

露兜筋单体化合物结构修饰及生物活性研究

田 瑜, 高 丽, 李永胜, 张小坡, 曹 丽, 许旭东*

中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

摘 要: 目的 基于药用植物露兜筋 *Pandanus tectorius* 中的单体咖啡酰奎宁酸类天然产物 3-*O*-咖啡酰奎宁酸进行结构修饰, 并对其结构修饰物进行体外抗流感病毒生物活性研究。方法 以 3-*O*-咖啡酰奎宁酸为原料, 通过 3 条反应路线分别制得目标化合物, 利用流感病毒体外感染 MDCK 细胞模型评价该类衍生物抗病毒活性。结果 设计并合成 13 个 3-*O*-咖啡酰奎宁酸类衍生物 **B1**~**B13**, 均经波谱技术确证结构。药理实验结果表明, 衍生物 **B4**、**B6** 和 **B10** 具有不同程度抑制流感病毒在细胞中复制的活性。结论 化合物 **B2**、**B4**~**B13** 为未见文献报道的咖啡酰奎宁酸类新化合物, **B4** 具有潜在的抗流感病毒生物活性, 值得进一步深入研究。

关键词: 露兜筋; 3-*O*-咖啡酰奎宁酸; 结构修饰; 抗流感病毒; MDCK 细胞

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)08-1133-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.08.007

Structural modification and biological evaluation of monomeric compound from *Pandanus tectorius*

TIAN Yu, GAO Li, LI Yong-sheng, ZHANG Xiao-po, CAO Li, XU Xu-dong

Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: Objective To modify the structure of natural monomeric compound 3-*O*-caffeoylquinic acid from medicinal plant *Pandanus tectorius*, and evaluate the anti-influenza virus activity of the derivatives. **Methods** Applying 3-*O*-caffeoylquinic acid as material, the target compounds were prepared by three routes and evaluated for their anti-influenza virus effects by MDCK cells *in vitro*. **Results** Thirteen caffeoylquinic acid derivatives **B1**—**B13** were synthesized. The structures of the target compounds were identified by spectrum. Pharmacological results showed that the compounds **B4**, **B6**, and **B10** had the different potential inhibition on the replication of influenza virus in cells. **Conclusion** The new compounds **B2** and **B4**—**B13** which show the potential biological activity of anti-influenza virus, have not been reported in any literatures and are worth studying further.

Key words: *Pandanus tectorius* (L.) Parkins.; 3-*O*-caffeoylquinic acid; structural modification; anti-influenza virus; MDCK cells

露兜筋 *Pandanus tectorius* (L.) Parkins. 为露兜树科 (Pandaceae) 露兜树属 *Pandanus* Linn. f. 植物, 由于其形态奇特, 形似菠萝, 在我国岭南民间地区习称野菠萝^[1-2]。露兜筋作为一种民间药用植物已有悠久的历史, 具有平肝清热、去湿利尿、发汗解表、行气止痛的功效, 可用于治感冒发热、风湿痹痛、肝火头痛、疝气痛、肝炎、肝硬化腹水、尿路感染、肾炎水肿、眼结膜炎、跌打损伤等病症^[3-4]。本课题组前期对露兜筋的化学成分采取了相关提取分离研究, 对其 70%乙醇提取物进行系统分析, 并

从其正丁醇萃取部位中得到了咖啡酰奎宁酸类单体成分^[5]。在自然界中, 咖啡酰奎宁酸类化合物以单咖啡酰奎宁酸、双咖啡酰奎宁酸和三咖啡酰奎宁酸类结构居多^[6], 国内外对其药理活性研究的方向主要以抗氧化、抗病毒、抗炎、抗血小板聚集及保肝等活性为主^[7-9], 但缺少对其单体结构修饰物的相关研究报道。本课题组在此研究基础上, 选取露兜筋乙醇提取物正丁醇部位中量较高的单体化合物 3-*O*-咖啡酰奎宁酸为研究对象, 对其进行结构修饰, 设计合成了一系列咖啡酰奎宁酸类衍生物 **B1**~**B13**, 其中

收稿日期: 2015-01-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81302656)

作者简介: 田 瑜 (1983—), 女, 辽宁大连人, 博士, 助理研究员, 主要从事天然产物结构修饰与活性研究。E-mail: ytian@implad.ac.cn

*通信作者 许旭东 (1968—), 男, 北京市人, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事中药及天然药物研究与开发。E-mail: xdxu@implad.ac.cn

化合物 **B2**、**B4**~**B13** 均为未见文献报道的咖啡酰奎宁酸类新化合物；同时采用流感病毒体外感染犬肾 (MDCK) 细胞模型，首次对这些新衍生物进行体外抗病毒活性评价^[10]，以期发现具有深入研究价值的抗病毒活性化合物，为中药新药的研发奠定基础。

1 仪器与试剂

艾卡 (IKA®) C-MAG HS 7 型磁力搅拌器，艾卡 (IKA®) RV10 basic 型旋转蒸发仪，梅特勒-托利多 (METTLER TOLEDO AL104) 电子天平，Bruker Avance III 600 型核磁共振波谱仪，赛默飞世尔 (ThermoFisher) LTQ-Orbitrap XL 液质联用仪，IR 谱采用 Analect RFX-65A 型红外光谱仪测定 (KBr 压片法)，BYLABUV-III 紫外灯 (北京炳洋科技有限公司)。柱色谱用硅胶及薄层色谱用硅胶 G、H、GF₂₅₄ 和柱色谱用硅胶 (青岛海洋化工有限公司)，常规试剂为市售分析纯和化学纯。

