

五环三萜含氮衍生物的合成及糖原磷酸化酶抑制活性

李 晶, 靳晓婷, 张丽颖*

(承德医学院中药研究所, 河北省中药研究与开发重点实验室, 承德 067000)

摘 要 以五环三萜化合物科罗索酸为原料, 经乙酰化保护、酰胺化、水解等反应, 合成了 8 个科罗索酸 C-28 位酰胺衍生物; 以齐墩果酸为原料, 经酰化、烷基化、催化氢化等反应合成了 6 个齐墩果酸 C-3 位含氮衍生物, 所有目标化合物进行了糖原磷酸化酶抑制活性测试。结果表明: 11 个化合物表现出不同程度的抑酶活性, 其中 4 个化合物活性强于其先导化合物, 其中目标化合物 **6** 的糖原磷酸化酶抑制活性最强, IC_{50} 为 $11.2 \mu\text{mol/L}$ 。

关键词 五环三萜; 科罗索酸; 齐墩果酸; 糖原磷酸化酶抑制剂; 合成

中图分类号 R914.5 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2016)04-0422-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160406

引用本文 李晶, 靳晓婷, 张丽颖. 五环三萜含氮衍生物的合成及糖原磷酸化酶抑制活性[J]. 中国药科大学学报, 2016, 47(4): 422–428.
Cite this article as: LI Jing, JIN Xiaoting, ZHANG Liying. Synthesis and biological evaluation of novel amide derivatives of pentacyclic triterpenes as inhibitors of glycogen phosphorylase[J]. *J China Pharm Univ*, 2016, 47(4): 422–428.

Synthesis and biological evaluation of novel amide derivatives of pentacyclic triterpenes as inhibitors of glycogen phosphorylase

LI Jing, JIN Xiaoting, ZHANG Liying*

Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Research and Development of Hebei Province, Chengde Medical University, Chengde 067000, China

Abstract Eight novel amide derivatives of corosolic acid were synthesized by acylation, amidation and hydrolysis reactions, etc. Six novel amide derivatives of oleanolic acid were synthesized by acylation, alkylation and reduction reactions, etc. Biological evaluation of the target compounds as inhibitors of glycogen phosphorylase (GP) has been described. Results indicated that eleven derivatives exhibited moderate-to-good inhibitory activities against glycogen phosphorylase. Among them, four target compounds possess better inhibition effects than lead compounds and compound **6** show the best inhibition effect with the IC_{50} of $11.2 \mu\text{mol/L}$.

Key words pentacyclic triterpenes; corosolic acid; oleanolic acid; glycogen phosphorylase inhibitor; synthesis

The study was supported by the Science Foundation for Excellent Youth Scholars of Education Department of Hebei Province (No. Y2012026)

糖原代谢是糖代谢的重要组成部分, 尤其是在某些疾病状态下 (如禁食高血糖症和缺血性组织损伤等), 糖原代谢异常可能成为关键的病理因素, 导致一系列与糖原过度降解相关的病变, 如糖尿病、缺血性心肌损伤和脑损伤等^[1]。糖原磷酸化酶 (glycogen phosphorylase, GP) 是催化糖原分解

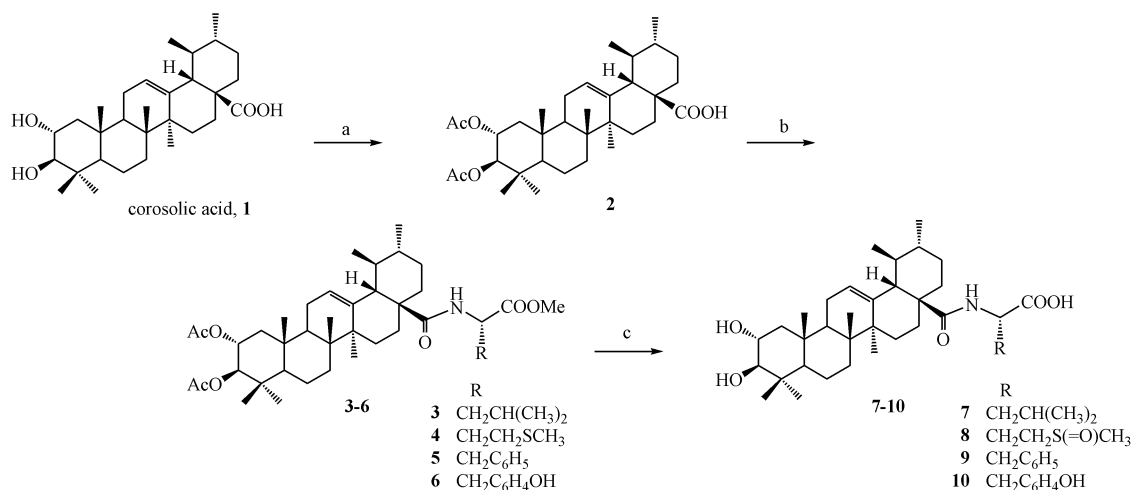
代谢的第一步关键酶, 利用无机磷酸使糖原分解为葡萄糖-1-磷酸 (G-1-P), 后者可在肌肉中直接进行糖酵解, 或者经过肝脏的磷酸葡萄糖变位酶的作用, 转变为 6-磷酸葡萄糖后再分解为葡萄糖。抑制糖原磷酸化酶, 可以减慢肝糖原分解的速度, 促进糖原合成, 从而降低肝糖输出和血浆葡萄糖水

