

医药与日化原料

# 苯甲酸衍生物类神经氨酸酶抑制剂的 合成及活性评价

王 敬, 袁建勇, 刘盼和, 胡叶敏, 李雁武\*

(重庆医科大学 药学院, 重庆 400016)

**摘要:** 以 4-氨基-3-碘苯甲酸甲酯 (V) 为原料, 经过偶联、酰化、水解等反应得到苯甲酸衍生物类流感病毒神经氨酸酶抑制剂 VI~IX, 化合物 V d [4-乙酰胺基-3-(2-乙基-1-丁烯基) 苯甲酸甲酯] 经过氧化、还原、水解反应得到化合物 X~XII, 结构经 <sup>1</sup>HNMR、<sup>13</sup>CNMR、MS 确证, 并用化学荧光法测定对神经氨酸酶的抑制率, 测试选用流感病毒菌株 H3N2 (California/04), H1N1 (California/99) 和 B (Shanghai/02)。结果显示: 在 VI~IX 中, 苯环 C3 位置侧链越大, 化合物的活性越低, 其中, 化合物 IX [4-乙酰胺基-3-(2-羟基-2-乙基丁烷基) 苯甲酸] 的活性最强, 对 H3N2、H1N1、B 的半数抑制浓度分别为 1.0、2.1、1.6 μmol/L; X~XII 中, 苯环侧链 α 位碳上的羟基比 β 位活性增强, 在苯环侧链 α 位的碳上含有单羟基的化合物 XII [4-乙酰胺基-3-(2-乙基-1-羟基丁烷基) 苯甲酸] 具有对两种 A 型流感病毒最强的活性, 半数抑制浓度分别为 0.15 和 0.20 μmol/L。

**关键词:** 神经氨酸酶; 流感病毒; 苯甲酸衍生物; 化学荧光法

中图分类号: R978.7 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214(2018)06-1029-09

## Synthesis and Activity Evaluation of Benzoic Acid Derivatives as Neuraminidase Inhibitors

WANG Jing, YUAN Jian-yong, LIU Pan-he, HU Ye-min, LI Yan-wu\*

(Pharmacy College of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract:** A series of benzoic acid derivatives as influenza neuraminidase inhibitors VI to IX were synthesized with 4-amino-3-iodine methyl benzoate (V) as raw material through coupling reaction, acylation, hydrolysis, and so on. The reaction of oxidation, reduction and hydrolysis of compound V d [methyl 4-acetamido-3-(2-ethylbut-1-en-1-yl)benzoate] led to compounds X~XII. These compounds were confirmed by <sup>1</sup>HNMR, <sup>13</sup>CNMR and MS. Inhibition rate on neuraminidase was determined by chemical fluorescence, and the test was carried out using the influenza virus strains H3N2 (California/04), H1N1 (California/99) and B (Shanghai/02). The results showed that among compounds VI~IX, the greater side chain at benzene ring C3 position, the lower activity of the compound, especially, compound IX [4-acetamido-3-(2-hydroxybutyl)benzoic acid] had the strongest Activity, the median inhibitory concentration on H3N2 and H1N1, B were 1.0, 2.1, 1.6 μmol/L. For compounds X~XII, the hydroxyl groups on the benzene ring side chain α carbon possessed better activity than that on β carbon. Compound XII [4-acetamido-3-(2-ethyl-1-hydroxybutyl) benzoic acid] containing single hydroxyl at α carbon in side chains of benzene ring exhibited the strongest activity on two types A influenza virus, the corresponding median inhibitory concentration was 0.15 and 0.20 μmol/L, respectively.

**Key words:** neuraminidase; influenza virus; benzoic acid derivatives; chemical fluorescence method

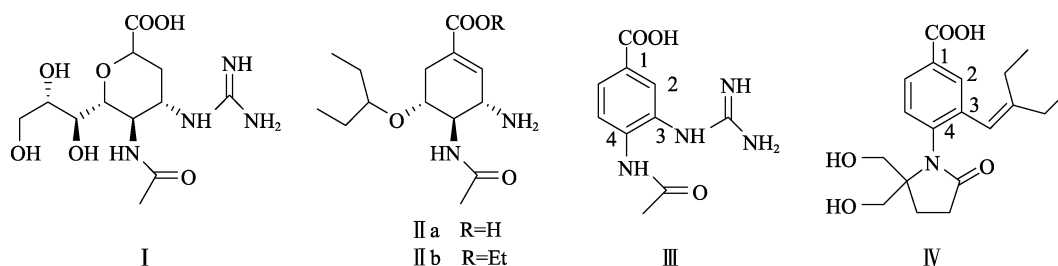
流感病毒是引起人类呼吸道感染的常见病因之一, 可导致较高的患病率和死亡率<sup>[1]</sup>。在可感染人

类的两种类型的流感病毒 (A 和 B) 中, A 型流感病毒, 特别是 2009 年大流行的 H1N1 病毒和高致病

性禽流感病毒 **H5N1**，能通过空气传播，对人类的健康构成了巨大的威胁<sup>[2-4]</sup>。尽管疫苗是目前公认的有效预防流感和防止其大流行的有效途径，但由于流感病毒抗原极易变异，很难及时研制出与正流行的病毒株相匹配的疫苗<sup>[5]</sup>；所以，高效的抗流感病毒药物仍然是预防和治疗流感的关键。

在流感病毒中，神经氨酸酶（NA）是分布于病毒包膜表面的一种糖蛋白，可催化唾液酸与糖蛋白之间糖苷键的水解。当流感病毒感染宿主细胞，并利用宿主细胞资源复制完成后，以出芽的形式突出宿主细胞，但是子代病毒与宿主细胞之间仍然依靠血凝素分子末端的唾液酸残基与该分子表面的

糖基团以糖苷键链接，这使得流感病毒无法立即脱离宿主细胞。NA 负责催化水解这一糖苷键，使新的病毒粒子从宿主细胞释放并阻止病毒聚集，进而感染新的细胞，在患者体内扩散<sup>[6-7]</sup>。因此，抑制 NA 的活性能保护宿主免受病毒感染和延迟病毒的传播。NA 的酶活性中心结构在所有的 **A** 型和 **B** 型流感病毒中保持稳定<sup>[8]</sup>，因而是一个优良的酶抑制药物作用靶点。目前，已经上市的 NA 抑制剂类药物扎那米韦（**I**）和奥司他韦（**II**）、4-（*N*-乙酰胺基）-3-胍基苯甲酸（**III**）、4-（5，5-二羟甲基吡咯烷-2-酮）-3-（2-乙基-1-丁烯基）苯甲酸（**IV**）结构如下所示。

