

咖啡酸苯乙酯的合成研究进展

卢定强^{1,2}, 蒋奔¹, 王俊¹, 赵辉¹, 凌岫泉¹, 刘骥¹

(1. 南京工业大学制药与生命科学学院, 江苏南京 210009; 2. 江苏省药物研究所, 江苏南京 210009)

摘要:咖啡酸苯乙酯是近年来新药研发的热点化合物,其抗肿瘤活性备受关注。介绍了不同底物合成咖啡酸苯乙酯的工艺路线及其催化机理,其中重点分析了绿原酸水解酶和脂肪酶对定向合成咖啡酸苯乙酯的生物催化特性和反应特征,并展望了咖啡酸苯乙酯合成方法的发展趋势及应用前景。

关键词:咖啡酸苯乙酯;提取;合成;生物催化;抗病毒活性

中图分类号:TQ463

文献标识码:A

文章编号:0253-4320(2009)04-0020-05

Research progress in synthesis of caffeic acid phenethyl ester

LU Ding-qiang^{1,2}, JIANG Ben¹, WANG Jun¹, ZHAO Hui¹, LING Xiu-quan¹, LIU Ji¹

(1. College of Life Science and Pharmacy, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China;

2. Jiangsu Provincial Institute of Materia Medica, Nanjing 210009, China)

Abstract: Caffeic acid phenethyl ester with anti-cancer activity has attracted considerable attention. Synthetic routes and its catalytic mechanisms of caffeic acid phenethyl ester from different substrates are reviewed. The bio-synthetic characteristics by chlorogenate hydrolase and lipase are mainly discussed, respectively. The development trends and prospects of synthetic methods related with caffeic acid phenethyl ester are looked forward to.

Key words: caffeic acid phenethyl ester; extraction; synthesis; biocatalysis; antiviral activity

咖啡酸苯乙酯(CAPE),化学名为 3-(3',4'-二羟基苯基)-2-丙烯酸苯乙醇酯。CAPE 是蜂胶中的主要有效成分,具有抗氧化^[1-2]、抗病毒^[3]、抑制 DNA^[4]、诱导细胞凋亡、抗菌、消炎、抗动脉硬化及提高免疫力等^[5-11]多种药理活性,其中抗肿瘤活性最为显著,备受关注,是目前新药研发的热点化合物。

药理研究表明,CAPE 抗肿瘤的作用机制主要有:①影响肿瘤及受病毒转染细胞的氧化还原状态使其失去调节能力^[12],而发挥细胞毒性作用;②诱导肿瘤细胞凋亡,如 CAPE 通过激活 caspase3 实现下调 Bcl-2 和上调 Bax 来诱导 HL-60 细胞凋亡^[13],CAPE 还可导致 C6 神经胶质瘤细胞 DNA 断裂、亚二倍体细胞数增加、激活 CPP32 使 p53、Bax、Bak 表达增强来诱导神经胶质瘤细胞凋亡^[14];③调节免疫功能,如 CAPE 通过调节人黑素瘤细胞 HO-1 和胶质瘤细胞 GBM-18 表面抗原的表达,与瑞香素联合使用,增强抑瘤效果^[15]。

随着 CAPE 药理活性研究的深入,其新药研发正在紧锣密鼓地开展之中,然而目前原料药的规模

化制备是其产业化的根本瓶颈,因此规模化制备 CAPE 一直是个研究热点和难点。本文从提取法、化学合成法及生物合成法 3 个方面综述了 CAPE 合成的国内外研究进展,分析了不同底物合成 CAPE 的工艺路线及其催化机理,其中重点分析了绿原酸水解酶和脂肪酶对定向合成 CAPE 的生物催化特性和反应特征,并展望了 CAPE 合成方法的发展趋势及应用前景。

1 天然来源及提取方法

CAPE 的主要天然来源是蜂胶^[16]和红景天(*Rhodiola sacra*)^[17]等天然植物。根据原料的产地和品种不同,CAPE 的含量也不尽相同,以蜂胶为例,中国、欧洲、阿根廷等国家的蜂胶中 CAPE 含量较高^[18]。

