

# 3-甲基-2-乙酰苯胂喹喔啉 1,4-二氧化物的合成与抑菌活性研究

李风梅,马明真,罗 星,李 华\*

(中国农业大学烟台研究院,山东烟台 264670)

[收稿日期] 2016-11-24 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 03-0029-06 [中图分类号] S859.79

**[摘 要]** 为了合成一种有抑菌活性的新喹喔啉衍生物,即 3-甲基-2-乙酰苯胂喹喔啉 1,4-二氧化物,以邻硝基苯胺为基本原料,经氧化反应,Beirut 反应和加成缩合反应,制得目标产物,产率 73.5%。用红外光谱法(IR)、质谱法(MS)和核磁共振谱法(NMR)对产物结构进行表征,证明合成产物为目标产物。并通过抑菌测试发现,新化合物对大肠杆菌、枯草杆菌、金葡萄球菌和青霉菌均有明显的抑菌活性,为今后开展喹喔啉及其衍生物的抗菌药用研究奠定基础。

**[关键词]** 喹喔啉;合成;结构表征;抑菌测试

## Study on the Synthesis and Bacteriostasis of 3-Methyl-2-Acetylphenylhydrazone Quinoxaline 1,4-Dioxide

LI Feng-mei, MA Ming-zhen, LUO Xing, LI Hua\*

(China Agricultural University(Yantai), Yantai, Shandong 264670, China)

**Abstract:** In order to synthesize a new quinoxaline derivative with antibacterial activity, 3-methyl-2-acetylphenylhydrazone quinoxaline 1,4-dioxygen, using o-nitroaniline as raw material, and acquire the target derivatives in a yield of 73.5% though Oxidation reaction, Beirut reaction and addition condensation reaction. It was proved that the new compound synthesized in experiment were target compound by infrared spectroscopy (IR), mass

**基金项目:** 烟台市科技发展计划项目(2012ZH247)

**作者简介:** 李风梅,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

[11] 赵淑杰,韩忠明,李彦颖,等. 鹿药提取物清除羟基自由基的研究[J]. 华南农业大学学报.2010,31(2):59-62

[12] ShuJie Zhao, HanYu Xu, Yang Zhan, et al. Ultrasonic extraction and determination of polysaccharide from Smilacina japonica.[J]. European Journal of BioMedical Research,2016(1):53-56.

[13] 崔喜艳 主编.基础生物化学实验方法和技术[M].北京:中国林业出版社,2007:62-62.

[14] 侯小涛,赵超超,邓家刚.甘蔗叶多糖除蛋白工艺研究[J].食

品工业科技,2012,33(20):240-245.

[15] Yang W F, Wang Y, Li X P, et al. Purification and structural characterization of Chinese yam polysaccharide and its activities [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 117: 1021-1027.

[16] 赵海运,王庆奎,邢克智,等.黄芪多糖除蛋白质方法与条件优化[J].天津农学院学报,2009,16(4):5-8

(编辑:陈 希)

spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR). The antibacterial results showed that the 3-methyl-2-acetyl phenylhydrazone quinoxaline 1,4-dioxane had obvious inhibitory activity against *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Penicillium*. The experimental results will lay the foundation for the future research of quinoxaline and its derivatives.

**Key words:** quinoxaline; synthesis; structure characterized; antibacterial test

喹喔啉是二十世纪五十年代开始合成的具有抗菌活性的先导化合物。其衍生物是一类苯并吡嗪类杂环物质,大多具有广泛的生物活性。主要用于医药、农药、饲料、染料、杀菌、除草等领域<sup>[1]</sup>。七、八十年代该类化合物作为饲料添加剂,用于提高抗病能力促进畜禽生长。后来研究发现其代表性物质喹乙醇对喂养生物有致癌、致畸以及光敏毒性<sup>[2]</sup>,逐步被淘汰。寻找新的对人畜安全低残留、具有特殊功能的喹喔啉衍生物化合物成为发展方向。

近年来研究发现,喹喔啉衍生物具有抗肿瘤活性<sup>[3]</sup>,对 HIV 病毒具有抑制作用<sup>[4]</sup>,对利什曼原虫病具有独特效果<sup>[5]</sup>,在荧光探针方面具有发展潜力<sup>[6]</sup>。因此喹喔啉衍生物的合成研究受到新的重视。

