

本文引用:杨彦霞,庄方方,闫福林.岩白菜素衍生物合成方法及抗肿瘤活性评价[J].新乡医学院学报,2019,36(9):819-823. DOI:10.7683/xyxyxb.2019.09.004.

【基础研究】

岩白菜素衍生物合成方法及抗肿瘤活性评价

杨彦霞¹, 庄方方², 闫福林³

(1. 新乡医学院第三附属医院药学部, 河南 新乡 453003; 2. 河南省职工医院药学部, 河南 郑州 450001; 3. 新乡医学院药学院, 河南 新乡 453003)

摘要: **目的** 合成岩白菜素的衍生物,并评价其抗肿瘤活性。**方法** 以天然植物鬼臼槲中分离得到的岩白菜素为原料,首先合成炔烃中间体,然后通过 Click 反应在其分子结构中引入三氮唑基团;运用甲基噻唑基四唑法检测制备的各种衍生物对胃癌 MGC-803 细胞、食管癌 EC9706 细胞、黑色素瘤 B16 细胞的体外抗肿瘤活性。**结果** 制备出 8 种衍生物,大多衍生物对 3 种肿瘤细胞株有一定的细胞毒活性。其中衍生物 4 对食管癌 EC9706 细胞有很强的细胞毒活性,其半数抑制浓度(IC_{50})为 $(6.2 \pm 0.7) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,优于阳性对照物氟尿嘧啶 IC_{50} 值 $(6.3 \pm 0.1) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。**结论** 建立了操作简便的岩白菜素衍生物合成方法,为此类化合物抗肿瘤药物筛选奠定了实验基础。

关键词: 岩白菜素衍生物;三氮唑;抗肿瘤活性

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2019)09-0819-05

Synthesis and anti-tumour activity evaluation of bergenin derivatives

YANG Yan-xia¹, ZHUANG Fang-fang², YAN Fu-lin³

(1. Department of Pharmacy, the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China; 2. Department of Pharmacy, Henan Provincial Staff Hospital, Zhengzhou 450001, Henan Province, China; 3. School of Pharmacy, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China)

Abstract: Objective To synthesize bergenin derivatives and evaluate their antitumor activity. **Methods** The bergenin extracted from *Rodgersia aesculifolia* Batal. was used as raw material for the synthesis of the alkyne intermediate, and the triazolium group was introduced into its molecular structure by Click reaction. Their antitumor activities of the bergenin derivatives against gastric cancer cells MGC-803, esophageal cancer cells EC9706 and melanoma cells B16 *in vitro* was detected by methylthiazolidyl tetrazole method. **Results** A total of 8 derivatives were obtained from bergenin, and most of the compounds showed potent antitumor activity to above three tumor cells. The compound 4 showed strong cytotoxic activity to esophageal cancer cells EC9706, and its half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) value was $(6.2 \pm 0.7) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, which was better than the positive control substance fluorouracil [IC_{50} was $(6.3 \pm 0.1) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$]. **Conclusion** A simple method for the synthesis of bergenin derivatives was established, which laid the experimental foundation for the screening of antitumor drugs.

Key words: bergenin derivatives; triazole; anti-tumour activity

岩白菜素是一类二氢异香豆素类化合物,是传统中药岩白菜(*Bergenia ligulata*)^[1]的主要活性成分,也存在于其他植物中,如鬼灯檠(*Rodgersia aesculifolia Batal.*)^[2]。作者在对天然植物鬼灯檠进行化学成分研究中得到了大量的岩白菜素。岩白菜素有多种药理活性,如降血脂^[3]、抗人类免疫缺陷病毒^[4]、抗炎^[5]、抗心律失常^[6]、神经保护^[7]、肝脏保护^[8]和胃肠道道保护^[9]等。而对岩白菜素的抗肿瘤活性研究较少。1,2,3-三氮唑及其衍生物由于具

