

救必应酸酯类衍生物的合成、鉴定及其体外抗肿瘤活性研究[△]

南敏伦^{1*}, 赫玉芳^{1,2#}, 司学玲³, 赵昱玮⁴, 王 雪^{1,5}, 白 雪^{1,5}, 李川晶^{1,5}(1.吉林省中医药科学院植物化学研究所, 长春 130012; 2.长春中医药大学管理学院, 长春 130117; 3.修正药业集团长春高新制药有限公司, 长春 130012; 4.吉林省吉测检测技术有限公司, 长春 130117; 5.吉林农业大学中药材学院, 长春 130118)

中图分类号 R914.5; R965.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)05-0591-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.05.04

摘要 目的:合成并鉴定救必应酸酯类衍生物,并评价其体外抗肿瘤活性。方法:以救必应酸为原料,通过28位酯化、3 β 位和23位羟基与酸酐反应合成救必应酸酯类衍生物;采用高分辨质谱、核磁共振氢谱、核磁共振碳谱及理化性质对合成的救必应酸酯类衍生物进行结构鉴定。采用MTT法评价紫杉醇(阳性对照)、救必应酸及救必应酸酯类衍生物对人宫颈癌细胞HeLa、人恶性黑色素瘤细胞A375、人肺腺癌细胞SPC-A1、人肝癌细胞HepG2的体外抗肿瘤活性[以半数抑制浓度(IC₅₀)为指标]。结果:共合成了6个救必应酸酯类衍生物,分别为救必应酸甲酯(化合物1)、3,23-O-双(乙酰基)救必应酸甲酯(化合物2)、3,23-O-双(丙酰基)救必应酸甲酯(化合物3)、3,23-O-双(丁酰基)救必应酸甲酯(化合物4)、3,23-O-双(邻苯二甲酰基)救必应酸甲酯(化合物5)及3,23-O-双(丁二酰基)救必应酸甲酯(化合物6)。与紫杉醇比较,化合物5和化合物6对HeLa、A375、HepG2、SPC-A1细胞的抗肿瘤活性与其相似,差异无统计学意义($P>0.05$),救必应酸及其他化合物的IC₅₀显著减小($P<0.05$)。结论:本研究合成了6个救必应酸酯类衍生物,其中化合物5、6具有显著的体外抗肿瘤活性,可为后续研究提供参考。

关键词 救必应酸;衍生物;合成;鉴定;抗肿瘤活性

质量的关键环节。通过3次PDCA循环后,门诊处方前置审核系统得以顺利实施并完善,并提升了处方合格率,提高了处方质量,保障了患者安全、合理用药;有效地杜绝了“大处方”“长处方”,规范了医师的从业行为,提高了医院的诊疗水平。但仍有些问题还需要进一步完善,如知识库中抗菌药品疗程的设置:《处方管理办法》规定门诊处方抗菌药物原则上不得超过3d的量,最多不超过7d的量(抗结核药物除外),但很多科室根据临床应用指南或文献中的抗生素的用药疗程认为此规定不合理,例如消化科在治疗幽门螺旋杆菌感染时,抗生素的使用疗程在2周治疗效果更好^[11-13]等。故这些问题尚待进一步完善解决。我院将继续加强处方前置审核工作的持续改进,使患者的用药安全得到更加切实有效的保障,不断提升医疗质量水平。

参考文献

- [1] 季宏建,岳峰,朱宏亮,等.我院门/急诊电子处方事前审核模式的建立及完善[J].中国药房,2017,28(1):80-83.
- [2] 顾掌生,吴巍.推行事前审核 促进患者安全用药[J].医院管理论坛,2013,30(11):54-58.
- [3] 郑宝丽,杨毅恒.北京大学第三医院处方审核记录分析[J].中国医院用药评价与分析,2011,11(8):751-754.

[△]基金项目:国家自然科学基金面上资助项目(No.31470418)