本文以邻硝基苯胺为原料,经碱性条件下次氯酸钠环氧化、Beirut 缩合、苯胂脒缩合,制备新喹喔啉衍生物 3-甲基-2-乙酰苯胂脒喹喔啉 1,4-二氧化物。对此物质进行结构表征,研究抑菌活性,以期对喹喔啉衍生物研究发展做出贡献。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

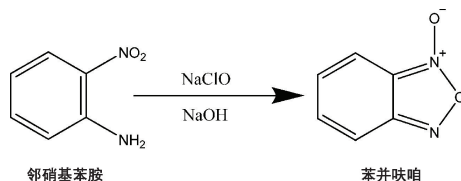
1.1.1 试剂 邻苯二胺(天津市光复精细化工研究所产品),无水乙醇、次氯酸钠(天津市永大化学试剂有限公司产品),乙酰丙酮(江苏强盛功能化学股份有限公司),三乙胺(天津广成化学试剂产品),甲醇(天津科密欧化学试剂产品),苯胂(上海西唐生物科技有限公司),营养琼脂(青岛海博生物技术产品),以上均为分析纯。供试菌种为标准质控菌株:大肠杆菌 ATCC25922、枯草杆菌 ATCC6633、金黄色葡萄球菌 ATCC29213、青霉菌 ATCC1109,均由中国农业大学生物所提供。

1.1.2 仪器 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;万调万用电炉 DL-1 型,电热恒温培养箱 420 型,山东龙口先科仪器产品;循环水式真空泵 SHZ-D 型,河南巩义予华仪器产品;电热恒温鼓风干燥

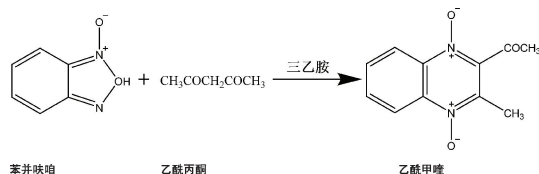
箱 DHG-9140A 型,嘉兴中新医疗仪器产品;显微熔点仪 XR4 型,上海光学仪器产品;傅里叶红外光谱仪 IRAffinity-1 型,日本 SHIMADZU 产品;质谱仪 6510 型,安捷伦科技产品;压力蒸汽灭菌器 YX280A 型,上海三申医疗器械产品;超净工作台,SW-CJ 型,苏州安泰空气技术公司产品;MF2 型全自动菌落-显微多功能一体机,杭州迅数科技有限公司产品;游标卡尺、接种针、打孔器、镊子、滤纸等均为市售。

### 1.2 方法

1.2.1 苯并氧化呋咱制备 500 mL 的烧杯中加入 20 g 邻硝基苯胺,100 mL 无水乙醇,水浴加热搅拌完全溶解,滴加 5 mL 20%氢氧化钠,溶液呈红褐色。冷水浴下用长颈漏斗缓慢滴加 180 mL 次氯酸钠溶液,2 h 滴加完,继续搅拌 3 h,产生大量黄色沉淀,抽滤,用蒸馏水洗涤 3 次,60 ℃烘干 2 h,得黄色粉末状固体,不需要重结晶,熔点 68 ℃~69 ℃(文献参考值<sup>[7]</sup> 69 ℃~71 ℃),产率为 96.5%。反应方程式:

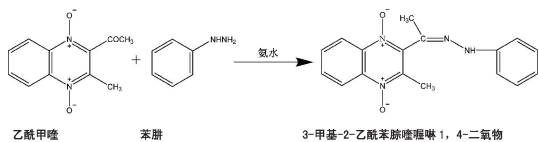


1.2.2 乙酰甲喹制备 100 mL 烧杯中加入 5 g 苯并呋咱,6 mL 乙酰丙酮中,搅拌至完全溶解。加入 18 mL 三乙胺,搅拌 30 min,室温下静置 1 d,抽滤,得乙酰甲喹粗品,将所得粗品用无水乙醇进行重结晶,得浅黄色针状结晶,熔点 152 ℃~154 ℃,产率为 78%。反应方程式:



1.2.3 3-甲基-2-乙酰苯胂脒喹喔啉 1,4-二氧化物的制备 将 6 g 乙酰甲喹,25 mL 乙醇置于 150 mL 三颈瓶中,水浴加热溶解,后向其中加入 3 g 苯胂,2 mL 氨水,于 40 ℃下搅拌 5 h,有大量结晶析出,减

