

告达庭葡萄糖苷的合成及抗肿瘤活性研究

陶雪芬, 张如松(浙江中医药大学药学院药物化学教研室, 杭州 310053)

摘要: 目的 合成告达庭- β -D-葡萄糖苷并研究其抗肿瘤活性。方法 以告达庭为原料在 CdCO_3 催化下与溴活化的乙酰葡萄糖成苷, 脱保护基得到目标产物, 以 MTT 法考察其对肿瘤细胞的抑制作用。结果 合成了告达庭- β -D-葡萄糖苷, 结构经 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 鉴定。结论 初步药理实验表明乙酰葡萄糖苷对大鼠胶质瘤细胞 C_6 的抑制作用较强, 而告达庭- β -D-葡萄糖苷对 C_6 细胞的抑制作用与原料告达庭相当。

关键词: 告达庭; 葡萄糖苷; 合成; 抗肿瘤活性

中图分类号: R916.696

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2011)07-0644-05

Synthesis of Caudatin Glucoside and Study on Its Antitumor Activity

TAO Xuefen, ZHANG Rusong(Department of Medicinal Chemistry, College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medicinal University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To synthesize caudatin- β -D-glucoside and determine its antitumor activity. **METHODS** The target compound caudatin- β -D-glucoside was synthesized from caudatin by reaction with tetra-*O*-acetyl-D-glucosyl bromide catalyzed by CdCO_3 and then deprotection in $\text{CH}_3\text{ONa}/\text{CH}_3\text{OH}$. The antitumor activity was studied by MTT method. **RESULTS** Caudatin- β -D-glucoside was synthesized and characterized by $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra. **CONCLUSION** Preliminary pharmacological result shows that the inhibitory effect of caudatin-tetra-*O*-acetyl-D-glucoside on rat glioma cell C_6 is higher than that of caudatin while caudatin- β -D-glucoside shows similar activity to caudatin.

KEY WORDS: caudatin; glucoside; synthesis; antitumor activity

C_{21} 甾体衍生物是天然产物中一类重要的生物活性物质, 因具有抗肿瘤和免疫强化等作用而受到重视。该类化合物除从玄参科、毛茛科等植物中发现外, 还普遍存在于萝藦科植物中。从分子结构上看, C_{21} 甾体苷通常由孕甾烷衍生物与 2-去氧糖等形成的一类化合物, 常见苷元有加加明、告达庭、萝藦苷元、凯德苷元等, 常见的糖有磁麻糖(cymarose)、2-脱氧毛地黄糖(digimose)、夹竹桃糖(oleandrose)、洋地黄毒糖(digitoxose)、阿洛糖、葡萄糖及黄花夹竹桃糖等, 糖链最多的含有 6 个糖单元^[1-2]。笔者所在研究室对萝藦科鹅绒藤属植物耳叶牛皮消的块根白首乌中所含的 C_{21} 甾体苷类化合物进行了系统的研究, 药理实验研究表明无论是白首乌中提取分离得到的白首乌总苷还是苷元告达庭及其衍生物均有不同程度的抗肿瘤作用^[3-4], 但由于 C_{21} 甾体苷在植物中含量很低, 分离鉴定等工作比较繁琐, 而苷元的富集相对比较容易, 因此探究以苷元为中间体通过半合成的方

法制备各种 C_{21} 甾体苷, 并进行抗肿瘤活性评价, 具有实际意义。

1 合成方法

以自行提取得到的告达庭苷元(1)为原料, 与 2, 3, 4, 6-*O*-四乙酰基- α -D-溴代葡萄糖反应得乙酰化的葡萄糖告达庭苷, 通过脱除乙酰保护基, 得目标化合物告达庭- β -D-葡萄糖苷(5)。结构式见图 1, 合成路线见图 2。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Bruker DRX-400 型核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司), RMS 为内标物, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ 为溶剂, 200~300 目硅胶(青岛海洋化工厂), 10%硫酸乙醇液为显色剂。白首乌经浙江省医学科学院药物所张治国研究员鉴定为耳叶牛皮消 *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight 的块根, 购自四川省。

