

含没食子酸单元的马蹄金素衍生物的合成及其抗 HBV 活性研究

刘毅^{1,2,3}, 卢苇^{1,2,3}, 刘青川⁴, 黄正明⁴, 梁光义^{2,3,5*}, 徐必学^{2,3*}

- (1. 贵州大学药学院, 贵州 贵阳 550002; 2. 贵州医科大学省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵州 贵阳 550014; 3. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵州 贵阳 550014; 4. 中国人民解放军第 302 医院, 北京 100039; 5. 贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550002)

摘要: 本文以马蹄金素 (Matijjin-Su, MTS) 为先导化合物进行结构优化, 通过加入没食子酸结构单元, 设计并合成了 11 个新的衍生物。对所合成的目标化合物以 HepG2 2.2.15 细胞进行体外抗 HBV 活性测试, 结果表明: 除 **4a** 和 **4b** 外, 其余目标化合物均有一定的体外抗 HBV 活性, 其中 **5c**、**6c** 和 **6d** 显示较强的抗 HBV 活性, 其 IC₅₀ 达到了 6.12、8.44、9.86 μmol·L⁻¹, 说明含有没食子酸结构的马蹄金素衍生物具有进一步研究的价值。

关键词: 乙肝病毒; 马蹄金素衍生物; 合成; 生物活性

中图分类号: R917; R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 07-1140-06

Synthesis and anti-HBV activity evaluation of Matijjin-Su derivatives containing gallic acid moiety

LIU Yi^{1,2,3}, LU Wei^{1,2,3}, LIU Qing-chuan⁴, HUANG Zheng-ming⁴, LIANG Guang-yi^{2,3,5*}, XU Bi-xue^{2,3*}

(1. College of Pharmacy, Guizhou University, Guiyang 550002, China; 2. State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550014, China; 3. The Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550014, China; 4. 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China; 5. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

Abstract: In this study, eleven containing gallic acid moiety derivatives of Matijjin-Su (MTS) were synthesized and evaluated for their anti-HBV activities in HepG2 2.2.15 cells in an effort to find novel effective anti-hepatitis B virus (HBV) agents. Compounds **5c**, **6c** and **6d** exhibited significant anti-HBV activity with IC₅₀ values of 6.12, 8.44 and 9.86 μmol·L⁻¹, respectively. Incorporation of gallic acid moiety into MTS derivatives can lead to profound changes in their anti-HBV activity, and could be worth of further research.

Key words: hepatitis B virus; derivative of Matijjin-Su; synthesis; biological activity

乙肝病毒 (hepatitis B virus, HBV) 的感染可引起急、慢性的乙型肝炎, 世界卫生组织 2016 年 6 月公布的数据显示全球约有 2.4 亿人感染慢性乙型肝炎 (简称乙肝, 乙肝表面抗原阳性持续至少 6 个月)^[1], 乙肝患者还可能会逐渐发展为肝硬化、肝癌等^[2, 3]。

从免疫学角度看, 乙肝病毒携带者比非乙肝病毒携带者的肝癌发生率高 100 倍^[4]。临床上用药治疗乙肝的药物主要有 α-干扰素类药物和核苷类药物^[5], 到目前为止, 还没有药物能够彻底清除体内 HBV 并最终治愈乙肝^[6], 因此, 寻找和开发具有独特化学结构的创新药物显得尤为重要。本课题组前期从治疗肝炎的民族药马蹄金中发现了具有抗 HBV 活性的马蹄金素 (Matijjin-Su, MTS), 并以其为先导化合物设计合成了一系列衍生物。其中对 1 个优选的 MTS 衍生物 (研发代号 Y101, 结构见图 1) 进行了深入系统的临床前

收稿日期: 2017-01-16; 修回日期: 2017-02-18.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81360472); 西部之光人才 (2014 年) 资助项目.

*通讯作者 Tel: 86-851-83807713,

E-mail: guangyi_liang@126.com; bixue_xu@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0059

研究, 获得了国家食品药品监督管理总局颁发的临床批件 (原料药及其制剂批件号: 2013L02491, 2014L00070)^[7,8]。

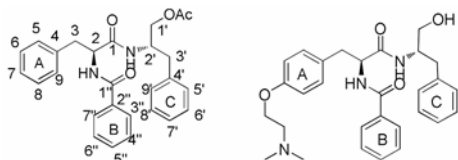


Figure 1 Chemical structures of MTS and Y101

没食子酸酚羟基经过甲基化后的衍生物在药物中得到了广泛应用, 如治疗心率失常药物^[9]、抗疲劳药物^[10]等, 甲氧基都发挥了很重要的作用。很多药物结构中甲氧基也广泛存在^[11-13], 如甲氧基化的黄酮在抗癌、抗炎活性上表现非常好, 且甲氧基的存在提高了化合物的脂溶性, 增加机体的药物吸收^[14]。在前期研究基础上^[15,16], 本文以马蹄金素为母体, 设计合成了 B 环为 3 个羟基被甲基化的没食子酸马蹄金素衍生物, 并对其进行了体外抗 HBV 活性测试, 希望

