新型含喹啉酮结构的三唑磺酰胺衍生物的合成及其对线粒体复合物 III 的抑制活性

程 华^a 汪万强^a 黄 琳^a 崔 萍^a 吴琼友^{*,b}

(^a 湖北文理学院化学化工与食品科学学院 襄阳 441053)

(^b 华中师范大学化学学院 农药与生物教育部重点实验室 武汉 430079)

摘要 线粒体复合物 III 是细胞呼吸链的重要组成部分,也是杀菌剂的重要作用靶标之一。根据生物电子等排、活性亚结构拼接原理,设计并合成了一系列含喹啉酮结构三唑磺酰胺衍生物,经质谱、氢谱、碳谱及元素分析对其结构进行了确认,测试了该类化合物对猪心线粒体复合物 III 的抑制活性,结果表明目标化合物 **6f** [$IC_{50} = (45.75 \pm 1.02) \mu\text{mol/L}$] 对复合物 III 的抑制活性较对照药剂吡唑磺菌胺 [$IC_{50} = (92.96 \pm 1.30) \mu\text{mol/L}$] 提高了一倍多,可作为先导结构进一步优化。

关键词 2-喹啉酮; 1,2,4-三唑磺酰胺; 琥珀酸-细胞色素 c 氧化还原酶; 抑制活性; 合成

Synthesis and Biological Activities of Novel Triazolesulfonamide Derivatives Containing Quinolin-2-one Moiety

Cheng, Hua^a Wang, Wanqiang^a Huang, Lin^a Cui, Ping^a Wu, Qiongyou^{*,b}

(^a Department of Chemical Engineering, Hubei University of Arts and Science, Xiangyang 441053)

(^b Key Laboratory of Pesticide & Chemical Biology, Ministry of Education, College of Chemistry, Central China Normal University, Wuhan 430079)

Abstract Complex III is an essential component for cellular respiration chain and one of the most important targets of fungicides. According to bioisosterism and combination of bioactive sub-structure, a series of novel triazolesulfonamide derivatives containing quinolin-2-one moiety were designed and synthesized. The structures of the synthesized compounds were confirmed by MS, ¹H NMR, ¹³C NMR and elemental analysis. The antibacterial activities of these compounds against porcine complex III were evaluated, and the bioassay results indicated that the target compound **6f** [$IC_{50} = (45.75 \pm 1.02) \mu\text{mol/L}$] showed much higher inhibitory potency (more than one-fold higher) against complex III than that of the control amisulbrom [$IC_{50} = (92.96 \pm 1.30) \mu\text{mol/L}$], thus compound **6f** may recognize as a lead for further structure modification.

Keywords quinolin-2-one; 1,2,4-triazolesulfonamide; porcine succinate-cytochrome reductase; biological activity; synthesis

线粒体呼吸链复合体 III (简称线粒体复合物 III),也叫细胞色素 c 还原酶(cytochrome reductase)或 bc_1 复合物,它是线粒体电子传递链的中心元素^[1],也是杀菌剂的重要作用靶标之一。近年来,随着鸡心、牛心、兔心、酵母等不同来源的线粒体复合物 III 的晶体结构陆续被成功解析^[2~4],其内部的电子传递过程也清晰地呈

现在人们眼前。复合物 III 有两个醌的功能结合位点即还原型辅酶 Q 的氧化位点(Q_o 位点)和氧化型辅酶 Q 的还原位点(Q_i 位点)^[5~7]。基于此,作用于复合物 III 的杀菌剂可分为 Q_o 位点抑制剂和 Q_i 位点抑制剂^[8,9],其中 Q_o 位点杀菌剂取得了巨大的成功,典型的 Q_o 位点抑制剂包括甲氧丙烯酸酯类、噁唑菌酮、黏噻唑、标桩菌素

* E-mail: qywu@mail.ccnu.edu.cn

Received October 12, 2015; revised November 30, 2015; published online January 7, 2015.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21272091), the Hubei Provincial Department of Education (No. Q20102606), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. CCNU15A02014), the Xiangyang Science and Technology Bureau (No. 2010GG1B33), and the Natural Science Foundation of Hubei Province (No. 2014CFC1153).

国家自然科学基金(No. 21272091)、湖北省教育厅项目(No. Q20102606)、中央高校基本科研业务费(No. CCNU15A02014)、襄阳市科技局项目(No. 2010GG1B33)、湖北省自然科学基金(No. 2014CFC1153)资助项目。

等^[10]. 相对而言, Q_i 位点抑制剂品种较少, 仅有氰霜唑、吡唑磺菌胺等为数不多的商品化抑制剂^[11]. 发展 Q_i 位点抑制剂是解决 Q_o 位点杀菌剂如甲氧丙烯酸酯类杀菌剂所带来的越来越严重的抗性问题的有效途径.

喹啉酮是含有喹啉环结构的一类重要杂环化合物, 天然的 2(1*H*)-喹啉酮类物质主要存在于一些天然植物中如吴茱萸、常青树等的生物碱中^[12], 随着取代基的不同, 喹啉酮类化合物呈现出不同的生物活性以及广阔的药理和生理活性, 在化工、医药等领域都有很广泛的应用. 在农药领域中, 喹啉酮环结构的化合物被广泛应用于各种除草剂、杀虫剂及杀菌剂. 拜耳公司新开发的化合物 **A** 具有除草和杀虫活性^[13], 化合物 **B** 是由巴斯夫公司研发的一种新型化合物, 主要用来防治稗草、矢车菊等^[14], 化合物 **C** 是先正达公司新报道的一类除草剂^[15], 化合物 **D** 是贵州大学宋宝安课题组^[16]报道的具有杀菌活性小分子.

