

乌苏烷型-2,12-烯-28-羧酸酯的合成及其体外抗肿瘤活性研究

孟艳秋, 丁 一, 张 萌, 杨 哲

沈阳化工大学, 辽宁 沈阳 110142

摘 要: 目的 设计合成了乌苏烷型-2,12-烯-28-羧酸酯类化合物, 并对其进行了体外抗肿瘤活性研究。方法 熊果酸先进行 C₂₈-羧基与卤代烃发生酯化反应, 然后 C₃-羟基与甲基磺酰氯在 0 °C 冰浴条件下发生甲基磺酰化反应, 最后在 168 °C 回流条件下发生消除反应, 从而得到目标产物; 通过 MTT 法对上述合成的乌苏烷型-2,12-烯-28-羧酸酯类化合物进行体外抗肿瘤活性研究。结果 设计并合成了 7 个目标产物 **3a~3g**, 利用 IR、MS 和 ¹H-NMR 确证了结构; 抗肿瘤活性筛选结果表明 **3b** 对 A549 肿瘤细胞的抑制率略低于阳性对照药吉非替尼。结论 此路线操作简单, 设计合理, 对进一步开展熊果酸的结构改造和抗肿瘤活性研究具有一定的参考价值。

关键词: 熊果酸; 结构改造; 抗肿瘤活性

中图分类号: R284.3; R979.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2014)02-0116-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.02.002

Synthesis of ursane type-2,12-diene-28-carboxylic acid ester and their antitumor activity *in vitro*

MENG Yan-qiu, DING Yi, YANG Zhe, ZHANG Meng

Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang 110142, China

Abstract: Objective To search for a synthetic route for synthesis of ursane type-2,12-diene-28-carboxylic acid ester and to study their antitumor activities *in vitro*. **Methods** The carboxyl group at C₂₈ of ursolic acid reacted with halogenated hydrocarbons by esterification reaction, and the hydroxyl group at C₃ reacted with methyl sulfonyl chloride by methyl sulfonic acid reaction at 0 °C. The target product was obtained after the elimination reaction at 168 °C. The antitumor activities of the compounds were tested by MTT assay. **Results** Seven target products **3a~3g** were synthesized, and were characterized by IR, MS and ¹H-NMR. The antitumor activity screening results showed that compound **3b** exhibited lower inhibitory rate against A549 cells than gefitinib. **Conclusion** This route has the advantages of simple operation and reasonable design, provides some practical reference value for the further development on the structure modification of ursolic acid derivatives and study on anti-tumor activity.

Key words: ursolic acid; structure modification; antitumor activity

熊果酸又名乌索酸、乌苏酸, 化学名为 3β-羟基-乌苏烷型-12-烯-28-酸, 纯品为白色针状结晶(乙醇)。已有研究证明, 熊果酸具有镇静、抗炎、抗菌、抗糖尿病、降血糖等多种生物学效应, 它的抗肿瘤活性已得到公认, 很有希望被发展成为低毒有效的抗癌新药^[1-3]。

当熊果酸 A 环为疏水性环时, 该类化合物具有较高的抗肿瘤活性^[4]。为了进一步研究其抗肿瘤活性, 笔者将熊果酸 C₂₈-羧基成酯, C₃-羟基与甲基磺酰氯反

应生成甲基磺酰酯, 进而与碳酸锂进行消除反应, 2,3 位形成双键, 参考文献报道^[5-7]设计出 7 个乌苏烷型-2,12-二烯-28-羧酸酯类化合物 **3a~3g**, 合成路线见图 1。经 IR、MS 和 ¹H-NMR 确证了该类化合物的结构; 并通过 MTT 法对其进行了体外抗肿瘤活性研究。

1.1 仪器与试剂

Buchi B-545 熔点测定仪 (瑞士 Buchi 公司); Nicolet 470 傅里叶变换红外光谱仪 (Thermo 公司); LCQ 型质谱仪 (Finnigan 公司); ARX-500 型核磁

收稿日期: 2013-09-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21372156)

作者简介: 孟艳秋 (1963—), 女, 辽宁省义县人, 教授, 主要从事新药研究工作。Tel: 15940588671 E-mail: mengyanqiu@hotmail.com

