

## C-7位卤代酰基头孢化物的合成及其抗菌活性研究

李 洋<sup>1</sup>, 范 莉<sup>1</sup>, 唐雪梅<sup>2</sup>, 杨德蒙<sup>1</sup>, 胡军华<sup>3\*</sup>, 吴玉珠<sup>3</sup>, 占 爽<sup>3</sup>, 杨大成<sup>1\*</sup>

(1. 西南大学化学化工学院, 重庆市高校应用化学重点实验室, 生物有机与药物化学研究所, 重庆 400715;  
2. 西南大学科学技术处, 重庆 400715; 3. 西南大学柑橘研究所, 重庆 400715)

**摘要:** 头孢类药物广泛用于感染疾病的治疗。上市头孢药物结构的差别, 主要在其C-7位氨基侧链以及C-3位基团的不同。本研究尝试性地选取C-3位基团不同的4种头孢母核, 采用C-7位氨基引入简单基团修饰的策略, 设计并合成了5个系列25个头孢卤代酰基化分子, 测试了抗人致病菌、抗毕赤酵母菌、抗柑橘溃疡病菌及病原真菌的活性。生物活性测试结果表明, 大多数分子具有抗人致病菌活性, 其中7个化合物, 包括TM1f, 对8株人致病菌的抑制活性强于或相当于上市药物头孢噻吩、头孢西丁钠和头孢唑肟钠; TM1s抑制柑橘褐斑病菌*Al.6*的活性强于头孢噻吩, 与阳性对照咪唑鲜胺相当, 首次发现头孢类分子具有强抗柑橘病原真菌活性。TM1f和TM1s值得进一步研究。

**关键词:** 头孢; 卤代酰基; 抗人致病菌活性; 抗毕赤酵母菌活性; 抗柑橘溃疡病活性; 抗柑橘病原真菌活性  
**中图分类号:** R916      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0513-4870(2021)07-1965-11

## Synthesis and antibacterial activity of C-7 haloacyl cephalosporins

LI Yang<sup>1</sup>, FAN Li<sup>1</sup>, TANG Xue-mei<sup>2</sup>, YANG De-meng<sup>1</sup>, HU Jun-hua<sup>3\*</sup>, WU Yu-zhu<sup>3</sup>,  
ZHAN Shuang<sup>3</sup>, YANG Da-cheng<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Applied Chemistry of Chongqing Municipality, Institute of Bioorganic and Medicinal Chemistry, School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China;  
2. Science and Technology Division, Southwest University, Chongqing 400715, China; 3. Citrus Research Institute, Southwest University, Chongqing 400715, China)

**Abstract:** Cephalosporins are widely used in the treatment of infectious diseases. The structural differences in cephalosporin drugs mainly lie in the C-7 amino side chain and the C-3 substituent. In this study, twenty-five haloacylated cephalosporins of five series were designed by using a strategy of introducing simple substituents at the C-7 amino group in four cephalosporin parent nucleus with different C-3 substituents and efficiently synthesized under optimized conditions. Their activities against human pathogenic bacteria, *Pichia pastoris*, citrus canker and citrus pathogenic fungi were evaluated. The results showed that most of the molecules had activity against human pathogenic bacteria, of which seven compounds including TM1f had stronger or equivalent inhibitory activities against eight human pathogens than the marketed drugs cefalotin, cefoxitin sodium and ceftizoxime sodium. The inhibitory activity of TM1s against *Alternaria alternata* Al.6 was stronger than that of cephalosporins and comparable to that of the positive control prochloraz. TM1f and TM1s are worthy of further study.

**Key words:** cephalosporin; halogenated acid chloride; activity against human pathogenic bacteria; activity against *pichia pastoris*; anti-citrus canker activity; activity against citrus pathogenic fungi

收稿日期: 2021-03-09; 修回日期: 2021-03-24.

基金项目: 重庆市技术创新与应用发展专项面上项目 (cstc2019jsex-msxmX0123); 重庆市北碚区应用开发计划项目 (2018-5).

\*通讯作者 Tel: 86-13640566978, E-mail: hxydc@swu.edu.cn;

Tel: 86-13983086553, E-mail: 709882528@qq.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0337

感染是指微生物在宿主体内生活时与宿主相互作用并导致不同程度的病理变化的过程。感染无处不在,给人类造成很多烦恼和伤害,甚至导致死亡。目前解决感染的医疗方法,主要采用化学治疗。化学治疗药物种类繁多,诸如抗生素类药物、抗细菌类药物、抗真菌类药物、抗结核类药物、抗病毒类药物等。这些药物,适用于一种或多种感染,能够解决感染性疾病的传播,有效保护人类健康。

头孢菌素,抗菌谱广、毒性低,在感染治疗中得到了广泛的应用。目前头孢在临床中大致分为五代:以头孢拉定、头孢唑林、头孢氨苄为代表的第一代头孢药物对革兰阳性菌作用强,对革兰阴性菌作用较弱;以头孢唑啉、头孢克洛、头孢替胺为代表的第二代头孢药物在保持对革兰阳性菌作用强的基础上,增强了对革兰阴性菌的抗菌活性;以头孢他啶、头孢曲松、头孢哌酮为代表的第三代头孢药物以及以头孢吡肟、头孢唑南、头孢匹罗为代表的第四代头孢药物对革兰阳性菌、革兰阴性菌以及厌氧菌均有广谱的抗菌活性,且第四代头孢药物抗革兰阳性菌活性强于第三代、对肾脏无毒性;第五代头孢药物包括头孢洛林酯、头孢托罗和头孢吡普,抗菌超广谱且无肾毒性<sup>[1,2]</sup>。分析头孢类上市药物分子的结构发现,头孢药物分子由头孢母核、C-7位氨基修饰基团、C-3位取代基三部分组成;头孢母核,常见的有7-ACA、7-ACCA、7-ANCA、7-MAC和7-MCA(7-MAC脱除二苯甲基者)(结构见图1);头孢C-7位氨基修饰基团,可以是简单的噻吩乙酰基、*L*-苯甘氨酸基、半胱氨酸基、氰甲基巯基乙酰基、氨基噻唑乙酰基等,也可以是很复杂的结构片段2-呋喃基-(*Z*)-2-甲氧基亚胺基乙酰基、2-(4-氨基)噻唑-(*Z*)-2-甲氧基亚胺基乙酰基等。C-3位修饰基团,较常见的有乙酰氧甲基、氯原子、甲基巯基四氮唑甲基。五代头孢药物结构上的主要差别是C-7位氨基侧链以及C-3位基团的不同。

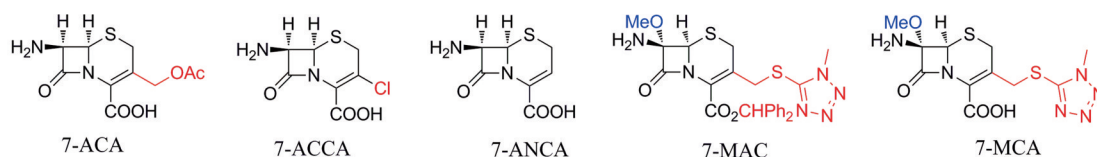


Figure 1 Structures of some cephalosporin parent nucleus

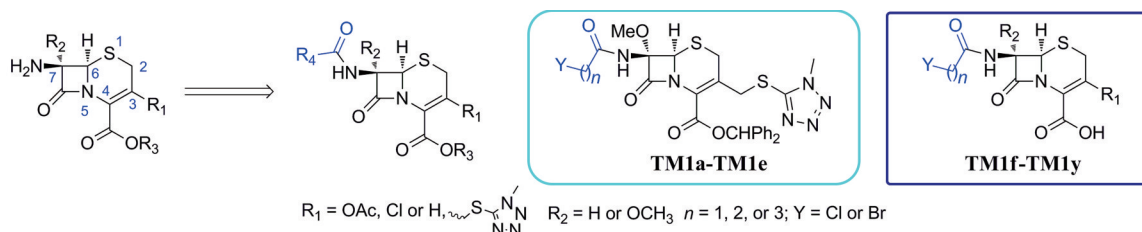


Figure 2 Model and their general structures of target molecules

对头孢类分子的研究,虽然尚有结构改造或修饰的研究<sup>[3-6]</sup>,但目前主要集中在抗菌活性的研究<sup>[7-12]</sup>;为提高头孢类药物的稳定性,最常见的是对C-7位侧链取代基和C-3位取代基进行改造<sup>[1]</sup>。本研究室长期开展氟喹诺酮药物的衍生研究<sup>[13-18]</sup>,发现氟喹诺酮母核引入简单基团,包括氯代酰基,可以获得较其母核更好的抗菌活性、抗结核活性等<sup>[19]</sup>,有鉴于此,尝试性地对头孢母核进行简单修饰,希望发现较母核活性更好、或者较其结构相近的头孢药物活性更好、或者具有未报道活性的新分子,由此设计了如下的分子模式及目标分子(图2)。

