

Synthesis and *In Vitro* Antitumor Activities of Lupanol Gallate

Wei jie Li

School of Chemical and Environmental Engineering, Hanshan Normal University, Chaozhou Guangdong
Email: weijieli1688@126.com

Received: Sep. 3rd, 2016; accepted: Sep. 18th, 2016; published: Sep. 22nd, 2016

Copyright © 2016 by author and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Under the presence of *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DDC) as dehydrating agent and 4-dimethylaminopyridine (DMAP) as catalyst, lupanol was refluxed with excessive gallic acid for 10 h in dichloromethane to give lupanol gallate as a new compound at 69.6% yield. The latter was explored for *in vitro* antitumor activities against A549, LAC and HepG2 cell lines. The results showed that lupanol and cisplatin as positive control compounds had no inhibitory abilities against the above three tested tumor cell lines. The IC₅₀ values of lupanol gallate against A549, LAC and HepG2 cells were 51.71 μM, 62.16 μM and 64.34 μM respectively. The antitumor activities of lupanol gallate against A549 and LAC cells were inferior to those of adriamycin, however its antitumor activity against HepG2 cell exceeded that of adriamycin.

Keywords

Lupanol Gallate, Synthesis, Antitumor Activity

没食子酸羽扇烷醇酯的合成及其体外抗肿瘤活性

李伟杰

韩山师范学院化学与环境工程学院, 广东 潮州
Email: weijieli1688@126.com

摘要

在缩合剂 N,N' -二环己基碳二亚胺(DCC)和催化剂4-二甲氨基吡啶(DMAP)的作用下,羽扇烷醇与过量的没食子酸在二氯甲烷中回流10 h,合成了新化合物没食子酸羽扇烷醇酯,产率为69.6%。研究了没食子酸羽扇烷醇酯体外对肿瘤细胞株A549、LAC和HepG2的抑制活性。结果表明,羽扇烷醇和顺铂作为阳性对照物,它们对上述3株肿瘤细胞株的增殖没有抑制作用,没食子酸羽扇烷醇酯对A549、LAC和HepG2的 IC_{50} 值分别是51.71、62.16和64.34 μM ,其对肿瘤细胞株A549和LAC增殖的抑制作用不及阿霉素,而对HepG2增殖的抑制作用比阿霉素的强。

关键词

没食子酸羽扇烷醇酯, 合成, 抗肿瘤活性

1. 引言

没食子酸是一种天然多酚类化合物,其化学名为3,4,5-三羟基苯甲酸,广泛存在于五倍子、漆树和茶等植物中。没食子酸及其酯具有抗菌、抗病毒和抗肿瘤等多种生理活性[1]-[3]。羽扇烷醇属于五环三萜类天然产物,在自然界中含量较少。文献报道表明,羽扇烷醇没有抗肿瘤活性[4],但其结构修饰物具有多种生物活性[4]-[8]。据文献报道,羽扇烷醇二元羧酸单酯具有抗HIV活性[6][7]。笔者最近的研究表明,羽扇烷醇二元羧酸单酯对肿瘤细胞株A549、HepG2和HeLa的增殖具有很强的抑制活性,其抗肿瘤活性比阿霉素的强[4];肉桂酸羽扇烷醇酯对食管鳞癌细胞Eca-109、TE-1和EC-9706的增殖均有良好的抑制活性,其抗肿瘤活性与阿霉素的相近[8]。目前,未见文献报道没食子酸羽扇烷醇酯。本文以羽扇烷醇和没食子酸为原料,报道了新的化合物没食子酸羽扇烷醇酯的合成方法(见图1),并以顺铂和阿霉素作阳性对照药物,研究了其对肿瘤细胞株A549、LAC和HepG2增殖的抑制活性。

2. 实验方法

2.1. 主要仪器和试剂

Brucker DRX-400 核磁共振仪, TMS 为内标; MDS Sciex API 2000 LC/GC/MS 质谱仪; Perkin-Elmer 240C 元素分析仪; Synergy HT 多功能酶标仪(美国 BioTek 公司); 羽扇烷醇由本实验室按文献方法制备获得[9]。3-(4',5'-二甲基噻唑-2')-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)(广州博强生物科技有限公司); 青霉素、链

