

· 实验研究 ·

四氮唑类化合物的合成及体外抑菌活性研究

崔军军 刘文陆 傅 磊[△]

(上海交通大学药学院 上海 200240)

摘要 目的 利用点击化学反应合成四氮唑类化合物,寻找温和的反应条件。对合成的四氮唑类化合物进行体外抑菌活性研究,以期发现抑菌活性化合物并初步研究其构效关系。方法 以氰基类化合物和叠氮钠为原料,溴化锌为催化剂,通过点击化学反应合成一类四氮唑结构化合物并研究其合成工艺条件的优化。利用微量二倍稀释法对合成的四氮唑类化合物进行体外抑菌活性测试。结果 利用所得到的优化点击化学反应条件合成了 11 个四氮唑类化合物,并发现化合物 2h 具有广谱抑菌活性。结论 优化后的点击化学反应条件温和,后处理方便,产率较高。抑菌活性和构效关系研究为后续的四氮唑类化合物抑菌活性研究工作提供了一定的基础。

关键词 四氮唑;合成;点击化学;抑菌活性;构效关系

中图分类号 R914.5 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)18-3478-05

Synthesis and Antibacterial Activity in Vitro of Tetrazoles

CUI Jun-jun, LIU Wen-lu, FU Lei[△]

(School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200240, China)

ABSTRACT Objective: Synthesis of tetrazoles by click chemistry reaction and modify the reaction conditions. Investigating the antibacterial activity of tetrazoles in vitro. **Methods:** Tetrazoles was prepared from nitriles and sodium azide as materials and catalyzed by ZnBr₂; The in vitro antibacterial activities of the synthesized tetrazoles was presented using the doubling dilution method and the SAR was studied. **Results:** A mild, convenient Click reaction method was found and 11 tetrazole compounds were produced under this method. Through an in vitro antibacterial assay, the compound 2h has a broad range of antibacterial activity. **Conclusion:** The optimized click chemistry reaction conditions are mild, convenient and high yield. The result of primary antibacterial investigation and the SAR analysis provides some basic contribution for the following study of tetrazole compound's antibacterial activity.

Key words: Tetrazole; Synthesis; Click Chemistry; Antibacterial activity; Structure activity relationship

Chinese Library Classification (CLC): R914.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)18-3478-05

前言

近二十年来,四氮唑类化合物因其独特的结构和生物活性在医学药学,材料科学等领域倍受关注^[1,2],例如 1,5 位取代的四氮唑类化合物是合成抗菌素的常用中间体。最早的四氮唑合成方法是以叠氮酸(HN₃)作为原料引入叠氮基团^[3],但是叠氮酸具有沸点低,毒性大,易爆炸等诸多受限因素,现已放弃使用。在随后的传统合成方法中,四氮唑类化合物由三甲基叠氮硅烷在 DMF 溶剂中以氯化铵或者四丁基氯化铵作为催化剂进行合成^[4-8],这种方法会产生易升华的易爆物质叠氮胺(NH₄N)^[9],且反应的原料三甲基叠氮硅烷在一定条件下会在反应过程中产生大量的叠氮化合物,影响反应的进行及后处理,也不符合绿色化学所提倡的安全,高效理念。

2001 年 K. Berry Sharpless 提出了点击化学(Click Chemistry)的概念。点击化学反应(Click Chemistry Reaction)很快就

被应用于三氮唑,四氮唑类化合物的合成。与传统合成方法相比,点击化学具有多个显而易见的优点,例如:原料简单易得;反应操作简单,条件温和,对氧、水不敏感;产物收率高、立体选择性好;快速、高通量模块化合成;产物后处理简单方便等,因此得到了广泛的关注^[12-14]。

