Lycogarubin C 和 Lycogalic Acid 的化学合成及抗肿瘤活性研究

陈 旺 郝慧琳 张晨露 沈月毛*

(山东大学药学院 济南 250012)

摘要 Lycogarubin C 和 lycogalic acid 是由 Steglich 和 Akazawa 在 1994 年分别独立从粘细菌 *Lycogala epidendrum* 中分离得到的海洋天然产物。Lycogarubin C 有一定的细胞毒活性; lycogalic acid 是螺旋-环-螺旋(Helix-Loop-Helix, bHLH)翻译阻遏因子 Hes1 二聚体的抑制剂。另外, lycogalic acid 是吲哚[2,3-*a*]咔唑类生物碱的生物合成的关键中间体, 吲哚[2,3-*a*]咔唑类生物碱有广泛的生物活性。本文报道了两条合成 lycogarubin C 和 lycogalic acid 的路线。路线一: 由吲哚和吡咯出发经过 8 步反应以 27% 的收率得到 lycogarubin C, 其中的关键步骤是 3,4-二碘-1*H*-吡咯-2,5-二甲酸甲酯和 *N*-对甲基苯磺酰基-1*H*-吲哚-3-硼酸的 Suzuki-Miyaura 交叉偶联反应; 路线二: 由亚氨基二乙酸出发经过 7 步反应以 25% 的收率得到 lycogarubin C, 其中的关键步骤是 *N*-苄基亚氨基二乙酸二甲酯和草酸二甲酯的 Hinsberg 反应和 3,4-二(三氟甲磺酰氧基)-1*H*-吡咯-2,5-二甲酸甲酯和 *N*-二甲基叔丁基硅基-1*H*-吲哚-3-硼酸的钯催化的交叉偶联反应。Lycogarubin C 再经水解之后酸化得到 lycogalic acid。细胞毒实验表明 lycogarubin C 对 MDA-MB-231, A549, HeLa 和 PC3 肿瘤细胞有一定的生长抑制作用, 进一步研究表明它具有 DNA 拓扑异构酶 2 的抑制活性。

关键词 Lycogarubin C; Lycogalic acid; Suzuki-Miyaura 偶联; DNA 拓扑异构酶 2

Synthesis and Antitumor Activity of Lycogarubin C and Lycogalic Acid

Chen, Wang Hao, Huilin Zhang, Chenlu Shen, Yuemao*

(School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250012)

Abstract Lycogarubin C and lycogalic acid were first isolated independently by Steglich and Akazawa from *Lycogala epidendrum* in 1994. Lycogarubin C showed a potential cytotoxic activity. Lycogalic acid is an inhibitor of Hes1 dimer of helix-loop-helix (bHLH) transcriptional repressor factor. Lycogalic acid is also the key intermediate in the biosynthesis of indolo[2,3-*a*]carbazole alkaloids that exhibit broad spectrum of bioactivity. Two efficient synthetic pathways of lycogarubin C and lycogalic acid were completed in this study. The first pathway included eight steps started from the commercially available indole and pyrrole to produce lycogarubin C with an overall yield of 27%. The second pathway was completed in seven steps with an overall yield of 25%. The key reactions are palladium-catalyzed Suzuki-Miyaura coupling of bis-iodo or bis-triflate derivative and indolboronic acid derivatives and Hinsberg-type synthesis of dimethyl *N*-benzyl-3,4-dihydroxypyrrole-2,5-dicarboxylate, respectively. Treatment of lycogarubin C with sodium hydroxide in ethanol under refluxing followed by acidification afforded lycogalic acid quantitatively. Lycogarubin C and lycogalic acid showed the antiproliferative activities against four human tumor cell lines of MDA-MB-231, A549, HeLa and PC3. Further study showed that lycogarubin C inhibited the activity of DNA topoisomerase 2.

Keywords lycogarubin C; lycogalic acid; Suzuki-Miyaura coupling; DNA topoisomerase 2

Lycogarubin C 和 lycogalic acid 是由 Steglich^[1]和 Akazawa^[2]在 1994 年分别独立的从粘细菌 *Lycogala epidendrum* 中分离得到的海洋天然产物(Figure 1)。文献

报道 lycogarubin C 有一定的细胞毒活性^[3]。Lycogalic acid, 也被称为 chromopyrrolic acid (CPA)^[4], 是螺旋-环-螺旋(Helix-Loop-Helix, bHLH)翻译阻遏因子 Hes1 二

* E-mail: yshen@sdu.edu.cn

Received November 18, 2013; revised December 2, 2013; published online December 13, 2013.

Project supported by the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program, No. 2010CB833802), the National Natural Science Foundation of China (Nos. 81273384, 90913024) and the National Science Fund for Distinguished Young Scholars (No. 30325044).

