

齐墩果酸衍生物的合成及抗肿瘤活性的研究

孟艳秋^{1*}, 聂慧慧¹, 王晓晨¹, 李 丹¹, 葛崇勋¹, 赵 娜¹, 陈 虹², 曹 波²

(1. 沈阳化工大学制药工程教研室, 辽宁 沈阳 110142; 2. 中国人民解放军武警医学院生药学教研室, 天津 300162)

摘要: 以天然产物齐墩果酸为先导化合物, 经过氧化、酯化 (酰化)、水解等反应设计合成了 10 个齐墩果酸衍生物, 以 HeLa、HepG2 和 BGC-823 细胞为靶细胞, 采用 MTT 法用吉非替尼和依托泊苷作阳性对照, 进行初步的体外抗肿瘤活性筛选。结果表明, 化合物 **5a** 对 HepG2 细胞、化合物 **7** 对 HeLa 细胞的抑制活性明显高于母体齐墩果酸。因此, 化合物 **5a** 和 **7** 值得进一步研究。

关键词: 齐墩果酸; 五环三萜化合物; 抗肿瘤活性

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 10-1215-06

Synthesis and anti-tumor activity of oleanolic acid derivatives

MENG Yan-qiu^{1*}, NIE Hui-hui¹, WANG Xiao-chen¹, LI Dan¹, GE Chong-xun¹,
ZHAO Na¹, CHEN Hong², CAO Bo²

(1. Department of Pharmaceutical Engineering, Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang 110142, China;
2. Department of Pharmacognosy, Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China)

Abstract: Structural modifications were performed with natural product of oleanolic acid to search for novel anticancer drugs. Ten oleanolic acid derivatives were designed and obtained by the reaction of oxidation, acylation or hydrolyzation, etc. The cytotoxic activity of derivatives was evaluated against HeLa, HepG2 and BGC-823 cells *in vitro* by MTT assay, gefitinib and etoposide used as a positive control. The results showed that compound **5a** was particularly active to inhibit HepG2 cells growth, and anti-tumor activity of compound **7** on HeLa cells was significantly stronger than oleanolic acid. They are worthy to be studied further.

Key words: oleanolic acid; pentacyclic triterpenoid; anti-tumor activity

齐墩果酸 (oleanolic acid, OA) 属于五环三萜类化合物, 首先在木樨属植物橄榄叶中分得, 广泛分布于植物界, 如在青叶胆全草、女贞果实等植物内广泛存在, 但大多数与糖结合成苷存在^[1]。OA 具有广泛的生物活性, 包括抗肿瘤^[2-4]、保肝^[5, 6]、抗菌消炎^[7]、抗 HIV^[8]和降糖降脂^[9]等作用。研究表明, 3-氧代齐墩果酸对多种肿瘤细胞具有抑制作用, 28 位羧酸成酯、成酰胺以及与糖结合成苷的衍生物具有较强的抗

肿瘤活性^[10-12]。在参考五环三萜化合物结构改造的基础上^[13-15], 以 OA 为先导化合物, 保留五环三萜骨架和 12 位双键, 对 3 位羟基、11 位亚甲基和 28 位羧基进行改造, 合成了 10 个齐墩果酸衍生物, 并对其进行了体外抗肿瘤活性的筛选, 期望从中筛选具有较强抗肿瘤活性的化合物。

以齐墩果酸 (化合物 **1**) 为原料, 将 3 位羟基与醋酸酐反应得到 3-乙酰氧基化合物 **2a**, 将 3 位羟基氧化成羰基得到化合物 **2b**; 将 **2a** 的 11 位亚甲基氧化成羰基得化合物 **3a**, **3a** 的 28 位羧基与胺反应得酰胺化合物 **4a~4b**, **3a** 与糖配体反应得到糖苷 **4c**; 化合物 **4a~4c** 再在碱性条件下水解得化合物 **5a~5c**。将 **2b** 与盐酸羟胺反应生成化合物 **3b**, 再将 28 位羧基与

收稿日期: 2011-05-06.

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

*通讯作者 Tel: 86-24-89383903, Fax: 86-24-89383760,

E-mail: mengyanqiu@hotmail.com

全乙酰溴代葡萄糖反应得化合物 **6**, 乙酰葡萄糖脱去乙酰氧基得化合物 **7**; 化合物 **3b** 的肟羟基与肉桂酸反应得化合物 **8**, 再将 **28** 位羧基成酰胺得到化合物 **9a~9d**。见合成路线 1。

