1,4-二氧喹醛酸酯合成及抑菌活性研究

马明真,李风梅,高宝生,宋俊芬,罗　星,李　华*

(中国农业大学烟台研究院,烟台 264670)

[收稿日期] 2016-03-19　[文献标识码]A　[文章编号]1002-1280(2016)06-0026-07　[中图分类号]S859.79

[摘　要]　为了合成两种具有抑菌活性的1,4-二氧喹醛酸酯,即1,4-二氧喹喔啉-3-甲基-2-甲酸苯酯和1,4-二氧喹喔啉-3-甲基-2-甲酸肉桂酯,以苯并呋咱为原料,经Beirut反应、酯交换反应,合成了两种喹醛酸酯;1,4-二氧喹喔啉-3-甲基-2-甲酸苯酯合成产率为29.3%,1,4-二氧喹喔啉-3-甲基-2-甲酸肉桂酯合成产率为18.3%。两种1,4-二氧喹醛酸酯对大肠杆菌、金葡萄球菌、青霉菌和枯草杆菌均有明显的抑菌活性。通过测定产物的熔点和光谱分析证明系为所合成的目标产物。

[关键词]　苯并呋咱;酯交换反应;喹醛酸酯;抑菌活性

Study on the Synthesis and Bacteriostasis of 1,4-dioxide Quinoline Aldehydes Esters

MA Ming-zhen, LI Feng-mei, GAO Bao-sheng, SONG Jun-fen, LUO Xing, LI Hua*

(*China Agriculture University*(*Yantai*), *Yantai* 264670, *China*)

Abstract: Using benzofuroxan as raw material, two kinds of 1,4-dioxide quinoline aldehydes esters, 1,4-dioxide quinoline-3-methyl-2-phenyl formate and 1,4-dioxide quinoline-3-methyl-2-cinnamylformate, were synthesized by Beirut reaction and ester exchange reaction. The yield of 1,4-dioxide quinoline-3-methyl-2-phenyl formate was 29.3% and the yield of 1,4-dioxide quinoline-3-methyl-2-cinnamylformate was 18.3%. Two kinds of 1,4-dioxide quinoline aldehyde ester have obvious antibacterial activity to *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Penicillium sp.* and *Bacillus subtilis*. It was proved that new compounds synthesized in experiment were target compounds by measuring the melting point and spectral analysis.

Key words: benzofuroxan; ester exchange reaction; quinoline aldehydes esters; antibacterial activity

1,4-二氧喹喔啉类衍生物具多种生物活性[1-3],已在许多领域中广泛报道[4-6]。其具有明显的抑菌活性[7-8],并能促进饲料消化吸收和提高饲料转化率[9-10],对畜禽的饲养有重大意义,所以

基金项目:烟台市科技发展计划项目(2012ZH247)

作者简介:马明真,从事设施农业科学与工程专业方面研究。

通讯作者:李　华。E-mail:8540890692@qq.com

被广泛用作兽药[11-12]进行研究。

国家级一类新兽药喹烯酮,具有抑菌促生效果好、低毒、低残留、无三致作用的特点,且使用安全,是农业部重点推广的兽药[10,13]。目前针对喹烯酮的研究多集中在合成工艺、药理、毒理等方面[13-15],较少涉及喹烯酮的转型升级及结构创新。在保证安全有效、生物学活性较高的前提下,有必要制备各具特色、结构多样的喹喔啉衍生物,以适应我国畜禽养殖疾病防控和食品安全的需求。

本文以苯并呋咱为原料,经 Beirut 反应、酯交换反应,合成了两种新喹喔啉衍生物,即 1,4-二氧喹喔啉-3-甲基-2-甲酸苯酯和 1,4-二氧喹喔啉-3-甲基-2-甲酸肉桂酯,并用滤纸片法[5]对其抑菌活性进行了研究,以期为新兽药的制备提供参考。

1　材料与方法

1.1　仪器与试剂　分析天平,WT-B 型,上海精密科学仪器产品;恒温磁力搅拌器,85-1 型,江苏荣华仪器产品;循环水式真空泵,SHZ-D 型,河南巩义予华仪器产品;万调万用电炉,DL-1 型,山东龙口先科仪器产品;电热恒温鼓风干燥箱,DHG-9140A 型,嘉兴中新医疗仪器产品;压力蒸汽灭菌器,YX280A 型,上海三申医疗器械产品;电热恒温培养箱,420 型,山东龙口先科仪器产品;超净工作台,SW-CJ 型,苏州安泰空气技术公司产品;游标卡尺、接种针、打孔器、镊子、滤纸等均为市售。

