

藤黄酸衍生物的研究

冯 钜¹, 柳文媛², 陈优生³, 郭青龙³, 尤启冬^{2*}

(¹中国药科大学药物分析学教研室; ²药物化学教研室; ³生理教研室, 南京 210009)

【摘要】 目的: 制备藤黄酸的衍生物, 并进行抗肿瘤活性的研究。方法: 半合成方法制备了藤黄酸甲酯、乙酯和氯代物, 用 MS, UV, IR, 1D 和 2D NMR 光谱法鉴定。其结构分别为藤黄酸甲酯(**2**), 6 甲氧基藤黄酸甲酯(**3**), 藤黄酸乙酯(**4**), 33-氯化转位藤黄酸(33-chlorogambogellic acid, **5**), 33, 37-二氯转位藤黄酸(33, 37-dichlorogambogellic acid, **6**)。结果和结论: 藤黄酸乙酯, 33-氯化转位藤黄酸和 33, 37-二氯转位藤黄酸为新化合物, 初步的药理实验表明, 化合物 **5** 和 **6** 比藤黄酸有较强的抗肿瘤活性。

【关键词】 藤黄酸; 衍生物; 结构鉴定; 抗肿瘤活性

【中图分类号】 R284 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000—5048(2005)04—0302—04

藤黄是藤黄属某些植物所分泌的干燥树脂, 具有攻毒蚀疮、破血散结等功效, 在我国为传统的进口南药, 中医传统用于消肿、化毒、止血等^[1]。我国药理和临床工作者最早发现藤黄具有抗癌作用, 并经多次实验证明其主要的有效成分为以藤黄酸(gambogic acid, **1**)为代表的桥环 xanthone 化合物^[2]。对藤黄酸抗肿瘤作用的研究表明, 藤黄酸能选择性地杀死癌细胞, 而对正常的外周血中白细胞无明显

影响, 这为寻找抗癌药提供新颖的前景。

目前, 从藤黄中共分离和鉴定了二十余个藤黄酸类桥环 xanthone 化合物, 另外从藤黄属个别植物的种籽和叶子中也分离了少量该类化合物^[5—8]。

为了研究藤黄酸的构效关系, 对其进行了结构修饰, 半合成了藤黄酸的 5 个衍生物, 用波谱方法鉴定了它们的结构, 并初步测定了它们的抗肿瘤活性。

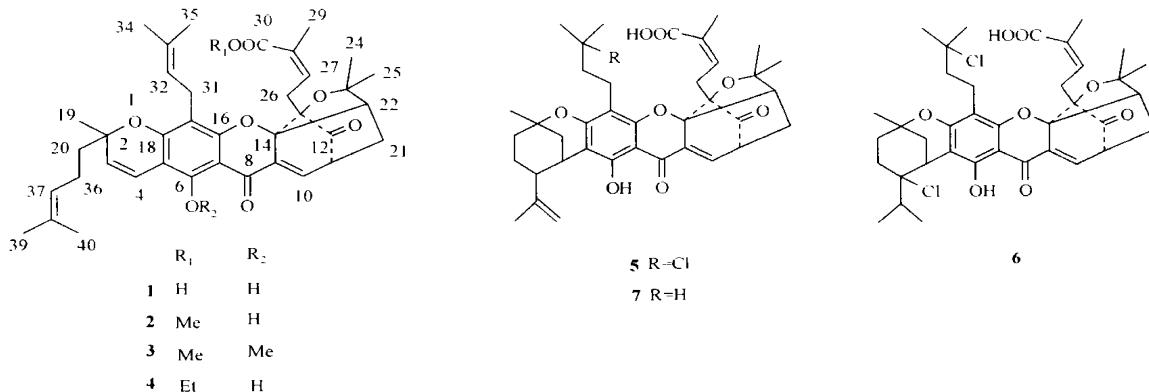


Fig. 1 Structures of compound 1~7

1 实验部分

1.1 仪器和材料

紫外光谱用 2051 型紫外可见分光光度仪测定; 红外光谱用 Nicolet Impact410 型红外光谱仪测定; ESI-MS 用 HP1100 型质谱仪 (LC/MSD System,

