

· 研究论文 ·

doi: 10.16801/j.issn.1008-7303.2024.0042

1-苯基-5-氨基吡唑类蜕皮激素类似物的 合成与杀虫活性

李秀珍, 靳彬艳, 崔佳琳, 冯彦姣, 张晓鸣, 张莉*

(中国农业大学 理学院 应用化学系 农药创新中心, 北京 100193)

摘要: 为开发结构新颖的高效昆虫生长调节剂, 以蜕皮激素受体 (EcR) 为靶标, 以课题组前期发现的高活性化合物 **I7** (*N*-(4-氰基-1-苯基-1*H*-吡唑-5-基)-2-苯乙酰胺) 为先导, 设计合成了 20 个 1-苯基-5-氨基吡唑类化合物, 结构均经核磁共振氢谱 (^1H NMR)、核磁共振碳谱 (^{13}C NMR) 和高分辨质谱 (HRMS) 确证。杀虫活性测定结果表明, 化合物 **M10**、**M17**、**M18** 在 250 mg/L 质量浓度下对小菜蛾 *Plutella xylostella* 致死率较先导化合物 **I7** (60%) 提高了 20% 以上, 其中化合物 **M10** 活性最佳, 在 125 mg/L 质量浓度下对小菜蛾致死率 (60%) 略低于相同质量浓度下商品化药剂虫酰肼 (70%), 且其处理后的小菜蛾呈现出典型蜕皮激素类似物中毒症状; 小菜蛾蜕皮激素受体 (*P. xylostella* EcR, *PxEcR*) 靶标结合活性结果表明, 化合物 **M2**、**M6**、**M9**、**M12**、**M13**、**M15** 和 **M20** 的靶标结合活性均优于化合物 **I7**, 其中化合物 **M15** ($\text{IC}_{50}(\text{PxEcR}) = 2.02 \mu\text{mol/L}$) 的靶标结合活性是化合物 **I7** ($\text{IC}_{50}(\text{PxEcR}) = 23.21 \mu\text{mol/L}$) 的 11.5 倍; 通过分子对接、分子动力学模拟等方法进一步分析了化合物 **I7**、**M10**、**M15** 与 EcR 受体的结合作用机制, 可为后续靶向 EcR 的昆虫生长调节剂研究提供参考。

关键词: 蜕皮激素类似物; 农药分子设计; 小菜蛾; 杀虫活性; 分子对接; 分子动力学模拟

中图分类号: R184.31

文献标志码: A

Synthesis and insecticidal activity of 1-phenyl-5-aminopyrazole ecdysteroid analogs

LI Xiuzhen, JIN Binyan, CUI Jialin, FENG Yanjiao, ZHANG Xiaoming, ZHANG Li*

(Innovation Center of Pesticide Research, Department of Applied Chemistry, College of Science,
China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: To develop highly efficient and structurally novel insect growth regulators, 20 1-phenyl-5-amino pyrazoles were designed and synthesized using ecdysteroid receptor (EcR) as the target and **I7** (*N*-(4-cyano-1-phenyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-2-phenylacetamide), a highly active compound discovered by our group, as a lead. All synthesized structures were confirmed by ^1H NMR, ^{13}C NMR and HRMS. The insecticidal activity of the compounds showed that the lethality of compounds **M10**, **M17** and **M18** was

收稿日期: 2024-03-07; 录用日期: 2024-03-30; 网络首发日期: 2024-04-10.

Received: March 7, 2024; Accepted: March 30, 2024; Published online: April 10, 2024.

URL: <https://doi.org/10.16801/j.issn.1008-7303.2024.0042>

<http://www.nyxb.cn/cn/article/doi/10.16801/j.issn.1008-7303.2024.0042>

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21977114).

Funding: Supported by The National Natural Science Foundation of China (No. 21977114).

第一作者 (First author): 李秀珍, E-mail: lxzhen@cau.edu.cn. *通讯作者 (Corresponding author): 张莉, E-mail: zhang_li@cau.edu.cn.

The authors declare that they have no competing interests.



more than 20% higher than that of lead compound **I7** (60%) at a concentration of 250 mg/L. Compound **M10** was the most active, exhibiting a lethality rate of 60% at 125 mg/L, which is slightly lower than that of the commercial tebufenozide (70%), and *Plutella xylostella* treated with this compound showed typical symptoms of ecdysteroid analogue poisoning. The results of the target binding activity of *P. xylostella* EcR(PxEcR) showed that the compounds **M2**, **M6**, **M9**, **M12**, **M13**, **M15** and **M20** were better than that of compound **I7**, and that the target binding activity of compound **M15** ($IC_{50}(PxEcR) = 2.02 \mu\text{mol/L}$) was 11.5 times higher than that of compound **I7** ($IC_{50}(PxEcR) = 23.21 \mu\text{mol/L}$). The binding mechanism between compounds **I7**, **M10**, **M15** and EcR receptor was further analyzed by molecular docking and molecular dynamics simulation, which will provide guidance for the further research on insect growth regulators targeting EcR.

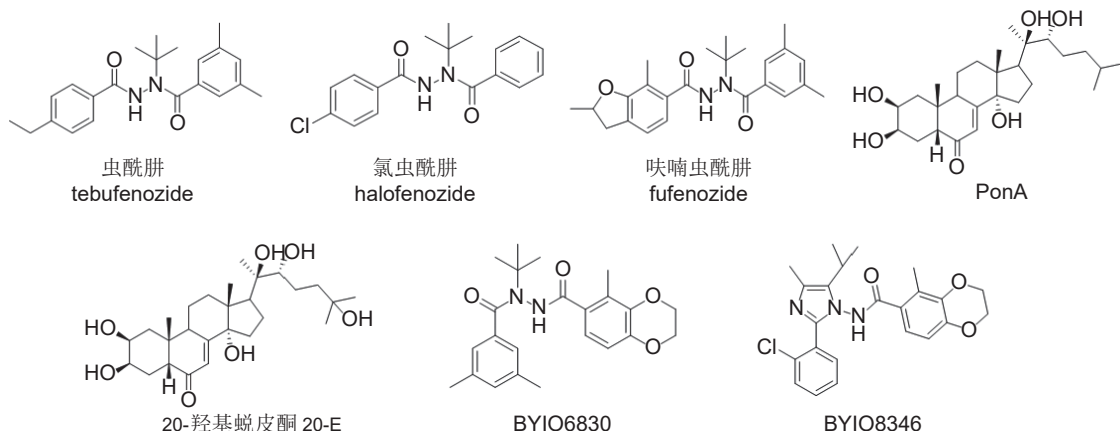
Keywords: ecdysteroid analogs; pesticide molecular design; *Plutella xylostella*; insecticidal activity; molecular docking; molecular dynamics simulations

昆虫生长调节剂 (insect growth regulators, IGRs) 是通过干扰昆虫正常发育进而导致其死亡的一类特异性杀虫剂, 具有低毒性、高选择性、对环境安全等优势^[1-2], 根据 IGRs 作用方式以及结构类型主要分为保幼激素类似物、几丁质合成抑制剂和蜕皮激素类似物等^[3]。其中, 蜕皮激素类似物通过与蜕皮激素受体 (EcR) 结合并与超气门蛋白 (USP) 形成异源二聚体导致昆虫过度蜕皮而死亡^[4-5]。因此, EcR 被认为是开发蜕皮激素类似物昆虫生长调节剂的一个重要靶标。

目前, 针对 EcR 靶标开发的商品化药剂以双酰胺类化合物为主, 如虫酰肼 (tebufenozide)、氯虫酰肼 (halofenozide)、呋喃虫酰肼 (fufenozide) 等 (图式 1), 该类化合物对鳞翅目害虫具有良好的杀虫活性, 但其结构骨架单一, 长期使用易产生抗性^[6-8]。几十年来, 科研人员不断试图突破双酰胺类化合物的单一骨架, 期望发现结构新颖的高效