平。因此,糖原磷酸化酶抑制剂已经成为新型的降血糖药物,引起了人们的广泛关注^[2]。辉瑞、默克、雅培、诺和诺德及 OSI 等国际著名制药公司已纷纷展开了对此类药物的研发工作。辉瑞公司的糖原磷酸化酶抑制剂 CP-316819 曾进入 II 期临床试验,但因该化合物不良反应大、生物利用度低等问题,现已被终止进行临床试验。以 CP-316819 为先导化合物,OSI 公司开发了一系列氮杂吡啶酰胺衍生物,其中,化合物 PSN-357 已进入 II 期临床试验用于治疗 2 型糖尿病^[3-7]。

2002 年,柳占彪等^[8]发现了以齐墩果酸为代

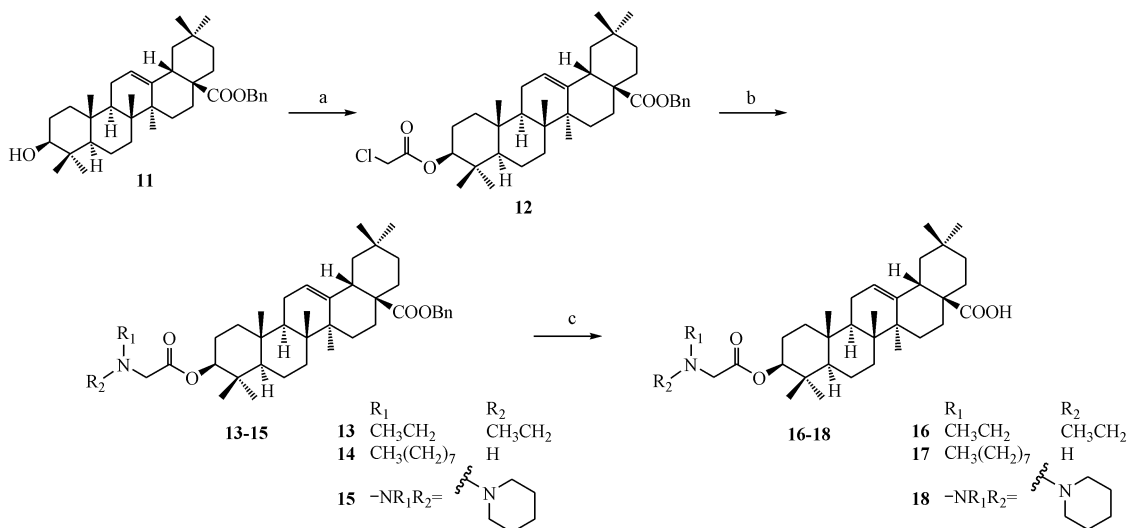
表的五环三萜酸化合物能抑制肝糖原的流失和分解,推论齐墩果酸的降糖作用与肝糖原相关。孙宏斌课题组^[9-11]发现了以山楂酸为代表的一系列五环三萜酸化合物是新型糖原磷酸化酶抑制剂,这可能是五环三萜酸类化合物降血糖的作用机制之一。

基于含氮结构作为改善药物水溶性的常规策略已广泛运用于新药研究中,本研究以天然五环三萜酸化合物为先导结构,在其 C-3 位及 C-28 位分别引入了不同的含氮基团,具体合成见路线 1~2,并对它们进行了初步的糖原磷酸化酶抑制活性研究。



Scheme 1 Synthesis of compounds 3-10

Reagents and condition: (a. Ac_2O , Pyr, r. t. ; b. i) $(\text{COCl})_2$, CH_2Cl_2 , DMF, r. t. , ii) $\text{RCH}(\text{NH}_2)\text{COOMe} \cdot \text{HCl}$, DMAP, CH_2Cl_2 , $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{r. t.}$; c. 4 mol/L NaOH, MeOH/ H_2O , r. t.



Scheme 2 Synthesis of compounds 13-18

Reagents and condition: a. ClCH_2COCl , K_2CO_3 , DMAP, CH_2Cl_2 , r. t. ; b. $\text{R}_1\text{R}_2\text{NH}$, K_2CO_3 , DMF, r. t. ; c. H_2 , Pd-C, THF, r. t.

1 实验部分

1.1 材料

Avance-300 MHz 型核磁共振仪、Shimadzu FT-IR-8400S 傅里叶变换红外光谱仪、maXis Impact-HRMS(德国 Bruker 公司); HP1100 LC/MSD(美国 PE 公司); RY-1 熔点仪(天津市分析仪器厂); 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)。

糖原磷酸化酶、葡萄糖-1-磷酸、糖原、孔雀绿(美国 Sigma 公司); 咖啡因(上海试剂二厂); Hepes、EGTA、EDTA(南京生兴生物技术有限公司); 四水合钼酸铵(合肥工业大学化学试剂厂)。其余试剂均为市售化学纯或分析纯。

2 合成试验

2.1 化合物 3~6 的合成(以化合物 3 为例)

