

医药与日化原料

吡啶联异噁唑啉类杂环衍生物的合成及生物活性

杨洪亮^{1,2}, 金博¹, 陈俭清^{1,2}, 盛尊来^{1,2*}

(1. 东北农业大学 动物医学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省重点实验室 动物疾病防控技术与制剂创制实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 以2-氯-5-氯甲基吡啶为原料, 合成了12个吡啶联异噁唑啉类杂环衍生物(IXa~l), 其结构经¹HNMR、¹³CNMR、MS及IR确证。体外抗菌活性测试结果表明, 所得目标化合物对金黄色葡萄球菌(ATCC25923)、肺炎链球菌(ATCC49619)和粪肠球菌(ATCC29212)均有抑制作用。其中, 化合物IXf和IXl对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度(MIC)均为16 mg/L, 对肺炎链球菌和粪肠球菌的MIC均为32 mg/L, 抗菌效果最佳; 体外驱虫活性测试结果表明: 目标化合物均有驱虫效果, 在质量浓度2 g/L下化合物IXa~b和IXg~h对蚯蚓的麻痹时间和死亡时间均明显少于阿苯达唑, 驱虫效果明显强于阿苯达唑。

关键词: 吡啶联异噁唑啉; 抗菌活性; 驱虫活性; 构效关系; 医药原料

中图分类号: O626 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214(2019)03-0487-07

Synthesis and Biological Activity of Pyridinyl-4,5-2H-isoxazole Heterocyclic Derivatives

YANG Hong-liang^{1,2}, JIN Bo¹, CHEN Jian-qing^{1,2}, SHENG Zun-lai^{1,2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China; 2. Heilongjiang Key Laboratory for Animal Disease Control and Pharmaceutical Development, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

Abstract: Twelve pyridinyl-4,5-2H-isoxazole heterocyclic derivatives (IXa~l) were synthesized from 2-chloro-5-chloromethylpyridine and their structures were characterized by ¹HNMR, ¹³CNMR, MS and IR. Antibacterial activities results indicated all of compounds exhibited potent activities against *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Streptococcus pneumonia* (ATCC49619) and *Enterococcus faecalis* (ATCC29212). Especially, compounds IXf and IXl showed the best activities, the minimal inhibitory concentration (MIC) values of IXf and IXl against *Staphylococcus aureus* were 16 mg/L, the MIC values of IXf and IXl against *Streptococcus pneumonia* and *Enterococcus faecalis* were 32 mg/L. All the target compounds displayed excellent anthelmintic activities, paralyzing time and death time of compounds IXa, IXb, IXg and IXh were significantly less than those of albendazole against Indian earthworm at 2 g/L concentration, indicating that these four compounds had much stronger anthelmintic effects than albendazole.

Key words: pyridinyl-4,5-2H-isoxazole; antibacterial activity; anthelmintic activities; structure-activity relationship; drug materials

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31802227); Youth Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (QC2016025); University Nursing Programs for Young Scholars with Creative Talents in Heilongjiang Province (UNPYSCT-2017003); "Young Talents" Project of Northeast Agricultural University (17QC13)

细菌耐药性问题已成为全球面临的严峻的公共卫生安全问题, 临床上多种耐药菌引起的感染性疾病

已成为威胁人类健康的重大隐患。由于细菌能够不断产生新的耐药机制, 现有药物的有效抗菌能力正在下

收稿日期: 2018-08-30; 定用日期: 2018-12-04; DOI: 10.13550/j.jxhg.20180640

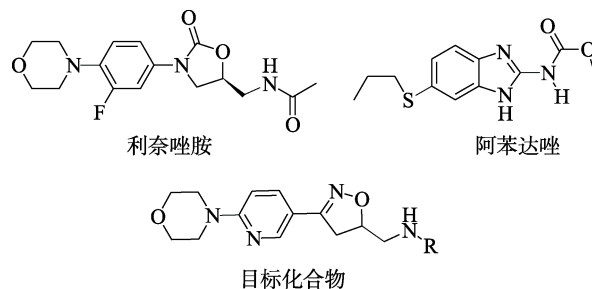
基金项目: 国家自然科学基金(31802227); 黑龙江省青年科学基金(QC2016025); 黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划(UNPYSCT-2017003); 东北农业大学“青年才俊”项目(17QC13)

作者简介: 杨洪亮(1987—), 男, 讲师, E-mail: hongli_yang@126.com。联系人: 盛尊来(1979—), 男, 副教授, E-mail: 8358410@qq.com。

降, 人类正在加速进入“后抗生素时代”^[1-2], 对新型抗菌药物的需求已迫在眉睫。此外, 寄生虫病是威胁人类健康的一大类疾病, 其中, 蛔虫病是一种普遍的人畜共患病, 该病分布广泛, 但以贫穷落后、卫生条件差的地区多见, 热带和亚热带地区更多, 对人类健康造成重大危害^[3-4]。目前, 驱虫药物的发展比较缓慢且应用受限。因此, 急需开发更加安全、有效的驱虫药物。

利奈唑胺 (linezolid) (结构如下所示) 是近几十年来上市的一种人工全合成的噁唑烷酮类抗菌药物, 临床证实有很好的疗效。人们对利奈唑胺进行了大量的结构修饰和改造研究^[5-9], 虽然在疗效等方面有所改善, 但药代动力学性质仍然不够理想, 毒性也较大, 因而一直没有新的药物上市。阿苯达唑 (albendazole), 又名丙硫咪唑, 为苯并咪唑类结构, 是治疗多种寄生虫病的首选药物。但阿苯达唑在水及多种有机溶剂中溶解性较差, 生物利用度较低, 在一定程度上影响了其抗寄生虫疗效, 因而需要开发能够提高药物溶解性及生物利用度的新的抗寄生虫药物。

本课题组前期研究发现, 吡啶联异噁唑和吡啶联异噁唑啉类杂环衍生物有很好的生物活性^[10-11]。因此, 本文在前期研究基础上, 分析总结利奈唑胺和驱虫药阿苯达唑的结构特点, 设计合成了一系列吡啶联异噁唑啉类杂环衍生物 (结构如下式所示), 并对目标化合物的体外抗菌效果和驱虫效果进行了测试。本文为后续开发新颖的抗菌及驱虫药物提供了实验基础。



