

新型 2-氰基丙烯酸酯(酰胺)类衍生物的设计合成及杀线虫活性研究

王 余 陈艺方 罗 鑫 邢志富 彭 菊 陈吉祥*

(贵州大学绿色农药与农业生物工程国家重点实验室培育基地 教育部绿色农药与
农业生物工程重点实验室 贵阳 550025)

摘要 为了寻找新颖和高效的杀线虫剂,设计合成了 28 个 2-氰基丙烯酸酯(酰胺)类衍生物,并通过 ^1H NMR, ^{13}C NMR 和高分辨质谱(HRMS)对所有目标化合物结构进行了确证。(E)-3-(4-氯苯基)-2-氰基丙烯酸乙酯(**3f**)的构型通过 X 射线单晶衍射方法确认。杀线虫活性测试结果显示,在 100 mg/L 浓度下处理 72 h 后,所有目标化合物对南方根结线虫、水稻干尖线虫和甘薯茎线虫(二龄幼虫)均具有一定的杀线虫活性。其中,(E)-2-氰基-3-(4-氟苯基)丙烯酸乙酯(**3i**)和(E)-2-氰基-3-(呋喃-2-基)丙烯酸乙酯(**3n**)对南方根结线虫的 LC_{50} 分别为 24.58 和 32.13 mg/L。(E)-3-[4-(2-((3-氯-5-(三氟甲基)吡啶-2-基)氧基)乙氧基)苯基]-2-氰基丙烯酸乙酯(**17a**)对水稻干尖线虫和甘薯茎线虫的 LC_{50} 分别为 31.97 和 38.26 mg/L,明显优于对照药剂 Tioxazafen (48.95 和 74.95 mg/L)。此外,化合物 **3i** 可以显著促进南方根结线虫体内活性氧(ROS)的产生、脂褐素和脂质的积累,表明化合物 **3i** 可能通过促进线虫的氧化应激最终导致线虫死亡。化合物 **3i** 可以作为先导化合物来开发新型杀线虫剂。

关键词 2-氰基丙烯酸酯; 酰胺; 杀线虫活性; 南方根结线虫; 水稻干尖线虫; 甘薯茎线虫; 氧化应激

Design, Synthesis and Nematicidal Activity of Novel 2-Cyanoacrylate (Amide) Derivatives

Wang, Yu Chen, Yifang Luo, Xin Xing, Zhifu Peng, Ju Chen, Jixiang*

(Key Laboratory of Green Pesticide and Agricultural Bioengineering, State Key Laboratory Breeding Base of Green Pesticide and Agricultural Bioengineering, Ministry of Education, Guizhou University, Guiyang 550025)

Abstract To find novel and efficient nematicides, 28 2-cyanoacrylate (amide) derivatives were designed and synthesized. The structures of all target compounds were confirmed by ^1H NMR, ^{13}C NMR, and high-resolution mass spectra (HRMS). The configuration of ethyl (E)-3-(4-chlorophenyl)-2-cyanoacrylate (**3f**) was confirmed by X-ray single crystal diffraction. The results of nematicidal activities test showed that all the target compounds had certain nematicidal activities against *Meloidogyne incognita*, *Aphelenchoides besseyi*, and *Ditylenchus destructor* (second-stage juveniles) after 72 h of treatment at 100 mg/L. Among them, the LC_{50} s of ethyl (E)-2-cyano-3-(4-fluorophenyl)acrylate (**3i**) and ethyl (E)-2-cyano-3-(furan-2-yl)acrylate (**3n**) against *Meloidogyne incognita* for 72 h were 24.58 and 32.13 mg/L, respectively. The LC_{50} s of ethyl (E)-3-(4-(2-((3-chloro-5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl)oxy)ethoxy)phenyl)-2-cyanoacrylate (**17a**) against *A. besseyi* and *D. destructor* were 31.97 and 38.26 mg/L, respectively, which were significantly better than that of the control agent Tioxazafen (48.95 and 74.95 mg/L). In addition, compound **3i** could significantly promote the production of reactive oxygen species (ROS) and the accumulation of lipofuscin and lipid in *M. incognita*, which indicated that compound **3i** might promote oxidative stress of *M. incognita* and eventually lead to the death of nematodes. Compound **3i** can be used as a lead compound to develop novel nematicides.

Keywords 2-cyanoacrylate; amide; nematicidal activity; *Meloidogyne incognita*; *Aphelenchoides besseyi*; *Ditylenchus destructor*; oxidative stress

植物病原线虫具有传播迅速、寄主广泛和危害严重等特点,每年在全球造成的损失达 1570 亿美元,是导致

农作物减产最为主要的害虫之一^[1-2]。根结线虫寄主广泛,可寄生的植物超过 5500 种,主要浸染寄主根系,给

* Corresponding author. E-mail: jxchen@gzu.edu.cn

Received August 20, 2022; revised October 3, 2022; published online December 21, 2022.

Project supported by the Natural Science Foundation of Guizhou Province (No. QKHJC-ZK[2022]039) and the Natural Science Foundation of Guizhou University (No. (2021)01).

贵州省自然科学基金(No. QKHJC-ZK[2022]039)和贵州大学自然科学基金(No. (2021)01)资助项目。

粮食、蔬菜等经济作物造成巨大损失^[3], 其中危害最为严重的是南方根结线虫。此外, 水稻干尖线虫和甘薯茎线虫也对农作物造成严重危害^[4-5]。线虫的防治一直以来都是农业生产上的难题, 目前建立的线虫防治体系主要包括种子预防处理、作物轮作、物理防治、生物防治以及化学防治^[6-7], 其中化学防治是最主要且有效的防治手段之一。全球杀线虫剂数量少, 研究投入不够, 真正能够长期使用的高效杀线虫剂品种少^[8]。传统有机磷和氨基甲酸酯类杀线虫剂的长期使用会增加线虫的抗药性, 且剧毒类杀线虫剂已不再适应现代农业的发展需求^[9-11]。因此, 研究和开发高效安全的新型杀线虫剂是线虫防控领域中一个亟待解决的问题。

酯类化合物普遍存在于植物中, 如欧芹、无花果和瑞香狼毒等, 具有良好的杀线虫活性, 受到人们的广泛关注^[12-14]。研究发现, 2-氰基丙烯酸酯类化合物对线虫也表现出优异的致死活性, 如 2-氰基丙烯酸甲酯类化合物 **1** 和 **2** 对南方根结线虫表现出良好的毒杀活性^[15-16]。近年来, 许多芳基甲酰胺类化合物被设计合成用于杀线虫活性的研究, 以期发现潜在的候选杀线虫剂^[17]。例如, 氟吡菌酰胺(Fluopyram)能够选择性地抑制线粒体呼吸链的复合体 II, 致使线虫细胞能量迅速耗尽, 最终导致线虫死亡^[18-19]。此外, 由杜邦公司开发的广谱杀线虫剂三氟咪唑啉酰胺(Fluazaindolizine)也含有酰胺结构^[20]。由此可见, 酰胺结构也是杀线虫剂创制中的重要活性基团。

基于此, 合成并筛选了一些 2-氰基丙烯酸酯类化合物的杀线虫活性, 发现该类化合物对南方根结线虫具有很好的杀线虫活性, 然后保留其 2-氰基丙烯基部分, 并将酯结构替换为酰胺键基团, 共设计合成了 28 个 2-氰基丙烯酸酯(酰胺)类化合物。采用浸虫法测定所有目标

化合物对南方根结线虫、水稻干尖线虫和甘薯茎线虫的离体杀线虫活性, 并以南方根结线虫为研究对象, 评价目标化合物对线虫空泡化现象、卵孵化率及氧化应激指标的影响。

1 结果与讨论

1.1 化合物 3a~3n, 6a~6b 和 7a~7c 的合成

化合物 **3a~3n**, **6a~6b** 和 **7a~7c** 的合成路线如 Scheme 1 所示。以取代芳基甲醛(**1**)和氰基乙酸乙酯(**2**)为起始原料, 以 *N*-甲基哌啶为催化剂, 在乙醇中回流反应生成化合物 **3a~3n**, 化合物 **3a~3n** 与氢氧化钠发生水解后再酸化生成中间体 **4**, 中间体 **4** 在氯化亚砷中回流生成中间体 **5**, 最后中间体 **5** 与取代乙醇或取代乙胺反应得到化合物 **6a~6b** 和 **7a~7c**。

1.2 化合物 11a~11h 和 17a~17b 的合成

通过醚键连接不同的活性基团以进一步拓宽 2-氰基丙烯酸酯类化合物的类型, 最终合成了化合物 **11a~11h** 和 **17a~17b**, 合成路线如 Scheme 2 所示。首先, 取代 4-羟基苯甲醛(**8**)与活性氯取代化合物 **9** 反应生成中间体 **10**, 中间体 **10** 再与氰基乙酸乙酯或氰基乙酸丁酯反应生成化合物 **11a~11g**; 然后 1,2-二溴乙烷(**13**)分别与 4-羟基苯甲醛(**12**)和 3-氯-5-(三氟甲基)吡啶-2-醇(**15**)经两次取代反应生成中间体 **16**, 中间体 **16** 再与氰基乙酸乙酯或氰基乙酸丁酯反应生成化合物 **17a~17b**。

