

熊果酸衍生物的合成及抗肿瘤活性的研究

孟艳秋*, 刘 丹, 白忠伟, 蔡伶俐, 艾宏儒

(沈阳化工大学制药工程教研室, 辽宁 沈阳 110142)

摘要: 以天然产物熊果酸为先导化合物, 经过氧化、酰化、酯化(酞化)、水解等反应设计合成了 16 个熊果酸衍生物, 其中包括 11 个新五环三萜化合物, 以 HeLa、SKOV3 和 BGC-823 细胞为靶细胞, MTT 法进行初步的体外抗肿瘤活性研究。结果表明, 化合物 **7a** 对 HeLa 细胞的抑制活性、化合物 **8a** 对 SKOV3 细胞的抑制活性均明显强于熊果酸, 值得进一步研究。

关键词: 熊果酸; 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) 05-0556-05

Synthesis and anti-tumor activity of ursolic acid derivatives

MENG Yan-qi*, LIU Dan, BAI Zhong-wei, CAI Ling-li, AI Hong-ru

(Department of Pharmaceutical Engineering, Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang 110142, China)

Abstract: Structure of natural product-ursolic acid was modified for increasing its antitumor activity. Ursolic acid was acylated, esterified, hydrolized or oxidized to obtain target pentacyclic triterpenoid compounds with different substitutes. Sixteen derivatives of ursolic acid were designed and synthesized including eleven new compounds. Anti-tumor activities of ursolic acid and these derivatives against HeLa, SKOV3 and BGC-823 cells *in vitro* were investigated by MTT assay. The results indicated that compounds **7a** and **8a** were found to have stronger cell growth inhibitory than ursolic acid on HeLa cells and SKOV3 cells separately, and are worth to be intensively studied further.

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

熊果酸 (ursolic acid, UA) 又名乌索酸 (乌苏酸), 属五环三萜类化合物^[1]。它在自然界分布广泛, 如存在于杜鹃花科植物熊果的叶、果实中, 玄参科植物毛泡桐的叶中。其具有广泛的生物活性, 包括抗癌、对肝损伤的保护、抗菌消炎和抗病毒等作用^[2, 3]。研究证明, 熊果酸 3 羟基成酯为亲酯基团, 28 位羧基呈酰胺的衍生物抗肿瘤活性较好^[4, 5]。参考五环三萜化合物结构改造的经验^[4-8], 以熊果酸为先导化合物, 保留 12 位双键不变, 对 3 位羟基和 28 位羧基进行改造, 合成了 16 个熊果酸的衍生物 (其中 11 个化合物

为首次报道的化合物), 并对其进行了体外抗肿瘤活性的筛选, 以期从中发现结构新颖的抗肿瘤化合物。

以熊果酸 (化合物 **1**) 为原料, 保留五环三萜骨架和 28 位羧基, 将 3 位羟基氧化为羰基得化合物 **2**; 保留五环三萜骨架和 28 位羧基, 与不同的酸酐反应得到 3 位为烷酰氧基的衍生物 **3a~3c**; 3 位为烷酰氧基时, 28 位羧基与醇成酯得化合物 **5a~5g**; 3 位分别为酰氧基、羟基或羰基时, 28 位羧基成酰胺的化合物 **6a、6b、7a、8a 和 8b**。见合成路线 1。

结果与讨论

1 化学合成

以熊果酸为起始原料, 经过氧化、酰化、酯化(酞化)、水解等反应得到 16 个目标化合物, 经 ¹H NMR、

收稿日期: 2011-01-06.

