

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

天然物 Ochrocarpin B 之全合成

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2113-M-038-004-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：臺北醫學大學生化學科

計畫主持人：林美香

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 10 月 31 日

計畫名稱中文：天然物 Ochrocarpin B 之全合成

計畫名稱英文：Total synthesis of Ochrocarpin B

計畫編號：NSC 93-2113-M-038-004

執行期限：93 年 8 月 1 日 至 94 年 7 月 31 日

主持人姓名：林美香 執行機關：台北醫學大學 醫學系 生化學科

e-mail address：mhl00001@tmu.edu.tw

一、中英文摘要

中文摘要

抗癌一直以來不論中外皆是日益受到重視之問題，而癌細胞抗藥性之日益增加亦使得新藥物要不斷的研發，從天然物中尋找有新的作用機轉及獨特化學結構的細胞毒性類似物是開發抗癌新藥的趨勢。一新具有抗癌活性之結構為 coumarin 類天然物頗為大家之重視，是一開發抗癌新藥的研究目標。

天然物 Ochrocarpin B 是由 *Ochrocarpos punctatus* H. Perrier (Clusiaceae) 之樹皮抽提出之新的 coumarins 對卵巢細胞 (A2780 ovarian cancer cell line) 具有細胞毒性，其 IC₅₀ 為 3.8 ± 0.3 μg/mL。其在植物體內之含量低 (0.06%)，又尚不知其抗癌之真正作用機轉，是一錯之新抗癌藥物之研究對象。

Ochrocarpin B 是一以 4-phenyl-furanocoumarin 為母核，第五位為羥基 (hydroxyl group)、第六位為 isovaleryl 基取代的新 furanocoumarin 類天然物。Ochrocarpin B 之合成可由化合物 **15** 與 ethylbenzoylacetate (**16**) 行 Pechmann 反應生成 coumarin 環再行碘化得到 **14**，**14** 再進行 acylation，最後再與 2-methyl-3-butyn-2-ol 行 coupling reaction 與 annulation 而得到。此合成流程只須 4 步驟是一快速、簡短之合成法。

此天然物至今仍未合成出來，但從其合成中有一重大發現為了解天然物之新化學。植物體自身可生成之有機物質不一

定可以人工合成法來合成製造之及分子上之官能基之反應性。

關鍵詞：細胞毒性、抗癌藥物、coumarin、Ochrocarpin B

英文摘要

The quests to search a new anticancer drugs develop are always active in scientific community. Various coumarin analogues are known to be potent cytotoxic against carcinoma cell. A new coumarin analogue, Ochrocarpin B was isolated from the bark of *Ochrocarpos punctatus* H. Perrier (Clusiaceae) and it is a cytotoxin against A2780 (ovarian cancer cells) with IC₅₀ value 3.8 ± 0.3 μg/mL. Since the detail cytotoxic mechanism was unknown, synthesized this natural product and their derivatives for structural activities relationship study will be a tool reveal the detail cytotoxic mechanism on the ovarian cancer cells.

The structure of Ochrocarpin B composed a core 4-phenylcoumarin moiety with full substituted on the phenyl group of coumarin. The total synthesis of Ochrocarpin B is in progress, we understand synthetic method cannot synthesize the natural product from the methods of the synthesis.

keywords: coumarin, Ochrocarpin B, cytotoxic,

二、緣由與目的

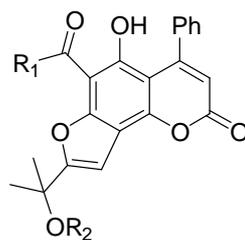
抗癌主題一直以來不論中外皆是日

益受到重視之問題，而癌細胞抗藥性之日益增加亦使得新藥物要不斷的研發，這其中包括天然藥物及合成藥物兩方面齊頭並進的進行著。從天然物中尋找有新的作用機轉及獨特化學結構的細胞毒性類似物是開發抗癌新藥的趨勢。天然物非常之多，已知具有抗癌活性之結構如吲哚生物鹼(indole alkaloids, vincristine)、喹啉生物鹼(quinoline alkaloids, camptothecin)等。一新具有抗癌活性之結構為 coumarin 類天然物頗為大家之重視，是一開發抗癌新藥的研究目標。