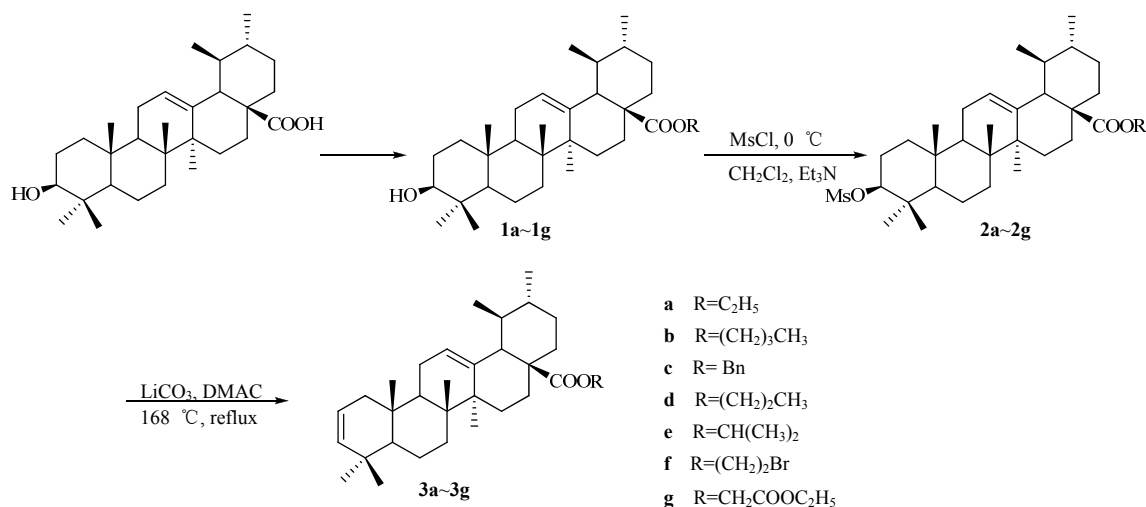


图 1 目标化合物的合成路线

Fig. 1 Synthetic routes of target compounds

共振仪 (瑞士 Bruker 公司)。

薄层色谱硅胶 GF254、柱色谱硅胶 (100~200 目, 青岛海洋化工厂); 石油醚 (沸程在 60~90℃)、醋酸乙酯 (天津市博迪化工有限公司); 熊果酸 (质量分数 >98%, 成都天源天然产物有限公司); 其他试剂均为分析纯 (国药集团化学试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 3β-羟基-乌苏烷型-12-烯-28-羧酸酯的制备

2.1.1 3β-羟基-乌苏烷型-12-烯-28-羧酸乙酯 (1a) 的制备 将熊果酸 (100 mg, 0.22 mmol) 溶于 4 mL *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF), 加入无水碳酸钾 0.06 g, 缓慢滴加溴乙烷 3 滴 (0.88 mmol), 室温反应 5 h, TLC 检测反应终点。减压蒸出剩余的溴乙烷后, 加入饱和氯化钠水溶液 2 mL, 用醋酸乙酯 (4 mL×3) 萃取, 合并有机相水洗至 pH 7~8 后, 无水硫酸镁干燥, 抽滤, 减压蒸除有机溶剂, 无需进一步处理可进行下一步反应, 得到白色固体化合物 96.98 mg, 产率 91%。

2.1.2 3β-羟基-乌苏烷型-12-烯-28-羧酸正丁酯 (1b) 的制备 由熊果酸 (100 mg, 0.22 mmol) 与溴代正丁烷 10 滴 (0.88 mmol) 反应得到, 无需进一步处理可进行下一步反应, 得到化合物 98.14 mg, 产率 87%。

2.1.3 3β-羟基-乌苏烷型-12-烯-28-羧酸苄酯 (1c) 的制备 由熊果酸 (100 mg, 0.22 mmol) 与溴苄 3 滴 (0.88 mmol) 反应得到, 无需进一步处理可进行下一步反应, 得到化合物 97.43 mg, 产率 81%。

2.1.4 3β-羟基-乌苏烷型-12-烯-28-羧酸正丙酯 (1d) 的制备 由熊果酸 (100 mg, 0.22 mmol) 与

溴代正丙烷 10 滴 (0.88 mmol) 反应得到, 无需进一步处理可进行下一步反应, 得到化合物 92.5 mg, 产率 82%。

2.1.5 3β-羟基-乌苏烷型-12-烯-28-羧酸异丁酯 (1e) 的制备 由熊果酸 (100 mg, 0.22 mmol) 与溴代异丙烷 10 滴 (0.88 mmol) 反应得到, 无需进一步处理可进行下一步反应, 得到化合物 92.52 mg, 产率 82%。