2.2 告达庭苷元的提取分离

白首乌干燥块根 10 kg 粉碎后, 以 240 L

基金项目: 白首乌 C_{21} 甾体苷类化合物抗肿瘤活性的构效关系研究(Y200805461)

作者简介: 陶雪芬, 女, 硕士, 讲师 Tel: (0571)86613657 E-mail: txfzjyh@sina.com

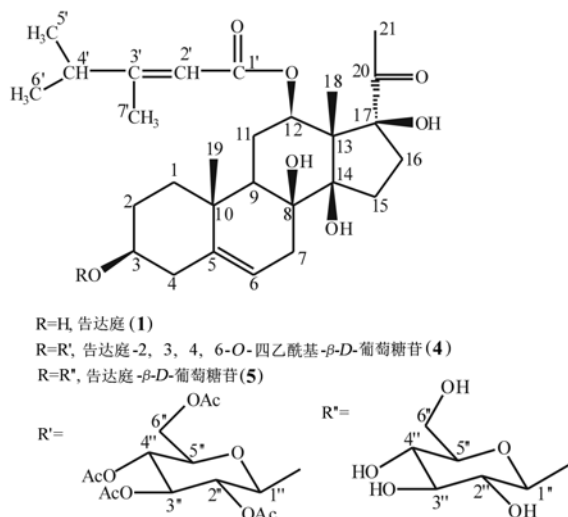


图 1 1、4 和 5 的化学结构

Fig 1 The chemical structure of 1, 4 and 5

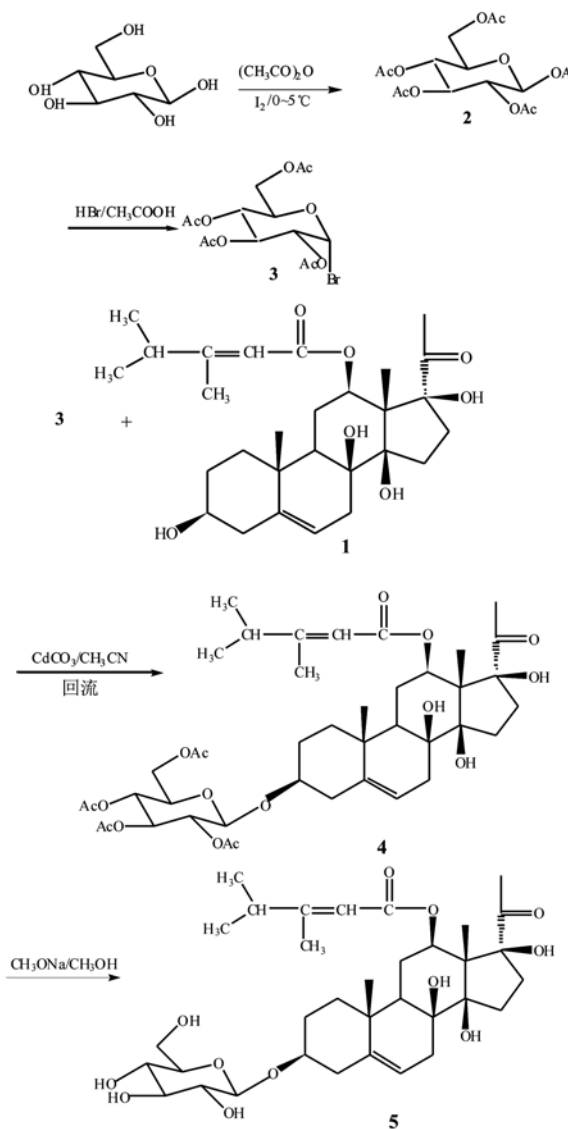


图 2 告达庭-β-D-葡萄糖苷的合成

Fig 2 Synthesis of caudatin-β-D-glucoside

MeOH 回流提取 3 次, 每次 2 h, 合并提取液, 减压回收溶剂, 得 MeOH 提取物 880 g。该提取物加 8 L 氯仿水浴加热 2 h, 冷却后过滤, 减压回收氯仿, 得氯仿提取物 320 g。再将氯仿提取物浸入 3 L n -C₆H₁₄ 中, 加热回流 2 次, 每次 30 min, 得 n -C₆H₁₄ 不溶部分, 干燥, 得总苷 305 g。将总苷加入 3 L 5% HCl 乙醇溶液加热回流 2 h, 以 40% NaOH 溶液中和至 pH=7, 减压浓缩至干, 以 CHCl₃-CH₃OH (100:1~50:1) 作洗脱剂, 在硅胶柱中进行梯度洗脱, 得到化合物 1 45 g, 化合物 1 的 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据与文献[5]报道的告达庭苷元数据一致, 见表 1。

表 1 化合物 1 的 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据¹⁾

Tab 1 The ¹H-NMR and ¹³C-NMR data of compound 1¹⁾

位置	¹³ C-NMR	¹ H-NMR
1α	39.0(t)	1.07~1.08, m
1β		1.76~1.84, m
2α	31.1(t)	1.80~1.84, m
2β		2.32~2.33, m
3	72.1(d)	3.51~3.58, m
4α	42.2(t)	1.88~1.92, m
4β		2.32~2.38, m