有广法的生物活性而一直备受关注^[10],有研究报道其具有抗肿瘤药理活性^[11]。基于三氮唑的抗肿瘤药理活性,本研究拟以岩白菜素为初始原料,首先在分子结构中引入炔烃,然后通过 Click 反应^[12]引入 1,2,3-三氮唑基团,制备含活性基团三氮唑的岩白菜素衍生物,并采用甲基噻唑基四唑法 (methylthiazolyl tetrazolium, MTT) 检测制备的衍生物对胃癌 MGC-803 细胞、食管癌 EC9706 细胞、黑色素瘤 B16 细胞的体外抗肿瘤活性。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂与仪器 人食管癌 EC9706 细胞、胃癌 MGC-803 细胞及黑色素瘤 B16 细胞购自广州

DOI:10.7683/xyxyxb.2019.09.004

收稿日期:2018-11-19

基金项目:河南省自然科学基金资助项目(编号:182300410356)。

作者简介:杨彦霞(1987-),女,河南周口人,硕士,主管药师,研究方向:药物化学。

吉妮欧生物科技有限公司;溴化苄、4-乙基氯化苄购自美国 Sigma Aldrich 公司,4-叔丁基氯苄购自阿拉丁试剂(上海)有限公司,氟尿嘧啶(fluorouracil, FU)购自山东普德有限公司,柱层析用石油醚、乙酸乙酯(ethyl acetate, EA)购自天津科密欧试剂公司,达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)、胎牛血清购自杭州四季青生物技术公司,MTT 试剂盒、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自美国 Sigma 公司;柱层析用硅胶(200~300 目)、薄层层析用硅胶 GF254 购自青岛海洋化工厂, Bruker-400 型核磁共振波谱仪购自德国 Bruker 公司, FTS-40 红外光谱仪购自美国 Bio-Rad 公司, X-4 显微熔点仪(温度计未校正)购自上海精密仪器有限公司, Q-TOF 6540 高分辨质谱仪购自美国安捷伦公司。

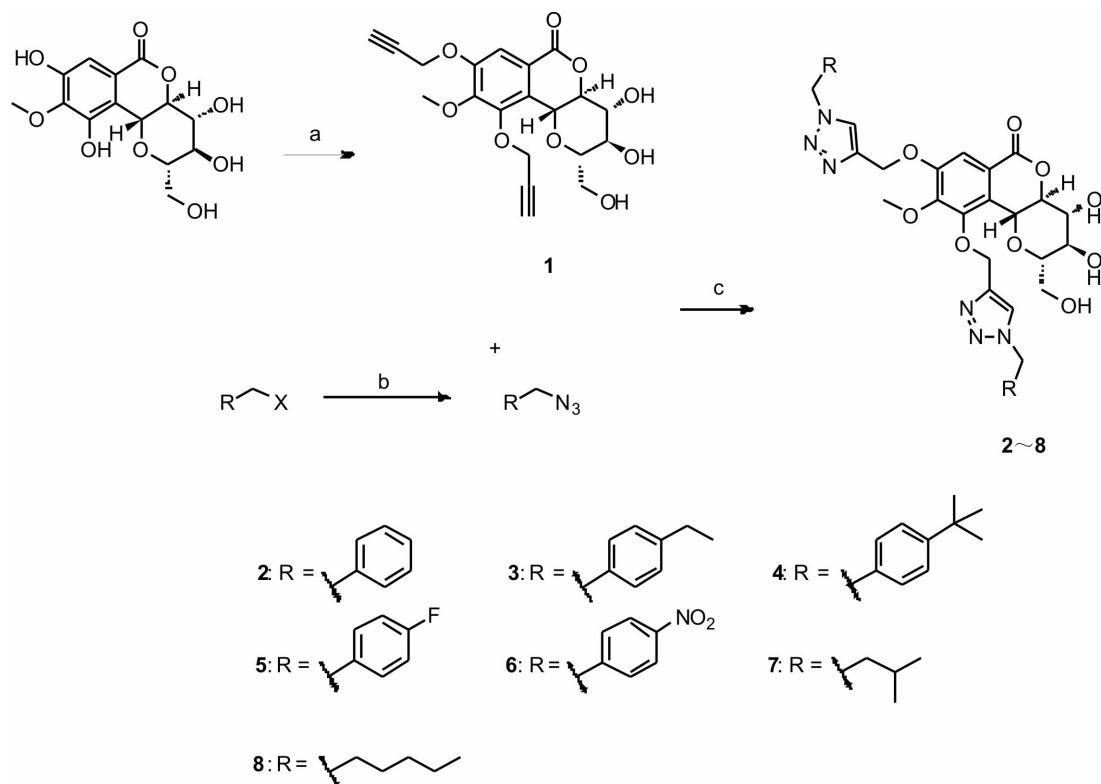
1.2 岩白菜素衍生物的制备 步骤 1:取岩白菜素(32.8 mg, 0.1 mmol)、3-溴丙炔(35.7 mg, 0.3 mmol)、KI(49.8 mg, 0.2 mmol)、K₂CO₃(27.6 mg, 0.2 mmol)溶解于 N-甲基吡咯烷酮(N-methyl-2-pyrrolidone, NMP)中, 60 °C 反应 4 h。薄层色谱法(thin-layer chromatography, TLC)检测, 反应结束后冷却至室温, 有机相用 EA 萃取 3 次, 萃取液用过量的 Na₂SO₄ 粉末干燥 15 min, 过滤、减压浓缩

