

含 1,2,4-三唑并[3,4-*b*]-1,3,4-噻二唑杨梅素衍生物的设计、合成及生物活性研究王启帆^a 张源泉^a 幸丽^a 周远香^a 龚晨裕^a 何帮灿^a
张念^a 吴拥军^{*,b} 薛伟^{*,a}^(a) 贵州大学绿色农药与农业生物工程教育部重点实验室 贵阳 550025^(b) 贵州大学生命科学学院 贵阳 550025

摘要 利用活性拼接的原理,以杨梅苷为原料,将 1,2,4-三唑并[3,4-*b*]-1,3,4-噻二唑引入到杨梅素结构中,合成了一系列含三唑并噻二唑的杨梅素衍生物,通过 ¹H NMR、¹³C NMR 和高分辨质谱(HRMS)进行了结构表征,并通过 X 单晶衍射实验确认了 3-(3-((3-乙基-[1,2,4]三唑[3,4-*b*][1,3,4]噻二唑-6-基)硫代)丙氧基)-5,7-二甲氧基-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)-4*H*-色酮-4-酮(**A5**)的结构。生物活性测试结果表明:浓度为 100 μg/mL 时,3-(3-((3-(4-(叔丁基)苯基)-[1,2,4]三唑[3,4-*b*][1,3,4]噻二唑-6-基)硫基)丙氧基)-5,7-二甲氧基-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)-4*H*-色酮-4-酮(**A15**)对柑桔溃疡病菌(*Xac*)的抑制率为 63.3%,优于对照药噻菌铜(57.3%);部分化合物对烟草花叶病毒(TMV)表现出较好的抑制活性。其中,治疗活性方面,化合物 **A5**, 5,7-二甲氧基-3-(4-((3-(甲氧基甲基)-[1,2,4]三唑[3,4-*b*][1,3,4]噻二唑-6-基)硫代)丁氧基)-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)-4*H*-色酮-4-酮(**A8**), 5,7-二甲氧基-3-(3-(3-苯基-[1,2,4]三唑[3,4-*b*][1,3,4]噻二唑-6-基)硫代)丙氧基)-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)-4*H*-色酮-4-酮(**A9**), 5,7-二甲氧基-3-(4-((3-(对甲苯基)-[1,2,4]三唑[3,4-*b*][1,3,4]噻二唑-6-基)硫代)丁氧基)-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)-4*H*-色酮-4-酮(**A12**)的 EC₅₀ 值分别为 88.3, 139.1, 109.9, 160.1 μg/mL, 优于对照药宁南霉素(227.2 μg/mL)。保护活性方面,5,7-二甲氧基-3-(4-((3-苯基-[1,2,4]三唑[3,4-*b*][1,3,4]噻二唑-6-基)硫代)丁氧基)-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)-4*H*-色酮-4-酮(**A10**), 5,7-二甲氧基-3-(4-((3-(4-甲氧基苯基)-[1,2,4]三唑[3,4-*b*][1,3,4]噻二唑-6-基)硫基)丁氧基)-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)-4*H*-色酮-4-酮(**A14**), 3-(3-((3-(4-(叔丁基)苯基)-[1,2,4]三唑[3,4-*b*][1,3,4]噻二唑-6-基)硫基)丙氧基)-5,7-二甲氧基-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)-4*H*-色酮-4-酮(**A15**), 3-(4-((3-(4-叔丁基)苯基)-[1,2,4]三唑[3,4-*b*][1,3,4]噻二唑-6-基)硫基)丁氧基)-5,7-二甲氧基-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)-4*H*-色酮-4-酮(**A16**), 3-(4-((3-(4-氯苯基)-[1,2,4]三唑[3,4-*b*][1,3,4]噻二唑-6-基)硫基)丁氧基)-5,7-二甲氧基-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)-4*H*-色酮-4-酮(**A18**)的 EC₅₀ 值分别为 103.1, 107.4, 86.3, 79.2, 111.5 μg/mL, 优于对照药宁南霉素(179.2 μg/mL)。微量热涌动实验表明,化合物 **A12** 和 **A16** 与烟草花叶病毒外壳蛋白(TMV-CP)具有较强的亲和力,分子对接实验表明,化合物 **A16** 与 TMV-CP 具有较强的相互作用。

关键词 杨梅素衍生物; 1,2,4-三唑并[3,4-*b*]-1,3,4-噻二唑; 生物活性; 晶体结构; 病毒蛋白Design, Synthesis and Biological Activity of Myricetin Derivatives Containing 1,2,4-Triazolo[3,4-*b*]-1,3,4-thiadiazoleWang, Qifan^a Zhang, Yuanquan^a Xing, Li^a Zhou, Yuanxiang^a Gong, Chenyu^a
He, Bangcan^a Zhang, Nian^a Wu, Yongjun^{*,b} Xue, Wei^{*,a}^(a) Key Laboratory of Green Pesticide & Agricultural Engineering, Ministry of Education, Guizhou University, Guiyang 550025^(b) College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025

Abstract A series of myricetin derivatives containing 1,2,4-triazolo[3,4-*b*]-1,3,4-thiadiazole moiety were designed and synthesized using myricetin as the starting material through active splicing strategy. All target compounds were characterized by ¹H NMR, ¹³C NMR and high-resolution mass spectra (HRMS). Single crystal X-ray diffraction experiments were carried out

* Corresponding authors. E-mail: wyjbio@163.com; wxue@gzu.edu.cn

Received September 25, 2022; revised October 22, 2022; published online November 21, 2022.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21867003) and the Science Fund of Guizhou Province (No. 20192452).

国家自然科学基金(No. 21867003)和贵州省科学基金(No. 20192452)资助项目。

with 3-(3-((3-ethyl-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazol-6-yl)thio)propoxy)-5,7-dimethoxy-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-4*H*-chromen-4-one (**A5**). When the concentration was 100 $\mu\text{g/mL}$, the inhibition rate of 3-(3-((3-(4-*tert*-butyl)phenyl)-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazol-6-yl)thio)propoxy)-5,7-dimethoxy-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-4*H*-chromen-4-one (**A15**) against *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) was 63.3%, which was better than that of the control drug thiophanate-copper (57.3%). Biological activity test results that these compounds showed good inhibitory activity against tobacco mosaic virus (TMV). Among them, in terms of therapeutic activity, the EC_{50} values of compounds **A5**, 5,7-dimethoxy-3-(4-((3-(methoxymethyl)-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazol-6-yl)thio)butoxy)-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-4*H*-chromen-4-one (**A8**), 5,7-dimethoxy-3-(3-((3-phenyl-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazol-6-yl)thio)propoxy)-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-4*H*-chromen-4-one (**A9**), and 5,7-dimethoxy-3-(4-((3-(*p*-tolyl)-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazol-6-yl)thio)butoxy)-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-4*H*-chromen-4-one (**A12**) were 88.3, 139.1, 109.9, 160.1 $\mu\text{g/mL}$, respectively, which were better than the control drug ningnanmycin (227.2 $\mu\text{g/mL}$). In terms of protective activity, the EC_{50} values of compounds 5,7-dimethoxy-3-(4-((3-phenyl-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazol-6-yl)thio)butoxy)-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-4*H*-chromen-4-one (**A10**), 5,7-dimethoxy-3-(4-((3-(4-methoxyphenyl)-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazol-6-yl)thio)butoxy)-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-4*H*-chromen-4-one (**A14**), **A15**, 3-(4-((3-(4-*tert*-butyl)phenyl)-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazol-6-yl)thio)-5,7-dimethoxy-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-4*H*-chromen-4-one (**A16**), and 3-(4-((3-(4-chlorophenyl)-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazol-6-yl)thio)butoxy)-5,7-dimethoxy-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-4*H*-chromen-4-one (**A18**) were 103.1, 107.4, 86.3, 79.2, 111.5 $\mu\text{g/mL}$, respectively, which were better than the control drug ningnanmycin (179.2 $\mu\text{g/mL}$). Microscale thermophoresis (MST) indicated that compounds **A12** and **A16** have strong binding force to tobacco mosaic virus coat protein (TMV-CP). Molecular docking experiments showed that compound **A16** has a strong interaction with TMV-CP.

Keywords myricetin derivatives; 1,2,4-triazolo[3,4-*b*]-1,3,4-thiadiazole moiety; biological activity; crystal structure; viral protein

植物细菌性和病毒性病害在农业生产中一直是棘手的难题^[1-2], 柑桔溃疡病菌会使柑桔受害后落叶、落果、树势衰退, 严重时会造成整株枯死^[3]; 烟草花叶病毒(TMV)是影响烟草生长的主要原因, 同时也能使番茄、黄瓜等作物染病, 造成减产^[4]; 长时间传统农药的使用使植物病原菌产生了不同程度的耐药性^[5-6]. 因此, 开发新型、低毒、环境友好的农药是大势所趋, 具有重要意义^[7].

天然产物又称次级代谢产物, 如黄酮、酚类、萜类、生物碱、萜烯类以及多糖等. 杨梅素属黄酮类化合物, 广泛存在于自然界中^[8], 同时具有抑菌^[9-10]、抗病毒^[11-12]、抗癌^[13]、消炎^[14]以及抗肿瘤^[15]等生物活性, 在新药和先导化合物的发现中起着重要作用. 在我们之前的工作中, 彭峰等^[16]利用活性拼接原理, 将活性小分子噻二唑基团引入杨梅素结构中, 合成了一系列含 1,3,4-噻二唑硫醚的杨梅素衍生物, 并对其进行了抑菌和抗病毒活性测试, 结果表明, 在 100 $\mu\text{g/mL}$ 时, 对柑桔溃疡病菌和水稻白叶枯病菌具有良好的抑制作用; 在 500 $\mu\text{g/mL}$ 时, 对烟草花叶病毒具有良好的抗病毒活性, 达到了预期的效果.

1,2,4-三唑并[3,4-*b*]-1,3,4-噻二唑作为噻二唑衍生物的一类, 同样表现出良好的生物活性. 主要体现在医用抑菌药物^[17-18]和抑真菌药物^[19-20], 但在植物病害领域应用较少, 基于此, 伍思凯等^[21]设计合成了一系列 1,2,4-三唑并[3,4-*b*]-1,3,4-噻二唑衍生物, 并对水稻白叶枯病菌和水稻条纹病菌(*Xoc*)进行了抑制活性的测试, 结果表明, 合成的化合物均具有良好的抑制活性, 其抑制活性与调节防御相关酶活性密切相关.