犬肾 (MDCK) 细胞和流感病毒 A/Beijing/7/2009 (BJ09) 由中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所药理毒理研究中心提供。

2 方法

2.1 目标化合物的设计

露兜簕中单体成分 3-*O*-咖啡酰奎宁酸的化学结构由 2 部分组成，咖啡酸与奎宁酸的 3 位羟基通

过酯键连接而成。本实验设计的目标化合物是图 1 中的化合物 **B1**~**B13**。其中，化合物 **B1** 为奎宁酸部分 4、5 位羟基丙叉基取代；化合物 **B2** 为奎宁酸部分 4、5 位羟基丙叉基取代的同时，奎宁酸部分 1 位羧基、咖啡酸部分酚羟基通过苄基取代；化合物 **B3** 为奎宁酸部分 4、5 位羟基以及 1 位羟基、羧基均丙叉基取代；化合物 **B4**~**B8** 为奎宁酸部分 4、5 位羟基丙叉基取代的同时，取代基 R 分别为环戊基 (化合物 **B4**)、正己基 (化合物 **B5**)、3-丁氧基丙基 (化合物 **B6**)、3-(2-乙基己氧基) 丙基 (化合物 **B7**)、顺-9-十八碳烯基 (化合物 **B8**)；化合物 **B9**~**B13** 为化合物 **B4**~**B8** 脱去 4、5 位羟基丙叉基保护，取代基 R 分别为环戊基 (化合物 **B9**)、正己基 (化合物 **B10**)、3-丁氧基丙基 (化合物 **B11**)、3-(2-乙基己氧基) 丙基 (化合物 **B12**)、顺-9-十八碳烯基 (化合物 **B13**)。

2.2 合成路线的设计

本实验对 3-*O*-咖啡酰奎宁酸衍生物的合成采用 3 条反应路线，见图 1。以 3-*O*-咖啡酰奎宁酸为起始原料，通过对甲苯磺酸催化，在干燥丙酮中将其奎宁酸部分的 4、5 位羟基与 2,2-二甲氧基丙烷反应，得到化合物 **B1**；以通过无机碱碳酸钾为缚酸剂，将化合物 **B1** 在无水乙腈中与溴苄进行烃化反应，

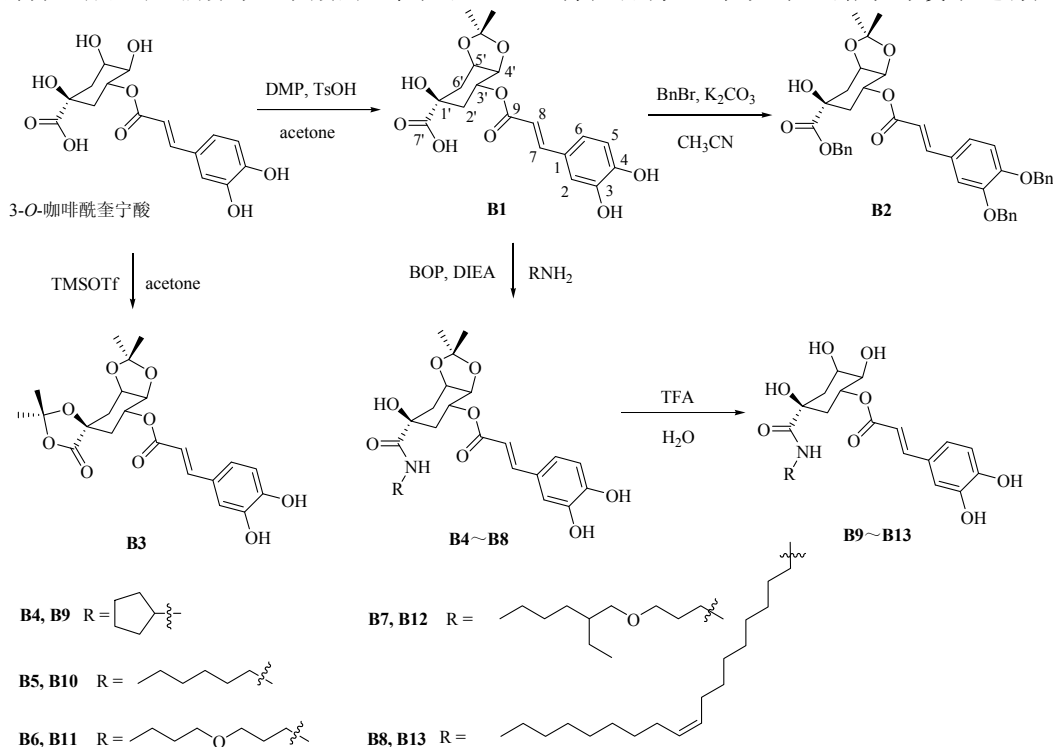


图 1 3-*O*-咖啡酰奎宁酸衍生物的合成路线

Fig. 1 Synthetic route of 3-*O*-caffeoylquinic acid derivatives

得到化合物 **B2**；以 3-*O*-咖啡酰奎宁酸为原料，由 Lewis 酸三甲基硅烷三氟甲磺酸酯(TMSOTf)催化，与溶剂并反应试剂干燥丙酮作用，得到化合物 **B3**；化合物 **B1** 在 BOP 和 *N,N*-二异丙基乙胺(DIEA)的缩合条件下，在无水乙腈和四氢呋喃混合溶剂中，与各种胺发生缩合反应，得到化合物 **B4~B8**；化合物 **B4~B8** 再在含水的三氟乙酸中脱去丙酮叉保护，得到化合物 **B9~B13**。

