

微波技术在 10-羟基喜树碱醚化反应中的应用

孟光荣^a 李嘉俊^a 张倩^a 马红梅^{*,b}^(a) 复旦大学药学院药物化学教研室 上海 201203^(b) 华东理工大学药学院 上海 200237

摘要 为减少喜树碱结构在碱性条件下的内酯环开环反应, 将微波技术应用于 10-羟基喜树碱的醚化反应中, 与常规加热条件相比, 微波反应不仅极大地缩短了反应时间, 同时也将反应收率从 20%~30% 显著地提高到 50%~83%。这一研究结果对喜树碱的其他类型反应也具有可借鉴作用。

关键词 10-羟基喜树碱; 醚化反应; 微波技术

Application of Microwave Technique into Etherification of 10-Hydroxycamptothecin

Meng, Guangrong^a Li, Jiajun^a Zhang, Qian^a Ma, Hongmei^{*,b}^(a) Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203^(b) School of Pharmacy, East China University of Science & Technology, Shanghai 200237

Abstract In an effort to reduce the cleavage of E lactone ring in camptothecin, microwave technique was applied in the etherification of 10-hydroxycamptothecin. Compared with the conventional heating condition, microwave can truncate the reaction time and improve the yield from 20%~30% to 50%~83% significantly. Furthermore, this reaction condition could be used for reference in other relative reactions of camptothecins.

Keywords 10-hydroxycamptothecin; etherification; microwave technology

10-羟基喜树碱是天然的喜树碱衍生物之一, 20 世纪 60 年代末, 我国即开展对喜树碱(Camptothecin, CPT)类化合物的研究工作, 通过从喜树植物体中提取多种成分并比较其抗癌活性, 发现十多种生物碱中 10-羟基喜树碱(HCPT)的成药性最佳。20 世纪 70 年代 10-羟基喜树碱的临床试验在国内开始, 1988 年获准上市^[1], 已被列入国家基本药物及医保用药目录, 是我国特有的自行研制开发的天然抗肿瘤药物。

但是 10-羟基喜树碱溶解性差和毒副作用较大等缺点严重影响了其临床应用^[2~4], 为克服这些缺点, 药物化学家们进行了大量的结构改造研究, 包括引入各类含氮基团以成盐后增强水溶性^[5a~5d]以及针对 E 环的改造以减少 E 环开环带来的毒副作用等^[6a~6c]。

