

文章编号:1674-2869(2019)05-0435-05

# 新杂合抗结核药物的合成及抗菌活性

祝宏<sup>1</sup>,曾祥聪<sup>1</sup>,丁娇<sup>1</sup>,李丽<sup>1</sup>,马俊<sup>2</sup>,张焕<sup>1</sup>,刘慧<sup>\*1</sup>

1. 武汉工程大学化工与制药学院,湖北 武汉 430205;

2. 武汉市金银潭医院,湖北 武汉 430023

**摘要:**为满足临床对抗结核药物的需求,对临床一线抗结核药物异烟肼、乙胺丁醇和广谱抗生素乙酰水杨酸进行杂合,合成了新的杂合药物乙酰水杨酸异烟肼和乙酰水杨酸乙胺丁醇,以期达到多靶点给药和减缓细菌耐药速率的目的。其结构用红外光谱(IR)、高分辨质谱(HRMS-ESI)、核磁共振氢谱(<sup>1</sup>H NMR)进行物理化学表征,并利用生物活性实验对目标产物进行活性测定。表征结果表明:所得产物为目标杂合药物,有一定的抑菌活性。

**关键词:**乙酰水杨酸;异烟肼;乙胺丁醇;抗结核药物;抑菌活性

中图分类号:O626 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1674-2869.2019.05.005

## Synthesis and Antibacterial Activity of New Hybrid Anti-Tuberculosis Drugs

ZHU Hong<sup>1</sup>, ZENG Xiangcong<sup>1</sup>, DING Jiao<sup>1</sup>, LI Li<sup>1</sup>, MA Jun<sup>2</sup>, ZHANG Huan<sup>1</sup>, LIU Hui<sup>\*1</sup>

1. School of Chemical Engineering and Pharmacy, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430205;

2. Wuhan Jinyintan Hospital, Wuhan 430023, China

**Abstract:** To meet the needs of clinical anti-tuberculosis drugs, we adopted three clinical first-line anti-tuberculosis drugs, isoniazid, ethambutol and broad-spectrum antibiotic acetylsalicylic acid to synthesize a new hybrid drug acetyl chloride, namely, isonic acid isoniazid and acetylsalicylate ethambutol. It is expected to achieve multi-target administration and slow the rate of bacterial resistance. The structure of the prepared product was characterized by infrared spectroscopy, high resolution mass spectrometry, nuclear magnetic resonance spectroscopy, and the activity of it was determined by biological experiments. The results show that the obtained product is the target hybrid drug with antibacterial activity.

**Keywords:** acetylsalicylic acid; isoniazid; ethambutol; tuberculosis; antituberculosis drugs

结核病是一种传染性强、难治愈、发病率、致死率高的疾病,而中国是感染人群最多且死亡率较高的国家<sup>[1]</sup>。结核杆菌是结核病的病原体,可攻击人的组织及器官,近年来药物的使用频繁,导致耐药结核杆菌及耐多药结核杆菌的产生<sup>[2]</sup>,为满足临床的需求,需要采取措施来预防和抗结核药物的创新。在新药研究与开发上,杂合物越来越受重视,对其的研究和开发也越来越多,通过化学反应将不同的连接基团的两个分子连接起来合成杂合药物,形成的药物或具有两者的性质。分子

中的两类药物的药效部位各自与不同的靶标结合,多靶点给药,减缓耐药性速率<sup>[3]</sup>;强化药理作用,减弱相应的毒副作用;或发挥各自的药理活性,协同完成治疗效用<sup>[4]</sup>,发挥药物的最大药效,降低药物的耐药率,延迟耐药的周期。

水杨酸类药物是应用最早,最广和最普通解热镇痛药,Ratnasinghe等<sup>[5]</sup>在调查研究中发现,服用阿司匹林可以降低肺癌的死亡率。异烟肼是一种全能杀菌药,乙胺丁醇是人工合成的一种阿拉伯糖类抗结核药,两者均用于临床是治疗结核病

收稿日期:2019-02-18

\*通讯作者:刘慧,博士,副教授。E-mail: 403901352@qq.com

作者简介:祝宏,教授,硕士研究生导师。E-mail: z13871447010@163.com

引文格式:祝宏,曾祥聪,丁娇,等.新杂合抗结核药物的合成及抗菌活性[J].武汉工程大学学报,2019,41(5):435-439.

