

绿原酸衍生物的合成及体外抗肿瘤活性研究

张 希^{1,2}, 许旭东², 田 瑜^{2*}, 尚 海^{2*}

1. 哈尔滨商业大学药学院(药物工程技术研究中心), 黑龙江 哈尔滨 150076

2. 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** 设计并合成天然产物绿原酸的酰胺类衍生物, 并对该系列化合物进行体外抗肿瘤活性研究。**方法** 以绿原酸为起始原料, 经保护、缩合、脱保护 3 步反应制得目标产物。采用噻唑蓝(MTT)法, 考察所合成的目标化合物对人宫颈癌 HeLa 细胞、人肝癌 HepG2 细胞和人盲肠腺癌 HCT-8 细胞 3 种肿瘤细胞的体外增殖活性的影响。**结果** 设计并合成了 10 个绿原酸取代的苯甲酰胺及苯乙酰胺类衍生物 **B1~B5**、**C1~C5**, 其结构均经 ¹H-NMR、¹³C-NMR 及 HR-ESI-MS 确定。抗肿瘤活性测试结果表明, 10 个绿原酸衍生物对 3 株肿瘤细胞株表现出不同程度的抑制效果, 其中衍生物 **B2** 对 HeLa 细胞表现出良好的活性, 且活性优于阳性对照药顺铂, 所有的衍生物均对 HCT-8 细胞表现出抑制作用, 且均优于阳性对照药顺铂。**结论** 10 个绿原酸衍生物均为新化合物, 部分衍生物具有较好的抗肿瘤活性, 值得进一步深入研究。

关键词: 绿原酸; 苯甲酰胺衍生物; 苯乙酰胺类衍生物; 合成; 抗肿瘤活性

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)04-0937-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.04.018

Synthesis and *in vitro* antitumor activity evaluation of chlorogenic acid derivatives

ZHANG Xi^{1,2}, XU Xu-dong², TIAN Yu², SHANG Hai²

1. College of Pharmacy (Pharmaceutical Engineering Technology Research Center), Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

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

Abstract: **Objective** To design and synthesize the natural chlorogenic acid amide derivatives and evaluate the *in vitro* antitumor activities of these compounds. **Methods** Using chlorogenic acid as starting material, the target compounds were prepared through three steps of protection, condensation, and deprotection reactions. Their antitumor activities of the synthesized target compounds were evaluated for HeLa, HepG2 and HCT-8 cells by MTT assay. **Results** Ten chlorogenic acid-substituted benzamide and phenylacetamide derivatives **B1—B5**, **C1—C5** were designed and synthesized. Their structures were determined by ¹H-NMR, ¹³C-NMR and HR-ESI-MS. MTT assay showed that ten chlorogenic acid derivatives exhibited antitumor activities. Derivative B2 showed good activity against HeLa tumor cells and was superior to the positive control drug cisplatin. All derivatives showed inhibitory effects against HCT-8 tumor cells, and were all better than cisplatin. **Conclusion** Ten chlorogenic acid derivatives were new compounds. Some derivatives have good antitumor activity and were deserved further research.

Key words: chlorogenic acid; benzamide derivatives; phenylacetamide derivatives; synthesis; antitumor activity

绿原酸(chlorogenic acid, 图 1)又称 3-*O*-咖啡酰奎尼酸或咖啡鞣酸, 是由咖啡酸(caffeic acid)与奎尼酸(quinic acid)形成的缩酚酸, 属于苯丙素类化合物^[1]。绿原酸普遍分布于忍冬科忍冬属和菊

科蒿属植物中, 如杜仲、金银花、向日葵、茵陈、牛蒡等^[2-4]。药理学研究表明, 绿原酸具有抗癌、抗白血病、抗菌、抗氧化、调血脂及免疫调节等多种药理作用^[5-10], 其广泛的药理活性受到学者的高度

收稿日期: 2019-12-03

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目(7192129); 国家自然科学基金资助项目(81302656); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2016-J2M-1-012)

作者简介: 张 希(1992—), 男, 在读硕士研究生, 从事药学相关研究。

***通信作者** 田 瑜(1983—), 女, 博士, 副研究员, 主要从事天然产物结构改造、生物活性及靶标研究。E-mail: ytian@implad.ac.cn
尚 海(1983—), 男, 博士, 副研究员, 主要从事中药及天然药物的研究与开发。E-mail: hshang@implad.ac.cn