结果与讨论

1 化学部分

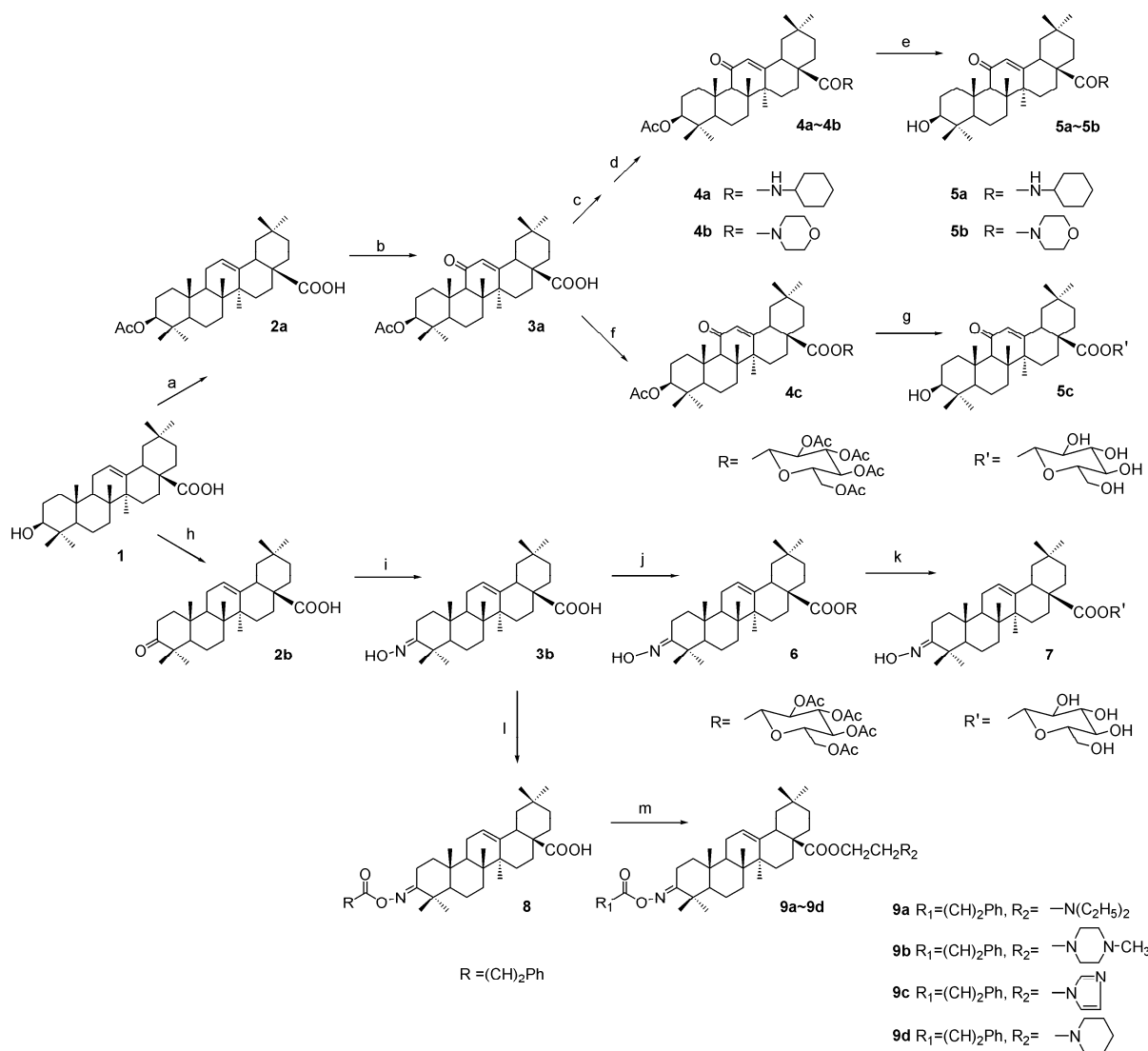
以天然产物齐墩果酸为先导化合物, 经过氧化、酯化 (酰化)、水解等反应设计合成了 10 个齐墩果酸衍生物。目标化合物经 ^1H NMR、MS 等确证其结构, 数据见表 1 和表 2。

2 生物活性评价

采用四甲基偶氮唑盐法 (MTT 比色法) 对合成

的化合物进行初步的体外抗肿瘤活性测试, 实验结果见表 3。

由表 3 中数据可以看出, 在化合物浓度为 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 化合物 **6** 对 HeLa、BGC-823 细胞, 化合物 **9a** 对 HepG2 和 BGC-823 细胞的抗肿瘤活性均高于 OA, 化合物 **5a**、**5c**、**7** 和 **8** 对 HeLa、HepG2 和 BGC-823 三种细胞的抗肿瘤活性高于 OA; 化合物 **5a** 对 HepG2 的 IC_{50} 值为 $(12.50 \pm 3.00) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 化合物 **7** 对 HeLa 细胞的 IC_{50} 值为 $(22.92 \pm 3.82) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 与上市的抗肿瘤药物吉非替尼 (IC_{50} : HepG2 $(20.73 \pm 16.3) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, HeLa $(17.12 \pm 7.9) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的活性相当。因此, 化合物 **5a**、**7** 值得进一步研究。