* 副研究员,硕士。研究方向:植物化学及结构修饰。电话:0431-86058683。E-mail:nml2000@163.com

通信作者:研究员,博士。研究方向:植物化学及结构修饰。电话:0431-86058683。E-mail:hyf_1992@163.com

- [4] 岳峰,朱宏亮,裔照国,等.事前处方点评与事后处方点评改善药学服务质量对比研究[J].中国药业,2016,25(12):77-78.
- [5] 徐宝琴.PDCA循环在提高下肢深静脉血栓高危患者预防措施落实中的应用[J].护理与康复,2017,16(6):664-666.
- [6] 周新燕,顾江.利用质量管理工具控制医疗欠费[J].中国卫生经济,2014,33(9):87-88.
- [7] 陈叶香.PDCA循环在医院食品安全质量管理中的应用[J].中国医药科学,2011,1(24):141-142.
- [8] 马春玲.提高药师的专业知识水平对于安全用药迫在眉睫[J].中国农村卫生,2013(3):272.
- [9] 孙琪,高歌.基于医学知识库的全科医生智能处方辅助系统设计[J].医院管理,2014,14(28):99-100.
- [10] 俞佳,吕良忠,吴越,等.基于智能推理机的医院合理用药审核评价系统的设计与应用研究[J].中国现代应用药学,2012,29(7):664-668.
- [11] 中华医学会消化病学分会幽门螺杆菌学组/全国幽门螺杆菌研究协作组.第四次全国幽门螺杆菌感染处理共识报告[J].中华消化杂志,2012,32(10):655-660.
- [12] 杨雷,郝玮玮,李娅,等.不同疗程伴同疗法与含铋剂四联疗法根除幽门螺杆菌的疗效[J].世界华人消化杂志,2015,23(28):4589-4594.
- [13] 严剑峰.新四联与标准三联疗法不同疗程根除幽门螺杆菌的临床观察[J].中国药业,2013,22(7):54-55.

(收稿日期:2018-09-25 修回日期:2018-12-11)

(编辑:刘 萍)

Study on Synthesis and Identification of Rotundic Acid Esters Derivatives and *in vitro* Antitumor Activity

NAN Minlun¹, HE Yufang^{1,2}, SI Xueling³, ZHAO Yuwei⁴, WANG Xue^{1,5}, BAI Xue^{1,5}, LI Chuanjing^{1,5} (1. Institute of Phytochemistry, Jilin Academy of Chinese Medicine Sciences, Changchun 130012, China; 2. College of Management, Changchun University of TCM, Changchun 130117, China; 3. Xiuzheng Pharmaceutical Group Changchun Hi-tech Pharmaceutical Co., Ltd., Changchun 130012, China; 4. Jilin Jice Detective Technical Co., Ltd., Changchun 130117, China; 5. College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To synthesize and identify rotundic acid esters derivatives, and to evaluate *in vitro* antitumor activity. METHODS: Using rotundic acid as raw material, rotundic acid esters derivatives were synthesized by 28-esterification, 3 β and 23-position hydroxyl group combined with acid anhydride. The structure of rotundic acid esters derivatives were identified by HRMS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR and physicochemical properties. The *in vitro* antitumor activities were evaluated by MTT assay against paclitaxel (positive control), rotundic acid and rotundic acid esters derivatives with human cervical cancer cells HeLa, human malignant melanoma cells A375, human lung adenocarcinoma cells SPC-A1 and human liver cancer cells HepG2 (take IC₅₀ as an indicator). RESULTS: Totally 6 kinds of rotundic acid esters derivatives were synthesized, i.e. rotundic acid methyl ester (compound 1), 3, 23-*O*-di(acetyl) rotundic acid methyl ester (compound 2), 3, 23-*O*-di(propionyl) rotundic acid methyl ester (compound 3), 3, 23-*O*-di(butyryl) rotundic acid methyl ester (compound 4), 3, 23-*O*-di(phthaloyl) rotundic acid methyl ester (compound 5) and 3, 23-*O*-di(succinyl) rotundic acid methyl ester (compound 6). Compared with paclitaxel, the antitumor activity of compound 5 and compound 6 to HeLa, A375, HepG2 and SPC-A1 was similar to it, and there was no significant difference between them ($P > 0.05$); the IC₅₀ of rotundic acid and other compounds decreased with statistical significance ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: In the study, 6 kinds of rotundic acid esters derivatives are synthesized and compound 5 and compound 6 have significant antitumor activity *in vitro*, which can provide reference for further study.