苯并呋咱(按文献[16-17]方法自制);乙醇、苯酚,均为分析纯,天津永大化学试剂产品;乙酰乙酸乙酯,分析纯,天津福晨化学试剂产品;乙酸乙酯、甲醇,均为分析纯,天津科密欧化学试剂产品;盐酸,分析纯,烟台三和化学试剂产品;三乙胺,分析纯,天津广成化学试剂产品;肉桂醇,分析纯,上海阿拉丁生化科技产品;营养琼脂,青岛海博生物技术产品。供试菌种:大肠杆菌、枯草杆菌、金黄色葡萄球菌、青霉菌。以上菌种均由中国农业大学生物所提供。

1.2　喹醛酸酯合成

1.2.1　1,4-二氧喹喔啉-3-甲基-2-甲酸乙酯的制备　取苯并呋咱 20 g(163.93 mmoL)加入 25 mL乙酰乙酸乙酯,水浴加热(40 ℃)搅拌溶解,溶液呈橙黄色。冷水浴(15 ℃),缓慢加入 40 mL 三乙胺,溶液呈红色,静置在底部和边缘可看到土黄色晶体析出,24 h 后抽滤,乙醇洗涤得粗品。60 ℃烘干,甲醇重结晶。合成路线如图 1 所示。

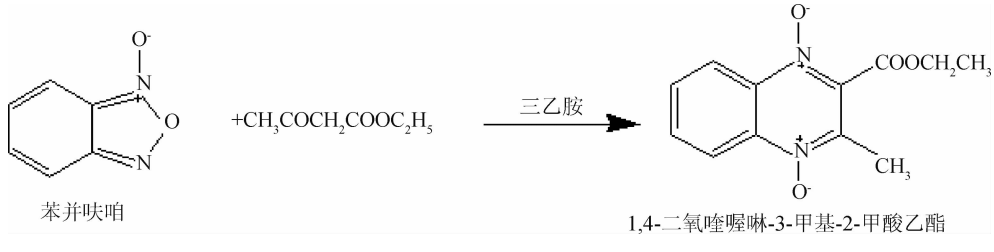


图 1　Beirut 反应

1.2.2　1,4-二氧喹醛酸酯制备　1,4-二氧喹喔啉-3-甲基-2-甲酸苯酯的合成:取 5 g 1,4-二氧喹喔啉-3-甲基-2-甲酸乙酯放入烧杯中,加入 25 mL 乙醇,加热搅拌 40 min,温度控制在 50~60 ℃,全部溶解后,加入 2.5 g 苯酚,回流 5 min(77 ℃)后,滴加 1 mL 盐酸,继续回流 2 h,减压蒸馏回收乙醇,得深红色粘稠反应产物,加 50 mL 乙酸乙酯,室温静置,析出晶体。抽滤,用蒸馏水洗涤,得土褐色固体。60℃烘干,乙酸乙酯重结晶。合成路线如图 2 所示。

1,4-二氧喹喔啉-3-甲基-2-甲酸肉桂酯的合成:取 5 g 1,4-二氧喹喔啉-3-甲基-2-甲酸乙酯放入烧杯中,加入 30 mL 乙醇,加热搅拌 40 min,温度控制在 50~60 ℃,全部溶解后,加入 4 mL肉桂醇,回流 5 min(77 ℃)后,滴加 1.5 mL 盐酸,继续回流 2 h,减压蒸馏回收乙醇,得深红色粘

稠反应产物,加 50 mL 乙酸乙酯,室温静置,用超声分散 20 分钟,析出沉淀。抽滤,用蒸馏水洗涤,得褐色固体。60℃烘干,乙酸乙酯重结晶。合成路线如图 3 所示。