图 1 活性化合物的结构

Figure 1 The structure of activity compounds

我们课题组在前期以线粒体复合物 III 为靶标筛选新型杀菌剂的过程中发现, 吡唑磺菌胺的三唑磺酰胺部分是一类高效的杂环片段, 通过结构修饰可以筛选到高活性的复合物 III 抑制剂. 因此, 本文中我们采用活性亚结构拼接和生物合理设计的方法, 将喹啉酮活性结构单元引入到三唑磺酰胺结构中, 设计了一系列未见文献报道的新型含喹啉酮结构的三唑磺酰胺类化合物, 利用 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 及元素分析对目标化合物的结构进行了表征. 测试了所合成的目标化合物对猪心线粒体复合物 III 的抑制活性, 结果表明该类化合物均对复合物 III 具有一定抑制效果, 其中, 目标化合物 **6f** [$\text{IC}_{50} = (45.75 \pm 1.02) \mu\text{mol/L}$] 对复合物 III 的抑制活性优于对照药剂吡唑磺菌胺. 目标化合物的合成路线如 Scheme 1 所示.

图式 1 化合物的合成路线

Scheme 1 The synthetic route of compounds

1 结果与讨论

1.1 二硫化合物的合成

合成关键中间体三唑磺酰氯 **3** 时, 主要是构建二硫键, 该反应机理已有文献报道^[17] (Scheme 2), 从反应机理可知巯基先和磺酰氯生成酯, 再被还原成二硫化合物, 如果苯磺酰氯的用量过多会导致反应停留在第一步反应, 若用量过少, 则反应难以进行完全, 根据总反应方程式可以得知: 苯磺酰氯和二硫化物的物质的量的比为 1:2 最佳, 另外苯磺酰氯不稳定, 所以反应中所用的反应原料、缚酸剂、反应溶剂都要干燥; 由于二硫化物不稳定, 容易被氧化, 所以反应过程中要氮气保护, 在干燥时, 温度也不宜过高, 一般在真空干燥箱里进行干燥.

图式 2 中间体 1 的合成机理

Scheme 2 The mechanism of intermediate 1

1.2 喹啉酮的合成

喹啉酮的合成过程是经过傅克烷基化反应后关环, 其反应机理如 Scheme 3 所示^[18]. 该反应中路易斯酸必须是无水的, 路易斯酸和反应原料的物质的量的比为 3:

1, 另外, 该反应用到溶剂高沸点氯苯, 因为高温能促进苯环的离去, 有利于喹啉酮的生成. 实验中我们发现苯环上的取代基对喹啉酮的合成有一定的影响, 当苯环上为单取代时其收率(**5f**, 82%)要高于二取代(**5l**, 64%), 而对单取代芳基而言, 供电子基团的收率(**5e**, 80%)要高于吸电子基团(**5b**, 54%).

1.3 目标化合物的合成

在制备目标化合物时, 为优化反应条件, 我们以化合物 **6a** 的合成作为模板, 考察了反应溶剂及碱对反应的影响: 以三乙胺为碱时, 我们发现反应可在多种溶剂中进行如 THF、DMF、DCM、DMSO, 其中, 在 THF、DMF 和 DMSO 中反应产率相当, 但 DMF 和 DMSO 作溶剂时, 反应时间比 THF 稍快, 考虑到 THF 作溶剂时后处理先对简单, 我们最终采用沸点较低的 THF 作溶剂; 然后, 我们考察了不同碱如吡啶、DMAP、 K_2CO_3 、 Cs_2CO_3 、NaH 对反应的影响, 发现以 K_2CO_3 、 Cs_2CO_3 、NaH 为碱时均可得到中等收率的目标产物, 其中以 NaH 作碱时, 反应时间最短, 产率最高可达 83%. 因此, 所有目标产物的制备均以 NaH 为碱、THF 为溶剂进行.

1.4 目标化合物的活性研究

化合物对线粒体复合物 III 的抑制活性结果列于表 2, 由表 2 可知, 多数目标化合物对复合物 III 具有一定的抑制活性, 其中 **6a**, **6e**, **6i**, **6f** 在 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下的酶抑制率分别为 35%, 30%, 35% 和 59%, 特别值得一提的是化合物 **6f** 的抑制率达到了 59%, 明显优于对照药剂吡唑磺菌胺的抑制率 45%, 同时, 我们测试了该化合物的 IC_{50} , 结果表明, 该化合物抑制活性高于对照商品化

药剂吡唑磺菌胺 2 倍以上, 可作为先导结构进行进一步优化.