点击化学反应通常是在水或者 DMF^[18]等溶剂中,以 Cu⁰^[15-17]作催化剂,将叠氮类化合物和炔基类化合物快速结合得到三氮唑类化合物。但是,应用上述方法以叠氮基类化合物和氰基类化合物为原料进行四氮唑类化合物的合成时,反应并不理想^[10,11]。2001 年, Zachary P. Demko 利用上述原料,采用溴化锌作为催化剂,以纯水为溶剂,在加热的条件下很好的得到了四氮唑类化合物^[9]。此方法相比传统的四氮唑合成方法极大的提高了反应效率(一步反应即可完成),简化了后处理过程。遗憾的是此方法要求的反应温度较高(140-170℃)。此温度下,反应的原料之一叠氮钠在高温和剧烈震动的时候容易产生爆炸,所以存在较大的操作危险性,并且不利于扩大生产。

为了寻找更为温和的反应温度,我们尝试优化上述反应条件。以合成一系列四氮唑母核结构的化合物为目标,通过比较分析不同的溴化锌当量,不同的反应温度,以及不同的反应溶剂配比对反应产率的影响,寻找最优的反应条件。反应的通式如图 1 所示:

作者简介 崔军军(1985),男,硕士研究生,电话:(021) 34204789
[△]通讯作者 傅磊(1965),男,博士,教授,博士生导师,主要从事药物化学研究。电话:(021) 34204791,E-mail:leifu@sjtu.edu.cn
(收稿日期:2011-12-25 接受日期:2012-01-22)

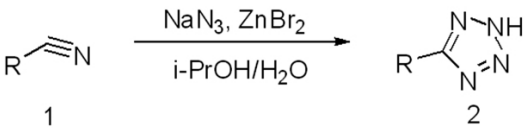


图 1 四氮唑的合成通式
Fig.1 General synthesis route of tetrazoles

1 材料与方法

1.1 培养基

以肉汤培养基做为细菌培养基,酵母膏胨葡萄糖 (YPD) 琼脂培养基作为真菌培养基。

1.2 四氮唑类化合物 (2a-2k) 的合成 (General Procedure)

将 1.0 mmol 的原料, 溴化锌 (2.0 mmol), 叠氮钠 (2.0 mmol) 及 10 mL 的水, 异丙醇的混合溶剂 (1:8) 加入 25 mL 的圆底烧瓶中, 65 °C 下剧烈搅拌反应, TLC 检测反应过程。反应结束后, 向体系中加入 3 N 的盐酸调节 pH 值到 2。乙酸乙酯萃取三次, 有机相合并, 减压蒸干。残余物中加入 0.25 N 的氢氧化钠溶液, 剧烈搅拌 30 min, 直到全部溶解, 并形成氢氧化锌沉淀。减压过滤, 滤渣用氢氧化钠溶液冲洗数次并合并在滤液中。向滤液中滴加 3 N 的盐酸, 调节 pH 值为 2, 同时剧烈搅拌, 大量白色沉淀析出。减压过滤, 滤饼用 3 N 的盐酸清洗, 水洗, 干燥得到四氮唑产物。

1.3 抑菌活性测定实验方法^[20] :

采用微量二倍稀释法标准药理试验操作方法进行。

参照麦氏比浊法, 菌液用无菌水稀释到与 0.5 McFarland (相当于 1× 10⁸ cfu/mL 的菌近似浓度) 的饱和硫酸钡溶液相同的吸光度后备用。细菌在 625 nm 下测定吸光度, 真菌在 570

