

刺囊酸衍生物的合成及其对脂肪酶的抑制作用

王雪¹, 南敏伦², 白雪¹, 赫玉芳³, 赵昱玮⁴, 李川晶¹, 何忠梅^{1*}

(1. 吉林农业大学, 长春 130118; 2. 吉林省中医药科学院, 长春 130012;
3. 长春中医药大学, 长春 130118; 4. 吉林省吉测检测技术有限公司, 长春 130118)

[摘要] **目的:**刺囊酸属于齐墩果烷型五环三萜类化合物,由于刺囊酸的首要结构特点为环系稳定,活性位点较少,因此该文主要对刺囊酸的结构进行修饰,合成一系列刺囊酸衍生物,以此来提高其生物利用度,并研究其抑制脂肪酶活性。**方法:**以天然脂肪酶抑制剂刺囊酸为原料,设计、合成新型刺囊酸衍生物,然后采用2,4-二硝基苯酚丁酸酯(2,4-dinitrophenyl butanoate, PNPB)法对其抑制脂肪酶作用进行研究。**结果:**合成了9个化合物,利用红外光谱,紫外,质谱,核磁共振谱等技术来表征其结构,经鉴定均为新化合物。进一步进行抑制脂肪酶活性实验,结果表明,所合成化合物1~9均对脂肪酶具有抑制作用,半抑制浓度(IC₅₀)分别为7.03, 2.05, 2.14, 3.65, 3.24, 0.28, 0.34, 0.46, 0.39 g·L⁻¹,其对脂肪酶的抑制率均明显高于先导化合物刺囊酸(IC₅₀ = 7.17 g·L⁻¹),且化合物6~9的抑制活性较于阳性药奥利司他(Orlistat)(IC₅₀ = 0.53 g·L⁻¹),各化合物对脂肪酶抑制活性依次为化合物6 > 7 > 9 > 8 > 奥利司他 > 2 > 3 > 5 > 4 > 1 > 刺囊酸。**结论:**以刺囊酸为先导化合物进行设计、合成衍生物,从而提高抑制脂肪酶活性的研究思路是可行的。

[关键词] 刺囊酸; 衍生物; 脂肪酶; 活性

[中图分类号] R284.2; R289; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)20-0125-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191416

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190402.1659.013.html>

[网络出版时间] 2019-04-04 11:20

Synthesis of Echinocystic Acid Derivatives and Inhibitory Effect on Lipase

WANG Xue¹, NAN Min-lun², BAI Xue¹, HE Yu-fang³, ZHAO Yu-wei⁴,
LI Chuan-jing¹, HE Zhong-mei^{1*}

(1. Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;
2. Academy of Chinese Medical Sciences of Jilin Province, Changchun 130012, China;
3. Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130118, China;
4. Jilin Jice Testing Technology Co. Ltd., Changchun 130118, China)

[Abstract] **Objective:** Echinocystic acid (EA) is a kind of oleanolic pentacyclic triterpenoid compound, due to its main structural features of stability and less active sites, the structures of EA were modified in this paper to synthesize a series of EA derivatives, improve their bioavailability, and investigate their inhibitory effect on lipase. **Method:** In this study, EA derivatives were designed and synthesized from EA, which is a natural lipase inhibitor. Their inhibitory effects on lipase were tested by using 2, 4-dinitrophenyl butanoate (PNPB) method. **Result:** Nine compounds were synthesized, and their structures were characterized by infrared spectrum (IR), ultraviolet spectrum (UV), mass spectrum (MS), nuclear magnetic resonance spectrum (¹H-NMR and ¹³C-NMR), all of which were identified as new compounds. Further experiments on the inhibitory effect on lipase showed that compounds 1-9 had higher inhibitory effects than EA, IC₅₀ = 7.03, 2.05, 2.14, 3.65, 3.24, 0.28, 0.34, 0.46, and 0.39 g·L⁻¹.

[收稿日期] 20190325(017)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31470418)

[第一作者] 王雪,在读硕士,从事中药化学成分提取、分离及产品开发工作, Tel:0431-86058683, E-mail:401891251@qq.com

[通信作者] *何忠梅,博士,副教授,从事中药化学成分提取、分离及产品开发工作, Tel:0431-86058683, E-mail:987329817@qq.com

Compounds **6-9** had higher inhibitory effect than Orlistat ($IC_{50} = 0.53 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Inhibition rates were as follows: **6** > **7** > **9** > **8** > Orlistat > **2** > **3** > **5** > **4** > **1** > EA. **Conclusion**: It is feasible to design and synthesize derivatives with EA as the lead compound to improve the inhibitory effect on lipase.

