

· 研究论文 ·

新型齐墩果酸糖苷化衍生物的合成及体外抗 HCT8 活性

邓代艳¹, 王欢², 张勇民³, 李军¹, 董登祥^{1*}

(1. 贵州中医药大学 药学院, 贵州 贵阳 55002; 2. 贵州威门药业股份有限公司, 贵州 贵阳 550018; 3. 法国索邦大学 法国国家科研中心, 巴黎 75005)

摘要: 为提高齐墩果酸的水溶性和稳定性, 以齐墩果酸苷元为起始原料, 对其 28-COOH 进行甲基化修饰后制得齐墩果酸-28-羧甲酯(**1**)。分别以 *D*-半乳糖、*D*-葡萄糖、*D*-氨基葡萄糖为起始原料, 通过对糖羟基的保护与去保护, 得到一系列的二糖、四糖片段。通过三氯乙酰亚胺酯途径和对甲苯磺基途径, 利用合成的糖片段对 **1** 的 3-位羟基进行糖化学结构修饰, 合成了 4 种新型的齐墩果酸糖苷化衍生物(**2**~**5**), 其结构经 ¹H NMR, ¹³C NMR 和 MS(ESI) 表征。采用 MTT 法测试了 **2**~**5** 对高表达人结肠癌细胞(HCT8) 的体外抑制活性。结果表明: **2**~**5** 对 HCT8 有一定的抑制作用, 化合物 **5** 浓度为 1×10^{-3} mmol/L 时, 抑制率达到 $(98.96 \pm 0.10)\%$ 。

关键词: 齐墩果酸; 糖化学; 半乳糖; 结构修饰; 合成; 抗肿瘤活性

中图分类号: O621.3; O629.2

文献标志码: A

DOI: 10.15952/j.cnki.cjsc.1005-1511.19435

Synthesis and *In Vitro* Anti-HCT 8 Activities of Novel Oleanolic Glycoside Derivatives.

DENG Dai-yan¹, WANG Huan², ZHANG Yong-min³,
LI Jun¹, DONG Deng-xiang^{1*}

(1. School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China;

2. Guizhou Weimen Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550018, China;

3. French National Scientific Research Center, University of Sorbonne, Paris 75005, France)

Abstract: In order to improve the water solubility and stability of oleic acid, oleanolic acid-28-carboxy methyl ester(**1**) was obtained by methylating oleanolic acid glycosides with oleanolic acid glycosides. At the same time, using *D*-galactose, *D*-glucose and *D*-glucosamine as starting materials, a series of disaccharide and tetranose fragments were obtained by protecting and deprotecting hydroxyl groups on sugar. Four new oleanolic acid glycosylation derivatives(**2**~**5**) were obtained by glycosylation of 3-hydroxyl groups of **1** by trichloroacetylidene ester pathway and *p*-toluene thio-group pathway. The structures were characterized ¹H NMR, ¹³C NMR and MS(ESI). High expression human colon cancer cell line(HCT8) was used to study the antitumor activities of **2**~**5** *in vitro* by MTT assay. The results showed that **2**~**5** had a certain inhibitory effect on HCT8, and the inhibition rate of compound **5** reached $(98.96 \pm 0.10)\%$ at the highest concentration of 1×10^{-3} mol/L.

Keywords: oleanolic acid; glycol chemistry; galactose; modification; synthesis; antitumor activity

收稿日期: 2019-12-27; 修订日期: 2020-01-20

基金项目: 黔合院士工作站[(2014)4013]

第一作者简介: 邓代艳(1996-), 女, 汉族, 贵州贵阳人, 硕士研究生, 主要从事中药和民族药研究。E-mail: 1847212660@qq.com

通信联系人: 董登祥, 副教授, E-mail: ddx331@163.com

齐墩果酸(Chart 1)又名庆四素,是齐墩果烷型中的五环三萜类化合物,一般为白色粉末,大多以糖苷或游离形式存在于植物中^[1],如青龙衣^[2]、白花蛇舌草、山楂、丁香、大枣、女贞子、枇杷叶及夏枯草等。齐墩果酸具有多种药理活性,如保肝、抗肿瘤、降糖、抗 HIV、抗溃疡、增强免疫等^[3-8],目前,临床上主要以齐墩果酸口服制剂治疗急性慢性肝炎,尤其是急性黄疸型和慢性中毒型肝炎,或者抗癌辅助药物^[9]。恶性肿瘤疾病患者口服齐墩果酸后,吞噬细胞百分比比例显著上升,吞噬指数也有所提高,且体内主要器官无明显损伤。

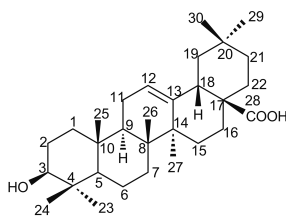


Chart 1

目前,齐墩果酸在临床上运用的制剂品种单一,并且水溶性较差,导致生物利用度不理想。为改善齐墩果酸衍生物的活性和生物利用度,研究人员进行了多方面努力^[10-11]。唐初等^[12]将 C-28 位羧基转化成酯或酰胺,得到的齐墩果酸衍生物具有较强的抗肿瘤活性。王京等^[13]以多种类型的基因作为链段,使羟基与硝酸酯类 NO 供体偶联,合成的齐墩果酸衍生物对人肺癌细胞 A549、人结肠癌细 HT-29 以及人肝癌细胞 SMMC-7721 的抑制活性均较强。Yoshikawa 等^[14]研究了齐墩果酸连不同糖基对降糖活性的影响。发现不能在 C-28 位羧基形成糖苷键,而 C-3 位羟基形成糖苷键能增强活性。