2.3 合成方法

2.3.1 4',5'-*O*-丙叉基-3'-*O*-咖啡酰奎宁酸(**B1**)的合成 参考文献的合成方法^[11]，于 250 mL 圆底烧瓶中准确称取 7.0 g(19.8 mmol)3-*O*-咖啡酰奎宁酸，加入 60 mL 无水丙酮和 40 mL 2,2-二甲氧基丙烷(DMP)，搅拌反应呈悬浊液。向反应液中加入催化量(50 mg)TsOH，搅拌至反应液澄清，于室温下反应，TLC 监测反应结束后，用无水 Na₂CO₃ 中和至 pH 值为 5~6，抽滤，减压蒸除溶剂，残余物通过硅胶柱色谱纯化，得到咖啡酰奎宁酸衍生物 **B1**。

2.3.2 3,4-苄氧基-4',5'-*O*-丙叉基-3'-*O*-咖啡酰奎宁酸苄酯(**B2**)的合成 于 100 mL 圆底烧瓶中准确称取 0.1 g(0.25 mmol)化合物 **B1** 和 0.17 g(1.23 mmol)无水 K₂CO₃，加入 40 mL 无水乙腈搅拌均匀，缓慢加入 0.01 mL 溴苄，于氩气保护下回流反应，直到 TLC 监测反应结束，减压蒸除溶剂，用 50 mL 醋酸乙酯稀释，5% NaHCO₃ 洗至中性，有机层用无水 Na₂SO₄ 干燥。减压蒸除溶剂，残余物通过硅胶柱色谱纯化，得到咖啡酰奎宁酸衍生物 **B2**。

2.3.3 4',5'-*O*-丙叉基-3'-*O*-咖啡酰奎宁酸-1'-*O*-环内酯(**B3**)的合成 参考文献的合成方法^[12]，于 25 mL 圆底烧瓶中准确称取 0.7 g(2 mmol)3-*O*-咖啡酰奎宁酸和 0.35 g(6 mmol)无水丙酮，加入 10 mL 无水四氢呋喃搅拌均匀，冰浴下缓慢滴加 TMSOTf 0.33 mL(2 mmol)，滴毕于室温下反应过夜，加入冰的 1 mol/L NaOH 溶液 0.35 mL 淬灭反应，醋酸乙酯提取，有机层用无水 Na₂SO₄ 干燥。减压蒸除溶剂，残余物通过硅胶柱色谱纯化，得到咖啡酰奎宁酸衍生物 **B3**。

2.3.4 4',5'-*O*-丙叉基-3'-*O*-咖啡酰奎宁酸酰胺类化合物(**B4~B8**)的合成 参考文献的合成方法^[11]，于 250 mL 圆底烧瓶中，准确称取衍生物 **B1** 1.2 g(3 mmol)和 BOP 1.5 g(3 mmol)，在氩气保护的条件下，加入 70 mL 无水混合溶剂 THF-CH₃CN(3:2)搅拌至溶解。加入 0.8 g(6 mmol)的 DIEA 后，

向反应液中滴加各种胺 3 mmol，直到 TLC 监测反应结束。减压蒸除溶剂，残余物通过硅胶柱色谱纯化，得到咖啡酰奎宁酸衍生物 **B4~B8**。

2.3.5 3'-*O*-咖啡酰奎宁酸酰胺类化合物(**B9~B13**)的合成 参考文献的合成方法^[13]，于 50 mL 圆底烧瓶中，分别准确称取 2 mmol 衍生物 **B4~B8**，加入 TFA-DCM-H₂O(9:1:1)的混合溶液 20 mL，室温下搅拌反应 0.5 h，至 TLC 监测反应结束。减压蒸除溶剂，残余物通过硅胶柱色谱纯化，得到咖啡酰奎宁酸衍生物 **B9~B13**。

2.4 MTT 法检测衍生物对 MDCK 细胞毒性

用 DMSO 将各衍生物溶解至 50 mg/mL 的储备液。将细胞用培养液配成单个细胞悬液，接种到 96 孔板，37 ℃、5% CO₂ 环境下培养 24 h。用培养液稀释衍生物，以等体积的 DMSO 做溶剂对照。吸弃细胞培养液，加入含有衍生物或 DMSO 的培养液，37 ℃，5% CO₂ 环境下培养 48 h，每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL)20 μL，继续培养 4 h，小心吸弃孔内培养上清液，每孔加 150 μL DMSO，37 ℃孵育 10 min，使结晶物充分融解。用酶标仪在 550 nm 波长处测吸光度(*A*)值，计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验组}} / A_{\text{对照组}}$$

衍生物对 MDCK 细胞 50%有毒浓度(50% cytotoxic concentration, CC₅₀)用 GraphPad Prism(GraphPad Software, San Diego, CA)分析计算。治疗指数(therapeutic index, TI)=CC₅₀/EC₅₀，每个实验均重复 3 次。

2.5 衍生物体外抑制流感病毒复制作用^[10]

