

齐多夫定衍生物的合成及抗菌活性研究

李锡勇¹, 孙亚敏¹, 姜玉钦²

(1.威海海洋职业学院, 山东 威海 264300; 2.河南师范大学 化学化工学院, 河南 新乡 453007)

摘 要:二氢叶酸还原酶是细菌存活所必需的酶,且在哺乳动物中的氨基酸序列存在显著差异, DNA 结构同源性很小,因此这些酶可以作为抗细菌感染的优秀药物靶标.为了寻找新型抗菌化合物,以齐多夫定为先导物,分别和不同取代基的芳香类的末端炔发生反应,利用药物拼合原理,将活性基团引入到目标产物结构中,得到一系列齐多夫定链接 1,2,3-三氮唑的新化合物,结构经¹H NMR, ¹³C NMR 和 HRMS 确证.对合成化合物进行初步生物活性测试,部分化合物对化脓链球菌显示抑制作用.

关键词:二氢叶酸还原酶;齐多夫定;1,2,3-三氮唑;抗菌

中图分类号:R914.5

文献标志码:A

齐多夫定为抗病毒药,用于艾滋病或与艾滋病有关的综合症患者及免疫缺陷病毒(HIV)感染的治疗^[1-2].二氢叶酸还原酶(dihydrofolate reductase, DHFR)是细菌存活所必需的酶,能够参与四氢叶酸的合成以及由脱氧尿苷酸合成胸苷酸过程中再氧化后的再循环,是抗菌药物的重要靶标^[3].文献报道^[4-6],嘧啶类药物可以通过抑制 DHFR 来发挥在人体中对大肠杆菌的抗菌作用,临床研究表明^[4],服用齐多夫定后病人大便中大肠杆菌活菌指标明显低于正常指标.分子对接结果表明,齐多夫定的嘧啶环位于 DHFR 的疏水性口袋(图 1 中绿色部分),且羰基和胺基分别与酪氨酸残基(Tyr100)和丙氨酸残基(Ala7)形成氢键,羟基与蛋氨酸残基(Met16)形成氢键, N₃ 与组氨酸残基(Hip45)也有结合(如图 1 所示).

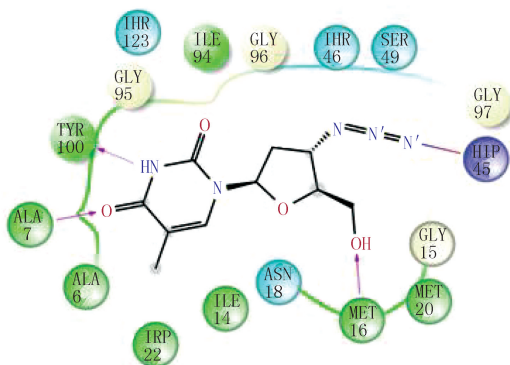


图 1 齐多夫定与 DHFR 活性口袋周围氨基酸残基的二维结合图

而 1,2,3-三氮唑类化合物是一类非常重要的五元含氮杂环化合物^[7],具有特殊的芳香结构,稳定性强,在强酸和强碱条件下,都不会轻易分解,而且易发生多种非共价键作用,如较强的络合金属离子和氢键的能力等^[8-13].三氮唑类化合物结构中包含具有生物活性的基团.三氮唑基团是构建分子的基本模块之一,不仅是某些有机合成的重要中间体,也是某些生理活性化合物的基本骨架.

收稿日期:2018-04-05;修回日期:2018-05-07.

基金项目:河南省重点科技攻关(152102210285);河南省产学研项目(142107000081).

作者简介:李锡勇(1984—),男,山东济宁人,威海海洋职业学院讲师,研究方向为新药开发, E-mail:lixiyongedu@163.com.

通信作者:姜玉钦(1980—),男,河南南阳人,河南师范大学副教授,研究方向为药物合成, E-mail:jiangyuqin@htu.cn.

