

· 药物化学 ·

新型三唑类抗真菌药物的合成及其抑菌活性研究

庞涛¹, 吴茂诚², 王潇屹³ (1. 第二军医大学附属长征医院药学部, 上海 200003; 2. 第二军医大学药学院有机化学教研室, 上海 200433; 3. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

[摘要] 目的 设计合成新的三唑类化合物, 并对其体外抑菌活性研究。方法 以1,3-二氟苯为原料, 运用Click反应合成一系列目标化合物; 用微量液体稀释法检测目标化合物, 测定其体外抗真菌活性。结果 合成了12个目标化合物; 所有化合物对所选真菌均表现出一定的抑菌活性。结论 取代基的电子效应对化合物活性有影响, 供电子基团比吸电子基团对活性提高更有利。

[关键词] 三唑; Click反应; 抗真菌活性

[中图分类号] R914.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2013)05-0373-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2013.05.016

Synthesis and antifungal activities of new triazole compounds

PANG Tao¹, WU Mao-cheng², WANG Xiao-yi³ (1. Department of pharmacy, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Organic Chemistry, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

[Abstract] **Objective** To design and synthesis novel triazole antifungal derivatives and study the antifungal activity. **Methods** All the target compounds were prepared from 1,3-difluorobenzene via click reaction; The antibacterial activities of the title compounds were determined with broth dilution method. **Results** Twelve compounds were synthesized and characterized by 1H NMR and MS. All the title compounds exhibited potent antifungal activities against nearly all fungi tested. **Conclusion** The electronic effects of the substituents affected the activity of compounds, specifically the electron-donating groups.

[Key words] triazole; click reaction; antifungal activity

当今社会,随着广谱抗生素、免疫抑制剂的大量应用,器官移植和创伤性诊疗措施的广泛开展,深部真菌感染的发病率和病死率呈显著上升趋势,防治工作已成为重要的临床课题^[1]。三唑类药物是临床应用最为广泛的一类新型抗真菌药物,如氟康唑、酮康唑和沃立康唑等,但也由于此类抗真菌药物在各类患者中的长期大量使用,使得真菌的耐药性问题日益突出,因此设计合成新的抗真菌药物已成为研究中的热点,尤其是氟康唑衍生物的合成。氟康唑的体内抗真菌活性好,但是耐药性比较严重^[2]。推测可能是其结构中两侧的1,2,4-三氮唑亲水性比较强。本合成根据氮唑类化合物的抗真菌作用机制及前期构效关系研究结果,以氟康唑为先导化合物,保留氟康唑的3个药效团^[3,4]:三唑环、叔醇羟基和2,4-二氟苯基结构,将其一端的1,2,4-三氮唑换成

1,2,3-三氮唑,同时引入疏水基团,以增加脂溶性,调节脂水分配系数,以期能够提高抗真菌活性,改善耐药性。本课题设计的合成路线如下:间二氟苯1与氯乙酰氯经傅-克反应制得 ω -氯代-2,4-二氟苯乙酮²^[5],然后在甲苯中与1-氢-1,2,4-三唑反应生成2,4-二氟-2-(1-氢-1,2,4-三唑-1-基)苯乙酮³^[6],3与溴丙炔在锌粉的催化下发生加成反应生成中间体5-(1-氢-1,2,4-三唑-1-基)-4-(2,4-二氟苯基)戊炔-2-醇⁴,最后通过Click反应^[7,8]环合得到目标化合物。具体路线如图1所示。

1 仪器和试剂

Yamato model MP-21型熔点测定仪(温度未经校正),Broker Spectrospin AC-P 300型核磁共振仪(CDC13为溶剂,TMS为内标),Agilent 1100系列液相色谱联用仪,Heidolph LABOROTA 4000(旋转蒸发仪),三用紫外分析仪SHB-III A,循环水式多用真空泵ZF78(上海豫康科教仪器设备有限公司)。薄层色谱硅胶板和柱层析硅胶(烟台江友公司),所有