鉴于此, 利用活性拼接原理, 将小分子 1,2,4-三唑

并[3,4-*b*]-1,3,4-噻二唑引入天然产物杨梅素中(图 1), 并对其进行了抑菌和抗病毒活性测试, 以期得到新型、低毒的小分子农药.

1 结果与讨论

1.1 化合物的合成

将各种取代的甲酰肼与二硫化碳反应得到中间体 **1**, 将其充分溶解于 80%水合肼中, 回流反应得到中间体 **2**, 后与二硫化碳回流反应得到中间体 **3**; 以杨梅苷、碘甲烷为原料, 经过甲基化而后在无水乙醇中加入盐酸脱糖得到中间体 **4**, 中间体 **4** 再分别与 1,3-二溴丙烷以及 1,4-二溴丁烷反应得到中间体 **5**, 最后中间体 **5** 与中间体 **3** 经亲核取代反应得到目标化合物 **A1**~**A18**, 合成路线见 Scheme 1.

1.2 化合物的结构表征

以化合物 **A5** 为例, 对其进行了 ^1H NMR、 ^{13}C NMR、高分辨质谱(HRMS)以及单晶衍射分析. 在 ^1H NMR 谱图中, δ 7.30、6.52 和 6.38 出现的峰归属于杨梅素四个苯环上的芳香氢; δ 4.15 和 3.58 处出现两个三重峰, 归属于连接杨梅素母体与三唑并噻二唑的碳链上靠近氧的亚甲基上的氢和靠近硫的亚甲基上的氢; δ 2.26 处出现一个五重峰, 归属于碳链上居中的亚甲基上的氢; δ 3.98~3.92 处出现数个单峰, 归属于连接在杨梅素上甲氧基的氢; δ 3.07 处出现一个四重峰, 归属于连接在三唑并噻二唑上的乙基中亚甲基的氢; δ 1.44 处出现一个单峰, 归属于连接在三唑并噻二唑上的乙基中甲基的氢. 在 HRMS 谱图中, 目标产物的 HRMS $[\text{M}+\text{H}]^+$ 实测值与理论计算值($m/z \pm 0.0030$)在误差范围内, 目标化合

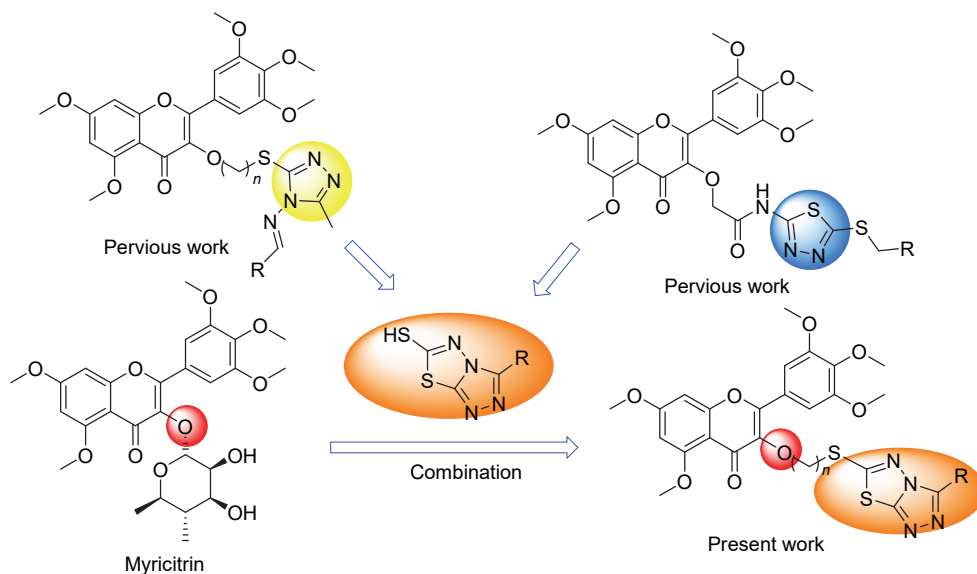
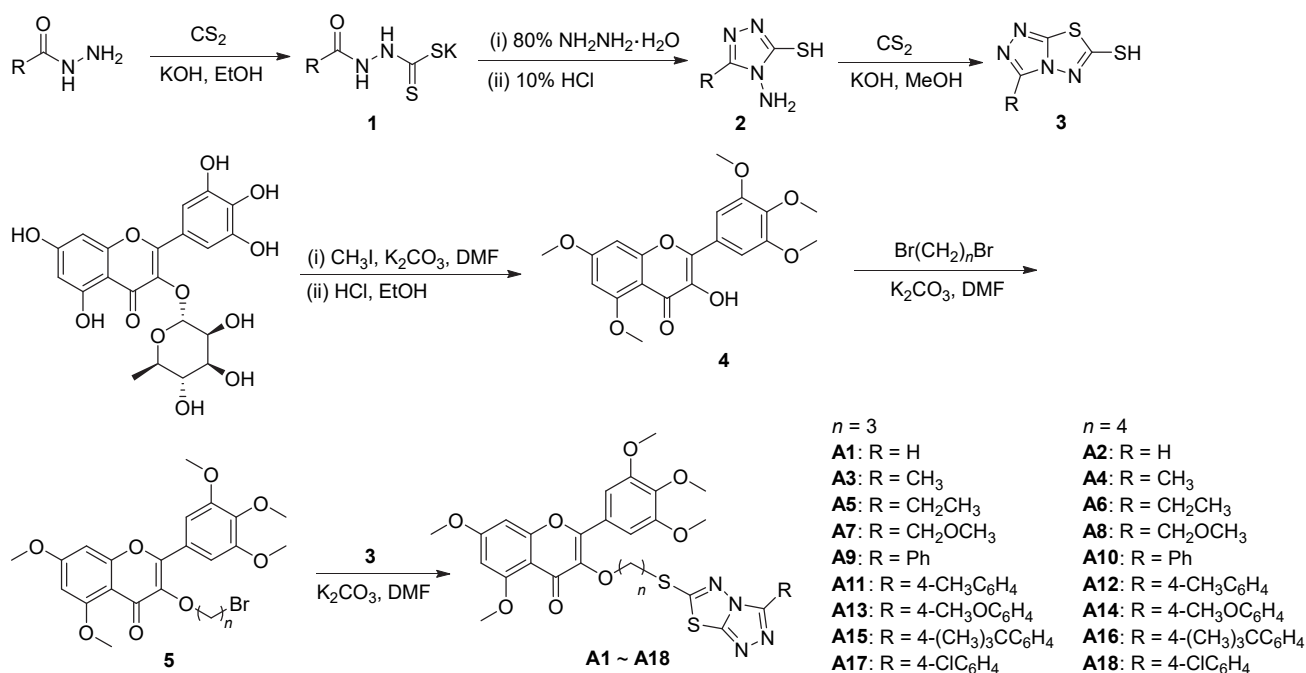


图1 目标化合物的设计思路
Figure 1 Design strategy for target compounds



图式1 目标化合物的合成路线
Scheme 1 Synthetic routes of target compounds

物 **A5** 的结构得到进一步证实. 与此同时, 培养以 **A5** 为代表的单晶, 进一步确定含 1,2,3-三唑并[3,4-*b*]-1,3,4-噻二唑的杨梅素衍生物的结构. **A5** 的晶体学数据结果显示: **A5** 属于三斜晶体, 无色针状, 在 273 K 下获得 24128 个独立可观测反射点, 空间群为 *P*-1, $a=1.04573(19)$ nm, $b=1.10688(18)$ nm, $c=1.4939(3)$ nm; $\alpha=76.738(5)^\circ$, $\beta=69.867(5)^\circ$, $\gamma=62.276(5)^\circ$, $V=0.062276(5)$ nm³, $\mu=0.243$ mm⁻¹, $Z=2$, $D_c=1.425$ mg/m³, $F(000)=644.0$. **A5** 的晶体结构(图 2)和数据(CCDC: 2191313)可以通过

剑桥晶体数据库访问获得.

1.3 生物活性测试

1.3.1 目标化合物的抑细菌活性

对柑桔溃疡病菌、水稻白叶枯病菌(*Xoo*)和猕猴桃溃疡病菌(*Ps*a)进行了抑菌活性测试, 目标化合物 **A1**~**A18** 的抑细菌活性测试结果(表 1)表明, 部分化合物对柑桔溃疡病菌和水稻白叶枯病菌具有一定的抑制活性. 当浓度为 100 μg/mL 时, 化合物 **A15**, **A16** 对柑桔溃疡病

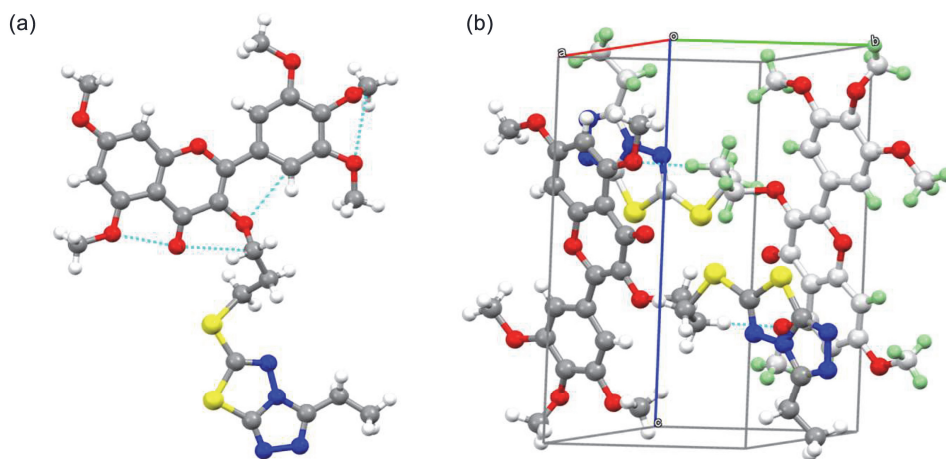


图2 目标化合物 A5 的晶胞结构图(a)和晶胞堆积图(b)
Figure 2 Crystal structure (a) and crystal packing diagram (b) of A5

