

含 1,2,3,4-四氢异喹啉片段磺酰肼和酰肼类化合物的设计、合成及生物活性研究

徐欢 吴鸿飞 张晓鸣 路星星 孙腾达 齐悦
林誉凡 杨新玲 张莉 凌云*

(中国农业大学理学院 应用化学系 北京 100193)

摘要 为了发现以漆酶作为潜在靶标的农用杀菌剂候选化合物,以天然产物四氢异喹啉衍生物 4-甲基-*N'*-(1,2,3,4-四氢异喹啉-1-硫代羰基)苯磺酰肼(**4bg**)为先导,引入活性片段 1,2,3,4-四氢异喹啉,设计合成了 14 个未见文献报道的磺酰肼类和 9 个酰肼类化合物。目标物结构均经过 ^1H NMR、 ^{13}C NMR、HRMS 确证。离体抑菌活性测试结果表明,2-甲基-*N'*-(1,2,3,4-四氢异喹啉-2-碳硫酰基)苯磺酰肼(**4b**)对苹果腐烂病菌(*V. mali*)和油菜菌核病菌(*S. sclerotiorum*)均表现出显著的抑菌活性,EC₅₀ 分别为 4.81, 1.57 $\mu\text{g/mL}$, 优于先导化合物 **4bg**。同时,5-甲基-*N'*-(1,2,3,4-四氢异喹啉-2-碳硫酰基)吡嗪-2-甲酰肼(**5i**)对苹果腐烂病菌、油菜菌核病菌、番茄灰霉病菌(*B. cinerea*)、稻瘟病菌(*M. oryzae*)、小麦赤霉病菌(*F. graminearum*)均表现较好的抑菌活性(EC₅₀=12.88~28.65 $\mu\text{g/mL}$)。此外,在 50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下,化合物 **4b** 和 **5i** 表现出一定的漆酶抑制活性(37.07%, 35.49%),与阳性对照半胱氨酸(43.10%)相当。通过分子对接的方法分析了化合物 **4b** 和 **5i** 与漆酶蛋白的结合模式,为化合物进一步改造提供参考。

关键词 漆酶抑制剂; 1,2,3,4-四氢异喹啉; (磺)酰肼类; 抑菌活性; 分子对接

Design, Synthesis and Bioactivity of Sulfonyl Hydrazides and Hydrazides Containing Fragment 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline

Xu, Huan Wu, Hongfei Zhang, Xiaoming Lu, Xingxing Sun, Tengda Qi, Yue
Lin, Yufan Yang, Xinling Zhang, Li Ling, Yun*

(Department of Applied Chemistry, College of Science, China Agricultural University, Beijing 100193)

Abstract In order to find agricultural fungicide candidates with laccase as potential target, 14 unreported sulfonyl hydrazide and 9 hydrazide derivatives were designed and synthesized by replacing tetrahydroquinoline skeleton of the lead compound 4-methyl-*N'*-(1,2,3,4-tetrahydroquinoline-1-carbonothioyl)benzenesulfonylhydrazide (**4bg**) with active fragment 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline. The structures of the target compounds were confirmed by ^1H NMR, ^{13}C NMR and HRMS. The *in vitro* bioassay showed that 2-methyl-*N'*-(1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-2-carbonothioyl)benzenesulfonylhydrazide (**4b**) showed excellent fungicidal activity against *V. Mali* and *S. sclerotiorum* with EC₅₀ values of 4.81 and 1.57 $\mu\text{g/mL}$, respectively, which were better than that of lead compound **4bg**. In addition, 5-methyl-*N'*-(1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-2-carbonothioyl)pyrazine-2-carbohydrazide (**5i**) showed good broad-spectrum fungicidal activity against *V. Mali*, *S. sclerotiorum*, *B. cinerea*, *M. oryzae* and *F. graminearum* with EC₅₀ range of 12.88~28.65 $\mu\text{g/mL}$. Moreover, compounds **4b** and **5i** exhibited moderate laccase inhibitory activity (37.07%, 35.49%), which were similar to that of cysteine (43.10%) at 50 $\mu\text{g/mL}$. Furthermore, the binding modes of compounds **4b** and **5i** with laccase protein were simulated by molecular docking method, which provided guidance for further modification of compounds.

Keywords laccase inhibitor; 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline; (sulfonyl) hydrazide; fungicidal activity; molecular docking

化学杀菌剂是解决植物病原真菌感染多发、频发、重发有效的方法。但近年来,各类化学杀菌剂的不合理

施用导致“3R” (Resistance, Resurgence, Residue)问题逐渐加剧。因此,开发具有易于生物降解的天然单元和新

* Corresponding author. E-mail: lyun@cau.edu.cn

Received July 28, 2022; revised August 18, 2022; published online October 10, 2022.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 22077137, 21472236).

国家自然科学基金(Nos. 22077137, 21472236)资助项目。

颖作用模式的新型生态友好型杀菌剂是农业的必要需求^[1-2]。

漆酶(Laccase, EC 1.10.3.2)是一种含铜多酚氧化酶,广泛分布于多种植物病原真菌中,参与众多生理过程,包括色素合成、植物发病机制、防御反应、真菌形态形成以及木质素降解^[3-4]。抑制漆酶活性将导致真菌的异常生长或侵染能力下降,从而保护植物免受真菌的伤害。漆酶蛋白结构包含肽链、糖配基、四个铜离子反应簇,其晶体结构的解析为漆酶抑制剂的深入研究奠定了基础^[5]。当前已报道的漆酶抑制剂主要分为两类:(1)无机化合物:金属螯合剂、金属离子、卤素离子等^[6-8];(2)有机化合物:短醇^[9]、胍腈^[10-11]、缩氨基硫脲类^[12]等。这些抑制剂可通过螯合铜原子、修饰氨基酸残基、改变糖蛋白构象或与底物竞争性结合等方式影响漆酶活性。目前,漆酶作为农用杀菌剂潜在靶标引起了广泛研究,但尚未有农用商品化漆酶抑制剂的报道。本课题组前期以漆酶为靶标进行化合物设计与合成,发现4-氯肉桂醛衍生物(PMDD-5Y)是潜在的漆酶抑制剂^[12]。其中 Zhang 等^[13]以 PMDD-5Y 为先导,引入天然产物四氢喹啉片段,发现了具有更高漆酶抑制活性的化合物 **4bg**。该化合物对多种植物病原真菌呈现较好的杀菌活性,值得进一步修饰改造。

1,2,3,4-四氢异喹啉(THIQ)是一个重要的结构单元,存在于许多天然生物碱、生物活性分子和药物中。基于 THIQ 的天然产物和合成化合物具有抗利什曼原虫、抗真菌、抗病毒、抗癌、抗疟疾等多种生物活性(图 1)^[14-15]。同时,它可以针对许多神经元单位治疗神经退行性疾病和其他神经元疾病^[16-17]。因此,可以将 THIQ 作为活性较好的药效团引入农药分子设计中,以期增强其生物活性。