Scheme 1 Synthetic routes of target compounds. Reagents and conditions: (a) $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$, DMAP, THF, rt; (b) glacial CH_3COOH , K_2CO_3 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$; (c) $(\text{COCl})_2$, CH_2Cl_2 ; (d) amine, CH_2Cl_2 , Et_3N , rt; (e) CH_2Cl_2 , NaOH , rt; (f) $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{BrO}_9$, CHCl_3 ; (g) $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, CH_3ONa , rt; (h) Jones reagent, CH_2Cl_2 , rt; (i) $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, Pyridine; (j) $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{BrO}_9$, CHCl_3 ; (k) $\text{CH}_3\text{OH}/\text{THF}$, NaOH ; (l) $(\text{COCl})_2$, CH_2Cl_2 , $\text{Ph}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$, Benzene, DMAP; (m) DMF, anhydrous K_2CO_3 , $\text{Br}(\text{CH}_2)_2\text{Br}$, amine

Table 1 MS and elemental analysis data of target compounds

Compd.	ESI-MS (<i>m/z</i>)	Elemental analysis / Calcd. (Found)		
		C	H	N
5a	551.5 [M+H] ⁺	78.42 (78.64)	10.27 (10.08)	8.62 (8.73)
5b	539.4 [M+H] ⁺	75.39 (75.65)	10.11 (9.90)	2.49 (2.59)
5c	632.4 [M+H] ⁺	68.02 (68.33)	9.06 (8.92)	—
6	815.2 [M+H] ⁺	65.88 (66.06)	8.31 (8.19)	23.92 (24.00)
7	815.2 [M+H] ⁺	68.22 (68.43)	9.26 (9.09)	20.18 (20.26)
8	599.4 [M] [−]	77.68 (78.09)	9.14 (8.91)	10.70 (10.67)
9a	682.5 [M+H ₂ O] ⁺	77.02 (77.32)	9.78 (9.52)	9.05 (9.16)
9b	709.5 [M+H ₂ O+K] ⁺	75.91 (76.10)	9.52 (9.30)	8.65 (8.81)
9c	677.5 [M+K] ⁺	75.72 (76.15)	8.79 (8.57)	9.26 (9.22)
9d	694.5 [M-H] [−]	77.42 (77.70)	9.78 (9.60)	8.72 (9.00)