表1 目标化合物 A1~A18 的抑菌活性(抑制率/%)^a
Table 1 Antibacterial activities (inhibition rate/%) of target compounds A1~A18

Compd.	<i>n</i>	R	<i>Xac</i>		<i>Psa</i>		<i>Xoo</i>	
			100 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$
A1	3	H	26.9 $\pm$ 3.7	0.9 $\pm$ 1.2	11.7 $\pm$ 1.8	13.4 $\pm$ 2.4	38.9 $\pm$ 0.6	21.4 $\pm$ 1.5
A2	4	H	34.5 $\pm$ 2.7	21.6 $\pm$ 2.3	19.3 $\pm$ 1.9	13.6 $\pm$ 1.5	32.9 $\pm$ 0.2	25.5 $\pm$ 0.6
A3	3	CH ₃	31.2 $\pm$ 0.9	14.5 $\pm$ 1.7	19.7 $\pm$ 1.7	14.1 $\pm$ 2.9	25.7 $\pm$ 0.2	16.8 $\pm$ 0.2
A4	4	CH ₃	16.4 $\pm$ 2.6	11.8 $\pm$ 4.3	15.7 $\pm$ 1.3	11.9 $\pm$ 1.0	29.2 $\pm$ 0.9	16.3 $\pm$ 2.4
A5	3	CH ₂ CH ₃	17.6 $\pm$ 2.5	11.7 $\pm$ 2.4	17.5 $\pm$ 0.4	12.2 $\pm$ 0.8	28.5 $\pm$ 0.2	20.3 $\pm$ 0.2
A6	4	CH ₂ CH ₃	34.9 $\pm$ 3.2	29.2 $\pm$ 2.0	25.6 $\pm$ 0.6	26.1 $\pm$ 0.8	41.4 $\pm$ 2.7	24.1 $\pm$ 0.2
A7	3	CH ₂ OCH ₃	21.3 $\pm$ 3.9	20.0 $\pm$ 0.9	20.2 $\pm$ 1.7	10.9 $\pm$ 1.0	32.6 $\pm$ 1.2	14.7 $\pm$ 4.3
A8	4	CH ₂ OCH ₃	40.6 $\pm$ 2.0	39.0 $\pm$ 3.8	18.2 $\pm$ 3.4	15.9 $\pm$ 1.6	33.7 $\pm$ 0.6	22.3 $\pm$ 0.4
A9	3	Ph	28.7 $\pm$ 1.7	26.1 $\pm$ 3.8	20.1 $\pm$ 3.0	19.4 $\pm$ 2.6	23.7 $\pm$ 0.4	25.1 $\pm$ 0.4
A10	4	Ph	8.9 $\pm$ 0.3	6.5 $\pm$ 2.7	19.3 $\pm$ 1.6	15.4 $\pm$ 0.9	24.3 $\pm$ 0.8	28.5 $\pm$ 2.3
A11	3	4-CH ₃ C ₆ H ₄	37.3 $\pm$ 2.4	31.9 $\pm$ 1.6	31.7 $\pm$ 1.1	30.7 $\pm$ 0.9	26.5 $\pm$ 0.8	25.9 $\pm$ 1.3
A12	4	4-CH ₃ C ₆ H ₄	39.1 $\pm$ 2.8	3.3 $\pm$ 1.7	38.4 $\pm$ 1.2	31.0 $\pm$ 1.6	22.7 $\pm$ 1.7	27.1 $\pm$ 0.7
A13	3	4-CH ₃ OC ₆ H ₄	46.4 $\pm$ 1.8	30.4 $\pm$ 4.4	46.4 $\pm$ 0.3	26.0 $\pm$ 1.1	22.6 $\pm$ 4.5	23.8 $\pm$ 0.8
A14	4	4-CH ₃ C ₆ H ₄	28.0 $\pm$ 3.3	10.0 $\pm$ 0.4	24.8 $\pm$ 1.4	22.9 $\pm$ 0.6	34.0 $\pm$ 0.2	26.5 $\pm$ 2.3
A15	3	4-(CH ₃) ₃ CC ₆ H ₄	63.3 $\pm$ 2.8	22.4 $\pm$ 1.5	41.6 $\pm$ 0.4	33.9 $\pm$ 1.2	59.9 $\pm$ 0.9	32.0 $\pm$ 0.7
A16	4	4-(CH ₃) ₃ CC ₆ H ₄	54.7 $\pm$ 0.5	34.6 $\pm$ 1.7	51.1 $\pm$ 1.7	41.8 $\pm$ 0.4	42.2 $\pm$ 1.7	29.5 $\pm$ 1.3
A17	3	4-ClC ₆ H ₄	42.2 $\pm$ 3.6	32.4 $\pm$ 1.3	22.9 $\pm$ 1.8	27.9 $\pm$ 4.3	32.1 $\pm$ 0.9	24.0 $\pm$ 1.7
A18	4	4-ClC ₆ H ₄	38.3 $\pm$ 1.9	33.4 $\pm$ 1.8	36.3 $\pm$ 0.5	26.9 $\pm$ 2.3	24.6 $\pm$ 0.4	21.3 $\pm$ 1.0
杨梅苷			20.7 $\pm$ 0.5	18.2 $\pm$ 0.6	13.8 $\pm$ 4.3	12.8 $\pm$ 1.2	13.9 $\pm$ 1.4	8.5 $\pm$ 1.6
叶枯唑 ^b			53.1 $\pm$ 2.9	36.1 $\pm$ 2.3	50.3 $\pm$ 2.4	34.8 $\pm$ 2.6	59.5 $\pm$ 1.3	37.6 $\pm$ 4.8
噻菌铜 ^b			57.3 $\pm$ 2.5	40.1 $\pm$ 1.4	55.9 $\pm$ 3.5	37.8 $\pm$ 1.3	62.3 $\pm$ 0.6	46.8 $\pm$ 2.0

^a Average of three replicates. ^b The commercial bactericides (bismethiazol and thiodiazole-copper) were used for comparison of antibacterial activity.

菌的抑制率为 63.3%, 54.7%, 接近商品对照药叶枯唑 (53.1%) 和噻菌铜 (57.3%), 化合物 A15 对水稻白叶枯的抑制率 (59.9%) 接近商品对照药叶枯唑 (59.5%) 和噻菌铜 (62.3%), 化合物 A16 对猕猴桃溃疡病菌的抑制率为 51.1%, 接近对照药叶枯唑 (50.3%) 和噻菌铜 (55.9%)。当浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 时, 化合物 A8 对柑桔溃疡病菌的抑制率为 39.0%, 接近商品对照药叶枯唑 (36.1%) 和噻菌铜 (40.1%), 化合物 A16 对猕猴桃溃疡病菌的抑制率为 41.8%, 接近对照药叶枯唑 (34.8%) 和噻菌铜 (37.8%)。

1.3.2 目标化合物的抗病毒活性

目标化合物 A1~A18 的抗 TMV 活性如表 2 所示, 当浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$ 时, 大部分化合物对 TMV 病毒都具有较好的抑制活性。其中, 化合物 A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A16 和 A18 的治疗活性优于商品对照药宁南霉素 (57.5%); 化合物 A5, A6, A10, A14, A15, A16 和 A18 的保护活性优于商品对照药宁南霉素 (62.8%); 此外, 化合物 A12 和 A16 的钝化活性分别为 78.1 和 77.9%, 接近于商品对照药宁南霉素 84.9%。

表 2 目标化合物 A1~A18 的抗 TMV 活性^a
Table 2 Antiviral activities of target compound A1~A18 against TMV

Compound	<i>n</i>	R	Curative activity/%	Protective activity/%	Inactivative activity/%
A1	3	H	50.6±4.8	61.5±1.4	65.3±3.9
A2	4	H	66.5±1.8	62.3±3.5	54.8±0.8
A3	3	CH ₃	50.7±1.9	49.7±2.4	61.0±2.9
A4	4	CH ₃	54.2±3.6	55.6±4.7	47.8±1.2
A5	3	CH ₂ CH ₃	73.6±4.1	66.4±1.7	41.4±2.8
A6	4	CH ₂ CH ₃	66.5±2.5	66.9±2.4	57.4±4.7
A7	3	CH ₂ OCH ₃	60.8±2.4	42.2±3.3	58.8±4.2
A8	4	CH ₂ OCH ₃	67.8±2.1	53.5±1.4	56.9±1.6
A9	3	Ph	71.7±4.7	54.9±3.9	51.6±1.5
A10	4	Ph	50.7±4.2	72.1±3.8	57.8±3.9
A11	3	4-CH ₃ C ₆ H ₄	44.4±4.6	60.4±2.8	70.5±3.7
A12	4	4-CH ₃ C ₆ H ₄	64.1±1.8	62.2±2.9	78.1±3.8
A13	3	4-CH ₃ OC ₆ H ₄	45.2±2.9	48.0±3.4	35.1±3.4
A14	4	4-CH ₃ OC ₆ H ₄	53.3±2.5	67.3±3.3	36.0±2.8
A15	3	4-(CH ₃) ₃ CC ₆ H ₄	54.3±4.0	69.8±3.7	72.2±3.5
A16	4	4-(CH ₃) ₃ CC ₆ H ₄	60.1±3.3	73.8±3.7	77.9±4.1
A17	3	4-ClC ₆ H ₄	53.5±4.1	60.7±0.7	53.4±4.5
A18	4	4-ClC ₆ H ₄	59.2±3.9	67.3±3.0	74.8±3.2
杨梅苷 ^b			33.7±3.5	44.5±2.8	32.4±4.3
Ningnanmycin ^c			57.5±1.6	62.8±0.4	84.9±2.4

^a Average of three replicates, *c*=500 μg/mL. ^b The lead compound of myricitrin. ^c Commercial antiviral agent ningnanmycin was used for comparison of antiviral activity.