国家重点基础研究发展计划(973 计划, No. 2010CB833802)、国家自然科学基金(Nos. 81273384, 90913024)和国家杰出青年科学基金(No. 30325044)资助项目。

聚体的抑制剂^[5]。此外, lycogalic acid 是吲哚[2,3-*a*]咔唑类生物碱的生物合成的关键中间体^[6]。吲哚[2,3-*a*]咔唑类生物碱, 例如 rebeccamycin 和 staurosporine, 具有广泛的蛋白激酶抑制活性和 DNA 拓扑异构酶 I (Topo I) 抑制活性^[7]。为了阐明吲哚[2,3-*a*]咔唑类生物碱生物合成的具体过程, lycogalic acid 经化合物 **I** 氧化成化合物 **III** 的过程引起了科研人员相当大的兴趣, 因为该过程中包涵了一步不同寻常的芳基-芳基氧化偶联反应(Figure 1)。文献报道化合物 **III**, **IV** 和 **V** 是 lycogalic acid 经过 RebP/StaP 和 StaC/RebC 一系列酶促反应的有氧化偶联产物^[6]。因此, 我们开发了两条合成 lycogarubin C 的路线, 以期为该天然产物的化学合成和生物合成提供参考。

目前, 文献报道的此类 3,4-二吲哚吡咯类天然产物合成方法主要有: 吲哚-3-丙酮酸-锅反应^[1], 钯催化的偶联反应^[8]、吲哚-3-丙酮酸和氨的氧化偶联反应^[9]、吲哚炔双亲烯烃体系的 Diels-Alder 反应^[10]和一系列酶催化的吲哚-3-丙酮酸生物合成^[4,6]。这些方法因为产率不理想, 或试剂昂贵, 成本太高, 不能满足简单高效合成该类化合物的要求, 因此本研究发展了两条合成 3,4-二吲哚吡咯类化合物的新路线(Scheme 1, 2)。路线一: 首先分别合成 *N*-对甲基苯磺酰基吲哚-3-硼酸(**6**)^[11]和 3,4-二碘吡咯-2,5-二甲酸甲酯(**3**), 然后是该方法的关键步

骤: 化合物 **3** 和化合物 **6** 的钯催化 Suzuki-Miyaura 交叉偶联反应, 最后用金属镁和氯化铵在甲醇^[12]中脱去对甲基苯磺酰基得到 lycogarubin C, lycogarubin C 再经水解之后酸化得到 lycogalic acid; 路线二: 首先用 Hinsberg 反应合成 *N*-苄基-3,4-二羟基吡咯二甲酸甲酯(**10**)^[13], 经三氟甲磺酰化以后得到关键中间体 **11**, 再和 *N*-二甲叔丁基硅基-1*H*-吲哚-3-硼酸经钯催化交叉偶联反应得到目标化合物, 脱除保护基后得到 lycogarubin C。同时对 lycogarubin C 和 lycogalic acid 的抗肿瘤活性及作用靶点进行了初步研究。

1 结果与讨论

1.1 化合物的合成

路线一: 3,4-二碘-1*H*-吡咯-2,5-二甲酸甲酯(**3**)的制备, 由吡咯出发经过叔丁氧羰基(Boc)保护^[14]、在 2,2,6,6-四甲基哌啶的存在下在 2,5 位引入二甲氧羰基^[15]、脱 Boc、碘代后得到 3,4-二碘-1*H*-吡咯-2,5-二甲酸甲酯(**3**)^[16](Scheme 1), 三步收率为 58%; 平行地, *N*-对甲基苯磺酰基-3-吲哚硼酸(**6**)的制备参照文献报道^[17], 由吲哚出发经对甲基苯磺酰氯(TsCl)保护 NH, 再与醋酸汞反应得到有机汞化合物, 再经硼烷四氢呋喃溶液还原水解后得到吲哚硼酸(**6**), 三步收率为 77%。化合物 **3**

图 1 Lycogalic acid 是吲哚[2,3-*a*]咔唑类生物碱生物合成的前体

Figure 1 Lycogalic acid is the precursor in the biosynthesis of indolo[2,3-*a*]carbazole alkaloids

Reagents and conditions: (a) Boc₂O, Et₃N, DCM, r.t., 2 h; (b) *n*-BuLi, HTMP, -78 °C then ClCOOMe; (c) DMF, 130 °C, 12 h, then NIS, 80 °C, 4 h; (d) TsCl, KOH, TBAB, toluene, H₂O, 6 h; (e) Hg(OAc)₂, AcOH, HClO₄, r.t., 24 h; (f) BH₃, THF, r.t., 1 h then H₂O; (g) Pd-DPPF, CsF, dioxane, 90 °C, 12 h; (h) Mg, NH₄Cl, MeOH, reflux; (i) NaOH, MeOH then HCl

