

熊果酸 A 环开环结构修饰工艺路线的设计

夏 燕, 孟艳秋*, 仇兴华, 焉兆凯

沈阳化工大学 制药工程教研室, 辽宁 沈阳 110142

摘要: 目的 设计一条原辅材料易得、低毒, 操作条件简单可控的熊果酸 A 环开环结构修饰的工艺路线, 从而得到更多具有广泛生物活性的熊果酸衍生物。方法 对类似的化合物进行国内外文献资料的调查与研究, 根据活性拼接原理提出设计路线。结果 提出自行设计的熊果酸 A 环开环结构修饰路线成本较低, 试剂低毒。结论 熊果酸 A 环结构修饰路线设计合理, 为熊果酸结构修饰物的深入研究提供基础。

关键词: 熊果酸; 工艺路线; A 环开环; 齐墩果酸; 结构修饰

中图分类号: R284.3 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)01-0034-04

Process routing design on structure modifier of A-ring cleavage of ursolic acid

XIA Yan, MENG Yan-qiu, QIU Xing-hua, YAN Zhao-kai

Faculty of Pharmaceutical Engineering, Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang 110142, China

Key words: ursolic acid (UA); process routing; A-ring cleavage; ursolic acid; structure modification

熊果酸 (ursolic acid, UA), 又名乌苏酸、乌索酸, 属于乌苏烷型五环三萜化合物, 广泛存在于植物中, 具有镇静、抗炎、抗菌、抗糖尿病、降低血糖等多种生物学效应^[1-3]。1990 年, 日本将熊果酸列为最有希望的癌化学预防药物之一^[4]。

目前, 关于熊果酸构效关系的研究主要集中在 3 位羟基、C₁₂-C₁₃ 位双键和 28 位羧基的改造, 药理活性的研究主要集中在抗炎、抗 HIV、抗肿瘤等方面, 研究表明, 部分结构修饰物活性优于母体化合物。本实验对已有的萜类化合物 A 环开环结构

修饰工艺路线的报道进行总结, 并根据活性拼接原理提出自行设计的熊果酸 A 环结构修饰路线。

1 文献报道的萜类化合物的 A 环修饰路线

1.1 齐墩果酸结构修饰路线^[5]

此方法是以齐墩果酸为起始原料, 将 3 位羟基氧化得 3-羰基化合物, 接着在原甲酸乙酯的作用下生成 2-羟甲基-3-O-齐墩果型-12-烯-28-羧基。通过碱性的 H₂O₂ 提供的三羧酸使 A 环开环, 加入 CH₂N₂ 使其甲基化生成三甲基酯。具体路线见图 1。

齐墩果酸在 CH₂Cl₂-丙酮为溶剂、冰浴条件下

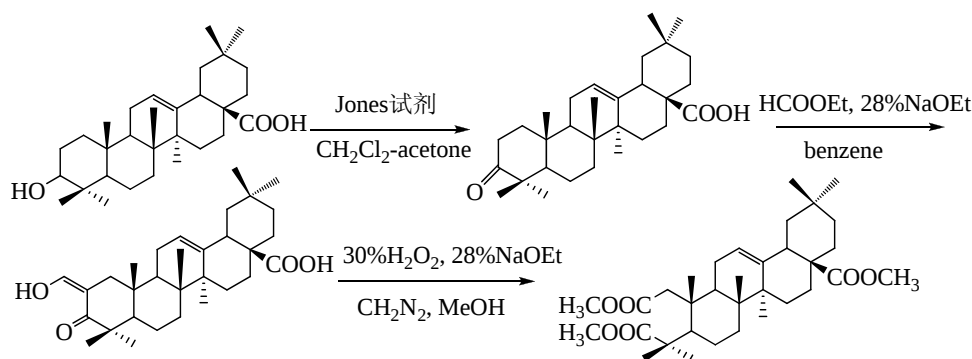


图 1 齐墩果酸 A 环修饰路线

Fig. 1 Modified routing on A-ring of oleanolic acid

收稿日期: 2010-03-13

基金项目: 教育部留学回国人员基金 (20080890); 辽宁省教育厅高等学校科学研究重点项目 (L2010433)