1.3 目标化合物的谱图分析

所有目标化合物结构均通过 ¹H NMR, ¹³C NMR 和 HRMS 确证。以化合物 **6b**(图 2)为例进行分析, 从 ¹H NMR 谱图可以看出, δ 8.20 (s, 1H) 为 8 位 CH 的吸收峰, δ 8.02 (d, $J=8.9$ Hz, 2H) 为 3 位和 5 位化学等价 CH 的吸

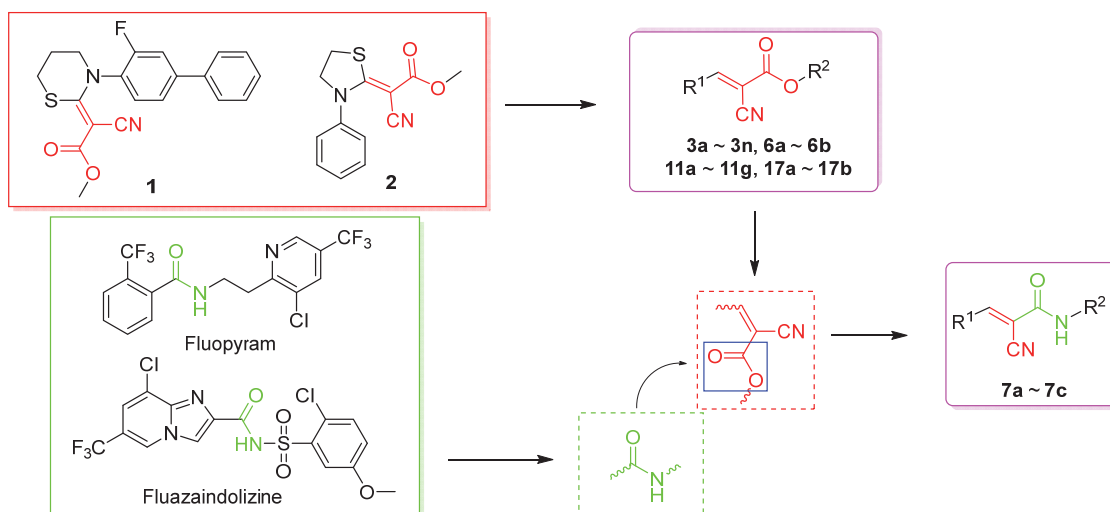
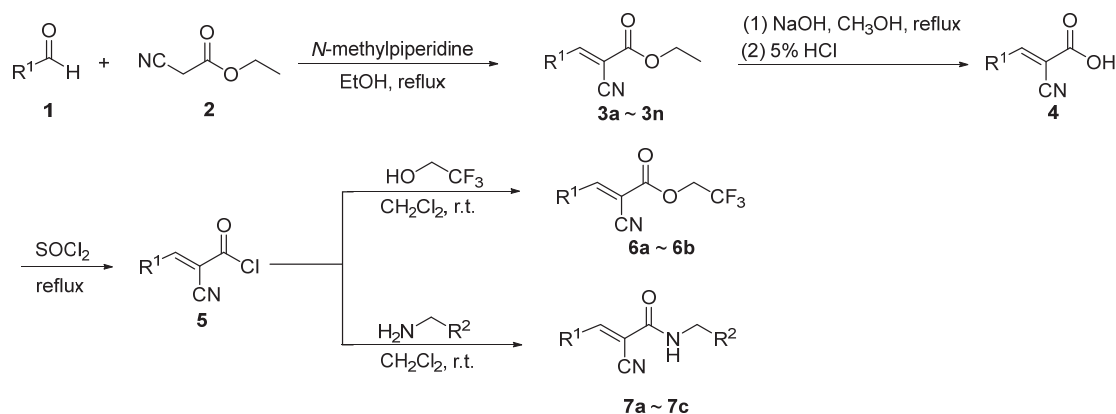
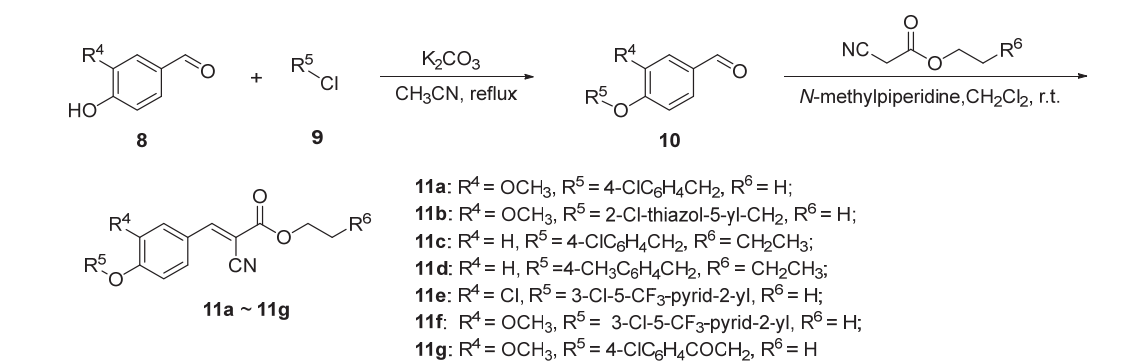


图 1 目标化合物的设计
Figure 1 Design of target compounds



图式 1 化合物 3a~3n, 6a~6b 和 7a~7c 的合成路线
 Scheme 1 Synthetic route of compounds 3a~3n, 6a~6b and 7a~7c



图式 2 化合物 11a~11g 和 17a~17b 的合成路线
 Scheme 2 Synthetic route of compounds 11a~11g and 17a~17b

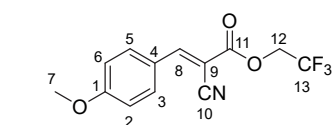


图 2 化合物 6b 的结构
 Figure 2 Structure of compound 6b

收峰, δ 6.99 (d, $J=8.9$ Hz, 2H) 为 2 位和 6 位 CH 的吸收信号, δ 4.66 (q, $J=8.3$ Hz, 2H) 为 12 位 CH₂ 的吸收峰, δ 3.89 为 7 位 CH₃ 的吸收峰. 在 ¹³C NMR 谱图中, δ 164.58 为 11 位羰基的吸收峰, δ 162.01 为 C₁ 的吸收峰, δ 156.33 为 C₈ 的吸收峰, δ 134.34 为 3 位和 5 位两个化学等价碳的吸收峰, δ 124.07 属于 C₄ 的吸收峰, δ 122.69 (q, $^1J_{FC}=$

277.4 Hz)为13位三氟甲基上碳的吸收峰, δ 115.05是2位和6位两个化学等价碳的吸收峰, δ 97.22属于C₉的吸收峰, δ 61.53 (q, $^2J_{\text{FC}}=37.2$ Hz)属于C₁₂的吸收峰, δ 55.82是7位甲基上碳的吸收峰. HRMS (ESI) C₁₃H₁₀F₃NO₃ [M+H]⁺计算值为286.0674, 测试值为286.0686.

1.4 目标化合物的离体杀线虫活性

所有目标化合物施药72 h后对二龄南方根结线虫、水稻干尖线虫和甘薯茎线虫的离体杀线虫活性见表1. 由测试结果可知, 在100 mg/L浓度下, 所有目标化合物对以上三种线虫都具有一定的毒杀活性. 其中化合物**3f**、**3g**、**3i**、**3l**和**3n**在100 mg/L浓度下对南方根结线虫的毒杀活性大于90%, **3i**在50 mg/L浓度下仍然具有98.2%的活性, 略低于氟吡菌酰胺. 此外, 化合物**17a**在100 mg/L浓度下对水稻干尖线虫和甘薯茎线虫的致死率均为100%, 当浓度降低为50 mg/L时仍具有89.3%和83.6%的活性, 优于Tioxazafen (62.9%和46.7%).

选取初筛活性较好的目标化合物进一步测定其对

相应线虫的半数致死浓度(LC₅₀), 结果见表2和表3. 由测试结果可知, **3i**和**3n**对二龄南方根结线虫的LC₅₀分别为24.58和32.13 mg/L, 虽低于对照药剂氟吡菌酰胺(3.16 mg/L), 仍表现出不俗的杀线虫活性. **17a**对水稻干尖线虫和甘薯茎线虫的LC₅₀分别为31.97和38.58 mg/L, 优于对照药剂Tioxazafen (37.03和67.53 mg/L).