KEYWORDS Rotundic acid; Derivatives; Synthesis; Identification; Antitumor activity

救必应酸(Rotundic acid)是一种五环三萜酸类化合物,主要存在于冬青科冬青属植物中,资源丰富^[1]。相关文献报道,救必应酸具有降血脂^[2]、抗肿瘤^[3]、保护心脑血管^[4]等药理作用,尤其是抗肿瘤活性引起了广大学者的关注。虽然救必应酸具有一定的抗肿瘤活性,但其极性较小、溶解度较差、生物利用度较低,影响了其临床应用。为改善救必应酸生物活性,国内外学者针对其结构特点,通过结构修饰,得到了一系列溶解性好、生物活性强、疗效更确切、毒性更低的化合物,如齐敦果酸^[5]、熊果酸^[6]、桦木酸^[7]等。

根据有关文献报道,在救必应酸母体上引入亲脂基团,可提高其脂溶性,并增强其透过血脑屏障的能力,进而提高其生物活性^[8]。本课题组结合救必应酸3 β 位、19 α 位、23位含有三个羟基,28位含有一个羧基的特点,对救必应酸进行结构修饰,然后以救必应酸为母核,先合成救必应酸甲酯,再与相应的酸酐反应生成救必应酸酯类衍生物,并对合成的救必应酸类衍生物进行结构鉴定,然后评价救必应酸及救必应酸酯类衍生物对人宫颈癌细胞 HeLa、人恶性黑色素瘤细胞 A375、人肺腺癌细胞 SPC-A1、人肝癌细胞 HepG2 的体外抗肿瘤活性,为筛选活性更好的抗肿瘤药物提供参考。

1 材料

1.1 仪器

超净工作台(青岛中建净化空调工程有限公司);

MPA100 熔点测定仪[先锋科技(香港)股份有限公司]; DD2 400-MR 核磁共振波谱(NMR)仪(美国安捷伦公司); ELEMENT GD 电喷雾质谱(ESI-MS)仪(美国赛默飞世尔科技公司); ELX800 酶标仪(美国 Bio-Tek 公司); IX 73 倒置显微镜、DM-1 解剖显微镜均购自上海天放实验仪器有限公司。

1.2 药品与试剂

救必应酸(吉林省中医药科学院植物化学研究所自制,批号:160801,纯度:>99%); MTT(美国 SECOMA 公司,批号:170502); 胎牛血清(美国赛默飞世尔科技公司,批号:160110-159); 胰蛋白酶(上海第一生化药业有限公司,批号:170602); 二甲基亚砜(DMSO,北京索莱宝科技有限公司,批号:161212); 紫杉醇(太极集团四川太极制药有限公司,批号:20160802,纯度:99.5%); 吡啶(西陇化工股份有限公司,批号:151103); 4-二甲氨基吡啶(今日化学技术有限公司,批号:T029057); 丁二酸酐(天津市光复精细化工研究,批号:20170613); 乙酸酐(天津市富鑫商贸有限公司,批号:170201); 丙酸酐(批号:47093)、丁酸酐(批号:B108974)、邻苯二甲酸酐(批号:52026)均购自阿拉丁试剂(上海)有限公司。

1.3 细胞

人宫颈癌细胞 HeLa、人恶性黑色素瘤细胞 A375、人肺腺癌细胞 SPC-A1、人肝癌细胞 HepG2 均由吉林大学基础医学院提供。

2 救必应酸酯类衍生物的合成、鉴定及其抗肿瘤活性检测

本研究共合成6个救必应酸酯类衍生物(编号:化合物1~6),并采用MS、核磁共振氢谱($^1\text{H-NMR}$)、核磁共振碳谱($^{13}\text{C-NMR}$)等波谱手段及其理化性质对化合物1~6进行鉴定。救必应酸酯类衍生物合成路线见图1。