为寻找更加新型高效的抗菌药物,本课题组根据齐多夫定分子中含有叠氮基团,可以通过“click”反应,使其与带有不同取代基的苯胺基丙炔化合物反应得到 1,2,3-三氮唑类化合物.而齐多夫定中含有与甲氧苄啶(TMP)类似的嘧啶环,由此推测齐多夫定链接 1,2,3-三氮唑化合物会是一类潜在的 DHFR 抑制剂.为了验证该设想,我们设计并合成了 6 个新型齐多夫定链接 1,2,3-三氮唑化合物 **3a~3f**(如图 2,表 1 所示),通过¹H NMR, ¹³C NMR 和 HRMS 对其结构进行了表征,选择两种致病菌化脓性链球菌和白色葡萄球菌对所合成化合物进行了体外抗菌活性测定.

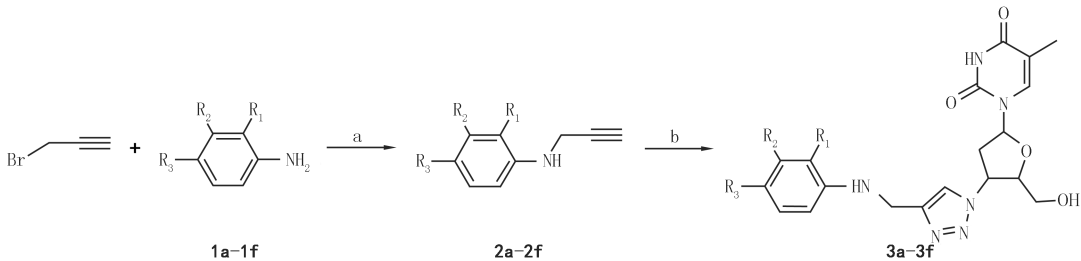


图 2 目标化合物的合成路线

表 1 图 2 合成的新化合物

化合物	取代基 R ₁	取代基 R ₂	取代基 R ₃
3a	H	H	C ₄ H ₉
3b	H	H	OC ₂ H ₅
3c	C ₂ H ₅	H	H
3d	H	OCH ₃	OCH ₃
3e	H	OCH ₃	H
3f	CF ₃	H	H

反应条件:(a) 碳酸钾, 丙酮, 室温; (b) 3 (齐多夫定), 五水硫酸铜, 抗坏血酸钠, 叔丁醇, 50℃

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

齐多夫定(99.5 %,阿尔法试剂);苯胺衍生物(99 %,阿拉丁试剂);溴丙炔(98 %,国药集团);碳酸钾(99 %,国药集团);氘代二甲基亚砜(DMSO-*d*₆)其他试剂与药品均为市售分析纯,除特别说明外,不经处理直接使用.DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(郑州予华仪器有限公司);YRE -2020 旋转蒸发仪(郑州予华仪器有限公司);酸度计(梅特勒-托利多);AV 400 型核磁共振仪(德国 Bruker 公司);LC 1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);Bruker microToF II 高分辨质谱(德国 Bruker 公司).

1.2 合成方法

N-丙炔基-对丁基苯胺 **2a** 的合成

在 500 mL 反应瓶中,将对丁基苯胺 15 g(0.1 mol)和溴丙炔 12 g(0.15 mol)加入到丙酮 200 mL 中,再加入碳酸钾 40 g(0.3 mol),在 30 °C 条件下搅拌反应 5 h,薄层层析(TLC)监控原料反应完全,加入水 100 mL,用二氯甲烷 100 mL 萃取反应液 3 次,合并有机相,浓缩后经柱层析(*V*_{石油醚} : *V*_{乙酸乙酯} = 5 : 1)分离提纯得到 N-丙炔基-对丁基苯胺(**2a**)14 g,收率为 75 %(核磁标准数据和文献[12]符合).

2b~2f 合成步骤同上 **2a** 合成.

目标化合物 **3a~3f** 的合成.

在 500 mL 反应瓶中,依次加入齐多夫定 27 g(0.1 mol)、N-丙炔基-对丁基苯胺(**2a**)19 g(0.1 mol),叔丁醇 100 mL,五水硫酸铜 2.5 g(0.01 mol)和抗坏血酸钠 4 g(0.02 mol),在 50 °C 条件下反应,TLC 监控原料反应完全,得到黄色液体,用二氯甲烷 500 mL 萃取 2 次,有机相经无水硫酸钠干燥后,蒸除溶剂得到黄色固

体,柱色谱得到淡黄色的产品 3a 40 g,收率为 87 %.