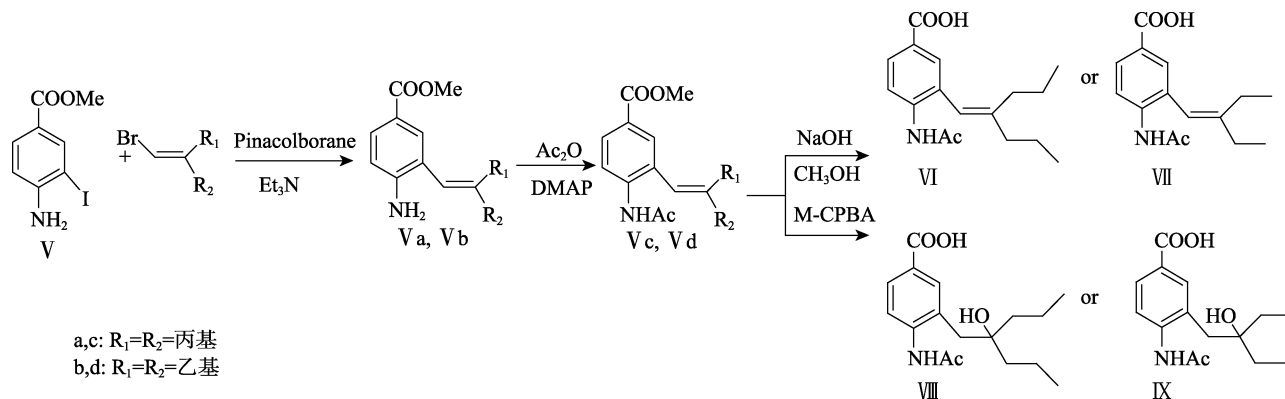


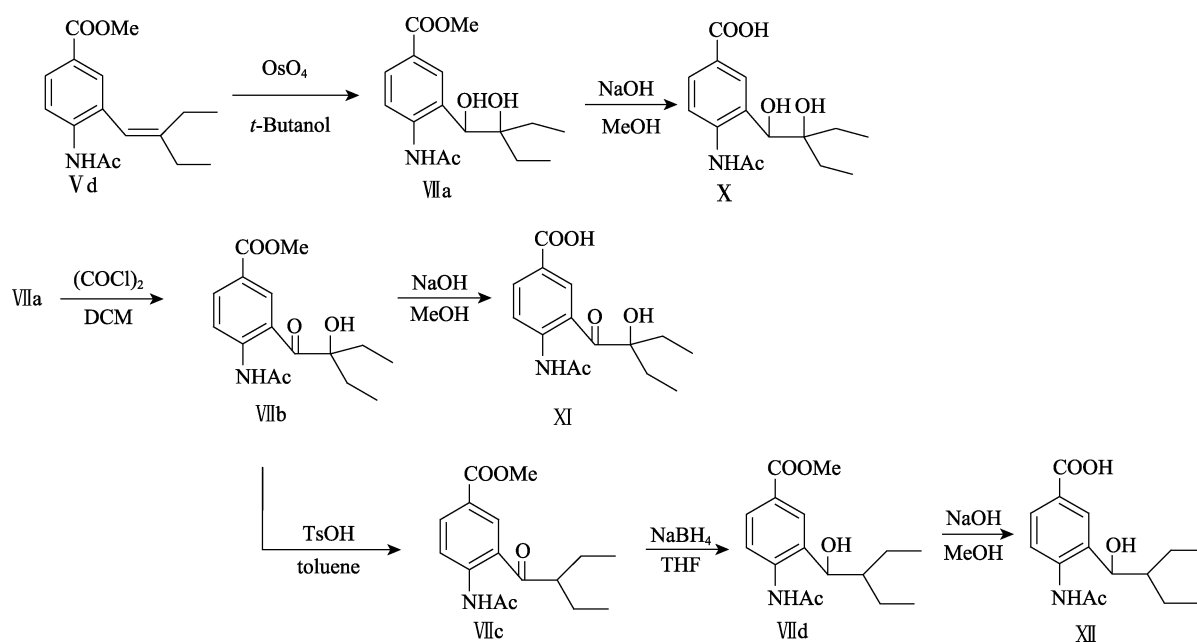
**I** 和 **II** 含有较多的手性中心，价格昂贵且产生了越来越多的抗药性病例<sup>[9-11]</sup>，迫切需要开发新的 NA 抑制剂类抗流感病毒药物。其中已经报道的以苯环为中心骨架的 NA 抑制剂引起了广泛关注，以苯环为基本骨架使化合物手性中心较少，可潜在性地简化化学合成过程并减少相应的成本<sup>[12-14]</sup>，因此可以提供更加经济的抗流感病毒药物。

最早报道的苯甲酸衍生物类 NA 抑制剂 4-（*N*-乙酰胺基）-3-胍基苯甲酸（**III**）<sup>[13]</sup>对 **A** 型和 **B** 型流感病毒 NA 都显示出一定的活性（ $IC_{50}=10 \mu\text{mol/L}$ ）。化合物 **III** 与 NA 的活性中心结合后的 X-ray 结构显示，苯环 C1 位置的羧酸或羧酸盐取代基以及 C4 位置的 *N*-乙酰基取代基是与活性中心结合的重要位

点<sup>[13]</sup>；通过进一步研究发现，修饰 C3 位置的脂肪侧链可以改善抑制剂的活性<sup>[14]</sup>。对脂肪侧链结构优化得到了化合物 4-（5，5-二羟甲基吡咯烷-2-酮）-3-（2-乙基-1-丁烯基）苯甲酸（**IV**）<sup>[15]</sup>，尽管 **IV** 对 **A** 型流感病毒作用大大增强，但对 **B** 型流感病毒作用不佳（ $IC_{50}=104 \mu\text{mol/L}$ ）。本文根据以上研究，并考虑到苯环 C3 位置侧链的重要性，对抑制剂结构进行了进一步优化，以 4-氨基-3-碘苯甲酸甲酯（**V**）为原料合成了抑制剂 **VI**~**VII**，并引入羟基结构衍生出化合物 **VIII**~**IX**，如下所示。

为了获得更强的抑制活性，经由化合物 **Vd**，继续从活性相对较强的化合物 **VII** 衍生出了不同位置羟基或酮基取代的化合物 **X**~**XII**，如下所示。





## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

4-氨基-3-碘苯甲酸甲酯, 萨恩化学技术(上海)有限公司; 1-溴-2-乙基-1-丁烯、1-溴-3-正丙基-1-戊烯, 日本 TCI 公司; 4-二甲氨基吡啶, 上海楷石化工有限公司; 间氯过氧苯甲酸, 重庆科沃化工有限公司; 乙硼烷, 百灵威科技有限公司; 硅胶(200~300 目), 乳山市太阳干燥剂有限公司; 邻苯二酚硼烷, 频哪醇硼烷, 上海福兴医药科技有限公司;  $\text{Pd-C}$ , 艾科试剂; 四(三苯基磷)钯, 科瑞迪化学; 四氧化锇, 美国 Sigma-Aldrich 公司; 草酰氯, 阿拉丁试剂; 对甲基苯磺酸, 上海邦成化工有限公司; 二氯甲烷、硼氢化钠, 三乙胺( $\text{Et}_3\text{N}$ )、二氧六环、 $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 、醋酸酐、亚硫酸钠、碳酸氢钠、丙酮, 成都科龙化工试剂厂。2-(*N*-吗啡啉)乙磺酸(MES, 质量分数 $\geq 99.5\%$ ), 阿拉丁试剂。神经氨酸酶底物(2'-4-甲基伞形酮- $\alpha$ -*N*-乙酰神经氨酸), 美国 Sigma 公司。所有试剂均为 AR。

