

# 三氮唑并嘧啶修饰的苯并唑类衍生物的合成、抗菌活性评价及分子对接研究

Synthesis, evaluation of antibacterial activity and molecular docking of benzazole derivatives modified by triazole and pyrimidine

商梦帅 张宇萌 张弘 胡鑫洋 崔朋雷 (通讯作者)

Shang Mengshuai, Zhang Yumeng, Zhang Hong, Hu Xinyang, Cui Penglei (corresponding author)

(河北农业大学理学院 河北保定 071000)

(College of Science, Agricultural University of HebeiBaoding Hebei 071000)

**摘要:** 1,2,4-三氮唑与 4-乙酰乙酸乙酯在冰醋酸中回流反应得到三氮唑并嘧啶中间体, 进一步和三氯氧磷、芳香胺及苯并噻/噁唑硫醇反应得到一系列三氮唑并嘧啶修饰的苯并唑类衍生物, 通过色谱方法对目标产物进行纯化并利用核磁共振及碳谱等进行结构表征。测试了新合成的化合物对解淀粉芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的抑制活性, 结果显示化合物 8d 与 8h 具有很强的抑菌活性, 它们对枯草芽孢杆菌的抑制活性与对照诺氟沙星相当 (MIC 为 25mg/L)。分子对接研究显示 8h 与细菌体内的 SecA 蛋白可以通过 SER374 等有效键合, 对接在 ATP 附近的活性区域。

**Abstract:** 1,2,4-triazole with 4-ethyl acetate in glacial acetic acid reflux reaction to triazole and pyrimidine intermediate, further and trichloroxy phosphorus, aromatic amine and benzothi/ oxazole thiol reaction to get a series of triazole and pyrimidine modified benzazole derivatives, by chromatography method to the target product purification and using nuclear magnetic hydrogen spectroscopy and carbon spectrum for structural characterization. The inhibitory activity of newly synthesized compounds against *B. amyloqueens*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* was tested and showed that compounds 8d and 8h were comparable to *B. subtilis* compared to control norfloxacin (MIC of 25 mg/L). Molecular docking studies showed that 8h and SecA protein in bacteria can be effectively bonded by SER374 to dock the active region near ATP.

**关键词:** 三氮唑并嘧啶; 苯并噻唑; 苯并噁唑; 抗菌活性; 分子对接

中图分类号: R91

**Key words:** triazazole and pyrimidine; benzothiazole; benzoxazole; antibacterial activity; molecular docking

## 0 引言

随着抗生素的广泛使用甚至滥用, 越来越多的细菌逐渐对抗菌药物产生耐药性, 尤其在临床治疗中由耐药菌株的感染导致的病死率大幅增加, 其治疗已成为临床上的难题。中国细菌耐药性监测报告显示, 在医院临床治疗中耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 与耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌 (MRCNS) 最近十多年都有很高的检出率。细菌耐药性被世界卫生组织 (WHO) 看作是 21 世纪最大的公共卫生安全问题之一, 引起了广泛关注<sup>[1-4]</sup>。

