

• 实验研究 •

积雪草酸 C₂、C₃、C₂₃、C₂₈ 衍生物的合成及其体外抗肿瘤活性研究

孟艳秋, 赵敏杰, 张 译, 刘立伟, 刘冬莹
沈阳化工大学 制药工程教研室, 辽宁 沈阳 110142

摘要: 目的 设计并合成积雪草酸 C₂、C₃、C₂₃、C₂₈ 衍生物, 并对其体外抗肿瘤活性进行研究。方法 以天然产物积雪草酸为先导化合物, 对 C₂、C₃、C₂₃ 位羟基及 C₂₈ 位羧基进行结构改造, 并采用 SRB 法对目标化合物进行初步的体外抗肿瘤活性研究。结果 设计并合成了目标化合物, 利用 MS 及 ¹H-NMR 确证了结构; 体外实验中, 积雪草酸衍生物的抗肿瘤活性明显高于积雪草酸, 并优于对照药吉非替尼。结论 积雪草酸衍生物具有良好的抗肿瘤活性, 值得进一步研究。

关键词: 积雪草酸; 结构改造; 合成; 抗肿瘤活性

中图分类号: R914; R979.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2015)04-0355-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2015.04.002

Synthesis of asiatic acid C₂, C₃, C₂₃, and C₂₈ derivatives and their antitumor activities *in vitro*

MENG Yan-qiu, ZHAO Min-jie, ZHANG Yi, LIU Li-wei, LIU Dong-ying

College of Pharmaceutical and Biological Engineering, Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang 110142, China

Abstract: **Objective** To design and synthesize asiatic acid C₂, C₃, C₂₃, and C₂₈ derivatives, and to study their antitumor activities *in vitro*. **Methods** Asiatic acid was used as starting material to synthesize the target compounds by structural modification at C₂, C₃, and C₂₃ hydroxyl groups, and C₂₈ carboxyl group. The antitumor activities of the compounds were tested by SRB assay. **Results** The target compounds were synthesized and characterized by MS and ¹H-NMR. The *in vitro* antitumor activity experiments showed that the antitumor activity of asiatic acid derivatives were higher than those of asiatic acid *in vitro*, and were better than control drug gefitinib. **Conclusion** Asiatic acid derivatives have good antitumor activities which could be a valuable candidate for further development.

Key words: asiatic acid; structure modification; synthesis; antitumor activity

积雪草酸又名亚细亚酸, 是积雪草的有效成分之一, 是具有乌苏烷型骨架的五环三萜类化合物^[1-2]。现代研究表明, 积雪草酸具有抗炎护肤、保肝护肺、抗氧化、抗抑郁、降血脂、降血糖、抗肿瘤、神经保护等药理作用^[2-6], 能够减弱化疗药物抗癌的不良反应等。在五环三萜类化合物结构修饰的过程中, 对羧基的修饰主要为羧基成酯和成胺的反应^[7-11]。由此可见, 积雪草酸及其衍生物的结构修饰及生物活性的研究已成为该领域的研究热点。参考五环三萜化合物结构改造的经验^[12-15], 本文以

积雪草酸为先导化合物, 对其结构进行修饰改造, 合成了一系列新的积雪草酸衍生物, 利用 MS、元素分析和 ¹H-NMR 确认了结构, 并对部分化合物进行了体外抗肿瘤活性的研究。

1 仪器与试剂

Büchi B-540 熔点测定仪; Bruker ARX-300 型核磁共振波谱仪; LCQ 型质谱仪 (Finnigan 公司); 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱 (日本 Sanoy 公司); Model 550 酶标仪 (Bio-Rad 公司); 积雪草酸 (质量分数为 95%, 购于广西昌洲天然产物有限公司);

收稿日期: 2015-01-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21372156); 辽宁省教育厅高等学校优秀人才支持计划资助项目 (LR2013017); 沈阳市科技计划资助项目 (F13-316-1-47)

作者简介: 孟艳秋, 女, 教授, 博士, 主要从事药物化学研究。Tel: (024)89383903 E-mail: mengyanqiu@hotmail.com

薄层色谱硅胶 GF254, 购于深圳市宇恒硅橡胶制品有限公司; 显色剂为 10% 硫酸乙醇溶液; RPMI-1640 培养液 (Gibco 公司); 溴化四氮唑盐 (MTT)、蛋白酶 K 和小牛血清蛋白 (BSA), 购于上海图赫实业有限公司; 磺基罗丹明 B (SRB) 购自 Sigma 公司; 紫杉醇 (批号 100382-200301, 上海静荣生物科技有限公司); 吉非替尼 (批号 J20070047, 阿斯利康制药有限公司); 人乳腺癌细胞株 MCF-7、肺癌细胞株 A549 均购自美国模式培养物保藏所 (ATCC)。所有试剂均为分析纯或化学纯。

2 方法与结果

2.1 目标化合物 AA-I₁~I₆ 的合成

2.1.1 3,23-O-异亚丙基-乌苏烷型-12-烯-28-羧酸 (AA-1) 的制备 将积雪草酸 (0.20 g, 0.40 mmol) 和对甲基苯磺酸 (0.03 g, 0.20 mmol) 溶解在 DMF 中, 然后滴加 2,2-二甲氧基丙烷 (1.00 mL, 4.00 mmol), 在室温下搅拌, 石油醚-醋酸乙酯 (3:1) 为展开剂, TLC 监测反应完毕, 用 5% 氢氧化钠调节 pH 值至 7~8, 混合物用醋酸乙酯提取, 有机层用蒸馏水及饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥, 抽滤, 减压蒸馏得白色固体 AA-1, mp 156.4~158.2 °C。