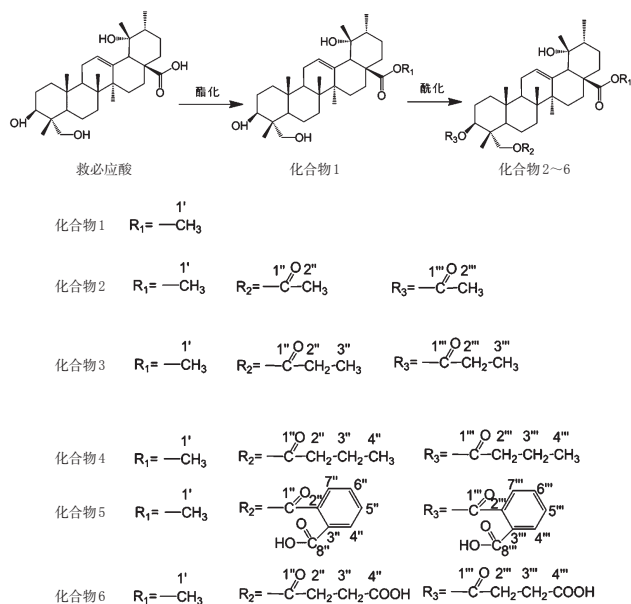


图1 救必应酸酯类衍生物的合成路线

Fig 1 Synthetic route of Rotundic acid esters derivatives

2.1 化合物1的合成与鉴定

2.1.1 化合物1的合成 取救必应酸0.976 g(2 mmol),置于圆底烧瓶中,加入*N,N*-二甲基甲酰胺25 mL,无水碳酸钾1.104 g(8 mmol),碘甲烷0.62 mL(10 mmol),反应过程中用薄层色谱(TLC)法检测反应至无救必应酸。反应结束后,加入水200 mL,搅拌,过滤,滤饼用水洗脱至中性,用100 mL乙酸乙酯溶解,再用饱和碳酸氢钠、1 mol/L盐酸、水各洗脱3次,每次30 mL;无水硫酸钠脱水,过滤,干燥,即得化合物1(0.84 g,产率为83.7%)。

2.1.2 化合物1的鉴定 白色粉末。熔点(mp)为249.8~251.7 °C,ESI-MS(m/z):525[M+Na] $^+$, $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ : 5.19 (1H, 12-CH), 4.39 (1H, 19-OH), 4.14 (1H, 3-OH), 3.85 (1H, 23-OH), 3.50 (3H, 1'-CH₂), 3.44~3.41 (1H, 3-CH), 3.32 (1H, 23-CH₂), 3.09~3.06 (1H, 23-CH₂), 2.61~2.54 (1H, 11-CH₂), 2.40 (1H, 18-CH), 1.88~1.45 (14H), 1.29 (3H, 30-CH₃), 1.25~1.13 (5H), 1.08 (3H, 27-CH₃), 0.93~0.91 (1H), 0.87 (3H, 24-CH₃), 0.84 (d, $J=6.9$ Hz, 3H, 29-CH₃), 0.60 (3H, 26-CH₃), 0.53 (3H, 25-CH₃)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO) δ : 177.41 (C-28), 138.28 (C-13), 127.20 (C-12), 71.62 (C-3), 70.52 (C-19), 64.69 (C-23), 53.31 (C-18), 51.19 (C-1'), 47.49 (C-5), 46.67 (C-9), 46.54 (C-17),

41.81 (C-20), 41.33 (C-14), 41.05 (C-8), 39.24 (C-1), 38.01 (C-4), 37.16 (C-22), 36.23 (C-10), 32.16 (C-7), 28.02 (C-15), 26.54 (C-21), 26.29 (C-29), 25.80 (C-2), 25.13 (C-16), 24.08 (C-27), 23.14 (C-11), 17.57 (C-6), 16.29 (C-25), 16.17 (C-26), 15.41 (C-30), 12.55 (C-24)。根据以上数据确定该化合物1为救必应酸甲酯。

2.2 化合物2~6的合成与鉴定

2.2.1 化合物2~6的合成 取0.5 g化合物1(1 mmol)5份,分别溶于20 mL吡啶中,分别加入6 mmol相应酸酐,0.976 g(0.8 mmol)4-二甲氨基吡啶,搅拌使其完全溶解,85 °C搅拌反应,反应过程中用TLC法检测反应是否完全。反应结束后,放至室温;再转移至150 mL冰水浴中,用稀盐酸调其pH为5~6,滤过,滤饼用水洗至中性,再用200 mL乙酸乙酯溶解;再依次用水、饱和氯化钠溶液各洗3次,每次25 mL,乙酸乙酯层用无水硫酸钠脱水;再回收溶剂,干燥,干法上样,分别以石油醚-乙酸乙酯-甲酸(6:3:0.05, $V/V/V$)、石油醚-乙酸乙酯-甲酸(7:2:0.05, $V/V/V$)、石油醚-乙酸乙酯(3:2, V/V)、石油醚-乙酸乙酯(7:4, V/V)、三氯甲烷-甲醇-甲酸(10:2:0.1, $V/V/V$)溶液进行柱层析,根据TLC检测结果,合并相同流分,回收溶剂,纯化,减压干燥,即得化合物2(0.52 g,产率为88.7%)、化合物3(0.44 g,产率为71.7%)、化合物4(0.50 g,产率为77.9%)、化合物5(0.52 g,产率为65.2%)、化合物6(0.35 g,产率为49.9%)。