靶向 EcR 的昆虫生长调节剂。目前已报道的非双酰胺类蜕皮激素类似物有: 四氢喹啉 (THQ) 类、酰胺酮 (AMK) 类、 γ -亚甲基- γ -内酰胺 (γ -ML)、咪唑类 (IMD) 和咪唑噻二唑类 (ITD) 等^[9-11], 其中大多数化合物对鳞翅目昆虫表现出优异的杀虫活性^[12]。

随着对蜕皮激素及其类似物的深入研究, 已有包含针对鳞翅目和半翅目昆虫的 9 个蜕皮激素及其类似物与 EcR/USP 复合物的晶体结构被解析^[13-18], 为靶向 EcR/USP 的药物分子合理设计奠定了基础。晶体结构中的配体分子既有天然蜕皮甾酮类的 PonA 和 20-羟基蜕皮酮 (图式 1), 也有非甾醇类化合物 BYIO6830 和 BYIO8346 等 (图式 1)。烟芽叶蛾 EcR/USP 与 BYIO8346 复合物的晶体结构 (PDB ID: 7BJU) 显示^[18], 配体与氨基酸 Thr343、Asn504 和 Tyr408 形成氢键相互作用, 与酰胺键相连的苯并二噁烷区域存在疏水相互作用。这表明 Thr343、Asn504 和 Tyr408 是保



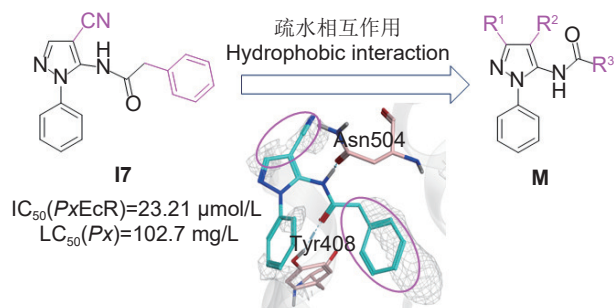
图式 1 虫酰肼、氯虫酰肼、呋喃虫酰肼、PonA、20-羟基蜕皮酮、BYIO6830 和 BYIO8346 的结构式

Scheme 1 Chemical structures of tebufenozide, halofenozide, fufenozide, PonA, 20-E, BYIO6830 and BYIO8346

持配体-受体氢键相互作用的 3 个关键氨基酸, 配体分子中的疏水取代基可能进一步促进配体和受体的结合, 这为蜕皮激素类似物的设计改造提供了重要的理论依据。

本课题组前期通过虚拟筛选, 发现 1-苯基-5-氨基吡唑是与 EcR 靶标结合中起关键作用的基团, 基于此设计合成的化合物 **I7**, 具有小菜蛾 EcR/USP 结合活性 ($IC_{50} = 23.21 \mu\text{mol/L}$), 且对小菜蛾表现出一定的致死活性 ($LC_{50} = 102.7 \text{ mg/L}$)^[19]。因此, 含有 1-苯基-5-氨基吡唑结构的化合物 **I7** 可作为新型的蜕皮激素类似物先导, 进行进一步修饰改造。

分析化合物 **I7** 与 EcR 受体的分子对接模式和静电势图 (见图式 2), 发现酰胺键与氨基酸 Asn504、Tyr408 形成氢键相互作用, 吡唑环 4 位氰基和末端苯乙基处于配体结合腔的疏水区域 (白色网格) 与配体存在疏水相互作用。因此, 本工作以化合物 **I7** 为先导化合物, 对吡唑环 3、4 位分别进行-CH₃ (R¹)、-CN (R²) 的不同取代, 并对末端取代基 (R³) 进行修饰改造, 引入疏水环状基团, 以期通过增强配体与 EcR 受体活性腔的疏水相互作用, 提高药物活性, 设计了 M 系列化合物。进而以化合物 1-苯基-4-氰基-5-氨基吡唑、1-苯基-3-甲基-5-氨基吡唑和酰氯为原料合成 M 系列化合物。目标化合物 M 的设计思路见图式 2, 合成路线见图式 3。测定了 M 系列化合物与小菜蛾 EcR/USP 靶标结合活性和杀虫活性, 并对其构效关系进行初步研究, 以期发现结构新颖的高效 1-苯基-5-氨基吡唑类蜕皮激素类似物。



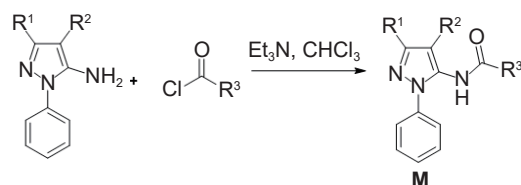
图式 2 目标化合物分子设计思路

Scheme 2 Design strategies of the target compounds

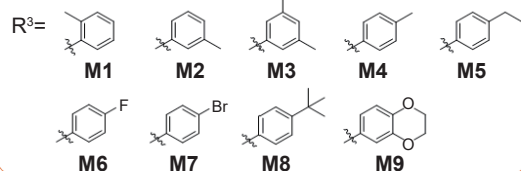
1 材料与方法

1.1 仪器与供试材料

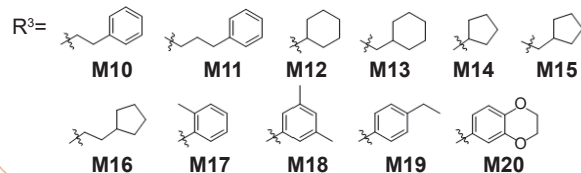
Bruker Avance 300 型和 Bruker Avance 600 型



R¹=H, R²=CN



R¹=CH₃, R²=H



图式 3 目标 M 系列化合物的合成路线

Scheme 3 Synthetic routes of the target compounds M

核磁共振仪 (德国 Bruker 公司), 测试时以 TMS 为内标, DMSO-*d*₆ 作为溶剂; FTICR-MS 7.0 质谱仪 (美国瓦里安公司); X-5 型数字显示显微熔点测试仪 (北京富凯有限公司, 温度未校正); 液体闪烁计数器 Hidex-300SL (2 min/filter, 芬兰 Hidex 公司)。

柱层析硅胶 (筛孔径 0.050~0.075 mm, 200~300 目), 购自青岛海洋化工厂; [³H] PonA (tritiated PonA, 95 Ci/mmol, 美国 PerkinElmer 公司); 硝酸纤维素膜 (NC45, 德国 Merck Millipore 公司); Aquasol-2 玻璃小瓶 (美国 PerkinElmer 公司)。虫酰肼 (tebufenozide) 原药 (纯度 ≥99%, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司), 其他试剂均为市售化学纯或分析纯。小菜蛾 *Plutella xylostella*, 购买市售小菜蛾虫卵后在实验室孵育喂养。

1.2 目标化合物的合成

1.2.1 目标化合物 M1~M9 的合成 将 1-苯基-4-氰基-5-氨基吡唑 (1 mmol) 和三乙胺 (Et₃N, 1 mmol) 溶于氯仿 (5 mL) 中, 冰浴下滴加取代酰氯 (1.5 mmol) 的氯仿 (3 mL) 溶液, 滴毕, 65 °C 回流反应过夜。薄层层析 (TLC, *V*(石油醚):*V*(乙酸乙酯)=3:1) 监测反应完成后, 水洗 3 次, 1 mol/L 稀盐酸洗 2 次, 饱和碳酸氢钠洗 3 次, 饱和食盐水洗 3 次, 无水硫酸钠干燥, 减压脱溶, 柱层析 (*V*(石油醚):*V*(乙酸乙酯)=15:1) 纯化, 即得目标化合物 **M1~M9**。

1.2.2 目标化合物 M10~M20 的合成 将 1-苯基-3-甲基-5-氨基吡唑 (1 mmol) 和三乙胺 (Et_3N , 1 mmol) 溶于氯仿 (5 mL) 中, 冰浴下滴加取代酰氯 (1.2 mmol) 的氯仿 (3 mL) 溶液, 滴毕, 室温反应过夜。TLC ($V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=3:1$) 监测反应完成后, 水洗 3 次, 1 mol/L 稀盐酸洗 2 次, 饱和碳酸氢钠洗 3 次, 饱和食盐水洗 3 次, 无水硫酸钠干燥, 减压脱溶, 柱层析 ($V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=12:1$) 纯化, 即得目标化合物 M10~M20。