[**Key words**] echinocystic acid; derivatives; lipase; activity

肥胖是导致许多慢性疾病的高危因素,目前肥胖治疗方法主要包括减少食物摄入、促进能量消耗、调节脂肪代谢以及抑制脂肪酶活性等,其中最为有效的方法莫过于通过抑制脂肪酶活性来达到治疗肥胖的效果^[1]。因此,国内外学者对脂肪酶抑制剂进行了大量的筛选,发现从植物药提取的多糖类^[2]、黄酮类^[3]、皂苷类^[4]、多酚类^[5]、萜类^[6]等成分均具有抑制脂肪酶的作用,微生物发酵来源^[7]和化学合成来源的脂肪酶抑制剂^[8]也有很强的抑制脂肪酶活性作用,且具有相当大的开发潜力。相对于微生物发酵来源和化学合成来源的脂肪酶抑制剂相比,植物药提取来源的脂肪酶抑制剂具有来源更加广泛且相对安全可靠、副作用较小等优势。

刺囊酸别名 $3\beta, 16\alpha$ -二羟基齐墩果-12-烯-28-酸,属于齐墩果烷型五环三萜类化合物,广泛分布于皂荚、猪牙皂、蒙自合欢等多种药用植物中,具有良好的抗丙型肝炎病毒(HCV),抗糖尿病,抗流感病毒,抑制脂肪酶活性等药理活性。由于刺囊酸具有环系稳定、活性位点少等特点,为了提高刺囊酸的生物利用度,近年来中外学者进行了不断实验研究^[9-15],对其进行了更为广泛的结构修饰及改造。但其抑制脂肪酶活性未受到药理学研究者的重视,鲜有报道。

本文以提高药效为研究思路,从中药皂荚(*Gleditsia sinensis*)中提取得到先导化合物刺囊酸,然后设计、制备得到新型具有更佳活性的化合物,主要通过对刺囊酸的 C-3 位和 C-16 位进行乙酰化反应,再在其 C-28 位引入一系列氨基酸,设计合成了 9 个全新结构的刺囊酸衍生物。通过 MS, ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 鉴定其结构,并采用 2,4-二硝基苯酚丁酸酯(PNPB)法筛选化合物抑制脂肪酶活性。

1 材料

RE-52A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),SHB-III 型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司),X-4 型熔点测定仪(巩义市予华仪器有限责任公司),DD2 400-MR 型核磁共振仪及 7900 IPC-MSD 型质谱仪(美国安捷伦),MR-96A 型酶标仪(迈瑞医疗有限公司),96 孔板(Corning 公司)。

刺囊酸(自制,HPLC 测定纯度 >98%);三羟甲

基氨基甲烷(Tris)购自北京索莱宝科技有限公司(批号 1110P071);胰脂肪酶(Pancreatic lipases, PL)购自上海通蔚实业有限公司(批号 SLBS3971);2,4-二硝基苯酚丁酸酯(PNPB)购自杭州海瑞化工有限公司(批号 FD15365);二甲基亚砷(DMSO)购自华瑞化工股份有限公司(批号 20170509);奥利司他(Orlistat)购自山东新时代药业有限公司(批号 D84180303);甘氨酸甲酯盐酸盐、丙氨酸甲酯盐酸盐、亮氨酸甲酯盐酸盐、缬氨酸甲酯盐酸盐均购自上海吉至生化科技有限公司;其他试剂均购自 Sigma 公司。

2 方法与结果

2.1 衍生物的合成 本文以刺囊酸为先导化合物,合成一系列刺囊酸衍生物,详见图 1。

2.1.1 化合物 1 的合成 称取刺囊酸 1.000 g (2.120 mmol)置于圆底烧瓶中,加入吡啶 40 mL,乙酸酐 20 mL,于 105 ℃ 磁力搅拌 24 h,以石油醚-乙酸乙酯-甲酸(8:2:0.05)进行 TLC 检测,反应完全后,转移至烧杯中,加冰水 100 mL,加入稀盐酸,调 pH 4,搅拌,过滤,滤饼用乙醇重结晶,干燥,即得化合物 1。

化合物 1 白色粉末 1.180 g,产率 99.8%;mp 156 ~ 158 ℃; $[M + H]^+ 556.77$; ¹H-NMR(400 MHz, DMSO) δ : 12.60(1H, 28-COOH), 5.50(1H, br s, 12-CH), 5.32(1H, br s, 16-CH), 4.41 ~ 4.38(1H, br d, 3-CH), 3.01 ~ 2.97(1H, br s, 11-CH₂), 2.05(3H, s, 2''-CH₃), 2.01(3H, s, 2'-CH₃), 1.84 ~ 1.81(3H), 1.67 ~ 1.31(13H), 1.23(3H, s, 29-CH₃), 1.14 ~ 1.04(4H), 0.94(3H, s, 23-CH₃), 0.91(6H, s, 27-CH₃, 30-CH₃), 0.82(6H, s, 26-CH₃, 24-CH₃), 0.71(3H, s, 25-CH₃); ¹³C-NMR(100 MHz, DMSO) δ : 176.71(C-28), 170.07(C-1''), 169.46(C-1'), 142.05(C-13), 122.65(C-12), 79.87(C-3), 75.52(C-16), 54.58(C-5), 46.40(C-17), 45.97(C-9), 45.93(C-19), 40.66(C-14), 38.93(C-18), 38.76(C-15), 37.57(C-8), 37.24(C-1), 36.50(C-4), 34.59(C-10), 32.93(C-21), 32.37(C-22), 31.66(C-29), 30.70(C-7), 30.10(C-20), 27.75(C-23), 26.16(C-27), 23.92(C-2), 23.21(C-30), 22.80(C-11), 21.60(C-2''), 20.94(C-2'), 17.74(C-6), 16.75(C-26), 16.61(C-24), 15.12(C-25)。

