9 (d, *J*=6.9 Hz), 130.4 (d, *J*=8.0 Hz), 127.9, 127.2, 126.0, 124.1 (d, *J*=2.8 Hz), 121.5 (q, *J*=268.1 Hz), 120.6, 118.4 (d, *J*=21.1 Hz), 116.5, 114.8 (d, *J*=22.8 Hz), 95.1 (d, *J*=2.3 Hz), 35.7; HR-ESI-MS calcd for C₁₈H₁₅F₄N₄O [M+H]⁺ 379.1177, found 379.1177.

4-氟-*N*-(2-((1-甲基-3-(三氟甲基)-1*H*-吡啶-5-基)氨基)苯基)苯甲酰胺(**11**): 白色固体, 产率 84%. m.p. 183.2~184.3 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.90 (s, 1H, NH), 8.05 (dd, *J*=8.5, 5.6 Hz, 2H), 7.65 (s, 1H, NH), 7.35 (q, *J*=8.8, 7.8 Hz, 3H), 7.16 (t, *J*=7.78 Hz, 1H), 6.95 (t, *J*=7.52 Hz, 1H), 6.82 (d, *J*=8.04 Hz, 1H), 6.28 (s, 1H), 3.70 (s, 3H, NCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 164.9, 164.1 (d, *J*=248.8 Hz), 143.1, 138.9 (q, *J*=37.4 Hz), 138.8, 130.9 (d, *J*=2.8 Hz), 130.6 (d, *J*=9.1 Hz), 127.8, 127.1, 126.3, 123.9, 121.5 (q, *J*=268.2 Hz), 120.6, 116.5, 115.2, 115.0, 94.9 (d, *J*=2.2 Hz), 35.7; HR-ESI-MS calcd for C₁₈H₁₅F₄N₄O [M+H]⁺ 379.1177, found 379.1176.

2-氯-*N*-(2-((1-甲基-3-(三氟甲基)-1*H*-吡啶-5-基)氨基)苯基)苯甲酰胺(**12**): 白色固体, 产率 86%. m.p. 168.7~169.5 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.09 (s, 1H, NH), 7.64 (d, *J*=6.5 Hz, 1H), 7.59~7.42 (m, 4H), 7.56 (s, 1H, NH), 7.18 (t, *J*=7.6 Hz, 1H), 7.01 (t, *J*=7.6 Hz, 1H), 6.91 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 6.24 (s, 1H), 3.72 (s, 3H, NCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 165.6, 143.5, 139.0 (q, *J*=37.1 Hz), 137.2, 136.5, 131.2, 130.2, 129.7, 129.3, 127.1, 126.9, 126.7, 126.5, 121.5 (q, *J*=268.1 Hz), 121.5, 117.8, 93.6, 35.7; HR-ESI-MS calcd for C₁₈H₁₅ClF₃N₄O [M+H]⁺ 395.0881, found 395.0882.

3-氯-*N*-(2-((1-甲基-3-(三氟甲基)-1*H*-吡啶-5-基)氨基)苯基)苯甲酰胺(**13**): 白色固体, 产率 75%. m.p. 160.4~162.1 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.97 (s, 1H, NH), 8.00 (s, 1H), 7.90 (d, *J*=7.66 Hz, 1H), 7.63 (d, *J*=8.46 Hz, 2H), 7.53 (t, *J*=7.87 Hz, 1H), 7.33 (d, *J*=

7.64 Hz, 1H), 7.15 (t, *J*=7.60 Hz, 1H), 6.93 (t, *J*=7.42 Hz, 1H), 6.78 (d, *J*=8.01 Hz, 1H), 6.27 (s, 1H), 3.68 (s, 3H, NCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 164.6, 143.1, 139.0, 138.9 (q, *J*=37.3 Hz), 136.5, 133.1, 131.3, 130.2, 127.9, 127.8, 127.2, 126.7, 125.9, 121.5 (d, *J*=268.2 Hz), 120.5, 116.4, 95.1 (d, *J*=2.2 Hz), 35.7; HR-ESI-MS calcd for C₁₈H₁₅ClF₃N₄O [M+H]⁺ 395.0881, found 395.0883.

4-氯-*N*-(2-((1-甲基-3-(三氟甲基)-1*H*-吡啶-5-基)氨基)苯基)苯甲酰胺(**14**): 白色固体, 产率 86%. m.p. 187.4~191.1 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.95 (s, 1H, NH), 8.00 (d, *J*=8.1 Hz, 2H), 7.65 (s, 1H, NH), 7.59 (d, *J*=8.3 Hz, 2H), 7.37 (d, *J*=7.9 Hz, 1H), 7.17 (t, *J*=7.8 Hz, 1H), 6.95 (t, *J*=7.5 Hz, 1H), 6.81 (d, *J*=8.1 Hz, 1H), 6.28 (s, 1H), 3.70 (s, 3H, NCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 164.9, 143.1, 138.9 (q, *J*=37.3 Hz), 138.9, 136.4, 133.2, 129.9 (2C), 128.3 (2C), 127.8, 127.2, 126.2, 121.5 (q, *J*=268.1 Hz), 120.6, 116.5, 95.0, 35.7; HR-ESI-MS calcd for C₁₈H₁₅ClF₃N₄O [M+H]⁺ 395.0881, found 395.0879.

