

异噁唑生物的合成及其抗菌活性研究

张存彦¹, 刘登科², 孙长海¹, 刘默², 刘威²

1. 天津红日药业股份有限公司, 天津 301700

2. 天津药物研究院, 天津 300193

摘要: **目的** 设计并合成异噁唑生物, 并对其体外抗菌活性进行了初步评价。**方法** 以 3,4-二氟苯甲醛、盐酸羟胺为起始原料, 经多步反应合成目标化合物。以利奈唑胺为阳性对照药, 对目标化合物的抗菌活性进行评价。**结果** 合成了 9 个新化合物, 其结构经 ¹H-NMR、MS 确证, 体外活性测试结果显示, 有 1 个化合物有显著的抗菌活性, 与利奈唑胺相当。**结论** 体外活性试验表明, 含异噁唑的所制备化合物作为新型的抗菌剂, 其构效关系值得进一步研究。

关键词: 异噁唑; 衍生物; 3,4-二氟苯甲醛; 利奈唑胺; 抗菌活性

中图分类号: R914 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 5515(2012)01 - 0014 - 05

Synthesis and antibacterial activity of derivatives containing isoxazoline

ZHANG Cun-yan¹, LIU Deng-ke², SUN Chang-hai¹, LIU Mo², LIU Wei²

1. Tianjin Chasesun Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 301700, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To design and synthesize antibacterial derivatives containing isoxazoline. and to evaluate their antibacterial activities. **Methods** The target compounds were synthesized with the starting material 3, 4-difluoro-benzaldehy with hydroxylamine hydrochloride. And their antibacterial activities have been tested *in vitro* with linezolid as positive control. **Results** Nine target compounds were synthesized and their structures were confirmed by ¹H-NMR, MS. The pharmacological tests showed that one of the tested compounds exhibited novel antibacterial activity compared with linezolid. **Conclusion** The structure-activity relationships of isoxazoline derivatives, as a novel antibacterial type, should be further investigated.

Key words: isoxazoline; derivatives; 3,4-difluoro-benzaldehy; linezolid; antibacterial activity

当前对抗耐药菌制剂的需求是一个全球性的问题。人们越来越关注具有多重耐药性的革兰阳性菌所导致的感染。噁唑烷酮类化合物是一类新型的具有良好发展前景的抗菌药, 其代表药物是利奈唑胺。近来, 利奈唑胺在国外被用于治疗由革兰阳性菌所造成的感染。但是利奈唑胺易引起白细胞血小板减少及高血压等不良反应。为了发现不良反应更低的抗菌药物, 研究人员对噁唑烷酮的化学结构进行了进一步的研究, 其中生物电子等排体的使用是发现新药的重要手段。近年来, 通过对异噁唑的结构改造合成具有生物活性的化合物已成为创制药物研究的热点之一^[1-11]。以异噁唑为原料合成的化合物具有多种药理活性, 如保护植物免受病菌感染、抗菌

等^[1-8]。本实验设计并且合成了 9 个含异噁唑的化合物, 并对其活性进行了初步测试, 结果发现所合成的化合物具有一定的抗菌活性。

1 仪器与试剂

Bruker AV400 型核磁共振仪; YRT-3 熔点仪 (南京旭析仪器有限公司); ZF-20D 暗箱式紫外分析仪; Buchi Rotavapor R-215 型旋转蒸发仪。

利奈唑胺, 自制, 采用面积归一化法计算质量分数为 99.7%。3,4-二氟苯甲醛为工业品, 其他试剂均为 AR 或 CP。

微生物鉴定培养基的 pH 7.9±0.1, 北京三药科技开发公司; 标准金黄色葡萄球菌 CMCC 26003 (*Staphylococcus aureus* 26003)、标准藤黄八叠球菌

收稿日期: 2011-08-11

基金项目: 天津市科委基础科学重点资助项目 (033801911)