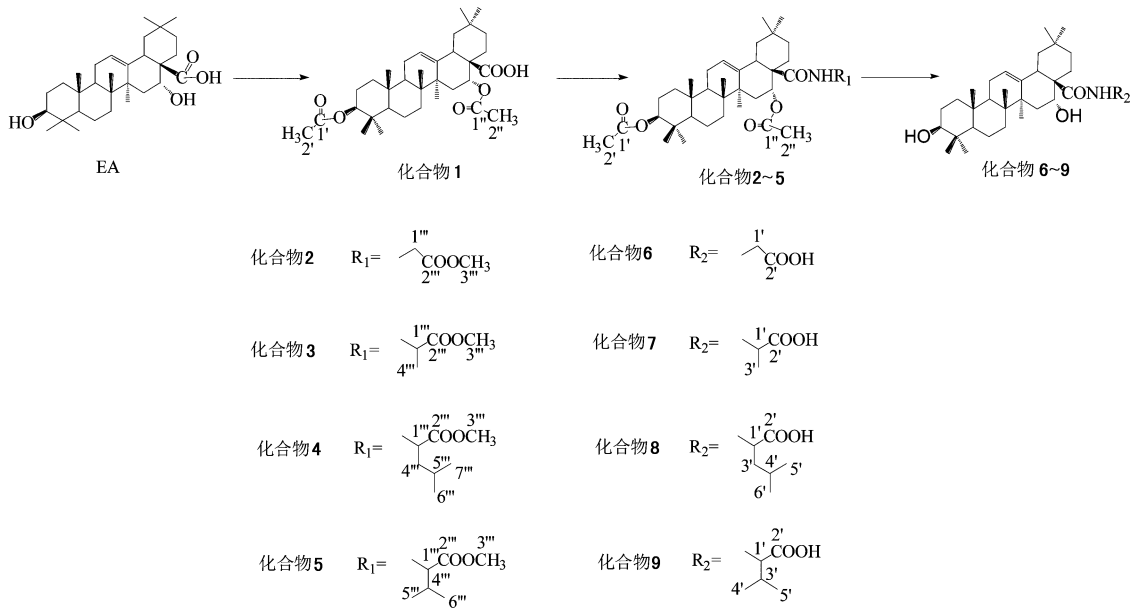


图 1 刺囊酸生物的合成设计路线

Fig. 1 Synthetic route of echinocystic acid derivatives

2.1.2 化合物 2 ~ 5 的合成 称取化合物 1 2.700 mmol 置圆底烧瓶中(冰水浴),加入二氯甲烷 25 mL 使溶解,加入草酰氯 2 mL,在冰水浴中持续搅拌 1 h,转至室温磁力搅拌 24 h,旋干,加入二氯甲烷反复旋蒸 3 次,每次 30 mL,用二氯甲烷 90 mL 溶解,备用;称取氨基酸甲酯盐酸盐 8.100 mmol 于圆底烧瓶中,加入二氯甲烷 60 mL,三乙胺 6 mL,加入预备溶液,搅拌,冰水浴中反应 30 min,后移至室温磁力搅拌 24 h,反应完全后,依次用 1% 的盐酸水溶液、水、饱和食盐水各洗 3 次,每次 50 mL,二氯甲烷液用无水硫酸钠脱水,回收溶剂,以石油醚-乙酸乙酯柱色谱,收集相同组分,回收溶剂,干燥,得到化合物 2 ~ 5。

化合物 2 白色粉末 1.500 g,产率 88.6%。mp 198 ~ 200 °C; $[M + H]^+$ 627.85; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ : 7.96(1H, $J = 5.7$ Hz, NH), 5.51(1H, br s, 12-CH), 5.37(1H, br s, 16-CH), 4.42 ~ 4.37(1H, br d, 3-CH), 3.95 ~ 3.77(1H, m, 1'''-CH₂), 3.66 ~ 3.63(1H, m, 1'''-CH₂), 3.59(3H, s, 3'''-CH₃), 2.94 ~ 2.90(2H, br s, 11-CH₂), 2.20 ~ 2.15(1H, br s, 18-CH), 2.05(3H, s, 2''-CH₃), 2.00(3H, s, 2'-CH₃), 1.85 ~ 1.30(14H), 1.21(3H, s, 29-CH₃), 1.18 ~ 0.99(4H), 0.94(3H, s, 23-CH₃), 0.90(6H, s, 27-CH₃, 30-CH₃), 0.81(6H, s, 24-CH₃, 26-CH₃), 0.66(3H, s, 25-CH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO) δ : 175.03(C-28), 170.18(C-1''), 170.04(C-1'), 169.37(C-2''),