$R_4$ 可以是简单基团,也可以是复杂结构。作为研究伊始的尝试,作者选取4种头孢母核和多种卤代酰基,设计了5个系列25个简单目标分子;在测试目标分子对人致病菌、真菌的抗菌活性之后,开展目标分子抑制柑橘溃疡病菌及病原真菌的活性研究。本研究既发现了高活性抗细菌分子,也发现了强活性抗柑橘病原真菌分子。

## 结果与讨论

### 1 化学实验

药物分子合成的难易,主要取决于分子结构的复杂程度、溶解性和稳定性。本研究涉及7-MAC、7-ACA、7-ACCA及7-ANCA(后3者统称为7-AXCA)头孢母核,7-MAC为羧酸酯型母核,7-AXCA为羧酸型母核,它们的溶解性差异很大,必须采用不同的合成方法。

**1.1 7-MAC衍生物TM1a~TM1e的合成** 7-MCA是头孢美唑、头孢米诺等药物的母核,其对应药物活性强、不良反应小;7-MAC脂溶性强,便于溶剂选择,但7-氨基碳上连接甲氧基,使氨基周围空间位阻大,导致其修饰难度大于另外3种母核。借鉴本实验室的经验,首先选择7-MAC进行设想分子的合成。鉴于 $\beta$ -内酰胺

抗生素结构中 C-4 位的游离羧基是抗菌作用的必需基团、多数头孢药物为羧基型化合物, 因此将 7-MAC 卤代酰基衍生物 **TM1a**~**TM1e** 进一步水解, 获得相应的目标分子 **TM1f**~**TM1j**。

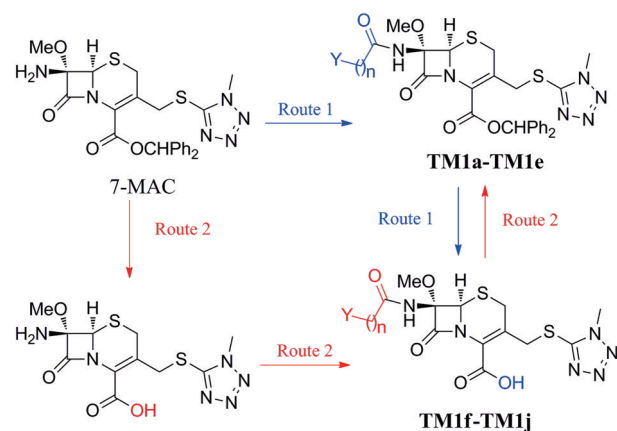
从合成目标分子 **TM1a**~**TM1e** 和 **TM1f**~**TM1j** 考虑, 应该有两条路线 (route 1, route 2) (合成路线 1)。无论从路线长短、原料溶解性、反应选择性、反应难易还是后处理难度, route 1 具有明显的优势。通过反应条件选取, 获得了合成路线 2 所示的路线及其反应条件。

卤代酰氯是双官能团分子, 反应的选择性必须控制。此外, 头孢母核衍生的主要问题在于母核的不稳定

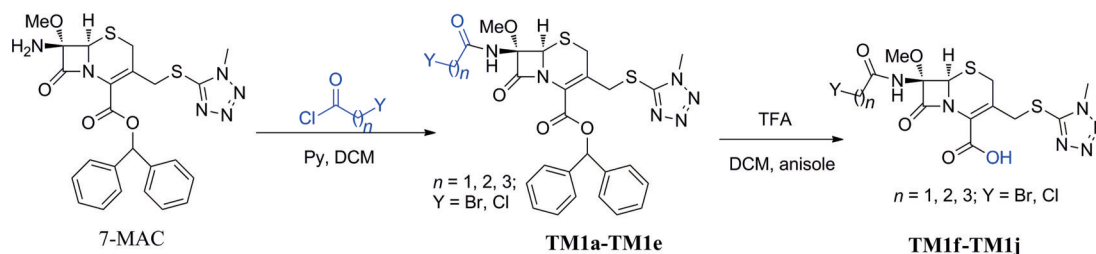
性, 强碱、强热、强还原条件等都会导致母核破坏、双键移位、手性改变等<sup>[20,21]</sup>。因此, 优化或弱化反应条件是必须开展的研究过程。

研究伊始, 采用氨基和酰氯反应的常规条件进行 7-MAC 的酰基化, 发现总是有两种产物, 且其  $R_f$  值接近, 因此进行反应条件探索。8 种碱的平行实验结果表明, 吡啶的反应效果最好; 投料比平行实验显示, 7-MAC/Py、7-MAC/Py 的摩尔比为 1:1.5 时反应最好; 温度试验表明, 于低温反应器 (-25 °C)、冰浴 (4 °C) 中搅拌反应, 氯乙酰化都能在 2 h 完成, 但 <sup>1</sup>H NMR 表征显示, 4 °C 进行的反应其部分产物双键移位, 成为 2-位双键 ( $\Delta^2$ ) 及 3-位双键 ( $\Delta^3$ ) 异构体的混合物且分离困难, 而 -25 °C 条件下的反应产物双键未移位。目前认为, 头孢菌素中的  $\Delta^3$  对抗菌活性至关重要, 如果  $\Delta^3$  移位至  $\Delta^2$  或将双键饱和, 抗菌活性就会减弱<sup>[1]</sup>; 当头孢菌素化合物以酯的形式出现时, 容易发生  $\Delta^2$  与  $\Delta^3$  的异构化<sup>[22,23]</sup>。因此, 反应温度应控制为 -25 °C 从而防止双键移位以确保分子的抗菌活性。

至此, 优化的反应条件为: 7-MAC 与氯乙酰氯及吡啶的投料比为 1:1.5:1.5, 在 -25 °C 的二氯甲烷溶液中快速搅拌反应。采用此优化条件, 实现了目标分子 **TM1a**~**TM1e** 的有效合成 (表 1), 收率高于 85%, 且 **TM1c** > **TM1b** > **TM1a**。



Scheme 1 Synthetic routes of 7-MAC derivatives



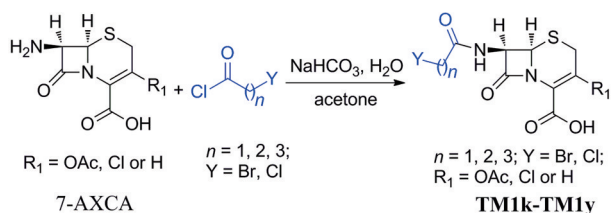
Scheme 2 Synthesis of 7-MAC derivatives

Table 1 Synthetic results of **TM1a**~**TM1e**

Entry	Compd.	7-MAC g/mmol	Y(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> COCl g/mmol	Py g/mmol	Temp./°C	Time/h	Weight/g	Yield/%
1	<b>TM1a</b>	2.63/5	2-ClCH <sub>2</sub> COCl 0.847/7.5	0.61/7.5	-25	1.5	2.55	85
2	<b>TM1b</b>	2.64/5	3-Cl(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COCl 0.952/7.5	0.63/7.5	-25	1.5	2.88	93
3	<b>TM1c</b>	2.64/5	4-Cl(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COCl 1.057/7.5	0.59/7.5	-25	1.5	3.017	97
4	<b>TM1d</b>	2.63/5	3-Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COCl 1.286/7.5	0.66/7.5	-25	1.5	3.090	94
5	<b>TM1e</b>	2.64/5	4-Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COCl 1.391/7.5	0.62/7.5	-25	1.5	2.125	91
6	<b>TM1a</b>	5.24/10	2-ClCH <sub>2</sub> COCl 1.694/15	1.18/15	-25	1.5	5.349	89
7	<b>TM1a</b>	10.04/20	2-ClCH <sub>2</sub> COCl 3.40/30	2.34/30	-25	2.0	10.934	91