N-(2-((1-甲基-3-(三氟甲基)-1*H*-吡啶-5-基)氨基)苯基-2-三氟甲基)苯甲酰胺(**15**): 白色固体, 产率 89%. m.p. 157.1~158.3 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.15 (s, 1H, NH), 7.85 (d, *J*=7.7 Hz, 1H), 7.78 (d, *J*=4.0 Hz, 2H), 7.75~7.66 (m, 1H), 7.57 (s, 1H, NH), 7.46 (d, *J*=7.7 Hz, 1H), 7.19 (t, *J*=7.5 Hz, 1H), 7.01 (t, *J*=7.5 Hz, 1H), 6.90 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 6.26 (s, 1H), 3.72 (s, 3H, NCH₃-H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 166.4, 143.4, 139.0 (q, *J*=37.2 Hz), 137.4, 136.0 (d, *J*=2.1 Hz), 132.4, 130.1, 128.8, 127.0, 126.6 (d, *J*=5.2 Hz), 126.3 (d, *J*=4.9 Hz), 126.2, 126.1 (d, *J*=31.5 Hz), 123.9 (q, *J*=273.8 Hz), 121.5 (q, *J*=268.1 Hz), 121.4, 117.6, 93.8, 35.6; HR-ESI-MS calcd for C₁₉H₁₅F₆N₄O [M+H]⁺ 429.1145, found 429.1147.

N-(2-((1-甲基-3-(三氟甲基)-1*H*-吡啶-5-基)氨基)苯基-3-三氟甲基)苯甲酰胺(**16**): 白色固体, 产率 87%. m.p. 179.7~180.3 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.14 (s, 1H, NH), 8.34~8.23 (m, 2H), 7.95 (d, *J*=7.8 Hz, 1H), 7.76 (t, *J*=7.8 Hz, 1H), 7.70 (s, 1H, NH), 7.36 (dd, *J*=7.9, 1.5 Hz, 1H), 7.18 (td, *J*=7.7, 1.5 Hz, 1H), 6.95 (td, *J*=7.6, 1.4 Hz, 1H), 6.82 (dd, *J*=8.1, 1.3 Hz, 1H), 6.29 (s, 1H), 3.70 (s, 3H, NCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 164.5, 143.0, 139.2, 138.9 (q, *J*=37.3 Hz), 135.5, 132.0, 129.5, 129.1 (q, *J*=32.0 Hz), 128.0 (d, *J*=3.9 Hz), 128.1, 127.4, 125.8, 124.6 (q, *J*=3.9 Hz),

124.1 (q, $J=272.4$ Hz), 121.5 (q, $J=268.0$ Hz), 120.5, 116.4, 95.2 (d, $J=2.2$ Hz), 35.7; HR-ESI-MS calcd for $C_{19}H_{15}F_6N_4O$ $[M+H]^+$ 429.1145, found 429.1142.

N-(2-((1-甲基-3-(三氟甲基)-1*H*-吡啶-5-基)氨基)苯基-4-三氟甲基)苯甲酰胺(**17**): 白色固体, 产率 86%. m.p. 203.6~205.9 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.12 (s, 1H, NH), 8.19 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.90 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.71 (s, 1H, NH), 7.39 (d, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.18 (td, $J=7.8, 1.5$ Hz, 1H), 6.96 (td, $J=7.6, 1.3$ Hz, 1H), 6.83 (dd, $J=8.2, 1.3$ Hz, 1H), 6.31 (s, 1H), 3.71 (s, 3H, NCH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.8, 143.1, 139.0 (q, $J=37.3$ Hz), 139.0, 138.3, 131.4 (q, $J=31.9$ Hz), 128.8 (2C), 127.9, 127.3, 125.9, 125.2 (q, $J=3.8$ Hz), 124.0 (q, $J=272.5$ Hz), 121.5 (q, $J=268.1$ Hz), 120.6, 116.5, 95.1 (d, $J=2.5$ Hz, 2C), 35.7; HR-ESI-MS calcd for $C_{19}H_{15}F_6N_4O$ $[M+H]^+$ 429.1145, found 429.1143.

2-甲基-*N*-(2-((1-甲基-3-(三氟甲基)-1*H*-吡啶-5-基)氨基)苯基)苯甲酰胺(**18**): 白色固体, 产率 80%. m.p. 190.1~191.7 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.87 (s, 1H, NH), 7.64 (s, 1H, NH), 7.57~7.48 (m, 2H), 7.39 (t, $J=7.44$ Hz, 1H), 7.32~7.25 (m, 2H), 7.17 (t, $J=7.73$ Hz, 1H), 7.00 (t, $J=7.63$ Hz, 1H), 6.90 (d, $J=8.07$ Hz, 1H), 6.24 (s, 1H), 3.72 (s, 3H, NCH₃), 2.42 (s, 3H, CH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 168.5, 143.6, 139.0 (q, $J=37.2$ Hz), 137.3, 136.6, 135.7, 130.6, 129.8, 127.6, 127.3, 126.7 (2C), 125.5, 121.5 (d, $J=268.1$ Hz), 121.4, 117.7, 93.6, 35.7, 19.5; HR-ESI-MS calcd for $C_{19}H_{18}F_3N_4O$ $[M+H]^+$ 375.1427, found 375.1425.