142.11(C-13), 122.52(C-12), 79.87(C-3), 76.55(C-16), 54.64(C-5), 51.51(C-3'''), 46.54(C-17), 46.34(C-9), 45.95(C-19), 41.16(C-1'''), 40.59(C-14), 39.47(C-18), 38.77(C-15), 37.64(C-8), 37.24(C-1), 36.48(C-4), 34.89(C-10), 32.95(C-21), 32.42(C-22), 31.07(C-29), 30.84(C-7), 30.05(C-20), 27.75(C-23), 26.17(C-27), 24.15(C-2), 23.22(C-30), 22.82(C-11), 21.64(C-2'), 20.92(C-2'), 17.73(C-6), 16.60(C-26), 16.49(C-24), 15.17(C-25)。

化合物 3 白色固体粉末 1.200 g,产率 69.3%。mp 143 ~ 145 °C; $[M + H]^+$ 641.88; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ : 7.86 ~ 7.84(1H, m, CONH), 5.51(1H, br s, 12-CH), 5.36(1H, br s, 16-CH), 4.42 ~ 4.36(1H, br d, 3-CH), 4.15 ~ 4.11(1H, m, 1'''-CH), 3.57(3H, s, 3'''-CH₃), 2.96 ~ 2.93(2H, br s, 11-CH₂), 2.18 ~ 2.09(1H, 18-CH), 2.04(3H, s, 2''-CH₃), 2.00(3H, s, 2'-CH₃), 1.78 ~ 1.15(18H), 1.20(3H, s, 29-CH₃), 1.14 ~ 0.98(3H), 0.92(3H, s, 23-CH₃), 0.90(6H, s, 27-CH₃, 30-CH₃), 0.80(6H, s, 24-CH₃, 26-CH₃), 0.68(3H, s, 25-CH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO) δ : 174.16(C-28), 172.65(C-2'''), 170.08(C-1''), 169.37(C-1'), 142.08(C-13), 122.46(C-12), 79.81(C-3), 76.45(C-16), 54.59(C-5), 51.68(C-3'''), 48.39(C-1'''), 46.43(C-17), 46.24(C-9), 45.87(C-19), 40.59(C-

14), 39.02 (C-18), 38.66 (C-15), 37.60 (C-8), 37.21 (C-1), 36.45 (C-4), 34.86 (C-10), 33.00 (C-21), 32.46 (C-22), 31.03 (C-29), 30.56 (C-7), 30.04 (C-20), 27.72 (C-23), 26.13 (C-27), 24.19 (C-2), 23.20 (C-30), 22.78 (C-11), 21.66 (C-2''), 20.95 (C-2'), 17.70 (C-6), 16.63 (C-4'''), 16.58 (C-26), 16.55 (C-24), 15.19 (C-24)。

化合物 4 白色固体粉末 1.300 g, 产率 70.50%。mp 190 ~ 192 °C; [M + H]⁺ 683.96; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ: 7.81 ~ 7.78 (1H, m, CONH), 5.51 (1H, br s, 12-CH), 5.33 (1H, br s, 16-CH), 4.42 ~ 4.36 (1H, br d, 3-CH), 4.21 ~ 4.13 (1H, m, 1''-CH), 3.57 (3H, s, 3'''-CH₃), 3.00 ~ 2.97 (2H, br s, 11-CH₂), 2.17 ~ 2.08 (1H, br s, 18-CH), 2.05 (3H, s, 2''-CH₃), 2.00 (3H, s, 2'-CH₃), 1.78 ~ 1.15 (18H), 1.19 (3H, 29-CH₃), 1.15 ~ 0.98 (3H), 0.91 ~ 0.87 (12H, s, 6'''-CH₃, 7'''-CH₃, 23-CH₃, 27-CH₃), 0.81 ~ 0.80 (9H, s, 30-CH₃, 26-CH₃, 24-CH₃), 0.65 (3H, s, 25-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO) δ: 174.54 (C-28), 172.78 (C-2'''), 170.09 (C-1''), 169.34 (C-1'), 142.15 (C-13), 122.30 (C-12), 79.81 (C-3), 76.60 (C-16), 54.60 (C-5), 51.64 (C-3'''), 50.62 (C-1'''), 46.47 (C-17), 46.40 (C-9), 45.84 (C-19), 40.66 (C-14), 39.05 (C-18), 38.67 (C-15), 37.60 (C-8), 37.22 (C-1), 36.46 (C-4), 34.92 (C-10), 33.00 (C-21), 32.64 (C-22), 30.87 (C-29), 30.44 (C-7), 30.01 (C-20), 27.73 (C-23), 26.10 (C-27), 24.30 (C-5'''), 24.16 (C-2), 23.20 (C-30), 23.00 (C-4'''), 22.77 (C-11), 21.66 (C-2''), 20.95 (C-2'), 20.89 (C-6''', 7'''), 17.72 (C-6), 16.70 (C-26), 16.62 (C-24), 15.19 (C-25)。