5	140.9(s)	
6	117.9(d)	5.38, br s
7	34.5(t)	2.19~2.22, m
8	74.6(s)	
9	44.0(d)	1.57, br d (12.9)
10	38.4(s)	
11α	24.5(t)	1.70~1.77, m
11β		1.93~1.95, m
12	71.9(d)	4.55, dd (5.41, 6.7)
13	58.2(s)	
14	88.3(s)	
15α	33.4(t)	1.93~1.95, m
15β		2.00~2.07, m
16α	32.2(t)	1.70~1.77, m
16β		2.86~2.92, m
17	91.8(s)	
18	9.7(q)	1.55, s
19	18.9(q)	1.19, s
20	209.5(s)	
21	27.4(q)	2.22, s
1'	167.0(s)	
2'	113.3(d)	5.53, s
3'	166.2(s)	
4'	38.4(d)	2.38~2.46, m
5'	21.1(q)	2.13, d (4.6)
6'	21.2(q)	1.13, d (3.6)
7'	16.8(q)	2.16, s

注: 1)-s: 季, d: CH, t: CH₂, q: CH₃ 碳原子

Note: 1)-s: quaternary, d: CH, t: CH₂, q: CH₃ C-atoms

2.3 C₂₁甾体苷的合成

2.3.1 1, 2, 3, 4, 6-*O*-五乙酰基-*D*-葡萄糖(2)合成 向 100 mL 的单口圆底烧瓶中加入 50 mL (0.525 mol)新蒸馏醋酸酐, 然后加入 10 g(0.050 mol) *D*-葡萄糖粉末。先在冰水浴中冷却至 0~5 °C, 然后加入几粒碘, 在冰水浴中搅拌反应 30 min, 溶液呈透明的红棕色, 且底部有固体析出, 表明乙酰化完全。将反应液缓慢倒入 200 mL 冰水中, 搅拌至大量棕黄色固体析出, 抽滤得黄色固体。用乙酸乙酯溶解后, 先用饱和硫代硫酸钠溶液洗涤除去催化剂碘, 有机层再用饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 滤液回收溶剂至干, 得到大量白色固体, 再用无水乙醇重结晶, 得化合物 **2** 21.3 g, 产率 98.2%, 熔点 112~113 °C(文献^[6]值: 110~111 °C)