初步构效关系分析发现, 化合物对水稻干尖线虫和甘薯茎线虫的毒杀活性与其结构没有明显的规律, 但2-氰基丙烯酸酯类化合物对南方根结线虫的毒杀活性整体上优于氰基丙烯酸酰胺类化合物, 如**6a**>**7a**, **6b**>**7c**. 2-氰基丙烯酸酯和2-氰基丙烯酸酰胺类化合物的杀线虫活性之间的差异可能与它们的内吸性和代谢有关. 此外, 2-氰基丙烯酸酯类化合物对南方根结线虫的毒杀活性与取代基的种类和位置有关. 当R¹为苯环取代时, 杀线虫活性高于吡啶环, 如**3f**、**3g**、**3i**和**3l**的活性明显高于**3a**、**3b**、**3c**和**3d**. 而R¹为呋喃环取代时活性高于其它杂环, 例如**3n**的活性大于**3e**、**3k**和**3m**. 三氟甲基的引

表1 目标化合物对三种线虫的离体杀线虫活性(校正死亡率/% , 72 h)

Table 1 *In vitro* nematicidal activity (corrected mortality rate/% , 72 h) of target compounds against three nematodes

化合物	南方根结线虫		水稻干尖线虫		甘薯茎线虫	
	50 mg/L	100 mg/L	50 mg/L	100 mg/L	50 mg/L	100 mg/L
3a	56.0±5.5	71.2±3.0	6.3±2.5	11.4±2.2	14.4±2.3	17.3±3.5
3b	56.6±4.7	62.8±6.7	0	7.8±2.1	7.8±0.7	13.5±2.1
3c	45.8±4.5	54.9±1.4	0	9.6±2.4	0	8.4±2.0
3d	47.0±3.4	67.0±6.8	0	8.3±2.7	11.5±3.0	14.5±0.9
3e	48.5±3.6	74.6±1.2	5.2±1.4	20.3±1.9	18.3±4.6	31.0±0.8
3f	32.8±2.1	95.5±4.0	10.2±2.3	59.7±5.9	0	11.5±1.1
3g	42.2±7.3	92.5±2.2	29.7±1.5	53.9±7.0	6.5±1.2	17.3±3.0
3h	61.2±2.3	75.8±7.5	26.2±2.8	33.4±5.2	0	8.7±3.2
3i	98.2±0.7	100	6.3±0.6	20.3±4.0	9.4±2.4	11.9±4.1
3j	54.9±2.3	65.7±5.0	14.7±2.7	50.9±4.4	8.5±2.1	12.7±3.4
3k	30.9±3.2	57.0±2.3	16.8±5.5	38.8±3.1	5.9±2.9	24.1±2.8
3l	50.2±4.8	93.0±1.4	30.7±2.7	77.2±4.9	9.0±2.2	23.1±4.6
3m	14.2±3.6	26.4±3.1	46.4±7.4	96.7±1.0	0	9.9±1.6
3n	82.2±3.7	96.3±0.5	20.2±2.4	32.2±4.6	0	13.7±1.4
6a	40.0±4.7	83.7±3.5	0	8.1±3.2	12.8±2.3	22.1±1.4
6b	33.2±1.3	54.9±4.1	15.5±4.2	29.3±4.3	11.1±2.4	16.9±1.4
7a	22.8±4.8	39.3±2.7	0	11.5±2.5	15.1±9.6	21.1±1.7
7b	9.9±3.2	33.3±9.1	13.0±2.9	19.4±3.2	15.5±3.4	19.3±3.9
7c	12.1±2.1	21.2±2.2	0	13.1±2.3	10.8±4.4	16.0±1.2
11a	11.0±4.6	22.5±3.9	0	8.6±2.2	7.8±1.0	14.3±1.4
11b	10.7±6.2	17.5±1.4	8.2±2.2	13.7±1.6	8.5±2.8	21.4±2.5
11c	4.8±1.3	11.6±1.5	0	10.2±2.9	7.4±2.6	13.5±1.6
11d	13.2±3.9	22.4±1.7	6.1±2.1	14.8±1.6	0	12.4±1.4
11e	27.5±7.3	37.1±8.9	6.8±2.6	15.2±1.8	6.3±1.0	16.7±0.6
11f	17.8±0.7	30.8±6.6	0	10.4±2.3	0	10.5±1.7
11g	29.7±3.8	39.5±5.8	5.6±2.0	14.6±2.7	12.7±2.0	20.7±2.6
17a	6.9±0.3	38.5±4.0	89.3±4.6	100	83.6±5.8	100
17b	12.6±1.4	34.4±3.3	20.3±3.7	29.9±2.4	10.5±1.5	14.9±2.6
氟吡菌酰胺	100	100	100	100	100	100
Tioxazafen			62.9±7.4	93.4±2.1	46.7±7.4	90.0±2.1

表2 化合物 **3i** 和 **3n** 对南方根结线虫的 LC₅₀ 值(72 h)
Table 2 LC₅₀ values of compounds **3i** and **3n** against *Meloidogyne incognita* (72 h)

化合物	$y=ax+b$	LC ₅₀ /(mg·L ⁻¹)	R ²	化合物	$y=ax+b$	LC ₅₀ /(mg·L ⁻¹)	R ²
3i	$y=1.92x+2.33$	24.58±1.22	0.96	氟吡菌酰胺	$y=1.92x+4.04$	3.16±0.62	0.95
3n	$y=3.59x-0.41$	32.13±1.57	0.97				

表3 目标化合物 **17a** 对水稻干尖线虫和甘薯茎线虫的 LC₅₀ 值(72 h)
Table 3 LC₅₀ values of compound **17a** against *Aphelenchoides besseyi* christie and *Ditylenchus destructor*(72 h)

化合物	水稻干尖线虫			甘薯茎线虫		
	$y=ax+b$	LC ₅₀ /(mg·L ⁻¹)	R ²	$y=ax+b$	LC ₅₀ /(mg·L ⁻¹)	R ²
17a	$y=3.13x+0.29$	31.97±3.27	0.91	$y=2.49x+1.05$	38.58±2.39	0.99
氟吡菌酰胺	$y=3.13x+6.98$	0.23±0.03	0.93	$y=1.58x+6.01$	0.23±0.05	0.94
Tioxazafen	$y=1.97x+1.91$	37.03±2.60	0.95	$y=2.17x+1.03$	67.53±9.43	0.99

入会降低化合物的活性, 如 **6b**>**3g**, **3i**>**3h**. 当 R¹ 为苯环取代时, 在苯环的对位引入取代基有利于化合物活性的提高(**3g**>**3j**), 且取代基的吸供电子性质与化合物的活性无明显关系(**3g** vs. **3f**、**3h**、**3i** 和 **3l**); 当苯环的对位取代基为卤素时, 化合物对南方根结线虫的活性随取代基电负性的增强而增加, 例如 **3i**>**3f**>**3l**.

1.5 化合物 **3i** 对南方根结线虫体内空泡化现象的影响

在没有外部供能的情况下, 南方根结线虫将通过消耗自身肠道内的颗粒状脂肪获取能量, 其体内会逐渐出现空泡^[21], 而有的化合物可以在短时间内杀死线虫或者破坏线虫的正常耗能程序, 从而抑制这种空泡化现象的出现^[22]. 为了测试目标化合物对南方根结线虫空泡化现象的影响, 以化合物 **3i** 为受试化合物, 施药 72 h 后观察不同处理组线虫的生理状态并拍照, 结果见图 3. 由结果可知, 当浓度为 100 mg/L 时, 线虫体内的空泡化程度极低, 甚至部分线虫没有出现空泡, 而降低浓度后, 线虫体内的空泡逐渐增加. 这表明 **3i** 可以显著抑制南方根结线虫体内空泡的形成, 抑制效果随浓度的增大而增加.

1.6 化合物 **3i** 对南方根结线虫虫卵孵化率的影响

卵孵化率是决定线虫繁殖速度的关键因素, 而抑制卵孵化是有效驱虫剂的一种重要标志^[23]. 为了探究化

合物对南方根结线虫虫卵孵化率的影响, 将 **3i** 设置为不同浓度的受试液, 作用于虫卵 7 d 后, 统计不同处理组虫卵的孵化情况并计算孵化率, 结果见图 4. 由结果可知, 高浓度 **3i** 可以显著抑制南方根结线虫虫卵的孵化, 且孵化率与 **3i** 的剂量有关.

1.7 化合物 **3i** 对南方根结线虫氧化应激指标的影响

与氧化应激有关的 ROS 产生、脂褐素和脂质积累是环境污染物毒性效应的主要机制^[24]. 以氧化应激为指标, 检测了不同浓度的 **3i** 作用南方根结线虫 72 h 后线虫体内 ROS 的产生、脂褐素和脂质积累的情况, 结果见图 5 和图 6. 与阴性对照(CK)相比, 不同浓度的 **3i** 显著增加了南方根结线虫体内 ROS 的产生、脂褐素和脂质的积累, 且这些生化指标与 **3i** 的浓度呈正相关, 表明 **3i** 可能通过促进线虫的氧化应激从而导致线虫死亡.