化合物 5 白色固体粉末 1.200 g, 产率 67.85%。mp 172 ~ 174 °C; [M + H]⁺ 669.93; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ: 7.47 ~ 7.45 (1H, m, CONH), 5.55 (1H, br s, 12-CH), 5.42 (1H, br s, 16-CH), 4.42 ~ 4.36 (1H, br d, 3-CH), 3.59 (3H, s, 3'''-CH₃), 2.97 ~ 2.93 (2H, br s, 11-CH₂), 2.20 ~ 2.11 (1H, br s, 18-CH), 2.04 (3H, s, 2''-CH₃), 2.00 (3H, s, 2'-CH₃), 1.86 ~ 1.27 (17H), 1.20 (3H, s, 29-CH₃), 1.14 ~ 0.96 (3H), 0.93 (3H, s, 23-CH₃), 0.90 ~ 0.89 (6H, s, 5'''-CH₃, 6'''-CH₃), 0.87 ~ 0.82 (6H, s, 27-CH₃, 30-CH₃), 0.80 (6H, s, 26-CH₃, 24-CH₃), 0.62 (3H, s, 25-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO) δ: 174.67 (C-28), 171.68 (C-2'''), 170.08 (C-

1''), 169.32 (C-1'), 142.02 (C-13), 122.76 (C-12), 79.80 (C-3), 76.41 (C-16), 58.13 (C-1'''), 54.56 (C-5), 51.53 (C-3'''), 46.71 (C-17), 46.33 (C-9), 45.84 (C-19), 40.66 (C-14), 38.99 (C-18), 38.67 (C-15), 37.60 (C-8), 37.21 (C-1), 36.43 (C-4), 34.82 (C-10), 32.94 (C-21), 32.47 (C-22), 30.99 (C-29), 30.60 (C-7), 30.02 (C-20), 29.67 (C-4'''), 27.72 (C-23), 26.08 (C-27), 24.20 (C-2), 23.21 (C-30), 22.79 (C-11), 21.66 (C-5'''), 20.95 (C-6'''), 19.04 (C-2''), 18.88 (C-2'), 17.67 (C-6), 16.62 (C-26), 16.52 (C-24), 15.18 (C-25)。

2.1.3 化合物 6~9 的合成 分别称取化合物 2~5 各 1.000 mmol 分别置圆底烧瓶中, 加入甲醇 25 mL 使完全溶解, 加入 2.5 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 20 mL, 95 °C 加热回流 6 h, 反应完成后, 转移至烧杯中, 放置室温, 加水 200 mL, 用稀盐酸调 pH 5~6, 过滤, 收集滤饼, 干燥, 得到化合物 6~9。

化合物 6 白色固体粉末 0.502 g, 产率 94.90%。mp 224 ~ 226 °C; [M + H]⁺ 529.75; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ: 12.43 (1H, 28-COOH), 7.40 (1H, J = 5.4 Hz, NH), 5.30 (1H, br s, 12-CH), 4.74 (1H, 16-OH), 4.28 (2H, d, 3-OH, 16-CH), 3.75 ~ 3.68 (1H, s, 1'-CH₂), 3.57 ~ 3.49 (1H, s, 1'-CH₂), 2.99 ~ 2.98 (1H, br d, 3-CH), 2.87 ~ 2.83 (2H, br s, 11-CH₂), 2.29 ~ 2.20 (1H, br s, 18-CH), 1.88 ~ 1.35 (14H), 1.30 (3H, s, 29-CH₃), 1.24 ~ 0.95 (4H), 0.91 (3H, s, 23-CH₃), 0.90 (3H, s, 27-CH₃), 0.85 (3H, s, 30-CH₃), 0.84 (3H, s, 26-CH₃), 0.67 (3H, s, 24-CH₃), 0.65 (3H, s, 25-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO) δ: 176.56 (C-28), 171.25 (C-2'), 143.77 (C-13), 121.52 (C-12), 76.84 (C-3), 73.25 (C-16), 54.93 (C-5), 47.61 (C-17), 46.68 (C-9), 46.31 (C-19), 41.17 (C-1'), 41.08 (C-14), 39.02 (C-18), 38.74 (C-15), 38.39 (C-8), 38.24 (C-1), 36.56 (C-4), 35.02 (C-10), 34.52 (C-21), 32.78 (C-22), 32.55 (C-29), 30.48 (C-7), 30.05 (C-20), 28.22 (C-23), 27.00 (C-27), 26.55 (C-2), 24.81 (C-30), 22.89 (C-11), 18.00 (C-6), 16.61 (C-26), 16.01 (C-24), 15.30 (C-25)。