得粗产品, 粗产品经硅胶柱层析分离纯化, 在石油醚(petroleum ether, PE)和 EA 不同比例(PE:EA, 1:1, 0:1)下洗脱, 得到纯净产物 1(图 1)。

步骤 2:取 1 mmol 溴化苄与 2 mmol 叠氮化钠于 5 mL 干燥圆底烧瓶中, 加入 2 mL 二甲基甲酰胺(N,N-Dimethylformamide, DMF), 30 °C 下反应 10 h, TLC 检测反应, 反应结束后向反应液中缓慢加入 10 mL 乙醚和 10 mL 蒸馏水温和条件下进行萃取, 有机相用过量的无水 Na₂SO₄ 干燥 15 min, 过滤, 浓缩得到苄基取代的叠氮化合物(图 1)。

步骤 3:取中间产物 1(40.2 mg, 0.1 mmol)、苄基取代的叠氮化合物(0.25 mmol)、CuSO₄·5H₂O(5 mg)、和维生素 C 钠(5 mg)于 3 mL THF-H₂O(v/v=1/1)或者 3 mL t-BuOH-H₂O(v/v=1/1)反应溶剂中, 40 °C 条件下反应 4 h, TLC 检测反应。结束后反应溶液冷却至室温, 有机相用 EA 萃取 3 次, 萃取液用过量的 Na₂SO₄ 粉末干燥 15 min, 过滤、减压浓缩得粗产品, 粗产品经硅胶柱层析分离纯化, 在 PE 和 EA 不同比例(PE:EA, 5:1, 3:1)下洗脱, 得到目标产物 2(图 1)。

化合物 3~8 的制备方法(图 1)同化合物 2, 区别于中间产物 1 与不同的叠氮化合物进行 Click 反应。



a: 3-溴丙炔, KI, K₂CO₃, NMP, 60 °C, 66.7%; b: NaN₃, DMF, 30 °C; c: CuSO₄·5H₂O, 维生素 C 钠, THF-H₂O 或者 t-BuOH-H₂O, 40 °C, 产率 74.4%~96.3%。

图 1 衍生物 1~8 的合成路线

Fig. 1 Synthesis route of compounds 1-8

1.3 岩白菜素及其衍生物的抗肿瘤活性检测

1.3.1 细胞培养 人胃癌 MGC-803 细胞,食管癌 EC9706 细胞及黑色素瘤 B16 细胞置于含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基,于 37 ℃、含体积分数 5% CO₂ 的恒温培养箱中培养,正常传代 3 次后将细胞置于含体积分数 10% 胎牛血清、0.01 U · L⁻¹ 链霉素与 0.10 U · L⁻¹ 青霉素的 DMEM 培养液中,于 37 ℃、含体积分数 5% CO₂ 的恒温培养箱中饱和湿度培养,每 2 ~ 3 d 换液 1 次。