7-MAC 衍生物脱二苯甲基, 工业生产上常采用  $\text{AlCl}_3$  [24]。借此方法, 实验了 **TM1a** 的脱除效果, 发现操作不简便、含有杂质、收率不高; 选用多肽合成 [25] 中常用的三氟醋酸 (TFA), 操作简单, 反应快速, 收率很高, 相关结果见表 2。

**1.2 7-AXCA 衍生物的合成** 7-AXCA 在常见有机溶剂中溶解度不好, 但是可溶于有机溶剂的碱性水溶液 [26]。初步实验后, 选定了合成路线 3 所示的合成反应。



**Scheme 3** Synthesis of 7-AXCA derivatives

通过条件探索, 发现投料比 7-AXCA/ $\text{Y}(\text{CH}_2)_n\text{COCl}$ / $\text{NaHCO}_3$  为 1:1.5:3 最好, 在室温 (4~19 °C) 反应 3.5~4 h, 反应已经结束。经过简单后处理, 得到目标分子 **TM1k~TM1y**, 收率中等到优秀。相关实验结果见表 3。

## 2 生物活性评价

**2.1 抗人致病菌活性** 人类被感染, 许多是被微生物攻击所致。医治感染疾病, 最好最简单的措施是药物对症治疗。寻找针对不同致病菌株的药物, 是药物研究的长期课题。作者采用本实验室常用的测试方法 [27-29], 测试了目标分子 **TM1a~TM1y** 对 4 株革兰阴性菌株、4 株革兰阳性菌株的抑菌能力, 相关结果见表 4。

目标分子的活性都强于或相当于母核分子、相当或弱于头孢上市药物; **TM1f** 对所测试菌株的抑制活性整体最好; 目标分子对藤黄微球菌株的抑制活性整体最强。此外, 革兰阴性菌株对卤代酰基产物的敏感性整体为: 大肠杆菌 > 铜绿假单胞菌 > 沙门氏菌 > 鲍

曼不动杆菌; 对革兰阳性菌株而言, 其敏感性整体为: 藤黄微球菌 > 枯草芽孢杆菌 > 金葡菌。

对大肠杆菌, 4 个头孢母核本身均未显示出明显抑制活性, 而目标分子的整体活性是 **TM1f~TM1j** > **TM1k~TM1o** > **TM1a~TM1e** > **TM1u~TM1y** > **TM1p~TM1t**, 对应母核依次为 7-MCA、7-ACA、7-MAC、7-ANCA 及 7-ACCA; 卤代酰基碳链长度对化合物的抑菌活性整体表现为  $2\text{C} \gg 3\text{C} \approx 4\text{C}$ ; 碳链长度相同时, 含氯者的活性一般强于含溴者。7-MAC 卤代酰基产物 **TM1a~TM1e** 的活性弱于脱除二苯甲基后的产物 **TM1f~TM1j** (7-MCA 型), 说明 C-4 位羧基型分子的抗菌活性明显强于对应酯型分子。25 个目标分子中有 11 个化合物  $\text{MIC} = 2 \sim 16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 活性强于或相当于上市药物头孢噻吩 ( $16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , MIC 值, 后同); **TM1f** 及 **TM1g** 与上市药物头孢西丁钠、头孢唑肟钠抑制活性 ( $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 相当, 是头孢噻吩的 8 倍。

对沙门氏菌, 上市药物头孢西丁钠及头孢唑肟钠、4 个头孢母核以及绝大多数目标分子均未显示出明显抑制活性 ( $\geq 256 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 但是 7-ACA 卤代酰基产物 **TM1k/TM1n** 的抑制活性 ( $32/64 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 为上市药物头孢噻吩 ( $64 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 的 2 倍或相当。

对鲍曼不动杆菌, 4 个头孢母核、头孢西丁钠及几乎所有目标分子均未显示出明显抑制活性, 然而 **TM1k** 与头孢噻吩、头孢唑肟钠相当 ( $128 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。

对铜绿假单胞菌, 虽然 4 个头孢母核及 7-ANCA、7-ACCA、7-MAC 的酰基衍生物活性很差 ( $\geq 256 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 但 7-MCA 和 7-ACA 的卤代酰基产物显示明显的抑制活性 ( $4 \sim 128 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 7-MCA 卤代酰基产物 **TM1f~TM1j** 抑制活性为 7-MAC 卤代酰基产物 **TM1a~TM1e** 的 4~8 倍; 特别地, **TM1f** 抑制活性 ( $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 为头孢西丁钠的 4 倍、头孢噻吩的 8 倍、头孢唑肟钠的 16 倍, 值得进一步研究。

对藤黄微球菌, 4 种母核几乎无活性, 但 25 个卤代

**Table 2** Synthetic results of **TM1f~TM1j**

Entry	Compd.	Y	n	<b>TM1a~TM1e</b> g/mmol	DCM/mL	TFA/mL	Temp./°C	Weight/g	Yield/%
8	<b>TM1f</b>	Cl	1	<b>TM1a</b> 1.202/2.0	1.0	1.0	4→15	0.78	89
9	<b>TM1g</b>	Cl	2	<b>TM1b</b> 1.230/2.0	1.0	1.0	4→19	0.85	94
10	<b>TM1h</b>	Cl	3	<b>TM1c</b> 1.258/2.0	1.0	1.0	4→16	0.80	89
11	<b>TM1i</b>	Br	2	<b>TM1d</b> 1.319/2.0	1.0	1.0	4→14	0.88	89
12	<b>TM1j</b>	Br	3	<b>TM1e</b> 1.35/2.0	1.0	1.0	4→16	0.91	90
13	<b>TM1f</b>	Cl	1	<b>TM1a</b> 6.01/10.0	2.0	2.0	4→8	3.66	84

Table 3 Synthetic results of TM1k-TM1y

Entry	Compd.	Y	n	7-AXCA g/mmol	Y(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> COCl g/mmol	NaHCO <sub>3</sub> g/mmol	Temp./°C	Time/h	Weight/g	Yield/%
14	TM1k	Cl	1	7-ACA 1.35/5.0	2-ClCH <sub>2</sub> COCl 0.847/7.5	1.34/15	4→17	3.5	1.60	85
15	TM1l	Cl	2	7-ACA 1.38/5.0	3-Cl(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COCl 0.952/7.5	1.32/15	4→17	3.5	1.62	88
16	TM1m	Cl	3	7-ACA 1.33/5.0	4-Cl(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COCl 1.057/7.5	1.31/15	4→17	3.5	1.72	91
17	TM1n	Br	2	7-ACA 1.34/5.0	3-Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COCl 1.286/7.5	1.29/15	4→17	4.0	1.58	79
18	TM1o	Br	3	7-ACA 1.36/5.0	4-Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COCl 1.390/7.5	1.34/15	4→17	4.0	1.91	89
19	TM1p	Cl	1	7-ACCA 1.17/5.0	2-ClCH <sub>2</sub> COCl 0.847/7.5	1.35/15	4→19	4.0	1.00	67
20	TM1q	Cl	2	7-ACCA 1.21/5.0	3-Cl(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COCl 0.952/7.5	1.36/15	4→19	4.0	1.42	87
21	TM1r	Cl	3	7-ACCA 1.24/5.0	4-Cl(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COCl 1.057/7.5	1.29/15	4→19	4.0	1.47	86
22	TM1s	Br	2	7-ACCA 1.16/5.0	3-Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COCl 1.286/7.5	1.32/15	4→19	4.0	1.41	76
23	TM1t	Br	3	7-ACCA 1.22/5.0	4-Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COCl 1.390/7.5	1.28/15	4→19	4.0	1.52	80
24	TM1u	Cl	1	7-ANCA 1.01/5.0	2-ClCH <sub>2</sub> COCl 0.847/7.5	1.26/15	4→17	4.0	0.90	65
25	TM1v	Cl	2	7-ANCA 1.00/5.0	3-Cl(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COCl 0.952/7.5	1.35/15	4→17	4.0	1.25	86
26	TM1w	Cl	3	7-ANCA 0.99/5.0	4-Cl(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COCl 1.057/7.5	1.34/15	4→17	4.0	1.12	73
27	TM1x	Br	2	7-ANCA 0.97/5.0	3-Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COCl 1.286/7.5	1.27/15	4→17	4.0	1.05	63
28	TM1y	Br	3	7-ANCA 1.04/5.0	4-Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COCl 1.390/7.5	1.33/15	4→17	4.0	1.12	64

