

三氮唑修饰 β -内酰胺分子的合成及抗菌活性研究



吴女江, 王震, 崔雪, 李浩海, 王雪松*

海南医科大学药学院, 海南海口 571199

摘要: 目的 设计合成 β -内酰胺三氮唑化合物。方法 以三氮唑和 6-氨基青霉烷酸为起始原料, 通过活性拼接原理, 合成一类 β -内酰胺三氮唑化合物, 采用核磁共振氢谱及碳谱、质谱等技术确定其分子结构表征后, 再测定目标化合物的抗菌及抑制 β -内酰胺活性的能力。结果 合成了 3 种未见文献报道的目标化合物。经三批次重复实验验证, 测定化合物最小抑菌浓度 (MIC): 阴性对照组呈现稳定的细菌增值, 空白对照无菌生长表明其本身抗菌能力的有效可靠性; 测定化合物抑制 β -内酰胺酶活: CX-1 (目标化合物 1) 具有潜在的 β -内酰胺酶抑制特性, 而结构类似的 CX-2 (目标化合物 2)、CX-3 (目标化合物 3) 作用相对较弱, 但对 β -内酰胺酶都有抑制作用。结论 该研究对进一步结构优化寻找良好的抗菌疗效且合成路线简单的化合物有重要意义。

关键词: 三氮唑; β -内酰胺; 抗生素; 活性测定

DOI: [10.57237/j.cse.2025.01.002](https://doi.org/10.57237/j.cse.2025.01.002)

Synthesis and Antibacterial Activity Study of Triazole-Modified β -Lactam Molecules

Nvjiang Wu, Zhen Wang, Xue Cui, Haohai Li, Xuesong Wang*

College of Pharmacy, Hainan Medical University, Haikou 571199, China

Abstract: *Objective* To design and synthesize β -lactam triazole compounds. *Methods* Using triazole and 6-aminopenicillanic acid as starting materials, a series of β -lactam triazole compounds were synthesized based on the principle of active splicing. The molecular structures were characterized by ^1H NMR, ^{13}C NMR and mass spectrometry. The antibacterial activity and the ability to inhibit β -lactamase of the target compounds were then determined. *Results* Three target compounds not reported in the literature were synthesized. After three batches of repeated experiments, the minimum inhibitory concentration of the compounds was determined: the negative control group showed stable bacterial growth, and the blank control group had no bacterial growth, indicating the validity and reliability of the antibacterial ability of the compounds themselves; the inhibitory effect of the compounds on β -lactamase activity was determined: CX-1 (target compound 1) had potential β -lactamase inhibitory properties, while the structurally similar CX-2 (target compound 2) and CX-3 (target compound 3) had relatively weak effects, but all had inhibitory effects on β -lactamase. *Conclusion* This study holds significant importance for future research directions. By leveraging the findings from this study, researchers can focus on modifying the molecular structures of these β -lactam triazole compounds to discover new

基金项目: 海南医科大学 2024 大学生创新创业训练计划项目 (项目编号: X202411810085).

*通信作者: 王雪松, wangxuesong@muhn.edu.cn

收稿日期: 2025-04-30; 接受日期: 2025-06-23; 在线出版日期: 2025-07-04

<http://www.chemscieng.com>

compounds with enhanced antibacterial efficacy and more straightforward synthetic routes.

Keywords: Triazole; β -Lactam; Antibiotic; Antibacterial Activity

1 引言

自青霉素被发现可用于治疗细菌感染以来,越来越多的青霉素类抗生素被用于临床,久而久之细菌也出现了耐药性[1]。因此,合成全新的青霉素类抗生素或者新的具有抗菌活性的类似物刻不容缓。目前临床上应用的 β -内酰胺酶抑制剂主要有克拉维酸、舒巴坦、三唑巴坦及他唑巴坦[2]。同时,在前期的文献调研中,我们发现三氮唑可形成多种非共价键,是药物分子中常见的官能团,它在药物化学领域中占据重要位置[3]。同样我们也发现三氮唑骨架存在于抗菌药物中,例如舒巴坦 2-位的甲基上引入一个三氮唑,得到了迄今为止应用最为广泛的 β -内酰胺酶抑制剂--他唑巴坦,且其比舒巴坦更稳定、抗感染效果更好[4]。他唑巴坦是目前临床上效果最佳的 β -内酰胺酶抑制剂[5]。同时在市场上也有很强的优势,他唑巴坦显示了强大的优势[6]。但是,目前他唑巴坦的工业合成是以 6-氨基青霉烷酸为原料,经 10 步反应来完成的,该反应步骤复杂繁琐,低收率,高污染等问题的存在,限制了该工艺路线在大规模合成他唑巴坦的应用[7]。所以,我们想要通过活性拼接原理,将三氮唑与 6-APA 连接起来,合成一类 β -内酰胺三氮唑化合物,寻求与他唑巴坦具有同等或类似抗菌功效且合成路线简单的活性化合物。因此,依托本实验的实施,可期望绿色高效地合成三氮唑修饰的 β -内酰胺化合物,并在此基础上完成抗菌活性测定。

2 β -内酰胺三氮唑化合物的合成

2.1 实验试剂

6-氨基青霉烷酸,安耐吉化学; 9-溴茱,天津市希恩思生化科技有限公司; 双三苯基磷二氯化钡,苯甲酰氯,Adamas-beta 公司; 对氨基苯甲酸乙酯,Adamas-beta 公司; 叔丁醇锂,安耐吉化学; 对甲苯磺酰叠氮,安耐吉化学; HATU,Adamas-beta 公司; DIPEA,阿拉丁公司; 1,3,5-三甲氧基苯,Adamas-beta 公司。