1.3.2 MTT 法测定岩白菜素及合成的 8 种化合物的半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) 分别取对数生长期、状态良好的胃癌 MGC-803 细胞、食管癌 EC9706 细胞及黑色素瘤 B16 细胞,制成单细胞悬液,细胞密度调整为 1 × 10² L⁻¹,接种在 96 孔板,每孔加细胞悬液 100 μL,置于 37 ℃、含体积分数 5% CO₂ 的恒温培养箱中培养 24 h,细胞贴壁后,将细胞分为给药组、对照组和空白组。给药组按照预定的浓度梯度分别加入岩白菜素及合成的 8 种衍生物待测样品,每个梯度做 6 个重复。对照组细胞给予等体积的用于溶解样品用的溶剂,空白组细胞给予三蒸水,培养 48 h 后,每孔加入 20 μL MTT,置于 37 ℃、含体积分数 5% 的 CO₂ 培养箱中温育 4 h,弃上清液,每孔加入 200 μL DMSO,震荡 10 min,沉淀溶解,用酶标仪在 492 nm 波长处检测吸光度值,计算样品对细胞的抑制率;采用氟尿嘧啶为阳性对照。抑制率 = [(对照组吸光度值 - 空白组吸光度值) - (给药组吸光度值 - 空白组吸光度值)] / (对照组吸光度值 - 空白组吸光度值) × 100%,以抑制率为横坐标,药物浓度为纵坐标作图,计算每个样品的 IC₅₀, IC₅₀ ≤ 100 μmol · L⁻¹ 为有肿瘤细胞抑制作用, IC₅₀ > 100 μmol · L⁻¹ 为无肿瘤细胞抑制作用。本实验连续测定 3 次,取均值。

2 结果

2.1 衍生物 1~8 的结构特征 化合物 1: (2S,3R,4R,4aS,10bR)-3,4-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)-9-methoxy-8,10-bis(prop-2-yn-1-yloxy)-2,3,4,4a-tetrahydropyrano[3,2-c]isochromen-6(10bH)-one, 产率: 66.7%, 白色固体, m. p. 180 ~ 182 ℃, IR (cm⁻¹) 3 399, 3 284, 2 123, 1 698, 1 328, 1 121, 1 030; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, ppm, TMS) δ 7.50 (s, 1H), 5.61 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 5.32 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 4.95 (s, 2H), 4.86 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 4.71 (q, J = 15.7 Hz, 2H), 4.52 (s, 1H), 3.93 (t, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.66 (s, 2H),

3.54 (s, 2H) ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆, ppm, TMS) δ 163.5, 150.7, 148.9, 148.5, 127.4, 118.9, 111.6, 81.5, 80.2, 79.9, 79.1, 78.7, 77.9, 74.1, 71.2, 70.2, 60.9, 60.9, 60.9, 56.6。C₂₀H₉(M + Na)⁺ 高分辨质谱 (high-resolution mass spectrometer, HRESIMS) 计算值 427.099 9, 实测值 427.099 9。

化合物 2: (2S,3R,4R,4aS,10bR)-8,10-bis((1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-3,4-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)-9-methoxy-2,3,4,4a-tetrahydro-pyrano[3,2-c]isochromen-6(10bH)-one, 产率 86.9%, 白色粉末, m. p. 105 ~ 106 ℃, IR (cm⁻¹) 3 400, 3 289, 2 925, 1 717, 1 327, 1 103, 1 030; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, ppm, TMS) δ 8.31 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.41 - 7.26 (m, 10H), 5.64 (s, 2H), 5.62 (s, 2H), 5.35 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 5.26 (s, 2H), 5.08 (q, J = 11.3 Hz, 2H), 4.89 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 4.77 (d, J = 10.3 Hz, 1H), 4.03 (q, J = 7.1 Hz, 1H), 3.92 (t, J = 9.9 Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.38 (s, 2H)。 ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆, ppm, TMS) δ 163.6, 151.6, 149.3, 148.5, 143.6, 142.6, 136.2, 136.1, 128.9, 128.8, 128.3, 128.2, 128.0, 127.9, 125.1, 124.9, 119.1, 111.6, 82.0, 80.4, 74.1, 71.4, 70.2, 66.2, 62.3, 60.9, 60.7, 59.9, 52.9。C₃₄H₁₆N₆O₉(M + Na)⁺ HRESIMS 计算值 693.227 9, 实测值 693.227 3。

