

甘草次酸 C₃、C₃₀ 衍生物的合成及其体外抗肿瘤活性研究

孟艳秋, 刘立伟, 刘冬莹, 王向磊, 傅谟宏
沈阳化工大学 制药工程教研室, 辽宁 沈阳 110142

摘要: 目的 设计并合成甘草次酸 C₃、C₃₀ 衍生物, 并对其体外抗肿瘤活性进行研究。方法 以甘草次酸为先导化合物, 对其 C₃ 位羟基、C₃₀ 位羧基进行结构修饰, 并采用 SRB 法对目标化合物进行体外抗肿瘤活性研究。结果 设计合成了 12 个新型甘草次酸衍生物, 并利用 MS、¹H-NMR 及元素分析确证了结构; 体外实验中, 目标化合物对 MCF-7 和 A549 肿瘤细胞的抑制活性均明显强于甘草次酸, 其中化合物 GA-I₁、GA-I₂ 和 GA-II₁ 对 MCF-7 和 A549 两种细胞表现出很好的抑制活性, 明显高于对照药吉非替尼。结论 甘草次酸衍生物具有良好的抗肿瘤活性, 值得进一步研究。

关键词: 甘草次酸; 五环三萜类; 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)06-0610-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2015.06.002

Synthesis of glycyrrhetic acid C₃ and C₃₀ derivatives and their antitumor activities *in vitro*

MENG Yan-qiu, LIU Li-wei, LIU Dong-ying, WANG Xiang-lei, FU Mo-hong

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

Abstract: Objective To design and synthesize glycyrrhetic acid C₃ and C₃₀ derivatives and their antitumor activities *in vitro*. **Methods** Glycyrrhetic acid was used as starting material to synthesize the target compounds by structural modification at C₃ hydroxyl group, and C₃₀ carboxyl group. The antitumor activities of the compounds were tested by SRB assay. **Results** Twelve novel glycyrrhetic acid derivatives were synthesized and characterized by MS, ¹H-NMR, and elemental analysis. The *in vitro* antitumor activity experiments showed that cytotoxic effects of target compounds against MCF-7 and A549 cells were higher than those of glycyrrhetic acid *in vitro*. In which compounds GA-I₁, GA-I₂, and GA-II₁ had better cytotoxic effects against MCF-7 and A549 cells, and it was better than control drug gefitinib. **Conclusion** The target compounds glycyrrhetic acid derivatives have good antitumor activities which could be a valuable candidate for further development.

Key words: glycyrrhetic acid; pentacyclic triterpenoids; structure modification; synthesis; antitumor activity

甘草次酸是从豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的根及根茎中提取出来的具有齐墩果烷型骨架的五环三萜类天然产物^[1]。自 1935 年 Ruzicka 等^[2]首次报道甘草次酸的化学结构以来, 国内外学者对甘草次酸及其衍生物进行了大量的研究^[3-5], 主要是将甘草次酸 C₃ 位羟基和 C₃₀ 位羧基同相应的酸酐、醇或卤代烷反应生成一系列甘草次酸酯类衍生物, 这类衍生物大多具有很好的抗肿瘤活性。将甘草次酸 C₁₁ 位羰基还原, C₃ 位羟基成

酯, C₃₀ 位羧基与相应的醇反应得到 3-胺基酸酯-11-脱氧甘草次酸-30-酯类衍生物, 具有很好的抑菌活性及抗炎活性^[6-7]。本文以甘草次酸为先导化合物, 在本课题组前期对五环三萜类化合物结构改造以及构效关系研究^[8-12]的基础上, 保留五环三萜骨架, 对其 C₃ 和 C₃₀ 位进行结构修饰, 合成了 12 个新的甘草次酸衍生物, 利用 MS、¹H-NMR 和元素分析确证了结构, 并采用 SRB 法对目标化合物进行了体外抗肿瘤活性研究。

收稿日期: 2015-03-08

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 (1963—), 女, 辽宁义县人, 教授, 博士, 主要从事药物化学研究。Tel: (024)89383903 E-mail: mengyanqiu@hotmail.com

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); MCO-15AC 二氧化碳培养箱 (日本 Sanoy 公司); Spectra Max PLUS 384 型酶标仪; XDS-1B 倒置显微镜; TGL-16B 低速台式离心机; BCD-190TMPK 电冰箱。