Table 2 ¹H MNR data of target compounds

Compd.	¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ
5a	8.03 (s, 1H, NH), 5.77 (s, 1H, H-12), 3.58 (s, 1H, OH), 3.54 (m, 1H, NH-CH), 3.15 (t, 1H, H-3, <i>J</i> = 7.2 Hz), 2.33 (t, 1H, H-18, <i>J</i> = 7.0 Hz), 2.26 (s, 1H, H-9), 1.74–1.11 (m, 10H, CH ₂ ×5), 0.99 (s, 12H, CH ₃ ×4)
5b	5.77 (s, 1H, H-12), 3.65 (t, 4H, CH ₂ ×2, <i>J</i> = 5.7 Hz), 3.58 (s, 1H, OH), 3.47 (t, 4H, CH ₂ ×2, <i>J</i> = 5.7 Hz), 2.33 (s, 1H, H-12), 2.02 (s, 1H, H-22), 1.38 (brd, 2H, H-19, <i>J</i> = 7.5 Hz), 1.38 (brd, 2H, H-6, <i>J</i> = 8.1 Hz), 0.99 (s, 12H, CH ₃ ×4)
5c	6.15 (d, 1H, O-CH-O, <i>J</i> = 24 Hz), 5.77 (s, 1H, H-9), 4.00 (t, 1H, O-CH, <i>J</i> = 7.0 Hz), 3.58 (d, 4H, CH-OH), 3.48 (t, 1H, 3-OH, <i>J</i> = 7.0 Hz), 2.74 (t, 1H, H-18, <i>J</i> = 7.8 Hz), 2.26 (s, 1H, H-9), 2.13–1.88 (m, 2H, H-22)
6	6.66 (d, 1H, COOCH-O, <i>J</i> = 17.1 Hz), 5.29 (s, 1H, H-12), 5.25 (s, 2H, O-CH-C=O), 4.78 (s, 1H, COOCH), 4.34 (d, 2H, CHCH ₂ OC=O, <i>J</i> = 15 Hz), 2.21 (d, 12H, O=CCH ₃ ×4, <i>J</i> = 6.0 Hz), 2.00 (s, 1H, =N-OH), 1.56–1.23 (m, 16H, CH ₂ ×8)
7	6.15 (d, 1H, COOCHO, <i>J</i> = 12.8 Hz), 5.29 (t, 1H, H-12, <i>J</i> = 6.2 Hz), 4.00 (m, 1H, O-CH), 3.79 (d, 2H, CH ₂ OH), 3.58 (d, 3H, OH×3, <i>J</i> = 2.7 Hz), 3.49 (t, 1H, CH-OH, <i>J</i> = 2.7 Hz), 2.13–1.88 (m, 2H, H-22), 2.00 (s, 1H, =N-OH), 1.56–1.23 (m, 16H, CH ₂ ×8), 1.23 (m, 6H, CH ₃ ×2)
8	12.28 (s, 1H, COOH), 7.40–7.74 (m, 5H, H-Ph), 6.74 (d, 1H, Ph-CH, <i>J</i> = 15 Hz), 6.50 (d, 1H, CHCOON, <i>J</i> = 15 Hz), 5.17 (s, 1H, H-12), 2.72 (m, 2H, H-11), 2.50 (s, 1H, H-18), 1.20 (s, 3H, CH ₃), 1.10 (s, 6H, CH ₃), 0.99 (s, 3H, CH ₃), 0.87 (s, 6H, CH ₃), 0.76 (s, 3H, CH ₃)
9a	7.74 (d, 2H, Ph-H×2, <i>J</i> = 12 Hz), 7.70 (d, 1H, Ph-CH, <i>J</i> = 15 Hz), 7.40 (t, 2H, Ph-H, <i>J</i> = 15 Hz), 6.50 (d, 1H, CHCOON, <i>J</i> = 16.5 Hz), 5.18 (m, 1H, H-12), 3.46 (m, 2H, COOCH ₂), 2.90 (s, 1H, H-18), 2.81 (m, 2H, H-11), 2.50 (m, 4H, N (CH ₂)), 1.20 (s, 3H, CH ₃), 1.10 (s, 6H, CH ₃), 0.99 (s, 3H, CH ₃), 0.87 (s, 6H, CH ₃), 0.76 (s, 3H, CH ₃)
9b	7.60 (d, 2H, Ph-H×2, <i>J</i> = 12 Hz), 7.48 (d, 1H, Ph-CH, <i>J</i> = 17.1 Hz), 7.40 (t, Ph-H×2, <i>J</i> = 15 Hz), 7.33 (t, Ph-H, <i>J</i> = 18 Hz), 6.31 (d, 1H, =CH-COO, <i>J</i> = 24 Hz), 5.29 (t, 1H, H-12, <i>J</i> = 7.1 Hz), 4.18 (t, 2H, COOCH ₂ , <i>J</i> = 18 Hz), 2.35 (t, 8H, N-CH ₂ ×4, <i>J</i> = 18 Hz), 2.26 (d, 3H, N-CH ₃ , <i>J</i> = 6.0 Hz), 2.13–1.88 (br, 2H, H-22), 2.04–1.79 (br, 2H, H-11), 1.56–1.23 (m, 16H, CH ₂ ×8), 1.23 (s, 6H, CH ₃ ×2)
9c	7.60 (d, 2H, Ph-H×2, <i>J</i> = 12 Hz), 7.48 (d, 1H, Ph-CH, <i>J</i> = 17.1 Hz), 7.40 (t, Ph-H×2, <i>J</i> = 15 Hz), 7.33 (t, Ph-H, <i>J</i> = 18 Hz), 7.22 (d, 1H, N-CH=C, <i>J</i> = 13.2 Hz), 6.31 (d, 1H, =CH-COO, <i>J</i> = 24 Hz), 5.29 (s, 1H, H-12), 4.56 (t, 2H, COOCH ₂ , <i>J</i> = 24 Hz), 2.13–1.88 (m, 2H, H-22), 2.04–1.79 (m, 2H, H-11), 1.56–1.23 (m, 16H, CH ₂ ×8), 1.23 (s, 6H, CH ₃ ×2), 0.99 (s, 6H, CH ₃ ×2)
9d	7.60 (d, 2H, Ph-H×2, <i>J</i> = 12 Hz), 7.48 (d, 1H, Ph-CH, <i>J</i> = 17.1 Hz), 7.40 (t, Ph-H×2, <i>J</i> = 15 Hz), 7.33 (t, Ph-H, <i>J</i> = 18 Hz), 6.31 (d, 1H, =CH-COO, <i>J</i> = 15.1 Hz), 5.29 (s, 1H, H-12), 4.18 (t, 2H, COOCH ₂ , <i>J</i> = 12 Hz), 2.45 (t, 4H, N-CH ₂ ×2, <i>J</i> = 12.6 Hz), 2.13–1.88 (m, 2H, H-22), 1.73–1.48 (m, 2H, H-16), 1.56–1.23 (m, 16H, CH ₂ ×8), 1.23 (s, 6H, CH ₃ ×2), 0.99 (s, 6H, CH ₃ ×2)

Table 3 Inhibitory activity of oleanolic acid and its derivatives on different cancer cells proliferation. a: Inhibitory percentage of cells treated with 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of each compound for 96 h; b: The agent concentration ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) that inhibited tumor cells growth by 50%. NT: Not test