化合物 3: (2S,3R,4R,4aS,10bR)-8,10-bis((1-(4-ethylbenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-3,4-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)-9-methoxy-2,3,4,4a-tetrahydropyrano[3,2-c]isochromen-6(10bH)-one, 产率: 91.3%, 无色油状物, IR (cm⁻¹) 3 380, 1 717, 1 321, 1 103, 1 023; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD, ppm, TMS) δ 8.03 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.20 - 7.15 (m, 8H), 5.61 (d, J = 11.3 Hz, 1H), 5.53 (s, 2H), 5.50 (s, 2H), 5.19 (s, 2H), 5.06 (d, J = 11.4 Hz, 1H), 4.53 (d, J = 10.2 Hz, 1H), 3.91 - 3.82 (m, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.41 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 3.35 (s, 2H), 2.60 (q, J = 7.6 Hz, 4H), 1.18 (t, J = 7.6 Hz, 6H)。 ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD, ppm, TMS) δ 165.7, 153.5, 151.1, 150.5, 146.4, 146.4, 145.3, 144.7, 134.3, 134.2, 130.5, 129.8, 129.9, 129.5, 129.4, 126.2, 125.9, 120.6, 114.2, 83.3, 82.0, 76.1, 73.5, 71.6, 67.2, 63.8, 62.6, 61.9, 55.0, 55.0, 29.7, 29.7, 16.3, 16.3。C₃₈H₁₈N₆O₉(M + Na)⁺ HRESIMS 计算值 749.290 5, 实测值 749.290 6。

化合物 4: (2S,3R,4R,4aS,10bR)-8,10-bis

((1-(4-(tert-butyl)benzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-3,4-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)-9-methoxy-2,3,4,4a-tetrahydropyrano[3,2-c]isochromen-6(10bH)-one, 产率:80.8%, 黄色粉末, m. p. 121 ~ 123 °C, IR (cm⁻¹) 3 380, 2 961, 1 722, 1 321, 1 103, 1 023; ¹H NMR (400 MHz, Acetone, ppm, TMS) δ 8.18 (s, 2H), 7.60 (s, 1H), 7.40 (dd, J = 8.5, 3.4 Hz, 4H), 7.28 (dd, J = 13.5, 8.5 Hz, 4H), 5.60 (s, 4H), 5.28 (s, 2H), 5.17 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 5.07 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 4.70 (d, J = 10.3 Hz, 1H), 3.97 – 3.91 (m, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.76 (dd, J = 12.5, 5.0 Hz, 1H), 3.48 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 3.41 (s, 2H), 1.27 (s, 18H)。 ¹³C NMR (100 MHz, Acetone, ppm, TMS) δ 163.8, 152.3, 151.4, 149.5, 149.4, 143.9, 143.3, 133.2, 133.1, 128.1, 128.0, 127.9, 125.9, 125.9, 125.0, 124.5, 119.6, 112.4, 82.5, 80.8, 74.8, 72.2, 70.6, 66.3, 62.8, 61.4, 60.8, 53.4, 53.3, 34.4, 30.9。 C₄₂H₃₂N₆O₉(M + Na)⁺ HRESIMS 计算值 805.353 1, 实测值 805.352 3。