酰基产物均显示优秀的抑制活性, 其中 16 个化合物的 MIC 值为  $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 与所测试 3 种头孢药物相当, 尤其是 7-MCA 衍生的 TM1f~TM1j、7-ACA 衍生的 TM1k~TM1o, MIC 值都为  $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 整体活性很好。

对金葡菌 ATCC25129、ATCC14125, 7-MCA 卤代酰基产物普遍具有抑菌活性 ( $8\sim 128 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 其中 TM1f 的抑菌活性强于所测试 3 种头孢药物; 7-MAC 及 7-ACA 卤代酰基产物中的 TM1a 及 TM1k 具有较好抑菌活性 ( $16\sim 64 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 而 7-ACCA 与 7-ANCA 卤代酰基产物几乎无抑菌活性。

对枯草芽孢杆菌, 7-MCA 卤代酰基产物 TM1f~TM1j 都有较好抑菌活性 ( $8\sim 32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 7-MAC、7-ACA 卤代酰基产物中连有氯乙酰基者 (TM1a、TM1k) 的抑制活性 ( $16.8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 分别为头孢噻吩的 4 倍和 8 倍, 且 TM1a 和 TM1k 的抑制活性分别与头孢西丁钠相当或其 2 倍; 7-ACCA、7-ANCA 卤代酰基产物几乎无抑菌活性。

**2.2 抗毕赤酵母菌活性** 呈酵母样或类酵母形态的单细胞真菌中, 有许多种属是动植物乃至人类的病原菌, 如隐球菌属 *Cryptococcus* 真菌等, 易造成浅部或深部组织严重感染。巴斯德毕赤酵母菌 *Komagataella phaffii* 又称毕赤酵母 *Pichia pastoris*, 是一种典型的单细胞真菌, 普遍作为生化研究和医学研究的标准模式生物。毕赤酵母对人和动植物基本无害, 基因组相对保守, 基因编辑工具多且方法成熟, 非常适合作为医学模型筛选药物靶标<sup>[30]</sup>。一般情况下, 毕赤酵母常作为模式物种初步评估药物分子或益生菌等对酵母样真菌的抑制和拮抗活性<sup>[31]</sup>。采用本实验室常用的测试方法<sup>[27-29]</sup>, 作者测试了目标分子 TM1a~TM1y 的抑菌能力, 相关结果见表 5。

表 5 结果表明, 头孢母核、TM1b~TM1e、TM1y 活性最差, TM1g~TM1m、TM1q~TM1x、头孢噻吩活性其次, 但是 TM1a 和 TM1f 显示明显的抑制活性, 分别为头孢噻吩的 8 倍及 4 倍。这类化合物对毕赤酵

**Table 4** Inhibitory activity of target molecule **TM1** against human pathogenic bacteria

Compd.	Inhibitory activity (MIC/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )							
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella Enteritidis</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Bacillus subtilis</i>
						ATCC25129	ATCC14125	
TM1a	4	>256	>256	16	2	64	32	16
TM1b	32	>256	>256	>256	4	>256	>256	>256
TM1c	32	>256	>256	>256	2	>256	>256	>256
TM1d	32	>256	>256	>256	2	256	256	256
TM1e	64	>256	>256	256	8	>256	>256	>256
TM1f	2	256	256	4	2	8	8	8
TM1g	2	>256	256	64	2	16	32	16
TM1h	8	>256	256	64	2	32	64	32
TM1i	8	>256	256	32	2	16	32	32
TM1j	16	>256	256	64	2	128	128	128
TM1k	16	32	128	16	2	16	16	8
TM1l	16	128	256	128	2	128	128	128
TM1m	4	128	256	128	2	64	128	128
TM1n	8	64	256	64	2	128	128	128
TM1o	32	>256	256	128	2	256	>256	256
TM1p	>256	>256	256	256	8	>256	>256	>256
TM1q	256	>256	256	>256	8	256	>256	>256
TM1r	256	>256	256	>256	4	>256	>256	>256
TM1s	128	256	256	256	2	128	256	256
TM1t	256	>256	>256	>256	8	>256	>256	256
TM1u	64	128	256	256	2	256	256	256
TM1v	128	256	>256	>256	8	>256	>256	>256
TM1w	128	>256	>256	>256	2	>256	>256	256
TM1x	16	>256	>256	>256	4	256	>256	256
TM1y	>256	>256	>256	>256	64	>256	>256	>256
7-MAC	>256	>256	>256	>256	128	>256	>256	>256
7-ACA	>256	>256	>256	>256	128	>256	>256	>256
7-ACCA	>256	>256	>256	>256	128	>256	>256	>256
7-ANCA	>256	>256	>256	>256	256	>256	>256	>256
Cefalotin	16	64	128	32	2	32	32	64
Cefoxitin sodium	2	>256	>256	16	2	16	16	16
Ceftizoxime sodium	2	256	128	64	2	64	128	128
Blank control	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256

**Table 5** Inhibitory activity (MIC) of target molecule **TM1** against *Pichia pastoris*

Compd.	MIC/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$		Compd.	MIC/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	
	24 h	48 h		24 h	48 h
TM1a	32	32	TM1r	256	256
TM1b	>512	>512	TM1s	256	256
TM1c	>512	>512	TM1t	256	256
TM1d	>512	>512	TM1u	256	256
TM1e	>512	>512	TM1v	256	256
TM1f	64	64	TM1w	256	256
TM1g	256	256	TM1x	256	256
TM1h	256	256	TM1y	>512	>512
TM1i	256	256	7-MAC	>512	>512
TM1j	256	256	7-ACA	>512	>512
TM1k	256	256	7-ACCA	>512	>512
TM1l	256	256	7-ANCA	>512	>512
TM1m	256	256	Cefalotin	256	256
TM1n	128	128	Fluconazole	4	4
TM1o	128	128	Blank control	>512	>512
TM1q	256	256			

母菌的抑制活性整体较差,表明该类化合物对毕赤酵母菌不敏感,具有一定的选择性。

**2.3 抗柑橘溃疡病菌和病原真菌活性** 柑橘溃疡病

分布广泛,可危害几十种芸香科植物,是影响世界柑橘生产的重大检疫性病害。柑橘溃疡病菌系分化复杂、发病率高、传播快、寄主范围广,防治柑橘溃疡病一直是一个世界性难题,目前尚无一种方法可以根治<sup>[28]</sup>。采用本实验室常用的测试方法<sup>[27-29]</sup>,对目标分子进行了抗柑橘溃疡病菌的活性测试,相关结果见表6。

柑橘在全世界范围内具有长期的选育和栽培历史,近百年来随着全球柑橘种质和苗木的频繁交流,共同促进了柑橘真菌性病害起源和扩散。柑橘褐斑病和柑橘炭疽病对柑橘生长危害较严重,每年必须做4~8次药剂防控,而长期使用化学杀菌剂会导致病原菌产生抗药性,并且大量喷洒杀菌剂也会造成环境污染。因此,生产上需要一批低毒或无害且高效抑制柑橘真菌性病害的新药物<sup>[29]</sup>。采用本实验室常用的测试方法<sup>[27-29]</sup>,对目标分子进行了抗柑橘胶孢炭疽菌 *Co.3* 和柑橘褐斑病菌 *Al.6* 活性测试,相关结果见表6和表7。

表6结果显示,所合成的化合物抑制柑橘溃疡病菌活性随化合物浓度降低而减弱,具有较好的活性-剂

**Table 6** Inhibitory activity of target molecule **TM1** ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) against Citrus-Canker and Citrus- pathogenic fungi (inhibition %)