天然产物通过糖基化反应形成的糖苷类化合物,可提高天然产物的稳定性、水溶性和生物利用度^[15-17]。此外,糖链与三萜类化合物的生物活性关系密切,改变糖链可能对皂苷的活性产生较大影响^[18-21]。王欢等^[22]通过糖苷化对常春藤进行结构修饰后,显著提高了常春藤的水溶性,同时增强了其体外抗膀胱癌细胞的活性。

本文在此基础上,以齐墩果酸苷元为起始原料,对其 28-COOH 进行甲基化修饰后制得齐墩果酸-28-羧甲酯(**1**)。分别以 *D*-半乳糖、*D*-葡萄糖、*D*-氨基葡萄糖为起始原料,通过对糖羟基的保护与去保护,得到一系列的二糖、四糖片段。通过三

氯乙酰亚胺酸酯途径和对甲苯硫基途径,利用合成的糖片段对 **1** 的 3-位羟基进行糖化学结构修饰,合成了 4 种新型的齐墩果酸糖苷化衍生物(**2~5**, Scheme 1),其结构经 ¹H NMR, ¹³C NMR 和 MS(ESI)表征。采用 MTT 法测试了 **2~5** 对高表达人结肠癌细胞(HCT8)的体外抑制活性。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

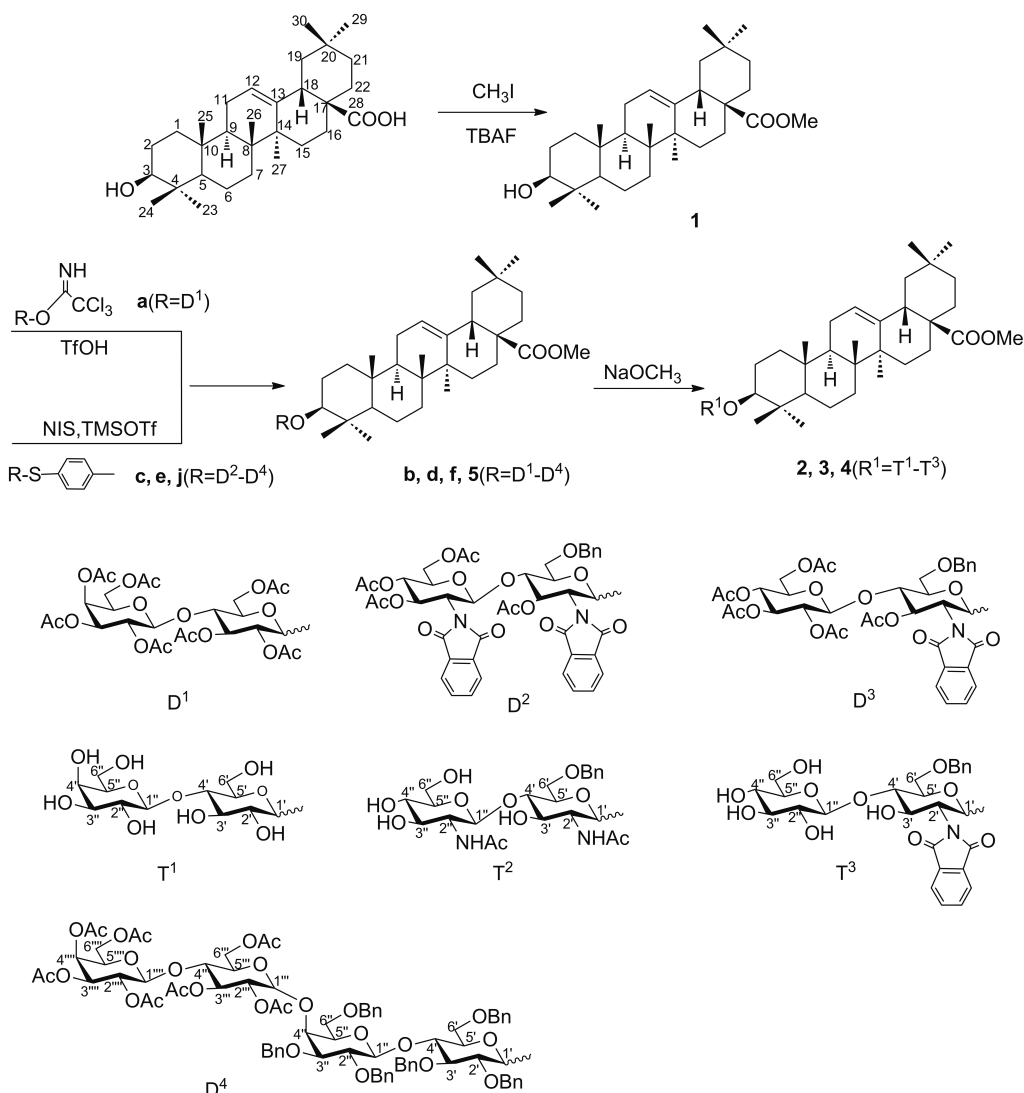
WFH-203B 型三用紫外分析仪;INOVA-400/500 MHz 型核磁共振仪(CDCl₃为溶剂,TMS 为内标);FINNI ANLACQ-DECA 型质谱仪。