3-甲基-*N*-(2-((1-甲基-3-(三氟甲基)-1*H*-吡啶-5-基)氨基)苯基)苯甲酰胺(**19**): 白色固体, 产率 84%. m.p. 169.1~170.5 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.88 (s, 1H, NH), 7.78 (s, 2H), 7.68 (s, 1H, NH), 7.40 (t, $J=5.8$ Hz, 3H), 7.17 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 6.97 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.27 (s, 1H), 3.71 (s, 3H, NCH₃), 2.39 (s, 3H, CH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.1, 143.3, 139.0 (q, $J=37.2$ Hz), 138.4, 137.5, 134.5, 132.1, 128.5, 128.2, 127.5, 126.9 (d, $J=5.2$ Hz), 125.1, 121.5 (q, $J=268.1$ Hz), 120.9, 116.9, 94.5 (d, $J=2.3$ Hz, 2C), 35.7, 21.0; HR-ESI-MS calcd for $C_{19}H_{18}F_3N_4O$ $[M+H]^+$ 375.1427, found 375.1425.

4-甲基-*N*-(2-((1-甲基-3-(三氟甲基)-1*H*-吡啶-5-基)氨基)苯基)苯甲酰胺(**20**): 白色固体, 产率 87%. m.p. 155.1~156.3 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.85 (s, 1H, NH), 7.90 (d, $J=7.9$ Hz, 2H), 7.68 (s, 1H, NH), 7.41 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 7.32 (d, $J=7.9$ Hz, 2H), 7.16 (t,

$J=7.6$ Hz, 1H), 6.96 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 6.84 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.28 (s, 1H), 3.70 (s, 3H, NCH₃), 2.38 (s, 3H, CH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 165.9, 143.3, 141.6, 139.0 (q, $J=37.2$ Hz), 138.5, 131.6, 128.8 (2C), 128.0 (2C), 127.5, 126.8 (2C), 121.5 (q, $J=268.1$ Hz), 120.9, 116.9, 94.4 (d, $J=2.2$ Hz), 35.7, 21.0; HR-ESI-MS calcd for $C_{19}H_{18}F_3N_4O$ $[M+H]^+$ 375.1427, found 375.1429.

2-甲氧基-*N*-(2-((1-甲基-3-(三氟甲基)-1*H*-吡啶-5-基)氨基)苯基)苯甲酰胺(**21**): 白色固体, 产率 76%. m.p. 121.7~122.3 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.08 (s, 1H, NH), 8.00 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.94 (d, $J=7.4$ Hz, 1H), 7.86 (s, 1H, NH), 7.54 (t, $J=7.3$ Hz, 1H), 7.20 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.12 (q, $J=7.5$ Hz, 3H), 7.01 (d, $J=7.4$ Hz, 1H), 5.94 (s, 1H), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 3.75 (s, 3H, NCH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 163.6, 157.1, 145.0, 139.0 (q, $J=37.1$ Hz), 134.5, 133.1, 130.9, 130.3, 125.5, 123.8, 123.4, 122.3, 121.4 (q, $J=268.2$ Hz), 120.8 (d, $J=4.0$ Hz, 2C), 112.3, 91.5, 56.0, 35.6; HR-ESI-MS calcd for $C_{19}H_{18}F_3N_4O_2$ $[M+H]^+$ 391.1376, found 391.1374.

3-甲氧基-*N*-(2-((1-甲基-3-(三氟甲基)-1*H*-吡啶-5-基)氨基)苯基)苯甲酰胺(**22**): 白色固体, 产率 78%. m.p. 153.8~157.1 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.88 (s, 1H, NH), 7.66 (s, 1H, NH), 7.58~7.50 (m, 2H), 7.41 (dd, $J=16.4, 8.2$ Hz, 2H), 7.23~7.11 (m, 2H), 6.96 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 6.84 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.27 (s, 1H), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 3.70 (s, 3H, NCH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 165.7, 159.1, 143.3, 138.9 (q, $J=37.3$ Hz), 138.6, 135.9, 129.4, 127.6, 127.0, 126.6, 121.4 (q, $J=287.1$ Hz), 120.8, 120.2, 117.4, 116.8, 113.1, 94.6, 55.3, 35.7; HR-ESI-MS calcd for $C_{19}H_{18}F_3N_4O_2$ $[M+H]^+$ 391.1376, found 391.1375.