图1 露兜树和绿原酸

Fig. 1 Plant *Pandanus tectorius* and chlorogenic acid

关注,其中,抗氧化、抗菌和抗辐射等生物学功能已广泛应用于食品、美容、医药和化工等领域^[11]。近年来研究发现,绿原酸还可以通过阻滞细胞生长周期、抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡等作用机制来阻止肿瘤的发生发展^[12-14],其对肺癌、肝癌、乳腺癌、结肠癌等均具有良好的防治效果。对绿原酸的抗肿瘤活性研究已经成为热点之一。

露兜树 *Pandanus tectorius* (L.) Parkins., 在海南当地又称作野菠萝或山菠萝。课题组在前期研究中发现,以露兜树中主要成分之一的绿原酸为先导物,合成得到的绿原酸苯基酰胺类衍生物 **4e** 对人肝癌 HepG2 细胞有抑制作用,且与原型天然产物绿原酸活性相当。鉴于目前绿原酸苯基酰胺类及苯乙酰胺类衍生物的抗肿瘤活性仍未报道,因此本实验设计合成了一系列绿原酸苯基酰胺类及苯乙酰胺类衍生物 **B1~B5** 和 **C1~C5**,其结构均经 ¹H-NMR、¹³C-NMR 和 HR-ESI-MS 确证。并通过体外抗肿瘤活性模型,测试了化合物对 HepG2 细胞、人宫颈癌 HeLa 细胞和人盲肠腺癌 HCT-8 细胞的体外抗增殖活性。初步探讨构效关系,为进一步发现抗肿瘤活性良好且具有深入研究价值的绿原酸类化合物奠定基础。

1 仪器与试剂

艾卡 (IKA®) RCT basic 型磁力搅拌器 [艾卡 (广州) 仪器设备有限公司]; Mettler Toledo AL104 梅特勒-托利多电子天平 [梅特勒-托利多 (北京) 精密仪器有限公司]; Bruker Avance III 600 型核磁共振波谱仪 [布鲁克 (北京) 科技有限公司]; 赛默飞世尔 (ThermoFisher) LTQ-Orbitrap XL 液质联用仪 (赛默飞世尔科技有限公司); 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱 (日本 Sanoy 公司)。

绿原酸、*N,N*-二异丙基乙胺 (DIEA)、卡特缩合剂 (BOP)、苯乙胺、4-羟基苯胺、3,4-二甲氧基

苯甲胺、高藜芦胺、4-羟基苄胺、二甲亚砜 (DMSO) 购于 (Energy Chemical 公司); 噻唑蓝 (MTT, Amresco 公司); 常规试剂市售分析纯和化学纯; 薄层色谱用硅胶板和柱色谱用硅胶 (青岛海洋化工有限公司); HeLa、HepG2、HCT-8 细胞 (中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心)。

2 方法与结果

2.1 合成部分

2.1.1 中间体 A 的合成 准确称取 21.0 g (60.0 mmol) 绿原酸,加入到 500 mL 圆底烧瓶中。室温条件下依次加入 150 mL 干燥丙酮、120 mL DMP,反应液为混悬状态,加入 150 mg 对甲苯磺酸进行催化,室温下搅拌 1 h。TLC 检测反应,展开剂为醋酸乙酯-甲酸-乙酸-水 (100:5:5:13)。反应结束后,加入饱和碳酸钠,中和剩余的对甲苯磺酸,抽滤,滤液浓缩即得淡黄色化合物 A,称定质量 19.8 g,收率为 85.1%。

2.1.2 目标化合物 B1~B5 的合成 将 395.0 mg (1.0 mmol) 化合物 A, 443.0 mg (1.1 mmol) BOP 置于 50 mL 圆底烧瓶中,抽真空,氮气保护。加入乙腈-THF 溶解至澄清,用针管缓慢滴加胺 (**B1**: 苯乙胺, **B2**: 4-羟基苯胺, **B3**: 3,4-二甲氧基苯胺, **B4**: 高藜芦胺, **B5**: 4-羟基苄胺),室温反应 3 h。TLC 展开剂为二氯甲烷-甲醇 (**B1**: 15:1, **B2**: 10:1, **B3**: 13:1, **B4**: 5:1, **B5**: 6:1),监测反应完全,减压蒸干,残余物通过硅胶柱色谱纯化,二氯甲烷-甲醇 (**B1**: 30:1, **B2**: 20:1, **B3**: 25:1, **B4**: 10:1, **B5**: 10:1) 洗脱依次得到目标化合物 **B1~B5**。