柱色谱用 200~300 目硅胶、薄层色谱用硅胶 GF254 均由青岛海洋化工厂生产; 显色剂为 10% 硫酸乙醇溶液; 流动相选用石油醚 (沸程为 60~90 °C) 与醋酸乙酯或丙酮。甘草次酸 (质量分数 > 98%) 购于成都天源天然产物有限公司; 磺基罗丹明 B (SRB)、台盼蓝均购自 Sigma 公司; 胎牛血清购于杭州四季青公司; RPMI-1640 培养基购自 Gibco 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); 所有试剂均为化学纯或分析纯。乳腺癌细胞株 MCF-7/S、肺癌细胞株 A549 均购自美国模式培养物保藏所 (ATCC), 保存在中国科学院大连化学物理研究所药用资源开发组。

2 方法与结果

以甘草次酸为原料, 将 C₃ 位羟基消除, A 环生成环烯, 进而将 C₂、C₃ 位双键氧化生成环氧化物, 同时将 C₃₀ 位羧基与相应的醇反应成酯, 得到 5 个 I 系列 2,3-环氧-11-氧代齐墩果烷型-12-烯-30-羧酸酯类化合物。C₃ 位羟基氧化成羰基, 同时 C₃₀ 位羧基与相应的醇反应成酯或与胺反应成酰胺, 得到 7 个 II 系列 3,11-氧代-齐墩果烷型-12-烯-30-羧酸酯/酰胺类化合物。

2.1 目标化合物 GA-I₁~I₅ 的合成

2.1.1 3-羟基-11-氧代-齐墩果烷型-12-烯-30-羧酸酯 (GA-1) 的制备 将甘草次酸 (100 mg, 0.219 mmol) 溶于 2 mL DMF 中, 加入无水 K₂CO₃ (100 mg, 0.724 mmol), 室温下搅拌, 10 min 后缓慢滴加 0.08 mL 溴乙烷, TLC 监测反应, 待反应完全后, 加入适量水, 用醋酸乙酯 (10 mL×3) 萃取, 合并有机相, 无水硫酸镁干燥, 滤过, 减压蒸馏浓缩得到产物 90.6 mg, 产率 85.4%, mp 175.4~176.8 °C, ESI-MS *m/z*: 484.7 [M+H]⁺。

2.1.2 3-甲基磺酰氧基-11-氧代-齐墩果烷型-12-烯-30-羧酸酯 (GA-2) 的制备 将 GA-1 (100 mg, 0.206 mmol) 溶于 3 mL 二氯甲烷和 1 mL 三乙胺 (TEA) 的混合溶液中, 冰浴下搅拌, 缓慢滴加 0.25 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, TLC 监控反应。反应完毕后, 滤过, 滤液用 1 mol/L 盐酸溶液洗涤至微酸性, 醋酸乙酯萃取, 再水洗至中性。有机相无水硫酸镁干燥, 滤过, 减压蒸除溶剂得到产物 85.8 mg, 产率 70.4%, mp 175.4~176.8 °C, ESI-MS *m/z*: 590.8 [M+H]⁺。

2.1.3 2-烯-11-氧代-齐墩果烷型-12-烯-30-羧酸酯 (GA-3) 的制备 将 GA-2 (100 mg, 0.169 mmol) 溶于 10 mL 二甲基乙酰胺 (DMAC) 中, 加入无水 Li₂CO₃ (60.0 mg, 73.89 mmol), 于 165 °C 下加热回流 30 min。反应液冷却后, 滤过。滤液加入 10 mL 水, 用醋酸乙酯 (10 mL×3) 提取。有机相用 1 mol/L 盐酸溶液洗涤至微酸性, 再水洗至中性。有机相无水硫酸镁干燥, 滤过, 减压蒸除溶剂得到产物 51.7 mg, 产率 65.4%, mp 175.4~176.8 °C, ESI-MS *m/z*: 466.7 [M+H]⁺。