压过滤,60℃烘干,用乙酸乙酯重结晶,得3-甲基-2-乙酰苯胺-喹啉1,4-二氧化物,产率为73.5%,熔点为212.1℃~212.7℃。化学方程式:



### 1.3 抑菌测试

**1.3.1 培养基的制备** 称取营养琼脂17.5g,放入盛有500mL的烧杯中,在电炉上加热,用玻璃杯搅拌,防止琼脂粉末沾到烧杯底部,溶解至溶液呈清澈状态,停止加热,稍稍冷却后倒入三角瓶中,在高压蒸汽灭菌锅中,高压灭菌20min,备用。

**1.3.2 滤纸片抑菌圈实验** 选取优质滤纸,用打孔器打出直径为6mm的滤纸片,用压力蒸汽灭菌器高压灭菌20min;用去离子水配制成0.5、1.0、1.5、2.0、2.5mg/mL的3-甲基-2-乙酰苯胺-喹啉1,4-二氧化物溶液各50mL。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;用无菌镊子夹取灭菌滤纸片,在不同浓度的溶液中充分浸湿后,贴在上述各种含菌平皿上,每种浓度的滤纸片在每只平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;然后将平皿放入28℃培养箱中培养48h。

**1.3.3 数据处理** 用MF2型全自动菌落-显微多功能一体机测量其抑菌圈直径。对每个平皿的3次重复取平均值,并对测量数据进行生物学统计分析与差异显著性检验,若差异显著,还应进行各个因素不同水平的多重比较,用来充分说明新化合物的抗菌效果。

## 2 结果与分析

### 2.1 新化合物结构表征

**2.1.1 红外光谱** IR(KBr)/cm<sup>-1</sup>: 3-甲基-2-乙酰苯胺-喹啉1,4-二氧化物在3500~500cm<sup>-1</sup>区域内出现吸收峰,3354cm<sup>-1</sup>强峰是N-H伸缩振动吸收谱带,3047cm<sup>-1</sup>强峰是苯环上C-H的伸缩振动吸收谱带,1602cm<sup>-1</sup>强峰是C=N的伸缩振动吸收谱带,1476cm<sup>-1</sup>强峰是N-N的伸缩振动吸收谱带,1323cm<sup>-1</sup>是N-O的伸缩振动吸收谱带。750cm<sup>-1</sup>中强峰是苯环邻位双取代特征吸收谱带。见图1。

**2.1.2 核磁共振谱(NMR)** ①:<sup>1</sup>HNMRδppm: 8.6(1H), 8.047(1H), 7.67~7.75(3H), 7.31(2H), 7.17

(2H), 6.95(1H), 3.05(3H), 2.51(3H); 见图2。

②:<sup>13</sup>CNMRδppm: 154.0, 145.6, 142.0, 142.0 141.0, 140.1, 135.0, 131.4, 131.4, 130.2, 129.8, 129.5, 120.5, 118.8, 113.6, 见图3。