1 实验部分

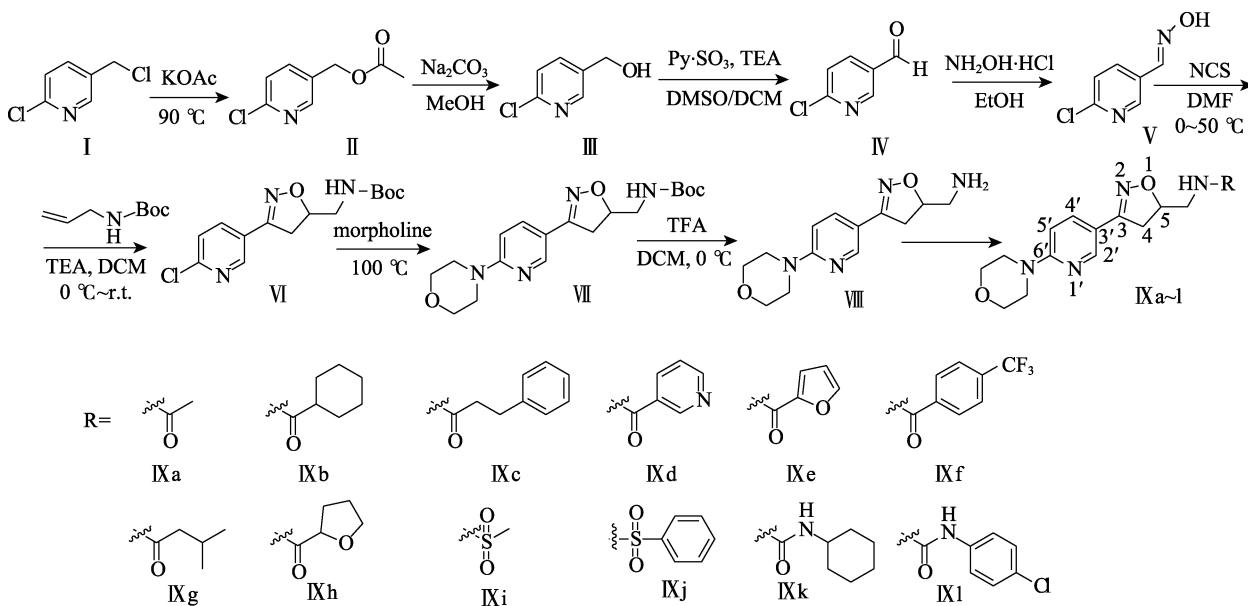
1.1 试剂与仪器

二氯甲烷 (DCM) 在使用前经过 CaH_2 干燥后蒸馏得到; 三乙胺 (TEA)、二甲亚砜 (DMSO) 和 *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 使用前经过分子筛干燥得到, 均为化学纯, 天津市天力化学试剂有限公司, 其他试剂和药品均为市售 AR, 除特殊说明外未经进一步处理。薄层色谱用硅胶 G, 台州市路桥四甲生化塑料品厂; 柱色谱用硅胶, 200~300 目, 青岛海洋化工有限公司; 水解酪蛋白 (Mueller-Hinton, MH) 肉汤培养基, 青岛高科园海博生物技术有限公司。

Agilent 1100 型液相色谱-质谱联用仪 (LC/MS), 美国 Agilent 公司; 400 MHz 核磁共振波谱仪, 美国 Varian 公司, TMS 为内标; WRS-1A 数字熔点仪, 上海世诺物理光学仪器有限公司; ZF-2 型三用紫外分析仪, 上海市安亭电子仪器厂; MCO-20AIC 型二氧化碳培养箱, 日本 Sanyo 公司; Agilent Cary 630 FTIR 红外光谱仪, 美国 Agilent 公司。

1.2 合成步骤

目标化合物的合成路线如下所示。其中, NCS 为 *N*-氯代丁二酰亚胺。



以 2-氯-5-氯甲基吡啶为原料, 经取代、酯基水解、氧化、成脞、[3+2]环加成反应得中间体 VI, 吡

啶环上取代吗啉后脱掉 Boc 保护基团得重要中间体 VIII, 然后分别形成酰胺、磺酰胺及脲类衍生物, 共

合成 12 个目标化合物。

1.2.1 化合物 II~VIII 的合成

化合物 II 的合成参考文献[12], 中间体 III~VIII 的合成参考文献[10-11]。

1.2.2 目标化合物 IXa~h 的合成

合成方法参考文献[13]。分别将化合物 VIII 210 mg (0.8 mmol), 有机酸(乙酸、环己基甲酸、苯丙酸、烟酸、糠酸、对三氟甲基苯甲酸、异戊酸、四氢糠酸) 1.2 mmol, 4-二甲氨基吡啶(DMAP) 50 mg (0.4 mmol) 和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDCI) 230 mg (1.2 mmol) 溶于 10 mL DMF 中, 室温搅拌过夜, TLC [V(DCM) : V(MeOH) : V(TEA) = 60 : 2 : 1] 监测反应完全, 用乙酸乙酯(EtOAc) 萃取(20 mL × 3), 合并有机相, 无水 Na₂SO₄ 干燥, 减压蒸干有机溶剂, 重结晶得目标化合物。

N-{[3-(6'-吗啉吡啶-3'-基)-4,5-2*H*-异噁唑-5-基]甲基}乙酰胺(IX a): 产率 66.4%, 白色固体, m.p. 198.0~198.2 °C; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 8.31 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.10 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.82 (dd, *J* = 9.2、2.4 Hz, 1H), 6.90 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 4.90 ~ 4.64 (m, 1H), 3.74 ~ 3.64 (m, 4H), 3.57 ~ 3.49 (m, 4H), 3.44 ~ 3.29 (m, 1H), 3.25 ~ 3.21 (m, 2H), 3.10 ~ 3.04 (m, 1H), 1.82 (s, 3H); ¹³CNMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 170.1, 159.8, 155.0, 146.9, 135.6, 115.2, 107.2, 79.3, 66.3, 45.2, 42.3, 37.7, 23.0; IR (KBr), *v*/cm⁻¹: 3309(—NH), 2905、2858(—CH), 1649(C=O), 1612(C=N), 1548(N—H), 1504(C=C), 1381(—CH), 1112(C—O); ES-MS, *m/z*: 实测值(理论值): 305.2 (304.2)[M+H⁺]