2 结论

在课题组前期研究的基础上, 采用活性亚结构拼接和生物合理设计的方法, 将具有广泛生物活性的喹啉酮结构单元与商品化杀菌剂吡唑磺菌胺的三唑磺酰胺结构进行杂化, 设计合成了 14 个未见文献报道的新型含喹啉酮结构的三唑磺酰胺类化合物. 利用 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 及元素分析对目标化合物的结构进行了表征. 测试了所合成的目标化合物对猪心线粒体复合物 III 的抑制活性, 发现目标化合物 **6f** [$IC_{50} = (45.75 \pm 1.02) \mu\text{mol/L}$] 对复合物 III 的抑制活性较对照药剂吡唑磺菌胺提高了一倍, 可作为先导结构进行进一步优化.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

^1H NMR 谱图数据由 Mercury Plus 400MHz 核磁共振仪或者 Varian VNMR 600MHz (TMS 为内标, 氘代氯仿、氘代 DMSO 为溶剂), 质谱数据由 Finnigan Trace MS 质谱仪测定, 熔点由 Büchi B-545 数字熔点仪(温度未经校正)测定; 此外, 合成过程中用到的仪器有: 德国 Heidolph MR3001 型恒温加热磁力搅拌器, 瑞士 Büchi R-200 型旋转蒸发仪、德国 Sartorius 电子天平、ZF-200 暗箱式紫外分析仪、DLSB 低温冷却循环泵、SHZ-D(III) 循环水式真空泵、70-1 型远红外线干燥箱、Zk-82BB 型电热真空干燥箱和 KQ-100DZ 型数控超声波清洗仪等

图式 3 中间体 5 的合成机理

Scheme 3 The mechanism of intermediate 5

表 1 溶剂及碱对合成目标化合物的影响

Table 1 The influence of solvent and base on the yield of the product

溶剂	DCM	DMF	DMSO	THF	THF	THF	THF	THF	THF
碱	Et_3N	Et_3N	Et_3N	Et_3N	Pyridine	DMAP	K_2CO_3	Cs_2CO_3	NaH
反应时间/h	5	1.5	1.5	2	3	3	2	1.5	1
收率/%	54	78	75	78	47	64	70	72	83

表2 化合物对猪心复合物 III 的抑制活性

Table 2 Inhibitory activity of the synthesized compounds against porcine SCR cyt bc₁

化合物	R	抑制率/%	IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹)
6a	H	35	—
6b	6-F	<10	—
6c	6-Br	24	—
6d	6-Cl	22	—
6e	6-Me	30	—
6f	8-Me	59	45.75 ± 1.02
6g	6,8-Me ₂	<10	—
6h	7,8-Me ₂	18	—
6i	6-Cl-8-Me	35	—
6j	5-Cl-8-Me	25	—
6k	7-Cl-8-Me	<10	—
6l	6-F-8-Cl	<10	—
6m	6-F-8-Br	<10	—
6n	5,8-F ₂	27	—
Amisulbrom	—	45	92.96 ± 1.30

仪器. 柱层析所用硅胶(200~300 目)和点样硅胶板由青岛海洋化工厂提供, 所使用石油醚沸程为 60~90 °C; 其它试剂和溶剂如无特殊说明, 均为分析纯或化学纯.

3.2 实验方法

3.2.1 中间体 1 的合成

在氮气保护的条件下, 将 3.03 g 三氮唑巯基化合物溶于 15 mL 干燥二氯甲烷中, 加入 2.37 g 干吡啶, 在冰浴条件下慢慢滴加 2.64 g 苯磺酰氯, 滴加时间约为 1 h, 滴加完毕后移去冰浴, 在常温条件下反应 16 h, 反应完全后, 蒸去二氯甲烷, 将剩余物在搅拌条件下加入 15 mL 水和 9 mL 乙醇, 反应 1 h, 过滤, 再用 6 mL 水和 6 mL 乙醇洗涤两次, 得到白色固体, 在 60~70 °C 条件下真空干燥得到二硫化物 **1**, 收率 92%^[19].

3.2.2 中间体 2 的合成

上步产物 0.52 g 投入到 0.90 g 碳酸钾的 DMF 溶液中, 搅拌 1 h 后, 冰浴条件下缓慢滴加 0.37 g *N,N*-二甲基磺酰氯, 反应完全后, 加入大量的水, 二氯甲烷萃取, 无水硫酸钠干燥, 蒸去溶剂得无色油状物, 加入少量甲醇, 即析出大量白色固体, 抽滤干燥, 得中间体 **2**, 收率 90%^[20].

3.2.3 中间体 3 的合成

上步中间体 2.00 g 溶于 25%醋酸水溶液中, 5 °C 下通入氯气, 反应时间 0.5 h, 静置, 抽滤得中间体 **3**, 收率

91.1%^[17].

3.2.4 中间体 4 的合成

称取 22.40 g 碳酸钾, 加入 68 mL 水, 待碳酸钾完全溶解并恢复室温时, 加入 6 g 相应的苯胺, 然后缓慢滴加 7.28 g 肉桂酰氯溶于 34.8 mL 丙酮的溶液, 滴加时间为 1 h, 常温搅拌, 反应完全后, 静置, 抽滤, 水洗, 石油醚洗涤, 得白色固体, 干燥得中间体 **4a~4n**.

3.2.5 中间体 5 的合成

称取 10.48 g 上步产物, 和 7 mL 氯苯混合, 搅拌均匀后回流, 加入 27.70 g AlCl₃ (无水), 待反应完全后, 除去多余氯苯, 再将剩余物质倒入冰水中, 抽滤, 得棕色固体, 用甲醇重结晶, 得到中间体 **5a~5n**.

喹啉-2(1*H*)-酮(**5a**): 白色固体, 产率 89%. m.p. 199~200 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.70 (s, 1H, NH), 7.83 (d, *J*=9.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.59~7.56 (m, 1H, Ar-H), 7.52~7.50 (m, 1H, Ar-H), 7.31 (d, *J*=7.6 Hz, 1H, Ar-H), 6.73 (d, *J*=9.6 Hz, 1H, Ar-H), EI-MS *m/z*: 145.92 (M⁺).

