

· 论著 ·

没食子酰哌嗪类化合物的合成及抗真菌作用研究

王瀚萱^{1,2}, 董家潇², 马颖³, 高越¹, 金永生¹ (1. 海军军医大学药学院, 上海 200433; 2. 解放军第 72 集团军医院药械科, 浙江 湖州 313000; 3. 烟台大学新型制剂与生物技术药物研究山东省高校协同创新中心、教育部分子药理和药物评价重点实验室, 山东 烟台 264005)

[摘要] 目的 设计合成没食子酰哌嗪衍生物, 考察其对耐药真菌的抗菌活性。方法 以三甲氧基没食子酸为原料, 在 PyBOP/DIEA 存在下与哌嗪反应得到中间体, 在脱保护后与相应的酸缩合, 最后脱甲基得到目标化合物。采用美国国家临床实验室标准委员会(CLSI)推荐方法, 将目标化合物对 2 株临床分离的耐药白色念珠菌株进行体外抗真菌活性试验, 进而与氟康唑(8 $\mu\text{g/ml}$)联用, 开展协同抗真菌活性试验。结果 共合成了 11 个化合物, 其中 6 个化合物表现出优于没食子酸的抗真菌活性。结论 没食子酰哌嗪可以提高没食子酸的抗真菌活性, 没食子酸酰结构是重要的药效团, 若引入桂皮酸或 2,3-二氯苯甲酸可以进一步提高活性。

[关键词] 没食子酸; 抗真菌; 协同作用; 合成

[中图分类号] R96

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2020)06-0506-03

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.201908127

Study on synthesis and antifungal activities of galloyl piperazine derivatives

WANG Hanxuan^{1,2}, DONG Jiaxiao², MA Ying³, GAO Yue¹, JIN Yongsheng¹ (1. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Drug and Equipment, the 72nd Group Army Hospital of PLA, Huzhou 313000, China; 3. Key Laboratory of Molecular Pharmacology and Drug Evaluation (Yantai University), Ministry of Education, Collaborative Innovation Center of Advanced Drug Delivery System and Biotech Drugs in University of Shandong, Yantai 264005, China)

[Abstract] **Objective** To design, synthesize and measure antifungal activities of galloyl piperazine derivatives. **Methods** Trimethoxyl gallic acid was used as starting material, reacted with piperazine in the presence of PyBOP/DIEA to afford the intermediates. The target compounds were obtained through the reaction with corresponding acids after deprotection gave. The antifungal activities of the target compounds were evaluated by FLC-resistant *Candida albican* isolated according to the CLSI recommended method. **Results** 11 target compounds were synthesized and six of them showed more potent antifungal activities than gallic acid. **Conclusion** Galloyl piperazine derivatives could enhance antifungal activities. Galloyl moiety was an important pharmacophore, which could improve antifungal activities with the introduction of cinnamic acid and 2,3-dichlorobenzoic acid.

[Key words] gallic acid; antifungals; synergy; synthesis

近年来, 真菌感染尤其是念珠菌感染日益严重, 感染率居高不下^[1]。并且由于免疫损伤以及长期住院患者增多, 又进一步增加了机会性和系统性真菌感染的可能^[2]。临床上常见的抗真菌药物如氟康唑等, 由于真菌耐药性和毒性等问题, 限制了其使用。因此, 研发新的抗菌药物已经成为迫切任务。

天然产物的抑菌作用受到了普遍关注, 天然产物以其结构新颖、生物活性强、毒性低等特点, 成

为了近年寻找抗真菌新药及其先导化合物的研究热点。没食子酸(gallic acid, GA), 又称五倍子酸或鞣酸, 即 3,4,5-三羟基苯甲酸, 是一种存在于五倍子和漆树等植物中的有机酸。文献报道^[3-7] 其具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤等作用。近期有研究^[3] 报道, 没食子酸于体内外表现出较好的抗真菌作用。课题组以此为基础, 对没食子酸进行结构改造, 合成了系列没食子酰哌嗪类化合物, 并进一步评价了其单独及协同抗真菌作用, 为进一步研究和开发没食子类抗真菌化合物提供了基础。

1 材料

所使用原料均为市售分析纯或化学纯试剂。核磁共振氢谱(HNMR)和碳谱由 Bruker AVANCE

[基金项目] 上海市卫计委科研课题(20124057)