Compd.	Inhibition rate for different cell / % ^a			IC ₅₀ / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^b		
	HeLa	HepG2	BGC-823	HeLa	HepG2	BGC-823
OA	25.0 ± 2.80	21.9 ± 5.60	11.9 ± 2.50	> 10	> 10	> 10
5a	33.6 ± 10.5	46.94 ± 3.80	21.4 ± 2.90	53.74 ± 19.72	12.50 ± 3.00	> 10
5b	NT	NT	NT	NT	NT	NT
5c	33.4 ± 7.60	31.7 ± 6.30	14.7 ± 7.90	46.50 ± 12.08	46.86 ± 9.82	> 10
6	31.9 ± 6.80	13.4 ± 1.80	16.4 ± 4.30	50.42 ± 13.55	>10	> 10
7	37.5 ± 3.20	29.5 ± 2.40	27.6 ± 3.20	22.92 ± 3.82	79.50 ± 9.93	> 10
8	34.4 ± 7.90	26.3 ± 3.40	18.8 ± 4.90	32.17 ± 10.06	> 10	> 10
9a	14.2 ± 5.00	36.1 ± 11.40	21.9 ± 4.40	>10	53.68 ± 23.60	> 10
9b	NT	NT	NT	NT	NT	NT
9c	NT	NT	NT	NT	NT	NT
9d	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Gefitinib	42.6 ± 5.94	46.2 ± 7.92	46.0 ± 12.54	17.12 ± 7.90	20.73 ± 16.36	19.27 ± 14.53
Etoposide	69.7 ± 3.53	58.7 ± 5.97	60.1 ± 6.45	2.37 ± 0.99	5.62 ± 2.11	5.01 ± 2.85

3 小结

初步的构效关系表明: ① 28 位羧基与糖成酯或 28 位羧基与胺成酰胺时, 对 HeLa 细胞和 HepG2 细胞的抗肿瘤活性明显增强, 如 **5a** > **5c** > OA; ② 28 位羧基成酯, 并延长酯上的含氮碳链时, 对 HeLa 细胞的抗肿瘤活性明显降低, 如 **8** > **9a**, 但对 HepG2 细胞和 BGC-823 细胞的抗肿瘤活性增强, 如 **9a** > **8**; ③ 28 位羧基与糖成酯时, 糖链上羟基越多抗肿瘤活性越强, 如 **7** > **6**; ④ 3 位成脲羟基与 3 位为羟基相比, 对 BGC-823 细胞的抗肿瘤活性增强, 如 **7** > **5c**。

实验部分

仪器与试剂 X-4 数字显示显微熔点测定仪; ARX-300 MHz 核磁共振仪, CDCl_3 为溶剂, TMS 为内标; 热电-菲尼根 LCQ 型质谱仪。齐墩果酸购于陕西森弗生物技术有限公司; 薄层色谱硅胶 GF254、硅胶 H 为青岛海洋化工有限公司生产, 其余试剂均为分析纯, 显色剂为 10% 硫酸乙醇溶液; 活性测试所用 HeLa 细胞、HepG2 细胞、BGC-823 细胞为天津武警医学院药系提供。

1 化学合成

1.1 3 β -乙酰氧基-齐墩果烷型-12-烯-28-羧酸 (2a) 将 200 mg 齐墩果酸溶解于 10 mL 四氢呋喃中, 依次加入 10 mg DMAP 和 0.5 mL 乙酸酐, 室温反应, 以 TLC 检测反应终点, 4 h 反应完毕, 蒸除反应溶剂, 得白色固体。用二氯甲烷溶解, 饱和氯化钠溶液洗涤两次, 无水硫酸镁干燥, 蒸除二氯甲烷得白色固体粗品。粗品经硅胶柱色谱纯化, 洗脱剂为石油醚-乙酸乙酯 10 : 1 (v/v), 得到白色固体 176 mg, 产率为 88%。

1.2 3-氧代-齐墩果烷型-12-烯-28-羧酸 (2b) 将 100 mg 齐墩果酸溶解于 4 mL 丙酮-二氯甲烷 (1 : 1) 溶液中, 冰浴下缓慢滴加 0.4 mL Jones 试剂, 室温反应, TLC 检测反应终点, 反应 1 h 后加 5 mL 异丙醇淬灭, 水-乙酸乙酯萃取 3 次, 合并有机相, 依次以饱和碳酸氢钠溶液、饱和食盐水洗涤, 无水硫酸镁干燥, 得到白色固体 90.5 mg, 产率为 90.5%, mp 220.3~222.1 °C。

1.3 3 β -乙酰氧基-11-羰基-齐墩果烷型-12-烯-28-羧酸 (3a) 将 100 mg **2a** (0.20 mmol) 溶解于冰乙酸中, 加入 80 mg 重铬酸钾, 110 °C 回流, 以 TLC 检测反应终点, 约 8 h 反应完毕, 用饱和碳酸氢钠溶液调节 pH 至 7~8, 二氯甲烷萃取, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 减压蒸馏后得粗品。粗品用硅胶柱色谱纯化, 洗