$2\alpha, 3\beta$ -二乙酰氧基熊果烷-12-烯-28-羧酸(**2**) 将科罗索酸(0.10 g, 0.21 mmol)溶于吡啶(5 mL), 缓慢加入乙酸酐(2.5 mL), 室温搅拌过夜。减压蒸去吡啶, 残留物以乙酸乙酯溶解后依次以 1 mol/L 盐酸、饱和碳酸氢钠溶液和水洗涤, 无水硫酸钠干燥。除去干燥剂, 母液蒸去溶剂后快速柱色谱(石油醚-乙酸乙酯, 8:1)得白色固体(0.11 g, 93%)。mp: 225 ~ 227 °C。IR (KBr, cm^{-1}): 2 924, 2 871, 1 743, 1 695, 1 454。 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 0.76, 0.89, 0.90 (each 3H, s, CH_3), 1.07 (6H, s, $2 \times \text{CH}_3$), 0.85 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, CH_3), 0.95 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, CH_3), 1.97 (3H, s, $\text{CH}_3\text{C} = \text{O}$), 2.05 (3H, s, $\text{CH}_3\text{C} = \text{O}$), 2.19 (1H, d, $J = 11.2$ Hz, H-18), 4.76 (1H, d, $J = 10.3$ Hz, H-3 α), 5.09-5.10 (1H, m, H-2 β), 5.23 (1H, t, $J = 3.6$ Hz, H-12)。 ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 182.3, 170.7, 170.4, 138.2, 125.5, 80.8, 70.2, 55.1, 52.7, 48.0, 47.6, 44.3, 42.2, 39.7, 39.5, 39.1, 38.9, 38.2, 36.8, 32.9, 30.7, 28.5, 28.1, 24.2, 23.6, 23.5, 21.1, 21.05, 20.8, 18.3, 17.7, 17.2, 17.0, 16.6。ESI-MS: 555.3 $[\text{M} - \text{H}]^-$ 。

N -($2\alpha, 3\beta$ -二乙酰氧基熊果烷-12-烯-28-酰胺)-L-亮氨酸甲酯(**3**) 将 $2\alpha, 3\beta$ -二乙酰氧基熊果烷-12-烯-28-羧酸(0.15 g, 0.27 mmol)溶解于精制干燥的二氯甲烷(10 mL)中, 冰浴下滴加草酰氯(0.5 mL), 室温搅拌 24 h, 减压蒸除二氯甲烷, 再

加入精制干燥的二氯甲烷(10 mL \times 3), 溶解, 蒸除, 得到 $2\alpha, 3\beta$ -二乙酰氧基熊果烷-12-烯-28-酰氯。将亮氨酸甲酯盐酸盐(0.17 g, 0.81 mmol)和 N , N -二甲氨基吡啶(DMAP, 0.02 g, 0.15 mmol)溶于干燥的二氯甲烷中, 滴加上述新鲜制备的 $2\alpha, 3\beta$ -二乙酰氧基熊果烷-12-烯-28-酰氯的二氯甲烷溶液, 滴毕, 室温搅拌 12 h, 反应液依次使用 1 mol/L 盐酸水溶液、饱和食盐水洗涤, 有机层干燥、过滤、浓缩, 快速柱色谱(石油醚-乙酸乙酯, 4:1)得白色固体(0.18 g, 96%)。mp: 133 ~ 135 °C。IR (KBr, cm^{-1}): 3 409, 2 951, 1 742, 1 659。 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 0.68 (3H, s, CH_3), 0.86 (3H, s, CH_3), 0.89 (6H, s, $2 \times \text{CH}_3$), 0.91 (3H, s, CH_3), 0.93 (3H, s, CH_3), 0.95 (3H, s, CH_3), 1.05 (3H, s, CH_3), 1.08 (3H, s, CH_3), 1.97, 2.04 (each 3H, s, $\text{CH}_3\text{C} = \text{O}$), 3.69 (3H, s, COOCH_3), 4.55-4.99 (1H, m, CONHCH), 4.74 (1H, d, $J = 10.3$ Hz, H-3 α), 5.04 ~ 5.12 (1H, m, H-2 β), 5.36 (1H, t, $J = 2.1$ Hz, H-12), 6.33 (1H, d, $J = 7.08$ Hz, CONH)。 ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 177.3, 173.5, 170.7, 170.4, 138.6, 126.1, 80.7, 70.1, 55.0, 54.0, 52.0, 50.9, 47.9, 47.6, 44.3, 42.5, 39.8, 39.7, 39.4, 39.2, 38.2, 37.5, 32.8, 30.9, 28.5, 27.9, 24.9, 24.8, 23.5, 23.4, 22.7, 22.5, 21.1, 20.8, 18.3, 17.7, 17.1, 16.7, 16.6。ESI-MS: 684.4 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

利用同样的方法制备化合物 4~6。

N -($2\alpha, 3\beta$ -二乙酰氧基熊果烷-12-烯-28-酰胺)-L-蛋氨酸甲酯(**4**) mp: 130 ~ 132 °C。IR (KBr, cm^{-1}): 2 922, 2 869, 1 739, 1 651。 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 0.67 (3H, s, CH_3), 0.89 (6H, d, $J = 6.90$ Hz, $2 \times \text{CH}_3$), 0.90 (3H, s, CH_3), 0.96 (3H, s, CH_3), 1.05 (3H, s, CH_3), 1.08 (3H, s, CH_3), 1.97, 2.05 (each 3H, s, $\text{CH}_3\text{C} = \text{O}$), 3.73 (3H, s, COOCH_3), 4.58 (1H, dd, $J = 5.91, 11.82$ Hz, CONHCH), 4.74 (1H, d, $J = 10.34$ Hz, H-3 α), 5.04-5.12 (1H, m, H-2 β), 5.40 (1H, t, $J = 3.4$ Hz, H-12), 6.60 (1H, d, $J = 6.22$ Hz, CONH)。 ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 177.7, 172.5, 170.7, 170.4, 138.5, 126.2, 80.6, 70.1, 54.9, 53.8, 52.4, 51.7, 47.9, 47.5, 44.2, 42.4, 39.7, 39.7, 39.4, 39.1, 38.1, 37.6, 32.7, 32.2, 30.9, 29.9, 28.5, 27.9, 24.6, 23.5, 23.4, 21.1, 21.1, 20.8, 18.2, 17.7,