nm 下测定吸光度。

将四氮唑类化合物溶于 DMSO 中, 配成浓度为 4 mg/mL 的溶液。向 96 孔板的第二列每孔加入 10 μL, 设两个复孔。再取上述备用菌液, 用无菌的液体培养基稀释 10000 倍, 使菌浓达到 1× 10⁴ cfu/mL 左右。向 96 孔板的第二列到第十二列每孔加入培养基稀释后的菌液 100 μL。另取 100 μL 的稀释后菌液加入 96 孔板的第二列每孔中, 反复吹打多次后, 吸取 100 μL 移入相应的第三列每孔中吹打。这样, 第三列每孔中药物的浓度被稀释为第二列每孔中药物浓度的二分之一。重复这个过程之十一列, 从第十一列中移出的 100 μL 弃用。则从第二列到第十一列药物浓度分别为 200 μg/mL, 100 μg/mL, 50 μg/mL, 25 μg/mL, 12.5 μg/mL, 6.25 μg/mL, 3.13 μg/mL, 1.56 μg/mL, 0.78 μg/mL, 0.39 μg/mL。在 96 孔板的第一列加入无菌的培养基 100 μL, 与有 100 μL 稀释后菌液的第十二列作为对照。96 孔板置于 37 °C (真菌为 28 °C) 隔水式恒温培养箱中培养, 细菌需 24 h 以上, 而真菌要 48 h 以上。当板上第十二列每孔中菌有明显生长试验才有意义。最小抑制浓度 (MIC) 是抑制细菌或者真菌生长的最小浓度。在微量 2 倍稀释法中, 以肉眼观察, 药物最低浓度管无细菌生长者, 即为受试菌的最小抑菌浓度。

2 结果

2.1 点击化学反应条件的优化

在本研究所合成的四氮唑类化合物中, 选取 5- 苯基四氮唑详细探讨合成条件对反应时间的要求和反应产率的影响, 其中溴化锌选择不同当量 0.5, 1, 2, 温度选择 45 °C, 65 °C, 85 °C, 105 °C。结果如表 1 所示:

表 1 5- 苯基四氮唑合成, 各反应因素对反应时间的要求和反应产率的影响

Table 1 The effect of different reaction factors' on the reaction time and yield of the synthesis of 5-phenyl tetrazole

No.	Temp. (°C)	ZnBr ₂ (N)	Time (h)	Yield (%)
1	45	0.5	30	21%
2	65	0.5	24	23%
3	85	0.5	20	25%
4	105	0.5	15	30%
5	45	1	22	51%
6	65	1	18	68%
7	85	1	12	73%
8	105	1	10	80%
9	45	2	19	56%
10	65	2	12	91%
11	85	2	9	97%
12	105	2	8	98%

注 表中时间(Time)为反应完成时间, 产率 (Yield)为最终产率;

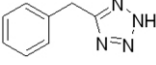
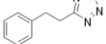
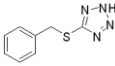
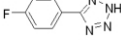
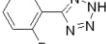
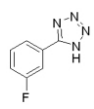
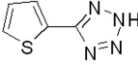
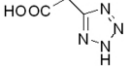
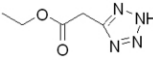
Note: 'Time' and 'Yield' in Table 1 were calculated after reaction.

溴化锌的当量 N>2 时, 没有明显的降低反应时间 (Time) 和提高反应产率 (Yield) 的实验结果, 所以本表并未列出。

2.2 四氮唑类化合物的合成

表 2 四氮唑类化合物的合成

Table 2 The synthesis of a series of tetrazole compound

No.	Tetrazole	Temp. (°C)	Time (h)	Yield (%)
2a		65	12	91%
2b		65	12	94%
2c		65	18	92%
2d		65	12	87%
2e		65	24	42%
2f		65	24	46%
2g		65	24	57%
2h		65	12	21%
2i		65	8	83%
2j		65	12	84%
2k		65	24	20%

在实验过程中发现化合物 2k 的产率偏低。为提高化合物 2k 产率,我们首先尝试纯水作为溶剂,反应时间延长至 24h,在不同的溴化锌当量下,都只得到了很少的产物 (trace) 。之后尝

试在溶剂中加入异丙醇,反应产率明显提高。为进一步提高产率,我们继续尝试对溶剂的配比进行优化,得到的结果如表 3 所示：

表 3 反应溶剂配比变化对化合物 2k 产率的影响

Table 3 The effect of different solvent ratio on the yield of compound 2k

No.	i-PrOH/H ₂ O	Time (h)	Yield (%)
1	H ₂ O	24	Trace
2	1:20	24	Trace
3	1:8	24	20%
4	1:1	24	25%
5	i-PrOH	24	22%