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

缓慢滴加 Jones 试剂使 3 位羟基氧化为羰基,将 28% 甲醇钠和醋酸滴加到 3-氧代齐墩果酸的丙酮溶液中,室温反应 24 h 后,冰浴冷却萃取收集产物 2-羟甲叉基-3-O-齐墩果型-12-烯-28-羧酸,该反应产率可达 98%。在室温下滴加 28% 甲醇钠到该产物的甲醇溶液中,调节温度在 2~5 °C 时滴加 30% H_2O_2 ,在该条件下反应 1 h,反应液浓缩,用 6 mol HCl 调中性后用 EtOAc 萃取,有机层用饱和食盐水洗后,收集干燥。固体用甲醇溶解,滴加重氮甲烷的乙醚溶液搅拌,浓缩,加入甲醇洗,即得到产物 2,3-二甲氧基-2,3-二氧基-2,3-开环-齐墩果型-12-烯-28-甲酯,产率为 58%。

此路线的合成收率比较高,特别是第一步产率可达到 98%,无需进一步处理即可进行下一步反应,为工业化生产节省资源,适合工业化生产。在生成

2-羟甲叉基-3-O-齐墩果型-12-烯-28-羧基时,需 24 h 反应,虽然反应时间长也可通过增加反应批次的方法解决,但在反应过程中重氮甲烷参与酯化反应,因重氮甲烷属爆炸品,可燃、高毒、具强刺激性,此反应操作要求高。同时在生成 2-羟甲叉基-3-O-齐墩果型-12-烯-28-羧基的过程中,会形成烯醇异构影响产率并对该步的纯化带来一定的麻烦。这些都为本路线的工业化带来一定的困难。

1.2 羊毛甾烷 A 环修饰路线^[6]

羊毛甾烷在二元弱碱联氨的作用下将 11 位的羰基还原,再经 Jones 试剂氧化使 3 位的羟基变为羰基,得产物 3-氧化-5 α -羊毛甾烷。在间氯过氧化苯甲酸作用下发生拜耶尔-魏立格氧化反应使 A 环扩环后再开环的产物。具体路线见图 2。

以羊毛甾烷为先导化合物在二元弱碱联氨的作

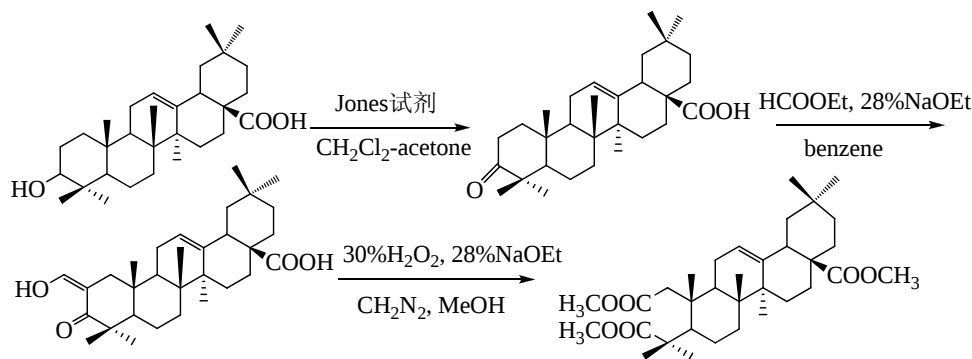


图 2 羊毛甾烷 A 环修饰路线

Fig. 2 Modified routing on A-ring of lanostane

用下将 11 位的羰基还原,在丙酮-THF 为溶剂、冰浴条件下缓慢滴加 Jones 试剂使 3 位的羟基变为羰基,得产物 3-氧化-5 α -羊毛甾烷。在三氯甲烷为溶剂、冰浴条件下加入间氯过氧化苯甲酸、冰醋酸、浓硫酸,发生拜耶尔-魏立格氧化反应,在酮羰基旁插入一个氧生成酯,该反应体系升至室温,且避光反应 5 d。反应完成后,取上层琥珀色溶液用水、乙醚萃取分层,分别用 1.5 mol/L NaHCO_3 、饱和 Na_2CO_3 洗液洗至黄色,浓缩收集得产物七元环内酯羊毛甾烷,产率为 29%。经 Jones 试剂氧化开环搅拌 15 h 得产物,产率为 78%。