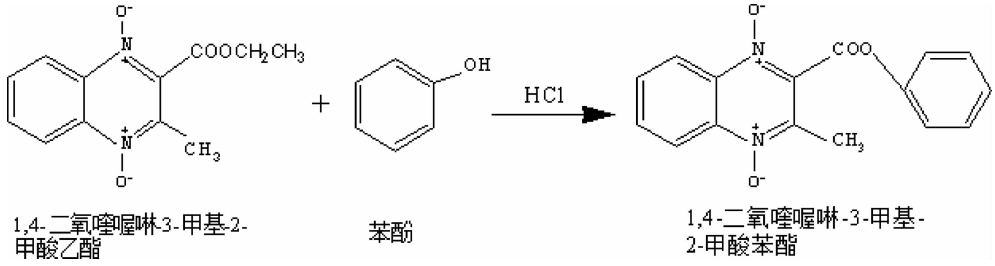


图 2　与苯酚的酯交换反应

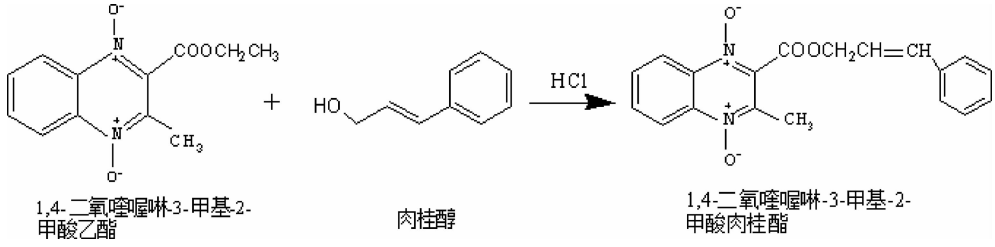


图 3　与肉桂醇的酯交换反应

1.3　抑菌试验

1.3.1　培养基的制作　称取营养琼脂 17.5 g,放入盛有 500 mL 蒸馏水的烧杯中,在电炉上加热,用玻璃棒不断搅拌,防止琼脂粉末粘到烧杯底部,溶解至溶液呈通澈状态,停止加热,稍稍冷却后倒入三角瓶中,在压力蒸汽灭菌器中高压灭菌 20 min。

1.3.2　滤纸片法　将高压灭菌后的琼脂培养基趁热倒入灭菌培养皿中,冷却凝固后,用接种针从菌落上轻轻抹上一些细菌,均匀地涂抹在培养皿中的琼脂平板上;选取优质滤纸,用打孔器打出直径为 6 mm的滤纸片,用压力蒸汽灭菌器高压灭菌20 min;用蒸馏水分别配制 0.5、1.5、2.0、2.5 mg/mL 的 1,4 - 二氧喹喔啉 - 3 - 甲基 - 2 - 甲酸苯酯和1,4 - 二氧喹喔啉 - 3 - 甲基 - 2 - 甲酸肉桂酯溶液各 50 mL;用无菌镊子夹取一定数量的灭菌滤纸片,放在药品中充分浸湿后,贴在含菌培养皿上,每只培养皿内间隔一定的距离贴 3 片,用浸有去离子水的滤纸做空白对照,每种处理做两组重复,以上操作均在超净工作台上进行;将培养皿放入28 ℃电热恒温培养箱中培养 48 h;用游标卡尺测量抑菌圈直径。试验中出现的抑菌圈直径越大,说明药品的抑菌活性越强。

2　结　果

2.1　1,4 - 二氧喹喔啉 - 3 - 甲基 - 2 - 甲酸乙酯制备　苯并呋咱和乙酰乙酸乙酯的用量比值为 1∶1.25,保持乙酰乙酸乙酯过量,反应进行的较为彻底,产率为 65.44%,熔点 153.1 ℃ ~ 153.9 ℃。

2.2　1,4 - 二氧喹醛酸酯制备　本文研究了两种 1,4 - 二氧喹醛酸酯的制备反应,均在浓盐酸催化下进行。苯酚与 1,4 - 二氧喹喔啉 - 3 - 甲基 - 2 - 甲酸乙酯发生酯交换反应,得到土红色松散晶体,产率为 29.3%,熔点 135.9 ℃ ~ 136.8 ℃;肉桂醇与 1,4 - 二氧喹喔啉 - 3 - 甲基 - 2 - 甲酸乙酯发生酯交换反应,得到肉色松散晶体,产率为 18.3%,熔点 138.7 ℃ ~ 139.1 ℃。