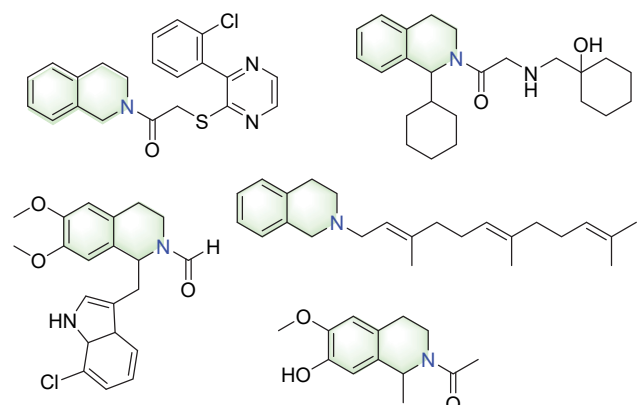
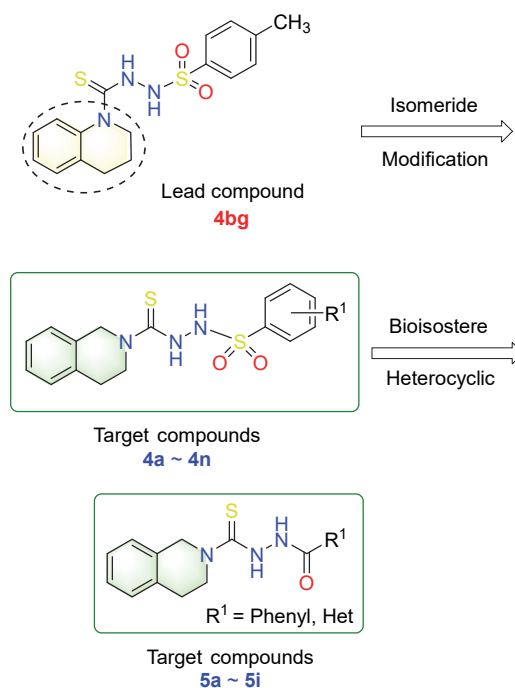


图 1 含有 1,2,3,4-四氢异喹啉片段的医用高活性化合物
Figure 1 Medical highly active compounds containing 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline fragment

为了进一步探索发现具有更高漆酶抑制活性和杀菌活性的化合物,本文以 **4bg** 为先导化合物,以其同分

异构体四氢异喹啉片段替换 **4bg** 结构中的四氢喹啉片段,设计合成化合物 **4a~4n**。之后,采用生物电子等排的方法将其磺酰肼片段替代为不同(杂)芳基取代的酰肼片段,设计合成了化合物 **5a~5i**,并对所合成的目标化合物进行生物活性测定和构效关系分析。目标化合物的设计思路如 Scheme 1 所示。



图式 1 目标化合物的设计思想

Scheme 1 Design strategy of the target compounds

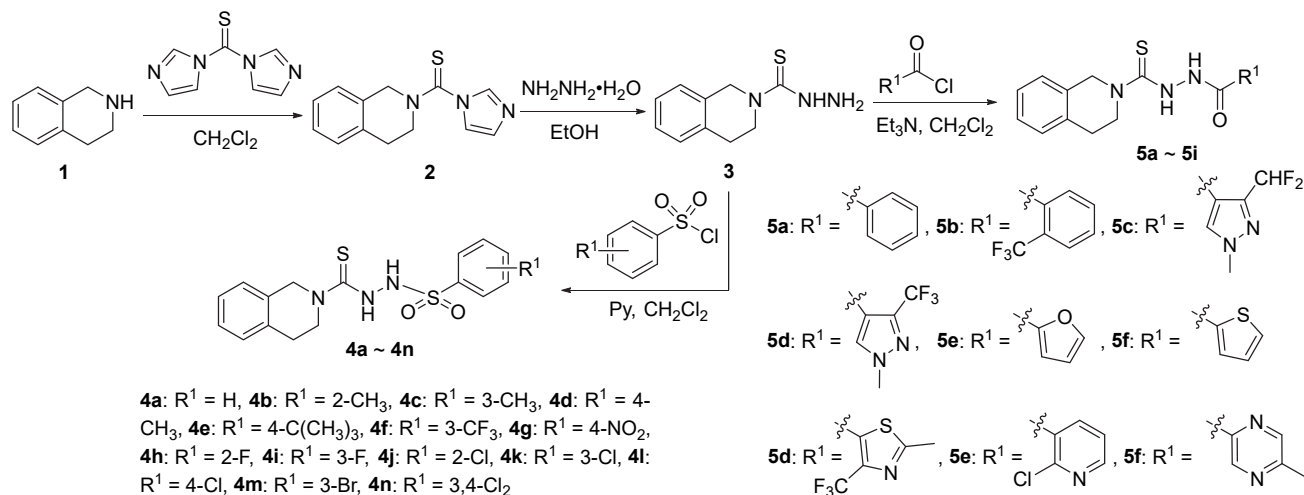
1 结果与讨论

1.1 目标化合物的合成

中间体及目标化合物的合成路线如 Scheme 2 所示,以 1,2,3,4-四氢异喹啉、*N,N'*-硫羰基二咪唑为起始原料,通过亲核取代反应制得中间体 **2**;中间体 **2** 在 80%水合肼作用下,肼解为关键中间体 **3**;中间体 **3** 与含不同取代基的苯磺酰氯发生磺酰化反应,生成磺酰肼类目标化合物 **4a~4n**;与各种(杂)芳基酰氯发生亲核加成-消除反应,生成酰肼类目标化合物 **5a~5i**。

1.2 谱图解析

目标化合物结构均通过 ¹H NMR、¹³C NMR 和 HRMS 确证。根据 ¹H NMR 图谱显示,目标化合物氢原子信号峰大致分为三类。以化合物 **5f** 为例进行解析,第一类是肼上的两个活泼氢,化学位移为 δ 10.46 和 9.73,处于谱图最低场区域,均显示为单峰;第二类是芳基氢,包括四氢异喹啉芳环部分氢原子和噻吩环上的氢原子,化学位移为 δ 7.18~7.91,噻吩环上的氢原子由于受 S 原子的影响,化学位移向低场移动;第三类是四氢异喹



图式 2 目标化合物的合成路线

Scheme 2 Synthetic route of target compounds

啉饱和环上烷基氢, 化学位移分别为 δ 5.02, 3.99~4.02 和 2.91~2.93, 处于谱图最高场区域, 显示为单峰和两个三重峰, 偶合常数均为 5.90 Hz. 在 ^{13}C NMR 图谱中, 同样也可以将目标化合物碳原子信号峰分为三类. 处于最低场区域的是硫羰基碳和羰基碳, 化学位移分别为 δ 184.0 和 161.1; 处于较低场区域为芳环上的不饱和碳, 化学位移为 δ 126.7~138.3; 处于高场区域为四氢异喹啉饱和环上的烷基碳, 化学位移分别为 δ 28.4, 46.4, 50.6; 在 HRMS 图谱中, 目标化合物的 HRMS $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的测量值与理论值一致, 均在误差允许范围内, 进一步确证了化合物的结构.

1.3 目标化合物 5f 的晶体结构

为进一步确证目标化合物的晶体结构, 采用乙醇溶剂简单挥发法对目标化合物 **5f** 进行了 X 射线单晶衍射分析 (CCDC 号为 2181227), 化合物 **5f** 的晶体结构如图 2 所示. 该分子结构含有四氢异喹啉骨架、酰肼和噻吩环. 其晶体最小结构单元为两个分子呈反向平行排列, 具体的单晶数据参数在辅助材料中有详细说明.

1.4 离体抑菌活性

目标化合物对 8 种植物病原菌的初步离体抑菌活性结果表明, 在 50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下, 化合物 **4** 对多种病原菌均表现出一定的抑菌活性. 其中, 化合物 **4d** 对于供试的 6 种病原菌的抑制率均在 50% 以上, 与先导化合物 **4bg** 效果相当, 表明四氢异喹啉片段的引入可展现与四氢喹啉片段相当的抑菌效果. 化合物 **4** 对苹果腐烂病菌、油菜菌核病菌两种病原菌的抑制效果较为显著; 化合物 **4b**, **4c**, **4d**, **4e**, **4f**, **4k** 对苹果腐烂病菌的抑制活性均超过 80%, 化合物 **4b**, **4c**, **4d**, **4k** 对油菜菌核病菌的抑制活性也均在 80% 左右. 除此之外, 大部分化合物对瓜