作者简介: 张存彦 (1976—), 博士, 工程师, 2008 年毕业于天津大学应用化学专业, 研究方向为药物合成工艺以及新药设计。Tel: (022)59693586
E-mail: zhangcunyan1976@sina.com

CMCC 28001 (*Sarcina lutea* 28001)、标准绿脓假单胞菌 CMCC 10211 (*Pseudomonas aeruginosa* 10211)、标准肺炎克雷伯杆菌 CMCC 46117 (*Klebsiella pneumoniae* 46117) 菌株均购于中国药品生物制品检定所, 其中标准金黄色葡萄球菌 CMCC 26003、标准藤黄八叠球菌 CMCC 28001 属于革兰阳性菌, 标准绿脓假单胞菌 CMCC 10211、标准肺炎克雷伯杆菌 CMCC 46117 属于革兰阴性菌。

2 方法与结果

2.1 5-乙酰胺甲基-3-[3-氟-4-(1-哌嗪基苯基)]异噁唑啉(中间体 A)的合成

参考文献[12]的方法, 以 3,4-二氟苯甲醛为起始原料, 按照合成路线制得 5-乙酰胺甲基-3-[3-氟-4-(1-哌嗪基苯基)]异噁唑啉(中间体 A)。中间体 A 为白色固体, 收率 98%, 熔点 160.3~161 °C。合成路线见图 1。

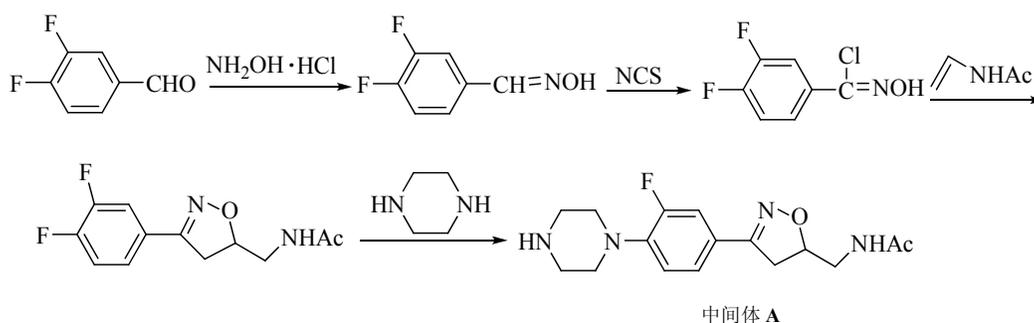


图 1 中间体 A 的合成路线

Fig. 1 Synthetic route of intermediate A

2.2 *N*-[[3-[3-氟-4-(4-(2-氯乙酰基)-1-哌嗪基)苯基]-4,5-二氢-5-异噁唑啉]甲基]乙酰胺(化合物 1)及其衍生物的合成

将 2.54 g (0.01 mol) 中间体 A 溶于 10 mL 氯仿中, 加入三乙胺 2 mL (0.01 mol), 冷却至 5 °C 以下, 缓慢滴加氯乙酰氯 (1.2 g, 0.01 mol), 使温度控制在 5 °C 以下, 反应瓶中有大量烟雾产生, 滴加完以后, 薄层色谱法检测反应完全, 加入 30 mL 水萃取, 水层加入氯仿 20 mL × 2 萃取, 合并有机层, 无水硫酸钠干燥。抽滤, 蒸发浓缩滤液, 无水乙醚结晶, 即得化合物 1。收率 85.8%。¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.81 (3H, s), 3.04~3.11 (5H, m), 3.22~3.25 (2H, t), 3.40~3.43 (1H, q), 3.62 (4H, s), 4.42 (2H, s), 4.65~4.74 (1H, m), 7.06~7.10 (1H, t), 7.35~7.42 (2H, m), 8.08~8.11 (1H, t)。