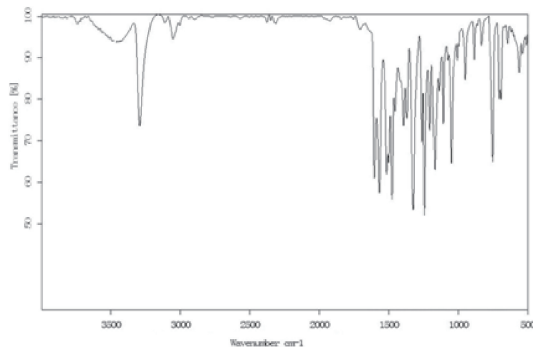


图1 3-甲基-2-乙酰苯胺喹啉1,4-二氧化物的红外光谱图

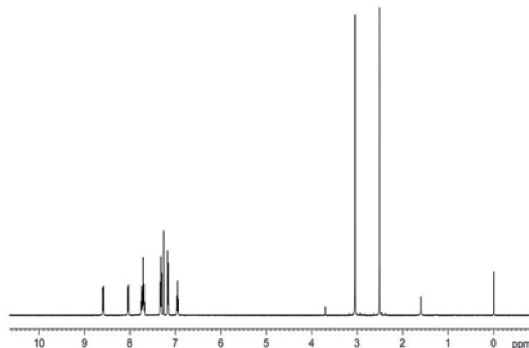


图2 3-甲基-2-乙酰苯胺喹啉1,4-二氧化物的<sup>1</sup>HNMR谱图

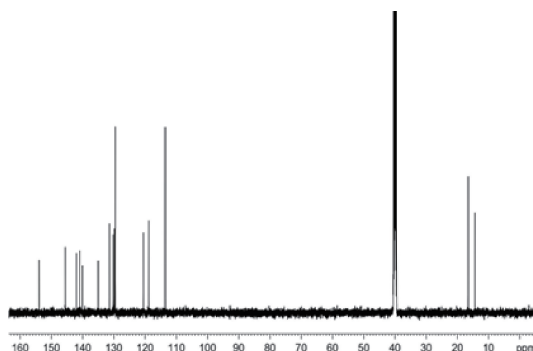


图3 3-甲基-2-乙酰苯胺喹啉1,4-二氧化物的<sup>13</sup>CNMR谱图

**2.1.3 质谱(MS)** 最大质荷比m/z=624.15,基峰m/z=291.18。确定该化合物分子量为308.12,分子式为C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>,见图4。

为了证明合成的新化合物为目标产物,做了以

上三种光谱分析。通过红外光谱确定了合成物的主要吸收峰;通过核磁共振氢谱和碳谱确定了合成物 H 与 C 的位置与含量;通过质谱确定了合成物的分子式与分子量。以上光谱分析的结果可证实所合成的新化合物确为 3-甲基-2-乙酰苯脲喹啉 1,4-二氧化物。

2.2 抑菌实验结果分析 用去离子水作对照,采用抑菌圈法测定目标化合物的抑菌活性。抑菌圈直径越大表明抑菌活性越强。抗菌实验测量数据见表 1。对上述数据进行两因素交叉分组有重复观测值试验资料的生物学统计分析与差异显著性判定(F 检验法)。经计算可得表 2。

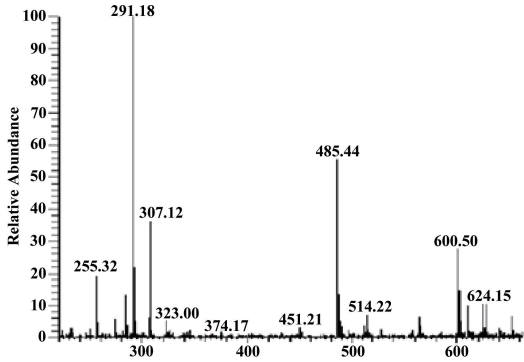


图 4 3-甲基-2-乙酰苯脲喹啉 1,4-二氧化物的质谱图

| 表 1 3-甲基-2-乙酰苯脲喹啉 1,4-二氧化物体外抑菌实验的抑菌圈直径 |                             |          |          |          |          | 单位:mm    |
|----------------------------------------|-----------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 菌株                                     | 药品浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> ) |          |          |          |          |          |
|                                        | 0                           | 0.5      | 1.0      | 1.5      | 2.0      | 2.5      |
| 大肠杆菌                                   | 5.8±0.4                     | 19.1±1.1 | 23.4±1.4 | 28.2±1.6 | 30.7±2.0 | 31.5±2.5 |
| 枯草杆菌                                   | 6.1±0.3                     | 18.3±1.0 | 24.6±1.5 | 25.1±1.5 | 29.4±1.9 | 32.2±2.5 |
| 金葡萄球菌                                  | 6.0±0.4                     | 9.4±0.7  | 12.8±1.1 | 23.2±1.2 | 24.5±1.7 | 28.3±2.3 |
| 青霉菌                                    | 6.0±0.2                     | 20.0±1.3 | 21.2±1.3 | 23.7±1.4 | 29.8±1.9 | 30.3±2.4 |
| x±s,n=3                                |                             |          |          |          |          |          |

| 表 2 不同化合物浓度和不同菌种抗菌实验资料方差分析表 |         |    |        |       |                   |
|-----------------------------|---------|----|--------|-------|-------------------|
| 变异来源                        | SS      | df | MS     | F     | 临界 F 值            |
| 药品浓度(A)                     | 4920.09 | 5  | 984.02 | 98402 | F0.01(5,48)=3.43  |
| 不同菌种(B)                     | 373.89  | 3  | 124.63 | 12463 | F0.01(3,48)=4.22  |
| 互相作用(A*B)                   | 240.41  | 15 | 16.09  | 1609  | F0.01(15,48)=2.43 |
| 误差(e)                       | 0.52    | 48 | 0.01   |       |                   |
| 总变异                         | 5534.9  | 71 |        |       |                   |
| a=6,b=4,n=3                 |         |    |        |       |                   |