基金项目: 教育部留学回国人员基金 (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

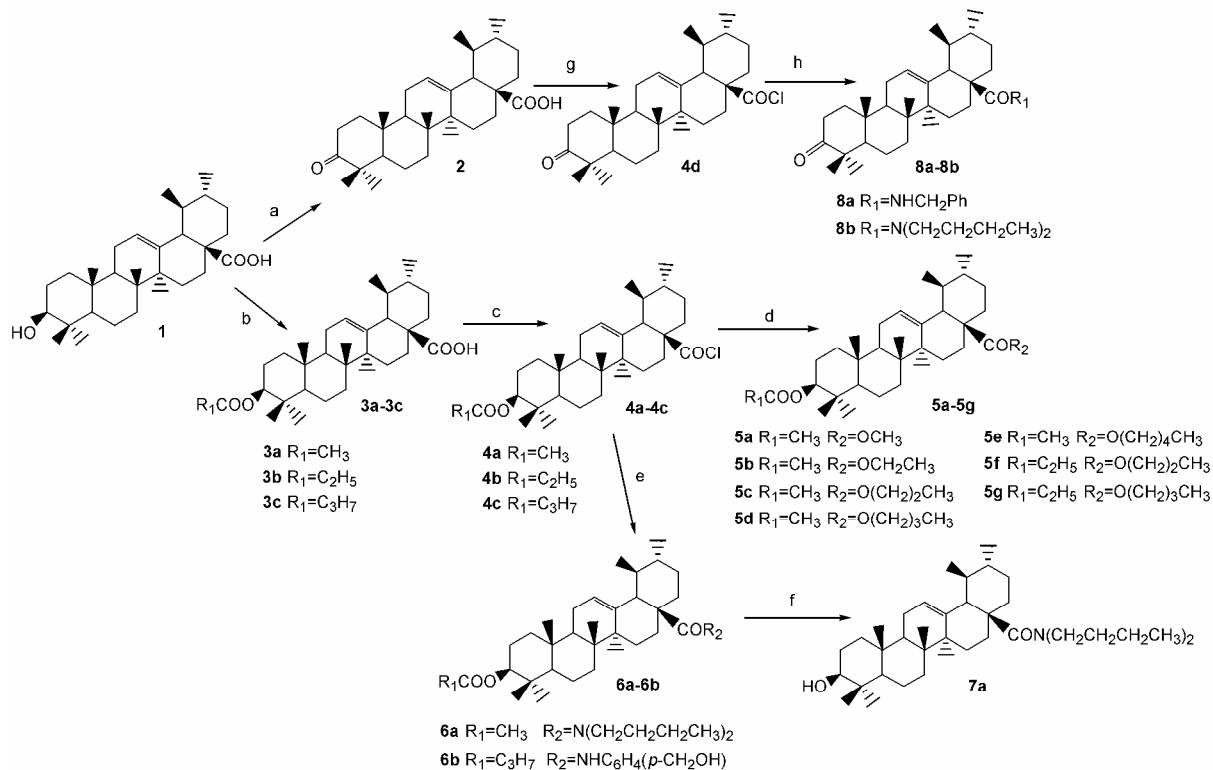
元素分析和 MS 确证其结构, 数据见表 1 和表 2。

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 中数据可知, 在化合物浓度为 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 当熊果酸的 28 位羧基游离, 3 位羟基被乙(丙、丁)酰氧基取代后得到的化合物 **3a~3c** 和母体



Scheme 1 Synthetic routes of target compounds

Reagents and conditions: (a) PDC, CH_2Cl_2 , rt.; (b) $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ or $(\text{C}_2\text{H}_5\text{CO})_2\text{O}$ or $(\text{C}_3\text{H}_7\text{CO})_2\text{O}$, DMAP, THF, rt.; (c) (g) $(\text{COCl})_2$, CH_2Cl_2 , rt.; (d) ROH, Et_3N , rt.; (e) $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ or $\text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_4(p\text{-CH}_2\text{OH})$, Et_3N , rt.; (f) $\text{CH}_3\text{OH}/\text{THF}$, NaOH; (h) PhCH_2NH_2 , $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, Et_3N , rt.

Table 1 MS and elemental analysis data of target compounds. * Novel compounds

Compd.	ESI-MS (m/z)	Elemental analysis/ Calcd.(Found)			
		C	H	N	O
2	453.2 $[\text{M}-\text{H}]^-$				
3a	497.6 $[\text{M}-\text{H}]^-$				
3b	511.5 $[\text{M}-\text{H}]^-$				
3c	525.5 $[\text{M}-\text{H}]^-$				
5a	535.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$				
5b *	549.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$	77.21 (77.52)	10.40 (10.33)		12.23 (12.15)
5c *	563.7 $[\text{M}+\text{Na}]^+$	77.34 (77.73)	10.48 (10.44)		11.70 (11.83)
5d *	577.6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$	77.64 (77.93)	10.59 (10.54)		11.45 (11.53)
5e *	568.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$	77.96 (78.12)	10.56 (10.63)		11.29 (11.25)
5f *	577.5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$	77.76 (77.93)	10.65 (10.54)		11.41 (11.53)
5g *	569.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$	77.88 (78.12)	10.57 (10.63)		11.30 (11.25)
6a *	610.7 $[\text{M}+\text{H}]^+$	78.41 (78.76)	11.03 (11.07)	2.28 (2.30)	7.80 (7.87)
6b *	632.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$	77.63 (77.93)	9.81 (9.73)	2.20 (2.22)	10.20 (10.13)
7a *	568.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$	79.89 (80.36)	11.69 (11.54)	2.44 (2.47)	5.56 (5.63)
8a *	560.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$	81.30 (81.72)	9.68 (9.82)	2.54 (2.58)	5.63 (5.88)
8b *	566.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$	79.94 (80.65)	11.14 (11.22)	2.51 (2.48)	5.59 (5.65)