取哌啶 0.24 g (2.8 mmol) 转移入 10 mL 氯仿中, 加入碳酸钾约 0.4 g (2.8 mmol), 搅拌, 加入 1.1 g (2.8 mmol) 化合物 1, 加入 5 mL 甲醇, 加热回流, 反应约 3 h, 经薄层色谱法监测反应结束。滤过, 氯仿冲洗滤饼, 减压浓缩滤液, 经硅胶柱色谱分离, 以甲醇-二氯甲烷 (3:50) 洗脱, 收集合适的流出组分, 即得 *N*-[[3-[3-氟-4-(4-(2-氯乙酰基)-1-哌嗪基)苯基]-4,5-二氢-5-异噁唑啉]甲基]乙酰胺(化

合物 1a)。白色固体 0.3 g, 收率 24.4%。mp 144.6~146.1 °C。¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.35~1.36 (2H, d), 1.47~1.52 (5H, q), 1.81 (3H, s), 3.01~3.10 (7H, m), 3.21~3.24 (3H, t), 3.33~3.43 (3H, m), 3.59 (2H, s), 3.72 (2H, s), 4.68~4.72 (1H, m), 7.06~7.10 (1H, t), 7.35~7.41 (2H, m), 8.09~8.12 (1H, t)。MS-FAB ($[M]^+$) *m/z*: 446.1。

用类似方法合成 *N*-[[3-[3-氟-4-(4-(1,2,4-三唑基-1-乙酰基)-1-哌嗪基)苯基]-4,5-二氢-5-异噁唑啉]甲基]乙酰胺(化合物 1b)。白色固体 1.05 g, 收率 88.2%。mp 192.1~194.0 °C。¹H-NMR (DMSO) δ: 1.81 (3H, s), 3.05~3.11 (3H, m), 3.15 (2H, s), 3.23~3.26 (2H, t), 3.37~3.43 (1H, q), 3.63~3.67 (4H, m), 4.67~4.75 (1H, m), 5.33 (2H, s), 7.07~7.11 (1H, t), 7.37~7.44 (2H, m), 7.95 (1H, s), 8.09~8.12 (1H, t), 8.44 (1H, s); MS-FAB ($[M]^+$) *m/z*: 430.3。合成路线见图 2。

2.3 *N*-[[3-[3-氟-4-(4-(2-溴丁酰基)-1-哌嗪基)苯基]-4,5-二氢-5-异噁唑啉]甲基]乙酰胺(化合物 2)及其衍生物的合成

参照“2.2”项下方法, 得类白色固体 4.1 g, 收率 87.4%。¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 0.91~0.95 (3H,

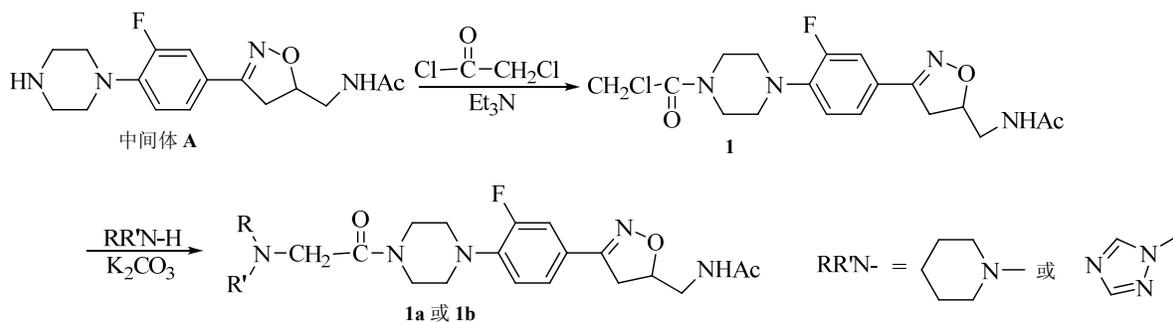


图 2 化合物 1 及其衍生物的合成路线

Fig. 2 Synthetic route of compound 1 and its derivative

t), 1.81 (3H, s), 1.86~2.05 (2H, m), 3.04~3.15 (5H, m), 3.22~3.27 (2H, m), 3.36~3.43 (1H, m), 3.64~3.73 (4H, m), 4.66~4.74 (1H, m), 4.90~4.93 (1H, t), 7.07~7.11 (1H, t), 7.35~7.42 (2H, m), 8.08~8.11 (1H, t)。