6-氟喹啉-2(1*H*)-酮(**5b**): 白色固体, 产率 54%. m.p. 270~271 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.84 (s, 1H, NH), 7.88 (d, *J*=9.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.55 (d, *J*=8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.40 (d, *J*=4.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.31 (d, *J*=7.8 Hz, 1H, Ar-H), 6.57 (d, *J*=9.6 Hz, 1H, Ar-H); EI-MS *m/z*: 163.92 (M⁺).

6-溴喹啉-2(1*H*)-酮(**5c**): 白色固体, 产率 74%. m.p. 268~269 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.89 (s, 1H, NH), 7.93 (s, 1H, Ar-H), 7.88 (d, *J*=9.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.65 (d, *J*=6.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.25 (d, *J*=9.0 Hz, 1H, Ar-H), 6.56 (d, *J*=9.6 Hz, 1H, Ar-H); EI-MS *m/z*: 222.93 (M⁺).

6-氯喹啉-2(1*H*)-酮(**5d**): 白色固体, 产率 70%. m.p. 267~268 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.90 (s, 1H, NH), 7.89 (d, *J*=9.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.80 (s, 1H, Ar-H), 7.54 (d, *J*=8.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.31 (d, *J*=9.0 Hz, 1H, Ar-H), 6.57 (d, *J*=9.6 Hz, 1H, Ar-H); EI-MS *m/z*: 179.84 (M⁺).

6-甲基喹啉-2(1*H*)-酮(**5e**): 白色固体, 产率 80%. m.p. 233~234 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.68 (s, 1H, NH), 7.80 (d, *J*=8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.43 (s, 1H, Ar-H), 7.31 (d, *J*=8.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.20 (d, *J*=7.2 Hz, 1H, Ar-H), 6.46 (d, *J*=9.6 Hz, 1H, Ar-H), 2.32 (s, 3H, CH₃); EI-MS *m/z*: 159.74 (M⁺).

8-甲基喹啉-2(1*H*)-酮(**5f**): 白色固体, 产率 82%. m.p. 219~220 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.93 (s, 1H, NH), 7.90 (d, *J*=9.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.50 (d,

$J=9.6$ Hz, 1H, Ar-H), 7.35 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H), 7.10 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H), 6.51 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H), 2.42 (s, 3H, CH₃); EI-MS m/z : 159.36 (M^+).

6,8-二甲基喹啉-2(1H)-酮(**5g**): 白色固体, 产率 86%. m.p. 228~230 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.20 (s, 1H, NH), 7.94 (d, $J=9.6$ Hz, 1H, Ar-H), 7.75 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, Ar-H), 7.63 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, Ar-H), 6.67 (d, $J=9.6$ Hz, 1H, Ar-H), 2.47 (s, 3H, CH₃), 2.81 (s, 3H, CH₃); EI-MS m/z : 173.53 (M^+).

7,8-二甲基喹啉-2(1H)-酮(**5h**): 白色固体, 产率 80%. m.p. 198~200 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.79 (s, 1H, NH), 7.84 (d, $J=9.0$ Hz, 1H, Ar-H), 7.40 (d, $J=7.2$ Hz, 1H, Ar-H), 7.03 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H), 6.44 (d, $J=9.6$ Hz, 1H, Ar-H), 2.34 (s, 3H, CH₃), 2.32 (s, 3H, CH₃); EI-MS m/z : 173.58 (M^+).

6-氯-8-甲基喹啉-2(1H)-酮(**5i**): 白色固体, 产率 73%. m.p. 176~178 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.08 (s, 1H, NH), 7.88 (d, $J=9.6$ Hz, 1H, Ar-H), 7.65 (s, 1H, Ar-H), 7.35 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, Ar-H), 6.57 (d, $J=9.6$ Hz, 1H, Ar-H), 2.38 (s, 3H, CH₃); EI-MS m/z : 193.95 (M^+).

7-氯-8-甲基喹啉-2(1H)-酮(**5k**): 白色固体, 产率 64%. m.p. 236~238 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.08 (s, 1H, NH), 7.91 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, Ar-H), 7.53 (d, $J=7.2$ Hz, 1H, Ar-H), 7.25 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H), 6.53 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, Ar-H), 2.47 (s, 3H, CH₃); EI-MS m/z : 193.96 (M^+).

8-氯-6-氟喹啉-2(1H)-酮(**5l**): 白色固体, 产率 47%. m.p. 220~222 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.67 (s, 1H, NH), 7.93 (d, $J=9.6$ Hz, 1H, Ar-H), 7.88 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, Ar-H), 7.66 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, Ar-H), 6.67 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, Ar-H); EI-MS m/z : 197.67 (M^+).

8-溴-6-氟喹啉-2(1H)-酮(**5m**): 白色固体, 产率 50%. m.p. 221~223 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.67 (s, 1H, NH), 7.93 (d, $J=9.6$ Hz, 1H, Ar-H), 7.88 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, Ar-H), 7.66 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, Ar-H), 6.67 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, Ar-H); EI-MS m/z : 240.947 (M^+).

5,8-二氟喹啉-2(1H)-酮(**5n**): 白色固体, 产率 44%. m.p. 233~235 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.05 (s, 1H, NH), 7.99 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, Ar-H), 7.45 (d, $J=6.4$ Hz, 1H, Ar-H), 7.02 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, Ar-H), 6.64 (d, $J=9.6$ Hz, 1H, Ar-H); EI-MS m/z : 181.46 (M^+).