1.3 杀虫活性测定

采用浸叶法^[20]测定目标化合物的杀虫活性。准确称取一定质量待测药剂, 以二甲亚砜 (DMSO) 为溶剂, 配制成质量浓度为 5000 mg/L 的母液, 然后用含质量分数为 0.05% 曲拉通 (X-100) 的水溶液稀释得 500 mg/L 工作液。在培养皿中垫入滤纸, 将适量的圆白菜菜叶放入配好的工作液中充分浸渍 5~8 s, 自然晾干放入上述培养皿中。空白对照组 (CK) 用蒸馏水处理, 溶剂对照组分别用含质量分数为 0.05% 的曲拉通水溶液和相同浓度的 DMSO 处理。每皿接 10 头 3 龄中期小菜蛾, 每个化合物浓度设 3 组重复。将处理后的样品置于温度 26 °C、湿度 60% 的培养箱内培养观察。96 h 后统计死亡率, 以毛笔触动虫体, 无反应的统计为死虫。

分别按公式 (1) 和 (2) 计算死亡率 (P_1 , %) 和校正死亡率 (P_2 , %)。

$$P_1/\% = \frac{K}{N} \times 100 \quad (1)$$

$$P_2/\% = \frac{P_1 - P_0}{1 - P_0} \times 100 \quad (2)$$

式中: K 为死亡虫数; N 为处理总虫数; P_0 为空白对照组的死亡率 (计算方法同 P_1), %。

1.4 EcR/USP 蛋白结合实验

参照文献方法^[21-23], 运用大肠杆菌体外转录翻译得到 PxEcR、小菜蛾超气门蛋白 (PxUSP), 进行 [^3H] PonA 放射性配体结合实验。实验设定竞争结合组 (SB), 总结合组 (TB) 和非特异性结合组 (NSB), 每组设置 3 个重复。SB 组: 8 μL 的小菜蛾蜕皮激素受体蛋白工作液 (EcR + USP), 4.8 μL [^3H] PonA 乙醇溶液 (终浓度 10 nmol/L), 3.2 μL 40 mg/L 的待测化合物; TB 组: 8 μL 的小菜蛾蜕皮激素受体蛋白工作液 (EcR + USP), 4.8 μL [^3H] PonA 乙醇溶液 (终浓度 10 nmol/L), 3.2 μL 低

盐 buffer (pH = 7.9); NSB 组: 8 μL 的小菜蛾蜕皮激素受体工作液 (EcR + USP), 4.8 μL [^3H] PonA 乙醇溶液 (终浓度 10 nmol/L), 3.2 μL 不带标记的 PonA, 总体积 16 μL 。低盐 buffer 包含: 5 mg/L 重组抑肽酶 (aprotinin)、5 mg/L 抑肽素 A (pepstatin)、5 mg/L 亮肽素 (leupepton) 和 100 mg/L 标准蛋白溶液 (牛血清蛋白, BSA)。样品于 25 °C 下孵育 90 min 后立即通过硝酸纤维素膜过滤, 并用 3 mL 冰缓冲液洗涤 3 次, 加 3 mL 闪烁液, 液体闪烁计数器获取数据。结合率 (R_a) 按公式 (3) 进行计算。对于结合活性高的化合物, 梯度降低浓度, 至少 5 个浓度, 每个浓度 3 次重复, 根据每个浓度下的结合率拟合曲线获得 IC_{50} 值。

$$R_a/\% = \left(1 - \frac{R_a(\text{SB}) - R_a(\text{NSB})}{R_a(\text{TB}) - R_a(\text{NSB})} \right) \times 100 \quad (3)$$

1.5 分子对接

采用 MOE (Molecular Operating Environment, 2018.01 version) 软件中的 DOCK 模块, 由于目前没有小菜蛾蜕皮激素受体蛋白的晶体结构, 因此选择同为鳞翅目, 且序列同源性高的棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 蜕皮激素受体与配体分子 BYI08346 的晶体复合物 (PDB ID: 3IXP) 作为对接蛋白, 指定 BYI08346 周围 4.5 Å 所在区域为蛋白结合口袋。采用半柔性对接的方式, 即对接时小分子和蛋白侧链视为柔性, 而蛋白肽链骨架保持刚性结构。采用基于力场的 GBVI/WSA dG 评分函数 (公式 4), 用于计算配体的结合自由能 (ΔG , kJ/mol)。合成的目标小分子采用 MMFF94x 力场^[24]进行能量最小化, 选择每个化合物的低能构象作为分子对接的初始构象, 对接完成后每个小分子均输出 30 个对接构象与相应的对接打分值。

$$\Delta G \approx c + \alpha \left[\frac{2}{3} (\Delta E_{\text{Coul}} + \Delta E_{\text{sol}}) + \Delta E_{\text{vdW}} + \beta \Delta S_{\text{Aweighted}} \right] \quad (4)$$

式中: c 为旋转和平移熵的平均增益/损失; α , β 为常数; E_{Coul} 为库仑静电力, 利用当前加载的电荷、 $\epsilon_i = 1$ 的介电常数计算得出; E_{sol} 为溶剂化静电力, 通过 GB/VI 溶剂化模型计算得出; E_{vdW} 为范德华作用力对成键的贡献; $S_{\text{Aweighted}}$ 为按暴露面积加权的表面积。

1.6 分子动力学模拟

分子动力学模拟软件运用 AMBER12^[25] 进

行。将化合物 **I7**、**M10**、**M15** 与 **EcR** 晶体复合物 (PDB ID: 3IXP) 通过分子对接获得的合理结合构象作为分子动力学模拟初始构象。配合物体系中添加 Na^+ 使整个体系呈电中性, 用显性 TIP3P^[26] 的水盒子充满整个复合物体系, 以配体小分子为中心, 水盒子分布到附近 $10 \text{ \AA} \times 10 \text{ \AA} \times 10 \text{ \AA}$ ($1 \text{ \AA} = 0.1 \text{ nm}$) 的范围内。体系进行能量最优化, 升温, 100 ps 左右将体系升温至 298 K, 最后体系在温度恒定为 298 K, 压强为 1 个标准大气压的条件下, 采用 AMBER12 中的 PMEMD 程序^[27-28] 开始分子动力学模拟。设置长程静电相互作用和范德华作用的截断值为 $10 \text{ \AA}$, 模拟步长为 2.0 fs, 每 1 ps 保存一个轨迹文件, 对化合物 **I7**、**M10** 和 **M15** 进行 20 ns 分子动力学模拟。

2 结果与分析

2.1 化合物合成

以化合物 1-苯基-4-氰基-5-氨基吡唑、1-苯基-3-甲基-5-氨基吡唑和对应的酰氯为原料, 三乙胺作缚酸剂, 氯仿作溶剂, 65°C 回流或室温搅拌过夜反应, 经柱层析 ($V(\text{石油醚}): V(\text{乙酸乙酯}) = 15:1 \sim 12:1$) 分离纯化, 得到目标化合物。目标化合物结构表征数据如下。

N-(4-氰基-1-苯基-1*H*-吡唑-5-基)-2-甲基苯甲酰胺 (**M1**): 白色固体; 产率 34.9%; m.p. $188.2 \sim 189.5^\circ\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 11.00 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 7.61 (m, 4H), 7.58~7.49 (m, 1H), 7.47~7.36 (m, 2H), 7.32 (t, $J=6.7 \text{ Hz}$, 2H), 2.30 (s, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 168.50, 142.47, 141.25, 137.50, 136.14, 134.48, 131.03, 130.78, 129.59, 129.21, 127.26, 125.90, 124.38, 112.80, 90.62, 19.31; HRMS $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O} [\text{M} + \text{Na}]^+$, 计算值 325.1063, 实测值 325.1060。

