

## 熊果酸衍生物的合成及初步体外抗肿瘤活性研究

潘洪双, 李 磊, 崔华博, 杨丽娜, 于婷婷, 孟艳秋\*

(沈阳化工大学制药工程教研室, 辽宁 沈阳 110142)

**摘要:** 以熊果酸为先导化合物, 在其 A 环联合 4-氯吡啶环, 同时对 C-28 位进行成酯、酰胺化等结构修饰, 设计合成了两类共 10 个新型熊果酸 A 环衍生物, 其结构经  $^1\text{H}$ NMR、MS 等确认。采用 MTT 法, 选用人肝癌细胞 (HepG2) 和人胃癌细胞 (SGC7901) 对所得化合物进行初步的体外抗肿瘤活性测试。结果表明, 所测化合物对 HepG2、SGC7901 肿瘤细胞的抑制作用均强于母体熊果酸, 尤其是化合物 **6**、**12** 表现出较为显著的抗肿瘤活性, 与已上市药物紫杉醇活性相当, 值得进一步研究。

**关键词:** 熊果酸 A 环; 结构修饰; 抗肿瘤活性

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 12-1890-05

## Synthesis and anti-tumor activity of derivatives of ursolic acid *in vitro*

PAN Hong-shuang, LI Lei, CUI Hua-bo, YANG Li-na, YU Ting-ting, MENG Yan-qiu\*

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

**Abstract:** A series of ursolic acid derivatives were synthesized by the introduction of 4-chloroindole compounds at A ring and esterification and amidation at C-28 position, which structures were characterized by  $^1\text{H}$ NMR, MS and etc. The cytotoxic activity of derivatives was evaluated against HepG2 and SGC7901 cells *in vitro* by MTT assay, in which paclitaxel and adriamycin were used as a positive control. The results indicated that all of derivatives can inhibit cell proliferation in HepG2 and SGC7901 cells with a better activity than ursolic acid. Especially, the compounds **6** and **12** showed significant antitumor activity comparable to the paclitaxel. The compounds are worthy to be studied further.

**Key words:** ursolic acid A ring; structural modification; antitumor activity

熊果酸 (ursolic acid, UA) 又名乌索酸 (乌苏酸), 存在于多种天然药用植物中, 近来有学者发现可以从苹果渣中提取熊果酸<sup>[1]</sup>, 其市场发展潜力巨大。熊果酸具有五环三萜类化合物的典型结构, 具有抗炎<sup>[2]</sup>、护心脑血管<sup>[3]</sup>、抗癌保肝<sup>[4]</sup>、抗菌, 抗 HIV 病毒<sup>[5]</sup>等多种药理作用。目前, 对熊果酸的结构修饰多集中在 A 环、C-3 位和 C-28 位<sup>[6,7]</sup>。研究证明, 在熊

果酸 C-3 位保持极性基团对其保持活性十分重要<sup>[8]</sup>, 在 C-28 位连接氨基醇类化合物、成酯等结构改造均能使熊果酸抗肿瘤活性有不同程度的提高<sup>[9,10]</sup>, 而在其 A 环引入杂环时, 对其抗肿瘤活性也会产生较大影响<sup>[11-13]</sup>。本文以熊果酸为先导化合物, 参考前人对五环三萜类化合物进行结构改造的经验<sup>[14-16]</sup>, 对熊果酸 A 环、C-11 位、C-28 位进行结构改造, 设计合成了两类共 10 个熊果酸 A 环衍生物。

以熊果酸为起始原料, 用三氧化铬将 C-3 位和 C-11 位同时氧化, 得到 3,11-氧代-乌苏烷型-12-烯-28-酸 (**1**), 将中间体 **1** 与卤代烷类化合物反应后再与 4-氯苯胍盐酸盐反应, 生成一系列 5'-氯-[2,3-b]-吡啶-乌苏烷型-11-羰基-12-烯-28-羧酸酯类衍生物 (**3**~

收稿日期: 2017-07-17; 修回日期: 2017-09-04.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21372156); 辽宁省自然科学基金资助项目 (201605288); 沈阳市科学技术计划资助项目 (F-16-230-6-00).

