

# 甘草次酸3位氨基酸衍生物的合成及其抑菌活性

王 军<sup>a\*,b</sup> 胡小丽<sup>b</sup> 文伟河<sup>b</sup> 杨雷雷<sup>b</sup> 朱玉亮<sup>b</sup>

(<sup>a</sup> 江苏警官学院公安科技系 南京 210012; <sup>b</sup> 南京工业大学生物与制药工程学院 南京 210009)

**摘 要** 以甘草次酸(**1**)为原料,将其11位羰基还原、30位羧基酯化得11-脱氧甘草次酸-30-乙酯(**3**)。再以四氢呋喃为溶剂,*N,N'*-二环己基碳二亚胺(DCC)/4-二甲氨基吡啶(DMAP)为偶合剂,选用Fmoc保护氨基酸对11-脱氧甘草次酸-30-乙酯的3位羟基进行酯化,得到11-脱氧甘草次酸-30-乙酯-3位氨基酸酯衍生物(**4a~4d**)。化合物**4a~4d**在 $V(\text{CHCl}_2):V(\text{Et}_2\text{NH})=1:1$ 溶液中脱去Fmoc保护基得到最终产物(**5a~5d**),产率80%~87%。化合物**5a~5d**用<sup>1</sup>H NMR、EI-MS进行了表征。活性实验结果表明,化合物**5a~5d**对在高浓度二甲基甲酰胺下生长的枯草芽孢杆菌、大肠杆菌和酵母菌具有保护作用。

**关键词** 甘草次酸, Fmoc保护氨基酸, 还原, 酯化, 脱保护

中图分类号: O629.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-0518(2012)08-0873-05

DOI: 10.3724/SP.J.1095.2012.00371

甘草次酸作为传统中药甘草的有效成分,具有抗过敏、抗炎、抗病毒、抗溃疡、抗增殖、抗氧化和治疗内分泌异常等功效<sup>[1-2]</sup>。但长期服用会引起人体甲醛固酮增多症。Shinbata等<sup>[3]</sup>研究表明,当甘草次酸11位羰基被还原后,上述副作用可消失。Glinskii等<sup>[4-5]</sup>发现,氨基酸和碳水化合物通过酯键或N-苷连接生成的衍生物能抑制癌细胞转移和细胞凋亡。Schwarz等<sup>[6]</sup>在甘草次酸3位引入氨基来增强其极性后,对16种人类常见的肿瘤细胞有不同程度的抑制和促进肿瘤细胞凋亡作用。甘草次酸氨基酸衍生物,一般以DCC/DMAP为偶合剂在 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 溶液中合成,但是该方法反应时间长、收率低<sup>[6-7]</sup>。本文以DCC/DMAP为偶合剂,在四氢呋喃溶液中将Fmoc保护的氨基酸引入到11-脱氧甘草次酸-30-乙酯分子中,得到了8种新型11-脱氧甘草次酸-30-乙酯-3位氨基酸类衍生物(见Scheme 1),初步研究了它们的抑菌活性。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂和仪器