[基金项目] 上海市重点学科资助项目(B906);上海科委基金资助项目(09dZ1976700);全军特殊环境重点研究实验室资助项目。

[作者简介] 庞涛(1984-),男,主管药师,本科。Tel:(021)65492766, E-mail:394370168@qq.com。

试剂均为市售分析纯或化学纯。

2 合成实验

2.1 2-氯-2',4'-二氟苯乙酮(2)的制备 将无水间二氟苯(30 g, 1.30 mol)和三氯化铝(40 g, 1.49 mol)置于三颈瓶中,室温下慢慢滴加氯乙酰氯(30

g, 1.30 mol),室温搅拌 30 min,升温至 45 °C,继续搅拌 4.5 h,将反应液倒入 500 ml 冰水中,析出固体,过滤,滤液用二氯甲烷 100 ml × 2 萃取,合并有机相,水洗至中性,无水硫酸钠干燥,真空浓缩得白色固体 42 g,收率 87.0%, mp: 46 ~ 48 °C。

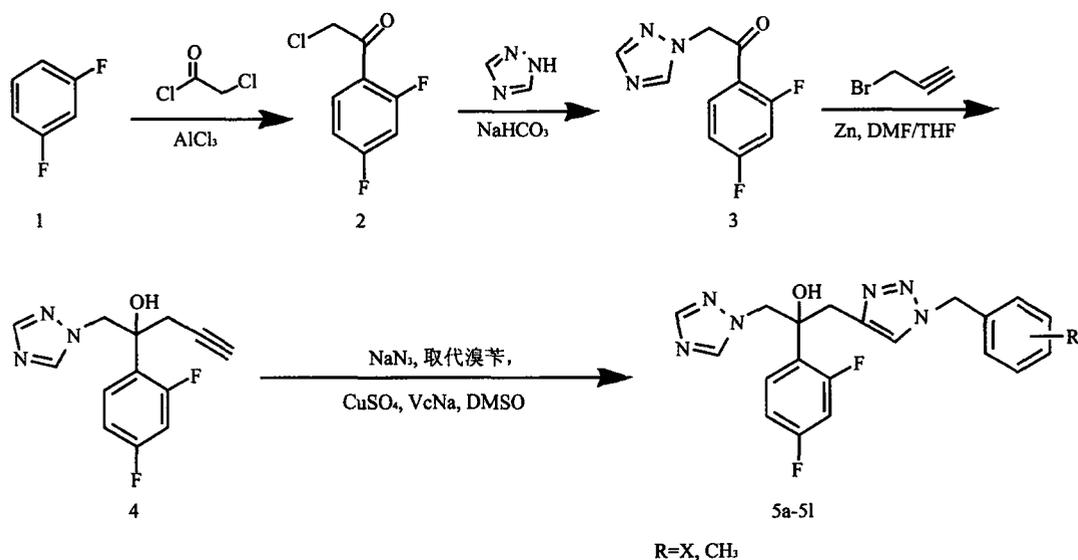


图1 目标化合物的合成路线

2.2 2-(1H-1,2,4-三唑-1-基)-2',4'-二氟苯乙酮(3)的制备 将三氮唑 27 g(0.20 mol)、TEBA 0.80 g,无水碳酸钾 41 g(0.15 mol)加入 400 ml 二氯甲烷中得悬浮液。将 2-氯-2',4'-二氟苯乙酮 38 g(0.20 mol),溶于二氯甲烷 50 ml 中,冰浴下滴入上述悬浮液中,0 ~ 5 °C 下反应 5 h 后,常温下继续反应 24 h。过滤,收集滤液,用水 100 ml × 3 萃取,有机相用无水硫酸钠干燥,真空浓缩。将残留物溶于乙酸乙酯 100 ml 中,搅拌下滴加浓硝酸,至黄色固体不再析出为止;过滤,滤饼用少量乙酸乙酯洗 3 次,干燥,再溶于 100 ml 水,用 30% 的氢氧化钠水溶液调 pH 至 9,析出固体,过滤,干燥得粗品,用正己烷:乙酸乙酯(V/V)1:1 重结晶,得化合物 35 g,收率 40%, mp: 104 ~ 105 °C。