2.1.3 目标化合物 C1~C5 的合成 分别准确称取 **B1~B5** 各 1.0 mmol (**B1**: 520.0 mg, **B2**: 537.0 mg, **B3**: 566.0 mg, **B4**: 580.0 mg, **B5**: 522.0 mg),加入体积比为三氟乙酸-二氯甲烷-水 (9:1:1) 中,室温反应 1 h, TLC 检测反应,展开剂为二氯甲烷-甲醇 (10:1) 蒸除溶剂,残余物通过硅胶柱色谱纯化,二氯甲烷-甲醇 (**C1**: 15:1, **C2**: 10:1, **C3**: 13:1, **C4**: 9:1, **C5**: 10:1) 洗脱依次得到目标化合物 **C1~C5**。绿原酸衍生物的结构及合成路线见图 2。

2.2 体外抗肿瘤活性研究

采用 MTT 法测试目标化合物 **B1~B5** 和 **C1~C5** 对人宫颈癌 HeLa 细胞、人结直肠癌 HCT-8 细胞,人肝癌 HepG2 细胞的体外抗肿瘤活性,以顺铂

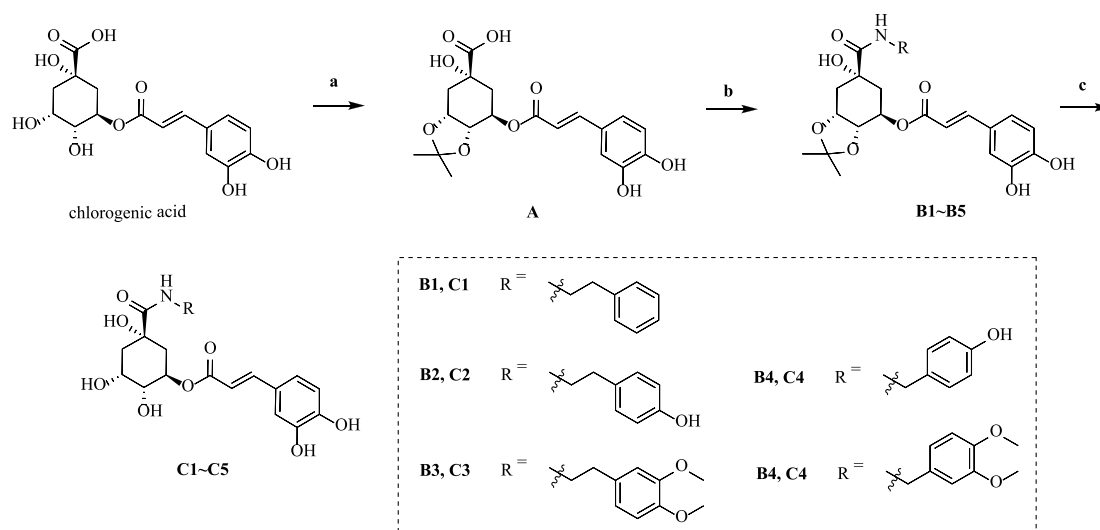


图2 绿原酸衍生物的合成路线

Fig. 2 Synthetic route of chlorogenic acid derivatives

(Cisplatin) 为阳性对照品。取对数生长期的 HeLa、HCT-8 和 HepG2 细胞接种于 96 孔细胞板, 每孔 7×10^3 个细胞 $100 \mu\text{L}$, 在 CO_2 培养箱 (37°C , $5\% \text{CO}_2$, 相对湿度 90%) 中培养 24 h。设置空白组 (不加细胞, 只加等量的细胞培养液和 DMSO)、对照组 (不加药, 只加细胞和等量的细胞培养液及 DMSO) 和阳性对照组 (顺铂的浓度分别为 40、20 和 $10 \mu\text{mol/L}$), 96 孔板内每孔加入梯度稀释的 **B1~B5** 和 **C1~C5** 药液 (浓度梯度分别为 40、20 和 $10 \mu\text{mol/L}$) $200 \mu\text{L}$, 设 3 复孔, 在 CO_2 培养箱 (37°C , $5\% \text{CO}_2$, 相对湿度 90%) 中培养 48 h。每孔加入 5 mg/L 的 MTT 溶液 $20 \mu\text{L}$, 再继续培养 4 h, 弃去上清液, 每孔加入 $150 \mu\text{L}$ DMSO, 震荡 10 min, 酶标仪测定 492 nm 波长处吸光度 (A) 值, 计算 **B1~B5** 和 **C1~C5** 对肿瘤细胞的抑制率。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{给药}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