Scheme 1

Reagents and conditions: (a) SOCl₂, MeOH, -10 °C, 3 d; (b) BnBr, K₂CO₃, DMF, 60 °C, 6 h; (c) (CO₂Me)₂, NaH, THF, reflux, 3 h; (d) Tf₂O, pyridine, 0 °C, 1 h; (e) Pd(PPh₃)₄, aq. Na₂CO₃, dioxane, reflux, 10 h; (f) H₂, Pd(OH)₂-C, EtOH, r.t., 12 h; (g) TBAF, THF, r.t., 1 h

Scheme 2

和 6 在钯催化下进行 Suzuki 交叉偶联生成关键中间体 7。本文对多种偶联条件体系进行了筛选, 最佳反应体系是 Pd(dppf)₂Cl₂-Cs₂CO₃-dioxane 回流。该条件下, 化合物(7)的收率为 52%。化合物 7 与金属镁和氯化铵在甲醇体系中回流, 脱去对甲基苯磺酰基得到目标化合物 lycopogallic acid, lycopogallic acid 经水解、酸化后得到 lycopogallic acid。或者由化合物 7 经氢氧化钾水解, 可以直接得到 lycopogallic acid (Scheme 1)。以 lycopogallic acid 计算, 总收率为 27%。

路线二: *N*-苄基-3,4-二羟基-1*H*-吡咯-2,5-二甲酸甲酯(10)的制备, 由亚氨基二乙酸经过甲酯和苄基保护以后和草酸二甲酯发生 Hinsberg 反应^[13], 产物再和三氟甲磺酸酐反应生成关键中间体 11 (Scheme 2), 4 步收率共计为 49%。*N*-二甲基叔丁基硅基-1*H*-吡咯-3-硼酸(12)的制备参照文献报道^[18], 由吡咯出发, 经 TBS 保护, 再用 NBS 取代再经正丁基锂和硼酸三甲酯反应, 水解后得

到吡咯硼酸(12), 总收率为 71%。三氟甲磺酸酯(11)和吡咯硼酸(12)的偶联在钯催化下进行 Suzuki 交叉偶联而得到。本文对多种偶联条件体系进行了筛选, 最佳反应体系是 Pd(PPh₃)₄-Na₂CO₃(aq.)-dioxane 回流, 该条件下化合物 13 的收率为 64%。化合物 13 经 Pearlman 催化剂加氢, 脱苄基和 TBAF 脱 TBS 保护得到目标化合物 lycopogallic acid (Scheme 2)。以 lycopogallic acid 计算, 总收率为 25%。

1.2 Lycopogallic acid 的细胞毒性和拓扑异构酶抑制活性

采用 SRB 法检测 lycopogallic acid 和 lycopogallic acid 对 MDA-MB-231, A549, HeLa 和 PC3 四株肿瘤细胞增殖的影响, 实验结果表明 lycopogallic acid 有一定的细胞毒性(表 1)。

采用 DNA 松弛实验检测 lycopogallic acid 和 lycopogallic acid 对拓扑异构酶的抑制活性。0.25 μg 的 pBR322 DNA

在 1 U Topo I 的作用下, 由超螺旋型变成松弛型 DNA. OPT 是文献报道的 Topo I 特异抑制剂, 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, pBR322 DNA 仍然保持超螺旋结构, 表明 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 OPT 可以完全抑制 Topo I 对 0.25 μg 的 pBR322 DNA 的催化活性. Lycogarubrin C 和 lycogalic acid 均无拓扑异构酶 I 抑制活性(图 2A).

表 1 Lycogarubrin C 和 lycogalic Acid 对 MDA-MB-231, A549, HeLa 和 PC3 四株肿瘤细胞的 IC_{50}

Table 1 The IC_{50} of Lycogarubrin C and Lycogalic Acid on MDA-MB-231, A549, HeLa and PC3 cell lines

Compd.	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$			
	MDA-MB-231	A549	HeLa	PC3
Lycogarubrin C	38.2	29.8	30.2	45.0
Lycogalic acid	>50	>50	>50	>50
Etoposide (VP16)	12.2	2.4	23.8	30.2

0.25 μg 的 pBR322 DNA 在 1 U Topo II α 的作用下, 由超螺旋型变成松弛型 DNA. VP16 是文献报道的 Topo II α 特异抑制剂, 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, pBR322 DNA 仍然保持超螺旋结构, 表明 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 VP16 可以完全抑制 Topo II α 对 0.25 μg 的 pBR322 DNA 的催化活性. Lycogarubrin C 有较强的拓扑异构酶 II α 抑制活性(图 2B).