[作者简介] 王瀚萱, 硕士研究生, Tel:13645656602, Email: 1196117576@qq.com

[通信作者] 高越, 博士, 副教授, 研究方向: 药物分析, Tel: (021) 81871369; 金永生, 博士, 副教授, 研究方向: 药物化学, Tel: (021) 81871227

II 300 或 600 型核磁共振仪测得; 质谱(MS)由 Q-Tof micro (ESI-MS) 或 Finingan LCQ Deca XP MAX 质谱仪测定。

2 方法

2.1 化合物的合成

以三甲氧基没食子酸为原料, 在 PyBOP/DIEA

存在下与 Boc 保护哌嗪或取代哌嗪缩合得到化合物 **4a~4h** 或 **2**, 然后 **2** 在 HCl/乙酸乙酯溶液中脱 Boc 得到三甲氧基没食子酰哌嗪(**3**), **3** 再与不同取代苯甲酸在 PyBOP/DIEA 条件下缩合得到化合物 **4i~4k**。最后, **4a~4k** 采用 BBr₃ 脱甲基得到目标化合物 **1a~1k**。具体合成路线见图 1。

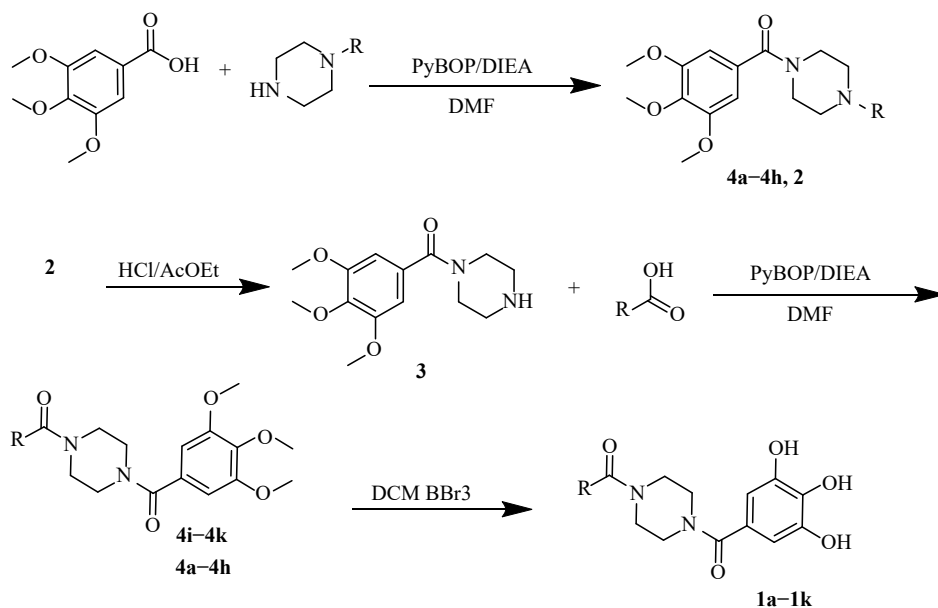


图 1 目标化合物的合成路线

2.1.1 4-(3,4,5-三甲氧基苯甲酰基)哌嗪-1-羧酸叔丁醇酯(**2**)的合成

取三甲氧基苯甲酸 2.1 g (10 mmol), BOC 保护的哌嗪盐酸盐 2.2 g (12 mmol), PyBOP 7.8 g (15 mmol), DIEA 1.9 g (15 mmol), 置入于 100 ml 茄形瓶中, 加入 20 ml 干燥 DMF, 室温搅拌 4~6 h, TLC 监测反应, 待原料点消失后, 将反应液倒入到 200 ml 冰水中, 终止反应, 并继续搅拌 1 h。然后将析出的固体过滤, 用乙醇重结晶, 得到中间体 3.1 g (8 mmol), 收率 80%。化合物 **4a~4h** 也采用此法合成。

2.1.2 1-(3,4,5-三甲氧基苯甲酰基)哌嗪(**3**)的合成

取中间体(**2**)1 g (5.3 mmol), 加入到 HCl-乙酸乙酯溶液中常温搅拌约 3 h, TLC 监测反应, 待原料点消失后过滤, 烘干, 得到中间体三甲氧基没食子酰哌嗪(**3**)1.4 g, 直接用于下一步反应。