ESI Mode); 核磁共振谱用 Brucker ACF-300 型测定, 熔点用 XT4 双目显微熔点测定仪测定 (温度计未经校正)。

实验所用试剂均为分析纯。

藤黄酸原料自制, 纯度大于 95% (HPLC)。

1.2 衍生物的制备

* 【收稿日期】 2004-11-08 【*通讯作者】 Tel: 025—83271351

【基金项目】 国家高技术研究发展计划(“八六三”计划)资助项目(No. 2002AA2Z3112); 国家自然科学基金资助项目(No. 30472044); 国家教育委员会重点项目基金资助项目(No. 104099)

藤黄酸甲酯和6-甲氧基藤黄酸甲酯的制备

藤黄酸 100 mg, 溶于丙酮 10 mL, 加入煅烧过的无水碳酸钾 300 mg, 碘甲烷 1 mL, 室温下电磁搅拌一周。将反应物倾入水中, 乙醚提取, 水洗, 无水硫酸钠干燥, 蒸去乙醚, 残留物用硅胶柱色谱分离, 分别得藤黄酸甲酯(2)与6-甲氧基藤黄酸甲酯(3)。

藤黄酸乙酯的制备 藤黄酸 100 mg, 溶于 10

mL 丙酮, 加入煅烧过的无水碳酸钾 300 mg, 溴乙烷 1 mL, 室温下电磁搅拌一周。将反应物倾入水中, 乙醚提取, 水洗, 无水硫酸钠干燥, 蒸去乙醚, 残留物用 ODS 柱色谱纯化, 得树脂状藤黄酸乙酯(4)。

33-氯化转位藤黄酸和33,37-二氯转位藤黄酸的制备 藤黄酸 300 mg 与冰醋酸 9 mL、盐酸 0.2

mL, 100 °C水浴加热 1 h, 冷却, 将反应液倾入 3 倍量水中, 析出黄色固体, 乙醚提取, 水洗, 无水硫酸钠干燥, 蒸去乙醚, 残留物用 ODS 柱色谱纯化, 得树脂状33-氯化转位藤黄酸(5)和33,37-二氯转位藤黄酸(6)。

2 结构确证

藤黄酸乙酯(4), 黄色树脂状固体, 纯度大于 90% (HPLC), ESI-MS 给出 $[M + H]^+$ 峰为 m/z 657。紫外光谱 ν 290, 360, 与藤黄酸类紫外光谱相似。红外光谱 λ (KBr) 3 448, 1 736, 1 709, 1 648, 1 631, 1 594, 1 453, 1 439, 1 383 cm^{-1} , 示有羟基、酮羰基、 α 、 β -不饱和酯羰基、苯环和甲基等。该化合物的核磁共振谱除了比藤黄酸多一个乙氧基的信号(δ_{H} 3.88 (2H, m), 1.09 (3H, t, J = 7.3 Hz), δ_{C} 60.01, 13.94)外, 其余信号与藤黄酸完全一致(表1), 因此鉴定为藤黄酸乙酯。

藤黄酸甲酯(2), 黄色无定形粉末, 纯度大于 90% (HPLC), ESI-MS 给出 $[M + H]^+$ 峰为 m/z 643。紫外光谱 ν 290, 360, 与藤黄酸类紫外光谱相似。红外光谱 λ (KBr) 3 452, 1 734, 1 708, 1 647, 1 631, 1 593, 1 434, 1 456, 1 384 cm^{-1} , 示有羟基、酮羰基、 α 、 β -不饱和酯羰基、苯环和甲基等。该化合物的核磁共振氢谱除了比藤黄酸多一个甲氧基的信号(3.43 3H, s)外, 其余信号与藤黄酸完全一致(表1), 因此鉴定为藤黄酸甲酯。

6-甲氧基藤黄酸甲酯(3), 黄色立方状结晶, 纯度大于 95% (HPLC), mp 123 ~ 125 °C, ESI-MS 给出 $[M + H]^+$ 峰为 m/z 657。紫外光谱 ν 280, 340, 与藤黄酸类紫外光谱相似。红外光谱 λ (KBr) 1 736, 1 710, 1 663, 1 608, 1 585, 1 426, 1 464, 1 384 cm^{-1} , 示有羟基、酮羰基、 α 、 β -不饱和酯羰基、苯