流感病毒菌株 **H3N2** (California/04)、**H1N1** (California/99)、**B** (Shanghai/02), 美国阿拉巴马伯明翰大学。

集热式恒温加热磁力搅拌器, 巩义市予华科技有限公司; SGW X-4 型显微熔点仪, 上海仪电物理光学仪器有限公司; Hei-VAP 旋转蒸发器, 德国 Heidolph 公司; EX225ZH/AD 型分析天平, 美国 OHAUS 公司; 6420 型质谱仪, 美国 Agilent 科技公司; ARX-400 型核磁共振仪, 德国 Bruker 公司; 超净工作台, 汉闵实验室设备有限公司; Fluostar Gality 微板光学测定仪及配套荧光测定 96 孔板, 德国 BMG 公司。

### 1.2 目标化合物的合成

#### 1.2.1 中间体 Va, Vb 的合成<sup>[16-17]</sup>

**Vb** 的制备: 将 1-溴-2-乙基-1-丁烯 (6.7 mmol) 溶于二氧六环 (30 mL) 中, 氮气保护在室温下搅拌, 然后加入  $\text{Et}_3\text{N}$  (3.7 mL, 26.90 mmol),  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (779 mg, 0.67 mmol), 并逐滴加入频哪醇硼烷 (2.9 mL, 20.2 mmol), 将混合液加热到 80 °C 搅拌 1 h 后冷却, 逐滴加入 5 mL 水; 将 4-氨基-3-碘苯甲酸甲酯 (1.5 g, 5.4 mmol) 溶于 15 mL 二氧六环, 和  $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  (6.4 g, 20.2 mmol) 一起加入到体系中, 将混合液加热到 90 °C 搅拌 8 h。TLC 监测反应完全 [展开剂为 *V* (正己烷) : *V'* (乙酸乙酯) = 1 : 1,  $R_f = 0.4$ ]。将反应液降温后用硅藻土过滤, 加入 40 mL  $\text{NaCl}$  水溶液到滤液中, 加乙酸乙酯 (3×50 mL) 萃取, 用无水  $\text{MgSO}_4$  干燥, 过滤, 浓缩, 用硅胶柱色谱分离纯化 [展开剂为 *V* (正己烷) : *V'* (乙酸乙酯) = 1 : 1] 得无色油状物 **Vb** 918.9 mg, 收率 73%。

4-氨基-3-(2-乙基-1-丁烯基)苯甲酸甲酯(**Vb**):  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 0.97(t,  $J = 7.6$ , 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.14(t,  $J = 7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.08(q,  $J = 7.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.23(q,  $J = 7.6$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.85(s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.07(s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 5.96(s, 1H, CH), 6.64(d,  $J = 8.4$  Hz, 1H, ArH), 7.69(d,  $J = 2.0$  Hz, 1H, ArH), 7.75(dd,  $J = 8.4$ 、2.0 Hz, 1H, ArH);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 12.9, 13.0, 24.1, 28.6, 51.5, 113.6, 117.8, 119.2, 123.2, 129.7, 132.0, 148.6, 150.2, 167.4。ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M} + \text{H}]^+$  calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_2$ , 234.1; found, 234.3。

**Va** 与 **Vb** 的合成过程类似, 不同之处为: 底物是 1-溴-3-正丙基-1-戊烯; 硼氢化试剂与 1-溴-3-正丙基-1-戊烯的物质的量的比及反应时间基本一致。TLC 监测反应完全 [展开剂为 *V* (正己烷) : *V'* (乙

酸乙酯)=1:1,  $R_f=0.42$ )用硅胶柱色谱分离纯化〔展开剂为  $V$ (正己烷): $V$ (乙酸乙酯)=1:1〕得无色油状物  $V a$  1.07g, 收率 76%。

4-氨基-3-(2-正丙基-1-戊烯基)苯甲酸甲酯( $V a$ ):  $^1\text{H NMR}$ (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 0.81(t,  $J=7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 0.97(t,  $J=7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.40(m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.54(m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.02(m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.17(m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.85(s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.10(s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 6.00(s, 1H, CH), 6.64(d,  $J=8.4$  Hz, 1H, ArH), 7.68(d,  $J=2.0$  Hz, 1H, ArH), 7.74(dd,  $J=8.4, 2.0$  Hz, 1H, ArH);  $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 14.4, 21.6, 33.1, 38.7, 52.0, 114.0, 119.5, 120.2, 123.6, 130.0, 132.5, 147.3, 149.1, 167.9。ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calcd for  $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{NO}_2$ , 262.2; found, 262.3。

### 1.2.2 中间体 $V c$ , $V d$ 的合成

$V c$  的制备: 将化合物  $V a$  (0.5 mmol) 溶解在 5 mL 醋酸酐中, 在室温下搅拌 15 min, 然后加入 4-二甲氨基吡啶(DMAP, 7 mg, 0.05 mmol), 将混合物搅拌 2 h, TLC 监测反应完全〔展开剂为  $V$ (正己烷): $V$ (乙酸乙酯)=1:1,  $R_f=0.58$ 〕, 加入乙酸乙酯 20 mL, 混合物用饱和  $\text{NaHCO}_3$  (2×10 mL),  $\text{NaCl}$  水溶液(2×10 mL)洗涤, 有机层用无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥, 过滤, 浓缩, 经硅胶柱色谱分离〔展开剂为  $V$ (正己烷): $V$ (乙酸乙酯)=1:1〕得无色油状物  $V c$  109.2 mg, 收率 72%。

4-乙酰胺基-3-(2-正丙基-1-戊烯基)苯甲酸甲酯( $V c$ ):  $^1\text{H NMR}$ (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 0.78(t,  $J=7.3$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.01(t,  $J=7.3$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.38(m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.58(m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.93(t,  $J=7.6$ , 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.16(s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 2.23(t,  $J=7.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.89(s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.08(s, 1H, CH), 7.45(s, 1H, NH), 7.75(s, 1H, ArH), 7.92(d,  $J=8.6$  Hz, 1H, ArH), 8.41(d,  $J=8.6$  Hz, 1H, ArH);  $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 14.3, 14.4, 21.4, 21.6, 25.4, 33.0, 38.4, 52.4, 119.2, 119.4, 125.1, 127.7, 129.7, 131.5, 140.1, 149.9, 167.2, 168.5。ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{NO}_3$ , 304.4; found, 304.2。

$V d$  与  $V c$  的合成过程类似, 不同之处为底物是  $V b$  (0.5 mmol);  $V b$  与醋酸酐物质的量的比及反应时间基本一致。TLC 监测反应完全〔展开剂为  $V$ (正己烷): $V$ (乙酸乙酯)=1:1,  $R_f=0.56$ 〕经硅胶柱色谱分离〔展开剂为  $V$ (正己烷): $V$ (乙酸乙酯)=1:1)得油状物  $V d$  125.2 mg, 收率 91%。

