

文章编号: 1004-4353(2014)02-0117-04

桦木醇吡啶盐衍生物的合成及其生理活性研究

栾俊颖, 池万福, 韩荣弼*

(延边大学长白山生物资源与功能分子教育部重点实验室, 吉林 延吉 133002)

摘要: 以桦木醇为原料合成了 4 种桦木醇吡啶盐, 运用¹H-NMR 和 IR 确认了化合物的结构. 用噻唑蓝 (MTT) 比色法对这 4 种化合物对肝星状细胞、人肺癌细胞和人肝癌细胞的抑制作用进行了活性分析, 结果表明, 化合物 3、4a 和 4c 对上述 3 种癌细胞有明显的抑制作用, 并且对肝星状细胞的 IC₅₀ 值均明显低于桦木醇.

关键词: 桦木醇; 吡啶盐衍生物; MTT 法; 抗癌活性

中图分类号: O625.25

文献标识码: A

Synthesis and physiological activity research of betulin pyridinium salt derivatives

LUAN Junying, CHI Wanfu, HAN Rongbi*

(Key Laboratory of Natural Resources of Changbai Mountain & Functional Molecules
(Yanbian University), Ministry of Education, Yanji 133002, China)

Abstract: Four betulin pyridinium salts were prepared from betulin. The structure of the products were identified by ¹H-NMR and IR. In order to study the effects of betulin pyridinium salts on inhibiting tumor cells, activity analysis of compounds 3 and 4a-c on the HSC cell, A549 cell and HepG2 was carried out by MTT assay. The results showed that compounds 3, 4a and 4c had obvious inhibitory action on the HSC cell, A549 cell and HepG2. On HepG2 cells, IC₅₀ of compounds 3, 4a and 4c were significantly lower than IC₅₀ of betulin.

Key words: betulin; pyridine salt derivatives; MTT assay; anti-cancer activity

桦木醇及其衍生物具有抗 HIV^[1-3]、抗肿瘤^[4-6]和消炎^[7-8]等作用, 而且在抗 HIV、抗肿瘤等方面显示出靶向作用强、不良反应小的特性. 2005 年 S. C. Agnieszka 等人^[9]发现白桦脂醇对酒精引起的肝细胞损伤具有明显的保护作用; Tang J J 等人^[10]研究发现桦木醇能够降低通常被固醇调节元件结合蛋白 (SREBP) “打开”的基因活动, 指出其有可能成为高脂血症药物开发的先导化合物. H. Kommera 等人^[11]研究发现在桦木酸的 C-3 的羟基上连接氯乙酰基时, 其在体外的抗癌活性比桦木酸大大增加. 本文以桦木醇 1 为原料, 将其与溴乙酰氯发生酯化反应得到化合物 2, 然后将

化合物 2 与吡啶反应得到化合物 3, 最终再通过阴离子交换得到目标化合物 4a-c (合成路线见图 1), 并对各化合物的活性进行了探讨.

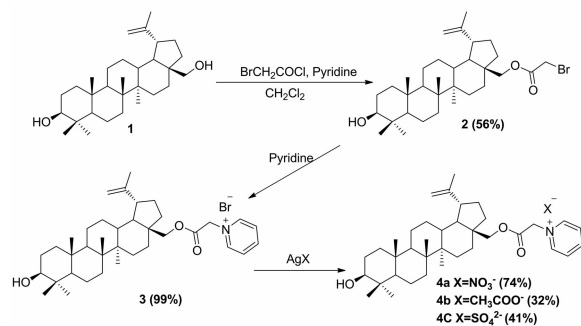


图 1 桦木醇吡啶盐衍生物的合成

收稿日期: 2014-03-20

* 通信作者: 韩荣弼 (1962—), 男, 教授, 研究方向为有机合成化学.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21362039); 吉林省科技发展计划项目 (20130101025JC)

1 合成

1.1 仪器和试剂

$^1\text{H-NMR}$ 用 AV-300 型超导核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司, TMS 为内标)测定; 熔点用 X-5 型显微熔点仪(温度计未经校正)测定; 红外光谱用 IRPrestige-21 型傅立叶变换红外光谱仪测定. 所有反应试剂均为市售分析纯, 购买后未经处理直接使用.

1.2 桦木醇(1)的提取

桦木醇的提取和纯化按文献[12-13]方法进行, 所得桦木醇的熔点、红外以及氢谱数据与文献值一致.

1.3 溴乙酰氯的制备

在溴乙酸(13.8 g, 100 mmol)中, 加入二氯化亚砷(10 mL), $85\text{ }^\circ\text{C}$ 下搅拌 2 h, 蒸馏收集 $120\text{ }^\circ\text{C}$ 的馏分, 得到 9.1 g 黄色液体. 产率为 64%, b. p. $127\sim 128\text{ }^\circ\text{C}$; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 4.35(s, 2H, H—CH₂), $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 165.74, 33.63.