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

E-mail: myq6581@163.com

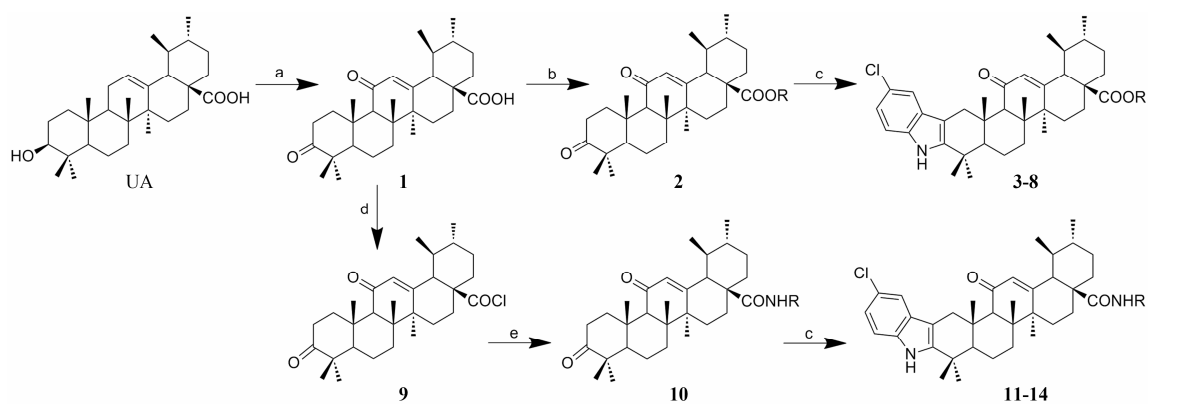
DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0692

8)。将中间体 **1** 与氨基醇类化合物反应后再与 4-氯苯肼盐酸盐反应得到一系列 5'-氯-[2,3-b]-吲哚-乌苏烷型-11-羧基-12-烯-28-酰-氨基醇类衍生物 (**11~14**), 见合成路线图 1。

## 结果与讨论

### 1 化学合成

以熊果酸为先导化合物, 对其 A 环、C-11 和 C-28 进行结构改造, 设计并合成了两类共 10 个熊果酸衍生物, 其结构 <sup>1</sup>H NMR、MS 等确证。数据见表 1 和表 2。



3: R=CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

4: R=CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

5: R=CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

6: R=CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>3</sub>

7: R=CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>

8: R=CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>

11: R=(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OH

12: R=CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>OH

13: R=CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH

14: R=C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>OH

Reagent and conditions: (a) CrO<sub>3</sub>, AcOH, Ac<sub>2</sub>O; (b) DMF, anhydrous K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, RBr; (c) 4-Cl phenylhydrazine hydrochloride, AcOH; (d) (COCl)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, DMF; (e) NH<sub>2</sub>R, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TEA.