N-(4-氰基-1-苯基-1*H*-吡唑-5-基)-3-甲基苯甲酰胺 (**M2**): 白色固体; 产率 59.8%; m.p. $148.6 \sim 150.1^\circ\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 10.96 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 7.71 (m, 2H), 7.61~7.50 (m, 4H), 7.50~7.39 (m, 3H), 2.38 (s, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 166.21, 142.55, 141.50, 138.34, 137.61, 133.51, 132.18, 129.59, 129.00, 128.76, 128.48, 125.12, 123.89, 112.82, 90.81, 20.98; HRMS $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O} [\text{M} + \text{Na}]^+$, 计算值 325.1060, 实测值 325.1063。

N-(4-氰基-1-苯基-1*H*-吡唑-5-基)-3,5-二甲基苯甲酰胺 (**M3**): 白色固体; 产率 86.3%; m.p. $179.8 \sim 181.6^\circ\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 10.87 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.55 (m, 4H), 7.51 (s, 2H), 7.49~7.43 (m, 1H), 7.28 (s, 1H), 2.33 (s, 6H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 166.32,

142.53, 141.53, 138.16, 137.64, 134.21, 132.15, 129.58, 128.98, 125.70, 123.89, 112.83, 90.86, 20.88; HRMS $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O} [\text{M} + \text{H}]^+$, 计算值 317.1389, 实测值 317.1397。

N-(4-氰基-1-苯基-1*H*-吡唑-5-基)-4-甲基苯甲酰胺 (**M4**): 黄色固体; 产率 50.3%; m.p. $159.7 \sim 161.4^\circ\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 10.89 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.82 (m, 2H), 7.53 (m, 4H), 7.47~7.40 (m, 1H), 7.34 (d, $J=7.8 \text{ Hz}$, 2H), 2.36 (s, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 165.96, 143.27, 142.55, 141.51, 137.62, 129.57, 129.40, 129.23, 128.97, 128.06, 123.87, 112.86, 90.91, 21.17; HRMS $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O} [\text{M} + \text{H}]^+$, 计算值 303.1236, 实测值 303.1240。

N-(4-氰基-1-苯基-1*H*-吡唑-5-基)-4-乙基苯甲酰胺 (**M5**): 白色固体; 产率 76.7%; m.p. $151.3 \sim 152.8^\circ\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 10.90 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 7.85 (s, 2H), 7.55 (s, 5H), 7.40 (s, 2H), 2.60 (d, $J=45.3 \text{ Hz}$, 2H), 1.19 (s, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 165.96, 149.36, 142.55, 141.50, 137.61, 129.58, 128.98, 128.26, 128.16, 123.88, 112.84, 90.90, 28.24, 15.34; HRMS $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O} [\text{M} + \text{H}]^+$, 计算值 317.1392, 实测值 317.1397。

N-(4-氰基-1-苯基-1*H*-吡唑-5-基)-4-氟苯甲酰胺 (**M6**): 白色固体; 产率 44.2%; m.p. $173.5 \sim 175.1^\circ\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 10.90 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 7.86 (d, $J=8.3 \text{ Hz}$, 2H), 7.57 (m, 3H), 7.56~7.49 (m, 3H), 7.48~7.37 (m, 1H), 1.29 (s, 9H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 165.91, 156.04, 142.54, 141.50, 137.61, 129.59, 129.40, 128.97, 127.93, 125.71, 123.88, 112.82, 90.91, 34.92, 30.93; HRMS $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{FN}_4\text{O} [\text{M} + \text{H}]^+$, 计算值 307.0986, 实测值 307.0990。

4-溴-*N*-(4-氰基-1-苯基-1*H*-吡唑-5-基)苯甲酰胺 (**M7**): 白色固体; 产率 66.1%; m.p. $180.7 \sim 182.0^\circ\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 11.05 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.07~7.94 (m, 2H), 7.63~7.50 (m, 4H), 7.49~7.33 (m, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 165.41, 142.73, 142.55, 137.85, 132.18, 131.82, 130.11, 129.48, 128.65, 126.49, 123.76, 113.21, 89.78, 79.30; HRMS $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{BrN}_4\text{O} [\text{M} + \text{H}]^+$, 计算值 389.0008, 实测值 389.0008。

4-(叔丁基)-*N*-(4-氰基-1-苯基-1*H*-吡唑-5-基)苯甲酰胺 (**M8**): 白色固体; 产率 85.3%; m.p. $184.0 \sim 185.6^\circ\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 11.14 (s, 1H), 8.32 (s, 1H), 7.86 (d, $J=8.6 \text{ Hz}$, 2H), 7.75 (d, $J=8.6 \text{ Hz}$, 2H), 7.67~7.57 (m, 2H), 7.52 (m, 2H), 7.47~7.40 (m, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 165.41, 142.73, 142.55, 137.85, 132.18, 131.82, 130.11, 129.48, 128.65, 126.49, 123.76, 113.21, 89.78, 79.30; HRMS $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O} [\text{M} + \text{H}]^+$, 计算值 345.1705, 实测值 345.1710。

O-(4-氰基-1-苯基-1*H*-吡唑-5-基)-2,3-二氢苯并 [b][1, 4] 二氧辛烯-6-甲酰胺 (**M9**): 白色固体; 产率 59.2%; m.p.

148.8~150.2 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 10.78 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.62~7.50 (m, 4H), 7.50~7.38 (m, 3H), 7.09~6.94 (m, 1H), 4.31 (dd, J = 8.9, 4.9 Hz, 4H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 165.11, 147.59, 143.31, 142.50, 141.55, 137.63, 129.57, 128.96, 124.93, 123.87, 121.75, 117.39, 117.02, 112.84, 90.84, 64.62, 64.14; HRMS $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 计算值 369.0959, 实测值 369.0958.

N-(3-甲基-1-苯基-1*H*-吡唑-5-基)-3-苯基丙酰胺 (**M10**): 白色固体; 产率 25.4%; m.p. 107.6~108.9 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 9.90 (s, 1H), 7.50~7.39 (m, 4H), 7.38~7.27 (m, 3H), 7.27~7.18 (m, 3H), 6.23 (s, 1H), 2.88 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.61 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.23 (s, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 171.01, 148.01, 141.05, 138.86, 136.37, 129.16, 128.45, 128.38, 127.00, 126.13, 123.45, 102.16, 37.08, 30.80, 13.88; HRMS $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$, 计算值 306.1600, 实测值 306.1601.

N-(3-甲基-1-苯基-1*H*-吡唑-5-基)-4-苯基丁酰胺 (**M11**): 白色固体; 产率 68.3%; m.p. 96.6~98.1 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 9.80 (s, 1H), 7.44 (m, J = 4.2 Hz, 4H), 7.34 (m, 1H), 7.21 (m, 5H), 6.16 (s, 1H), 2.53 (s, 2H), 2.27~2.13 (m, 5H), 1.85~1.70 (m, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 171.68, 147.93, 141.66, 138.90, 136.44, 129.11, 128.42, 127.11, 125.92, 123.60, 102.49, 34.78, 34.55, 26.61, 13.88; HRMS $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$, 计算值 320.1753, 实测值 320.1757.

N-(3-甲基-1-苯基-1*H*-吡唑-5-基)环己烷甲酰胺 (**M12**): 白色固体; 产率 38.2%; m.p. 117.1~118.7 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 7.31 (m, 1H), 6.18 (s, 1H), 2.29 (m, 1H), 2.22 (s, 3H), 1.72 (m, 4H), 1.62 (m, 1H), 1.29 (m, 3H), 1.17 (m, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 174.80, 147.87, 138.92, 136.53, 129.01, 127.05, 123.56, 102.70, 43.86, 28.93, 25.49, 25.23, 13.87; HRMS $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$, 计算值 284.1756, 实测值 284.1757.

2-环己基-*N*-(3-甲基-1-苯基-1*H*-吡唑-5-基)乙酰胺 (**M13**): 白色固体; 产率 52.7%; m.p. 113.7~115.4 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 9.77 (s, 1H), 7.49~7.42 (m, 4H), 7.37 (m, 1H), 6.17 (s, 1H), 2.20 (s, 3H), 2.10 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 1.59 (m, 6H), 1.14 (m, 3H), 0.87 (m, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 171.18, 147.88, 138.86, 136.44, 129.03, 127.10, 123.72, 102.63, 99.67, 43.22, 34.74, 32.53, 25.90, 25.67, 13.87; HRMS $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$, 计算值 298.1913, 实测值 298.1914.