为了有效应对当前的细菌耐药性问题, 除了合理用药外最有效的方法是基于新靶点设计新型更加有效的抗菌药物。含氮原子的杂环化合物 (如三氮唑及吡啶等) 具有多种的生物活性, 在药物设计中越来越受到人们的关注。Gundla 等合成了嘧啶药效团修饰的三氮唑类衍生物, 生物活性测试显示这类化合物对金黄色葡萄球菌和肺炎克雷伯菌具有很强的抑制活性<sup>[5]</sup>。Badwaik 等制备了三氮唑修饰的吡啶衍生物, 评估了新合成的衍生物对三种革兰氏阴性菌 (大肠杆菌、铜绿假单胞菌和不动杆菌)、三种革兰氏阳性菌 (金黄色葡萄球菌、化脓性链球菌和粪肠球菌) 和两种真菌 (棒状曲霉和白色念珠菌) 的体外抗菌活性。在所有合成的衍生物中, 3-(5-(2-溴苄硫基)-4H-1,2,4-三唑-3-基) 吡啶和 3-(5-(2,4-二溴苄硫基)-4H-1,4-三氮唑-3-基) 吡啶显示出最强的抗菌活性<sup>[6]</sup>。Raj Luxmi 等利用点击化学合成了 15 个萘基连接的二取代 1,2,3-三氮唑类化合物, 这类化合物具有通过 1-(丙-2-炔-1-基氧基) 萘和芳香族叠氮化物之间的反应得到。新合成的化合物的结构通过 FTIR、<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 和 HRMS 等技术方法进行表征。进一步通过 X 射线晶体学确认了典型化合物的结构。评价了合成的化合物对芽孢杆菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌活性。结果显示这些新合成的 1,2,3-三唑的衍生物对测试菌株显示出中等至良好的抗菌活性<sup>[7]</sup>。Narasimha Rao Bandaru 等将富含氮原子的吡啶并吡啶和三氮唑设计到一个分子中, 合成了一些三氮唑修饰的吡啶并吡啶类衍生物, 测试了这些化合物对金黄色葡萄球菌和肺炎克雷伯菌的抑菌活性, 其中有些化合物对这两个菌的抑菌圈直径可达到 15 ± 0.82mm 与 14 ± 0.7 mm, 对它们表现出很强的抑制活性, 进一步测试这些化合物对两个菌的 MIC 值, 最低可达到 0.25 和 0.5mg/L<sup>[8]</sup>。Zhe Zhang 等通过点击反应在温和条件下合成了一系列具有 1,2,3-三唑药效团的新衍生物。利用肉汤稀释法测试了这些化合物在体外对 4 种菌株的抗菌活性, 包括金黄色葡萄球菌 (MRSA ATCC 43300, ATCC 29213,

AD 3, 和 144) 和 1 株大肠杆菌 (ATCC 25922)。大多数合成衍生物对 MRSA 表现出有效的抗菌活性 (MIC = 0.125-2 μg/mL)。还发现大多数化合物在 8 μg/mL 的浓度下对 RAW264.7 细胞的增殖没有明显的抑制作用。在这些衍生物中, 有的化合物 (含有二甲胺基侧链的化合物) 在降低感染小鼠的 MRSA 方面显示出比替米林更有效。另外, 在小鼠全身模型中, 有的化合物 (存活率为 50%) 也显示出优于头孢氨苄的体内功效 (存活率为 20%)。结构-活性关系 (SAR) 研究表明, 该化合物具有最强的体外和体内抗菌活性<sup>[9]</sup>。

综上所述三氮唑与嘧啶药效团具有良好的抗菌活性, 我们通过药效团亚结构拼接的原理, 将三氮唑并嘧啶与苯并噻/噁唑设计到一个分子中, 合成了一系列新型的三氮唑并嘧啶衍生物, 通过核磁共振与碳谱等表征产物的结构, 测试了化合物抗菌活性, 为了解释抑菌作用机制, 通过分子对接的方法进一步研究了化合物与细菌体内 SecA 蛋白的键合作用情况<sup>[10-11]</sup>。

表 1 实验中用的仪器

实验仪器	生产厂家
集热式恒温加热磁力搅拌器	保定市高新区阳光科技仪器厂
旋转蒸发器	海南省予华仪器有限公司
超声波清洗器	必能得超声 (上海) 有限公司
电热恒温鼓风干燥器	上海飞跃实验仪器有限公司
循环水式多用真空泵	郑州长城科工贸有限公司
电子天平	上海佑科仪器仪表有限公司
恒温油浴锅	河南予华仪器有限公司
Bruker ACF-300 型核磁共振仪 (TMS 为内标)	德国布鲁克公司
紫外分析仪	海门市麒麟医用仪器厂