Compd.	Inhibitory activity/%									
	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Citri</i> , <i>RL strain</i>				<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>Co.3</i>				<i>Alternaria alternata</i> , <i>Al.6</i>	
	2	1	0.5	0.2	4	2	4	2		
<b>TM1a</b>	42	32	32	12	0	0	0	0		
<b>TM1b</b>	43	28	11	-3	0	0	0	0		
<b>TM1c</b>	70	44	43	1	0	0	0	0		
<b>TM1d</b>	52	45	35	-29	0	0	0	0		
<b>TM1e</b>	17	-7	-24	-43	0	0	0	0		
<b>TM1f</b>	71	70	27	-9	0	0	0	0		
<b>TM1g</b>	68	66	7	-14	0	0	0	0		
<b>TM1h</b>	68	67	27	15	0	0	0	0		
<b>TM1i</b>	69	65	19	-14	0	0	0	0		
<b>TM1j</b>	66	54	2	-58	0	0	0	0		
<b>TM1k</b>	19	-10	-25	-73	0	0	0	0		
<b>TM1l</b>	14	13	-6	-19	20	20	0	0		
<b>TM1m</b>	32	21	16	2	0	0	0	0		
<b>TM1n</b>	15	1	-4	-10	0	0	30	20		
<b>TM1o</b>	13	10	-21	-43	0	0	0	0		
<b>TM1p</b>	19	19	-5	-32	0	0	0	0		
<b>TM1q</b>	29	-8	-10	-29	0	0	0	0		
<b>TM1r</b>	-6	-13	-32	-98	20	20	0	0		
<b>TM1s</b>	-3	-6	-25	-68	0	0	90	30		
<b>TM1t</b>	45	22	-10	-25	0	0	0	0		
<b>TM1u</b>	-1	-4	-19	-18	0	0	0	0		
<b>TM1v</b>	12	7	-11	-59	0	0	0	0		
<b>TM1w</b>	7	-21	-61	-107	0	0	0	0		
<b>TM1x</b>	4	4	-14	-22	0	0	0	0		
<b>TM1y</b>	16	4	4	-36	0	0	0	0		
7-MAC	22	10	-19	-25	0	0	0	0		
7-ACA	25	11	-9	-29	0	0	0	0		
7-ACCA	18	5	-1	-45	0	0	0	0		
7-ANCA	-10	-8	-81	-85	0	0	0	0		
Cefalotin	12	7	-1	-22	0	0	60	50		
Blank control					0	0	0	0		
Prochloraz					90	80	90	50		

**Table 7** Second screening results of target molecule **TM1** against *Alternaria alternata*, *Al.6*

Compd.	Regression equation	$\text{KD}_{50}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$r$	Standard error	Chi-square value	95% confidence limit
<b>TM1s</b>	$Y = 4.5816 + 0.6194 \times X$	4.7363	0.8359	1.8232	0.1706	0.0013-17738.3184

量关系;在浓度为 $2,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 下,7-MCA 卤代酰基产物 **TM1f**~**TM1j** 抑菌活性最好(抑制率分别为66%~71%、54%~70%),强于同等浓度下的7-MAC 卤代酰基产物 **TM1a**~**TM1e** (17%~70%、-7%~45%),也远强于头孢噻吩(12%、7%);卤代酰基产物对应头孢母核的活性强弱顺序为7-MCA > 7-MAC > 7-ACA  $\approx$  7-ACCA > 7-ANCA。本研究首次报道,某些头孢母核的酰基衍生物具有抑制柑橘溃疡病菌活性。

对柑橘病原真菌,在浓度为 $2,4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,绝大多数目标分子对柑橘胶孢炭疽菌 *Co.3* 及柑橘褐斑病菌 *Al.6* 无抑制活性,但 $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度的 **TM1s** 对褐斑病菌 *Al.6* 的抑制率高达90%,与阳性对照咪唑胺相当,强于同类药物头孢噻吩,值得进一步研究。目前未见文献报道头孢卤代酰基产物对柑橘病原真菌具有强烈抑制活性。

### 3 结论

提高头孢药物稳定性的措施之一是对头孢母核的C-7位侧链取代基和C-3位取代基进行改造。本研究选取C-3位取代基不同的4种头孢母核进行C-7位氨基修饰,在优化的反应条件下,以中等至高收率合成了相应目标分子,所得25个卤代酰基衍生物的分子结构得到 $^1\text{H NMR}$ 及HR-MS的确证。大多数分子具有抗人致病菌活性,其中7个化合物对于所测试的人致病菌活性强于或相当于上市药物头孢噻吩、头孢西丁钠、头孢唑钠, **TM1f**显示了最强最广的抑菌活性;此外, **TM1s**对柑橘褐斑病菌 *Al.6* 特别敏感,抑菌活性与阳性对照咪唑胺相当,且强于同类药物头孢噻吩。本研究发现了较头孢母核活性更好、或者较其结构相近的头孢药物活性更好、或者具有未报道活性的新分子。目标分子的后续衍生物及其生物活性会陆续报道。

## 实验部分

### 1 目标化合物的合成

7-MAC、7-ACA、7-ACCA 及 7-ANCA (重庆天地药业有限责任公司赠送, AR); 氯乙酰氯、3-氯丙酰氯、4-氯丁酰氯和 4-溴丁酰氯 (上海达瑞精细化工有限公司, AR); 碳酸氢钠、吡啶 (重庆市钛新化工有限公司, AR); 其余试剂均为市售化学纯或分析纯产品, 未经纯化直接使用。

磁力搅拌低温恒温水槽 (PSL-1810, 上海爱朗仪器有限公司); 熔点测定仪 (X-6, 北京福凯仪器有限公司); 自动旋光仪 (WZZ-2S, 上海精密科学仪器有限公司); 核磁共振仪 (AV-600, Bruker, USA; TMS 为内标)。

**TM1a~TM1e** 合成的操作示例:

100 mL 圆底烧瓶中加入 7-MAC 5 mmol、DCM 4 mL, 搅拌, 溶解完全后, 置于低温反应器中, 控温 (-25 °C) 搅拌, 溶解均匀后加入吡啶 7.5 mmol, 搅拌 20 min, 滴加酰氯 7.5 mmol 的 DCM 1 mL 溶液, 滴加速度约为每秒 4 滴。滴毕, -25 °C 下持续搅拌反应, TLC 监测反应进程。反应结束, 加入冰冷的饱和食盐水 20 mL 和 DCM 20 mL, 快速搅拌, 0.5 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液调节 pH = 2~3。移至分液漏斗, 分液, DCM 萃取 (20 mL×1) 水相, 合并有机相, 饱和食盐水洗涤 (20 mL×2), 收集有机相, 无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 旋蒸, 真空干燥, 得到目标分子 **TM1a~TM1e**。

**TM1f~TM1j** 合成的操作示例:

100 mL 圆底烧瓶中加入 **TM1a~TM1e** 2.0 mmol、DCM 1.0 mL, 搅拌溶解, 加入苯甲醚 2.0 mmol, 冰浴, 搅拌, 滴加 TFA 1.0 mL。滴毕, 移至室温搅拌, TLC 监测反应进程。反应结束, 慢加乙醚 5 mL、石油醚 20 mL, 搅拌, 冷冻, 析出固体后, 抽滤, 石油醚洗涤, 得固体粉末, 真空干燥, 得到目标分子 **TM1f~TM1j**。

**TM1k~TM1y** 合成的操作示例:

于 100 mL 反应瓶中依次加入 7-AXCA (5 mmol)、丙酮 5 mL 和水 1 mL, 室温搅拌, 加入碳酸氢钠 (1.26 g, 1.5 mmol), 冰浴, 滴加酰氯 (1.0 mmol), 搅拌。TLC 监测反应进程。反应完全后, 加入冰冷 2 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸调节 pH = 7, 旋除溶剂丙酮, 冷冻析出固体, 加入冰冷 2 mol·L<sup>-1</sup> HCl 调节 pH = 3, 大量固体析出。抽滤, 干燥, 得固体 **TM1k~TM1y**。

**TM1** 系列化合物的表征数据如下:

**TM1a**: 淡黄色固体, mp 96~97 °C,  $[\alpha]_D^{23} +228$  (*c* 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta_H$  9.68 (s, 1H), 7.54 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.46 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.36 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.33 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.29 (dd, *J* = 13.5, 7.3 Hz, 2H), 6.89 (s, 1H), 5.22 (s, 1H), 4.39 (d,

*J* = 13.3 Hz, 1H), 4.22 (d, *J* = 3.8 Hz, 2H), 4.18 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.76 (d, *J* = 17.9 Hz, 1H), 3.57 (d, *J* = 17.8 Hz, 1H), 3.44 (s, 3H)。HR-MS calcd. for C<sub>26</sub>H<sub>25</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>, [M+H]<sup>+</sup>: 601.108 9, found: 601.108 7; [M+Na]<sup>+</sup>: 623.090 8, found: 623.090 6。