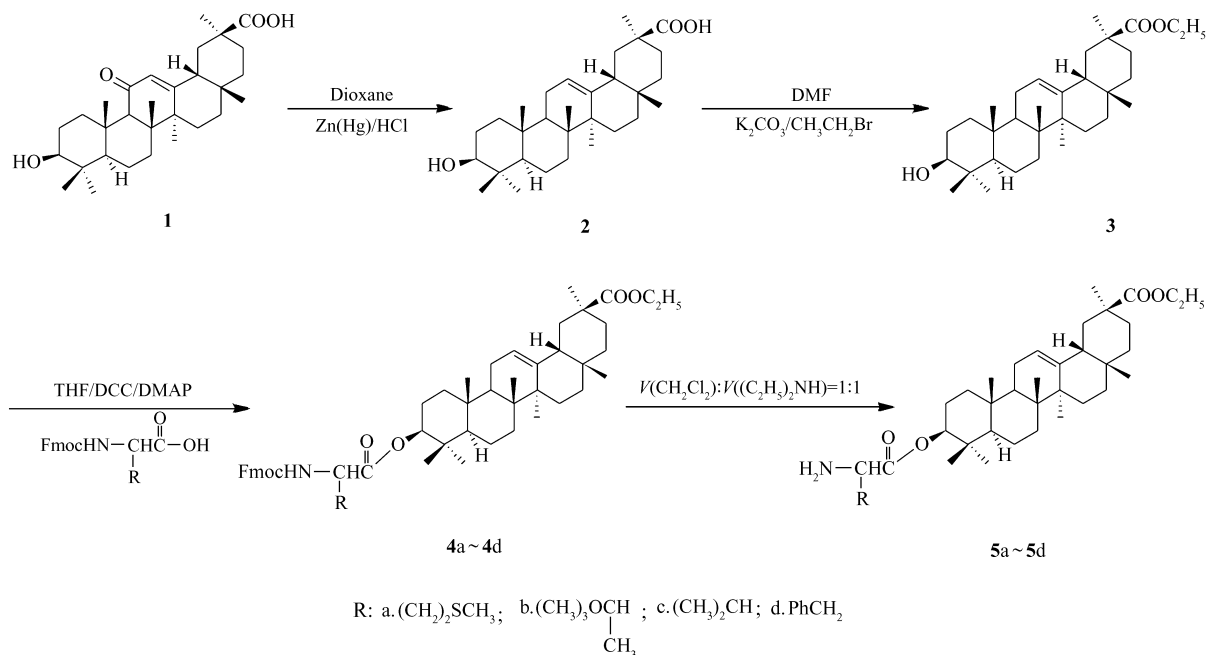
98%甘草次酸(南京泽朗医药科技有限公司); Fmoc-Met-OH(Fmoc保护甲硫氨酸), Fmoc-Thr(*t*Bu)-OH(Fmoc保护苏氨酸), Fmoc-Val-OH(Fmoc保护缬氨酸), Fmoc-Phe-OH(Fmoc保护苯丙氨酸)(上海吉尔生化公司); 11-脱氧甘草次酸,按文献[8]方法制备,其余试剂均为分析纯。Bruker DRX-500型核磁共振仪(瑞士Bruker公司), ZF5型手提式紫外分析仪(上海青浦滬西仪器厂), Finnigan MAT/USA型液质联用仪, Philips-505型扫描电子显微镜。

### 1.2 11-脱氧甘草次酸-30-乙酯(**3**)的制备

在单口圆底烧瓶中加入1.074 g(2.353 mmol) 11-脱氧甘草次酸(**2**)和24 mL DMF使完全溶解后,加入0.858 g(6.217 mmol)无水碳酸钾,搅拌下滴入溴乙烷约0.5 mL,室温下搅拌6 h。反应混合物用乙酸乙酯提取,提取液分别用水和饱和氯化钠溶液分别洗涤2~3次。取有机相加无水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥后,减压蒸馏除溶剂得浅黄色固体(**3**) 1.026 g,收率90%。

### 1.3 11-脱氧甘草次酸-30-乙酯-3-Fmoc保护氨基酸酯(**4a~4d**)衍生物的制备

11-脱氧甘草次酸-30-乙酯-3-Fmoc保护甲硫氨酸酯(**4a**)的制备: 将2.927 g(7.8 mmol) Fmoc-Met-



Scheme 1 Synthetic routes of the target products

OH 和 1.6 g  $N,N'$ -二环己基碳二亚胺 (DCC, 7.8 mmol) 溶于 40 mL 的 THF 溶液, 冰浴冷却搅拌 30 min, 加 1.897 g (3.9 mmol) 11-脱氧甘草次酸-30-乙酯和 120 mg 催化量的 4-二甲基氨基吡啶 (DMAP), 室温下继续搅拌反应, 用 TLC 检测至反应结束。过滤除去生成的  $N,N'$ -二环己基脲 (DCU), 滤液浓缩, 柱层析 ( $V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{石油醚}) = 1:6$ ) 纯化, 得到白色固体 (4a) 2.94 g, 收率 90%。 $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 7.257 ~ 7.772 (m, 8H, PhH), 5.402 ~ 5.417 (d, 1H,  $J = 7.5$  Hz, NH), 5.261 (t, 1H,  $J = 3.45$  Hz, H-12), 4.410 (m, 1H, NHCH), 4.228 (s, 1H, FmocCH), 4.170 (m, 2H, FmocCH<sub>2</sub>), 4.165 ~ 4.128 (m, 2H, COOH<sub>2</sub>), 4.114 (m, 1H, H-3), 2.504 (s, 2H, SCH<sub>2</sub>), 2.104 (m, 2H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 0.7801 ~ 1.648 (m, 24H, 8CH<sub>3</sub>); MS  $m/z$ : 838.4  $[M + 1]^+$ , 计算值: 838.5。