取哌啶 0.20 g (0.002 35 mol) 转移入 10 mL 氯仿中, 加入碳酸钾 0.32 g (0.002 35 mol), 搅拌, 加入化合物 2 1.1 g (0.002 35 mol), 加热回流, 反应约 5 h, 经薄层色谱监测反应结束。滤过, 氯仿冲洗滤饼, 减压浓缩滤液, 经硅胶柱色谱分离, 以甲醇-二氯甲烷 (3:50) 洗脱, 收集合适的流出组分, 即得 *N*-[[3-[3-氟-4-(4-(2-哌啶丁酰基)-1-哌嗪基)苯基]-4,5-二氢-5-异噁唑基]甲基]乙酰胺 (化合物 2a)。白色固体 0.23 g, 收率 20.3%。mp 152.4~154.3 °C。¹H-NMR (DMSO) δ: 0.75~0.78 (3H, t), 1.36~1.39 (2H, d), 1.45 (5H, s), 1.63~1.70 (1H, m),

1.81 (3H, s), 2.47~2.49 (4H, m), 2.89 (1H, s), 3.04~3.17 (4H, m), 3.22~3.24 (2H, t), 3.36~3.45 (3H, m), 3.59~3.65 (1H, m), 3.79~3.86 (2H, t), 7.06~7.10 (1H, t), 7.35~7.42 (2H, m), 8.09~8.12 (1H, t); MS-FAB ($[M]^+$) *m/z*: 474.1。

用类似方法合成了 *N*-[[3-[3-氟-4-(4-(1,2,4-三唑基-2-丁酰基)-1-哌嗪基)苯基]-4,5-二氢-5-异噁唑基]甲基]乙酰胺 (化合物 2b)。白色固体, mp 92.4~95.3 °C。¹H-NMR (DMSO) δ: 0.81~0.87 (3H, m), 1.81 (3H, s), 2.04~2.11 (2H, m), 2.92~3.13 (5H, m), 3.22~3.25 (2H, t), 3.36~3.43 (1H, m), 3.58~3.74 (4H, m), 4.66~4.74 (1H, m), 5.58~5.62 (1H, t), 7.04~7.09 (1H, t), 7.35~7.42 (2H, m), 7.96 (1H, s), 8.08~8.11 (1H, t), 8.66 (1H, s)。MS-FAB ($[M]^+$) *m/z*: 458.0。合成路线见图 3。