环和甲基等。该化合物的核磁共振氢谱与藤黄酸甲酯基本一致, 但比藤黄酸甲酯多一个甲氧基的信号(3.81, 3H, s), 同时少了6位缩合羟基的信号(12.84, 1H, br. s)。同时, 二者的核磁共振碳谱仅有 C_5 ~ C_8 的化学位移值有较大差异(表2), 因此鉴定为6-甲氧基藤黄酸甲酯。

33-氯化转位藤黄酸(5), 黄色无定形粉末, 纯度大于 90% (HPLC), 紫外光谱 ν 361, 红外光谱 λ (KBr) 3 459, 1 737, 1 691, 1 633, 1 591 cm^{-1} , 示有羟基、羰基和苯环等。ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z 663 $[M - H]^-$, 故其相对分子质量应为 664 且 m/z 665 $[M + I]^{+}$ 峰高约为 663 $[M - I]^-$ 峰高的 1/3, 应为含氯原子的同位素峰, 说明分子组成中含一个氯原子。该化合物的 NMR 谱未出现藤黄酸 3-H 和 4-H 互相偶合的烯质子双峰, 表现出与藤黄酸不同的特征, 但与化合物 gambogelic acid(转位藤黄酸, 7)^[5] 的氢谱相似, 出现了末端双键[(δ_{C} 108.43 (CH_2), δ_{H} 4.56 and 4.23 (each 1H, br. s)] 信号。同时该化合物氢谱比转位藤黄酸少一个烯质子(δ_{H} 5.08 (1H, m, 32-H))信号, 碳谱比后者亦缺少一对烯碳信号(δ 122.21 (C-32), 130.89 (C-33))。联系其相对分子质量比后者多了 36 且分子组成中含有 Cl 原子, 推测可能为转位藤黄酸的 $\Delta^{32,33}$ 的 HCl 加成产物。比较该化合物和转位藤黄酸的 ^{13}C NMR 数据(表2)可知, 除 C_{31} ~ C_{35} 外, 其他碳的化学位移基本一致, 证实氯原子是在该侧链上取代。因此, 该化合物的结构为33-氯化转位藤黄酸。

33,37-二氯转位藤黄酸(6), 黄色无定形粉末, 纯度大于 90% (HPLC), 紫外光谱示最大吸收峰为 359.7 nm, 红外光谱示有羟基(3439 cm^{-1})、羰基(1737 cm^{-1})、 α 、 β -不饱和酸(1689 cm^{-1})、缩合羰基(1632 cm^{-1})和苯环(1589 cm^{-1})。ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z 699 $[M - H]^-$, 故其相对分子质量应为 700。质谱上 m/z 701 $[M + I]^{+}$ 丰度为 $[M - I]^-$ 峰高的 2/3, 故分子组成中应包含二个氯原子。结合 ^{13}C 和 ^1H NMR 谱得出该化合物的分子式为 $C_{38}\text{H}_{46}\text{O}_8\text{Cl}_2$ 。比 33-chlorogambogelic acid 分子式多了 36, 推测为另一双键上 HCl 的加成产物。该化合物的 DEPT 谱上未出现连接电负性杂原子的 CH_2 的信号, 因此排除氯原子接在 C-40 的可能; 但氯原子若是接在 C-38 上, 则 39- CH_3 应呈单峰, 但是对 HMBC 和 HSQC 谱的分析发现 39- CH_3 位于氢谱最高场, 且为双峰。同时在 H-H COSY 谱上可以看到 39 和 40 位的两个甲基均和另一质子存在邻位关系, 因此 38 位应为叔碳, 而氯原子可能接在 37-C。为了进一步对氯原子的位置进行确证, 比较化合物 5 和 4 的 F 环碳的化学位移(见表1), 发现 5 比 4 的 C_3 和 C_{20} 信号向高场移动, 而 C_4 和 C_{36} 向低场移动, 从而证实了氯原子接在 C_{37} 上, 因为 C_3 、 C_{20} 由于处于氯原子取代的 γ 位而向高场位移, C_4 、 C_{36} 由于处于氯原子取代的 β 位而向低场位移, 符合卤代烃的碳谱规律。因此, 该化合物结构为33,37-二氯转位藤黄酸。