17.1, 16.6, 15.5。ESI-MS: 702.4 $[M + H]^+$ 。

N-(2 α , 3 β -二乙酰氧基熊果烷-12-烯-28-酰胺)-L-苯丙氨酸甲酯(**5**) mp: 128 ~ 132 °C。IR (KBr, cm^{-1}): 2 917, 2 867, 1 752, 1 655。 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 0.60 (3H, s, CH_3), 0.82 (3H, d, $J = 6.29$ Hz, CH_3), 0.89 (6H, s, $2 \times \text{CH}_3$), 0.94 (3H, s, CH_3), 1.02 (3H, s, CH_3), 1.05 (3H, s, CH_3), 1.96, 2.04 (each 3H, s, $\text{CH}_3\text{C} = \text{O}$), 3.05-3.12 (2H, m, Ar-H), 3.67 (3H, s, COOCH_3), 4.70 ~ 4.75 (2H, m, H-3 α , $\text{NHCHC} = \text{O}$), 5.03 ~ 5.12 (1H, m, H-2 β), 5.24 (1H, t, $J = 3.3$ Hz, H-12), 6.35 (1H, d, $J = 6.18$ Hz, CONH), 7.08 ~ 7.11 (2H, m, Ph-H), 7.25 ~ 7.28 (3H, m, Ph-H)。 ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 177.3, 172.1, 170.7, 170.4, 138.5, 136.4, 129.4, 128.4, 127.0, 126.1, 80.7, 70.1, 55.0, 53.7, 53.6, 52.0, 47.8, 47.6, 44.2, 42.4, 39.8, 39.7, 39.4, 39.2, 38.3, 38.1, 37.3, 32.7, 30.9, 28.5, 27.8, 24.8, 23.5, 23.4, 21.1, 21.0, 20.8, 18.2, 17.7, 17.1, 16.6。ESI-MS: 718.3 $[M + H]^+$ 。

N-(2 α , 3 β -二乙酰氧基熊果烷-12-烯-28-酰胺)-L-酪氨酸甲酯(**6**) mp: 160 ~ 164 °C。IR (KBr, cm^{-1}): 3 423, 2 974, 2 858, 1 743, 1 629。 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 0.61 (3H, s, CH_3), 0.83 (3H, d, $J = 6.35$ Hz, CH_3), 0.89 (6H, s, $2 \times \text{CH}_3$), 0.94 (3H, s, CH_3), 1.02 (3H, s, CH_3), 1.05 (3H, s, CH_3), 1.97, 2.05 (each 3H, s, $\text{CH}_3\text{C} = \text{O}$), 2.91 ~ 3.09 (2H, m, Ar-H), 3.67 (3H, s, COOCH_3), 4.66 ~ 4.76 (2H, m, H-3 α , $\text{NHCHC} = \text{O}$), 5.05 ~ 5.09 (1H, m, H-2 β), 5.26 (1H, t, $J = 2.1$ Hz, H-12), 5.82 (1H, br. s, Ph-OH), 6.41 (1H, d, $J = 6.40$ Hz, CONH), 6.73 (2H, dd, $J = 8.41, 63.74$ Hz, Ph-H), 6.95 (2H, dd, $J = 8.42, 63.74$ Hz, Ph-H)。 ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 177.5, 172.2, 170.7, 170.5, 155.0, 138.5, 130.5, 128.2, 126.1, 115.4, 80.7, 70.1, 55.0, 53.7, 52.0, 47.9, 47.6, 44.2, 42.4, 42.2, 39.7, 39.4, 39.2, 38.1, 37.6, 37.3, 32.7, 30.9, 28.5, 27.8, 24.8, 23.5, 23.4, 21.1, 21.0, 20.8, 18.2, 17.7, 17.1, 16.6, 16.5。ESI-MS: 734.4 $[M + H]^+$ 。

2.2 化合物**7**~**10**的合成(以化合物**7**为例)

N-(2 α , 3 β -二羟基熊果烷-12-烯-28-酰胺)-L-亮氨酸(**7**) 将 *N*-(2 α , 3 β -二乙酰氧基熊果烷-12-烯-28-酰胺)-L-亮氨酸甲酯(0.18 g, 0.26 mmol)溶

于四氢呋喃(6 mL)和甲醇(4 mL)的混合溶剂中,滴加 4 mol/L 氢氧化钠水溶液(1.5 mL),滴至室温搅拌 1 h。反应液用水稀释,用乙酸乙酯与四氢呋喃组成的混合溶剂萃取。有机层依次以 1 mol/L 盐酸、饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥。硅胶柱色谱(二氯甲烷-甲醇, 10:1)得白色固体(0.14 g, 90%)。mp: 156 ~ 160 °C。IR (KBr, cm^{-1}): 3 402, 2 925, 2 869, 1 726, 1 636。 ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6 + \text{D}_2\text{O}$) δ : 0.53, 0.64, 0.75, 0.77, 0.82, 0.84, 0.85, 0.86, 0.97 (each 3H, s, CH_3), 2.06 (1H, d, $J = 16.14$ Hz, CHOH), 2.72 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, CHOH), 3.39 ~ 3.40 (1H, m, H-3 α), 4.07 ~ 4.15 (1H, m, H-2 β), 5.14 (1H, t, $J = 3.5$ Hz, H-12), 7.12 (1H, d, $J = 7.08$ Hz, CONH)。 ^{13}C NMR (75 MHz, d_6 -DMSO) δ : 176.0, 173.8, 137.8, 124.7, 82.2, 67.0, 54.6, 52.1, 50.2, 46.9, 46.5, 41.6, 40.3, 40.3, 38.7, 38.6, 38.1, 37.4, 36.4, 32.7, 30.2, 28.6, 27.1, 24.1, 23.4, 23.0, 22.8, 22.7, 21.4, 20.8, 17.8, 16.9, 16.8, 16.7, 16.2。ESI-MS: 584.4 $[M - H]^-$ 。