2.1.4 2,3-环氧-11-氧代-齐墩果烷型-30-羧酸乙酯 (GA-I₁) 的制备 将 GA-3 (100 mg, 0.214 mmol) 溶于 10 mL 二氯甲烷中, 冰浴下搅拌, 加入间氯过氧苯甲酸 (*m*-CPBA, 200 mg, 1.16 mmol), 反应 30 min 后转至常温反应 5 h 左右, 反应液用 0.1 mg/L 10% 亚硫酸钠溶液洗涤 3 次, 然后用二氯甲烷 (10 mL×3) 萃取, 有机相用无水硫酸镁干燥, 滤过, 减压蒸馏浓缩。粗品用硅胶柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯 (15:1) 洗脱, 得白色粉末状固体 45.6 mg, 产率 43%, mp 188.6~190.3 °C。元素分析 (%): C (77.20), H (9.88), O (12.99)。ESI-MS *m/z*: 497.4 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 5.67 (s, 1H, H-12), 4.16 (m, 2H, COOCH₂), 3.18 (m, 1H, H-2), 2.83 (d, 1H, *J*=7.0 Hz, H-3), 2.32 (s, 1H, H-9), 2.25 (t, 1H, *J*=6.5 Hz, H-5), 1.27 (t, 3H, *J*=7.2 Hz, COOCH₂CH₃), 1.32、1.15、1.14、1.11、1.09、1.04、0.80 (s, 21H, CH₃×7)。

2.1.5 2,3-环氧-11-氧代-齐墩果烷型-30-羧酸苄酯 (GA-I₂) 的制备 按照化合物 GA-I₁ 的合成方法, 由 GA (100 mg, 0.219 mmol) 与溴化苄 (0.12 mL) 反应, 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 76.0 mg, 产率 62.9%, mp 189.6~191.6 °C。元素分析 (%): C (79.63), H (9.10), O (11.56)。ESI-MS *m/z*: 559.2 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.38~6.89 (m, 5H, Ph), 5.57 (s, 1H, H-12), 4.83 (s, 2H, PhCH₂),

3.17 (m, 1H, H-2), 2.85 (d, 1H, $J=6.3$ Hz, H-3), 2.31 (s, 1H, H-9), 2.23 (t, 1H, $J=6.5$ Hz, H-5), 1.33、1.31、1.17、1.12、1.08、1.03, 0.74 (s, 21H, $\text{CH}_3 \times 7$)。

2.1.6 2,3-环氧-11-氧代-齐墩果烷型-30-羧酸丙酯 (GA-I₃) 的制备 按照化合物 GA-I₁ 的合成方法, 由 GA (100 mg, 0.219 mmol) 与溴丙烷 (0.08 mL) 反应, 硅胶柱色谱纯化, 石油醚 - 醋酸乙酯 (20 : 1) 洗脱, 得白色粉末状固体 42.3 mg, 产率 35.5%, mp 160.5~162.8 °C。元素分析 (%): C (77.75), H (10.02), O (12.39)。ESI-MS m/z : 511.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。¹H-NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 5.65 (s, 1H, H-12), 4.05 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, COOCH_2), 3.16 (m, 1H, H-2), 2.81 (d, 1H, $J=6.5$ Hz, H-3), 2.31 (s, 1H, H-9), 2.21 (t, 1H, $J=7.0$ Hz, H-5), 1.31、1.24 (s, 6H, $\text{CH}_3 \times 2$), 1.20 (m, 2H, CH_2CH_3), 1.14、1.10 (s, 6H, $\text{CH}_3 \times 2$), 1.06、1.03 (s, 6H, $\text{CH}_3 \times 2$), 0.95 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 0.79 (s, 3H, CH_3)。

2.1.7 2,3-环氧-11-氧代-齐墩果烷型-30-羧酸异丙酯 (GA-I₄) 的制备 按照化合物 GA-I₁ 的合成方法, 由 GA (100 mg, 0.219 mmol) 与 2-溴丙烷 (0.08 mL) 反应, 粗品用硅胶柱色谱纯化, 石油醚 - 醋酸乙酯 (20 : 1) 洗脱, 得白色粉末状固体 49.5 mg, 产率 41.3%, mp 162.9~163.6 °C。元素分析 (%): C (77.75), H (10.02), O (12.39)。ESI-MS m/z : 511.4

$[\text{M}+\text{H}]^+$ 。¹H-NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 5.64 (s, 1H, H-12), 4.43 (m, 1H, COOCH), 3.22 (m, 1H, H-2), 2.82 (d, 1H, $J=7.0$ Hz, 3-H), 2.32 (s, 1H, H-9), 2.26 (t, 1H, $J=7.3$ Hz, H-5), 1.32 (s, 3H, CH_3), 1.23 (d, 3H, $J=5.9$ Hz, $\text{COOCHCH}_3\text{a}$), 1.18 (d, 3H, $J=6.3$ Hz, $\text{COOCHCH}_3\text{b}$), 1.15、1.12、1.11、1.09、1.04、0.79 (s, 18H, $\text{CH}_3 \times 6$)。