3 结果与讨论

3.1 化合物解析

化合物 **B1**: 白色粉末。收率为 63.2%。HR-ESI-MS m/z : 520.194 1 (计算值 520.194 7, $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{NO}_8\text{Na} [\text{M} + \text{Na}]^+$)。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 9.63 (1H, s, Ph'-OH), 9.17 (1H, s, Ph'-OH), 7.84 (1H, t, $J = 5.9$ Hz, CONH), 7.48 (1H, d, $J = 15.7$ Hz, H-7'), 7.28~7.17 (5H, m, Ph''-H), 7.05 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-2'), 7.02 (1H, dd, $J = 8.2, 1.7$ Hz, H-6'), 6.76 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5'), 6.26 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8'), 5.48 (1H, s, H-1), 5.34~5.30 (1H, m, H-3), 4.41~4.38 (1H, m, H-4), 4.12~4.10 (1H, m,

H-5), 3.34~3.25 (2H, m, NH-CH₂), 2.73~2.70 (2H, m, CH₂-Ph''), 2.22~2.18 (1H, m, H-2), 1.95~1.92 (1H, m, H-2), 1.72~1.70 (2H, m, H-6), 1.41 (3H, s, CH₃CO), 1.26 (3H, s, CH₃CO); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 175.1, 165.9, 148.5, 145.6, 145.4, 139.4, 128.7, 128.3, 126.1, 125.5, 121.4, 115.8, 114.9, 114.0, 108.0, 76.8, 74.0, 73.5, 70.8, 40.1, 37.0, 34.3, 28.0, 25.9。

化合物 **B2**: 浅黄色粉末。收率为 73.3%。HR-ESI-MS m/z : 536.189 5 (计算值 536.189 7, $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{NO}_9\text{Na} [\text{M} + \text{Na}]^+$)。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 9.64 (1H, s, Ph'-OH), 9.18 (2H, s, Ph'-OH, Ph''-OH), 7.76 (1H, t, $J = 5.9$ Hz, CONH), 7.47 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7'), 7.05 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 7.01 (1H, dd, $J = 8.3, 2.0$ Hz, H-6'), 6.98~6.96 (2H, m, Ph''-H), 6.76 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5'), 6.66~6.64 (2H, m, Ph''-H), 6.25 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8'), 5.47 (1H, s, H-1), 5.34~5.30 (1H, m, H-3), 4.41~4.39 (1H, m, H-4), 4.12~4.10 (1H, m, H-5), 3.27~3.16 (2H, m, NH-CH₂), 2.59~2.57 (2H, m, CH₂-Ph''), 2.22~2.18 (1H, m, H-2), 1.95~1.92 (1H, m, H-2), 1.73~1.72 (2H, m, H-6), 1.41 (3H, s, CH₃-C-O), 1.25 (3H, s, CH₃-C-O); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 175.0, 165.9, 155.6, 148.5, 145.6, 145.4, 129.6, 129.4, 125.5, 121.5, 115.8, 115.0, 114.9, 114.1, 108.0, 76.7, 74.1, 73.5, 70.8, 40.5, 37.0, 34.3, 28.1, 25.9。