2 结论

本文报道了一个新的简单、有效的 3,4-二吡咯吡咯类化合物的合成方法. 该方法由简单原料吡咯或者亚氨

基二乙酸和吡咯出发经过 8 步反应以 27% 的收率得到 lycogarubrin C 和 lycogalic acid. 该方法所用原料简单、易得, 操作过程简单, 可以方便地应用于 3,4-二吡咯(芳基)吡咯类衍生物的合成. SRB 实验表明 lycogarubrin C 有一定的抗肿瘤活性, DNA 松弛实验显示 lycogarubrin C 和 lycogalic Acid 均无拓扑异构酶 I 抑制活性, 但 lycogarubrin C 有较强的拓扑异构酶 II α 抑制活性.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

熔点用 X4 型显微熔点仪测定(温度未校正); 核磁共振仪为 Bruker Avance-600 型, TMS 为内参; 质谱仪为 LTQ-Orbitrap XL 型(Thermo Fisher), 离子源采用电喷雾离子化(ESI); 柱色谱使用 200~300 目硅胶(购自青岛海洋化工厂); 薄层色谱使用 Silica Gel GF₂₅₄(购自青岛海洋化工厂); 所有试剂均为国产或进口分析纯, 无水溶剂用常规方法干燥处理.

3.2 实验方法

3.2.1 化学合成

N-叔丁氧羰基吡咯(**1**): 吡咯 13.42 g (0.2 mol) 溶于 100 mL 的二氯甲烷中, 室温下加入二碳酸二叔丁酯 43.65 g (0.2 mol) 和三乙胺 20.2 g (0.2 mol), 室温搅拌反应 2 h. 反应液加水 400 mL, 用二氯甲烷(400 mL $\times$ 2)萃取, 合并有机层, 无水硫酸镁干燥, 减压浓缩, 得到 31.4 g 无色油状物 **1**, 收率为 94%. ^1H NMR (600 MHz,

图 2 Lycogarubrin C 和 lycogalic acid 对拓扑异构酶催化松弛 DNA 的抑制作用

Figure 2 The effect of lycogarubrin C and lycogalic acid on the DNA relaxing activity of topoisomerases

CDCl_3) δ : 7.27 (s, 2H), 6.25 (s, 2H), 1.62 (s, 9H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 149.0, 120.0, 111.9, 83.6, 28.0; ESI-MS m/z : 168.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-叔丁氧羰基吡咯-2,5-二甲酸甲酯(2): 2,2,6,6-四甲基哌啶 13.5 mL (80 mmol)溶于 100 mL 的无水四氢呋喃, 在 -78°C 氮气保护下缓慢滴加入正丁基锂溶液 30 mL (正己烷 2.5 mol/L 溶液). 再缓慢滴加入 *N*-叔丁氧羰基吡咯(1) 5.35 g (32 mmol)的无水四氢呋喃溶液 30 mL. -78°C 下搅拌反应 3 h 后, 氮气保护下将该溶液滴加入氯甲酸甲酯 7.4 mL (98 mmol)的无水四氢呋喃溶液 20 mL. 保温搅拌反应 30 min, 反应液加入饱和氯化铵 20 mL 淬灭反应, 缓慢升至室温. 反应液减压浓缩后加水 150 mL, 乙酸乙酯萃取(100 mL $\times$ 4), 合并有机层, 无水硫酸镁干燥, 减压浓缩. 粗产物经柱色谱纯化, 石油醚-丙酮($V:V=20:1$)洗脱得到淡黄色固体粉末, 再用环己烷重结晶得到 5.9 g 类白色针状结晶 2, 收率 65%. m.p. $107\sim 109^\circ\text{C}$; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 6.86 (s, 2H), 3.89 (s, 6H), 1.68 (s, 9H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 159.9, 148.9, 126.7, 115.8, 86.3, 52.1, 27.3; ESI-MS m/z : 284.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3,4-二碘-1*H*-吡咯-2,5-二甲酸甲酯(3): *N*-叔丁氧羰基吡咯-2,5-二甲酸甲酯(2) 477 mg (1.68 mmol)溶于 4 mL DMF, 该溶液在 130°C 下加热 12 h, 然后降温到 80°C 加入 *N*-碘代丁二酰亚胺(NIS) 834 mg (3.71 mmol). 反应液 80°C 下搅拌反应 4 h, 冷却后减压浓缩. 粗产物经柱色谱纯化, 石油醚-丙酮($V:V=10:1$)洗脱得到 677 mg 类白色固体粉末 3, 收率 95%. m.p. 240°C 以上时分解; ^1H NMR (600 MHz, acetone- d_6) δ : 12.04 (s, 1H), 3.87 (s, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, acetone- d_6) δ : 158.4, 127.8, 84.9, 51.4; ESI-MS m/z : 434.2 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