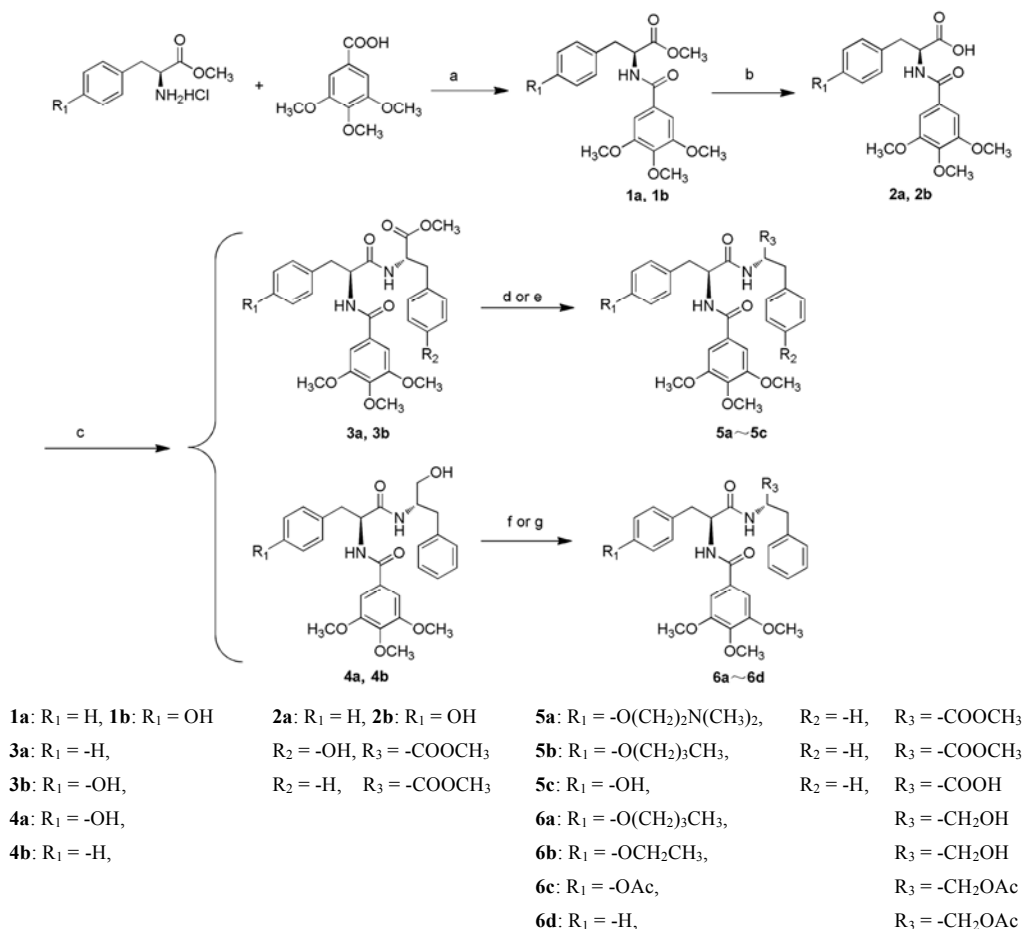
在拓宽马蹄金素结构修饰产物类型的同时, 获得更多具有深入研究价值的目标分子。

选择 *L*-苯丙氨酸甲酯盐酸盐或 *L*-酪氨酸甲酯盐酸盐为原料, 首先将其与 3,4,5-三甲氧基苯甲酸进行缩合反应得到化合物 **1** (**1a**、**1b**), 由化合物 **1** 水解得羧酸 **2** (**2a**、**2b**), 再将所得羧酸 **2** 分别与 *L*-苯丙氨酸甲酯盐酸盐、*L*-酪氨酸甲酯盐酸盐或 *L*-苯丙氨酸醇进行缩合反应, 即得目标化合物 **3** (**3a**、**3b**) 和 **4** (**4a**、**4b**), 最后通过对甲酯的水解和羟基的亲核取代, 即可得目标化合物 **5** (**5a**~**5c**) 和 **6** (**6a**~**6d**)。见合成路线图 1。

结果与讨论

1 目标化合物的合成

根据前期研究中积累的马蹄金素衍生物在抗 HBV 活性方面的构效关系数据, 选取不同的基团在 R₁、R₂、R₃ 三个位点进行取代, 或者通过化学方法换成不同的基团, 共合成目标化合物 11 个。其理化性质见表 1。



a) IBCF, NMM, CH₂Cl₂, DMF, 0 °C, 8 h; b) NaOH, DMF, rt.; c) Methyl *L*-tyrosinate hydrochloride or *L*-phenylalaninol, IBCF, NMM, CH₂Cl₂, DMF, 0 °C, 8 h; d) RX, K₂CO₃, DMF; e) NaOH, DMF, rt.; f) RX, K₂CO₃, DMF; g) Ac₂O, pyridine, r.t., 8 h.