2.1.3 4-(2,3-二氯苯甲酰基)-1-(3,4,5-三甲氧基苯甲酰基)哌嗪的合成(**4i**)

取三甲氧基没食子酰哌嗪(**3**)0.5 g (1.8 mmol), 2,3-二氯苯甲酸 0.35 g (1.85 mmol), 其余方法同化合物 **2** 的合成。得到目标化合物 0.56 g (1.26 mmol),

收率 70%。化合物 **4j~4n** 的合成均采用此法。

2.1.4 4-(2,3-二氯苯甲酰基)-1-(3,4,5-三羟基苯甲酰基)哌嗪的合成(**1i**)

取 **4a** 0.56 g (1.26 mmol), 在无氧条件下, 置于 100 ml 的三口瓶, 加入 20 ml 干燥二氯甲烷, 然后降温至 (-20~-30) °C, 加入 5 ml 2 mol/L 的三溴化硼二氯甲烷溶液, 然后缓慢升温至室温, 并搅拌反应 10 h。再将反应液降温至 -10 °C, 然后缓慢加入 200 ml 冰水猝灭反应, 再室温搅拌 1 h, 如有固体析出, 过滤。滤液用分液漏斗分出二氯甲烷层, 并用 10 ml 水, 洗 2 次, Na₂SO₄ 干燥, 然后除去硫酸钠, 再除去溶剂, 得到的固体和前面的滤饼合并, 并经乙醇重结晶, 放置于烘箱烘干。得到最终产物 273 mg, 收率 (0.67 mmol) 53%。其余 **1** 类化合物均采用此方法合成。

2.2 化合物的抗真菌活性测试

选用 ATCC 标准株 *Candida albicans* 为质控菌, 临床耐药株 *Candida albicans* 103 为实验菌株。氟康唑注射液 (批号: A447404) 购自美国辉瑞公司。采用美国国家临床实验室标准委员会 (CLSI)

推荐的标准化抗真菌敏感性实验方法^[8]测试体外抗真菌活性,以目标化合物 MIC₈₀ 作为判断终点。

3 结果

共合成化合物 11 个,经检索,均未见文献报道。所有目标化合物均经¹H NMR 和 MS 确证结构,相关理化数据见表 1。目标化合物的抗真菌活性实验结果见表 2。

4 讨论

目标化合物采用 PyBop/DIEA 条件下与相应的哌嗪缩合而得到,该反应操作和条件简便易行,收率较高。脱甲基保护采用三溴化硼的方法,副反应少,收率较好。文献报道了没食子酸体外对敏感

念珠菌的 MIC 值在 12.5 ~ 100 μg/ml^[3];体内模式实验中,腹腔注射 80 mg/(kg·d)可以显著提高系统性真菌感染的治愈率^[3]。因此,没食子酸是一个较好的先导化合物。活性测试所选用的 2 株白色念珠菌临床分离株均为耐药菌株(氟康唑的 MIC₈₀ > 64 μg/ml)。合成的目标化合物中,所有没食子酰哌嗪(1b, 1d 和 1f)化合物无论单用还是联用,均对 2 株耐药菌表现出较好的抗真菌活性,并且这些活性化合物在单用时 MIC₈₀ ≤ 64 μg/ml,均显著优于没食子酸的抗真菌活性(MIC₈₀ > 64 μg/ml)。初步的构效关系表明,没食子酸的游离三羟基结构是重要的药效团,如果羟基被保护起来,活性将会丧失。本研究结果为进一步设计具有抗真菌作用的没食子酸衍生物提供了理论和物质基础。