筛选出活性较优的化合物,以商品药宁南霉素为对照药,对化合物 A2, A5, A6, A8, A9, A12 和 A16 进行了抗 TMV 的治疗活性 EC₅₀ 测试(表 3)。测试结果分别为 162.7, 88.3, 585.8, 139.1, 109.9, 160.1 和 206.9 μg/mL, 除化合物 A6 外, EC₅₀ 值均优于宁南霉素(227.2 μg/mL)。此外,对化合物 A5, A6, A10, A14, A15, A16 和 A18 进行了抗 TMV 的保护活性 EC₅₀ 测试(表 4), 测试结果分别为 157.5, 140.0, 103.1, 107.4, 86.3, 79.2 和 111.5 μg/mL, 均优于宁南霉素的 EC₅₀ 值(179.2 μg/mL)。

1.4 目标化合物 A12、A16 与 TMV-CP 的微量热涌动实验分析

选取治疗活性、保护活性和钝化活性三者均优于或接近于对照药宁南霉素的化合物进行微量热涌动实验,

以目标化合物 A12 和 A16 为例(图 3), 初步探究 A12, A16 与 TMV-CP 的作用机制。根据 MST (microscale thermophoresis) 显示, 化合物 A12 与 TMV-CP 的解离常数 $K_d=(0.015\pm0.005)$ μmol/L, 化合物 A16 与 TMV-CP 的解离常数 $K_d=(0.056\pm0.027)$ μmol/L, 均优于先导化合物杨梅苷的解离常数 $K_d=(61.447\pm26.262)$ μmol/L 和对照药宁南霉素的解离常数 $K_d=(3.215\pm1.477)$ μmol/L。由 MST 结果可以看出, 目标化合物 A12, A16 比先导化合物杨梅苷、对照药宁南霉素与 TMV-CP 的结合能力好。

1.5 分子对接

分子对接研究显示(图 4), 化合物 A16 与氨基酸残基 ASN-101 (0.3 nm) 形成的氢键比宁南霉素与氨基酸残基 ASN-101 (0.4 nm) 短, 说明化合物 A16 比宁南霉素与

表 3 目标化合物 A2, A5, A6, A8, A9, A12 和 A16 对 TMV 的治疗活性^a
Table 3 Curative activity of target compounds A2, A5, A6, A8, A9, A12 and A16 against TMV

Compound	<i>n</i>	R	Regression equation	<i>r</i>	EC ₅₀ /(μg·mL ⁻¹)
A2	4	H	$y=0.7824x+3.2698$	0.9869	162.7
A5	3	CH ₂ CH ₃	$y=0.685x+3.6671$	0.9851	88.3
A6	4	CH ₂ CH ₃	$y=0.3793x+3.9502$	0.9627	585.8
A8	4	CH ₂ OCH ₃	$y=0.8048x+3.2751$	0.9909	139.1
A9	3	Ph	$y=0.746x+3.4774$	0.9677	109.9
A12	4	4-CH ₃ C ₆ H ₄	$y=0.7368x+3.3759$	0.9900	160.1
A16	4	4-(CH ₃) ₃ CC ₆ H ₄	$y=0.6697x+3.4492$	0.9940	206.9
Ningnanmycin ^b			$y=0.5854x+3.6206$	0.9879	227.2

^a Average of three replicates. ^b Commercial antiviral agent ningnanmycin was used for comparison of antiviral activity.

表 4 目标化合物 A5, A6, A10, A14, A15, A16 和 A18 对 TMV 的保护活性^a
Table 4 Protective activity of target compounds A5, A6, A10, A14, A15, A16 and A18 against TMV

Compound	<i>n</i>	R	Regression equation	<i>r</i>	EC ₅₀ /(μg·mL ⁻¹)
A5	3	CH ₂ CH ₃	$y=0.6575x+3.5553$	0.9575	157.5
A6	4	CH ₂ CH ₃	$y=0.7189x+3.4571$	0.9892	140.0
A10	4	Ph	$y=0.8465x+3.2956$	0.9861	103.1
A14	4	4-CH ₃ OC ₆ H ₄	$y=0.6385x+3.7031$	0.9983	107.4
A15	3	4-(CH ₃) ₃ CC ₆ H ₄	$y=0.6518x+3.7382$	0.9938	86.3
A16	4	4-(CH ₃) ₃ CC ₆ H ₄	$y=0.7571x+3.5624$	0.9805	79.2
A18	4	4-ClC ₆ H ₄	$y=0.7189x+3.5282$	0.9892	111.5
Ningnanmycin ^b			$y=0.7401x+3.3323$	0.9966	179.2

^a Average of three replicates. ^b Commercial antiviral agent ningnanmycin was used for comparison of antiviral activity.

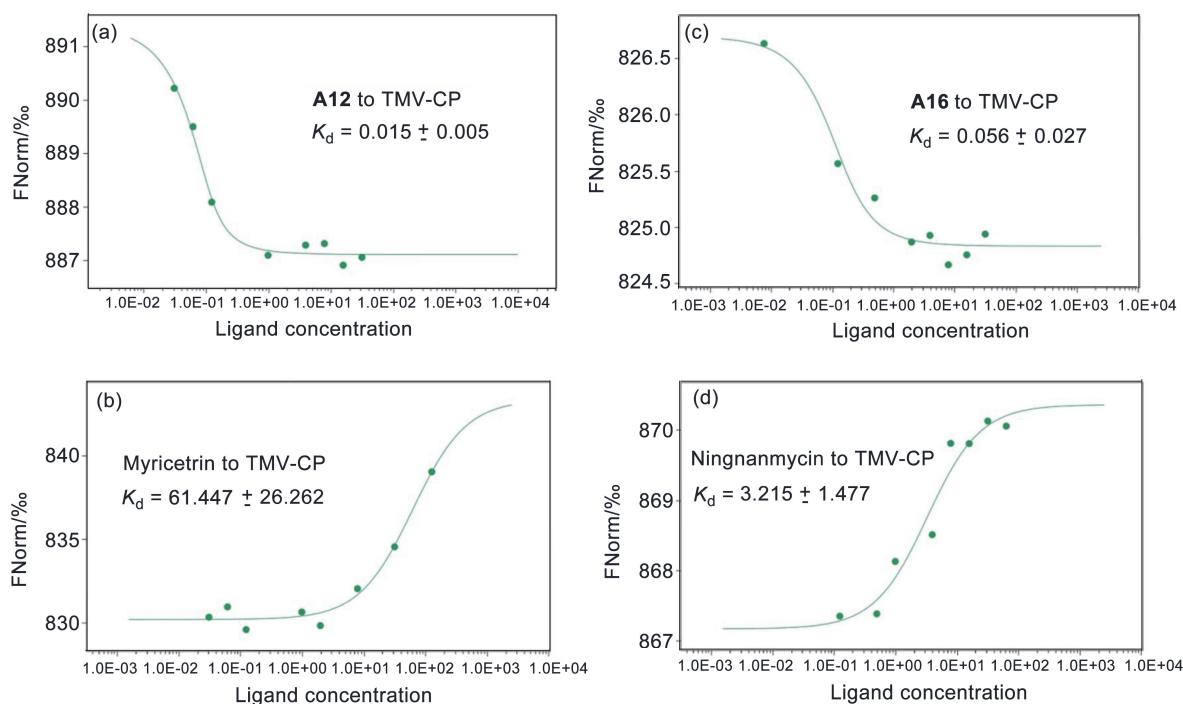


图 3 (a) A12、(b)杨梅苷、(c) A16 和(d)宁南霉素的 MST
Figure 3 MST of A12 (a), myricitrin (b), A16 (c), and ningnanmycin (d)

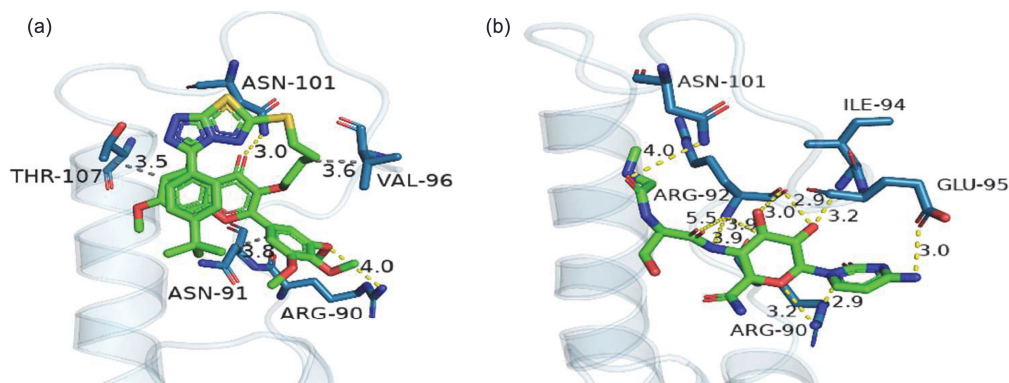


图 4 (a) A16 和(b)宁南霉素的分子对接
Figure 4 Molecular docking studies of A16 (a) and ningnanmycin (b)

TMV-CP 之间的结合力强. 与此同时, 化合物 **A16** 与某些氨基酸残基之间的一些非键相互作用也是不可低估的作用方式, 例如碳氢、硫键、 π -烷基、 π - Σ 、 π -阳离子、 π - π 堆积等. 分子对接研究表明 **A16** 有较好的抗 TMV 活性.

2 结论

以取代苯甲酰肼、二硫化碳、杨梅苷、1,3-二溴丙烷和 1,4-二溴丁烷为原料, 经过六步反应合成了 18 个含 1,2,4-三唑并[3,4-*b*]-1,3,4-噻二唑的杨梅素衍生物. 抑菌测试结果表明, 浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时, **A15** 对柑桔溃疡病菌的抑制率为 63.3%, 优于对照药噻菌铜(57.3%); 抗病毒活性测试表明, 大多数化合物对 TMV 具有显著的治疗和保护活性, 部分化合物如 **A5**, **A8** 和 **A9** 的治疗活性 EC_{50} 值分别为 88.3, 139.1 和 109.9 $\mu\text{g/mL}$, 优于对照药宁南霉素(227.2 $\mu\text{g/mL}$); 部分化合物如 **A10**, **A14**, **A15**, **A16** 和 **A18** 的保护活性 EC_{50} 值分别为 103.1, 107.4, 86.3, 79.2 和 111.5 $\mu\text{g/mL}$, 优于对照药宁南霉素(179.2 $\mu\text{g/mL}$). 微量热涌动实验表明, 化合物 **A12** 和 **A16** 比宁南霉素有更强的亲和力, 说明化合物 **A12** 和 **A16** 与 TMV-CP 的结合能力比宁南霉素更好. 分子对接研究表明, 化合物 **A16** 与 ASN-101 (0.3 nm) 形成的氢键比宁南霉素与 ASN-101 (0.4 nm) 短, 说明化合物 **A16** 比宁南霉素与 TMV-CP (PDB 代码: 1EI7) 之间的结合力强.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

XT-4 型数字显微熔点测定仪(北京科德仪器有限公司); 德国 Bruker Ascend-500 型核磁共振波谱仪(500 MHz); Thermo Scientific Q Exactive 高分辨质谱仪(HRMS, 赛默飞世尔科技有限公司); WFH-203B 型三用紫外分析仪(上海精科实业有限公司); Multiskan FC 酶标仪(赛默飞世尔科技有限公司); LDZX-50KBS 立式高压蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂); 晶体的数据是由 X 射线衍射仪收集的(德国 Bruker 公司). 杨梅苷试剂购自上海泰坦科技股份有限公司; 无水乙醇、无水甲醇和 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)等溶剂均为市售分析纯.