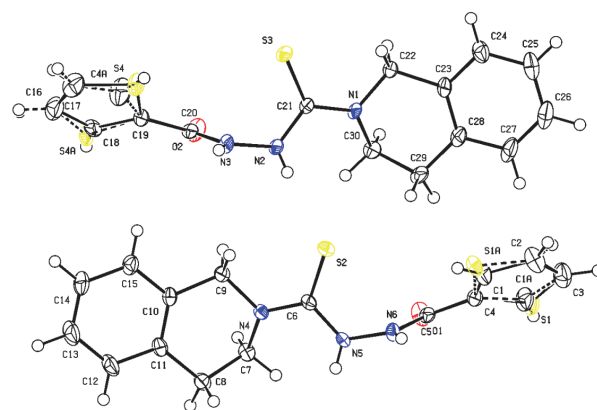


图 2 化合物 5f 的晶体结构图

Figure 2 Crystal structure of compound 5f

果腐霉菌表现出中等抑菌活性, 化合物 **4c**, **4d**, **4l** 对瓜果腐霉菌的抑制活性分别为 74.41%, 75.70%, 76.67%, 优于对照药剂丙硫菌唑 (57.77%). 进一步分析构效关系表明, 在化合物 **4** 中引入给电子基 ($R^1 = \text{CH}_3$) 后整体抑菌活性优于强吸电子基 ($R^1 = \text{NO}_2$); 当 $R^1 = \text{Cl}$ 时, 整体抑菌活性呈现间位 > 对位 > 邻位的规律, 即 **4k** > **4l** > **4j**. 将磺酰肼替换为酰肼片段后 (化合物 **5**), 整体抑菌活性与化合物 **4** 无明显差别. 不同杂环对抑菌活性影响较大. 其中, 当 R^1 为无取代苯环 (**5a**)、噻吩环 (**5f**)、吡嗪环 (**5i**) 时整体抑菌活性较好, 对供试的 8 种病原菌在 50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下的抑制率均超过 50%. 尤其是 R^1 为吡嗪环时, 化合物 **5i** 展现优异且广谱的抑菌活性, 对多种病原菌的抑制率接近 100%, 与对照药剂丙硫菌唑相当.

进一步选择活性较好的化合物进行 EC_{50} 测试 (表 2) 结果表明: 化合物 **4b**, **4c**, **4d** 对苹果腐烂病菌、油菜菌核病菌均有着较好的抑制效果, $\text{EC}_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$, 优于先导化合物 **4bg**, 其中化合物 **4b** 活性最佳. 化合物 **5a**,

表 1 目标化合物的离体抑菌活性(50 $\mu\text{g/mL}$, 抑制率/%)
Table 1 Fungicidal activity *in vitro* of the target compounds (50 $\mu\text{g/mL}$, inhibition rate/%)

Compd.	<i>V. mali</i>	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>R. solani</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>M. grisea</i>	<i>P. aphanidermatum</i>	<i>P. capsici</i>
4a	70.17 $\pm$ 1.30	56.89 $\pm$ 4.97	31.47 $\pm$ 0.00	25.86 $\pm$ 2.17	33.33 $\pm$ 0.00	36.95 $\pm$ 0.00	45.57 $\pm$ 0.71	35.22 $\pm$ 0.50
4b	80.98 $\pm$ 1.22	79.22 $\pm$ 3.42	46.70 $\pm$ 0.00	29.31 $\pm$ 2.17	38.33 $\pm$ 1.00	38.98 $\pm$ 0.00	63.07 $\pm$ 1.12	37.71 $\pm$ 0.83
4c	87.03 $\pm$ 0.50	80.44 $\pm$ 1.22	58.50 $\pm$ 2.77	41.38 $\pm$ 2.50	53.75 $\pm$ 2.28	43.05 $\pm$ 0.71	74.41 $\pm$ 0.43	61.13 $\pm$ 0.50
4d	88.33 $\pm$ 1.30	79.33 $\pm$ 2.28	50.51 $\pm$ 1.50	15.86 $\pm$ 1.00	50.00 $\pm$ 0.00	42.54 $\pm$ 1.30	75.70 $\pm$ 0.83	57.14 $\pm$ 0.87
4e	98.27 $\pm$ 1.00	69.78 $\pm$ 1.87	34.52 $\pm$ 0.00	32.76 $\pm$ 2.17	55.00 $\pm$ 2.12	38.98 $\pm$ 0.00	50.76 $\pm$ 0.71	48.67 $\pm$ 1.09
4f	80.98 $\pm$ 1.00	68.44 $\pm$ 0.71	58.12 $\pm$ 1.80	15.52 $\pm$ 2.17	43.75 $\pm$ 0.83	24.24 $\pm$ 1.48	67.93 $\pm$ 0.83	45.18 $\pm$ 2.50
4g	48.13 $\pm$ 0.00	70.22 $\pm$ 1.30	17.39 $\pm$ 1.30	35.52 $\pm$ 2.05	14.17 $\pm$ 0.87	13.56 $\pm$ 2.50	44.92 $\pm$ 1.12	27.74 $\pm$ 1.30
4h	69.31 $\pm$ 0.43	61.33 $\pm$ 0.83	25.00 $\pm$ 1.30	29.31 $\pm$ 1.30	23.33 $\pm$ 1.00	28.81 $\pm$ 1.58	44.28 $\pm$ 0.71	19.77 $\pm$ 1.09
4i	68.88 $\pm$ 1.41	76.00 $\pm$ 1.50	34.52 $\pm$ 0.00	26.55 $\pm$ 2.05	30.83 $\pm$ 1.50	25.25 $\pm$ 2.28	69.22 $\pm$ 0.43	44.19 $\pm$ 0.00
4j	40.35 $\pm$ 0.87	77.44 $\pm$ 1.48	20.43 $\pm$ 0.43	43.79 $\pm$ 1.30	24.17 $\pm$ 0.87	0	18.36 $\pm$ 1.58	16.28 $\pm$ 0.71
4k	86.60 $\pm$ 1.79	80.78 $\pm$ 2.50	50.89 $\pm$ 0.83	26.90 $\pm$ 2.50	43.75 $\pm$ 1.30	35.42 $\pm$ 0.83	68.90 $\pm$ 0.71	66.11 $\pm$ 1.22
4l	67.15 $\pm$ 1.22	69.78 $\pm$ 3.08	32.23 $\pm$ 1.12	10.34 $\pm$ 0.00	34.17 $\pm$ 1.66	32.88 $\pm$ 2.00	76.67 $\pm$ 0.71	64.12 $\pm$ 0.71
4m	67.15 $\pm$ 1.22	60.00 $\pm$ 2.50	26.52 $\pm$ 0.83	34.48 $\pm$ 1.80	43.33 $\pm$ 0.00	50.68 $\pm$ 0.83	57.24 $\pm$ 1.58	53.16 $\pm$ 0.87
4n	79.25 $\pm$ 0.00	77.78 $\pm$ 3.57	34.52 $\pm$ 2.00	17.24 $\pm$ 0.00	42.08 $\pm$ 0.83	25.76 $\pm$ 3.57	58.53 $\pm$ 1.41	44.68 $\pm$ 1.48
5a	93.81 $\pm$ 0.00	100	86.48 $\pm$ 1.30	66.04 $\pm$ 1.79	58.02 $\pm$ 0.83	80.95 $\pm$ 0.00	67.09 $\pm$ 1.92	49.77 $\pm$ 0.71
5b	67.01 $\pm$ 0.71	66.82 $\pm$ 2.5	54.65 $\pm$ 1.22	41.04 $\pm$ 2.87	58.02 $\pm$ 0.83	59.05 $\pm$ 0.50	17.95 $\pm$ 0.00	35.81 $\pm$ 0.50
5c	58.96 $\pm$ 0.43	39.74 $\pm$ 0.87	16.42 $\pm$ 1.80	9.58 $\pm$ 2.86	25.38 $\pm$ 0.50	33.73 $\pm$ 1.22	19.42 $\pm$ 0.50	33.10 $\pm$ 0.83
5d	77.36 $\pm$ 0.00	58.52 $\pm$ 0.83	30.06 $\pm$ 3.27	12.92 $\pm$ 3.70	30.00 $\pm$ 1.66	37.31 $\pm$ 0.00	27.67 $\pm$ 0.43	50.99 $\pm$ 0.43
5e	56.70 $\pm$ 0.71	43.60 $\pm$ 1.09	33.72 $\pm$ 1.22	44.03 $\pm$ 2.50	33.15 $\pm$ 1.00	57.14 $\pm$ 0.50	20.94 $\pm$ 0.43	35.81 $\pm$ 0.50
5f	79.97 $\pm$ 0.50	59.72 $\pm$ 1.30	60.76 $\pm$ 0.87	65.3 $\pm$ 2.05	49.05 $\pm$ 0.83	78.57 $\pm$ 1.30	61.11 $\pm$ 0.43	54.88 $\pm$ 0.83
5g	77.04 $\pm$ 0.50	68.12 $\pm$ 1.09	39.55 $\pm$ 2.05	52.84 $\pm$ 1.30	36.65 $\pm$ 0.00	42.61 $\pm$ 1.00	27.75 $\pm$ 1.92	68.12 $\pm$ 1.09
5h	57.22 $\pm$ 1.30	53.55 $\pm$ 0.87	32.41 $\pm$ 1.09	38.43 $\pm$ 1.30	38.45 $\pm$ 0.43	50.95 $\pm$ 0.83	14.96 $\pm$ 0.43	50.70 $\pm$ 0.50
5i	100	100	100	67.54 $\pm$ 2.38	97.15 $\pm$ 0.43	82.86 $\pm$ 0.87	50.43 $\pm$ 1.00	71.63 $\pm$ 1.09
4bg	88.40 $\pm$ 0.50	92.70 $\pm$ 1.00	— ^a	71.70 $\pm$ 0.80	59.30 $\pm$ 1.00	39.70 $\pm$ 0.40	43.10 $\pm$ 1.00	47.10 $\pm$ 3.60
丙硫菌唑	100	100	93.84 $\pm$ 0.50	94.58 $\pm$ 2.86	100	100	57.77 $\pm$ 1.48	66.76 $\pm$ 1.12