2 结论

设计合成了 28 个 2-氰基丙烯酸酯(酰胺)类衍生物 (21 个为新化合物), 并测试了所有目标化合物对三种植物病原线虫的离体杀线虫活性. 活性测试结果表明, 化合物 **3i** 和 **3n** 对二龄南方根结线虫的 LC₅₀ 分别为 24.58 和 32.13 mg/L, 化合物 **17a** 对二龄水稻干尖线虫和甘薯茎线虫的 LC₅₀ 分别为 31.97 和 38.26 mg/L. 对南方根结

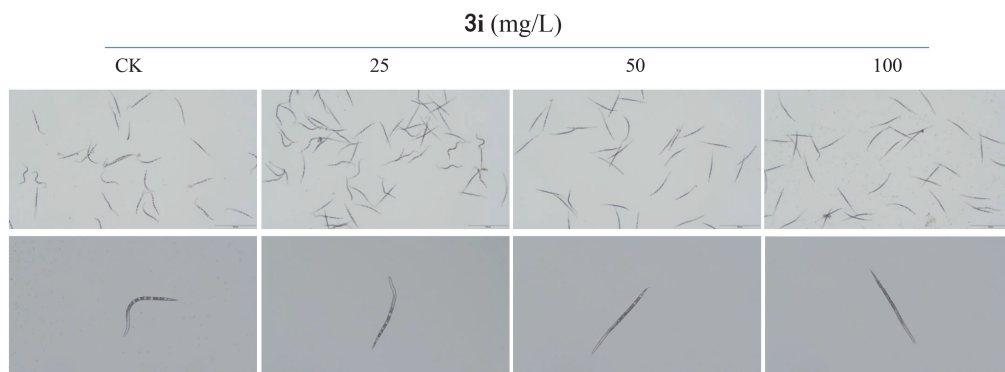


图3 化合物 **3i** 对南方根结线虫空泡化的影响
Figure 3 Effect of compound **3i** on cavitation of *Meloidogyne incognita*

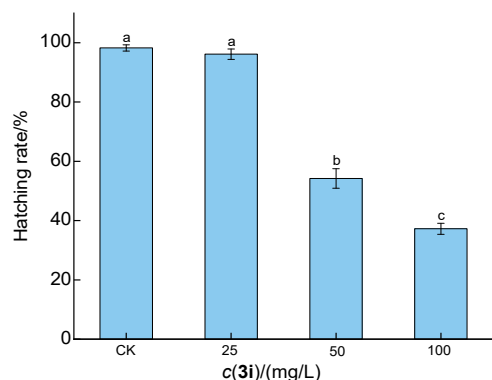


图4 化合物 **3i** 对南方根结线虫卵孵化率的影响

Figure 4 Effect of compound **3i** on the hatching rate of the eggs of *Meloidogyne incognita*

线虫体内空泡化现象及虫卵孵化率的测定实验表明, 高浓度的 **3i** 可以有效抑制南方根结线虫空泡的形成和虫卵的孵化. 与氧化应激指标相关的染色实验显示, 化合物 **3i** 可以显著增加南方根结线虫体内 ROS 的产生、脂褐素和脂质的积累, 表明化合物 **3i** 可能通过促进线虫体内的氧化应激从而导致线虫死亡. 以上结果表明 2-氰基丙烯酸酯类化合物 **3i** 可以作为杀线虫剂开发的先导化合物.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

在 254 nm 紫外光下, 通过硅胶 GF254 上显示的薄

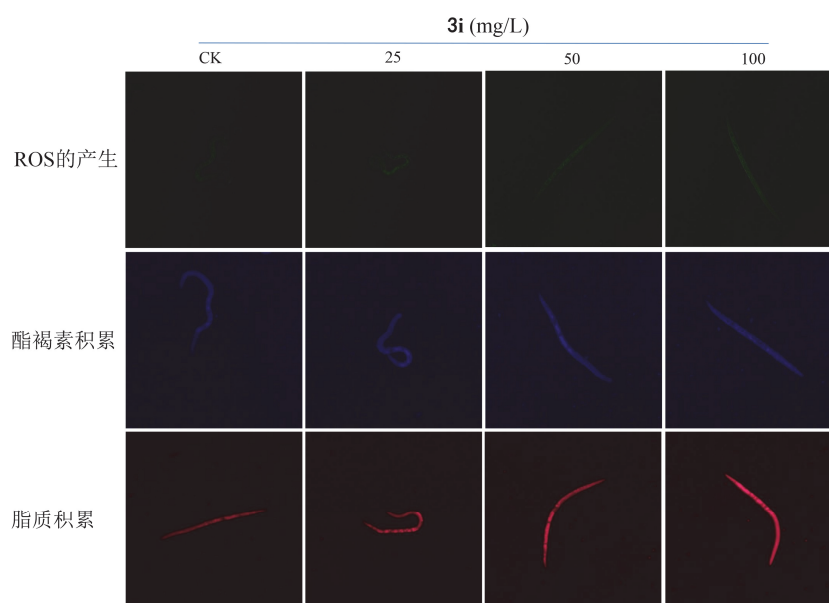


图5 化合物 **3i** 对南方根结线虫氧化应激指标的影响

Figure 5 Effect of compound **3i** on oxidative stress of *Meloidogyne incognita*

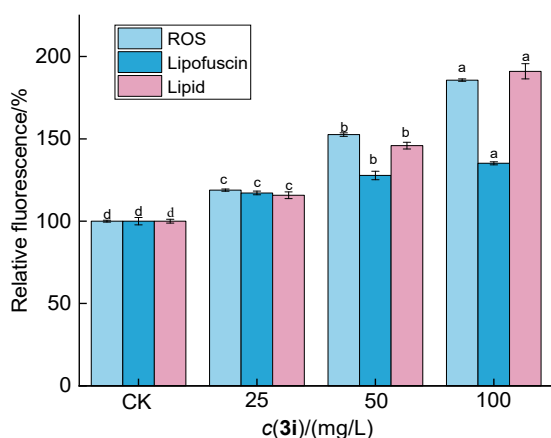


图6 相对于 CK 的 ROS、脂褐素和脂质荧光量百分比变化

Figure 6 Percentage changes of ROS, lipofuscin and lipid fluorescence relative to CK

层色谱(TLC)监测反应过程; 使用 XT-4 双目显微镜(中国北京泰克仪器有限公司)测量化合物熔点; 以四甲基硅烷(TMS)为内标, 氘代氯仿或氘代二甲基亚砜为溶剂, 在 Bruker Ascend-400 光谱仪(德国布鲁克)上进行 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 检测; 使用 Sarforius 型电子天平(精度: 1/10000 g)称量药品; SW-CJ-1D 超净工作台(苏州净化); LDZX-50KB 高压灭菌锅(上海中安医疗器械厂); 生化培养箱(上海跃进医疗器械有限公司, 中国上海); BX41 体式显微镜(奥林巴斯, 日本); 荧光显微镜(奥林巴斯 TH4-200, 日本); TGL-16C 离心机(上海安亭科学仪器). 所用试剂除特殊说明外均为市售化学纯或分析纯.

3.2 实验方法

中间体 **4**, **5**, **10**, **14** 和 **16** 参照文献[25]方法制备.

3.2.1 化合物 **3a~3n**, **11a~11g** 和 **17a~17b** 的合成

向 25 mL 三口烧瓶中依次加入取代芳醛 **1** (2.68 mmol)、氰基乙酸乙酯(8.06 mmol)和 6 mL 无水乙醇(正丁醇), 室温下充分搅拌溶解, 然后向上述体系中滴加 5 滴 1-甲基哌啶, 加热回流约 10 h, TLC 监测反应进程。反应结束后, 待冷却至室温, 向其加入 30 mL 水, 乙酸乙酯(30 mL×3)萃取, 合并有机相, 无水硫酸镁干燥, 减压脱溶后柱层析分离纯化(石油醚/乙酸乙酯, $V:V=10:1\sim2:1$)得化合物 **3a~3n**。化合物 **11a~11g**, **17a~17b** 也按照此步骤合成。

(*E*)-3-(3-溴吡啶-4-基)-2-氰基丙烯酸乙酯(**3a**): 白色固体, 产率 56.2%. m.p. 76~77 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.98 (s, 1H, Ar-H), 8.79 (d, $J=5.0$ Hz, 1H, Ar-H), 8.40 (s, 1H, CH=C(CN)), 7.89 (d, $J=5.0$ Hz, 1H, Ar-H), 4.37 (q, $J=7.1$ Hz, 2H, CH₂), 1.32 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, CH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 160.8, 152.8, 151.8, 149.7, 140.0, 123.9, 121.9, 114.3, 111.1, 63.5, 14.4. HRMS (ESI) calcd for C₁₁H₈O₂N₂Br [M+H]⁺ 278.9776, found 278.9763.

(*E*)-3-(5-溴吡啶-3-基)-2-氰基丙烯酸乙酯(**3b**): 白色固体, 产率 58.7%. m.p. 113~114 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.17 (d, $J=1.7$ Hz, 1H, Ar-H), 8.98 (d, $J=2.1$ Hz, 1H, Ar-H), 8.72 (t, $J=2.0$ Hz, 1H, Ar-H), 8.54 (s, 1H, CH=C(CN)), 4.41 (q, $J=7.1$ Hz, 2H, CH₂), 1.38 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, CH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 161.5, 153.9, 151.1, 150.2, 139.4, 129.9, 120.8, 115.5, 106.9, 63.2, 14.4. HRMS (ESI) calcd for C₁₁H₈O₂N₂Br [M+H]⁺ 278.9776, found 278.9763.

