

# 多羟基甾醇的合成 (IV): 20-亚甲基-4-孕烯- $\beta$ , $\alpha$ -二醇的制备及其抗肿瘤活性研究\*

## Synthesis of Polyhydroxysterols(IV): The Synthesis of 20-methylene-4-pregnene- $\beta$ , $\alpha$ -diol, and the Investigation of Its Anticancer Activity

崔建国<sup>1</sup> 黄燕敏<sup>1</sup> 何小玉<sup>1</sup> 曾陇梅<sup>2</sup>  
Cui Jianguo<sup>1</sup> Huang Yanmin<sup>1</sup> He Xiaoyu<sup>1</sup> Zeng Longmei<sup>2</sup>

(1.广西师范学院化学系 南宁市明秀东路 530001; 2.中山大学化学与化学工程学院 广东广州 510275)

(1. Chemistry Department, Guangxi Teachers College, East Mingxiulu, Nanning, Guangxi, 530001, China;  
2. Coll. of Chemistry & Chemical Engi., Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong, 510275, China)

**摘要** 从孕烯醇酮(4)出发,经过6步反应合成新的多羟基甾醇化合物 20-亚甲基-4-孕烯- $\beta$ ,  $\alpha$ -二醇(3),总收率为 33.40%,并通过 IR<sup>1</sup>H NMR等谱图数据对化合物(3)的结构进行表征.用 0.005 mg/ml 化合物(3)和 0.05 mg/ml 的 4-孕烯- $\beta$ ,  $\alpha$ -二羟基-20酮(9),通过 MTT法对宫颈癌细胞(HELA)及白血病细胞(P-388)进行抗肿瘤细胞活性研究,结果表明,化合物(3)对 HELA和 P-388的生长均没有产生明显的细胞毒性.

**关键词** 甾醇 20-亚甲基-4-孕烯- $\beta$ ,  $\alpha$ -二醇 结构表征 抗肿瘤活性

中图分类号 O629.21

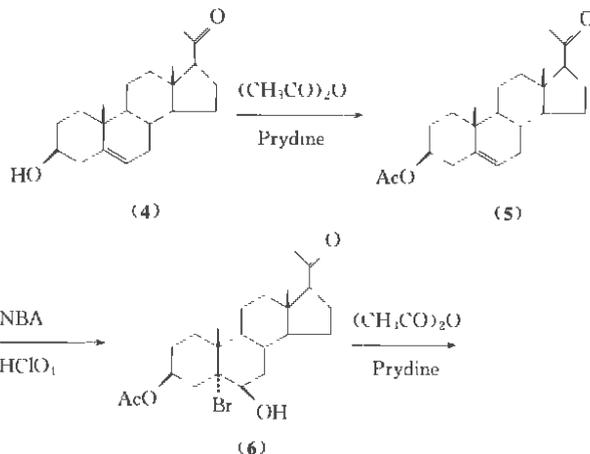
**Abstract** Using pregnenolone (4) as a starting material, 20-methylene-4-pregnene- $\beta$ ,  $\alpha$ -diol (3) was synthesized in 6 steps in an overall yield of 33.40%. The structure of (3) is determined by IR and <sup>1</sup>H NMR analysis. The study of cytotoxicity of 2 against cancer cells showed that 2 is inactive against the growth of human cervical carcinoma cells (HELA) and leukemia cells (P-388).

**Key words** sterols, 20-methylene-4-pregnene- $\beta$ ,  $\alpha$ -diol, structure elucidation, anticancer activity

近年来,从海洋生物中分离得到不少新的多羟基甾醇,并发现它们具有很好的生理活性<sup>[1-3]</sup>,例如,从南海软珊瑚中分离得到新的多羟基甾醇 24-亚甲基胆甾-4烯- $\beta$ ,  $\alpha$ -二醇(1)<sup>[4]</sup>具有明显的细胞毒性,它对鼠类白血病细胞的 IC<sub>50</sub>为 1 $\mu$ g/ml.为了进一步证实该化合物的结构和探索该化合物在细胞毒性方面的构效关系,我们设计合成了该化合物<sup>[5]</sup>及其差向异构体 24-亚甲基胆甾-4烯- $\beta$ ,  $\alpha$ -二醇(2)<sup>[6]</sup>, (1)的 6-羟基结构从  $\beta$  结构转变为  $\alpha$  结构后,其细胞毒性作用明显减弱.同时,我们还合成了一些不同的多羟基甾醇,发现它们的抗肿瘤活性与甾核及支链上双键的存在与否有着较大的关系,无论甾核上或者支链上的双键被饱和后,都会显著减低该化合物的抗肿瘤活性<sup>[7]</sup>.为了进一步对此类化合物的抗肿瘤活性构效关