2.2.2 化合物2的鉴定 白色粉末。mp为106.9~108.9 °C;ESI-MS(m/z):609.39[M+Na] $^+$, $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ : 5.19 (1H, 12-CH), 4.67~4.62 (1H, 19-OH), 3.85 (1H, 3-CH), 3.82 (1H, 23-CH₂), 3.68~3.62 (1H, 23-CH₂), 3.50 (3H), 2.58~2.52 (1H, 11-CH₂), 2.41 (1H, 18-CH), 2.00 (3H, 2''-CH₃), 1.98 (3H, 2'''-CH₃), 1.90~1.86 (2H), 1.64~1.34 (12H), 1.29 (3H, 30-CH₃), 1.24~1.12 (5H), 1.09 (3H, 27-CH₃), 1.02~0.97 (1H), 0.93 (3H, 24-CH₃), 0.85 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, 29-CH₃), 0.79 (3H, 26-CH₃), 0.64 (3H, 25-CH₃)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO) δ : 176.43 (C-28), 169.98 (C-1''), 169.85 (C-1'''), 138.37 (C-13), 126.99 (C-12), 73.82 (C-3), 71.58 (C-19), 64.73 (C-23), 53.29 (C-18), 51.29 (C-1'), 47.52 (C-5), 47.47 (C-9), 46.73 (C-17), 41.33 (C-20), 40.90 (C-14), 40.17 (C-8), 37.40 (C-1), 37.18 (C-4), 36.23 (C-22), 32.08 (C-10), 27.92 (C-7), 26.29 (C-15), 25.80 (C-21), 25.81 (C-29), 25.07 (C-2), 23.85 (C-16), 23.09 (C-27), 22.64 (C-11), 20.90 (C-2''), 20.59 (C-2'''), 17.59 (C-6), 16.43 (C-25), 16.23 (C-26), 15.37 (C-30), 12.84 (C-24)。根据以上数据确定该化合物2为3,23-*O*-双(乙酰基)救必应酸甲酯。

2.2.3 化合物3的鉴定 白色粉末。mp为175.4~177.0 °C,ESI-MS(m/z):637.39[M+Na] $^+$, $^1\text{H-NMR}$ (400

MHz, DMSO) δ : 5.20 (1H, 12-CH), 4.69~4.63 (1H, 19-OH), 3.88 (1H, 3-CH), 3.85 (1H, 23-CH₂), 3.68~3.61 (1H, 23-CH₂), 3.50 (3H, 1'-CH₃), 2.58~2.57 (1H, 11-CH₂), 2.40 (1H, 18-CH), 2.34~2.23 (4H, 2''-CH₂, 2'''-CH₂), 1.90~1.85 (2H), 1.67~1.35 (12H), 1.29 (3H, 30-CH₃), 1.24~1.16 (4H), 1.09~0.96 (10H, 3''-CH₃, 3'''-CH₃, 27-CH₃), 0.97-0.96 (1H), 0.93 (3H, 24-CH₃), 0.85 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, 29-CH₃), 0.80 (3H, 26-CH₃), 0.62 (3H, 25-CH₃)。 ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO) δ : 177.38 (C-28), 172.92 (C-1''), 172.88 (C-1'''), 138.27 (C-13), 126.99 (C-12), 73.51 (C-3), 71.54 (C-19), 64.23 (C-23), 53.31 (C-18), 51.24 (C-1'), 47.47 (C-5), 47.40 (C-9), 46.81 (C-17), 41.31 (C-20), 40.91 (C-14), 40.37 (C-8), 37.45 (C-1), 37.12 (C-4), 36.18 (C-22), 32.03 (C-10), 27.94 (C-7), 27.12 (C-15), 26.24 (C-21), 25.78 (C-29), 25.06 (C-2), 23.77 (C-16), 23.07 (C-27), 22.84 (C-11), 22.78 (C-2''), 22.57 (C-2'''), 17.55 (C-6), 16.26 (C-25), 16.21 (C-26), 15.30 (C-30), 12.79 (C-24), 9.16 (C-3''), 9.06 (C-3''')。根据以上数据确定该化合物 3 为 3, 23-*O*-双(丙酰基)救必应酸甲酯。