**Scheme 1** Synthetic routes of target compounds

**Table 2** <sup>1</sup>H NMR data of target compounds

Compd.	<sup>1</sup> H NMR (CDCl <sub>3</sub> )
3	7.76 (s, 1H, NH), 7.45 (d, 1H, <i>J</i> =8.2 Hz, Ar-H), 7.29 (s, 1H, Ar-H), 7.16 (s, 1H, Ar-H), 5.51 (s, 1H, H-12), 3.96 (s, 2H, -COOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 2.28 (d, 1H, <i>J</i> =10.8 Hz, H-18), 1.63–1.49 (m, 3H, -COOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.58 (s, 2H, -COOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.24 (s, 1H, H-9), 1.16, 1.14, 1.07, 1.02, 0.92, 0.99, 0.87 (s, each 3H)
4	7.74 (s, 1H, NH), 7.45 (d, 1H, <i>J</i> =9.2 Hz, Ar-H), 7.19 (s, 1H, Ar-H), 7.15 (s, 1H, Ar-H), 5.64 (s, 1H, H-12), 4.27 (s, 1H, -COOCH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>3</sub> ), 2.28 (d, 1H, <i>J</i> =9.6 Hz, H-18), 1.44 (d, 3H, <i>J</i> =9.5 Hz, -COOCH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>3</sub> ), 1.43 (d, 3H, <i>J</i> =9.5 Hz, -COOCH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>3</sub> ), 1.29 (s, 1H, H-9), 1.23, 1.19, 1.08, 1.02, 1.01, 0.97, 0.87 (s, each 3H)
5	7.74 (s, 1H, NH), 7.45 (d, 1H, <i>J</i> =9.7 Hz, Ar-H), 7.19 (s, 1H, Ar-H), 7.06 (s, 1H, Ar-H), 5.71 (s, 1H, H-12), 4.01 (s, 2H, -COOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 2.37 (d, 1H, <i>J</i> =8.7 Hz, H-18), 1.53 (s, 2H, -COOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.47 (s, 2H, -COOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.29 (s, 1H, H-9), 1.24 (s, 2H, -COOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.14, 1.11, 1.02, 0.95, 0.92, 0.91, 0.88 (s, each 3H)
6	7.72 (s, 1H, NH), 7.45 (d, 1H, <i>J</i> =9.2 Hz, Ar-H), 7.17 (s, 1H, Ar-H), 7.05 (s, 1H, Ar-H), 5.72 (s, 1H, H-12), 3.75 (d, 2H, <i>J</i> =10.2 Hz, -COOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>3</sub> ), 2.35 (d, 1H, <i>J</i> =8.9 Hz, H-18), 1.41 (s, 1H, -COOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>3</sub> ), 1.36–1.22 (m, 3H, -COOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>3</sub> ), 1.24 (s, 1H, H-9), 1.15–1.08 (m, 3H, -COOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>3</sub> ), 1.12, 1.01, 1.02, 0.98, 0.92, 0.88, 0.86 (s, each 3H)
7	7.78 (s, 1H, NH), 7.43 (d, 1H, <i>J</i> =8.9 Hz, Ar-H), 7.14 (s, 1H, Ar-H), 7.07 (s, 1H, Ar-H), 5.64 (s, 1H, H-12), 3.98 (t, 2H, <i>J</i> =8.4 Hz, -COOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 2.42 (d, 1H, <i>J</i> =8.9 Hz, H-18), 1.75 (s, 2H, -COOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.42 (s, 2H, -COOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.29 (s, 2H, -COOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.25 (s, 1H, H-9), 1.15 (s, 3H, -COOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.13, 1.11, 1.06, 1.01, 0.99, 0.89, 0.88 (s, each 3H)
8	7.72 (s, 1H, NH), 7.45 (d, 1H, <i>J</i> =9.3 Hz, Ar-H), 7.05 (s, 1H, Ar-H), 7.04 (s, 1H, Ar-H), 5.64 (s, 1H, H-12), 4.04 (s, 2H, -COOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 2.98 (s, 2H, -COOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 2.44 (d, 1H, <i>J</i> =9.1 Hz, H-18), 1.49 (s, 2H, -COOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.38 (s, 2H, -COOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.32 (s, 1H, H-9), 1.26 (s, 2H, -COOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.25 (s, 3H, -COOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.15, 1.12, 1.09, 1.01, 0.99, 0.99, 0.89 (s, each 3H)
11	7.72 (s, 1H, NH), 7.40 (d, 1H, <i>J</i> =9.3 Hz, Ar-H), 7.34 (s, 1H, Ar-H), 7.17 (s, 1H, Ar-H), 6.61 (br, 1H, NH), 5.56 (s, 1H, H-12), 3.63 (s, 2H, -CH <sub>2</sub> OH), 3.49 (s, 2H, -CH <sub>2</sub> ), 1.31 (s, 1H, H-9), 1.23, 1.13, 1.06, 1.05, 0.98, 0.94, 0.93 (s, each 3H)
12	7.81 (s, 1H, NH), 7.33 (d, 1H, <i>J</i> =9.2 Hz, Ar-H), 7.17 (s, 1H, Ar-H), 7.05 (s, 1H, Ar-H), 6.58 (br, 1H, NH), 5.73 (s, 1H, H-12), 4.15–3.98 (m, 1H, -NHCH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> OH), 3.88 (d, 2H, <i>J</i> =8.6 Hz, -NHCH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> OH), 1.32–1.21 (m, 3H, -NHCH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> OH), 1.22 (s, 1H, H-9), 1.15, 1.14, 1.12, 1.11, 1.04, 0.98, 0.94 (s, each 3H)
13	7.88 (s, 1H, NH), 7.45 (d, 1H, <i>J</i> =9.4 Hz, Ar-H), 7.23 (s, 1H, Ar-H), 7.14 (s, 1H, Ar-H), 6.60 (br, 1H, NH), 5.67 (s, 1H, H-12), 3.58 (s, 2H, -NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH), 3.58 (s, 1H, -NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH), 3.13 (s, 1H, NHCH <sub>2</sub> OH), 1.34 (s, 2H, -NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH), 1.24 (s, 1H, H-9), 1.11, 1.03, 0.98, 0.91, 0.89, 0.88, 0.83 (s, each 3H)
14	8.38 (s, 1H, NH), 7.46 (d, 1H, <i>J</i> =9.5 Hz, Ar-H), 7.44 (s, 1H, Ar-H), 7.34–7.15 (m, 4H, Ar-H), 7.14 (s, 1H, Ar-H), 6.61 (br, 1H, NH), 5.67 (s, 1H, H-12), 5.11 (s, 2H, CH <sub>2</sub> OH), 1.31 (s, 1H, H-9), 1.23, 1.11, 1.09, 1.05, 0.98, 0.97, 0.88 (s, each 3H)