N-对甲基苯磺酰基吡咯(4): 吡咯 586 mg (5 mmol)溶于甲苯 30 mL, 室温下加入四丁基溴化铵(催化量), 氢氧化钾(50%水溶液)28 mL 和对甲基苯磺酰氯 954 mg (5 mmol)的甲苯溶液 10 mL. 室温搅拌反应 4 h, 加入水 100 mL, 分出有机层. 有机层经水洗(50 mL $\times$ 2)、饱和食盐水洗(50 mL)、无水硫酸镁干燥后减压浓缩. 得到 1.33 g 类白色固体粉末 4, 收率 98%. m.p. $86\sim 88^\circ\text{C}$; ^1H NMR (600 MHz, acetone- d_6) δ : 8.14 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 8.08 (s, 1H), 8.02 (d, $J=7.8$ Hz, 2H), 7.80 (d, $J=7.7$ Hz, 1H), 7.47 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.41 (d, $J=7.8$ Hz, 2H), 7.38 (d, $J=7.0$ Hz, 1H), 2.87 (s, 3H); ESI-MS m/z : 272.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-对甲基苯磺酰基-3-吡咯醋酸汞(5): 醋酸汞 1.59 g (5 mmol)加入到 *N*-对甲基苯磺酰基吡咯(4) 1.33 g (4.9 mmol)的 50 mL 醋酸溶液中. 室温搅拌 10 min, 滴加入 5

滴高氯酸. 反应液室温下搅拌 24 h, 加水 150 mL, 过滤得到白色固体化合物, 经大量水洗后真空干燥 12 h 得到 2.49 g 有机汞化合物 5, 收率为 96%. 该化合物不稳定, 不经纯化直接使用.

N-对甲基苯磺酰基-3-吡咯硼酸(6): 室温下将硼烷 (1 mol/L 四氢呋喃溶液)23.5 mL (23.5 mmol)滴加到化合物 5 2.49 g (4.7 mmol)的无 100 mL 水四氢呋喃溶液中. 反应液室温下搅拌反应 1 h, 缓慢加入水 38 mL. 反应液减压浓缩后加水 150 mL, 乙酸乙酯萃取(60 mL $\times$ 2), 合并有机层, 无水硫酸镁干燥, 减压浓缩. 粗产物在正己烷中研磨四次, 抽滤得到类白色固体硼酸化合物 6 1.21 g, 收率为 82%. 该化合物不稳定, 不经进一步纯化直接使用.

3,4-二(1-对甲基苯磺酰基-1*H*-吡咯-3-基)-1*H*-吡咯-2,5-二甲酸甲酯(7): *N*-对甲基苯磺酰基-3-吡咯硼酸(6) 130 mg (0.15 mmol), 氟化铯 200 mg (1.2 mmol)和 3,4-二碘吡咯-2,5-二甲酸甲酯(3) 90 mg (0.2 mmol)溶于二氧六环 10 mL 中. 反应液氮气流下搅拌脱氧 10 min, 加入 $\text{Pd}(\text{dppf})_2\text{Cl}_2$ 20 mg (0.02 mmol), 然后在氮气保护下搅拌回流反应 12 h, TLC 检测反应完全. 反应液冷却到室温, 加水 100 mL, 乙酸乙酯萃取(60 mL $\times$ 3)合并有机层, 无水硫酸镁干燥, 减压浓缩. 粗产物经柱色谱纯化, 石油醚-丙酮($V:V=5:1$)洗脱得到 76.5 mg 类白色固体粉末 7, 收率为 52%. m.p. $>220^\circ\text{C}$; ^1H NMR (600 MHz, acetone- d_6) δ : 11.80 (s, 1H), 7.87 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 7.64 (s, 2H), 7.53 (d, $J=7.4$ Hz, 4H), 7.24 (d, $J=8.0$ Hz, 4H), 7.26 $\sim$ 7.20 (m, 4H), 7.01 (s, 2H), 3.58 (s, 6H), 2.32 (s, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, acetone- d_6) δ : 159.9, 145.1, 134.9, 134.2, 131.2, 130.0, 126.5, 126.2, 124.2, 123.8, 123.0, 121.7, 120.5, 115.3, 113.1, 51.0, 20.6; ESI-MS m/z : 722.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Lycogarubrin C: 化合物 7 72 mg (0.1 mmol)和氯化铵 57 mg (1 mmol)溶于甲醇 20 mL, 加入镁粉 24 mg (1 mmol). 反应液回流 6 h, TLC 检测反应完全. 反应液冷却到室温, 加水 60 mL, 乙酸乙酯萃取(30 mL $\times$ 3)合并有机层, 无水硫酸镁干燥, 减压浓缩. 粗产物经柱色谱纯化, 石油醚-丙酮($V:V=2:1$)洗脱得到 37.6 mg 类白色固体粉末 lycogarubrin C, 收率为 91%. m.p. $120\sim 123^\circ\text{C}$; ^1H NMR (600 MHz, acetone- d_6) δ : 11.08 (s, 1H, H-1), 10.05 (s, 2H, H-1'), 7.29 (d, $J=8.1$ Hz, 2H, H-5'), 7.19 (d, $J=7.9$ Hz, 2H, H-8'), 7.07 (s, 2H, H-2'), 6.98 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, H-6'), 6.82 (t, $J=7.4$ Hz, 2H, H-7'), 3.64 (s, 6H, H-7); ^{13}C NMR (150 MHz, acetone- d_6) δ : 160.57, 136.01, 127.96, 125.07, 122.76, 120.66, 119.68, 118.50, 110.96, 108.38, 50.63; ESI-MS m/z : 414.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$. 文献[10]报