## 1 实验

### 1.1 实验仪器

见表 1。

### 1.2 实验试剂

见表 2。

### 1.3 体外抗菌活性

利用平板涂布法测试了新合成的化合物 8a-8h 的抑菌活性(表 3), 测试的菌株包括: 解淀粉芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌, 诺氟沙星作为对照。结果表明, 合成的化合物具有中等到较强的抗菌活性, 其中化合物 8a 和 8b 对测试菌株抑制活性较差, 二者抑制解淀粉芽孢杆菌的 MIC 值都大于 100mg/L, 抑制金黄色葡萄球菌及枯草芽孢杆菌的 MIC 值都是 100mg/L。化合物 8c 抑制解淀粉芽孢杆菌及金黄色葡萄球菌的 MIC 值为 100mg/L, 而抑制枯草芽孢杆菌 MIC 值为 50mg/L, 抑菌活性有了明显的提高。化合物 8d 抑制解淀粉芽孢杆菌及金黄色葡萄球菌的 MIC 值为 50mg/L, 抑制枯草芽孢杆菌 MIC 值为 25mg/L, 具有最强的抑菌活性。化合物 8e 和 8f 的抑菌活性不高, 抑制解淀粉芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和抑制枯草芽孢杆菌 MIC 值接近甚至高于 100mg/L, 化合物 8g 则对金黄色葡萄球菌和抑制枯草芽孢杆菌表现出较高的抑制活性, 抑制二者的 MIC 值为 50mg/L, 但是对解淀粉芽孢杆菌具有较差的抑制作用。化合物 8h 对测试菌株有很强的抑制活性, 抑制枯草芽孢杆菌的 MIC 值为 50mg/L, 抑制

表 2 实验中用到的试剂及药品

实验试剂	规格	生产厂家
3-氨基-1,2,4-三氮唑	分析纯	上海安耐吉化学试剂有限公司
4-氯乙酰乙酸乙酯	分析纯	天津市光复科技发展有限公司
冰醋酸	分析纯	萨恩化学技术(上海)有限公司
三氯氧磷 (POCl <sub>3</sub> )	分析纯	天津市风船化学试剂科技有限公司
氯仿	分析纯	萨恩化学技术(上海)有限公司
4-(氯甲基)苯甲酰氯	分析纯	天津市科密欧化学试剂有限公司
碳酸钾	分析纯	天津市科密欧化学试剂有限公司
无水硫酸钠	分析纯	萨恩化学技术(上海)有限公司
苯胺	分析纯	天津市科密欧化学试剂有限公司
2-氯苯胺	分析纯	天津市科密欧化学试剂有限公司
异丙醇	分析纯	上海安耐吉化学试剂有限公司
乙腈	分析纯	天津市科密欧化学试剂有限公司
氢氧化钠	分析纯	天津市科密欧化学试剂有限公司
乙酸乙酯	分析纯	上海安耐吉化学试剂有限公司
甲醇	分析纯	天津市科密欧化学试剂有限公司

表 3 化合物 8a-8h 的抑菌活性 (MIC, mg/L)

X	R	解淀粉芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌
8a	S H	>100	100	100
8b	S 2-CH <sub>3</sub>	>100	100	100
8c	S 2-Cl	100	100	50
8d	S 2,4-Cl <sub>2</sub>	50	50	25
8e	O H	>100	>100	100
8f	O 2-CH <sub>3</sub>	>100	100	>100
8g	O 2-Cl	100	50	50
8h	O 2,4-Cl <sub>2</sub>	50	25	25
诺氟沙星		25	25	25

解淀粉芽孢杆菌的 MIC 值为 25mg/L, 可见对枯草芽孢杆菌与金黄色葡萄球菌的抑制作用和对照品(诺氟沙星)相当。分析构效关系发现, 化合物 8 中引入氯原子(如 8d 和 8h)有助于提高抗菌活性。

#### 1.4 分子对接研究

SecA 蛋白在细菌体内发挥着重要作用, 为蛋白跨膜转运提供能量, 是抗菌药物研究的新靶点<sup>[9-10]</sup>, 为了阐明新化合物的抗菌作用机制, 利用 Autodock 软件将化合物 8h 与 SecA 蛋白晶体做了分子对接研究, 并利用 Pymol 进行可视化处理(图 1), 结果显示化合物 8h(紫色)能够在 SecA 的活性结构区域(ATP 附近)与 SecA 有效结合, 产生较强的作用力, 比如可以和 SER374 产生氢键作用。化合物 8h 可能会对 ATP 与 SecA 结合产生较强的干扰作用, 使得 ATP 不能正常水解为蛋白跨膜转运提供能量而产生抗菌作用。