分别用 Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Val-OH 和 Fmoc-Phe-OH 代替 Fmoc-Met-OH, 按同样的方法分别合成化合物 4b ~ 4d。

化合物 4b, 收率 92%,  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 7.260 ~ 7.779 (m, 8H, PhH), 5.568 (m, 1H, NH), 5.262 (s, 1H, H-12), 4.508 ~ 4.541 (dd, 1H,  $J_1 = 4.65$  Hz,  $J_2 = 5.05$  Hz, NHCH), 4.413 ~ 4.449 (dd, 1H,  $J_1 = 7.85$  Hz,  $J_2 = 7.35$  Hz,  $(\text{CH}_3)_3\text{OCH}$ ), 4.349 ~ 4.384 (m, 1H, FmocCH), 4.242 ~ 4.261 (m, 3H, FmocCH<sub>2</sub>, H-3), 4.082 ~ 4.261 (m, 2H, COOCH<sub>2</sub>), 0.781 ~ 1.431 (m, 36H, 12CH<sub>3</sub>); MS  $m/z$ : 852.5  $[M + 1]^+$ , 计算值: 852.6。

化合物 4c, 收率 85%,  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 7.255 ~ 7.770 (m, 8H, PhH), 5.262 ~ 5.2836 (m, 2H, H-12, NH), 4.551 ~ 4.583 (t, 1H,  $J = 5.05$  Hz, NHCH), 4.384 ~ 4.410 (m, 2H, FmocCH<sub>2</sub>), 4.3109 ~ 4.3304 (dd, 1H,  $J_1 = 3.1$  Hz,  $J_2 = 3.5$  Hz, FmocCH), 4.178 ~ 4.248 (m, 2H, COOCH<sub>2</sub>), 4.091 ~ 4.164 (m, 1H, H-3), 2.231 (s, 1H,  $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ ), 0.780 ~ 1.358 (m, 27H, 9CH<sub>3</sub>); MS  $m/z$ : 806.3  $[M + 1]^+$ , 计算值: 806.5。

化合物 4d, 收率 91%,  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 7.169 ~ 7.761 (m, 13H, PhH), 5.260 (s, 1H, NH), 5.168 ~ 5.184 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz, H-12), 4.675 (m, 1H, NHCH), 4.534 ~ 4.547 (d, 1H,  $J = 6.75$  Hz, FmocCH), 4.369 ~ 4.404 (m, 2H, FmocCH<sub>2</sub>), 4.128 ~ 4.309 (t, 1H,  $J = 6.95$  Hz, COOH<sub>2</sub>), 4.092 ~ 4.114 (m, 1H, H-3), 3.066 ~ 3.2039 (m, 2H, PhCH<sub>2</sub>), 0.7785 ~ 1.428 (m, 21H, 7CH<sub>3</sub>); MS  $m/z$ : 854.3  $[M + 1]^+$ , 计算值: 854.5。

1.4 11-脱氧甘草次酸-30-乙酯-3-氨基酸酯衍生物脱 Fmoc 保护产物(5a~5d)的制备

11-脱氧甘草次酸-30-乙酯-3-甲硫氨酸(5a)的制备:在 50 mL 单口圆底烧瓶中加入 0.837 g (1 mmol)化合物 4a、20 mL  $V(\text{CH}_2\text{Cl}_2):V(\text{二乙胺})=1:1$  溶液,室温搅拌 30 min,TLC 检测( $V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{石油醚})=1:2$ )至反应结束,减压蒸去溶剂,得到淡黄色浆状物,柱层析( $V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{石油醚})=1:4$ )纯化,得到白色固体(5a),收率 85%。 $^1\text{H NMR}(500\text{ MHz},\text{CDCl}_3),\delta:5.26(\text{s},1\text{H},\text{H-12}),4.55\sim4.58(\text{t},1\text{H},J=7.25\text{ Hz},\text{H-3}),4.07\sim4.21(\text{m},2\text{H},\text{COOCH}_2),3.65\sim3.67(\text{dd},1\text{H},J_1=4.6\text{ Hz},J_2=4.6\text{ Hz},\text{NH}_2\text{CH}),2.11(\text{s},3\text{H},\text{SCH}_3),1.30(\text{s},3\text{H}),1.28(\text{s},3\text{H}),1.27(\text{s},3\text{H}),1.14(\text{s},3\text{H}),1.12(\text{s},3\text{H}),0.97(\text{s},3\text{H}),0.89(\text{s},3\text{H}),0.78(\text{s},3\text{H});\text{MS } m/z:616.2[\text{M}+1]^+, \text{计算值}:616.4。$