**TM1b**: 淡黄色固体, mp 96~97 °C,  $[\alpha]_D^{23} +150$  (*c* 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta_H$  9.42 (s, 1H), 7.54 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.46 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.36 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.33 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.29 (dd, *J* = 14.1, 7.2 Hz, 2H), 6.88 (s, 1H), 5.18 (s, 1H), 4.37 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H), 4.16 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.79 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.75 (d, *J* = 18.1 Hz, 1H), 3.55 (d, *J* = 17.9 Hz, 1H), 3.42 (s, 3H), 2.76 (tt, *J* = 12.3, 8.0 Hz, 2H)。HR-MS calcd. for C<sub>27</sub>H<sub>27</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>, [M+H]<sup>+</sup>: 615.124 6, found: 615.124 5; [M+Na]<sup>+</sup>: 637.106 5, found: 637.106 4。

**TM1c**: 黄色油状物,  $[\alpha]_D^{23} +196$  (*c* 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta_H$  9.33 (s, 1H), 7.54 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.45 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.36 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.32 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.29 (dd, *J* = 14.2, 7.3 Hz, 2H), 6.87 (s, 1H), 5.16 (s, 1H), 4.37 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H), 4.16 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.74 (d, *J* = 17.9 Hz, 1H), 3.65 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.55 (d, *J* = 17.9 Hz, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.44~2.40 (m, 2H), 1.98~1.93 (m, 2H)。HR-MS calcd. for C<sub>28</sub>H<sub>29</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>, [M+H]<sup>+</sup>: 629.140 2, found: 629.140 2; [M+Na]<sup>+</sup>: 651.122 1, found: 651.122 0。

**TM1d**: 黄色油状物,  $[\alpha]_D^{23} +104$  (*c* 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta_H$  9.41 (s, 1H), 7.54 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.46 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.36 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.33 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.29 (dd, *J* = 14.1, 7.2 Hz, 2H), 6.88 (s, 1H), 5.17 (s, 1H), 4.37 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H), 4.16 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.75 (d, *J* = 18.0 Hz, 1H), 3.64 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.55 (d, *J* = 17.9 Hz, 1H), 3.43 (d, *J* = 5.0 Hz, 3H), 2.96~2.85 (m, 2H)。HR-MS calcd. for C<sub>27</sub>H<sub>27</sub>BrN<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>, [M+Na]<sup>+</sup>: 681.056 0, found: 681.055 6。

**TM1e**: 黄色油状物,  $[\alpha]_D^{23} +169$  (*c* 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta_H$  9.35 (s, 1H), 7.55 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.47 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.37 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.33 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.31~7.27 (m, 2H), 6.89 (s, 1H), 5.17 (s, 1H), 4.39 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H), 4.17 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 3.87 (d, *J* = 14.8 Hz, 4H), 3.76 (d, *J* = 17.9 Hz, 1H), 3.56 (dd, *J* = 12.3, 5.3 Hz, 2H), 3.46 (s, 3H), 2.45~2.40 (m, 2H), 2.05 (td, *J* = 13.5, 6.9 Hz, 2H)。HR-MS calcd. for C<sub>28</sub>H<sub>29</sub>BrN<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>, [M+Na]<sup>+</sup>: 695.071 6, found: 695.071 0。

**TM1f**: 淡黄色固体, mp 131~132 °C,  $[\alpha]_D^{23} +180$

(*c* 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> 9.61 (s, 1H), 5.14 (s, 1H), 4.36 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 4.23 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.19 (t, *J* = 10.7 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.73 (d, *J* = 17.5 Hz, 1H), 3.49 (d, *J* = 17.9 Hz, 1H), 3.40 (s, 3H)。HR-MS calcd. for C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>, [M+H]<sup>+</sup>: 435.030 7, found: 435.030 4; [M+Na]<sup>+</sup>: 457.012 6, found: 457.012 4。

**TM1g**: 淡黄色固体, mp 100~101 °C, [α]<sub>D</sub><sup>23</sup> +213 (*c* 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> 9.36 (s, 1H), 5.10 (s, 1H), 4.35 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 4.20 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.78 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.73 (d, *J* = 18.2 Hz, 2H), 3.48 (d, *J* = 17.9 Hz, 1H), 3.39 (s, 3H), 2.82~2.70 (m, 2H)。HR-MS calcd. for C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>, [M+H]<sup>+</sup>: 449.046 3, found: 449.046 1; [M+Na]<sup>+</sup>: 471.028 2, found: 471.028 1。

**TM1h**: 淡黄色固体, mp 100~102 °C, [α]<sub>D</sub><sup>23</sup> +125 (*c* 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> 9.28 (s, 1H), 5.09 (s, 1H), 4.36 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 4.19 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.72 (d, *J* = 17.8 Hz, 1H), 3.65 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.48 (d, *J* = 17.9 Hz, 1H), 3.37 (s, 3H), 2.39 (dd, *J* = 16.0, 8.8 Hz, 2H), 1.95 (dt, *J* = 13.6, 6.7 Hz, 2H)。HR-MS calcd. for C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>, [M+H]<sup>+</sup>: 463.062 0, found: 463.061 8; [M+Na]<sup>+</sup>: 485.043 9, found: 485.043 7。

**TM1i**: 淡黄色固体, mp 110~114 °C, [α]<sub>D</sub><sup>23</sup> +248 (*c* 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> 9.36 (s, 1H), 5.10 (s, 1H), 4.35 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H), 4.20 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.75~3.69 (m, 2H), 3.63 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.48 (d, *J* = 17.9 Hz, 2H), 3.39 (s, 3H), 2.95~2.84 (m, 2H)。HR-MS calcd. for C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>BrN<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>, [M+Na]<sup>+</sup>: 514.977 7, found: 514.977 4。

**TM1j**: 淡黄色固体, mp 106~109 °C, [α]<sub>D</sub><sup>23</sup> +108 (*c* 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> 9.29 (s, 1H), 5.09 (s, 1H), 4.36 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 4.19 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.73 (dd, *J* = 14.5, 7.5 Hz, 1H), 3.54 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.48 (d, *J* = 17.9 Hz, 1H), 3.37 (s, 3H), 2.41 (dd, *J* = 16.6, 7.4 Hz, 2H), 2.04 (td, *J* = 13.6, 6.9 Hz, 2H)。HR-MS calcd. for C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>BrN<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>, [M+Na]<sup>+</sup>: 528.993 4, found: 528.993 0。

**TM1k**: 白色固体, mp 182~185 °C, [α]<sub>D</sub><sup>23</sup> +227 (*c* 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> 8.93 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.68 (dd, *J* = 8.0, 5.0 Hz, 1H), 5.10 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 5.00 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 4.69 (d, *J* = 12.8 Hz, 2H), 4.17 (s, 2H), 3.55~3.47 (m, 2H), 2.03 (s, 3H)。HR-MS calcd. for C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S, [M+Na]<sup>+</sup>: 371.007 5,

found: 371.007 5。

**TM1l**: 白色固体, mp 164~165 °C, [α]<sub>D</sub><sup>23</sup> +144 (*c* 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> 13.53 (s, 1H), 9.01 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 5.77~5.71 (m, 1H), 5.11 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 5.01 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 4.69 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 3.79 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.63 (d, *J* = 18.1 Hz, 1H), 3.49 (d, *J* = 18.1 Hz, 1H), 2.70 (s, 2H), 2.03 (s, 3H)。HR-MS calcd. for C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S, [M+Na]<sup>+</sup>: 385.023 1, found: 385.023 2。

**TM1m**: 白色固体, mp 189~192 °C, [α]<sub>D</sub><sup>23</sup> +248 (*c* 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> 8.93 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.69~5.66 (m, 1H), 5.09 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H), 5.00 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 4.69 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 3.64 (s, 2H), 3.62 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 3.49 (d, *J* = 18.2 Hz, 1H), 2.35 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.03 (s, 3H), 1.95 (dd, *J* = 8.3, 5.2 Hz, 2H)。HR-MS calcd. for C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S, [M+Na]<sup>+</sup>: 399.038 8, found: 399.038 6。