利用前药原理, 我们设计通过对 10-羟基喜树碱 10 位羟基醚化引入链状小片段后, 再与各类水溶性基团如氨基酸等缩合, 从而获得可提高水溶性和靶向性的各类

10-羟基喜树碱氨基酸缀合物(图 1)。

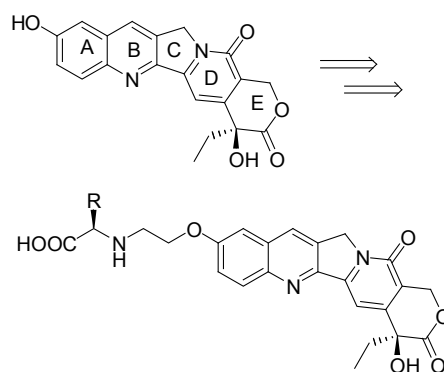


图 1 喜树碱-氨基酸缀合物的设计

Figure 1 Design of amino acid-conjugates of camptothecin

本文将报道微波促进条件下的 10-羟基喜树碱醚化反应的研究情况。对于 10-羟基喜树碱的醚化反应, 我们首先参照了李庆勇等^[7~9]的文献方法, 但由于反应时

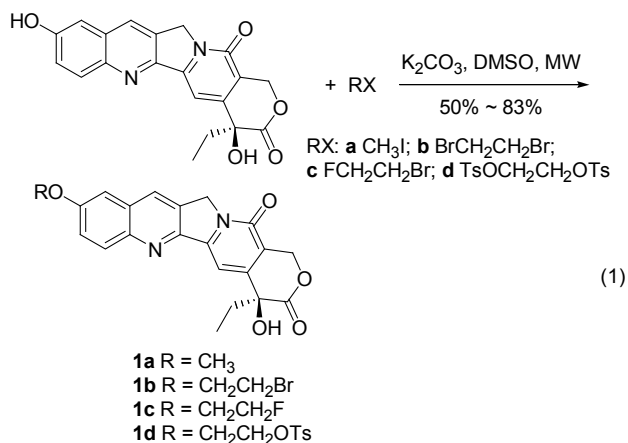
* E-mail: hmme@ecust.edu.cn

Received May 19, 2012; revised August 1, 2012; published online August 10, 2012.

Project supported by the National Drug Innovative Program (No. 2009ZX09301-011).

创新药物平台(No. 2009ZX09301-011)资助项目。

间过长, 碱性条件下 E 环容易开环, 导致反应收率较低, 后处理困难. 针对这一问题, 我们充分利用微波技术反应高效、反应时间短的优点^[10-12], 高效地合成了 4 种 10-羟基喜树碱的醚化产物(Eq. 1), 其中化合物 **1b** 和 **1d** 用于进一步的结构修饰研究中. 同时, 对 4 种醚化产物的体外抗肿瘤活性进行了测定.



1 实验部分

1.1 仪器与试剂

微波合成实验采用祥鹄 XH-100B 型微波催化合成仪; TLC 用板为青岛海洋 0.2 mm GF254 高效薄层析硅胶板; 熔点用 SGW X-4 显微熔点仪测定; ¹H NMR 谱用 Bruker-DPX 400 MHz 核磁共振仪测定(以 DMSO-*d*₆ 为溶剂, 以 TMS 为内标); 质谱用 Agilent G1946D 质谱仪测定. 其他所有实验用试剂均为市售国产分析纯.

1.2 合成

1.2.1 常规合成方法

称取 10-羟基喜树碱 50 mg 于圆底烧瓶中, 加入 2 mL DMSO, 30 °C 热溶清, 依次加入 3 倍量无水碳酸钾和 7 倍量醚化试剂, 外浴 70 °C 加热搅拌, TLC 检测反应至反应基本完全, 反应时间从 2.5~24 h 不等. 反应基本完全后, 自然冷却至室温, 将反应液慢慢滴加到 40 mL 冰水中, 过滤得到淡黄色固体粗品. 粗品用甲醇/氯仿混合溶剂溶清, 柱层析[Silica Gel H, 洗脱剂: *V*(二氯甲烷): *V*(甲醇)=35:1], 分得淡黄色粉末状固体.

1.2.2 微波合成方法

1a, **1c** 和 **1d** 的合成: 称取 10-羟基喜树碱 50 mg 于 10 mL 微波反应瓶中, 加入 2 mL DMSO 微加热溶清, 依次加入 3 倍量无水碳酸钾和 7 倍量醚化试剂, 置于微波合成仪中. 磁力搅拌下于 600 W 和 70 °C 下反应 10 min, 自然冷却至室温, 将反应液慢慢滴加到 40 mL 冰水中, 过滤得到淡黄色固体粗品. 对粗品进行柱层析得到纯品, 方法同常规合成方法.

1b 的合成: 投料比及后处理同上, 磁力搅拌下 600 W 和 60 °C 下反应 5 min 后, 停止反应, 后处理得化合物 **1b**(反应条件的优化见表 2).

10-甲氧基喜树碱(**1a**): 收率 83.12%/25.60%(微波法/常规法); 淡黄色固体, m.p. 258~260 °C(文献值^[13] 254~255 °C); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 0.88 (t, $J=7.26$ Hz, 3H, 18-CH₃), 1.83~1.90 (m, 2H, 19-CH₂), 3.92 (s, 3H, 10-OCH₃), 5.19 (s, 2H, 5-CH₂), 5.40 (s, 2H, 17-CH₂), 6.48 (s, 1H, 20-OH), 7.24 (s, 1H, 14-CH), 7.45~7.47 (m, 2H, 9-CH and 11-CH), 8.02 (d, $J=9.89$ Hz, 1H, 12-CH), 8.48 (s, 1H, 7-CH); ESI-MS m/z : 379.1 ($M^+ + 1$).