2.2 目标化合物的合成

2.2.1 6-APA 上羧基的保护

在装有无水二氯甲烷(10 mL)的 50 mL 茄形瓶中,加入 6-APA (1 g, 4.6 mmol) 和三乙胺 (0.9292 g, 9.2 mmol) 搅拌至溶解,再加入乙酰乙酸乙酯 (0.598 g, 4.6 mmol) 继续搅拌 3 小时。然后将溶剂真空除去,加入 9-溴茱 (1.127 g, 4.6 mmol) 溶解在 DMF (10 mL) 中,并将反应混合物搅拌过夜,后用乙酸乙酯稀释溶液并用盐水洗涤 (3 \times 15 mL),将合并的有机层用无水硫酸镁干燥,减压浓缩,经硅胶柱层析分离(洗脱剂: PE/EtOAc = 20/1, 15/1, 10/1, v/v),得白色固体(化合物 2)。将化合物 2 溶于丙酮 (10 mL) 中,加入对甲苯磺酸一水合物 (0.969 g, 5.1 mmol) 1 h 后出现白色沉淀,过滤,滤饼用乙醚 (5 mL) 洗涤。最后,将滤饼溶于二氯甲烷 (20 mL) 中,加入三乙胺 (0.9292 g, 9.2 mmol) 并搅拌 2 h,再加入 NaOH 溶液 (1M, 10 mL) 分离有机相,水相用二氯甲烷萃取,合并所有有机相,用盐水 (10 mL) 洗涤,干燥并减压浓缩,经硅胶柱层析分离(洗脱剂: PE/EtOAc = 3/1, 2/1, v/v),得白色粉末(化合物 3, 0.3535 g, 20%),合成路线如图 1 所示[8]。