分别用化合物 4b~4d 代替化合物 4a,按同样方法制得化合物 5b~5d。

化合物 5b,收率 81.5%, $^1\text{H NMR}(300\text{ MHz},\text{CDCl}_3),\delta:5.26(\text{s},1\text{H},\text{H-12}),4.49\sim4.54(\text{dd},1\text{H},J_1=4.65\text{ Hz},J_2=5.01\text{ Hz},\text{H-3}),4.05\sim4.24(\text{m},2\text{H},\text{COOCH}_2),3.81\sim3.89(\text{d},1\text{H},J=4.38\text{ Hz},\text{CHNH}_2),3.26\sim3.27(\text{m},1\text{H},\text{OCH}),2.11(\text{s},3\text{H},\text{SCH}_3),1.30(\text{s},3\text{H}),1.28(\text{s},3\text{H}),1.26(\text{s},3\text{H}),1.23(\text{s},3\text{H}),1.21(\text{s},3\text{H}),1.18(\text{s},3\text{H}),1.13(\text{s},3\text{H}),1.12(\text{s},3\text{H}),0.96(\text{s},3\text{H}),0.93(\text{s},3\text{H}),0.90(\text{s},3\text{H}),0.78(\text{s},3\text{H});\text{MS } m/z:630.4[\text{M}+1]^+, \text{计算值}:630.5。$

化合物 5c,收率 82%, $^1\text{H NMR}(500\text{ MHz},\text{CDCl}_3),\delta:5.255\sim5.262(\text{d},1\text{H},J=3.3\text{ Hz},\text{H-12}),4.518\sim4.564(\text{m},1\text{H},\text{NH}_2\text{CH}),4.089\sim4.213(\text{m},2\text{H},\text{COOCH}_2),3.734\sim3.749(\text{d},1\text{H},J=7.3\text{ Hz},\text{H-3}),2.297\sim2.311(\text{m},1\text{H},(\text{CH}_3)_2\text{CH}),0.738\sim1.326(\text{m},27\text{H},9\text{CH}_3);\text{MS } m/z:584.3[\text{M}+1]^+, \text{计算值}:584.5。$

化合物 5d,收率 87%, $^1\text{H NMR}(500\text{ MHz},\text{CDCl}_3),\delta:8.769(\text{s},2\text{H},\text{NH}_2),7.172\sim7.348(\text{m},5\text{H},\text{PhH}),5.247\sim5.261(\text{t},1\text{H},J=3.45\text{ Hz},\text{H-12}),4.539\sim4.660(\text{m},1\text{H},\text{NH}_2\text{CH}),4.338(\text{s},1\text{H},\text{H-3}),4.117\sim4.338(\text{m},2\text{H},\text{COOCH}_2),3.363\sim3.470(\text{m},2\text{H},\text{PhCH}_2),0.726\sim1.3380(\text{m},21\text{H},7\text{CH}_3);\text{MS } m/z:632.3[\text{M}+1]^+, \text{计算值}:632.5。$

1.5 抑菌试验

化合物 5a~5d 用 DMF 溶解并加少量吐温 80 增溶乳化,分别配成 10、5、2.5、1.25 和 0.625 mmol/L 的样液。在培养皿中倒入 20 mL 培养基,待培养基冷却后,将 0.20 mL 菌液均匀涂布于培养基上,将灭菌的滤纸片沾同浓度的化合物 5a~5d,轻轻放置在培养皿的中间,同时设空白对照。大肠杆菌和枯草芽孢杆菌置于培养箱中 37 ℃ 培养 12 h,酵母菌于 35 ℃ 培养 48 h。测抑菌圈直径和 SEM 扫描照相。