## 2 生物活性评价

以紫杉醇 (paclitaxel) 和多柔比星 (adriamycin) 为阳性对照物, 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。

**Table 3** Anti-tumor activity of target compounds on HepG2 and SGC7901 cells

Compd.	Inhibition rate/% (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )		$\text{IC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	
	HepG2	SGC7901	HepG2	SGC7901
UA	12.62	13.34	>20	>20
3	18.25	21.19	>20	>20
4	36.57	35.35	12.38	9.95
5	25.49	19.35	>20	7.50
6	48.96	54.60	10.22	3.12
7	30.93	38.52	>20	>20
8	41.28	38.81	>20	10.74
11	39.58	42.16	>20	>20
12	52.83	49.56	8.96	12.45
13	29.36	27.53	>20	>20
14	33.69	24.31	>20	>20
Paclitaxel	52.75	50.82	14.35	7.87
Adriamycin	64.37	59.38	3.48	2.07

从表中可以看出, 在化合物浓度为  $1\times 10^{-5}$   $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时所测试的目标化合物对 HepG2 和 SGC7901 细胞的生长均具有一定的抑制作用, 且优于母体熊果酸。C-28 位羧基连接卤代烷类化合物成酯时, 化合物抗肿瘤活性化合物  $6 > 4 > 8 > 7 > 5 > 3$ , 结果表明连接具有支链的卤代烷较直链卤代烷有更好的活性; 同时, 随着卤代烷碳链的增长, 其抗肿瘤活性也有所增加。C-28 位羧基连接氨基醇类化合物成醇胺时, 化合物 **12** 表现出较好的抗肿瘤活性, 对两种肿瘤细胞的抑制率分别为 52.83% 和 49.56%, 与阳性对照药紫杉醇活性相当。综上所述, 认为化合物 **6**、**12** 值得进一步研究。

## 3 小结

本文以熊果酸为先导化合物, 对其 A 环、C-11 和 C-28 进行结构改造, 设计合成了两类共 10 个熊果酸衍生物, 经体外初步药理活性测试显示, 熊果酸 A 环骈合 4-氯吡啶环, 同时 C-28 位羧基与卤代烷反应成酯可以提高熊果酸抗肿瘤活性, 卤代烷的长短及结构对其活性有较大影响; 而当 C-28 位羧基与氨基醇反应成醇胺时也可提高熊果酸的抗肿瘤活性, 连接氨基醇的结构是影响活性的主要因素。本研究结果对熊果酸的进一步结构修饰有一定的参考意义。

## 实验部分

X-4 数字显示显微熔点测定仪; ARX-300 MHz 核磁共振仪,  $\text{CDCl}_3$  为溶剂, TMS 为内标; 热电-菲尼根 LCQ 型质谱仪。熊果酸购于陕西慧科植物开发有限公司; 薄层色谱硅胶 GF254、硅胶 H 为青岛海洋化工有限公司生产, 显色剂为 10% 硫酸乙醇溶液; 活性测试所用的 RPMI-1640 培养基 (含 10% 胎牛血清、100  $\text{u}\cdot\text{mL}^{-1}$  青霉素、100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  链霉素); 溴化四氮唑盐 (MTT)、蛋白酶 K (proteinase K) 和小牛血清蛋白 (BSA) 购于上海图赫实业有限公司; 阳性对照物紫杉醇 (paclitaxel)、阿霉素 (adriamycin) 购于阿斯利康制药有限公司; 人癌细胞 HepG2、SGC7901 细胞为沈阳药科大学提供。所用试剂均为分析纯或化学纯。