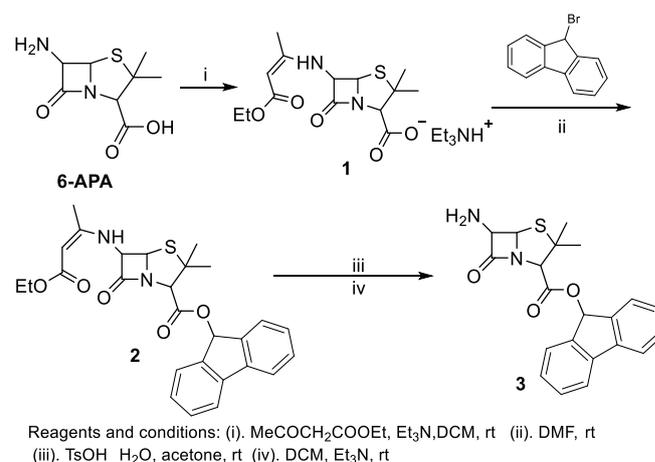


图 1 羧基的保护

2.2.2 化合物 CX-1 的合成

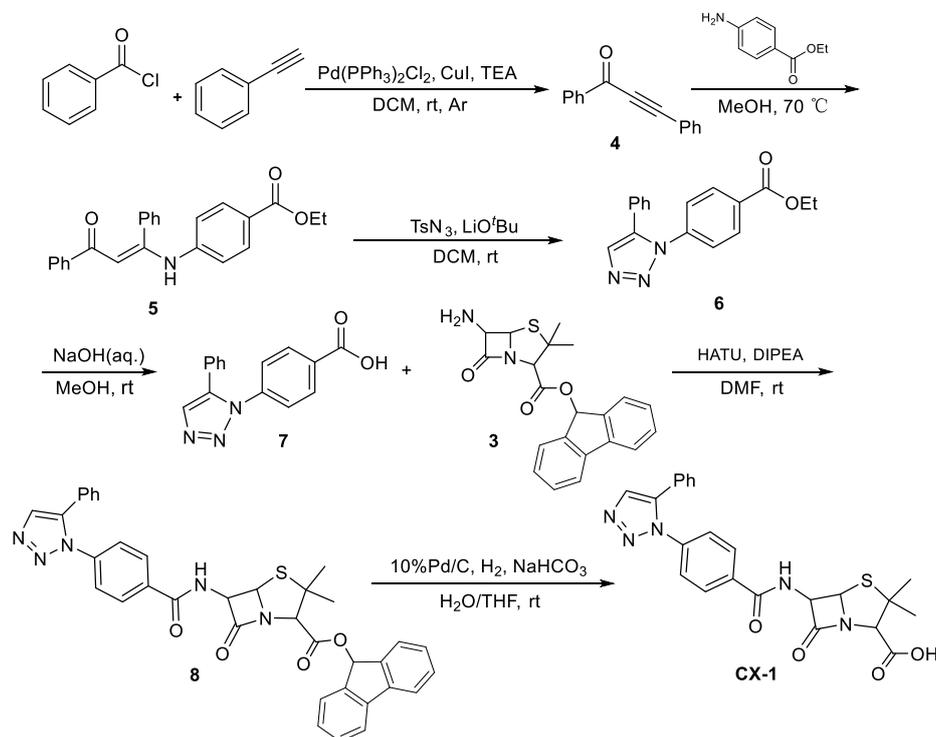


图2 化合物 CX-1 合成路线

依次将双三苯基磷二氯化钯 (0.21 g, 0.3 mmol)、苯甲酰氯 (1.4 g, 10 mmol)、苯乙炔 (1.276 g, 11 mmol)、三乙胺 (3.5 mL) 加入装有 30 mL 二氯甲烷的 100 mL 茄形瓶中, 最后加入碘化亚铜 (0.19 g, 1 mmol) 在氩气保护下反应 12 h。将反应液经硅藻土过滤, 加水 (3×40 mL) 萃取 3 次, 将有机层干燥后, 减压浓缩, 经硅胶柱层析分离 (洗脱剂: PE/EtOAc = 500/1, 400/1, 300/1, v/v) 得棕黄色固体 (化合物 4)。向 50 mL 茄形瓶中依次加入化合物 4 (1.03 g, 5 mmol)、对氨基苯甲酸乙酯 (0.825 g, 5 mmol), 再加入 10 mL 甲醇, 70 °C 回流 6 h。旋干溶剂, 经硅胶柱层析分离 (洗脱剂: PE/EtOAc = 30/1, 25/1, 20/1, v/v) 得黄色粉末 (化合物 5, 1.06g, 57%)。将化合物 5 (0.371 g, 1 mmol)、叔丁醇锂 (0.24 g, 3 mmol) 依次加入 25 mL 茄形瓶中, 再加入 4 mL 二氯甲烷以及对甲苯磺酰叠氮 (TsN₃, 0.394 g, 2 mmol) 室温反应 12 h, TLC 检测反应基本完全后, 用水 (3×20 mL) 和二氯甲烷 (20 mL) 萃取 3 次, 无水硫酸镁干燥, 减压浓缩, 经硅胶柱层析分离 (洗脱剂: PE/EtOAc = 20/1, 15/1, 10/1, v/v), 得白色固体 (化合物 6, 0.23 g, 产率 78%)。将化合物 6 (0.1465 g, 0.5 mmol) 溶于 4 mL 甲醇中, 再滴加氢氧化钠溶液 (0.2 g, 5 mmol, 溶于 0.5 mL 水), 室

温反应 12 h, TLC 检测反应完全后, 用 2N HCl 溶液调 pH 约为 2, 用水 (20 mL) 和乙酸乙酯 (3×20 mL) 萃取 3 次, 无水硫酸镁干燥, 减压浓缩, 得白色固体 (化合物 7, 0.136 g, 产率 97%)。将化合物 7 (0.1325 g, 0.5 mmol)、HATU (0.22 g, 0.58 mmol) 溶于 2 mL DMF 中, 再滴加 DIPEA (0.075 g, 0.58 mmol), 室温反应 30 min 后, 加入化合物 3 (0.152 g, 0.4 mmol), 反应过夜, TLC 检测反应基本完全后, 用水 (3×20 mL) 和乙酸乙酯 (20 mL) 萃取 3 次, 无水硫酸镁干燥, 减压浓缩, 经硅胶柱层析分离 (洗脱剂: PE/EtOAc = 3/1, 2/1, v/v), 得黄色油状液体 (化合物 8, 0.23 g, 产率 92%)。将化合物 8 (0.3135 g, 0.5 mmol)、NaHCO₃ (0.084 g, 1 mmol) 加入到 THF (2 mL) 和水 (2 mL) 的混合溶液中, 最后加入 5% Pd/C (1.0g), 将反应瓶连接上氢气球, 室温反应 12 h, 将 Pd/C 过滤并用 THF (1 mL) 和水 (1 mL) 的混合液洗涤, 加入柠檬酸 (0.126 g, 0.6 mmol) 酸化 30 min 后, 加水 (5 mL) 和乙酸乙酯 (3×5 mL) 萃取 3 次, 有机层用无水硫酸镁干燥, 减压浓缩, 经硅胶柱层析分离 (洗脱剂: 乙酸乙酯/石油醚 = 2/1, 3/1, 1% CH₃COOH, v/v), 得淡黄色油状液体 (化合物 CX-1, 0.095g, 产率 40%), 合成路线如图 2 所示。