N-{[3-(6'-吗啉吡啶-3'-基)-4,5-2*H*-异噁唑-5-基]甲基}环己甲酰胺(IX b): 产率 47.6%, 灰色固体, m.p. 144.6~147.3 °C; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 8.30 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.92 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.81 (dd, *J* = 9.2、2.4 Hz, 1H), 6.90 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 4.70 ~ 4.63 (m, 1H), 3.74 ~ 3.61 (m, 4H), 3.57 ~ 3.46 (m, 4H), 3.41 ~ 3.34 (m, 1H), 3.29 ~ 3.26 (m, 2H), 3.09 ~ 3.03 (m, 1H), 2.14 ~ 2.08 (m, 1H), 1.66 ~ 1.57 (m, 5H), 1.35 ~ 1.20 (m, 5H); ¹³CNMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 176.2, 159.8, 154.9, 146.9, 135.6, 115.3, 107.2, 79.4, 66.3, 45.3, 44.3, 37.6, 29.5, 25.7, 14.6; IR (KBr), *v*/cm⁻¹: 3308(—NH), 2927(—CH), 1638(C=O), 1610(C=N), 1507(C=C), 1258(C—N), 1118(C—O); ES-MS, *m/z*: 实测值(理论值): 373.3 (372.2) [M+H⁺]

N-{[3-(6'-吗啉吡啶-3'-基)-4,5-2*H*-异噁唑-5-基]甲基}-3-苯丙酰胺(IX c): 产率 68.4%, 白色固体, m.p. 178.3~181.4 °C; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 8.30 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.11 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.80 (dd, *J* = 9.2、2.0 Hz, 1H), 7.26 ~ 7.14 (m, 5H), 6.90 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 4.69 ~ 4.61 (m, 1H), 3.74 ~

3.62 (m, 4H), 3.57 ~ 3.46 (m, 4H), 3.28 ~ 3.17 (m, 2H), 3.06 ~ 2.98 (m, 2H), 2.80 ~ 2.76 (m, 2H), 2.41 ~ 2.38 (m, 2H); ¹³CNMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 172.4, 159.8, 155.0, 146.9, 141.7, 135.6, 128.7, 125.4, 115.2, 107.2, 79.3, 66.3, 45.3, 42.3, 37.5, 31.6; IR (KBr), *v*/cm⁻¹: 3313(—NH), 2980(—CH), 1638(C=O), 1612(C=N), 1500(C=C), 1388(—CH), 1112(C—O); ES-MS, *m/z*: 实测值(理论值): 395.1 (394.2) [M+H⁺]

N-{[3-(6'-吗啉吡啶-3'-基)-4,5-2*H*-异噁唑-5-基]甲基}烟酰胺(IX d): 产率 38.6%, 白色固体, m.p. 169.7~170.9 °C; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 8.99 (s, 1H), 8.93 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.70 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 8.33 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.22 ~ 8.14 (m, 1H), 7.83 (dd, *J* = 9.2、2.4 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 8.0, 1H), 6.90 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 4.88 ~ 4.81 (m, 1H), 3.73 ~ 3.63 (m, 4H), 3.56 ~ 3.51 (m, 4H), 3.50 ~ 3.40 (m, 3H), 3.25 ~ 3.19 (m, 1H); ¹³CNMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 165.8, 159.8, 155.0, 152.4, 148.9, 147.0, 135.7, 135.5, 130.2, 123.9, 115.2, 107.2, 79.0, 66.3, 45.2, 43.1; IR (KBr), *v*/cm⁻¹: 3317(—NH), 2916(—CH), 1618(C=O), 1608(C=N), 1507(C=C), 1288 (C—N), 1152(C—O); ES-MS, *m/z*: 实测值(理论值): 368.3 (367.2) [M+H⁺]

N-{[3-(6'-吗啉吡啶-3'-基)-4,5-2*H*-异噁唑-5-基]甲基}咪喃-2-甲酰胺(IX e): 产率 58.2%, 淡黄色固体, m.p. 155.9 ~ 157.2 °C; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 8.56 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.32 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.83 ~ 7.81 (m, 2H), 7.13 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 6.90 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 6.62 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 4.83 ~ 4.76 (m, 1H), 3.73 ~ 3.63 (m, 4H), 3.58 ~ 3.49 (m, 4H), 3.48 ~ 3.29 (m, 3H), 3.22 ~ 3.16 (m, 1H); ¹³CNMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 159.8, 158.6, 154.9, 147.8, 146.9, 145.6, 135.7, 115.2, 114.1, 112.3, 107.2, 79.0, 66.3, 45.2, 38.0; IR (KBr), *v*/cm⁻¹: 3302(—NH), 2922(—CH), 1653(C=O), 1612(C=N), 1507(C=C), 1315(—CH), 1112(C—O); ES-MS, *m/z*: 实测值(理论值): 357.1 (356.2) [M+H⁺]

N-{[3-(6'-吗啉吡啶-3'-基)-4,5-2*H*-异噁唑-5-基]甲基}-4-(三氟甲基)苯甲酰胺(IX f): 产率 67.2%, 白色固体, m.p. 190.9~191.9 °C; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 8.97 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.33 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.04 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.85 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.82 (dd, *J* = 9.2、2.0 Hz, 1H), 6.90 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 4.89 ~ 4.82 (m, 1H), 3.72 ~ 3.65 (m, 4H), 3.56 ~ 3.51 (m, 4H), 3.51 ~ 3.39 (m, 3H), 3.25 ~ 3.19 (m, 1H); ¹³CNMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 166.0, 159.8, 155.0, 147.0, 138.4, 135.7, 128.6 (q, *J*_{C-F} = 255.2 Hz), 125.8, 115.2, 107.2, 78.9, 66.3, 45.2, 43.2, 38.0; IR (KBr), *v*/cm⁻¹: 3298(—NH), 2903(—CH), 1638(C=O), 1612(C=N), 1505(C=C), 1336(—CH), 1246(C—F), 1112(C—O); ES-MS, *m/z*: 实测值(理论值): 435.2 (434.2) [M+H⁺]