D-半乳糖、*D*-葡萄糖、*D*-氨基葡萄糖、 α -乳糖,国药集团化学试剂有限公司;齐墩果酸对照品,纯度 $\geq 99\%$,南京源植生物科技有限公司;2,3,4,6-四-*O*-乙酰基- β -D-吡喃半乳糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-三-*O*-乙酰基-D-吡喃葡萄糖三氯乙酰亚胺酸酯(**a**),对甲基-苯基-S-(2-去氧-2-邻苯二甲酰亚胺基-3,4,6-三-*O*-乙酰基- β -D-吡喃葡萄糖基)-(1 $\rightarrow$ 4)-6-*O*-苄基-2-去氧-2-邻苯二甲酰亚胺基-3-*O*-乙酰基- β -D-吡喃葡萄糖苷(**c**),对甲基-苯基-S-(2,3,4,6-四-*O*-乙酰基- β -D-吡喃半乳糖基)-(1 $\rightarrow$ 4)-6-*O*-苄基-3-*O*-乙酰基-2-去氧-2-邻苯二甲酰亚胺基- β -D-吡喃葡萄糖苷(**e**),对甲基-苯基-S-[(2,3,4,6-四-*O*-乙酰基-D-半乳糖基)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-三-*O*-乙酰基-D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-2,6-二-*O*-苄基-D-半乳糖基)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-三-*O*-苄基-D-葡萄糖苷(**j**);其余所用试剂均为分析纯。

1.2 合成

(1) **1** 的合成^[12]

称取 OA 1.0 g 加入 500 mL 圆底烧瓶中,加入 MeI 2 mL,四丁基氟化铵(TBAF)500 mg,5% NaHCO₃溶液 80 mL 和 DCM 40 mL,通入氮气,搅拌下反应 4 h(TLC 检测,展开剂:A = Cy/EtOAc = 3/2, V/V)。用 DCM/H₂O 萃取,有机相用无水 MgSO₄干燥,过滤,收集滤液,浓缩,残余物经硅胶柱层析(洗脱剂:A = 1/1)纯化得白色固体粉末 **1** 1.03 mg,收率 98.6%, m. p. 156 ~ 158 °C; ¹H NMR(CDCl₃, 400 MHz) δ : 5.28(m, *J* = 2.8 Hz, 1H, 12-H), 3.63(s, 3H, OCH₃), 3.21(m, 1H, 3-H), 2.86(dd, *J* = 14.0 Hz, 4.8 Hz, 1H, 18-H), 1.97(s, H, 11-H), 1.75(m, 2H, 22-H), 1.65(m, 2H, 16-H), 1.59(m, 2H, 2-H),



Scheme 1

1. 48(s, H, 9-H), 1.40(m, 2H, 6-H), 1.39(m, 6H, 1,5,7-H), 1.36(m, 4H, 19,21-H), 1.25(m, 2H, 15-H), 1.12(s, 3H, 27-H), 0.99(s, 3H, 26-H), 0.96(s, 3H, 30-H), 0.93(s, 3H, 23-H), 0.90(s, 3H, 24-H), 0.77(s, 3H, 29-H), 0.72(s, 3H, 25-H); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 400 MHz) δ : 178.3(C^{28}), 143.7(C^{13}), 122.3(C^{12}), 79.0(C^3), 55.2(OMe), 51.5(C^9), 47.6(C^5), 46.7(C^{17}), 45.8(C^{19}), 41.6(C^4), 41.3(C^{14}), 39.2(C^{18}), 38.7(C^8), 37.0(C^{10}), 33.8(C^{21}), 33.1(C^{29}), 32.6(C^{22}), 32.3(C^7), 30.6(C^{20}), 28.1(C^{15}), 26.9(C^{27}), 25.9(C^2), 23.6(C^{11}), 23.3(C^{30}), 23.0(C^{16}), 17.7(C^6), 18.3(C^{26}), 16.8(C^{25}), 15.6(C^{23}), 15.2(C^{24}); MS(ESI) m/z : 493.2 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ 。

(2) 2 的合成

称取化合物 **a** 198 mg(0.25 mmol) 和 **1** 100 mg(0.21 mmol) 加入 50 mL 干燥圆底烧瓶中, 加入 4Å 分子筛 100 mg, 抽真空, 通入氮气, 加入无水 DCM 约 7 mL, 搅拌使其充分溶解; 将反应体系置于冰盐浴条件下搅拌, 平衡 10 min 后加入 $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ 18 μL , 反应至终点(TLC 检测, 展开剂: $A=5/4$)。加入几滴 TEA 终止反应, 用 DCM/ H_2O 萃取, 有机相用无水 MgSO_4 干燥, 过滤, 收集滤液, 减压蒸除溶剂, 残余物经硅胶柱层析(洗脱剂为 $\text{Cy}/\text{EtOAc}=3/1$)纯化, 浓缩得化合物 **b** 45 mg, 收率 20.3%。

称取化合物 **b** 26 mg(0.05 mmol) 加入 50 mL 圆底烧瓶中, 加入 MeOH 约 4 mL, 搅拌使其溶解; 缓慢加入新制 MeONa 溶液, 调 pH 至 12~13, 搅