4-乙酰胺基-3-(2-乙基-1-丁烯基)苯甲酸甲酯( $V d$ ):  $^1\text{H NMR}$ (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 0.95(t,  $J=7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.17(t,  $J=7.5$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.00(q,  $J=7.5$ , 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.18(s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 2.28(q,  $J=7.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.89(s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.04(s, 1H, CH), 7.44(s, 1H, NH), 7.78(s, 1H, ArH), 7.92(d,  $J=8.4$  Hz, 1H, ArH), 8.41(d,  $J=8.4$  Hz, 1H, ArH);  $^{13}\text{C NMR}$

(100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 12.7, 13.0, 24.2, 24.9, 28.5, 52.0, 116.9, 119.0, 124.9, 127.3, 129.3, 131.1, 139.7, 152.8, 166.8, 168.1。ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calcd for  $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_3$ , 276.3; found, 276.2。

### 1.2.3 VI、VII 的合成<sup>[18]</sup>

VI 的制备: 将  $V c$  (61 mg, 0.2 mmol) 溶解在 2 mL 甲醇中, 加入 2 mL 1 mol/L  $\text{NaOH}$ 。将混合物在室温下搅拌 2~3 h, TLC 监测反应完全〔展开剂为  $V$ (正己烷): $V$ (乙酸乙酯): $V$ (乙酸)=2:1:0.01,  $R_f=0.36$ 〕, 用 1 mol/L 的盐酸调节溶液 pH=2, 并将混合物蒸干后, 用 3 mL 甲醇溶解固体残留物, 过滤, 浓缩。将获得的残留物经硅胶柱色谱〔展开剂为  $V$ (正己烷): $V$ (乙酸乙酯): $V$ (乙酸)=2:1:0.01〕过柱得无色固体 VI 35.3 mg, 收率 61%。

4-乙酰胺基-3-(2-正丙基-1-戊烯基)苯甲酸(VI): m.p. 110~111 °C,  $^1\text{H NMR}$ (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 0.80(t,  $J=7.3$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.01(t,  $J=7.2$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.39(m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.59(m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.94(t,  $J=7.3$ , 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.19(s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 2.24(t,  $J=7.3$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 6.09(s, 1H, CH), 7.51(s, 1H, NH), 7.83(s, 1H, ArH), 8.00(d,  $J=8.4$  Hz, 1H, ArH), 8.45(d,  $J=8.4$  Hz, 1H, ArH);  $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 14.3, 14.4, 21.4, 21.6, 25.4, 33.1, 38.4, 119.2, 119.3, 124.4, 127.8, 130.5, 132.2, 140.8, 150.2, 168.8, 172.1。ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{NO}_3$ , 290.2; found, 290.4。

与 VI 的合成过程类似, 不同之处为底物是将  $V d$  (56 mg, 0.2 mmol);  $V d$  与氢氧化钠的物质的量的比及反应时间基本一致, TLC 监测反应完全〔展开剂为  $V$ (正己烷): $V$ (乙酸乙酯): $V$ (乙酸)=2:1:0.01,  $R_f=0.35$ 〕。将获得的残留物经硅胶柱色谱过柱〔展开剂为  $V$ (正己烷): $V$ (乙酸乙酯): $V$ (乙酸)=2:1:0.01〕得白色固体 VII 26.6 mg, 收率 51%。

4-乙酰胺基-3-(2-乙基-1-丁烯基)苯甲酸(VII): m.p. 110~111 °C,  $^1\text{H NMR}$ (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 8.45(d,  $J=8.6$  Hz, 1H, ArH), 8.00(d,  $J=8.6$  Hz, 1H, ArH), 7.84(s, 1H, ArH), 7.48(s, 1H, NH), 6.05(s, 1H, CH), 2.30(q,  $J=7.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.19(s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 2.04(q,  $J=7.5$ , 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.18(t,  $J=7.5$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 0.97(t,  $J=7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 12.7, 13.0, 24.2, 24.9, 28.5, 116.8, 119.0, 124.0, 127.3, 130.1, 131.7, 140.4, 153.1, 168.3, 171.5。ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{NO}_3$ , 262.1; found, 262.3。

### 1.2.4 VIII、IX 的合成<sup>[19]</sup>

VIII 的制备: 将  $V c$  (0.33 mmol) 溶于 2 mL 二氯甲烷中, 加入间氯过氧苯甲酸(M-CPBA, 96 mg, 0.43 mmol 质量分数 77%) 并在室温下搅拌 0.5 h 后用 2 mL 质量分数 10% 的  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  除去过量的间氯过

氧苯甲酸,然后用10 mL乙酸乙酯稀释。混合物用5 mL 1 mol/L的氢氧化钠洗涤,再分别用饱和碳酸氢钠(2×5 mL)和NaCl水溶液(2×5 mL)洗有机层,用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤,蒸掉溶剂。将环氧化物粗品溶解在5 mL乙醇中,加入钯碳(10 mg, Pd摩尔分数10%),混合物在H<sub>2</sub>(用气球做氢气储库,约为0.2 MPa)气氛下室温搅拌3 h。将反应液过滤并浓缩,获得的残渣溶解在2 mL甲醇中,加入2 mL 1 mol/L的NaOH并将混合物在室温下搅拌2 h, TLC监测反应完全〔展开剂为V(正己烷):V(乙酸乙酯):V(乙酸)=200:100:3, R<sub>f</sub>=0.32〕,用1 mol/L盐酸调节溶液pH=2。将混合物蒸干后,用3 mL甲醇溶解固体残留物,过滤,浓缩,硅胶柱色谱过柱〔展开剂为V(乙酸乙酯):V(乙酸)=200:100:5〕得无色固体VIII 36.5 mg,收率36%。

4-乙酰胺基-3-(2-羟基-2-丙基戊烷基)苯甲酸(VIII)的制备: m.p. 166~167 °C, <sup>1</sup>HNMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ: 0.93(m, 6H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>), 1.60~1.24(m, 8H, CH<sub>2</sub>), 2.12(s, 2H, ArCH<sub>2</sub>), 2.16(s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 2.83(s, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>), 7.81(s, 1H, ArH), 7.95(d, J=8.5 Hz, 1H, ArH), 8.11(d, J=8.5 Hz, 1H, ArH), 10.01(s, 1H, COOH); <sup>13</sup>CNMR(100 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ: 14.9, 17.4, 25.0, 41.8, 42.6, 78.2, 122.7, 125.3, 128.8, 130.0, 134.6, 143.0, 169.5, 171.9. ESI-MS (m/z): [M+H]<sup>+</sup> calcd for C<sub>17</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>4</sub>, 308.2; found, 308.4 [M+1]。