化合物 5: (2S, 3R, 4R, 4aS, 10bR)-8, 10-bis((1-(4-fluorobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-3,4-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)-9-methoxy-2,3,4,4a-tetrahydropyrano[3,2-c]isochromen-6(10bH)-one, 产率:96.3%, 白色粉末, m. p. 117 ~ 119 °C, IR (cm⁻¹) 3 380, 2 961, 1 722, 1 321, 1 127, 1 023; ¹H NMR (400 MHz, Acetone, ppm, TMS) δ 8.23 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.48 – 7.38 (m, 4H), 7.14 (ddd, J = 8.8, 6.0, 3.4 Hz, 4H), 5.66 (s, 2H), 5.65 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 5.20 – 5.03 (m, 2H), 4.70 (d, J = 10.3 Hz, 1H), 4.04 (q, J = 7.1 Hz, 1H), 3.96 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 3.94 – 3.90 (m, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.75 (dd, J = 12.5, 5.0 Hz, 1H), 3.42 (s, 2H)。 ¹³C NMR (100 MHz, Acetone, ppm, TMS) δ 163.9, 163.7, 161.5, 152.2, 149.5, 149.3, 143.9, 143.3, 132.3, 130.6, 130.6, 130.5, 130.5, 127.9, 124.9, 124.5, 119.5, 115.9, 115.9, 115.7, 115.7, 112.3, 82.4, 80.7, 74.7, 72.1, 70.5, 66.2, 62.6, 61.4, 60.7, 52.9, 52.8。 C₃₄H₃₂F₂N₆O₉(M + Na)⁺ HRESIMS 计算值 729.209 1, 实测值 729.206 4。

化合物 6: (2S, 3R, 4R, 4aS, 10bR)-3, 4-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)-9-methoxy-8, 10-bis((1-(4-nitrobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-2,3,4,4a-tetrahydropyrano[3,2-c]isochromen-6(10bH)-one, 产率:74.4%, 白色粉末, m. p. 141 ~ 143 °C, IR

(cm⁻¹) 3 368, 1 717, 1 522, 1 346; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, ppm, TMS) δ 8.37 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.25 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 8.23 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 7.57 (s, 1H), 7.52 (t, J = 9.1 Hz, 4H), 5.83 (s, 2H), 5.81 (s, 2H), 5.59 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 5.30 (s, 3H), 5.09 (q, J = 11.4 Hz, 2H), 4.79 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 3.92 (t, J = 9.9 Hz, 1H), 3.76 (s, 2H), 3.65 (dd, J = 13.9, 8.8 Hz, 1H), 3.60 – 3.53 (m, 1H), 3.33 (s, 2H)。 ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆, ppm, TMS) δ 163.5, 151.6, 149.3, 148.5, 147.4, 147.3, 143.7, 143.5, 143.4, 142.8, 129.1, 129.0, 127.3, 125.4, 125.3, 124.0, 119.1, 111.6, 82.0, 80.3, 74.1, 71.3, 70.2, 66.2, 62.3, 60.9, 60.8, 52.0。 C₃₄H₃₂N₈O₁₃(M + Na)⁺ HRESIMS 计算值 783.198 1, 实测值 783.196 8。

化合物 7: (2S, 3R, 4R, 4aS, 10bR)-3, 4-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)-8, 10-bis((1-isopentyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-9-methoxy-2,3,4,4a-tetrahydropyrano[3,2-c]isochromen-6(10bH)-one, 产率:76.5%, 无色油状物, IR (cm⁻¹) 3 369, 2 956, 1 722, 1 321, 1 103, 1 030; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD, ppm, TMS) δ 8.14 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 5.26 (s, 2H), 5.18 (d, J = 11.1 Hz, 1H), 5.09 (d, J = 11.2 Hz, 1H), 4.69 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 4.44 (dd, J = 16.3, 7.6 Hz, 4H), 4.01 – 3.94 (m, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.82 – 3.74 (m, 2H), 3.46 (dd, J = 15.5, 7.5 Hz, 1H), 3.30 (s, 2H), 1.84 – 1.73 (m, 4H), 1.49 (ddd, J = 18.2, 13.4, 6.7 Hz, 2H), 0.95 (t, J = 6.3 Hz, 12H)。 ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD, ppm, TMS) δ 165.8, 153.6, 151.0, 150.7, 145.0, 144.3, 129.2, 126.1, 125.9, 120.6, 113.8, 83.5, 82.1, 76.2, 73.6, 71.7, 67.5, 63.8, 62.6, 62.0, 50.1, 50.0, 40.4, 40.3, 26.9, 26.7, 22.8, 22.7。 C₃₀H₄₂N₆O₉(M + Na)⁺ HRESIMS 计算值 653.290 5, 实测值 653.289 9。