### 1 化学合成

#### 1.1 3,11-氧代-乌苏烷型-12-烯-28-羧酸的制备 (1)

将熊果酸 (228 mg, 0.5 mmol) 溶解于 5% 乙酸酐的乙酸溶液中 (0.75 mL 乙酸酐, 14.25 mL 乙酸), 加入  $\text{CrO}_3$  (99.6 mg, 0.99 mmol), 室温反应, TLC 检测反应终点。4 h 反应完毕, 加入水 (20 mL) 和二氯甲烷 (20 mL), 分层后, 水层以二氯甲烷 (20 mL) 萃取两次, 合并有机相, 用饱和碳酸氢钠溶液洗涤至微碱性, 再水洗至中性, 无水硫酸钠干燥, 减压抽滤, 滤液减压脱溶得到绿色胶状物。粗品经硅胶柱色谱分离纯化, 洗脱剂为石油醚-乙酸乙酯=5:1, 得白色固体, 中间体 **1**。

#### 1.2 5'-氯-[2,3-b]-吡啶-乌苏烷型-11-羧基-12-烯-28-羧酸正丙酯 (3)

将中间体  $\text{UA}_1$  (126 mg, 0.22 mmol) 溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF, 4 mL), 加入无水碳酸钾 (0.06 g, 0.44 mmol), 缓慢滴加 4 倍当量 1-溴丙烷 (0.88 mmol), 室温反应, TLC 检测反应终点 (展开剂: 石油醚-乙酸乙酯=5:1), 5 h 反应结束。减压蒸出剩余的卤代烷后, 加入饱和食盐水 (20 mL) 和乙酸乙酯 (20 mL), 分离有机相, 有机相用饱和食盐水 (20 mL $\times$ 3) 萃取 3 次, 有机相用无水硫酸镁干燥, 过滤, 滤液减压脱溶得淡黄色固体。粗品经硅胶柱色谱纯化, 洗脱剂为石油醚-乙酸乙酯=13:1, 得白色固体 **2**。

将 4-氯苯胍盐酸盐 (180 mg, 0.1 mmol) 溶解于冰乙酸 (10 mL), 118  $^{\circ}\text{C}$  冷凝回流。将化合物 **2a** (50 mg, 0.1 mmol) 溶解在冰乙酸 (5 mL) 中, 缓慢滴加到 4-氯苯胍盐酸盐溶液中, 继续回流, 以 TLC 监测反应终点。4 h 反应结束, 向反应体系中缓慢滴加水

(10 mL), 降至室温, 析出黄褐色固体, 减压抽滤, 水洗滤饼至中性。室温干燥, 得黄褐色固体。粗品经硅胶柱色谱纯化, 洗脱剂为石油醚-乙酸乙酯=3:1, 得白色粉末状固体 3。产率为 58.3%, mp 157~159 °C。

**1.3 5'-氯-[2,3-b]-吡啶-乌苏烷型-11-羧基-12-烯-28-羧酸异丙酯 (4)** 按照化合物 3 的合成方法, 由中间体 1 与 1-溴异丙烷反应后再与 4-氯苯胍盐酸盐反应。最终粗品经硅胶柱色谱纯化, 洗脱剂为石油醚-乙酸乙酯=13:1, 得白色粉末状固体 4, 产率为 54.6%。mp 140~144 °C。

**1.4 5'-氯-[2,3-b]-吡啶-乌苏烷型-11-羧基-12-烯-28-羧酸正丁酯 (5)** 按照化合物 3 的合成方法, 由中间体 1 与 1-溴正丁烷反应后再与 4-氯苯胍盐酸盐反应。最终粗品经硅胶柱色谱纯化, 洗脱剂为石油醚-乙酸乙酯=15:1, 得白色粉末状固体 5, 产率为 46.6%。mp 229~233 °C。

**1.5 5'-氯-[2,3-b]-吡啶-乌苏烷型-11-羧基-12-烯-28-羧酸异丁酯 (6)** 按照化合物 3 的合成方法, 由中间体 2 与 1-溴异丁烷反应再与 4-氯苯胍盐酸盐反应。最终粗品经硅胶柱色谱纯化, 洗脱剂为石油醚-乙酸乙酯=15:1, 得白色粉末状固体 6, 产率为 44.8%。mp 225~227 °C。