从蜂胶中提取 CAPE 主要采用甲醇提取法。原料用甲醇浸提 3 次,每次 8~10 天,浸提液过滤后冷冻保存。将甲醇浸提物溶于水中,分别用等量的己烷、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇分级萃取,正丁醇相减压蒸馏浓缩后冷冻干燥保存 CAPE 组分。浓缩物经

收稿日期:2008-12-31

基金项目:国家自然科学基金资助项目(20876076)

作者简介:卢定强(1968-),男,博士,教授,硕士生导师,主要从事生物化工研究,通讯联系人,025-83285202, ludingqiang@njut.edu.cn。

高速逆流色谱制备获 CAPE 纯品^[19]。200 g 天然样品中可分离得到 CAPE 800 mg^[19-20]。

类似地,可以从红景天(*Rhodiola sacra*)中提取 CAPE,110 g 样品中可分离得到 CAPE 65 mg^[17]。

提取法制备 CAPE 的方法操作简单,原料来源纯天然,且提取过程对环境友好。然而,不同来源和品种的天然原料含量差异明显,且难以大规模获得;提取工艺步骤多、耗时长,结构类似的杂质难以去除,必须采用制备色谱等低成本纯化手段才能保证产品纯度。因此,提取法在当前制备 CAPE 不失为一种可行方法,但要实现工业化生产还要在规模化制备等关键分离技术方面进一步完善。

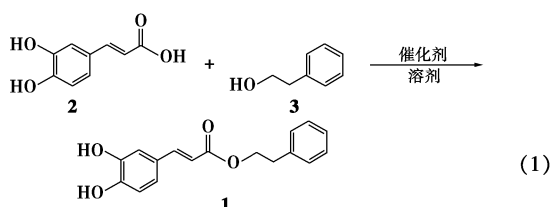
2 化学合成法

自从 1988 年,Grünberger 等^[21]报道了从蜂胶中提取 CAPE 以来,其合成方法特别是化学合成法开始受到广泛关注。根据以往文献,归纳了从不同底物的角度出发合成 CAPE 的工艺路线及其催化机理。

2.1 以咖啡酸作为底物合成 CAPE

2.1.1 催化剂直接催化咖啡酸(2)和苯乙醇(3)生成 CAPE(1)

咖啡酸和苯乙醇直接被催化酯化合成 CAPE 的方法报道^[22-24]较多,但反应过程本质相同,反应通式见式(1)。催化剂的选择对合成 CAPE 至关重要,主要有以下 3 种情况:①咖啡酸、SOCl₂、苯乙醇在硝基苯中等摩尔混合,加热 2 h,用乙醚/正己烷过柱分离制得 CAPE,收率 60%^[25];②对甲苯磺酸作为催化剂、苯作为脱水剂,咖啡酸和苯乙醇加热回流反应 3~4 d,色谱分离制得 CAPE,收率为 40%^[25-27];③将咖啡酸、二环乙基碳二亚胺(DCC)、二甲基氨基吡啶(DMAP)加入 THF/CH₂Cl₂(体积比 1:1)混合液中,室温下搅拌,缓慢滴加苯乙醇。用 TLC 跟踪反应,用乙醚/正己烷过柱得纯品,收率为 46%^[25,27]。



直接催化咖啡酸和苯乙醇合成 CAPE 过程中,催化剂的选择对反应的转化率影响较大,其中传统的无机酸催化酯化反应的转化率较低,而 SOCl₂ 作为催化剂的转化率较高。

2.1.2 酰氯法

咖啡酸与过量的 SOCl₂ 在回流温度下反应约

1 h 后减压蒸馏除去未反应的 SOCl₂,得固态中间体酰氯。在室温下滴加苯乙醇、吡啶和硝基苯混合液反应 1 h。用 CH₂Cl₂/正己烷过柱得纯品,收率 50%~86%^[28-30]。