化合物 7 白色固体粉末 0.394 g, 产率 72.56%。mp 163 ~ 165 °C; [M + H]⁺ 543.78; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ: 12.63 (1H, COOH), 7.27 ~ 7.25 (1H, m, CONH), 5.31 (1H, br s, 12-CH), 4.74 (1H, d, 16-OH), 4.26 (2H, d, 16-CH, 3-

OH), 4.07 ~ 4.00 (1H, m, NHCH), 3.00 ~ 2.97 (1H, br d, 3-CH), 2.85 ~ 2.82 (2H, br s, 11-CH₂), 2.28 ~ 2.19 (1H, br s, 18-CH), 1.85 ~ 1.38 (14H), 1.29 (3H, s, 29-CH₃), 1.22 ~ 0.95 (7H), 0.89 (6H, s, 23-CH₃, 27-CH₃), 0.84 ~ 0.83 (6H, s, 30-CH₃, 26-CH₃), 0.67 (6H, s, 24-CH₃, 25-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO) δ: 175.92 (C-28), 174.04 (C-2'), 143.59 (C-13), 121.80 (C-12), 76.84 (C-3), 73.07 (C-16), 54.94 (C-5), 47.86 (C-1'), 47.73 (C-17), 46.56 (C-9), 46.34 (C-19), 41.21 (C-14), 39.16 (C-18), 38.77 (C-15), 38.41 (C-8), 38.28 (C-1), 36.56 (C-4), 34.94 (C-10), 34.61 (C-21), 32.77 (C-22), 32.63 (C-29), 30.22 (C-7), 30.02 (C-20), 28.23 (C-23), 27.03 (C-27), 26.54 (C-2), 24.89 (C-30), 22.90 (C-11), 17.99 (C-6), 17.50 (C-3'), 16.64 (C-26), 16.03 (C-24), 15.33 (C-25)。

化合物 8 白色固体粉末 0.540 g, 产率 92.30%。mp 215 ~ 217 °C; [M + H]⁺ 585.86; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ: 12.56 (1H, COOH), 7.27 ~ 7.24 (1H, m, CONH), 5.26 (1H, br s, 12-CH), 4.69 (1H, d, 16-OH), 4.28 (2H, d, 16-CH, 3-OH), 4.13-4.07 (1H, m, NHCH), 2.99 ~ 2.97 (1H, br d, 3-CH), 2.89 ~ 2.86 (2H, br s, 11-CH₂), 2.24 ~ 2.16 (1H, br s, 18-CH), 1.93 ~ 1.44 (16H), 1.29 (3H, s, 29-CH₃), 1.25 ~ 0.95 (5H), 0.89 ~ 0.85 (12H, s, 5'-CH₃, 6'-CH₃, 23-CH₃, 27-CH₃), 0.83 (3H, s, 30-CH₃), 0.81 ~ 0.79 (3H, s, 26-CH₃), 0.66 (6H, s, 24-CH₃, 25-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO) δ: 176.06 (C-28), 174.20 (C-2'), 143.74 (C-13), 121.37 (C-12), 76.80 (C-3), 73.08 (C-16), 54.94 (C-5), 50.53 (C-1'), 47.72 (C-17), 46.66 (C-9), 46.29 (C-19), 41.19 (C-14), 39.02 (C-18), 38.68 (C-15), 38.40 (C-8), 38.23 (C-1), 36.55 (C-4), 35.00 (C-10), 34.54 (C-21), 32.80 (C-22), 32.80 (C-29), 30.08 (C-7), 30.00 (C-20), 28.23 (C-23), 27.02 (C-27), 26.54 (C-2), 24.77 (C-30), 24.44 (C-3'), 23.03 (C-4'), 22.87 (C-11), 21.43 (C-5', 6'), 18.01 (C-6), 16.83 (C-26), 16.05 (C-24), 15.36 (C-25)。