3.2.6 目标物 **6** 的合成

将 0.223 g 上步产物和 0.08 g NaH (纯度为 60%) 在重蒸的 THF 里搅拌 1 h, 加入 0.27 g 中间体 **3**, 反应完全

后, 水洗, 用二氯甲烷仿萃取, 无水硫酸钠干燥, 柱层析得到目标化合物 **6a~6n**.

3-(2(1H)-氧亚基喹啉-1-基磺酰基)-*N,N*-二甲基-1H-1,2,4-三唑-1-磺酰胺(**6a**): 白色固体, 产率 83%. m.p. 110~112 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.60 (s, 1H, N-CH), 8.66 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, Ar-H), 8.10 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H), 7.83 (d, $J=7.2$ Hz, 1H, Ar-H), 7.71~7.67 (m, 2H, Ar-H), 7.51 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, Ar-H), 2.92 (s, 6H, 2N-CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 159.56, 154.10, 148.43, 144.06, 130.82, 138.82, 134.94, 130.81, 127.48, 126.73, 124.22, 114.12, 38.33; EI-MS m/z : 383.29 (M^+). Anal. calcd for C₁₃H₁₃N₅O₅S₂: C 40.72, H 3.42, N 18.27, S 16.73; found C 40.89, H 3.322, N 18.14, S 16.56.

3-(6-氟-2(1H)-氧亚基喹啉-1-基磺酰基)-*N,N*-二甲基-1H-1,2,4-三唑-1-磺酰胺(**6b**): 白色固体, 产率 56%. m.p. 154~156 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.62 (s, 1H, N-CH), 8.63 (d, $J=9.0$ Hz, 1H, Ar-H), 8.42 (s, 1H, Ar-H), 7.96 (d, $J=9.0$ Hz, 1H, Ar-H), 7.63~7.62 (m, 1H, Ar-H), 7.58~7.59 (m, 1H, Ar-H), 2.93 (s, 6H, 2N-CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 161.38, 159.11, 153.86, 141.75, 135.28, 127.95, 122.88, 119.67, 118.12, 116.86, 38.41; EI-MS m/z : 401.28 (M^+). Anal. calcd for C₁₃H₁₂FN₅O₅S₂: C 38.90, H 3.01, N 17.45, S 15.98; found C 39.07, H 2.877, N 17.66, S 16.23.

3-(6-溴-2(1H)-氧亚基喹啉-1-基磺酰基)-*N,N*-二甲基-1H-1,2,4-三唑-1-磺酰胺(**6c**): 白色固体, 产率 63%. m.p. 168~169 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.59 (s, 1H, N-CH), 8.62 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, Ar-H), 8.41 (s, 1H, Ar-H), 7.95 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, Ar-H), 7.62 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, Ar-H), 7.57 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, Ar-H), 2.93 (s, 6H, 2N-CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 160.86, 158.37, 152.04, 147.65, 145.48, 139.53, 129.44, 127.08, 126.97, 122.08, 120.39, 115.02, 111.72, 38.27; EI-MS m/z : 462.25 (M^+). Anal. calcd for C₁₃H₁₂BrN₅O₅S₂: C 33.77, H 2.62, N 15.15, S 13.87; found C 34.02, H 2.750, N 14.94, S 13.71.

3-(6-氯-2(1H)-氧亚基喹啉-1-基磺酰基)-*N,N*-二甲基-1H-1,2,4-三唑-1-磺酰胺(**6d**): 白色固体, 产率 60%. m.p. 153~155 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.61 (s, 1H, N-CH), 8.63 (d, $J=9.0$ Hz, 1H, Ar-H), 8.26 (s, 1H, Ar-H), 7.85 (d, $J=9.6$ Hz, 1H, Ar-H), 7.70 (d, $J=9.0$ Hz, 1H, Ar-H), 7.59 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, Ar-H), 2.94 (s, 6H, 2N-CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 159.38, 154.77, 148.81, 143.38, 141.87, 125.50, 131.83, 131.73, 129.66, 127.97, 126.94, 115.17, 38.32; EI-MS m/z : 417.07

(M⁺). Anal. calcd for C₁₃H₁₂ClN₅O₅S₂: C 37.37, H 2.89, N 16.76, S 15.35; found C 37.66, H 2.716, N 16.46, S 15.60.

3-(6-甲基-2(1*H*)-氧亚基喹啉-1-基磺酰基)-*N,N*-二甲基-1*H*-1,2,4-三唑-1-磺酰胺(**6e**): 白色固体, 产率 82%. m.p. 148~150 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.72 (s, 1H, N-CH), 8.18 (d, *J*=9.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.63~7.60 (m, 2H, Ar-H), 7.53 (d, *J*=8.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.27 (d, *J*=8.4 Hz, 1H, Ar-H), 3.03 (s, 6H, 2N-CH₃), 2.52 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 154.99, 149.45, 144.26, 138.87, 137.21, 132.73, 128.84, 122.90, 122.76, 122.35, 109.45, 33.80, 16.51; EI-MS *m/z*: 397.19 (M⁺). Anal. calcd for C₁₄H₁₅N₅O₅S₂: C 42.31, H 3.80, N 17.62, S 16.14; found C 42.13, H 3.636, N 17.72, S 15.99.