此路线的合成重复用到 Jones 试剂,其价格便宜,但在拜耶尔-魏立格氧化时需避光反应 5 d,反应时间长且生成的七元环内酯羊毛甾烷产率太低,仅为 29%。同时在试验中要用到 MPCBA,该原料价格昂贵,且为中等毒性,实际生产中,车间应通

风良好,设备应密闭,操作人员应穿戴防护用具。

1.3 熊果酸开环路线^[7]

以熊果酸为先导化合物经 Jones 试剂氧化得 3-羰基熊果酸,接着在叠氮钠作用下成开环,化合物 3 分别与四氟邻苯二甲酸、DIBAL 反应,在 Pd/C 作用下催化氢化得化合物 4~6,并对合成的熊果酸衍生物做抗肿瘤活性测试。合成路线见图 3。

以熊果酸为起始原料,在冰浴条件下缓慢滴加 Jones 试剂,升至室温反应 1 h 后,加入异丙醇搅拌 30 min 淬灭其氧化性,滤过,收集产物 3-氧代熊果酸,产率为 98%。在 NaN_3 作用下 A 环开环,生成 2-氰基-2,3-开环-4-甲叉基-齐墩果-12-烯-28-羧酸和 4-氮杂-A-同-3-氧代熊果酸,两种化合物的产率相当。化合物 3 分别与四氟邻苯二甲酸加热到 160 °C 反应得到化合物 4。经 2.0 mol 的 DIBAL 在 -30 °C 下还原生成化合物 5,在 10% Pd/C 催化下加氢生