4-甲氧基-*N*-(2-((1-甲基-3-(三氟甲基)-1*H*-吡啶-5-基)氨基)苯基)苯甲酰胺(**23**): 白色固体, 产率 78%. m.p. 165.1~167.1 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.80 (s, 1H, NH), 7.99 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.68 (s, 1H, NH), 7.40 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.16 (t, $J=7.4$ Hz, 1H), 7.05 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 6.96 (t, $J=7.3$ Hz, 1H), 6.84 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 6.28 (s, 1H), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 3.70 (s, 3H, NCH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 165.4, 161.9, 143.3, 138.9 (q, $J=37.2$ Hz), 138.5, 129.9 (s, 2C), 127.5, 126.9, 126.8, 126.6, 121.5 (q, $J=268.1$ Hz), 120.8, 116.8, 113.5 (s, 2C), 94.4, 55.4, 35.7; HR-ESI-MS calcd for $C_{19}H_{18}F_3N_4O_2$ $[M+H]^+$ 391.1376, found 391.1372.

N-(2-((3-(二氟甲基)-1-甲基-1*H*-吡啶-5-基)氨基)苯基)苯甲酰胺(**24**): 白色固体, 产率 86%. m.p. 168.7~169.5 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.88 (s, 1H, NH), 8.00 (d, *J*=7.5 Hz, 2H), 7.59 (t, *J*=7.3 Hz, 1H), 7.56~7.48 (m, 3H), 7.38 (d, *J*=7.7 Hz, 1H), 7.15 (t, *J*=7.7 Hz, 1H), 6.97~6.71 (m, 3H), 6.13 (s, 1H), 3.65 (s, 3H, NCH₃); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 166.4, 144.5 (t, *J*=28.4 Hz), 143.1, 139.5, 135.0, 132.0, 128.7 (2C), 128.4 (2C), 128.0, 127.4, 126.7, 120.7, 116.5, 112.2 (t, *J*=231.4 Hz), 94.6, 35.8; HR-ESI-MS calcd for C₁₈H₁₇F₂N₄ [M+H]⁺ 343.1365, found 343.1362.

N-(2-((3-(二氟甲基)-1-甲基-1*H*-吡啶-5-基)氨基)苯基)-2-氟苯甲酰胺(**25**): 白色固体, 产率 82%. m.p. 109.2~110.4 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.82 (s, 1H, NH), 7.81 (t, *J*=7.2 Hz, 1H), 7.57 (d, *J*=13.2 Hz, 2H), 7.52 (s, 1H, NH), 7.33 (q, *J*=8.2, 7.3 Hz, 2H), 7.16 (t, *J*=7.6 Hz, 1H), 7.04~6.69 (m, 3H), 6.09 (s, 1H), 3.67 (s, 3H, NCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 163.4, 159.8 (d, *J*=249.5 Hz), 144.5 (t, *J*=28.4 Hz), 143.3, 138.2, 133.3 (d, *J*=8.5 Hz), 131.0 (d, *J*=2.0 Hz), 127.2, 127.0, 126.8, 124.9 (d, *J*=3.5 Hz), 124.3 (d, *J*=13.8 Hz), 121.4, 117.5, 116.7 (d, *J*=22.3 Hz), 112.2 (t, *J*=231.4 Hz), 93.8, 35.7; HR-ESI-MS calcd for C₁₈H₁₆F₃N₄O [M+H]⁺ 361.1271, found 361.1270.

N-(2-((3-(二氟甲基)-1-甲基-1*H*-吡啶-5-基)氨基)苯基)-3-氟苯甲酰胺(**26**): 白色固体, 产率 89%. m.p. 158.2~160.1 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.98 (s, 1H, NH), 7.86 (dd, *J*=18.1, 8.8 Hz, 2H), 7.65~7.59 (m, 1H), 7.58 (s, 1H, NH), 7.47 (t, *J*=8.5 Hz, 1H), 7.38 (d, *J*=7.7 Hz, 1H), 7.19 (t, *J*=7.7 Hz, 1H), 7.00~6.74 (m, 3H), 6.18 (s, 1H), 3.68 (s, 3H, NCH₃); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 165.1, 162.3 (d, *J*=243.9 Hz), 144.5 (t, *J*=28.5 Hz), 142.9, 139.9, 137.4 (d, *J*=7.0 Hz), 130.8 (d, *J*=8.0 Hz), 128.3, 127.7, 126.1, 124.6 (d, *J*=2.7 Hz), 120.5, 118.8 (d, *J*=20.9 Hz), 116.2, 115.2 (d, *J*=22.8 Hz), 112.2 (t, *J*=231.4 Hz), 95.0, 35.8; HR-ESI-MS calcd for C₁₈H₁₆F₃N₄O [M+H]⁺ 361.1271, found 361.1270.

N-(2-((3-(二氟甲基)-1-甲基-1*H*-吡啶-5-基)氨基)苯基)-4-氟苯甲酰胺(**27**): 白色固体, 产率 82%. m.p. 169.2~170.9 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.88 (s, 1H, NH), 8.06 (dd, *J*=8.4, 5.7 Hz, 2H), 7.53 (s, 1H, NH), 7.36~7.31 (m, 3H), 7.14 (t, *J*=7.7 Hz, 1H), 6.97~6.65 (m, 3H), 6.13 (s, 1H), 3.64 (s, 3H, NCH₃); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 165.5, 164.5 (d, *J*=248.7 Hz), 144.5 (t, *J*=28.3 Hz), 143.0, 139.8, 131.5 (d, *J*=3.0 Hz),

131.1 (d, *J*=9.0 Hz, 2C), 128.2, 127.5, 126.4, 120.6, 116.3, 115.6 (d, *J*=21.8 Hz, 2C), 112.2 (t, *J*=231.5 Hz), 94.8, 35.8; HR-ESI-MS calcd for C₁₈H₁₆F₃N₄O [M+H]⁺ 361.1271, found 361.1270.