化合物 8: (2S, 3R, 4R, 4aS, 10bR)-8, 10-bis((1-hexyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-3, 4-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)-9-methoxy-2,3,4,4a-tetrahydropyrano[3,2-c]isochromen-6(10bH)-one, 产率:87.8%, 白色粉末, m. p. 103 ~ 105 °C, IR (cm⁻¹) 3 314, 2 931, 1 722, 1 328, 1 103, 1 036; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD, ppm, TMS) δ 8.12 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 5.28 (s, 2H), 5.19 (d, J = 11.1 Hz, 1H), 5.12 (d, J = 11.2 Hz, 1H), 4.73 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 4.42 (q, J = 7.3 Hz, 4H), 4.03 – 3.92 (m, 2H), 3.88 (s, 3H),

3.83 – 3.79 (m, 1H), 3.48 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 3.32 (s, 2H), 1.96 – 1.84 (m, 4H), 1.30 (dd, $J = 13.1, 10.9$ Hz, 12H), 0.89 (dd, $J = 8.7, 4.3$ Hz, 6H)。¹³ C NMR (100 MHz, CD₃OD, ppm, TMS) δ 165.8, 153.6, 151.0, 150.8, 145.0, 144.3, 129.2, 126.1, 125.9, 120.7, 113.9, 83.5, 82.1, 76.2, 73.6, 71.7, 67.5, 63.8, 62.6, 62.0, 51.7, 51.6, 32.5, 31.5, 31.5, 27.4, 23.8, 14.6。C₃₂H₄₆N₆O₉ (M + Na)⁺ HRESIMS 计算值681.3218,实测值681.3195。

2.2 岩白菜素及其衍生物的体外抗肿瘤活性 结果见表1。岩白菜素无抗肿瘤活性,其1,2,3-三氮唑衍生物中苯环、脂肪环的引入均能提高岩白菜素的抗肿瘤活性。尤其是苯环对位被吸电子基及空间位阻比较大的叔丁基取代的衍生物4对食管癌EC9706细胞抑制活性较好。

表1 岩白菜素及其衍生物的体外抗肿瘤活性
Tab.1 Antitumor activity of bergenin and it's derivatives in vitro

化合物	IC ₅₀ /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)		
	MGC-803	EC9706	B16
岩白菜素	>100	>100	>100
化合物1	>100	52.5 ± 1.7	>100
化合物2	25.4 ± 1.4	35.4 ± 1.5	>100
化合物3	41.5 ± 1.6	7.4 ± 0.8	36.7 ± 1.5
化合物4	12.0 ± 1.0	6.2 ± 0.7	17.6 ± 1.2
化合物5	28.9 ± 1.4	12.6 ± 0.4	12.5 ± 0.4
化合物6	23.2 ± 1.3	10.9 ± 0.1	10.9 ± 0.0
化合物7	52.7 ± 1.7	11.4 ± 1.0	33.5 ± 1.5
化合物8	62.8 ± 1.7	11.5 ± 1.6	50.8 ± 1.7
氟尿嘧啶	3.2 ± 0.1	6.3 ± 0.1	3.4 ± 2.6