**1.6 5'-氯-[2,3-b]-吡啶-乌苏烷型-11-羧基-12-烯-28-羧酸正戊酯 (7)** 按照化合物 3 的合成方法, 由中间体 2 与溴代正戊烷反应再与 4-氯苯胍盐酸盐反应。最终粗品经硅胶柱色谱纯化, 洗脱剂为石油醚-乙酸乙酯=13:1, 得白色粉末状固体 7, 产率为 53.2%。mp 241~245 °C。

**1.7 5'-氯-[2,3-b]-吡啶-乌苏烷型-11-羧基-12-烯-28-羧酸正己酯 (8)** 按照化合物 3 的合成方法, 由中间体 2 与溴己烷反应后再与 4-氯苯胍盐酸盐反应。最终粗品经硅胶柱色谱纯化, 洗脱剂为石油醚-乙酸乙酯=7:1, 得白色粉末状固体 8, 产率为 45.5%。mp 249~254 °C。

**1.8 5'-氯-[2,3-b]-吡啶-乌苏烷型-11-羧基-12-烯-28-酰-氨基乙醇 (11)** 将中间体 1 (120 mg, 0.2 mmol) 溶解于 5 mL 二氯甲烷, 加入草酰氯 (0.8 mmol), 并加入 2 滴 DMF 作为催化剂, 在室温下搅拌 4 h, 生成 5'-Cl-[2,3-b]-吡啶-乌苏烷型-11-羧基-12-烯-28-酰氯 (9)。蒸除溶剂二氯甲烷和草酰氯, 残余物加入 2 mL 环己烷, 减压蒸除环己烷, 反复操作两次。向产物中加入二氯甲烷, 用三乙胺调 pH 至 8~9, 待 pH 稳定后再加入氨基乙醇 (0.8 mmol), 室温搅拌 24 h, TLC 监测反应终点, 反应完成后, 加入 30 mL 水, 使其分层,

用盐酸调 pH 至 3, 减压蒸除反应溶剂, 析出黄色固体。最终粗品经硅胶柱色谱纯化, 洗脱剂为石油醚-乙酸乙酯=7:1, 得白色粉末状固体 10。

将 4-氯苯胍盐酸盐 (180 mg, 0.1 mmol) 溶解于冰乙酸 (10 mL), 118 °C 冷凝回流。将化合物 10 (50 mg, 0.1 mmol) 溶解在冰乙酸 (5 mL) 中, 缓慢滴加到 4-氯苯胍盐酸盐溶液中, 继续回流, 以 TLC 监测反应终点。4 h 反应结束, 向反应体系中缓慢滴加水 (10 mL), 降至室温, 析出黄褐色固体, 减压抽滤, 水洗滤饼至中性。室温干燥, 得黄褐色固体。粗品经硅胶柱色谱纯化, 洗脱剂为石油醚-乙酸乙酯=3:1, 得白色粉末状固体 11。产率为 48.7%。mp 186~189 °C。

**1.9 5'-氯-[2,3-b]-吡啶-乌苏烷型-11-羧基-12-烯-28-酰-2-氨基-1-丙醇 (12)** 按照化合物 11 的合成方法, 由中间体 1 与 2-氨基-1-丙醇反应后再与 4-氯苯胍盐酸盐反应。最终粗品经硅胶柱色谱纯化, 洗脱剂为石油醚-乙酸乙酯=7:1, 得白色粉末状固体 12, 产率为 44.8%。mp 184~186 °C。

**1.10 5'-氯-[2,3-b]-吡啶-乌苏烷型-11-羧基-12-烯-28-酰-3-氨基-1-丙醇 (13)** 按照化合物 11 的合成方法, 由中间体 1 与 3-氨基-1-丙醇反应后再与 4-氯苯胍盐酸盐反应。最终粗品经硅胶柱色谱纯化, 洗脱剂为石油醚-乙酸乙酯=7:1, 得白色粉末状固体 13, 产率为 44.6%。mp 142~144 °C。