2.1.8 2,3-环氧-11-氧代-齐墩果烷型-30-羧酸丁酯 (GA-I₅) 的制备 按照化合物 GA-I₁ 的合成方法, 由 GA (100 mg, 0.219 mmol) 与溴代正丁烷 (0.1 mL) 反应, 硅胶柱色谱纯化, 石油醚 - 醋酸乙酯 (20 : 1) 洗脱, 得白色粉末状固体 44.7 mg, 产率 37.1%, mp 149.2~151.1 °C。元素分析 (%): C (77.62), H (10.13), O (12.38)。ESI-MS m/z : 525.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。¹H-NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 5.67 (s, 1H, H-12), 4.12 (t, $J=7.0$ Hz, 2H, COOCH_2), 3.18 (m, 1H, H-2), 2.83 (d, $J=6.5$ Hz, 1H, H-3), 2.33 (s, 1H, H-9), 2.21 (t, $J=7.5$ Hz, 1H, H-5), 1.26、1.16、1.15、1.12、1.10 (s, 15H, $\text{CH}_3 \times 5$), 1.07 (m, 2H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_2$), 1.03 (s, 3H, CH_3), 0.99 (m, 2H, CH_2CH_3), 0.94 (t, $J=7.5$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 0.87 (s, 3H, CH_3)。

目标化合物 GA-I₁~I₅ 的合成路线见图 1。

2.2 目标化合物 GA-II₁~II₇ 的合成

2.2.1 3,11-氧代-齐墩果烷型-12-烯-30-羧酸 (GA-4) 的制备 将甘草次酸 (1.00 g, 2.12 mmol), 溶于

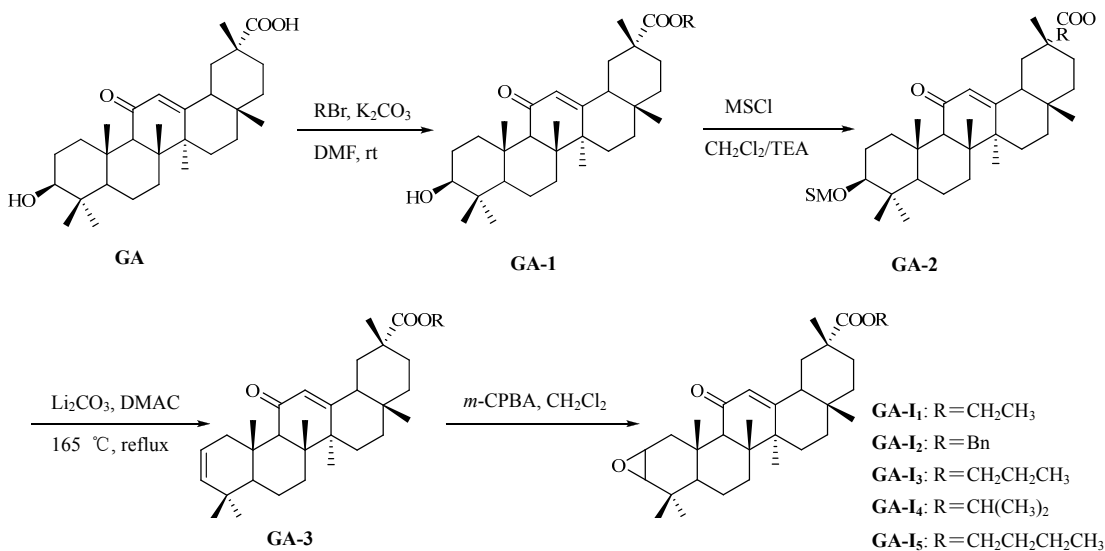


图 1 目标化合物 GA-I₁~I₅ 的合成路线

Fig. 1 Synthetic route of target compounds GA-I₁~I₅

10 mL 的四氢呋喃 (THF) 中, 在冰盐浴下缓慢滴加 2 mL 新鲜制备的 Jones 试剂。搅拌 1 h 后停止反应, 将溶液倒入 5 mL 水中直至出现白色沉淀, 抽滤, 室温下自然干燥, 得白色固体 0.92 g, 产率为 92.59%, mp 184.6~186.8 °C。ESI-MS m/z : 482.7。