Table 2 ¹H NMR data of target compounds. ^aNovel compounds

Compd.	¹ H NMR (CDCl ₃)
2	5.26 (s, 1H, H-12), 2.51 (m, 1H, H-2a), 2.39 (m, 1H, H-2b), 2.20 (d, 1H, <i>J</i> = 11.1 Hz, H-18), 1.08 (s, 6H, CH ₃ ×2), 1.05 (s, 3H, CH ₃), 1.02 (s, 3H, CH ₃), 0.95 (s, 3H, CH ₃), 0.86 (d, 3H, <i>J</i> = 6.4 Hz, CH ₃), 0.82 (s, 3H, CH ₃)
3a	5.23 (s, 1H, H-12), 4.50 (t, 1H, <i>J</i> = 7.9 Hz, H-3), 2.20 (d-like, 1H, <i>J</i> = 11.4 Hz, H-18), 2.04 (s, 3H, CH ₂ CO), 1.07 (s, 3H, CH ₃), 0.95 (s, 6H, CH ₃ ×2), 0.86–0.81 (m, 9H, CH ₃ ×3), 0.76 (s, 3H, CH ₃)
3b	5.25 (s, 1H, H-12), 4.50 (t-like, 1H, <i>J</i> = 7.5 Hz, H-3), 2.33–2.28 (m, 2H, -CH ₂ CO), 2.19 (d, 1H, <i>J</i> = 10.8 Hz, H-18), 1.15 (t, 3H, <i>J</i> = 7.6 Hz, CH ₂ CH ₂ COO), 1.08 (s, 3H, CH ₃), 0.95 (s, 6H, CH ₃), 0.85 (s, 9H, CH ₃ ×3), 0.78 (s, 3H, CH ₃)
3c	5.23 (s, 1H, H-12), 4.50 (t-like, 1H, <i>J</i> = 7.3 Hz, H-3), 2.31–2.26 (m, 2H, -CH ₂ CO), 2.19 (d, 1H, <i>J</i> = 11.4 Hz, H-18), 1.08 (s, 3H, CH ₃), 0.97–0.92 (s, 9H, CH ₃ ×3), 0.86–0.85 (s, 9H, CH ₃ ×3), 0.78 (s, 3H, CH ₃)
5a	5.25 (br s, 1H, H-12), 4.52 (t, 1H, <i>J</i> = 7.9 Hz, H-3), 3.62 (s, 1H, -CH ₃), 2.06 (s, 3H, CH ₃ COO-), 1.91, 1.34 (d, each 3H, <i>J</i> = 3.3 Hz, -CH ₃), 1.19, 1.10, 0.98, 0.87, 0.76 (s, each 3H, -CH ₃)
5b^a	5.23 (br s, 1H, H-12), 4.52 (t, 1H, <i>J</i> = 7.7 Hz, H-3), 4.06 (q, 2H, <i>J</i> = 7.1 Hz, -CH ₂ -), 2.06 (s, 3H, CH ₃ COO-), 1.91, 1.33 (d, each 3H, <i>J</i> = 10.3 Hz, -CH ₃), 1.19, 1.05, 0.94, 0.87, 0.75 (s, each 3H, -CH ₃)
5c^a	4.05 (s, 1H, H-3), 3.95 (s, 2H, -CH ₂ -), 2.05 (s, 3H, CH ₃ COO-), 1.91, 1.63 (d, each 3H, <i>J</i> = 10.5 Hz, -CH ₃), 1.33, 1.07, 0.94, 0.87, 0.76 (s, each 3H, -CH ₃)
5d^a	5.26 (br s, 1H, H-12), 4.52 (t, 1H, <i>J</i> = 8.7 Hz, H-3), 4.02 (t, 2H, <i>J</i> = 7.3 Hz, -CH ₂ -), 2.05 (s, 3H, CH ₃ COO-), 1.93, 1.67 (d, each 3H, <i>J</i> = 7.9 Hz, -CH ₃), 1.36, 1.09, 0.92, 0.87, 0.78 (s, each 3H, -CH ₃)