^a —: Not determined.

5i 对苹果腐烂病菌(EC_{50} =14.81, 13.06 $\mu\text{g/mL}$)、油菜菌核病菌(EC_{50} =18.61, 12.88 $\mu\text{g/mL}$)、番茄灰霉病菌(EC_{50} =12.59, 22.37 $\mu\text{g/mL}$)、稻瘟病菌(EC_{50} =15.71, 26.84 $\mu\text{g/mL}$)均表现较好抑制活性。除此之外, 化合物 **5i** 对小麦赤霉病菌(EC_{50} =28.65 $\mu\text{g/mL}$)也表现出一定的抑菌活性。初步推测, 磺酰脲基片段对苹果腐烂病菌和油菜菌核病菌体现出一定的特效性, 而部分(杂)芳基磺酰脲基片段的引入对供试植物病原菌呈现广谱性, 为进一步结构优化指明了方向。

1.5 漆酶抑制活性

参考 Zhang 等^[13]采用动力学法测漆酶活性, 测定了高活性化合物 **4b**, **4d**, **5a**, **5i** 对真菌漆酶的抑制活性。活性测试结果(表 3)表明, 具有较好抑菌活性的目标化合物均表现出一定漆酶抑制活性, 在 100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下抑制率均超过 50%, 与先导化合物 **4bg** 相当, 但不及阳性对照半胱氨酸(Cys)。然而, 当测试浓度降低至 50 $\mu\text{g/mL}$ 时, 目标化合物的漆酶抑制活性下降幅度较小, 抑制率为 37.07%~50.24%, 与半胱氨酸(43.10%)相当。

1.6 分子对接

基于以上研究发现, 化合物 **4b** 和 **5i** 均具有较好的抑菌活性和一定的漆酶抑制活性, 因此, 为了进一步分

析高抑菌活性化合物 **4b**, **5i** 与漆酶蛋白的结合模式, 采用分子对接的方法对其进行了探究。结果表明, 这两个化合物与先导化合物相似的结合构象嵌入活性口袋中。进一步分析化合物与漆酶蛋白活性口袋处氨基酸残基的结合情况(图 3)可以看出, 化合物 **4b** 与 **5i** 的硫羰基中的硫原子均与 Phe162, Leu164, His458 形成氢键作用, 与先导化合物 **4bg** 相似, 这可能是两个化合物均具有一定漆酶抑制活性的原因。此外, 化合物 **4b** 脲基中的氮原子与 Phe265 形成 H- π 相互作用, 磺酰基中的氧原子与 Gly392 形成氢键作用, 化合物 **5i** 与 Asp206 形成氢键作用, 这可能是导致漆酶抑制活性略有差别的原因之一。相比于先导化合物 **4bg**, 化合物 **4b**, **5i** 未与 Pro391 形成 H- π 相互作用, 后续化合物设计中增加与 Pro391 相互作用可能更有利于漆酶抑制活性。

2 结论

本文在前期研究工作的基础上, 对天然产物四氢喹啉衍生物 **4bg** 进行结构优化, 以其同分异构体四氢异喹啉代替四氢喹啉片段, 设计合成 14 个未见文献报道的磺酰脲基化合物 **4**, 在此基础上, 引入不同(杂)芳基磺酰脲基, 设计合成 9 个未见文献报道的磺酰脲基化合物 **5**。所

表2 目标化合物对五种植物病原菌的 EC₅₀ 值
Table 2 EC₅₀ of target compounds against five phytopathogenic fungi

测试菌株	化合物	EC ₅₀ /(μg·mL ⁻¹)	95%置信区间	毒力回归方程	r
<i>V. mali</i>	4b	4.81	3.27~7.14	$y = -1.05 + 1.62x$	0.96
	4c	4.50	3.77~5.34	$y = -0.94 + 1.47x$	0.98
	4d	4.90	3.24~7.23	$y = -0.88 + 1.41x$	0.98
	4e	7.32	5.98~9.01	$y = -1.01 + 1.17x$	0.99
	4f	6.44	4.97~8.23	$y = -0.89 + 1.10x$	0.99
	4k	5.54	4.58~6.77	$y = -0.98 + 1.33x$	0.98
	5a	14.81	11.75~20.07	$y = -1.60 + 1.38x$	0.98
	5i	13.06	10.39~18.33	$y = -2.12 + 1.89x$	0.99
	4bg	9.67	7.39~12.70	$y = -4.05 + 3.92x$	0.98
	丙硫菌唑	0.13	0.05~0.36	$y = 1.29 + 1.46x$	0.95
<i>S. sclerotiorum</i>	4b	1.57	0.52~2.72	$y = -0.24 + 0.99x$	0.94
	4c	8.04	5.39~11.13	$y = -0.83 + 0.92x$	0.96
	4d	7.58	5.54~10.53	$y = -0.68 + 0.78x$	0.98
	4k	13.03	10.90~15.60	$y = -2.05 + 1.84x$	0.99
	5a	18.61	15.15~24.33	$y = -2.09 + 1.64x$	0.96
	5i	12.88	10.79~14.64	$y = -4.36 + 3.90x$	0.99
	4bg	13.69	8.21~23.63	$y = -3.09 + 2.79x$	0.97
	丙硫菌唑	0.15	0.11~0.20	$y = 1.29 + 1.51x$	0.99
<i>B. cinerea</i>	5a	12.59	10.62~14.95	$y = -1.83 + 1.67x$	0.98
	5i	22.37	16.41~35.00	$y = -1.58 + 1.18x$	0.98
	丙硫菌唑	4.90	3.52~7.09	$y = -0.59 + 0.85x$	0.99
<i>M. grisea</i>	5a	15.71	13.20~19.55	$y = -2.38 + 1.99x$	0.97
	5i	26.84	20.70~38.58	$y = -2.29 + 1.58x$	0.98
	丙硫菌唑	3.61	2.72~4.85	$y = -0.59 + 1.04x$	0.99
<i>F. graminearum</i>	5i	28.65	20.71~46.88	$y = -1.82 + 1.24x$	0.98
	丙硫菌唑	1.52	1.09~2.14	$y = -0.13 + 0.79x$	0.98