(2S)-*N*-(2 α , 3 β -二羟基熊果烷-12-烯-28-酰胺)-4-(甲基亚砷)丁酸(**8**) mp: 200 °C (dec.)。IR (KBr, cm^{-1}): 3 375, 2 924, 2 869, 1 605, 1 030。 ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ : 0.74 (3H, s, CH_3), 0.80 (3H, s, CH_3), 0.91 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, CH_3), 0.98 (6H, s, $2 \times \text{CH}_3$), 1.01 (3H, s, CH_3), 1.13 (3H, s, CH_3), 2.86 ~ 2.94 (2H, m, $\text{CH}_2\text{S} = \text{O}$), 3.41 ~ 3.51 (1H, m, H-3 α), 3.59 ~ 3.63 (1H, m, H-2 β), 4.25 (1H, br. s, CONHCH), 5.43 (1H, br. s, H-12)。 ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) δ : 180.8, 139.7, 128.6, 85.0, 70.0, 57.1, 55.2, 50.4, 50.1, 48.7, 43.9, 41.5, 41.4, 41.0, 40.8, 39.7, 39.2, 34.6, 32.4, 31.0, 27.5, 26.5, 29.8, 29.5, 25.9, 25.0, 24.5, 22.0, 20.0, 19.8, 18.2, 18.0, 17.8。ESI-MS: 618.4 $[M - H]^-$; HRMS for $\text{C}_{35}\text{H}_{58}\text{N}_1\text{O}_6\text{S}_1$ Calcd. 620.398 48, Found 620.397 94。

N-(2 α , 3 β -二羟基熊果烷-12-烯-28-酰胺)-L-苯丙氨酸(**9**) mp: 180 °C (dec.)。IR (KBr, cm^{-1}): 3 437, 2 922, 2 868, 1 603, 1 394。 ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ : 0.69 (3H, s, CH_3), 0.80 (3H, s, CH_3), 0.85 (3H, d, $J = 6.46$ Hz, CH_3), 0.94 (3H, d, $J = 6.23$ Hz, CH_3), 0.97 (3H, s, CH_3), 1.00 (3H, s, CH_3), 1.09 (3H, s, CH_3), 2.90 (1H, d, $J =$

9.60 Hz, H-18), 3.07 ~ 3.28 (2H, m, Ar-H), 3.56 ~ 3.61 (1H, m, H-3 α), 4.23 (1H, dd, J = 4.51, 5.61 Hz, H-2 β), 5.34 (1H, t, J = 3.5 Hz, H-12), 7.13 ~ 7.18 (5H, m, Ph-H)。 ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) δ : 179.6, 177.8, 139.9, 139.2, 131.6, 129.3, 128.8, 127.6, 85.0, 70.0, 57.8, 57.1, 55.2, 50.4, 48.9, 48.7, 43.7, 41.5, 41.0, 39.7, 39.0, 38.9, 34.5, 32.4, 29.8, 29.5, 26.0, 25.0, 24.6, 22.0, 20.0, 18.2, 17.9, 17.9, 17.7。ESI-MS: 642.6 $[\text{M} - \text{H}]^-$ 。

N-(2 α , 3 β -二羟基熊果烷-12-烯-28-酰胺)-L-酪氨酸(**10**) mp: 182 $^{\circ}\text{C}$ (dec.)。IR (KBr, cm^{-1}): 3 437, 2 939, 2 868, 1 722, 1 619, 1 513。 ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ : 0.41, 0.70 (each 3H, s, CH_3), 0.79 (3H, d, J = 6.2 Hz, CH_3), 0.86 (3H, s, CH_3), 0.89 (6H, d, J = 6.0 Hz, 2 \times CH_3), 0.98 (3H, s, CH_3), 2.38 (1H, d, J = 11.3 Hz, H-18), 2.72 ~ 2.94 (2H, m, Ar-H), 3.44 (1H, br. s, H-3 α), 3.97 (1H, br. s, H-2 β), 5.12 (1H, br. s, H-12), 6.59 (2H, d, J = 7.9 Hz, Ph-H), 6.93 (2H, d, J = 7.9 Hz, Ph-H), 7.06 (1H, br. s, CONH)。 ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) δ : 157.2, 139.1, 131.8, 129.6, 127.9, 116.0, 84.5, 69.5, 56.7, 54.5, 48.8, 43.3, 40.9, 40.9, 40.5, 40.4, 39.2, 38.4, 37.5, 33.9, 31.9, 29.3, 28.9, 25.5, 24.5, 24.2, 24.1, 21.5, 19.5, 17.7, 17.5, 17.3, 17.2。ESI-MS: 634.4 $[\text{M} - \text{H}]^-$ 。

2.3 化合物 **13** ~ **15** 的合成 (以化合物 **13** 为例)