5e^a	5.25 (br s, 1H, H-12), 4.52 (t, 1H, <i>J</i> = 4.2 Hz, H-3), 4.00 (t, 2H, <i>J</i> = 4.0 Hz, -CH ₂ -), 2.05 (s, 3H, CH ₃ COO-), 1.93, 1.67 (d, each 3H, <i>J</i> = 7.4 Hz, -CH ₃), 1.36, 1.09, 0.92, 0.87, 0.78 (s, each 3H, -CH ₃)
5f^a	5.27 (br s, 1H, H-12), 4.52 (t, <i>J</i> = 5.3 Hz, 1H, H-3), 3.96 (s, 2H, -CH ₂ -), 2.35 (q, 2H, <i>J</i> = 7.2 Hz, -CH ₂ COO), 1.91, 1.52 (d, each 3H, <i>J</i> = 7.5 Hz, -CH ₃), 1.35, 1.10, 0.96, 0.88, 0.78 (s, each 3H, -CH ₃)
5g^a	5.26 (br s, 1H, H-12), 4.52 (t, 1H, <i>J</i> = 7.6 Hz, H-3), 4.01 (t, 2H, <i>J</i> = 4.1 Hz, -CH ₂ -), 2.35 (q, 2H, <i>J</i> = 7.6 Hz, CH ₂ COO), 1.92, 1.53 (d, each 3H, <i>J</i> = 6.9 Hz, -CH ₃), 1.35, 1.16, 0.94, 0.88, 0.78 (s, each 3H, -CH ₃)
6a^a	5.24 (s, 1H, H-12), 4.51–4.49 (m, 1H, H-3) 3.09 (br, 4H, NCH ₂ -NCH ₂), 2.45 (m, 1H, H-18), 2.04 (s, 3H, CH ₂ CO), 1.08 (s, 3H, CH ₃), 0.96–0.87 (m, 21H, CH ₃ ×7), 0.80 (s, 3H, CH ₃)
6b^a	8.61 (s, 1H, NH), 7.98 (d, 1H, <i>J</i> = 8.7 Hz, Ar-H), 7.30–7.26 (m, 1H, Ar-H), 7.19 (d-like, 1H, <i>J</i> = 7.4 Hz, Ar-H), 7.06 (t-like, 1H, <i>J</i> = 7.3 Hz, Ar-H), 5.39 (s, 1H, H-12), 4.64 (s, 2H, CH ₂ OH), 4.49 (m, 1H, H-3), 2.33–2.30 (m, 2H, CH ₂ COO), 1.12 (s, 3H, CH ₃), 0.98–0.90 (m, 12H, CH ₃ ×4), 0.85–0.83 (m, 6H, CH ₃ ×2), 0.78 (s, 3H, CH ₃)
7a^a	5.23 (s, 1H, H-12), 3.21 (br, 4H, H ₂ NCH ₂), 3.21 (br, 1H, H-3), 1.07 (s, 3H, CH ₃), 0.98 (s, 3H, CH ₃), 0.94–0.92 (m, 12H, CH ₃ ×4), 0.87 (d, 3H, <i>J</i> = 6.3 Hz, CH ₃), 0.78 (s, 6H, CH ₃ ×2)
8a^a	7.37–7.23 (m, 5H, Ar-H), 6.16 (br, 1H, NH), 5.23 (s, 1H, H-12), 4.57 (dd, 1H, <i>J</i> = 14.7, 6.0 Hz, Ar-CH _a), 4.16 (dd, 1H, <i>J</i> = 14.7, 4.5 Hz, Ar-CH _b), 2.22 (s, 2H, CH ₂ CO), 1.09 (s, 3H, CH ₃), 0.96 (s, 3H, CH ₃), 0.91 (s, 3H, CH ₃), 0.86 (br, 9H, CH ₃ ×3), 0.72 (s, 3H, CH ₃)
8b^a	5.27 (s, 1H, H-12), 3.28 (br, 4H, NHCH ₂), 2.51–2.42 (m, 2H, H-2), 1.08–1.04 (m, 9H, CH ₃ ×3), 0.95–0.93 (m, 9H, CH ₃ ×3), 0.87 (d, 3H, <i>J</i> = 6.5 Hz, CH ₃), 0.84 (s, 6H, CH ₃ ×2)