的重要一线药物,具有杀菌力强、选择性高、副作用少的优点。杂合反应在药物合成中有着广泛的应用,在杂合药物的制备过程中,酰化反应在治疗结核病领域有着重要作用。通过成酯、成酰胺等修饰可以改变原来药物的理化性质、降低毒副作用、改善药物的体内代谢、提高疗效等来减弱药物的耐药性<sup>[6-8]</sup>。在蛋白质中酰胺键是关键的化学键,也是合成其他高分子材料的基础结构,具有极性大、稳定性好和结构多样性等性质,成为有机化学分支中最普遍和应用最广的官能团之一,但很多简单的酰胺其实是很难合成的<sup>[9-11]</sup>。根据以上分子设计原理,本文合成了两种抗结核类衍生物(见图1),这类化合物的抗结核杆菌研究还是较新的领域,有巨大潜在的研究意义。

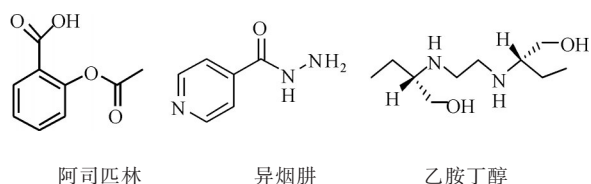


图1 乙酰水杨酸、异烟肼和乙胺丁醇的化学结构

Fig. 1 Structures of acetylsalicylic acid, isoniazid and ethambutol

乙酰水杨直接与异烟肼及乙胺丁醇反应活性很低,产物的收率也很低,需要对反应过程进行改进。根据乙酰水杨酸的化学结构上有裸露的羧

基,碳原子部分会显正电性,羧酸是弱的酰化基,在反应过程中需要加入催化剂使羧酸形成活性中间体,增强反应活性。异烟肼分子结构中的肼基,有比较强的亲核能力,容易进行酸胺缩合反应。乙酰水杨酸和异烟肼进行酸胺缩合反应,在反应的过程加入二环己基碳二亚胺,与乙酰水杨酸形成活性酰胺,发生亲核取代反应得到目标产物。实验过程加入催化量的催化剂p-二甲氨基吡啶<sup>[12]</sup>和DCC上有孤对电子进攻羰基C,获得氢后离去得酰胺产物9;进攻羟基氢生成过渡态,经质子作用脱水,再脱去质子得到酰化产物13(见图2和图3)。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器的厂家

异烟肼(天津市博迪化工有限公司);乙胺丁醇(宜昌人福药业有限责任公司);其余反应所用的试剂均为分析纯,并按要求进行纯化处理。

DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌; AB204-N 型电子天平; ZF 7 三用紫外分析仪; 旋转蒸发器 RE-52C; Mercury Plus 400 超导核磁共振仪; Nicolet5700 型傅里叶红外光谱仪, KBr 压片; UltiMate3000 戴安高效液相色谱仪; Thermo Trace GC ULTRA DSQ II 型气质联用仪; Agilent 6460 LC/MS 液质联用仪。