MDCK 细胞在 96 孔板中长成致密单层后接种流感病毒 A/Beijing/7/2009(BJ09)(感染复数 MOI=0.1)，37 ℃孵育 2 h，然后将细胞培养液换成含有不同浓度衍生物及 2 mg/mL TPCK-treated 胰酶的培养液，继续培养 24 h，收集细胞上清测定病毒滴度，同时固定细胞做间接免疫荧光检测细胞内的病毒。衍生物 50%有效浓度(50% effective concentration, EC₅₀)用 GraphPad Prism(GraphPad Software, San Diego, CA)软件分析计算。

3 结果与讨论

3.1 化合物实验数据

化合物 **B1**：淡黄色粉末，收率 90.1%。HR-MS *m/z*: 417.116 7 (C₁₉H₂₂O₉Na，计算值 417.116 2 [M+Na]⁺)。¹H-NMR(600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.58(1H, s, Ph-OH-3/4), 9.14(1H, s, Ph-OH-3/4), 7.48(1H, d, *J*=

15.8 Hz, H-7), 7.05 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-2), 7.00 (1H, dd, $J = 1.4, 8.2$ Hz, H-6), 6.77 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5), 6.23 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8), 5.34~5.30 (1H, m, H-3'), 4.39~4.38 (1H, m, H-4'), 4.11~4.09 (1H, m, H-5'), 2.20~2.16 (1H, m, H-2'/6'), 2.03~2.01 (1H, m, H-2'/6'), 1.92~1.89 (1H, m, H-2'/6'), 1.83~1.79 (1H, m, H-2'/6'), 1.40 (3H, s, H-8'/9'), 1.25 (3H, s, H-8'/9'); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 176.2 (C-7'), 165.8 (C-9), 148.5 (C-4), 145.6 (C-3), 145.4 (C-7), 125.6 (C-1), 121.5 (C-6), 115.8 (C-10'), 114.9 (C-5), 114.1 (C-8), 108.1 (C-2), 76.5 (C-4'), 73.2 (C-1'), 72.7 (C-3'), 70.4 (C-5'), 36.4 (C-2'), 34.8 (C-6'), 28.1 (C-8'), 26.0 (C-9').

化合物 **B2**: 白色粉末, 收率 68.5%。HR-MS m/z : 687.257 3 ($\text{C}_{40}\text{H}_{40}\text{O}_9\text{Na}$, 计算值 687.257 0 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$)。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.55 (1H, d, $J = 15.7$ Hz, H-7), 7.50 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, Bn-H), 7.47~7.44 (4H, m, Bn-H), 7.40~7.36 (8H, m, Bn-H), 7.33~7.31 (3H, m, Bn-H, H-2), 7.22 (1H, dd, $J = 2.0$ Hz, 8.3 Hz, H-6), 7.08 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5), 6.50 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8), 5.37~5.33 (1H, m, H-3'), 5.19 (4H, s, Bn-CH $_2$), 5.15~5.09 (2H, m, Bn-CH $_2$), 4.41~4.39 (1H, m, H-4'), 4.12~4.11 (1H, m, H-5'), 2.24~2.20 (1H, m, H-2'/6'), 2.10~2.07 (1H, m, H-2'/6'), 1.99~1.96 (1H, m, H-2'/6'), 1.88~1.84 (1H, m, H-2'/6'), 1.41 (3H, s, H-8'/9'), 1.26 (3H, s, H-8'/9'); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 174.2 (C-7'), 166.3 (C-9), 151.2 (C-4), 149.0 (C-3), 145.1 (C-7), 137.0 (C-Bn'''-1), 136.8 (C-Bn''''-1), 135.2 (C-Bn''-1), 128.8 (C-Bn'''-3, 5), 128.7 (C-Bn''''-3, 5), 128.7 (C-Bn''-3, 5, Bn'''-4), 128.3 (C-Bn''''-4, Bn''-4), 128.1 (C-Bn'''-2, 6), 128.0 (C-1), 127.4 (C-Bn''''-2, 6), 127.3 (C-Bn''-2, 6), 123.1 (C-6), 115.9 (C-10'), 114.3 (C-5), 113.9 (C-8), 109.7 (C-2), 77.4 (C-4'), 77.0 (C-1'), 74.0 (C-3'), 71.4 (C-Bn'''-7), 71.1 (C-Bn''''-7), 70.7 (C-5'), 67.9 (C-Bn''-7), 37.0 (C-6'), 34.5 (C-2'), 28.1 (C-8'), 26.0 (C-9').

化合物 **B3**: 淡黄色粉末, 收率 66.7%。HR-MS m/z : 457.147 2 ($\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{NaO}_9$, 计算值 457.147 5 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$)。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.60 (1H, s, Ph-OH-3/4), 9.16 (1H, s, Ph-OH-3/4), 7.51 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-7), 7.11~6.95 (2H, m, H-2, 6), 6.77 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-5), 6.25 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-8),

5.24~5.10 (1H, m, H-3'), 4.50~4.36 (1H, m, H-4'), 4.26~4.14 (1H, m, H-5'), 2.29~2.18 (2H, m, H-2'/6'), 2.14~2.04 (1H, m, H-2'/6'), 1.90~1.79 (1H, m, H-2'/6'), 1.57 (6H, s, H-11', 12'), 1.41 (3H, s, H-8'/9'), 1.27 (3H, s, H-8'/9'); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 173.7 (C-7'), 165.9 (C-9), 148.4 (C-4), 145.7 (C-3), 145.6 (C-7), 125.5 (C-1), 121.4 (C-6), 115.8 (C-10'), 114.9 (C-5), 113.7 (C-8), 110.4 (C-2), 108.2 (C-13'), 78.2 (C-4'), 75.6 (C-1'), 72.5 (C-3'), 69.4 (C-5'), 35.7 (C-6'), 34.0 (C-2'), 28.1 (C-11'), 27.9 (C-12'), 27.8 (C-8'), 25.7 (C-9').