10-(2-溴乙氧基)喜树碱(**1b**): 收率 52.75%/31.80%(微波法/常规法); 黄色固体, m.p. 262~264 °C(文献值^[5d] 235~237 °C); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 0.86 (t, $J=7.24$ Hz, 3H, 18-CH₃), 1.79~1.89 (m, 2H, 19-CH₂), 3.90 (t, $J=5.28$ Hz, 2H, Br-CH₂), 4.49 (t, $J=5.28$ Hz, 2H, 10-OCH₂), 5.23 (s, 2H, 5-CH₂), 5.40 (s, 2H, 17-CH₂), 6.50 (s, 1H, 20-OH), 7.26 (s, 1H, 14-CH), 7.51 (dd, $J=9.39, 2.74$ Hz, 1H, 11-CH), 7.54 (d, $J=2.74$ Hz, 1H, 9-CH), 8.12 (d, $J=9.39$ Hz, 1H, 12-CH), 8.50 (s, 1H, 7-CH); ESI-MS m/z : 471.0 ($M + H^+$), 473.0 ($M + H^+ + 2$).

10-(2-氟乙氧基)喜树碱(**1c**): 收率 57.06%/19.70%(微波法/常规法). 黄色固体, m.p. 139~143 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 0.86 (t, $J=7.24$ Hz, 3H, 18-CH₃), 1.80~1.87 (m, 2H, 19-CH₂), 4.36~4.45 (dm, $J=29.7$ Hz, 2H, 10-O-CH₂), 4.76~5.39 (dm, $J=44.8$ Hz, 2H, F-CH₂), 5.21 (s, 2H, 5-CH₂), 5.39 (s, 2H, 17-CH₂), 6.51 (s, 1H, 20-OH), 7.25 (s, 1H, 14-CH), 7.48~7.52 (m, 2H, 9-CH and 11-CH), 8.04 (d, $J=10.6$ Hz, 1H, 12-CH), 8.41 (s, 1H, 7-CH); ESI-MS m/z : 411.1 ($M^+ + 1$); HRMS calcd for C₂₂H₂₀FN₂O₅ [$M + H$]⁺ 411.1356, found 411.1336.

10-(2-对甲氧磺酰氧基乙氧基)喜树碱(**1d**): 收率 49.76%/28.50%(微波法/常规法). 淡黄色颗粒, m.p. 250~252 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 0.88 (t, $J=7.24$ Hz, 3H, 18-CH₃), 1.82~1.89 (m, 2H, 19-CH₂), 2.39 (s, 3H, 4'-CH₃), 4.36 (brs, 2H, SO₃-CH₂), 4.45 (brs, 2H, OCH₂), 5.24 (s, 2H, 5-CH₂), 5.42 (s, 2H, 17-CH₂), 6.51 (brs, 1H, 20-OH), 7.28 (s, 1H, 14-CH), 7.36 (dd, $J=9.20, 2.54$ Hz, 1H, 11-CH), 7.45 (s, 1H, 9-CH), 7.46 (d, $J=8.60$ Hz, 2H, 3'-CH, 5'-CH), 7.83 (d, $J=8.22$ Hz, 2H, 2'-CH, 6'-CH), 8.04 (d, $J=8.99$ Hz, 1H, 12-CH), 8.48 (s, 1H, 7-CH); ESI-MS m/z : 563.2 ($M^+ + 1$); HRMS calcd for C₂₉H₂₇N₂O₈S [$M + H$]⁺ 563.1488, found 563.1456.