2.2.3 化合物 CX-2 的合成

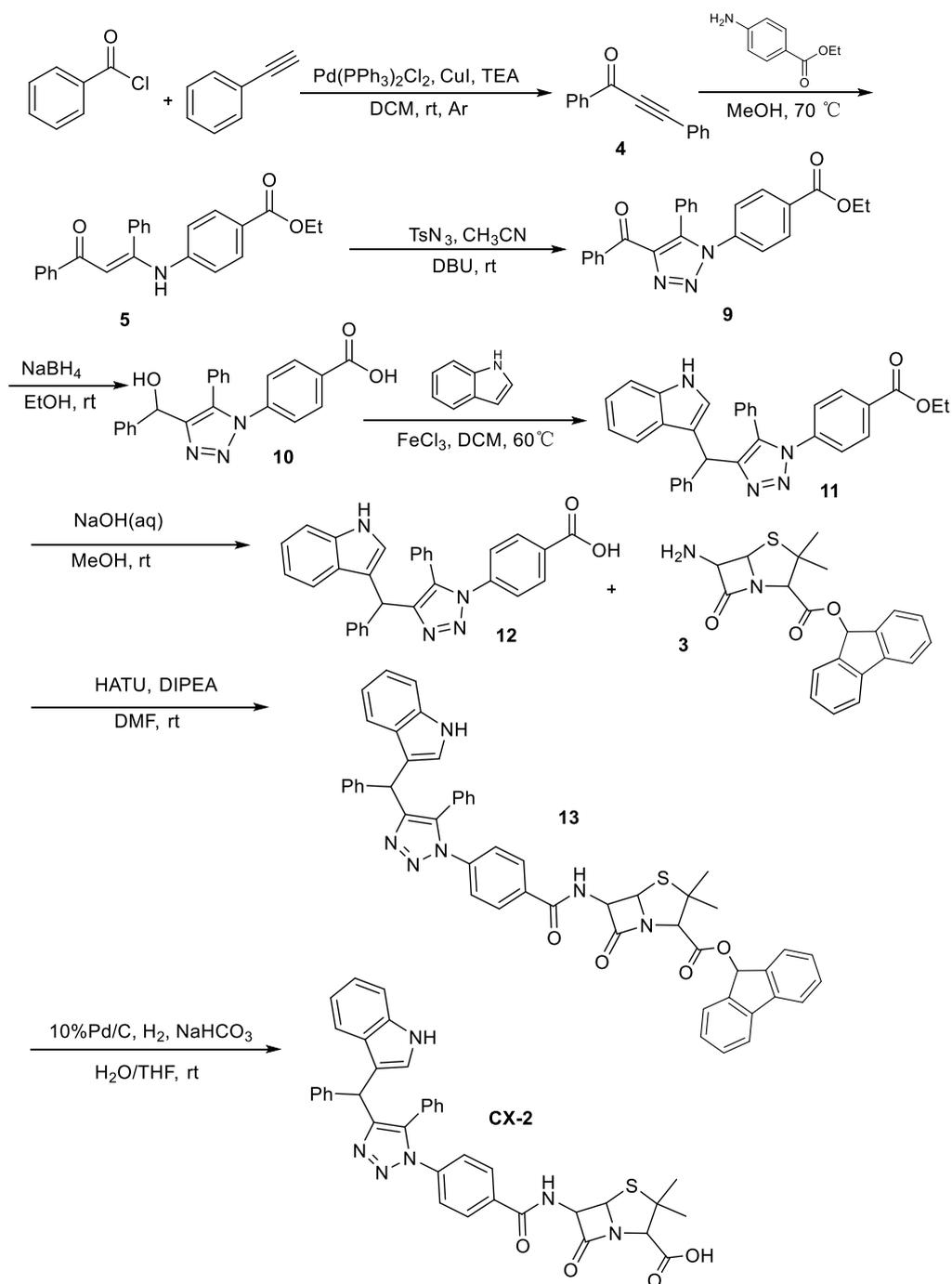


图3 化合物 CX-2 合成路线

依次将双三苯基磷二氯化钯 (0.21 g, 0.3 mmol)、苯甲酰氯 (1.4 g, 10 mmol)、苯乙炔 (1.276 g, 11 mmol)、三乙胺 (3.5 mL) 加入装有 25 mL 二氯甲烷的 100 mL 茄形瓶中, 最后加入碘化亚铜 (0.19 g, 1 mmol) 在氩气保护下反应 12 h。将反应液经硅藻土过滤, 加水

(3×40 mL) 萃取 3 次, 将有机层干燥后, 减压浓缩, 经硅胶柱层析分离 (洗脱剂: PE/EtOAc = 500/1, 400/1, 300/1, v/v) 得棕黄色固体 (化合物 4)。向 50 mL 茄形瓶中依次加入化合物 4 (1.03 g, 5 mmol)、对氨基苯甲酸乙酯 (0.825 g, 5 mmol), 再加入 10 mL 甲醇, 70°C

回流 6 h。旋干溶剂, 经硅胶柱层析分离 (洗脱剂: PE/EtOAc = 30/1, 25/1, 20/1, v/v) 得黄色粉末 (化合物 5, 1.06 g, 57%)。将化合物 5 (0.742 g, 2 mmol) 溶于 5 mL 乙腈中, 再滴加对甲苯磺酰叠氮 (TsN_3 , 0.788 g, 4 mmol)、DBU (0.608 g, 4 mmol) 室温反应 2 h, TLC 检测反应基本完全后, 减压浓缩, 经硅胶柱层析分离 (洗脱剂: PE/EtOAc = 20/1, 15/1, 10/1, v/v), 得白色粉末 (化合物 9, 0.508 g, 产率 64%)。将化合物 9 (0.397 g, 1 mmol)、硼氢化钠 (0.074 g, 2 mmol) 溶于 4 mL 乙醇中, 室温反应 4 h, TLC 检测反应完全后, 加水淬灭, 用乙酸乙酯 (3×10 mL) 萃取 3 次, 有机层用无水硫酸镁干燥, 减压浓缩, 经硅胶柱层析分离 (洗脱剂: PE/EtOAc = 5/1, 4/1, 3/1, v/v), 得白色粉末 (化合物 10, 0.356 g, 产率 89%)。将化合物 10 (0.2 g, 0.5 mmol)、吡啶 (0.0877 g, 0.75 mmol) 溶于 2 mL DCM 中, 最后加入无水三氯化铁 (0.04 g, 0.25 mmol), 60 °C 回流 12 h, TLC 检测反应基本完全后, 经硅胶柱层析分离 (洗脱剂: PE/EtOAc = 10/1, 8/1, 6/1, v/v), 得白色粉末 (化合物 11, 0.229 g, 产率 92%)。将化合物 11 (0.4 g, 0.8 mmol) 溶于 4 mL 甲醇中, 再滴加氢氧化钠溶液 (0.32 g, 8 mmol, 溶于 0.5 mL 水), 室温反应 12 h, TLC 检测反应完全后, 用 2N HCl 溶液调 pH 约为 2, 用水 (20 mL) 和乙酸乙酯 (3×20 mL) 萃取 3 次, 有机层用无水硫酸镁干燥, 减压浓缩, 得白色固体 (化合物 12, 0.38 g, 产率 97%)。将化合物 12 (0.235 g, 0.5 mmol)、HATU (0.22 g, 0.58 mmol) 溶于 2 mL DMF 中, 再滴加 DIPEA (0.075 g, 0.58 mmol), 室温反应 30 min 后, 加入化合物 3 (0.152 g, 0.4 mmol), 反应过夜, TLC 检测反应基本完全后, 用水 (3×20 mL) 和乙酸乙酯 (20 mL) 萃取 3 次, 有机层用无水硫酸镁干燥, 减压浓缩, 经硅胶柱层析分离 (洗脱剂: PE/EtOAc = 3/1, 2/1, v/v), 得黄色油状液体 (化合物 13, 0.316 g, 产率 95%)。将化合物 13 (0.25 g, 0.3 mmol)、 NaHCO_3 (0.05 g, 0.6 mmol) 加入到 THF (1.5 mL) 和水 (1.5 mL) 的混合溶液中, 最后加入 5% Pd/C (0.6 g), 将反应瓶连接上氢气球, 室温反应 12 h, 将 Pd/C 过滤并用 THF (1 mL) 和水 (1 mL) 的混合液洗涤, 加入柠檬酸 (0.084 g, 0.4 mmol) 酸化 30 min 后, 加水 (5 mL) 和乙酸乙酯 (3×5 mL) 萃取 3 次, 有机层用无水硫酸镁干燥, 减压浓缩, 经硅胶柱层析分离 (洗脱剂: 乙酸乙酯/石油醚 = 2/1, 3/1, 1% CH_3COOH , v/v), 得淡黄色油状液体 (化合物 CX-2, 0.101 g, 产率 50%), 合成路线如图 3 所示。