2.2.2 3,11-氧代-齐墩果烷型-12-烯-30-羧酸 (GA-5) 的制备 将化合物 GA-4 (100 mg, 0.21 mmol) 溶解在 5 mL 二氯甲烷中, 加入 2 mL 草酰氯, 室温搅拌 24 h, 生成(3 β , 20 β)-3,11-氧代-齐墩果烷型-12-烯-30-酰氯, 蒸除反应溶剂和草酰氯, 残余物加入 2 mL 环己烷, 减压蒸除环己烷, 反复操作 2 次, 得到化合物 GA-5 (直接进入下一步反应)。

2.2.3 *N*-[3,11-氧代-齐墩果烷型-12-烯-30-酰]-环己胺 (GA-II₁) 的制备 将 GA-5 溶于 2 mL 二氯甲烷中, 加三乙胺调 pH 值至 9~10, 搅拌 5 min 后加入环己胺 (78.36 mg, 0.85 mmol), 室温下反应, TLC 检测反应终点。反应结束后, 向反应液中加入 3 mL 水, 以 2 mol/L 盐酸调 pH 值至 3, 减压蒸除二氯甲烷, 析出淡黄色固体, 抽滤, 水洗滤饼至中性, 室温干燥, 粗品经硅胶柱色谱纯化, 石油醚-丙酮 (3:1) 洗脱, 得白色粉末状固体 58 mg, 产率 47.5%, mp 292.6~294.0 °C。元素分析 (%): C (78.36), H (10.22), N (2.39) O (8.91)。ESI-MS m/z : 550.4 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 6.41 (brs, 1H, NH), 4.50 (s, 1H, H-12), 3.84 (m, 1H, NHCH), 2.97~2.88 (m, 1H, H-2a), 2.75~2.63 (m, 8H, CH₂CH₂×2), 2.58~2.43 (m, 1H, H-2b), 2.20 (s, 1H, H-9), 1.90 (t, $J=7.5$ Hz, 1H, H-18), 1.39、1.27、1.18、1.12、1.06、0.85、0.61 (s, 21H, CH₃×7)。

2.2.4 *N*-[3,11-氧代-齐墩果烷型-12-烯-30-酰]-正丙胺 (GA-II₂) 的制备 按照化合物 GA-II₁ 的合成方法, 由化合物 GA-5 (100 mg, 0.21 mmol) 与正丙胺 (62.17 mg, 0.85 mmol) 反应得到, 粗品用硅胶柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯 (3:1) 洗脱, 得白色粉末状固体 59 mg, 产率 41.1%。mp 170.7~171.4 °C。元素分析 (%): C (77.66), H (10.32), N (2.72), O (9.55)。ESI-MS m/z : 510.3 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 6.38 (brs, 1H, NH), 5.68 (s, 1H, H-12), 3.11 (t, 2H, $J=8.0$ Hz, COCH₂), 3.00~2.90 (m, 1H, H-2a), 2.75~2.63 (m, 1H, H-2b), 2.24 (s, 1H, H-9), 2.08 (t, 1H, $J=7.5$ Hz, H-18), 2.03 (m, 2H, COCH₂CH₂), 1.35 (t, 3H, $J=8.0$ Hz, CH₂CH₃), 1.24、1.13、

1.06、0.95、0.81、0.75、0.63 (s, 21H, CH₃×7)。

2.2.5 3,11-氧代-齐墩果烷型-12-烯-30-羧酸乙酯 (GA-II₃) 的制备 将 GA-4 (100 mg, 0.21 mmol), 溶于 3 mL DMF 中, 加入无水 K₂CO₃ (100 mg, 0.724 mmol), 室温下搅拌, 10 min 后缓慢滴加 10 mL 溴乙烷, TLC 监测反应, 待反应完全后, 加入适量水, 用醋酸乙酯萃取 (10 mL×3), 合并有机相, 无水硫酸镁干燥, 滤过, 减压蒸除溶剂得到粗品, 硅胶柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯 (3:1) 洗脱, 得到白色粉末状固体 54.0 mg, 产率 48.1%, mp 175.3~176.4 °C。元素分析 (%): C (77.30), H (9.82), O (12.78)。ESI-MS m/z : 497.1 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 5.78 (s, 1H, H-12), 3.69 (m, 2H, OCH₂CH₃), 3.02~2.90 (m, 1H, H-2a), 2.72~2.63 (m, 1H, H-2b), 2.30 (s, 1H, H-9), 2.10 (t, 1H, $J=7.5$ Hz, H-18), 1.73 (t, 3H, $J=7.5$ Hz, OCH₂CH₃), 1.20、1.11、1.08、0.97、0.81、0.75、0.63 (s, 21H, CH₃×7)。