#### 2 结论

将具有多样生物活性的三氮唑并嘧啶与苯并唑类药效团整合

到一个分子中, 合成了一系列含有上述两种药效团的化合物 8a-8h, 测试了新化合物的抗菌活性, 发现化合物 8d 抑制枯草芽孢杆菌以及 8h 抑制金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的 MIC 值与对照品(诺氟沙星)相当, 说明这些化合物和对照品对这些菌株具有相近的抗菌活性。化合物 8h 和 SecA 蛋白可以通过氢键等进行有效键合, 结合在 SecA 的活性结构区域(ATP 附近)。说明该类化合物可以通过抑制细菌体内的新靶点 SecA 产生抗菌作用, 值得后续进一步研究。

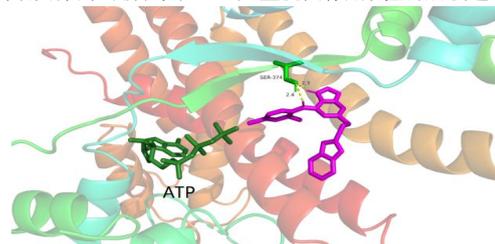


图 1 化合物 8h(紫色)与 SecA 对接图

参考文献:

- [1]Varela, M. F., Stephen, J., Lekshmi, M. Bacterial resistance to antimicrobial agents[J]. *Antibiotics*, 2021(10): 593-615.
  - [2]CHINET 中国细菌耐药监测结果(2021 年).
  - [3]Kumarasamy, K.K., Toleman, M.A., Walsh, T.R. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2010(10): 597-602.
  - [4]Arias, C.A., Murray, B.E. Antibiotic-resistant bugs in the 21st century -a clinical super-challenge[J]. *New England Journal of Medicine*, 2009(360): 439-443.
  - [5]Bandaru, N.R., Makam, P., Akshinthala, P. Molecular hybrids of pyrazolo[3,4-b]pyridine and triazole: design, synthesis and in vitro antibacterial studies[J]. *Molecules*, 2022(27): 7647-7661.
  - [6]Ahirwar, J., Ahirwar, D., Lanjhiyana, S. Synthesis, characterization, molecular modeling, and biological evaluation of 1,2,4-Triazole-pyridine hybrids as potential antimicrobial agents[J]. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 2018(55): 2598-2609.
  - [7]Chander, P. K., Raj, L. Synthesis, antibacterial, and antioxidant activities of naphthyl-linked disubstituted 1,2,3-triazoles[J]. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 2020(57): 2400-2409.
  - [8]Bandaru, N.R., Makam, P., Akshinthala, P., Katari, N.K., Banoth, V., Kollu, B., Gundla, R. Molecular Hybrids of Pyrazolo[3,4-b]pyridine and Triazole: Design, Synthesis and In Vitro Antibacterial Studies. *Molecules*, 2022(27): 7647-7660.
  - [9]Zhang, Z., Li, K., Zhang, G.-Y., Tang, Y.-Z., Jin, Z. Design, synthesis and biological activities of novel pleuromutilin derivatives with a substituted triazole moiety as potent antibacterial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2020(204): 112604-112618.
  - [10]Cui, P., Li, X., Zhu, M. Design, synthesis and antimicrobial activities of thiouracil derivatives containing triazolo-thiadiazole as SecA inhibitors[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2017(127): 159-165.
  - [11]Cui, P., Li, X., Zhu, M. Design, synthesis and antibacterial activities of thiouracil derivatives containing acyl thiourea as SecA inhibitors[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2017(27): 2234-2237.
- 基金项目: 河北省自然科学基金项目: 靶向 SecA 的几类硫脲嘧啶衍生物的设计、合成及抗菌活性评价(B2019204032); 河北农业大学自主培养人才科研项目: 几种硫脲嘧啶类新型抗菌剂的合成及活性评价(PY201812); 河北农业大学创新创业训练计划项目: 靶向 SecA 的硫脲嘧啶类抗菌剂的合成及抗菌活性评价(2023059)。