化合物 **B3**: 白色粉末。收率为 68.7%。

HR-ESI-MS m/z : 566.200 1 (计算值 566.200 2, $C_{28}H_{33}NO_{10}Na$ $[M + Na]^+$)。 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.66 (1H, s, Ph'-OH), 9.22 (s, 1H, Ph'-OH), 7.78 (1H, t, $J = 5.9$ Hz, CONH), 7.50 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-7'), 7.08 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-2'), 7.03 (1H, dd, $J = 8.3, 1.9$ Hz, H-6'), 6.83 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, Ph''-H-5''), 6.80~6.78 (2H, m, H-5', Ph''-H-2''), 6.70 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, Ph''-H-6''), 6.27 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-8'), 5.49 (1H, s, H-1), 5.36~5.32 (1H, m, H-3), 4.43~4.40 (1H, m, H-4), 4.14~4.12 (1H, m, H-5), 3.73 (3H, s, Ph''-CH₃-O), 3.70 (3H, s, Ph''-CH₃-O), 3.37~3.23 (2H, m, NH-CH₂), 2.67~2.65 (2H, m, CH₂-Ph''), 2.26~2.23 (1H, m, H-2), 1.99~1.95 (1H, m, H-2), 1.74~1.73 (2H, m, H-6), 1.43 (s, 3H, CH₃-C-O), 1.27 (s, 3H, CH₃-C-O); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 175.1, 166.0, 148.6, 148.5, 147.3, 145.7, 145.5, 131.8, 125.6, 121.5, 120.6, 115.9, 114.9, 114.1, 112.5, 111.8, 108.1, 76.9, 74.2, 73.6, 70.9, 55.5, 55.4, 40.3, 37.1, 34.7, 34.3, 28.1, 26.0。

化合物 **B4**: 白色粉末。收率为 71.6%。HR-ESI-MS m/z : 580.216 0 (计算值 580.215 9, $C_{29}H_{35}NO_{10}Na$ $[M + Na]^+$)。 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.64 (1H, s, Ph'-OH), 9.27 (1H, s, Ph''-OH), 9.19 (2H, s, Ph'-OH), 8.16 (1H, t, $J = 6.2$ Hz, CONH), 7.48 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-7'), 7.05~7.03 (3H, m, Ph''-H, H-2'), 7.01 (1H, dd, $J = 8.3, 2.0$ Hz, H-6'), 6.76 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5'), 6.68~6.67 (2H, m, Ph''-H), 6.25 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-8'), 5.53 (1H, s, H-1), 5.37~5.33 (1H, m, H-3), 4.43~4.41 (1H, m, H-4), 4.19~4.12 (3H, m, H-5, NH-CH₂), 2.27~2.24 (1H, m, H-2), 2.01~1.98 (1H, m, H-2), 1.78~1.77 (2H, m, H-6), 1.41 (3H, s, CH₃-C-O), 1.26 (3H, s, CH₃-C-O); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 175.1, 166.0, 156.2, 148.5, 145.6, 145.4, 129.7, 128.4, 125.6, 121.5, 115.8, 115.0, 114.9, 114.1, 108.1, 76.9, 74.2, 73.6, 70.8, 41.6, 37.1, 34.4, 28.1, 26.0。

化合物 **B5**: 白色粉末。收率为 72.2%。HR-ESI-MS m/z : 522.174 1 (计算值 522.174 0, $C_{26}H_{29}NO_{29}Na$ $[M + Na]^+$)。 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.64 (s, 1H, Ph'-OH), 9.20 (1H, s, Ph'-OH), 8.27 (1H, t, $J = 5.9$ Hz, CONH), 7.47 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7'), 7.05 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-2'), 7.01

(1H, dd, $J = 8.0, 1.7$ Hz, H-6'), 6.87~6.85 (2H, m, Ph''-H-5'', 2''), 6.77~6.74 (2H, m, H-5', Ph''-H-6''), 6.25 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8'), 5.58 (1H, s, H-1), 5.37~5.35 (1H, m, H-3), 4.44~4.42 (1H, m, H-4), 4.23~4.20 (3H, m, NH-CH₂), 4.13~4.12 (1H, m, H-5), 3.71 (3H, s, Ph''-CH₃-O), 3.70 (3H, s, Ph''-CH₃-O), 2.29~2.26 (1H, m, H-2), 2.03~2.01 (1H, m, H-2), 1.79~1.75 (2H, m, H-6), 1.42 (3H, s, CH₃-C-O), 1.26 (3H, s, CH₃-C-O); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 175.3, 166.0, 148.6, 148.5, 147.6, 145.6, 145.4, 132.0, 131.6, 128.7, 125.6, 121.5, 119.0, 115.8, 114.9, 114.1, 111.6, 110.9, 108.1, 76.9, 74.2, 73.6, 70.9, 55.6, 55.4, 41.8, 37.1, 34.3, 28.1, 25.9。