Coumarin 結構之天然物，廣泛分布在自物界中，其用途為香料、化妝品、光學發光劑 (optical brightening agents)、分散螢光劑 (dispersed fluorescent)、染料雷射劑 (tunable dye lasers)、生物活性有驅蟲、安眠、抗凝血、抗病毒(HIV, human immuno-deficiency virus)、抗發炎、肌肉鬆弛、抗癌(melanoma, renal cell carcinoma and prostate)等。最近，大家最感興趣的是其抗癌活性，因抗癌新藥的開發中，從天然物中尋找有新的作用機轉及獨特化學結構的細胞毒性類似物是今後癌症藥物開發的趨勢。已知天然物之衍生物具有抗癌作用且已臨床使用的有 taxol, etoposide, teniposide, vincristine, vinblastine, camptothecin 極其類似物。這些抗癌藥物皆有對抗特定癌細胞之專一性及抗藥性之產生，而造成抗藥性之可能性為減少藥物之吸收和攝取、加快藥物代謝、加快藥物在細胞內之排出、特殊蛋白之表現等。解決之道有許多方法，尋找一新結構且有新作用機轉之天然物不失為最佳選擇。

Ochrocarpin A-D 是新一類 coumarin 天然物，是由 *Ochrocarpos Punctatus* H. Perrier (Clusiaceae) 之樹皮抽提出之新的 coumarins 對卵巢細胞 (A2780 ovarian

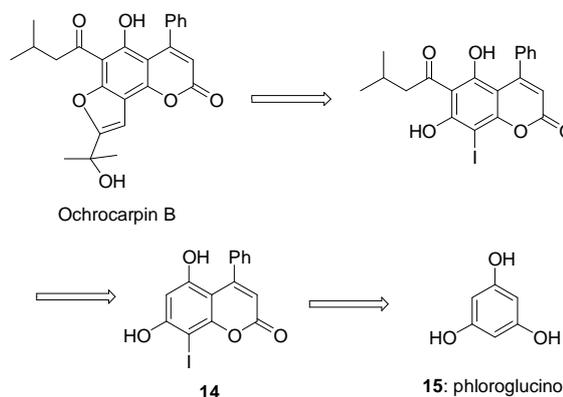
cancer cell line) 具有細胞毒性，其 IC_{50} 為 3.7 - 6.3 $\mu\text{g/mL}$ 。天然物 Ochrocarpin B 是一以 4-phenyl-furanocoumarin 為母核，第五位為羥基 (hydroxyl group)、第六位為 isovaleryl 基取代的新 furanocoumarin 類天然物。因其在植物體內之含量低(0.06%)，且具有效的細胞毒性 (IC_{50} 為 $3.8 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$)，又尚不知其抗癌之真正作用機轉，是一錯之新抗癌藥物之研究對象。



Ochrocarpin A: $R_1 = \text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$, $R_2 = \text{H}$
 Ochrocarpin B: $R_1 = \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $R_2 = \text{H}$
 Ochrocarpin C: $R_1 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $R_2 = \text{H}$
 Ochrocarpin D: $R_1 = \text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$, $R_2 = \text{CH}_3$

Ochrocarpin B 之合成，依據逆合成分析 (Scheme 1)，可由化合物 **14** 先進行 acylation 再與 2-methyl-3-butyn-2-ol (**13**) 行 coupling reaction 與 annulation 而得到，化合物 **14** 則可由 **15** 與 ethylbenzoylacetate (**16**) 行 Pechmann 反應生成 coumarin 環再行碘化反應得到。

Scheme 1



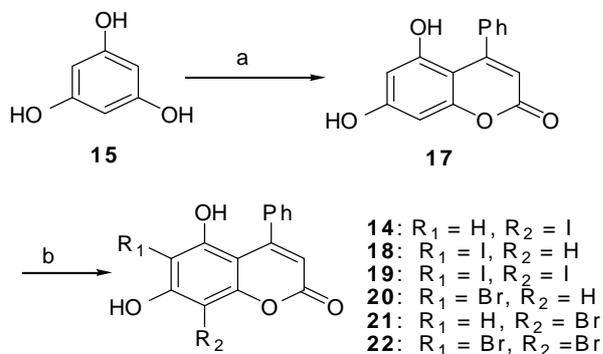
由此天然物之合成中會有兩大重大發現：一為了解天然物之新化學。植物體自身可生成之有機物質可否亦可以人工合成法來合成製造之及分子上之官能基