表3 部分化合物对漆酶的抑制活性
Table 3 Inhibition rate of some compounds on laccase

Compd.	Inhibition rate/%	
	100 μg/mL	50 μg/mL
4b	58.37	37.07
4d	62.38	50.24
5a	62.00	47.45
5i	50.14	35.49
4bg	72.30	52.40
Cys	94.45	43.10

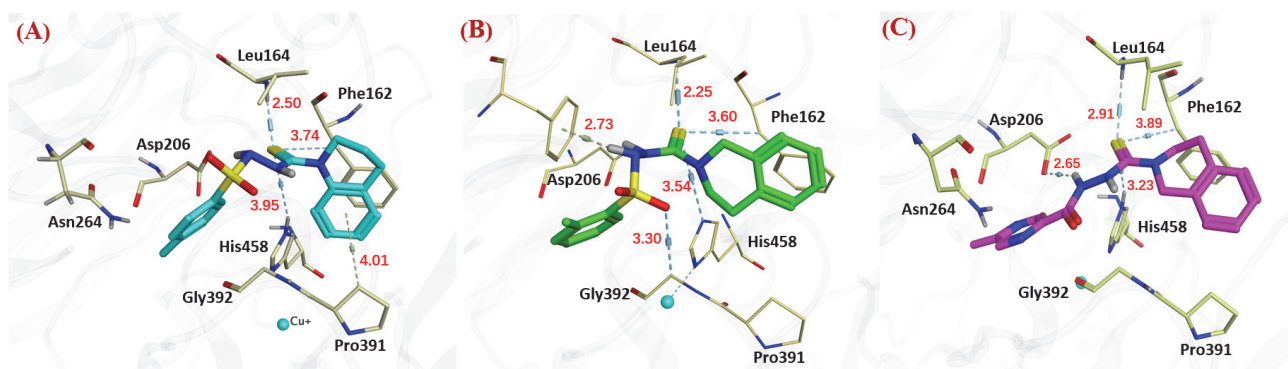


图3 先导化合物 4bg (A)、化合物 4b (B) 和 5i (C) 与漆酶蛋白的结合模式
Figure 3 Binding mode of lead compound 4bg (A), compounds 4b (B) and 5i (C) with laccase protein

有化合物结构经过 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 和 HRMS 的确证。生物活性研究表明, 引入四氢异喹啉环后化合物体现与先导化合物 **4bg** 相当的生物活性。通过离体杀菌构效关系分析发现, 化合物 **4** 在 R^1 上引入给电子取代基甲基对抑菌活性有利。其中, 化合物 **4b** 对苹果腐烂病菌、油菜菌核病菌均有着较好的抑制效果, EC_{50} 分别为 4.81, 1.57 $\mu\text{g/mL}$ 。化合物 **5** 引入(杂)芳基酰肼后, 部分化合物对供试植物病原菌呈现广谱性, 其中化合物 **5i** 抑菌活性最突出, 对多种病原菌 EC_{50} 在 12.88~28.65 $\mu\text{g/mL}$ 之间。同时漆酶活性测定表明, 化合物 **4b** 和 **5i** 在 50 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度下, 对漆酶的抑制活性为 37.07%, 35.49%, 与阳性对照 Cys 相当。分子对接表明, 化合物 **4b** 和 **5i** 与靶标蛋白之间均存在较强的亲和力。本研究可为以漆酶为潜在靶标化学杀菌剂的研发提供参考。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

X-4 精密显微熔点测定仪; Bruker Advance NEO; 500MHz 核磁共振波谱仪[以 TMS 为内标, 二甲基亚砜(DMSO)为溶剂]; Agilent LC1200/MS Q-TOF6520 液质联用仪; Bruker D8 Venture 单晶衍射仪; Multiskan SkyHigh 全波长酶标仪。实验中试剂均为市售分析纯或化学纯试剂, 除特别注明外, 所用溶剂未经无水处理。

3.2 实验方法

3.2.1 中间体的制备

中间体 **2** 和关键中间体 **3** 参考文献的方法制备^[18-19], 表征数据如下。

(3,4-二氢异喹啉-1(2H)-基)(1H-咪唑-1-基)甲硫酮(**2**): ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.10 (s, 1H), 7.59 (t, $J=1.2$ Hz, 1H), 7.41~7.12 (m, 4H), 7.07 (s, 1H), 5.18~4.77 (m, 2H), 3.96 (d, $J=104.2$ Hz, 2H), 3.14~2.95 (m, 2H)。

3,4-二氢异喹啉-1(2H)-硫代甲酰肼(**3**): ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 9.07 (s, 1H), 7.25~7.08 (m, 4H), 4.86 (s, 2H), 4.75 (s, 2H), 3.89 (t, $J=6.0$ Hz, 2H), 2.84 (t, $J=5.9$ Hz, 2H)。

3.2.2 目标化合物的制备

以 N' -(1,2,3,4-四氢异喹啉-2-碳硫酰基)苯磺酰肼(**4a**)为例, 在 50 mL 单口瓶中, 依次加入中间体 **3** (2.50 mmol), 8 mL 二氯甲烷, 吡啶(2.75 mmol), 室温搅拌。在冰浴下向体系中滴加苯磺酰氯(2.75 mmol), 30 min 后撤去冰浴, 室温搅拌 4 h, 薄层色谱(TLC)监测至反应完毕。反应完成后, 体系用质量分数为 10% 的 HCl 水溶液洗涤两次, 饱和 NaCl 水溶液洗涤一次, 合并有机相, 减压脱

溶后, 柱层析纯化, 干燥, 即得目标化合物 **4a** 0.35 g, 白色固体, 收率 40.3%。m.p. 131.8~133.6 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.08 (s, 1H), 9.20 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.79 (d, $J=7.6$ Hz, 2H), 7.62 (t, $J=7.4$ Hz, 1H), 7.42 (t, $J=7.6$ Hz, 2H), 7.29~7.21 (m, 4H), 4.84 (s, 2H), 3.86 (t, $J=5.9$ Hz, 2H), 2.82 (t, $J=5.7$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 183.4, 137.2, 135.2, 133.8, 133.2, 129.1, 128.8, 128.6, 127.3, 126.8, 126.7, 50.7, 46.8, 28.1; HRMS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 348.0840, found 348.0838。

同法制得其余化合物 **4b~4n**, 用三乙胺代替吡啶制得化合物 **5a~5i**, 相关理化数据及结构鉴定数据如下。

2-甲基- N' -(1,2,3,4-四氢异喹啉-2-碳硫酰基)苯磺酰肼(**4b**): 黄色固体, 收率 65.5%。m.p. 146.0~147.5 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 9.91 (s, 1H), 9.26 (s, 1H), 7.73 (d, $J=7.7$ Hz, 1H), 7.44 (td, $J=7.5, 1.0$ Hz, 1H), 7.29 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.22~7.09 (m, 5H), 4.77 (s, 2H), 3.79 (t, $J=5.9$ Hz, 2H), 2.75 (t, $J=5.8$ Hz, 2H), 2.65 (s, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 183.5, 138.8, 136.0, 135.2, 133.7, 133.3, 132.9, 130.9, 128.6, 127.3, 126.8, 126.6, 126.1, 50.6, 46.7, 28.1, 21.3; HRMS calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 362.0997, found 362.0994。

3-甲基- N' -(1,2,3,4-四氢异喹啉-2-碳硫酰基)苯磺酰肼(**4c**): 黄色固体, 收率 64.4%。m.p. 130.0~131.6 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.04 (d, $J=3.9$ Hz, 1H), 9.09 (d, $J=4.0$ Hz, 1H), 7.56~7.50 (m, 2H), 7.37 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.28~7.16 (m, 5H), 4.79 (s, 2H), 3.82 (t, $J=5.9$ Hz, 2H), 2.76 (t, $J=5.8$ Hz, 2H), 2.16 (s, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 183.4, 138.8, 137.0, 135.2, 134.4, 133.2, 129.0, 129.0, 128.6, 127.3, 126.8, 126.6, 126.0, 50.6, 46.8, 28.1, 20.9; HRMS calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 362.0997, found 362.0992。