化合物 **B4**: 淡黄色粉末, 收率 65.2%。HR-MS m/z : 484.194 6 ($\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{NO}_8\text{Na}$, 计算值 484.194 7 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$)。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.51~7.44 (2H, m, N-H, H-7), 7.06~6.98 (2H, m, H-2, 6), 6.78 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5), 6.24 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8), 5.43 (1H, s, H-1'), 5.38~5.32 (1H, m, H-3'), 4.43~4.42 (1H, m, H-4'), 4.13~4.10 (1H, m, H-5'), 4.04~3.95 (1H, m, H-1''), 2.26~2.21 (1H, m, H-2'/6'), 1.98~1.94 (1H, m, H-2'/6'), 1.81~1.77 (4H, m, H-2'/6', H-2'', 5''), 1.68~1.55 (2H, m, H-2'', 5''), 1.53~1.44 (2H, m, H-3'', 4''), 1.44~1.35 (5H, m, H-8'/9', 3'', 4''), 1.25 (3H, s, H-8'/9'); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 174.7 (C-7'), 166.0 (C-9), 148.5 (C-4), 145.7 (C-3), 145.4 (C-7), 125.7 (C-1), 121.5 (C-6), 115.9 (C-10'), 114.9 (C-5), 114.2 (C-8), 108.2 (C-2), 77.0 (C-4'), 74.2 (C-1'), 73.7 (C-3'), 71.1 (C-5'), 50.5 (C-1''), 37.0 (C-6'), 34.5 (C-2'), 32.4 (C-2''), 32.3 (C-5''), 28.1 (C-8'), 26.0 (C-9'), 23.6 (C-3'', 4'')。

化合物 **B5**: 淡黄色粉末, 收率 68.9%。HR-MS m/z : 500.225 9 ($\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{NO}_8\text{Na}$, 计算值 500.226 0 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$)。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.74 (1H, t, $J = 5.9$ Hz, N-H), 7.47 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7), 7.05 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-2), 7.00 (1H, dd, $J = 1.8, 8.2$ Hz, H-6), 6.76 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5), 6.24 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8), 5.44 (1H, s, H-1'), 5.36~5.32 (1H, m, H-3'), 4.42~4.41 (1H, m, H-4'), 4.13~4.11 (1H, m, H-5'), 3.09~3.00 (2H, m, H-1''), 2.25~2.22 (1H, m, H-2'/6'), 1.97~1.94 (1H, m, H-2'/6'), 1.76~1.75 (2H, m, H-2'/6'), 1.41 (3H, s, H-8'/9'), 1.39~1.36 (2H, m, H-2''), 1.25 (3H, s, H-8'/9'), 1.23~1.21 (6H, m, H-3''~5''), 0.83 (3H, t, $J = 7.1$ Hz, H-6''); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 174.9 (C-7'), 165.8 (C-9),

148.4 (C-4), 145.5 (C-3), 145.2 (C-7), 125.5 (C-1), 121.3 (C-6), 115.7 (C-10'), 114.8 (C-5), 114.0 (C-8), 108.0 (C-2), 76.8 (C-4'), 74.0 (C-1'), 73.5 (C-3'), 70.8 (C-5'), 38.5 (C-1''), 37.0 (C-6'), 34.5 (C-2'), 30.9 (C-2''), 28.9 (C-3''), 27.9 (C-4''), 25.8 (C-8', 9'), 22.0 (C-5''), 13.8 (C-6'').

化合物 **B6**: 淡黄色粉末, 收率 40.2%。HR-MS m/z : 506.238 1 ($C_{26}H_{36}NO_9$, 计算值 506.239 0 $[M-H]^-$)。 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.77 (1H, t, $J = 5.6$ Hz, $N-H$), 7.47 (1H, d, $J = 15.7$ Hz, H-7), 7.04 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 7.00 (1H, dd, $J = 1.9, 8.2$ Hz, H-6), 6.76 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5), 6.24 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8), 5.42 (1H, s, H-1'), 5.36~5.32 (1H, m, H-3'), 4.43~4.41 (1H, m, H-4'), 4.13~4.11 (1H, m, H-5'), 3.34~3.31 (4H, m, H-3'', 5''), 3.17~3.06 (2H, m, H-1''), 2.25~2.22 (1H, m, H-2'/6'), 1.97~1.94 (1H, m, H-2'/6'), 1.76~1.75 (2H, m, H-2'/6'), 1.65~1.61 (2H, m, H-2''), 1.48~1.43 (2H, m, H-6''), 1.41 (3H, s, H-8'/9'), 1.33~1.28 (2H, m, H-7''), 1.26 (3H, s, H-8'/9'), 0.86 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, H-8''); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 175.0 (C-7'), 165.8 (C-9), 148.4 (C-4), 145.5 (C-3), 145.2 (C-7), 125.5 (C-1), 121.3 (C-6), 115.7 (C-10'), 114.8 (C-5), 114.0 (C-8), 108.0 (C-2), 76.8 (C-4'), 74.0 (C-1'), 73.5 (C-3'), 70.8 (C-5'), 69.7 (C-5''), 67.9 (C-3''), 37.0 (C-6'), 36.3 (C-1''), 34.4 (C-2'), 31.3 (C-2''), 29.2 (C-6''), 28.0 (C-8'), 25.8 (C-9'), 18.8 (C-7''), 13.7 (C-8'').