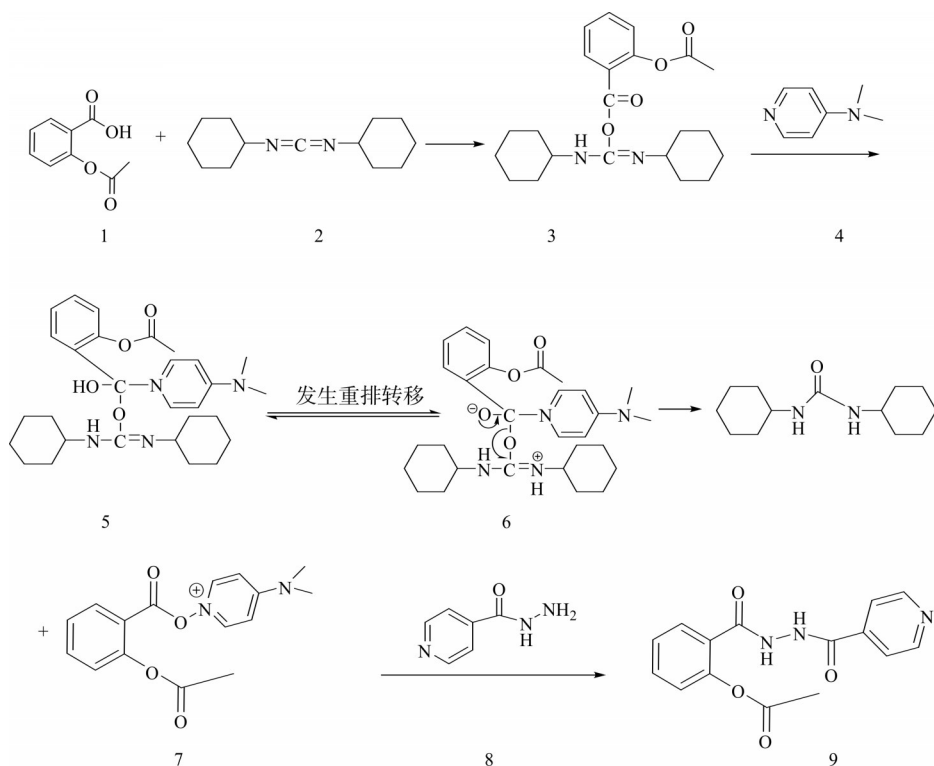


图2 乙酰水杨酸-异烟肼的合成路线

Fig. 2 Synthesis route of acetylsalicylic acid-isoniazid

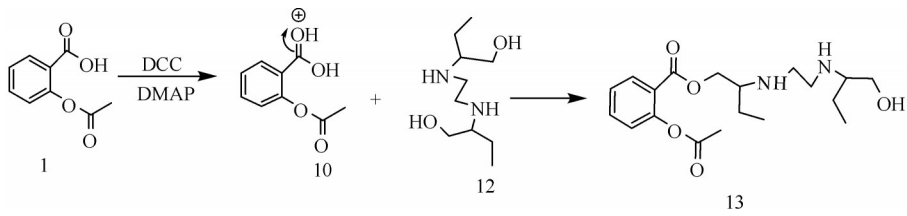


图 3 乙酰水杨酸-乙胺丁醇的合成路线

Fig. 3 Synthesis route of acetylsalicylic acid-ethambutol

1.2 试验方法

1.2.1 目标化合物 9 和 13 的合成 称取 0.66 g (3.66 mmol) 乙酰水杨酸以及 0.50 g 异烟肼 (3.64 mmol)溶于 15 mL *N,N*-二甲基甲酰胺中,在 30 ℃条件下磁力搅拌,加入 0.75 g 除水剂二环己基碳二亚胺和 0.02 g 催化剂 4-二甲氨基吡啶(异烟肼质量的 5%~10%),溶液变成黄色,保温反应 12 h,用薄层层析硅胶板跟踪反应,待反应结束后,过滤。将滤液缓慢滴加至 120 mL 冰水中,边加边搅拌,将得到的混合液再次抽滤,滤饼用冰水洗涤 1~3 次,再用饱和 NaCl 溶液洗涤 1 次,最后将滤饼转入真空干燥器中充分干燥,得到目标产物淡黄色化合物 9。分析计算可知,产品收率为 87.50%。

乙酰水杨酸-异烟肼(9):淡黄色固体;m.p. 115~120; IR ( KBr,  $\text{cm}^{-1}$  ) : 3 248.82, 2 857.15, 1 675.95, 1 659.45, 1 501.37, 1 620.42, 11 449.13, 1 130.34, 951.78, 751.29 ; 1 H NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$  ), $\delta$ : 6.90(m, 1H), 7.03 (m, 1H),7.27(m, 1H), 7.10 (s, 1H), 2.93(d, 1H), 2.93(d, 1H), 2.31(d, 3H), 2.55(m, 1H), 2.93(d, 1H), 2.93(d, 1H), 3.16 (dd, 1H); HRMS-ESI ( $m/z$ ) calculated for  $[M+H]^+$  :299.09, found:299.89。