4-甲基- N' -(1,2,3,4-四氢异喹啉-2-碳硫酰基)苯磺酰肼(**4d**): 黄色固体, 收率 81.5%。m.p. 123.2~125.2 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.03 (d, $J=4.0$ Hz, 1H), 9.04 (d, $J=4.1$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.25~7.16 (m, 4H), 7.09 (d, $J=7.8$ Hz, 2H), 4.78 (s, 2H), 3.81 (t, $J=5.9$ Hz, 2H), 2.73 (t, $J=5.7$ Hz, 2H), 2.27 (s, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 183.4, 144.2, 135.2, 134.0, 133.2, 129.5, 128.9, 128.6, 127.3, 126.8, 126.6, 50.7, 46.8, 27.9, 21.5; HRMS calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 362.0997, found 362.0991。

4-叔丁基- N' -(1,2,3,4-四氢异喹啉-2-碳硫酰基)苯磺酰肼(**4e**): 灰色固体, 收率 64.5%。m.p. 170.9~172.2 $^{\circ}\text{C}$;

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.06 (s, 1H), 9.00 (s, 1H), 7.60 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 7.28 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 7.25~7.12 (m, 4H), 4.78 (s, 2H), 3.81 (t, $J=5.8$ Hz, 2H), 2.72 (t, $J=5.6$ Hz, 2H), 1.17 (s, 9H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 183.3, 156.6, 134.7, 133.5, 132.9, 128.5, 128.4, 126.9, 126.5, 126.2, 125.4, 50.4, 46.6, 34.8, 30.8, 27.4; HRMS calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 404.1466, found 404.1461.

3-三氟甲基- N' -(1,2,3,4-四氢异喹啉-2-碳硫酰基)苯磺酰肼(**4f**): 黄色固体, 收率 57.6%. m.p. 139.7~140.9 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.06 (s, 1H), 9.53 (s, 1H), 8.06~7.96 (m, 3H), 7.68~7.62 (m, 1H), 7.24~7.13 (m, 4H), 4.78 (s, 2H), 3.82 (t, $J=5.9$ Hz, 2H), 2.79 (t, $J=5.8$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 183.3, 139.0, 135.1, 133.1, 132.7, 130.7, 130.4, 130.0, 128.5, 127.3, 126.8, 125.3, 124.9, 122.7, 50.6, 46.7, 28.2; HRMS calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 416.0714, found 416.0710.

4-硝基- N' -(1,2,3,4-四氢异喹啉-2-碳硫酰基)苯磺酰肼(**4g**): 白色固体, 收率 47.6%. m.p. 158.5~159.1 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.05 (s, 1H), 9.67 (s, 1H), 8.17 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.99 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.26~7.13 (m, 4H), 4.80 (s, 2H), 3.83 (t, $J=5.9$ Hz, 2H), 2.78 (t, $J=5.7$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 183.5, 150.4, 143.8, 135.2, 133.3, 130.4, 128.6, 127.4, 126.8, 126.7, 124.3, 50.8, 46.8, 28.0; HRMS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 393.0691, found 393.0693.

2-氟- N' -(1,2,3,4-四氢异喹啉-2-碳硫酰基)苯磺酰肼(**4h**): 黄色固体, 收率 40.9%. m.p. 137.4~138.8 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.04 (s, 1H), 9.50 (s, 1H), 7.74~7.67 (m, 1H), 7.66~7.61 (m, 1H), 7.28~7.23 (m, 1H), 7.22~7.13 (m, 5H), 4.79 (s, 2H), 3.81 (t, $J=5.9$ Hz, 2H), 2.77 (t, $J=5.8$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 183.3, 159.6 (d, $J=256.0$ Hz), 136.7 (d, $J=8.5$ Hz), 135.2, 133.2, 131.5, 128.6, 127.3, 126.7 (d, $J=18.5$ Hz), 125.9 (d, $J=13.6$ Hz), 124.8 (d, $J=3.2$ Hz), 117.6 (d, $J=21.4$ Hz), 50.6, 46.7, 28.1; HRMS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{FN}_3\text{O}_2\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 366.0746, found 366.0740.

3-氟- N' -(1,2,3,4-四氢异喹啉-2-碳硫酰基)苯磺酰肼(**4i**): 灰色固体, 收率 68.4%. m.p. 142.4~144.0 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.02 (s, 1H), 9.40 (s, 1H), 7.63~7.52 (m, 2H), 7.49~7.39 (m, 2H), 7.23~7.15 (m, 4H), 4.81 (s, 2H), 3.83 (t, $J=5.9$ Hz, 2H), 2.80 (t, $J=5.8$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 183.5, 161.9 (d, $J=247.8$ Hz), 139.8 (d, $J=6.9$ Hz), 135.2, 133.2, 131.4

(d, $J=7.9$ Hz), 128.6, 127.3, 126.8, 126.7, 125.0 (d, $J=2.5$ Hz), 120.9 (d, $J=21.3$ Hz), 115.7 (d, $J=24.5$ Hz), 50.7, 46.8, 28.2; HRMS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{FN}_3\text{O}_2\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 366.0746, found 366.0743.

2-氯- N' -(1,2,3,4-四氢异喹啉-2-碳硫酰基)苯磺酰肼(**4j**): 粉色固体, 收率 57.5%. m.p. 126.1~127.8 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 9.99 (s, 1H), 9.47 (d, $J=45.1$ Hz, 1H), 7.89 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.60~7.54 (m, 2H), 7.35~7.29 (m, 1H), 7.21~7.12 (m, 4H), 4.80 (s, 2H), 3.81 (t, $J=5.9$ Hz, 2H), 2.78 (t, $J=5.8$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 183.2, 135.9, 135.2, 135.1, 133.3, 132.8, 132.4, 132.3, 128.6, 127.6, 127.3, 126.8, 126.6, 50.7, 46.7, 28.2; HRMS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{ClN}_3\text{O}_2\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 382.0450, found 382.0447.

3-氯- N' -(1,2,3,4-四氢异喹啉-2-碳硫酰基)苯磺酰肼(**4k**): 粉色固体, 收率 55.8%. m.p. 128.3~129.8 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.03 (s, 1H), 9.41 (s, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.72~7.63 (m, 2H), 7.41 (t, $J=7.9$ Hz, 1H), 7.25~7.14 (m, 4H), 4.81 (s, 2H), 3.84 (t, $J=5.9$ Hz, 2H), 2.80 (t, $J=5.8$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 183.4, 139.6, 135.2, 133.9, 133.6, 133.2, 131.1, 128.6, 128.3, 127.4, 127.3, 126.8, 126.7, 50.7, 46.8, 28.2; HRMS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{ClN}_3\text{O}_2\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 382.0450, found 382.0447.

4-氯- N' -(1,2,3,4-四氢异喹啉-2-碳硫酰基)苯磺酰肼(**4l**): 灰色固体, 收率 53.7%. m.p. 142.1~143.9 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.03 (s, 1H), 9.41 (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.77 (dd, $J=29.4, 7.8$ Hz, 2H), 7.35 (t, $J=7.9$ Hz, 1H), 7.19 (dd, $J=21.1, 6.5$ Hz, 4H), 4.81 (s, 2H), 3.84 (t, $J=5.6$ Hz, 2H), 2.81 (t, $J=5.3$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 183.4, 138.8, 136.2, 135.2, 133.2, 130.7, 129.2, 128.7, 128.2, 127.3, 126.8, 126.7, 126.4, 50.7, 46.9, 28.0; HRMS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{ClN}_3\text{O}_2\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 382.0450, found 382.0446.