脱剂为石油醚-乙酸乙酯 6 : 1 (v/v), 得淡黄色粉末状固体 76 mg, 产率为 76%。

1.4 3-羟亚氨基-齐墩果烷型-12-烯-28-羧酸 (3b) 将 100 mg 化合物 **2b** 与 210 mg 盐酸羟胺溶解于 4 mL 吡啶中, 115 °C 回流 1~1.5 h, 反应完毕迅速倒入冰水中, 有白色固体析出, 抽滤, 干燥, 得到白色固体 88 mg, 产率为 87.3%, mp 188.4~189.8 °C。

1.5 N-[3 β -乙酰氧基-11-羰基-齐墩果烷型-12-烯-28-酰]-环己胺 (4a) 将 100 mg 化合物 **3a** (0.19 mmol) 溶解于 4 mL 二氯甲烷中, 加入草酰氯 (0.439 6 mmol), 室温搅拌 20 h, 生成 3 β -乙酰氧基-11-羰基-齐墩果烷型-12-烯-28-酰氯, 蒸除反应溶剂和未反应的草酰氯, 残余物中加入 2 mL 环己烷, 减压蒸除环己烷, 反复操作 3 次。加入 2 mL 二氯甲烷溶解, 加三乙胺调 pH 为 8~9 后, 加入 1 mL 环己胺 (20 mmol), 以 TLC 检测反应终点, 室温反应 6 h。蒸除溶剂, 以水分散固体, 用 2 mol·L⁻¹ 盐酸调 pH 至 3~4, 抽滤, 得棕色固体。粗品用硅胶柱色谱纯化, 洗脱剂为石油醚-乙酸乙酯 10 : 1 (v/v), 得白色粉末状固体 34 mg, 产率为 34%。

1.6 N-[3 β -乙酰氧基-11-羰基-齐墩果烷型-12-烯-28-酰]-吗啉 (4b) 按照 **4a** 合成方法, 由 100 mg 化合物 **3a** 与 1 mL 吗啉 (0.19 mmol) 反应得到。粗品用硅胶柱色谱纯化, 洗脱剂为石油醚-乙酸乙酯 10 : 1 (v/v), 得白色粉末状固体 42 mg, 产率为 52.5%。

1.7 3-乙酰氧基-齐墩果烷型-11-羰基-12-烯-28-O-[2, 3, 4, 6-四-O-乙酰基- β -D-吡喃葡萄糖]-酯 (4c) 将 100 mg 化合物 **3a** (0.19 mmol) 和 150 mg 全乙酰溴代葡萄糖 (0.36 mmol) 溶解于 5 mL 氯仿中, 依次加入 5 mg 四丁基溴化铵和碳酸钾水溶液 (碳酸钾 150 mg 溶于 2 mL 水), 剧烈搅拌并加热至 50 °C, 以 TLC 检测反应终点, 反应 4 h。静置, 有机相加氯仿稀释后用水洗涤, 浓缩后用硅胶柱色谱纯化 (石油醚-乙酸乙酯 5 : 1), 得白色固体 63 mg, 产率为 63%。

1.8 N-[3 β -羟基-11-羰基-齐墩果烷型-12-烯-28-酰]-环己胺 (5a) 将 34 mg 化合物 **4a** 溶解于 6 mL 二氯甲烷中, 加入 2 mol·L⁻¹ NaOH 溶液 0.5 mL, 室温搅拌, 以 TLC 检测反应终点, 反应约 6 h, 用 1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液调节 pH 至中性, 分去水相, 有机相减压浓缩, 浓缩液用硅胶柱色谱纯化, 洗脱剂为石油醚-乙酸乙酯 12 : 1 (v/v), 得白色粉末状固体 16 mg, 产率为 47%。mp 126.9~134.7 °C。

1.9 N-[3 β -羟基-11-羰基-齐墩果烷型-12-烯-28-酰]-吗啉 (5b) 按照 **5a** 的合成方法在碱性条件下脱乙

酰基而得到。粗品用硅胶柱色谱纯化, 洗脱剂为石油醚-乙酸乙酯 15:1 (v/v), 得白色粉末状固体 17 mg, 产率为 40.5%。mp 132.0~136.3 °C。

1.10 3-羟基-齐墩果烷型-11-羧基-12-烯-28-O-葡萄糖酯 (5c) 将 50 mg 化合物 4c (0.079 mmol) 溶解于 10 mL 二氯甲烷-甲醇 (1:2) 溶液中, 加入新制甲醇钠-甲醇溶液 1 mL, 室温下搅拌, 以 TLC 检测反应终点, 5 h 反应完毕。反应液中加入酸性阳离子树脂中和至 pH 7。过滤后浓缩, 浓缩液用硅胶柱色谱纯化, 洗脱液为氯仿-甲醇 15:1, 得白色粉末 42 mg, 产率为 84%。