Tab. 1 ^1H NMR data of compounds 2~7 (in CDCl_3 , the value of J in Hz)

Compd	1	2	3	4	5	6	7
3	5.37 d 10.1	5.43 d 10.1	5.53 d 10.2	5.43 d 9.9	1.83 m 1.76 m	2.54 m 1.60 m	1.24~1.95 m (2H)
4	6.59 d 10.1	6.67 d 10.1	6.66 d 10.2	6.67 d 9.9	3.47 br d	3.54 m	3.42 br s
10	7.56 d 6.9	7.53 d 6.9	7.42 d 6.9	7.54 d 6.9	7.50 d 6.9	7.48 d 6.9	7.49 d, 6.9
11	3.49 dd, 6.9, 4.5	3.48 m	3.42 m	3.48 m	3.48 dd 4.6, 4.9	3.48 m	3.46 dd 4.6, 4.9
19	1.36 s (3H)	1.28 s (3H)	1.28 s (3H)	1.28 s (3H)	1.34 s (3H)	1.28 s (3H)	1.32 s (3H)
20	1.72 m (2H)	1.72 m (2H)	1.72 m (2H)	1.69 m (2H)	1.87 m 1.58 m	1.86 m (2H)	1.24~1.95 m (2H)
21	2.32 dd, 13.2	2.31 dd 13.5	2.29 dd 13.3, 4.6	2.31 dd 13.2	2.48 dd	2.40 dd 13.4	2.30 dd 13.2,
	4.5 1.35 m	4.8 1.41 m	1.38 dd 13.3, 9.3	4.5 1.39 m	13.7 4.9 1.36 m	4.7 1.36 m	4.6 1.24~1.95 m
22	2.53 br. d 9.3	2.51 d 9.3	2.49 d 9.3	2.51 d 9.1	2.48 d 9.3	2.47 d 10.0	2.53 d, 9.2
24	1.38 s (3H)	1.46 s (3H)	1.44 s (3H)	1.55 s (3H)	1.34 s (3H)	1.36 s (3H)	1.29 s (3H)
25	1.75 s (3H)	1.73 s (3H)	1.75 s (3H)	1.73 s (3H)	1.75 s (3H)	1.75 s (3H)	1.72 s (3H)
26	2.98 br. d 7.3 (2H)	2.99 m (2H)	2.97 m (2H)	2.97 m (2H)	2.97 d 7.4 (2H)	3.01 d 7.4 (2H)	2.99 d, 7.3 (2H)
27	6.12 t, 7.3 7.3	5.92 m	5.94 m	6.00 m	5.90 m	6.01 m	6.03 m
29	1.73 s (3H)	1.69 s (3H)	1.70 s (3H)	1.68 s (3H)	1.69 s (3H)	1.69 s (3H)	1.71 s (3H)
31	3.30 dd, 14.6	3.31 dd 14.7	3.38 m 3.26 dd	3.30 m 3.47 m	2.96 m (2H)	2.96 m (2H)	3.26 dd 14.1, 7.9
	8.1 3.10 m	7.6 3.15 m	14.6, 5.4				3.12 dd 14.1, 5.3
32	5.05 m	5.05 m	5.05 m	5.05 m	1.84 m (2H)	1.84 m (2H)	5.06 m
34	1.70 s (3H)	1.68 s (3H)	1.69 s (3H)	1.65 s (3H)	1.62 s (3H)	1.69 s (3H)	1.71 s (3H)
35	1.64 s (3H)	1.65 s (3H)	1.65 s (3H)	1.65 s (3H)	1.61 s (3H)	1.60 s (3H)	1.65 s (3H)
36	2.01 dd, 16.0 7.8	2.03 m	2.03 dd 15.8 7.8	2.02 m	1.37 m (2H)	1.33 m (2H)	1.24~1.95 m (2H)
37	5.05 m	5.05 m	5.09 m	5.05 m	2.16 d 12.3	1.65 m	2.09 d, 12.2
39	1.66 s (3H)	1.66 s (3H)	1.68 s (3H)	1.68 s (3H)	1.87 s (3H)	0.85 s (3H)	1.84 s (3H)
40	1.56 s (3H)	1.55 s (3H)	1.55 s (3H)	1.55 s (3H)	4.56 m 4.23 m	1.18 s (3H)	4.54 br s 4.21 br s
6-OH	12.76 br. s	12.84 br. s			12.85 br s	12.71 s	12.24 br s
6-OCH ₃			3.81 s (3H)				12.65 s
COOCH ₃		3.43 s (3H)	3.43 s (3H)		3.88 m (2H)		
COOEt					1.09 t, 7.3 (3H)		