**TM1n**: 白色固体, mp 153~156 °C, [α]<sub>D</sub><sup>23</sup> +235 (*c* 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> 13.56 (s, 1H), 9.00 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 5.73 (dd, *J* = 8.2, 4.8 Hz, 1H), 5.11 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 5.01 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 4.69 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 3.65 (dd, *J* = 8.4, 3.6 Hz, 2H), 3.62 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H), 3.49 (d, *J* = 18.1 Hz, 1H), 2.84 (dd, *J* = 12.8, 6.4 Hz, 2H), 2.03 (s, 3H)。HR-MS calcd. for C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S, [M+Na]<sup>+</sup>: 428.972 6, found: 428.972 4。

**TM1o**: 白色固体, mp 176~178 °C, [α]<sub>D</sub><sup>23</sup> +232 (*c* 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> 8.93 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.68 (dd, *J* = 8.0, 4.8 Hz, 1H), 5.10 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 5.00 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 4.69 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 3.66~3.61 (m, 2H), 3.55~3.47 (m, 2H), 2.36 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.25~2.13 (m, 1H), 2.04 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H), 1.98~1.91 (m, 1H)。HR-MS calcd. for C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S, [M+Na]<sup>+</sup>: 442.988 3, found: 442.988 0。

**TM1p**: 淡黄色固体, mp 235~238 °C, [α]<sub>D</sub><sup>23</sup> +164 (*c* 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> 13.95 (s, 1H), 9.10 (s, 1H), 5.75 (dd, *J* = 8.1, 4.8 Hz, 1H), 5.19 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 4.17 (s, 2H), 3.97 (d, *J* = 18.0 Hz, 1H), 3.63 (d, *J* = 18.0 Hz, 1H)。HR-MS calcd. for C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S, [M+Na]<sup>+</sup>: 332.947 4, found: 332.945 2。

**TM1q**: 淡黄色固体, mp 236~237 °C, [α]<sub>D</sub><sup>23</sup> +250 (*c* 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> 8.95 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 5.72 (dd, *J* = 8.3, 4.9 Hz, 1H), 5.19 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 3.97 (d, *J* = 18.0 Hz, 1H), 3.82 (ddd, *J* = 57.5, 16.8, 6.0 Hz, 2H), 3.68 (d, *J* = 18.0 Hz, 1H), 2.72 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H)。HR-MS calcd. for C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>

O<sub>4</sub>S, [M+Na]<sup>+</sup>: 346.963 0, found: 346.962 9。

**TM1r**: 淡黄色固体, mp 237~241 °C, [α]<sub>D</sub><sup>23</sup>+121 (c 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> 8.90 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.68 (dd, *J* = 8.0, 4.9 Hz, 1H), 5.18 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 3.99~3.95 (m, 1H), 3.69~3.64 (m, 1H), 3.09~3.05 (m, 2H), 2.63 (t, *J* = 7.2 Hz, 7H), 1.67~1.61 (m, 2H)。HR-MS calcd. for C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S, [M+Na]<sup>+</sup>: 360.978 7, found: 360.979 2。

**TM1s**: 淡黄色固体, mp 144~148 °C, [α]<sub>D</sub><sup>23</sup>+266 (c 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> 9.15 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.35 (dd, *J* = 17.1, 8.2 Hz, 1H), 5.79 (dd, *J* = 8.2, 4.9 Hz, 1H), 5.23 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 5.20 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 4.00 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 3.72~3.70 (m, 1H), 2.84 (dt, *J* = 13.0, 6.6 Hz, 2H)。HR-MS calcd. for C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>BrClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S, [M+H]<sup>+</sup>: 368.930 6, found: 368.930 5。

**TM1t**: 淡黄色固体, mp 172~176 °C, [α]<sub>D</sub><sup>23</sup>+227 (c 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> 13.45 (s, 1H), 8.82 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 5.68 (dd, *J* = 8.2, 4.8 Hz, 1H), 5.09 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 3.62 (d, *J* = 18.1 Hz, 1H), 3.46 (d, *J* = 18.1 Hz, 1H), 3.08 (dd, *J* = 13.2, 7.0 Hz, 2H), 2.63 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.65 (dt, *J* = 13.7, 7.0 Hz, 2H)。HR-MS calcd. for C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>BrClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S, [M+Na]<sup>+</sup>: 404.928 2, found: 404.927 6。

**TM1u**: 白色固体, mp 170~173 °C, [α]<sub>D</sub><sup>23</sup>+273 (c 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> 13.17 (s, 1H), 9.24 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.50 (dd, *J* = 6.3, 2.3 Hz, 1H), 5.74 (dd, *J* = 8.2, 5.0 Hz, 1H), 5.08 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 4.17 (s, 2H), 3.65 (dd, *J* = 19.0, 2.3 Hz, 1H), 3.56 (dd, *J* = 19.0, 6.4 Hz, 1H)。HR-MS calcd. for C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S, [M+Na]<sup>+</sup>: 298.986 4, found: 298.986 4。

**TM1v**: 白色固体, mp 170~173 °C, [α]<sub>D</sub><sup>23</sup>+145 (c 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> 13.19 (s, 1H), 9.00 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.49 (dd, *J* = 6.2, 2.1 Hz, 1H), 5.75 (dd, *J* = 8.2, 5.0 Hz, 1H), 5.05 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 3.79 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 3.63 (dd, *J* = 19.0, 2.1 Hz, 1H), 3.54 (dd, *J* = 19.0, 6.2 Hz, 1H), 2.71 (td, *J* = 6.0, 3.0 Hz, 2H)。HR-MS calcd. for C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S, [M+Na]<sup>+</sup>: 313.002 0, found: 313.002 0。

**TM1w**: 白色固体, mp 149~153 °C, [α]<sub>D</sub><sup>23</sup>+215 (c 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> 8.89 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.35 (dd, *J* = 6.1, 2.0 Hz, 1H), 5.66 (dd, *J* = 8.2, 4.9 Hz, 1H), 5.00 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 3.65~3.62 (m, 2H), 3.59 (dd, *J* = 18.8, 2.2 Hz, 1H), 3.49 (dd, *J* = 18.8, 6.3 Hz, 1H), 2.36 (dd, *J* = 10.8, 3.9 Hz, 2H), 1.97~1.92 (m, 2H)。HR-MS calcd. for C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S,

[M+Na]<sup>+</sup>: 327.017 7, found: 327.017 7。

**TM1x**: 白色固体, mp 151~152 °C, [α]<sub>D</sub><sup>23</sup>+213 (c 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> 13.04 (s, 1H), 8.98 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.49 (dd, *J* = 6.3, 2.3 Hz, 1H), 5.75 (dd, *J* = 8.2, 5.0 Hz, 1H), 5.05 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 3.65 (dd, *J* = 6.0, 2.2 Hz, 2H), 3.62 (dd, *J* = 12.6, 2.5 Hz, 1H), 3.54 (dd, *J* = 19.0, 6.3 Hz, 1H), 2.89~2.78 (m, 2H)。HR-MS calcd. for C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S, [M+H]<sup>+</sup>: 334.969 6, found: 334.9695; [M+Na]<sup>+</sup>: 356.9515, found: 356.951 3。

**TM1y**: 白色固体, mp 152~154 °C, [α]<sub>D</sub><sup>23</sup>+216 (c 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> 12.84 (s, 1H), 8.81 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.48 (dd, *J* = 6.2, 2.2 Hz, 1H), 5.71 (dd, *J* = 8.2, 4.9 Hz, 1H), 5.04 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 3.62 (dd, *J* = 18.9, 2.1 Hz, 1H), 3.52 (dd, *J* = 19.0, 6.4 Hz, 1H), 3.09~3.05 (m, 2H), 2.64~2.62 (m, 2H), 1.68~1.61 (m, 2H)。HR-MS calcd. for C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S, [M+H]<sup>+</sup>: 348.985 2, found: 348.985 0; [M+Na]<sup>+</sup>: 370.967 1, found: 370.967 2。

## 2 化合物的生物活性测试

**2.1 抗人致病菌活性** 按照美国国家临床实验室标准化委员会 (NCCLS) 推荐的微量稀释法, 采用本实验室常用的测试方法<sup>[27-29]</sup>, 测定了目标分子对金葡菌 ATCC 25129 及 ATCC 14125、藤黄微球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌 ATCC 25922、鲍曼不动杆菌 ATCC 19606、沙门菌 ATCC 13076、铜绿假单胞菌 ATCC 27853 的 MIC, 相关结果见表 4。