2.1.3 咖啡酸和 β-苯基溴乙烷反应

咖啡酸和碳酸氢钾溶于二钾亚矾,搅拌加入 β-苯基溴乙烷,加热至 70℃。混合搅拌反应 3 h,冷却至 25℃ 以下。边搅拌边加水产生沉淀,过滤得沉淀物粗品。用碳酸氢钾稀溶液和甲苯洗涤,然后用热甲苯冷却结晶得纯品。10 g 咖啡酸可以反应得到 9 g 纯度为 99% 的 CAPE^[31]。

咖啡酸和 β-苯基溴乙烷还可以在其他多种溶剂和催化剂体系下反应生成 CAPE,各种体系转化率不同,反应时间也不同。例如,将二甲基甲酰胺和质量分数为 25% 的 NaOH 作为溶剂和催化剂,50 h 内转化率为 30%^[31]。

2.2 以 3,4-二羟基苯甲醛为底物合成 CAPE

2.2.1 Wittig 反应

将三苯基磷乙酸苯乙醇酯基氯化物和 3,4-二羟基苯甲醛溶于 CHCl₃ 和 1,4-二氧六环的混合液中,搅拌加入 K₂CO₃,超声,TLC 跟踪反应。反应液减压蒸馏,用正己烷/醋酸乙酯过柱得纯品,收率 71%^[22,24,32-33]。

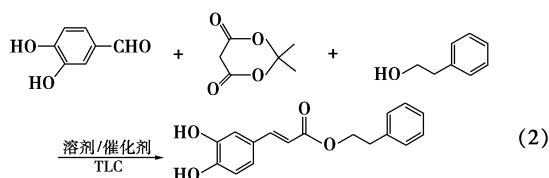
3,4-二羟基苯甲醛还可以和磷酸酯在碱催化下反应生成 CAPE^[22,24,33-34]。

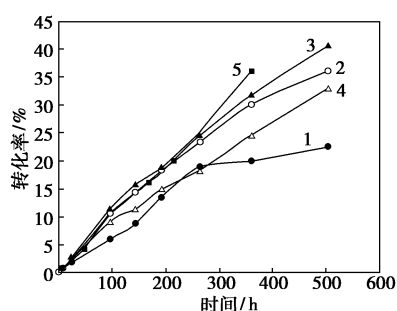
2.2.2 丙二酸单酯法

以甲苯作为溶剂,高效催化剂 DPAT 催化丙二酸和醇酯化生成丙二酸二酯,它与 KOH 等摩尔反应生成丙二酸单酯单钾盐,其经酸化得到的丙二酸单酯与 3,4-二羟基苯甲醛经 Knoevenagel-Doebner 缩合制得 CAPE^[24,35-38]。

2.2.3 一锅法^[24,35]

以甲苯作为溶剂,丙二酸亚异丙酯和苯乙醇反应一段时间后加入 3,4-二羟基苯甲醛和吡啶,搅拌至溶解后加入哌啶。TLC 跟踪反应,反应结束后减压蒸馏除去溶剂。残液冷却后加入乙醚,搅拌至溶解,用稀盐酸和水洗涤,收集乙醚层,乙醚层用无水 MgSO₄ 干燥过夜,过滤后蒸干乙醚,用甲苯重结晶得到纯品,收率 68.9%。反应过程见式(2)^[24]。





1—0 mg; 2—50 mg; 3—100 mg; 4—200 mg; 5—400 mg

图2 分子筛用量对酯化反应转化率的影响^[41]

在非极性溶剂中还是比在极性溶剂中高很多。反应温度为 70℃ 时,咖啡酸具有很高的溶解性,同时转化率也得到提高。咖啡酸和苯乙醇的最适摩尔比为 1:92,苯乙醇含量的升高会引起酶的失活。咖啡酸和酶的最适摩尔比为 1:15,此时 48 h 内酯化反应的转化率为 100%,反应不需要搅拌,50r/min 已经足够让底物得到混合。反应在不搅拌的情况下,可以使酶具有更好的批量稳定性,然而转化率却通常低于 90%。