化合物 9 白色固体粉末 0.520 g, 产率 93.36%。mp 199 ~ 201 °C; [M + H]⁺ 571.83; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ: 12.74 (1H, COOH), 7.06 ~ 7.03 (1H, m, CONH), 5.35 (1H, br s, 12-CH), 4.87 ~ 4.86 (1H, d, 16-OH), 4.31 ~ 4.30 (1H,

br s, 16-CH), 4.21 (1H, d, 3-OH), 4.09 ~ 4.05 (1H, d, 1'-CH), 2.99 ~ 2.96 (1H, br d, 3-CH), 2.91 ~ 2.87 (2H, br s, 11-CH₂), 2.21 ~ 2.12 (1H, br s, 18-CH), 2.09 ~ 2.00 (1H, d, 3'-CH), 1.88 ~ 1.35 (14H), 1.26 (3H, s, 29-CH₃), 1.20 ~ 0.98 (4H), 0.89 ~ 0.81 (18H, s, 4'-CH₃, 5'-CH₃, 23-CH₃, 27-CH₃, 30-CH₃, 26-CH₃), 0.69 (3H, s, 24-CH₃), 0.67 (3H, s, 25-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO) δ: 176.46 (C-28), 172.84 (C-2'), 143.08 (C-13), 122.02 (C-12), 76.76 (C-3), 72.66 (C-16), 54.92 (C-5), 56.96 (C-1'), 48.45 (C-17), 46.42 (C-9), 46.18 (C-19), 41.40 (C-14), 40.74 (C-18), 38.67 (C-15), 38.40 (C-8), 38.29 (C-1), 36.50 (C-4), 34.84 (C-10), 34.44 (C-21), 32.62 (C-22), 32.62 (C-29), 30.31 (C-7), 29.85 (C-20), 29.11 (C-3'), 28.21 (C-23), 27.02 (C-27), 26.58 (C-2), 25.37 (C-30), 22.86 (C-11), 18.94 (C-4', 5'), 18.02 (C-6), 16.83 (C-26), 16.06 (C-24), 15.45 (C-25)。

2.2 刺囊酸及其衍生物对脂肪酶的抑制活性实验^[16-19]

2.2.1 酶溶液的配制 准确称取脂肪酶 5 mg, 溶于 Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液 10 mL 中, 振荡, 充分溶解, 即得。

2.2.2 化合物溶液的配制 准确称取各化合物 10 mg, 溶于 100 mL DMSO 中, 振荡, 充分溶解。精密量取 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用 DMSO 定容至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.3 PNPB 溶液的配制 准确移取 PNPB 10 μL, 加乙睛 5 mL, 振荡, 充分溶解, 即得, 作为底物。

2.2.4 酶活性检测 准确移取脂肪酶溶液 100 μL, 化合物溶液 20 μL, 分别点入 96 孔板, 每个溶液设 3 个复孔 (化合物质量浓度分别为 0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 2.50, 5.00, 10.0 g·L⁻¹), 37 °C 下孵育 15 min, 立即加入 PNPB 溶液 20 μL。反应结束后, 用酶标仪进行检测, 检测波长为 400 nm, 每 3 min 测定 1 个点, 测定 15 min, 记录数据, 计算吸光度随时间的变化率 K。根据如下公式计算抑制率。每个反应重复 3 次。反应体系中以不加入酶溶液作为空白, 以不加入化合物溶液作为正常组。抑制率 = (K_{正常组} - K_{实验组}) / K_{正常组} × 100%。

各化合物对脂肪酶抑制活性依次为 6 > 7 > 9 > 8 > 奥利司他 > 2 > 3 > 5 > 4 > 1 > 刺囊酸, 半数抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 0.28, 0.34, 0.39, 0.46, 0.53, 2.05, 2.14, 3.24, 3.65, 7.03, 7.17 g·L⁻¹。所

合成的刺囊酸衍生物对脂肪酶的活性均大于刺囊酸,且化合物 5~9 的活性大于化合物 2~5,化合物 1 的活性最低,几乎接近于刺囊酸。结果见表 1。

表 1 EA 及其衍生物抑制脂肪酶活性

Table 1 Lipase inhibitory effect of EA and EA derivatives $g \cdot L^{-1}$

名称	IC ₅₀	名称	IC ₅₀
奥利司他	0.53	化合物 5	3.24
刺囊酸	7.17	化合物 6	0.28
化合物 1	7.03	化合物 7	0.34
化合物 2	2.05	化合物 8	0.46
化合物 3	2.14	化合物 9	0.39
化合物 4	3.65		

3 讨论

本文以从皂荚中提取、降解、分离得到的刺囊酸为先导化合物,首先通过乙酰化反应合成得到化合物 1,再与不同的氨基酸甲酯盐酸盐反应得到氨基酸酯类化合物,再将其经过水解反应得到氨基酸类化合物,共合成 9 个化合物,且本文中实验所得化合物均为首次获得。