表 1 目标化合物的结构及核磁共振图谱和质谱数据

化合物	结构式	MS[M+H] ⁺	¹ H NMR(δ, ppm)
1a		425	(300 MHz, CDCl ₃) 7.20 (q, J=8.1 Hz, 2H), 6.99 (d, J=7.5 Hz, 1H), 6.68 (s, 2H), 4.09 – 3.59 (m, 13H), 3.09 (s, 4H)
1b		383	¹ H NMR (600 MHz, MeOD) δ 7.30 – 7.19 (m, 2H), 7.14 – 7.06 (m, 1H), 6.48 (s, 2H), 3.81 (s, 4H), 3.06 (s, 4H)
1c		390	(600 MHz, Chloroform-d) δ 7.19 (t, J=8.1 Hz, 1H), 6.92 – 6.86 (m, 2H), 6.82 – 6.79 (m, 1H), 6.65 (s, 2H), 3.87 (d, J=4.9 Hz, 9H), 3.86 – 3.33 (m, 4H), 3.21 (s, 4H)
1d		348	(600 MHz, Methanol-d ₄) δ 7.19 (t, J=8.1 Hz, 1H), 6.96 (t, J=2.2 Hz, 1H), 6.92 – 6.87 (m, 1H), 6.85 – 6.79 (m, 1H), 6.46 (s, 2H), 3.75 (s, 4H), 3.21 (s, 4H)
1e		390	(300 MHz, Chloroform-d) δ 7.43 – 7.35 (m, 1H), 7.29 – 7.20 (m, 1H), 7.08 – 6.96 (m, 2H), 6.67 (d, J=1.9 Hz, 2H), 4.12 (d, J=5.1 Hz, 2H), 3.88 (dd, J=5.4, 1.8 Hz, 9H), 3.67 (d, J=15.9 Hz, 2H), 3.08 (s, 4H)
1f		348	(600 MHz, Methanol-d ₄) δ 7.39 (dd, J=7.9, 1.5 Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.17 – 7.15 (m, 1H), 7.05 (d, J=1.5 Hz, 1H), 6.48 (s, 2H), 3.84 (d, J=47.0 Hz, 4H), 3.06 (s, 4H)
1g		386	(300 MHz, Chloroform-d) δ 7.26 (d, J=8.0 Hz, 1H), 7.21 (d, J=8.2 Hz, 1H), 6.66 (s, 3H), 6.54 (d, J=8.2 Hz, 1H), 3.87 (d, J=2.9 Hz, 12H), 3.80 (s, 4H), 3.24 (s, 4H)
1h		386	(600 MHz, Chloroform-d) δ 6.91 (s, 2H), 6.85 (d, J=9.0 Hz, 2H), 6.65 (s, 2H), 3.87 (s, 9H), 3.86 (s, 3H), 3.77 (s, 4H), 3.08 (s, 4H)
1i		452	(300 MHz, Chloroform-d) δ 7.52 (d, J=8.0 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.21 (d, J=1.5 Hz, 1H), 6.63 (s, 2H), 3.87 (d, J=2.9 Hz, 9H), 3.81 – 3.14 (m, 8H)
1j		483	(300 MHz, Chloroform-d) δ 7.40 (d, J=2.5 Hz, 1H), 7.21 (dd, J=8.8, 2.5 Hz, 1H), 6.97 (d, J=8.8 Hz, 1H), 6.63 (s, 2H), 4.80 (s, 2H), 3.88 (s, 9H), 3.69 (s, 4H), 3.66 (s, 4H)
1k		410	(300 MHz, Chloroform-d) δ 7.72 (d, J=15.3 Hz, 1H), 7.62 – 7.48 (m, 2H), 7.44 – 7.32 (m, 3H), 6.87 (d, J=15.4 Hz, 1H), 6.65 (s, 2H), 3.88 (d, J=1.5 Hz, 9H), 3.75 (s, 8H)

量相对准确等优点,故适合开发研制成利巴韦林脂质体吸入粉雾剂。此外,制备的利巴韦林脂质体冻干粉还可开发为溶液气雾剂,故在药剂开发方面也有较好前景。然而,本实验尚为初步研究,仍需要对制剂处方工艺进一步优化,以进一步提高包封率与改善整体粒径分布等性能。如要进入临床试用,还需对给药装置筛选、体内外药物沉积、药效学等进行深入考察,以满足临床使用的基本要求。

【参考文献】

- [1] KNOWLES S R, PHILLIPS E J, DRESSER L, et al. Common adverse events associated with the use of ribavirin for severe acute respiratory syndrome in Canada[J]. *Clin Infect Dis*, 2003, 37(8): 1139-1142.
- [2] OMRANI A S, SAAD M M, BAIG K, et al. Ribavirin and interferon Alfa-2a for severe Middle East respiratory syndrome coronavirus infection: a retrospective cohort study[J]. *Lancet Infect Dis*, 2014, 14(11): 1090-1095.
- [3] CHENG V C, LAU S K, WOO P C, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and re-emerging infection[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2007, 20(4): 660-694.
- [4] DAILYMED. Formula, VIRAZOLE® (Ribavirin for Inhalation

Solution, USP) PRESCRIBING INFORMATION [EB/OL]. (2019-5-1). <https://dailymed.nlm.nih.gov>.