(*E*)-3-(6-氯吡啶-3-基)-2-氰基丙烯酸乙酯(**3c**): 白色固体, 产率 66.1%. m.p. 113~114 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.95 (d, $J=2.5$ Hz, 1H, Ar-H), 8.53 (d, $J=8.5$, 2.6 Hz, 1H, Ar-H), 8.50 (s, 1H, CH=C(CN)), 7.81 (d, $J=8.5$ Hz, 1H, Ar-H), 4.34 (q, $J=7.1$ Hz, 2H, CH₂), 1.32 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, CH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 161.7, 154.1, 153.2, 151.3, 139.9, 127.6, 125.5, 115.6, 106.0, 63.1, 14.4. HRMS (ESI) calcd for C₁₁H₁₀O₂N₂Cl [M+H]⁺ 237.0425, found 237.0425.

(*E*)-2-氰基-3-(2-甲氧基吡啶-3-基)丙烯酸乙酯(**3d**): 白色固体, 产率 69.4%. m.p. 67~68 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.43 (dd, $J=8.1$, 6.4 Hz, 2H, Ar-H), 8.41 (s, 1H, CH=C(CN)), 7.25~7.20 (m, 1H, Ar-H), 4.32 (q, $J=7.1$ Hz, 2H, CH₂), 3.98 (s, 3H, OCH₃), 1.30 (dd, $J=8.4$, 5.8 Hz, 3H, CH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 161.9, 152.4, 148.5, 138.4, 118.1, 115.6, 114.9, 105.0, 63.0, 54.6, 14.4. HRMS (ESI) calcd for C₁₂H₁₃O₃N₂ [M+

H]⁺ 233.0921, found 233.0920.

(*E*)-3-(2-氯噻唑-4-基)-2-氰基丙烯酸乙酯(**3e**): 白色固体, 产率 73.2%. m.p. 124~125 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.68 (s, 1H, CH=C(CN)), 8.56 (s, 1H, Ar-H), 4.31 (q, $J=7.1$ Hz, 2H, CH₂), 1.30 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, CH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 161.6, 158.6, 160.0, 145.4, 134.0, 115.9, 102.9, 63.0, 14.4. HRMS (ESI) calcd for C₉H₈O₂N₂ClS [M+H]⁺ 243.0000, found 242.9989.

(*E*)-3-(4-氯苯基)-2-氰基丙烯酸乙酯(**3f**): 白色固体, 产率 64.3%. m.p. 86~87 °C (lit.^[26] 86~87 °C); ^1H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.18 (s, 1H, CH=C(CN)), 7.91 (t, $J=5.5$ Hz, 2H, Ar-H), 7.48~7.44 (m, 2H, Ar-H), 4.37 (q, $J=7.1$ Hz, 2H, CH₂), 1.38 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 162.3, 153.5, 139.6, 132.2, 129.8, 115.3, 103.5, 62.9, 14.2. HRMS (ESI) calcd for C₁₂H₁₁O₂NCl [M+H]⁺ 236.0472, found 236.0472.

(*E*)-2-氰基-3-(4-甲氧基苯基)丙烯酸乙酯(**3g**): 白色固体, 产率 64.0%. m.p. 78~79 °C (lit.^[27] 80~81 °C); ^1H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.16 (s, 1H, CH=C(CN)), 7.99 (d, $J=8.9$ Hz, 2H, Ar-H), 7.00~6.96 (m, 2H, Ar-H), 4.36 (q, $J=7.1$ Hz, 2H, CH₂), 3.88 (s, 3H, -OCH₃), 1.38 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, CH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 163.8, 163.2, 154.5, 133.7, 124.4, 116.3, 114.8, 99.3, 62.5, 55.7, 14.2. HRMS (ESI) calcd for C₁₃H₁₄O₃N [M+H]⁺ 232.0968, found 232.0968.

(*E*)-2-氰基-3-(4-(三氟甲基)苯基)丙烯酸乙酯(**3h**): 白色固体, 产率 71.8%. m.p. 107~108 °C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.28 (s, 1H, CH=C(CN)), 8.08 (d, $J=8.3$ Hz, 2H, Ar-H), 7.76 (d, $J=8.3$ Hz, 2H, Ar-H), 4.41 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, CH₂), 1.41 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, CH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 161.8, 153.0, 134.5 (q, $^5J_{\text{FC}}=1.2$ Hz), 134.2 (q, $^2J_{\text{FC}}=33.0$ Hz), 131.0, 126.2 (q, $^4J_{\text{FC}}=3.7$ Hz), 123.4 (q, $^1J_{\text{FC}}=272.7$ Hz), 114.8, 105.9, 63.2, 14.1. HRMS (ESI) calcd for C₁₃H₉O₂NF₃ [M+H]⁺ 268.0592, found 268.0579.

(*E*)-2-氰基-3-(4-氟苯基)丙烯酸乙酯(**3i**): 白色固体, 产率 81.3%. m.p. 91~92 °C (lit.^[28] 92~93 °C); ^1H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.21 (s, 1H, CH=C(CN)), 8.03 (dd, $J=8.8$, 5.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.19 (t, $J=8.6$ Hz, 2H, Ar-H), 4.38 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, CH₂), 1.39 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, CH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 165.4 (d, $^1J_{\text{FC}}=257.6$ Hz), 162.4, 153.6, 133.6 (d, $^3J_{\text{FC}}=9.3$ Hz), 127.9 (d, $^4J_{\text{FC}}=3.3$ Hz), 116.8 (d, $^2J_{\text{FC}}=22.1$ Hz), 115.5, 102.6, 62.8, 14.2. HRMS (ESI) calcd for C₁₃H₉O₂NF₃ [M+H]⁺

218.0621, found 218.0612.

(*E*)-2-氰基-3-(2-甲氧基苯基)丙烯酸乙酯(**3j**): 黄色固体, 产率 86.3%. m.p. 71~72 °C (lit.^[29] 72~74 °C); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 8.76 (s, 1H, CH=C(CN)), 8.28 (dd, *J*=7.9, 1.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.54~7.49 (m, 1H, Ar-H), 7.06 (d, *J*=7.7 Hz, 1H, Ar-H), 6.96 (d, *J*=8.3 Hz, 1H, Ar-H), 4.37 (q, *J*=7.1 Hz, 2H, CH₂), 3.90 (s, 3H, OCH₃), 1.39 (t, *J*=7.1 Hz, 3H, CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 162.9, 159.2, 149.9, 135.0, 129.4, 129.2, 121.0, 120.7, 116.0, 111.2, 102.3, 62.5, 55.8, 14.2. HRMS (ESI) calcd for C₁₃H₁₄O₃N [M+H]⁺ 232.0968, found 232.0968.

(*E*)-2-氰基-3-(1*H*-吡啶-4-基)丙烯酸乙酯(**3k**): 黄色固体, 产率 74.6%. m.p. 139~140 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 8.80 (d, *J*=14.8 Hz, 1H, NH), 8.66 (s, 1H, CH=C(CN)), 8.28 (d, *J*=7.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.60 (t, *J*=9.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.38 (t, *J*=2.5 Hz, 1H, Ar-H), 7.27 (t, *J*=16.3, 8.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.77 (s, 1H, Ar-H), 4.40 (q, *J*=7.1 Hz, 2H, CH₂), 1.41 (t, *J*=7.1 Hz, 3H, CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 163.3, 152.5, 136.1, 129.95, 126.9, 123.1, 122.2, 121.3, 116.6, 101.3, 100.6, 62.6, 14.3. HRMS (ESI) calcd for C₁₄H₁₃O₂N₂ [M+H]⁺ 241.0971, found 241.0971.

(*E*)-3-(4-溴苯基)-2-氰基丙烯酸乙酯(**3l**): 白色固体, 产率 83.6%. m.p. 94~95 °C (lit.^[30] 97~98 °C); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 8.17 (s, 1H, CH=C(CN)), 7.86~7.82 (m, 2H, Ar-H), 7.65~7.61 (m, 2H, Ar-H), 4.37 (q, *J*=7.1 Hz, 2H, CH₂), 1.39 (t, *J*=7.2 Hz, 3H, CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 162.3, 153.6, 132.7, 132.3, 130.3, 128.3, 115.3, 103.6, 62.9, 14.2. HRMS (ESI) calcd for C₁₂H₉O₂NBr [M+H]⁺ 277.9824, found 277.9811.

(*E*)-2-氰基-3-(3-甲基噻吩-2-基)丙烯酸乙酯(**3m**): 棕色固体, 产率 75.2%. m.p. 99~100 °C (lit.^[31] 101~102 °C); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 8.44 (d, *J*=0.9 Hz, 1H, CH=C(CN)), 7.68 (d, *J*=5.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.02 (d, *J*=5.1 Hz, 1H, Ar-H), 4.35 (t, *J*=7.2 Hz, 2H, CH₂), 2.46 (s, 3H, =C(CH₃)), 1.37 (dd, *J*=8.2, 6.1 Hz, 3H, CH₂CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 163.3, 149.3, 146.7, 144.9, 134.2, 130.9, 116.1, 97.5, 62.5, 14.8, 14.2. HRMS (ESI) calcd for C₁₁H₁₂O₂NS [M+H]⁺ 222.0583, found 222.0583.