拌下反应至终点(TLC 检测,展开剂 A = 1/2)。加入阳离子交换树脂调 pH 至弱酸性,滤去树脂,减压浓缩除去甲醇,真空干燥得粗产物,用 HL-20 凝胶柱纯化(洗脱剂:MeOH)纯化,浓缩得白色粉末齐墩果酸-28-羧甲酯-3-*O*-(β -D-吡喃半乳糖基)-(1 $\rightarrow$ 4) β -D-吡喃葡萄糖(**2**) 20 mg, 收率 94.1%, m. p. 24 ~ 248 °C; ^1H NMR (CD_3OD , 500 Hz) δ : 5.23 (brt, J = 3.4 Hz, 1H, 12-H), 4.36 (d, J = 7.6 Hz, 1H, 1''-H Lac), 4.28 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 1'-H Lac), 3.89 (dd, J = 11.9 Hz, 2.5 Hz, 1H, 6''-H Lac), 3.82 (s, 1H, 2''-H Lac), 3.76 (dd, J = 11.5 Hz, 3.9 Hz, 1H, 6''-H Lac), 3.75 (s, 3H, 5''-H Lac, 3''-H Lac), 3.68 (s, 1H, 4''-H Lac), 3.60 (s, 3H, OCH_3), 3.58 (m, 2H, 3'-H Lac), 3.57 (dd, J = 11.9 Hz, 3.3 Hz, 1H, 3-H), 3.53 (dd, J = 7.6 Hz, 2.1 Hz, 1H, 5'-H Lac), 3.47 (t, J = 9.7 Hz, 1H, 6'-H Lac), 3.38 (m, J = 9.4 Hz, 1H, 4'-H Lac), 3.27 (t, J = 8.9 Hz, 1H, 2'-H Lac), 2.85 (dd, J = 13.7 Hz, 4.3 Hz, 1H, 18-H), 2.06 (s, 2H, 11-H), 1.86 (s, 2H, 22-H), 1.61 (s, 2H, 16-H), 1.59 (s, 2H, 2-H), 1.48 (s, 2H, 9-H), 1.40 (s, 2H, 6-H), 1.36 (s, 2H, 5-H), 1.32 (s, 8H, 21-H, 19-H, 1-H, 7-H), 1.13 (s, 3H, 27-H), 0.95 (s, 3H, 30-H), 0.90 (s, 6H, 29-H, 23-H), 0.72 (s, 3H, 26-H), 0.69 (s, 3H, 24-H); ^{13}C NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ : 180.0 (C^{28}), 144.9 (C^{13}), 123.9 (C^{12}), 106.6 ($\text{C}^{1'}$ Lac), 105.0 (C^3), 90.9 ($\text{C}^{5'}$ Lac), 80.7 ($\text{C}^{5''}$ Lac), 77.0 ($\text{C}^{2'}$ Lac), 76.5 ($\text{C}^{4'}$ Lac), 76.2 ($\text{C}^{6'}$ Lac), 75.7 ($\text{C}^{5'}$ Lac), 75.4 ($\text{C}^{3''}$ Lac), 74.7 ($\text{C}^{2''}$ Lac), 73.5 ($\text{C}^{4''}$ Lac), 72.5 ($\text{C}^{6''}$ Lac), 57.0 (OMe), 52.2 (C^9), 49.5 (C^5), 48.1 (C^{17}), 47.0 (C^{19}), 42.8 (C^4), 40.6 (C^{14}), 40.1 (C^{18}), 39.7 (C^8), 37.8 (C^1), 36.4 (C^{10}), 34.7 (C^{21}), 33.9 (C^{29}), 33.7 (C^{22}), 33.5 (C^7), 31.7 (C^{20}), 27.2 (C^{15}), 26.9 (C^{27}), 25.9 (C^2), 24.5 (C^{11}), 24.2 (C^{30}), 23.9 (C^{16}), 18.9 (C^6), 17.6 (C^{26}), 17.2 (C^{25}), 16.9 (C^{23}), 15.9 (C^{24}); MS(ESI) m/z : 817.3 $\{[\text{M} + \text{Na}]^+\}$ 。

(3) **3** 的合成

称取 **c** 50 mg (0.05 mmol)、**1** 50 mg (0.10 mmol)、NIS 15 mg (0.08 mmol) 和 4Å 分子筛 50 mg 加入 25 mL 干燥圆底烧瓶中,抽真空,通入氮

气,加入适量 DCM,搅拌使其溶解;于 0 °C 平衡 10 min 后加入 TfOH 5 μL (0.02 mmol),搅拌下反应 1 h (TLC 检测,展开剂: A = 1/1)。加入饱和 NaHCO_3 和饱和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 淬灭反应,用 $\text{DCM}/\text{H}_2\text{O}$ 萃取,有机相层用无水 MgSO_4 干燥,过滤,收集滤液,减压蒸除溶剂,残余物经硅胶柱层析(洗脱剂: A = 2/1)纯化得白色固体 **d** 22 mg, 收率 32.0%。

称取 **d** 10 mg (0.04 mmol) 加入 25 mL 圆底烧瓶中,加入 Ac_2O 2 mL (0.02 mol) 和 MeOH 2 mL,通入氮气,搅拌下反应 24 h (TLC 检测,展开剂: B = DCM/MeOH = 8/1, V/V)。加入适量 Tol,减压蒸除溶剂,残余物用 MeOH 溶解,过滤,收集滤液,减压蒸除溶剂,残余物经硅胶柱层析(洗脱剂: B)纯化,再用 HL-20 (洗脱剂: MeOH) 纯化得白色固体齐墩果酸-28-羧甲酯-3-*O*-(2-去氧-2-*N*-乙酰基- β -D-吡喃葡萄糖基)-(1 $\rightarrow$ 4)-6-*O*-苄基-2-去氧-2-*N*-乙酰基- β -D-吡喃葡萄糖基(**3**) 8 mg, 收率 74.2%, m. p. 293 ~ 296 °C; ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ : 7.25 ~ 7.35 (m, 5H, Ar-H), 5.48 (d, J = 8.2 Hz, 1H, 1-H Glu), 5.25 (brt, J = 2.8 Hz, 1H, 12-H), 4.87 (m, 1H, 3-H), 3.41 ~ 4.45 (m, 15H, Bn-CH_2 , Glu-H, Gal-H), 3.60 (s, 3H, OCH_3), 3.31 (s, 6H, NCH_3), 3.07 (d, J = 9.4 Hz, 1H, 23-H), 2.85 (dd, J = 14.0 Hz, 4.8 Hz, 1H, 18-H), 2.04 (s, 2H, 11-H), 1.79 (s, 2H, 22-H), 1.68 (s, 2H, 2-H), 1.60 (s, 2H, 16-H), 1.52 (s, 2H, 6-H), 1.36 (s, 4H, 7-H, 1-H), 1.30 ~ 1.34 (s, 5H, 5-H, 19-H, 21-H), 1.14 (s, 3H, 27-H), 0.94 (s, 3H, 26-H), 0.93 (s, 3H, 30-H), 0.92 (s, 3H, 24-H), 0.90 (s, 3H, 24-H), 0.76 (s, 3H, 29-H), 0.73 (s, 3H, 25-H); ^{13}C NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ : 179.4 (C^{28}), 171.6 (2C, NHCOCH_3), 150.8 (C^{13}), 137.2 (C^1 Ar), 128.6 ~ 129.4 (5C, C^{2-6} Ar), 125.9 (C^{12}), 106.7 ($\text{C}^{1'}$ Glu-N), 105.6 ($\text{C}^{1''}$ Glu-N'), 79.6 (Bn-CH_2), 78.72 (C^3), 75.83 ($\text{C}^{2''}$), 74.14 ($\text{C}^{3'}$), 73.02 ($\text{C}^{3''}$) 72.66 ($\text{C}^{3''}$), 72.10 ($\text{C}^{4'}$), 70.26 ($\text{C}^{4''}$), 67.55 ($\text{C}^{6''}$), 56.38 (C^{23}), 52.75 ($\text{C}^{5'}$), 51.76 ($\text{C}^{5''}$), 50.04 (OMe), 49.3 (C^5), 48.9 (C^{17}), 45.4 (C^{14}), 40.8 (C^{19}), 37.7 (C^4), 35.6 (C^2), 34.4 (C^{21}), 32.4 (C^{18}), 31.2 (C^{15}), 30.0 (C^{30} , C^{29}), 29.9 (C^7), 29.5 (C^{16}), 26.5 (C^{22}), 26.3 (C^{11}), 25.6 (C^{27}), 24.8