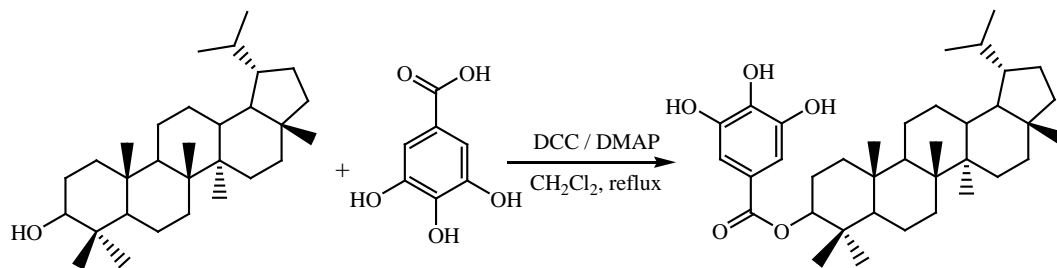


Figure 1. Synthesis of lupanol gallate
图1. 没食子酸羽扇烷醇酯的合成

霉素、PRMI-1640 培养基和胎牛血清(杭州四季青生物工程材料公司); 阿霉素(深圳万乐药业有限公司); 顺铂(济南齐鲁制药有限公司); 没食子酸(Alfa Aesar Co.); 其它试剂均为分析纯。

2.2. 没食子酸羽扇烷醇酯的合成

在干净的 100 mL 圆底烧瓶中加入 214.36 mg (0.50 mmol)羽扇烷醇、102.08 mg (0.60 mmol)没食子酸、123.80 mg (0.60 mmol) DCC、4.89 mg (0.04 mmol) DMAP 和 30 mL 二氯甲烷, 装上球形冷凝管, 并在冷凝管上装一个干燥管, 干燥剂为无水氯化钙, 然后回流(40℃)搅拌, 反应时间通过薄层层析(TLC)跟踪来确定。反应 10 h 后冷却, 过滤, 滤液减压浓缩, 以石油醚:丙酮 = 4:1 作洗脱剂, 硅胶 200~300 目, 残留物经柱层析得白色固体 202.1 mg, 产率为 69.6%。产物 $R_f = 0.52$ (展开剂: 二氯甲烷); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ : 0.74 (3H, s), 0.77 (3H, s), 0.81 (3H, s), 0.85 (6H, d, $J = 8.0$ Hz), 0.92 (3H, s), 0.95 (3H, s), 1.01 (3H, s), 1.24~1.34 (11H, m), 1.36~1.37 (3H, m), 1.50~1.54 (3H, m), 1.63~1.66 (8H, m), 1.83~1.97 (1H, m), 4.57~4.64 (1H, m), 7.01 (2H, s), 其中 3 个活泼氢被氘代; ESI-MS, m/z : 579 [M-1]. Anal. calcd for $\text{C}_{37}\text{H}_{56}\text{O}_5$: C 76.51, H 9.72; found C 76.21, H 9.75。

2.3. 没食子酸羽扇烷醇酯的体外抗肿瘤活性

2.3.1. 细胞培养

人非小细胞肺癌细胞株 A549、肺腺癌细胞株 LAC 和肝癌细胞株 HepG2 来源于暨南大学医药研究开发基地, 它们分别在含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的 RPMI-1640 培养基 (pH 7.4) 中生长。

2.3.2. 细胞毒理试验[8]

收集对数期细胞 1×10^4 接种于 96 孔板, 置于 37℃, 5% CO_2 培养箱培养使细胞贴壁。加入不同浓度的待测样品, 实验组每个浓度做 3 个平行孔, 37℃, 5% CO_2 条件下培养 72 h。加入 20 μL MTT 溶液(5 mg/mL, 即终浓度为 0.5% MTT)继续培养 4 h。终止培养, 吸去孔内培养液, 每孔加入 150 μL DMSO, 置于摇床上震荡 10 min, 使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 570 nm 处测量各孔的吸光度值。实验同时设调零孔(培养基, MTT, DMSO)、对照孔(细胞, 培养液, MTT, DMSO)和阳性对照孔(顺铂或阿霉素)。计算细胞生长抑制率的公式如下:

$$\text{细胞生长抑制率} = \left(\frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}} \right) \times 100\%$$

其中 $A_{\text{样品}}$ 、 $A_{\text{对照}}$ 和 $A_{\text{空白}}$ 分别表示样品、对照和空白试验的吸光度。

2.3.3. 统计分析

使用统计软件 SPSS11.5 处理实验数据。每个样品对癌细胞生长的抑制试验均重复 3 次, 其抑制率为 3 次实验的平均值, 求得样品或药物对癌细胞生长抑制 50% 所需要的浓度, 即是 IC_{50} 。实验结果见表 1。