2.3　抑菌试验　用去离子水作对照,采用滤纸片法对两种喹醛酸酯进行了抑菌活性测试。结果表明,不同浓度的 1,4 - 二氧喹喔啉 - 3 - 甲基 - 2 - 甲酸苯酯和 1,4 - 二氧喹喔啉 - 3 - 甲基 - 2 - 甲酸肉桂酯对大肠杆菌、金葡萄球菌、青霉菌和枯草杆

菌的抑菌圈直径均明显比对照组大,随着药品浓度的增加,抑菌圈直径呈明显增大的趋势(表1、表2)。在1.5 mg/mL浓度下1,4-二氧喹喔啉-3-甲基-2-甲酸苯酯对金葡萄球菌和1,4-二氧喹喔啉-3-甲基-2-甲酸肉桂酯对大肠杆菌的抑菌照片见图4。

表1　1,4-二氧喹喔啉-3-甲基-2-甲酸苯酯体外抑菌试验的抑菌圈直径　　**单位:mm**

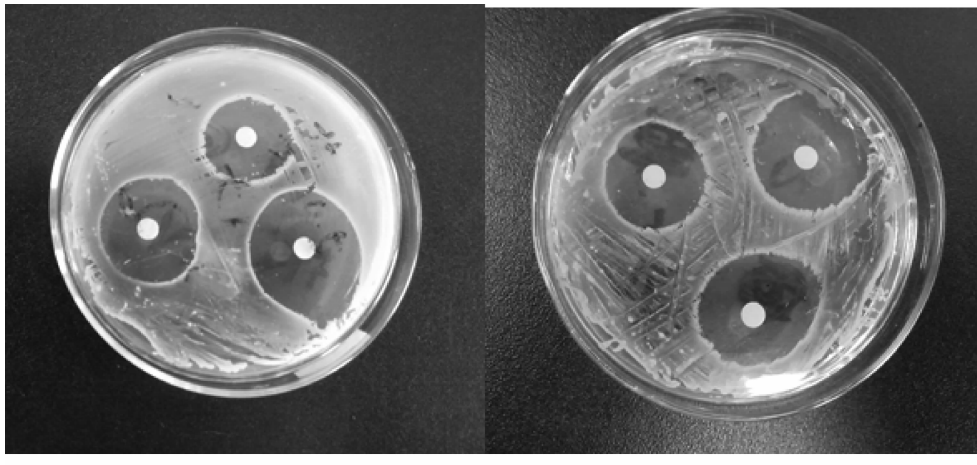
菌株	药品浓度/(mg·mL^{-1})					
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
大肠杆菌	5.8±0.6	9.2±1.2	14.3±1.6	22.6±1.5	35.5±2.1	38.6±2.3
金葡萄球菌	5.6±0.7	6.5±1.1	16.5±1.4	23.3±1.8	28.1±1.9	37.2±2.0
青霉菌	6.0±0.5	7.6±1.3	8.3±1.5	23.7±1.6	29.2±1.9	30.9±2.2
枯草杆菌	6.0±0.8	8.5±1.2	8.6±1.4	23.9±1.9	29.8±2.2	33.5±2.1

($\bar{x}\pm s$, n=5)

表2　1,4-二氧喹喔啉-3-甲基-2-甲酸肉桂酯体外抑菌试验的抑菌圈直径　　**单位:mm**

菌株	药品浓度/(mg·mL^{-1})					
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
大肠杆菌	6.0±0.4	8.3±1.0	9.8±1.5	25.8±1.7	27.3±2.3	34.1±2.0
金葡萄球菌	5.9±0.5	10.0±1.1	10.7±1.4	27.3±1.5	35.8±2.0	38.4±2.2
青霉菌	6.0±0.7	6.5±1.3	11.2±1.6	17.5±1.9	23.5±1.9	29.3±2.3
枯草杆菌	5.8±0.3	6.9±1.1	9.4±1.3	22.1±1.8	25.6±2.1	30.9±2.3

($\bar{x}\pm s$, n=5)



A　　B

图4　1,4-二氧喹喔啉-3-甲基-2-甲酸苯酯对金葡萄球菌的抑菌结果(A)和1,4-二氧喹喔啉-3-甲基-2-甲酸肉桂酯对大肠杆菌(B)的抑菌结果(化合物质量浓度为1.5 mg/mL)