之反應性。二為清楚了解此天然物之物性及化性，以方便進一步之結構修飾。

三、結果與討論

起始物 **15** 與 **16** 在 trifluoroacetic acid 下反應得到 **17**，產率為 42%，接著進行碘化反應或溴化反應，希望得到 8-halocoumarin (**14** or **21**, Scheme 2)，嘗試條件有：1. ICl, CH₂Cl₂, rt, 得到 6-iodocoumarin (**18**): 8-iodocoumarin (**14**): 6,8-diiodocoumarin (**19**) = 1:1:3 (未加以純化, 比例由 NMR data 得知)。2. ICl, EtOH, 0 °C，結果同 1。3. I₂, EtOH, rt, 結果同 1。4. 依文獻方法可選擇在第 8 位置溴化之條件：KBr, H₂O₂, NH₄VO₃, HClO₄, solvent (CH₃CN : H₂O = 2:1)，得到 6-bromocoumarin (**20**): 8-bromocoumarin (**21**) = 1: 2 及大量 **17**。5. I₂, HgO, toluene, 沒有反應。6. HBr, DMSO, rt, 得到 6,8-dibromocoumarin (**22**)。

Scheme 2

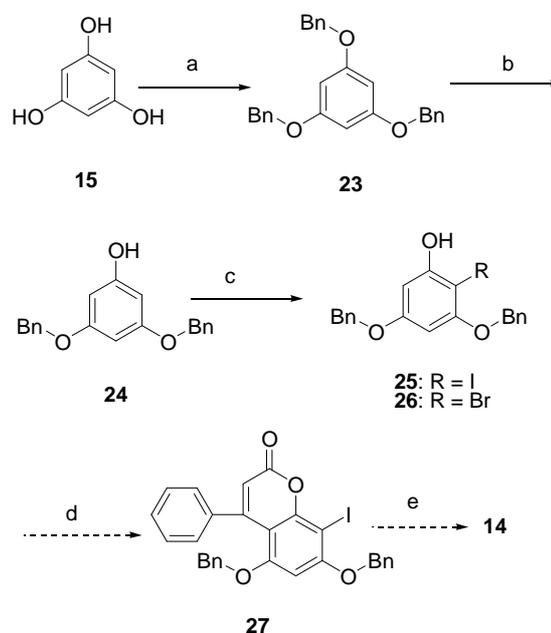


conditions: a. ethyl benzoylacetate, CF₃COOH, 42%; b. ICl, CH₂Cl₂, rt

由於上述方法無法得到選擇性產物 8-halocoumarin (**14**, **21**)，我們也嘗試把 5,7-dihydroxy 基保護起來，藉由 bulky 保護基以使 6 位不能進行鹵化反應。保護基用了 TMDMS (*tert*-butyldimethylsilyl) 及 isovaleryl，在 TMDMS 及 isovaleryl 保護下，試著碘化 (ICl, CH₂Cl₂, rt) 及溴化 (NBS, CCl₄, reflux; NBS, DMF, 100 °C) 皆無法進行鹵化反應。

又嘗試以 **15** 先進行 benzylation 把 triol 全部保護之後，再以 EtSNa 來切除其一之保護基，接著進行碘化反應得到 **25**，在此，因以 EtSNa 切除其一之保護基之產率低 (20%)，故以 3,5-dibenzyloxybenzyl alcohol 先與 NBS 進行 bromination，在與 PDC (pyridium dichromate) 進行氧化，接著 *m*CPBA 存在下行 Baeyer-Villiger 反應希望得到 **26**，但是在 Baeyer-Villiger 反應此步驟卻失敗。取少量 **25** 進行 coumarin 關環反應卻無法反應，故無法合成出 **14** (Scheme 3)。

Scheme 3



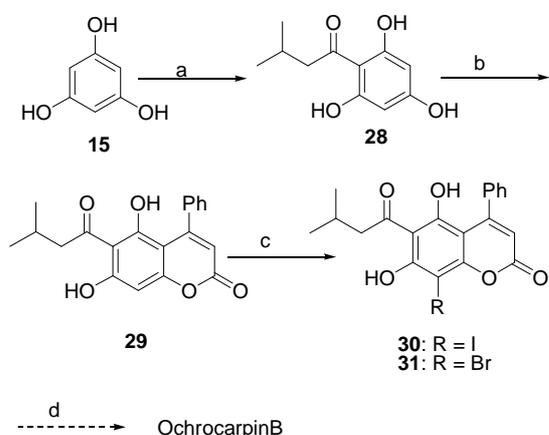
conditions: a. PhCH₂Br, K₂CO₃, DMF, rt, 48h; b. EtSH, NaH, DMF, 150 °C, 3h, 20%; c. ICl, CH₂Cl₂, rt, 0.5h; d. CF₃COOH, ethyl benzoylacetate, no reaction.