(C²⁰), 20.9 (2C, NHCCH₃), 18.6 (C⁶), 17.3 (C²⁴), 16.8 (C²⁶); MS(ESI) m/z : 905.3 { [M + Na]⁺ }。

(4) 4 的合成

称取化合物 **e** 150 mg (0.17 mmol) 和 **1** 150 mg (0.31 mmol) 加入 50 mL 干燥圆底烧瓶中, 加入 NIS 60 mg 和 4Å 分子筛 100 mg, 抽真空, 通入氮气, 加入无水 DCM 约 8 mL, 搅拌使其充分溶解; 冰盐浴冷却, 平衡 10 min 后加入 TfOH 8 μL (0.02 mmol), 反应至终点 (TLC 检测, 展开剂: A = 3/2)。加入饱和 NaS₂O₃ 溶液中和过量 NIS, 反应体系由红色变为无色, 再加入饱和 NaHCO₃ 溶液中和过量 TfOH, 用 DCM/H₂O 萃取, 有机相用无水 MgSO₄ 干燥, 过滤, 收集滤液, 减压蒸除溶剂, 残余物经硅胶柱层析 (洗脱剂: A = 3/1) 纯化, 浓缩得化合物 **f** 130 mg, 收率 62.5%。

将 **f** 置于干燥圆底烧瓶中, 加入 Ac₂O 2 mL (0.02 mol) 和 MeOH 2 mL, 通入氮气, 搅拌下反应 24 h (TLC 检测, 展开剂: B = 10/1)。加入适量 Tol, 减压蒸除溶剂, 残余物用 MeOH 溶解, 过滤, 收集滤液, 减压蒸除溶剂, 粗品经硅胶柱层析 (洗脱剂: B = 8/1) 纯化, 再用 HL-20 (洗脱剂: MeOH) 纯化得白色固体齐墩果酸-28-羧甲酯-3-*O*-(β-D-吡喃葡萄糖基)-(1→4)-6-*O*-苄基-2-去氧-2-乙酰氨基-β-D-吡喃葡萄糖基(**4**) 25 mg, 收率 68%, m. p. 274 ~ 277 °C; ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ: 7.22 ~ 7.25 (m, 5H, Ar-H), 5.43 (d, J = 8.2 Hz, 1H, 1-H_{Glu}), 5.21 (brt, J = 2.8 Hz, 1H, 12-H), 4.91 (m, 1H, 3-H), 4.67 (m, 2H, Bn-CH₂), 4.66 (s, 1H, 1''-H), 4.49 (s, 1H, 2'-H), 4.24 (s, 1H, 3'-H), 3.86 (s, 1H, 2''-H), 3.77 (s, 1H, 5''-H), 3.65 (s, 1H, 5'-H), 3.50 (s, 2H, 6''-H), 3.49 ~ 3.55 (m, 3H, 3''-H, 4''-H, 4'-H), 3.53 (s, 3H, OCH₃), 3.32 (s, 3H, NCH₃), 2.92 (d, J = 9.4 Hz, 1H, 23-H), 2.84 (d, J = 14, 1H, 4.8 Hz, 18-H), 1.92 (s, 2H, 22-H), 1.85 (s, 2H, 22-H), 1.68 (s, 2H, 16-H), 1.59 (s, 2H, 2-H), 1.53 (s, 1H, 9-H), 1.46 (s, 2H, 6-H), 1.39 (s, 1H, 5-H), 1.28 (s, 8H, 1-H, 7-H, 19-H, 21-H), 1.14 (s, 3H, 27-H), 0.96 (s, 3H, 26-H), 0.92 (s, 3H, 30-H), 0.90 (s, 3H, 23-H), 0.89 (s, 3H, 24-H), 0.69 (s, 6H, 29-H, 25-H); MS(ESI) m/z : 948.5 { [M + Na]⁺ }。