笔者所在课题组在前人研究基础上,以咖啡酸和苯乙醇为底物,叔丁醇为溶剂,以自制酶制剂为催化剂,反应 200 h 即获得了 23.4% 的 CAPE 转化率。此外,还设计了新型生物反应器,通过反应分离耦合装置解决了生物催化体系中的底物抑制问题,实现了反应和分离的连续进行,取得了较好的转化效果。

生物酶法合成 CAPE 具有条件温和、操作简单、成本低、转化率高和对环境危害小等优点,但咖啡酸和苯乙醇的反应最适摩尔比低,溶剂消耗大,工业化效率低。采用成熟的化工设计和反应分离耦合关键技术是今后规模化制备 CAPE、解决酶催化合成 CAPE 存在问题的重要研究方向。

4 展望

随着对咖啡酸苯乙酯药理活性研究的越来越深入,其作为一种新型的抗癌、抗病毒药物的前景越来越受到科研工作者的重视。对于咖啡酸苯乙酯的制备的研究也成为了一个新的热点。从天然来源中提取 CAPE 具有操作简单、低污染等其他方法无法比拟的优点,但是它同样存在耗时长、效率低的缺点,这就决定了利用提取法无法进行大规模、工业化的制备 CAPE。化学合成法虽然具有高能耗、对环境污染比较大等缺点,但是这都不妨碍它成为 CAPE 产业化发展最有竞争力的方法。研究人员可以从化学工程的角度,通过对化学合成过程的研究,认识其规

律性,并使之应用于工业化的生产过程和装置的开发、设计、操作,以达到优化和提高合成效率的目的。

生物合成法作为一种合成 CAPE 的新方法,其研究才刚刚起步。在大量的前期研究基础上,笔者认为可以从 3 个层次来提高其效率:①催化剂的选择和制备是提高转化率的重要手段,可以采用产酶菌株的筛选、产酶工程菌的构建及定向进化等改造手段获得优质的酶;②生物反应动力学规律是规模化放大的重要依据,可以从生物反应工程的角度,研究酶催化反应的动力学特征并依据化工软件建立数学模型,为工程化放大提供基础数据;③新型生物反应器的设计及反应分离耦合过程的系统优化是解决其工程化问题的根本手段,在研究动力学基础上总结生物转化体系中的因素影响规律,并在此基础上设计基于反应与分离耦合过程的新型生物反应器,进行工程化和连续化的操作来最大化地提高 CAPE 的产率。通过生物转化效率的提高,CAPE 新药研发及其产业化发展必将具有强劲的竞争力。

参考文献

- [1] Chen M, Wu C, Chen Y, *et al.* Cell killing and radiosensitization by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in lung cancer cells[J]. *J Radiat Res*, 2004, 45(2): 253 - 260.
- [2] Altug M E, Serarslan Y, Bal R, *et al.* Caffeic acid phenethyl ester protects rabbit brains against permanent focal ischemia by antioxidant action: A biochemical and planimetric study[J]. *Brain Res*, 2008, 1201: 135 - 142.
- [3] Frenkel K, Wei H, Bhimani R, *et al.* Inhibition of tumor promoter-mediated processes in mouse skin and bovine lens by caffeic acid phenethyl ester[J]. *Cancer Res*, 1993, 53(6): 1255 - 1261.
- [4] Chen J, Shao Y, Huang M, *et al.* Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on human leukemia HL-60 cells[J]. *Cancer Lett (Shannon Irel)*, 1996, 108(2): 211 - 214.
- [5] C V, M N, A A, *et al.* Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis[J]. *J Appl Microbiol*, 2007, 103(5): 1747 - 1756.
- [6] Wille J J. Prophylactic and therapeutic treatment of topical and transdermal drug-induced skin reactions: US, 2005 - 83178[P]. 2007 - 02 - 22.
- [7] Wu W, Lu L, Long Y, *et al.* Free radical scavenging and antioxidative activities of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and its related compounds in solution and membranes: A structure-activity insight[J]. *Food Chem*, 2007, 105(1): 107 - 115.
- [8] Zhu B T. Method and composition for the treatment of Parkinson's disease: WO, 2007-US854[P]. 2007 - 07 - 26.
- [9] Ates B, Dogru M I, Gul M, *et al.* Protective role of caffeic acid phenethyl ester in the liver of rats exposed to cold stress[J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2006, 20(3): 283 - 289.
- [10] Atik E, Goeruer S, Kiper A N. The effect of caffeic acid phenethyl ester