3 β -二乙胺基乙酰氧基齐墩果烷-12-烯-28-羧酸苄酯(**13**) 将二乙胺 (70 mg, 0.96 mmol) 和 K_2CO_3 (0.13 g, 0.96 mmol) 置于 DMF (15 mL) 中, 分批加入 3 β -氯乙酰氧基齐墩果烷-12-烯-28-羧酸苄酯^[12] (0.3 g, 0.48 mmol), 室温搅拌过夜。过滤除去 K_2CO_3 , 母液倾入水中, 乙酸乙酯萃取, 然后依次以水和饱和食盐水洗涤, 无水 Na_2SO_4 干燥, 减压蒸去溶剂, 快速柱色谱 (石油醚-乙酸乙酯, 10:1) 得到透明固体 (0.22 g, 68%)。mp: 53 ~ 55 $^{\circ}\text{C}$ 。IR (KBr, cm^{-1}): 2 966, 1 725, 1 455, 1 175。 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 0.67, 0.92, 0.93, 0.97, 0.99, 1.14, 1.20 (each 3H, s, CH_3), 2.74 (4H, qua, 2 \times CH_3CH_2), 2.97 (1H, d, J = 10.2 Hz, H-18), 3.40 (2H, s, NCH_2CO), 4.62 (1H, t, J = 8.2 Hz, H-3 α), 5.03 (1H, d, J = 12.5 Hz, Ar-H), 5.09 (1H, d, J = 12.5 Hz, Ar-H), 5.28 (1H, t, J = 3.5 Hz, H-12),

7.29 ~ 7.36 (5H, m, Ph-H)。 ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 177.4, 171.3, 143.7, 136.4, 128.3, 127.9, 127.8, 122.4, 80.9, 65.8, 55.2, 54.1, 47.7, 47.5, 46.7, 45.8, 41.6, 41.4, 39.3, 38.1, 37.6, 36.8, 33.8, 33.0, 32.6, 32.3, 30.6, 28.0, 27.6, 25.8, 23.6, 23.3, 23.0, 18.2, 16.9, 16.8, 15.3, 12.4。ESI-MS: 660.5 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

3 β -正辛胺基乙酰氧基齐墩果烷-12-烯-28-羧酸苄酯(**14**) mp: 82 ~ 84 $^{\circ}\text{C}$ 。IR (KBr, cm^{-1}): 2 927, 2 854, 1 731, 1 463。 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 0.61, 0.85, 0.86, 0.92, 1.02, 1.17, 1.39 (each 3H, s, CH_3), 2.59 (2H, t, J = 7.0 Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 2.90 (1H, d, J = 10.2 Hz, H-18), 3.39 (2H, s, $\text{CH}_2\text{C} = \text{O}$), 4.57 (1H, t, J = 1.9 Hz, H-3 α), 5.03 (1H, d, J = 12.5 Hz, Ar-H), 5.09 (1H, d, J = 12.5 Hz, Ar-H), 5.28 (1H, br. s, H-12), 7.29-7.36 (5H, m, Ph-H)。 ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 177.4, 172.3, 143.7, 136.4, 128.4, 127.9, 127.8, 122.4, 81.4, 65.9, 55.3, 51.2, 49.6, 47.5, 46.7, 45.9, 41.7, 41.4, 39.3, 38.1, 37.7, 36.9, 33.9, 32.6, 32.4, 31.8, 30.7, 30.0, 29.4, 29.2, 28.1, 27.6, 27.2, 25.8, 23.6, 23.4, 23.1, 22.6, 18.2, 16.9, 16.7, 15.3, 14.0。ESI-MS: 716.5 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

3 β -哌啶基乙酰氧基齐墩果烷-12-烯-28-羧酸苄酯(**15**) mp: 118 ~ 120 $^{\circ}\text{C}$ 。IR (KBr, cm^{-1}): 2 937, 2 875, 1 725, 1 455。 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 0.63, 0.87, 0.89, 0.90, 0.92, 0.94, 1.14 (each 3H, s, CH_3), 2.54 (4H, qua, 2 \times NCH_2), 2.91 (1H, d, J = 13.1 Hz, H-18), 3.20 (2H, s, $\text{CH}_2\text{C} = \text{O}$), 4.57 (1H, t, J = 8.5 Hz, H-3 α), 5.06 (1H, d, J = 12.6 Hz, Ar-H), 5.11 (1H, d, J = 12.6 Hz, Ar-H), 5.30 (1H, t, J = 2.0 Hz, H-12), 7.31 ~ 7.39 (5H, m, Ph-H)。 ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 177.4, 172.1, 143.6, 136.4, 128.3, 127.9, 127.8, 122.3, 81.0, 65.8, 60.3, 55.2, 54.1, 47.5, 46.7, 45.8, 41.6, 41.3, 39.3, 38.1, 37.6, 36.8, 33.8, 33.0, 32.6, 32.3, 30.6, 28.0, 27.6, 25.9, 25.8, 23.9, 23.8, 23.6, 23.3, 23.0, 18.1, 16.8, 16.7, 15.3。ESI-MS: 672.6 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

2.4 化合物 **16** ~ **18** 的合成 (以化合物 **16** 为例)

3 β -二乙胺基乙酰氧基齐墩果烷-12-烯-28-羧酸(**16**) 将 3 β -二乙胺基乙酰氧基齐墩果烷-12-

烯-28-羧酸苄酯(200 mg,0.30 mmol)溶于四氢呋喃(10 mL)中,加入催化量的 10% Pd/C,室温常压氢化 24 h。常压过滤除去 Pd/C,滤液蒸干得到黏稠状液体。硅胶柱色谱(石油醚-乙酸乙酯,20:1)得到白色固体(0.13 g,78%)。mp:217~219℃。IR(KBr,cm⁻¹):3 395,2 966,1 725,1 455。¹H NMR(300 MHz,CDCl₃) δ:0.76,0.85,0.87,0.93,0.94,1.08,1.13(each 3H,s,CH₃),2.74(4H,qua,2×CH₂CH₂),2.83(1H,d,J=10.3 Hz,H-18),3.37(2H,s,NCH₂CO),4.56(1H,t,J=7.9 Hz,H-3α),5.28(1H,t,J=2.2 Hz,H-12)。¹³C NMR(75 MHz,CDCl₃) δ:182.9,143.7,122.3,81.0,55.3,53.4,47.5,46.4,45.9,41.6,41.0,39.2,38.0,37.6,36.9,33.8,33.0,32.6,32.4,30.6,28.1,27.7,25.8,23.6,23.5,23.3,22.9,18.2,17.1,16.8,15.3,12.1。ESI-MS:568.4[M-H]⁺。