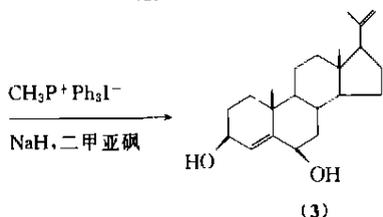
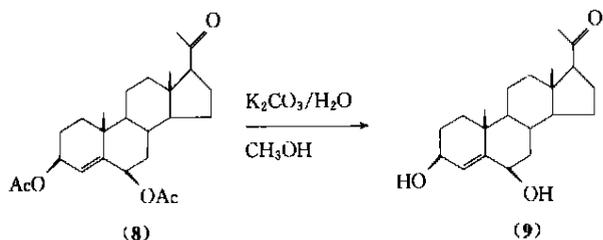
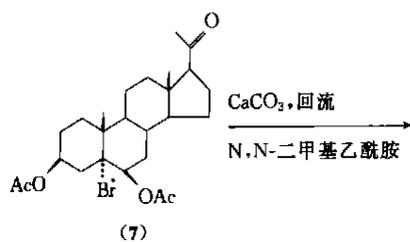
系进行研究,我们合成新化合物 20-亚甲基-4-孕烯- $\beta$ ,  $\alpha$ -二醇(3),并对其抗肿瘤活性进行了研究.

合成从孕烯醇酮(4)出发,经过6步反应合成了目标产物: 20-亚甲基-4-孕烯- $\beta$ ,  $\alpha$ -二醇(3).合成路线如下:



2003-10-16收稿.

\* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 29932030).



## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

合成所用试剂均为分析纯试剂,溶剂按常规方法进行处理,干燥。红外光谱测定采用美国 Nicolet 205 FT-IR 红外光谱仪和 Nicolet FT 360 红外光谱仪, KBr 压片;<sup>1</sup>H 核磁共振谱测定采用 Varian Unity INOVA 500 NB (500 MHz) 核磁共振仪, CDCl<sub>3</sub> 为溶剂, TMS 作内标;熔点测定采用 X<sub>4</sub> 显微熔点测定仪,温度计未经校正。

### 1.2 实验步骤

#### 1.2.1 β-乙酰氧基-5α-溴-6-羟基孕-20 酮 (6) 的制备

孕烯醇酮 (4) 0.52 g 溶解于 3 ml 吡啶中,加入乙酰基 1.86 ml,反应混合物在室温搅拌反应 40 h,停止反应,加进水 10 ml,用乙酸乙酯萃取 4 次 (10 ml × 4),合并萃取液,分别用 1N 稀盐酸洗 2 次,水洗 1 次,饱和 NaHCO<sub>3</sub> 洗 1 次,饱和食盐水洗至中性,无水硫酸钠干燥。过滤,减压蒸出溶剂,当有大量固体析出时,停止蒸馏,加热溶解所析出的固体,静置让其析出结晶。抽滤并干燥后得到白色片状晶体 β-乙酰氧基孕烯醇酮 (5) 0.53 g,产率 90%。m. p. 150~151°C。

180 mg β-乙酰氧基孕烯醇酮 (5) 溶于含有 0.01 ml HClO<sub>4</sub> 和 0.05 ml H<sub>2</sub>O 的 2 ml 二氧六环中,避光搅拌下分 4 次加入 N-溴代乙酰胺 (NBA) 0.20 g (1.5 mmol),每次加料间隔时间为 10 min。加料完毕,继续搅拌 90 min 停止反应,加入 5% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 使反应溶液变为无色。然后用二氯甲烷萃取 4 次,合并萃取液,分