化合物(3a):收率 87%;熔点:116.8~119.7 °C.¹H NMR(400 MHz,DMSO-*d*₆)δ:11.35(s,1H),8.17(s,1H),7.81(s,1H),7.10(d,*J* = 8.6 Hz,2H),6.58(d,*J* = 8.5 Hz,2H),6.42(t,*J* = 6.5 Hz,1H),5.86(s,1H),5.40~5.24(m,2H),4.29(s,1H),4.20(d,*J* = 4.6 Hz,1H),3.60(dd,*J* = 12.0,4.4 Hz,2H),3.35(s,3H),2.67(dq,*J* = 29.4,6.7,5.9 Hz,2H),2.53~2.47(m,1H),1.81(s,3H),1.20(s,10H).¹³C NMR(100 MHz,DMSO-*d*₆)δ:164.2,150.9,146.4,138.8,136.7,125.9,123.0,112.5,110.1,84.9,84.4,61.2,59.6,39.3,37.6,33.9,31.9,29.7,12.7.HRMS(ESI)计算值 C₂₃H₃₀N₆O₄Na:477.222 6[M+Na]⁺,实际值:477.220 3.

化合物(3b):收率 73%;熔点:191.4~193.4 °C.¹H NMR(400 MHz,DMSO-*d*₆)δ:11.35(s,1H),8.14(s,1H),7.84~7.79(m,1H),6.74~6.68(m,2H),6.63~6.56(m,2H),6.41(d,*J* = 6.6 Hz,1H),5.60(s,1H),5.34(s,1H),5.27(d,*J* = 5.2 Hz,1H),4.25(d,*J* = 3.8 Hz,2H),4.22~4.18(m,1H),3.87(t,*J* = 7.0 Hz,2H),3.74~3.66(m,1H),3.61(dt,*J* = 12.0,4.3 Hz,1H),2.77~2.58(m,2H),1.84~1.78(m,3H),1.26(t,*J* = 7.0 Hz,3H).¹³C NMR(100 MHz,DMSO-*d*₆)δ:164.2,150.9,150.6,146.8,143.1,136.7,122.9,115.8,113.9,110.1,85.0,84.3,63.7,61.2,59.6,39.9,37.6,15.3,12.7.HRMS(ESI)计算值 C₂₁H₂₆N₆O₅Na:465.186 2[M+Na]⁺,实际值:465.188 1.

化合物(3c):收率 80%;熔点:108.4~110.7 °C.¹H NMR(400 MHz,DMSO-*d*₆)δ:11.35(s,1H),8.12(s,1H),7.81(s,1H),7.00~6.94(m,2H),6.62~6.52(m,2H),6.43(s,1H),5.47(t,*J* = 5.2 Hz,1H),5.40~5.19(m,2H),4.40(s,2H),4.20(s,1H),3.70(d,*J* = 11.3 Hz,1H),3.61(d,*J* = 9.2 Hz,1H),3.17(d,*J* = 5.3 Hz,1H),2.67(d,*J* = 26.4 Hz,2H),2.48(d,*J* = 7.4 Hz,1H),1.81(s,3H),1.15(t,*J* = 7.4 Hz,3H).¹³C NMR(100 MHz,DMSO-*d*₆)δ:164.2,150.9,145.7,136.7,128.1,128.1,127.0,123.0,116.8,110.2,110.1,84.9,84.4,61.2,59.7,39.3,37.6,23.8,13.8,13.7,12.7.HRMS(ESI)计算值 C₂₁H₂₆N₆O₄Na:449.191 3[M+Na]⁺,实际值:449.191 1.