3-甲基-*N*-{[3-(6'-吗啉吡啶-3'-基)-4,5-2*H*-异噁唑-5-基]甲基}丁酰胺(IXg): 产率 61.3%, 白色固体, m.p. 160.7~162.2 °C; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 8.30 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.03 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.81 (dd, *J* = 8.8、2.4 Hz, 1H), 6.89 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.69 ~ 4.66 (m, 1H), 3.74 ~ 3.64 (m, 4H), 3.57 ~ 3.47 (m, 4H), 3.40 ~ 3.36 (m, 1H), 3.30 ~ 3.17 (m, 2H), 3.10 ~ 3.04 (m, 1H), 1.96 ~ 1.90 (m, 2H), 1.93 ~ 1.86 (m, 1H), 0.85 ~ 0.81 (m, 6H); ¹³CNMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 172.5, 159.8, 154.9, 146.9, 135.6, 115.3, 107.2, 79.4, 66.3, 45.1, 42.1, 37.7, 26.0, 22.7; IR (KBr), *v*/cm⁻¹: 3308(—NH), 2961(—CH), 1641(C=O), 1612(C=N), 1504(C=C), 1386(—CH), 1112(C—O); ES-MS, *m/z*: 实测值(理论值): 347.3 (346.2) [M+H⁺].

N-{[3-(6'-吗啉吡啶-3'-基)-4,5-2*H*-异噁唑-5-基]甲基}四氢呋喃-2-甲酰胺(IXh): 产率 64.2%, 白色固体, m.p. 151.0~153.3 °C; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 8.31 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.91 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.82 (dd, *J* = 9.2、2.0 Hz, 1H), 6.90 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 4.76 ~ 4.69 (m, 1H), 4.23 ~ 4.19 (m, 1H), 3.86 ~ 3.80 (m, 1H), 3.74 ~ 3.72 (m, 1H), 3.70 ~ 3.65 (m, 4H), 3.58 ~ 3.49 (m, 4H), 3.44 ~ 3.32 (m, 1H), 3.30 ~ 3.07 (m, 3H), 2.17 ~ 1.96 (m, 1H), 1.90 ~ 1.58 (m, 3H); ¹³CNMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 173.5, 159.8, 154.8, 146.9, 135.6, 115.2, 107.2, 78.9, 78.1, 69.0, 66.3, 45.2, 41.9, 30.5, 25.3; IR (KBr), *v*/cm⁻¹: 3293(—NH), 2953(—CH), 1656(C=O), 1612(C=N), 1509(C=C), 1317(—CH), 1120(C—O); ES-MS, *m/z*: 实测值(理论值): 361.3 (360.2) [M+H⁺].

1.2.3 目标化合物 IXi~j 合成

合成方法参照文献[14]。冰水浴下, 将化合物 VIII 262 mg (1.0 mmol), 磺酰氯 1.05 mmol, DMAP 24.4 mg (0.2 mmol)和三乙胺 0.28 mL (2.0 mmol)溶于 10 mL DMF 中, 自然升至室温搅拌约 2 h, TLC [*V*(DCM) : *V*(MeOH) : *V*(TEA) = 60 : 1 : 1] 监测反应完全, 用乙酸乙酯(EtOAc)萃取(20 mL × 3), 合并有机相, 无水 Na₂SO₄ 干燥, 减压蒸干有机溶剂, 重结晶得目标化合物。

N-{[3-(6'-吗啉吡啶-3'-基)-4,5-2*H*-异噁唑-5-基]甲基}甲磺酰胺(IXi): 产率 47.2%, 白色固体, m.p. 180.4~181.4 °C; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 8.33 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.83 (dd, *J* = 9.2、2.4 Hz, 1H), 7.28 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 6.90 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 4.76 ~ 4.69 (m, 1H), 3.73 ~ 3.64 (m, 4H), 3.57 ~ 3.50 (m, 4H), 3.48 ~ 3.44 (m, 1H), 3.23 ~ 3.10 (m, 3H), 2.92 (s, 3H); ¹³CNMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 159.9, 155.0, 147.0, 135.7, 115.1, 107.2, 79.5, 66.3, 45.9, 45.2, 37.6; IR (KBr), *v*/cm⁻¹: 3281(—NH), 2981(—CH), 1612(C=N), 1505(C=C), 1384(—CH), 1241(S=O), 1114(C—O); ES-MS, *m/z*: 实测值(理论值): 340.9 (340.1) [M+H⁺].

N-{[3-(6'-吗啉吡啶-3'-基)-4,5-2*H*-异噁唑-5-基]甲基}苯磺酰胺(IXj): 产率 55.4%, 白色固体, m.p. 168.6~169.8 °C; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 8.29 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.96 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 7.83 ~ 7.77 (m, 3H), 7.66 ~ 7.56 (m, 3H), 6.90 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 4.70 ~ 4.63 (m, 1H), 3.73 ~ 3.63 (m, 4H), 3.58 ~ 3.48 (m, 4H), 3.44 ~ 3.37 (m, 1H), 3.18 ~ 3.12 (m, 3H); ¹³CNMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 159.8, 154.9, 146.9, 141.0, 135.6, 132.9, 129.7, 126.9, 115.1, 107.2, 79.1, 66.3, 46.1, 45.2; IR (KBr), *v*/cm⁻¹: 2927(—CH), 1608(C=N), 1504(C=C), 1332(—CH), 1244(S=O), 1120(C—O); ES-MS, *m/z*: 实测值(理论值): 403.1 (402.1) [M+H⁺].