道 lycogarubrin C 为一个淡黄色固体, m.p. 123~125 °C; ^1H NMR (500 MHz, acetone- d_6) δ : 11.06 (br s, 1H), 10.04 (br s, 2H), 7.26~7.30 (m, 2H), 7.16~7.20 (m, 2H), 7.07 (d, $J=2.8$ Hz, 2H), 6.95~6.99 (m, 2H), 6.79~6.83 (m, 2H), 3.64 (s, 6H). 与之相对比, 本实验得到的化合物与天然 lycogarubrin C 相同.

Lycogalic acid: Lycogarubrin C 30 mg (0.073 mmol) 和氢氧化钠 8 mg (0.2 mmol) 溶于甲醇 5 mL 和水 1 mL 中, 反应液回流 2 h, TLC 检测反应完全. 反应液冷却到室温, 加水 30 mL 用稀盐酸调 pH 值到 3, 乙酸乙酯萃取 (20 mL $\times$ 3) 合并有机层, 无水硫酸镁干燥, 减压浓缩. 粗产物经柱色谱纯化, 氯仿-甲醇 ($V:V=20:1$) 洗脱得到类白色固体粉末 lycogalic acid 23 mg, 收率 82%. m.p. >220 °C; ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.13 (s, 1H, H-1), 10.20 (s, 2H, H-1'), 7.25 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, H-5'), 7.14 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, H-8'), 7.02 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, H-6'), 6.89 (s, 2H, H-2'), 6.80 (t, $J=7.4$ Hz, 2H, H-7'); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 162.1, 135.9, 128.2, 125.4, 124.5, 123.8, 120.7, 119.9, 118.6, 111.5, 108.6, 40.4, 40.2, 40.1, 39.9, 39.8, 39.7, 39.5; ESI-MS m/z : 386.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$. 文献[1]报道 lycogalic acid 的 ^1H NMR 数据为: (100 MHz, MeOH- d_4) δ : 6.89 (s, H-2'), 7.19 (d, $J=7.2$ Hz, H-8'), 6.81 (dd, $J=7.2, 7.0$ Hz, H-7'), 6.98 (dd, $J=8.0, 7.0$ Hz, H-6'), 7.27 (dd, $J=8.0$ Hz, H-5'). 与之相对比, 本实验得到的化合物与天然 lycogalic acid 相同.

亚氨基乙二酸二甲酯盐酸盐(8): -10 °C 下将二氯亚砷 41.2 mL (565 mmol) 滴加入 200 mL 甲醇中, 10 min 滴完. 将亚氨基乙二酸 25 g (188 mmol) 分批加入到反应液中. 反应液升温至室温再搅拌 3 d. 回收部分甲醇, 冷却结晶抽滤出白色固体粉末, 冷的甲醇洗涤后, 得到白色结晶 34.9 g, 收率为 94%, m.p. 166~170 °C; ^1H NMR (600 MHz, D_2O) δ : 4.69 (s, 2H), 4.00 (s, 4H), 3.71 (s, 6H); ESI-MS m/z : 386.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-苄基亚氨基乙二酸二甲酯(9): 亚氨基乙二酸二甲酯盐酸盐 10 g (50 mmol) 溶于 100 mL DMF 中, 碳酸钾 10.35 g (75 mmol) 悬浮于反应瓶中, 室温下滴加入溴化苄 6.1 mL (55 mmol), 60 °C 下搅拌反应过夜. 反应加大量水, 用二氯甲烷萃取. 合并有机层无水硫酸钠干燥后蒸干, 得无色油状物, 即为所得目标化合物. 收率为 80%. 不需要纯化直接使用. ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.41 (d, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.33 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.27 (d, $J=7.5$ Hz, 1H), 3.91 (s, 2H), 3.66 (s, 6H), 3.56 (s, 4H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 171.1, 128.9, 128.8, 128.2, 127.2, 57.4, 53.4, 50.6; ESI-MS m/z : 252.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-苄基-3,4-二羟基-1*H*-2,5-吡咯二甲酸甲酯(10): 草酸二甲酯 5.9 g (50 mmol) 和氢氧化钠 2.88 g (120 mmol) 溶于 100 mL 无水四氢呋喃中, 室温下滴加入 *N*-苄基乙二酸二甲酯 10 g (40 mmol), 回流反应 6 h. 反应液冷却到室温加水淬灭, 倾入大量的水中, 用浓盐酸调 pH 值到 2~3, 抽滤出固体化合物, 乙酸乙酯结晶, 得到类白色固体 9.28 g, 收率为 76%. m.p. 165~167 °C; ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.66 (s, 2H), 7.25 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.18 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 6.86 (d, $J=7.0$ Hz, 2H), 5.78 (s, 2H), 3.72 (s, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 161.4, 140.0, 139.3, 128.8, 127.2, 126.2, 112.4, 51.7, 48.0; ESI-MS m/z : 306.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-苄基-3,4-二氟甲磺酰氧基-1*H*-2,5-吡咯二甲酸甲酯(11): 化合物 10 6.1 g (20 mmol) 溶于 50 mL 吡啶中, 0 °C 下滴加入三氟甲磺酸酐 6.3 mL (44 mmol) 搅拌反应 1 h. 加水淬灭反应, 倾入大量的水中, 乙酸乙酯萃取, 有机层稀盐酸洗、水洗、饱和食盐水洗, 蒸干后粗产物经硅胶柱色谱分离. 石油醚-丙酮 ($V:V=50:1$) 洗脱, 得到白色固体结晶 9.5 g, 收率 85%. m.p. 70~71 °C; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.34 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.29 (d, $J=7.3$ Hz, 1H), 7.03 (d, $J=7.5$ Hz, 2H), 6.23 (s, 2H), 3.91 (s, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 158.2, 136.4, 129.1, 128.8, 128.4, 127.8, 117.7, 62.5, 49.9; ESI-MS m/z : 587.2 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$.