(*E*)-2-氰基-3-(呋喃-2-基)丙烯酸乙酯(**3n**): 白色固体, 产率 81.7%. m.p. 87~88 °C (lit.^[28] 87~88 °C); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 8.00 (s, 1H, CH=C(CN)), 7.74 (d, *J*=1.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.37 (d, *J*=3.6 Hz, 1H, Ar-H), 6.65 (dd, *J*=3.6, 1.7 Hz, 1H, Ar-H), 4.34 (q, *J*=7.1

Hz, 2H, CH₂), 1.37 (t, *J*=7.1 Hz, CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 162.9, 161.6, 158.4, 154.0, 136.7, 133.6, 127.4, 125.3, 124.0, 121.3, 116.0, 115.1, 109.3, 109.0, 100.4, 65.0, 62.6, 50.9, 14.2. HRMS (ESI) calcd for C₁₀H₁₀O₃N [M+H]⁺ 192.0655, found 192.0655.

(*E*)-3-[4-((4-氯苄基)氧基)-3-甲氧基苯基]-2-氰基丙烯酸乙酯(**11a**): 白色固体, 产率 52.1%. m.p. 101~102 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.30 (s, 1H, CH=C(CN)), 7.79 (d, *J*=2.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.71 (dd, *J*=8.6, 2.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.48 (s, 4H, Ar-H), 7.25 (d, *J*=8.6 Hz, 1H, Ar-H), 5.22 (s, 2H, CH₂O), 4.30 (q, *J*=7.1 Hz, 2H, CH₂CH₃), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 1.30 (t, *J*=7.1 Hz, 3H, CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 162.8, 155.2, 152.7, 149.3, 135.7, 133.2, 130.3, 129.0, 126.9, 124.8, 116.9, 113.7, 99.2, 69.6, 62.6, 56.0, 14.5. HRMS (ESI) calcd for C₂₀H₁₉O₄NCl [M+H]⁺ 372.0997, found 372.0997.

(*E*)-3-[4-((2-氯噻唑-5-基)甲氧基)-3-甲氧基苯基]-2-氰基丙烯酸乙酯(**11b**): 黄色固体, 产率 46.8%. m.p. 128~129 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 8.15 (s, 1H, CH=C(CN)), 7.79 (d, *J*=1.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.57 (s, 1H, Ar-H), 7.44 (dd, *J*=8.4, 1.9 Hz, 1H, Ar-H), 6.99 (d, *J*=8.4 Hz, 1H, Ar-H), 5.31 (s, 2H, CH₂O), 4.37 (q, *J*=7.1 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 3.93 (s, 3H, OCH₃), 1.39 (t, *J*=7.2 Hz, CH₂CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 162.9, 154.4, 153.4, 151.3, 150.0, 140.8, 135.3, 127.1, 126.0, 116.2, 113.7, 112.5, 100.5, 63.5, 62.6, 56.1, 14.2. HRMS (ESI) calcd for C₁₇H₁₆O₄N₂ClS [M+H]⁺ 379.0514, found 379.0513.

(*E*)-3-[3-((4-氯苄基)氧基)苯基]-2-氰基丙烯酸丁酯(**11c**): 白色固体, 产率 43.7%. m.p. 92~93 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 8.17 (s, 1H, CH=C(CN)), 8.04~7.97 (m, 2H, Ar-H), 7.41~7.34 (m, 4H, Ar-H), 7.06~7.02 (m, 2H, Ar-H), 5.12 (s, 2H, CH₂O), 4.31 (t, *J*=6.6 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 1.74 (dt, *J*=14.5, 6.8 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 1.54~1.40 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂), 0.97 (t, *J*=7.4 Hz, 3H, CH₂CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 163.2, 162.6, 154.3, 134.4, 133.7, 129.0, 124.8, 116.2, 115.6, 99.8, 69.6, 66.4, 30.6, 19.2, 13.8. HRMS (ESI) calcd for C₂₁H₂₁O₃NCl [M+H]⁺ 370.1205, found 370.1204.

(*E*)-2-氰基-3-[4-((4-甲基苄基)氧基)苯基]丙烯酸丁酯(**11d**): 白色固体, 产率 38.4%. m.p. 88~89 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 8.16 (s, 1H, CH=C(CN)), 8.01~7.97 (m, 2H, Ar-H), 7.32 (d, *J*=8.0 Hz, 2H, Ar-H), 7.21 (d, *J*=7.9 Hz, 2H, Ar-H), 7.07~7.03 (m, 2H, Ar-H),

5.11 (s, 2H, CH₂O), 4.31 (t, $J=6.7$ Hz, 2H, OCH₂CH₂-CH₂), 2.37 (s, 3H, CH₃), 1.74 (dt, $J=14.5, 6.7$ Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂), 1.50~1.42 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂), 0.97 (t, $J=7.4$ Hz, 3H, CH₂CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 163.3, 163.0, 154.4, 138.3, 133.7, 132.8, 129.5, 127.7, 124.5, 116.2, 115.6, 99.4, 70.3, 66.3, 30.6, 21.3, 19.1, 13.8. HRMS (ESI) calcd for C₂₁H₂₁O₃NCl [M+H]⁺ 350.1742, found 350.1751.

(*E*)-3-[3-氯-4-(3-氯-5-(三氟甲基)吡啶氧基)苯基]-2-氰基丙烯酸酯乙酯(**11e**): 白色固体, 产率 62.2%. m.p. 117~118 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.24 (d, $J=0.9$ Hz, 1H, Ar-H), 8.20 (s, 1H, CH=C(CN)), 8.10 (d, $J=2.1$ Hz, 1H, Ar-H), 8.08~8.02 (m, 2H, Ar-H), 7.40 (d, $J=8.5$ Hz, 1H, Ar-H), 4.41 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, CH₂), 1.41 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 162.0, 159.9, 152.4, 152.2, 142.5 (q, $^3J_{FC}=4.2$ Hz), 136.9 (q, $^3J_{FC}=9.6$ Hz), 133.3, 130.4, 130.4, 128.5, 124.8, 123.1 (q, $^1J_{FC}=272.2$ Hz), 119.2, 115.0, 104.4, 63.1, 14.2. HRMS (ESI) calcd for C₁₈H₁₀O₃N₂Cl₂F₃ [M+H]⁺ 429.0028, found 429.0015.

(*E*)-3-[4-(3-氯-5-(三氟甲基)吡啶-2-基)-3-甲氧基苯基]-2-氰基丙烯酸酯乙酯(**11f**): 白色固体, 产率 68.6%. m.p. 107~108 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.24 (s, 1H, CH=C(CN)), 8.22 (s, 1H, Ar-H), 7.99 (d, $J=2.1$ Hz, 1H, Ar-H), 7.87 (d, $J=2.0$ Hz, 1H, Ar-H), 7.54 (dd, $J=8.3, 2.0$ Hz, 1H, Ar-H), 7.29 (d, $J=8.2$ Hz, 1H, Ar-H), 4.40 (q, $J=7.1$ Hz, 2H, CH₂), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 1.41 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, CH₂CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 162.5, 160.5, 154.1, 151.8, 145.6, 142.5 (q, $^3J_{FC}=4.3$ Hz), 136.5 (q, $^4J_{FC}=3.1$ Hz), 130.2, 126.0, 123.6, 122.9 (q, $^1J_{FC}=272.2$), 118.8, 115.7, 113.5, 102.7, 62.9, 56.1, 14.2. HRMS (ESI) calcd for C₁₉H₁₅O₄N₂ClF₃ [M+H]⁺ 427.0668, found 427.0667.

(*E*)-3-[4-(2-(4-氯苯基)-2-氧代乙氧基)-3-甲氧基苯基]-2-氰基丙烯酸酯乙酯(**11g**): 黄色固体, 产率 57.3%. m.p. 144~145 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.14 (s, 1H, CH=C(CN)), 7.81 (d, $J=2.1$ Hz, 1H, Ar-H), 7.43~7.33 (m, 5H, Ar-H), 6.95~6.89 (m, 1H, Ar-H), 5.20 (s, 2H, COCH₂O), 4.37 (q, $J=7.1$ Hz, 2H, OCH₂CH₃), 3.96 (s, 3H, OCH₃), 1.39 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, OCH₂CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 163.1, 154.6, 152.4, 149.7, 134.4, 134.2, 129.0, 128.6, 127.5, 125.0, 116.4, 112.8, 112.1, 99.7, 70.1, 62.6, 56.1, 14.3. HRMS (ESI) calcd for C₂₁H₁₇O₅NCl [M+H]⁺ 398.0890, found 398.0804.