2.2.6 3,11-氧代-齐墩果烷型-12-烯-30-羧酸甲氧甲酰基甲酯 (GA-II₄) 的制备 按照化合物 GA-II₃ 的合成方法, 与氯乙酸甲酯 20 mL 在室温下反应, 粗品用柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯 (5:1) 洗脱, 得到白色固体 41.1 mg, 产率 35.6%, mp 189.5~190.8 °C。元素分析 (%): C (73.57), H (8.80), O (17.75)。ESI-MS m/z : 541.4 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 5.77 (s, 1H, H-12), 3.81 (s, 2H, OCH₂CO), 3.45 (s, 3H, COCH₃), 3.02~2.90 (m, 1H, H-2a), 2.72~2.63 (m, 1H, H-2b), 2.33 (s, 1H, H-9), 2.05 (t, $J=7.5$ Hz, 1H, H-18), 1.13、1.10、1.05、0.98、0.93、0.88、0.73 (s, 21H, CH₃×7)。

2.2.7 3,11-氧代-齐墩果烷型-12-烯-30-酰-羧酸乙氧甲酰基甲酯 (GA-II₅) 的制备 按照 GA-II₃ 的合成方法, 与氯乙酸乙酯 10 mL 在室温下反应, 粗品用柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯 (5:1) 洗脱, 得到白色固体 44.5 mg, 产率 37.6%, mp 194.3~196.2 °C。元素分析 (%): C (73.40), H (8.95), O (17.55)。ESI-MS m/z : 555.4 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 5.80 (s, 1H, H-12), 3.83 (s, 2H, OCH₂CO), 3.62 (m, 2H, COCH₂), 3.10~2.98 (m, 1H, H-2a), 2.65~2.50 (m, 1H, H-2b), 2.27 (s, 1H, H-9), 2.07 (t, $J=7.5$ Hz, 1H, H-18), 1.70 (t, $J=7.0$ Hz, 3H, OCH₂CH₃), 1.27、1.19、1.09、0.99、0.92、0.87、0.75 (s, 21H, CH₃×7)。

2.2.8 3,11-氧代-齐墩果烷型-12-烯-30-羧酸异丙酯 (GA-II₆)的制备 根据化合物 GA-II₃的合成方法,与溴代异丙烷 10 mL 在室温下反应,粗品用柱色谱纯化,石油醚-醋酸乙酯(5:1)洗脱,得到浅黄色固体 42.6 mg,产率 39.2%, mp 176.5~178.1 °C。元素分析(%): C (77.38), H (9.74), O (12.68)。ESI-MS m/z : 511.2 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 5.78 (s, 1H, H-12), 3.78 (m, 1H, OCH), 3.13~2.95 (m, 1H, H-2a), 2.88~2.70 (m, 1H, H-2b), 2.43 (s, 1H, H-9), 2.10 (t, 1H, $J=7.5$ Hz, H-18), 1.28 (d, 3H, $J=7.5$ Hz, OCHCH_{3a}), 1.20 (d, $J=7.5$ Hz, 3H, OCHCH_{3b}), 1.25、1.10、0.96、0.91、0.86、0.83、0.75 (s, 21H, CH₃×7)。

2.2.9 3,11-氧代-齐墩果烷型-12-烯-30-羧酸正丁酯

(GA-II₇)的制备 根据化合物 GA-II₃的合成方法,与溴代正丁烷 10 mL 在室温下反应,粗品用柱色谱纯化,石油醚-醋酸乙酯(5:1)洗脱,得到白色固体 40.4 mg,产率 36.2%, mp 183.4~184.7 °C。元素分析(%): C (77.60), H (9.87), O (12.43)。ESI-MS m/z : 525.4 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 5.77 (s, 1H, H-12), 3.65 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, OCH₂), 3.16~2.98 (m, 1H, H-2a), 2.90~2.75 (m, 1H, H-2b), 2.43 (s, 1H, H-9), 2.10 (t, 1H, $J=7.5$ Hz, H-18), 1.73 (m, 2H, OCH₂), 1.66 (m, 2H, OCH₂CH₂), 1.51 (t, 3H, $J=7.5$ Hz, CH₂CH₃), 1.27、1.15、0.96、0.91、0.87、0.80、0.76 (s, 21H, CH₃×7)。