3 讨论

为了提高岩白菜素的抗肿瘤活性,本实验建立了在岩白菜素分子结构中引入活性基团三氮唑的合成方法,并对合成的衍生物进行抗肿瘤活性的评价。本研究结果显示,中间产物炔烃化合物1对食管癌EC9706细胞显示出明显的抑制活性,岩白菜素的1,2,3-三氮唑衍生物的抗肿瘤活性明显强于岩白菜素。其中,1,2,3-三氮唑衍生物上取代基R在抗肿瘤活性方面起重要的作用,并且岩白菜素衍生物结构中苯环上取代基的电子属性及空间位阻也不同程度的影响其抗肿瘤活性,如苯环对位上含有给电子基团如4-CH₂CH₃和4-C(CH₃)₃(化合物3和4)或者含有吸电子基团如4-F和4-NO₂(化合物5和6)的衍生物的抗肿瘤活性明显优于苯环对位上无取代基的衍生物(化合物2),尤其是苯环对位上含4-C(CH₃)₃空间位阻比较大的衍生物(化合物4),对胃癌MGC-803细胞、食管癌EC9706细胞和

黑色素瘤B16细胞的抑制活性明显强于岩白菜素,IC₅₀分别低至12.0、6.2、17.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,对食管癌EC9706细胞的抑制活性优于阳性对照药品氟尿嘧啶(IC₅₀为6.3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。用脂肪链取代苯环的衍生物(化合物7,8),其抗肿瘤活性明显强于岩白菜素,但与苯环取代衍生物相比,其抗肿瘤活性无明显增强。

参考文献:

[1] BAHL C P, MURARI R, PARTHASARATHY M R, *et al.* Components of *bergenia strecheyi* & *bergenia ligulata* [J]. *Indian J Chem*, 1974, 12(6):1038-1039.

[2] TANEYAMA M, YOSHIDA S, KOBAYASHI M, *et al.* Isolation of norbergenin from *Saxifraga stolonifera* [J]. *Phytochemistry*, 1983, 22(4):1053-1054.

[3] JAHROMI M A F, CHANSOURIA J P N, RAY A B. Hypolipidaemic activity in rats of bergenin, the major constituent of *Flueggea microcarpa* [J]. *Phytother Res*, 2010, 6(4):180-183.

[4] PIACENTE S, PIZZA C, DE T N, *et al.* Constituents of *Ardisia japonica* and their *in vitro* anti-HIV activity [J]. *J Nat Prod*, 1996, 59(6):565-569.

[5] SWARNALAKSHMI T, SETHURAMAN M G, SULOCHANA N. A note on the anti-inflammatory activity of bergenin [J]. *R Arivudainambi Curr Sci*, 1984, 53(17):917-921.

[6] PU H L, HUANG X, ZHAO J H, *et al.* Bergenin is the antiarrhythmic principle of *Fluggea virosa* [J]. *Planta Med*, 2002, 68(4):372-374.

[7] TAKAHASHI H, KOSAKA M, WATANABE Y, *et al.* Synthesis and neuroprotective activity of bergenin derivatives with antioxidant activity [J]. *Bioorg Med Chem*, 2003, 11(8):1781-1788.

[8] HWAKYUNG L, HACKSEANG K, HONGSERCK C, *et al.* Hepatoprotective effects of bergenin, a major constituent of *Mallotus japonicus*, on carbon tetrachloride-intoxicated rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2000, 72(3):469-474.

[9] GOEL R K, MAITI R N, MANICKAM M, *et al.* Antiulcer activity of naturally occurring pyrano-coumarin and isocoumarins and their effect on prostanoid synthesis using human colonic mucosa [J]. *Indian J Exp Biol*, 1997, 35(10):1080-1083.

[10] SANGHVI Y S, BHATTACHARYA B K, KINI G D, *et al.* Growth inhibition and induction of cellular differentiation of human myeloid leukemia cells in culture by carbamoyl congeners of ribavirin [J]. *J Med Chem*, 1990, 33(1):336-344.

[11] KAMAL A, SHANKARAI AH N, DEVAIAH V, *et al.* Synthesis of 1,2,3-triazole-linked pyrrolobenzodiazepine conjugates employing "click" chemistry: DNA-binding affinity and anticancer activity [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18(4):1468-1473.

[12] THIRUMURUGAN P, MATOSIUK D, JOZWIAK K. Click chemistry for drug development and diverse chemical-biology applications [J]. *Chem Rev*, 2013, 113(7):4905-4979.

(本文编辑:杨 博 英文编辑:杨 博)