称取 0.44 g (2.44 mmol) 乙酰水杨酸和 0.50 g (2.45 mmol) 乙胺丁醇溶于 15 mL 二甲亚砜中,在 30 ℃条件下磁力搅拌,加入 0.50 g 除水剂二环己基碳二亚胺和 0.03 g 催化剂 4-二甲氨基吡啶(乙胺丁醇质量的 5%~10%),溶液变成白色,保温反应 12 h,用薄层层析硅胶板跟踪反应,待反应结束后,过滤。待反应结束后,过滤,将滤液缓慢滴加至 120 mL 水中,边加边搅拌,将得到的混合液用二氯甲烷反复萃取 3 次,萃取所得有机相依次用水、饱和 NaCl 溶液各洗涤 1 次,向洗涤后的有机相中加入无水硫酸钠进行干燥,静置 0.5 h 后旋干,得到目标产物白色化合物 13。分析计算可知,产品收率为 86.35%。

乙酰水杨酸-乙胺丁醇(13):白色固体;m.p.

120~125; IR ( KBr,  $\text{cm}^{-1}$  ) : 3 342.36, 2 926.48, 1 733.69, 1 606.30, 1 102.36, 1 047.68, 757.59; 1 H NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$  ), $\delta$ : 6.91(m, 1H), 7.04(s, 1H), 9.45 (m, 1H), 7.25(m, 1H), 7.43 (d, 1H), 2.32 (s, 3H), 4.27(s, 2H), 3.4 (m, 1H), 1.34(s, 2H), 1.02(s, 3H), 1.91(d, 1H), 2.15(m, 2H), 2.15(m, 2H), 1.91 (d, 1H), 2.34 (s, 1H), 2.32 (d, 2H), 0.73 (s, 3H), 3.47 (d, 2H), 1.91 (d, 1H); HRMS-ESI ( $m/z$ ) calculated for  $[M+H]^+$  :366.22; found:405.22。

2 生物活性测试

2.1 测试方法

抑菌活性试验用抗结核药物的 7H9 培养基,由武汉市金银潭医院提供。化学试剂二甲基亚砜、质量分数 10%的 Tween-80、甲醇、去离子水为分析纯,购自国药化学试剂有限公司。用不含抗结核药物的 7H9 培养基作空白对照。采用微孔显色法及盲法编排测试。

称取乙酰水杨酸、异烟肼、乙胺丁醇、乙酰水杨酸-异烟肼和乙酰水杨酸-乙胺丁醇各 50 mg,用去离子水分别溶解,再转移至 50 mL 的容量瓶用去离子水定容,分别配成 1.0 mg/mL 浓度的药液,以 0.5 mg/mL 为进行实验测试的最大浓度,浓度依次往下做对倍稀释。

2.2 测试结果

以不加抗结核药原液的培养基为对照组,随着时间推移,观察培养基的显色情况,培养基的显色情况反映了 HR37V 标准株的生长情况,进一步说明了药物对结核杆菌的敏感性<sup>[12]</sup>。R 为对结核分枝杆菌的耐药性,即无活性;S 为对结核分枝杆菌的敏感性,即为有活性(质量浓度单位为  $\mu\text{g/mL}$ ),培养基能显示蓝色的最低浓度为药物的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)<sup>[13]</sup>值,结果见表 1。

表 1 目标化合物的抑菌活性

药物	MIC / ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	敏感	不敏感
乙酰水杨酸	$\geq 125$	$\leq 62.5$
异烟肼	$\geq 62.5$	$\leq 31.25$
乙胺丁醇	$\geq 500$	$\leq 250$
乙酰水杨酸-异烟肼	$\geq 62.5$	$\leq 31.25$
乙酰水杨酸-乙胺丁醇	$\geq 125$	$\leq 62.5$

3 结果与讨论

3.1 化合物的合成

乙酰水杨酸-异烟肼的合成,实质就是羧酸中的羟基被氨基取代而生成酰胺的反应,可以阻止和延缓异烟肼在体内的乙酰化;乙酰水杨酸-乙胺丁醇的合成,实质就是羧基和羟基生产酯的反应,并起到协同的抗菌作用,减弱药物的耐药率,合成抗结核杆菌且具有抗耐药的药物分子。更重要的是乙酰水杨酸-异烟肼和乙酰水杨酸-乙胺丁醇都