2.3.2 2, 3, 4, 6-*O*-四乙酰基- α -*D*-溴代葡萄糖(3)合成 将 8.0 g(0.02 mol) **2** 溶于 63 mL 冰醋酸, 再加入 50 mL ω (HBr)=30%的醋酸溶液, 室温搅拌 24 h, TLC 检验反应完全后, 停止反应, 加入 200 mL 氯仿萃取, 有机层先用饱和 NaHCO₃ 水溶液洗涤到无明显气泡放出, 再用饱和食盐水洗涤至中性, 无水硫酸镁干燥, 过滤回收溶剂得黄色糖浆物, 无水乙醚重结晶得到淡黄色固体 **3** 7.6 g, 产率 86.4%。mp: 87~89 °C(文献^[7]值: 88~89 °C)。

2.3.3 告达庭-2, 3, 4, 6-*O*-四乙酰基- β -*D*-葡萄糖苷(4)合成 在装有回流冷凝管的圆底烧瓶中加入 240 mg(0.497 mmol)告达庭, 309 mg(0.75 mmol) **3**, 少量 CdCO₃, 25 mL 乙腈, 加热回流 3 h, TLC 检验苷元消失, 过滤, 回收溶剂至干, 固体以二氯甲烷-甲醇(90:1)作洗脱剂, 在硅胶柱中洗脱, 得白色泡沫状产物 0.35 g, 收率 84.7%, ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据见表 2。经 ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, HMQC 及 HMBC 分析, 乙酰葡萄糖的端基碳的共振信号 δ : 99.5 和相应的端基质子的共振信号 δ : 5.08 (1H, d, J=6.4 Hz), 从端基质子的偶合常数得知乙酰葡萄糖与苷元以 β 苷键连接。比较告达庭和 **4** 的苷元部分的 ¹³C-NMR 数据, 可见苷化位移效应: C-2(-2.0), C-3(+7.5), C-4(-3.7), 说明乙酰葡萄糖连接在告达庭的 C-3 羟基上。

2.3.4 告达庭- β -*D*-葡萄糖苷(5)合成 在圆底烧瓶中加入化合物 0.25 g(0.31 mol)**4**, 0.2 g 甲醇钠及 40 mL 绝对甲醇, 室温回流 30 min, TLC 显示化合物 **4** 消失, 减压回收溶剂, EtOAc 溶解, 水洗,

表 2 化合物 **4** 的 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据¹⁾

Tab 2 The ¹H-NMR and ¹³C-NMR data of compound **4**¹⁾

位置	¹³ C-NMR	¹ H-NMR
苷元部分		
1 α	38.5(t)	0.92~1.08, m
1 β		1.68~1.76, m
2 α	29.1(t)	1.76~1.80, m
2 β		2.00~2.13, m
3	79.6(d)	3.79~3.81, m
4 α	38.9(t)	1.76~1.80, m
4 β		2.44~2.55, m
5	138.6(s)	
6	119.4(d)	5.34, s
7 α	33.6(t)	2.05~2.08, m
7 β		2.44~2.55, m
8	74.0(s)	
9	44.2(d)	1.76, d(12.8)
10	37.1(s)	
11 α	24.8(t)	2.01~2.09, m
11 β		2.09~2.12, m
12	72.3(d)	5.02, dd(4, 3.6)
13	57.7(s)	
14	89.2(s)	
15 α	34.6(t)	2.26~2.28, m
15 β		2.50~2.55, m
16 α	32.7(t)	2.09~2.13, m
16 β		3.24~3.27, m
17	92.1(s)	
18	10.5(q)	1.97, s
19	17.8(q)	1.26, s
20	209.2(s)	
21	27.3(q)	2.05~2.09
1'	165.7(s)	
2'	113.9(d)	5.86, s
3'	165.3(s)	
4'	37.9(d)	2.44~2.46, m
5'	20.7(q)	0.93, d(6.4)
6'	20.6(q)	0.95, d(6.8)
7'	16.2(q)	2.26, s
四乙酰葡萄糖部分		
1	99.5(d)	5.08, d(8)
2	72.0(d)	5.03, dd(3.2, 4)
3	72.0(d)	5.47, dd(10, 8)
4	69.0(d)	5.52, dd(10, 16.8)
5	73.4(d)	5.77, dd(9.6, 9.6)
6	62.3(t)	4.40~4.43, m; 4.59, dd(4.4, 4.4)
2-OCO	170.3(s)	
3-OCO	170.1(s)	
4-OCO	169.6(s)	
6-OCO	169.4(s)	
-CH ₃	20.7(q)	2.00, s
-CH ₃	20.6(q)	2.00, s
-CH ₃	20.6(q)	2.01, s
-CH ₃	20.7(q)	2.01, s