(5) 5 的合成

称取化合物 **j** 60 mg (0.08 mmol)、**1** 50 mg (0.10 mmol)、NIS 30 mg (0.12 mmol) 和 4Å 分子筛 50 mg 加入 25 mL 干燥圆底烧瓶中, 抽真空, 通入氮气, 加入 DCM 溶解; 于 0 °C 冰浴平衡 10 min, 加入 TfOH 2 μL (0.02 mmol), 搅拌下反应 2 h (TLC 检测, 展开剂: A = 1/1)。加入饱和 NaHCO₃ 和饱和 Na₂S₂O₃ 淬灭反应, 用 DCM/H₂O 萃取, 有机相用无水 MgSO₄ 干燥, 过滤, 收集滤液, 减压蒸除溶剂得粗品, 经硅胶柱层析 (洗脱剂: A = 2/1) 纯化得白色固体齐墩果酸-28-羧甲酯-3-*O*-(β-D-吡喃半乳糖基-(1→4)-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→4)-2,6-二-*O*-苄基-β-D-吡喃半乳糖基-(1→4)-2,3,6-三-*O*-苄基-β-D-吡喃葡萄糖基(**5**) 20 mg, 收率 26.8%; m. p. 320 ~ 322 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.15 ~ 7.23 (m, 25H, Ar-H), 5.31 (d, J = 8.3 Hz, 1H, 1-H_{Lac}), 5.27 (brt, J = 2.8 Hz, 1H, 12-H), 5.14 (m, 1H, 3-H), 5.14 (d, J = 7.8 Hz, 2H, 1'''-H, 1'''-H), 5.06 (s, 1H, 3'''-H), 4.99 (s, 1H, 5'''-H), 4.88 (s, 1H, 2'''-H), 4.75 (s, 8H, Bn-CH₂), 4.65 (s, 1H, 4'''-H), 4.51 (s, 1H, 2'''-H), 3.60 (s, 1H, 3''-H, 3'-H), 4.43 (s, 1H, 5'''-H), 4.39 (s, 1H, 3'''-H), 4.35 (s, 2H, 6'''-H), 4.31 (s, 2H, 6'''-H), 4.24 (s, 2H, 2''-H, 2'-H), 4.13 (s, 2H, 6''-H, 6'-H), 4.04 (s, 1H, 23-H), 3.79 (s, 1H, 5'-H), 3.61 (s, 3H, OCH₃), 3.53 (s, 1H, 5''-H), 3.50 (s, 1H, 4'''-H), 3.28 (s, 1H, 4''-H), 3.26 (s, 1H, 4'-H), 2.03 (s, 24H, 8 × OAc), 3.19 (s, 1H, 3-H), 2.82 (d, J = 14.8 Hz, 18-H), 1.80 (s, 2H, 11-H), 1.68 (s, 2H, 22-H), 1.62 (s, 2H, 16-H), 1.58 (s, 2H, 2-H), 1.40 (s, 2H, 6-H), 1.37 (s, 1H, 9-H), 1.35 (s, 2H, 19-H), 1.32 (s, 1H, 5-H), 1.26 (s, 2H, 21-H), 1.25 (s, 2H, 1-H), 1.24 (s, 2H, 7-H), 1.17 (s, 2H, 15-H), 1.16 (s, 3H, 27-H), 0.97 (s, 3H, 26-H), 0.93 (s, 3H, 30-H), 0.90 (s, 3H, 23-H), 0.87 (s, 3H, 24-H), 0.72 (s, 6H, H-29, H-25); ¹³C NMR δ: 178 (C²⁸), 152.98 (C¹³), 126.67 ~ 128.45 (24C, Ar), 129.78 (C¹²), 101.80 (C^{1'}), 98.64 (C^{1''}), 97.76 (C^{1'''}), 96.69 (C^{1'''}), 80.16 (C³), 78.00 ~ 78.10 (4C, Bn-CH₂), 77.05 (C⁵), 72.93 (C^{5''}), 75.36 (C^{5'''}), 74.18 (C^{5'''}),

72.00 ~ 72.10 (4C, C^{3'''}, C^{3''}, C^{3'}), 69.20 ~ 67.89 (4C, C^{2'''}, C^{2''}, C^{2'}), 67.20 ~ 67.89 (2C, C^{6'''}, C^{6''}, C^{6'}), 65.40 ~ 76.87 (4C, C^{4'''}, C^{4''}, C^{4'}), 56.38 (OMe), 50.82 (C²³), 49.41 (C⁵), 47.34 (C⁹), 46.83 (C¹⁷), 44.75 (C¹⁴), 40.65 (C¹⁹), 40.20 (C⁸), 39.63 (C²¹), 34.92 (C⁴), 33.54 (C¹⁵), 32.43 (C¹⁸), 30.65 (C¹⁰), 29.82 (C¹), 28.82 (C³⁰), 28.47 (C²⁹), 26.57 (C²), 23.97 (C¹¹), 24.70 (C²²), 23.54 (C²⁰), 37.47 (C⁷), 21.52 (C²⁷), 21.97 (C²⁵), 20.63 (C¹⁶), 18.45 (C⁶), 16.59 (C²⁶), 16.24 (C²⁴); MS(ESI) *m/z*: 1607.7 { [M + Na]⁺ }。

1.3 生物活性测试

取对数生长期的人结肠癌 HCT8 细胞,以 3 × 10⁵个/mL 的细胞浓度,每孔按 100 μL 细胞悬液随机平行接种到 96 孔板内,孵育 24 h 后,接种药物。实验设置 4 组,包括空白对照组、正常对照组、阳性对照组、实验组;其中空白培养基对照组为 HCT8 培养基由 90% F ~ 12 K 无血清培养液和 10% 胎牛血清现配而成,正常细胞组为正常培养细胞,以阿霉素为阳性对照组,实验组为化合物 **2~5**。在显微镜下观察细胞生长状态后,加入含有不同药物浓度(浓度分别为 1 × 10⁻³ mmol/L, 1 × 10⁻⁴ mmol/L, 1 × 10⁻⁵ mmol/L, 1 × 10⁻⁶ mmol/L)的新鲜培养基。每组 6 个复孔,分别孵育 24 h 后,每孔加入 10 μL MTT 溶液(浓度为 5 mg/mL),在 5% CO₂ 的恒温孵育箱中继续孵育 4 h。吸去上清液,每孔加入 200 μLDMSO 溶液,振荡 10 min。用酶标仪测定波长 570 nm 处的吸光度值,重复 3 次。