- (CAPE) on histopathological changes in testicular ischemia-reperfusion injury[J]. *Pharmacol Res*, 2006, 54(4): 293 - 297.
- [11] Aytacoglu B N, Ersoz G, Sucu N, *et al.* Combined therapy of teicoplanin and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in the treatment of experimental mediastinitis in the rat[J]. *J Chemother (Firenze, Italy)*, 2006, 18(3): 268 - 277.
- [12] Chiao C, Carothers A M, Grunberger D, *et al.* Apoptosis and altered redox state induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in transformed rat fibroblast cells[J]. *Cancer Res*, 1995, 55(16): 3576 - 3583.
- [13] Chen Y, Shiao M, Hsu M, *et al.* Effect of caffeic acid phenethyl ester, an antioxidant from propolis, on inducing apoptosis in human leukemic HL-60 cells[J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49(11): 5615 - 5619.
- [14] Lee Y, Kuo H, Chu C, *et al.* Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of C6 glioma cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, 66(12): 2281 - 2289.
- [15] Guarini L, Su Z Z, Zucker S, *et al.* Growth inhibition and modulation of antigenic phenotype in human melanoma and glioblastoma multiforme cells by caffeic acid phenethyl ester (CAPE). [Erratum to document cited in CA118(15):139338q][J]. *Cell Mol Biol*, 1992, 38(6): 615.
- [16] 李熠, 赵静, 薛晓峰, 等. 超高效液相色谱法同时测定蜂胶中的 12 种活性成分[J]. *色谱*, 2007, 25(6): 857 - 860.
- [17] Jung W, Lee D, Kim J, *et al.* Anti-inflammatory activity of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) extracted from *Rhodiola sacra* against lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in mice[J]. *Process Biochem*, 2008, 43(7): 783 - 787.
- [18] Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins[J]. *Food Chem*, 2003, 84(3): 329 - 339.
- [19] Jin U, Chung T, Kang S, *et al.* Caffeic acid phenyl ester in propolis is a strong inhibitor of matrix metalloproteinase-9 and invasion inhibitor: Isolation and identification[J]. *Clin Chim Acta*, 2005, 362(1/2): 57 - 64.
- [20] Krol W, Scheller S, Czuba Z, *et al.* Inhibition of neutrophils' chemiluminescence by ethanol extract of propolis (EEP) and its phenolic components[J]. *J Ethnopharmacol*, 1996, 55(1): 19 - 25.
- [21] Grunberger D, banerjee R, Eisinger K E A. Preferential cytotoxicity on tumor cell by caffeic acid phenylethyl ester isolated from Propolis[J]. *Experientia*, 1988(44): 230 - 232.
- [22] 夏春年, 胡惟孝. 天然抗癌药——咖啡酸苯乙醇酯的合成进展[J]. *合成化学*, 2003(6): 545 - 550.
- [23] 李衍彰. 咖啡酸酯衍生物的单槽制法: 中国, 2000 - 123634[P]. 2002 - 03 - 13.
- [24] 柳枫. 咖啡酸酯衍生物的制备研究及其生物活性研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2006.
- [25] Lee Y. A one-pot esterification process for the preparation of caffeic acid ester derivatives from caffeic acid and alcohols in the presence of a halogenating agent: EP, 2000-310718[P]. 2002 - 06 - 05.