Table 1. IC_{50} values of lupanol gallate against human tumor cell lines

表 1. 没食子酸羽扇烷醇酯对肿瘤细胞株的 IC_{50} 值

排序	样品或药物	IC_{50} (μM) A549	IC_{50} (μM) LAC	IC_{50} (μM) HepG2
1	顺铂	>100	>100	>100
2	阿霉素	35.15 ± 0.65	20.48 ± 0.47	79.50 ± 0.86
3	羽扇烷醇	>100	>100	>100
4	没食子酸羽扇烷醇酯	51.71 ± 0.78	62.16 ± 0.52	64.34 ± 0.93

3. 结果与讨论

3.1. 没食子酸羽扇烷醇酯的合成

目前, 没食子酸酯的合成方法主要有 4 种[1] [2] [10]-[16]: 1) 直接酯化法。没食子酸与脂肪醇在路易斯酸的作用下反应, 合成没食子酸酯, 产率可达 90% 以上。该方法主要适用于制备没食子酸脂肪醇酯。2) 羟基保护-酯化法。该方法是没食子酸通过苯基化或乙酰化反应先将其 3 个酚羟基保护起来, 然后与二氯亚砷或五氯化磷反应形成酰氯, 再与醇反应形成酯, 最后脱去保护基制得没食子酸酯。该方法反应步骤较多, 副反应多, 产率较低, 且使用有腐蚀性的酰化试剂。3) DCC 法。没食子酸的 3 个酚羟基用苯基或乙酰基保护, 然后以 *N,N'*-二环己基碳二亚胺(DCC)作缩合剂和 4-二甲氨基吡啶(DMAP)作催化剂, 与醇反应形成酯, 再脱去保护基制得没食子酸酯; 或者以 DCC 作缩合剂和 DMAP 作催化剂, 没食子酸与醇直接反应制备没食子酸酯。前者反应条件温和, 反应时间短, 产率高, 反应底物醇的适用范围广, 但反应步骤较多; 后者反应条件温和, 反应时间短, 产率较低, 反应底物醇的适用范围较窄。4) 生物酶催化合成法。在酶的催化下, 没食子酸与醇反应合成没食子酸酯。寻找合适的酶作催化剂, 是制备没食子酸酯的关键。目前该方法仍不成熟, 产率较低。没食子酸羽扇烷醇酯是一种新化合物, 其合成方法未见文献报道。本文以 DCC 作缩合剂, DMAP 为催化剂, 羽扇烷醇与过量的没食子酸在二氯甲烷中回流 10 h (回流温度为 40℃), 一步反应合成了没食子酸羽扇烷醇酯, 产率为 69.6%。该方法不需要酚羟基的预先保护, 操作简便。

3.2. 没食子酸羽扇烷醇酯的体外抗肿瘤活性

以非小细胞肺癌细胞 A549、肺腺癌细胞 LAC 和肝癌细胞 HepG2 为肿瘤细胞模型, 顺铂和阿霉素为阳性对照药物, 笔者采用 MTT 法研究了新化合物没食子酸羽扇烷醇酯对上述 3 株肿瘤细胞的体外抗肿瘤活性, 实验结果见表 1。

样品或药物的抗肿瘤活性分别通过上述 3 株肿瘤细胞生长的半数抑制浓度来表达, 即 IC_{50} 。以 $IC_{50} < 100 \mu M$ 作为评价样品或药物是否具有抗肿瘤活性的标准。 IC_{50} 值越小, 表示样品或药物的抗肿瘤活性越好; 而 $IC_{50} > 100 \mu M$, 则表示样品或药物没有抗肿瘤活性。从表 1 可见, 顺铂和羽扇烷醇对上述 3 株实验肿瘤细胞株的 IC_{50} 值均高于 $100 \mu M$, 表明它们对实验肿瘤细胞株的增殖没有抑制作用; 而没食子酸羽扇烷醇酯和阿霉素对实验细胞株的增殖具有抑制作用。没食子酸羽扇烷醇酯对非小细胞肺癌细胞 A549 和肺腺癌细胞 LAC 的 IC_{50} 值分别为 $51.71 \mu M$ 和 $62.16 \mu M$, 其对上述 2 株肿瘤细胞增殖的抑制作用不及阿霉素; 而没食子酸羽扇烷醇酯对肝癌细胞 HepG2 的 IC_{50} 值为 $64.34 \mu M$, 其对 HepG2 增殖的抑制活性比阿霉素强; 没食子酸羽扇烷醇酯对 A549 和 HepG2 的抗肿瘤活性比羽扇烷醇二元羧酸单酯的弱[4]。

4. 结论

1) 在 DCC 和 DMAP 的作用下, 羽扇烷醇与过量的没食子酸在二氯甲烷中回流 10 h, 一步反应合成了新化合物没食子酸羽扇烷醇酯, 产率为 69.6%。该合成方法不需要酚羟基的预先保护, 操作简便。