IX与VIII的合成过程类似,不同之处为底物是Vd(0.33 mmol); Vd与间氯过氧苯甲酸的物质的量的比及反应时间基本一致, TLC监测反应完全〔展开剂为V(正己烷):V(乙酸乙酯):V(乙酸)=200:100:3, R<sub>f</sub>=0.31〕。将获得的残留物经硅胶柱色谱过柱〔展开剂为V(正己烷):V(乙酸乙酯):V(乙酸)=200:100:5〕得白色固体IX 18.4 mg,收率20%。

4-乙酰胺基-3-(2-羟基-2-乙基丁烷基)苯甲酸(IX)的制备: m.p. 159~160 °C, <sup>1</sup>HNMR(300 MHz, CD<sub>3</sub>OD), δ: 0.93(t, J=7.4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.93(t, J=7.4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.49(m, 4H, CH<sub>2</sub>), 2.15(s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 2.82(s, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>), 7.85(s, 1H, ArH), 7.87(d, J=8.2 Hz, 1H, ArH), 7.99(d, J=8.2 Hz, 1H, ArH); <sup>13</sup>CNMR(100 MHz, D<sub>2</sub>O), δ: 8.3, 24.2, 31.9, 43.0, 77.9, 123.5, 127.3, 129.7, 131.2, 135.1, 143.1, 169.5, 171.3. ESI-MS (m/z): [M+H]<sup>+</sup> calcd for C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>, 280.2; found, 280.3 [M+1]。

#### 1.2.5 中间体VIIa的合成<sup>[20]</sup>

将64 mg 4-甲基吗啉-N-甲氧氮芥, 2.5 mL水, 1 mL丙酮, 20 mg OsO<sub>4</sub>溶解在0.6 mL叔丁醇中,将上述试剂混合后加入138 mg化合物Vd,将混合物室温搅拌30 h, TLC监测反应完全〔展开剂为V(正己烷):V(乙酸乙酯)=1:1, R<sub>f</sub>=0.2〕加入

10 mL乙酸乙酯,用饱和NaHCO<sub>3</sub>(2×5 mL), NaCl(2×5 mL)洗涤有机层,有机层用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤,浓缩,硅胶柱色谱过柱〔展开剂为V(正己烷):V(乙酸乙酯)=1:2〕得无色油状物VIIa 101 mg,收率66%。

4-乙酰胺基-3-(2-乙基-1,2-二羟基丁烷基)苯甲酸甲酯(VIIa): <sup>1</sup>HNMR(300 MHz, CD<sub>3</sub>OD), δ: 0.90(t, J=7.6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.94(t, J=7.4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.56~1.42(m, 3H, CH<sub>2</sub>), 1.78(m, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.15(s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 3.88(s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.76(s, 1H, CH), 7.86(dd, J=8.5, 2.0 Hz, 1H, ArH), 8.01(d, J=2.0 Hz, 1H, ArH), 8.11(d, J=8.5 Hz, 1H, ArH); <sup>13</sup>CNMR(75 MHz, CD<sub>3</sub>OD), δ: 6.2, 6.8, 23.0, 26.7, 27.4, 51.1, 75.2, 77.8, 117.6, 121.8, 124.6, 128.5, 132.4, 141.0, 166.9, 169.8. ESI-MS (m/z): [M+H]<sup>+</sup> calcd for C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>5</sub>, 310.2; found, 310.4[M+1]。

#### 1.2.6 X的合成

将化合物VIIa(93 mg, 0.3 mmol)溶于3 mL甲醇中,加入3 mL 1 mol/L的NaOH溶液,然后将混合物在室温下搅拌1 h, TLC监测反应完全〔展开剂为V(正己烷):V(乙酸乙酯):V(乙酸)=200:100:3, R<sub>f</sub>=0.47〕,用1 mol/L的HCl调节pH=2,将混合物蒸干,残留的固体溶解在15 mL甲醇中,过滤,浓缩,经硅胶柱色谱过柱〔展开剂为V(正己烷):V(乙酸乙酯):V(乙酸)=200:100:3〕得白色固体X 48 mg,收率54%。

4-乙酰胺基-3-(2-乙基-1,2-二羟基丁烷基)苯甲酸(X)的制备: m.p. 218~219 °C; <sup>1</sup>HNMR(400 MHz, DMSO), δ: 0.80(t, J=7.6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.89(t, J=7.4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.30~1.58(m, 3H, CH<sub>2</sub>), 1.62(m, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.01(s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 4.62(s, 1H, CH), 7.75(dd, J=8.5, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.97(d, J=2.0 Hz, 1H, ArH), 8.03(d, J=8.5 Hz, 1H, ArH); <sup>13</sup>CNMR(100 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ: 8.0, 8.6, 25.3, 27.7, 28.4, 74.5, 78.0, 121.9, 125.2, 129.0, 131.9, 133.5, 141.5, 168.2, 168.5. ESI-MS (m/z): [M+H]<sup>+</sup> calcd for C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub>, 296.1; found, 296.3[M+1]。

#### 1.2.7 中间体VIIb的合成<sup>[21]</sup>

向15 mL三口圆底烧瓶中加入2 mL二氯甲烷和草酰氯(0.2 mL, 2.2 mmol),用磁力搅拌器搅拌,中间放置装有CaSO<sub>4</sub>的干燥管,放两个恒压滴液漏斗,分别装DMSO(0.34 mL, 4.4 mmol)的二氯甲烷溶液(2 mL)和溶解在1 mL四氢呋喃和5 mL二氯甲烷的化合物VIIa(309 mg, 1 mmol)。先将DMSO在-50~-60 °C下加入到草酰氯溶液中,反应混合液搅拌2 min后开始滴入化合物VIIa,在4 min内滴完,然后再搅拌25 min,加入三乙胺(0.56 mL, 10 mmol)后搅拌15 min, TLC监测反应完全〔展开剂为V(正己烷):V(乙酸乙酯)=1:1, R<sub>f</sub>=0.6〕。将混合物

升温至室温,加入 20 mL 乙酸乙酯,用饱和  $\text{NaHCO}_3$  (10 mL $\times$ 2),  $\text{NaCl}$  水溶液 (10 mL $\times$ 2) 洗涤有机层,用无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥,过滤,浓缩,用硅胶柱色谱过柱〔展开剂为  $V$  (正己烷) :  $V$  (乙酸乙酯) = 2 : 1 $\rightarrow$ 1 : 1〕得无色油状物 VIIb 162 mg, 收率 52%。

4-乙酰胺基-3-(2-乙基-2-羟基丁酰基) 苯甲酸甲酯 (VIIb):  $^1\text{H NMR}$ (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 0.82(t,  $J=7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 0.82(t,  $J=7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.02(m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.16(m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.28(s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 3.95(s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.21(s, 1H, CH), 8.19(dd,  $J=8.9, 1.6$  Hz, 1H, ArH), 8.83(d,  $J=1.6$  Hz, 1H, ArH), 8.84(d,  $J=8.9$  Hz, 1H, ArH), 11.35(s, 1H, NH);  $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 8.3, 26.1, 34.5, 52.9, 84.1, 119.4, 121.5, 123.9, 132.8, 136.2, 145.0, 166.1, 169.9, 209.0。ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calcd for  $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_5$ , 308.1; found, 308.3 $[\text{M}+1]$ 。