3-(8-甲基-2(1*H*)-氧亚基喹啉-1-基磺酰基)-*N,N*-二甲基-1*H*-1,2,4-三唑-1-磺酰胺(**6f**): 白色固体, 产率 76%. m.p. 119~120 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.72 (s, 1H, N-CH), 8.24 (d, *J*=8.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.66 (d, *J*=7.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.52 (d, *J*=6.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.41~7.45 (m, 1H, Ar-H), 7.27 (d, *J*=8.8 Hz, 1H, Ar-H), 3.04 (s, 6H, 2N-CH₃), 2.38 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 161.22, 154.22, 146.27, 144.47, 141.60, 136.44, 130.80, 127.12, 126.77, 125.28, 112.75, 38.72, 17.20; EI-MS *m/z*: 397.33 (M⁺). Anal. calcd for C₁₄H₁₅N₅O₅S₂: C 42.31, H 3.80, N 17.62, S 16.14; found C 42.59, H 3.755, N 17.39, S 16.37.

3-(6,8-二甲基-2(1*H*)-氧亚基喹啉-1-基磺酰基)-*N,N*-二甲基-1*H*-1,2,4-三唑-1-磺酰胺(**6g**): 白色固体, 产率 86%. m.p. 134~136 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.73 (s, 1H, N-CH), 8.13 (d, *J*=8.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.41 (s, 1H, Ar-H), 7.36 (s, 1H, Ar-H), 7.21 (d, *J*=8.8 Hz, 1H, Ar-H), 2.61 (s, 6H, 2N-CH₃), 2.45 (s, 3H), 2.33 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 161.27, 153.77, 146.26, 143.07, 140.85, 136.81, 136.10, 133.15, 127.34, 124.22, 112.81, 38.82, 21.43, 17.13; EI-MS *m/z*: 411.03 (M⁺); Anal. calcd for C₁₅H₁₇N₅O₅S₂: C 43.79, H 4.16, N 17.02, S 15.59; found C 43.90, H 4.072, N 16.74, S 15.38.

3-(7,8-二甲基-2(1*H*)-氧亚基喹啉-1-基磺酰基)-*N,N*-二甲基-1*H*-1,2,4-三唑-1-磺酰胺(**6h**): 白色固体, 产率 86%. m.p. 118~119 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.71 (s, 1H, N-CH), 8.18 (d, *J*=8.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.56 (d, *J*=8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.35 (d, *J*=8.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.17 (d, *J*=8.4 Hz, 1H, Ar-H), 3.04 (s, 6H, 2N-CH₃), 2.44 (s, 3H, CH₃), 2.31 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 161.38, 154.42, 146.22, 144.59, 141.44, 139.02, 133.99, 129.84, 125.60, 124.36, 111.65, 38.85, 20.58,

12.94; EI-MS *m/z*: 411.29 (M⁺). Anal. calcd for C₁₅H₁₇N₅O₅S₂: C 43.79, H 4.16, N 17.02, S 15.59; found C 43.94, H 4.045, N 16.83, S 15.83.

3-(6-氯-8-甲基-2(1*H*)-氧亚基喹啉-1-基磺酰基)-*N,N*-二甲基-1*H*-1,2,4-三唑-1-磺酰胺(**6i**): 白色固体, 产率 64%. m.p. 148~150 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 9.62 (s, 1H, N-CH), 8.60 (d, *J*=8.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.05 (s, 1H, Ar-H), 7.72 (s, 1H, Ar-H), 7.6 (d, *J*=8.0 Hz, 1H, Ar-H), 2.95 (s, 6H, 2N-CH₃), 2.26 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 159.62, 153.94, 144.18, 142.08, 137.93, 131.12, 127.58, 124.33, 114.26, 38.36, 16.56; EI-MS *m/z*: 431.08 (M⁺). Anal. calcd for C₁₄H₁₄ClN₅O₅S₂: C 38.93, H 3.27, N 16.22, S 14.85; found C 38.79, H 3.055, N 16.59, S 14.57.

3-(5-氯-8-甲基-2(1*H*)-氧亚基喹啉-1-基磺酰基)-*N,N*-二甲基-1*H*-1,2,4-三唑-1-磺酰胺(**6j**): 白色固体, 产率 68%. m.p. 150~152 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 9.63 (s, 1H, N-CH), 8.79~8.77 (m, 1H, Ar-H), 7.73 (d, *J*=8.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.69~7.65 (m, 2H, Ar-H), 2.96 (s, 6H, 2N-CH₃), 2.26 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 162.22, 158.36, 144.24, 140.67, 136.85, 131.41, 126.80, 125.61, 124.64, 122.67, 120.36, 37.37, 23.68; EI-MS *m/z*: 431.26 (M⁺). Anal. calcd for C₁₄H₁₄ClN₅O₅S₂: C 38.93, H 3.27, N 16.22, S 14.85; found C 38.69, H 3.055, N 15.99, S 15.17.

3-(7-氯-8-甲基-2(1*H*)-氧亚基喹啉-1-基磺酰基)-*N,N*-二甲基-1*H*-1,2,4-三唑-1-磺酰胺(**6k**): 白色固体, 产率 76%. m.p. 143~145 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.62 (s, 1H, N-CH), 8.67 (d, *J*=8.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.95 (d, *J*=8.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.70 (d, *J*=8.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.57 (d, *J*=8.4 Hz, 1H, Ar-H), 2.94 (s, 6H, 2N-CH₃), 2.33 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 159.50, 154.33, 148.30, 143.69, 135.10, 132.60, 127.69, 126.32, 125.42, 113.07, 38.27, 13.66; EI-MS *m/z*: 431.13 (M⁺). Anal. calcd for C₁₄H₁₄ClN₅O₅S₂: C 38.93, H 3.27, N 16.22, S 14.85; found C 38.99, H 3.7055, N 16.49, S 14.57.