2.4　目标产物结构分析

2.4.1　红外光谱(IR)　1,4-二氧喹喔啉-3-甲基-2-甲酸苯酯:2996 cm^{-1}强峰是-CH_3伸缩振动吸收谱带,1738 cm^{-1}强峰是C=O的伸缩振动吸收谱带,1332 cm^{-1}强峰是N-O伸缩振动吸收谱带,1244 cm^{-1}强峰是C-O伸缩振动吸收谱带。770 cm^{-1}中强峰是苯环邻位双取代特征吸收谱带。其中1332 cm^{-1}的强吸收峰是取代喹喔啉-1,4-二氧化物的特征吸收峰[18]。

1,4-二氧喹喔啉-3-甲基-2-甲酸肉桂酯:2997 cm^{-1}强峰是-CH_3伸缩振动吸收谱带,1739 cm^{-1}强峰是C=O的伸缩振动吸收谱带,1521 cm^{-1}强峰是C=C伸缩振动吸收谱带,1332 cm^{-1}强峰是N-O伸缩振动吸收谱带,1244 cm^{-1}强峰是C-O伸缩振动吸收谱带。770 cm^{-1}中强峰是苯环邻位双取代特征吸收谱带。其中1332 cm^{-1}的强吸收峰是取代喹喔啉-1,4-二氧化物的特征吸收峰(图5-图6)。