2.1.2 2-乙酰氧基-3,23-O-异亚丙基-乌苏烷型-12-烯-28-羧酸 (AA-2) 的制备 将化合物 AA-1 用四氢呋喃溶解, 加入催化剂量的 4-二甲氨基吡啶, 滴加乙酸酐 10.00 mmol, 常温反应, 石油醚-醋酸乙酯 (3:1) 为展开剂, TLC 监测反应完毕, 蒸干溶剂, 充分水洗, 滤过, 滤饼洗至中性。自然晾干, 得产物 AA-2 (96.00 mg), 收率为 42.10%。

2.1.3 2-乙酰氧基-3,23-O-异亚丙基-乌苏烷型-12-烯-28-酰氯 (AA-4) 的制备 将化合物 AA-2 (50.00 mg, 0.09 mmol) 溶解在 4 mL 二氯甲烷中, 加入草酰氯 (0.35 mmol), 常温反应, 石油醚-醋酸乙酯 (3:1) 为展开剂, TLC 监测反应完毕, 蒸除反应溶剂和未反应的草酰氯, 残余物加入 2 mL 环己烷, 减压蒸除环己烷, 反复操作 2 次, 得产物 AA-4 (39.00 mg), 收率为 78.00%。

2.1.4 2-乙酰氧基-3,23-O-异亚丙基-乌苏烷型-12-烯-28-对硝基苯酯 (AA-I₁) 的制备 将化合物 AA-2 (50.00 mg, 0.09 mmol) 溶解在 4 mL 二氯甲烷中, 加入草酰氯 (0.35 mmol), 室温搅拌 20 h, 生成 2-乙酰氧基-3,23-O-异亚丙基-乌苏烷型-12-烯-28-酰氯, 蒸除反应溶剂和未反应的草酰氯, 残余物加入

2 mL 环己烷, 减压蒸除环己烷, 反复操作 2 次。酰氯中加入 2 mL 二氯甲烷使之完全溶解后, 加三乙胺调 pH 值为 9~10, 搅拌 5 min 后, 加入对硝基苯酚 (48.69 mg, 0.35 mmol), 室温下反应, TLC 监测反应终点。反应结束后, 减压蒸除二氯甲烷, 向反应液中加入 2 mL 水, 用盐酸调 pH 值至 3~4, 析出白色固体, 迅速减压抽滤, 水洗滤饼至中性。室温干燥得白色固体 AA-I₁ 粗品。粗品用硅胶柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯 (1:1) 洗脱得白色粉末状固体 24.51 mg, 产率为 49.10%。mp 130.0~131.9 °C。元素分析 (%): C (70.25), H (8.25), N (2.54), O (18.91)。ESI-MS m/z : 678.42 $[M+H]^+$ 。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.27~7.62 (m, 4H, Ph), 5.15 (t, $J=8.2$ Hz, 1H, H-12), 3.28 (d, $J=7.5$ Hz, 2H, H-23a), 2.65 (d, $J=7.0$ Hz, 1H, H-23b), 2.15 (s, 3H, CH₃CO), 1.28 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1.20 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1.05 (s, 3H, CH₃), 0.95 (d, $J=8.0$ Hz, 3H, CH₃), 0.81 (s, 6H, CH₃×2), 0.74 (d, $J=8.0$ Hz, 3H, CH₃), 0.58 (s, 3H, CH₃)。

2.1.5 2-乙酰氧基-3,23-O-异亚丙基-乌苏烷型-12-烯-28-对叔丁基苯酯 (AA-I₂) 的制备 按照化合物 AA-I₁ 的合成方法, 由化合物 AA-2 和 4-叔丁基苯酚反应。粗品用硅胶柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯 (1:1) 洗脱得白色粉末状固体 AA-I₂, 收率为 32.81%。mp 165.0~166.4 °C。元素分析 (%): C (76.32), H (9.44), O (13.27)。ESI-MS m/z : 689.29 $[M+H]^+$ 。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.51~7.08 (m, 4H, Ph), 5.13 (t, $J=8.0$ Hz, 1H, H-12), 3.26 (d, $J=7.5$ Hz, 2H, H-23a), 2.62 (d, $J=7.0$ Hz, 1H, H-23b), 2.10 (s, 3H, CH₃CO), 1.35 (s, 9H, PhC(CH₃)₃×3), 1.25 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1.17 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1.08 (s, 3H, CH₃), 0.93 (d, $J=8.0$ Hz, 3H, CH₃), 0.85 (s, 6H, CH₃×2), 0.73 (d, $J=7.5$ Hz, 3H, CH₃), 0.60 (s, 3H, CH₃)。