Tab. 2 ^{13}C NMR data of compounds 2~7 (in CDCl_3)

Compd.	1	2	3	4	5	6	7	Compd.	1	2	3	4	5	6	7
C-2	81.14	81.14	80.27	81.20	83.65	82.93	77.0	G-23	83.92	83.92	83.53	83.65	83.93	83.88	34.3
C-3	124.4	124.4	126.9	124.4	36.29	32.04	39.3	G-24	28.87	28.87	28.60	28.74	28.50	28.45	28.9
C-4	115.9	115.9	116.3	115.9	28.69	34.43	28.8	G-25	29.85	29.85	29.66	29.85	30.29	30.31	29.9
C-5	102.7	102.7	112.3	102.4	104.0	104.4	104.1	G-26	29.26	29.26	29.12	29.09	29.12	29.08	29.1
C-6	157.5	157.5	155.0	157.5	160.8	161.0	160.8	G-27	138.1	138.1	135.6	135.9	137.7	138.6	138.2
C-7	100.4	100.4	109.5	100.4	99.30	99.23	99.6	G-28	127.7	127.7	127.3	127.9	127.6	127.3	127.8
C-8	178.8	178.8	174.3	179.0	178.3	178.5	178.5	G-29	20.75	20.75	20.51	20.77	20.41	20.39	20.8
C-9	133.3	133.3	133.3	133.5	133.6	133.2	133.9	G-30	171.2	171.2	167.0	166.9	171.7	171.9	171.6
C-10	135.3	135.3	135.5	135.1	134.2	134.9	134.3	G-31	21.59	21.59	21.86	21.58	18.74	18.76	21.8
C-11	46.79	46.79	46.50	46.81	46.49	46.63	46.7	G-32	122.2	122.2	121.6	122.2	44.34	44.39	122.4
C-12	203.3	203.3	203.7	203.5	203.2	202.8	203.8	G-33	131.5	131.5	131.4	131.4	70.44	70.21	131.1
C-13	83.78	83.78	83.29	83.65	83.65	83.52	83.9	G-34	18.08	18.08	17.84	18.02	32.03	31.85	18.2
C-14	90.89	90.89	90.89	90.91	90.18	90.41	90.4	G-35	25.65	25.65	25.36	25.59	31.82	31.97	25.8
C-16	157.3	157.3	158.5	157.5	155.1	155.7	155.3	G-36	22.73	22.73	22.38	22.68	22.63	31.25	22.8
C-17	107.6	107.6	107.5	107.1	105.4	106.1	106.2	G-37	123.8	123.8	123.5	123.7	47.81	34.78	48.1
C-18	161.47	161.5	131.3	159.4	164.1	164.1	164.4	G-38	131.78	131.8	131.6	131.8	147.5	83.52	147.6
C-19	27.7	27.70	27.90	27.56	28.05	27.60	28.4	G-39	25.67	25.67	25.33	25.6	22.71	16.83	23.0
C-20	41.97	41.97	42.03	41.77	39.09	35.56	36.5	G-40	17.62	17.62	17.30	17.55	108.4	19.39	108.6
C-21	25.18	25.18	25.05	25.21	24.88	24.89	25.2	6-OMe			61.81				
C-22	48.98	48.98	49.02	48.77	48.74	48.85	48.9	30-OR			50.69	60.01			
												13.94			

3 活性试验

方法: 测定细胞的生长曲线并用 MTT 比色法

观察藤黄酸衍生物体外对人肝细胞性肝癌(SMMC-

7721)细胞生长活性的抑制作用。

结果: 化合物 2~6 体外对人肝细胞性肝癌(SMMC-7721)细胞生长活性的 IC_{50} 分别为 3.017×10^{-5} , 1.899×10^{-4} , 7.808×10^{-4} , 6.601