2.2.4 化合物 CX-3 的合成

依次将双三苯基磷二氯化钯 (0.21 g, 0.3 mmol)、苯甲酰氯 (1.4 g, 10 mmol)、苯乙炔 (1.276 g, 11 mmol)、三乙胺 (3.5 mL) 加入装有 25 mL 二氯甲烷的 100 mL 茄形瓶中, 最后加入碘化亚铜 (0.19 g, 1 mmol) 在氩气保护下反应 12 h。将反应液经硅藻土过滤, 加水 (3×40 mL) 萃取 3 次, 干燥后, 减压浓缩, 经硅胶柱层析分离 (洗脱剂: PE/EtOAc = 500/1, 400/1, 300/1, v/v) 得棕黄色固体 (化合物 4)。向 50 mL 茄形瓶中依次加入化合物 4 (1.03 g, 5 mmol)、对氨基苯甲酸乙酯 (0.825 g, 5 mmol), 再加入 10 mL 甲醇, 70 °C 回流 6 h。旋干溶剂, 经硅胶柱层析分离 (洗脱剂: PE/EtOAc = 30/1, 25/1, 20/1, v/v) 得黄色粉末 (化合物 5, 1.06 g, 57%)。将化合物 5 (0.742 g, 2 mmol) 溶于 5 mL 乙腈中, 滴加对甲苯磺酰叠氮 (TsN_3 , 0.788 g, 4 mmol)、DBU (0.608 g, 4 mmol) 室温反应 2 h, TLC 检测后, 减压浓缩, 经硅胶柱层析分离 (洗脱剂: PE/EtOAc = 20/1, 15/1, 10/1, v/v), 得白色粉末 (化合物 9, 0.508 g, 产率 64%)。将化合物 9 (0.397 g, 1 mmol)、硼氢化钠 (0.074 g, 2 mmol) 溶于 4 mL 乙醇中, 室温反应 4 h, TLC 检测后, 加水淬灭, 用乙酸乙酯 (3×10 mL) 萃取 3 次, 无水硫酸镁干燥, 减压浓缩, 经硅胶柱层析分离 (洗脱剂: PE/EtOAc = 5/1, 4/1, 3/1, v/v), 得白色粉末 (化合物 10, 0.356 g, 产率 89%)。将化合物 10 (0.12 g, 0.3 mmol)、1, 3, 5-三甲氧基苯 (0.0756 g, 0.45 mmol) 溶于 2 mL DCM 中, 最后加入无水三氯化铁 (0.024 g, 0.15 mmol), 60 °C 回流 12 h, TLC 检测后, 经硅胶柱层析分离 (洗脱剂: PE/EtOAc = 10/1, 8/1, 6/1, v/v), 得白色粉末 (化合物 14, 0.138 g, 产率 84%)。将化合物 14 (0.1647 g, 0.3 mmol) 溶于 3 mL 甲醇中, 再滴加氢氧化钠溶液 (0.12 g, 3 mmol, 溶于 0.5 mL 水), 室温反应 12 h, TLC 检测后, 用 2N HCl 溶液调 pH 约为 2, 用水 (20 mL) 和乙酸乙酯 (3×20 mL) 萃取 3 次, 干燥后, 减压浓缩, 经硅胶柱层析分离 (洗脱剂: PE/EtOAc = 3/1, 2/1, 1/1, 1% CH_3COOH , v/v), 得白色固体 (化合物 15, 0.1 g, 产率 64%)。将化合物 15 (0.245 g, 0.47 mmol)、HATU (0.205 g, 0.54 mmol) 溶于 2 mL DMF 中, 再滴加 DIPEA (0.07 g, 0.54 mmol), 室温反应 30 min 后, 加入化合物 3 (0.14 g, 0.37 mmol), 反应过夜, TLC 检测后, 用水 (3×20 mL) 和乙酸乙酯 (20 mL) 萃取 3 次, 无水硫酸镁干燥, 减压浓缩, 经硅胶柱层析分离 (洗脱剂: PE/EtOAc = 3/1, 2/1, v/v),