2.1.6 3β-羟基-齐墩果烷型-12-烯-30-羧酸溴乙酯 (1f) 的制备 由熊果酸 (100 mg, 0.22 mmol) 与 1,2-二溴乙烷 5 滴 (5.08 mmol) 冰浴下反应得到, 无需进一步处理可进行下一步反应, 得到化合物 110.29 mg, 产率 89%。

2.1.7 3β-羟基-齐墩果烷型-12-烯-30-羧酸乙氧甲酰基甲酯 (1g) 的制备 将熊果酸 (100 mg, 0.22 mmol) 溶于 5 mL 丙酮中, 加热回流使其充分溶解, 待溶液澄清后停止加热, 加入无水碳酸钾 0.05 g, 室温搅拌溶液成乳白色后, 将微量的 KI 加入到该溶液中, 缓慢滴加 10 滴氯乙酸乙酯 (0.88 mmol), 室温反应 4 h, TLC 监测反应。反应结束后, 减压浓缩后加入饱和氯化钠水溶液 2 mL, 用醋酸乙酯 (4 mL×3) 萃取, 合并醋酸乙酯层, 有机层水洗至中性后用无水硫酸镁干燥, 滤过、浓缩, 无需进一步处理可进行下一步反应, 得到化合物 101.43 mg, 产率 85%。

2.2 3β-甲基磺酰氧基-乌苏烷型-2,12-二烯-28-羧酸酯的制备

将化合物 1a~1g (0.20 mmol) 溶解在 5 mL 二

氯甲烷和 1.5 mL 三乙胺中,冰浴下向此混合液中滴加 1 mL 甲基磺酰氯 (MsCl)。控制反应温度在 0°C 左右。滴加完毕后,反应化合物搅拌 3 h,经 TLC 检测反应终点。滤过,滤液以 1 mol/L 盐酸溶液洗涤至微酸性,再水洗至中性,无水硫酸镁干燥,滤过,旋蒸,得到化合物 **2a~2g**。

化合物 **2a**: 84.41 mg, 产率 75%。¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 5.24 (t, 1H, H-12), 4.35 (t, 1H, H-3), 4.05~4.06 (m, 2H, OCH₂), 3.01 (s, 3H, CH₃S), 2.22 (d, 1H, H-18), 1.23 (t, 3H, CH₃), 0.95 (d, 3H), 0.86 (d, 3H), 0.76, 0.85, 0.95, 1.03, 1.07 (s, 3H)。IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3 427, 2 926, 1 721, 1 361, 1 174, 908。

化合物 **2b**: 83.54 mg, 产率 74%。

化合物 **2c**: 84.49 mg, 产率 76%。

化合物 **2d**: 78.77 mg, 产率 74%。

化合物 **2e**: 77.7 mg, 产率 73%。

化合物 **2f**: 125.6 mg, 产率 77%。

化合物 **2g**: 84.63 mg, 产率 73%。

2.3 乌苏烷型-2, 12-二烯-28-羧酸酯的制备

向所得化合物 **2a~2g** (0.15 mmol) 中加入 6 mL *N,N*-二甲基乙酰胺 (DMAC) 溶液使其完全溶解,加入碳酸锂 (70 mg, 0.94 mmol)。反应混合液 168 °C 回流 30 min。当反应液冷却后,滤过。滤液加入 10 mL 水,用醋酸乙酯 (10 mL×3) 萃取。合并有机相,1 mol/L 盐酸溶液洗涤至微酸性,再水洗至中性。无水硫酸镁干燥,滤过,旋蒸浓缩经硅胶柱色谱纯化,洗脱剂为石油醚-醋酸乙酯 (40:1),得目标产物。

化合物 **3a**: 白色无定形固体, 45.48 mg, 产率 65%。mp 113.8~119.2 °C; ESI-MS m/z : 466.6 [M]⁺; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 5.42 (dd, 1H, H-2), 5.37 (dd, 1H, H-3), 5.28 (t, 1H, H-12), 4.06 (m, 2H, OCH₂), 2.25 (d, 1H, H-18), 1.23 (t, 3H, CH₃), 1.11 (m, 3H), 0.95 (m, 9H), 0.89 (s, 6H), 0.81 (s, 3H)。IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3 425, 2 924, 2 867, 1 722, 1 659, 1 456, 1 386, 1 270, 1 227, 1 146, 1 097, 729。