化合物(3d):收率 76%;熔点:110.7~112.6 °C.¹H NMR(400 MHz,DMSO-*d*₆)δ:11.35(s,1H),8.16(s,1H),7.82(s,1H),6.97(t,*J* = 12.0,12.0 Hz,1H),6.43(dd,*J* = 12.0,6.0 Hz,1H),6.23(dd,*J* = 12.0,6.0 Hz,2H),6.14(dd,*J* = 6.0,6.0 Hz,1H),6.06(t,*J* = 6.0 Hz,1H),5.37~5.28(m,2H),4.30(s,2H),4.21(s,1H),3.66(s,5H),3.37(dd,*J* = 6.0,6.0 Hz,2H),2.76~2.62(m,2H),1.81(s,3H).¹³C NMR(100 MHz,DMSO-*d*₆)δ:164.2,160.7,150.9,150.2,146.4,136.6,130.0,122.9,110.1,105.8,102.1,98.5,84.9,84.3,61.1,59.5,55.1,39.1,37.6,12.7.HRMS(ESI)计算值 C₂₁H₂₆N₆O₆Na:481.181 2[M+Na]⁺,实际值:481.181 0.

化合物(3e):收率 88%;熔点:105.4~109.0 °C.¹H NMR(400 MHz,DMSO-*d*₆)δ:11.36(s,1H),8.14(s,1H),7.82~7.79(m,1H),7.64(dd,*J* = 7.8,1.4 Hz,1H),7.19(t,*J* = 8.2 Hz,1H),6.71(d,*J* = 9.2 Hz,1H),6.46~6.38(m,2H),5.35(t,*J* = 5.3 Hz,3H),4.44(d,*J* = 5.7 Hz,2H),4.21(q,*J* = 3.6 Hz,1H),3.76~3.60(m,5H),2.77~2.58(m,2H),1.81(s,3H).¹³C NMR(100 MHz,DMSO-*d*₆)δ:164.3,150.9,147.4,145.9,139.3,136.7,129.8,123.1,119.1,111.4,110.2,85.3,84.9,84.4,61.2,59.7,39.3,37.6,12.7.HRMS(ESI)计算值 C₂₀H₂₄N₆O₅Na:451.170 6[M+Na]⁺,实际值:451.172 6.

化合物(3f):收率 83%;熔点:70.4~73.9 °C.¹H NMR(400 MHz,DMSO-*d*₆)δ:11.34(s,1H),8.11(s,1H),7.80(s,1H),7.39(dd,*J* = 12.0,12.0 Hz,2H),6.89(d,*J* = 12.0 Hz,1H),6.70(t,*J* = 12.0 Hz,1H),6.42(t,*J* = 6.0 Hz,1H),6.00(t,*J* = 6.0 Hz,1H),5.35(dd,*J* = 6.0,6.0 Hz,1H),5.26(t,*J* = 6.0 Hz,1H),4.49(d,*J* = 6.0 Hz,2H),4.19(d,*J* = 6.0 Hz,1H),3.70~3.58(m,2H),2.77~2.58(m,2H),1.80(s,3H).¹³C NMR(100 MHz,DMSO-*d*₆)δ:164.2,150.9,145.9,145.5,136.7,133.9,126.7,126.4,124.6,122.9,115.9,112.7,110.1,84.9,84.3,61.2,59.6,38.8,37.6,12.7.HRMS(ESI)计算值 C₂₀H₂₁F₃N₆O₄Na:489.147 4[M+Na]⁺,实际值:489.148 2.

1.3 抗菌活性测试

采用抑菌环法^[14]测定目标化合物的抗细菌活性,选用化脓性链球菌和白色葡萄糖球菌作为抗菌活性测试对象.首先是制备液体培养基(含有蛋白胨 1 g、酵母膏 0.5 g、氯化钠 1 g、蒸馏水 100 mL)和固体培养基(含有蛋白胨 1 g、酵母膏 0.5 g、氯化钠 1 g、琼脂 2 g、蒸馏水 100 mL),通过高压灭菌锅对培养基进行灭菌,

并把固体培养基置于灭菌后的平板上.其次,把化脓性链球菌和白色葡萄糖球菌菌种活化后,移取 100 μL 菌液,置于灭菌后的 100 mL 蒸馏水中混合均匀.以强力霉素和齐多夫定作为对照化合物,用 N,N-二甲基甲酰胺把所合成的目标化合物和对照化合物配置成浓度为 100 mg/mL 的溶液,把孔径为 5 mm 的圆形滤纸灭菌后浸泡在上述溶液中.