3β-正辛氨基乙酰氧基齐墩果烷-12-烯-28-羧酸(**17**) mp:170℃(dec.)。IR(KBr,cm⁻¹):2 916,2 849,1 735,1 466。¹H NMR(300 MHz,CDCl₃) δ:0.76,0.84,0.86,0.90,0.93,1.13,1.27(each 3H,s,CH₃),2.62(2H,t,J=3.6 Hz,CH₂CH₂NH),2.82(1H,d,J=10.3 Hz,H-18),3.41(2H,s,CH₂C=O),4.56(1H,t,J=8.2 Hz,H-3α),5.27(1H,t,J=2.1 Hz,H-12)。¹³C NMR(75 MHz,CDCl₃) δ:182.4,171.8,143.8,122.2,55.2,50.4,49.2,47.5,46.4,45.9,41.6,41.0,39.2,38.0,37.7,36.9,33.8,33.0,32.5,32.4,31.8,30.6,29.5,29.4,29.2,28.0,27.7,27.1,25.8,23.5,23.3,22.9,22.6,18.1,17.1,16.6,15.3,14.0。ESI-MS:626.4[M+H]⁺。

3β-哌啶基乙酰氧基齐墩果烷-12-烯-28-羧酸(**18**) mp:235~238℃。IR(KBr,cm⁻¹):3 451,2 925,1 733,1 465。¹H NMR(300 MHz,CDCl₃) δ:0.76,0.85,0.86,0.90(each 3H,s,CH₃),0.93(6H,s,2×CH₃),1.13(3H,s,CH₃),2.60(4H,br.s,2×NCH₂),2.82(1H,d,J=10.3 Hz,H-18),3.23(2H,s,CH₂C=O),4.56(1H,t,J=8.1 Hz,H-3α),5.28(1H,t,J=2.0 Hz,H-12)。¹³C NMR(75 MHz,CDCl₃) δ:212.9,182.5,143.7,122.5,81.3,59.9,55.3,53.8,47.6,46.5,45.9,41.7,41.1,39.3,38.1,37.7,37.0,33.9,33.0,32.6,32.5,30.7,28.9,27.7,25.9,25.6,23.8,23.7,23.6,23.4,23.0,18.2,17.1,16.8,15.4。ESI-MS:580.9[M-H]⁻。

2.5 对糖原磷酸化酶抑制活性评价

参照文献方法^[13],对本研究合成的 15 个化合物以咖啡因为阳性对照进行了抑制纯化的 MgPa 重组蛋白(rMgPa)活性测试,结果见表 1。操作流程如下:在微孔板中加入反应缓冲液,加入待测化合物及 rMgPa,室温温孵 20 min,加入显色液(钼酸铵和孔雀绿),用多功能酶标仪进行测定(检测波长:655 nm)。

Table 1 Inhibitory activity of compounds 3-18 against rMGPα			
Compound	RMGPα IC ₅₀ ^a / (μmol/L)	Compound	RMGPα IC ₅₀ / (μmol/L)
1	20	10	>500
OA	14	11	461
2	35	12	12.6
3	137.1	13	209.3
4	252.9	14	>500
5	23.9	15	20.1
6	11.2	16	79.8
7	95.6	17	>500
8	19.7	18	12.7
9	361.5	Caffeine ^b	144

^a Each value represents the mean of three determinations; ^b Caffeine was used as positive control. OA:Oleanolic acid

3 结果与讨论

3.1 化学合成

在由化合物**4**经由 4 mol/L NaOH 水解合成化合物**8**的反应中,意外发现了蛋氨酸上硫原子氧化为亚砷的反应。根据文献报道^[14-15],硫原子在含水溶剂的存在下,易被空气中的氧氧化为亚砷,根据上述文献报道及本研究实验条件,结合碳谱及高分辨质谱分析:与硫原子相连的理论位移在 30 左右的碳迁移到了化学位移 50.35 处,高分辨质谱确证了化合物的分子组成。最终确证所得到的产物为一对非对映异构体,其中蛋氨酸的硫原子被空气中的氧氧化为亚砷。

3.2 生物活性

本研究测定了 15 个新化合物对糖原磷酸化酶的抑制活性。化合物**3~10**及**12~18**对糖原磷酸化酶的抑制活性见表 1。结果显示:阳性对照咖啡因对糖原磷酸化酶具有中等的抑制作用,其 IC₅₀与文献[16]报道基本一致。大部分合成的衍生物显示出了一定的糖原磷酸化酶抑制活性,其中化合物**6**的活性(IC₅₀=11.2 μmol/L)高于其先导化合物科