化合物 **3b**: 白色无定形固体, 42.63 mg, 产率 61%。mp 116.8~119.5 °C; ESI-MS m/z : 495.2 [M+H]⁺; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 5.41 (dd, 1H, H-2), 5.37 (dd, 1H, H-3), 5.27 (t, 1H, H-12), 4.00 (t, 2H, OCH₂), 1.65 (m, 2H, CH₂),

1.37 (m, 2H, CH₂), 0.89 (t, 3H, CH₃), 2.23 (d, 1H, H-18), 1.09 (s, 3H), 0.96 (m, 9H), 0.79 (s, 6H), 0.73 (s, 3H)。IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3 424, 2 957, 2 870, 1 723, 1 643, 1 579, 1 456, 1 379, 1 271, 1 229, 1 144, 729。

化合物 **3c**: 白色无定形固体, 42.19 mg, 产率 59%。mp 102.4~106.6 °C; ESI-MS m/z : 563.8 [M+Cl]⁺; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.34 (m, 5H, C₆H₅), 5.37 (dd, 1H, H-3), 5.27 (t, 1H, H-12), 5.10 (s, 2H, OCH₂), 2.27 (d, 1H, H-18), 0.71、0.88、0.93、0.95、1.08、1.25、1.35 (s, 21H, 7×CH₃)。IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3 428, 3 066, 2 924, 2 868, 1 724, 1 642, 1 454, 1 379, 1 269, 1 109, 805, 730, 696, 661。

化合物 **3d**: 白色无定形固体, 42.88 mg, 产率 65%。mp 114.4~117.5 °C; ESI-MS m/z : 478.9 [M-H]⁻; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 5.42 (dd, 1H, H-2), 5.37 (dd, 1H, H-3), 5.28 (t, 1H, H-12), 3.96 (t, 2H, OCH₂), 2.26 (d, 1H, H-18), 1.69 (m, 2H, CH₂), 1.09 (s, 3H), 0.95 (m, 9H), 0.93 (t, 1H, CH₃), 0.87 (s, 6H), 0.80 (s, 3H); IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3 427, 2 920, 2 853, 1 724, 1 640, 1 563, 1 455, 1 381, 1 267, 802, 728, 661。

化合物 **3e**: 白色无定形固体, 43.57 mg, 产率 67%。mp 116.1~118.8 °C; ESI-MS m/z : 479.2 [M-H]⁻; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 5.41 (dd, 1H, H-2), 5.37 (dd, 1H, H-3), 5.27 (t, 1H, H-12), 4.93 (m, 1H, COOCH), 2.24 (d, 1H, H-18), 1.32 (d, 6H, (CH₃)₂), 1.09 (s, 3H), 0.96 (m, 9H), 0.87 (s, 6H), 0.82 (s, 3H)。IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3 423, 2 925, 2 870, 1 722, 1 658, 1 575, 1 455, 1 375, 1 268, 804, 729, 661。

化合物 **3f**: 白色无定形固体, 50.09 mg, 产率 61%。mp 107.8~115.6 °C; ESI-MS m/z : 578.0 [M+Cl]⁺; IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3 433, 2 924, 2 869, 1 731, 1 644, 1 577, 1 455, 1 378, 1 269, 801, 730, 661。

化合物 **3g**: 白色无定形固体, 44.35 mg, 产率 62%。mp 78.4~82.5 °C; ESI-MS m/z : 542.5 [M+H₂O]⁺; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 5.42 (dd, 1H, H-2), 5.37 (dd, 1H, H-3), 5.29 (t, 1H, H-12), 4.58 (s, 2H, COOCH₂COO), 4.19 (m, 2H, OCH₂), 2.26 (d, 1H, H-18), 1.26 (t, 3H, CH₃), 1.09 (s, 3H), 0.95 (m, 9H), 0.88 (s, 6H), 0.77 (s, 3H)。

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3 459, 2 957, 2 869, 1 740, 1 659, 1 456, 1 378, 1 270, 1 097, 805, 730, 662.