化合物 **B7**: 淡黄色粉末, 收率 38.8%。HR-MS m/z : 562.301 4 ($C_{30}H_{44}NO_9$, 计算值 562.301 6 $[M-H]^-$)。 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.76 (1H, t, $J = 5.8$ Hz, $N-H$), 7.47 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7), 7.04 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2), 7.00 (1H, dd, $J = 1.7, 8.3$ Hz, H-6), 6.76 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5), 6.23 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8), 5.41 (1H, s, H-1'), 5.36~5.32 (1H, m, H-3'), 4.43~4.41 (1H, m, H-4'), 4.13~4.11 (1H, m, H-5'), 3.34~3.32 (2H, m, H-3''), 3.24~3.20 (2H, m, H-5''), 3.16~3.07 (2H, m, H-1''), 2.26~2.22 (1H, m, H-2'/6'), 1.97~1.95 (1H, m, H-2'/6'), 1.78~1.75 (2H, m, H-2'/6'), 1.65~1.61 (2H, m, H-2''), 1.41 (4H, s, H-8'/9', 6''), 1.26~1.22 (11H, m, H-8'/9', 7''~9'', 11''), 0.86~0.80 (6H, m, H-10'', 12''); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 175.0 (C-7'), 165.8 (C-9), 148.4 (C-4), 145.6 (C-3), 145.3 (C-7), 125.5 (C-1), 121.3

(C-6), 115.8 (C-10'), 114.8 (C-5), 114.1 (C-8), 108.0 (C-2), 76.9 (C-4'), 74.0 (C-1'), 73.5 (C-3'), 70.8 (C-5'), 68.2 (C-3''), 67.1 (C-5''), 39.0 (C-6''), 37.0 (C-6'), 36.2 (C-1''), 34.4 (C-2'), 30.0 (C-7''), 29.2 (C-8''), 28.5 (C-2''), 28.0 (C-8'), 25.8 (C-9'), 23.4 (C-11''), 22.5 (C-9''), 13.9 (C-10''), 10.9 (C-12'').

化合物 **B8**: 淡黄色粉末, 收率 33.3%。HR-MS m/z : 642.400 1 ($C_{37}H_{56}NO_8$, 计算值 642.400 6 $[M-H]^-$)。 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.71 (1H, t, $J = 5.9$ Hz, $N-H$), 7.47 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-7), 7.04 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 7.00 (1H, dd, $J = 1.9, 8.2$ Hz, H-6), 6.76 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5), 6.23 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8), 5.42 (1H, s, H-1'), 5.36~5.32 (1H, m, H-3'), 4.43~4.40 (1H, m, H-4'), 4.13~4.11 (1H, m, H-5'), 3.10~2.99 (2H, m, H-1''), 2.25~2.21 (1H, m, H-2'/6'), 1.97~1.94 (3H, m, H-2'/6', 9'', 10''), 1.76~1.75 (2H, m, H-2'/6'), 1.41 (3H, s, H-8'/9'), 1.39~1.37 (2H, m, H-8''), 1.27~1.21 (29H, m, H-8'/9', 2''~7'', 10''~17''), 0.84 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, H-18''); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 175.0 (C-7'), 165.8 (C-9), 148.4 (C-4), 145.5 (C-3), 145.2 (C-7), 129.6 (C-9'', 10''), 125.5 (C-1), 121.3 (C-6), 115.7 (C-10'), 114.8 (C-5), 114.0 (C-8), 108.0 (C-2), 76.8 (C-4'), 74.0 (C-1'), 73.5 (C-3'), 70.8 (C-5'), 38.4 (C-1''), 37.0 (C-6'), 34.5 (C-2'), 31.2 (C-2''), 29.1 (C-8''), 29.1 (C-11''), 29.0 (C-7''), 28.8 (C-12''), 28.7 (C-6''), 28.6 (C-13''), 28.5 (C-5''), 28.5 (C-4''), 27.9 (C-8'), 26.6 (C-14''), 26.5 (C-16''), 26.2 (C-15''), 25.8 (C-9'), 23.4 (C-11''), 22.0 (C-17''), 13.9 (C-18'').

化合物 **B9**: 淡黄色粉末, 收率 78.0%。HR-MS m/z : 444.164 0 ($C_{21}H_{27}NO_8Na$, 计算值 444.163 4 $[M+Na]^+$)。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.57 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7), 7.05 (1H, s, H-2), 6.99~6.90 (1H, m, H-6), 6.78 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5), 6.29 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-8), 5.45~5.33 (1H, m, H-3'), 4.28~4.19 (1H, m, H-4'), 3.75~3.67 (1H, m, H-5'), 3.54~3.42 (1H, m, H-1''), 2.10~1.92 (6H, m, H-2', 6', 2''), 1.78~1.66 (2H, m, H-3''), 1.78~1.66 (2H, m, H-4''), 1.52~1.42 (2H, m, H-5''); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 176.2 (C-7'), 169.0 (C-9), 149.5 (C-4), 147.0 (C-3), 146.8 (C-7), 127.8 (C-1), 122.9 (C-6), 116.5 (C-5), 115.4 (C-8), 115.2 (C-2), 77.7 (C-4'), 74.3 (C-1'), 72.6 (C-3'), 71.9 (C-5'), 52.2 (C-1''), 40.0