别用水洗,饱和 NaHCO<sub>3</sub> 洗,水洗,饱和食盐水洗至中性,无水硫酸钠干燥。过滤,减压蒸出溶剂,残液加进适量混合溶剂 (乙醚:石油醚 = 1:1) 后,析出白色固体,此固体用丙酮:石油醚 (2:1) 进行重结晶,得到白色晶体 (6) 139 mg,产率 6%。m. p. 158~159°C; IR (KBr) ν: 3403, 2945, 1735, 1700, 1440, 1377, 1271, 1236, 1152, 1032, 983, 758, 589 cm<sup>-1</sup>。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ = 0.633 (s, 3H, 18-CH<sub>3</sub>), 1.326 (s, 3H, 19-CH<sub>3</sub>), 2.031 (s, 3H, C<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>CO), 2.124 (s, 3H, 21-CH<sub>3</sub>), 2.565 (t, 1H, J = 9.0 Hz, 17-CH), 4.188 (dd, 1H, J = 3.0 和 2.5 Hz, 6-CH), 5.473 (m, 1H, 3-CH)

#### 1.2.2 β,6-二乙酰氧基-5α-溴孕-20 酮 (7) 的制备

化合物 (6) 50 mg 溶于 1.0 ml 吡啶中,加进乙酸酐 0.30 g,室温下搅拌反应 40 h 停止反应,加进适量水,然后用乙酸乙酯萃取 4 次,合并萃取液,水洗,1N HCl 洗涤 1 次,水洗,饱和食盐水洗至中性,无水硫酸钠干燥。过滤,减压蒸出溶剂,得到的固体用少量的乙酸乙酯重新溶解,静置让其析出结晶。过滤晶体,石油醚洗涤,干燥后得到白色晶体 (7) 51 mg,产率 93%。m. p. 175~177°C; IR (KBr) ν: 2962, 1743, 1700, 1440, 1370, 1236, 1152, 1025, 983, 962, 744, 667, 589 cm<sup>-1</sup>。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ = 0.643 (s, 3H, 18-CH<sub>3</sub>), 1.292 (s, 3H, 19-CH<sub>3</sub>), 2.030 (s, 3H, C<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>CO), 2.093 (s, 3H, C<sub>6</sub>-CH<sub>3</sub>CO), 2.121 (s, 3H, 21-CH<sub>3</sub>), 2.559 (dd, 1H, J = 9.0 和 8.5 Hz, 17-CH), 5.335 (dd, 1H, J = 2.0 和 1.5 Hz, 6-CH), 5.456 (m, 1H, 3-CH)

#### 1.2.3 β,6-二乙酰氧基-4-孕烯-20 酮 (8) 的制备

碳酸钙 140 mg 悬浮于 3 ml N,N-二甲基乙酰胺 (DMA) 中,搅拌下加热至沸腾。然后在回流温度下 3 min 内滴加进 100 mg 化合物 (7) 溶解在 1.5 ml DMA 中的溶液,加完后,回流搅拌 30 min。再次加进碳酸钙 40 mg,继续回流反应 30 min 停止反应,冷至室温后,用适量 1N HCl 溶解碳酸钙,所得溶液用乙醚反复萃取 4 次。合并乙醚萃取液,水洗 2 次,饱和食盐水洗 1 次,无水硫酸钠干燥。过滤,减压蒸出溶剂,得到淡黄色固体约 0.1 g。硅胶柱层析分离 (流动相:石油醚:丙酮 = 7/1) 得到白色晶体 (8) 79 mg,产率 94%。m. p. 154~156°C; IR (KBr) ν: 2945, 1735, 1700, 1433, 1377, 1243, 1159, 1018, 934, 892, 702 cm<sup>-1</sup>。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ = 0.688 (s, 3H, 18-CH<sub>3</sub>), 1.173 (s, 3H, 19-CH<sub>3</sub>), 2.018 (s, 3H, C<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>CO), 2.047 (s, 3H, C<sub>6</sub>-CH<sub>3</sub>CO), 2.109 (s, 3H, 21-CH<sub>3</sub>), 2.510 (t, 1H, J = 9.0 Hz, 17-CH), 5.244 (ddd, 1H, J = 10.0, 6.5 和