Table 3 Structure and anti-tumor activity of target compounds on HeLa, SKOV3 and BGC-823 cells. ^aThe concentration is 1×10⁻⁵ mol·L⁻¹; nt: Not tested

Compd. ^a	Inhibition rate/%		
	HeLa	SKOV3	BGC-823
Ursolic acid	12.36	9.06	10.20
2	17.62	10.53	nt
3a	37.83	nt	nt
3b	21.54	14.00	13.69
3c	26.67	19.70	11.23
5a	6.40	5.86	nt
5b	20.19	8.84	nt
5c	8.80	9.40	nt
5d	nt	nt	26.85
5e	nt	nt	24.16
5f	nt	nt	9.62
5g	nt	nt	6.22
6a	3.46	7.59	nt
6b	10.67	22.88	nt
7a	41.61	16.72	nt
8a	23.87	46.28	nt
8b	-10.69	9.81	nt

熊果酸相比, 抑制 HeLa 细胞生长的活性略有提高, 抑制率分别为 37.83%、21.54% 和 26.67%。当熊果酸的 3 位羟基被乙酰氧基取代、28 位羧基与醇反应形成的羧酸酯类化合物 **5a~5c** 的抑制 HeLa 细胞生长的活性较 **3a** 降低。将熊果酸的 28 位羧基游离、3 位羟基氧化为羰基 (化合物 **2**), 活性和熊果酸相似, 对 HeLa、SKOV3 细胞生长的抑制率分别为 17.62% 和 10.53%。曾报道当 3 位为乙酰氧基、28 位羧基与苯胺形成酰胺的化合物的抑制 HeLa 细胞生长的活性比熊果酸明显提高, 抑制率达 55.66%^[7]; 当 3 位为羰基、28 位与苯胺形成的酰胺化合物 **8a** 对 HeLa、SKOV3 细胞的抑制活性较熊果酸明显提高, 分别为 23.87% 和 46.28%, 说明 28 位羧基与苯胺成酰胺有助于活性提高。3 位为乙酰氧基、28 位羧基与二正丁胺形成的酰胺化合物抑制 HeLa 细胞生长的活性低于熊果酸, 而 3 位羟基游离、28 位羧基二正丁胺形成的酰胺化合物对 HeLa 细胞生长的抑制活性又显著提高, 抑制率为 41.61%, 当 3 位为羰基、28 位与二

正丁胺形成的酰胺化合物 **8b** 对 HeLa 细胞却有促进生长的作用。

3 小结

初步的药理实验结果说明, 熊果酸 3 位羟基氧化、28 位羧基成酯不能提高抗肿瘤活性, 28 位羧基所连接胺的结构对抑制活性有较大的影响。本研究结果对熊果酸的结构进一步修饰具有一定的指导意义。

实验部分

1 仪器与试剂

X-4 数字显示显微熔点测定仪; Bruker 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。熊果酸购于成都思科华生物制品有限公司; 薄层色谱硅胶 GF254、硅胶 H 为青岛海洋化工厂生产, 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、SKOV3、BGC-823 细胞为天津武警医学院药学系提供。

2 化学合成

2.1 3-氧代-乌苏烷型-12-烯-28-羧酸 (2) 将 50 mg 熊果酸 (0.11 mmol) 加入到 15 mL 二氯甲烷中溶解, 依次加入 150 mg 硅藻土、129.8 mg 重铬酸吡啶 (PDC) (0.44 mmol)。室温下搅拌, 以 TLC 检测反应终点, 4 h 反应完毕, 抽滤, 滤饼以二氯甲烷洗涤 (5 mL \times 2), 合并滤液和洗液, 浓缩至 1 mL, 硅胶柱色谱纯化, 洗脱剂为石油醚/乙酸乙酯 = 4 : 1 (v/v), 得白色固体 14.9 mg, 产率 29.8%。