(C-6'), 38.6 (C-2'), 33.5 (C-2'', 5''), 24.8 (C-3'', 4'')。

化合物 **B10**: 淡黄色粉末, 收率 82.5%。HR-MS m/z : 460.194 8 ($C_{22}H_{31}NO_8Na$, 计算值 460.194 7 [$M+Na$]⁺)。¹H-NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.58 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7), 7.09~7.01 (1H, m, H-2), 6.98~6.91 (1H, m, H-6), 6.78 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.29 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8), 5.43~5.37 (1H, m, H-3'), 4.28~4.19 (1H, m, H-4'), 3.73~3.70 (1H, m, H-5'), 3.21~3.17 (2H, m, H-1''), 2.11~1.91 (4H, m, H-2', 6'), 1.55~1.45 (2H, m, H-2''), 1.35~1.26 (6H, m, H-3''~5''), 0.92~0.86 (3H, m, H-6''); ¹³C-NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 176.6 (C-7'), 169.0 (C-9), 149.6 (C-4), 147.0 (C-3), 146.8 (C-7), 127.8 (C-1), 123.0 (C-6), 116.5 (C-5), 115.3 (C-8), 115.1 (C-2), 77.8 (C-4'), 74.3 (C-1'), 72.6 (C-3'), 72.0 (C-5'), 40.2 (C-1''), 40.0 (C-6'), 38.7 (C-2'), 32.6 (C-2''), 30.4 (C-3''), 27.6 (C-4''), 23.6 (C-5''), 14.3 (C-6'')。

化合物 **B11**: 淡黄色粉末, 收率 71.5%。HR-MS m/z : 466.207 0 ($C_{23}H_{32}NO_9$, 计算值 466.207 7 [$M-H$]⁻)。¹H-NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.57 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-7), 7.04 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2), 6.95 (1H, dd, $J = 1.8, 8.2$ Hz, H-6), 6.78 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5), 6.29 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8), 5.42~5.38 (1H, m, H-3'), 4.24~4.23 (1H, m, H-4'), 3.72~3.70 (1H, m, H-5'), 3.48~3.46 (2H, m, H-3''), 3.43~3.41 (2H, m, H-5''), 3.30~3.28 (2H, m, H-1''), 2.12~2.07 (2H, m, H-2'/6'), 2.04~2.00 (1H, m, H-2'/6'), 1.95~1.92 (1H, m, H-2'/6'), 1.78~1.74 (2H, m, H-2''), 1.57~1.52 (2H, m, H-6''), 1.40~1.34 (2H, m, H-7''), 0.92 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, H-8''); ¹³C-NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 176.6 (C-7'), 169.0 (C-9), 149.5 (C-4), 147.0 (C-3), 146.8 (C-7), 127.8 (C-1), 122.9 (C-6), 116.5 (C-5), 115.4 (C-8), 115.2 (C-2), 77.7 (C-1'), 74.0 (C-4'), 73.5 (C-3'), 70.8 (C-5'), 69.7 (C-5''), 67.9 (C-3''), 40.0 (C-6'), 38.7 (C-2'), 38.4 (C-1''), 32.9 (C-6''), 30.2 (C-2''), 20.4 (C-7''), 14.2 (C-8'')。

化合物 **B12**: 淡黄色粉末, 收率 60.6%。HR-MS m/z : 522.269 5 ($C_{27}H_{40}NO_9$, 计算值 522.270 3 [$M-H$]⁻)。¹H-NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.57 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-7), 7.04 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-2), 6.94 (1H, dd, $J = 1.9, 8.1$ Hz, H-6), 6.77 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5), 6.29 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-8), 5.42~5.38 (1H, m, H-3'), 4.23 (1H, m, H-4'), 3.72~3.69 (1H, m,

H-5'), 3.47~3.45 (2H, m, H-1''), 3.31~3.28 (4H, m, H-3'', 5''), 2.13~2.07 (2H, m, H-2'/6'), 2.04~2.00 (1H, m, H-2'/6'), 1.95~1.92 (1H, m, H-2'/6'), 1.78~1.74 (2H, m, H-2''), 1.50~1.46 (1H, m, H-6''), 1.33~1.28 (8H, m, H-7''~9'', 11''), 0.91~0.86 (6H, m, H-10'', 12''); ¹³C-NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 176.6 (C-7'), 169.0 (C-9), 149.5 (C-4), 147.0 (C-3), 146.8 (C-7), 127.8 (C-1), 122.9 (C-6), 116.5 (C-5), 115.4 (C-8), 115.2 (C-2), 77.8 (C-1'), 75.0 (C-5''), 74.4 (C-4'), 72.7 (C-3'), 71.9 (C-5'), 70.4 (C-3''), 41.0 (C-6''), 40.0 (C-6'), 38.7 (C-2'), 38.4 (C-1''), 31.7 (C-7''), 30.3 (C-8''), 30.2 (C-2''), 24.9 (C-9''), 24.1 (C-11''), 14.4 (C-10''), 11.5 (C-12'')。