1.3 生物活性测试

以 10-羟基喜树碱作为阳性参照物, 采用 CCK-8 法, 分别测试 4 个 10-羟基喜树碱醚化衍生物对人口腔鳞癌细胞 KB、人肝癌细胞 HepG2 和小鼠结肠癌细胞 C26 三组细胞株的生长抑制情况。

取对数生长期的肿瘤细胞, 用 0.25% 胰酶消化, 离心后加培养基调整细胞浓度为 40000 个/mL, 然后接种入 96 孔培养板, 每孔 100 μ L。待测化合物用 DMSO 稀释, 取 1 μ L 加入 96 孔板后得以下梯度浓度: 50000, 5000, 500, 50, 5 和 0.5 nmol/L 等 6 个受试浓度, 每个浓度均设 3 个复孔, 阴性对照为等体积(1 μ L)药物溶剂(DMSO), 同时设清零孔对照。细胞于接种 12 h 待其贴壁后加药, 每孔 1 μ L(阴性对照组和清零孔加 1 μ L DMSO)。加药后细胞置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 饱和湿度培养 48 h, 然后每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂后继续培养 4 h。酶标仪检测各孔在 450 nm 处吸光度 A_{450} 。按公式: 细胞增殖抑制率(%) = (对照组 A_{450} - 给药组 A_{450} / 对照组 A_{450}) \times 100%, 应用 SPSS 软件计算半数抑制浓度(IC₅₀ 见表 1)。

表 1 化合物 1a~1d 的体外细胞毒活性
Table 1 Cytotoxic activities of 1a~1d *in vitro*

Compound	IC ₅₀ /(μ mol·L ⁻¹)		
	KB	HepG2	C26
10-Hydroxycamptothecin	1.670	0.605	0.058
1a	0.459	0.297	0.031
1b	6.656	0.544	0.079
1c	3.221	2.075	0.320
1d	1.309	0.713	0.172

2 结果与讨论

除了化合物 1b 外, 微波 70 $^{\circ}$ C 反应 10 min 条件下, 其他 3 个化合物的合成收率均有显著提高, 从 20%~30% 提高至 50%~83%, 尤其是 10-羟基喜树碱与碘甲烷的醚化反应, 收率可提高近 50%, 从而说明微波加热条件可有效地避免常规加热条件下反应时间过长, 10-羟基喜树碱 E 环内酯环开环等不利因素, 可极大地缩短反应时间和提高反应收率, 该方法为 10-羟基喜树碱的醚化提供了一个便捷有效的途径。

对于 10-羟基喜树碱与二溴乙烷的反应, 同样条件下, 尽管微波促进条件可大大地缩短反应时间, 但反应收率与常规加热条件下几乎等同。分析其原因, 我们认为醚化产物 10-(2-溴乙氧基)喜树碱(1b)边链上的溴原子活性较高, 在剧烈条件下容易发生其他反应而导致收率偏低。因此, 我们进一步降低反应温度, 探索了温度设置分别为 40, 50 以及 60 $^{\circ}$ C 的反应, 10 min 后, 停止反应, TLC 显示均有原料未反应完全, 分离目标化合物收率分

别为: 16.05%, 41.03% 和 45.93%。从结果可以看出, 对于 10-羟基喜树碱与二溴乙烷的醚化反应, 最佳反应温度应为 60 $^{\circ}$ C。同时我们也尝试了 60 $^{\circ}$ C 条件下改变反应时间的研究, 结果表明: 温度为 60 $^{\circ}$ C, 反应时间为 5 min 时收率最高(表 2)。

表 2 微波条件下合成目标化合物 1b 的反应温度、时间及收率

Table 2 Reaction temperature, time and yield to 1b with microwave catalysis

Entry	Temperature/ $^{\circ}$ C	Reaction time/min	Yield/%
1	40	10	16.05
2	50	10	41.03
3	60	10	45.93
4	70	10	29.07
5	60	5	52.75
6	60	15	41.47
7	60	20	39.02