$\times 10^{-7}$, 4.266×10^{-7} mmol/L。而藤黄酸的 IC_{50} 为 1.054×10^{-6} mmol/L, 因此, 33-氯化转位藤黄酸和 33, 37-二氯转位藤黄酸对人肝细胞性肝癌(SMMC-7721)细胞生长活性的抑制作用较藤黄酸更强。

【参考文献】

- [1] 江苏新医学院编. 中药大辞典(下册)[M]. 上海科学技术出版社, 1977. 2 695.
- [2] 陈葆仁(Chen BR). 藤黄抗癌成分的研究[J]. 江西医学院学报(*Acta Acad Med Jiangxi*), 1980, (2): 1—7.
- [3] 藤黄抗癌研究协作组. 藤黄(总体)抗癌实验与临床研究报告[J]. 江西医药(*Jiangxi Med*), 1982 (3): 1—5.
- [4] 郭青龙(Guo QL), 赵丽(Zhao L), 尤启冬(You QD), 等. 藤黄酸诱导人胃癌SGC-7901细胞的凋亡作用[J]. 中国天然药物(*Chin J Nat Med*), 2004, 2(2): 106—110.
- [5] Jun AA, Kazuhiro CB, Masahiro TD, et al. Cytotoxic xanthones from *Garcinia hanburyi*[J]. *Phytochemistry*, 1996, 41(3): 815—820.
- [6] Lin LJ, Lin LZ, John MP, et al. Isogambogic acid and isomorellinol from *Garcinia hanburyi*[J]. *Magn Reson Chem*, 1993, 31: 340—347.
- [7] Cao SC, Valerie HLS, Wu XH, et al. Novel cytotoxic polyprenylated xanthinoids from *Garcinia gaudichaudii* (Guttiferae)[J]. *Tetrahedron*, 1998, 54: 10 915—10 924.
- [8] Cao SG, Wu XH, Sim KY, et al. Cytotoxic caged tetraprenylated xanthinoids from *Garcinia gaudichaudii* (Guttiferae)[J]. *Tetrahedron*, 1998, 54: 3 353—3 356.

Study on Derivatives of Gambogic Acid

FENG Feng¹, LIU Wen-Yuan², CHEN You-Sheng², GUO Qing-Long³, YOU Qi-Dong²

(¹Department of Pharmaceutical Analysis, ²Department of Physiology, ³Department of Medicinal Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

【ABSTRACT】 AIM: To synthesize the derivatives of gambogic acid and to study their antitumor activities. METHODS: Methyl gambogate (**2**), methyl-6-methoxy-gambogate (**3**), ethyl gambogate (**4**), 33-chlorogambogellic acid (**5**) and 33, 37- dichloro- gambogellic acid (**6**) were prepared, and their structures were identified by MS, UV, IR, 1D and 2D NMR. RESULTS AND CONCLUSION: Compound **4**, **5**, **6** were identified as new compounds and compound **5** and **6** showed better anticancer activity than gambogic acid (**1**).

【KEY WORDS】 Gambogic acid; Derivation; Structural identification; Antitumor activity

·本刊动态·

《中国药科大学学报》编委会在宁召开

为继续提高《中国药科大学学报》学术质量, 增加与编委交流, 获得多学科信息, 《中国药科大学学报》编辑部于 2005 年 7 月 1 日在金陵药业股份有限公司金陵制药厂举办编委会议。会议由主编彭司勋院士主持, 近 30 名在宁编委出席了此次会议。

会上, 中国药科大学学报编辑部邹栩主任汇报了《中国药科大学学报》一年来的工作, 并对如何进一步提高刊物的学术质量, 扩大其影响力提出了编辑部今后工作的重点。王明时副主编作了《中国药科大学学报》审稿工作报告。报告分析了审稿过程中发现的突出问题, 对本校论文流向与高校期刊的发展提出了自己的见解。编辑部邀请的外语系史志祥副教授对论文英文摘要撰写中的常见问题进行了汇报。

会上, 编委们对如何提高《中国药科大学学报》学术质量进行了讨论。讨论中, 编委们畅所欲言, 从选题、署名、摘要写作以及约稿等方面对《中国药科大学学报》的提高和发展提出了许多很好的建议。最后, 彭司勋院士对讨论情况进行了总结。

(本刊讯)