在超净台上,移取 10 μL 液体培养基加到固体培养基表面,涂布均匀.用无菌镊子取出浸泡过的圆滤纸片铺到培养基表面.每个平板放 4 片,进行 3 次平行实验和 1 次空白对照.放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中培养 24 h,观察现象,通过琼脂培养基上分别出现不同大小的透明圆环-抑菌圈,通过测量抑菌圈直径就可以看出各样品的抑菌活性大小.

2 结果与讨论

2.1 反应溶剂的筛选

化学反应中,反应溶剂能够很大程度影响化学反应的速率,甚至反应能否成功与溶剂都有很大联系.为了筛选出合适的溶剂,选择齐多夫定和 N-丙炔基-对丁基苯胺作为模板反应.具体步骤如下:分别称取 1 mmol 齐多夫定,1 mmol N-丙炔基-对丁基苯胺,0.1 mmol 五水硫酸铜,0.2 mmol 抗坏血酸钠和 3 mL 待考查溶液,加入 10 mL 反应瓶中,转 50 $^{\circ}\text{C}$ 油浴反应,TLC 监控,反应完全时记下反应时间.将反应体系用二氯甲烷萃取两次,有机相经无水硫酸钠干燥,真空抽滤,蒸干溶剂,柱层析纯化,真空干燥计算产率(如表 2).

表 2 溶剂对反应收率的影响

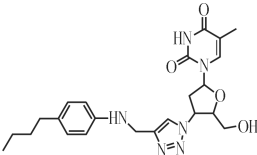
序号	溶剂	$t/^{\circ}\text{C}$	反应时间/h	收率/%
1	乙腈	50	5	39.1
2	丙酮	50	5	52.4
3	叔丁醇	50	5	95.7
4	N,N-二甲基甲酰胺	50	5	59.6
5	二氯甲烷	50	5	53.5
6	四氢呋喃	50	5	11.7
7	二甲基亚砷	50	5	41.5
8	甲醇	50	5	27.9

通过表 2 中对比,可以看到在这个催化体系中,溶剂叔丁醇的反应效果是最好的.而在其他溶剂中的反应效果差、时间长、收率低,综合考虑,选用叔丁醇作为五水硫酸铜-抗坏血酸钠催化体系的反应溶剂.

2.2 抗菌活性测试结果

体外抑菌活性测试结果表明(表 3),目标化合物对白色葡萄球菌的抑制效果不显著,但部分化合物对化脓性链球菌具有较好的抗菌活性,并且多数化合物对化脓性链球菌的抑菌效果强于齐多夫定,其中化合物 3a 与齐多夫定相比,抑制率达到 67%,说明在齐多夫定上链接上 1,2,3-三氮唑能够增强抑菌活性.

表 3 目标化合物的抗细菌活性

样品	结构	与强力霉素对比目标化合物的抑菌率/%	
		化脓性链球菌	白色葡萄糖菌
	67	29	
3a			

续表

样品	结构	与强力霉素对比目标化合物的抑菌率/%	
		化脓性链球菌	白色葡萄球菌
3b		44	17
3c		33	31
3d		57	9
3e		39	12
3f		42	4
齐多夫定		14	9
强力霉素		100	100

3 结 论

以溴丙炔和不同取代基的苯胺为起始原料合成了一系列具有不同取代基的芳香类的末端炔化合物,然后经过与齐多夫定反应得到了目标化合物,其结构经¹H NMR,¹³C NMR 和 HRMS 确证.测定了目标化合物对化脓性链球菌和白色葡萄球菌的抑菌活性,结果表明,部分化合物对化脓性链球菌显示良好的抑制作用,可以考虑发展成为一种抑制化脓性链球菌的临床药物.