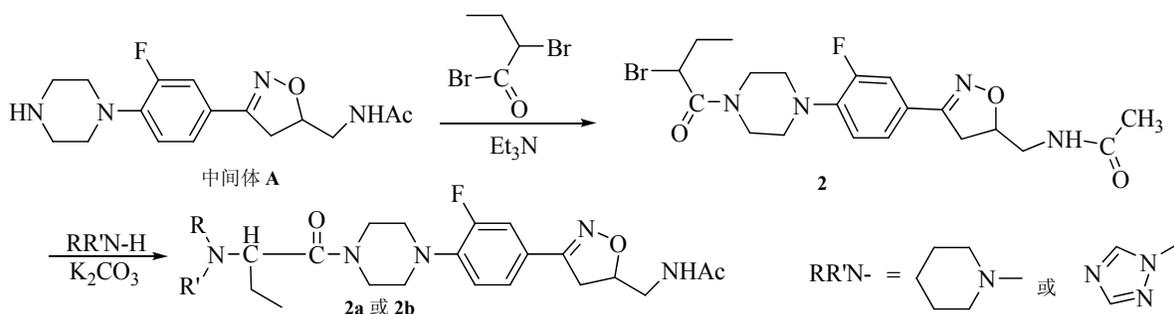


图 3 化合物 2 及其衍生物的合成路线

Fig. 3 Synthetic route of compound 2 and its derivative

2.4 *N*-[[3-[3-氟-4-[4-(邻氯苯磺酰基)-1-哌嗪基]苯基]-4,5-二氢-5-异噁唑基]甲基]乙酰胺 (化合物 3a) 等相关衍生物的合成

取 1.1 g (0.003 4 mol) 中间体 A, 置 50 mL 三口瓶中, 加入 15 mL 氯仿, 加热使溶解, 冷却至室温, 加入三乙胺 0.5 mL (0.003 4 mol), 冰浴冷却,

缓慢滴加邻氯苯磺酰氯 0.717 g (3.4 mmol), 使温度不高于 5 °C。滴加完毕后继续搅拌 30 min, 撤掉冰浴, 加热至室温, 薄层色谱法跟踪反应。反应完毕后, 20 mL 水加入反应瓶中, 萃取 2 次, 无水硫酸钠干燥有机层。滤过, 减压浓缩, 即得化合物 **3a**。乳白色固体, mp 169.3 ~ 171.3 °C。¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.81 (3H, s), 3.03~3.09 (1H, m), 3.12~3.15 (4H, m), 3.21~3.24 (2H, m), 3.32~3.35 (2H, m), 3.36~3.43 (4H, m), 4.68~4.72 (1H, m), 7.06~7.10 (1H, t), 7.34~7.40 (2H, m), 7.66~7.69 (1H, m), 8.08~8.11 (1H, t), 8.40~8.43 (1H, m), 8.67~8.68 (1H, m)。

用类似的方法合成 *N*-[[3-[3-氟-4-[4-(2,3-二氢苯并呋喃-5-磺酰基)-1-哌嗪基]苯基]-4,5-二氢-5-异噁唑基]甲基]乙酰胺(化合物 **3b**)。乳白色固体, mp 129.1 ~ 131.2 °C。¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.81 (3H, s), 2.99~3.01 (4H, m), 3.04~3.08 (1H, m), 3.13~3.15 (4H, m), 3.19~3.21 (2H, m), 3.22~3.28 (1H, m), 3.30~3.31 (1H, d), 3.34~3.41 (1H, m), 4.64~4.73 (3H, m), 6.91~6.99 (1H, m), 7.04~7.08 (1H, m), 7.33~7.43 (2H, m), 7.51~7.53 (1H, m), 7.61~7.62 (1H, d), 8.07~8.10 (1H, t)。

用类似的方法合成 *N*-[[3-[3-氟-4-[4-(4-溴-2,6-二氯苯磺酰基)-1-哌嗪基]苯基]-4,5-二氢-5-异噁唑基]甲基]乙酰胺(化合物 **3c**)。乳白色固体, mp 208.2~210.8 °C。¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.80 (3H, s), 3.03~3.09 (1H, m), 3.12~3.12 (3H, m), 3.21~3.24 (2H, t), 3.30 (2H, s), 3.35~3.39 (1H,

m), 3.42~3.44 (4H, m), 4.67~4.70 (1H, m), 7.06~7.10 (1H, m), 7.34~7.40 (2H, m), 7.98~8.02 (1H, m), 8.08~8.10 (1H, m)。

用类似的方法合成 *N*-[[3-[3-氟-4-[4-(间硝基苯磺酰基)-1-哌嗪基]苯基]-4,5-二氢-5-异噁唑基]甲基]乙酰胺(化合物 **3d**)。黄色固体, 熔点 164.2~165.4 °C。¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 0.93~0.97 (1H, t), 1.81 (3H, s), 3.02~3.08 (1H, m), 3.15 (7H, s), 3.20~3.23 (2H, m), 3.33~3.40 (1H, m), 4.65~4.72 (1H, m), 7.03~7.08 (1H, t), 7.32~7.37 (2H, m), 7.95~7.99 (1H, t), 8.08~8.11 (1H, t), 8.20~8.22 (1H, m), 8.40~8.41 (1H, t), 8.54~8.57 (1H, m)。