2.1.6 N-苯基-2-乙酰氧基-3,23-O-异亚丙基-乌苏烷型-12-烯-28-酰胺 (AA-I₃) 的制备 按照化合物 AA-I₁ 的合成方法, 由化合物 AA-2 和苯胺反应。粗品用硅胶柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯 (5:1) 洗脱得淡黄色粉末状固体 AA-I₃, 收率为 38.66%。mp 95.7~96.8 °C。元素分析 (%): C (74.78), H (9.34), N (4.57), O (12.62)。ESI-MS m/z : 647.87 $[M+H]^+$ 。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 9.84 (brs,

1H, CONH), 9.53 (brs, 1H, CONHNH), 7.25~6.81 (m, 5H, Ph), 5.19 (t, $J=8.2$ Hz, 1H, H-12), 3.32 (d, $J=7.5$ Hz, 2H, H-23a), 2.68 (d, $J=7.0$ Hz, 1H, H-23b), 2.20 (s, 3H, CH₃CO), 1.23 (s s, 3H, C(CH₃)₂), 1.15 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1.06 (s, 3H, CH₃), 0.96 (d, $J=8.3$ Hz, 3H, CH₃), 0.87 (s, 6H, CH₃×2), 0.71 (d, $J=8.5$ Hz, 3H, CH₃), 0.57 (s, 3H, CH₃)。

2.1.7 *N*-(3-二苯甲酮)-2-乙酰氧基-3,23-*O*-异亚丙基-乌苏烷型-12-烯-28-酰胺 (AA-I₄) 的制备 按照化合物 AA-I₁ 的合成方法, 由化合物 AA-2 和 3-氨基二苯甲酮反应。粗品用硅胶柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯 (5:1) 洗脱得淡黄色粉末状固体 AA-I₄, 收率为 39.61%。mp 198~200 °C。元素分析 (%): C (73.22), H (9.91), N (4.59), O (12.83)。ESI-MS m/z : 637.54 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.73 (s, 1H, NH), 5.99 (s, 1H, H-12), 5.07~5.04 (m, 2H, H-2/3), 4.59~4.53 (m, 1H, NHCH), 3.86 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, H-23a), 3.60 (d, $J=7.5$ Hz, 1H, H-23b), 2.43 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 2.10 (s, 3H, CH₃CO), 2.02 (s, 1H, OCH), 1.72 (d, $J=6.3$ Hz, 3H, CH(CH₃)₂), 1.36 (d, $J=6.3$ Hz, 3H, CH(CH₃)₂)。

2.1.8 *N*-[2-乙酰氧基-3,23-*O*-异亚丙基-乌苏烷型-12-烯-28-羰基]哌啶 (AA-I₅) 的制备 按照化合物 AA-I₁ 的合成方法, 由化合物 AA-2 和哌啶反应。粗品用硅胶柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯 (5:1) 洗脱得淡黄色粉末状固体 AA-I₅, 收率为 30.05%。mp 127~128.3 °C。元素分析 (%): C (75.30), H

(8.29), N (3.45), O (12.77)。ESI-MS m/z : 752.32 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 9.87 (brs, 1H, CONH), 9.55 (brs, 1H, CONHNH), 7.73~7.15 (m, 9H, Ph×2), 3.37 (d, $J=7.5$ Hz, 2H, H-23a), 2.75 (d, $J=7.0$ Hz, 1H, H-23b), 2.26 (s, 3H, CH₃CO), 1.28 (s s, 3H, C(CH₃)₂), 1.19 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1.10 (s, 3H, CH₃), 0.95 (d, $J=8.3$ Hz, 3H, CH₃), 0.83 (s, 6H, CH₃×2), 0.75 (d, $J=8.5$ Hz, 3H, CH₃), 0.56 (s, 3H, CH₃)。

2.1.9 *N*-[3-(2-甲基吡啶)]-2-乙酰氧基-3,23-*O*-异亚丙基-乌苏烷型-12-烯-28-酰胺 (AA-I₆) 的制备 按照化合物 AA-I₁ 的合成方法, 由化合物 AA-2 和 2-氨基-3-甲基吡啶反应。粗品用硅胶柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯 (5:1) 洗脱得淡黄色粉末状固体 AA-I₆, 收率为 34.48%。mp 134.6~135.2 °C。元素分析 (%): C (72.43), H (8.77), N (6.48), O (12.29)。ESI-MS m/z : 660.13 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.62~7.43 (m, 1H, Ar-H), 5.80 (br s, 1H, NH), 5.42 (s, 1H, H-12), 3.78 (d, $J=10.5$ Hz, 1H, H-2/3), 3.68 (m, 1H, H-2/3), 3.43 (d, $J=6.5$ Hz, 2H, H-23a), 3.30 (s, 1H, CH₃), 2.41 (d, $J=7.5$ Hz, 1H, H-23b), 2.25 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 2.06 (s, 3H, CH₃CO), 1.87 (s, 1H, OCH), 1.53 (d, $J=8.5$ Hz, 3H, CH(CH₃)₂), 1.12 (d, $J=8.5$ Hz, 3H, CH(CH₃)₂)。