化合物 **B13**: 淡黄色粉末, 收率 67.3%。HR-MS m/z : 602.368 3 ($C_{34}H_{52}NO_8$, 计算值 602.369 3 [$M-H$]⁻)。¹H-NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.57 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7), 7.04 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2), 6.94 (1H, dd, $J = 1.7, 8.2$ Hz, H-6), 6.77 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5), 6.29 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8), 5.43~5.38 (1H, m, H-3'), 4.24~4.23 (1H, m, H-4'), 3.73~3.71 (1H, m, H-5'), 3.23~3.15 (2H, m, H-1''), 2.13~2.08 (2H, m, H-2'/6'), 2.05~1.92 (3H, m, H-2'/6', 9''), 1.89~1.74 (1H, m, H-10''), 1.65~1.50 (4H, m, H-8'', 11''), 1.30~1.26 (24H, m, H-2''~7'', 12''~17''), 0.90~0.88 (3H, m, H-18''); ¹³C-NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 176.6 (C-7'), 169.0 (C-9), 149.5 (C-4), 147.0 (C-3), 146.7 (C-7), 127.8 (C-1), 122.9 (C-6), 116.5 (C-5), 115.4 (C-8), 115.4 (C-9''), 115.2 (C-2), 115.2 (C-10''), 77.7 (C-1'), 74.4 (C-4'), 72.6 (C-3'), 71.9 (C-5'), 40.2 (C-1''), 40.0 (C-6'), 38.7 (C-2'), 30.7 (C-2''), 30.6 (C-8''), 30.5 (C-11''), 30.4 (C-3''), 30.4 (C-7''), 30.2 (C-12''), 30.2 (C-16''), 30.1 (C-15''), 30.0 (C-14''), 27.8 (C-13''), 27.8 (C-4''), 27.7 (C-6''), 26.0 (C-5''), 23.7 (C-17''), 14.4 (C-18'')。

3.2 细胞学实验结果

首先用 MTT 法检测了各衍生物对 MDCK 细胞的毒性, 然后在无毒浓度范围内通过细胞学实验考察了衍生物 **B1**~**B13** 对流感病毒体外感染 MDCK 细胞的抑制作用, 具体结果见表 1。衍生物 **B4**、**B6** 和 **B10** 抑制病毒复制的 EC_{50} 分别为 2.34、1.06 和 19.88 $\mu g/mL$, 但是 **B4** 的细胞毒性更弱 (CC_{50} 为 63.77 $\mu g/mL$), 治疗指数更高 ($TI=27.25$), 因此 **B4** 具有更好的抗流感病毒活性, 具有深入研究价值。

表1 3-O-咖啡酰奎宁酸衍生物的抗病毒活性结果
Table 1 Antiviral activities of 3-O-caffeoylquinic acid derivatives

化合物	EC ₅₀ /(μg·mL ⁻¹)	CC ₅₀ /(μg·mL ⁻¹)
B1	>50	>50
B2	>50	>50
B3	>50	>50
B4	2.34	63.77
B5	>50	>50
B6	1.06	20.25
B7	>50	>50
B8	>50	>50
B9	>50	>50
B10	19.88	100.8
B11	>50	>50
B12	>50	>50
B13	>50	>50

初步的构效关系表明, 咖啡酰奎宁酸类化合物的 7'位羧基为其抗流感病毒活性的非活性必需基团, 酰胺部分连有长脂肪链不利于活性的增加, 而连有较短脂肪链的胺基, 如环戊胺、正戊胺则有助于活性提高。同时, 4'和 5'位的羟基也为非活性必需基团, 对该类单体化合物的这些结构部位进行化学修饰, 有可能发现抗流感病毒更优的衍生物。

参考文献

[1] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编 (上册) [M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1996.
[2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1992.
[3] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
[4] 刘嘉伟, 彭丽华, 洗美廷, 等. 露兜箬根化学成分研究 [J]. 中草药, 2012, 43(4): 636-639.

[5] Zhang X, Wu C M, Wu H F, *et al.* Anti-hyperlipidemic effects and otential mechanisms of action of the caffeoylquinic acid-rich andanus tectorius fruit extract in hamsters fed a high fat-diet [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61922.
[6] 赵 昱, 赵 军, 李湘萍, 等. 咖啡酰奎尼酸类化合物研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(11): 869-874.
[7] Han J, Miyamae Y, Shigemori H, *et al.* Neuroprotective effect of 3,5-di-O-caffeoylquinic acid on SH-SY5Y cells and senescence-accelerated-prone mice 8 through the up-regulation of phosphoglycerate kinase-1 [J]. *Neuroscience*, 2010, 169(3): 1039-1045.
[8] Miyamae Y, Kurisu M, Murakami K, *et al.* Protective effects of caffeoylquinic acids on the aggregation and neurotoxicity of the 42-residue amyloid β-protein [J]. *Bioorgan Med Chem*, 2012, 20(19): 5844-5849.
[9] Nugroho A, Lim S C, Byeon J S, *et al.* Simultaneous quantification and validation of caffeoylquinic acids and flavonoids in Hemistepta lyrata and peroxynitrite-scavenging activity [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 76: 139-144.
[10] Dang Z, Jung K, Zhu L, *et al.* Identification and synthesis of quinolizidines with anti-influenza A virus activity [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2014, 5(8): 942-946.
[11] Ma C M, Kully M, Khan J K, *et al.* Synthesis of chlorogenic acid derivatives with promising antifungal activity [J]. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15(21): 6830-6833.
[12] Ma C M, Masao H, Mohsen D, *et al.* Chlorogenic acid derivatives with alkyl chains of different lengths and orientations: potent α-glucosidase inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2008, 51(19): 6188-6194.
[13] Metaferia B B, Chen L, Baker H L, *et al.* Synthetic macrolides that inhibit breast cancer cell migration *in vitro* [J]. *J Am Chem Soc*, 2007, 129(9): 2434-2435.