可以通过“一锅法”<sup>[14-16]</sup>反应得到,操作简单易实施,可以利用廉价易得的试剂在温和条件下获得良好收益的目标产物,收率高,且该反应应用范围广,同时催化剂也可回收使用,潜在应用巨大。

3.2 谱图分析

目标化合物乙酰水杨酸-异烟肼的 IR 图谱(见图 4), 3 248.82  $\text{cm}^{-1}$ 、3 244.7  $\text{cm}^{-1}$  为酰胺基 N—H 键弯曲振动吸收峰, 1 675.95  $\text{cm}^{-1}$  为 C=O 的伸缩振动吸收峰。化合物乙酰水杨酸-异烟肼的  $^1\text{H}$  NMR (d6-二甲基亚砜作溶剂)图谱化学位移在 $\delta=2.93$  为酰胺基NH 氢吸收峰;目标化合物乙酰水杨酸-乙胺丁醇的 IR 图谱(见图 5), 1 733.69  $\text{cm}^{-1}$  为酯基R—CO—OR 伸缩振动吸收峰, 1 047.68  $\text{cm}^{-1}$  为—OH 的吸收峰。化合物乙酰水杨酸-乙胺丁醇的  $^1\text{H}$  NMR (d6-二甲基亚砜作溶剂)图谱化学位移在 $\delta=1.91$  为 OH 氢吸收峰,化学位移在 $\delta=2.15$  为 NH 氢吸收峰。

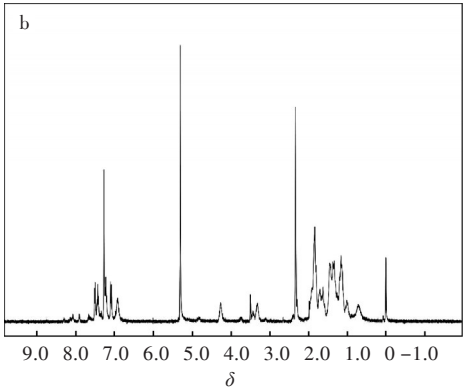
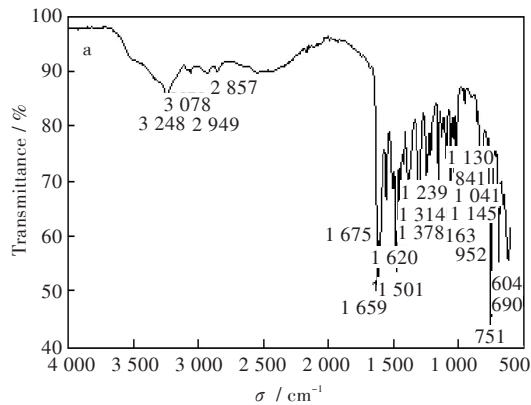


图 4 乙酰水杨酸-异烟肼:(a)红外图谱,(b)核磁共振氢谱  
Fig. 4 Acetylsalicylic acid-isoniazid:(a)IR spectrum ,(b) $^1\text{H}$  NMR

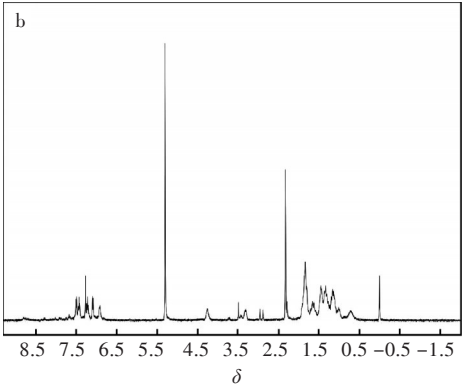
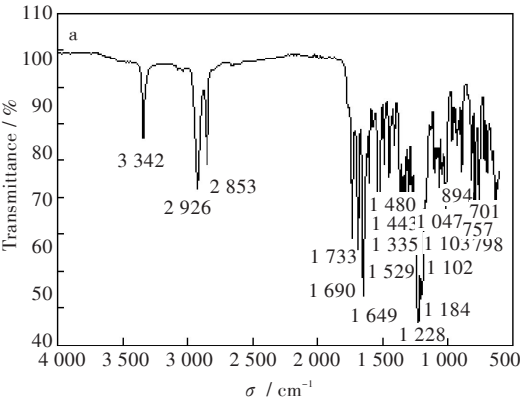