目标化合物 AA-I₁~I₆ 的合成路线见图 1。

2.2 目标化合物 AA-II₁~II₄ 的合成

2.2.1 2-羰基-3,23-*O*-异亚丙基-乌苏烷型-12-烯-28-羧酸 (AA-3) 的制备 将负载重铬酸吡啶噻盐 (PDC,

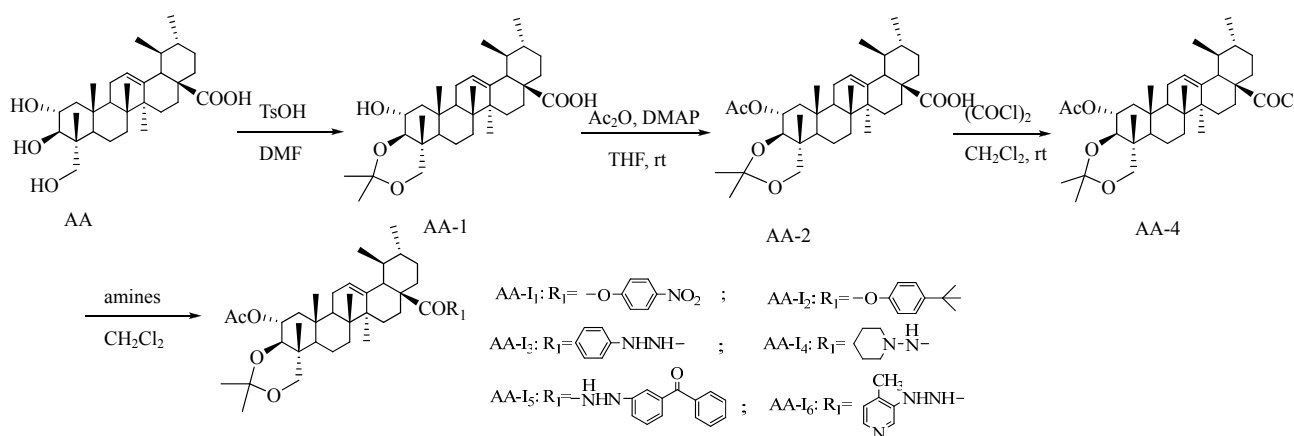


图 1 目标化合物 AA-I₁~I₆ 的合成路线

Fig. 1 Synthetic route of target compounds AA-I₁~I₆

160.00 mg, 0.15 mmol) 的硅胶加入到二氯甲烷溶剂中, 加入 0.20 mL 乙酸酐搅拌 30 min, 而后再将此溶液滴加到化合物 AA-1 (83.50 mg, 0.16 mmol) 的二氯甲烷溶液中, 回流反应 2 h。石油醚-醋酸乙酯 (4:1) 为展开剂, TLC 跟踪检测确定反应终点。反应完成后, 滤过, 去除硅胶, 减压蒸馏除去二氯甲烷, 剩余固体溶于 30.00 mL 醋酸乙酯, 搅拌 30 min, 用醋酸乙酯和水萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 放置过夜, 抽滤除去干燥剂, 旋蒸得到化合物 AA-3 的粗品 60.50 mg, 收率为 72.41%。

2.2.2 2-羰基-3,23-O-异亚丙基-乌苏烷型-12-烯-28-乙酯 (AA-II₁) 的制备 将化合物 AA-3 (50.00 mg, 0.10 mmol) 溶解在 4 mL 4-二甲氨基吡啶中, 加入催化剂量的碳酸钾, 滴入溴乙烷 (0.03 mL, 0.38 mmol), 室温搅拌, TLC 跟踪检测确定反应终点。混合物用醋酸乙酯提取, 有机层用蒸馏水及饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥, 抽滤, 减压蒸馏得白色固体, 粗品用硅胶柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯 (9:1) 洗脱得白色粉末状固体 AA-II₁ (24.50 mg), 收率为 46.52%。mp 115.7~116.6 °C。元素分析 (%): C (75.78), H (9.76), O (14.88)。ESI-MS m/z : 541.18 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 5.63 (s, 1H, H-12), 3.86 (d, $J=8.5$ Hz, 1H, H-2/3), 3.62 (m, 1H, H-2/3), 3.51 (d, $J=7.5$ Hz, 2H, H-23a), 2.76 (d, $J=7.5$ Hz, 1H, H-23b), 2.21 (m, 2H, CH₂), 1.67 (s, 2H, OCH₂), 1.43 (d, $J=8.5$ Hz, 3H, C(CH₃)₂), 1.02 (d, $J=8.5$ Hz, 3H, C(CH₃)₂), 0.63 (t, $J=6.5$ Hz, 3H, CH₃), 1.06 (s, 3H, CH₃), 0.93 (d, $J=8.0$ Hz, 3H, CH₃), 0.85 (s, 6H, CH₃×2), 0.74 (d, $J=8.0$ Hz, 3H, CH₃), 0.60 (s, 3H, CH₃)。

2.2.3 2-羰基-3,23-O-异亚丙基-乌苏烷型-12-烯-28-乙氧甲酰基甲酯 (AA-II₂) 的制备 按照化合物 AA-II₁ 的合成方法, 由化合物 AA-3 和氯乙酸乙酯反应。粗品用硅胶柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯 (7:1) 洗脱得白色粉末状固体 AA-II₂, 收率为 37.85%。mp 133.2~134.1 °C。元素分析 (%): C (72.45), H (9.23), O (18.72)。ESI-MS m/z : 599.24 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 5.71 (s, 1H, H-12), 3.72 (d, $J=7.5$ Hz, 1H, H-2/3), 3.52 (m, 1H, H-2/3), 3.38 (d, $J=7.5$ Hz, 2H, H-23a), 2.78 (d, $J=7.5$ Hz, 1H, H-23b), 2.28 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 2.18 (m, 2H, CH₂COO), 2.06 (m,