2.3 5-(1H-1,2,4-三唑-1-基)-4-(2,4-二氟苯基)-戊炔-2-醇(4)的制备 将 2-(1H-1,2,4-三唑-1-基)-2',4'-二氟苯乙酮 5 g(22.40 mmol)加入 20 ml *N,N*-二甲基甲酰胺:四氢呋喃混合液(V/V)1:1 中,再加入溴丙炔 5.33 g(44.80 mmol),室温下搅拌溶解^[8]。再分批加入 4.36 g(66.70 mmol) 锌粉。搅拌 2 ~ 5 min 后反应液沸腾,待反应液停止沸腾后升高反应温度至 60 °C,搅拌 7 h。将反应液倒入 4 M

盐酸 100 ml 中,乙酸乙酯 50 ml × 3 萃取,有机层用水萃取至 pH 约为 7,有机层用无水硫酸钠干燥,真空浓缩得产物 4 g,收率 67.9%。

2.4 1-(1H-1,2,4-三唑-1-基)-2-(2,4-二氟苯基)-3-[1-(2-氟苯基)-1H-1,2,3-三唑-4-基]-2-醇(5a) 将叠氮化钠 200 mg(2.80 mmol)、邻氟溴苄 400 mg(2.40 mmol)溶于二甲亚砜 30 ml 中,室温搅拌 6 h。然后加入 5-(1H-1,2,4-三唑-1-基)-4-(2,4-二氟苯基)-戊炔-2-醇 400 mg(1.52 mmol)、抗坏血酸钠 40 mg、五水硫酸铜 50 mg、水 2 ml,室温反应 6 h。将反应液倒入稀氨水中,乙酸乙酯 60 ml × 2 萃取,有机相用饱和食盐水萃取 2 次,并无水硫酸钠干燥,柱层析后得产物 510 mg,为固体粉末,收率 63.5%。所有 12 个目标化合物 5a ~ 5l 均参照此法制备。

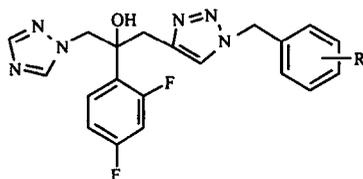
合成的 12 个目标化合物的理化常数及波谱数据见表 1。

3 药理实验

参照美国国家临床实验室标准委员会(NCCLS)提出的标准化抗真菌敏感性实验方法测试了化合物的体外抑菌活性^[9]。所有目标化合物对 8 种人体致病菌(*C. alb.* SC5314, *C. alb.* Y0109, *C. neo.*, *C.*

par., *C. tro.*, *T. rub.*, *C. kef.*, *A. fum.*) 的体外抑菌活 (ICZ), 酮康唑 (KCZ), 两性霉素 B 和氟康唑性测试结果如表 2 所示。阳性对照药为伊曲康唑 (FCZ)。