N-(3-甲基-1-苯基-1*H*-吡唑-5-基)环戊烷甲酰胺 (**M14**): 白色固体; 产率 64.8%; m.p. 102.0~103.2 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 9.76 (s, 1H), 7.52~7.41 (m, 4H), 7.40~7.30 (m, 1H), 6.18 (s, 1H), 2.81~2.64 (m, 1H), 2.21

(s, 3H), 1.77 (m, J = 14.8, 7.5 Hz, 2H), 1.55 (m, 6H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 174.98, 147.88, 138.91, 136.54, 129.03, 127.05, 123.49, 102.75, 44.36, 29.78, 25.62, 13.89; HRMS $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$, 计算值 270.1597, 实测值 270.1601.

2-环戊基-*N*-(3-甲基-1-苯基-1*H*-吡唑-5-基)乙酰胺 (**M15**): 白色固体; 产率 72.1%; m.p. 98.3~99.6 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 9.77 (s, 1H), 7.46 (m, J = 4.6 Hz, 4H), 7.41~7.30 (m, 1H), 6.18 (s, 1H), 2.28~2.18 (m, 5H), 2.12 (m, 1H), 1.73~1.39 (m, 6H), 1.17~1.01 (m, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 171.56, 147.90, 138.88, 136.46, 129.06, 127.09, 123.63, 102.60, 41.51, 36.59, 31.96, 24.57, 13.87; HRMS $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$, 计算值 284.1753, 实测值 284.1757.

3-环戊基-*N*-(3-甲基-1-苯基-1*H*-吡唑-5-基)丙酰胺 (**M16**): 黄色油状液体; 产率 20.9%; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 9.81 (s, 1H), 7.47 (d, J = 4.5 Hz, 4H), 7.36 (m, 1H), 6.19 (s, 1H), 2.27 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 2.21 (s, 3H), 1.68 (d, J = 4.4 Hz, 3H), 1.60~1.42 (m, 6H), 1.04 (s, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 172.00, 147.91, 138.92, 136.50, 129.04, 127.05, 123.58, 102.46, 39.19, 34.75, 32.10, 31.24, 24.82, 13.86; HRMS $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$, 计算值 298.1910, 实测值 298.1914.

2-甲基-*N*-(3-甲基-1-苯基-1*H*-吡唑-5-基)苯甲酰胺 (**M17**): 白色固体; 产率 22.7%; m.p. 134.4~134.8 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 10.22 (s, 1H), 7.58~7.44 (m, 4H), 7.44~7.31 (m, 3H), 7.27 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 6.30 (s, 1H), 2.25 (s, 3H), 2.24~2.09 (s, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 166.32, 147.99, 139.13, 137.81, 136.37, 133.45, 129.09, 126.97, 125.52, 123.11, 103.97, 20.93, 13.95; HRMS $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$, 计算值 292.1443, 实测值 292.1444.

3, 5-二甲基-*N*-(3-甲基-1-苯基-1*H*-吡唑-5-基)苯甲酰胺 (**M18**): 白色固体; 产率 65.2%; m.p. 108.9~110.3 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 10.23 (s, 1H), 7.47 (m, 6H), 7.31 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 7.22 (s, 1H), 6.25 (s, 1H), 2.32 (s, 6H), 2.25 (s, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 166.32, 147.99, 139.13, 137.81, 136.37, 133.45, 129.09, 126.97, 125.52, 123.11, 103.97, 20.93, 13.95; HRMS $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$, 计算值 306.1598, 实测值 306.1914.

4-乙基-*N*-(3-甲基-1-苯基-1*H*-吡唑-5-基)苯甲酰胺 (**M19**): 白色固体; 产率 43.3%; m.p. 124.4~125.7 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 10.28 (s, 1H), 7.82 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.59~7.51 (m, 2H), 7.45 (m, 2H), 7.32 (m, 3H), 6.29 (s, 1H), 2.67 (q, J = 7.6 Hz, 2H), 2.27 (s, 3H), 1.19 (t, J = 7.6 Hz, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 165.96, 149.36, 142.55, 141.50, 137.61, 129.58, 128.98, 128.26, 128.16, 123.88, 112.84, 90.90, 28.24, 15.34; HRMS

C₁₉H₁₉N₃O [M + H]⁺, 计算值 306.1606, 实测值 306.1601.

N-(3-甲基-1-苯基-1*H*-吡唑-5-基)-2, 3-二氢苯并 [b][1, 4] 二氧 辛烯-6-甲酰胺 (**M20**): 白色固体; 产率 28.7%; m.p. 155.3~156.9 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.16 (s, 1H), 7.52 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.43 (m, 4H), 7.31 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.97 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 6.27 (s, 1H), 4.29 (q, *J* = 4.8 Hz, 4H), 2.26 (s, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 165.14, 147.99, 146.93, 143.13, 139.13, 136.39, 129.10, 126.95, 126.22, 123.11, 121.44, 117.13, 116.84, 104.01, 64.53, 64.12, 13.95; HRMS C₁₉H₁₇N₃O₃[M + H]⁺, 计算值 336.1345, 实测值 336.1343.

2.2 杀虫活性

小菜蛾杀虫活性测定结果 (表 1) 表明, 20 个目标化合物对小菜蛾均具有一定的致死活性, 在 500 mg/L 质量浓度下, 其中有 9 个化合物对小菜蛾的致死率大于等于 80%; 在 250 mg/L 质量浓度下, 化合物 **M10**、**M17**、**M18** 对小菜蛾的致死率

表 1 500、250 和 125 mg/L 质量浓度下目标化合物对小菜蛾的致死率

Table 1 *In vivo* insecticidal activity of target compounds against *Plutella xylostella* at 500, 250 and 125 mg/L

化合物 Compound	校正死亡率 Corrected mortality/%		
	500 mg/L	250 mg/L	125 mg/L
M1	60	/	/
M2	30	/	/
M3	40	/	/
M4	50	/	/
M5	70	/	/
M6	80	50	/
M7	80	/	/
M8	20	/	/
M9	60	/	/
M10	100	100	60
M11	90	60	/
M12	80	40	/
M13	80	40	/
M14	90	50	/
M15	70	/	/
M16	50	/	/
M17	100	80	40
M18	100	100	50
M19	70	40	/
M20	70	40	/
I7	90	60	/
虫酰肼 tebufenozide	100	100	70

注: “/” 表示未进行相关活性测试。
Note: “/” means that no relevant activity test was performed.

仍大于等于 80%, 优于先导化合物 **I7** (60%); 其中化合物 **M10** 在 125 mg/L 下对小菜蛾的致死率达到 60%, 略低于商品化药剂虫酰肼 (70%), 表现出较好的小菜蛾致死活性。初步构效关系分析可知, 吡唑环上不同位置的取代基对活性有影响, 吡唑环为 3-CH₃ 取代的化合物活体杀虫活性明显优于 4-CN 取代化合物, 例如当 R³ 同为 2-CH₃Ph 取代基时, 对小菜蛾致死率 **M17** (R¹ = CH₃, R² = H) > **M1** (R¹ = H, R² = CN)。目标化合物的杀虫活性也随 R³ 取代基的不同而变化: 当 R¹ = CH₃, R² = H 时, R³ 为苯环取代基时对活性有利, 例如对小菜蛾致死率 **M10** (R³ = CH₂CH₂Ph) > **M14** (R³ = C₅H₁₀) > **M12** (R³ = C₆H₁₂), 且链长增加会降低杀虫活性, 例如对小菜蛾致死率 **M10** (R³ = CH₂CH₂Ph) > **M11** (R³ = CH₂CH₂CH₂Ph)。同时, 苯环上取代基的种类和位置也对活性有影响, 例如当 R¹ = H, R² = CN 时, 对小菜蛾致死率 **M6** (R³ = 4-FPh) > **M7** (R³ = 4-BrPh) > **M4** (R³ = 4-CH₃Ph) > **M8** (R³ = 4-C(CH₃)₃Ph); **M1** (R³ = 2-CH₃Ph) > **M4** (R³ = 4-CH₃Ph) > **M2** (R³ = 3-CH₃Ph), 表明当苯环上为吸电子取代基时对活性有利, 当苯环上为给电子取代基时, 邻位取代对活性有利。