2H, COOCH₂), 1.58 (s, 2H, OCH₂), 1.43 (d, $J=8.5$ Hz, 3H, CH(CH₃)₂), 1.02 (d, $J=8.5$ Hz, 3H, CH(CH₃)₂), 0.76 (t, $J=6.5$ Hz, 3H, CH₃)。

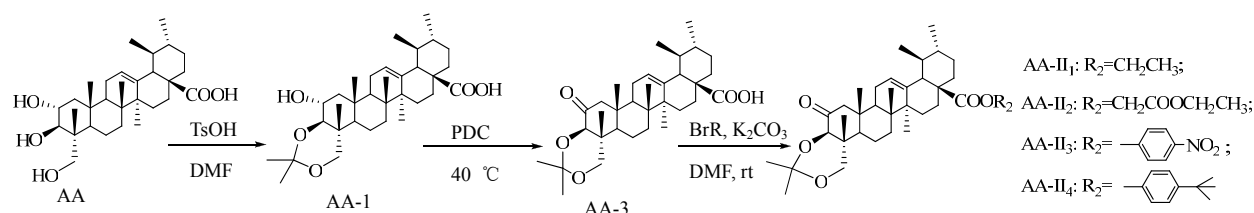
2.2.4 2-羰基-3,23-O-异亚丙基-乌苏烷型-12-烯-28-对甲基苯酯 (AA-II₃) 的制备 按照化合物 AA-II₁ 的合成方法, 由化合物 AA-3 和对硝基苯酚反应。粗品用硅胶柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯 (7:1) 洗脱得白色粉末状固体 AA-II₃ (19.20 mg), 收率为 37.85%。mp 134.2~135.5 °C。元素分析 (%): C (72.19), H (8.34), N (2.26), O (17.89)。ESI-MS m/z : 633.27 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.66~7.42 (m, 4H, Ph), 5.42 (s, 1H, H-12), 3.76 (d, $J=6.5$ Hz, 1H, H-2/3), 3.52 (m, 1H, H-2/3), 3.41 (d, $J=7.5$ Hz, 2H, H-23a), 2.63 (d, $J=7.5$ Hz, 1H, H-23b), 2.32 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1.65 (s, 2H, OCH₂), 1.41 (d, $J=8.5$ Hz, 3H, CH(CH₃)₂), 0.93 (d, $J=8.5$ Hz, 3H, CH(CH₃)₂)。

2.2.5 2-羰基-3,23-O-异亚丙基-乌苏烷型-12-烯-28-对叔丁基苯酯 (AA-II₄) 的制备 按照化合物 AA-II₁ 的合成方法, 由化合物 AA-3 和 4-叔丁基苯酚反应。粗品用硅胶柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯 (7:1) 洗脱得白色粉末状固体 AA-II₄ (19.30 mg), 收率为 37.85%。mp 133.2~134.1 °C。元素分析 (%): C (78.33), H (9.56), O (12.56)。ESI-MS m/z : 645.23 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.83~7.21 (m, 4H, Ph), 5.53 (s, 1H, H-12), 4.21 (d, $J=6.5$ Hz, 1H, H-2/3), 3.89 (m, 1H, H-2/3), 3.35 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, H-23a), 2.71 (d, $J=7.5$ Hz, 1H, H-23b), 2.47 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1.54 (s, 2H, OCH₂), 1.46 (d, $J=8.5$ Hz, 3H, CH(CH₃)₂), 1.17 (d, $J=8.5$ Hz, 3H, CH(CH₃)₂), 0.82 (s, 1H, CH₃), 0.78 (s, 1H, CH₃), 0.65 (s, 1H, CH₃)。

目标化合物 AA-II₁~II₄ 的合成路线见图 2。

2.3 目标化合物 AA-III₁~III₄ 的合成

2.3.1 2-羰基-3,23-二乙酰氧基-乌苏烷型-12-烯-28-羧酸 (AA-6) 的制备 将化合物 AA-3 (100.00 mg, 0.19 mmol) 溶解在二氯甲烷中, 加入稀盐酸数滴, 搅拌 2 h, TLC 跟踪检测确定反应终点。减压蒸除溶剂, 用醋酸乙酯溶解产物, 用水和氯化钠溶液洗有机相, 有机相用无水硫酸钠干燥, 放置过夜, 抽滤除去干燥剂, 旋蒸得到化合物 AA-6 粗品,

图2 目标化合物 AA-II₁~II₄ 的合成路线Fig. 2 Synthetic route of target compounds AA-II₁~II₄

将粗品 AA-6 用四氢呋喃溶解, 加入催化剂量的 4-二甲氨基吡啶, 滴加乙酸酐 10.00 mmol, 常温反应, 石油醚-醋酸乙酯 (1:1) 为展开剂, TLC 检测反应的终点。反应结束后, 蒸干溶剂, 充分水洗, 滤过, 滤饼洗至中性, 自然晾干, 得产物 AA-6 (67.00 mg), 收率为 61.83%。