2 结果与讨论

2.1 合成

2~5 的合成采用了三氯乙酰亚胺酸酯和对甲苯硫基两种路线,其中亚胺脂合成法的收率较高,但亚胺脂基团容易失活,主要原因在于合成三氯乙酰亚胺酸酯时,1-位的半缩醛-OH 被 CNCl₃ 保护后,对质子酸较敏感,得到的产物稳定性差。在实验当中,我们多次尝试脱去齐墩果酸 C-28-位上的甲基,如 20% NaOH、30% NaOH、50% NaOH 碱性条件,加热条件,均未成功。用不同浓度 KOH 和酯交换尝试,效果也不太理想。

2.2 抑制活性

表 1 为目标化合物对 HCT8 的体外抑制活性。由表 1 可见,齐墩果酸经 C-28 位甲酯化和 C-3 位连接二糖和四糖后得到的衍生物(**2~4**)在不同浓度下对 HCT8 均具有抑制活性。其中化合物 **5** 在最高浓度 1 × 10⁻³ mmol/L 时,抑制率达到 (98.96 ± 0.10)%。

表 1 目标化合物对 HCT8 的体外抑制率
Table 1 inhibitory rate of target compounds on HCT8 in vitro

化合物	浓度/mmol · L ⁻¹	抑制率/%
2	1 × 10 ⁻⁶	33.01 ± 6.02
	1 × 10 ⁻⁵	41.45 ± 7.07
	1 × 10 ⁻⁴	51.12 ± 0.75
	1 × 10 ⁻³	64.41 ± 0.03
	1 × 10 ⁻⁶	34.04 ± 4.04
3	1 × 10 ⁻⁵	48.80 ± 3.79
	1 × 10 ⁻⁴	92.25 ± 0.28
	1 × 10 ⁻³	96.91 ± 0.12
	1 × 10 ⁻⁶	38.61 ± 6.36
	1 × 10 ⁻⁵	67.75 ± 2.03
4	1 × 10 ⁻⁴	73.46 ± 0.47
	1 × 10 ⁻³	89.53 ± 0.10
	1 × 10 ⁻⁶	36.3 ± 4.61
	1 × 10 ⁻⁵	48.7 ± 2.53
	1 × 10 ⁻⁴	62.9 ± 1.09
5	1 × 10 ⁻³	98.26 ± 0.10
	1 × 10 ⁻⁶	75.19 ± 0.29
	1 × 10 ⁻⁵	98.96 ± 0.05
阿霉素	1 × 10 ⁻⁶	75.19 ± 0.29
	1 × 10 ⁻⁵	98.96 ± 0.05

3 结论

合成了 4 种新型的齐墩果酸糖苷化衍生物(**2~5**),并采用 MTT 法初步评价了化合物对人结肠癌细胞 HCT8 的体外抑制活性。虽然化合物的抑制活性略低于阿霉素,但也为今后齐墩果酸及其衍生药物的开发与应用提供借鉴。对于天然化合物中具有良好活性的化合物,但水溶性差的物质,可考虑用糖片段进行结构的修饰,解决水溶性差的难题。

参考文献

[1] 廖忻,陈文莹,杨杰也,等. 齐墩果酸的来源及护肾作用研究进展[J]. 安徽农学通报,2018,24(06): 156 ~ 160.
(LIAO X, CHEN W Y, YANG J Y, *et al.* Advances