2-氯-*N*-(2-((3-(二氟甲基)-1-甲基-1*H*-吡啶-5-基)氨基)苯基)苯甲酰胺(**28**): 白色固体, 产率 91%. m.p. 139.0~141.5 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.04 (s, 1H, NH), 7.67 (d, *J*=6.94 Hz, 1H), 7.55 (d, *J*=7.86 Hz, 1H), 7.49 (t, *J*=7.94 Hz, 2H), 7.43 (t, *J*=7.36 Hz, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.15 (t, *J*=7.59 Hz, 1H), 7.02~6.71 (m, 3H), 6.10 (s, 1H), 3.65 (s, 3H, NCH₃); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 166.1, 144.4 (d, *J*=28.4 Hz), 143.2, 138.2, 137.0, 131.6, 130.6, 130.1, 129.8, 127.6, 127.4, 126.9, 126.7, 121.3, 117.4, 112.2 (t, *J*=231.4 Hz), 93.7, 35.7; HR-ESI-MS calcd for C₁₈H₁₆ClF₂N₄O [M+H]⁺ 377.0975, found 377.0974.

3-氯-*N*-(2-((3-(二氟甲基)-1-甲基-1*H*-吡啶-5-基)氨基)苯基)苯甲酰胺(**29**): 白色固体, 产率 75%. m.p. 152.3~153.1 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.00 (s, 1H, NH), 8.1 (s, 1H, NH), 7.95 (dt, *J*=7.8, 1.4 Hz, 1H), 7.69~7.63 (m, 1H), 7.59~7.53 (m, 2H), 7.34 (dd, *J*=7.8, 1.6 Hz, 1H), 7.19~7.13 (m, 1H), 7.03~6.67 (m, 3H), 6.17 (s, 1H), 3.66 (s, 3H, NCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 165.1, 144.5 (t, *J*=28.3 Hz), 142.9, 140.0, 137.0, 133.5, 131.7, 130.6, 128.3, 128.3, 127.7, 127.2, 125.9, 120.4, 116.0, 112.2 (t, *J*=231.5 Hz), 95.1, 35.8; HR-ESI-MS calcd for C₁₈H₁₆ClF₂N₄O [M+H]⁺ 377.0975, found 377.0973.

4-氯-*N*-(2-((3-(二氟甲基)-1-甲基-1*H*-吡啶-5-基)氨基)苯基)苯甲酰胺(**30**): 白色固体, 产率 86%. m.p. 189.1~190.3 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.95 (s, 1H, NH), 8.02 (d, *J*=8.51 Hz, 2H), 7.61 (s, 1H, NH), 7.58 (s, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.34 (d, *J*=7.07 Hz, 1H), 7.15 (t, *J*=7.08 Hz, 1H), 7.00~6.69 (m, 3H), 6.15 (s, 1H), 3.65 (s, 3H, NCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 164.9, 144.0 (t, *J*=28.4 Hz), 142.5, 139.4, 136.3, 133.3, 129.9 (2C), 128.3 (2C), 127.8, 127.1, 125.7, 120.1, 115.8, 111.7 (t, *J*=231.4 Hz), 94.4, 35.3; HR-ESI-MS calcd for C₁₈H₁₆ClF₂N₄O [M+H]⁺ 377.0975, found 377.0971.

N-(2-((3-(二氟甲基)-1-甲基-1*H*-吡啶-5-基)氨基)苯基)-2-三氟甲基苯甲酰胺(**31**): 白色固体, 产率 87%. m.p. 143.3~144.5 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.12 (s, 1H, NH), 7.84 (t, *J*=8.10 Hz, 2H), 7.78 (t, *J*=7.49 Hz, 1H), 7.71 (t, *J*=7.64 Hz, 1H), 7.43 (d, *J*=6.13 Hz, 2H), 7.17 (t, *J*=7.30 Hz, 1H), 7.04~6.72 (m, 3H),

6.13 (s, 1H), 3.66 (s, 3H, NCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 166.4, 144.1 (t, *J*=28.3 Hz), 142.7, 138.0, 136.0 (d, *J*=2.4 Hz), 132.4, 130.1, 128.9, 127.0, 126.5, 126.3 (q, *J*=4.8 Hz), 126.0 (q, *J*=31.4 Hz), 126.0, 123.9 (q, *J*=273.8 Hz), 120.8, 116.8, 111.8 (t, *J*=231.4 Hz), 93.4, 35.2; HR-ESI-MS calcd for C₁₉H₁₆F₅N₄O [M+H]⁺ 411.1239, found 411.1235.