1.4 28-O-溴乙酰基桦木醇(2)的制备

将桦木醇 1 (0.44 g, 1.0 mmol) 和三乙胺 (0.28 mL, 2.0 mmol) 溶解于二氯甲烷 (8 mL) 中, 在冰浴中边搅拌边滴加含有 $82\text{ }\mu\text{L}$ 溴乙酰氯 (1 mmol) 和 4 mL 二氯甲烷的混合溶液, 继续反应 6 h; 水洗 (10 mL \times 3), 干燥, 减压除去溶剂得白色固体 0.341 g, 产率为 56%. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 4.52, 4.62 (each s, 1H, H-29), 3.88, 4.30 (each d, 1H, $J=9.6\text{ Hz}$, H-28), 3.76~3.82 (m, 2H, OCOCH_2Br), 3.05~3.18 (m, 1H, H-3), 2.28~2.45 (m, 1H, H-19), 1.61 (s, 1H, H-30), 0.95, 0.90, 0.89, 0.75, 0.68 (each s, 3H, $5\times\text{CH}_3$).

1.5 28-O-(2-吡啶乙酰基)桦木醇溴化盐(3)的制备

将化合物 2 (0.69 g, 1.2 mmol) 和吡啶 (0.19 g, 2.4 mmol) 溶解于二氯甲烷 (10 mL) 中, 室温下搅拌到无白色固体析出. 抽滤, 用大量二氯甲烷冲洗, 减压除去溶剂得白色固体 0.384 g. 产率为 99%, m. p. $>220\text{ }^\circ\text{C}$; IR (KBr), cm^{-1} : 3406 (O—H), 3045 (C—H), 2940, 2868 (C—H), 1749

(C=O), 1638 (C=C), 1206 (C—O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 300 MHz) δ : 9.09 (d, 2H, $J=4.8\text{ Hz}$, H-arom), 8.67~8.76 (m, 1H, H-arom), 8.22~8.34 (m, 2H, H-arom), 5.72 (s, 2H, OCOCH_2Br), 4.70, 4.57 (each s, 1H, H-29), 4.36, 3.92 (each d, 1H, $J=10.8\text{ Hz}$, H-28), 2.91~3.01 (m, 1H, H-3), 1.65 (s, 3H, H-30), 0.97, 0.94, 0.87, 0.76, 0.65 (each s, 3H, $5\times\text{CH}_3$).

1.6 28-O-(吡啶乙酰基)桦木醇盐(4a-c)的制备

将化合物 3 (0.22 g, 0.35 mmol) 和硝酸银或醋酸银、硫酸银 (0.70 mmol) 溶解于乙醇 (10 mL) 中, 用频率为 600 Hz 的超声波超声震荡 1 h. 抽滤, 用大量乙醇冲洗, 减压除尽溶剂后分别得黄色固体 (4a) 0.384 g、灰白色固体 (4b) 0.384 g 和棕色固体 (4c) 0.384 g.

28-O-(吡啶乙酰基)桦木醇硝酸盐 (4a) 的产率为 74%, m. p. $180.9\sim 182.1\text{ }^\circ\text{C}$; IR (KBr), cm^{-1} : 3437 (O—H), 3063 (C—H), 2941, 2870 (C—H), 1749 (C=O), 1638 (C=C), 1383 (NO_3^-), 1213 (C—O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 300 MHz) δ : 9.07 (d, 2H, $J=5.4\text{ Hz}$, H-arom), 8.65~8.77 (m, 1H, H-arom), 8.20~8.29 (m, 2H, H-arom), 5.70 (s, 2H, OCOCH_2Br), 4.70, 4.57 (each s, 1H, H-29), 4.36, 3.92 (each d, 1H, $J=10.5\text{ Hz}$, H-28), 2.89~2.98 (m, 1H, H-3), 1.65 (s, 3H, H-30), 0.97, 0.94, 0.87, 0.75, 0.65 (each s, 3H, $5\times\text{CH}_3$).

28-O-(吡啶乙酰基)桦木醇醋酸盐 (4b) 的产率为 32%, m. p. $170.4\sim 171.8\text{ }^\circ\text{C}$; IR (KBr), cm^{-1} : 3383 (O—H), 3065 (C—H), 2941, 2868 (C—H), 1745 (C=O), 1641 (AcO^-), 1635 (C=C), 1217 (C—O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 300 MHz) δ : 8.85 (br s, 2H, H-arom), 8.51 (br s, 1H, H-arom), 8.06 (br s, 2H, H-arom), 4.92 (s, 2H, OCOCH_2Br), 4.67, 4.54 (each s, 1H, H-29), 4.35, 3.87 (each d, 1H, $J=10.5\text{ Hz}$, H-28), 2.88~2.98 (m, 1H, H-3), 1.63 (s, 3H, H-30), 0.97, 0.93, 0.88, 0.77, 0.66 (each s, 3H, $5\times\text{CH}_3$).