因为合成化合物的药品浓度(A)的 $F>F_{0.01(5,48)}=3.43$ 、 $P<0.01$ ;不同菌种(B)的 $F>F_{0.01(3,48)}=4.22$ 、 $P<0.01$ ;交互作用(A\*B)的 $F>F_{0.01(15,48)}=2.43$ 、 $P<0.01$ ,表明药品浓度各水平的抑菌圈直径差异极显著、不同菌种各水平抑菌圈直径差异极显著、不同药品浓度与不同菌种的交互作用差异极显著。因而还需进行不同药品浓度抑菌圈直径的多重比较(采用q法)。

A因素各水平重复数为 $12(b*n)$ ,标准误为 $\bar{Sx}_A=0.03$ 。根据 $df_e=48$ ,秩次距 $k=2,3,4,5$ 查表得临界q值。 $LSR_\alpha=q_\alpha*\bar{Sx}_A$ 。经查表与计算可得表3、表4。

由多重比较表数据可得:不同浓度的目标产物对大肠杆菌、枯草杆菌、金葡萄球菌和青霉菌四种菌株的抑菌圈直径均比对照组大,差异极显著;且随着3-甲基-2-乙酰苯脲-喹啉 1,4-二氧化物质量浓度的增大,其对不同菌株的抗菌性极显著增加。

### 3 讨论与小结

在第一步反应,苯并呋咱的制备过程中,以乙醇为溶剂,邻硝基苯胺在碱性条件下被次氯酸钠氧化,产率高达96.5%。与文献<sup>[8]</sup>相比,本文反应过程无需加热,降低反应成本;其次,使用次氯酸钠强氧化剂,促进邻硝基苯胺氧化成呋咱环,使反应更快速,更完全,产率增加44%。

表 3 q 值与 LSR 值表

| df <sub>e</sub> | 秩次距 | q <sub>0.05</sub> | q <sub>0.01</sub> | LSR <sub>0.05</sub> | LSR <sub>0.01</sub> |
|-----------------|-----|-------------------|-------------------|---------------------|---------------------|
| 48              | 2   | 2.848             | 3.796             | 0.085               | 0.114               |
|                 | 3   | 3.424             | 4.334             | 0.103               | 0.130               |
|                 | 4   | 3.770             | 4.656             | 0.113               | 0.140               |
|                 | 5   | 4.016             | 4.886             | 0.120               | 0.147               |
|                 | 6   | 4.202             | 5.062             | 0.126               | 0.152               |

表 4 不同药品浓度抑菌圈直径的多重比较表(q 法)

| 不同药品浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> ) |       | 平均数 |   |
|-------------------------------|-------|-----|---|
| 0(A1)                         | 5.975 | a   | A |
| 0.5(A2)                       | 16.70 | b   | B |
| 1.0(A3)                       | 20.50 | c   | C |
| 1.5(A4)                       | 25.05 | d   | D |
| 2.0(A5)                       | 28.60 | e   | E |
| 2.5(A6)                       | 30.58 | f   | F |

中间产物乙酰甲喹的制备,苯并咪唑和乙酰丙酮以三乙胺为催化剂,反应条件温和,产率为 78%。与文献<sup>[9]</sup>相比,在本文反应过程中,乙酰丙酮(6 mL,5.88 g)稍过量,使苯并咪唑与乙酰丙酮反应比例为 1:1.2,室温下静置时间为 24 h,比文献<sup>[9]</sup>反应时间长 6 h,最后产率提高 16.8%。

在最后的苯胼脒缩合反应中,乙酰甲喹和苯胼的用量为 1:1,用乙醇作溶剂,乙酸乙酯重结晶,80℃条件下干燥,能获得较高纯度的目标产物,产率可达 73.5%。与其他新喹啉苯胼类衍生物的制备相比,如马敬中等<sup>[10-11]</sup>,产率增加 10%左右。