值得注意的是, 经化合物 **M10** 处理后的小菜蛾呈现典型的蜕皮激素类似物中毒症状 (如图 1), 表现为发育畸形, 头壳开裂, 表皮半脱落等, 与对照药剂虫酰肼处理的症状相似。

2.3 EcR/USP 靶标结合活性

我们进一步测定了目标化合物与小菜蛾 EcR/USP 的靶标结合活性。40 mg/L 质量浓度下, 对 20 个目标化合物与小菜蛾 EcR/USP 的结合活性进行普筛实验, 结果见图 2。普筛浓度下, 20



图 1 经 M10 处理后小菜蛾的中毒症状

Fig. 1 The poisoning symptoms of *Plutella xylostella* treated by M10

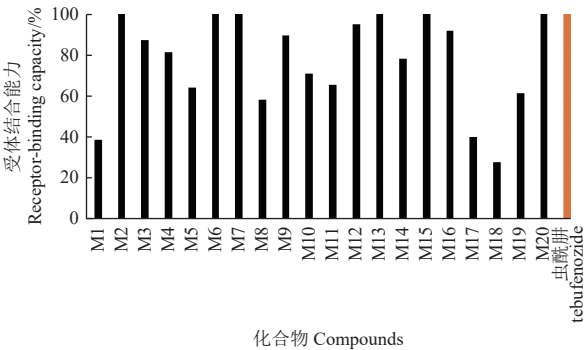


图 2 20 个目标化合物对小菜蛾蜕皮激素受体的结合活性

Fig. 2 Binding activity of 20 target compounds against ecdysone receptor of *Plutella xylostella*

个目标化合物均与小菜蛾 EcR/USP 有一定的结合能力。11 个目标化合物与受体结合能力大于 80%，其中 6 个化合物 (M2、M6、M7、M13、M15 和 M20) 与小菜蛾 EcR/USP 的结合能力为 100%，同虫酰肼与小菜蛾 EcR/USP 的结合能力 (100%) 相当。

对普筛结果较好的 11 个化合物和先导化合物 I7 进行 IC₅₀ 值测定 (表 2)，IC₅₀ 值越小，表示靶标结合活性越高，即所测化合物与小菜蛾 EcR/USP 靶标结合活性普遍优于化合物 I7 (IC₅₀ = 23.21 μmol/L)。化合物 M7、M10、M11、M14 具有中等结合活性；化合物 M2、M6、M9、M12、M13、M15、M20 具有中等以上结合活性，特别是化合物 M15 的 IC₅₀ 值为 2.02 μmol/L，活性较化合物 I7 提高了 11.5 倍。但是，目标化合物与小菜蛾 EcR/USP 的靶标结合活性均低于虫酰肼 (IC₅₀ = 0.85 μmol/L)，靶标结合活性仍然有待提高。

表 2 部分目标化合物的 PxECr 结合活性
Table 2 The PxECr-binding activity of some target compounds

化合物 Compound	半抑制浓度 IC ₅₀ /(μmol/L)	化合物 Compound	半抑制浓度 IC ₅₀ /(μmol/L)
M2	2.75 ± 0.52	M6	15.26 ± 1.03
M7	59.57 ± 1.16	M9	6.38 ± 1.27
M10	36.34 ± 0.52	M11	58.73 ± 0.35
M12	3.04 ± 0.22	M13	4.41 ± 0.11
M14	26.95 ± 0.63	M15	2.02 ± 0.75
M20	12.44 ± 0.85	I7	23.21 ± 9.01
虫酰肼 tebufenozide	0.85 ± 0.77		

2.4 作用机制研究

结合 EcR/USP 靶标结合活性结果和小菜蛾杀虫活性结果，选取代表化合物 M10、M15 进行分

子动力学模拟 (MD)，分析其与 EcR 结合作用机制。将化合物 M10、M15 分别与 EcR 晶体复合物 (PDB ID: 3IXP) 进行分子对接，获得合理的结合构象，并将此构象作为初始构象进行 20 ns 分子动力学模拟。

分子动力学模拟完成后，计算 20 ns 时段内体系的均方根偏差 (RMSD)，来评估复合物结构的稳定性以及合理性。如图 3 (a) 所示，受体骨架原子的 RMSD 值在 2.3~3.1 Å 范围内浮动，配体化合物 I7 的 RMSD 值在 0.9~1.4 Å 范围内浮动，体系相对稳定；如图 3 (b) 所示，受体骨架原子的 RMSD 值在 2.5~3.5 Å 范围内浮动，配体化合物 M10 的 RMSD 值在 0.5~1.4 Å 范围内浮动，体系较为稳定；如图 3 (c) 所示，受体骨架原子的 RMSD 值在 3.0~3.5 Å 范围内浮动，配体化合物 M15 的 RMSD 值在 1.0~1.4 Å 范围内浮动，体系稳定。即经过 20 ns 的分子动力学模拟，体系均处于稳定的状态。

对分子动力学模拟过程中平衡阶段构象与初始构象进行对比分析。如图 3 (d) 所示，化合物 M10 分子动力学模拟后整个分子向上偏移，酰胺结构与 Tyr408 和 Asn504 保持氢键相互作用，同时吡啶环 2 号 N 原子与 Thr343 羟基的距离拉近，两者形成新的氢键作用；如图 3 (e) 所示，化合物 M10 分子动力学模拟后整个分子向左边稍稍移动，保持与氨基酸 Asn504、Tyr408、Thr343 的氢键相互作用，整体构象偏离不大；如图 3 (f) 所示，化合物 M15 分子动力学模拟平衡阶段末端甲基环戊烷柔性较大易发生翻转，仍保持与氨基酸 Asn504、Tyr408、Thr343 的氢键相互作用。表明我们通过分子对接得到的结合构象是合理且能稳定存在的。

提取分子动力学模拟后的平衡构象，研究化合物 I7、M10、M15 与 EcR 受体的作用机制。如图 4(a) 所示，化合物 I7 酰胺基团 —NH 和 C=O 分别与 EcR 受体的 Asn504、Tyr408 形成氢键作用，吡啶环 2 号 N 原子与 Thr343 形成氢键作用，1-苯基-5-氨基吡啶骨架位于 Phe336、Ile339、Thr340、Trp526、Met380 和 Met381 形成的疏水性口袋中，末端苯甲基与 Met413、Val416、Leu420 和 Leu500 形成疏水作用；如图 4 (b) 所示，化合物 M10 酰胺基团 —NH 和 C=O、吡啶环 2 号 N 原子分别与 Asn504、Tyr408 和 Thr343 形成氢键作用，1-苯基-5-氨基吡啶骨架位于 Phe336、Ile339、Trp526、Met380 和 Met381 形成的疏水性口袋