2) 没食子酸羽扇烷醇酯对 A549 和 LAC 增殖的抑制活性不及阿霉素, 而对 HepG2 增殖的抑制活性比阿霉素强。

基金项目

国家级星火计划项目(2014GA780069)和广东省普通高校特色创新项目(2014KTSCX161)。

参考文献 (References)

- [1] 金灿, 张雪彦, 熊凯, 吴国民, 刘贵锋, 陈健, 孔振武. 没食子酸衍生化反应研究进展[J]. 生物质化学工程, 2015, 49(4): 49-56.
- [2] 薄采颖, 毕良武, 赵振东, 张秋格, 李冬梅, 古研, 王婧. 没食子酸酯的合成方法综述[J]. 现代化工, 2008, 28(2): 393-397.
- [3] Dan, C., Liang, J., Bai, B.R., Peng, S.L. and Ding, L.S. (2010) A New Phenolic Glucoside Gallate from the Flower Buds of *Eugenia Caryophyllate*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, **8**, 180-182. <http://dx.doi.org/10.3724/SP.J.1009.2010.00180>
- [4] Li, W.-J., Hao, J. and Xiao, Y.-Y. (2013) Synthesis and *In Vitro* Antitumor Activities of Lupeol Dicarboxylic Acid Monoester Derivatives. *Archives of Pharmacal Research*, **36**, 1447-1453. <http://dx.doi.org/10.1007/s12272-013-0155-x>
- [5] Ghosh, P., Rasul, M.G., Chakraborty, M., Mandal, A. and Saha, A. (2011) Microwave Assisted One-Pot Synthesis of Pyranzine Derivatives of Pentacyclic Triterpenoids and Their Biological Activity. *Indian Journal of Chemistry*, **50B**, 1519-1523.
- [6] Yu, D., Sakurai, Y., Chen, C.-H., Chang, F.-R., Huang, L., Kashiwada, Y. and Lee, K.-H. (2006) Anti-AIDS Agents 69. Moronic Acid and Other Triterpene Derivatives as Novel Potent Anti-HIV Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, **49**, 5462-5469. <http://dx.doi.org/10.1021/jm0601912>
- [7] Tolstikova, T.G., Sorokina, I.V., Tolstikov, G.A., Tolstikov, A.G. and Flekhter, O.B. (2006) Biological Activity and Pharmacological Prospects of Lupane Terpenoids: II. Semisynthetic Lupane Derivatives. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, **32**, 261-276. <http://dx.doi.org/10.1134/S1068162006030083>
- [8] 李伟杰. 肉桂酸羽扇烷醇酯的合成及其抗癌活性[J]. 有机化学研究, 2016, 4(1): 1-5.
- [9] Hajos, Z.G., Parrish, D.R. and Goldberg, M.W. (1965) Synthesis and Stereochemistry of Hydrophenanthrenes. III. The Reaction of 1,3-Dicyclohexyl-1-(1,2,3,9,10,10a#-hexahydro-7-methoxy-2#-phenanthrylc arbonyl)urea with Sodium Alkoxides. *The Journal of Organic Chemistry*, **30**, 2849-2851. <http://dx.doi.org/10.1021/jo01019a515>
- [10] 范广璞, 刘菊香, 刘长春. L-抗坏血酸没食子酸酯的酶催化合成及抗氧化性[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(12): 123-127.
- [11] 宋胜梅, 凌翠霞, 丁秀云. 磁性纳米固体超强酸催化合成没食子酸酯[J]. 化工时刊, 2004, 18(10): 42-47.
- [12] 李敢. 没食子酸丙酯的合成研究进展[J]. 现代盐化工, 2016(2): 25-26.
- [13] 伍贤, 李敏谊, 方汉宏, 陈翔, 郭琼玲, 陈飞. 没食子酸低级烷醇酯合成工艺的改进[J]. 1998, 20(6): 381, 375.
- [14] 薄采颖, 毕良武, 赵振东, 李冬梅, 古研, 王婧, 张秋格, 王玉民, 周永红. 没食子酸萜醇酯的合成与结构鉴定研究[J]. 生物质化学工程, 2009, 43(2): 1-5.
- [15] 霍振宇, 任明星, 贾承胜, 夏书芹, 张晓鸣, 冯翥. 没食子酸植物甾醇酯合成工艺的研究[J]. 中国油脂, 2016, 41(2): 65-69.
- [16] 张爱黎, 孟庆民. 十二烷基苯磺酸催化没食子酸酯类合成的研究[J]. 辽宁化工, 2000, 29(1): 16-17.

期刊投稿者将享受如下服务：

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：jocr@hanspub.org