注: 1)-s: 季, d: CH, t: CH₂, q: CH₃ 碳原子

Note: 1)-s: quaternary, d: CH, t: CH₂, q: CH₃ C-atoms

无水 MgSO_4 干燥, 过滤, 回收 EtOAc , 浓缩液以乙酸乙酯-石油醚(50:1)作洗脱剂, 在硅胶柱中洗脱, 得白色粉末状产物 0.16 g, 收率 80.0%, $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据见表 3, 端基碳的共振信号 δ : 101.6 和相应的端基质子的共振信号 δ : 5.52 (1H, m)。

2.4 化合物 1、4、5 的体外抗肿瘤试验

2.4.1 MTT 显色测定法 在 96 孔细胞培养板上, 接种一定密度的大鼠胶质瘤细胞 C_6 细胞悬液, 每孔 100 μL , 培养 1 d(细胞贴壁)后加入不同浓度的药物, 每孔 100 μL , 均设 4 复孔, 另设空白对照组(只加培养液)和正常对照组(加细胞, 不加药), 在 37 $^\circ\text{C}$, 5% CO_2 饱和湿度的培养箱中培养 3 d, 取出, 每孔加入 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 MTT 20 μL , 继续培养 4 h, 倾去各孔内液体, 再每孔加入 DMSO 150 μL , 振摇均匀, 用酶标仪在 490 nm 波长下测每个小孔的光密度, 计算抑制率, 结果见表 4。

2.4.2 数据统计 IC_{50} 用 82798- IC_{50} 计算软件计算, 结果见表 4。

3 结果与讨论

以告达庭苷元为原料, 与 2, 3, 4, 6-*O*-四乙酰基- α -*D*-溴代葡萄糖在 CdCO_3 作催化剂, 乙腈为溶剂的条件下加热回流得到 β 成苷产物, 经 $\text{CH}_3\text{ONa}/\text{CH}_3\text{OH}$ 系统脱保护基得到告达庭- β -*D*-葡萄糖苷, 结构经 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 确证。初步药理研究表明告达庭-2, 3, 4, 6-*O*-四乙酰基- β -*D*-葡萄糖苷(4)对 C_6 细胞的抑制作用较苷元告达庭强; 告达庭- β -*D*-葡萄糖苷对 C_6 细胞的抑制作用与苷元告达庭相比并没有显著改善。乙酰化葡萄糖苷(4)对 C_6 细胞的抑制作用较 1 及 5 强, 这可能与药物的脂水分配系数有关, 葡萄糖水溶性太大不易透过细胞膜, 导致 5 的细胞抑制作用反而不如 4。

表 4 化合物 1、4 及 5 对 C_6 细胞的抑制作用

Tab 4 Inhibitory effect of compound 1, 4 and 5 on rat glioma cells C_6

化合物	抑制率/%					$\text{IC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
	5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	
1	2.28	11.77	20.85	66.65	99.82	41.66
4	9.38	49.41	74.60	87.30	100.00	17.36
5	2.07	24.73	53.92	63.61	63.06	39.41