Scheme 1 Synthetic route of target compounds

Table 1 Physical properties and spectral data of the synthesized analogues

Compd.	Yield /%	mp/°C	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz) and ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 100 MHz)	[α] _D ²⁰ (c 1)	ESI-MS (<i>m/z</i>) [M+H] ⁺
3a	31.03	192–193	¹ H NMR δ: 9.25 (1H, s, Ar-OH), 8.52 (2H, m, CONH), 7.37 (2H, d, <i>J</i> = 7.2 Hz, H-6,8), 7.28–7.14 (3H, m, H-5,9, H-7), 7.06–7.00 (4H, m, H-5',9', H-3'',7''), 6.63 (2H, d, <i>J</i> = 8.8 Hz, H-6',8'), 4.75 (1H, m, H-2), 4.42 (1H, m, H-2'), 3.79–3.68 (9H, m, 3×OCH ₃), 3.58 (3H, m, COOCH ₃), 3.12–2.88 (4H, m, H-3, H-3'); ¹³ C NMR δ: 172.46 (C-1), 172.27 (C-1'), 166.16 (C-1''), 156.52 (C-7'), 152.89 (C-4'',6''), 140.36 (C-5''), 138.82 (C-4), 130.53 (C-5',9'), 129.74 (C-4'), 128.54 (C-6,8), 127.46 (C-5,9), 126.75 (C-7, H-2''), 115.58 (C-6',8'), 105.39 (C-3'',7''), 60.55 (Ar-OCH ₃), 56.41 (C-2), 54.89 (C-2'), 54.69 (Ar-(OCH ₃) ₂), 52.32 (COOCH ₃), 37.63 (C-3), 36.49 (C-3').	–52.5 (DMF)	537.2
3b	33.54	169–171	¹ H NMR δ: 9.18 (1H, s, Ar-OH), 8.54 (1H, d, <i>J</i> = 7.2 Hz, CONH), 8.46 (1H, d, <i>J</i> = 8.4 Hz, CONH), 7.35–7.02 (9H, m, H-5',9', H-5,9, H-3'',7''), 6.61 (2H, d, <i>J</i> = 8.0 Hz, H-6,8), 4.66 (1H, m, H-2), 4.50 (1H, m, H-2'), 3.86–3.66 (9H, m, 3×OCH ₃), 3.58 (1H, s, COOCH ₃), 3.05–2.78 (4H, m, H-3, H-3'); ¹³ C NMR δ: 172.43 (C-1), 172.34 (C-1'), 166.11 (C-1''), 156.21 (C-7), 152.88 (C-4'',6''), 140.34 (C-5''), 137.55 (C-4'), 130.66 (C-5,9), 129.83 (C-4), 129.58 (C-6',8'), 128.77 (C-5',9'), 127.09 (C-7, H-2''), 115.30 (C-6,8), 105.40 (C-3'',7''), 60.56 (Ar-OCH ₃), 56.41 (C-2), 55.24 (C-2'), 54.31 (Ar-(OCH ₃) ₂), 52.36 (COOCH ₃), 37.12 (C-3), 36.95 (C-3').	–66.3 (DMF)	537.2
4a	29.48	204–206	¹ H NMR δ: 9.14 (1H, s, Ar-OH), 8.40 (1H, d, <i>J</i> = 8.4 Hz, CONH), 7.84 (1H, d, <i>J</i> = 8.4 Hz, CONH), 7.22–7.09 (11H, m, H-3'',7'', H-5,9,6,8, H-5',9'), 6.62 (1H, d, <i>J</i> = 8.0 Hz, CH ₂ OH), 4.80 (1H, m, H-2), 4.59 (1H, m, H-2'), 3.82–3.69 (11H, m, 3×OCH ₃ , CH ₂ OH), 2.96–2.78 (4H, m, H-3, H-3'); ¹³ C NMR δ: 171.19 (C-1), 165.59 (C-1''), 155.72 (C-4''), 152.45 (C-6'), 139.89 (C-5''), 139.07 (C-4), 130.20 (C-6',8'), 129.50 (C-6,8), 129.23 (C-5',9'), 128.46 (C-5,9), 128.13 (C-7), 125.95 (C-7), 114.84 (C-2''), 104.99 (C-3'',7''), 62.20 (C-1'), 60.13 (Ar-OCH ₃), 56.00 (C-2), 55.17 (C-2'), 52.54 (Ar-(OCH ₃) ₂), 36.66 (C-3'), 36.43 (C-3).	–68.6 (MeOH)	509.2
4b	42.07	190–192	¹ H NMR δ: 8.49 (1H, d, <i>J</i> = 8.8 Hz, CONH), 7.90 (1H, d, <i>J</i> = 8.4 Hz, CONH), 7.34–7.07 (12H, m, H-5,9, H-5',9', H-3'',7''), 4.84 (1H, t, <i>J</i> = 5.6 Hz, CH ₂ OH), 4.67 (1H, m, H-2), 3.88 (1H, m, H-2'), 3.79–3.67 (9H, m, 3×OCH ₃), 3.38–3.23 (2H, m, H-1'), 3.07–2.63 (4H, m, H-3, H-3'); ¹³ C NMR δ: 172.12 (C-1), 165.69 (C-1''), 152.50 (C-4'',6''), 139.97 (C-5''), 139.06 (C-4'), 138.47 (C-4), 129.41 (C-6',8'), 129.32 (C-6,8), 129.27 (C-5',9'), 128.18 (C-5,9), 128.13 (C-7), 126.32 (C-7), 126.01 (C-2''), 105.02 (C-3'',7''), 62.24 (C-1'), 60.18 (Ar-OCH ₃), 56.04 (C-2'), 54.87 (C-2), 52.64 (Ar-(OCH ₃) ₂), 37.44 (C-3'), 36.48 (C-3).	–72.4 (MeOH)	493.3
5a	32.50	125–127	¹ H NMR δ: 8.57 (1H, d, <i>J</i> = 7.6 Hz, CONH), 8.50 (1H, d, <i>J</i> = 8.4 Hz, CONH), 7.28–7.18 (7H, m, H-5',9', H-5,9), 7.07 (2H, s, H-3'',7''), 6.81 (2H, d, <i>J</i> = 8.8 Hz, H-6,8), 4.70 (1H, m, H-2), 4.52 (1H, m, H-2'), 3.92 (2H, t, <i>J</i> = 6.8 Hz, Ar-OCH ₂ CH ₂ N(CH ₂ CH ₃) ₂), 3.81–3.68 (9H, m, 3×OCH ₃), 3.59 (3H, s, COOCH ₃), 3.06–2.83 (4H, m, H-3, H-3'), 2.72 (2H, t, <i>J</i> = 5.6 Hz, Ar-OCH ₂ CH ₂ N(CH ₂ CH ₃) ₂), 2.54 (4H, m, Ar-OCH ₂ CH ₂ N(CH ₂ CH ₃) ₂), 0.95 (6H, m, Ar-OCH ₂ CH ₂ N(CH ₂ CH ₃) ₂); ¹³ C NMR δ: 172.39 (C-1), 172.33 (C-1'), 166.08 (C-1''), 157.49 (C-7), 152.87 (C-4'',6''), 140.34 (C-5''), 137.53 (C-4'), 130.72 (C-5,9), 130.59 (C-6',8'), 129.76 (C-4), 129.56 (5',9'), 128.76 (C-7), 127.08 (C-2''), 114.46 (C-6,8), 105.39 (C-3'',7''), 66.55 (Ar-OCH ₂ CH ₂ N(CH ₂ CH ₃) ₂), 60.54 (Ar-OCH ₃), 56.41 (C-2), 55.16 (C-2'), 54.32 (Ar-(OCH ₃) ₂), 52.35 (Ar-OCH ₂ CH ₂ N(CH ₂ CH ₃) ₂), 51.79 (COOCH ₃), 47.43 (Ar-OCH ₂ CH ₂ N(CH ₂ CH ₃) ₂), 37.04 (C-3), 36.95 (C-3'), 12.26 (Ar-OCH ₂ CH ₂ N(CH ₂ CH ₃) ₂).	–40.0 (MeOH)	608.3