3-(8-氯-6-氟-2(1*H*)-氧亚基喹啉-1-基磺酰基)-*N,N*-二甲基-1*H*-1,2,4-三唑-1-磺酰胺(**6l**): 白色固体, 产率 53%. m.p. 168~170 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.62 (s, 1H, N-CH), 8.72 (d, *J*=8.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.09 (d, *J*=6.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.96 (d, *J*=8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.71 (d, *J*=8.0 Hz, 1H, Ar-H), 2.95 (s, 6H, 2N-CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 159.78, 159.28, 157.32, 154.34, 148.36, 142.67, 138.08, 132.20, 128.20, 121.04,

115.64, 38.26; EI-MS m/z : 435.10 (M^+). Anal. calcd for: $C_{13}H_{11}ClFN_5O_5S_2$: C 35.83, H 2.54, N 16.07, S 14.71; found C 36.12, H 2.393, N 16.27, S 14.46.

3-(8-溴-6-氟-2(1*H*)-氧亚基喹啉-1-基磺酰基)-*N,N*-二甲基-1*H*-1,2,4-三唑-1-磺酰胺(**6m**): 白色固体, 产率 50%. m.p. 185~187 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.72 (s, 1H, N-CH), 8.25 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, Ar-H), 7.80 (d, $J=7.6$ Hz, 1H, Ar-H), 7.45 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, Ar-H), 7.37 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, Ar-H), 3.07 (s, 6H, 2N-CH₃); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 159.95, 159.23, 157.47, 154.48, 148.39, 142.83, 139.08, 128.05, 123.02, 115.52, 111.39, 38.29; EI-MS m/z : 479.03 (M^+). Anal. calcd for $C_{13}H_{11}BrFN_5O_5S_2$: C 32.51, H 2.31, N 14.58, S 13.35; found C 32.66, H 2.604, N 14.76, S 13.57.

3-(5,8-二氟-2(1*H*)-氧亚基喹啉-1-基磺酰基)-*N,N*-二甲基-1*H*-1,2,4-三唑-1-磺酰胺(**6n**): 白色固体, 产率 43%. m.p. 172~174 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.65 (s, 1H, N-CH), 8.79 (d, $J=9.2$ Hz, 1H, Ar-H), 7.75~7.69 (m, 2H, Ar-H), 7.56~7.51 (m, 1H, Ar-H), 2.98 (s, 6H, 2N-CH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 159.10, 155.14, 153.87, 151.36, 148.52, 134.45, 123.53, 115.45, 111.07, 38.28; EI-MS m/z : 419.22 (M^+). Anal. calcd for $C_{13}H_{11}F_2N_5O_5S_2$: C 37.23, H 2.64, N 16.70, S 15.29; found C 37.33, H 2.470, N 16.74, S 15.38.

3.2 活性测试方法

琥珀酸-细胞色素 c 氧化还原酶中泛醌-细胞色素 c 氧化还原酶(细胞色素 bc₁ 复合体), 即线粒体复合体 III (QCR) 的活性测定方法为^[11]: 于 -20 °C 冰箱取出冻存的底物 DBH₂ 和 cytochrome c, 室温融化. 于 -80 °C 冰箱取出分装冻存的酶, 加预冷的 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液稀释至浓度为 18 nmol/L, 冰上放置. 洗净 3 mL 的石英比色皿, 在总体积为 1.8 mL 的测活体系中依次加入 900 μ L 0.2 mol/L 的 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液(pH 6.5)至终浓度为 100 mmol/L, 120 μ L 30 mmol/L 的 EDTA 至终浓度为 2 mmol/L, 180 μ L 1 mmol/L 的 cytochrome c 至终浓度为 100 μ mol/L, 9 μ L 12 mmol/L 的 DBH₂ 至终浓度为 60 μ mol/L, 13.5 μ L 0.1 mol/L 的去污剂 lauryl maltoside (*n*-dodecyl- β -D-maltoside) 至终浓度为 750 μ mol/L, 加水补齐体积至 1795 μ L. 其中, DBH₂ 是由 DB 通过还原制备而得, 而 DBH₂ 十分容易自氧化, 因此未加酶时, 两个底物就会发生非酶反应, 该反应能被一种膜蛋白去污剂 lauryl maltoside 所抑制, 并且在 pH 6.5 的 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液中本底反应最低, 即能监测到最大的泛醌-细胞色素 c 氧化还原酶活力. 因此在 23 °C 恒温水浴及 600 r/min 的磁力搅拌条件下, 开始监测, 基

线走平加入容易自氧化的底物 DBH₂ 开始记录 100 s, 此时斜率表示的是非酶反应速率. 加 5 μ L 已经事先稀释至 18 nmol/L 的酶启动反应, 则体系中酶浓度为 0.05 nmol/L, 反应 5 min, 也是在波长为 550 nm 处监测底物 cytochrome c 光吸收的增加, 采集线性范围内的实验点, 控制底物消耗不超过 5%. cytochrome c 的摩尔消光系数为 18.5 mL $\cdot$ mol⁻¹ $\cdot$ cm⁻¹. 计算在反应时间内 cytochrome c 的还原产量并拟合线性斜率, 再扣掉非酶反应的斜率值得到的数据即为反应的初速度.