3-溴- N' -(1,2,3,4-四氢异喹啉-2-碳硫酰基)苯磺酰肼(**4m**): 白色固体, 收率 78.5%. m.p. 125.1~126.6 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.04 (s, 1H), 9.27 (s, 1H), 7.72 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.38 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 7.24~7.16 (m, 4H), 4.80 (s, 2H), 3.83 (t, $J=5.9$ Hz, 2H), 2.77 (t, $J=5.7$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 183.4, 139.7, 136.5, 135.2, 133.2, 131.3, 131.1, 128.6, 127.7, 127.3, 126.8, 126.7, 122.1, 50.7, 46.8, 28.3; HRMS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{BrN}_3\text{O}_2\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 425.9945, found 425.9940.

3,4-二氯- N' -(1,2,3,4-四氢异喹啉-2-碳硫酰基)苯磺酰肼(**4n**): 白色固体, 收率 49.8%. m.p. 140.8~142.6 $^{\circ}\text{C}$;

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.04 (s, 1H), 9.55 (s, 1H), 7.91 (d, $J=2.1$ Hz, 1H), 7.68 (dd, $J=8.4$, 2.1 Hz, 1H), 7.60 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.23~7.15 (m, 4H), 4.82 (s, 2H), 3.86 (t, $J=5.9$ Hz, 2H), 2.80 (t, $J=5.8$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 183.4, 138.2, 136.8, 135.1, 133.2, 132.2, 131.4, 130.4, 129.3, 128.7, 128.6, 127.3, 126.8, 126.7, 50.7, 46.8, 28.1; HRMS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 416.0061, found 416.0055.

N' -(1,2,3,4-四氢异喹啉-2-碳硫酰基)苯甲酰肼(**5a**): 白色固体, 收率 25.7%. m.p. 157.2~159.0 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.44 (s, 1H), 9.74 (s, 1H), 7.94~7.86 (m, 2H), 7.60~7.54 (m, 1H), 7.50 (t, $J=7.5$ Hz, 2H), 7.25~7.17 (m, 4H), 5.03 (s, 2H), 4.02 (t, $J=5.9$ Hz, 2H), 2.93 (t, $J=5.9$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 183.9, 166.2, 135.5, 134.0, 133.6, 132.1, 128.9, 128.7, 128.0, 127.3, 126.8, 126.7, 50.6, 46.3, 28.5; HRMS calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 312.1165, found 312.1175.

N' -(1,2,3,4-四氢异喹啉-2-碳硫酰基)-2-三氟甲基苯甲酰肼(**5b**): 白色固体, 收率 47.4%. m.p. 157.9~159.2 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.44 (s, 1H), 9.79 (s, 1H), 8.08 (d, $J=7.4$ Hz, 1H), 7.81 (t, $J=8.2$ Hz, 2H), 7.70 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.26~7.15 (m, 4H), 5.02 (s, 2H), 4.03 (t, $J=5.5$ Hz, 2H), 2.93 (t, $J=5.7$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 184.0, 166.1, 135.4, 135.0, 133.9, 132.8, 130.9, 130.1, 128.6, 127.3, 127.2, 126.9, 126.8, δ : 124.1 (q, $J=273.7$ Hz), 50.6, 46.5, 28.5; HRMS calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 380.1044, found 380.1039.

3-二氟甲基-1-甲基- N' -(1,2,3,4-四氢异喹啉-2-碳硫酰基)-1*H*-吡啶-4-甲酰肼(**5c**): 白色固体, 收率 36.5%. m.p. 177.8~178.9 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.26 (s, 1H), 9.71 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 7.35 (d, $J=54.0$ Hz, 1H), 7.25~7.17 (m, 4H), 5.01 (s, 2H), 4.02~3.98 (m, 2H), 3.96 (s, 3H), 2.92 (t, $J=5.7$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 183.9, 161.1, 145.4 (t, $J=23.1$ Hz), 135.4, 133.9, 133.0, 128.6, 127.3, 126.8, 126.7, 114.5 (t, $J=3.1$ Hz), 110.0 (t, $J=234.5$ Hz), 50.6, 46.3, 39.9, 28.4; HRMS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 366.1200, found 366.1196.

1-甲基- N' -(1,2,3,4-四氢异喹啉-2-碳硫酰基)-3-三氟甲基-1*H*-吡啶-4-甲酰肼(**5d**): 白色固体, 收率 50.6%. m.p. 173.2~173.9 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.24 (s, 1H), 9.72 (s, 1H), 8.43 (s, 1H), 7.25~7.18 (m, 4H), 5.01 (s, 2H), 4.06~3.99 (m, 2H), 3.99 (s, 3H), 2.92

(t, $J=5.9$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 183.9, 159.8, 140.0 (q, $J=37.5$ Hz), 135.4, 134.6, 133.9, 128.6, 127.2, 127.1, 126.8, 121.3 (q, $J=269.2$ Hz), 114.8, 50.6, 46.3, 40.4, 28.5; HRMS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 384.1106, found 384.1101.

N' -(1,2,3,4-四氢异喹啉-2-碳硫酰基)呋喃-2-甲酰肼(**5e**): 白色固体, 收率 26.7%. m.p. 166.5~168.9 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.31 (s, 1H), 9.70 (s, 1H), 7.90 (d, $J=0.9$ Hz, 1H), 7.26 (t, $J=5.0$ Hz, 1H), 7.24~7.15 (m, 4H), 6.66 (dd, $J=3.4$, 1.7 Hz, 1H), 5.00 (s, 2H), 4.00 (t, $J=5.8$ Hz, 2H), 2.91 (t, $J=5.9$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 183.8, 157.7, 147.0, 146.1, 135.4, 133.9, 128.6, 127.3, 126.8, 126.7, 114.8, 112.3, 50.6, 46.4, 28.5; HRMS calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 302.0958, found 302.0966.

N' -(1,2,3,4-四氢异喹啉-2-碳硫酰基)噻吩-2-甲酰肼(**5f**): 白色固体, 收率 50.6%. m.p. 173.2~173.9 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.46 (s, 1H), 9.73 (s, 1H), 7.90 (dd, $J=3.7$, 0.9 Hz, 1H), 7.83 (dd, $J=5.0$, 0.9 Hz, 1H), 7.26~7.16 (m, 5H), 5.02 (s, 2H), 4.00 (t, $J=5.9$ Hz, 2H), 2.92 (t, $J=5.9$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 184.0, 161.1, 138.3, 135.4, 133.9, 131.8, 129.4, 128.7, 128.6, 127.3, 126.8, 126.7, 50.6, 46.4, 28.4; HRMS calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 318.0729, found 318.0737.

2-甲基- N' -(1,2,3,4-四氢异喹啉-2-碳硫酰基)-4-三氟甲基噻吩-5-甲酰肼(**5g**): 白色固体, 收率 62.5%. m.p. 187.0~188.2 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.69 (s, 1H), 9.89 (s, 1H), 7.25~7.17 (m, 4H), 5.00 (s, 2H), 3.99 (t, $J=5.6$ Hz, 2H), 2.91 (t, $J=5.8$ Hz, 2H), 2.75 (s, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 183.6, 168.8, 158.9, 140.4 (q, $J=36.2$ Hz), 135.4, 134.0 (q, $J=132.8$ Hz), 128.6, 127.3, 126.8, 126.7, 120.7 (q, $J=271.7$ Hz), 50.7, 46.5, 28.4, 19.1; HRMS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_2\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 401.0712, found 401.0710.

2-氯- N' -(1,2,3,4-四氢异喹啉-2-碳硫酰基)烟酰肼(**5h**): 白色固体, 收率 52.9%. m.p. 114.1~115.7 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.55 (s, 1H), 9.88 (s, 1H), 8.53 (dd, $J=4.8$, 1.9 Hz, 1H), 8.18 (dd, $J=7.5$, 1.9 Hz, 1H), 7.59 (dd, $J=7.5$, 4.8 Hz, 1H), 7.29~7.16 (m, 4H), 5.02 (s, 2H), 4.01 (t, $J=5.8$ Hz, 2H), 2.93 (t, $J=5.9$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 183.7, 164.6, 151.3, 147.6, 139.4, 135.4, 133.8, 131.7, 128.6, 127.3, 126.8, 126.7, 123.5, 50.6, 46.4, 28.5; HRMS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{ClN}_4\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 347.0728, found 347.0737.