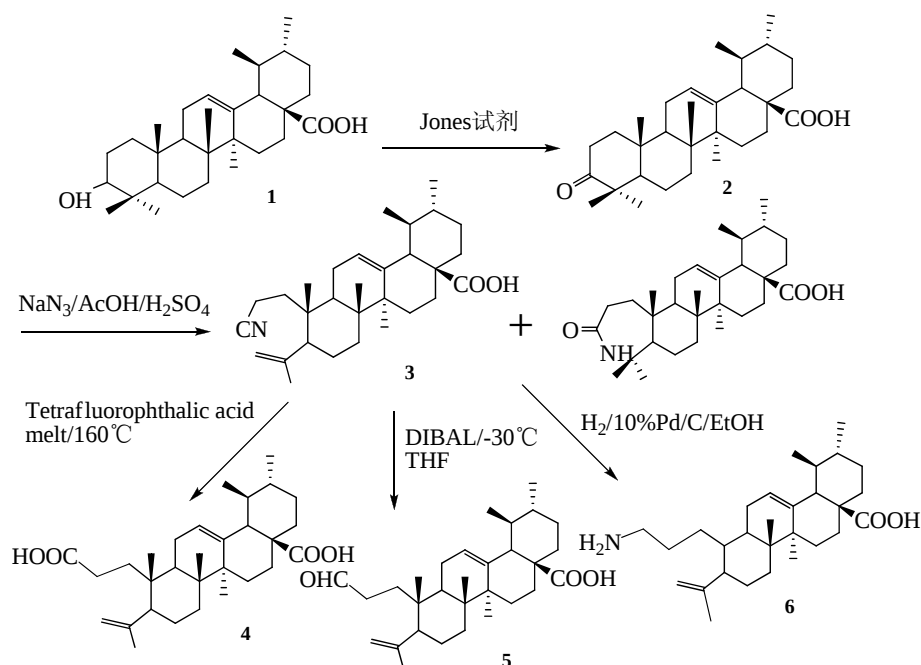


图 3 熊果酸 A 环修饰路线

Fig. 3 Modified routing on A-ring of ursolic acid

成化合物 **6**，产率分别为 50%、46%、95%。并对此系列化合物进行了抗癌活性的研究。

对前列腺细胞 NRP152、NRP154 增长抑制作用的试验研究表明，熊果酸及其 3-羰基化合物抑制前列腺细胞 NRP152、NRP154 的 $IC_{50} > 5.0 \mu\text{mol/L}$ ，化合物 **4**、**5**、**6** 的 $IC_{50} > 5.0$ 、2.4、0.3 $\mu\text{mol/L}$ 。可见，A 环连接醛基和氨基比连接羧基抑制前列腺细胞增殖的活性更强，开环以后的熊果酸衍生物的抗肿瘤活性显著提高，为寻求新的抗癌活性药物提供依据。

活性分析可看出化合物 **6** 的产率和活性都是最优的。但在实际生产中，不管是叠氮钠，还是 Pd/C 都是危险易爆物品，叠氮钠甚至还是高毒物质。这不论是对生产设备，还是工作人员都有很高的要求。在合成化合物 **4**、**5** 的过程中对于温度的控制是个难点，同时所需试剂四氟邻苯二甲酸和二异丁基氢化铝较贵。这些都给本条路线的工业化实施带来很大困难。

2 熊果酸 A 环开环的路线设计

通过上述反应路线的分析，根据活性拼接原理设计熊果酸的开环路线为熊果酸与溴苄反应使 28 位羧基成酯，再经过 Jones 试剂氧化作用后，3 位羟基变为羰基，接着在原甲酸乙酯的作用下生成 2-羟甲基-3-O-乌苏烷型-12-烯-28-苄酯。通过碱性的

H_2O_2 提供的三羧酸使 A 环开环，加入溴代烷得到产物，具体路线见图 4。

熊果酸 28 位羧基成酯后，无论酸性水解还是碱性水解都很难发生。对 28 位羧基的保护一般采用成甲酯，脱保护用碘化锂卤解法，此方法的缺点在于脱保护收率不高^[8]；且碘化锂价格昂贵、易于分解。经过实验，陈军等^[9]发现熊果酸 28 位羧基采用苄基保护非常方便，且室温常压用 Pd/C 催化氢解即可脱去（几乎定量收率）。需要指出的是，在催化氢解反应中 12、13 位双键由于空间位阻原因并不受影响。

将五环三萜类化合物 C-3 位羟基氧化成羰基的方法有很多，如经 Swern 反应^[10]，PCC、PDC 或 Jones 试剂氧化。参考五环三萜类化合物 C-3 位羟基氧化的方法，首先用 PCC 氧化熊果酸得到 3-羰基熊果酸，发现即使反应达 24 h，反应仍然不完全，后来改用氧化性强的 PDC 产率还是得不到提高。经过大量的实验条件摸索工作后，选用 Jones 试剂为氧化剂，仅 1 h 即可反应完全，且产率很高，几乎不需要进一步处理即可进行下步反应。将 28% 的甲醇钠和醋酸滴加到 3-氧代熊果酸的丙酮溶液中，室温反应 24 h 后，冰浴冷却萃取收集产物 2-羟甲基-3-O-乌苏烷型-12-烯-28-苄酯，再在双氧水的氧化作用下开环生成 2,3-二甲氧基-2,3-二氧基-2,3-开环-乌苏烷