用紫外分光光度计测定在饱和的底物浓度下, 不同浓度的抑制剂对酶的反应动力学. 参比: 空气或者所用 buffer 对照: 在 1.8 mL 体系中加入底物和 2 μ L DMSO, 加酶启动反应, 测定没有抑制剂时酶的全活性. 样品: 改变抑制剂的浓度, 监测抑制剂对酶活性的影响. 数据处理: 根据朗伯比尔定律, 将吸光度转换为产物浓度, 再对时间线性拟合得到初速度. 将样品与对照相比算出抑制率, IC₅₀ 值根据下面的公式拟合得到:

$$y = \min + \frac{\max - \min}{1 + 10^{x - \log IC_{50}}}$$

公式中: y 为对应浓度抑制剂下酶的残留活性与未加抑制剂活性的百分比, max、min 为 S 形曲线的上、下两个平台, 相对活性的最大值和最小值, x 为对应抑制剂浓度, IC₅₀ 为残留活性为 50% 时的抑制剂浓度.

辅助材料(Supporting Information) 目标化合物 **6a**~**6n** 的 1H NMR、 ^{13}C NMR 和 MS 原始图谱. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载

References

- [1] (1) Sun, F.; Zhou, Q. J.; Sun, J.; Zhai, Y. J.; Rao, Z. H. *Bull. Life Sci.* **2008**, 20(4), 566 (in Chinese). (孙飞, 周强军, 孙吉, 翟宇佳, 饶子和, 生命科学, **2008**, 20(4), 566.)
- [2] Zhang, Z. L.; Lishar, H.; Shulmeister, V. M.; Chi, Y. I.; Kyeong, K. K.; Hung, L. W.; Crofts, A. R.; Berry, E. A.; Kim, S. H. *Nature* **1998**, 392, 677.
- [3] Iwata, S.; Lee, J. W.; Okada, K.; Lee, J. K.; Iwata, M.; Rasmussen, B.; Link, T. A.; Ramaswamy, S. *Science* **1998**, 281, 64.
- [4] Hunte, C.; Koepke, J.; Lange, C.; Romanith, T.; Michel, H. *Structure* **2000**, 8(6), 669.
- [5] Gao, X. G.; Wen, X. L.; Esser, L.; Quinn, B.; Yu, L. D.; Yu, C. A.; Xia, D. *Biochemistry* **2003**, 42(30), 9067.
- [6] Esser, L.; Quinn, B.; Li, Y. F.; Zhang, M. M.; Elberry, L.; Yu, C. A.; Xia, D. *J. Mol. Biol.* **2004**, 341(1), 281.
- [7] Huang, L.; Cobessi, D.; Tung, E. Y.; Berry, E. A. *J. Mol. Biol.* **2005**, 351(3), 573.
- [8] Yang, W. C.; Li, H.; Wang, F.; Zhu, X. L.; Yang, G. F. *ChemBioChem* **2012**, 13(11), 1542.
- [9] Maklashina, E.; Cecchini, G. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, 1797(12), 1877.

- [10] Li, H.; Zhu, X. L.; Yang, W. C.; Yang, G. F. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2014**, *83*(1), 71.
- [11] Cheng, H.; Shen, Y. Q.; Pan, X. Y.; Hou, Y. P.; Wu, Q. Y.; Yang, G. F. *New J. Chem.* **2015**, *39*(9), 7281.
- [12] Tang, J. L.; Xu, J. G.; Song, J.; Guang, L.; Chen, L. *J. Guangdong Pharm. Univ.* **2013**, *29*(6), 596 (in Chinese).
(汤洁丽, 许俊耿, 宋健, 关丽, 陈琳, 广东药学院学报, **2013**, *29*(6), 596.)
- [13] Harper, S.; Avolio, S. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*(2), 547.
- [14] Oshiro, Y.; Sam, S. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*(5), 658.
- [15] Salmon, R.; Mitchell, G.; Morris, J. A. *WO 2010116122*, **2010** [*Chem. Abstr.* **2010**, *153*, 470191].
- [16] Yang, J. Q.; Hu, Y. W.; Gu, Q.; Li, M. G.; Li, M. Q.; Song, B. A. *Chin. J. Org. Chem.* **2014**, *34*, 829. (in Chinese)
(杨家强, 胡月维, 谷晴, 李明刚, 李明强, 宋宝安, 有机化学, **2014**, *34*, 829.)
- [17] Mahieu, J. P.; Gosselet, M.; Seville, B.; Beuzard, Y. *Synth. Commun.* **1986**, *16*(13), 1709.
- [18] Manimaran, T.; Thiruvengadam, T. K.; Ramakrishnan, V. T. *Synth. Commun.* **1975**, *11*, 739.
- [19] Hegde, S. G.; Mahoney, M. D. *WO 2000042028*, **2000** [*Chem. Abstr.* **2000**, *133*, 105038].
- [20] Fukuda, K.; Kondo, Y.; Makabe, T.; Tanaka, N.; Utsunomiya, T.; Sakurai, Y. *WO 2006057354*, **2006** [*Chem. Abstr.* **2006**, *145*, 27993].

(Cheng, F.)