3.2 实验方法

中间体 **1**、**2** 和 **3** 参照文献合成^[22-23], 中间体 **4** 和 **5** 参照文献合成^[24-25].

3.2.1 目标化合物 **A1**~**A18** 的合成方法

向 100 mL 的单口圆底烧瓶中分别加入中间体 **3** (1.83 mmol)、无水碳酸钾(2.29 mmol)和 DMF 20 mL, 常温搅拌 30 min, 待中间体 **3** 完全溶解后, 加入中间体 **5**

(1.53 mmol), 反应 6~8 h, 薄层色谱(TLC)跟踪反应 [*V*(乙酸乙酯):*V*(甲醇)=25:2]. 反应结束后, 将体系用 200 mL 冰水分散, 析出大量固体, 抽滤得到粗产物, 再经柱层析 [*V*(乙酸乙酯):*V*(甲醇)=50:1~8:1] 纯化得到目标化合物 **A1**~**A18**.

3-(3-([1,2,4]三唑[3,4-*b*][1,3,4]噻二唑-6-基硫代)丙氧基)-5,7-二甲氧基-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)-4*H*-色酮-4-酮(**A1**): 白色固体, 收率 65.7%. m.p. 133.2~134.6 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ : 8.78 (s, 1H, Ph-H), 7.26 (s, 2H, Ph-H), 6.49 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, Ph-H), 6.35 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, Ph-H), 4.11 (d, $J=5.4$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 3.96 (s, 3H, PhOCH_3), 3.90 (d, $J=1.5$ Hz, 9H, PhOCH_3), 3.88 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, PhOCH_3), 3.52 (t, $J=7.1$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 2.21~2.16 (m, $J=12.8$, 6.5 Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ : 174.0, 167.3, 164.3, 161.1, 158.9, 153.9, 153.1, 140.2, 135.0, 125.9, 109.4, 105.9, 96.0, 92.5, 70.0, 61.1, 56.5, 55.9, 31.0, 29.9. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}_2$ [$\text{M}+\text{H}$] $^{+}$ 587.1625, found 587.1624.

3-(4-([1,2,4]三唑[3,4-*b*][1,3,4]噻二唑-6-基硫代)丁氧基)-5,7-二甲氧基-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)-4*H*-色酮-4-酮(**A2**): 白色固体, 收率 66.3%. m.p. 149.3~150.7 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ : 8.79 (s, 1H, Ph-H), 7.30 (s, 2H, Ph-H), 6.48 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, Ph-H), 6.34 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, Ph-H), 4.02 (t, $J=6.0$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 3.94 (s, 3H, PhOCH_3), 3.90 (d, $J=3.3$ Hz, 9H, PhOCH_3), 3.88 (s, 3H, PhOCH_3), 3.39 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 2.07~2.00 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 1.87 (dd, $J=13.8$, 6.2 Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ : 174.1, 167.3, 164.2, 161.1, 158.9, 153.9, 153.1, 140.4, 140.1, 135.1, 126.1, 109.4, 105.9, 96.0, 92.6, 71.1, 61.1, 56.5, 56.0, 33.8, 29.0, 25.7. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}_2$ [$\text{M}+\text{H}$] $^{+}$ 601.1421, found 602.1416.

5,7-二甲氧基-3-(3-((3-甲基-[1,2,4]三唑[3,4-*b*]-[1,3,4]噻二唑-6-基)硫代)丙氧基)-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)-4*H*-色酮-4-酮(**A3**): 白色固体, 收率 59.8%. m.p. 146.7~148.1 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ : 7.24 (s, 2H, Ph-H), 6.47 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, Ph-H), 6.33 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, Ph-H), 3.94 (d, $J=5.8$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 3.93 (s, 3H, PhOCH_3), 3.89 (s, 9H, PhOCH_3), 3.88 (s, 3H, PhOCH_3), 3.31 (t, $J=6.7$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 2.38 (s, 3H, Ar- CH_3), 2.12~2.07 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ : 174.1, 164.2, 161.0, 158.9, 153.8, 153.2, 150.6, 140.3, 140.1,

125.9, 109.3, 105.9, 96.0, 92.6, 70.5, 61.1, 56.5, 56.0, 30.3, 30.0, 10.4. HRMS (ESI) calcd for $C_{27}H_{28}N_4O_8S_2$ $[M+H]^+$ 601.1421, found 601.1433.

5,7-二甲氧基-3-(4-((3-甲基-[1,2,4]三唑[3,4-*b*]-[1,3,4]噻二唑-6-基)硫代)丙氧基)-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)-4*H*-色酮-4-酮(**A4**): 白色固体, 收率 58.3%. m.p. 135.5~136.9 °C; 1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ : 7.30 (s, 2H, Ph-H), 6.47 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, Ph-H), 6.33 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, Ph-H), 4.02 (t, $J=6.0$ Hz, 2H, $OCH_2CH_2CH_2CH_2S$), 3.94 (s, $PhOCH_3$, 3H), 3.90 (d, $J=4.3$ Hz, 9H, $PhOCH_3$), 3.88 (s, 3H, $PhOCH_3$), 3.39 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, $OCH_2CH_2CH_2CH_2S$), 2.63 (s, 3H, $ArCH_3$), 2.01 (dd, $J=14.6, 7.3$ Hz, 2H, $OCH_2CH_2CH_2CH_2S$), 1.89~1.85 (m, $OCH_2CH_2CH_2CH_2S$, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ : 174.0, 166.4, 164.2, 161.1, 158.9, 153.0, 144.3, 140.4, 140.1, 126.0, 109.4, 106.0, 96.0, 92.6, 71.1, 61.1, 56.5, 55.9, 33.9, 28.9, 25.7, 10.5. HRMS (ESI) calcd for $C_{28}H_{30}N_4O_8S_2$ $[M+H]^+$ 615.1578, found 615.1572.

3-(3-((3-乙基-[1,2,4]三唑[3,4-*b*][1,3,4]噻二唑-6-基)硫代)丙氧基)-5,7-二甲氧基-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)-4*H*-色酮-4-酮(**A5**): 白色固体, 收率 49.8%. m.p. 189.1~190.6 °C; 1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ : 7.32~7.29 (s, 2H, Ph-H), 6.52 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, Ph-H), 6.37 (t, $J=6.1$ Hz, 1H, Ph-H), 4.14 (t, $J=5.6$ Hz, 2H, $OCH_2CH_2CH_2CH_2S$), 3.98 (s, 3H, $PhOCH_3$), 3.94 (s, 6H, $PhOCH_3$), 3.93 (s, 3H, $PhOCH_3$), 3.92 (d, $J=3.3$ Hz, 3H, $PhOCH_3$), 3.57 (t, $J=7.0$ Hz, 2H, $OCH_2CH_2CH_2S$), 3.04 (q, $J=7.6$ Hz, 2H, $ArCH_2CH_3$), 2.27~2.19 (m, 2H, $OCH_2CH_2CH_2S$), 1.42 (t, $J=7.6$ Hz, 3H, $ArCH_2CH_3$); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ : 173.9, 166.2, 164.2, 161.0, 158.9, 153.1, 148.7, 140.2, 125.8, 109.3, 105.9, 96.0, 92.5, 69.9, 61.0, 56.4, 55.9, 31.0, 30.0, 18.7, 11.1. HRMS (ESI) calcd for $C_{28}H_{30}N_4O_8S_2$ $[M+H]^+$ 615.1578, found 615.1574.

3-(4-((3-乙基-[1,2,4]三唑[3,4-*b*][1,3,4]噻二唑-6-基)硫代)丁氧基)-5,7-二甲氧基-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)-4*H*-色酮-4-酮(**A6**): 白色固体, 收率 45.9%. m.p. 137.3~138.8 °C; 1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ : 7.34 (s, 2H, Ph-H), 6.51 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, Ph-H), 6.37 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, Ph-H), 4.06 (t, $J=6.0$ Hz, 2H, $OCH_2CH_2CH_2CH_2S$), 3.97 (s, 3H, $PhOCH_3$), 3.94 (d, $J=2.9$ Hz, 9H, $PhOCH_3$), 3.92 (s, 3H, $PhOCH_3$), 3.43 (t, $J=7.1$ Hz, 2H, $OCH_2CH_2CH_2CH_2S$), 3.05 (q, $J=7.6$ Hz, 2H, $ArCH_2CH_3$), 2.07 (dd, $J=11.9, 4.7$ Hz, 2H, $OCH_2CH_2CH_2CH_2S$),

1.91 (dd, $J=7.8, 6.1$ Hz, 2H, $OCH_2CH_2CH_2CH_2S$), 1.43 (t, $J=7.6$ Hz, 3H, $ArCH_2CH_3$); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ : 174.0, 166.2, 164.1, 161.0, 158.8, 153.1, 152.8, 148.8, 140.4, 140.1, 125.9, 109.4, 105.9, 95.9, 92.5, 71.0, 61.0, 56.4, 55.9, 33.8, 28.9, 25.7, 18.7, 11.1. HRMS (ESI) calcd for $C_{29}H_{32}N_4O_8S_2$ $[M+H]^+$ 629.1734, found 629.1729.