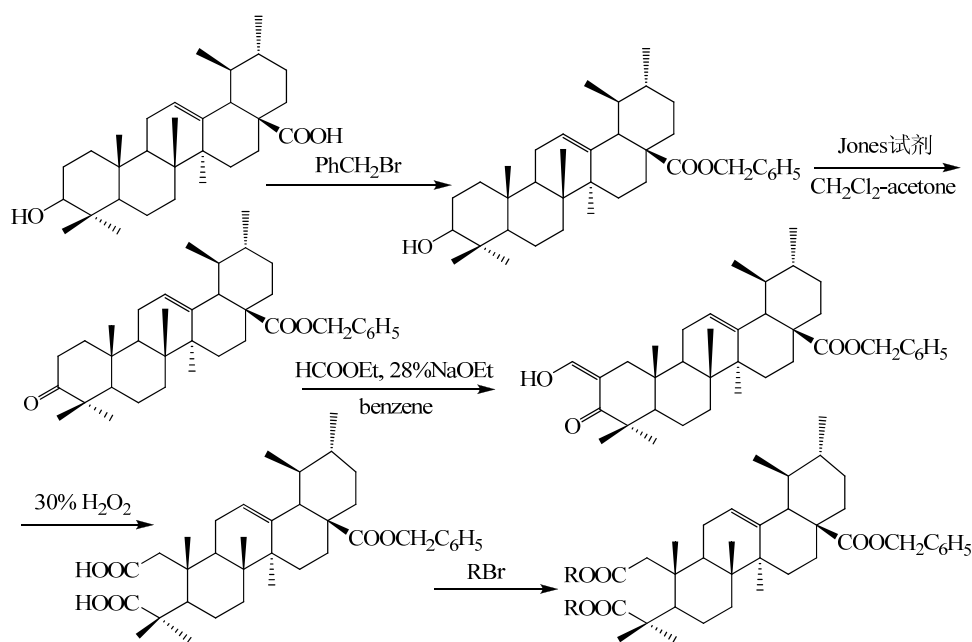


图 4 自行设计的熊果酸 A 环修饰路线

Fig. 4 Self-designed modified routing on A-ring of ursolic acid

型-12-烯-28-苄酯后与相应的溴代烷反应使羧基酯化生成目标化合物 2,3-二烷氧基-2,3-二氧基-2,3-开环-齐墩果型-12-烯-28-苄酯。

本实验路线是否可行还有待进一步验证。该路线选用试剂便宜,无剧毒物质,反应条件容易控制,对工作人员也无需特殊要求,适合工业化生产。如能实现,无疑为熊果酸结构修饰的研究打开了广阔的发展空间。

参考文献

- [1] Li J, Guo W J, Yang Q Y. Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon Carcinoma cell line HCT15 [J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8(3): 493-495.
- [2] Huang M T, Ho C T, Wang Z Y, et al. Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid [J]. *Cancer Res*, 1994, 54(3): 701.
- [3] 宋京, 张庆林. 熊果酸药理研究进展 [J]. *中草药*, 1999, 30(增刊): 95-96.
- [4] Muto Y, Ninomiya M, Fujiki H. Present status of research on cancer chemoprevention in Japan [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 1990, 20(3): 219.
- [5] Kazuhiro T, Toshiro K, Yoji K, et al. Synthesis of

[2-13C]-oleanolic acid and [2-13C]-myricerone. amagasaki, Hyogo 660-0813, Japan, Fukushima-ku [J]. *Tetrahedron*, 1999, 55(52): 14901-14914.

- [6] George R P, Jerry R D. Structural modification of the triterpene A ring [J]. *J Org Chem*, 1972, 37(7): 973-976.
- [7] Heather J, Honda T. Novel A-ring cleaved analogs of oleanolic and ursolic acids which affect growth regulation in NRP.152 prostate cells [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 1997, 7(13): 1769-1772.
- [8] Honda T, Gribble G W, Sub N, et al. Novel synthetic oleanane and ursane-triterpenoids with various enone functionalities in ring a as inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages [J]. *J Med Chem*, 2000, 43(9): 1866-1877.
- [9] 陈军, 柳军, 龚彦春, 等. 新型糖原磷酸化酶抑制剂熊果酸衍生物的合成及其生物活性 [J]. *中国药科大学学报*, 2006, 37(5): 397-402.
- [10] Simone C B G, Sophie S, Luciana D V, et al. Pharmacomodulation on the 3-acetylursolic acid skeleton: Design, synthesis, and biological evaluation of novel N-{3-[4-(3-aminopropyl)piperazinyl]propyl}-3-O-acetylursolamide derivatives as antimalarial agents [J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16(2): 771-782