化合物 **C1**: 白色粉末。收率为 68.6%。HR-ESI-MS m/z : 480.163 2 (计算值 480.163 4, $C_{24}H_{27}NO_8Na$ $[M + Na]^+$)。 1H -NMR (600 MHz, MeOD) δ : 7.58 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-7'), 7.27~7.16 (5H, m, Ph''-H), 7.05 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2'), 6.95 (1H, dd, $J = 8.3, 2.1$ Hz, H-6'), 6.78 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5'), 6.30 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8'), 5.40~5.36 (1H, m, H-3), 4.22~4.21 (1H, m, H-4), 3.70~3.68 (1H, m, H-5), 3.44~3.41 (2H, m, NH-CH₂), 2.81~2.78 (2H, m, CH₂-Ph''), 2.08~2.02 (2H, m, H-2), 1.99~1.95 (1H, m, H-6), 1.89~1.85 (1H, m, H-6); ^{13}C -NMR (150 MHz, MeOD) δ : 176.7, 169.0, 149.6, 147.0, 146.8, 140.3, 129.9, 129.5, 127.7, 127.4, 123.0, 116.5, 115.3, 115.1, 77.7, 74.3, 72.6, 71.9, 41.7, 39.9, 38.7, 36.5。

化合物 **C2**: 浅黄色粉末。收率为 71.5%。HR-ESI-MS m/z : 496.157 8 (计算值 496.158 4, $C_{24}H_{27}NO_9Na$ $[M + Na]^+$)。 1H -NMR (600 MHz, MeOD) δ : 7.58 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-7'), 7.05 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 7.04~7.02 (2H, m, Ph''-H), 6.95 (1H, dd, $J = 8.2, 2.0$ Hz, H-6'), 6.78 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 6.71~6.69 (2H, m, Ph''-H), 6.30 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8'), 5.40~5.36 (1H, m, H-3), 4.22~4.21 (1H, m, H-4), 3.70~3.68 (1H, m, H-5), 3.41~3.34 (2H, m, NH-CH₂), 2.71~2.68 (2H, m, CH₂-Ph''), 2.09~2.02 (2H, m, H-2), 2.00~1.96 (1H, m, H-6), 1.90~1.86 (1H, m, H-6); ^{13}C -NMR (150 MHz, MeOD) δ : 176.6, 169.0, 156.9, 149.6, 147.0, 146.8, 131.0, 130.8, 127.8, 123.0, 116.5, 116.2, 115.3, 115.1, 77.7, 74.3, 72.6, 71.9, 42.0, 39.9, 38.7, 36.7。

化合物 **C3**: 白色粉末。收率为 67.7%。HR-ESI-MS m/z : 526.169 1 (计算值 526.168 9, $C_{25}H_{29}NO_{10}Na$ $[M + Na]^+$)。 1H -NMR (600 MHz, MeOD) δ : 7.58 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7'), 7.05 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.95 (1H, dd, $J = 8.2$ Hz, 2.0 Hz, H-6'), 6.85~6.82 (2H, m, Ph"-H-5", 2"), 6.78 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 6.75 (1H, dd, $J = 8.1, 1.7$ Hz, Ph"-H-6"), 6.29 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8'), 5.39~5.35 (1H, m, H-3), 4.22~4.21 (1H, m, H-4), 3.81 (3H, s, Ph"-CH₃-O), 3.87 (3H, s, Ph"-CH₃-O), 3.70~3.68 (1H, m, H-5), 3.46~3.36 (2H, m, NH-CH₂), 2.75~2.72 (2H, m, CH₂-Ph"), 2.07~2.03 (2H, m, H-2), 1.97~1.93 (1H, m, H-6), 1.88~1.85 (1H, m, H-6); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO) δ : 176.6, 169.0, 150.3, 149.6, 149.0, 147.0, 146.8, 133.2, 132.4, 129.9, 127.8, 123.0, 122.3, 116.5, 115.4, 115.1, 113.8, 113.0, 77.7, 74.3, 72.6, 71.9, 56.5, 56.4, 41.7, 40.1, 38.6, 36.1。

化合物 **C4**: 浅黄色粉末。收率为 69.2%。HR-ESI-MS m/z : 540.184 6 (计算值 540.184 6, $C_{26}H_{31}NO_{10}Na$ $[M + Na]^+$)。 1H -NMR (600 MHz, MeOD) δ : 7.58 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7'), 7.10~7.09 (2H, m, Ph"-H), 7.05 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.95 (1H, dd, $J = 8.2, 2.0$ Hz, H-6'), 6.78 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 6.74~6.72 (2H, m, Ph"-H), 6.30 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8'), 5.43~5.38 (1H, m, H-3), 4.28 (2H, s, NH-CH₂), 4.24~4.23 (1H, m, H-4), 3.72~3.70 (1H, m, H-5), 2.15~2.09 (2H, m, H-2), 2.06~1.94 (2H, m, H-6); ^{13}C -NMR (150 MHz, MeOD) δ : 176.6, 169.1, 157.7, 149.6, 147.0, 146.8, 130.7, 129.7, 127.8, 123.0, 116.5, 116.2, 115.3, 115.1, 77.8, 74.4, 72.6, 71.9, 43.4, 40.0, 38.7。