表 1 目标化合物结构、熔点和波谱数据



化合物	R	mp(°C)	MS(M + H) ⁺	¹ H NMR(300 MHz, CDCl ₃)
5a	2-F	61.0 ~ 62.3	415.15	8.04(1H, s, triazole-H), 7.87(1H, s, triazole-H), 7.38 ~ 7.57(1H, m, triazole-H), 6.76 ~ 7.29(7H, m, Ar-H), 5.41(2H, s, CH ₂ -Ar), 4.65 ~ 4.77(2H, dd, J = 14.1 Hz, triazole-CH ₂), 3.08 ~ 3.49(2H, dd, J = 14.7 Hz, triazole-CH ₂);
5b	3-F	65.5 ~ 67.6	415.15	8.15(1H, s, triazole-H), 7.82(1H, s, triazole-H), 7.26 ~ 7.36(1H, m, triazole-H), 6.66 ~ 7.34(7H, m, Ar-H), 5.41(2H, s, CH ₂ -Ar), 4.57 ~ 4.78(2H, dd, J = 14.1 Hz, triazole-CH ₂), 3.08 ~ 3.50(2H, dd, J = 15.0 Hz, triazole-CH ₂);
5c	4-F	85.1 ~ 87.2	415.15	8.14(1H, s, triazole-H), 7.84(1H, s, triazole-H), 7.27 ~ 7.38(1H, m, triazole-H), 6.65 ~ 7.38(7H, m, Ar-H), 5.28(2H, s, CH ₂ -Ar), 4.56 ~ 4.72(2H, dd, J = 14.1 Hz, triazole-CH ₂), 3.08 ~ 3.48(2H, dd, J = 15.0 Hz, triazole-CH ₂);
5d	2-Cl	113.8 ~ 115.1	431.12	8.16(1H, s, triazole-H), 7.80(1H, s, triazole-H), 7.27 ~ 7.41(1H, m, triazole-H), 6.64 ~ 7.41(7H, m, Ar-H), 5.53(2H, s, CH ₂ -Ar), 4.57 ~ 4.72(2H, dd, J = 14.4 Hz, triazole-CH ₂), 3.08 ~ 3.51(2H, dd, J = 14.7 Hz, triazole-CH ₂);
5e	3-Cl	94.3 ~ 97.8	431.12	8.14(1H, s, triazole-H), 7.78(1H, s, triazole-H), 7.21 ~ 7.37(1H, m, triazole-H), 6.64 ~ 7.37(7H, m, Ar-H), 5.37(2H, s, CH ₂ -Ar), 4.56 ~ 4.73(2H, dd, J = 14.1 Hz, triazole-CH ₂), 3.09 ~ 3.49(2H, dd, J = 14.7 Hz, triazole-CH ₂);
5f	4-Cl	95.3 ~ 97.8	431.12	8.14(1H, s, triazole-H), 7.81(1H, s, triazole-H), 7.27 ~ 7.39(1H, m, triazole-H), 6.66 ~ 7.39(7H, m, Ar-H), 5.57 ~ 5.38(2H, d, CH ₂ -Ar), 4.55 ~ 4.73(2H, dd, J = 14.4 Hz, triazole-CH ₂), 3.08 ~ 3.49(2H, dd, J = 14.7 Hz, triazole-CH ₂);
5g	2-Br	107.2 ~ 109.6	475.07	8.16(1H, s, triazole-H), 7.81(1H, s, triazole-H), 7.57 ~ 7.60(1H, m, triazole-H), 6.65 ~ 7.37(7H, m, Ar-H), 5.52 ~ 5.53(2H, d, CH ₂ -Ar), 4.57 ~ 4.72(2H, dd, J = 14.1 Hz, triazole-CH ₂), 3.08 ~ 3.52(2H, dd, J = 15.0 Hz, triazole-CH ₂);
5h	3-Br	82.8 ~ 84.6	475.07	8.12(1H, s, triazole-H), 7.75(1H, s, triazole-H), 7.41 ~ 7.44(1H, m, triazole-H), 6.61 ~ 7.44(7H, m, Ar-H), 5.34(2H, s, CH ₂ -Ar), 4.55 ~ 4.72(2H, dd, J = 14.1 Hz, triazole-CH ₂), 3.09 ~ 3.48(2H, dd, J = 15.0 Hz, triazole-CH ₂);
5i	4-Br	111.5 ~ 112.7	475.07	8.16(1H, s, triazole-H), 7.83(1H, s, triazole-H), 7.46 ~ 7.48(1H, m, triazole-H), 6.68 ~ 7.48(7H, m, Ar-H), 5.38 ~ 5.39(2H, d, CH ₂ -Ar), 4.57 ~ 4.75(2H, dd, J = 14.1 Hz, triazole-CH ₂), 3.10 ~ 3.50(2H, dd, J = 14.7 Hz, triazole-CH ₂);
5j	2-CH ₃	102.4 ~ 104.1	433.16	8.16(1H, s, triazole-H), 7.78(1H, s, triazole-H), 7.24 ~ 7.37(1H, m, triazole-H), 6.62 ~ 7.37(7H, m, Ar-H), 5.33 ~ 5.40(2H, m, CH ₂ -Ar), 4.56 ~ 4.70(2H, dd, J = 14.1 Hz, triazole-CH ₂), 3.05 ~ 3.47(2H, dd, J = 14.7 Hz, triazole-CH ₂), 2.07(3H, s, CH ₃);
5k	3-CH ₃	87.5 ~ 88.7	433.16	8.15(1H, s, triazole-H), 7.78(1H, s, triazole-H), 7.32 ~ 7.77(1H, m, triazole-H), 6.63 ~ 7.32(7H, m, Ar-H), 5.36(2H, s, CH ₂ -Ar), 4.56 ~ 4.72(2H, dd, J = 14.1 Hz, triazole-CH ₂), 3.08 ~ 3.48(2H, dd, J = 15.0 Hz, triazole-CH ₂), 2.30(3H, s, CH ₃);
5l	4-CH ₃	83.5 ~ 85.6	433.16	8.15(1H, s, triazole-H), 7.80(1H, s, triazole-H), 7.27 ~ 7.36(1H, m, triazole-H), 6.64 ~ 7.14(7H, m, Ar-H), 5.36(2H, s, CH ₂ -Ar), 4.56 ~ 4.72(2H, dd, J = 14.1 Hz, triazole-CH ₂), 3.06 ~ 3.47(2H, dd, J = 15.0 Hz, triazole-CH ₂), 2.35(3H, s, CH ₃);