28-O-(吡啶乙酰基)桦木醇硫酸盐 (4c) 的产率为 41%, m. p. $202.6\sim 204.2\text{ }^\circ\text{C}$; IR (KBr),

cm⁻¹: 3 385 (O—H), 3 063 (=C—H), 2 941, 2 868 (C—H), 1 742 (C=O), 1 638 (C=C), 1 215 (C—O), 1 120 (SO₄²⁻); ¹H-NMR (DMSO, 300 MHz) δ: 9. 07 (br s, 2H, H-arom), 8. 65~8. 75 (m, 1H, H-arom), 8. 22~8. 27 (m, 2H, H-arom), 5. 69 (s, 2H, OCOCH₂ Br), 4. 66, 4. 53 (each s, 1H, H-29), 4. 36, 3. 91 (each d, 1H, J=10. 5 Hz, H-28), 2. 80~2. 99 (m, 1H, H-3), 1. 63 (s, 3H, H-30), 0. 97, 0. 93, 0. 87, 0. 76, 0. 65 (each s, 3H, 5×CH₃).

2 体外细胞活性测试

测试细胞为肝星状细胞 (HSC cell)、人肺癌细胞 (A549 cell) 和人肝癌细胞 (HepG 2 cell)。

细胞存活率测定采用 MTT 法: ①将上述单细胞悬液分别接种于 96 孔细胞培养板 (1×10⁴ cells/well) 中。②在 37℃ 及一定的湿度条件下培养 24 h 后, 将培养液换成 5% 血清; 加药, 使化合物 3、4a-c 的终浓度为 100 μg/mL 和 200 μg/mL, 每个浓度设 3 个平行空, 同时设阴性对照 (仅含培养液), 继续培养 48 h。③在培养结束前 4 h 掺入 20 μL MTT (5 mg/mL), 培养结束后离心 (4℃, 2 000 r/min, 5 min), 吸去上清液后, 每个孔加入 100 μL DMSO, 并用微量振荡器震荡, 使紫色晶体完全溶解; 用酶标仪在 540 nm 波长条件下测定光吸收 OD 值。④计算细胞增殖抑制率 (抑制率 = (1-OD_{样品}/OD_{空白对照})×100%, 然后根据不同待测物及其不同浓度的实验数据, 将抑制率与药物浓度做图, 得出剂量反应曲线, 计算出半数抑制浓度 (IC₅₀) 值。

桦木醇吡啶盐衍生物对肝星状细胞 (HSC cell)、人肺癌细胞 (A549 cell) 和人肝癌细胞 (HepG 2 cell) 的生长存活率见图 2—图 4 (图中数据为每组平行 3 次实验数据的平均值)。由图 2—图 4 可见, 除化合物 4b 外, 化合物 3、4a 和 4c 均对上述 3 种细胞有明显的抑制作用。由图 5 可以看出, 化合物 3、4a 和 4c 对人肝癌细胞 (HepG 2 cell) 的 IC₅₀ 值分别为 19. 43, 18. 95, 24. 83 μg/mL, 均明显小于桦木醇的 IC₅₀ 值 (44. 19 μg/mL)^[14]。这说明化合物 3、4a 和 4c 对人肝癌细胞 (HepG 2