5-甲基-*N'*-(1,2,3,4-四氢异喹啉-2-碳硫酰基)吡嗪-2-甲酰肼(**5i**): 白色固体, 收率 72.8%. m.p. 186.5 ~ 187.8 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.66 (s, 1H), 9.93 (s, 1H), 9.06 (d, *J*=1.2 Hz, 1H), 8.68 (d, *J*=0.6 Hz, 1H), 7.28~7.11 (m, 4H), 5.01 (s, 2H), 4.01 (t, *J*=5.9 Hz, 2H), 2.93 (t, *J*=5.9 Hz, 2H), 2.61 (s, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 182.8, 162.1, 158.0, 143.7, 143.0, 142.0, 135.5, 133.8, 128.6, 127.3, 126.8, 126.7, 50.5, 46.4, 28.4, 22.0; HRMS calcd for C₁₆H₁₈N₅OS [M + H]⁺ 328.1227, found 328.1238.

3.3 漆酶抑制活性测定

化合物对漆酶的抑制作用实验参照文献[13]进行. 使用购自 Sigma-Aldrich(上海, 中国)的粗毛栓菌(*Trametes versicolor*)纯漆酶. 反应混合物包含: 120 μL 柠檬酸-磷酸缓冲液(pH=4.5)、40 μL 纯漆酶、20 μL 2,6-二甲氧基苯酚(漆酶特异性底物)和 20 μL 待测化合物, 于 468 nm 波长下测定其在 20 min (间隔 120 s)内的吸光度变化值. 选择先导 **4bg** 及半胱氨酸作为阳性对照, DMSO 作为阴性对照. 每个样品实验重复 3 次, 计算抑制率.

$$\text{抑制率(\%)} = [(\Delta OD_n - \Delta OD_i) / \Delta OD_n] \times 100\%$$

ΔOD_n 为阴性对照 20 min 内吸光度的变化值, ΔOD_i 为测试化合物 20 min 内吸光度变化值.

3.4 杀菌生物活性测定

采用菌丝生长速率法^[20], 测定目标化合物在浓度为 50 μg/mL 下对 8 种常见植物病原真菌的抑制活性. 试验菌种: 苹果腐烂病菌(*Valsa mali*)、油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum* Schw)、稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)、瓜果腐霉病菌(*Pythium aphanidermatum*)、辣椒疫霉病菌(*Phytophthora capsica* Leonian).

抑制中浓度(EC₅₀)的测定: 选取抑制率大于 80% 的化合物测定其抑制中浓度值, 分别测试浓度为 25.00, 12.50, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78 μg/mL 时的抑制率, 用软件 SPSS 26.0 计算抑制中浓度 EC₅₀.

3.5 分子对接

从 PDB 库(<http://www.rcsb.org>)下载云芝(*Trametes versicolor*)漆酶与 2,5-二甲基苯胺的复合晶体(PDB ID:1KYA)的 PDB 文件^[21]. 目标化合物的结构优化以及蛋白结构的预处理均在 Molecular Operating Environ-

ment (MOE) 2019.0102 软件中进行. 在计算中, 采用 Induce fit 的方法将放置阶段产生的结合构象使用显示分子力学力场的方法进行细化, 并采用基于力场的 GBVI/WSA dG 打分函数, 进一步评估所产生的结合构象中配体和受体之间的结合自由能, 给出最终的打分值并输出. 最后, 采用 Sort/ascending 模块将所有结合构象按照打分值从低到高的顺序进行排列, 用于后续研究.

辅助材料(Supporting Information) 化合物 **5f** 的晶体数据; 中间体的 ¹H NMR 以及目标化合物 **4a~4n**, **5a~5i** 的 ¹H NMR, ¹³C NMR 和 HRMS 图谱. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://siocjournal.cn/>)上下载.

References

- [1] Steinberg, G.; Gurr, S. J. *Fungal Genet. Biol.* **2020**, *144*, 103476.
- [2] Fones, H. N.; Bebb, D. P.; Chaloner, T. M.; Kay, W. T.; Steinberg, G.; Gurr, S. J. *Nat. Food* **2020**, *1*, 455.
- [3] Ma, S.-X.; Cao, K.-K.; Liu, N.; Meng, C.; Cao, Z.-Y.; Dai, D.-Q.; Jia, H.; Zang, J. P.; Li, Z.; Hao, Z. Y.; Gu, S. Q.; Dong, J. G. *Fungal Biol.* **2017**, *121*, 589.
- [4] Zhao, Y. C.; Liu, Y. Q.; Dong, X.; Liu, J. J.; Zhao, D. G. *Transgenic Res.* **2022**, *31*, 215.
- [5] Giardina, P.; Faraco, V.; Pezzella, C.; Piscitelli, A.; Vanhulle, S.; Sanna, G. *Cell Mol. Life Sci.* **2010**, *67*, 369.
- [6] Lorenzo, M.; Moldes, D.; Rodriguez Couto, S.; Sanroman, M. A. *Chemosphere* **2005**, *60*, 1124.
- [7] Hao, J.-Z.; Zhang, W.-W.; Wang, H.-X.; Ziya, N.; Luo, Y.; Jia, P.-S.; Zhang, G. Q.; Ng, T. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2021**, *68*, 297.
- [8] Rosconi, F.; Fraguas, L. F.; Martínez-Drets, G.; Castro-Sowinski, S. *Enzyme Microb. Technol.* **2005**, *36*, 800.
- [9] Johannes, C.; Majcherczyk, A. J. *Biotechnol.* **2000**, *78*, 193.
- [10] Maniak, H.; Talma, M.; Matyja, K.; Trusek, A.; Giurg, M. *Molecules* **2020**, *25*, 1255.
- [11] Maniak, H.; Talma, M.; Giurg, M. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 12307.
- [12] Wang, Z.-W.; Peng, Q.; Gao, X.; Zhong, S.; Fang, Y.; Yang, X.-L.; Ling, Y.; Liu, X.-L. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 5318.
- [13] Zhang, X.-M.; Xu, H.; Su, H.-F.; Yang, X.-L.; Sun, T.-D.; Lu, X.-X.; Shi, F.-S.; Duan, H.-X.; Liu, X.-L.; Ling, Y. J. *J. Agric. Food Chem.* **2022**, *70*, 1776.
- [14] Chander, S.; Ashok, P.; Singh, A.; Murugesan, S. *Chem. Cent. J.* **2015**, *9*, 33.
- [15] Faheem; Karan Kumar, B.; Chandra Sekhar, K. V. G.; Chander, S.; Kunjiappan, S.; Murugesan, S. *RSC Adv.* **2021**, *11*, 12254.
- [16] Ogiyama, T.; Inoue, M.; Honda, S.; Yamada, H.; Watanabe, T.; Gotoh, T.; Kiso, T.; Koakutsu, A.; Kakimoto, S.; Shishikura, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 6079.
- [17] Peana, A. T.; Bassareo, V.; Acquas, E. *Neurotoxic. Res.* **2019**, *36*, 653.
- [18] Grzyb, J. A.; Batey, R. A. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 5279.
- [19] Grzyb, J. A.; Shen, M.; Yoshina-Ishii, C.; Chi, W.; Brown, R. S.; Batey, R. A. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 7153.
- [20] Wang, W.; Wang, J.-H.; Wu, F.-R.; Zhou, H.; Xu, D.; Xu, G. J. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69*, 5746.
- [21] *Molecular Operating Environment (MOE)*, 2019.01, Chemical Computing Group ULC, 1010 Sherbrooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, **2019**.

(Cheng, F.)