2.0 Hz, 3-CH), 5.296(dd, 1H, J= 3.5和 2.5 Hz, 6-CH), 5.627(brs, 1H, 4-CH)

#### 1.2.4 4-孕烯- $\beta$ , $\delta$ -二羟基-20-酮(9)的制备

化合物(8) 50 mg, 溶解于 5 ml 甲醇中, 加进 1.5 ml 10% 的  $K_2CO_3$  溶液, 加热回流 1.5 h, 冷至室温。然后减压蒸出大部分甲醇, 加进 15 ml  $CH_2Cl_2$  溶解析出的固体, 二氯甲烷溶液水洗 1 次, 饱和食盐水洗 1 次, 无水硫酸钠干燥。过滤, 蒸出溶剂, 得到的固体用丙酮-甲醇(5:1)重结晶, 得到无色针状晶体(9) 35 mg, 产率 87%。m. p. 181-183°C; IR (KBr)  $\nu$ : 3296, 2934, 1697, 1636, 1435, 1362, 1298, 1188, 1104, 1022, 978, 920, 841, 694  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 500 MHz):  $\delta$ = 0.667(s, 3H, 18-CH<sub>3</sub>), 1.261(s, 3H, 19-CH<sub>3</sub>), 2.122(s, 3H, 21-CH<sub>3</sub>), 2.521(t, 1H, J= 9.0 Hz, 17-CH), 4.186(ddd, 1H, J= 9.0, 6.5和 1.0 Hz, 3-CH), 4.241(dd, 1H, J= 3.0和 2.5 Hz, 6-CH), 5.559(s, 1H, 4-CH).

#### 1.2.5 20-亚甲基-4-孕烯- $\beta$ , $\delta$ -二醇(3)的制备

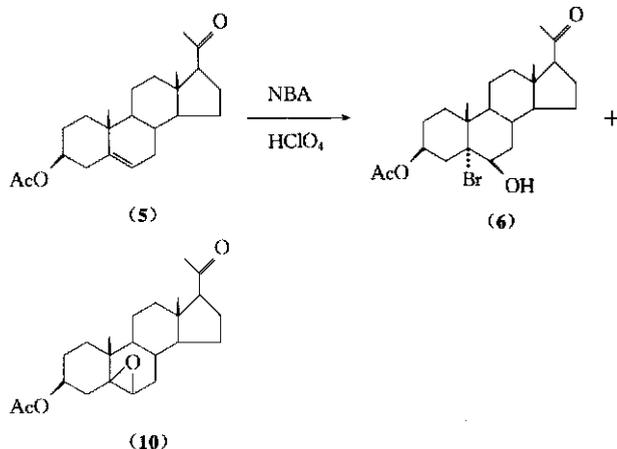
在充满 Ar 气的反应瓶中, 称取 NaH (80% 石蜡粉状固体) 80 mg, 接着用注射器注入 30~60°C 的石油醚洗涤 3 次, 真空抽干, 反复用 Ar 气置换 3 次, 在 Ar 气下加入无水二甲亚砜 5 ml, 升温至 80°C 搅拌反应 40 min, 得到黄绿色溶液。反应液降至室温, 加进溶于 2 ml 无水二甲亚砜中的甲基三苯基碘化磷 350 mg (0.88 mmol), 溶液变为棕黄色, 继续搅拌 5 min, 然后加进溶于 2 ml 无水二甲亚砜的化合物 930 mg (0.091 mmol), 升温到 80°C, 在 80~85°C 下继续搅拌反应。反应期间采用 TLC 控制反应进程 (展开剂: 石油醚/丙酮 = 3/1), 3.5 h 后, 反应结束。冷却至室温, 加进适量水, 混合物用乙醚萃取 5 次, 乙醚溶液水洗 2 次, 饱和食盐水洗 1 次至中性, 无水硫酸钠干燥。过滤, 减压蒸出溶剂, 得到淡黄色固体 60 mg。该固体用硅胶柱层析分离 (流动相: 石油醚 (bp 60~90°C)/丙酮 = 3/1), 得到无色针状晶体(3) 24 mg, 产率 80%。m. p. 203~204°C; IR (KBr)  $\nu$ : 3290, 1635, 1467, 1372, 1272, 1183, 1115, 1035, 1004, 884, 841, 722  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 500 MHz):  $\delta$ = 0.619(s, 3H, 18-CH<sub>3</sub>), 1.263(s, 3H, 19-CH<sub>3</sub>), 1.405(m, 2H, 2-H), 1.757(s, 3H, 21-CH<sub>3</sub>), 1.937(dd, 1H, J= 3.5 and 2.5 Hz, 17-CH), 4.186(ddd, 1H, J= 9.0, 6.5和 1.0 Hz, 3-CH), 4.238(dd, 1H, J= 3.5 and 2.5 Hz, 6-CH), 4.712(s, 1H, 22-CH), 4.855(s, 1H, 22-CH), 5.552(s, 1H, 4-CH).