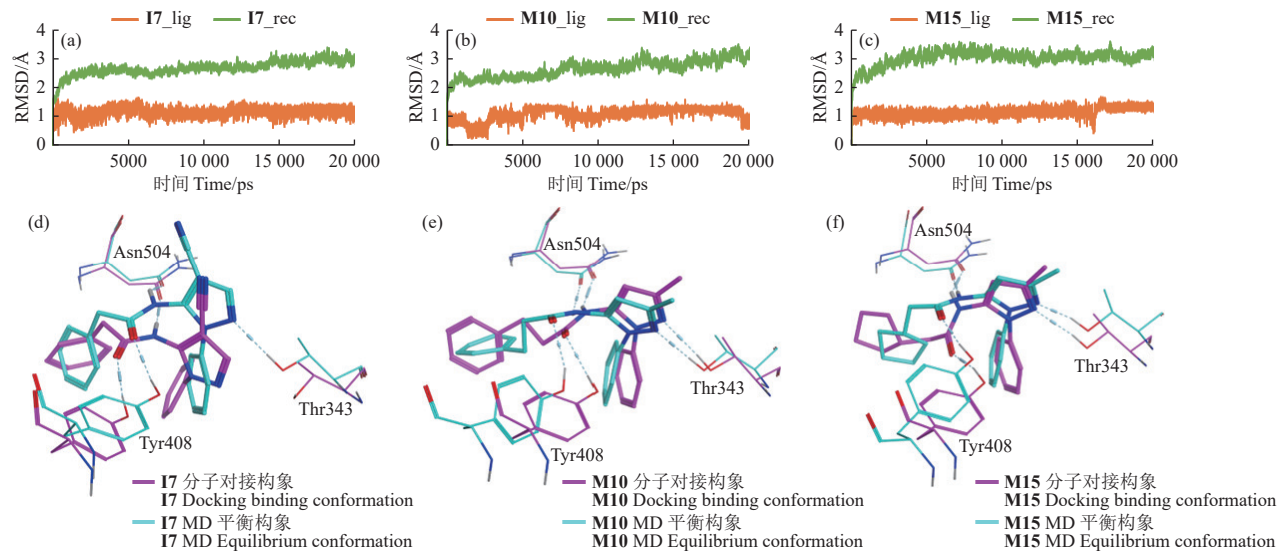


图 3 I7(a)、M10(b)、M15(c) 与 EcR 受体复合物在动力学过程中 RMSD 值变化图；I7(d)、M10(e)、M15(f) 分子对接和分子动力学过程中与 EcR 的结合构象比较

Fig. 3 The changes of RMSD in molecule dynamics of I7(a), M10(b), M15(c) with EcR; the comparison of modes of I7(d), M10(e), M15(f) with EcR in docking and dynamics

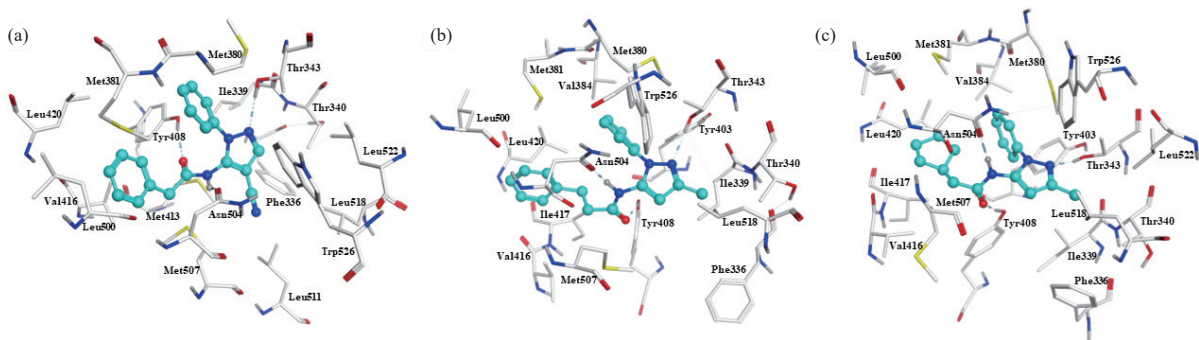


图 4 动力学优化后 I7、M10、M15 与 EcR 的结合模式

Fig. 4 Binding patterns of I7, M10, M15 and EcR after kinetic optimization

中，末端苯乙基与 Val416、Ile417、Leu420 和 Leu500 形成疏水作用；如图 4 (c) 所示，化合物 M15 同样保持与 Asn504、Tyr408、Thr343 形成的 3 个氢键作用，1-苯基-5-氨基吡唑骨架位于 Phe336、Ile339、Leu518、Trp526、Met380 和 Met381 形成的疏水性口袋中，末端甲基环戊烷与 Leu420、Met507、Ile417 和 Val416 形成疏水作用。

运用 MOE 计算产生氢键相互作用的原子间距离和相互作用能 (E , kJ/mol)，结果(表 3)表明，化合物 M15 与对应氨基酸的距离拉近，从而形成了更强的氢键相互作用力，使化合物 M15 与 EcR 受体结合更紧密，靶标结合活性较优，推测 R³ 区域链长增加不利于靶标活性。

综上所述，配体分子与氨基酸 Tyr408、Asn504、Thr343 的氢键作用是保持靶标结合活性

表 3 化合物 I7、M10、M15 与 EcR 受体氢键相互作用数据			
Table 3 Hydrogen bonding interaction data of compounds I7, M10, M15 with the EcR receptors			
配体 Ligand	受体 Receptor	距离 Distance/Å	相互作用能 E /(kJ/mol)
M10	N12 Asn504	3.06	-9.62
	N11 Thr343	3.16	-7.95
	O16 Tyr408	3.08	-3.35
M15	N12 Asn504	2.77	-29.71
	N11 Thr343	2.76	-8.37
	O16 Tyr408	2.60	-10.46
I7	N12 Asn504	2.82	-15.48
	N11 Thr343	3.06	-8.34
	O15 Tyr408	2.82	-8.34

的关键，1-苯基-5-氨基吡唑骨架与末端环状基团均处于配体结合腔的疏水口袋区域，增强此区域

的疏水相互作用有利于靶标活性的提高,且桥链部分链长增加会降低靶标活性,这为后续化合物改造提供参考。

3 结论

本文以化合物 **I7** (*N*-4-氰基-1-苯基-1*H*-吡唑-5-基)-2-苯乙酰胺) 为先导化合物,设计并合成了 20 个 1-苯基-5-氨基吡唑类蜕皮激素类似物,其结构均经过 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 和 HRMS 确证。对目标化合物进行小菜蛾杀虫活性测试,结果表明化合物 **M10**、**M17**、**M18** 在 250 mg/L 质量浓度下对小菜蛾的致死率较先导化合物 **I7** (60%) 提高 20% 以上,其中化合物 **M10** 活性最佳,在 125 mg/L 质量浓度下对小菜蛾致死率 (60%) 略低于商品化药剂虫酰肼 (70%),其处理后的小菜蛾呈现出典型蜕皮激素类似物中毒症状。对目标化合物进行小菜蛾 EcR/USP 靶标结合活性测试,并测定部分化合物 IC_{50} 值,化合物 **M2**、**M6**、**M9**、**M12**、**M13**、**M15**、**M20** 的 EcR/USP 靶标结合活性均优于先导化合物 **I7** ($\text{IC}_{50} = 23.21 \mu\text{mol/L}$),其中化合物 **M15** ($2.02 \mu\text{mol/L}$) 的 IC_{50} 值较化合物 **I7** 有 11.5 倍水平的提升,但目标化合物的 EcR/USP 靶标结合活性均低于虫酰肼 ($\text{IC}_{50} = 0.85 \mu\text{mol/L}$),靶标结合活性仍然有待提高。进一步分子作用机制研究发现,配体分子与氨基酸 Tyr408、Asn504、Thr343 的氢键作用是保持靶标结合活性的关键,1-苯基-5-氨基吡唑骨架与末端环状基团均处于配体结合腔的疏水口袋区域,增强此区域的疏水相互作用有利于靶标活性的提高,且桥链部分链长增加会降低靶标活性,本研究可为靶向 EcR 的昆虫生长调节剂研究提供参考。

参考文献 (References):