5b	47.91	175–177	¹ H NMR δ: 8.57 (1H, d, <i>J</i> = 7.4 Hz, CONH), 8.50 (1H, d, <i>J</i> = 8.6 Hz, CONH), 7.29–7.16 (7H, m, H-5,9, H-5',9'), 7.07 (2H, s, H-3'',7''), 6.83–6.77 (2H, m, H-6,8), 4.70 (1H, m, H-2), 4.54–4.45 (1H, m, H-2'), 3.88 (2H, t, <i>J</i> = 6.5 Hz, Ar-OCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃), 3.80–3.68 (9H, m, 3×OCH ₃), 3.59 (3H, s, COOCH ₃), 3.12–2.79 (4H, m, H-3, H-3'), 1.71–1.58 (2H, m, Ar-OCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃), 1.46–1.31 (2H, m, Ar-OCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃), 0.90 (3H, t, <i>J</i> = 7.4 Hz, Ar-OCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃); ¹³ C NMR δ: 171.97 (C-1), 171.91 (C-1'), 165.67 (C-1''), 157.25 (C-7), 152.45 (C-4'',6''), 139.93 (C-5''), 137.10 (C-4'), 130.29 (C-5,9), 130.04 (C-6',8'), 129.33 (C-4), 129.15 (C-5',9'), 128.35 (C-7), 126.66 (C-2''), 113.99 (C-6,8), 104.97 (C-3'',7''), 66.97 (Ar-OCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃), 60.14 (Ar-OCH ₃), 55.99 (C-2), 54.75 (C-2'), 53.90 (Ar-(OCH ₃) ₂), 51.94 (COOCH ₃), 36.58 (C-3), 36.31 (C-3'), 30.87 (Ar-OCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃), 18.83 (Ar-OCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃), 13.78 (Ar-OCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃).	–62.1 (DMF)	593.3
5c	89.94	204–205	¹ H NMR δ: 9.17 (1H, s, Ar-OH), 8.46 (1H, d, <i>J</i> = 8.4 Hz, CONH), 8.32 (1H, d, <i>J</i> = 7.6 Hz, CONH), 7.24–7.05 (9H, m, H-5',9', H-5,9, H-3'',7''), 6.62 (2H, d, <i>J</i> = 8.4 Hz, H-6,8), 4.66 (1H, m, H-2), 4.45 (1H, m, H-2'), 3.86–3.65 (9H, m, 3×OCH ₃), 3.12–2.81 (4H, m, H-3, H-3'); ¹³ C NMR δ: 173.32 (C-1'), 172.25 (C-1), 166.14 (C-1''), 156.18 (C-7), 152.87 (C-4'',6''), 140.32 (C-5''), 137.96 (C-4'), 130.66 (C-5,9), 129.88 (C-4), 129.66 (C-6',8'), 128.90 (C-5',9'), 128.69 (C-7), 126.93 (C-2''), 115.30 (C-6,8), 105.40 (C-3'',7''), 60.56 (Ar-OCH ₃), 56.41 (C-2'), 55.35 (C-2), 54.14 (Ar-(OCH ₃) ₂), 37.06 (C-3), 36.74 (C-3').	–49.2 (MeOH)	523.2
6a	61.22	170–172	¹ H NMR δ: 8.49 (1H, d, <i>J</i> = 8.8 Hz, CONH), 7.94 (1H, d, <i>J</i> = 8.3 Hz, CONH), 7.28–6.80 (12H, m, H-5,9,6,8, H-5',9', H-3'',7'',CH ₂ OH), 4.85 (1H, m, H-2), 4.63 (1H, m, H-2'), 3.87–3.69 (13H, m, Ar-OCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃ , 3×OCH ₃ , H-1'), 3.01–2.62 (4H, m, H-3, H-3'), 1.68–1.57 (2H, m, Ar-OCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃), 1.45–1.31 (2H, m, Ar-OCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃), 0.90 (3H, t, <i>J</i> = 7.4 Hz, Ar-OCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃); ¹³ C NMR δ: 171.42 (C-1), 165.79 (C-1''), 157.41 (C-7), 152.67 (C-4'',6''), 140.10 (C-5''), 139.28 (C-4'), 130.49 (C-5,9), 130.38 (C-6',8'), 129.65 (C-4), 129.46 (C-5',9'), 128.36 (C-7), 126.18 (C-2''), 114.18 (C-6,8), 105.19 (C-3'',7''), 67.17 (Ar-OCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃), 62.42 (C-1'), 60.35 (Ar-OCH ₃), 56.22 (C-2'), 55.36 (C-2), 52.81 (Ar-(OCH ₃) ₂), 36.83 (C-3), 36.67 (C-3), 31.08 (Ar-OCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃), 19.04 (Ar-OCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃), 14.00 (Ar-OCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃).	–83.2 (DMF)	565.4