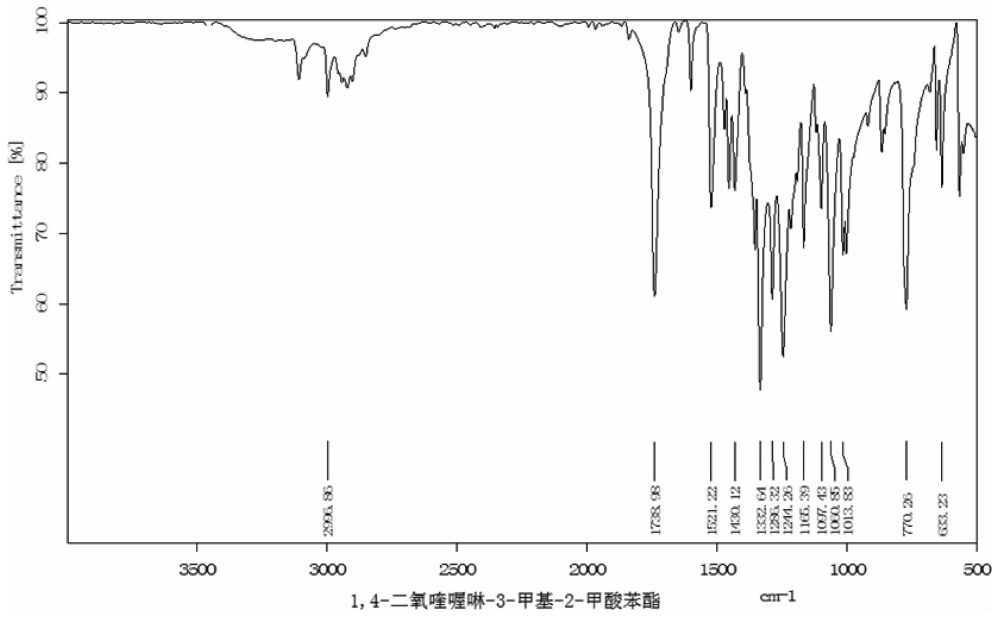


图 5　1,4 – 二氧喹喔啉 – 3 – 甲基 – 2 – 甲酸苯酯的红外光谱图

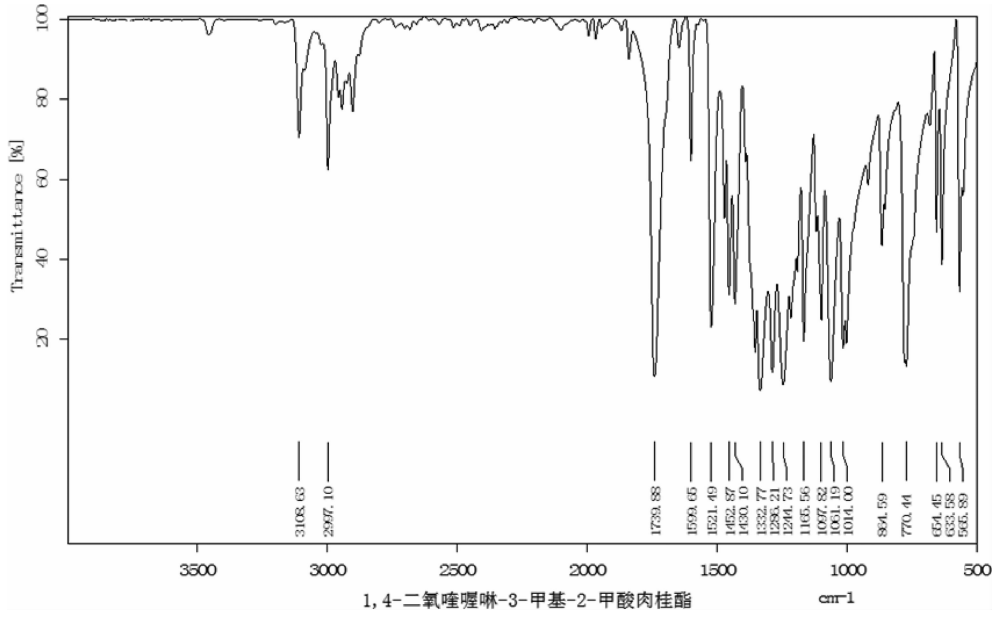


图 6　1,4 – 二氧喹喔啉 – 3 – 甲基 – 2 – 甲酸肉桂酯的红外光谱图

2.4.2　质谱(MS)　1,4 – 二氧喹喔啉 – 3 – 甲基 – 2 – 甲酸苯酯[M]:最大质荷比 m/z = 295.66,基峰 m/z = 294.66。确定该化合物分子量为 296,分子式为 $C_{16}H_{12}O_4N_2$。

1,4 – 二氧喹喔啉 – 3 – 甲基 – 2 – 甲酸肉桂酯[M]:最大质荷比 m/z = 334.89,基峰 m/z = 334.02。确定该化合物分子量为 336,分子式为 $C_{19}H_{16}O_4N_2$(图 7 – 图 8)。

2.4.3　核磁共振谱(^{1}HNMR)　1,4 – 二氧喹喔啉 – 3 – 甲基 – 2 – 甲酸苯酯 δppm:8.72 ~ 8.56(2H),8.05(2H),7.45(2H),7.37(2H),7.05(1H),2.51(3H)。

1,4 – 二氧喹喔啉 – 3 – 甲基 – 2 – 甲酸肉桂酯 δppm:8.62 ~ 8.56(2H),7.91 ~ 7.83(2H),7.33 ~ 7.25(2H),7.17(2H),6.95(1H),6.15(2H),4.05 ~ 3.87(2H),2.51(3H)(图 9 – 图 10)。