4 结论

以告达庭苷元为原料通过 2 步反应最终合成

表 3 化合物 5 的 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据¹⁾

Tab 3 The $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ data of compound 5¹⁾

位置	$^{13}\text{C-NMR}$	$^1\text{H-NMR}$
苷元部分		
1 α	39.0(t)	1.06~1.13, m
1 β		1.45~1.49, m
2 α	29.1(t)	1.45~1.49, m
2 β		1.49~1.88, m
3	79.9(d)	3.80~3.85, m
4 α	38.4(t)	1.49~1.88, m
4 β		2.36~2.39, m
5	140.0(s)	
6	118.7(d)	5.38, br s
7	33.4(t)	2.34~2.36, m
8	74.4(s)	
9	44.0(d)	1.06~1.13, m
10	37.3(s)	
11 α	24.6(t)	1.89~1.88, m
11 β		2.18~2.19, m
12	73.6(d)	4.32~4.33, m
13	58.0(s)	
14	88.7(s)	
15 α	34.5(t)	2.36~2.39, m
15 β		2.82~2.84, m
16 α	32.6(t)	1.49~1.88, m
16 β		2.83~2.89, m
17	92.0(s)	
18	10.0(q)	2.12, s
19	18.7(q)	1.07, s
20	209.5(s)	
21	27.5(q)	2.39, s
1'	166.9(s)	
2'	113.3(d)	5.52, br s
3'	166.4(s)	
4'	38.4(d)	2.26~2.46, m
5'	21.2(q)	1.06~1.13, m
6'	21.1(q)	1.07~1.13, m
7'	16.9(q)	2.38~2.36, m
葡萄糖部分		
1	101.6(d)	5.52, br s
2	71.9(d)	3.32, br s
3	75.8(d)	4.33~4.50, m
4	69.8(d)	4.33~4.50, m
5	76.5(d)	4.33~4.50, m
6	61.6(t)	3.80~3.90, m

注: 1)-s: 季, d: CH , t: CH_2 , q: CH_3 碳原子

Note: 1)-s: quaternary, d: CH , t: CH_2 , q: CH_3 C-atoms

了告达庭-2, 3, 4, 6-*O*-四乙酰基- β -*D*-葡萄糖苷及告达庭- β -*D*-葡萄糖苷, 两个化合物的结构均未

见文献报道。

REFERENCES

- [1] CHEN J J, ZHANG Z X, JUN Z. The chemical constituents of *Cynanchum Forrestii*. [J]. Acta Bot Yunnan(云南植物研究), 1989, 11(4): 471-476.
- [2] LOU H X, LI X. C₂₁ steroidal constituents from *Cynanchum Hancockianum*. [J]. Acta Pharm Sin(药学学报), 1992, 27(8): 595-602.
- [3] ZHANG R S, YE Y P, SHEN Y M. Studies on the cytotoxic constituents of *Cynanchum auriculatum* Royle ex wight. [J] Acta Pharm Sin(药学学报), 2000, 35(6): 431-437.
- [4] ZHANG R S, YE Y P. Two new cytotoxic C-21 steroidal glycosides from the root of *Cynanchum auriculatum*. [J]. Tetrahedron, 2000, 35(6): 3875-3879.
- [5] BANDO H, AMIYA T, SATO E, et al. Studies on the constituents of Asclepiadaceae plants. XL VIII . 5 α , 6 α -epoxycaudatin, a new polyoxypregnane derivative from *Cynanchum caudatum* Max. [J]. Chem Pharm Bull, 1980, 28(7): 2258-2260.
- [6] GUAN Y D, LI C J, GE S F. Organic Chemistry Experiment (有机化学实验) [M]. 2nd ed. Beijing: Peking University Press, 2002: 196-197.
- [7] NICOLAOU K C, SNYDER S A. Classics in Total Synthesis II [M]. Vol 2. California: Wiley-VCH, 1997: 161-206.

收稿日期: 2010-09-08