2.2 3 β -乙酰氧基-乌苏烷型-12-烯-28-羧酸 (3a) 将 200 mg 熊果酸 (0.44 mmol) 溶于 20 mL 四氢呋喃溶液中, 依次加入 2 mL 吡啶、180 mg 乙酸酐 (1.76 mmol) 和少量 DMAP, 室温下搅拌, 以 TLC 检测反应终点, 反应完毕, 蒸除反应溶剂, 以水分散固体, 2 mol·L⁻¹ 盐酸调 pH 3~4, 抽滤, 滤饼水洗至中性, 室温自然干燥, 得白色固体 210 mg, 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), 得白色固体 182.2 mg, 产率为 83.6%。mp 285~288 °C。

2.3 3 β -丙酰氧基-乌苏烷型-12-烯-28-羧酸 (3b) 按照化合物 **3a** 的合成方法, 由熊果酸 (50 mg, 0.11 mmol) 和丙酸酐 (71.58 mg, 0.55 mmol) 在 DMAP 的催化作用下得到, 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), 得白色粉末状固体 19.5 mg, 产率 45.8%。mp 240~244 °C。

2.4 3 β -丁酰氧基-乌苏烷型-12-烯-28-羧酸 (3c) 按照化合物 **3a** 的合成方法, 由熊果酸 (100 mg, 0.22

mmol) 和丁酸酐 (139.20 mg, 1.1 mmol) 在 DMAP 的催化作用下得到, 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), 得白色粉末状固体 46.2 mg, 产率 39.9%。mp 183~184 °C。

2.5 3 β -乙酰氧基-乌苏烷型-12-烯-28-羧酸甲酯 (5a) 将 100 mg (0.20 mmol) **3a** 溶于 5 mL 的二氯甲烷中, 滴加 0.08 mL 草酰氯, 室温反应 24 h, 减压蒸干溶剂, 加入 5 mL 环己烷溶解, 蒸干溶剂, 重复操作 3 次, 得化合物 **4a**。将化合物 **4a** 溶于 5 mL 二氯甲烷, 加三乙胺调 pH 8~9, 加入无水甲醇 (0.80 mmol)。室温搅拌, 用 TLC 检测反应终点。反应完毕以 2 mol·L⁻¹ HCl 酸化至 pH 3~4, 有机相以饱和氯化钠水溶液洗涤 (2 \times 15 mL), 合并有机相, 无水 Na_2SO_4 干燥, 放置过夜, 过滤、浓缩, 用硅胶柱色谱纯化, 洗脱剂为石油醚/乙酸乙酯 = 6 : 1 (v/v), 得白色固体 **5a**。收率为 53.62%。mp 123~125 °C。

2.6 3 β -乙酰氧基-乌苏烷型-12-烯-28-羧酸乙酯的制备 (5b) 参照化合物 **5a** 的合成方法, 化合物 **3a** 与无水乙醇反应得化合物 **5b**, 白色固体, 收率为 50.12%。mp 102~105 °C。

2.7 3 β -乙酰氧基-乌苏烷型-12-烯-28-羧酸正丙酯 (5c) 参照化合物 **5a** 的合成方法, 化合物 **3a** 与正丙醇反应得化合物 **5c**, 白色固体, 收率为 65.12%。mp 98~100 °C。

2.8 3 β -乙酰氧基-乌苏烷型-12-烯-28-羧酸正丁酯 (5d) 参照化合物 **5a** 的合成方法, 化合物 **3a** 与正丁醇反应得化合物 **5d**, 白色固体, 收率为 68.65%。mp 96~99 °C。

2.9 3 β -乙酰氧基-乌苏烷型-12-烯-28-羧酸正戊酯 (5e) 参照化合物 **5a** 的合成方法, 化合物 **3a** 与正戊醇反应得化合物 **5e**, 白色固体, 收率为 55.35%。mp 89~93 °C。

2.10 3 β -丙酰氧基-乌苏烷型-12-烯-28-羧酸正丙酯 (5f) 参照化合物 **5a** 的合成方法, 化合物 **3b** 与正丙醇反应得化合物 **5f**, 白色固体, 收率为 58.12%。mp 188~191 °C。

2.11 3 β -丙酰氧基-乌苏烷型-12-烯-28-羧酸正丁酯 (5g) 参照化合物 **5a** 的合成方法, 化合物 **3b** 与正丁醇反应得化合物 **5g**, 白色固体, 收率为 52.12%。mp 176~180 °C。