参 考 文 献

[1] Goodgame J C,Jr P J,Jablonowski H,et al.Amprenavir in combination with lamivudine and zidovudine versus lamivudine and zidovudine

- alone in HIV-1-infected antiretroviral-naïve adults, Amprenavir PROAB3001 International Study Team[J]. *Antiviral Therapy*, 2000, 5(3): 215-225.
- [2] Murphy R L, Kivel N M, Zala C, et al. Antiviral activity and tolerability of amdoxovir with zidovudine in a randomized double-blind placebo-controlled study in HIV-1-infected individuals[J]. *Antiviral Therapy*, 2010, 15(2): 185-192.
- [3] Weidle P J, Abrams E J, Gvetadze R, et al. A simplified weight-based method for pediatric drug dosing for zidovudine and didanosine in resource-limited settings[J]. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 2006, 25(1): 59-64.
- [4] 刘鑫荣. 齐多夫定的药理和临床应用[J]. *国外医药抗生素分册*, 1995(2): 123-125.
- [5] Bhana N, Ormrod D, Perry C M, et al. Zidovudine: a review of its use in the management of vertically-acquired pediatric HIV infection[J]. *Paediatric Drugs*, 2002, 4(8): 515-553.
- [6] Genin M J, Hutchinson D K, Allwine D A, et al. Substituent effects on the antibacterial activity of nitrogen-carbon-linked (azolyphenyl) oxazolidinones with expanded activity against the fastidious gram-negative organisms *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* [J]. *Cheminform*, 2000, 43(5): 953-970.
- [7] Reck F, Zhou F, Girardot M, et al. Identification of 4-substituted 1,2,3-triazoles as novel oxazolidinone antibacterial agents with reduced activity against monoamine oxidase A[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2005, 48(2): 499-506.
- [8] 潘峰, 方志杰. 1,2,3-三氮唑桥连维生素 D2 类化合物的合成[J]. *化学研究与应用*, 2016, 28(8): 1109-1113.
- [9] 栾庆洁, 王红红, 刘丽君, 等. 1,2,3-三氮唑-4,5-二羧酸-磷酸盐的制备及其催化合成缩酮(醛)[J]. *化学研究与应用*, 2017, 29(6): 821-826.
- [10] Pålhagen S, Canger R, Henriksen O, et al. Rufinamide: a double-blind, placebo-controlled proof of principle trial in patients with epilepsy [J]. *Epilepsy Research*, 2001, 43(2): 115-124.
- [11] 贾淑红, 李翠平, 何兴, 等. 哌啶链接 1,2,3-三氮唑化合物的合成及抗菌活性[J]. *化学研究与应用*, 2016, 28(2): 158-163.
- [12] Rajagopal B, Chou C H, Chung C C, et al. Synthesis of substituted 3-indolylamines and indole-3-carboxaldehydes by rhodium(II)-catalyzed annulation[J]. *Organic Letters*, 2014, 16(14): 3752-3757.
- [13] 姜玉钦, 吴凯, 毛龙飞. 曲克芦丁新工艺合成研究[J]. *河南师范大学学报(自然科学版)*, 2017, 45(4): 61-67.
- [14] 张濛, 王歆宇, 王万海. 两种方法检测抗菌剂抑菌效果的比较[J]. *中国消毒学杂志*, 2006, 23(5): 436-438.

Synthesis and antibacterial of novel zidovudine derivatives

Li Xiyong¹, Sun Yamin¹, Jiang Yuqin²

(1. Weihai Marine vocational college, Weihai, 264300, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Henan normal university, Xinxiang 453007, China)

Abstract: Dihydrofolate reductase is a necessary enzyme for the survival of bacteria, which could be used as an excellent drug target against bacterial infection due to its significant differences in the amino acid sequences in mammals and small DNA structure homology. Aiming to find new potent antibacterial compounds, zidovudine was used as a leader compound to react with different aminopropyne respectively. By using the principle of drug combination, a series of novel 1,2,3-triazole derivatives incorporate 3'-deoxythymidine were designed, synthesized and characterized. The target compounds were obtained using propargyl bromide and substituted aniline as starting materials followed by an azide-alkyne cycloaddition with 3'-Azido-3'-deoxythymidine. Antibacterial activity against *Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus albus* of all the synthesized compounds was evaluated using doxycycline as reference drugs.

Keywords: dihydrofolate reductase; zidovudine; 1,2,3-triazole; antibacterial activity

[责任编辑 赵晓华]