## 2 结果与讨论

孕烯醇酮(4)的 3 位羟基通过乙酰化保护得到化

合物(5), 然后(5)在 NBA(N-溴代乙酰胺)和高氯酸存在的条件下生成化合物(6), 然后从(6)出发, 合成了目标产物, 总产率为 33.40%。

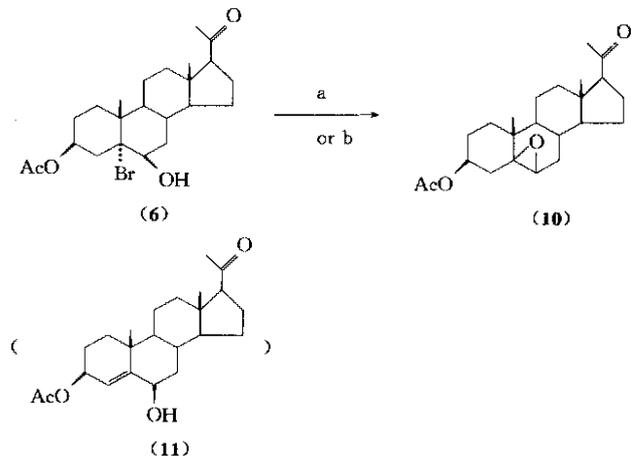
参考 Rodewald W. J 等<sup>[8]</sup>的方法, 从孕甾醇酮的乙酰化物(5), 得到 61% 产率的化合物(6)外, 还分离得到较为大量的化合物(10), 反应式为:



另外一些副产物并没有作进一步分离鉴别

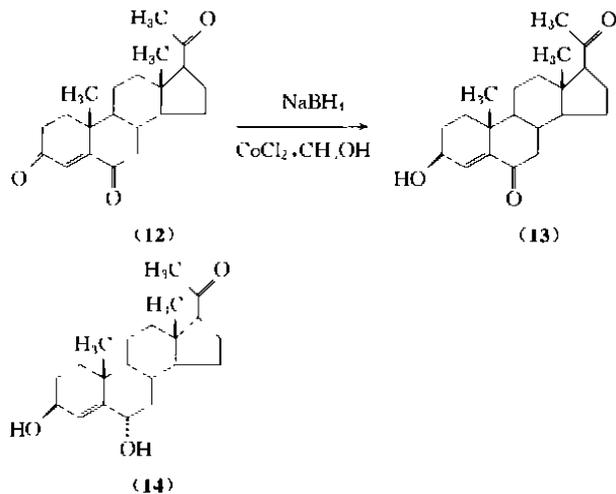
在对上述反应的研究中, 我们发现催化剂  $HClO_4$  的加入量大小对反应影响较大, 如果反应的酸性较大, 即  $HClO_4$  加入量较多, 将会有利于副产物生成。  $HClO_4$  加入量太少, 不利于产物生成。例如当(5)的反应量为 0.50 mmol 时, 在反应中加入 0.01 ml  $HClO_4$ , 0.05 ml 水, (6)的产率是 61%。但是, 同样的(5)加入量, 当加入 0.02 ml  $HClO_4$ , 0.05 ml 水时, (6)的产率仅 49%。

通过 HBr 的消除反应来生成烯烃的报道很多<sup>[9-10]</sup>。开始, 我们试图直接从(6)通过碱或酸的方法脱去 HBr 来制备化合物(11)。参考文献的方法<sup>[11-12]</sup>, 我们分别采用: a. 化合物 650 mg 冰乙酸 5 ml 浓盐酸 1D, 105°C 搅拌反应 30 min; b. 化合物 660 mg 吡啶 3 ml, 加热回流 9 h 的方法。但是, 没有得到预期产物(11), 得到的主要是由化合物(10)组成的混合物。



我们分析认为这是由于 C<sub>6</sub>-OH与 C<sub>5</sub>-Br刚好处于反式双竖键的位置,由于 C<sub>6</sub>-OH的邻基参予,它可促进 C<sub>5</sub>-Br的离去,进一步容易生成环氧化物。这一反应速度大大快于 Br与 C<sub>4</sub>-H的消除速度,所以得到的主要是由1组成的混合物。这样,要使 C<sub>5</sub>-Br与 C<sub>4</sub>-H发生消除反应,就必须先把(6)的 C<sub>6</sub>-OH保护起来。是先保护(6)的 C<sub>6</sub>-OH,然后在 N,N-二甲基乙酰胺中与碳酸钙一起回流,成功地得到了 87% 产率的化合物(8)。然后使(8)在碳酸钾溶液中水解生成化合物(9), (9)进一步与甲基三苯基碘化磷发生 Wittig反应,得到目标产物 20亚甲基-4孕烯- $\beta$ ,  $\beta$ -二醇(3)。