N-(2-((3-(二氟甲基)-1-甲基-1*H*-吡唑-5-基)氨基)苯基)-3-三氟甲基苯甲酰胺(**32**): 白色固体, 产率 85%. m.p. 149.1~151.3 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.13 (s, 1H, NH), 8.33 (s, 1H), 8.29 (d, *J*=7.67 Hz, 1H), 7.95 (d, *J*=7.60 Hz, 1H), 7.77 (t, *J*=7.73 Hz, 1H), 7.58 (s, 1H, NH), 7.34 (d, *J*=7.59 Hz, 1H), 7.16 (t, *J*=7.46 Hz, 1H), 7.04~6.67 (m, 3H), 6.16 (s, 1H), 3.66 (s, 3H, NCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 164.6, 144.1 (t, *J*=28.4 Hz), 142.4, 139.8, 135.5, 132.0, 129.5, 128.9 (t, *J*=32.1 Hz), 128.0, 127.4, 125.3, 124.7 (q, *J*=3.9 Hz), 124.1 (q, *J*=272.6 Hz), 119.9, 115.6, 111.7 (t, *J*=231.3 Hz), 115.6, 94.8, 35.3; HR-ESI-MS calcd for C₁₉H₁₆F₅N₄O [M+H]⁺ 411.1239, found 411.1235.

N-(2-((3-(二氟甲基)-1-甲基-1*H*-吡唑-5-基)氨基)苯基)-4-三氟甲基苯甲酰胺(**33**): 砖红色固体, 产率 88%. m.p. 197.0~198.8 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.09 (s, 1H, N-H), 8.19 (d, *J*=7.99 Hz, 2H), 7.90 (d, *J*=8.02 Hz, 2H), 7.58 (s, 1H), 7.36 (d, *J*=7.81 Hz, 1H), 7.16 (t, *J*=7.30 Hz, 1H), 7.01~6.69 (m, 3H), 6.2 (s, 1H), 3.66 (s, 3H, NCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 164.8, 144.1 (t, *J*=28.4 Hz), 142.4, 139.5, 138.4, 131.3 (q, *J*=31.6 Hz), 128.9 (s, 2C), 127.8, 127.3, 125.5, 125.2 (q, *J*=3.8 Hz), 124.0 (q, *J*=272.5 Hz), 120.0, 115.7, 111.7 (t, *J*=231.4 Hz), 94.6, 54.9, 35.3; HR-ESI-MS calcd for C₁₉H₁₆F₅N₄O [M+H]⁺ 411.1239, found 411.1236.

N-(2-((3-(二氟甲基)-1-甲基-1*H*-吡唑-5-基)氨基)苯基)-2-甲基苯甲酰胺(**34**): 白色固体, 产率 80%. m.p. 161.2~162.5 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.84 (s, 1H, N-H), 7.58 (d, *J*=7.52 Hz, 1H), 7.49 (d, *J*=7.30 Hz, 2H), 7.39 (t, *J*=7.50 Hz, 1H), 7.30 (d, *J*=8.20 Hz, 2H), 7.15 (t, *J*=7.81 Hz, 1H), 7.03~6.68 (m, 3H), 6.11 (s, 1H), 3.66 (s, 3H, NCH₃), 2.43 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 168.5, 144.1 (t, *J*=28.3 Hz), 142.9, 137.9, 136.6, 135.7, 130.5, 129.7, 127.6, 126.8, 126.6, 126.6, 125.5, 120.8, 116.9, 111.8 (t, *J*=231.4 Hz), 93.2, 35.3, 19.5; HR-ESI-MS calcd for C₁₉H₁₉F₂N₄O [M+H]⁺ 357.1521, found 357.1519.

N-(2-((3-(二氟甲基)-1-甲基-1*H*-吡唑-5-基)氨基)苯

基)-3-甲基苯甲酰胺(**35**): 红色固体, 产率 80%. m.p. 158.8~159.7 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.86 (s, 1H, N-H), 7.80 (s, 2H), 7.54 (s, 1H, NH), 7.42~7.35 (m, 3H), 7.15 (t, *J*=7.51 Hz, 1H), 7.00~6.67 (m, 3H), 6.13 (s, 1H), 3.65 (s, 3H, NCH₃), 2.39 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 166.1, 144.1 (t, *J*=28.4 Hz), 142.7, 138.9, 137.5, 134.5, 132.1, 128.5, 128.1, 127.4, 126.8, 126.4, 125.1, 120.3, 116.2, 111.7 (t, *J*=231.4 Hz), 93.9, 35.3, 21.0; HR-ESI-MS calcd for C₁₉H₁₉F₂N₄O [M+H]⁺ 357.1521, found 357.1522.