- [26] Nakanishi K, Oltz E M G D. Caffeic acid esters and methods of producing and using same: US, 07/369060[P]. 1991 - 04 - 16.
- [27] S S, B L E, A L B. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): Synthesis and X-ray crystallographic analysis[J]. *Chem Pharm Bull(Tokyo)*, 2001, 49(2): 236 - 238.
- [28] Chen W, Tsai C, Liao P, *et al.* Synthesis of caffeic acid esters as antioxidants by esterification via acyl chlorides[J]. *Chin Pharm J*, 1999, 51(4): 271 - 278.
- [29] Lee Y, Liao P, Chen W, *et al.* Preferential cytotoxicity of caffeic acid phenethyl ester analogues on oral cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2000, 153(1/2): 51 - 56.
- [30] Li Y C. One-pot preparation of caffeic acid esters: JP, 2000-307793[P]. 2001 - 07 - 24.
- [31] Prasad R, Conrad J P, Ilg T J. Preparation of caffeic acid phenethyl ester via selective esterification: US, 2004-920514[P]. 2008 - 05 - 06.
- [32] Bankova V S. Synthesis of natural esters of substituted cinnamic acid[J]. *Journal of Natural Products*, 1990, 53(4): 821 - 824.
- [33] Boutagy J, Thomas R. Olefin synthesis with organic phosphonate carbanions[J]. *Chem Rev*, 1974, 74(1): 87 - 99.
- [34] Piechucki C. Phase-transfer catalyzed Wittig-Horner reactions of diethyl phenyl- and styrylmethanephosphonates: A simple preparation of 1-aryl-4-phenylbuta-1, 3-dienes[J]. *Synthesis*, 1976(3): 187 - 188.
- [35] Xia C, Hu W. Synthesis of caffeic acid esters[J]. *J Chem Res*, 2005(5): 332 - 334.
- [36] 赵亚军, 焦玉国, 唐恢同, 等. 3, 5-二甲氧基苯乙醛和丙二酸单乙酯的 Knoevenagel 缩合[J]. *高等学校化学学报*, 1997, 18(8): 1312 - 1315.
- [37] Ryu Y, Scott A I. Self-condensation of activated malonic acid half esters: A model for the decarboxylative Claisen condensation in polyketide biosynthesis[J]. *Tetrahedron Lett*, 2003, 44(40): 7499 - 7502.
- [38] 闻韧. 药物合成反应[M]. 北京: 化学工业出版社, 1988: 230 - 234.
- [39] Kishimoto N, Kakino Y, Iwai K, *et al.* Enzymatic synthesis of caffeic acid esters from chlorogenic acid by transesterification and condensation reactions[J]. *Colloq Sci Int Café*, 2005, 20: 249 - 253.
- [40] Kishimoto N, Kakino Y, Iwai K, *et al.* Chlorogenate hydrolase-catalyzed synthesis of hydroxycinnamic acid ester derivatives by transesterification, substitution of bromine, and condensation reactions[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 68(2): 198 - 202.
- [41] Stevenson D E, Parkar S G, Zhang J, *et al.* Combinatorial enzymic synthesis for functional testing of phenolic acid esters catalysed by *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435)[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2007, 40(5): 1078 - 1086.
- [42] Widjaja A, Yeh T, Ju Y. Enzymatic synthesis of caffeic acid phenethyl ester[J]. *J Chin Inst Chem Eng*, 2008, 39(5): 413 - 418. ■

您想了解粉体加工技术及相关行业信息吗?

请浏览 中国粉体工业信息网 www.chinapowder.cn

粉碎 分级 纳米颗粒制备 混合 分散 改性 造粒 干燥 烧结 散料输送 储存 粉体检测 粉尘爆炸控制等

010 - 62772725 62772135(Fax)

清华大学材料系逸夫技术科学楼 2713 室