图 5 乙酰水杨酸-乙胺丁醇:(a)红外图谱,(b)核磁共振氢谱  
Fig. 5 Acetylsalicylic acid-ethambutol:(a)IR spectrum ,(b) $^1\text{H}$  NMR

4 结 语

采用氧化还原指示剂显色法来检测结核杆菌的耐药性,通过指示剂由氧化态转变为还原态过程中颜色变化判断药物的敏感性。初筛结果显示:目标化合物 9 和 13 显示出较好的杀菌活性,其中 13 的杀菌效果相对于 9 而言,有更强的的杀菌效果。此外,这个反应对环境友好、条件温和、成本低,其原理和机理可应用于药物分子合成,催化方法给化学反应提供了新的可能,对抗结核药物及抗耐药性的衍生物的设计和合成具有一定的意义。

参考文献

[1] 秦蓓,廖秀清. 结核病的临床诊断及研究进展[J]. 中华肺部疾病杂志,2018,11(1):108-110

[2] 张朝辉,严晶晶. 我国结核病现状及其防治措施[J]. 海南医学, 2018,29(23):3386-3389

[3] 张俊. 替唑尼特\_截短侧耳素等杂合抗结核药物的筛选及制备[D]. 武汉:武汉工程大学,2016.

[4] GOLD B, SMITH R, NGUYEN Q, et al. Novel cephalosporins selectively active on nonreplicating mycobacterium tuberculosis[J]. Medicinal Chemistry, 2016, 59 (13) :6027-6044.

[5] RATNASINGHE L D, GRAUBARD B L, KAHIE L, et al. Aspirin use and mortality from cancer in a prospective cohort study [J]. Anticancer Research, 2004, 24 (5B) ; 3177-3184.

[6] MAKAROV V, LECHARTIER B, ZHANG M, et al. Towards a new combination therapy for tuberculosis with next generation benzothiazinones [J]. EMBO Molecular Medicine, 2014, 6(3): 372-383.

[7] 黄赤,叶龙,彭永利. 低粘度聚酰胺的合成[J]. 武汉工程大学学报,2010,32(11):81-84.

[8] MA Z K, LYNCH A S. Development of a dual-acting antibacterial agent (TNP-2092) for the treatment of persistent bacterial infections[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2016, 59 (14) :6645-6657.

[9] 成丽丹,马定娜,黄龙江. 催化直接酰胺化反应研究进展[J]. 精细石油化工,2017,34(4):68-74.

[10] 沙文彬,黄文华. 硼化合物催化的直接酰胺化反应研究进展[J]. 化学与生物工程,2013,30(6):11-16.

[11] MOHY EI DINE T, ERB W, BERHAULT Y, et al. Catalytic chemical amide synthesis at room temperature: one more step toward peptide synthesis [J]. The Journal of Organic Chemistry, 2015, 80 (9): 4532-4544.

[12] RAWAT J, JAIM P K, RAVICHANDRAN V, et al. Synthesis and evaluation of mutual prodrugs of isoniazid, p-amino salicylic acid and ethambutol [J]. Arkivoc, 2007(1): 105-118.

[13] 周晓坤,马佳,姚冬梅,等. 合理利用药敏试验选择抗菌药[J]. 中国执业药. 2013,10(4):50-52.

[14] 彭薇,马峻,张俊,等. 利福霉素异烟肼和利福霉素沃尼妙林的合成[J]. 化学研究与应用,2017,29(12): 1933-1937.

[15] COQUEIRO A, REGASINI L O, STAPLETON P, et al. In vitro antibacterial activity of prenylated guanidine alkaloids from pterogyne nitens and synthetic analogues [J]. Natural Product Research, 2014, 77 (8):1972-1975.

[16] 董志兵,刘方,王敏,等. 席夫碱的一锅法合成及还原[J]. 武汉工程大学学报,2016,38(3):209-212, 230.

本文编辑:张 瑞