2.3.2 2-羰基-3,23-二乙酰氧基-乌苏烷型-12-烯-28-乙酯 (AA-III₁) 的制备 将化合物 AA-6 (50.00 mg, 0.09 mmol) 溶解在 4 mL 4-二甲氨基吡啶中, 加入催化剂量的碳酸钾, 滴入溴乙烷 (0.03 mL, 0.35 mmol), 室温搅拌, 石油醚-醋酸乙酯 (1:1) 为展开剂, TLC 跟踪检测确定反应终点。混合物用醋酸乙酯提取, 有机层用蒸馏水及饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥, 抽滤, 减压蒸馏得白色固体, 粗品用硅胶柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯 (5:1) 洗脱剂得白色粉末状固体 AA-III₁ (19.30 mg), 收率为 39.71%。mp 153.6~154.2 °C。元素分析 (%): C (71.78), H (8.94), O (19.36)。ESI-MS m/z : 585.42 $[M+H]^+$ 。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 5.71 (s, 1H, H-12), 3.83 (d, $J=8.5$ Hz, 1H, H-2/3), 3.69 (m, 1H, H-2/3), 3.53 (d, $J=7.0$ Hz, 2H, H-23a), 2.78 (d, $J=6.3$ Hz, 1H, H-23b), 2.21 (s, 2H, CH₂), 2.17 (m, 2H, COOCH₂), 2.09 (s, 3H, CH₃CO), 2.01 (s, 3H, CH₃CO), 0.65 (t, $J=6.5$ Hz, 3H, CH₃)。

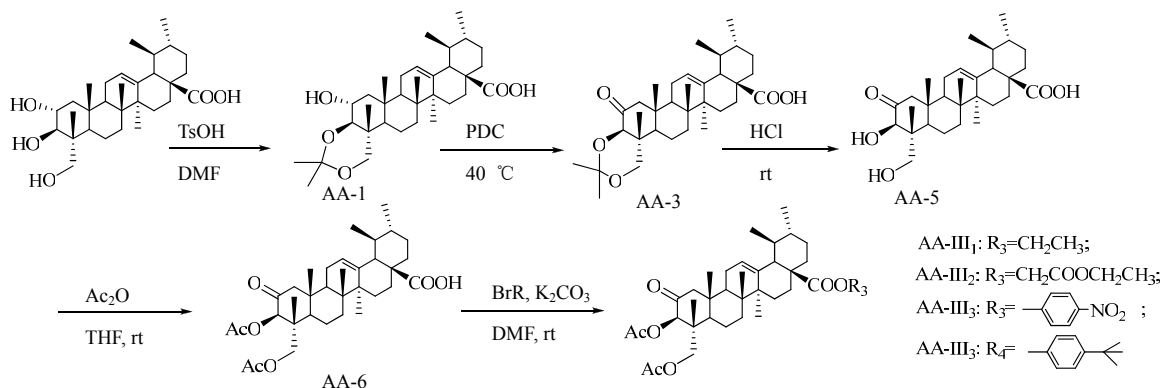
2.3.3 2-羰基-3,23-二乙酰氧基-乌苏烷型-12-烯-28-乙氧甲酰基甲酯 (AA-III₂) 的制备 按照化合物 AA-III₁ 的合成方法, 由化合物 AA-6 和氯乙酸乙酯反应。粗品用硅胶柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯 (5:1) 洗脱得白色粉末状固体 AA-III₂ (19.70 mg), 收率为 37.38%。mp 182.1~183.6 °C。元素分析 (%): C (69.23), H (8.56), O (22.58)。ESI-MS m/z : 643.54 $[M+H]^+$ 。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 5.73 (s, 1H, H-12), 3.67 (d, $J=8.5$ Hz, 1H,

H-2/3), 3.52 (m, 1H, H-2/3), 3.36 (d, $J=7.0$ Hz, 2H, H-23a), 2.84 (d, $J=6.3$ Hz, 1H, H-23b), 2.57 (s, 2H, CH₂), 2.38 (s, 2H, CH₂COO), 2.15 (m, 2H, COOCH₂), 2.08 (s, 3H, CH₃CO), 2.00 (s, 3H, CH₃CO), 0.53 (t, $J=6.5$ Hz, 3H, CH₃)。

2.3.4 2-羰基-3,23-二乙酰氧基-乌苏烷型-12-烯-28-对甲基苯酯 (AA-III₃) 的制备 按照化合物 AA-III₁ 的合成方法, 由化合物 AA-6 和对硝基苯酚反应。粗品用硅胶柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯 (4:1) 洗脱得白色粉末状固体 AA-III₃ (19.70 mg), 产率为 30.38%。mp 184.1~185.6 °C。元素分析 (%): C (69.08), H (7.48), N (2.27), O (21.35)。ESI-MS m/z : 678.54 $[M+H]^+$ 。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.68~7.35 (m, 4H, Ph), 5.69 (s, 1H, H-12), 3.86 (d, $J=7.5$ Hz, 1H, H-2/3), 3.74 (m, 1H, H-2/3), 3.51 (d, $J=7.0$ Hz, 2H, H-23a), 2.50 (d, $J=6.3$ Hz, 1H, H-23b), 2.29 (s, 3H, CH₃CO), 2.15 (m, 2H, COOCH₂), 2.07 (s, 3H, CH₃CO)。