取无菌 96 孔板,于每排 1 号孔加 RPMI1640 培养液 100 μl 作空白对照;3 ~ 12 号孔各加新鲜配制的菌液 100 μl;2 号孔分别加菌液 180 μl 和受试化合物溶液 20 μl;2 ~ 11 号孔 10 级倍比稀释,使各孔中的药液

浓度分别为 63、32、16、8、2、1、0.5、0.25、0.125 mg/L,各孔中的二甲亚砜含量均低于 1%;12 号孔不含药物,作阳性对照。各药敏板于 35 °C 培养。

念珠菌、新型隐球菌及丝状菌分别于 35 °C 培养

24、72 h 和一周后,用酶标分析仪与 630 nm 测各孔 OD 值。与阳性对照孔比,以 OD 值下降 80% 以上的最低浓度孔中的药物浓度为 MIC₈₀ (真菌生长 80% 被抑制时的浓度)。

表 2 目标化合物的体外抗真菌活性

化合物	MIC ^a (μg/ml)								
	R	<i>C. alb</i> Y0109	<i>C. alb</i> SC5314	<i>C. par</i>	<i>C. tro</i>	<i>C. kef</i>	<i>C. neo</i>	<i>T. nru</i>	<i>A. fum</i>
5a	2-F	<0.125	0.25	0.25	<0.125	0.25	<0.125	2	>64
5b	3-F	<0.125	<0.125	1	0.25	0.5	0.25	1	>64
5c	4-F	<0.125	<0.125	0.5	0.25	0.5	<0.125	0.5	>64
5d	2-Cl	<0.125	<0.125	0.25	0.25	0.25	<0.125	1	>64
5e	3-Cl	<0.125	<0.125	0.25	0.25	0.25	<0.125	0.5	64
5f	4-Cl	<0.125	<0.125	0.5	0.5	0.5	<0.125	4	>64
5g	2-Br	<0.125	<0.125	0.5	0.5	<0.125	<0.125	4	>64
5h	3-Br	<0.125	<0.125	0.25	0.25	0.25	<0.125	0.25	64
5i	4-Br	0.25	0.25	0.5	1	32	0.25	16	>64
5j	2-CH ₃	<0.125	<0.125	0.5	0.5	0.25	<0.125	4	>64
5k	3-CH ₃	0.25	0.25	0.25	<0.125	<0.125	<0.125	1	>64
5l	4-CH ₃	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	0.25	<0.125	1	>64
ICZ	-	0.062 5	0.062 5	0.062 5	0.062 5	0.062 5	0.062 5	0.062 5	0.062 5
TBF	-	0.25	4	0.25	0.062 5	0.062 5	0.25	0.015 6	0.015 6
KCZ	-	0.003 9	0.015 6	0.003 9	0.003 9	0.000 97	0.015 6	0.015 6	0.015 6
AMB	-	0.25	0.25	0.25	1	0.25	1	4	1
VCZ	-	0.003 9	0.003 9	0.003 9	0.003 9	0.003 9	0.003 9	0.015 6	0.015 6
FCZ	-	0.25	0.25	0.25	1	4	1	1	>64