异丙醇 冰其他配比 (如 1:3, 1:5, 1:7) 等条件下,产率与表中配比条件并没有明显变化,因此没有列出。

2.3 生物活性测试结果

对于合成的四氮唑类化合物,我们初步探索了其在革兰氏阳性菌,阴性菌以及真菌等菌株中的体外抑菌活性研究。

选取革兰氏阴性菌大肠杆菌 (*E.Coli*) ,绿脓杆菌 (*P.A*) 和革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌 (*S.AV*) ,耐药的金色葡萄球菌

(*MRSA*) 和枯草芽孢杆菌 (*B.S*) 以及真菌白色念珠菌 (*C.albican*) 做为抑菌活性实验菌株。选取抗菌药物头孢拉啶 (*Cephadrine*) ,头孢他啶 (*Ceftazidime*) ,头孢噻肟钠 (*Claforan*) ,青霉素钠 (*Penicillin*) ,制菌霉素 (*Mycostatin*) 作为阳性对照物。实验方法采用微量二倍稀释法标准操作步骤。实验结果如表 4 所示：

表 4 所合成的四氮唑类化合物体外抑菌活性

Table 4 The in vitro antibacterial activity of synthesized tetrazole compounds

Comp.	MIC (μg/mL)					
	B.S	E.Coli	P.A	SAV	MRSA	C.albicans
2a	>200	>200	>200	>200	>200	>200
2b	>200	>200	>200	>200	>200	>200
2c	>200		>200			>200
2d	>200	>200	>200	>200	>200	>200
2e	>200	>200	>200	>200	>200	>200
2f	>200	>200	>200	>200	>200	>200
2g	100	>200	>200	>200	100	>200
2h	25	100	100	25	6.25	>200
2i	>200	>200	>200	>200	>200	>200
2j	>200	>200	>200	>200	>200	>200
2k	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Cephadrine	50	25	-	>200	>200	-
Ceftazidime	6.25	>200	-	0.78	12.5	-
Claforan	0.78	>200	-	3.12	3.12	-
Penicillin	-	-	-	3.12	3.12	-
Mycostatin	-	-	-	-	-	-

Note: "-" No related experiments.

3 讨论

3.1 合成部分

本实验以寻找温和的点击化学反应条件为研究目的,考察了溴化锌的当量,反应温度以及溶剂配比三个因素对反应时间的要求和反应产率的影响。并利用优化的反应条件合成了一系列的四氮唑类化合物。具体实验结果如表 1 表 2,表 3 所示。

由表 1 可知 :当使用相同溴化锌当量时,随着反应温度升高,反应时间缩短,反应产率升高(例如 表 1 中 5,6,7,8,相同溴化锌当量(N=1),反应温度为 45℃,65℃,85℃,105℃,相应的反应时间为 22 h,18 h,12 h,10 h;反应产率为 51%,68%,73%,80%)。在相同反应温度下,随着溴化锌当量增大,反应时间缩短,产率升高(例如:表 1 中 2,6,10,相同的反应温度(65℃),溴化锌的当量为 0.5,1,2,相应的反应时间为 24 h,18 h,12 h,反应产率为 23%,74%,91%)。

同时我们注意到反应温度在 45℃时,相比较其他温度条件产率偏低。当反应温度达到 65℃时,产率明显提高,并接近最高产率(例如 表 1 中 10,11,反应温度分别为 65℃,85℃,反应产率分别为 91%,97%)。因此我们认为 65℃是获得理想产率的最低温度。

当溴化锌的当量为 2 时,85℃和 105℃温度条件下,反应所需时间接近(9h,8h),在 65℃条件下反应时间为 12 h。虽然 65℃反应时间长于 85℃和 105℃,但其低温条件更加符合我们寻找温和反应条件的研究目的。