- [1] MASI H S C, AHMAD B R. Insect growth regulators for insect pest control[J]. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 2019, 8(12): 208-218.
- [2] SATPATHY S, GOTYAL B S, RAMESH BABU V. Role of novel insecticides in crop protection and their selectivity to natural enemies: a review[J]. *J Environ Biol*, 2020, 41(2): 149-160.
- [3] OBERLANDER H, SILHACEK D L, SHAAYA E, et al. Current status and future perspectives of the use of insect growth regulators for the control of stored product insects[J]. *J Stored Prod Res*, 1997, 33(1): 1-6.
- [4] 阴斌,张莉,崔紫宁,等. 昆虫蜕皮激素类似物的定量构效关系及其受体三维结构研究进展[J]. *农药学报*, 2010, 12(4): 383-390.
- [5] YIN B, ZHANG L, CUI Z N, et al. Progress on quantitative structure-activity relationship of ecdysone analogues and the three-dimensional structure of ecdysone receptor[J]. *Chin J Pestic Sci*, 2010, 12(4): 383-390.
- [6] DHADIALLA T S, CARLSON G R, LE D P. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity[J]. *Annu Rev Entomol*, 1998, 43: 545-569.
- [7] BILLAS I M L, BROWNING C, LAWRENCE M C, et al. The structure and function of ecdysone receptors[M]//SMAGGHE G. Ecdysone: structures and Functions. Dordrecht: Springer, 2009: 335-360.
- [8] SMAGGHE G, GOMEZ L E, DHADIALLA T S. Bisacylhydrazine insecticides for selective pest control[M]//Insect Growth Disruptors. Amsterdam: Elsevier, 2012: 163-249.
- [9] CARLSON G R, DHADIALLA T S, HUNTER R, et al. The chemical and biological properties of methoxyfenozide, a new insecticidal ecdysteroid agonist[J]. *Pest Manag Sci*, 2001, 57(2): 115-119.
- [10] DINAN L, NAKAGAWA Y, HORMANN R E. Structure-activity relationships of ecdysteroids and non-steroidal ecdysone agonists[M]//Insect Growth Disruptors. Amsterdam: Elsevier, 2012: 251-298.
- [11] SMITH H C, CAVANAUGH C K, FRIZ J L, et al. Synthesis and SAR of *cis*-1-benzoyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline ligands for control of gene expression in ecdysone responsive systems[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003, 13(11): 1943-1946.
- [12] BIRRU W, FERNLEY R T, GRAHAM L D, et al. Synthesis, binding and bioactivity of gamma-methylene gamma-lactam ecdysone receptor ligands: advantages of QSAR models for flexible receptors[J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18(15): 5647-5660.
- [13] YOKOI T, MINAMI S, NAKAGAWA Y, et al. Structure-activity relationship of imidazothiadiazole analogs for the binding to the ecdysone receptor of insect cells[J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2015, 120: 40-50.
- [14] BILLAS I M L, IWEMA T, GARNIER J M, et al. Structural adaptability in the ligand-binding pocket of the ecdysone hormone receptor[J]. *Nature*, 2003, 426(6962): 91-96.
- [15] CARMICHAEL J A, LAWRENCE M C, GRAHAM L D, et al. The X-ray structure of a hemipteran ecdysone receptor ligand-binding domain[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(23): 22258-22269.
- [16] BROWNING C, MARTIN E, LOCH C, et al. Critical role of desolvation in the binding of 20-hydroxyecdysone to the ecdysone receptor[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(45): 32924-32934.
- [17] IWEMA T, BILLAS I M L, BECK Y, et al. Structural and functional characterization of a novel type of ligand-independent RXR-USP receptor[J]. *EMBO J*, 2007, 26(16): 3770-3782.
- [18] REN B, PEAT T S, STRELTISOV V A, et al. Unprecedented conformational flexibility revealed in the ligand-binding domains of the *Bovicola ovis* ecdysone receptor (EcR) and ultraspiracle (USP)

- subunits[J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2014, 70(Pt 7): 1954-1964.
- [18] BROWNING C, MCEWEN A G, MORI K, et al. Nonsteroidal ecdysone receptor agonists use a water channel for binding to the ecdysone receptor complex EcR/USP[J]. *J Pestic Sci*, 2021, 46(1): 88-100.
- [19] HU X P, MA X J, CUI J L, et al. Identification of 1-phenyl-4-cyano-5-aminopyrazoles as novel ecdysone receptor ligands by virtual screening, structural optimization, and biological evaluations[J]. *Chem Biol Drug Des*, 2021, 97(1): 184-195.
- [20] JIANG D X, ZHENG X H, SHAO G, et al. Discovery of a novel series of phenyl pyrazole inner salts based on fipronil as potential dual-target insecticides[J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(16): 3577-3583.
- [21] GRAHAM L D, JOHNSON W M, PAWLAK-SKRZECZ A, et al. Ligand binding by recombinant domains from insect ecdysone receptors[J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2007, 37(6): 611-626.
- [22] MINAKUCHI C, NAKAGAWA Y, KAMIMURA M, et al. Binding affinity of nonsteroidal ecdysone agonists against the ecdysone receptor complex determines the strength of their molting hormonal activity[J]. *Eur J Biochem*, 2003, 270(20): 4095-4104.
- [23] TANG B Z, DONG W, LIANG P, et al. Cloning, ligand-binding, and temporal expression of ecdysteroid receptors in the diamondback moth, *Plutella xylostella*[J]. *BMC Mol Biol*, 2012, 13: 32.
- [24] HALGREN T A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94[J]. *J Comput Chem*, 1996, 17(5-6): 490-519.
- [25] CASE D A, DARDEN T A, CHEATHAM T E, et al. AMBER 12, University of California, San Francisco[J]. 2012, 79: 926-935.
- [26] JORGENSEN W L, CHANDRASEKHAR J, MADURA J D, et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water[J]. *J Chem Phys*, 1983, 79(2): 926-935.
- [27] GÖTZ A W, WILLIAMSON M J, XU D, et al. Routine microsecond molecular dynamics simulations with AMBER on GPUs. 1. generalized born[J]. *J Chem Theory Comput*, 2012, 8(5): 1542-1555.
- [28] SALOMON-FERRER R, GÖTZ A W, POOLE D, et al. Routine microsecond molecular dynamics simulations with AMBER on GPUs. 2. explicit solvent particle mesh Ewald[J]. *J Chem Theory Comput*, 2013, 9(9): 3878-3888.

(责任编辑: 卢 欢)

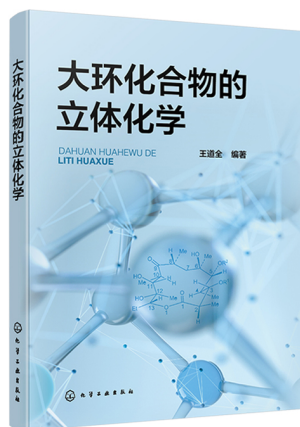
• 书 讯 •

系统阐述大环化合物立体化学方向的高水平专著

《大环化合物的立体化学》

王道全 编著

化学工业出版社 出版



内容简介:

本书在概述大环化合物的研究概况、发展趋势及展望的基础上,系统阐述了普通大环化合物的立体化学,包括大环烷、大环烯烃、大环炔烃、大环酮、大环内酯和大环内酰胺的构象,及其由环内双键和环上取代基引起的顺反异构等内容,重点分析了大环化合物的构象。此外,还介绍了大环化合物某些特有的性质以及发生在大环上的几个典型反应的构象分析。

图书特点:

- 1) 汇集团队研究成果,重点分析大环化合物构象。本书是作者科研团队多年来研究成果的集大成,是我国首部系统阐述大环化合物立体化学方向的高水平专著。
- 2) 系统开展基础研究,大力推动新农药创制工作。本书作者科研团队在系统开展了阿维菌素结构改造研究后,在麝香酮合成研究、环十二酮立体化学研究和大环化合物作为农药的创新研究等方面做了大量的工作,并取得了阶段性成果,可为发掘大环化合物的农药活性、推动新农药创制助力。

◆书 号: 978-7-122-45102-6 ◆定 价: 98.00 元 ◆出版时间: 2024 年 4 月 ◆开 本: 小 16 开

邮购地址: 北京市东城区青年湖 13 号化学工业出版社; 邮编: 100011; 当当、京东、天猫网店均可销售, 输入书号或书名搜索。也可联系出版社相关人员 (电话: 010-64519154/17610529386)。约稿出书请联系 (电话: 010-64519457/13810683813)。

(刘 军 提供)