2.4 体外抗肿瘤活性筛选实验

以阿霉素和吉非替尼为阳性对照药,采用 MTT 法对合成的 3 β -甲基磺酰氧基-乌苏烷型-2,12-二烯-

28-羧酸酯进行初步的体外活性测试,所选用的肿瘤细胞为人胃腺癌细胞株 (SGC-7901)、人非小细胞肺癌细胞株 (A549) 和人成纤维肉瘤细胞株 (HT-1080)。目标化合物的抗肿瘤活性数据以半数有效抑制浓度 IC_{50} 表示,结果见表 1。

表 1 化合物 3a、3b、3e 对肿瘤细胞毒活性
Fig. 1 Cytotoxic effect of compounds 3a, 3b, and 3e against cancer cells

化合物	抑制率/%			$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$		
	SGC7901	HT1080	A549	SGC7901	HT1080	A549
3a	3.2	3.7	2.5	> 50	> 50	> 50
3b	23.3	20.4	35.3	> 50	> 50	> 50
3e	7.6	4.4	1.9	> 50	> 50	> 50
阿霉素	99.9	99.9	77.7	0.075	0.005	0.202
吉非替尼	93.1	98.2	56.5	3.217	1.5115	15.869

由表 1 中数据可知,3 β -甲基磺酰氧基-乌苏烷型-2,12-二烯-28-羧酸酯 3a、3b、3e 对 SGC-7901、A549 和 HT-1080 肿瘤细胞均有一定的抑制作用,在质量浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,3b 对 A549 肿瘤细胞的抑制率略低于阳性对照药吉非替尼。3 β -甲基磺酰氧基-乌苏烷型-2,12-二烯-28-羧酸酯 3a、3b、3e 结构改造对 3 种肿瘤细胞的抗肿瘤活性较弱。

2 讨论

以熊果酸为先导化合物,对其 3 位和 28 位进行结构修饰,设计并合成了 7 个乌苏烷型-2,12-二烯-28-羧酸酯类产物。在合成 3 β -羟基-乌苏烷型-12-烯-28-羧酸酯类化合物时,需加入碳酸钾作为附酸剂,后处理时饱和氯化钠水溶液加入量要尽量少,否则乳化现象会很严重,使后处理比较困难。需要用大量水洗掉反应溶剂 DMF。合成乌苏烷型-2,12-二烯-28-羧酸酯类化合物时,先进行 C_{28} 位羧基酯化反应,后进行 C_3 位羟基甲基磺酰化反应,反应时间短,且产率得到大幅度提高。 C_3 位羟基进行甲基磺酰化反应时在 0 $^{\circ}\text{C}$ 冰浴中进行,并使反应环境为碱性。反应结束后用 1 mol/L 盐酸溶液除掉反应中的三乙胺再水洗至中性。2,3 位之间生成双键的反应,应该在高温 (168 $^{\circ}\text{C}$) 碱性条件下脱去甲基磺酰氧基。目标产物在反应过程中采用 TLC 监测反应终点,柱色谱分离后,其结构通过 IR, MS, ^1H -NMR 确证。

由于条件所限,未能将全部产物做活性测试,初步的体外抗肿瘤活性筛选实验结果表明,乌苏烷型-2,12-二烯-28-羧酸乙酯、乌苏烷型-2,12-二烯-28-羧酸乙氧甲酰基甲酯和乌苏烷型-2,12-二烯-28-羧酸异丙酯对 SGC-7901、A549 和 HT-1080 的生长具有一定的抑制作用,本研究结果对熊果酸结构的进一步修饰具有一定的指导意义。

参考文献

- [1] 张 星, 潘启超. 白花蛇舌草提取物—熊果酸的抗肿瘤作用 [J]. 现代药物与临床, 1999, 14(6): 255.
- [2] Ma C M, Cai S Q, Cui J R, *et al.* The cytotoxic activity of ursolic acid derivatives [J]. *Eur J Med Chem*, 2005, 40(6): 582-589.
- [3] 夏 燕, 孟艳秋, 仇兴华, 等. 熊果酸 A 环开环结构修饰工艺路线的设计 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 34-37.
- [4] Terasawa T, Okada T, Nishino H. Anti-tumor-promoter activity of modified glycyrrhetic acid derivatives. Synthesis and structure-activity relationships [J]. *Eur J Med Chem*, 1992, 27(4): 689-692.
- [5] 孟艳秋, 刘 丹, 白忠伟, 等. 熊果酸衍生物的合成及抗肿瘤活性的研究 [J]. 药学报, 2011, 46(5): 556-560.
- [6] 蔡伶俐. 新型熊果酸类似物的合成及抗肿瘤活性研究 [D]. 沈阳: 沈阳化工学院, 2009.
- [7] 夏 燕. 天然产物熊果酸类似物的合成及抗肿瘤活性研究 [D]. 沈阳: 沈阳化工学院, 2010.