采用 0.005 mg/ml的化合物(3)和 0.05 mg/ml的化合物(9),利用 MTT法对宫颈癌细胞(HELA)及白血病细胞(P-388)进行抗肿瘤细胞活性研究,结果该化合物对 HELA和 P-388的生长并没有产生明显的抑制作用。通过化合物(1)和化合物(3)的结构对比分析可以看到,与化合物(1)比较,由于化合物(3)的甾体支链长度缩短,其结构发生了改变,虽然其支链结构上还保留着双键,但其抗肿瘤活性大大降低。另外,根据如下反应,我们合成了化合物(14)<sup>[13]</sup>。



(14)的抗肿瘤细胞活性研究表明,在 0.05 mg/ml浓度时,它对宫颈癌细胞及白血病细胞却具有明显的抑制作用。从化合物(9)与(14)的结构对比可知,两者的结构差异仅仅在于 6位羟基的不同,其中(9)为 $\beta$ -构型,而(14)为 $\alpha$ -构型,但是它们的抗肿瘤活性却出现了较大的差别。

由此可见,在此类多羟基甾醇化合物中,它们的抗肿瘤细胞活性不仅与甾核中官能团的结构有关,而且其支链的结构在抗肿瘤细胞活性中也起着非常重要的作用。

- 1 D'Ania M V, Minale L, Riccio R. Polyoxygenated steroids of marine origin. *Chem Rev*, 1993, 93: 1839.
- 2 崔建国,王屹,林翠梧,等.海洋生物中具有生理活性的多羟基甾醇. *天然产物研究与开发*, 2000, 12(6): 94.
- 3 韩莉娟,崔建国,黄初升.海洋生物中具有生物活性的多羟基甾醇及甾体皂甙. *有机化学*, 2003, 23(3): 305.
- 4 Zeng L M, Li X Q, Su J Y, et al. A new cytotoxic dihydroxy sterol from the soft coral. *Alcyonium patagonicum*. *J Nat Prod*, 1995, 58(2): 296.
- 5 Cui J G, Zeng L M, Su J Y. Synthesis of polyhydroxysterols (I): Synthesis of 24-methylenecholest-4-en- $\beta$ ,  $\beta$ -diol, a cytotoxic natural hydroxylated sterol. *Steroids*, 2001, 66(1): 33.
- 6 Cui J G, Lin C W, Zeng L M, et al. Synthesis of polyhydroxysterols (III): synthesis and structural elucidation of 24-methylenecholest-4-en- $\beta$ ,  $\beta$ -diol. *Steroids*, 2002, 67(13-14): 1015.
- 7 崔建国,曾陇梅,苏镜娱,等.多羟基甾醇的合成及抗肿瘤细胞活性构效关系研究. *高等学校化学学报*, 2000, 21(9): 1399.
- 8 Rodewald W J, Jaszczynski J R, Sicinski R R. Functionalized steroids. Part I. An improved synthesis of androst-5-ene- $\beta$ , 1 $\beta$ , 19-triol derivatives. *Polish J Chem*, 1978, 52: 501.
- 9 Green G F H, Long A G. Compounds related to the steroid hormones. part II. the action of hydrogen bromide on 2-Bromo-3-oxo-5 $\alpha$ -steroids. *J Chem Soc*, 1961, 2532.
- 10 Hewett C L, Gibson S G, Redpath J, et al. 18-Norandrosta-8, 11, 13-trienes. part III. 1-amino-derivatives. *J Chem Soc Perkin I*, 1974, 1432.
- 11 Akhtav M, Barton D H R. The ratio of the second diffusion current of oxygen at the dropping mercury electrode. *Diffusion Coefficient of Oxygen*. *J Am Chem Soc*, 1964, 86: 1275.
- 12 Heilbron I M, Jones E R H, Spring F S. Studies in the sterol group. Part XXXII. the bromination of 6-ketocholestanyl acetate. *J Chem Soc*, 1937, 801.
- 13 崔建国,曾陇梅,苏镜娱.多羟基甾醇的选择性还原反应研究. *高等学校化学学报*, 2003, 24(4): 639.

(责任编辑: 邓大玉)