采用 PNPB 法对各化合物进行抑制脂肪酶活性检测,结果表明,先导化合物刺囊酸及所合成的 9 个化合物均表现出良好的抑制脂肪酶活性。对所得活性结果进行进一步分析,并探讨其抑制脂肪酶活性与其结构之间的关系,先导化合物刺囊酸的 IC₅₀ 为 $7.17 g \cdot L^{-1}$,其具有一定抑制脂肪酶的活性作用,但效果欠佳,经过结构修饰后,当化合物 1 中 C-28 位引入含氮基团时,其活性增强,但随着引入的含氮基团链增长,其活性反而随之下降,化合物 2~5 对脂肪酶的 IC₅₀ 分别为 2.05, 2.14, 3.65, 3.24 $g \cdot L^{-1}$,故化合物 2 > 3 > 5 > 4。氨基酸甲酯类化合物经过水解反应去除 C-3 和 C-16 乙酰基, C-28 位中的酯基时,其对脂肪酶的抑制活性明显提高,化合物 6~9 对脂肪酶的 IC₅₀ 分别为 0.28, 0.34, 0.46, 0.39 $g \cdot L^{-1}$,表现出良好的抑制脂肪酶活性,而作为市场上最为成功的脂肪酶抑制剂奥利司他在相同实验条件下的 IC₅₀ 为 $0.53 g \cdot L^{-1}$,对脂肪酶的抑制能力为化合物 6 > 7 > 9 > 8 > 奥利司他。本文的研究结果可为刺囊酸衍生物的开发利用给予一定的帮助。

[参考文献]

[1] 韩昕男,武淑芬,黑黽哲,等. 不同来源脂肪酶抑制剂研究进展[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(3): 138-140.
[2] 李鑫鑫,王一棠,陈琛,等. 12 种植物粗多糖的体外抗肥胖及抗氧化活性研究[J]. 食品科技, 2018, 43(2): 222-227.

[3] ZHU Y T, REN X Y, YUAN L, et al. Fast identification of lipase inhibitors in oolong tea by using lipase functionalised Fe₃O₄ magnetic nanoparticles coupled with UPLC-MS/MS[J]. Food Chem, 2015, 173: 521-526.
[4] WU X L, HE W Y, ZHANG H P, et al. Acteoside: a lipase inhibitor from the Chinese tea *Ligustrum purpurascens* kudingcha [J]. Food Chem, 2014, 142: 306-310.
[5] HU B, CUI F, YIN F, et al. Caffeoylquinic acids competitively inhibit pancreatic lipase through binding to the catalytic triad [J]. Int J Biol Macromol, 2015, 80: 529-535.
[6] WANG M, GU D, LI H, et al. Rapid prediction and identification of lipase inhibitors in volatile oil from *Pinus massoniana* L. needles [J]. Phytochemistry, 2017, 141: 114-120.
[7] Patil M, Patil R, Bhadane B, et al. Pancreatic lipase inhibitory activity of phenolic inhibitor from endophytic *Diaporthe arengae* [J]. Bio Agricultural Biotechnol, 2017, 10: 234-238.
[8] Ogiyama T, Yamaguchi M, Kurikawa N, et al. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of a novel series of hormone sensitive lipase inhibitor [J]. Bioorg Med Chem, 2017, 25(17): 4817-4828.
[9] YU F, WANG Q, WANG H, et al. Synthesis and biological evaluation of echinocystic acid derivatives as HCV entry inhibitors [J]. Chin Chem Lett, 2016, 27(5): 711-713.
[10] YU F, PENG Y, WANG Q, et al. Development of bivalent oleanane-type triterpenes as potent HCV entry inhibitors [J]. Eur J Med Chem, 2014, 77(2): 258-268.
[11] WANG H, YU F, PENG Y, et al. Synthesis and biological evaluation of ring A and/or C expansion and opening echinocystic acid derivatives for anti-HCV entry inhibitors [J]. Eur J Med Chem, 2015, 102: 594-599.
[12] 南敏伦,赵昱玮,赫玉芳,等. 刺囊酸衍生物及其在制备抗肿瘤的 药物中的应用; 中国, CN105693812A [P]. 2016-06-20.
[13] WANG H, WANG Q, XIAO S L, et al. Elucidation of the pharmacophore of echinocystic acid, a new lead for blocking HCV entry [J]. Eur J Med Chem, 2013, 64(6): 160-168.
[14] 周德敏,王晗,叶敏,等. 刺囊酸衍生物及其生物转化方法和用途; 北京, CN102584930A [P]. 2012-07-18.
[15] FENG X, ZOU Z, FU S, et al. Microbial oxidation and glucosidation of echinocystic acid by *Nocardiacorallin* [J]. J Mol Catal B-Enzym, 2010, 66(1/2): 219-223.
[16] 周菲,胡荣,刘晨杰,等. 不同连翘叶炮制品抑制胰脂肪酶活性比较 [J]. 山西大学学报: 自然科学版, 2018, 41(2): 406-412.
[17] 张忠. 茶多酚对胰脂肪酶活性的抑制作用 [J]. 食品工业, 2013, 34(8): 168-170.
[18] 杨鹏,李艳琴. 荞麦黄酮和荞麦糖醇对胰脂肪酶的抑制作用 [J]. 食品科学, 2015, 36(11): 60-63.
[19] 顾君,孙怡. 侧柏叶不同提取部位抑制胰脂肪酶及抗氧化活性筛选 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(14): 141-144.

[责任编辑 顾雪竹]