1.11 3-羟基-齐墩果烷型-12-烯-28-O-[2,3,4,6-四-O-乙酰基-β-D-吡喃葡萄糖]-酯 (6) 将 100 mg 化合物 3b (0.206 4 mmol)、175 mg 全乙酰溴代葡萄糖 (0.425 6 mmol) 和 121 mg 碳酸钾 (0.877 4 mmol) 溶解于 6 mL DMF 中, 在室温下搅拌过夜。TLC 检测反应终点, 反应结束后用乙酸乙酯稀释, 用水、饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥。过滤, 蒸干, 得到白色固体。粗品经硅胶柱色谱纯化, 洗脱剂为石油醚-乙酸乙酯 3:1 (v/v), 产率为 72.6%, mp 110.0~117.5 °C。

1.12 3-羟基-齐墩果烷型-12-烯-28-O-[β-D-吡喃葡萄糖]-酯 (7) 将 50 mg 化合物 6 (0.061 4 mmol) 溶解于 1.5 mL THF 和 1 mL 甲醇混合溶液中, 搅拌下慢慢加入 0.2 mL NaOH 溶液 (4 mol·L⁻¹), 室温搅拌 45 min, 混合物用 15 mL 水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩。粗产品用柱色谱纯化, 洗脱剂为二氯甲烷-甲醇 14:1 (v/v), mp 206.5~208.4 °C。

1.13 3-肉桂酰氧亚氨基-齐墩果烷型-12-烯-28 羧酸 (8) 将 50 mg 肉桂酸溶解于 5 mL 二氯甲烷中, 加入草酰氯 2 滴 (0.439 6 mmol), 室温反应 20 h, 蒸除溶剂和未反应的草酰氯, 残余物中加入 3 mL 环己烷, 减压蒸除环己烷, 反复操作 3 次。立即加入 100 mg 化合物 3b (0.22 mmol)、少量 DMAP 和 3 mL 苯, 60 °C 反应 1~1.5 h, 蒸除溶剂, 以水分散固体, 抽滤, 干燥, 得到白色粉末 58 mg, 产率为 44%, mp 220.3~222.1 °C。

1.14 3-肉桂酰氧亚氨基-齐墩果烷型-12-烯-28-(2-二乙胺-1-)-乙酯 (9a) 将 100 mg 化合物 8 (0.22 mmol) 溶解于 3 mL 无水 DMF 中, 加入 0.1 g 无水碳酸钾 (0.717 mmol), 冰浴下加入 1, 2-二溴乙烷 5 滴 (5.08 mmol), 冰浴反应, TLC 检测反应终点, 2~3 h 完毕。蒸除有机溶剂, 再加入少量 DMF 和 1 mL 二乙胺 (20 mmol), 室温搅拌过夜, TLC 检测反应终点, 抽滤, 滤饼用乙酸乙酯洗涤 (5 mL×2), 母液用水-乙酸乙酯

萃取 3 次, 合并有机相, 然后依次以饱和碳酸氢钠溶液、饱和食盐水洗涤, 无水硫酸镁干燥, 蒸除溶剂得到白色固体粗品, 用硅胶柱色谱纯化, 洗脱剂为石油醚-乙酸乙酯 7:1 (v/v), 得到白色粉末 11 mg, 产率为 7.6%, mp 171.4~173.8 °C。

1.15 3-肉桂酰氧亚氨基-齐墩果烷型-12-烯-28-(2-N-甲基哌嗪-1-)-乙酯 (9b) 按照 9a 的合成方法, 由 100 mg 化合物 8 (0.212 0 mmol) 与 N-甲基哌嗪 (1 mL, 0.423 3 mmol) 反应得到, 粗品用硅胶柱色谱纯化, 洗脱剂为石油醚-乙酸乙酯 8:1 (v/v), 得到白色粉末 15 mg, 产率为 9.9%, mp 177.6~180.1 °C。

1.16 3-肉桂酰氧亚氨基-齐墩果烷型-12-烯-28-(2-咪唑-1-)-乙酯 (9c) 按照 9a 的合成方法, 由 100 mg 化合物 8 (0.212 0 mmol) 与 31.21 mg 咪唑 (0.439 6 mmol) 反应得到, 粗品用硅胶柱色谱纯化, 洗脱剂为石油醚-乙酸乙酯 6:1 (v/v), 得到白色粉末 11 mg, 产率为 7.4%, mp 188.4~190.5 °C。

1.17 3-肉桂酰氧亚氨基-齐墩果烷型-12-烯-28-(2-哌啶-1-)-乙酯 (9d) 按照 9a 的合成方法, 由 100 mg 化合物 8 (0.212 0 mmol) 与 1 mL 哌啶 (0.421 4 mmol) 反应得到, 粗品用硅胶柱色谱纯化, 洗脱剂为石油醚-乙酸乙酯 8:1 (v/v), 得到白色粉末 12 mg, 产率为 7.9%, mp 188.9~193.4 °C。