(*E*)-3-[4-(2-((3-氯-5-(三氟甲基)吡啶-2-基)氧基)乙

氧基)苯基]-2-氰基丙烯酸乙酯(**17a**): 白色固体, 产率 63.7%. m.p. 160~161 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.15 (s, 1H, CH=C(CN)), 7.98 (d, $J=8.9$ Hz, 2H, Ar-H), 7.82 (dd, $J=2.2, 1.0$ Hz, 1H, Ar-H), 7.69 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, Ar-H), 6.94 (d, $J=8.9$ Hz, 2H, Ar-H), 4.48~4.43 (m, 2H, OCH₂CH₂O), 4.38 (dd, $J=6.0, 3.1$ Hz, 2H, OCH₂-CH₂O), 4.35 (t, $J=7.1$ Hz, 2H, OCH₂CH₃), 1.38 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 162.90, 161.59, 158.38, 154.01, 136.68 (q, $^3J_{FC}=5.3$ Hz), 133.64, 133.59, 127.42, 125.30, 122.63 (q, $^1J_{FC}=270.2$ Hz), 116.00, 115.08, 109.16 (q, $^2J_{FC}=35.6$ Hz), 100.38, 65.03, 62.60, 50.86, 14.21. HRMS (ESI) calcd for C₂₀H₁₇O₄-N₂ClF₃ [M+H]⁺ 441.0825, found 441.0823.

(*E*)-3-[4-(2-((3-氯-5-(三氟甲基)吡啶-2-基)氧基)乙氧基)苯基]-2-氰基丙烯酸丁酯(**17b**): 白色固体, 产率 66.2%. m.p. 141~142 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.15 (d, $J=3.1$ Hz, 1H, CH=C(CN)), 7.99~7.96 (m, 2H, Ar-H), 7.82 (dd, $J=2.3, 1.1$ Hz, 1H, Ar-H), 7.69 (d, $J=2.5$ Hz, 1H, Ar-H), 6.95~6.92 (m, 2H, Ar-H), 4.47~4.45 (m, 2H, OCH₂CH₂O), 4.40~4.37 (m, 2H, OCH₂CH₂O), 4.30 (t, $J=6.7$ Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.76~1.69 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.45 (dd, $J=15.1, 7.5$ Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂CH₃), 0.96 (t, $J=7.4$ Hz, 3H, CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 162.98, 161.58, 158.38, 153.96, 136.68 (q, $^3J_{FC}=5.3$ Hz), 133.63, 127.42, 125.31, 122.63 (q, $^1J_{FC}=270.4$ Hz), 115.95, 115.08, 109.16 (q, $^2J_{FC}=35.6$ Hz), 100.40, 66.41, 65.02, 50.86, 30.55, 19.08, 13.72. HRMS (ESI) calcd for C₂₂H₂₁O₄N₂ClF₃ [M+H]⁺ 469.1137, found 469.1136.

3.2.2 化合物 **6a**~**6b** 和 **7a**~**7c** 的合成

向 50 mL 单口烧瓶中依次加入中间体 **5** (2.68 mmol)、三乙胺(4.02 mmol)和 20 mL 无水二氯甲烷并搅拌充分, 冰浴下分批加入三氟乙醇(3.21 mmol), 移至室温下反应约 2 h, TLC 监测反应进程. 反应结束后, 加入 40 mL 水并用二氯甲烷萃取(30 mL×3), 合并有机相, 无水硫酸镁干燥, 减压脱溶后柱层析分离纯化(石油醚/乙酸乙酯, $V:V=6:1\sim 1:1$)得化合物 **6a**~**6b**. 在化合物 **7a**~**7c** 的合成中, 只将三氟乙醇替换为三氟乙胺或二氟乙胺, 其它实验步骤和条件不变.

(*E*)-3-(4-氟苯基)-2-氰基-2',2'-三氟乙基丙烯酸酯(**6a**): 黄色固体, 产率 87.5%. m.p. 79~80 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.26 (s, 1H, CH=C(CN)), 8.07 (dd, $J=8.8, 5.3$ Hz, 2H, Ar-H), 7.21 (t, $J=9.9$ Hz, 2H, Ar-H), 4.69 (q, $J=8.1$ Hz, 2H, CH₂); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 164.87 (d, $^1J_{FC}=259.1$ Hz, ArC), 160.2, 154.4,

133.1 (d, $^3J_{\text{FC}}=9.5$ Hz), 126.4 (d, $^4J_{\text{FC}}=3.2$ Hz), 121.5 (q, $^1J_{\text{FC}}=277.5$ Hz, CF_3), 116.0 (d, $^2J_{\text{FC}}=22.2$ Hz, Ar-C), 113.5, 99.6, 60.7 (q, $^2J_{\text{FC}}=37.4$ Hz, CH_2CF_3). HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_6\text{O}_2\text{NF}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 272.0341, found 272.0329.

(*E*)-3-(4-甲氧基苯基)-2-氰基-2',2'-三氟乙基丙烯酸酯(**6b**): 黄色固体, 产率 84.7%. m.p. 90~91 °C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.20 (s, 1H, $\text{CH}=\text{C}(\text{CN})$), 8.02 (d, $J=8.9$ Hz, 2H, Ar-H), 6.99 (d, $J=8.9$ Hz, Ar-H), 4.66 (q, $J=8.3$ Hz, 2H, CH_2), 3.89 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 164.6, 162.0, 156.3, 134.3, 124.1, 122.7 (q, $^1J_{\text{FC}}=277.4$ Hz), 115.5, 115.1, 97.2, 61.5 (q, $^2J_{\text{FC}}=37.2$ Hz), 55.8. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_6\text{O}_2\text{NF}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 286.0674, found 286.0686.

(*E*)-2-氰基-*N*-(2',2'-二氟乙基)-3-(4-氟苯基)丙烯酰胺(**7a**): 白色固体, 产率 69.4%. m.p. 132~133 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.31 (s, 1H, $\text{CH}=\text{C}(\text{CN})$), 8.00~7.95 (m, 2H, Ar-H), 7.22~7.16 (m, 2H, Ar-H), 6.69 (s, 1H, CONH), 6.10~5.80 (m, 1H, CHF_2), 3.81 (tdd, $J=14.6, 6.2, 4.1$ Hz, 2H, CH_2); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 165.4 (d, $^1J_{\text{FC}}=257.4$ Hz, Ar-C), 160.9, 152.6, 133.3 (d, $^3J_{\text{FC}}=9.2$ Hz, Ar-C), 127.9 (d, $^4J_{\text{FC}}=3.3$ Hz, Ar-C), 116.7 (d, $^2J_{\text{FC}}=22.1$ Hz, Ar-C), 116.5, 113.1 (t, $^1J_{\text{FC}}=241.9$ Hz, CHF_2), 102.6, 42.6 (t, $^2J_{\text{FC}}=26.9$ Hz, CH_2CHF_2). HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_6\text{O}_2\text{NF}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 253.0594, found 253.0583.

(*E*)-2-氰基-3-(4-甲氧基苯基)-*N*-(2',2'-三氟乙基)丙烯酰胺(**7b**): 黄色固体, 产率 85.2%. m.p. 177~178 °C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.29 (s, 1H, $\text{CH}=\text{C}(\text{CN})$), 7.94 (d, $J=11.8$ Hz, 2H, Ar-H), 6.98 (d, $J=9.0$ Hz, 2H, Ar-H), 6.66 (t, $J=6.1$ Hz, 1H, CONH), 4.11~4.02 (m, 2H, CH_2), 3.88 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 163.9, 161.5, 154.1, 133.6, 124.4, 123.9 (q, $^1J_{\text{FC}}=278.8$ Hz), 117.4, 114.9, 99.0, 55.7, 41.5 (q, $^2J_{\text{FC}}=35.2$ Hz). HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{O}_2\text{N}_2\text{F}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 283.0700, found 283.0688.

(*E*)-2-氰基-*N*-(2',2'-二氟乙基)-3-(4-甲氧基苯基)丙烯酰胺(**7c**): 白色固体, 产率 78.9%. m.p. 133~134 °C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.26 (s, 1H, $\text{CH}=\text{C}(\text{CN})$), 7.94 (d, $J=8.9$ Hz, 2H, Ar-H), 6.98 (d, $J=9.0$ Hz, 2H, Ar-H), 6.59 (t, $J=5.1$ Hz, 1H, CONH), 5.92 (tt, $J=55.9, 4.2$ Hz, 1H, CHF_2), 3.88 (s, 3H, CH_3), 3.79 (tdd, $J=14.5, 6.2, 4.1$ Hz, 2H, CH_2); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 163.8, 161.7, 153.5, 133.5, 124.4, 117.5, 114.9, 113.3 (t, $^1J_{\text{FC}}=241.9$ Hz), 99.3, 55.7, 42.6 (t, $^2J_{\text{FC}}=26.9$ Hz).

HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{O}_2\text{N}_2\text{F}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 265.0973, found 265.0783.