得黄色油状液体(化合物 16, 0.196 g, 产率 60%)。将化合物 16 (0.106 g, 0.12 mmol)、 NaHCO_3 (0.02 g, 0.24 mmol) 加入到 THF (1.5 mL) 和水 (1.5 mL) 的混合溶液中, 最后加入 5% Pd/C (0.24 g), 将反应瓶连接上氢气球, 室温反应 12 h, 将 Pd/C 过滤并用 THF (1 mL) 和水 (1 mL) 的混合液洗涤, 加入柠檬酸 (0.042

g, 0.2 mmol) 酸化 30 min 后, 加水 (5 mL) 和乙酸乙酯 (3 \times 5 mL) 萃取 3 次, 有机层干燥, 减压浓缩, 经硅胶柱层析分离(洗脱剂: 乙酸乙酯/石油醚 = 2/1, 3/1, 1% CH_3COOH , v/v), 得淡黄色油状液体(化合物 CX-3, 0.045g, 产率 52%), 合成路线如图 4 所示。

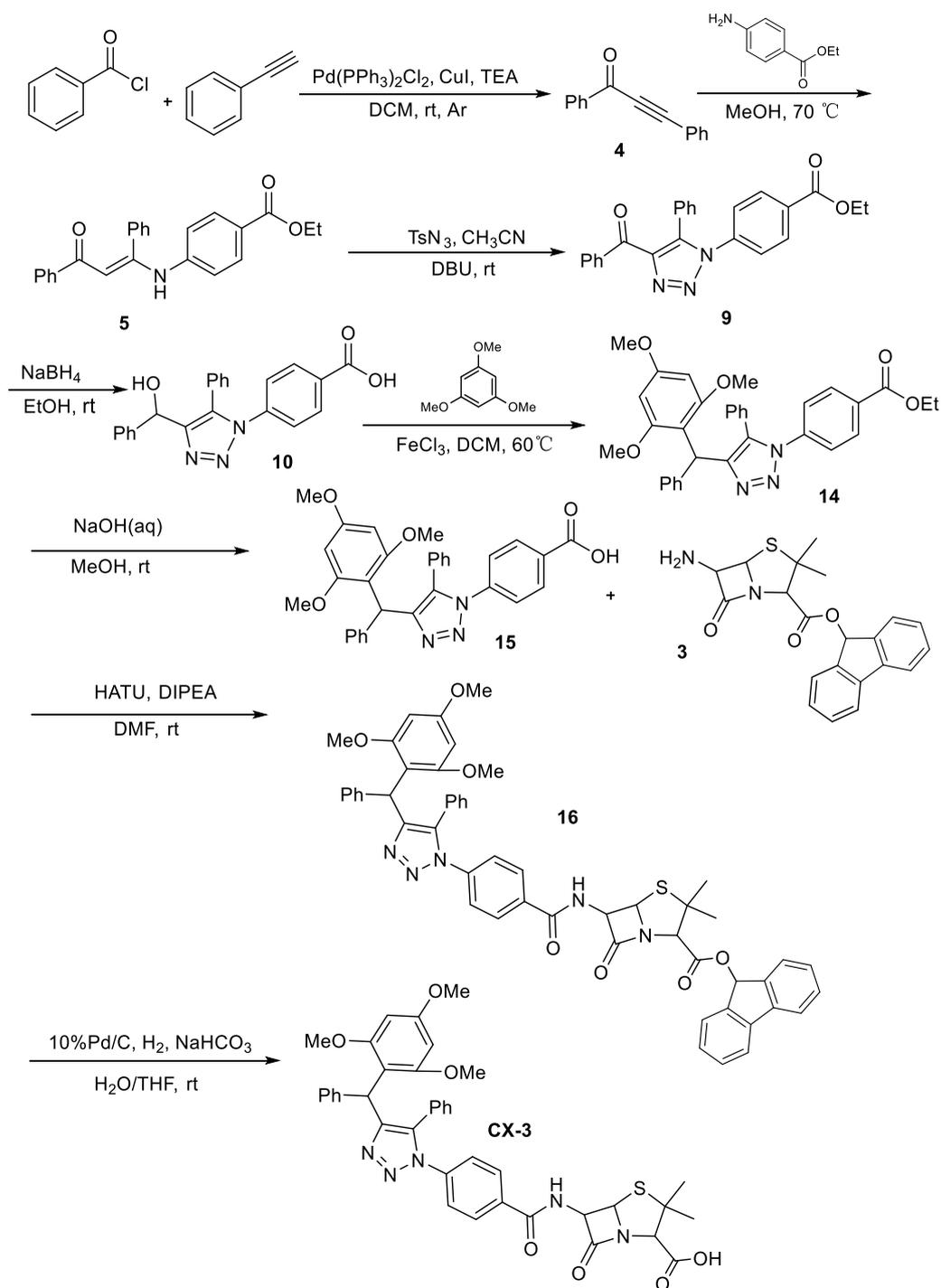


图 4 化合物 CX-3 合成路线

3 化合物最小抑菌浓度 (MIC) 的测定

3.1 实验材料

试剂: MH (B) 培养基, Solarbio 公司; 氨苄西林钠, Solarbio 公司。

菌株: 金黄色葡萄球菌 (ATCC 6538)、大肠杆菌 (ATCC 25922), 广东环凯微生物科技有限公司; 变形链球菌 (ATCC 25175), 中国微生物菌种保藏中心。