罗索酸($IC_{50} = 20 \mu\text{mol/L}$)。2,3-*O*-乙酰基科罗索酸衍生物 **2** ($IC_{50} = 35 \mu\text{mol/L}$) 的活性低于其先导化合物科罗索酸($IC_{50} = 20 \mu\text{mol/L}$)，这点之前报道的其他五环三萜化合物羟基乙酰化产物类似^[17]，提示 A 环羟基应为活性必须基团。科罗索酸 28 位引入脂肪族氨基酸基团的化合物 **7** ($IC_{50} = 95.6 \mu\text{mol/L}$) 活性高于引入相应的氨基酸酯衍生物 **3** ($IC_{50} = 137.1 \mu\text{mol/L}$)，而引入芳香族氨基酸 **9** 和 **10** ($IC_{50} = 361.5, >500 \mu\text{mol/L}$) 则恰恰相反，活性低于引入相应的氨基酸酯衍生物 **5** 和 **6** ($IC_{50} = 23.9, 11.2 \mu\text{mol/L}$)，提示科罗索酸 28 位引入基团的体积、电性均会影响衍生物的活性，但是深入的构效关系尚待进一步研究。

对化合物 **12** ~ **18** 的 IC_{50} 分析比较发现：在齐墩果酸 A 环 C-3 位引入含氮取代基后，活性有所下降。如化合物 **13** ~ **18** 活性均弱于齐墩果酸 ($IC_{50} = 14 \mu\text{mol/L}$)，其中 28 位游离羧酸化合物的活性强于相应的 28 位苄酯化合物，如化合物 **13** vs **16**，化合物 **18** vs **19**。

4 结 论

以五环三萜化合物科罗索酸和齐墩果酸为母核，共合成 14 个新型的五环三萜含氮衍生物，并进行了糖原磷酸化酶抑制活性测试。活性测试结果显示大部分化合物均显示出一定的糖原磷酸化酶抑制活性。初步的构效关系分析认为，在五环三萜的 C-3 位及 C-28 位引入含氮取代基后，其氮原子上取代基的变化会对抑酶活性产生较大影响。后续工作中，将继续系统的开展不同取代基类别对抑酶活性的构效关系研究。

致谢：活性筛选试验由中国药科大学新药筛选中心协助测定。

参 考 文 献

- [1] Sun HB. Drug discovery based on pharmacological interference with glycometabolism[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2006, **37**(1): 1–8.
- [2] Loughlin WA. Recent advances in the allosteric inhibition of glycogen phosphorylase[J]. *Mini-Rev Med Chem*, 2010, **10**(12): 1139–1155.
- [3] Treadway JL, Levy C B, Hoover DJ, *et al.* Glucose lowering by glucose phosphorylase inhibition in rats, dogs and humans[J].

- Diabetes*, 2001, **50**(2): A133–A133.
- [4] Treadway JL. Symposia on New Targets for Glycemic Control [C]//65th American Diabetes Association National Meeting. San Diego, 2005.
- [5] Hayes JM, Leonidas DD. Computation as a tool for glycogen phosphorylase inhibitor design mini-reviews in medicinal chemistry [J]. *Mini-Rev Med Chem*, 2010, **10**(12): 1156–1174.
- [6] Maha H, Taha MO. Ligand-based modelling followed by synthetic exploration unveil novel glycogen phosphorylase inhibitory leads [J]. *Bioorg Med Chem*, 2011, **19**(16): 4746–4771.
- [7] Oikonomakos NG. Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2002, **3**(6): 561–586.
- [8] Liu ZB, Zhang XP, Hu G. Oleanolic acid on the hepatic glycogen in the hyperglycemicized rats were produced by injecting olloxan [J]. *J Med Pharm Chin Minorities* (中国民族医药杂志), 2002, **8**(4): 29–30.
- [9] Wen XA, Zhang P, Liu J, *et al.* Pentacyclic triterpenes. Part 2: synthesis and biological evaluation of maslinic acid derivatives as glycogen phosphorylase inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, **16**(3): 722–726.
- [10] Chen J, Liu J, Gong YC, *et al.* Synthesis and biological evaluation of ursolic acid derivatives as novel inhibitors of glycogen phosphorylase [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2006, **37**(5): 397–402.
- [11] Wen XA, Zhang YX, Liu J, *et al.* Synthesis and biological activity of heterocycle-fused derivatives of pentacyclic triterpenes as glycogen phosphorylase inhibitors [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2009, **40**(6): 491–496.
- [12] Chen J, Liu J, Zhang LY, *et al.* Pentacyclic triterpenes. Part 3: synthesis and biological evaluation of oleanolic acid derivatives as novel inhibitors of glycogen phosphorylase [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, **16**(11): 2915–2919.
- [13] Martin W, Hoover D, Armento SJ, *et al.* Discovery of a human liver glycogen phosphorylase inhibitor that lowers blood glucose *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1998, **95**(4): 1776–1781.
- [14] Kohlmann C, Lutz S. Electroenzymatic synthesis of chiral sulfoxides [J]. *Eng Life Sci*, 2006, **6**(2): 170–174.
- [15] El OF, Burm BE, Leroy IM, *et al.* Design, synthesis, and evaluation of sugar amino acid based inhibitors of protein prenyl transferases PFT and PGGT-1 [J]. *J Med Chem*, 2004, **47**(16): 3920–3923.
- [16] Liang ZJ, Zhang LY, Li LC, *et al.* Identification of pentacyclic triterpenes derivatives as potent inhibitors against glucogen phosphorylase based on 3D-QSAR studies [J]. *Eur J Med Chem*, 2011, **46**(6): 2011–2021.
- [17] Zhang LY, Chen J, Gong YC, *et al.* Synthesis and biological evaluation of asiatic acid derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylases [J]. *Chem Biodivers*, 2009, **6**(6): 864–874.