**1.11 5'-氯-[2,3-b]-吡啶-乌苏烷型-11-羧基-12-烯-28-酰-2-氨基苄醇 (14)** 按照化合物 11 的合成方法, 由中间体 1 与邻氨基苄醇反应后再与 4-氯苯胍盐酸盐反应。最终粗品经硅胶柱色谱纯化, 洗脱剂为石油醚-乙酸乙酯=7:1, 得白色粉末状固体 14, 产率为 61.2%。mp 244~248 °C。

## 2 初步体外活性测试

选择人肺癌细胞 (HepG2) 和人胃癌细胞 (SGC7901) 靶细胞, 以紫杉醇 (paclitaxel) 和阿霉素 (adriamycin) 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 SGC7901 (HepG2) 细胞, 用含 10% 胎牛血清 RPMI 1640 培养液调整细胞数为每毫升  $2 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$  个的单细胞悬液, 以每孔 200  $\mu\text{L}$  接种于 96 孔培养板中。将培养板放入 CO<sub>2</sub> 培养箱, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 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  $1 \times 10^{-5}$ 、 $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-8}$  mol·L<sup>-1</sup> 的待测药物, 每浓度 6 个孔, 实验设空白对照组, 继续放入 CO<sub>2</sub> 培养箱, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度条件下培养 72 h。

培养 72 h 后, 每孔加入 MTT 溶液 ( $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  20  $\mu\text{L}$ ), 37  $^{\circ}\text{C}$  继续培养 4 h, 中止培养, 离心弃去孔内上清液, 每孔加入 DMSO 150  $\mu\text{L}$  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: 抑制率/% =  $[1 - (A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})] \times 100\%$ 。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] Carginin ST, Gnoatto SB. Ursolic acid from apple pomace and traditional plants: a valuable triterpenoid with functional properties [J]. *Food Chem*, 2017, 220: 477–489.
- [2] Tan J, Wei H, Chen SL, et al. Synthesis and anti-inflammatory activity of ursolic acid derivative-chalcone conjugates [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 938–946.
- [3] Lin YT, Yu YM, Chang WC, et al. Ursolic acid plays a protective role in obesity-induced cardiovascular diseases [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2016, 94: 627–633.
- [4] Huang Q, Chen H, Ren Y, et al. Anti-hepatocellular carcinoma activity and mechanism of chemopreventive compounds: ursolic acid derivatives [J]. *Pharm Biol*, 2016, 54: 1–8.
- [5] Woźniak L, Skąpska S, Marszałek K. Ursolic acid – a pentacyclic triterpenoid with a wide spectrum of pharmacological activities [J]. *Molecules*, 2015, 20: 20614–20641.
- [6] Chen J, Fu H, Wang Z, et al. A new synthetic ursolic acid derivative IUA with anti-tumor efficacy against osteosarcoma cells *via* inhibition of JNK signaling pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 34: 724–733.
- [7] Meng YQ, Zhang LF, Liu DY, et al. Synthesis and antitumor activity evaluation of novel ursolic acid derivatives [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2016, 18: 280–288.
- [8] Liu MC, Yang SJ, Jin LH, et al. Synthesis and evaluation as potential antitumor agents of novel ursolic acid derivatives [J]. *Med Chem Res*, 2016, 25: 1–13.
- [9] 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.
- [10] Meng YQ, Zhao YW, Kuai ZY, et al. Synthesis and antitumor activity evaluation of novel oleanolic acid derivatives [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2017, 19: 1000–1010.
- [11] Chen Y, Hou X, Zhi D, et al. Synthesis, characterization and anticancer activity of oleanolic acid and ursolic acid derivatives [J]. *Chin J Org Chem (有机化学)*, 2016, 36: 795–802.
- [12] Wang YY, Xiong H. Synthesis and antitumor activity of heterocyclic ursolic acid derivatives [J]. *Strait Pharm J (海峡药学)*, 2016, 28: 273–275.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Zhang LF, Meng YQ. Synthesis and anti-tumor activity of ursolic acid derivatives in C-3 hydroxy and C-28 carbonyl [J]. *J Shenyang Univ Chem Technol (沈阳化工大学学报)*, 2016, 30: 117–123.
- [16] Mendes VIS, Bartholomeusz GA, Ayres M, et al. Synthesis and cytotoxic activity of novel A-ring cleaved ursolic acid derivatives in human non-small cell lung cancer cells [J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 123: 317.