或許先在 **17** 之第六位置進行 acylation 後，鹵化在第 8 位置比較沒問題，試了兩個條件：1. isovaleryl chloride, acetone, 0 °C 得到 phenolic OH 之 ester 產物，2. isovaleryl chloride, AlCl₃, nitrobenzene, 60 °C 只得到起始物 **17**。由此結果我們得知 coumarin **17** 不容易在第 6 位置進行 acylation。

接著，更改合成路徑，基於

6-acylation 不易進行，所以，我們先以 **15** 進行 acylation 得到 **28**，**28** 再來進行 Pechmann condensation 順利合成 coumarin **29** (Scheme 4)。因接著要合成 furan ring，故 coumarin **29** 要先鹵化生成 **30** 或 **31**，**30** 或 **31** 在與 **13** 進行關環反應以合成 Ochrocarpin B，鹵化反應之碘化產物 **30** 易因 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 之 workup 或 column chromatography 而去碘化回到 coumarin **29**，而溴化產物 **31** 產率較低。furan ring 關環反應仍未成功。

Scheme 4

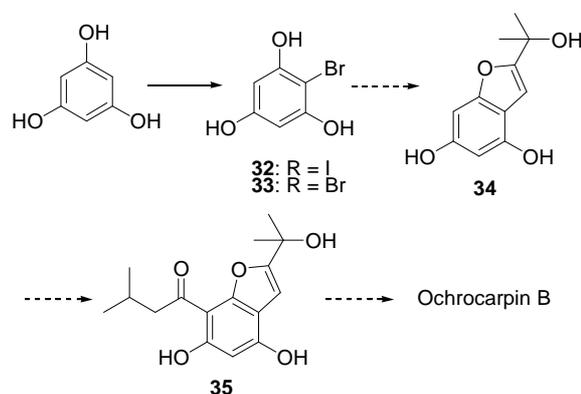


conditions: a. isovaleryl chloride, nitrobenzene, AlCl_3 , 60°C , 68%; b. ethyl benzoylacetate, conc. H_2SO_4 , glacial HOAc, 24%; c. ICl , CH_2Cl_2 , rt, 75%, or NBS, CCl_4 , reflux, 30%; d. 2-methyl-3-butyn-2-ol (**13**), Et_3N , $(\text{PPh}_3)_2\text{PdCl}_2$, CuI , DMF, 60°C .

既然 furan ring 之關環不能在最後一步進行，那麼改在合成之前幾步驟先合成之，是以 **15** 先進行 monohalogenation 試了以下條件 1. I_2 , THF/ H_2O , NaHCO_3 , 得到起始物 **15**、monoiodophloroglucinol (**32**) 及 diiodophloroglucinol。2. KBr , H_2O_2 , NH_4VO_3 , HClO_4 , solvent ($\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} = 2:1$)，得到大量起始物 **15** 及少量 monobromophloroglucinol (**33**)。3. NBS, CCl_4 , reflux，結果沒有反應只得到起始物 **15**。4. NBS, 180°C ，得到起始物 **15**、**33** 及 diiodophloroglucinol。5. HBr , DMSO, HOAc, rt, 得到 tribromophloroglucinol。雖

然未能選擇性地得到 monohalogenphloroglucinol (**32** or **33**)，我們仍以少量中間體 **33** 與 **13** 進行 furan ring 之關環反應，依舊沒有得到預期產物 **34** (Scheme 5)。

Scheme 5



四、計畫成果自評

歷經許多的努力及失敗經驗，截至目前為止，本實驗室尚未合成出 Ochrocarpin B，雖然本計畫執行時間已到期，我們仍不放棄再嘗試可能之合成法來合成此天然物，且經查詢文獻此天然物之全合成至今尚無人發表。在此合成中有一重大發現，是了解此天然物之新化學。植物體自身可生成之有機物質不一定可以人工合成法來合成製造之及此天然物分子上之官能基之反應性。

五、參考文獻

1. Chun-Mao Lin, Sheng-Tung Huang, Yu-Chin Liang, Mei-Shan Lin, Chwen-Ming Shih, Yuan-Ching Chang, and Chien-Tsu Chen. Isovitexin Suppresses Lipopolysaccharide-Mediated Inducible Nitric Oxide Synthase through Inhibition of NK-kappa B in Mouse Macrophages. *Planta Med.* 71, 1-6, 2005.