2.2.4 化合物 4 的鉴定 白色粉末。mp 为 166.9~168.4 °C; ESI-MS (m/z): 665.43[M+Na]⁺, ¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ : 5.20 (1H, 12-CH), 4.70~4.64 (1H, 19-OH), 3.88 (1H, 3-CH), 3.84 (1H, 23-CH₂), 3.67~3.58 (1H, 23-CH₂), 3.50 (3H), 2.61~2.54 (1H, 11-CH₂), 2.41 (1H, 18-CH), 2.29~2.15 (4H, 2''-CH₂, 2'''-CH₂), 1.90~1.86 (2H), 1.67~1.35 (16H, 3''-CH₂, 3'''-CH₂), 1.29 (3H, 30-CH₃), 1.24~1.13 (4H), 1.09 (3H, 27-CH₃), 0.99~0.97 (1H), 0.93~0.84 (13H), 0.79 (3H, 26-CH₃), 0.65 (3H, 25-CH₃)。 ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO) δ : 177.38 (C-28), 172.06 (C-1''), 171.99 (C-1'''), 138.26 (C-13), 127.00 (C-12), 73.49 (C-3), 71.55 (C-19), 64.20 (C-23), 53.30 (C-18), 51.24 (C-1'), 47.46 (C-5), 47.31 (C-9), 46.81 (C-17), 41.31 (C-20), 40.91 (C-14), 40.25 (C-8), 37.47 (C-1), 37.11 (C-4), 36.18 (C-22), 35.69 (C-10), 35.67 (C-2''), 32.06 (C-2'''), 27.96 (C-7), 26.24 (C-15), 25.78 (C-21), 25.05 (C-29), 23.72 (C-2), 23.07 (C-16), 22.57 (C-27), 22.49 (C-11), 18.09 (C-3''), 18.01 (C-3'''), 17.53 (C-6), 16.26 (C-25), 16.20 (C-26), 15.29 (C-30), 13.50 (C-4''), 13.32 (C-4'''), 12.84 (C-24)。根据以上数据确定该化合物 4 为 3, 23-*O*-双(丁酰基)救必应酸甲酯。

2.2.5 化合物 5 的鉴定 白色粉末。mp 为 155.6~157.1 °C; ESI-MS (m/z): 821.39[M+Na]⁺, ¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ : 13.21 (s, 2H), 7.78~7.61 (m, 8H), 5.19 (1H, 12-CH), 5.00~4.95 (1H, 19-OH), 4.10~3.97 (2H, 3CH, 23-CH₂), 3.85~3.82 (1H, 23-CH₂), 3.50 (3H, 1'-CH₃), 2.55~2.51 (1H, 11-CH₂), 2.40 (1H, 18-CH),

1.99~1.87 (2H), 1.77~1.44 (12H), 1.36~1.29 (3H), 1.22 (3H, 30-CH₃), 1.19-1.15 (2H), 1.08 (4H, 27-CH₃), 0.94~0.91 (1H), 0.97 (3H, 24-CH₃), 0.87 (3H, 26-CH₃), 0.84 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, 29-CH₃), 0.65 (3H, 25-CH₃)。 ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO) δ : 177.45 (C-28), 168.14 (C-1''), 167.89 (C-1'''), 166.95 (C-8''), 166.89 (C-8'''), 138.41 (C-13), 132.51 (C-2''), 132.40 (C-3''), 132.14 (C-2'''), 132.07 (C-3'''), 131.32 (C-4'''), 131.23 (C-5'''), 130.98 (C-4''), 130.48 (C-5''), 128.92 (C-6''), 128.72 (C-7''), 128.32 (C-6'''), 128.14 (C-7'''), 126.96 (C-12), 75.47 (C-3), 71.55 (C-19), 65.73 (C-23), 53.55 (C-18), 51.29 (C-1'), 47.51 (C-5), 47.47 (C-9), 46.73 (C-17), 41.34 (C-20), 41.01 (C-14), 40.63 (C-8), 37.37 (C-1), 37.15 (C-4), 36.24 (C-22), 32.01 (C-10), 27.84 (C-7), 26.27 (C-15), 25.83 (C-21), 25.10 (C-29), 25.04 (C-2), 23.72 (C-16), 23.13 (C-27), 22.04 (C-11), 17.59 (C-6), 16.30 (C-25), 16.23 (C-26), 15.33 (C-30), 12.85 (C-24)。根据以上数据确定该化合物 5 为 3, 23-*O*-双(邻苯二甲酰基)救必应酸甲酯。