1.2.4 目标化合物 IXk~l 合成

合成方法参照文献[15]。冰水浴下, 将化合物 VIII 262 mg (1.0 mmol), 环己基异氰酸酯 250.4 mg (2.0 mmol)或 4-氯苯基异氰酸酯 307.6 mg (2.0 mmol), 三乙胺 0.21 mL (1.5 mmol)溶于 10 mL DMF 中, 自然升至室温搅拌约 3~4 h, TLC [*V*(DCM) : *V*(MeOH) : *V*(TEA) = 60 : 1 : 1] 监测反应完全, 用乙酸乙酯萃取(20 mL × 3), 合并有机相, 无水 Na₂SO₄ 干燥, 减压蒸干有机溶剂, 重结晶得目标化合物。

1-环己基-3-{[3-(6'-吗啉吡啶-3'-基)-4,5-2*H*-异噁唑-5-基]甲基}脲(IXk): 产率 70.4%, 白色固体, m.p. 187.0~187.8 °C; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 8.31 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.82 (dd, *J* = 8.8、2.0 Hz, 1H), 6.89 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.91 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 5.86 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.68 ~ 4.61 (m, 1H), 3.70 ~ 3.68 (m, 4H), 3.54 ~ 3.51 (m, 4H), 3.40 ~ 3.33 (m, 2H), 3.21 ~ 3.19 (m, 2H), 3.10 ~ 3.05 (m, 1H), 1.73 ~ 1.70 (m, 4H), 1.63 ~ 1.60 (m, 4H), 1.52 ~ 1.49 (m, 2H); ¹³CNMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 160.2, 157.9, 155.1, 146.9, 135.6, 115.2, 107.2, 80.2, 66.3, 48.1, 45.3, 42.9, 37.4, 33.7, 25.3; IR (KBr), *v*/cm⁻¹: 3326(—NH), 2931(—CH), 1627(C=O), 1578(C=N), 1504(C=C), 1312(—CH), 1244(C—O); ES-MS, *m/z*: 实测值(理论值): 388.3 (387.2) [M+H⁺].

1-(4-氯苯基)-3-{[3-(6'-吗啉吡啶-3'-基)-4,5-2*H*-异噁唑-5-基]甲基}脲(IXl): 产率 75.7%, 白色固体, m.p. 228.0~229.4 °C; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 8.70 (s, 1H), 8.33 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.83 (dd, *J* = 9.2、2.4 Hz, 1H), 7.48 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.25 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.89 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 6.38 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 4.78 ~ 4.70 (m, 1H), 3.69 ~ 3.67 (m, 4H), 3.53 ~ 3.51 (m, 4H), 3.46 ~ 3.40 (m, 1H), 3.36 ~ 3.33 (m, 1H), 3.30 ~ 3.26 (m, 1H), 3.15 ~ 3.09 (m, 1H); ¹³CNMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 159.8, 155.7, 155.1, 146.9, 139.8, 135.6, 129.0, 125.1, 119.6, 115.2, 107.2, 79.8, 66.3, 45.2, 42.7, 37.5; IR (KBr), *v*/cm⁻¹: 3302(—NH), 2968(—CH), 1651(C=O), 1610(C=N), 1511(C=C), 1315(—CH), 1246(C—F), 1116(C—O);

ES-MS, m/z : 实测值(理论值): 416.4(415.1) $[M+H]^+$ 。

1.3 目标化合物的生物活性测试

1.3.1 抗菌活性测试^[16]

将目标化合物及阳性对照药(利奈唑胺)用DMSO溶解后加MH肉汤培养基稀释, 制得质量浓度为512 mg/L的抗菌药物工作液, 备用。从-80 °C冰箱中取已传代菌液, 接种于已灭菌的MH肉汤培养基中, 37 °C培养箱中培养18~24 h。用灭菌的接种环取斜面菌种在平皿上划线, 分离单菌落, 装于含有MH培养基的烧瓶中, 37 °C培养10~15 h。借助麦氏比浊仪, 用MH肉汤稀释培养菌液使其浊度达到0.5麦氏比浊标准, 此时菌液浓度约 1×10^{11} CFU/L, 再将其稀释100倍, 作为测试菌液, 最终浓度为 1×10^9 CFU/L。

MIC采用肉汤稀释法进行测定: 在96孔板上, 每孔加入100 μ L肉汤培养基, 第一列每孔加入100 μ L抗菌药物工作液, 然后进行倍比稀释, 稀释至第10列, 吸出100 μ L弃去, 质量浓度梯度为: 256、128、64、32、16、8、4、2、1、0.5 mg/L, 最后两列分别为阴性对照孔(仅含菌液)和空白对照孔(仅含培养基)。

按上述方法将各孔中抗菌药物工作液与菌液混合好后, 再将96孔板置于恒温培养箱中37 °C培养(18 \pm 2) h, 当阴性对照孔的细菌有足够生长(如明显的纽扣状生长或绝对的浊度), 未接种的空白对照孔没有生长, 同时阳性药物的MIC必须在规定的质控范围内(2~4 mg/L)时, 才可以读取微量稀释板的结果。每个孔中细菌生长的程度均应和阴性对照孔进行对比, 并且将能够明显抑制细菌生长的最小浓度认定为MIC。

1.3.2 驱肠虫活性测试

由于蚯蚓与机体肠道内蛔虫在解剖学和生理学特性上具有很高的相似度, 因此, 选取成年印度蚯蚓(*Pheretima posthuma*)来评估目标化合物的体外驱虫效果^[17-18]。将长度3~4 cm、宽度0.1~0.2 cm的蚯蚓用生理盐水清洗蚯蚓上泥土及排泄物, 目标化合物及阳性对照药阿苯达唑用最少量的DMSO溶解, 再用生理盐水稀释, 制得质量浓度为2 g/L的待测液, 将待测液置于灭菌平板中(直径6 cm), 阴性对照组平板中加入等量生理盐水。