3.3 生物活性测定

3.3.1 目标化合物对二龄南方根结线虫的离体活性测定

参照报道的方法^[20]获取二龄南方根结线虫, 并进行了杀线虫活性测定, 以商品药氟吡菌酰胺为阳性对照, 以不含受试化合物的受试液作为阴性对照(CK). 选择初筛浓度为 100 和 50 mg/L, 采用浸虫法测定其对二龄南方根结线虫 72 h 的离体杀线虫活性, 选择活性较好的化合物进一步测试其对二龄南方根结线虫 72 h 的半数致死浓度(LC_{50}). 每个处理三个平行, 实验重复三次, 结果以均数±偏差表示. 利用以下公式计算线虫的死亡率和校正死亡率(CK 组死亡率小于 5% 时没有校正死亡率):

$$\text{死亡率}(\%) = \frac{\text{处理组死亡线虫数}}{\text{处理组线虫总数}} \times 100\%$$

$$\text{校正死亡率}(\%) = \frac{(\text{处理组死亡率} - \text{空白组死亡率})}{(100 - \text{空白组死亡率})} \times 100\%$$

3.3.2 目标化合物对二龄水稻干尖线虫和甘薯茎线虫的离体活性测定

在水稻干尖线虫的培养方法^[25]上进一步优化来获得二龄水稻干尖线虫. 将水稻干尖线虫接种到培养好的灰葡萄孢培养基上, 27 °C 生化培养箱中避光培养 7~10 d. 取 2~3 个长满水稻干尖线虫的菌板, 用去离子水将其中的线虫冲出, 转移至 5 mL 离心管中 6000 r/min 离心 5 min, 弃上清. 将浓缩后的水稻干尖线虫接种到一个新的灰葡萄孢培养基上, 48 h 后用灭菌水将培养基中的水稻干尖线虫和虫卵冲洗至玻璃培养皿中, 静置 2 h, 水稻干尖线虫虫卵将吸附到玻璃培养皿上. 缓慢将水倒掉, 并用去离子水缓慢清洗玻璃培养皿 1~2 次, 加入去离子水, 将玻璃培养皿上的虫卵完全浸没, 放入 27 °C 生化培养箱静置 48 h 后, 虫卵将孵化为二龄幼虫. 二龄甘薯茎线虫的培养参照此方法. 在水稻干尖线虫和甘薯茎线虫的离体杀线虫活性测试中, 除增加 Tioxazafen 为阳性对照外, 其余均与第 3.3.1 节的活性测试方案一致.

3.4 生理生化测定

以二龄南方根结线虫为研究对象, 选择对南方根结线虫活性最好的化合物 **3i** 为受试化合物, 设置浓度为 0 (CK)、25、50 和 100 mg/L 的受试液进行后续实验.

3.4.1 目标化合物对南方根结线虫空泡化的影响

线虫处理方案与第 3.3.1 节一致, 作用 72 h 后观察用不同浓度受试液处理的南方根结线虫的生理状态, 并使用配有相机的显微镜拍照.

3.4.2 目标化合物对南方根结线虫虫卵孵化率的影响

南方根结线虫虫卵的获取及孵化率的测定参照已报道文献[22]完成, 结果以柱状图的形式表示, 采用方差分析进行统计分析, 同一字母(a, b, c)在同一列中的平均值没有显著差异($p < 0.05$).

3.4.3 目标化合物对南方根结线虫氧化应激指标的影响

线虫处理方案与第 3.3.1 节一致, 将处理好的线虫于 1.5 mL 离心管 6000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 在不同的条件下继续处理线虫, 用于进一步实验. (1) ROS 的产生: 向每个处理组加入 500 μ L 10 μ m 的 H₂DCFDA 荧光染料, 20 $^{\circ}$ C 避光染色 1 h, 无菌水洗涤三次. (2) 脂褐素的积累: 无菌水洗涤 2 次, 直接用于后续实验(脂褐素是一种自身荧光物质). (3) 脂质的积累: 向每个处理组加入 1 mL 1% 的多聚甲醛固定液固定 3 h, 然后分别依次用 1 mL 20%, 50% 和 70% 的乙醇溶液进行脱水处理, 每个处理 10 min, 之后用 0.5 mL 浓度为 5 mg/L 的尼罗红染液染色 1 h, 最后用无菌水洗涤液体至无色. 用配有荧光显微镜的相机观察成像. 荧光强度用 Image J 定量, 检测三次, 结果显示为相对于 CK 的百分比. 采用方差分析进行统计分析, 同一字母(a, b, c, d)在同一列中的平均值没有显著差异($p < 0.05$).

辅助材料(Supporting Information) 化合物 **3f** 的晶体结构和晶体数据, 化合物 **3a**~**3n**, **6a**~**6b**, **7a**~**7c**, **11a**~**11g** 和 **17a**~**17b** 的 ¹H NMR, ¹³C NMR 和 HRMS 图谱. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Blaxter, M. *PLoS Biol.* **2011**, 9, e1001050.
- [2] Wang, G. L.; Chen, X. L.; Deng, Y. Y.; Li, Z.; Xu, X. Y. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, 63, 6883.
- [3] Abad, P.; Favory, B.; Rosso, M. N.; Castagnone, S. P. *Mol. Plant Pathol.* **2003**, 4, 217.
- [4] Wang, F.; Zhang, L. H.; Wang, Z. M. *China Plant Prot.* **2017**, 37, 54.
- [5] Zhuang, H. C.; Ying, Y. X. *Plant Prot.* **2016**, 490, 77 (in Chinese). (庄会存, 尹永霞, 植物保护, **2016**, 490, 77.)
- [6] Kumar, R. M.; Rao, M.; Reddy, M.; Wang, Q.; Li, Y.; Zhang, L.; Du, B.; Yellareddygar, S. *Egypt. J. Biol. Pest Control.* **2011**, 456.
- [7] Collange, B.; Navarrete, M.; Peyre, G.; Mateille, T.; Tchamitchian, M. *Crop Prot.* **2011**, 30, 1251.
- [8] Keiser, J.; Utzinger, J. *Jama* **2008**, 299, 1937.
- [9] Meher, H. C.; Gajbihiye, V. T.; Chawla, G.; Singh, G. *Pest Manage. Sci.* **2009**, 65, 1201.
- [10] Fuller, V. L.; Lilley, C. J.; Urwin, P. E. *New Phytol.* **2008**, 180, 27.
- [11] Chen, J. X.; Song, B. A. *J. Integr. Agric.* **2021**, 20, 2015.
- [12] Nguyen, L. T.; Jang, J. Y.; Kim, T. Y.; Yu, N. H.; Park, A. R.; Lee, S.; Bae, C. H.; Yeo, J. H.; Hur, J. S.; Park, H. W.; Kim, J. C. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2018**, 148, 133.
- [13] Dang, Q. L.; Kim, W. K.; Nguyen, C. M.; Choi, Y. H.; Choi, G. J.; Jang, K. S.; Park, M. S.; Lim, C. H.; Luu, N. H.; Kim, J. C. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59, 11160.
- [14] Caboni, P.; Saba, M.; Oplos, C.; Aissani, N.; Maxia, A.; Menkisso-glu-Spiroudi, U.; Casu, L.; Ntalli, N. *Pest Manage. Sci.* **2015**, 71, 1099.
- [15] Jia, H. W.; Guo, W.; Li, W.; Li, T. F.; Chen, X. L.; Li, Z.; Xu, X. Y. *J. Chem. Res.* **2019**, 43, 161.
- [16] Chen, J. X.; Qing, X. L.; Song, B. A. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, 68, 12175.
- [17] Jeschke, P. *Pest Manage. Sci.* **2017**, 73, 1053.
- [18] Jeschke, P. *Pest Manage. Sci.* **2016**, 72, 433.
- [19] Lahm, G. P.; Desaege, J.; Smith, B. K.; Thomas, F. P.; Michel, A. R.; Tony, M.; Roman, K.; Renee, M. L.; Anne, D.; Brenton, T. S.; Daniel, C.; Tim, T.; John, A. W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, 27, 1572.
- [20] Chen, J. X.; Yi, C. F.; Wang, S. B.; Wu, S. K.; Li, S. Y.; Hu, D. Y.; Song, B. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019**, 29, 1203.
- [21] Rajasekharan, S. K.; Lee, J.-H.; Ravichandran, V.; Kim, J.-C.; Park, J. G.; Lee, J. *Sci. Rep.* **2019**, 9, 2010.
- [22] Satish, K. R.; Seulbi, K.; Kim, J. C.; Jintae, L. *Pestic. Biochem. Phys.* **2020**, 163, 76.
- [23] Rajasekharan, S. K.; Lee, J.-H.; Ravichandran, V.; Lee, J. *Sci. Rep.* **2017**, 7, 6803.
- [24] Yu, Y.; Hua, X.; Chen, H.; Wang, Y.; Li, Z.; Han, Y.; Xiang, M. *Environ. Pollut.* **2020**, 264, 114731.
- [25] Wei, C. Q.; Huang, J. J.; Luo, Y. Q.; Wang, S. B.; Wu, S. K.; Xing, Z. F.; Chen, J. X. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2021**, 175, 104857.
- [26] Yang, H. Y.; Zhang, W.; Liu, Q. *ChemistrySelect* **2019**, 4, 10819.
- [27] Krishnan, G. R.; Sreekumar, K. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 4763.
- [28] Jia, X. L.; Zhang, X. Y.; Wang, Z. J.; Zhao, S. H. *Synth. Commun.* **2022**, 52, 774.
- [29] Oskooie, H. A.; Roomizadeh, E.; Heravi, M. M. *J. Chem. Res.* **2006**, 246.
- [30] Shen, Y.; Yang, B. *Synth. Commun.* **1989**, 3069.
- [31] Paliwal, P.; Jetli, S. R.; Jain, S. *Chem. Sci. Trans.* **2012**, 1, 494.

(Lu, Y.)