2.2.6 化合物 6 的鉴定 白色粉末。mp 为 103.8~105.6 °C; ESI-MS (m/z): 725.38[M+Na]⁺, ¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ : 12.17 (2H, 4''-COOH, 4'''-COOH), 5.19 (1H, 12-CH), 4.71~4.65 (1H, 19-OH), 3.90~3.85 (1H, 23-CH₂), 3.81 (1H, 3-CH), 3.61~3.57 (1H, 23-CH₂), 3.50 (3H, 1'-CH₃), 2.62~2.56 (1H, 11-CH₂), 2.47~2.40 (9H, 18-CH, 2''-CH₂, 2'''-CH₂, 3''-CH₂, 3'''-CH₂), 2.06~1.85 (2H), 1.67~1.41 (12H), 1.30 (3H, 30-CH₃), 1.24~1.13 (5H), 1.09 (3H, 27-CH₃), 0.92 (3H, 24-CH₃), 0.90~0.88 (1H), 0.85 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, 29-CH₃), 0.79 (3H, 26-CH₃), 0.62 (3H, 25-CH₃)。 ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO) δ : 177.31 (C-28), 173.15 (C-1''), 172.94 (C-1'''), 171.26 (C-4''), 171.14 (C-4'''), 138.30 (C-13), 126.88 (C-12), 73.91 (C-3), 71.52 (C-19), 64.65 (C-23), 53.26 (C-18), 51.10 (C-1'), 47.42 (C-5), 47.22 (C-9), 46.53 (C-17), 41.24 (C-20), 40.91 (C-14), 40.26 (C-8), 37.16 (C-1), 37.02 (C-4), 36.12 (C-22), 31.89 (C-10), 29.07 (C-7), 28.87 (C-15), 28.70 (C-2''), 28.63 (C-2'''), 27.85 (C-3''), 26.19 (C-3'''), 25.71 (C-21), 25.04 (C-29), 23.71 (C-2), 23.01 (C-16), 22.48 (C-27), 18.29 (C-11), 17.51 (C-6), 16.18 (C-25), 16.08 (C-26), 15.20 (C-30), 12.68 (C-24)。根据以上数据确定该化合物 6 为 3, 23-*O*-双(丁二酰基)救必应酸甲酯。

2.3 救必应酸及其酯类衍生物抗肿瘤活性检测

2.3.1 细胞培养 分别取 HeLa、A375、SPC-A1、HepG24 细胞株, 加入适量培养液, 混悬, 于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 2~3 d, 以 0.1% 胰酶消化传代。

2.3.2 分组、给药及抗肿瘤活性检测 4 种肿瘤细胞均

设置阴性对照组(不加药,以相同体积培养基代替)、空白对照组(只加培养基)、阳性对照组(紫杉醇浓度为2.5、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的系列溶液)和7个试验组(用含DMSO小于10%的培养基,分别制备救必应酸、化合物1~6的浓度为2.5、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的系列溶液),除空白对照组外,其余各组均加入 1×10^5 个/mL的细胞悬液,然后于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养24 h后,加20 μL MTT溶液继续培养4 h,离心10 min,弃去上清液,加入150 μL DMSO,振摇10 min后,采用酶标仪于490 nm波长处测定各组吸光度(OD),并计算抑制率[抑制率=(阴性对照组OD-试验组OD)/(阴性对照组OD-空白对照组OD) $\times 100\%$],然后绘制不同药物浓度与抑制率的关系曲线,得半数抑制浓度(IC_{50})^[9-12]。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 22.0软件进行单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。救必应酸及其衍生物的体外抗肿瘤活性结果见表1。

表1 救必应酸及其衍生物的体外抗肿瘤活性结果($n=3$)

Tab 1 Anti-tumor activity *in vitro* of rotundic acid and its derivatives ($n=3$)

成分	IC_{50} , $\mu\text{mol/L}$			
	HeLa	A375	HepG2	SPC-A1
紫杉醇	2.05 \pm 0.47	6.02 \pm 0.99	4.75 \pm 0.49	5.62 \pm 0.89
救必应酸	11.35 \pm 0.68	20.68 \pm 1.32	13.24 \pm 0.69	25.47 \pm 1.05
化合物1	14.35 \pm 1.24	30.24 \pm 0.68	18.62 \pm 1.08	29.16 \pm 1.92
化合物2	16.74 \pm 11.36	28.64 \pm 1.05	19.25 \pm 1.36	30.21 \pm 2.61
化合物3	18.32 \pm 1.35	31.68 \pm 1.72	20.16 \pm 1.35	32.65 \pm 2.05
化合物4	21.62 \pm 1.48	33.95 \pm 1.85	22.15 \pm 2.04	35.47 \pm 1.84
化合物5	3.11 \pm 0.65*	8.62 \pm 0.72*	5.62 \pm 0.84*	7.25 \pm 0.76*
化合物6	2.05 \pm 0.47*	6.02 \pm 0.99*	4.75 \pm 0.49*	5.62 \pm 0.89*