5,7-二甲氧基-3-(3-((3-(甲氧基甲基)-[1,2,4]三唑[3,4-*b*][1,3,4]噻二唑-6-基)硫代)丙氧基)-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)-4*H*-色酮-4-酮(**A7**): 白色固体, 收率 66.1%. m.p. 149.2~150.7 °C; 1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ : 7.30 (s, 2H, Ph-H), 6.52 (d, $J=2.1$ Hz, 1H, Ph-H), 6.38 (d, $J=2.1$ Hz, 1H, Ph-H), 4.83 (s, 2H, CH_2OCH_3), 4.13 (t, $J=5.5$ Hz, 3H, $OCH_2CH_2CH_2S$), 3.98 (s, 3H, $PhOCH_3$), 3.94 (s, 6H, $PhOCH_3$), 3.93 (s, 3H, $PhOCH_3$), 3.59 (t, $J=7.0$ Hz, 2H, $OCH_2CH_2CH_2S$), 3.44 (s, CH_2OCH_3 , 3H), 2.28~2.19 (m, 2H, $OCH_2CH_2CH_2S$); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ : 173.9, 167.5, 164.2, 161.0, 158.9, 154.4, 153.0, 144.3, 140.1, 125.8, 109.3, 105.9, 96.0, 92.5, 69.9, 63.3, 61.0, 60.4, 58.7, 56.7~55.9, 55.9, 31.0, 29.9. HRMS (ESI) calcd for $C_{28}H_{30}N_4O_9S_2$ $[M+H]^+$ 631.1527, found 631.1524.

5,7-二甲氧基-3-(4-((3-(甲氧基甲基)-[1,2,4]三唑[3,4-*b*][1,3,4]噻二唑-6-基)硫代)丁氧基)-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)-4*H*-色酮-4-酮(**A8**): 黄色固体, 收率 66.7%. m.p. 114.0~115.7 °C; 1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ : 7.29 (s, 2H, Ph-H), 6.47 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, Ph-H), 6.32 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, Ph-H), 4.79 (s, 2H, CH_2OCH_3), 4.00 (t, $J=5.9$ Hz, 2H, $OCH_2CH_2CH_2CH_2S$), 3.93 (s, 3H, $PhOCH_3$), 3.90 (s, 6H, $PhOCH_3$), 3.89 (s, 3H, $PhOCH_3$), 3.87 (s, 3H, $PhOCH_3$), 3.42 (d, $J=7.1$ Hz, 2H, $OCH_2CH_2CH_2CH_2S$), 3.40 (s, 3H, CH_2OCH_3), 2.03~1.99 (m, 2H, $OCH_2CH_2CH_2CH_2S$), 1.85 (dd, $J=13.3, 7.1$ Hz, 2H, $OCH_2CH_2CH_2CH_2S$); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ : 174.1, 167.6, 164.2, 161.03, 158.9, 154.5, 153.0, 144.3, 140.4, 140.0, 126.0, 109.4, 105.9, 96.0, 92.5, 71.1, 63.4, 61.1, 58.8, 56.5, 55.9, 33.9, 28.9, 25.6. HRMS (ESI) calcd for $C_{29}H_{32}N_4O_9S_2$ $[M+H]^+$ 645.1684, found 645.1678.

5,7-二甲氧基-3-(3-((3-苯基-[1,2,4]三唑[3,4-*b*][1,3,4]噻二唑-6-基)硫代)丙氧基)-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)-4*H*-色酮-4-酮(**A9**): 黄色固体, 收率 70.8%. m.p. 195.1~196.4 °C; 1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ : 8.26 (d, $J=6.9$ Hz, 2H, Ph-H), 7.46 (d, $J=6.9$ Hz, 2H, Ph-H), 7.42 (d, $J=7.0$ Hz, 1H, Ph-H), 7.27 (s, 2H, Ph-H), 6.49 (d, $J=2.3$ Hz, 1H, Ph-H), 6.35 (d, $J=2.2$ Hz, 1H,

Ph-H), 4.12 (d, $J=5.5$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 3.95 (s, 3H, PhOCH_3), 3.89 (s, 3H, PhOCH_3), 3.88 (s, 3H, PhOCH_3), 3.87 (s, 6H, PhOCH_3), 3.65 (t, $J=7.1$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 2.27 (dd, $J=12.5, 6.2$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform- d) δ : 174.0, 167.0, 164.3, 161.1, 158.9, 154.4, 153.1, 146.1, 140.2, 130.6, 130.3, 129.0, 128.5, 128.3, 126.3, 126.1, 125.9, 125.8, 109.4, 105.9, 96.1, 96.0, 92.5, 69.9, 61.1, 56.5, 55.9, 32.5, 31.2, 30.2. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 663.1578, found 663.1577.

5,7-二甲氧基-3-(4-((3-苯基-[1,2,4]三唑[3,4- b][1,3,4]噻二唑-6-基)硫代)丁氧基)-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)-4H-色酮-4-酮(**A10**): 白色固体, 收率 74.2%. m.p. 125.5~127.1 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, Chloroform- d) δ : 8.25 (d, $J=7.0$ Hz, 2H, Ph-H), 7.47 (t, $J=7.3$ Hz, 2H, Ph-H), 7.43 (d, $J=7.1$ Hz, 1H, Ph-H), 7.30 (s, 2H, Ph-H), 6.47 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, Ph-H), 6.34 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, Ph-H), 4.05 (t, $J=5.9$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 3.94 (s, 3H, PhOCH_3), 3.90 (s, 9H, PhOCH_3), 3.89 (s, 3H, PhOCH_3), 3.51 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 2.13~2.08 (m, $J=7.2$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 1.95~1.88 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform- d) δ : 174.1, 167.0, 164.2, 161.1, 158.9, 154.4, 153.1, 152.9, 146.1, 140.4, 140.1, 130.3, 129.0, 126.3, 126.0, 125.7, 109.4, 105.9, 96.0, 92.5, 71.1, 61.1, 56.5, 55.9, 34.0, 28.9, 25.8. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 677.1734, found 677.1731.

5,7-二甲氧基-3-(3-((3-(对甲苯基)-[1,2,4]三唑[3,4- b][1,3,4]噻二唑-6-基)硫代)丙氧基)-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)-4H-色酮-4-酮(**A11**): 白色固体, 收率 69.4%. m.p. 107.9~109.0 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, Chloroform- d) δ : 8.16 (d, $J=8.2$ Hz, 2H, Ph-H), 7.30 (s, 2H, Ph-H), 7.28 (d, $J=4.5$ Hz, 2H, Ph-H), 6.51 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, Ph-H), 6.38 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, Ph-H), 4.15 (t, $J=5.5$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 3.98 (s, 3H, PhOCH_3), 3.92 (s, 3H, PhOCH_3), 3.91 (s, 3H, PhOCH_3), 3.90 (s, 6H, PhOCH_3), 3.66 (t, $J=7.0$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 2.38 (s, 3H, PhCH_3), 2.28 (dd, $J=12.3, 6.1$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform- d) δ : 173.9, 166.7, 164.2, 161.1, 158.9, 154.1, 153.2~152.7, 146.2, 140.5, 140.2, 129.6, 126.2, 125.8, 122.8, 109.4, 105.9, 96.0, 92.5, 69.9, 61.0, 56.4, 55.8, 31.2, 30.1, 21.5. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 677.1734, found 677.1728.

5,7-二甲氧基-3-(4-((3-(对甲苯基)-[1,2,4]三唑[3,4- b][1,3,4]噻二唑-6-基)硫代)丁氧基)-2-(3,4,5-三甲氧基

苯基)-4H-色酮-4-酮(**A12**): 白色固体, 收率 67.3%. m.p. 100.1~101.5 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, Chloroform- d) δ : 8.15 (d, $J=8.2$ Hz, 2H, Ph-H), 7.33 (s, 2H, Ph-H), 7.28 (t, $J=4.0$ Hz, 2H, Ph-H), 6.49 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, Ph-H), 6.36 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, Ph-H), 4.09 (t, $J=5.9$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 3.96 (s, 3H, PhOCH_3), 3.93 (s, 9H, PhOCH_3), 3.91 (s, 3H, PhOCH_3), 3.52 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 2.39 (s, 3H, PhCH_3), 2.16~2.08 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 1.97~1.92 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform- d) δ : 174.0, 166.7, 164.1, 161.0, 158.8, 153.0, 152.8, 140.4, 140.1, 129.6, 126.2, 125.9, 122.8, 109.4, 105.9, 95.9, 92.5, 71.0, 61.0, 56.4, 55.9, 33.9, 28.9, 25.8, 21.5. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 691.1891, found 691.1887.

5,7-二甲氧基-3-(3-((3-(4-甲氧基苯基)-[1,2,4]三唑[3,4- b][1,3,4]噻二唑-6-基)硫代)丙氧基)-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)-4H-色酮-4-酮(**A13**): 白色固体, 收率 68.4%. m.p. 126.3~127.8 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, Chloroform- d) δ : 8.20 (d, $J=8.9$ Hz, 2H, Ph-H), 7.28 (s, 2H, Ph-H), 6.97 (d, $J=9.0$ Hz, 2H, Ph-H), 6.49 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, Ph-H), 6.36 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, Ph-H), 4.12 (t, $J=5.5$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 3.96 (s, 3H, PhOCH_3), 3.90 (s, 3H, PhOCH_3), 3.89 (s, 3H, PhOCH_3), 3.87 (s, 6H, PhOCH_3), 3.81 (s, 3H, PhOCH_3), 3.64 (t, $J=7.1$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 2.26 (dt, $J=12.8, 6.3$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform- d) δ : 174.0, 166.6, 164.3, 161.1, 158.9, 153.9, 153.3~152.7, 146.0, 140.2, 128.0, 125.8, 118.3, 114.4, 109.4, 105.9, 96.0, 95.9, 92.6, 70.0, 61.1, 56.7~56.6, 56.5, 56.0, 55.4, 31.2, 30.2. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_9\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 693.1684, found 693.1678.