N-二甲基叔丁基硅基-1*H*-吡啶-3-硼酸(12): 0 °C 下将吡啶 7.03 g (60 mmol), 溶于 200 mL 无水四氢呋喃中, 0 °C 下缓慢滴加入 2.5 mol/L 正丁基锂己烷溶液 26.4 mL (66 mmol), 15 min 滴毕, 然后滴加入 TBSCl 9.95 g (66 mmol) 的四氢呋喃溶液, 缓慢升至室温, 继续搅拌反应 2 h. 反应液加入饱和氯化铵溶液淬灭. 蒸干四氢呋喃后得到无色油状物, 不经纯化直接使用. 上一步所得产物溶于 100 mL DMF 中. 0 °C 下分批加入 NBS 10.68 g (60 mmol), 保温搅拌反应 2 h. 反应液倾入水中, 乙酸乙酯萃取. 合并有机层, 无水硫酸钠干燥, 蒸干后硅胶柱色谱分离纯化, 石油醚洗脱, 得到类白色固体 15.5 g, 两步共计收率为 83.3%. *N*-二甲基叔丁基硅基-1*H*-3-溴吡啶 6.2 g (20 mmol) 溶于 150 mL 无水四氢呋喃中, -78 °C 下缓慢滴加入 2.5 mol/L 正丁基锂己烷溶液 10 mL (25 mmol), 15 min 滴毕, -78 °C 下搅拌反应 30 min. 再加入硼酸三甲酯 6 mL (50 mmol), -78 °C 下搅拌反应 2 h, 后加入 $V(\text{甲醇}):V(\text{水})=1:1$ (4 mL) 淬灭反应. -78 °C 下再搅拌 1 h 后, 缓慢恢复到室温. 反应液蒸去部分四氢呋喃后, 加入饱和氯化铵水溶液, 乙酸乙酯萃取合并有机层, 无水硫酸钠干燥, 浓缩后结晶, 抽滤得到类白色固体粉末 4.67 g, 收率为 85%. 化合物不稳定易分

解; ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.10 (s, 1H), 7.94 (d, $J=1.8$ Hz, 1H), 7.85 (d, $J=1.8$ Hz, 1H), 7.47~7.46 (m, 1H), 7.21~7.18 (m, 1H), 0.86 (s, 9H), 0.61 (s, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 207.3, 143.2, 141.0, 137.6, 125.0, 123.8, 115.8, 113.0, 26.5, 19.4, -3.9.