3.2 实验方法

3.2.1 培养基的配制

Mueller Hinton 液体培养基: 0.24 g 干粉 MH (B) 培养基溶于 10 mL 蒸馏水, 再取 2.4 g 干粉 MH (B) 培养基溶于 100 mL 蒸馏水[9]。

3.2.2 样品药液及阳性药液的配制

样品药液: 精确称取样品 CX-1 (5.93 mg)、CX-2 (8.56 mg)、CX-3 (9.21 mg) 于 1.5 mL ep 管, 加入 1 mL DMSO 使其完全溶解, 得到浓度为 12.8 mM 的母液, 再用液体培养基进行二倍稀释, 得到浓度为: 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 μM 的药液备用。

阳性药液: 精确称取 0.29 mg 氨苄西林钠 (Amp), 溶于 6 mL 液体培养基中, 得到浓度为 128 μM 的母液, 再用液体培养基进行二倍稀释, 得到浓度为: 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 μM 的药液备用[10]。

3.2.3 菌液的配制

在无菌条件下, 取单个菌落于已灭菌过的 10 mL 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床 200r/min, 培养 24 h, 测定其 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 后, 将其用培养基稀释 1000 倍, 此时菌液浓度为 $1.0 \times 10^5 \text{CFU/mL}$ 备用[11]。

3.2.4 样品的测定

在 96 孔板上的第 1 列-第 11 列依次加入 50 μL 菌液, 第 A 行-第 D 行中的第 1 列-第 11 列依次加入不同浓度的样品溶液, 浓度从 1 到 11 由大到小 (128,

64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 μM); 第 E 行-第 H 行中的第 1 列-第 11 列依次加入不同浓度的阳性药溶液, 浓度从 1 到 11 由大到小 (32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125 μM); 在第 12 列前四孔中加入 50 μL 菌液和 50 μL 培养基 (无药液的阴性对照), 后四孔中加入 100 μL 培养基 (空白对照)。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 生化培养箱中, 培养 24h 后, 观察结果。

3.3 结果与讨论

表 1 样品对 3 种细菌的 MIC (μM)

化合物	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	变形链球菌
CX-1	>128	2	8
CX-2	>128	4	4
CX-3	>128	8	4
Amp	4	0.0625	0.125

注: 1. 肉眼观察浑浊的前一孔即为该化合物的 MIC 值; 2. 读取 MIC 值时, 若第 11 列孔澄清, 则继续稀释, 直至读取到浑浊的前一孔即为 MIC 值; 若第 1 孔浑浊, 则记为 $>128\mu\text{M}$ 。

经过一段时间的培养后, 每个 96 孔板的阴性对照组均有细菌正常生长, 空白对照组均无细菌生长, 且重复三次实验后结果均如此, 因此实验结果较为可信。如表 1 所示, 可以看出化合物 CX-1、CX-2、CX-3 均可抑制金黄色葡萄球菌以及变形链球菌的生长, 但都不如阳性药-氨苄西林。其中 CX-2 对这两种细菌的抑制效果相仿, MIC 均为 4 μM , 而 CX-1 对金黄色葡萄球菌的抑制效果优于变形链球菌, CX-3 则正好相反; 但测试的 3 种化合物对大肠杆菌均无抑制活性。

4 化合物抑制 β -内酰胺酶活性的测定

4.1 实验原理

头孢硝基噻吩是一种显色 β -内酰胺酶底物, 当 β -内酰胺环中的酰胺键被 β -内酰胺酶水解时, 颜色会从黄色变为红色。完整结构的头孢硝基噻吩处于紫外吸收区 (约 380 nm 处), 其酶解产物迁移到可见光谱区 (约 500 nm 处)。因此, 可以通过检测 492 nm 处的吸光度得到其酶解产物的含量, 从而算出化合物对酶的百分抑制率[12]。

4.2 实验方法

4.2.1 储液的制备

样品溶液的制备：将化合物 CX-1 由母液 12.8 mM 稀释成 8 μ M、4 μ M、2 μ M、1 μ M、100 nM、10 nM、1 nM 的溶液，备用。再将化合物 CX-2、CX-3 稀释成 100 nM 溶液，备用[13]。

1x 激酶缓冲液的制备：20 mM HEPES 缓冲液，0.25M NaCl 溶液，1 μ g/mL BSA，0.01% Triton X-100。

头孢硝基噻吩溶液的配制：将 1.033 mg 头孢硝基噻吩溶于 DMSO，再加入 1x 激酶缓冲液，浓度为 2 mM [14]。

4x OXA-23 的制备：将母液为 50 μ g/mL 的 OXA-23，加 1x 激酶缓冲液稀释成 1.2 μ g/mL OXA-23 备用。

4.2.2 化合物活性测定

在 96 孔板的第 1 列-第 8 列的第 A 行-第 C 行，依次加入 50 μ L 浓度为 8 μ M、4 μ M、2 μ M、1 μ M、100 nM、10 nM、1 nM 的化合物 CX-1，1x 激酶缓冲液；再加入 1.2 μ g/mL OXA-23，每孔 25 μ L，37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min 后；加入 2 mM 头孢硝基噻吩，每孔 25 μ L，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min；在 492 nm 处，测定吸光度，计算抑制率。浓度为 100 nM 化合物 CX-2、CX-3 操作同上，测定其在 492 nm 处的吸光度，并计算抑制率[15]。