5,7-二甲氧基-3-(4-((3-(4-甲氧基苯基)-[1,2,4]三唑[3,4- b][1,3,4]噻二唑-6-基)硫基)丁氧基)-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)-4H-色酮-4-酮(**A14**): 白色固体, 收率 67.3%. m.p. 120.3~121.6 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, Chloroform- d) δ : 8.19 (s, 1H, Ph-H), 8.18 (s, 1H, Ph-H), 7.30 (s, 2H, Ph-H), 6.99 (s, 1H, Ph-H), 6.97 (s, 1H, Ph-H), 6.46 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, Ph-H), 6.33 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, Ph-H), 4.06 (t, $J=5.9$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 3.93 (s, 3H, PhOCH_3), 3.90 (s, 9H, PhOCH_3), 3.89 (s, 3H, PhOCH_3), 3.82 (s, 3H, PhOCH_3), 3.49 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 2.13~2.07 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 1.95~1.89 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform- d) δ : 174.1, 166.6, 164.2, 161.1, 158.9, 153.9, 153.2~152.8, 146.0, 140.4, 140.1, 128.0, 126.0, 118.3, 114.4, 109.4, 105.9, 96.0, 92.5, 71.1, 61.1, 56.5, 55.9, 55.4,

34.0, 28.9, 25.8. HRMS (ESI) calcd for $C_{34}H_{34}N_4O_9S_2$ $[M+H]^+$ 707.1840, found 707.1830.

3-(3-((3-(4-(叔丁基)苯基)-[1,2,4]三唑[3,4-*b*])[1,3,4]噻二唑-6-基)硫基)丙氧基)-5,7-二甲氧基-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)-4*H*-色酮-4-酮(**A15**): 白色固体, 收率 64.6%. m.p. 113.4~114.6 °C; 1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ : 8.19 (s, 1H, Ph-H), 8.18 (s, 1H, Ph-H), 7.48 (s, 1H, Ph-H), 7.46 (s, 1H, Ph-H), 7.28 (s, 2H, Ph-H), 6.49 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, Ph-H), 6.36 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, Ph-H), 4.12 (t, $J=5.5$ Hz, 2H, $OCH_2CH_2CH_2S$), 3.96 (s, 3H, $PhOCH_3$), 3.90 (s, 3H, $PhOCH_3$), 3.88 (s, 3H, $PhOCH_3$), 3.86 (s, 6H, $PhOCH_3$), 3.66 (t, $J=7.1$ Hz, 2H, $OCH_2CH_2CH_2S$), 2.30~2.24 (m, 2H, $OCH_2CH_2CH_2S$), 1.28 (s, 9H, $PhC(CH_3)_3$); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ : 174.0, 166.7, 164.3, 161.1, 158.9, 154.2, 153.6, 153.1, 146.2, 140.2, 126.1, 125.9, 122.8, 109.4, 105.9, 96.1, 92.6, 70.0, 61.1, 56.6, 56.4, 56.0, 35.0, 31.5~31.0, 30.2. HRMS (ESI) calcd for $C_{36}H_{38}N_4O_8S_2$ $[M+H]^+$ 719.2204, found 719.2196.

3-(4-((3-(4-(叔丁基)苯基)-[1,2,4]三唑[3,4-*b*])[1,3,4]噻二唑-6-基)硫基)丁氧基)-5,7-二甲氧基-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)-4*H*-色酮-4-酮(**A16**): 白色固体, 收率 65.3%. m.p. 172.1~173.3 °C; 1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ : 8.19 (s, 1H, Ph-H), 8.17 (s, 1H, Ph-H), 7.50 (s, 1H, Ph-H), 7.49 (s, 1H, Ph-H), 7.31 (s, 2H, Ph-H), 6.47 (d, $J=2.1$ Hz, 1H, Ph-H), 6.34 (d, $J=2.1$ Hz, 1H, Ph-H), 4.05 (t, $J=5.8$ Hz, 2H, $OCH_2CH_2CH_2CH_2S$), 3.93 (s, 3H, $PhOCH_3$), 3.90 (s, 9H, $PhOCH_3$), 3.89 (s, 3H, $PhOCH_3$), 3.51 (t, $J=7.1$ Hz, 2H, $OCH_2CH_2CH_2CH_2S$), 2.11 (t, $J=7.1$ Hz, 2H, $OCH_2CH_2CH_2CH_2S$), 1.92 (dt, $J=13.2$, 6.4 Hz, 2H, $OCH_2CH_2CH_2CH_2S$), 1.32 (s, 9H, $PhC(CH_3)_3$); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ : 174.1, 166.7, 164.2, 161.1, 158.9, 154.1, 153.7, 153.1, 152.9, 146.2, 140.5, 140.1, 126.0, 122.8, 109.4, 105.9, 96.0, 92.5, 71.1, 61.1, 56.5, 55.9, 35.0, 34.0, 33.4, 31.3, 28.9, 28.0, 25.7. HRMS (ESI) calcd for $C_{37}H_{40}N_4O_8S_2$ $[M+H]^+$ 733.2360, found 733.2354.

3-(3-((3-(4-氯苯基)-[1,2,4]三唑[3,4-*b*])[1,3,4]噻二唑-6-基)硫基)丙氧基)-5,7-二甲氧基-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)-4*H*-色酮-4-酮(**A17**): 白色固体, 收率 65.4%. m.p. 130.1~131.6 °C; 1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ : 8.22 (s, 1H, Ph-H), 8.20 (s, 1H, Ph-H), 7.43 (s, 1H, Ph-H), 7.41 (s, 1H, Ph-H), 7.27 (s, 2H, Ph-H), 6.49 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, Ph-H), 6.35 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, Ph-H), 4.12 (t, $J=5.6$ Hz, 2H, $OCH_2CH_2CH_2S$), 3.95 (s, 3H, $PhOCH_3$), 3.90 (s,

3H, $PhOCH_3$), 3.88 (s, 9H, $PhOCH_3$), 3.67 (t, $J=7.1$ Hz, 2H, $OCH_2CH_2CH_2S$), 2.26 (dt, $J=12.6$, 6.2 Hz, 2H, $OCH_2CH_2CH_2S$); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ : 174.0, 167.5, 164.3, 164.0, 161.1, 158.9, 154.6, 153.1, 145.2, 140.2, 136.3, 129.3, 127.6, 125.82, 124.2, 109.4, 105.9, 96.1, 96.0, 92.5, 69.9, 61.1, 56.5, 55.9, 34.9, 31.2, 30.1. HRMS (ESI) calcd for $C_{32}H_{29}ClN_4O_8S_2$ $[M+H]^+$ 697.1188, found 697.1183.

3-(4-((3-(4-氯苯基)-[1,2,4]三唑[3,4-*b*])[1,3,4]噻二唑-6-基)硫基)丁氧基)-5,7-二甲氧基-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)-4*H*-色酮-4-酮(**A18**): 白色固体, 收率 65.3%. m.p. 174.6~175.9 °C; 1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ : 8.19 (d, $J=8.6$ Hz, 2H, Ph-H), 7.42 (d, $J=8.6$ Hz, 2H, Ph-H), 7.30 (s, 2H, Ph-H), 6.46 (d, $J=2.0$ Hz, 1H, Ph-H), 6.33 (d, $J=2.0$ Hz, 1H, Ph-H), 4.06 (t, $J=5.9$ Hz, 2H, $OCH_2CH_2CH_2CH_2S$), 3.93 (s, 3H, $PhOCH_3$), 3.90 (s, 9H, $PhOCH_3$), 3.89 (s, 3H, $PhOCH_3$), 3.52 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, $OCH_2CH_2CH_2CH_2S$), 2.14~2.08 (m, $J=7.1$ Hz, 2H, $OCH_2CH_2CH_2CH_2S$), 1.95~1.89 (m, 2H, $OCH_2CH_2CH_2CH_2S$); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ : 174.0, 167.5, 164.2, 161.0, 158.8, 154.5, 153.1, 152.8, 145.2, 140.4, 140.1, 136.3, 129.3, 127.5, 126.0, 124.2, 109.4, 105.8, 96.0, 92.5, 71.0, 61.1, 56.5, 55.9, 34.0, 28.8, 25.8. HRMS (ESI) calcd for $C_{33}H_{31}ClN_4O_8S_2$ $[M+H]^+$ 711.1345, found 711.1339.

3.3 目标化合物的体外抑细菌活性测试

采用浊度法^[26], 以商品药剂噻菌铜和叶枯唑为对照药, 测试了目标化合物对 *Xoo*, *Xac* 和 *Psa* 的抑制活性.

配制营养肉汤培养基(NB): 5 g 蛋白胨、1 g 酵母粉、10 g 葡萄糖、3 g 牛肉膏和 1000 mL 蒸馏水, 并用质量分数为 20% NaOH 溶液调节 pH 至(7.2±0.2); 营养琼脂培养基(NA): 200 mL NB 液体培养基中加入 3.6 g 琼脂粉. 用接种环将三种细菌接种至 NA 固体培养基中, 并在 28 °C 恒温培养箱中培养出单菌落; 挑选适量单菌落加入到含有 NB 液体培养基中, 并在恒温摇床中振荡培养至对数生长期备用.

将化合物配制成 100 和 50 $\mu g/mL$, 分别取 190 μL 加入到 96 孔板中, 测试其 OD 值, 该值即为无菌培养基的 OD 值, 再取 10 μL 菌液加入 96 孔板中, 在 28 °C 下以 200 r/min 连续摇动孵育 36~48 h, 然后测其 OD 值.

校正 OD 值=含菌培养基 OD 值-无菌培养基 OD 值
抑制率(%)=(校正后对照培养基菌液 OD 值-校正后含药培养基菌液 OD 值)/校正后对照培养基菌液 OD 值×100%

3.4 目标化合物的抗 TMV 活性测试

3.4.1 目标化合物对 TMV 的治疗活性测试

对目标化合物的抗 TMV 活性测试采用半叶枯斑法^[27-28], 将心叶烟两边叶片撒上金刚砂, 用排笔蘸取 500 $\mu\text{g/mL}$ 的 TMV 病毒, 均匀的刷在两边的烟叶上, 0.5 h 后, 用毛笔蘸取待测化合物溶液(500 $\mu\text{g/mL}$), 均匀地涂抹在烟叶的右边. 晾干后, 移至 28 $^{\circ}\text{C}$ 环境中培养 2~3 d, 叶片出现明显的斑点后, 记录左右两边叶片上的斑点数, 利用公式计算抑制率.

3.4.2 目标化合物对 TMV 的保护活性测试

用毛笔蘸取待测化合物溶液(500 $\mu\text{g/mL}$)均匀地涂抹在烟叶的右边, 20~24 h 后, 用排笔蘸取 500 $\mu\text{g/mL}$ 的 TMV 病毒, 均匀地刷在两边的烟叶上, 移至 28 $^{\circ}\text{C}$ 环境中培养 2~3 d, 叶片出现明显的斑点后, 记录左右两边叶片上的斑点数, 利用公式计算抑制率.