2.12 N-(3 β -乙酰氧基-乌苏烷型-12-烯-28-酰)-二正丁胺 (6a) 参照化合物 **5a** 的合成方法, 由 **3a** (250 mg, 0.24 mmol) 与二正丁胺 (103 mg, 0.96 mmol) 反应, 粗品用硅胶柱色谱纯化得 **6a**, 白色粉末状固体

157.4 mg, 产率 51.4%。mp 139~142 °C。

2.13 *N*-(3 β -丁酰氧基-乌苏烷型-12-烯-28-酰)-2-氨基苄醇 (**6b**) 参照化合物 **5a** 的合成方法, 化合物 **3c** 与邻氨基苄醇反应, 得白色粉末状固体, 产率 7.2%。mp 106~118 °C。

2.14 *N*-(3 β -羟基-乌苏烷型-12-烯-28-酰)-二正丁胺 (**7a**) 将化合物 **6a** (77 mg, 0.051 mmol) 溶于甲醇/四氢呋喃 (1 mL/1 mL) 溶液中, 加入 4 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液, 40 °C 下搅拌, TLC 检测反应终点。反应结束, 减压蒸出溶剂, 水分散固体, 过滤, 滤饼水洗至中性, 室温干燥, 产物为白色粉末状固体 63.3 mg, 产率 88.4%。

2.15 *N*-(3-氧代-乌苏烷型-12-烯-28-酰)-苄胺 (**8a**) 参照化合物 **5a** 的合成方法, 将 100 mg (0.22 mmol) 化合物 **2** 溶于 5 mL 二氯甲烷中, 滴加 0.08 mL 草酰氯, 室温反应 24 h, 减压蒸干溶剂, 加入 5 mL 环己烷溶解, 蒸干溶剂, 重复操作 3 次, 得化合物 **4d**。将化合物 **4d** 溶于 5 mL 二氯甲烷, 加三乙胺调 pH 8~9, 加入苄胺 (0.80 mmol)。室温搅拌, 用 TLC 检测反应终点。反应完毕以 2 mol·L⁻¹ HCl 酸化至 pH 3~4, 有机相以饱和氯化钠水溶液洗涤 (2 × 15 mL), 合并有机相, 无水 Na₂SO₄ 干燥, 放置过夜, 过滤、浓缩, 浓缩物经柱色谱纯化, 得白色固体 **8a**。收率为 21.40%。

2.16 *N*-(3-氧代-乌苏烷型-12-烯-28-酰)-二正丁胺 (**8b**) 参照化合物 **8a** 的合成方法, 化合物 **4d** 与二正丁胺反应, 得白色粉末状固体 **8b** 11.5 mg, 产率 20.6%。

3 初步体外细胞毒活性测试

选择人宫颈癌 HeLa 细胞、卵巢癌 SKOV3 细胞和胃癌 BGC-823 细胞为靶细胞, 紫杉醇为阳性对照物, 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 (SKOV3 或 BGC-823) 细胞, 用含 10% 小牛血清 RPMI 1640 培养液调整细胞数为 2 × 10⁴ ~ 4 × 10⁴/mL 的单细胞悬液, 以每孔 200 μ L 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 μ L, 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 μ L 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 处各孔吸收度 (A) 值, 按公式:

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

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] Wang P, Zhang ZY, Wu Z. Distribution and epidemiological effect of ursolic acid in medical plants [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2000, 23: 717-721.
- [2] Huang J, Sun Y. The anticancer effect of ursolic acid [J]. Chin J New Drugs (中国新药杂志), 1997, 6: 101-103.
- [3] Lee HY, Chung HY, Kim KH, et al. Induction of differentiation in the cultured F9 teratocarcinoma stem cells by triterpene acids [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 1994, 120: 513-518.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] Shibata S, Takahashi K, Yano S, et al. Chemical modification of glycyrrhetic acid in relation to the biological activities [J]. Chem Pharm Bull, 1987, 35: 1910-1918.
- [7] Jain SM, Atal CK. Synthesis of amino derivatives of ursolic acid [J]. Indian J Chem, 1986, 25B: 427-428.
- [8] Meng YQ, Zhao LX, Liu D, et al. Structure-activity relationship of pentacyclic triterpenes [J]. Chin J New Drugs (中国新药杂志), 2004, 13: 1098-1102.