### 1.2.8 XI 的合成

将化合物 VIIb (123 mg, 0.4 mmol) 溶于 4 mL 甲醇中,加入 4 mL 1 mol/L 的  $\text{NaOH}$  溶液,然后将混合物在室温下搅拌 2 h, TLC 监测反应完全〔展开剂为  $V$  (正己烷) :  $V$  (乙酸乙酯) :  $V$  (乙酸) = 200 : 100 : 3,  $R_f=0.35$ 〕,用 1 mol/L 的  $\text{HCl}$  调节  $\text{pH}=2$ ,将混合物蒸干,残留的固体溶解在 15 mL 甲醇中,过滤,浓缩,经硅胶柱色谱过柱〔展开剂为  $V$  (正己烷) :  $V$  (乙酸乙酯) :  $V$  (乙酸) = 200 : 100 : 3〕得白色固 XI 69 mg, 收率 59%。

4-乙酰胺基-3-(2-乙基-2-羟基丁酰基) 苯甲酸 (XI): m.p. 161~162  $^\circ\text{C}$ ;  $^1\text{H NMR}$ (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$ : 0.84(t,  $J=7.5$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 0.84(t,  $J=7.5$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.04(m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.18(m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.31(s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 8.27(dd,  $J=1.8, 8.7$  Hz, 1H, ArH), 8.90(d,  $J=8.7$  Hz, 1H, ArH), 8.92(d,  $J=1.8$  Hz, 1H, ArH);  $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$ : 7.9, 25.7, 34.0, 83.9, 119.2, 121.2, 122.7, 133.1, 136.3, 145.2, 169.7, 170.0, 208.5。ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{NO}_5$ , 294.1; found, 294.3  $[\text{M}+1]$ 。

### 1.2.9 中间体 VIIc 的合成<sup>[22]</sup>

将化合物 VIIb (241 mg, 0.78 mmol) 溶解在 15 mL 干燥的甲苯中,加入 15 mg 对甲苯磺酸 ( $\text{TsOH}$ ), 110  $^\circ\text{C}$  回流 6 h, 混合物用 25 mL 甲苯稀释,用饱和  $\text{NaHCO}_3$  (2 $\times$ 10 mL),  $\text{NaCl}$  水溶液 (2 $\times$ 10 mL), 洗涤有机层,无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥,过滤,浓缩,获得的残留物溶于 3 mL 乙醇中,加入  $\text{Pd-C}$  (9 mg,  $\text{Pd}$  摩尔分数 10%), 在  $\text{H}_2$  氛围下 (用气球做氢气储库, 压力约为 0.2 MPa) 在 50  $^\circ\text{C}$  搅拌 5 h, TLC 监测反应完全〔展开剂为  $V$  (正己烷) :  $V$  (乙酸乙酯) = 1 : 1,  $R_f=0.5$ 〕,过滤,浓缩,经硅胶柱色谱分离〔展开剂为  $V$  (正己烷) :  $V$  (乙酸乙酯) = 1 : 1〕得油状物 VIIc 100 mg, 收率 42%。

4-乙酰胺基-3-(2-乙基丁酰基) 苯甲酸甲酯 (VIIc):  $^1\text{H NMR}$ (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 0.90(t,  $J=7.5$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 0.90(t,  $J=7.5$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.61(m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.80(m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.28(s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 3.49(m, 1H, CH), 3.95(s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 8.18(dd,  $J=1.8, 8.7$  Hz, 1H, ArH), 8.66(d,  $J=1.8$  Hz, 1H, ArH), 8.85(d,  $J=8.7$  Hz, 1H, ArH), 12.05(s, 1H,  $\text{COOH}$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 11.8, 25.2, 25.7, 49.8, 52.3, 120.4, 121.5, 123.7, 132.6, 135.7, 144.8, 166.0, 169.8, 209.2。ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calcd for  $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_4$ , 292.2; found, 292.3 $[\text{M}+1]$ 。

### 1.2.10 中间体 VIId 的合成<sup>[23]</sup>

将化合物 VIIc (88 mg, 0.3 mmol) 溶解在干燥的甲醇 (0.9 mL) 和四氢呋喃中 (0.9 mL), 在氩气保护下冷却至 0  $^\circ\text{C}$ , 加入  $\text{NaBH}_4$  (23 mg, 0.6 mmol); 将反应移至室温下搅拌 30 min TLC 监测反应完全〔展开剂为  $V$  (正己烷) :  $V$  (乙酸乙酯) = 1 : 1,  $R_f=0.54$ 〕,反应加冷水 (0.1 mL) 淬灭,将反应液蒸干,加乙酸乙酯 10 mL 溶解,有机层用饱和  $\text{NaHCO}_3$  溶液 (2 $\times$ 5 mL),  $\text{NaCl}$  水溶液 (2 $\times$ 5 mL) 洗涤,用无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥,过滤,浓缩,经硅胶柱色谱过柱〔展开剂为  $V$  (正己烷) :  $V$  (乙酸乙酯) = 1 : 1〕得白色固体 VIId 68 mg, 收率 77%。

4-乙酰胺基-3-(2-乙基-1-羟基丁烷基) 苯甲酸甲酯 (VIId): m.p. 81~83  $^\circ\text{C}$ 。  $^1\text{H NMR}$ (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 0.76(t,  $J=7.2$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 0.92(t,  $J=7.2$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.11(m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.56~1.72(m, 3H,  $\text{CH}_2$ , CH), 2.13(s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 3.30(d,  $J=2.7$  Hz, 1H, exchanged by  $\text{D}_2\text{O}$ , OH), 3.87(s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.64(dd,  $J=8.7, 2.7$  Hz, 1H), 7.65(d,  $J=1.8$  Hz, 1H, ArH), 7.88(dd,  $J=1.8, 8.4$  Hz, 1H, ArH), 8.33(dd,  $J=8.7$  Hz, 1H, ArH), 9.62(s, 1H, exchanged by  $\text{D}_2\text{O}$ , NH);  $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 10.1, 10.9, 20.6, 21.8, 25.1, 45.0, 52.1, 78.3, 121.2, 124.4, 129.8, 130.0, 130.1, 141.6, 166.8, 168.6。ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calcd for  $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{NO}_4$ , 294.2; found, 292.4 $[\text{M}+1]$ 。

### 1.2.11 XII 的合成

将化合物 VIId (68 mg, 0.23 mmol) 溶于 2.3 mL 甲醇中,加入 2.3 mL 1 mol/L 的  $\text{NaOH}$  溶液,然后将混合物在室温下搅拌 1 h TLC 监测反应完全〔展开剂为  $V$  (正己烷) :  $V$  (乙酸乙酯) :  $V$  (乙酸) = 200 : 100 : 3,  $R_f=0.39$ 〕,用 1 mol/L 的  $\text{HCl}$  调节  $\text{pH}=2$ ,将混合物蒸干,残留的固体溶解在 15 mL 甲醇中,过滤,浓缩,经硅胶柱色谱过柱〔展开剂为  $V$  (正己烷) :  $V$  (乙酸乙酯) :  $V$  (乙酸) = 200 : 100 : 3〕得白色固体 XII 45 mg, 收率 67%。