cell) 的抑制作用强于桦木醇。

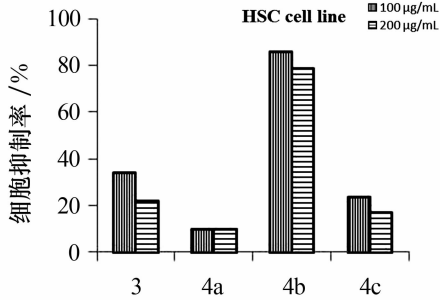


图 2 4 种化合物对肝星状细胞的活性测试结果

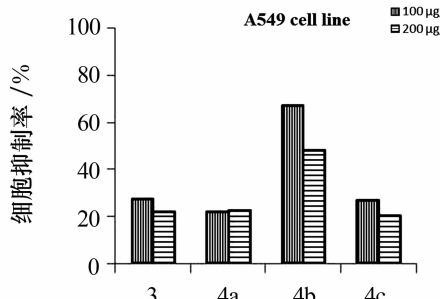


图 3 4 种化合物对人肺癌细胞的活性测试结果

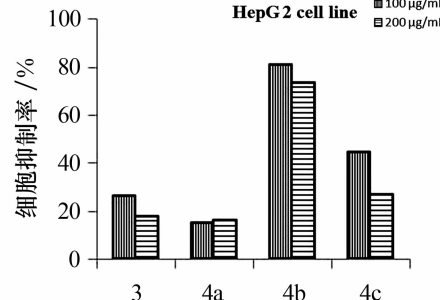


图 4 4 种化合物对人肝癌细胞的活性测试结果

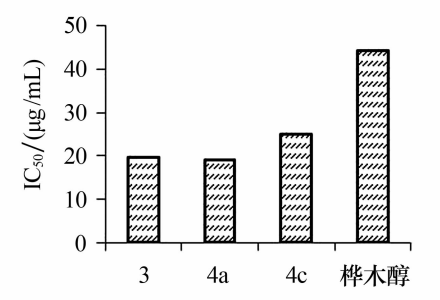


图 5 桦木醇与化合物 3、4a、4c 的 IC₅₀ 值对比

3 结论

本文以桦木醇为原料合成了 4 种桦木醇吡啶

盐化合物,并用 IR 和¹H-NMR 对这 4 种化合物进行了表征.采用 MTT 比色法测试了这 4 种化合物对肝星状细胞、人肝癌细胞、人肺癌细胞的细胞活性,结果表明,化合物 3、4a、4c 对上述 3 种细胞有着较好的抑制作用.这 3 种化合物对其他癌细胞的活性价值还有待于进一步研究.

参考文献:

- [1] Sun I C, Shen J K, Wang H K, et al. Anti-AIDS agents. 32. Synthesis and anti-HIV activity of betulin derivatives[J]. Bioorg Med Chem Lett, 1998, 8 (10):1267-1272.
- [2] Qian K, Yu D, Chen C H, et al. Anti-AIDS agents. 78.⁺ Design, synthesis, metabolic stability assessment, and antiviral evaluation of novel betulinic acid derivatives as potent anti-human immunodeficiency virus (HIV) agents[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2009, 52(10):3248-3258.
- [3] Wei Ying, Ma Chaomei, Chen Deyuan, et al. Anti-HIV-1 protease triterpenoids from *Stauntonia obovatifoliola* Hayata subsp. *intermedia* [J]. Phytochemistry, 2008, 69(9):1875-1879.
- [4] Kim J Y, Koo H M, Kim D S. Development of C-20 modified betulinic acid derivatives as antitumor agents[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2001, 11(17): 2405-2408.
- [5] Saxena B B, Zhu L, Hao M, et al. Boc-lysinated-betulonic acid: A potent, anti-prostate cancer agent [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2006, 14 (18):6349-6358.
- [6] Chintharlapalli S, Papineni S, Ramaiah S K, et al. Betulinic acid inhibits prostate cancer growth through inhibition of specificity protein transcription factors[J]. Cancer Res, 2007, 67(6):2816-2823.
- [7] Recio M C, Giner R M, Mánez S, et al. Investigations on the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from *Diospyros leucomelas*[J]. Planta Medica, 1995, 61(1):9-12.
- [8] Honda T, Liby K T, Su X, et al. Design, synthesis, and anti-inflammatory activity both in vitro and in vivo of new betulinic acid analogues having an enone functionality in ring A[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2006, 16(24):6306-6309.
- [9] Agnieszka S C, Martyna K S. Protective effects of betulin and betulinic acid against ethanol-induced cytotoxicity in HepG 2 cells [J]. Pharmacological Reports, 2005, 57(5):588-595.
- [10] Tang J J, Li J G, Qi W, et al. Inhibition of SREBP by a small molecule, betulin, improves hyperlipidemia and insulin resistance and reduces atherosclerotic plaques [J]. Cell Metabolism, 2011, 13(1):44-56.
- [11] Kommera H, Kaluderovic G N, Kalbitz J, et al. Synthesis and anticancer activity of novel betulinic acid and betulin derivatives [J]. Archiv der Pharmazie, 2010, 343(8):449-457.
- [12] 韩世岩,方桂珍,李珊珊. 四氢呋喃-苯混合溶剂法分离纯化桦木醇[J]. 林产化学与工业, 2005, 25: 129-132.
- [13] 王石发,张明光,李艳苹. 桦木醇提取及纯化工艺的研究[J]. 林产化学与工业, 2007, 27:22-26.
- [14] 隋若君,张小丽,方桂珍,等. 桦木醇丁二酸酯氨基酸叔丁酯的合成及对肝癌细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 林产化学与工业, 2013, 33(1):59-63.