2 初步体外细胞毒活性测试

选择人宫颈癌 HeLa 细胞、肝癌 HepG2 细胞和胃癌 BGC-823 细胞为靶细胞, 用吉非替尼和依托泊苷为阳性对照物, 用 MTT 比色法测定化合物细胞毒活性。

取 0.25% 胰蛋白酶消化单层培养的 HeLa (HepG2 或 BGC-823) 细胞, 用含 10% 小牛血 RPMI 1640 培养液调整细胞数为每毫升 $2 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$ 的单细胞悬液, 以每孔 200 μL 接种于 96 孔培养板中。将培养板放入 CO₂ 培养箱, 在 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养, 待培养细胞贴壁后, 分别加入浓度为 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-8} mol·L⁻¹ 的待测药物, 每浓度 6 个孔, 实验设空白对照组, 继续放入 CO₂ 培养箱, 在 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养 72 h。培养 72 h 后, 每孔加入 MTT 溶液 (5 mg·mL⁻¹) 20 μL, 37 °C 继续培养 4 h, 中止培养, 离心弃去孔内上清液, 每孔加入 150 μL DMSO 溶解甲臞沉淀, 超声振荡 10 min 混均。在 MR700 型酶联免疫检测仪上测定 570 nm 处各孔吸光度 (A) 值, 按公式:

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照组平均}A\text{值} - \text{给药组平均}A\text{值}}{\text{对照组平均}A\text{值}} \times 100\%$$

计算化合物对细胞的抑制率, 重复测试 3 次, 取平均值为最终结果。

References

- [1] Liu J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid [J]. J Ethnopharmacol, 1995, 49: 57–68.
- [2] Ovesna Z, Vachalkova A, Horvathova K, et al. Pentacyclic triterpenoic acids: new chemoprotective compounds [J]. Neoplasma, 2004, 51: 327–333.
- [3] Aggarwal BB, Takada Y, Oommen OV. From chemoprevention to chemotherapy common targets and common goals [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2004, 13: 1327–1338.
- [4] Aparecida Resende F, de Andrade Barcala CA, da Silva Faria MC, et al. Antimutagenicity of ursolic acid and oleanolic acid against doxorubicin induced clastogenesis in Balb/c mice [J]. Life Sci, 2006, 79: 1268–1273.
- [5] Gong XJ, Ding H, Qiu YS, et al. Toxicity of cyclophosphamide on primary cultured hepatocytes of rat and protective effects of oleanolic acid [J]. Her Med (医药导报), 2006, 25: 1114–1116.
- [6] Jeong HG. Inhibition of cytochrome P450 2E1 expression by oleanolic acid: hepatoprotective effects against carbon tetrachloride-induced hepatic injury [J]. Toxicol Lett, 1999, 105: 215–222.
- [7] Hsu HY, Yang JJ, Lin CC. Effects of oleanolic acid on inhibiting tumor growth and enhancing the recovery of hematopoietic system postirradiation in mice [J]. Cancer Lett, 1997, 111: 7–13.
- [8] Kashiwada Y, Wang HK, Nagao T, et al. Anti-AIDS agents. 30. Anti-HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid and structurally related triterpenoides [J]. J Nat Prod, 1998, 61: 1090–1095.
- [9] Ortiz Andrade RR, Garcia-Jimenez S, Castillo-Espana P, et al. α -Glucosidase inhibitory activity of the methanolic extract from *Tournefortia hartwegiana*: an anti-hyperglycemic agent [J]. J Ethnopharmacol, 2007, 109: 48–53.
- [10] Chen L, Shang J, Wang ZF, et al. Synthesis and biological evaluation of nitrate-oleanolic acid hybrids as inhibitors of HepG2 cell apoptosis [J]. Acta Pharma Sin (药学报), 2010, 45: 1516–1522.
- [11] Li QL, Gu J, Li LZ. Synthesis of oleanolic acid derivatives [J]. Chin J Synth Chem (合成化学), 2010, 18: 290–296.
- [12] Huang X, Chen S, Du Y, et al. Synthesis of oleanolic acid saponins mimicking components of Chinese folk medicine Di Wu [J]. Carbohydr Res, 2009, 344: 1153–1158.
- [13] Liu D, Meng YQ, Zhao J, et al. Synthesis and anti-tumor activity of novel amide derivatives of ursolic acid [J]. Chem Res Chin Univ, 2008, 24: 42–46.
- [14] Meng YQ, Liu D, Cai LL, et al. The synthesis of ursolic acid derivatives with cytotoxic activity and the investigation of their preliminary mechanism of action [J]. Bioorg Med Chem, 2009, 17: 848–854.
- [15] Meng YQ, Liu D, Bai ZW, et al. Synthesis and anti-tumor activity of ursolic acid derivatives [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2011, 46: 556–560.