2.3.5 2-羰基-3,23-二乙酰氧基-乌苏烷型-12-烯-28-对叔丁基苯酯 (AA-III₄) 的制备 按照化合物 AA-III₁ 的合成方法, 由化合物 AA-6 和 4-叔丁基苯酚反应。粗品用硅胶柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯 (5:1) 洗脱得白色粉末状固体 AA-III₄ (20.70 mg), 产率为 41.38%。mp 182.8~184.1 °C。元素分析 (%): C (74.87), H (8.62), O (16.39)。ESI-MS m/z : 689.15 $[M+H]^+$ 。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.54~7.29 (m, 4H, Ph), 5.58 (s, 1H, H-12), 3.87 (d, $J=8.5$ Hz, 1H, H-2/3), 3.70 (m, 1H, H-2/3), 3.51 (d, $J=7.0$ Hz, 2H, H-23a), 2.78 (d, $J=6.3$ Hz, 1H, H-23b), 2.32 (m, 2H, COOCH₂), 2.19 (s, 3H, CH₃CO), 2.07 (s, 3H, CH₃CO), 1.56 (s, 3H, CH₃), 1.50 (s, 3H, CH₃), 1.47 (s, 3H, CH₃)。

目标化合物 AA-III₁~III₄ 的合成路线见图 3。

图3 目标化合物 AA-III₁~III₄ 的合成路线Fig. 3 Synthetic route of target compounds AA-III₁~III₄

2.4 体外活性试验

以紫杉醇、吉非替尼为阳性对照物,采用SRB法对合成的积雪草酸类似物进行初步的体外活性测试。将人肺癌细胞 A549、人乳腺癌细胞 MCF-7 接种于 96 孔板中,每孔 100 μ L,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中孵育 24 h。加入待测化合物,浓度分别为 10、5、2.5、1、0.5 μ mol/L;对照组加等体积含 1% 二甲基亚砜的 PMI-1640 培养液;空白组只有培养液不加细胞。每组设 3 个复孔。培养 48 h 后,SRB 法检测细胞的存活率。每孔加入 100 μ L 10% 预冷的三氯乙酸,96 孔板置于 -4 $^{\circ}$ C 1 h,冷水清洗 5 次,室温晾干。37 $^{\circ}$ C 染色 30 min,1% 醋酸洗除未结合的 SRB。室温晾干后使用 Tris-base 碱液 (10 mmol/L, pH 10.5) 溶解与细胞蛋白结合的染料,采用酶标仪 570 nm 处测定吸光度 (A) 值,计算抑制率。实验重复 3 次,取平均值。

$$\text{抑制率} = 1 - (A_{\text{加药组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})$$

结果表明所测试的目标化合物对 A549 和 MCF-7 细胞生长均具有一定的抑制作用,其中化合物 AA-I₁、AA-I₂ 对 A549 和 MCF-7 细胞表现出很好的抑制活性,AA-I₁ 对 A549 和 MCF-7 细胞的抑制率分别为 40.33%、57.67%。AA-I₂ 对 A549 和 MCF-7 细胞的抑制率分别为 43.44%、53.82%,明显高于积雪草酸,对 A549 细胞的抑制活性高于临床常用药物吉非替尼。化合物 AA-II₃ 对 A549 和 MCF-7 细胞的抑制率为 39.61%、58.93%,明显高于积雪草酸,对 A549 细胞的抑制率高于吉非替尼。由此可见,将积雪草酸 C₂ 位羟基成酯, C₃、C₂₃ 位羟基成醚,同时 C₂₈ 位羧基成酯可以提高其抗肿瘤活性。对积雪草酸 C₂、C₃、C₂₃ 位羟基与 C₂₈ 位羧基进行

合理的结构修饰对其抗肿瘤活性具有较大影响。结果见表 1。

表1 化合物 AA-I₁~₂、AA-II₃~₄、AA-III₃~₄ 对 MCF-7、A549 的细胞毒性

Fig. 1 Cytotoxic effects of compounds AA-I₁~₂, AA-II₃~₄ and AA-III₃~₄ against MCF-7 and A549 cells

化合物	抑制率/%		IC ₅₀ /(μ mol·L ⁻¹)	
	A549	MCF-7	A549	MCF-7
积雪草酸	18.71	18.86	43.51	>50
AA-I ₁	40.33	57.67	30.14	>30.26
AA-I ₂	43.44	53.82	29.38	40.23
AA-II ₃	39.61	58.93	32.05	29.85
AA-II ₄	23.66	46.83	41.47	48.03
AA-III ₃	23.51	40.22	42.11	>50
AA-III ₄	29.71	42.67	29.60	>50
紫杉醇	79.88	85.98	3.69	0.026
吉非替尼	30.27	78.36	28.65	38.75

3 讨论

积雪草酸对人黑色素瘤细胞^[16]、恶性胶质瘤细胞^[17]等多种恶性肿瘤细胞均有不同程度的抑制作用。温小安等^[18]通过将山楂酸的 C₂₈ 位羧基与氯乙酸乙酯反应生成山楂酸乙氧甲酰基甲酯,对兔肌肉糖原磷酸化酶的抑制率是先导化合物的 2 倍,设计合成了一系列积雪草酸乙氧甲酰基甲酯衍生物,具有很好的抗肿瘤活性。Zhao 等^[11]对积雪草酸的 C₂、C₃、C₂₃ 位羟基进行酰化保护后对烯丙位进行氧化处理,所得衍生物对由 CCl₄ 诱发的肝毒性产生的保肝活性为 25.6%,明显强于积雪草酸 (保肝活性为 1%)。因此本课题组在已知的积雪草酸类似物构效