化合物 **C5**: 白色粉末。收率为 66.3%。HR-ESI-MS m/z : 482.142 9 (计算值 482.142 7, $C_{23}H_{25}NO_9Na$ $[M + Na]^+$)。 1H -NMR (600 MHz, MeOD) δ : 7.57 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-7'), 7.05 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.94 (1H, dd, $J = 8.0, 1.7$ Hz, H-6'), 6.88~6.87 (2H, m, Ph"-H-5", 2"), 6.83~6.81 (2H, m, H-5'), 6.78 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, Ph"-H-6"), 6.29 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-8'), 5.43~5.39 (1H, m, H-3), 4.32 (3H, m, NH-CH₂), 4.25~4.23 (1H, m, H-4), 3.80 (3H, s, Ph"-CH₃-O), 3.79 (3H, s, Ph"-CH₃-O), 3.73~3.71 (1H, m, H-5), 2.16~2.10 (2H, m, H-2), 2.07~1.95 (2H, m, H-6); ^{13}C -NMR (150 MHz, MeOD) δ : 176.7,

169.0, 150.4, 149.6, 149.6, 147.0, 146.8, 132.8, 127.7, 123.0, 120.8, 116.5, 115.3, 115.1, 112.9, 112.3, 77.8, 74.3, 72.6, 71.9, 56.5, 56.3, 43.5, 40.0, 38.8。

3.2 体外抗肿瘤实验结果

采用 MTT 法测试化合物 **B1~B5** 和 **C1~C5** 对 HeLa、HCT-8、HepG2 细胞的体外抗肿瘤活性, 以顺铂为阳性对照药, 在 40、20、10 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度下, 通过体外细胞学实验考察了绿原酸酰胺类衍生物 **B1~B5** 和 **C1~C5** 对 3 种肿瘤细胞株的体外细胞毒作用。样品液的浓度配制了 40、20、10 $\mu\text{mol/L}$ 3 个浓度梯度, 实验结果显示在 40 $\mu\text{mol/L}$ 的药物浓度下部分化合物表现出较好的抑制作用, 20、10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下抑制率不高, 故给出了样品 (衍生物和阳性药) 在 40 $\mu\text{mol/L}$ 时的实验数据。结果见表 1。

表 1 绿原酸衍生物 **B1~B5** 和 **C1~C5** 的体外抗肿瘤活性
Table 1 *In vitro* antitumor effect of target compounds **B1~B5** and **C1~C5**

化合物	抑制率/%		
	HeLa	HepG2	HCT-8
B1	23.65	41.15	76.45
B2	97.12	62.69	83.27
B3	<10	32.61	92.42
B4	<10	42.87	75.83
B5	24.64	51.45	58.28
C1	<10	52.82	89.98
C2	<10	<10	69.87
C3	<10	50.64	80.19
C4	21.49	50.47	92.51
C5	21.98	55.04	54.63
顺铂	48.52	81.37	23.12

3.3 初步构效关系总结

体外抗肿瘤活性结果表明, 在 40 $\mu\text{mol/L}$ 的测试浓度下, 10 个绿原酸衍生物 **B1~B5** 和 **C1~C5**, 对 3 株肿瘤细胞株表现出不同程度的抑制效果, 对 HCT-8 和 HepG2 细胞株的抑制作用优于 HeLa 细胞株, 表现出一定的选择性。其中, 在 HeLa 细胞株中, 化合物 **B2** 表现出最好的抑制作用, 且活性优于阳性对照药顺铂; 在 HepG2 细胞株中, 化合物 **B2** 同样表现出优于其他衍生物的抑制作用; 在 HCT-8 细胞株中, 化合物 **B2**、**B3**、**C1**、**C3**、**C4** 均表现出较好的抑制作用, 其中化合物 **C4** 的活性最好, 且所有衍生物活性均明显优于阳性对照药顺铂。初步的构效关系研究表明: (1) 本实验虽未对绿原酸和衍生物进行 3 个细胞株下的体外活性筛选比较, 但实验室前期研究发现, 绿原酸在体外细胞