随着喹啉多方面生物活性<sup>[12]</sup>的探索,近年来含喹啉结构的衍生物被证明有一定的药理活性,可以作为抗结核药物成分<sup>[13]</sup>,治疗神经系统退行性疾病,还具有抗血栓降血糖<sup>[14]</sup>等功效。因此,喹啉衍生物的合成研究对人类疾病治疗方面具有重大意义。但是在喹啉类化合物的研究进展过程中,国内大多集中在其合成方法或工艺的改进,虽然产率越来越高,但大多数反应仍需要在高温条件下进行<sup>[1]</sup>。因此,温和条件下,选择性好、收率高地合成喹啉仍是有机合成领域中的一个重要课题。

本文以苯并咪唑、苯胼为原料,采用三乙胺

作为催化剂,进行缩合反应生成一种新型喹啉衍生物-喹啉苯胼,其熔点为 212.1℃~212.7℃。然后通过红外光谱、核磁共振谱和质谱法对其进行结构表征,证实了新喹啉产物,3-甲基-2-乙酰苯胼-喹啉 1,4-二氧化物的结构。在新喹啉合成的三步反应过程中,反应条件基本在室温条件下,比较温和,且催化剂的选择廉价安全,合成路线工艺稳定,与前人合成的中间产物和目标产物相比,大幅度提高了产品的产率。为有机合成领域中喹啉的合成提供了一种新的思路。

此外,为了在实践中更合理的应用于临床用药,本文通过抑菌实验,初步研究了 3-甲基-2-乙酰苯胼-喹啉 1,4-二氧化物的抑菌活性。并通过方差分析和差异显著性比较可得,新化合物的药品浓度对 4 种菌株都有很好的抑菌活性,这对于更全面地了解喹啉及其衍生物的药用价值具有重要意义,为今后作为新型高效抗菌药物应用于兽医临床提供一定的理论基础。

参考文献:

[1] 向沁洁,曾庆乐. 喹啉类化合物的合成研究进展[J]. 广州化工, 2014, 42(1):11-14.

[2] 吴玉杰,陈冬梅,陶燕飞,等. 高效液相色谱法测定动物组织中 3-甲基喹啉-2-羧酸残留量[J]. 分析科学学报, 2009, 25(4):427-430.

[3] 张春玲,许秀枝,王 艰,等. 3-取代喹啉衍生物的合成及其抗肿瘤活性的研究[J]. 广东药学院学报, 2013, 29(1): 25-28.

[4] Xun L I, Yang K H, Xian-Jun Q U, et al. Advances in the research of quinoxalinonederivatives [J]. Chinese Journal of Medicinal Chemistry, 2006,31(11):979-989.

[5] Villalobos-Rocha J C, Sánchez-Torres L, Noguera-Torres B, et al. Anti-Trypanosomacruzi and anti-leishmanial activity by quinoxaline-7-carboxylate 1,4-di-N-oxide derivatives[J].

- Parasitology Research, 2014, 113(6):2027-2035.
- [6] 李建立, 万玉春, 王艳菊, 等. 新型喹喔啉衍生物的合成、光物理性质及理论分析[J]. 发光学报, 2011, 32(10):1024-1029.
- [7] 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.
- [8] 刘宇芳, 刘博, 董振明, 等. 苯并呋咱的新法合成[J]. 山西大学学报(自然科学版), 2010, 33(2):244-246.
- [9] 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.
- [10] 马敬中, 王洪波, 江洪. 1,4-二氧喹喔啉-2-甲醛酞胺的合成和除草活性研究[J]. 精细化工, 2004, 21(4):309-312.
- [11] 马敬中, 胡超男, 占升卫, 等. 1,4-二氧喹喔啉甲醛双胺的合成及除草活性研究[J]. 现代化工, 2005, 25(6):27-28.
- [12] 李荀, 杨康辉, 曲显俊, 等. 喹喔啉类化合物的生物活性研究进展[J]. 药学研究, 2007, 26(1):34-36.
- [13] Jaso A, Zarranz B, Aldana I, *et al.* Synthesis of new quinoxaline-2-carboxylate 1,4-dioxide derivatives as anti-Mycobacterium tuberculosis agents.[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2005, 48(6):2019-25.
- [14] Dudash J, Zhang Y, Moore J B, *et al.* Synthesis and evaluation of 3-anilino-quinoxalinones as glycogen phosphorylase inhibitors [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2005, 15(21):4790-4793.

(编辑:陈希)