注:缩写: *C. alb*-念珠菌; *C. par*-假丝酵母菌; *C. tro*-热带假丝酵母菌; *C. kef*-乳酒假丝酵母菌; *C. neo*-新型隐球菌; *T. nru*-红色毛癣菌; *A. fum*-曲霉菌; ICZ-伊曲康唑; TBF-特比萘芬; KCZ-酮康唑; VCZ-伏立康唑; AMB-两性霉素 B; FCZ-氟康唑

¹⁾ 生长抑制率为 80% 时的最小抑制浓度。

4 结果与讨论

从检测中发现,所有 12 个目标化合物对白念珠菌(Y0109,SC5314)的抑制活性明显优于对照药物特比萘芬、两性霉素 B 和氟康唑,化合物 5j,5l 的抑菌活性明显优于其他化合物。其中化合物 5j 体外对克柔念珠菌的抑制活性远好于特比萘芬和伊曲康唑,且与沃立康唑相当。化合物 5l 体外对白念珠菌(SC5314)和克柔念珠菌的抑制活性远好于氟康唑和两性霉素 B,且与酮康唑和沃立康唑相当。

这表明在侧链引入带有不同苯基取代的 1,2,3-三唑基团对增强三唑类化合物的抑菌活性是有利的,从苯基上取代基的电子效应来看,供电子的甲基取代的化合物其抑制活性要比吸电子的卤素取代的化合物的活性要强。推测可能是由于结合的氨基酸是缺电子的,供电子基团能更好的结合。由于化合物数量有限,该类化合物抗真菌活性与侧链取代基之间的构效关系还有待进一步研究。

【参考文献】

- [1] 熊建琼,邓朝霞,张雷,等. 伊曲康唑在多器官功能障碍综合征患者侵袭性真菌感染中的应用[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(11):1260.

- [2] Kontoyiannis DP, Sagar N, Hirschi KD, et al. Overexpression of Erg11p by the regulatable GAL1 promoter confers fluconazole resistance in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(11): 2798.
- [3] 季海涛,张万年,周有骏. 抗真菌药物作用靶点羊毛甾醇 14 α -去甲基化酶研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 1999, 26(2):108.
- [4] Phempel M. Experiences, recognitions and questions in azole antimycotics[J]. Jpn J Med Mycol, 1982, 23(1): 17.
- [5] Jiang Y, Zhang J, Cao Y, et al. Synthesis, *in vitro* evaluation and molecular docking studies of new triazole derivatives as antifungal agents[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2011, 21(15): 4471.
- [6] Chai X, Zhang J, Cao Y, et al. Design, synthesis and molecular docking studies of novel triazole as antifungal agent[J]. Eur J Med Chem, 2011, 46(7): 3167.
- [7] Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB, et al. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions[J]. Angew Chem Int Ed, 2001, 40(11): 2004.
- [8] Pore VS, Aher NG, Kumar M, et al. Design and synthesis of fluconazole-bile acid conjugate using click reaction[J]. Tetrahedron 2006, 62: 11178.
- [9] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts approved standard[S]. Document M27-A2, Wayne, PA, 2002.

【收稿日期】2013-03-12

【修回日期】2013-04-28