株上发挥抗肿瘤作用的有效浓度较高。通过本文的绿原酸衍生物实验结果来看,将绿原酸的羧基改造为酰胺,可能增加其抗肿瘤活性,因此绿原酸中的羧基不是活性必需基团。(2)绿原酸的羧基与酚羟基或甲氧基取代的苯甲胺或苯乙胺缩合后,对3种细胞株产生不同的抑制作用。其中与对位酚羟基取代苯乙胺缩合后,对HeLa、HepG2细胞株的抑制作用最好,如衍生物**B2**;而无取代、酚羟基取代或甲氧基取代,以及苯甲酰胺或苯乙酰胺,对HCT-8细胞株的抑制作用影响不大,如衍生物**B2**、**B3**、**C1**、**C3**、**C4**。(3)化合物**B3**、**C1**、**C3**、**C4**对3个细胞株的选择性较好,而化合物**B2**对3个细胞株均表现出较好的抑制作用,具有深入研究的价值。

参考文献

- [1] Michael N C, Jaganath I B, Ludwig I A, *et al.* Chlorogenic acids and the acyl-quinic acids: Discovery, biosynthesis, bioavailability and bioactivity [J]. *Nat Prod Rep*, 2017, 34(12): 1391-1421.
- [2] Karunanidhi A, Thomas R, Van B A, *et al.* *In vitro* antibacterial and antibiofilm activities of chlorogenic acid against clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* including the trimethoprim/sulfamethoxazole resistant strain [J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 392058.
- [3] Lou Z, Wang H, Zhu S, *et al.* Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid [J]. *J Food Sci*, 2011, 76(6): 398-403.
- [4] Liang N, Kitts D D. Role of chlorogenic acids in controlling oxidative and inflammatory stress conditions [J]. *Nutrients*, 2015, 8(1): 16.
- [5] Jiang Y, Kusama K, Satoh K, *et al.* Induction of cytotoxicity by chlorogenic acid in human oral tumor cell lines [J]. *Phytomedicine*, 2001, 7(6): 483-491.
- [6] Yagasaki K, Miura Y, Okauchi R, *et al.* Inhibitory effects of chlorogenic acid and its related compounds on the invasion of hepatoma cells in culture [J]. *Cytotechnology*, 2000, 33(1/3): 229-235.
- [7] Belkaid A, Currie J C, Julie D, *et al.* The chemopreventive properties of chlorogenic acid reveal a potential new role for the microsomal glucose-6-phosphate translocase in brain tumor progression [J]. *Cancer Cell Inter*, 2006, 6(1): 7.
- [8] Noratto G, Porter W, Byrne D, *et al.* Identifying peach and plum polyphenols with chemopreventive potential against estrogen-independent breast cancer cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(12): 5219-5226.
- [9] Meng S X, Cao J, Feng Q, *et al.* Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: A review [J]. *Evid Based Complt Alter Med*, 2013, 2013: 801457.
- [10] Zhao Y, Wang J, Ballevre O, *et al.* Antihypertensive effects and mechanisms of chlorogenic acids [J]. *Hypertens Res*, 2012, 35(4): 370-374.
- [11] Santana G J, Luis C Z, Jacobo V D. Chlorogenic acid: Recent advances on its dual role as a food additive and a nutraceutical against metabolic syndrome [J]. *Molecules*, 2017, doi: 10.3390/molecules22030358.
- [12] Trivedi V, Manna D, Gorai S, *et al.* Evidence of PKC binding and translocation to explain the anticancer mechanism of chlorogenic acid in breast cancer cells [J]. *Currt Mol Med*, 2017, 17(1): 79-89.
- [13] Ren T, Wang Y, Wang C, *et al.* Isolation and identification of human metabolites from a novel anti-tumor candidate drug 5-chlorogenic acid injection by HPLC-HRMS/MSⁿ and HPLC-SPE-NMR [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2017, 409(30): 7035-7048.
- [14] Rakshit S, Mandal L, Pal B C, *et al.* Involvement of ROS in chlorogenic acid-induced apoptosis of Bcr-Abl+CML cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 80(11): 1662-1675.