N-苄基-3,4-二(1-(二甲基叔丁基硅基)-1*H*-吡啶-3-基)-1*H*-吡咯-2,5-二甲酸甲酯(**13**): 化合物 **11** 570 mg (1 mmol)、化合物 **12** 830 mg (3 mmol)、碳酸钠 800 mg (6 mmol)和四三苯基磷钨 100 mg (0.1 mmol)溶于 15 mL 二氧六环和 3 mL 水中, 90 °C 氮气保护下搅拌反应过夜. 反应液倾入水中, 乙酸乙酯萃取合并有机层, 无水硫酸钠干燥, 蒸干后硅胶柱色谱分离、纯化, 石油醚-丙酮 ($V:V=10:1$)洗脱得到无色油状物 468.4 mg, 收率为 64%. ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.37 (dd, $J=17.5$, 8.1 Hz, 4H), 7.28 (s, 2H), 7.24 (d, $J=7.9$ Hz, 2H), 7.20 (d, $J=7.5$ Hz, 2H), 7.05 (t, $J=7.9$ Hz, 2H), 6.97 (t, $J=7.9$ Hz, 2H), 6.83 (s, 2H), 6.16 (s, 2H), 3.39 (s, 6H), 0.73 (s, 18H), 0.40 (s, 12H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 162.6, 140.7, 139.1, 131.6, 130.5, 128.5, 127.0, 126.4, 125.7, 124.6, 120.8, 119.6, 119.5, 113.6, 111.9, 51.5, 49.6, 26.2, 19.3, -4.1; ESI-MS m/z : 733.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3,4-二(1-(二甲基叔丁基硅基)-1*H*-吡啶-3-基)-1*H*-吡咯-2,5-二甲酸甲酯(**14**): 化合物 **13** 220 mg (0.3 mmol)溶于 30 mL 无水乙醇中, 氢氧化钨催化下加氢还原过夜, 抽滤除去催化剂, 蒸干乙醇后得到类白色固体化合物 171.5 mg, 收率 89%. m.p. 112~114 °C; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 10.08 (s, 1H), 7.40~7.36 (m, 4H), 7.04 (t, $J=7.6$ Hz, 2H), 6.98 (s, 2H), 6.90 (t, $J=7.6$ Hz, 2H), 3.72 (s, 6H), 0.77 (s, 18H), 0.44 (s, 12H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 161.4, 140.8, 131.4, 124.9, 124.2, 122.5, 121.9, 120.9, 120.7, 120.1, 119.8, 119.4, 113.6, 111.0, 110.9, 102.5, 51.7, 26.1, 19.2, -4.1; ESI-MS m/z : 642.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Lycogarubrin C: 化合物 **14** 160 mg (0.25 mmol)溶于 20 mL 四氢呋喃中加入三水合四丁基氟化铵 158 mg (0.5 mmol), 室温下搅拌反应 1 h. 反应液加大量水, 乙酸乙

酯萃取, 合并有机层, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩. 粗产物经硅胶柱色谱纯化, 石油醚-丙酮 ($V:V=2:1$)洗脱得到类白色固体粉末 lycogarubrin C 94 mg, 收率 90%.

3.2.2 生物活性测定

细胞毒活性测定采用 SRB 法^[19], 拓扑异构酶抑制活性测定采用 DNA 松弛实验^[20], 具体实验方法和实验数据处理方法见相应参考文献. 细胞毒活性测定以依托泊苷(VP16)为阳性对照, 拓扑异构酶抑制活性测定以 10-羟基喜树碱(OPT)和 VP16 为阳性对照.

References

- [1] Frode, R.; Hinze, C.; Josten, I.; Schmidt, B.; Steffan, B.; Steglich, W. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 1689.
- [2] Hashimoto, T.; Yasuda, A.; Akazawa, K.; Takaoka, S.; Tori, M.; Akazawa, Y. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 2559.
- [3] Hosoya, T.; Yamamoto, Y.; Uehara, Y.; Hayashi, M.; Komiyama, K.; Ishibashi, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 2776.
- [4] Howard-Jones, A. R.; Walsh, C. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 12289.
- [5] Arai, M. A.; Masada, A.; Ohtsuka, T.; Kageyama, R.; Ishibashi, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 5778.
- [6] Howard-Jones, A. R.; Walsh, C. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 11016.
- [7] Knolker, H. J.; Reddy, K. R. *Chem. Rev.* **2002**, 102, 4303.
- [8] Alois, F.; Helga, K.; Oliver, R. T. *Tetrahedron* **2002**, 58, 6373.
- [9] Claudia, H.; Andreas, K.; Andreas, T.; Wolfgang, S. *Synthesis (Mass)* **2007**, 608.
- [10] Liangfeng, F.; Gordon, W. G. *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51, 537.
- [11] Ke, W.; Zhanzhu, L. *Synth. Commun.* **2010**, 40, 144.
- [12] Barthélémy, N.; Leif, G.; Ulf, R. *Chem. Commun.* **1997**, 1017.
- [13] Andreas, M.; Roland, S.; Eleonore, D. *Synthesis (Mass)* **1995**, 795.
- [14] You, H.; Youn, H. S.; Im, I.; Bae, M. H.; Lee, S. K.; Ko, H.; Eom, S. H.; Kim, Y. C. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 1153.
- [15] Donohoe, T. J.; Thomas, R. E.; Cheeseman, M. D.; Rigby, C. L.; Bhalay, G.; Linney, I. D. *Org. Lett.* **2008**, 10, 3615.
- [16] Katrin, H.; Anthony, C. W.; Martin, G. B. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 88.
- [17] Garg, N. K.; Sarpong, R.; Stoltz, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 13179.
- [18] Yang, C. G.; Liu, G.; Jiang, B. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 9392.
- [19] Vichai, V.; Kirtikara, K. *Nat. Protoc.* **2006**, 1, 1112.
- [20] Aubry, A.; Fisher, L. M.; Jarlier, V.; Cambau, E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, 348, 158.

(Li, L.; Lu, Z.)