注:与紫杉醇比较,* $P > 0.05$

Note: vs. paclitaxel, * $P > 0.05$

由表1可知,救必应酸及其衍生物对HeLa、A375、HepG2、SPC-A1的生长均有一定的抑制作用,与紫杉醇比较,化合物5和化合物6对这4种细胞的抗肿瘤活性与其相似,差异无统计学意义($P > 0.05$),救必应酸及其他化合物的 IC_{50} 显著减小($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 救必应酸酯类衍生物的合成过程

由于救必应酸结构存在立体位阻,使得救必应酸28位羧基酯化反应比较困难,笔者前期曾采用救必应酸与甲醇在酸的催化下直接酯化,但其产率仅有15%。故在本试验中先将救必应酸成盐再与卤代烃进行反应。救必应酸与碳酸钾、氢氧化钾均能成盐,但试验过程中发现,救必应酸与无水碳酸钾在 N,N -二甲基甲酰胺溶液中更易形成均相溶液,而与氢氧化钾反应副产物较多。故在本试验中选取无水碳酸钾与救必应酸生成钾盐,然后再与相应的酸酐反应。

3.2 抗肿瘤活性研究

初步抗肿瘤活性的研究结果表明,合成的6个化合物对4种肿瘤细胞均具有一定抗肿瘤活性,且化合物5、6的活性明显高于其他衍生物及救必应酸,笔者推测可能是化合物5、6引入了吸电子基团;化合物6的活性高于化合物5的原因可能是丁二酸的吸电能力大于邻苯二甲酸。另外,通过分析数据可知合成的6个化合物对HeLa细胞的抗肿瘤活性皆高于其他3种肿瘤细胞,其原因可能是化合物对各细胞的选择性不同,因此,后续可进一步研究其构效关系对肿瘤细胞活性的影响。

综上所述,本研究合成了6个救必应酸酯类衍生物,其中化合物5、6具有显著的体外抗肿瘤活性,可作为新的抗肿瘤潜在化合物。本研究结果也为进一步研究救必应酸的结构修饰及其构效关系奠定了基础,为从天然药物中寻找安全有效的抗肿瘤化合物提供了试验依据。

参考文献

- [1] 孙辉,张晓琦,蔡艳,等. 救必应的化学成分研究[J]. 林产化学与工业, 2009, 29(1): 111-114.
- [2] 刘国樵. 五环三萜皂苷化合物用途: 中国, 200810198190 [P]. 2008-09-18.
- [3] 赵立春. 响应曲面法用于救必应等3种药材高效提取及其提取物的药理活性研究[D]. 保定: 河北大学, 2013.
- [4] 赵全成, 南敏伦, 赫玉芳, 等. 救必应酸在制备防治心脑血管疾病的药物中的应用: 中国, 201010204596.9 [P]. 2010-06-22.
- [5] 贺兴隆. 齐墩果酸衍生物的合成与表征及其抑菌活性的研究[D]. 沈阳: 辽宁师范大学, 2011.
- [6] 杨定菊, 李颖, 尹述凡. 3-O-乙酰基熊果酸-3-乙酰基-2-[(未)取代苯基]-2,3-二氢-1,3,4-噁二唑-5-甲酯的合成及其抗炎活性研究[J]. 有机化学, 2008, 28(6): 1055-1060.
- [7] 倪明宇, 马莉, 吴英良, 等. 桦木酸的抗肿瘤作用及其诱导KB细胞凋亡的研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(1): 38-42.
- [8] 陈荣, 廖晓峰. 熊果酸酯的合成研究[J]. 现代食品科技, 2006, 22(4): 181-182.
- [9] HE YF, NAN ML, SUN JM, et al. Synthesis, characterization and cytotoxicity of new rotundic acid derivatives[J]. *Molecules*, 2012, 17(2): 1278-1291.
- [10] HE YF, NAN ML, SUN JM, et al. Design, synthesis and cytotoxicity of cell death mechanism of rotundic acid derivatives[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23(9): 2543-2547.
- [11] 赫玉芳. 救必应酸的制备及其衍生物的设计、合成和抗肿瘤活性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2013.
- [12] 黄茂莘, 蔡杨靖, 刘寿柏, 等. 忧遁草枝叶的化学成分及体外抗肿瘤活性研究[J]. 中国药房, 2017, 28(7): 895-898.

(收稿日期: 2018-09-25 修回日期: 2019-01-03)

(编辑: 唐晓莲)