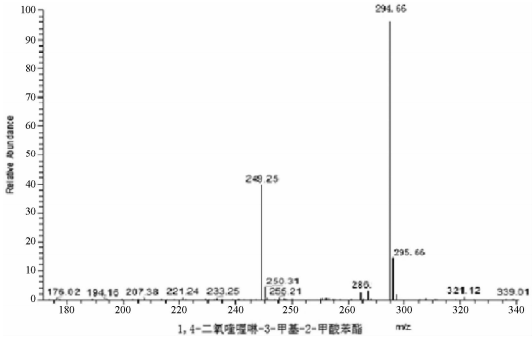


图 7　1,4 – 二氧喹喔啉 – 3 – 甲基 – 2 – 甲酸苯酯的质谱图

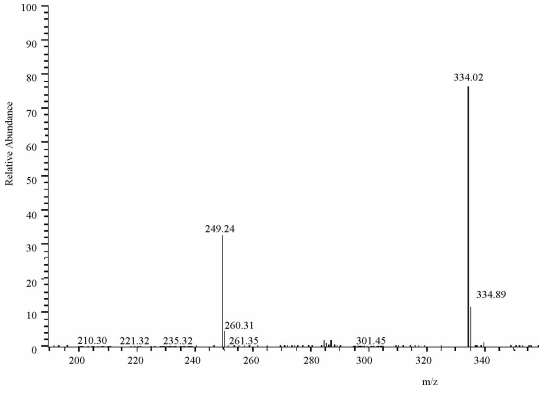


图 8　1,4 – 二氧喹喔啉 – 3 – 甲基 – 2 – 甲酸肉桂酯的质谱

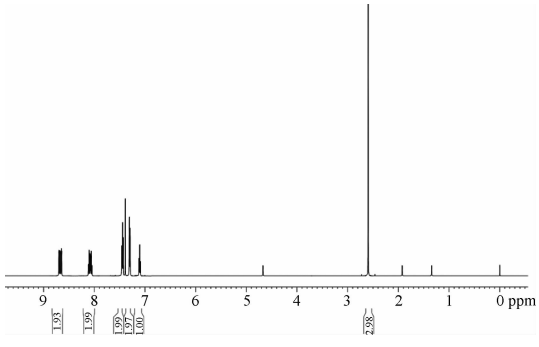


图 9　1,4 – 二氧喹喔啉 – 3 – 甲基 – 2 – 甲酸苯酯的^{1}HNMR 谱图

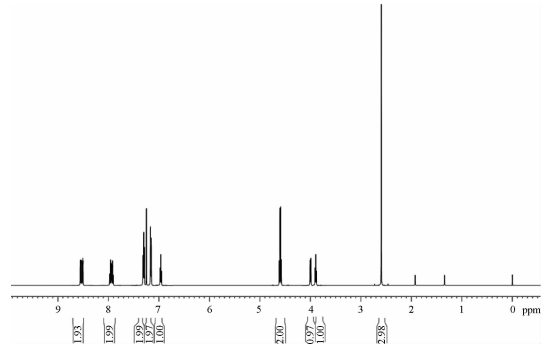


图 10　1,4 – 二氧喹喔啉 – 3 – 甲基 – 2 – 甲酸肉桂酯的^{1}HNMR 谱图

3　讨论与小结

1,4 – 二氧喹喔啉衍生物具有显著的抑菌活性,被广泛用作兽药进行研究。目前,国内围绕喹烯酮的制备方法、催化剂改进及喹烯酮衍生物方面的研究较多,如唐树和等[16]报道了以碳酸钠作催化剂进行 Beirut 反应制备 3 – 甲基 – 2 – 乙酰基一喹喔啉 – 1,4 – 二氧化物的合成工艺路线、戴述诚等[15]报道将催化剂甲醇钠改为盐类催化剂,对喹烯酮的合成工艺路线和合成方法进行了改进;但在其转型升级方面的研究较少,特别是结构创新方面的研究报道,如魏晓然等[19]研究了 3 – 甲基 – 2 – [3 – (2 – 呋喃基)丙烯甲酰] – 喹喔啉 – 1,4 – 二氧化物的合成较为少见。在保证安全有效的前提下,制备结构各具特色的喹喔啉衍生物的研究亟待加强。

为合成新喹喔啉衍生物,以苯并呋咱为原料,经 Beirut 反应和酯交换反应,分别将苯酚和肉桂醇引入 1,4 – 二氧喹喔啉 – 3 – 甲基 – 2 – 甲酸乙酯上,合成了两种喹醛酸酯。

在贝鲁特缩合反应中,在三乙胺的催化下苯并呋咱和乙酰乙酸乙酯反应,可以不用另加溶剂,乙酰乙酸乙酯既做反应物同时也是溶剂。实验过程中发现,用二乙胺作催化剂需冰水冷却,反应速度快,但会产生大量红褐色油状物,产率低;用三乙胺作催化剂,反应时间较长,但反应温和,产率高。每克苯并呋咱用 2 mL 三乙胺和 1.25 mL 乙酰乙酸乙酯时产率较高。与文献[6]相比,乙酰乙酸乙酯的用量减少了 13%,三乙胺的用量减少了 72%,用甲醇替代丙酮进行重结晶,最终产率提高了 10%。

在酯交换反应中,试验中用易挥发的浓盐酸做催化剂,保持在溶剂乙醇微沸的条件下进行反应。由于酯交换平衡的影响,会使目的产物的产率较低,因此,在反应过程中采取减压蒸馏蒸出乙醇,从而提高目的产物的产率。反应得到的产物为红褐色粘稠状物质,加入乙酸乙酯后析出沉淀。但在合成 1,4 – 二氧喹喔啉 – 3 – 甲基 – 2 – 甲酸肉桂酯时出现了不沉淀的现象,试验发现,用超声分散 20 min即可析出沉淀获得产物。

通过红外光谱、质谱和核磁共振谱鉴定证明了所得化合物系目标产物,说明该合成路径是合理有效的。同时,滤纸片抑菌试验说明了两种化合物对4种供试菌种均具有明显的抑菌活性。

参考文献:

[1] Suter W, Rosselet A, Knüsel F. Mode of action of quindoxin and substituted quinoxaline - di - N - oxides on *Escherichia coli*. [J]. Antimicrobial Agents & Chemotherapy, 1978, 13(5): 770 - 783.