N-[[3-[3-氟-4-[4-(间胺基苯磺酰基)-1-哌嗪基]苯基]-4,5-二氢-5-异噁唑基]甲基]乙酰胺(化合物 **3da**)的合成 取化合物 **3d** 1.1 g (2.2 mmol) 置 50 mL 三口瓶中, 倒入甲醇 15 mL, 搅拌使溶解, 加入甲酸铵 0.14 g (2.2 mmol) 和 10%钯碳 (0.12 g), 撤掉冰浴, 加热至室温, 薄层色谱法跟踪。反应完毕后, 加入 20 mL 水, 萃取 2 次, 无水硫酸钠干燥有机层。滤过, 减压浓缩, 得化合物 **3da** 0.85 g。乳白色固体, mp 150.2 ~ 151.3 °C。¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.28~1.32 (3H, t), 1.80 (3H, s), 3.01~3.05 (2H, m), 3.08~3.13 (2H, m), 3.21~3.24 (2H, t), 3.30 (4H, s), 3.36~3.42 (1H, q), 3.78~3.79 (2H, d), 4.05~4.10 (2H, m), 4.67~4.72 (1H, m), 6.97~7.00 (1H, t), 7.05~7.11 (2H, d), 7.19~7.21 (1H, m), 7.35~7.42 (3H, m), 8.08~8.11 (1H, t)。合成路线见图 4。

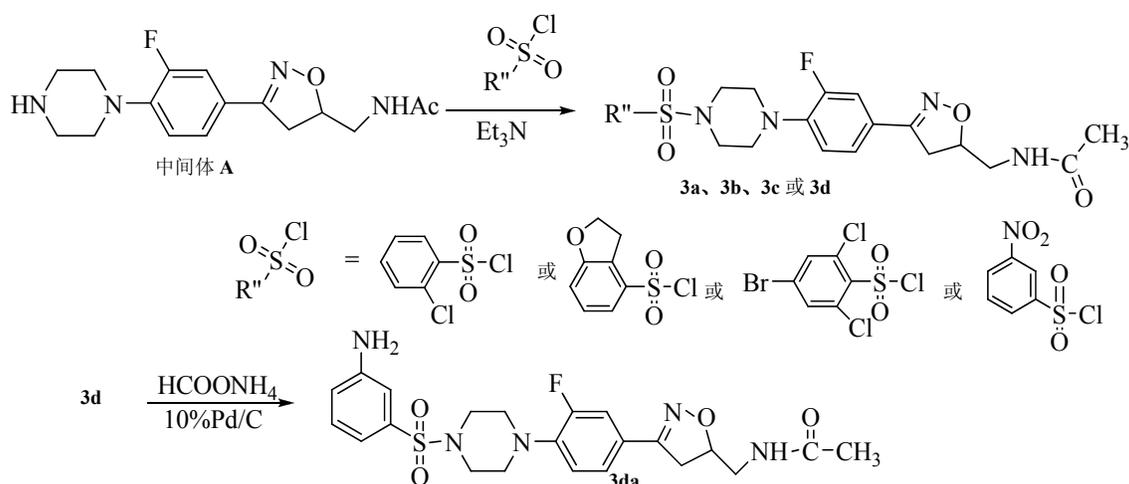


图 4 化合物 3 等衍生物的合成路线

Fig. 4 Synthetic route of compound 3 and derivatives

2.5 目标化合物的抑菌活性测试

先在已经消毒的 96 孔板的 1 孔、12 孔中分别加入菌液和肉汤培养液对照, 在 2~11 孔中用微量可调移液器从低浓度到高浓度依次加入用培养基倍比稀释样品溶液 0.25~128 $\mu\text{g/mL}$, 每孔 100 μL , 然后在每孔中加入稀释菌液 1 μL , 使得各孔中样品