将蚯蚓放入平板中(每组6只, 每个平板2只), 观察蚯蚓的活动情况, 并在1 h内记录各组蚯蚓的麻痹时间和死亡时间。当摇动蚯蚓没有观察到明显运动, 只有剧烈摇动才能观察到运动时, 记录该时间为麻痹时间。当剧烈摇动或将其浸入50 °C水中均没有观察到运动时, 记录该时间为死亡时间, 计算

各组的平均麻痹时间和平均死亡时间^[19-21]。

2 结果与讨论

2.1 化合物结构解析

本文通过9步反应合成12个目标化合物, 其结构均经¹H NMR、¹³C NMR、MS及IR确证。此处以化合物IXa为例, 进行结构解析。

氢谱中 δ 8.31处(d, 1H, $J=2.4$ Hz)为吡啶环上2位氢; δ 8.10处(t, 1H, $J=5.6$ Hz)为酰胺氮上的氢; δ 7.82处(dd, 1H, $J=9.2$ 和 2.4 Hz)为吡啶环上4位的氢; δ 6.90处(d, 1H, $J=9.2$ Hz)为吡啶环上5位的氢; δ 4.90~4.64处(m, 1H)为异噁唑啉环上CH的氢; δ 3.74~3.64和 δ 3.57~3.49处(m, 4H)为吗啡啉环上的两组CH₂上氢; δ 3.44~3.29和3.10~3.04处(m, 1H)为异噁唑啉环上CH₂的氢, 由于这两个氢分别处于环上和环下, 化学环境有所不同, 故出现两个峰; δ 3.25~3.21处(m, 2H)为与酰胺氮相连的CH₂上的氢; δ 1.82处(s, 3H)为CH₃上的氢。

碳谱中 δ 170.1处为羰基碳; δ 159.8~107.2处6个峰为吡啶环上碳和异噁唑啉环上双键碳; δ 79.3处为异噁唑啉环上CH的碳, δ 66.3和45.2处为吗啡啉环上两组CH₂上的碳; δ 42.3处为环外CH₂上的碳; δ 37.7处为异噁唑啉环上CH₂的碳; δ 23.0处为CH₃上的碳。

红外光谱中, 3390 cm^{-1} 处为酰胺N—H伸缩振动峰; 2905、2858 cm^{-1} 处为烷烃C—H伸缩振动峰; 1649 cm^{-1} 处为羰基伸缩振动峰; 1612 cm^{-1} 处为吡啶中C=N伸缩振动峰; 1504 cm^{-1} 处为C=C伸缩振动峰; 1548 cm^{-1} 处为酰胺N—H弯曲振动峰; 1381 cm^{-1} 处为烷烃C—H弯曲振动峰; 1112 cm^{-1} 处为C—O伸缩振动峰。

质谱测得化合物IXa分子离子峰为305.2, 与目标化合物相对分子质量吻合, 综合以上分析说明, 已成功制备了化合物IXa, 其余化合物均按同样方法鉴定。

2.2 目标化合物的抗菌活性

将所合成的12个目标化合物分别在金黄色葡萄球菌ATCC25923、肺炎链球菌ATCC49619和粪肠球菌ATCC29212上采用肉汤稀释法进行最小抑菌浓度(MIC)的测试, 结果见表1。

从表1可以看出, 12个目标化合物对3种菌株均有作用效果, 对金黄色葡萄球菌ATCC25923的效果普遍略好于肺炎链球菌ATCC49619和粪肠球菌ATCC29212。其中, 化合物IXf和IXl的抗菌活性最佳, MIC分别为16、32和32 mg/L。构效关系可以

看出,在氨基侧链上无论引入脂肪基团(IXa~b、IXg~i和IXk)还是芳香基团(IXc~e和IXj),效果都没有明显改善,只有引入芳香环,并在芳香环对位有卤素取代基团时,活性才有所提高。这可能与药物与靶点作用时形成氢键的能力有关。目标化合物的抗菌效果均弱于阳性对照药。一方面由于所得化合物均为消旋体,并没有对异噁唑啉上的手性碳原子进行拆分,影响了化合物的抗菌效力;另一方面,本文将利奈唑胺中的噁唑烷酮结构替换为异噁唑啉,尽管都是五元杂环,但在分子柔韧度和氢键形成能力上还是存在差别,同样可能对抗菌效果造成影响。

表 1 目标化合物 MIC 测试(mg/L)
Table 1 MIC of target compounds(mg/L)

| | 金黄色葡萄球菌 ATCC25923 | 肺炎链球菌 ATCC49619 | 粪肠球菌 ATCC29212 |
|-----------|----------------------|--------------------|-------------------|
| IXa | 32 | 64 | 64 |
| IXb | 64 | 64 | 128 |
| IXc | 32 | 128 | 64 |
| IXd | 32 | 128 | 64 |
| IXe | 64 | 256 | 128 |
| IXf | 16 | 32 | 32 |
| IXg | 32 | 128 | 64 |
| IXh | 64 | 128 | 128 |
| IXi | 64 | 128 | 64 |
| IXj | 64 | 64 | 64 |
| IXk | 64 | 64 | 64 |
| IXl | 16 | 32 | 32 |
| linezolid | 2 | 4 | 4 |

2.3 目标化合物的驱虫活性

将所合成的 12 个目标化合物在成年印度蚯蚓上进行体外驱虫活性测试,结果见表 2。

表 2 目标化合物驱虫活性
Table 2 Anthelmintic activities of target compounds

| 编号 | 平均麻痹时间/min | 平均死亡时间/min |
|-------------|------------|------------|
| IXa | 4.6 ± 0.8 | 15.3 ± 2.2 |
| IXb | 5.3 ± 1.6 | 16.5 ± 1.5 |
| IXc | 8.2 ± 2.3 | 27.1 ± 4.2 |
| IXd | 11.3 ± 3.6 | 43.3 ± 3.8 |
| IXe | 14.6 ± 3.0 | 36.0 ± 3.8 |
| IXf | 13.5 ± 2.6 | 47.6 ± 5.8 |
| IXg | 7.6 ± 2.3 | 17.5 ± 1.5 |
| IXh | 3.8 ± 0.4 | 15.9 ± 3.3 |
| IXi | 10.2 ± 2.1 | 33.0 ± 2.8 |
| IXj | 8.7 ± 1.9 | 36.3 ± 3.6 |
| IXk | 9.6 ± 2.0 | 21.6 ± 3.2 |
| IXl | 9.9 ± 2.9 | 33.7 ± 3.6 |
| albendazole | 8.1 ± 1.7 | 30.5 ± 1.5 |