2 结果与讨论

2.1 关于脱氧甘草次酸 3 位羟基的氨基酸酯化反应

Fmoc 保护的氨基酸广泛用于多肽合成,该保护基团在碱性和高温下容易脱去,第 3 步用 Fmoc 保护氨基酸的酯化反应中使用 THF 为溶剂,因为 THF 为中性且沸点低,有利反应顺利进行,反应收率可从用 DMF 为溶剂的 56% 提高到 87%、反应时间由 8 h 缩短至 2 h<sup>[6-7]</sup>,且反应也不需要严格无水条件。在后处理时能将缩合剂 DCC 所产生的二环己基脲(DCHU)滤掉,可使实验过程变简单。

2.2 目标化合物的抑菌活性

目标化合物对 3 种细菌的抑菌圈直径列于表 1。从表 1 可以看出,化合物 5a~5d 对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、酵母菌的抑菌圈直径比对照(DMF)组直径要小。说明化合物 5a~5d 均对 DMF 的抑菌有拮

表 1 5 种化合物对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和酵母菌抑菌圈直径(mm)  
Table 1 Inhibition circle diameters of 5 compounds to three bacteria

Compounds (2.5 mmol/L)	Inhibition circle diameter/mm		
	<i>E. col</i>	<i>Bacillus Subtilis</i>	<i>Yeast</i>
Control	10	10	10
5a	9±0.08	9±0.14	9±0.01
5b	9±0.04	9±0.02	9±0.16
5c	9±0.03	9±0.13	9±0.21
5d	9±0.11	9±0.06	9±0.05

抗作用。从化合物 **5d** 的抑菌圈内外酵母菌 SEM 照片(图 1)可以看出,抑菌圈内菌体形态正常,菌体数比抑菌圈外明显少,但抑菌圈内并没有出现絮状物,说明未出现细胞的凋溶。

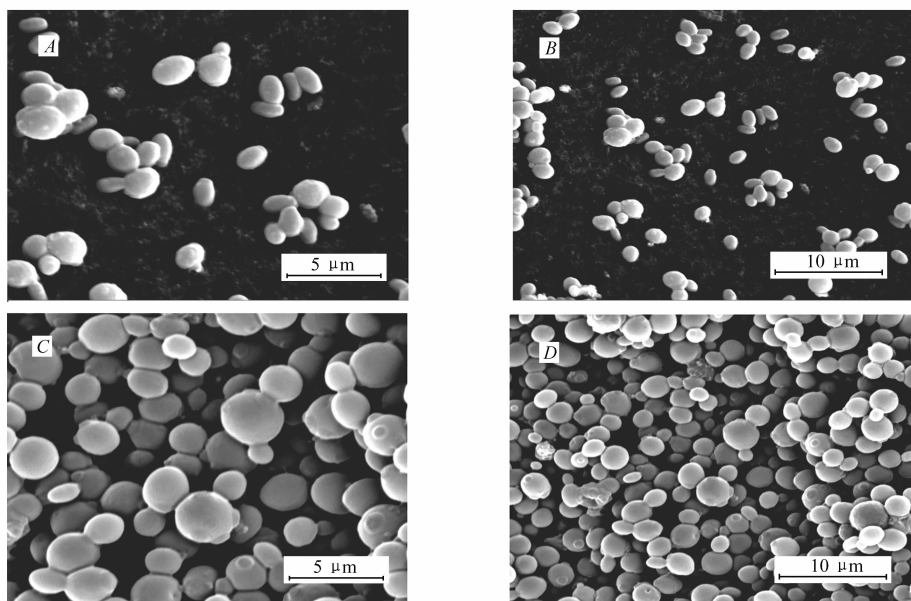


图 1 酵母菌的菌体形态的扫描电子显微镜

Fig. 1 SEM photographs of the morphology of Yeast  
A, B. in the antibacterial circle; C, D. out of antibacterial circle

由于化合物 **5a** ~ **5d** 水溶性不好,配制其抑菌溶液时选用 DMF 为溶剂,而溶剂空白对照的抑菌活性反而比各药物组强,倪学文等<sup>[9]</sup>已证明,当 DMF 浓度小于 1% 不影响细菌生长,而当 DMF 浓度大于 1% 时无细菌生长,由此可见,化合物 **5a** ~ **5d** 对在高浓度 DMF 下生长的大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和酵母菌具有一定的保护作用。

### 3 结 论

Fmoc 保护的氨基酸广泛用于多肽合成,该保护基团在碱性和高温下容易脱去,第 3 步用 Fmoc 保护氨基酸进行的酯化中使用 THF 作溶剂,不仅有利反应顺利进行,而且反应收率也由以前 56% 提高到 87%、反应时间由 8 h 缩短至 2 h。该反应也不需要严格的无水条件下进行。在后处理时能将缩合剂 DCC 所产生的二环己基脲(DCHU)除去,整个实验过程变简单。