以 10-羟基喜树碱为阳性对照, 分别测试了 4 个醚化产物的体外抗肿瘤细胞增殖活性(表 1)。IC₅₀ 数据显示 10 位羟基醚化后的衍生物仍然具有与 10-羟基喜树碱相当的抗肿瘤细胞增殖活性。其中, 取代基体积较小的 10-甲氧基喜树碱(1a)的活性略高于 10-羟基喜树碱, 而体积较大的乙基取代产物则活性略低于阳性对照物。这一结果提示我们, 在拓扑异构酶 I-DNA 二元复合物与喜树碱的结合腔内, 相应于 10-位位点可能只能容纳体积较小的基团, 大体积基团不利于三元复合物的形成, 这为进一步的结构修饰提供了重要参考。

References

- [1] Chu, W. *China New Med.* **2003**, 2(6), 76 (in Chinese). (褚伟, 中国新医药, **2003**, 2(6), 76.)
- [2] Fan, Y.; Weinstein, J. N.; Kohn, K. W. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 2216.
- [3] Crow, R. T.; Crothers, D. M. *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 4160.
- [4] Song, Y. L.; Zhang, W. N.; Ji, H. T. *Chin. Pharm. J.* **2002**, 37, 646 (in Chinese). (宋云龙, 张万年, 季海涛, 中国药学杂志, **2002**, 37, 646.)
- [5] (a) Venditto, V. J.; Simanek, E. *Mol. Pharm.* **2010**, 7, 307.
(b) Kingsbury, W. D.; Boehm, J. C.; Jakas, D. R.; Holden, K. G.; Hecht, S. M.; Gallagher, G.; Caranfa, M. J.; McCabe, F. L.; Faucette, L. F.; Johnson, R. K.; Hertzberg, R. P. *J. Med. Chem.* **1991**, 344, 98.
(c) Kim, D. K.; Ryu, D. H.; Lee, J. Y.; Lee, N.; Kim, Y. W.; Kim, J. S.; Chang, K.; Im, G. J.; Kim, T. K.; Choi, W. S. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 1594.
(d) Zu, Y. G.; Li, Q. Y.; Fu, Y. J.; Wang, W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 4023.
- [6] (a) Lavergne, O.; Lesueur-Ginot, L.; Rodas, F. P.; Bigg, D. C. H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 2235.
(b) Du, W.; Curran, D. P.; Bevins, R. L.; Zimmer, S. G.; Zhang, J.; Burke, T. G. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, 10, 103.
(c) Mao, L.; Wang, H.; Tan, M.; Ou, L.; Kong, D.; Yang, Z. *Chem. Commun.* **2012**, 48, 395.

- [7] Li, Q. Y.; Deng, X. Q.; Zu, Y. G.; Lv, H. Y.; Su, L.; Yao, L. P.; Zhang, Y.; Li, L. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 3200.
- [8] Li, Q. Y.; Zu, Y. G.; Shi, R. Z.; Yao, L. P.; Fu, Y. J.; Yang, Z. W.; Li, L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *14*, 7175.
- [9] Li, Q. Y.; Zu, Y. G.; Fu, Y. J. *Acta Pharm. Sin.* **2004**, *39*, 521 (in Chinese).
(李庆勇, 祖元刚, 付玉杰, 药学学报, **2004**, *39*, 521.)
- [10] Gedye, R.; Smith, F.; Westaway, K.; Ali, H. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27(3), 279.
- [11] Zhang, H. L.; Hu, X. M.; Lai, S. L. *J. South China Univ. Technol.* **1997**, *25*, 46 (in Chinese).
(张华莲, 胡希明, 赖声礼, 华南理工大学学报, **1997**, *25*, 46.)
- [12] Fan, X. J.; You, J. M.; Tan, G. Z. *Prog. Chem.* **1998**, *10*(3), 285.
- [13] Gao, M. Z.; Kathy, D. M.; George, W. S.; Qi, H. Z. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3865.

(Li, L.; Lu, Z.)