从表 2 中可以看出,所有化合物对蚯蚓的存活都有抑制作用。其中,化合物 IXa〔麻痹时间(4.6±0.8) min,死亡时间(15.3±2.2) min〕、IXb〔麻痹时间(5.3±1.6) min,死亡时间(16.5±1.5) min〕、IXg〔麻痹时间(7.6±2.3) min,死亡时间(17.5±1.5) min〕和 IXh〔麻痹时间(3.8±0.4) min,死亡时间(15.9±3.3) min〕的驱虫效果明显好于阳性对照药阿苯达唑〔麻痹时间(8.1±1.7) min,死亡时间(30.5±1.5) min〕,4 个化合物对蚯蚓的平均麻痹时间均在 8 min 以内,死亡时间均在 20 min 以内,化合物 IXd 和 IXf 的驱虫效果较差,平均麻痹时间均在 10 min 以上,平均死亡时间均在 40 min 以上。阳性药阿苯达唑在其氨基侧链处连有空间位阻小的甲酸甲酯侧链,从构效关系可以看出,在酰胺氨基侧链处引入空间位阻小的、具有柔性的脂肪侧链,如甲基(IXa)、环己基(IXb)、异丁基(IXg)及四氢呋喃-2-基(IXh)时,驱虫效果较好;引入空间位阻大的芳香取代基如吡啶-3-基(IXd)和 4-三氟甲基苯基(IXf)时,驱虫效果较差,表明该类化合物的作用方式可能与阿苯达唑类似,有开发成新型驱虫药物的潜力。

3 结论

本文设计并合成了 12 个结构新颖的吡啶联异噁唑啉类杂环衍生物,其结构均经 ¹HNMR、¹³CNMR、IR 和 MS 鉴定。所合成的化合物分别在金黄色葡萄球菌 ATCC25923、肺炎链球菌 ATCC49619 和粪肠球菌 ATCC29212 上进行体外抗菌活性测试。结果表明,所有化合物均有抑菌作用,其中侧链引入卤代芳环所得化合物 IXf 和 IXl 抗菌活性最佳(对金黄色葡萄球菌 MIC 均为 16 mg/L,对肺炎链球菌和粪肠球菌的 MIC 均为 32 mg/L)。对目标化合物进行了体外驱虫活性测试,结果显示,所有化合物均有驱虫效果,其中侧链引入空间位阻小的、具有一定柔性的脂肪基团化合物 IXa~b、IXg~h 活性最佳〔IXa 麻痹时间(4.6±0.8) min,死亡时间(15.3±2.2) min; IXb 麻痹时间(5.3±1.6) min,死亡时间(16.5±1.5) min; IXg 麻痹时间(7.6±2.3) min,死亡时间(17.5±1.5) min; IXh 麻痹时间(3.8±0.4) min,死亡时间(15.9±3.3) min〕,明显好于阳性对照药。上述结果为开发具有更高抗菌及驱虫活性的吡啶联异噁唑啉类化合物提供了初步依据,化合物活性的进一步优化及作用方式的确认等工作正在进行。该文为后续开发以吡啶联异噁唑啉为中心结构的抗菌及驱虫药物提供了实验依据。

参考文献:

- [1] Gilbert D N, Guidos R J, Boucher H W, *et al.* The 10 × '20 initiative: pursuing a global commitment to develop 10 new antibacterial drugs

