

· 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 μg/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 Jiachao², 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 Finigan 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。

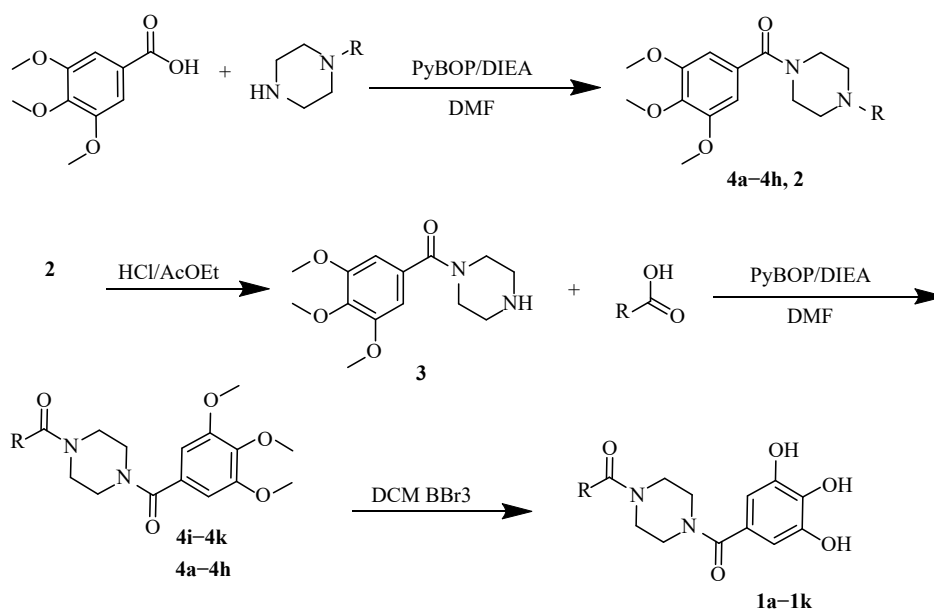


图 1 目标化合物的合成路线

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, <i>J</i> =8.1 Hz, 2H), 6.99 (d, <i>J</i> =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- <i>d</i>) δ 7.19 (t, <i>J</i> =8.1 Hz, 1H), 6.92 – 6.86 (m, 2H), 6.82 – 6.79 (m, 1H), 6.65 (s, 2H), 3.87 (d, <i>J</i> =4.9 Hz, 9H), 3.86 – 3.33 (m, 4H), 3.21 (s, 4H)
1d		348	(600 MHz, Methanol- <i>d</i> ₄) δ 7.19 (t, <i>J</i> =8.1 Hz, 1H), 6.96 (t, <i>J</i> =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- <i>d</i>) δ 7.43 – 7.35 (m, 1H), 7.29 – 7.20 (m, 1H), 7.08 – 6.96 (m, 2H), 6.67 (d, <i>J</i> =1.9 Hz, 2H), 4.12 (d, <i>J</i> =5.1 Hz, 2H), 3.88 (dd, <i>J</i> =5.4, 1.8 Hz, 9H), 3.67 (d, <i>J</i> =15.9 Hz, 2H), 3.08 (s, 4H)
1f		348	(600 MHz, Methanol- <i>d</i> ₄) δ 7.39 (dd, <i>J</i> =7.9, 1.5 Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.17 – 7.15 (m, 1H), 7.05 (d, <i>J</i> =1.5 Hz, 1H), 6.48 (s, 2H), 3.84 (d, <i>J</i> =47.0 Hz, 4H), 3.06 (s, 4H)
1g		386	(300 MHz, Chloroform- <i>d</i>) δ 7.26 (d, <i>J</i> =8.0 Hz, 1H), 7.21 (d, <i>J</i> =8.2 Hz, 1H), 6.66 (s, 3H), 6.54 (d, <i>J</i> =8.2 Hz, 1H), 3.87 (d, <i>J</i> =2.9 Hz, 12H), 3.80 (s, 4H), 3.24 (s, 4H)
1h		386	(600 MHz, Chloroform- <i>d</i>) δ 6.91 (s, 2H), 6.85 (d, <i>J</i> =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- <i>d</i>) δ 7.52 (d, <i>J</i> =8.0 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.21 (d, <i>J</i> =1.5 Hz, 1H), 6.63 (s, 2H), 3.87 (d, <i>J</i> =2.9 Hz, 9H), 3.81 – 3.14 (m, 8H)
1j		483	(300 MHz, Chloroform- <i>d</i>) δ 7.40 (d, <i>J</i> =2.5 Hz, 1H), 7.21 (dd, <i>J</i> =8.8, 2.5 Hz, 1H), 6.97 (d, <i>J</i> =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- <i>d</i>) δ 7.72 (d, <i>J</i> =15.3 Hz, 1H), 7.62 – 7.48 (m, 2H), 7.44 – 7.32 (m, 3H), 6.87 (d, <i>J</i> =15.4 Hz, 1H), 6.65 (s, 2H), 3.88 (d, <i>J</i> =1.5 Hz, 9H), 3.75 (s, 8H)