4-乙酰胺基-3-(2-乙基-1-羟基丁烷基) 苯甲酸 (XII): m.p. 181~183  $^\circ\text{C}$ 。  $^1\text{H NMR}$ (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ),  $\delta$ : 0.85(t,  $J=7.5$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 0.88(t,  $J=7.3$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.23(m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.47~1.65(m, 3H,  $\text{CH}_2$ , CH),

2.18(s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 4.78(d, *J*=6.8 Hz, 1H, Ar-CH), 7.87(d, *J*=8.5 Hz, 1H, ArH), 7.89(d, *J*=8.5 Hz, 1H, ArH), 7.95(s, 1H, ArH); <sup>13</sup>CNMR(100 MHz, CD<sub>3</sub>OD), δ: 10.1, 10.2, 20.7, 22.1, 24.3, 45.2, 74.9, 115.9, 124.8, 129.0, 131.5, 136.2, 142.2, 170.1, 171.8。ESI-MS (*m/z*): [M+H]<sup>+</sup> calcd for C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub>, 280.2; found, 280.3[M+1]。

### 1.3 化学荧光法测试目标化合物体外酶抑制活性

用 Morphy<sup>[24]</sup>等报道的方法对 7 种化合物做体外酶抑制活性实验。神经氨酸酶通过 Laver 等<sup>[25]</sup>描述的方法获得, 实验使用 2'-4-甲基伞形酮- $\alpha$ -*N*-乙酰神经氨酸<sup>[26]</sup>作为荧光基准物质(这种基准物质被神经氨酸酶分解得到的一种荧光产物, 能在 355 nm 荧光激发下发射 460 nm 的荧光, 荧光的强度可以灵敏地反应神经氨酸酶的活性)。

酶活性实验部分: 将 30  $\mu$ L 含神经氨酸酶的 33 mmol/L 的 MES 缓冲液(pH=3.5)与 10  $\mu$ L 4 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 20  $\mu$ L 20  $\mu$ mol/L 2'-4-甲基伞形酮- $\alpha$ -*N*-乙酰神经氨酸, 10  $\mu$ L 神经氨酸酶抑制剂样品和 30  $\mu$ L H<sub>2</sub>O 一起加入到 96 孔荧光酶标板孔里, 反应总体积为 100  $\mu$ L。混合物在 37  $^{\circ}$ C 培养 10 min 后, 立即加入 150  $\mu$ L NaOH 溶液(0.034 mmol/L, pH=11)终止反应并检测荧光强度。用超纯水代替抑制剂样品作空白对照; 通过线性回归计算出各化合物的 IC<sub>50</sub> 值; 利用酶的抑制百分比对应抑制剂的浓度绘图对 IC<sub>50</sub> 数值进行交叉检查, IC<sub>50</sub> 通过线性区域的剂量-效应曲线确定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 反应条件优化

本研究得到的 7 个活性化合物中, 化合物 VI、VIII 分别与 VII、IX 结构类似, 在结构上具有一定的代表性。化合物 X~XII 尽管合成路线较长, 但每步反应都是常见反应, 操作简单, 反应温和可控。由于合成化合物 Va 和 Vb 的反应较复杂, 是整个路线的控制性步骤, 故以 4-氨基-3-碘苯甲酸甲酯和 1-溴-2-乙基-1-丁烯合成化合物 Vb 为例, 探讨硼氢化试剂种类和用量对反应收率的影响。

#### 2.1.1 硼氢化试剂种类对 Vb 收率的影响

首先考察硼氢化试剂种类对收率的影响, 实验方法同 1.2.1, 结果见表 1。

从表 1 可以看出, 当硼氢化试剂分别与反应物 1-溴-2-乙基-1-丁烯反应(物质的量比为 1:1)时, 乙硼烷和硼酸三甲酯不发生反应。邻苯二酚硼烷多用于还原烯烃, 共轭还原  $\alpha$ 、 $\beta$ -烯醇<sup>[27]</sup>。在本研究中频哪醇硼烷是一个可活化卤代烃及卤代芳烃偶联反应硼氢化试剂<sup>[16-17]</sup>, 相比其他硼氢化试剂具有很

多优点, 如更温和的反应条件和更高的官能团容忍度。因此, 合成 Vb 的反应采用频哪醇硼烷做硼氢化试剂。

表 1 硼氢化试剂种类对反应收率的影响

Table 1 Effect of kind of borohydride reagent on the reaction yield

Vb 收率/%	硼氢化试剂			
	乙硼烷	硼酸三甲酯	邻苯二酚硼烷	频哪醇硼烷
0	0	15.3	51.2	

注: *n*(硼氢化试剂): *n*(1-溴-2-乙基-1-丁烯)=1:1。

#### 2.1.2 硼氢化试剂用量对 Vb 收率的影响

对硼氢化试剂频哪醇硼烷的用量进行了考察, 实验方法同 1.2.1, 结果如表 2 所示。

表 2 硼氢化试剂用量对反应收率的影响

Table 2 Effect of dosage of borohydride reagent on the reaction yield

Vb 收率/%	<i>n</i> (硼氢化试剂): <i>n</i> (1-溴-2-乙基-1-丁烯)				
	1:1	2:1	3:1	4:1	5:1
51.2	66.8	73.1	67.2	48.6	

由表 2 可知, 频哪醇硼烷为硼氢化试剂时, 随着频哪醇硼烷用量的增加 Vb 的收率先增大后减小, *n*(硼氢化试剂): *n*(1-溴-2-乙基-1-丁烯)=3:1 时, 最大收率为 73.1%, 随着硼氢化试剂用量增加至 4 倍时, 反应收率降至 67.2%。

综合以上结果, 应选择 *n*(硼氢化试剂): *n*(1-溴-2-乙基-1-丁烯)=3:1 的频哪醇硼烷为反应条件。频哪醇硼烷在此反应中主要起活化卤代烃作用和一定的催化作用, 这是因为 B 原子呈弱金属性且含有空电子轨道, 容易得到或失去电子, 与 1-溴-2-乙基-1-丁烯作用可形成频哪醇烯基硼, 再与卤代芳烃偶联反应得到 Vb。频哪醇硼烷作为硼氢化试剂的反应机理为: 频哪醇硼烷进攻卤代烯烃的  $\pi$  电子, 形成  $\pi$  配合物后进一步形成弱四元环配合物的过渡态, 脱去一分子溴化氢得到频哪醇烯基硼, 通过硼氢化反应, 与溴相连的碳原子由弱的正电性变为负电性, 有利于进攻碘代芳基, 使其容易发生偶联反应。频哪醇硼烷作为硼氢化试剂的优点为: (1) 反应体系副反应少, 反应速度快; (2) 反应生成的频哪醇烯基硼较稳定, 有利于下一步反应进行; (3) 具有更高的官能团容忍度, 可用于多种官能团的活化。