关系的基础上,对积雪草酸 C₂、C₃、C₂₃ 及 C₂₈ 位进行结构改造,设计并合成了 14 个积雪草酸衍生物,目标化合物的结构经 MS、¹H-NMR 及元素分析确证;并通过 SRB 法对其进行了体外抗肿瘤活性研究。本实验以积雪草酸为起始原料,保留五环三萜骨架,将积雪草酸 C₂ 位羟基成酯, C₃、C₂₃ 位羟基成醚,同时将 C₂₈ 位羧基成酯(或酰胺),得到 6 个 I 系列 2-乙酰氧基-3,23-O-异亚丙基-乌苏烷型-12-烯-28-羧酸酯(或酰胺)类化合物。C₂ 位羟基氧化成羰基, C₃、C₂₃ 位羟基成醚,同时将 C₂₈ 位羧基成酯,得到 4 个 II 系列 2-羰基-3,23-O-异亚丙基-乌苏烷型-12-烯-28-羧酸酯类化合物。C₂ 位羟基氧化成羰基, C₃、C₂₃ 位羟基成乙酰化成酯,同时将 C₂₈ 位羧基成酯,得到 4 个 III 系列 2-羰基-3,23-二乙酰氧基-乌苏烷型-12-烯-28-羧酸酯类化合物。活性数据显示表明,对积雪草酸结构进行合理的修饰,将 C₂ 位羟基成酯, C₃、C₂₃ 位成醚或酯, C₂₈ 位羧基成酯(或酰胺),可能提高其抗肿瘤活性。这对进一步开展积雪草酸的结构改造和抗肿瘤活性研究具有一定的指导意义。

参考文献

- [1] 冯旭,郭飞飞,赵龙,等.积雪草药理作用及其结构修饰的研究进展[J].中草药,2014,45(7):1037-1042.
- [2] 陈军,华维一,孙宏斌.积雪草酸及其衍生物的生物活性研究概况[J].中草药,2006,37(3):458-460.
- [3] 吕婷婷,刘芳,陈燕,等.积雪草酸对多发性骨髓瘤细胞增殖活性的影响及其机制探讨[J].中草药,2010,41(9):1484-1488.
- [4] 赵龙铨,田明珠,金礼吉,等.积雪草酸衍生物的合成与表征及其体外抗肿瘤活性的研究[J].有机化学,2011,31(5):646-652.
- [5] 刘清霞,叶开和,王婧茹,等.积雪草酸改善小鼠脂肪细胞胰岛素抵抗的机制研究[J].中国病理生理杂志,2013,29(7):1313-1317.
- [6] 袁菊萍,陆建明,陆媛.积雪草酸对 PC1₂ 细胞氧糖剥夺的保护作用/复氧损伤的保护作用[J].药学学报,2013,48(11):1738-1742.
- [7] 申利红,赖宜生,张奕华,等.硝酸酯类甘草次酸衍生物的合成及抗肿瘤活性[J].中国药科大学学报,2008,39(2):103-107.
- [8] 孟艳秋.乳香酸类化合物的结构改造及其抗癌活性的研究[D].沈阳:沈阳药科大学,2004:52-67.
- [9] 孟艳秋,刘丹,李丹丹,等.一种具有抗肿瘤活性的熊果酸化学修饰物胺[P].中国:101161670A,2008-04-16.
- [10] 孟艳秋,杨哲,张萌,等.甘草次酸 C₃, C₁₁, C₃₀ 衍生物的合成及其体外抗肿瘤活性研究[J].现代药物与临床,2014,29(1):6-10.
- [11] Zhao L X, Park H G, Jew S S, *et al.* Modification of C₁₁, C₂₈, C₂, 3, 23 or C₂, 23, 28 functional groups on asiatic acid and evaluation of hepatoprotective effects[J]. *Bull Kor Chem Soc*, 2007, 28(6): 970-976.
- [12] 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].药学学报,2011,46(11):848-854.
- [13] 刘丹,孟艳秋,赵娟,等.齐墩果酸与熊果酸结构修饰物的药理活性和构效关系研究进展[J].化学通报,2008,24:42-46.
- [14] 孟艳秋,丁一,张萌,等.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[J].现代药物与临床,2014,29(2):116-119.
- [15] 薛菁,王楠,孟艳秋.积雪草酸衍生物的合成及抗肿瘤活性的研究[J].沈阳化工大学学报,2014,28(1):24-31.
- [16] Park B C, Bosire K O, Lee E S, *et al.* Asiatic acid induces apoptosis in SK-MEL-2 human melanoma cells[J]. *Cancer Lett*, 2005, 218(1): 81-90.
- [17] Cho C W, Choi D S, Cardone M H, *et al.* Glioblastoma cell death induced by asiatic acid[J]. *Cell Biol Toxicol*, 2006, 22(6): 393-408.
- [18] 温小安,张璞,柳军,等.山楂酸衍生物的合成与生物活性研究[C].2005年全国药物化学会议论文集.郑州:中国药学会,2006:722-726.