- by 2020[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2010, 50(8): 1081-1083.
- [2] Katarzyna M, Izabela K, Marek K, *et al.* Recent development of potent analogues of oxazolidinone antibacterial agents[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2013, 21(3): 577-591.
- [3] Dhar D N, Sharma R L, Bansal G C. Gastro-intestinal nematodes in sheep in Kashmir[J]. *Veterinary Parasitology*, 1982, 11(2): 271-277.
- [4] Olson M E, O'Handley R M, Ralston B J, *et al.* Update on Cryptosporidium and Giardia infections in cattle[J]. *Trends in Parasitology*, 2004, 20(4): 185-191.
- [5] Shaw K J, Barbachyn M R. The oxazolidinones: past, present, and future[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2011, 1241(1): 48-70.
- [6] Kanafani Z A, Corey G R. Tedizolid (TR-701): a new oxazolidinone with enhanced potency[J]. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2012, 21(4): 515-522.
- [7] Boyer F E, Prasad J V N V, Choy A L, *et al.* Synthesis and SAR of novel conformationally-restricted oxazolidinones possessing Gram-positive and fastidious Gram-negative antibacterial activity. Part I: Substituted pyrazoles[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2007, 17(16): 4694-4698.
- [8] Komine T, Kojima A, Asahina Y, *et al.* Synthesis and structure activity relationship studies of highly potent novel oxazolidinone antibacterials[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2008, 51(20): 6558-6562.
- [9] Wang Dan (王丹), Xu Zhiqiang (许志强), Li Xinyi (李心怡), *et al.* Developments of linezolid and its derivatives[J]. *Journal of Liaoning University (Natural Sciences Edition) (辽宁大学学报自然科学版)*, 2017, 44(4): 333-336.
- [10] Yang Hongliang (杨洪亮), Xu Guoxing (徐国兴), Pei Yazhong (裴亚中). Synthesis, preliminary structure-activity relationships and biological evaluation of pyridinyl-4,5-2H-isoxazole derivatives as potent antitumor agents[J]. *Chemical Research in Chinese Universities (高等学校化学研究)*, 2017, 33(1): 61-69.
- [11] Yang Hongliang (杨洪亮), Xu Guoxing (徐国兴), Bao Meiying (宝梅英), *et al.* Design and synthesis of pyridinylisoxazoles and their anticancer activities[J]. *Chemical Journal of Chinese Universities (高等学校化学学报)*, 2015, 35(12): 2584-2592.
- [12] Hu Shengli (胡胜利), Zhang Hesheng (张合胜). A study on the synthesis of 6-chloro-3-pyridinecarboxaldehyde[J]. *Chemical Reagents (化学试剂)*, 2005, 27(6): 373-374.
- [13] Yapi A D, Desbois N, Chezal J M, *et al.* Design and preparation of aza-analogues of benzo[c]phenanthridine framework with cytotoxic and antiplasmodial activities[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2010, 45(7): 2854-2859.
- [14] Kamal A, Dastagiri D, Ramaiah M J, *et al.* Synthesis and apoptosis inducing ability of new anilino substituted pyrimidine sulfonamides as potential anticancer agents[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2011, 46(12): 5817-5824.
- [15] Hwang S H, Wagner K M, Morisseau C, *et al.* Synthesis and structure-activity relationship studies of urea-containing pyrazoles as dual inhibitors of cyclooxygenase-2 and soluble epoxide hydrolase[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2011, 54(8): 3037-3050.
- [16] Espinel S S. *Manual of clinical microbiology american society for microbiology[M]*. Washington, DC, USA: American Society for Microbiology, 1980.
- [17] Ayaz M, Junaid M, Subhan F, *et al.* Heavy metals analysis, phytochemical, phytotoxic and anthelmintic investigations of crude methanolic extract, subsequent fractions and crude saponins from Polygonum hydropiper L[J]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 14(1): 465-473.
- [18] Shruthi N, Poojary B, Kumar V, *et al.* Synthesis, molecular properties and evaluation of anthelmintic activity of new thiazolopyrimidine derivatives[J]. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2015, 7(6): 181-191.
- [19] Deb P K, Ghosh R, Das S, *et al.* In-vitro anthelmintic activity of Acorus calamus leaves[J]. *Asian Journal of Pharmaceutical & Clinical Reseach*, 2013, 6(3): 135-137.
- [20] Mondal P, Jana S, Balaji A, *et al.* Synthesis of some new isoxazoline derivatives of chalconised indoline 2-one as a potential analgesic, antibacterial and anthelmintic agents[J]. *Journal of Young Pharmacists*, 2012, 4(1): 38-41.
- [21] Das S S, Dey M, Ghosh A K. Determination of anthelmintic activity of the leaf and bark extract of Tamarindus indica Linn[J]. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2011, 73(1): 104-107.
- (上接第 474 页)
- [19] Xie X, Zhu D, Zhang W, *et al.* Microwave-assisted aqueous two-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography for simultaneous extraction and determination of four flavonoids in *Crotalaria sessiliflora*, L[J]. *Industrial Crops and Products*, 2017, 95: 632-642.
- [20] Gao T, Zhang M, Fang Z, *et al.* Optimization of microwave-assisted extraction of flavonoids from young barley leaves[J]. *International Agrophysics*, 2017, 31(1): 45-52.
- [21] Martins P F, Melo M M R D, Sarmiento P, *et al.* Supercritical fluid extraction of sterols from *Eichhornia crassipes* biomass using pure and modified carbon dioxide. Enhancement of stigmasterol yield and extract concentration[J]. *Journal of Supercritical Fluids*, 2016, 107: 441-449.
- [22] Zhang Xiujuan (张秀娟). Study on isolation, purification and antibacterial activity of antimicrobial compound from *Catalpa ovata* G. Don[D]. Jinan: Shandong Normal University (济南: 山东师范大学), 2009.
- [23] Rodríguez-Solana R, Salgado J M, Domínguez J M, *et al.* Estragole quantity optimization from fennel seeds by supercritical fluid extraction (carbon dioxide-methanol) using a Box-Behnken design. Characterization of fennel extracts[J]. *Industrial Crops and Products*, 2014, 60(1): 186-192.
- [24] Wefers D, Gmeiner B M, Tyl C E, *et al.* Characterization of diferuloylated pectic polysaccharides from quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd.)[J]. *Phytochemistry*, 2015, 116(1): 320-328.
- [25] Prasad R, Zainol M S B, Ahmad I, *et al.* Kinetics study of microwave assisted extraction of hypoglycemic active Compounds from *Ceriops Decandra* sp. leaves using ethanol: Comparison with the soxhlet extraction[J]. *Journal of Applied Sciences*, 2011, 11(13): 2364-2369.
- [26] Fa-Tao H E, Liu G P, Zhu F T, *et al.* Optimization hot water extraction process of polysaccharide from *Hericium erinaceus* for improving the yield of polysaccharide by response surface methodology[J]. *Food Science and Technology*, 2015, 1: 210-215.
- [27] Diao Wenchao (刁文超), Wang Ran (王然), Wang Fengwu (王凤舞), *et al.* Optimization of the extraction of pumpkin polysaccharides by combined ultrasonic treatment and multi-enzyme hydrolysis[J]. *Food Science (食品科学)*, 2012, 33(18): 14-20.
- [28] Liu Dayu (刘达玉), Zuo Yong (左勇). Study on extraction of dietary fiber from potato dregs by enzymatic hydrolysis[J]. *Science and Technology of Food Industry (食品工业科技)*, 2005, 26(5): 90-92.
- [29] Wei Xianya (韦献雅), Yin Liqin (殷丽琴), Zhong Chen (钟成), *et al.* Advances in the DPPH radical scavenging assay for antioxidant activity evaluation[J]. *Food Science (食品科学)*, 2014, 35(9): 317-322.
- [30] Madl T, Sterk H, Mittelbach M, *et al.* Tandem mass spectrometric analysis of a complex triterpene saponin mixture of *Chenopodium quinoa*[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2006, 17(6): 795-806.
- [31] Chen Yanhui (陈燕绘), Zhou Yan (周岩), Chen Yadong (陈亚东), *et al.* Advances in alfalfa saponin research[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences (河南农业科学)*, 2015, 44 (7): 11-16.