4.3 数据处理

化合物对酶的抑制率，计算公式：

$$\text{抑制率(\%)} = 1 - \frac{\text{NHC}_{\text{样品}}}{\text{NHC}_{\text{阴性}}} \times 100$$

NHC：头孢硝基噻吩水解常数

NHC_{阴性}：板上所有阴性对照的平均水解常数（1x 激酶缓冲液）

4.3.1 结果与讨论

表 2 不同浓度样品对 β -内酰胺酶的抑制率

化合物	浓度 (μ M)	吸光度	抑制率
CX-1	8	0.418	-1.38%
	4	0.379	8.09%
	2	0.420	-1.86%
	1	0.407	1.13%
	0.1	0.348	15.53%
	0.01	0.387	6.07%

化合物	浓度 (μ M)	吸光度	抑制率
CX-2	0.001	0.433	-5.10%
CX-3	0.1	0.383	7.16%
阴性	0.1	0.409	0.73%
		0.412	

实验结果如表 2 所示，首先我们以最小抑菌浓度实验为基础，对不同浓度的 CX-1 进行了抑制 β -内酰胺酶活性的测定，结果表明：当浓度为 4 μ M、0.1 μ M、0.01 μ M 时，CX-1 对 β -内酰胺酶有抑制作用，以 0.1 μ M 为最佳，抑制率为 15.53%；我们再以 0.1 μ M 为浓度，对化合物 CX-2、CX-3 进行了测定，其抑制率分别为 7.16%、0.73%，结果均不如化合物 CX-1，且 CX-3 基本无抑制作用。

5 结论

通过化合物最小抑菌浓度 (MIC) 和抑制 β -内酰胺酶活性的测定，我们得出以下结论：合成的 β -内酰胺三氮唑化合物具有良好的抗菌能力和抑制 β -内酰胺酶的特性。此外，通过合成 β -内酰胺三氮唑化合物的设计可以为未来的药物筛选提供新的思路，为寻求和探索具有良好抗菌疗效且合成路线简单的化合物有重要意义。

参考文献

- [1] 李显志, 张丽. 细菌抗生素耐药性: 耐药机制与控制策略 [J], 泸州医学院学报, 2011, 34(5): 445-455.
- [2] 蔡文辉, 张文莉, 付英梅, 等. β -内酰胺酶抑制剂研究进展 [J], 中国抗生素杂志, 2013, 38(11): 805-809.
- [3] 李冕. 1,2,3-三氮唑杂合体的抗菌活性 [J], 国外医药, 2019, 40(05): 460-466.
- [4] 张悦. 他唑巴坦的合成工艺改进 [D]. 河北科技大学, 2019: 3-4.
- [5] R G MICETICH, S N MAITI, P SPEVAK, et al. Synthesis and β -Lactamase Inhibitory Properties of 2 β -[(1,2,3-triazol-1-yl)methyl]-2 α -methylpenam-3 α -carboxylic Acid 1, 1-dioxide and Related Triazolyl Derivatives [J], Journal of Medicinal Chemistry, 1987, 30(8): 1469-1474.
- [6] 周子腾. β -内酰胺酶抑制剂他唑巴坦的合成研究 [D]. 山东大学, 2018: 45-46.
- [7] 李阳. 青霉素碳架重排的研究与他唑巴坦的合成 [D]. 天津: 天津大学, 2001: 4-5.

- [8] Margherita De Rosa, Giovanni Vigliotta, Giuseppe Palma, et al. Novel Penicillin-Type Analogues Bearing a Variable Substituted 2-Azetidinone Ring at Position 6: Synthesis and Biological Evaluation [J], *Molecules* 2015, 20, 22044-22057.
- [9] 张楠. 苯并噻唑和吡啶取代的菲啉季铵盐类衍生物作为 FtsZ 抑制剂的设计、合成和抗菌活性评价 [D]. 山东大学, 2021: 63-65.
- [10] S TORIIS, H TANAK, M TANKA, et al. Preparation of 2 β -Substituted Methyl penicillin Derivatives as Intermediates for Antibiotics and β -Lactamase Inhibitors [J], *JP*, 1988: 20-25.
- [11] T HIDEO, M TANAKA, S YAMADA, et al. Facile Halogenative Cyclization of 4(2-benzothiazolydithio) Azetidinones (kamiya'sdisulfide) into 2 β -(halomethyl)halomethyl Penams ina Two Layer System. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 1989, 62(9): 3046-3048.
- [12] 刘晓. 2 位取代的头孢菌素类新化合物的合成与生物活性的研究 [D]. 中国协和医科大学, 2008: 36-37.
- [13] 王勤, 赵祁, 王书芳, 等. 7 β -[2-(2-噻唑-4-基)-(Z)-2-甲氧亚胺乙酰氨基]-3-(2-芳基-1,3,4-噁二唑-5-硫亚甲基) 头孢菌素衍生物抑菌活性及构效关系探讨 [J], *兰州大学学报*. 2003. 39(1): 77-79.
- [14] 王时荣. 新型广谱 β -内酰胺酶抑制剂的设计、合成和活性评价 [D]. 军事科学院, 2018: 235-237.
- [15] 李勇湧, 黄文祥, 朱卫民. β -内酰胺酶抑制剂抑酶动力学研究 [J], *重庆医科大学学报*, 2010, 35(3): 1040-1042.