在实验的过程中发现化合物 2k 的产率偏低,我们尝试优

化溶剂配比,结果如表 3 所示。

综合各因素对反应时间和反应产率的影响,我们最终确定溴化锌当量为 2,反应温度为 65℃,异丙醇/水为 1/8 的溶剂体系作为最佳反应条件。利用此反应条件,我们合成了一系列四氮唑类化合物。结果如表 2 所示。

在表 2 中,化合物 2d,2e,2f 的产率较低且反应时间较长,与化合物 2a,2b,2c 相比,其分子中在苯环上增加了一个氟原子。由此,我们推测氟原子的存在会在该条件下降低反应产率。

3.2 体外抑菌活性部分

我们对合成的四氮唑类化合物进行了初步的体外抑菌活性研究,测试结果如表 4 所示。初步的抑菌活性实验结果显示,化合物 2h 对于革兰氏阳性菌耐药的金黄色葡萄球菌的抑制活性(MIC 6.25 μg/mL) 优于阳性对照物头孢他啶(MIC 12.5 μg/mL)。同时对于其他革兰氏阳性菌,阴性菌也具有广谱的抑菌活性(枯草芽孢杆菌 MIC 25μg/mL,大肠杆菌 MIC 100 μg/mL,绿脓杆菌 MIC 100 μg/mL,金黄色葡萄球菌 MIC 25 μg/mL),但是对于真菌没有抑制作用(MIC>200 μg/mL)。实验结果显示 2a-2g 及 2i 均没有抑菌活性。从分子结构分析,2a-2g 和 2i 上均连有芳香结构,而 2h 上连接的是吡啶环,因此我们推测 2h 中吡啶环可能是保持抑菌活性的一个关键结构部位。将吡啶环换成其他的含 N 原子的五元,六元芳香杂环(如吡咯,吡咯,噻吩等)或苯并含氮杂环类(如喹啉,吲哚等)做进一步结构优化和活性测试。目前这部分研究工作正在进行中。

参考文献(References)

[1] R. Jason Herr. 5-Substituted-1H-tetrazoles as Carboxylic Acid Isosteres:

- Medicinal Chemistry and Synthetic Methods [J]. Bioorg. Med. Chem, 2002, 10: 3379-3393
- [2] L. V. Myznikov, A. Hrabalek, G. I. Koldobskii. Drugs in the tetrazole series [J]. Chem. Heterocycl. Compd, 2007, 43(1): 1-9
- [3] Bernhard Gutmann, Jean-Paul Roduit, Dominique Roberge, et al. Synthesis of 5-Substituted 1H-Tetrazoles from Nitriles and Hydrazoic Acid by Using a Safe and Scalable High-Temperature Microreactor Approach [J]. Angew. Chem. Int. Ed, 2010, 49: 7101-7105
- [4] Mathias Alterman, Anders Hallberg. Fast Microwave-Assisted Preparation of Aryl and Vinyl Nitriles and the Corresponding Tetrazoles from Organo-halides [J]. J. Org. Chem, 2000, 65: 7984-7989
- [5] Blaise W. LeBlanc, Branko S. Jursic. Preparation of 5-Alkylthio and 5-Arylthiotetrazoles from Thiocyanates Using Phase Transfer Catalysis [J]. Synth. Commun, 1998, 28(19): 3591-3599
- [6] William G. Finnegan, Ronald A. Henry, Robert Lofquist. An Improved Synthesis of 5-Substituted Tetrazoles [J]. J. Am. Chem. Soc, 1958, 80: 3908-3911
- [7] Mats Larhed, Anders Hallberg. Microwave-Promoted Palladium-Catalyzed Coupling Reactions [J]. J. Org. Chem, 1996, 61: 9582-9584
- [8] Eugene Lieber, Takashi Enkoji. Synthesis and Properties of 5-(Substituted) Mercaptotetrazoles [J]. J. Org. Chem, 1961, 26: 4472-4479
- [9] Valentina Aureggi, Gottfried Sedelmeier. 1,3-Dipolar Cycloaddition: Click Chemistry for the Synthesis of 5-Substituted Tetrazoles from Organoaluminum Azide and Nitriles [J]. Angew. Chem. Int. Ed, 2007, 46: 8440-8444
- [10] Zachary P. Demko, K. Barry Sharpless. A Click Chemistry Approach to Tetrazoles by Huisgen 1,3-Dipolar Cycloaddition: Synthesis of 5-Sulfonyl Tetrazole from Azide and Sulfonyl Cyanides [J]. Angew. Chem. Int. Ed, 2002, 41: 2110-2113
- [11] Fernando Blanco, Ibon Alkorta, Jose Elguero. A theoretical study of the effect of copper (I) chloride on the azido/tetrazole isomerism [J]. Tetrahedron, 2011, 67: 8724-8730
- [12] Hartmuth C. Kolb, K. Barry Sharpless. The growing impact of click chemistry on drug discovery [J]. DDT, 2003, 8(24): 1128-1137
- [13] Hartmuth C. Kolb, M. G. Finn, K. Barry Sharpless. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions [J]. Angew. Chem. Int. Ed, 2001, 40(11): 2004-2021
- [14] Jean-Francois Lutz. 1,3-Dipolar Cycloadditions of Azide and Alkynes: A Universal Ligation Tool in Polymer and Materials Science [J]. Angew. Chem. Int. Ed, 2007, 46(7): 1018-1025
- [15] Victoria D. Bock, Henk Hiemstra, Jan H. Van Maarseveen. CuI-Catalyzed Alkyne-Azide "Click" Cycloadditions from a Mechanistic and Synthetic Perspective [J]. Eur. J. Chem, 2006: 51-68
- [16] Vsevolod V. Rostovtsev, Luck G. Green, Valery V. Fokin, et al. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective 'ligation' of azides and terminal alkynes [J]. Angew. Chem. Int. Ed, 2002, 41: 2596-2599
- [17] Christian W. Tornøe, Caspar Christensen, Morten Meldal. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of terminal Alkynes to Azide [J]. J. Org. Chem, 2002, 67: 3057-3064
- [18] Lutz Ackermann, Harish K. Potukuchi, Dirk Landsberg, et al. Copper-Catalyzed "Click" Reaction/Direct Arylation Sequence: Modular Syntheses of 1,2,3-Triazoles [J]. Organic Letters, 10(14): 3081-3084
- [19] Zachary P. Demko, K. Barry Sharpless. Preparation of 5-Substituted 1H-Tetrazoles from Nitriles in water [J]. J. Org. Chem, 2001, 66: 7945-7950
- [20] National Committee for Clinical Laboratory standard. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 5th ed. Approved standard, M7-A6. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards [C]. 2003

(上接第 3463 页)

- [14] 曾晓珊,戴良英,刘雄伦,等. 籼稻成熟胚遗传转化体系影响因素的优化[J]. 江西农业学报, 2007, 19(8): 1-3
Zeng Xiao-shan, Dai Liang-ying, Liu Xiong-lun, et al. Optimization of transformation mediated by agrobacterium tumefaciens in indica rice[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2007, 19(8): 1-3
- [15] 易自力,严钦泉,邓启云,等. 几种水稻籼型恢复系和不育系离体培养和遗传转化的研究[J]. 湖南大学学报. 自然科学版, 2002, 29(1): 1-7
Yi Zi-li, Yan Qin-quan, Deng Qi-yun, et al. Studies on in vitro culture and genetic transformation of several indica restorer lines and sterile line[J]. Journal of Hunan University(Natural Science), 2002, 29(1): 1-7
- [16] 刘巧泉, 张景六, 王宗阳, 等. 根癌农杆菌介导的水稻高效转化系统的建立 [J]. 植物生理学报, 1998, 24(3): 259-271
Liu Qiao-quan, Zhang Jing-liu, Wang Zong-yang, et al. A highly efficient transformation system mediated by agrobacterium tumefaciens in rice[J]. Acta Photophysiological Sinica, 1998, 24(3): 259-271