**2.2 抗毕赤酵母菌活性** 采用 NCCLS 推荐的微量肉汤稀释法, 参照本实验室常用的测试方法<sup>[27-29]</sup>, 测定了目标分子 **TM1a**~**TM1y** 抑制毕赤酵母菌的 MIC 值, 相关结果见表 5。

**2.3 抗柑橘溃疡病菌和病原真菌活性** 采用本实验室常用的测试方法<sup>[27-29]</sup>, 测定了目标分子 **TM1a**~**TM1y** 对柑橘溃疡病菌 *RL* 菌株、柑橘胶孢炭疽菌 *Co.3* 菌株与柑橘褐斑病菌 *Al.6* 菌株的抑制活性, 相关结果见表 6 及表 7。

活性测试的具体操作步骤, 参见辅助材料。

**致谢**: 西南大学药学院中医药学院徐兴然副教授、蚕桑纺织与生物质科学学院周博士在致病菌、毕赤酵母菌活性测试中提供的大力帮助, 重庆天地药业赠送头孢母核样品, 本学院老师在核磁共振测试中提供的支持。

**作者贡献**: 李洋负责大多数化合物的合成与部分生物活性测试, 论文的撰写、修改和校对; 范莉、唐雪梅、杨德蒙负责少数分子合成, 文本修改、校对; 胡军华、吴玉珠、占爽负责柑橘病菌生物活性测试, 文本修改; 杨大成负责课题规划, 指导实验的设计、化合物的合成, 对外联系, 文本的修改、校对。

**利益冲突**: 无利益冲突。

## References

- [1] Zhou CH. Basic Medicinal Chemistry (基础药物化学) [M]. Beijing: Science Press, 2014: 306-312.
- [2] Zheng H. Medicinal Chemistry (药物化学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003: 254-262.
- [3] Liu X. Study on the Synthesis and Biological Activity of New Cephalosporins with 2-Position Substitution (2位取代的头孢菌素类新化合物的合成与生物活性的研究) [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2008.
- [4] Shukla SN, Gaur P, Gupta JP, et al. Identification of new pharmacophore in bioactive palladium schiff base metal complexes of cephalosporins: synthesis, characterization and biological activity [J]. Int J PharmTech Res, 2015, 5: 1-5.
- [5] Zhang Z, Bi CF, Fan YH, et al. Cefepime, a fourth-generation cephalosporin, in complex with manganese, inhibits proteasome activity and induces the apoptosis of human breast cancer cells [J]. Int J Mol Med, 2015, 36: 1143-1150.
- [6] Chen GH, Yang Y, Lin C, et al. Synthesis and antibacterial activity of 7 $\beta$ -[2-(2-substituted aminothiazole-4-yl)-(Z)-2-methoxyiminoacetyl-amido]-3-quaternaryammoniummethyl-cephalosporins [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2009, 44: 366-370.
- [7] Abdul-Mutakabbir JC, Alosaimy S, Morrisette T, et al. Cefiderocol: a novel siderophore cephalosporin against multidrug-resistant gram-negative pathogens [J]. Pharmacotherapy, 2020, 40: 1228-1247.
- [8] Cherian PT, Cheramie MN, Marreddy RKR, et al. New  $\beta$ -lactam-tetramic acid hybrids show promising antibacterial activities [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2018, 28: 3105-3112.
- [9] Basoglu S, Demirbas A, Ulker S, et al. Design, synthesis and biological activities of some 7-aminocephalosporanic acid derivatives [J]. Eur J Med Chem, 2013, 69: 622-631.
- [10] Evans LE, Krishna A, Ma Y, et al. Exploitation of antibiotic resistance as a novel drug target: development of a  $\beta$ -lactamase-activated antibacterial prodrug [J]. J Med Chem, 2019, 62: 4411-4425.
- [11] Vigliotta G, Giordano D, Verdino A, et al. New compounds for a good old class: synthesis of two  $\beta$ -lactam bearing cephalosporins and their evaluation with a multidisciplinary approach [J]. Bioorg Med Chem, 2020, 28: 115302.
- [12] Haren MJV, Tehrani KHME, Kotsogianni I, et al. Cephalosporin prodrug inhibitors overcome metallo- $\beta$ -lactamase driven antibiotic resistance [J]. Chemistry, 2021, 27: 3806-3811.
- [13] Liu J, Ren ZH, Fan L, et al. Design, synthesis, biological evaluation, structure-activity relationship, and toxicity of clinafloxacinazole conjugates as novel antitubercular agents [J]. Bioorg Med Chem, 2019, 27: 175-187.
- [14] Yang DC, Ren YH, Fan L, et al. Fluoroquinolone derivatives of *p*-aminosalicylic acid and intermediates, preparation methods and applications thereof: CN, 2020110256397 [P]. 2020-09-25.
- [15] Yang DC, Pan JF, Fan L, et al. Fluoroquinolone derivatives of *p*-aminosalicylic acid and intermediates, preparation methods and applications thereof: CN, 2020110256626 [P]. 2020-09-25.
- [16] Pan JF, Sun XL, Fan L, et al. Study on the hybrid molecules of dihydroartemisinin and fluoroquinolones linked by *L*-homoserine derivative [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 52: 2157-2169.
- [17] Zhou FW, Lei HS, Fan L, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of dihydroartemisinin-fluoroquinolone conjugates as a novel type of potential antitubercular agents [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2014, 24: 1912-1917.
- [18] Yang DC, Ren ZH, Lei HS et al. Application of clinafloxacin amino derivatives and pharmaceutically acceptable salts thereof in preparation of anti-tuberculosis drugs: CN, ZL201310389329.7 [P]. 2014-12-10.
- [19] Han HY, Chen L, Xu XR, et al. Simple synthesis of clinafloxacin amide derivatives and their biological activities *in vitro* and *in vivo* [J]. Sci China Chem (中国科学: 化学), 2011, 41: 461-473.
- [20] Rei M. A mild and efficient method for the esterification of cephalosporanic acids [J]. Chem Lett, 1978, 7: 979-982.
- [21] Mobashery S, Johnston M. Preparation of ceph-3-em esters unaccompanied by  $\Delta^3 \rightarrow \Delta^2$  isomerization of the cephalosporin [J]. J Org Chem, 2002, 51: 4723-4726.
- [22] Chen ZK, Hu CQ. Degradation mechanism of cephalosporin antibiotics [J]. World Notes Antibiot (国外医药: 抗生素分册), 2004, 25: 249-252.
- [23] Yao LR, Jin GY, Liu XH, et al. Research progress on double bond isomerization of cephalosporin nucleus [J]. Chin J Pharm (中国医药工业杂志), 2014, 45: 978-985.
- [24] Zhou XB, Xue F, Ju SG. Research progress on removal methods of cephalosporin carboxyl protective group [J]. Technol Dev Chem Ind (化工技术与开发), 2009, 38: 26-30.
- [25] Yang DC, Fan L, Zhong YG, Study on the synthetic method of fully protected RGD tripeptide [J]. Chin J Org Chem (有机化学), 2003, 23: 493-498.
- [26] Chen FE. Organic Medicine Synthesis Method (有机药物合成法) [M]. Vol. 1. Beijing: China Medical Science Press, 1999: 632-635.
- [27] Fan L, Yang DC, Pan JF, et al. *p*-Aminosalicylic acid dihydroartemisinin derivatives and preparation method and application thereof: CN, 2020110275326 [P]. 2020-09-25.
- [28] Yang DC, Li WL, Luo P, et al. Synephrine fluoroquinolone derivatives and preparation method and application thereof: CN, 2020110275504 [P]. 2020-09-25.
- [29] Yang DC, Luo P, Li WL, et al. Synephrinazole derivatives and preparation method and application thereof: CN, 2020110275650 [P]. 2020-09-25.
- [30] Gasser B, Prielhofer R, Marx H, et al. *Pichia pastoris*: protein production host and model organism for biomedical research [J]. Fut Microbiol, 2013, 8: 191-208.
- [31] Inglin RC, Stevens MJA, Meile L, et al. High-throughput screening assays for antibacterial and antifungal activities of *Lactobacillus* species [J]. J Microbiol Methods, 2015, 114: 26-29.