Compd.	Yield /%	mp/°C	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz) and ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 100 MHz)	Continued	
				[α] _D ²⁰ (c 1)	ESI-MS (m/z) [M+H] ⁺
6b	70.47	179–181	¹ H NMR δ: 8.49 (1H, d, <i>J</i> = 8.6 Hz, CONH), 7.93 (1H, d, <i>J</i> = 8.3 Hz, CONH), 7.31–6.79 (12H, m, H-5,9,6,8, H-5',9', H-3",7", CH ₂ OH), 4.84 (1H, m, H-2), 4.65 (1H, m, H-2'), 3.99–3.62 (13H, m, Ar-OCH ₂ CH ₃ , H-1', 3×OCH ₃), 3.07–2.68 (4H, m, H-3, H-3'), 1.27 (3H, t, <i>J</i> = 7.0 Hz, Ar-OCH ₂ CH ₃); ¹³ C NMR δ: 171.47 (C-1), 165.82 (C-1"), 157.27 (C-7), 152.68 (C-4",6"), 140.13 (C-5"), 139.29 (C-4'), 130.52 (C-5,9), 130.40 (C-6',8'), 129.65 (C-4), 129.47 (C-5',9'), 128.37 (C-7'), 126.19 (C-2"), 114.15 (C-6,8), 105.20 (C-3",7"), 63.05 (C-1'), 62.43 (Ar-OCH ₂ CH ₃), 60.36 (Ar-OCH ₃), 56.22 (C-2'), 55.35 (C-2), 52.84 (Ar-(OCH ₃) ₂), 36.85 (C-3'), 36.69 (C-3), 14.97 (Ar-OCH ₂ CH ₃).	-70.6 (MeOH)	537.3
6c	86.16	211–212	¹ H NMR δ: 8.54 (1H, d, <i>J</i> = 8.4 Hz, CONH), 8.22 (1H, d, <i>J</i> = 8.2 Hz, CONH), 7.36 (2H, d, <i>J</i> = 8.3 Hz, H-6',8'), 7.28–7.14 (5H, m, H-5,9,7, H-5',9'), 7.10 (2H, s, H-3",7"), 7.01 (2H, d, <i>J</i> = 8.3 Hz, H-6,8), 4.69 (1H, m, H-2), 4.19 (1H, m, H-2'), 4.05–3.61 (11H, m, H-1', 3×OCH ₃), 3.13–2.70 (4H, m, H-3, H-3'), 2.22 (3H, s, Ar-OCOCH ₃), 1.99 (3H, s, CH ₂ OCOCH ₃); ¹³ C NMR δ: 171.49 (C-1), 170.58 (CH ₂ OCOCH ₃), 169.45 (Ar-OCOCH ₃), 165.90 (C-1"), 152.68 (C-4",6"), 149.20 (C-7), 140.18 (C-5"), 138.24 (C-4'), 136.07 (C-4), 130.37 (C-5,9), 129.53 (C-6',8'), 129.40 (C-5',9'), 128.52 (C-7'), 126.51 (C-2"), 121.61 (C-6,8), 105.23 (C-3",7"), 64.83 (C-1'), 60.35 (Ar-OCH ₃), 56.22 (C-2, Ar-(OCH ₃) ₂), 49.47 (C-2'), 36.96 (C-3'), 36.84 (C-3), 21.10 (CH ₂ OCOCH ₃), 20.90 (Ar-OCOCH ₃).	-69.0 (DMF)	593.2
6d	94.32	177–179	¹ H NMR δ: 8.55 (1H, d, <i>J</i> = 8.4 Hz, CONH), 8.24 (1H, d, <i>J</i> = 8.4 Hz, CONH), 7.35–7.11 (12H, m, H-5-9, H-5',9', H-3",7"), 4.69 (1H, m, H-2), 4.19 (1H, m, H-2'), 4.04–3.67 (11H, m, H-1', 3×OCH ₃), 3.04–2.77 (4H, m, H-3, H-3'), 1.99 (3H, s, CH ₂ OCOCH ₃); ¹³ C NMR δ: 171.78 (C-1), 170.78 (CH ₂ OCOCH ₃), 166.02 (C-1"), 152.88 (C-4",6"), 140.36 (C-5"), 138.81 (C-4'), 138.50 (C-4), 129.78 (C-6',8', H-6,8), 129.69 (C-5',9'), 129.61 (C-5,9), 128.73 (C-7'), 128.52 (C-7), 126.72 (C-2"), 105.44 (C-3",7"), 65.06 (C-1'), 60.55 (Ar-OCH ₃), 56.44 (C-2), 55.35 (Ar-(OCH ₃) ₂), 49.66 (C-2'), 37.95 (C-3'), 36.08 (C-3), 21.12 (CH ₂ OCOCH ₃).	-68.7 (DMF)	537.2