- [5] 酃建娣. 利巴韦林气雾剂治疗76例小儿病毒性上呼吸道感染的临床研究[J]. *中国初级卫生保健*, 2010, 24(5): 81-82.
- [6] 杜巧玲, 王安水. 利巴韦林气雾剂治疗小儿上呼吸道感染60例观察[J]. *临床误诊误治*, 2007, 20(4): 25-26.
- [7] 蔡清. 利巴韦林气雾剂治疗小儿上呼吸道感染的多中心临床观察[J]. *上海医药*, 2007, 28(9): 413-415.
- [8] 曹兰芳, 陈培丽, 王立波, 等. 利巴韦林气雾剂治疗小儿上呼吸道感染的多中心临床观察[J]. *临床儿科杂志*, 2006, 24(6): 525-528.
- [9] 屈哲, 李珊珊, 吕建军, 等. 脂质体药物作用于机体的病理表现和机制[C] 中国药物毒理学年会. 2012: 52.
- [10] 梁锦涓, 朱曼, 任浩洋. 多柔比星脂质体制剂与非脂质体制剂不良反应/事件评价[J]. *中国新药杂志*, 2013, 22(9): 1100-1104.
- [11] THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. USP 40, USA: United States Pharmacopeial Convention[M], 2017: 5995-5996.
- [12] 高蕾, 马玉楠, 王亚敏, 等. 吸入粉雾剂给药装置浅析及其综合评价[J]. *中国新药杂志*, 2019, 28(3): 335-337.

[收稿日期] 2020-04-14 [修回日期] 2020-09-07

[本文编辑] 陈盛新

(上接第 508 页)

表 2 目标化合物的体外抗真菌活性

化合物	<i>C. albicans</i> 103 (μg/ml)		分级抑制浓度指数(FICI)
	单用	联用 ¹⁾	
1a	>64	>64	>1
1b	16	4	0.254
1c	>64	>64	>1
1d	64	4	0.141
1e	>64	>64	>1
1f	32	8	0.254
1g	>64	>64	>1
1h	>64	>64	>1
1i	>64	>64	>1
1j	>64	>64	>1
1k	>64	>64	>1
没食子酸	>64	4	0.035

注: ¹⁾表示与氟康唑(8 μg/ml)联用。

【参考文献】

- [1] ALI I, SATTI N K, DUTT P, et al. Hydroxychavicol: A phytochemical targeting cutaneous fungal infections[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 37867.
- [2] PERUSQUÍA-ORTIZ A M, VÁZQUEZ-GONZÁLEZ D, BON-

IFAZ A. Opportunistic filamentous mycoses: aspergillosis, mucormycosis, phaeohyphomycosis and hyalohyphomycosis[J]. *JDDG*, 2012, 10(9): 611-621.

- [3] LI Z J, LIU M, DAWUTI G, et al. Antifungal activity of Gallic acid in vitro and in vivo[J]. *Phytother Res*, 2017, 31(7): 1039-1045.
- [4] AGLAN H A, AHMED H H, EL-TOUMY S A, et al. Gallic acid against hepatocellular carcinoma: An integrated scheme of the potential mechanisms of action from in vivo study[J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(6): 101042831769912.
- [5] LIMA K G, KRAUSE G C, SCHUSTER A D, et al. Gallic acid reduces cell growth by induction of apoptosis and reduction of IL-8 in HepG2 cells[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84: 1282-1290.
- [6] TAKAI E, HIRANO A, SHIRAKI K. Effects of alkyl chain length of gallate on self-association and membrane binding[J]. *J Biochem*, 2011, 150(2): 165-171.
- [7] WANG Z Y, XIA Q, LIU X, et al. Phytochemistry, pharmacology, quality control and future research of forsythia suspensa (thunb.) vahl: A review[J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 210: 318-339.
- [8] CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Standard M27-A3.3rd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

[收稿日期] 2019-08-29 [修回日期] 2019-10-29

[本文编辑] 李睿曼