3.4.3 目标化合物对 TMV 的钝化活性测试

将待测化合物溶液(1000 $\mu\text{g/mL}$)和 TMV 病毒(1000 $\mu\text{g/mL}$)等体积混合, 打匀混合液, 此混合液为钝化处理的 TMV (500 $\mu\text{g/mL}$)病毒. 静置 0.5 h 后, 用排笔蘸取纯 TMV 病毒(500 $\mu\text{g/mL}$)均匀地刷在左边叶片上, 再用排笔蘸取钝化处理的 TMV 病毒(500 $\mu\text{g/mL}$)均匀地刷在右边叶片上, 移至 28 $^{\circ}\text{C}$ 环境中培养 2~3 d, 叶片出现明显的斑点后, 记录左右两边叶片上的斑点数, 利用公式计算抑制率.

3.4.4 抗 TMV 活性测试的抑制率计算

以同叶左半叶作为空白对照, 宁南霉素作为药剂对照, 记录下每叶片左右斑点数, 如下公式计算其抗 TMV 活性的抑制率.

$$I = [(L - R) / L] \times 100\%$$

其中, I 为目标化合物抗 TMV 活性的抑制率; L 为左半叶的枯斑数, R 为右半叶的枯斑数.

3.4.5 微量热涌动实验

称取 $m(\text{mg}) = M(\text{相对分子量}) \times 4 / 1000$ 药于 200 μL 离心管(PE)中, 用 100 μL 二甲亚砜(DMSO)溶解, 再取 10 μL DMSO 溶解的药液于 200 μL PE 管中, 加入 190 μL 磷酸缓冲液(phosphate buffer saline, PBS), 打匀, 此管药液称为母液. 另取 16 个 200 μL PE 管, 编号 1~16. 取母液 10 μL 分别加入 1~2 号管中, 再取 10 μL SEC 缓冲溶液分别加入 2~16 号管中, 将 2 号管中 10 μL SEC 缓冲溶液和 10 μL 母液打匀, 打匀后吸取 10 μL 2 号管中的混合溶液于 3 号管中, 重复此操作一直到 16 号管, 16 号管打匀之后吸取 10 μL 混合溶液弃掉, 保证 1~16 号管中都有 10 μL 药液, 且浓度为梯度呈现.

向 1~16 号标记好的药液中分别加入 10 μL

TMV-CP 标记蛋白并打匀, 将 MST 专用毛细管吸满混合液, 按顺序对每根毛细管进行 MST 测量.

3.4.6 分子对接实验

首先利用 ChemBioDraw 画出目标化合物 A16 的 2D 结构, 再通过 ChemBio3D 将目标化合物分子 2D 结构转化为 3D 结构, 在 PDB 数据库中下载 TMV 病毒外壳蛋白至 3D 结构文件, 利用 PyMOL 去除 3D 结构中的水分子和小分子配体结构, 将上述结构转换为 PDBQT 文件, 并使用 AutoDock 软件进行分子对接.

3.4.7 X 单晶衍射实验

在化合物 A5 析出的晶体中挑选外观整洁、内部无杂质和裂缝且大小适宜的晶体进行单晶衍射实验, 将晶体置于单晶 X 射线衍射仪上, 在 273 K 下用 Mo K α 射线进行晶胞参数的测定和衍射数据的收集. 采集到的数据经结构解析确定分子结构, 采用 Olex-2.0 软件进行晶体结构解析, Mercury 软件处理获得晶体结构和晶胞堆积图.

辅助材料(Supporting Information) 提供了中间体和目标化合物的 ^1H NMR, ^{13}C NMR, HRMS 以及目标化合物 A5 的晶体数据. 这些材料可以免费从本刊网站 (<http://sioc-journal.cn/>) 上下载.

References

- [1] Pan, X. Y.; Xu, S.; Wu, J.; Luo, J. Y.; Duan, Y. B.; Wang, J. X.; Zhang, F.; Zhou, M. G. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2018**, *145*, 8.
- [2] Fan, Z. J.; Shi, J.; Luo, N.; Ding, M. H.; Bao, X. P. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 11598.
- [3] Jiang, S. C.; Tang, X.; Chen, M.; He, J.; Su, S. J.; Liu, L. W.; Xue, W. *Pest Manage. Sci.* **2019**, *76*, 853.
- [4] Mo, F.; Ma, J.; Yang, X.; Zhang, P.; Li, Q.; Zhang, J. *Phytomedicine* **2020**, 153223.
- [5] Zhang, J. H.; Wei, C. L.; Li, S. Y.; Hu, D. Y.; Song, B. A. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2020**, *167*, 104605.
- [6] Monchiero, M.; Gullino, M. L.; Pugliese, M.; Spadaro, D.; Garibaldi, A. *Plant Pathol.* **2015**, *44*, 13.
- [7] Chen, L. J.; Li, P.; Wang, X. B.; Ruan, X. H.; Xue, W. *Chemistry* **2017**, *80*, 1156 (in Chinese). (陈丽娟, 李普, 王晓斌, 阮祥辉, 薛伟, 化学通报, **2017**, *80*, 1156.)
- [8] Xue, W.; Gong, H. Y.; Qiu, Q. J.; Zhao, H. J.; Li, H. C.; Han, F. F. *Chem. Reag.* **2013**, *35*, 201 (in Chinese). (薛伟, 龚华玉, 仇秋娟, 赵洪菊, 李海畅, 韩菲菲, 化学试剂, **2013**, *35*, 201.)
- [9] Ruan, X. H.; Zhang, C.; Jiang, S. C.; Guo, T.; Xia, R. J.; Chen, Y.; Tang, X.; Xue, W. *Molecules* **2018**, *23*, 3132.
- [10] Zhong, X. M.; Wang, X. B.; Chen, L. J.; Ruan, X. H.; Li, Q.; Zhang, J. P.; Chen, Z.; Xue, W. *Chem. Cent. J.* **2017**, *11*, 106.
- [11] Huang, M. G.; Ruan, X. H.; Zhang, J. P.; Li, Q.; Wang, Y. H.; Chen, L. J.; Zhang, C.; Li, P. *Chin. J. Org. Chem.* **2017**, *37*, 2145 (in Chinese). (黄民国, 阮祥辉, 张菊平, 李琴, 王一会, 陈丽娟, 张橙, 李普, 有机化学, **2017**, *37*, 2145.)
- [12] Jiang, S. C.; Su, S. J.; Chen, M.; Peng, F.; Zhou, Q.; Liu, L. W.; Xue, W. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 5641.
- [13] Qiu, S. S.; Jiang, C. C.; Huang, Y.; Zhou, R. J. *Chin. J. Struct.*

- Chem.* **2017**, *36*, 416.
- [14] Wang, S. J.; Tong, Y.; Lu, S.; Yang, R.; Liao, X.; Xu, Y. F.; Li, X. *Planta Med.* **2010**, *76*, 1492.
- [15] Jiang, M.; Zhu, M.; Wang, L.; Yu, S. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *120*, 109506.
- [16] Peng, F.; Liu, T. T.; Wang, Q. F.; Liu, F.; Cao, X.; Yang, J. S.; Liu, L. W.; Xie, C. W.; Xue, W. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69*, 11085.
- [17] Lin, L.; Liu, H.; Wang, D. J.; Hu, Y. J.; Wei, X. H. *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* **2018**, *31*, 481.
- [18] Badr, S. M.; Barwa, R. M. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 4506.
- [19] Zhao, B.; Fan, S. J.; Fan, Z. J.; Wang, H. X.; Zhang, N. L.; Guo, X. F.; Yang, D. Y.; Wu, Q. F.; Yu, B.; Zhou, S. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 12439.
- [20] Lv, X. Y.; Yang, L.; Fan, Z. J.; Bao, X. P. *J. Saudi Chem. Soc.* **2018**, *22*, 101.
- [21] Wu, S. K.; Shi, J.; Chen, J. X.; Hu, D. Y.; Zang, L. S.; Song, B. A.; *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69*, 4645.
- [22] Chen, Y.; Li, P.; Chen, M.; Su, S. J.; He, J.; Zhang, M.; Liu, L. W.; Xue, W. *Chin. J. Org. Chem.* **2019**, *39*, 2813 (in Chinese).
(陈英, 李普, 陈梅, 苏时军, 贺军, 张敏, 柳立伟, 薛伟, 有机化学, **2019**, *39*, 2813.)
- [23] Zhang, C.; Jiang, S. C.; Chen, Y.; Guo, T.; Xia, R. J.; Tang, X.; Chen, L. J.; He, M.; Xue, W. *Chin. J. Org. Chem.* **2019**, *39*, 1160 (in Chinese).
(张橙, 蒋仕春, 陈英, 郭涛, 夏榕娇, 汤旭, 陈丽娟, 贺鸣, 薛伟, 有机化学, **2019**, *39*, 1160.)
- [24] Wang, L.; Zhou, X.; Lu, H.; Mu, X. F.; Jin, L. H. *Molecules* **2020**, *25*, 1488.
- [25] Li, P.; Chen, Y.; Xia, R. J.; Guo, T.; Zhang, M.; Jiang, S. C.; Tang, X.; He, M.; Xue, W. *Chem. J. Chin. Univ.* **2019**, *40*, 909 (in Chinese).
(李普, 陈英, 夏榕娇, 郭涛, 张敏, 蒋仕春, 汤旭, 贺鸣, 薛伟, 高等学校化学学报, **2019**, *40*, 909.)
- [26] Su, S. J.; Zhou, Q.; Tang, X. M.; Peng, F.; Liu, T. T.; Liu, L. W.; Xie, C. W.; He, M.; Xue, W. *Monatsh. Chem.* **2021**, *152*, 345.
- [27] Guo, T.; Xia, R. J.; Liu, T. T.; Peng, F.; Tang, X. M.; Zhou, Q.; Luo, H.; Xue, W. *Chem. Biodiversity* **2020**, *17*, e2000025.
- [28] Tang, X.; Zhang, C.; Chen, M.; Xue, Y. N.; Liu, T. T.; Xue, W. *New J. Chem.* **2020**, *44*, 2374.

(Lu, Y.)