2 衍生物的体外抗 HBV 活性研究

衍生物体外抗 HBV 活性评价采用四氮唑盐 (MTT) 法测定其对细胞的毒性, 选择 HepG2 2.2.15 细胞为 DNA 复制的抑制率模型, 以拉米夫定为阳性对照药, 对所合成的 11 个化合物进行体外抗 HBV 活性评价。

活性测试结果 (表 2) 表明: 马蹄金素的衍生物在测试浓度范围内除 **4a**、**4b** 外均有抗 HBV 活性, 其中化合物 **5c**、**6c** 和 **6d** 表现出良好的抗 HBV 活性, IC₅₀ 优于阳性对照药物拉米夫定, 并且其选择指数也较高。从结构来看, R₃ 为 COOH 时化合物活性较好, 其

Table 2 Inhibitory effect of target compounds on DNA replication in HepG2 2.2.15 cells. ^aNo activity under tested concentration

Compd	TC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	DNA replication	
		IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	SI (TC ₅₀ /IC ₅₀)
3a	100.02	14.91	6.71
3b	258.89	14.91	17.36
4a	— ^a	—	—
4b	—	—	—
5a	103.58	7.13	14.53
5b	269.96	13.50	20.00
5c	447.04	6.12	73.05
6a	296.72	14.17	20.94
6b	282.75	18.64	15.17
6c	295.24	8.44	34.98
6d	407.11	9.86	41.29
MTS	120.18	11.16	10.78
Lamivudine	786.00	18.90	41.59

中化合物 **5c** (IC₅₀: 6.12 μmol·L⁻¹, SI=73.05) 呈现出较好的抗 HBV 活性, 说明含有没食子酸结构的马蹄金素衍生物具有进一步研究的价值。

3 小结

本文以 *L*-苯丙氨酸甲酯盐酸盐、*L*-酪氨酸甲酯盐酸盐、*L*-苯丙氨酸、3,4,5-三甲氧基苯甲酸等为主要原料, 酰化、烷基化、水解、以及用 IBCF 和 NMM 等作为缩合剂形成酰胺 (肽) 键等反应合成了目标化合物 11 个, 用核磁共振、质谱对其进行了结构确证, 并以 HepG2 2.2.15 细胞为 HBV 载体, 对所合成的 11 个衍生物进行了抗 HBV 活性研究, 活性筛选结果表明所合成的化合物对 HBV DNA 复制有一定的抑制作用。在测试浓度范围内, 除化合物 **4a**、**4b** 无活性外, **5c** 的活性最好, 且抗 HBV 活性优于阳性对照药拉米夫定 (IC₅₀: 18.90 μmol·L⁻¹, SI: 41.59), 值得进一步研究开发。

实验部分

熔点用 XT-4 型熔点仪测定, 温度未校正; 核磁共振谱以 TMS 为内标, 用 Inova-400 MHz 型超导核磁共振仪 (美国 Varian 公司) 测定; 质谱用 HP-5793 质谱仪或 HP1100 LC-MS 液质联用仪测定 (美国 Hewlett-Packard 公司); 柱色谱用硅胶 (300~400 目) 及高效薄层板均为青岛海洋化工厂产品; 其余试剂均为市售分析纯或化学纯产品, 除特别说明外, 未经处理直接使用。

1 化学合成

1.1 目标化合物 3a、3b 的合成

1.1.1 中间体 1a、1b 的合成 将 *L*-苯丙氨酸甲酯盐酸盐 25.88 g (120 mmol) 与 3,4,5-三甲氧基苯甲酸 21.22 g (100 mmol) 混合置于反应瓶内, 于 70 °C 真空干燥 1 h, 冷却至室温后溶解于 500 mL 干燥的 CH₂Cl₂ (二氯甲烷) 和 50 mL DMF (*N,N*-二甲基甲酰胺) 中, 再加入 NMM (*N*-甲基吗啡啉) 24.71 mL (225 mmol), 氩气保护, 冰水浴冷却 30 min 后开始滴加 IBCF (氯甲酸异丁酯) 12.65 mL (100 mmol) 和 80 mL CH₂Cl₂ 混合液, 控制其流速使其在 50 min 内滴加完毕, 体系自然升温至室温, 反应 8 h。TLC (氯仿/甲醇=30:1, $R_f=0.5$, 磷钼酸显色) 检测反应完毕; 减压回收 CH₂Cl₂, 加入乙酸乙酯和水, 萃取, 所得有机层依次以稀盐酸、饱和碳酸氢钠溶液及饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压回收乙酸乙酯至干得中间体 1a。将以 *L*-酪氨酸甲酯盐酸盐替换起始原料 *L*-苯丙氨酸甲酯盐酸盐, 按照以上合成方法可制备得中间体 1b。

1.1.2 中间体 2a、2b 的合成 以 2a 为例: 将中间体 1a 溶解于 50 mL DMF 中, 加入 100 mL 氢氧化钠溶液 (1.0 mol·L⁻¹), 室温搅拌反应 2.5 h。TLC (氯仿/甲醇=10:1, $R_f=0.2$, 磷钼酸显色) 检测反应完毕; 浓盐酸调 pH 2~3, 乙酸乙酯萃取, 依次以蒸馏水、饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压回收乙酸乙酯至干得粗品 2a。