对化合物(**5a** ~ **5d**)活性初步研究,表明化合物 **5a** ~ **5d** 对在高浓度 DMF 中生长的大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和酵母菌均有不同程度的保护作用,这为有机溶剂体系下的全细胞催化提供了一个可行性策略。

### 参 考 文 献

- [1] Finney R S H, Tarknoy A L. The Pharmacological Properties of Glycyrrhetic Acid Hydrogen Succinate (Disodium Salt) [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1960, **12**: 49-58.
- [2] Farina C, Pinza M, Pifferi G. Synthesis and Anti-ulcer Activity of New Derivatives of Glycyrrhetic Oleanic and Ursolic Acid [J]. *IL Farmaco*, 1998, **53**: 22-32.
- [3] Shinbata S, Takahashi K, Yano S, *et al.* Chemical Modification of Glycyrrhetic Acid in Relation to the Biological Activities [J]. *Chem Pharm Bull*, 1987, **35**(5): 1910-1918.
- [4] Glinskii G. Synthetic Glycoamines and Methods for Their Use that Affect Cell Adhesion, Inhibit Cancer Cell Metastasis, and Induce Apoptosis; US, 5864024 [P], 1999-01-26.
- [5] Glinskii G. Synthetic Glycoamines that Promote or Inhibit Cell Adhesion; US, 5629412 [P], 1997-05-13.
- [6] Schwarz S, Csuk R. Synthesis and Antitumour Activity of Glycyrrhetic Acid Derivatives [J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, (18): 7458-7474.

- [7] YANG Xiaohui, LIU Lijun, REN Binbin, *et al.* Synthesis and Anti-inflammatory Activity of 3-Esterified Derivatives of Glycyrrhetic Acid[J]. *West Chinese J Pharm Sci*, 2009, **24**(3):221-223 (in Chinese).  
杨晓辉, 刘利军, 任彬彬, 等. 甘草次酸 3-位酯类衍生物的合成及其抗炎活性的研究[J]. 华西药学杂志, 2009, **24**(3):221-223.
- [8] Yon J P, Wang J W, Aisa H A, *et al.* Synthesis of Glycyrrhetic Acid Derivatives[J]. *Chem Nat Compd*, 2008, **44**(2):194-196.
- [9] NI Xuwen, WU Moucheng. Study on Isolation, Identification and the Antibacterial Activity of Ginkgolic Acids[J]. *Food Sci Technol*, 2004, **25**(9):59-63 (in Chinese).  
倪学文, 吴谋成. 银杏酚酸的分离鉴定及其抗菌活性研究[J]. 食品科学, 2004, **25**(9):59-63.

## Synthesis and Activity of 3-Amino Acid Derivatives of Glycyrrhetic Acid

WANG Jun<sup>a\*,b</sup>, HU Xiaoli<sup>b</sup>, WEN Weihe<sup>b</sup>, YANG Leilei<sup>b</sup>, ZHU Yuliang<sup>b</sup>  
(<sup>a</sup>Department of Forensic Science, Jiangsu Police Institute, Nanjing 210012, China;  
<sup>b</sup>College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering,  
Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

**Abstract** In order to obtain more effective glycyrrhetic derivatives, 3-amino acid derivatives were synthesized from glycyrrhetic acid *via* deoxidation of the 11-carbonyl group, ethyl esterification of the 30-carboxylic group and esterification of 3-hydroxyl group using Fmoc-protected amino acids, which include methionine, threonine, valine and phenylalanine, by dicyclohexylcarbodiimide (DCC)/dimethylaminopyridine (DMAP) coupling method in tetrahydrofuran. The final products were obtained by removing Fmoc using  $V(CH_2Cl_2):V((C_2H_5)_2NH) = 1:1$  solvent mixture with 80% ~ 87% yields and characterized by <sup>1</sup>H NMR and MS. Preliminary pharmacological research showed that compounds **5a** ~ **5d** could protect the growth of *E. coli*, *Bacillus Subtilis* and *Yeast* against high level of *N,N*-dimethylformamide.

**Keywords** glycyrrhetic, Fmoc protected amino acids, deoxidation, esterification, deprotect