- in the study of oleanolic acid origin and renal protection[J]. *Anhui Agronomy Bulletin*, 2018, **24**(06): 156 – 160.)
- [2] 周媛媛. 抗肿瘤中药青龙衣化学成分的研究[J]. *中草药*, 2010, **41**(1): 11 – 14.
(ZHOU Y Y. Study on chemical constituents of antitumor Chinese medicine Azure Dragon coat[J]. *Chinese Herbs*, 2010, **41**(1): 11 – 14.)
- [3] 李雅玲, 冯威, 陈航宇, 等. 齐墩果酸药理作用研究[J]. *生物技术世界*, 2018, **24**(04): 125 – 127.
(Li Y L, FENG W, CHEN H, *et al.* pharmacological action of oleanolic acid [J]. *Biotechnology World*, 2018, **24**(04): 125 – 127.)
- [4] ZENG Y B, HSIAO H M, CHAN S H, *et al.* Synthesis and anti-cancer activity of a glycosyl library of *N*-acetylglu-cosamine-bearing oleanolic acid [J]. *Moldivers*, 2014, **18**(1): 13 – 23.
- [5] MASTSUNAGA T, MORIKAWA Y, HAGA M, *et al.* EXPosure to 9, 10-Phenanthrene quinone accelerates malignant progression of lung cancer cells through up-regulation of aldo-ke-to reductase IB10 [J]. *Toxicol Appi Pharmacol*, 2014, **278**(2): 180 – 189.
- [6] 苏雨, 王海, 杨彬, 等. 齐墩果酸新对肝癌的抑制作用研究进展[J]. *中国实验诊断学*, 2019, **23**(08): 1470 – 1473.
(SU Y, WANG H Z, YANG B, *et al.* Advances in inhibition of oleanolic acid on liver cancer[J]. *Chinese Experimental Diagnostics*, 2019, **23**(08): 1470 – 1473.)
- [7] 秦丽英. 熊果酸与齐墩果酸对 HepG2 细胞中 Nrf2-UGT2B7/BSEP/MRP2 调控通路的影响及其机制研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2018.
(QIN L Y. Effect of ursolic acid and oleanolic acid on Nrf2-UGT2B7/BSEP/MRP2 regulatory pathway in HepG2 cells and its mechanism [D]. Nanchang: Nanchang University, 2018.)
- [8] 魏振奇, 蔡文卓, 郑晓娟, 等. 齐墩果酸对 α -淀粉酶及脂肪酶的抑制作用[J]. *吉林医药学院学报*, 2017, **38**(02): 102 – 105.
(WEI Z Q, CAI W Z, ZHENG X J, *et al.* inhibition of oleanolic acid on α -amylase and lipase [J]. *Journal of Jilin Institute of Medicine*, 2017, **38**(02): 102 – 105.)
- [9] TANG S, GAO D, ZHAO T, *et al.* An evaluation of the anti-tumor efficacy of oleanolic acid-loaded PEGylated liposomes [J]. *Nanotechnology*, 2013, **24**(23): 235.
- [10] 王巍. 齐墩果酸苄基酯衍生物的合成与表征及其抗癌活性的研究[D]. 济南: 山东大学, 2019.
(WANG W. synthesis and characterization of benzyl oleanate derivatives and their anticancer activity [D]. Jinan: Shandong University, 2019.)
- [11] 陈艳华, 侯熙彦, 支德福, 等. 齐墩果酸和熊果酸衍生物的合成、表征及抗癌活性的研究[J]. *有机化学*, 2016, **36**(04): 795 – 802.
(CHEN Y H, HOU X Y, ZHI D F, *et al.* synthesis, characterization and anticancer activity of oleanolic acid and ursolic acid derivatives [J]. *Organic Chemistry*, 2016, **36**(04): 795 – 802.)
- [12] 唐初. 齐墩果酸的结构修饰与生物活性研究进展[J]. *有机化学*, 2013, **12**(33): 46 – 65.
(TANG C. Progress in structural modification and bioactivity of oleanolic acid [J]. *Organic Chemistry*, 2013, **12**(33): 46 – 65.)
- [13] 王京, 郑诚月, 王杨, 等. 齐墩果酸衍生物的合成、抗癌活性及构效关系研究进展[J]. *国外医药(抗生素分册)*, 2017, **38**(03): 118 – 124.
(WANG J, ZHENG C Y, WANG Y, *et al.* The synthesis, anticancer activity and structure-activity relationship of oleanolic acid derivatives [J]. *Foreign Medicine (Antibiotics Division)*, 2017, **38**(03): 118 – 124.)
- [14] YOSHIKAWA M, MATSUDA H, HARADA E, *et al.* Eelatoside, a new hypoglycemic principle from the root cortex of *Aralia elatense*: Structure-related hypoglycemic activity of oleanolic acid glycosides [J]. *Chem Pharm Bull*, 1994, **42**(6): 1354 – 1356.
- [15] 郑翠, 李琳, 庞浩, 等. 天然产物活性组分的糖基化修饰研究进展[J]. *纤维素科学与技术*, 2012, **20**(01): 62 – 71.
(ZHENG C, LI L, PANG H, *et al.* Advances in glycosylation modification of active components of natural products [J]. *Cellulose Science and Technology*, 2012, **20**(01): 62 – 71.)
- [16] KIM H J, PARK H S, LEE I S. Microbial transformation of silybin by *trichoderma koningii* [J]. *Bioorg MedChem Lett*, 2006, **16**(4): 790 – 793.
- [17] HYE S M, KIM B G, KIM D H, *et al.* Production of flavonoid O-glucoside using sucrose synthase and flavonoid O-glucosyltransferase fusion protein [J]. *Microbiol Biotechnol*, 2009, **19**(7): 709 – 712.
- [18] 曾丽兰, 孙航宇, 洪开文, 等. 新型常春藤皂苷元糖缀合物的合成与体外抗肿瘤活性[J]. *合成化学*, 2018, **26**(4): 229 – 233.
(ZENG L L, SUN H Y, HONG K W, *et al.* synthesis and *in vitro* antitumor activity of novel ivy saponin

- conjugates[J]. Chinese Journal of Synthetic Chemistry, 2018, **26**(4): 229 – 233.)
- [19] SHIMODA K, HANADA H, HAMADA H. Glycosylation of hesperetin by plant cell cultures[J]. Phytochemistry, 2008, **69**(5): 1135 – 1140.
- [20] 洪开文, 贾宪生, 杨贤江, 等. 新型常春藤皂苷元衍生物的合成及其体外抗 HBV 活性[J]. 合成化学, 2017, **25**(1): 18 – 25.
(HONG K W, JIA X S, YANG X J, *et al.* synthesis of novel ivy saponin derivatives and their anti-hbv activity *in vitro*[J]. Chinese Journal of Synthetic Chemistry, **25**(1): 18 – 25.)
- [21] 孙航宇, 欧小洪, 孙薛姣, 等. 18- β -甘草次酸衍生物的合成与体外抗 HBV 活性研究[J]. 贵州科学, 2016, **34**(04): 55 – 56.
(SUN H Y, OU X H, SUN X J, *et al.* synthesis and *in vitro* anti-hbv activity of 18- β -licorice subacid derivatives[J]. Guizhou Science, 2016, **34**(04): 55 – 56.)
- [22] 王欢, 孙航宇, 洪开文, 等. 新型常春藤糖苷衍生物的合成及体外抗人膀胱癌细胞活性[J]. 合成化学, 2018, **26**(4): 240 – 244.
(WANG H, SUN H Y, HONG K W, *et al.* synthesis of novel ivy glycoside derivatives and *in vitro* anti-human bladder cancer cell activity [J]. Chinese Journal of Synthetic Chemistry, 2018, **26**(04): 240 – 244.)