[2] Beutin L, Preller E, Kowalski B. Mutagenicity of quindoxin, its metabolites, and two substituted quinoxaline - di - N - oxides. [J]. Antimicrobial Agents & Chemotherapy, 1981, 20(3): 336 - 343.

[3] Ganley B, Chowdhury G, Bhansali J, *et al*. Redox - activated, hypoxia - selective DNA cleavage by quinoxaline 1, 4 - di - N - oxide. [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2001, 9(9): 2395 - 2401.

[4] Carta A, Sanna P, Gherardini L, *et al*. Novel functionalized pyrido[2, 3 - g]quinoxalinones as antibacterial, antifungal and anticancer agents[J]. Farmaco, 2001, 56(12): 933 - 938.

[5] 孔新刚. 新1,4 - 二氧喹喔啉衍生物的合成、抑菌活性及与血清白蛋白相互作用的研究[D]. 新疆农业大学, 2008.

[6] 张道凌, 梁剑平, 刘 宇,等. 喹喔啉1, 4 - 二氧化物的合成及抗菌活性[J]. 中国医药工业杂志, 2008, 39(6): 410 - 412.

[7] 马敬中, 占升卫, 胡超男,等. 1, 4 - 二氧喹喔啉甲醛亚胺的合成和抑菌活性[J]. 应用化学, 2006, 23(6): 637 - 640.

[8] 孔新刚, 郭 明, 毛胜凤,等. 新化合物1, 4 - 二氧喹喔啉 - 3 - 甲醛缩氨基硫脲 - 2 - 甲酸乙酯的合成及抑菌活性[J]. 浙江农林大学学报, 2008, 25(6): 685 - 688.

[9] Yen J T, Nienaber J A, Pond W G, *et al*. Effect of carbadox on growth, fasting metabolism, thyroid function and gastrointestinal tract in young pigs. [J]. Journal of Nutrition, 1985, 115(8): 970 - 979.

[10] 王道坤. 国家一类新兽药——喹烯酮[J]. 畜牧市场, 2007, 12(1): 57 - 57.

[11] Ferrando R, Truhaut R, Raynaud J P, *et al*. Toxicity by relay. III. Safety for the human consumer of the use of Carbadox, a feed additive for swine, as estimated by a 7 years relay toxicity on dogs [J]. Toxicology, 1978, 11(2): 167 - 183.

[12] 朱柱振, 陈杖榴, 冯淇辉. 喹乙醇在鸡体内的药物动力学及组织浓度研究[J]. 畜牧兽医学报, 1993(3): 258 - 264.

[13] 曾英华, 方热军. 喹烯酮的研究及应用概况[J]. 湖南饲料, 2010(6): 19 - 20.

[14] 王 旭, 程古月, 周秋格,等. 兽用喹噁啉类毒理学研究进展[J]. 中国农学通报, 2015(17):16 - 21.

[15] 戴述诚, 郭忠东, 易惠文. 喹烯酮合成方法的改进[J]. 中国兽药杂志, 2005, 39(10): 42 - 43.

[16] 唐树和, 唐树民, 孙松华. 喹烯酮合成工艺的改进[J]. 化学通报: 印刷版, 2009, 72(4): 381 - 383.

[17] 赵晓丽, 郑国钧. 喹烯酮合成方法的研究[J]. 兽药与饲料添加剂, 2008, 13(3): 4 - 5.

[18] 叶孟兆, 谢荣春, 徐伟亮. 2 - 乙酰基 - 3 - 甲基喹喔啉 - 1,4 - 二氧化物的合成[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版, 1994(4): 427 - 430.

[19] 魏晓然, 王 琳, 罗 星,等. 3 - 甲基 - 2 - [3 - (2 - 呋喃基)丙烯甲酰] - 喹喔啉 - 1,4 - 二氮氧化物合成研究[J]. 中国兽药杂志, 2015, 49(6):17 - 22.

(编 辑:陈 希)