N-(2-((3-(二氟甲基)-1-甲基-1*H*-吡唑-5-基)氨基)苯基)-4-甲基苯甲酰胺(**36**): 红色固体, 产率 84%. m.p. 168.5~169.2 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.83 (s, 1H, NH), 7.91 (d, *J*=7.88 Hz, 2H), 7.55 (s, 1H, NH), 7.38 (d, *J*=7.86 Hz, 1H), 7.32 (d, *J*=7.86 Hz, 2H), 7.14 (t, *J*=7.88 Hz, 1H), 7.02~6.70 (m, 3H), 6.13 (s, 1H), 3.65 (s, 3H, NCH₃), 2.39 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 165.9, 144.1 (t, *J*=28.4 Hz), 142.7, 141.5, 138.9, 131.6, 128.8 (2C), 128.0 (2C), 127.4, 126.8, 126.4, 120.3, 116.1, 111.7 (t, *J*=231.4 Hz), 93.9, 35.3, 21.0; HR-ESI-MS calcd for C₁₉H₁₉F₂N₄O [M+H]⁺ 357.1521, found 357.1520.

N-(2-((3-(二氟甲基)-1-甲基-1*H*-吡唑-5-基)氨基)苯基)-2-甲氧基苯甲酰胺(**37**): 白色固体, 产率 75%. m.p. 115.1~116.5 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.09 (s, 1H, NH), 7.99 (dd, *J*=7.8, 1.8 Hz, 1H), 7.94 (dd, *J*=7.8, 1.9 Hz, 1H), 7.72 (s, 1H, NH), 7.58~7.51 (m, 1H), 7.19 (dd, *J*=8.5, 1.0 Hz, 1H), 7.16~7.05 (m, 3H), 6.96~6.65 (m, 2H), 5.80 (s, 1H), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 3.69 (s, 3H, NCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 163.7, 157.1, 144.6, 144.1 (t, *J*=28.2 Hz), 135.0, 133.1, 130.9, 130.1, 125.5, 123.7, 123.1, 122.4, 120.9, 120.4, 112.3, 111.7 (t, *J*=231.4 Hz), 91.0, 56.1, 35.3; HR-ESI-MS calcd for C₁₉H₁₉F₂N₄O₂ [M+H]⁺ 373.1471, found 373.1468.

N-(2-((3-(二氟甲基)-1-甲基-1*H*-吡唑-5-基)氨基)苯基)-3-甲氧基苯甲酰胺(**38**): 白色固体, 产率 75%. m.p. 145.1~147.3 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.89 (s, 1H, NH), 7.58 (d, *J*=7.7 Hz, 1H), 7.55 (s, 2H), 7.43 (t, *J*=7.6 Hz, 1H), 7.37 (d, *J*=7.8 Hz, 1H), 7.20~7.12 (m, 2H), 6.93 (td, *J*=7.6, 1.4 Hz, 1H), 6.85 (t, *J*=54.8 Hz, 1H), 6.77 (dd, *J*=8.1, 1.4 Hz, 1H), 6.13 (s, 1H), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 3.66 (s, 3H, NCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 165.8, 159.1, 144.1 (t, *J*=28.5 Hz), 142.7, 139.1, 135.9, 129.4, 127.6, 127.0, 126.2, 120.3, 120.2, 117.4, 116.1, 113.1, 111.8 (t, *J*=231.4 Hz), 94.1, 55.4,

35.4; HR-ESI-MS calcd for $C_{19}H_{19}F_2N_4O_2$ $[M+H]^+$ 373.1471, found 373.1468.

N-(2-((3-(二氟甲基)-1-甲基-1*H*-吡唑-5-基)氨基)苯基)-4-甲氧基苯甲酰胺(**39**): 白色固体, 产率 89%. m.p. 156.3~158.1 °C; 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.76 (s, 1H, NH), 7.98 (d, $J=8.76$ Hz, 2H), 7.53 (s, 1H, NH), 7.37 (d, $J=7.79$ Hz, 1H), 7.14 (t, $J=7.71$ Hz, 1H), 7.05 (d, $J=8.82$ Hz, 2H), 6.96~6.72 (m, 3H), 6.12 (s, 1H), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 3.64 (s, 3H, NCH₃); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 165.4, 161.9, 144.1 (d, $J=28.4$ Hz), 142.7, 138.9, 129.8 (2C), 127.4, 126.7, 126.6, 126.5, 120.3, 116.1, 113.4 (2C), 111.7 (t, $J=231.4$ Hz), 93.8, 55.4, 35.3; HR-ESI-MS calcd for $C_{19}H_{19}F_2N_4O_2$ $[M+H]^+$ 373.1471, found 373.1468.

3.3 生物活性测试

供试真菌: 油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*), 苹果腐烂病菌(*Valsa mali*), 玉米弯孢病菌(*Curvularia lunata*(Walk)Boed), 葡萄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)和烟草赤星病菌(*Alternaria alternariae*), 均为西北农林科技大学植物保护学院保存和提供。

3.3.1 杀菌活性初筛

本试验采用菌丝生长速率法测定^[18]. 试验药剂为目标化合物 **8**~**39**, 对照药剂为氟唑菌酰胺和先导化合物 **5IIc**. 称取 7.5 mg 待测化合物溶解于 1 mL 二甲基亚砜中, 配置成 7500 mg/L 的药液, 加入到已灭菌冷却至 50 °C 的马铃薯葡萄糖琼脂培养基中, 充分混匀后, 定容至 150 mL, 制备成浓度为 50 mg/L 的含药培养基, 然后将其倒入直径为 90 mm 的培养皿, 三个平行. 待培养基冷却凝固后, 在无菌条件下将活化好的 5 种病原真菌在超净实验台上用直径 5 mm 的打孔器打孔, 切取菌饼, 用接种针将菌饼接种于冷却后的含药培养基的中央, 盖上皿盖倒置于 25 °C 培养箱中培养, 待空白对照菌落长至接近 2/3 培养皿直径时, 以十字交叉法测量处理过的各菌落直径, 试验结果根据以下公式进行计算.