目标化合物 GA-II₁~II₇的合成路线见图 2。

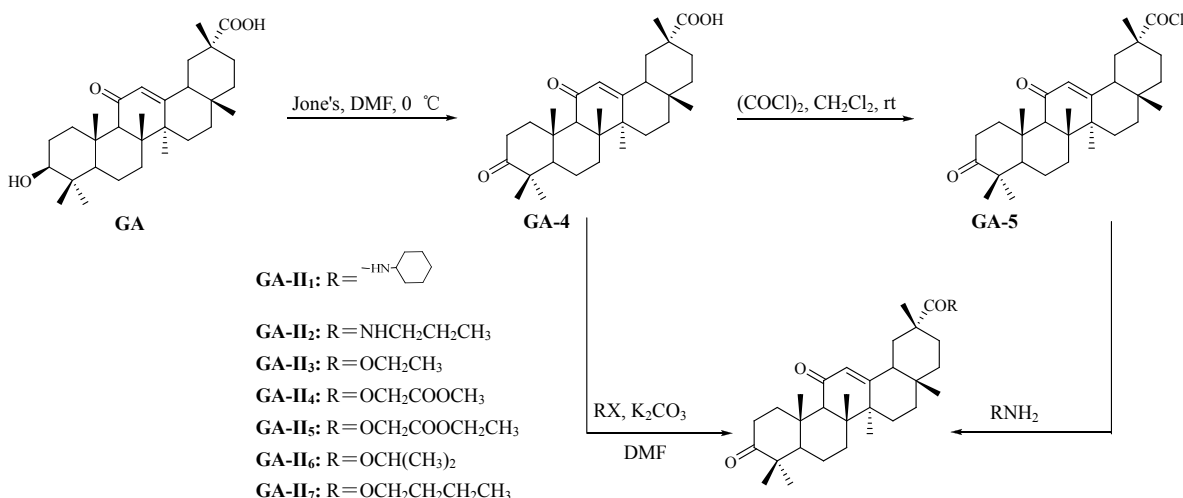


图 2 目标化合物 GA-II₁~II₇的合成路线

Fig. 2 Synthetic route of target compounds GA-II₁~II₇

2.3 体外活性试验

以吉非替尼和紫杉醇为阳性对照药,采用 SRB 法对合成的甘草次酸衍生物进行初步的体外抗肿瘤活性测试。所选用的肿瘤细胞为人乳腺癌细胞 MCF-7 和人肺癌细胞 A549。用 SRB 比色法测定化合物的细胞毒活性。对数生长期肿瘤细胞培养于 96 孔培养板内,每孔 100 μ L (大约含 6 500 个细胞),置于 37 °C、5% CO₂ 恒温箱中培养。培养 24 h 后给药组加入含有不同浓度的测试物,每个组设 3 个复孔。加入等体积含有 1% 二甲基亚砜的 RPMI-1640 培养基为空白对照组,置于 37 °C、5% CO₂ 恒温箱中培养。48 h 后弃培养液,每孔加 100 μ L 预冷的三

氯乙酸,置于 -4 °C 冷藏 1 h,冷水清洗 5 次后,SRB 于 37 °C 恒温染色 30 min。在酶标仪波长 570 nm 条件下测定吸光度 (A) 值,计算药物对细胞的生长抑制率 (IR),并计算半数抑制浓度 IC₅₀ 值,实验重复 3 次,结果取平均值。见表 1。

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

由表 1 数据可知,目标化合物对 MCF-7 和 A549 两种细胞增长均具有一定的抑制作用。其中化合物 GA-I₁、GA-I₂ 和 GA-II₁ 对 MCF-7 和 A549 两种细胞表现出很好的抑制活性,GA-I₁ 对 MCF-7 和 A549 细胞的抑制率分别为 71.57%、24.91%。GA-I₂ 对 MCF-7 和 A549 两种细胞的抑制率分别为 40.33%、20.17%。

表1 目标化合物对 MCF-7、A549 的细胞毒活性
Table 1 Cytotoxic effects of target compounds against MCF-7 and A549 cells