浓度分别为 0.125、0.25、0.5、1、2、4、8、16、32、64 $\mu\text{g/mL}$, 置于振荡器上振荡 1 min, 使孔内溶液充分混合后, 微孔板加盖并用胶纸密封以减少孵育过程中的蒸发, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中孵育 18 h, 肉眼观测无细菌生长孔所含最低药物浓度即为最小抑菌浓度 (MIC)。实验重复 3 次, 求其均值。结果见表 1。

表 1 目标化合物的抗菌活性测试

Table 1 Antibacterial activity of target compounds

化合物	MIC/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$			
	<i>S. lutea</i> 28001	<i>S. aureus</i> 26003	<i>K. pneumoniae</i> 46117	<i>P.aeruginosa</i> 10211
1a	4	2	64	64
1b	4	4	64	32
2a	4	4	64	64
2b	2	2	64	64
3a	16	16	64	32
3b	8	16	64	64
3c	4	8	32	64
3d	1	1	32	64
3da	0.5	0.25	64	32
利奈唑胺	0.5	0.25	16	32

3 讨论

化合物 **1** 与 **1a**、**1b** 的反应收率高于化合物 **2** 与 **2a**、**2b** 的反应收率, 可能是由于乙基的空间位阻较大造成的。

药理试验结果表明, 所有化合物均表现为对革兰阳性菌的抑菌作用优于对革兰阴性菌的抑菌作用, 并且化合物 **3da** 的活性优于其他化合物, 但是所有设计的化合物的抑菌活性均没有利奈唑胺高。

化合物 **3d**、**3da** 的药理活性较强, 对其合成路线和活性值得进一步研究。

参考文献

- [1] Barbachyn M R, Morris J, Wishka D G, *et al.* Substituted aminopenkenyl isoxazoline derivatives as antimicrobials [P]. WO: 9941244, 1999-08-19.
- [2] Douglas K H, Michael R B, Steven T B, *et al.* Oxazolidinone antimicrobials containing substituted diazine moieties [P]. US: 5547950, 1996-08-20.
- [3] Davenport J D. Substituted isoxazolines for control of plant phytopathogens [P]. US: 4283403, 1981-08-11.
- [4] Bramhall W H, Wilmslow G A H. Nitrofuryl derivatives of 5-substituted isoxalines [P]. US: 3769295, 1973-10-30.
- [5] 刘冰妮, 刘 默, 刘登科, 等. 异噁唑啉衍生物的合成、抗肿瘤活性及分子对接研究 [J]. 现代药物与临床, 2010, 25(2): 130-133.
- [6] 周英雷, 沈松伟, 刘方明. 新型含吡啶基异噁唑啉衍生物的合成与表征 [J]. 有机化学, 2010, 30(9):1342-1346.
- [7] 张 峥, 李 忠. 异噁唑啉衍生物合成及其生物活性 [J]. 农药研究与应用, 2007, 11(4): 21-26.
- [8] 杜光剑, 陈东亮, 卢锐炯, 等. 3-(吗啉吡啶基)-5-取代异噁唑啉类化合物的合成及抗菌活性研究 [J]. 有机化学, 2009, 29(10): 1575-1581.
- [9] 刘 默. 取代的哌嗪基苯基异噁唑啉衍生物及其用途 [P]. 中国: 101016270A, 2007-08-15.
- [10] 刘 默. 异噁唑啉衍生物及其用途 [P]. 中国: 101070308B, 2007-06-19.
- [11] 刘 默. 酰氯和磺酰氯类衍生物及其用途 [P]. 中国: 101220000B, 2007-12-28.
- [12] 张志强, 刘冰妮, 刘 默, 等. 5-乙酰胺甲基-3-[3-氟-4-(1-哌嗪基苯基)]异噁唑啉的合成 [J]. 精细化工中间体, 2009, 39(3): 31-33.