菌丝生长抑制率(%)=(对照菌落直径-处理菌落直径)/(对照菌落直径-菌饼直径)×100%

3.3.2 杀菌活性复筛

对于初筛活性较好的化合物测定其 EC_{50} 值. 根据菌丝生长抑制率进行机率值(y)与质量浓度对数(x)之间的线性回归关系, 计算药剂的毒力回归方程 $y=a+bx$, 抑制中浓度(EC_{50})及相关系数(R^2). 测定时配制化合物的质量浓度梯度为 25、12.5、6.25、3.13、1.56 mg/L.

3.4 分子对接

为研究目标化合物抑制作用方式, 进行了分子对接研究, 方法参考杨光富^[19-21]等的研究工作, 将活性最强的目标化合物 **14** 对接到 SDH 酶的活性口袋. 琥珀酸脱氢酶的晶体结构(PDB 编号: 2fbw)来自 Protein Data Bank 数据库. 使用软件 Discovery Studio 4.0 中的 CDocker 协议进行受体和配体对接, 根据人工视觉和对接构象分布挑选最佳构象.

辅助材料(Supporting Information) 中间体 **5**、**6** 和目标化合物 **8**~**39** 的 1H NMR, ^{13}C NMR 和 HRMS 谱图. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Liu, Z.; Li, Q. X.; Song, B. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 11039.
- [2] Fisher, M. C.; Hawkins, N. J.; Sanglard, D.; Gurr, S. J. *Science* **2018**, *360*, 739.
- [3] Wang, W.; Zhang, S.; Wang, J. H.; Wu, F. R.; Wang, T.; Xu, G. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69*, 491.
- [4] Patriarca, A. *Curr. Opin. Food Sci.* **2019**, *29*, 42.
- [5] Wang, W.; Cheng, X.; Cui, X.; Xia, D. G.; Wang, Z. Q.; Lü, X. H. *Pest Manage. Sci.* **2021**, *77*, 3529.
- [6] Ishii, H.; Zhen, F.; Hu, M. J.; Li, X. P.; Schnabel, G. *Pest Manage. Sci.* **2016**, *72*, 1844.
- [7] Li, H.; Gao, M. Q.; Chen, Y.; Wang, Y. X.; Yang, G. F. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 14001.
- [8] 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*, 3965.
- [9] 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*, 1021.
- [10] 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.
- [11] Xiong, L.; Shen, Y.-Q.; Jiang, L.-N.; Zhu, X.-L.; Yang, W.-C.; Huang, W.; Yang, G.-F. *ACS Symp. Ser.* **2015**, *1204*, 175.
- [12] Bardas, G. A.; Veloukas, T.; Koutita, O.; Karaoglaniadis, G. S. *Pest Manage. Sci.* **2010**, *66*, 967.
- [13] Xiong, L.; Zhu, X.-L.; Shen, Y.-Q.; Wishwa, W. K. W. M.; Li, K.; Yang, G.-F. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *95*, 424.
- [14] Guo, X. F.; Zhao, B.; Fan, Z. J.; Yan, D. Y.; Zhang, N. L.; Wu, Q. F.; Yu, B.; Zhou, S.; Kalinina, T. A.; Belskaya, N. P. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 1647.
- [15] Jones, D. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**, *9*, 751.
- [16] Wang, W.; Wang, J. H.; Wu, F. R.; Zhou, H.; Xu, D.; Xu, G. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69*, 5746.
- [17] Katte, T. A.; Reekie, T. A.; Jorgensen, W. T.; Kassiou, M. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 4883.
- [18] Li, A.; Li, Z.; Zhao, Y.; Yao, T.; Zhao, J. *Chin. J. Org. Chem.* **2020**, *40*, 2836 (in Chinese). (李安邦, 李中珊, 赵洋, 姚婷婷, 程敬丽, 赵金浩, 有机化学, **2020**, *40*, 2836.)
- [19] Liu, H.; Xia, D. G.; Hu, R.; Wang, W.; Cheng, X.; Wang, A. L.; Zhang, Q.; Lü, X. H. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2020**, *163*, 271.
- [20] Lü, X. H.; Ren, Z. L.; Liu, P.; Li, B. X.; Li, Q. S.; Chu, M. J.; Cao, H. Q. *Pest Manage. Sci.* **2017**, *73*, 1585.
- [21] Zhu, X. L.; Xiong, L.; Li, H.; Song, X. Y.; Liu, J. J.; Yang, G. F. *ChemMedChem* **2014**, *9*, 1512.

(Cheng, F.)