1.1.3 化合物 3a、3b、4a、4b 的合成 以 3a 为例: 将上述合成的中间体 2a (其合成见 1.1.2) 35.94 g (100 mmol) 与 *L*-酪氨酸甲酯盐酸盐 27.80 g (120 mmol) 混合置于反应瓶内, 于 70 °C 真空干燥 1 h, 自然冷却后溶解于 350 mL 干燥的 CH₂Cl₂ 和 80 mL DMF 中, 加入 NMM 24.71 mL (225 mmol), 取 IBCF (氯甲酸异丁酯) 12.65 mL (100 mmol) 与 50 mL CH₂Cl₂ 混合置于滴液漏斗中, 氩气保护, 冰水浴 (0 °C) 冷却 30 min 后开始滴加, 控制其流速使其在 50 min 内滴加完毕, 反应 8 h。TLC (氯仿/甲醇=30:1, $R_f=0.4$, 磷钼酸显色) 检测反应完毕; 加水少许终止反应, 减压回收部分 CH₂Cl₂, 乙酸乙酯萃取, 依次用蒸馏水、稀盐酸、饱和碳酸氢钠溶液及饱和氯化钠溶液洗涤, 再用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压回收部分乙酸乙酯, 析出白色固体经纯化后得白色结晶 3a 16.65 g (收率: 31.03%)。3b、4a、4b 用类似方法合成。

1.2 目标化合物 5a~5c 的合成

1.2.1 化合物 5a 的合成 将 3b 0.43 g (0.81 mmol,

其合成见 1.1.3)、碳酸钾 0.67 g (4.9 mmol) 与二甲氨基氯乙烷盐酸盐 0.087 g (0.81 mmol) 置于反应瓶内, 加入 1,4-二氧六环 (20 mL) 与水 (0.3 mL), 于内温 86 °C 反应 3.5 h。TLC (氯仿/甲醇=10:1, $R_f=0.5$, 磷钼酸显色) 检测反应完毕; 乙酸乙酯萃取, 水洗使其呈中性, 1.0 mol·L⁻¹ 盐酸溶液反萃取, 再以水洗有机层, 合并酸水层。酸水层用 1.0 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液调 pH 9~10, 析出白色固体, 乙酸乙酯萃取, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压蒸去乙酸乙酯, 纯化后得白色结晶 5a 0.16 g (收率: 32.50%)。

1.2.2 化合物 5b 的合成 取化合物 3b 0.42 g (0.81 mmol, 其合成见 1.1.3) 与碳酸钾 1.12 g (8.1 mmol) 置于反应瓶内, 加入 DMF (20 mL) 溶解, 再加入碘代正丁烷 0.1 mL (0.88 mmol), 35 °C 水浴搅拌 8 h。TLC (氯仿, $R_f=0.5$, 磷钼酸显色) 检测反应完毕; 乙酸乙酯萃取, 依次以水、饱和氯化钠洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压蒸去部分乙酸乙酯, 析出白色固体以氯仿/甲醇重结晶即得白色结晶 5b 0.23 g (收率: 47.91%)。

1.2.3 化合物 5c 的合成 将 3b (1 mmol) 置于反应瓶内, 加入 15 mL DMF 溶解, 再加入 2 mL 1.0 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液, 常温反应 3 h。TLC (氯仿/甲醇=10:1, $R_f=0.2$, 磷钼酸显色) 检测反应完毕; 1.0 mol·L⁻¹ 盐酸调 pH 2~3, 析出白色固体, 过滤、烘干后得白色结晶 5c 0.47 g (收率: 89.94%)。

1.3 化合物 6a~6d 的合成

1.3.1 化合物 6a、6b 的合成 以化合物 6a 为例: 取化合物 4a 0.41 g (0.81 mmol, 其合成见 1.1.3) 与碳酸钾 1.12 g (8.1 mmol) 置于反应瓶内, 加入 DMF (20 mL) 溶解, 再加入碘代正丁烷 0.1 mL (0.88 mmol), 35 °C 水浴搅拌 8 h。TLC (氯仿/甲醇=30:1, $R_f=0.6$, 磷钼酸显色) 检测反应完毕; 乙酸乙酯萃取, 依次以水、饱和氯化钠洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压蒸去部分乙酸乙酯, 析出白色固体以氯仿/甲醇重结晶即得白色结晶 6a 0.28 g (收率: 61.22%)。6b 以类似方法合成。

1.3.2 化合物 6c、6d 的合成 将化合物 4a 0.24 g (0.47 mmol, 其合成见 1.1.3) 置于反应瓶内, 加入 2.5 mL 吡啶溶解, 缓慢滴加乙酸酐 0.4 mL (4.23 mmol), 室温继续搅拌反应 8 h。TLC (氯仿/甲醇=30:1, $R_f=0.5$, 磷钼酸显色) 检测反应完毕; 将反应物倒入水中, 1.0 mol·L⁻¹ 盐酸调 pH 2~3, 乙酸乙酯萃取, 依次用蒸馏水、饱和氯化钠溶液洗涤, 以无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压回收乙酸乙酯至干得白色结晶 6c 0.24 g (收率: 86.16%)。6d 以类似方法合成。