化合物	抑制率/%		IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹)	
	MCF-7	A549	MCF-7	A549
甘草次酸	22.86	18.82	>10	>10
GA-I ₁	71.57	24.91	2.29	>10
GA-I ₂	40.33	20.17	9.97	>10
GA-I ₃	36.68	28.14	13.68	>10
GA-I ₄	34.53	26.60	14.17	>10
GA-I ₅	28.51	20.95	>10	>10
GA-II ₁	48.27	37.25	9.34	21.41
GA-II ₂	39.45	30.46	10.53	29.83
GA-II ₃	36.97	16.92	13.81	>10
GA-II ₄	35.82	22.40	13.95	>10
GA-II ₅	26.74	24.38	>10	>10
GA-II ₆	24.65	21.34	>10	>10
GA-II ₇	27.39	23.58	>10	>10
吉非替尼	21.64	30.27	38.75	28.65
紫杉醇	85.98	79.88	0.026	3.69

对 MCF-7 和 A549 两种细胞的抑制率分别为 48.27%、37.25%，明显高于甘草次酸，且对此两种细胞的抑制活性高于临床常用药吉非替尼。因此，C₃ 位羟基酯化，A 环并环氧乙烷环，同时 C₃₀ 位羧基成酯和酰胺可以提高其抗肿瘤活性。

3 讨论

初步药理实验结果表明，甘草次酸 C₃ 位羟基氧化成羰基或 A 环并环氧乙烷环，同时 C₂₈ 位羧基成酯或酰胺，对其体外抗肿瘤活性有显著提高。进一步分析，化合物 I 系列对 MCF-7 和 A549 肿瘤细胞的抑制活性：**GA-I₁ > GA-I₂ > GA-I₃ > GA-I₄ > GA-I₅**，可见 C₃₀ 位羧基引入酯基碳链的增长或引入支链可能对抑制肿瘤细胞活性不利。化合物 **GA-II₁、GA-II₂** 对 MCF-7 和 A549 肿瘤细胞的抑制活性明显高于 **GA-II₃~II₇**，所以，C₃₀ 位羧基引入酰胺基团对肿瘤的抑制活性有可能高于使其成酯类

所得化合物。这对进一步的甘草次酸结构修饰和抗肿瘤活性的研究具有一定的指导意义，为今后研究和开发高效低毒的抗肿瘤药物打下良好的基础。

参考文献

- [1] Hattori M, Sakamoto T, Kobashi K, *et al.* Metabolism of glycyrrhizin by human intestinal flora [J]. *Planta Med*, 1983, 48(1): 38-42.
- [2] Ruzicka L. Sexual hormones: Synthetic preparation of the male sexual hormones trans-dehydroandrosterone and androstene-3,17-dione [J]. *Helv Chim Acta*, 1935, 18: 86-95.
- [3] 康蕾, 李学强, 王凤荣. 18β-甘草次酸结构修饰及生物活性研究进展 [J]. *中草药*, 2012, 43(7): 1430-1440.
- [4] 申利红, 张奕华, 赖宜生, 等. NO 供体型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*, 2011, 42(1): 34-38.
- [5] 木合布力·阿布力孜, 王永波, 马红艳, 等. 18α(18β)-甘草次酸 30 位酰胺衍生物的合成工艺研究 [J]. *华西药理学杂志*, 2013, 28(6): 553-556.
- [6] 王军, 胡小丽, 文伟河, 等. 甘草次酸 3 位氨基酸衍生物的合成及其抑菌活性 [J]. *应用化学*, 2012, 29(8): 873-877.
- [7] 杨晓辉, 刘利军, 任彬彬, 等. 甘草次酸 3 位酯类衍生物的合成及其抗炎活性的研究 [J]. *华西药理学杂志*, 2009, 24(3): 221-223.
- [8] 王赧. 甘草次酸及其衍生物的研究与应用 [J]. *辽宁化工*, 2006, 35(6): 347-349.
- [9] Meng Y Q, Wang X L, Song Y L, *et al.* Synthesis of novel glycyrrhetic acid analogues [J]. *ICBBE*, 2010, 6: 52-60.
- [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] Meng Y Q, Liu D, Cai L L, *et al.* Synthesis of ursolic acid derivatives with cytotoxic activity and the investigation of their preliminary mechanism of action. [J]. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17(2): 848-854.
- [12] Meng Y Q, Song Y L, Yan Z, *et al.* Synthesis and *in vitro* cytotoxicity of novel ursolic acid derivatives [J]. *Molecules*, 2010, 15(6): 4033-4040.