### 2.2 化学荧光法测试目标化合物体外酶抑制活性

采用化学荧光法对各化合物的活性进行测定, 表 3 为 7 种化合物对 A 型流感病毒菌株 H3N2 (California/04), H1N1 (California/99) 和 B 型流感病毒菌株 B (Shanghai/02) 神经氨酸酶的抑制活性。

表 3 化合物 VI ~ XII 对流感病毒菌株 A/H3N2( California/04 ), A/H1N1 ( California/99 ) 和 B ( Shanghai/02 ) 的抗病毒活性 ( IC<sub>50</sub> )

Table 3 Antiviral activity of compounds VI ~ XII on influenza virus strains A/H3N2 ( California/04 ), A/H1N1 ( California/99 ) and B ( Shanghai/02 ) ( IC<sub>50</sub>/μmol/L )

化合物	IC <sub>50</sub> (μmol/L)		
	A/H3N2	A/H1N1	B
VI	4.2	4.3	5.8
VII	1.3	2.8	3.1
VIII	3.6	2.4	2.6
IX	1.0	2.1	1.6
X	0.4	1.8	2.3
XI	0.3	0.4	0.33
XII	0.15	0.2	1.6
III <sup>[13]</sup>	10	—	10

注: —表示没有此项数据。

由表 3 可知, 本文的化合物 VI~XII 均显示出抗 A 型和 B 型流感病毒神经氨酸酶的活性, 对两类 A 型神经氨酸酶亚型 N1, N2 都有较强的活性 (注: 根据酶活性中心结构分类, N1, N4, N5, N8 为一组亚型, N2, N3, N6, N7, N9 为另一组亚型, 同一亚型酶活性中心结构类似)<sup>[28]</sup>。在苯环 α 位的碳上具有单羟基的化合物 XII 活性最好。对上面 7 种新化合物进行结构-活性关系分析, 在 VI~IX 中, 烷基侧链越大, 化合物的活性越低, 所以化合物 VII、IX 活性比 VI、VIII 强, 含有羟基的侧链和含有双键的侧链相比较, 活性仅有少量的增强; 从活性相对较强的化合物 VII 衍生的化合物 X~XII 中, 苯环侧链 α 位碳上的羟基比 β 位活性增强, 说明 α 位的碳上电子环境的变化对活性有较大影响; 化合物 XI α 位的碳上为羰基, 因此活性比化合物 X 增强, 但化合物 XII 只含有单羟基却具有对 A 型流感病毒最强的活性, 说明以后的结构改造应重点放在苯环 α 位的碳上, 以便获得活性更强的活性化合物。

### 3 结论

经一系列反应合成了 7 个苯甲酸衍生物类神经氨酸酶抑制剂, 采用化学荧光法在体外测定了其流感病毒菌株 H3N2 ( California/04 ), H1N1 ( California/99 ) 和 B ( Shanghai/02 ) 神经氨酸酶的抑制活性, 结果表明, 所有 7 个化合物都表现出较强的神经氨酸酶抑制活性, 比之前文献报道的同类抑制剂<sup>[13]</sup>活性增强; 苯环 α 位的碳上具有有单羟基的化合物 XII 对两种 A 型流感病毒亚型 H3N2, H1N1 活性最好 ( IC<sub>50</sub> 分别为 0.15, 0.20 μmol/L ), 化合物 XI 对 B 型 ( 0.33 μmol/L ) 流感病毒活性最好。考虑到

A 型流感病毒对人类的致病能力更强, 可对化合物 XII 的苯环 α 位的碳进行结构改造, 得到活性更强的有成药前景的先导化合物。本研究获得的 7 个化合物对流感病毒覆盖面广, 不仅适用于流感的治疗, 也可用于流感的预防; 本研究对抗禽流感药物设计奠定了一定基础。

### 参考文献:

- [1] Medina R A, Garcia-Sastre A. Influenza a viruses: new research developments[J]. Nat Rev Microbiol, 2011, 9(8): 590-603.
- [2] Liu D, Liu X, Yan J, et al. Interspecies transmission and host restriction of avian H5N1 influenza virus[J]. Sci China C Life Sci, 2009, 52(5): 428-438.
- [3] Guan Y, Dhanasekaran V, Justin B, et al. The emergence of pandemic influenza viruses[J]. Protein Cell, 2010, 1(1): 9-13.
- [4] Sun Y P, Shi Y, Zhang W, et al. In silico characterization of the functional and structural modules of the hemagglutinin protein from the swine-origin influenza virus a (H1N1)-2009[J]. Sci China Life Sci, 2010, 53(6): 633-642.
- [5] Hessel L. Pandemic influenza vaccines: meeting the supply, distribution and deployment challenges[J]. Influenza Other Respi Viruses, 2009, 3(4): 165-170.
- [6] Lyndon M, Mikhail M, Maria R C, et al. Balanced hemagglutinin and neuraminidase activities are critical for efficient replication of influenza A virus[J]. J virol, 2000, 74: 6015- 6020.
- [7] Wagner R, Matrosovich M, Klenk H D. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections[J]. Rev Med virol, 2002, 12(3): 159-166.
- [8] Air G M, Brouillette W J. Influenza virus antiviral targets. In Antiviral Res[M]. LaFemina R Washington, DC: ASM Press, 2009: 187-207.
- [9] Mélanie S, Andrés P, Yacine A, et al. Influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors[J]. Antiviral Research, 2013, 98(2): 174-185.
- [10] Nila J D, Monica P, Alicia M S, et al. Outbreak of antiviral drug-resistant influenza a in long-term care facility, Illinois, USA, 2008[J]. Emerging Infectious Diseases, 2009, 15(12): 1973- 1976.
- [11] Andres A, Ana A L, Teresa T, et al. Selection and viral load kinetics of an oseltamivir-resistant pandemic influenza a (H1N1) virus in an immunocompromised patient during treatment with neuraminidase inhibitors[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2010, 68(3): 214-219.
- [12] Brouillette W J, Bajpai S N, Ali S M, et al. Pyrrolidinobenzoic acid inhibitors of influenza virus neuraminidase: modifications of essential pyrrolidinone ring substituents[J]. Bioorg Med Chem, 2003, 11(13): 2739-2749.
- [13] Singh S, Jedrzejewski M J, Air G M, et al. Structure-based inhibitors of influenza virus sialidase. a benzoic acid lead with novel interaction [J]. J Med Chem, 1995, 38(17): 3217-3225.
- [14] Lalitha V, Eric S J, Gundurao K, et al. Crystal structure of a new benzoic acid inhibitor of influenza neuraminidase bound with a new tilt induced by overpacking subsite C6[J]. BMC Structural Biology, 2012, 12: 7.
- [15] Yanwu L, Arundutt S, Gundurao K, et al. Pyrrolidinobenzoic acid inhibitors of influenza virus neuraminidase: The hydrophobic side chain influences type a subtype selectivity[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2012, 20(14): 4582-4589.