2 体外抗 HBV 活性筛选

2.1 MTT 法测定药物对细胞的毒性实验

以 HepG2 2.2.15 细胞传到 3 到 4 代时培养瓶长满细胞后, 经 0.25% 胰酶溶液消化后用 10% DMEM 配制成每毫升约 25 万个的细胞悬液, 接种到 96 孔培养板内, 每孔 100 μL , 摇匀后置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h, 细胞贴壁后即可给药 (配药: 称取 10 mg 样品, 加 1 mL DMSO 溶解, 溶液经无菌微孔滤膜滤过即得 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 储存液, 取相应量储存液用 2% DMEM 稀释至所需给药浓度), 每孔给 200 μL 药液, 每个浓度设 6 个孔, 以 2% DMEM 代替药液作为阴性细胞对照组, 以拉米夫定药液代替药液作为阳性对照组。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养 3 天, 每孔加入 20 μL MTT 溶液 (5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 继续培养 6 h, 1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 吸去孔内培养液, 每孔加入 200 μL DMSO, 振荡 10 min, 使形成的结晶充分溶解后通过酶联免疫检测仪测定其吸光度值 (OD 值), 采用改良寇氏法计算药物的半数有毒浓度 (TC_{50})。改良寇氏法计算 TC_{50} , $\text{TC}_{50} = \text{Log}^{-1} [\text{Xm-i} (\Sigma\text{P}-0.5)]$ 。

2.2 药物对 HBV DNA 的抑制实验

以 HepG2 2.2.15 细胞传到 3 到 4 代时的细胞, 经 0.25% 胰酶溶液消化后用 10% DMEM 配制成每毫升约 25 万个的细胞悬液, 每孔 500 μL 接种到 24 孔细胞培养板, 每孔给 700 μL 药液, 共 3 个浓度, 每个浓度设 3 个孔, 以 10% DMEM 代替药液作为阴性细胞对照组, 以拉米夫定药液代替药液作为阳性对照组。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养, 3 天换原浓度药液或 10% DMEM 培养。培养 6 天后即可提取 HBV DNA, 经荧光定量 PCR 测定其 DNA 含量, 通过含量测定结果计算样品对细胞中 HBV DNA 的抑制率, 采用改良寇氏法计算样品的半数抑制浓度 (IC_{50})。分别计算得到的半数有毒浓度 (TC_{50}) 和半数抑制浓度 (IC_{50}) 即可计算出样品的选择指数 (SI)^[17]。改良寇氏法计算 IC_{50} , $\text{IC}_{50} = \text{Log}^{-1} [\text{Xm-i} (\Sigma\text{P}-0.5)]$, $\text{SI} = \text{TC}_{50}/\text{IC}_{50}$ 。

References

- [1] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/201606>.
- [2] Benias PC, Min AD. Goals of antiviral therapy for hepatitis B: HBeAg seroconversion, HBsAg seroconversion, histologic improvement, and possible impact on risk of hepatocellular carcinoma [J]. *Curr Hepat Rep*, 2011, 10: 292–296.
- [3] Levrero M, Zucman-Rossi J. Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2016, 64: S84–S101.
- [4] Zhang X. The carcinogenic mechanism of hepatitis B virus [J]. *J Int Oncol*, 1997, 24: 231–231.
- [5] Wong V, Chan H. Chronic hepatitis B: a treatment update [J]. *Semin Liver Dis*, 2013, 33: 122–129.
- [6] Zeisel MB, Lucifora J, Mason WS, et al. Towards an HBV cure: state-of-the-art and unresolved questions – report of the ANRS workshop on HBV cure [J]. *Gut*, 2015, 64: 1314–1326.
- [7] Yuan J, Liu QC, Xu GC, et al. Synthesis and anti-hepatitis B virus activities of Matijjin-Su derivatives with potential for hepatic targeting [J]. *Chin J Org Chem (有机化学)*, 2015, 35: 2176–2183.
- [8] Fan HR, Ci XY, Li W, et al. The *in vitro* transport mechanism of bentysrepinine: a novel anti-hepatitis B virus drug candidate [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 1233–1239.
- [9] Liu YS, Zhou ZS, Gu KJ, et al. Studies on antiarrhythmics. I. Synthesis of 3,4,5-trimethoxybenzamide derivatives [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 1981, 16: 158–160.
- [10] Fan WT, Wu XL, Pan YL, et al. Synthesis of 3,4,5-trimethoxy benzamides and antifatigue activities [J]. *Chin J Pharm (中国医药工业杂志)*, 2014, 45: 312–314.
- [11] Furet P, Imbach P, Noorani M, et al. Entry into a new class of potent proteasome inhibitors having high anti-proliferative activity by structure-based design [J]. *J Med Chem*, 2004, 47: 4810–4813.
- [12] Wang Z, Wei P, Liu Y, et al. D and E rings may not be indispensable for antofine: discovery of phenanthrene and alkylamine chain containing antofine derivatives as novel antiviral agents against tobacco mosaic virus (TMV) based on interaction of antofine and TMV RNA [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62: 10393–10404.
- [13] Beutler J, Hamel E, Vlietinck A, et al. Structure-activity requirements for flavone cytotoxicity and binding to tubulin [J]. *J Med Chem*, 1998, 41: 2333–2338.
- [14] Zhou F, Peng DH, Du FL. Advances in research on chemical constituents and pharmacological effects of polymethoxy [J]. *Cent South Pharm (中南药学)*, 2008, 6: 734–737.
- [15] Yang XX, Cao PX, Huang ZM, et al. Synthesis and anti-hepatitis B virus activities of Matijjin-Su derivatives [J]. *Cent South Pharm (中南药学)*, 2014, 12: 97–102.
- [16] Liang GP, Hu ZX, Yang XX, et al. Synthesis and anti-hepatitis B virus activity of Matijjin-Su analogues [J]. *Cent South Pharm (中南药学)*, 2014, 12: 852–855.
- [17] Qiu JY, Xu BX, Huang ZM, et al. Synthesis and biological evaluation of Matijjin-Su derivatives as potent anti-HBV agents [J]. *Bioorg Med Chem*, 2011, 19: 5352–5360.