

医药与日化原料

磷酸酯糖苷衍生物的合成与抗肿瘤活性

杨家强¹, 车万莉¹, 陈磊¹, 杨璇², 熬慧¹

(1. 遵义医学院药学院, 贵州遵义 563003; 2. 曼尼托巴大学化学系, 加拿大温尼伯 R3T4K6)

摘要: 以 α -羟基磷酸酯和溴代单糖为中间体, 碱性离子液体[Bmim]OH 为催化剂, 微波辅助下, 以 79.6%~84.1% 的收率合成了系列磷酸酯糖苷化合物(III a~III f), 经 IR、¹HNMR、¹³CNMR 确认了产物结构。采用溴化噻唑蓝四氮唑(MTT)法进行了体外抗肿瘤活性测试。结果表明: 该类化合物对人胃癌细胞(SGC-7901)和人肺癌细胞(A549)有增殖抑制作用, 其中, 含葡萄糖基片段的目标物 III a、III b 对 SGC-7901 有较优的增殖抑制作用, IC₅₀ 分别为(12.9±0.9) $\mu\text{mol/L}$ 、(14.3±1.1) $\mu\text{mol/L}$; 含半乳糖基片段的目标物 III c、III d 对 A549 有较显著活性, IC₅₀ 分别为(15.9±0.9) $\mu\text{mol/L}$ 、(14.2±1.3) $\mu\text{mol/L}$ 。

关键词: 磷酸酯; 糖苷; 抗肿瘤活性; 医药原料

中图分类号: R914.4; 0627.51 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214(2018)12-2087-05

Synthesis and Antitumor Activity of Glycoside Derivatives Containing Phosphonate Moiety

YANG Jia-qiang¹, CHE Wan-li¹, CHEN Lei¹, YANG Xuan², AO Hui¹

(1. School of Pharmacy, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou, China; 2. Chemistry Department, University of Manitoba, Winnipeg, MB, Canada, R3T4K6)

Abstract: A series of glycoside derivatives containing phosphonate moiety (III a~f) in yields of 79.6%~84.1% were synthesized by using α -hydroxyphosphonate and bromine substituted monosaccharide as raw materials, alkaline ionic liquid [Bmim]OH as catalyst under microwave irradiation. Their structures were confirmed by IR, ¹HNMR and ¹³CNMR. These compounds were tested for their *in vitro* antitumor activities on some tumor cell lines by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. The results indicated that all tested compounds could inhibit the proliferation of SGC-7901 human gastric cancer cells and A549 human lung cancer cells. Among them, compounds IIIa and IIIb containing glucose fragment had better inhibition effect against SGC-7901 with IC₅₀ values of (12.9±0.9) $\mu\text{mol/L}$ and (14.3±1.1) $\mu\text{mol/L}$, respectively. Compounds IIIc and III d containing galactose fragment showed more remarkable activities against A549 with IC₅₀ values of (15.9±0.9) $\mu\text{mol/L}$ and (14.2±1.3) $\mu\text{mol/L}$, respectively.

Key words: phosphonate; glycoside; antitumor activity; drug materials

Foundation item: International Cooperation Project of Guizhou Provincial Science and Technology Department (G[2014]7013)

有机磷化合物由于具有多变的结构类型及良好的生物学特性, 一直是人们关注的热点^[1], 自从环磷酸胺、双磷酸盐等抗肿瘤含磷药物相继用于临床以来, 人们对有机磷化合物的抗肿瘤研究从未停止。磷酸酯类化合物作为一类重要的有机磷衍生物, 近

年研究极为广泛, 已经成为有机磷化学发展的重要组成部分, 在药物研发中扮演着重要角色。研究表明, 该类衍生物有抗肿瘤^[2]、抗菌^[3]、抗病毒^[4]、除草^[5]等多种生理活性。

前期课题组运用活性结构拼合原理、生物电子

收稿日期: 2018-04-09; 定用日期: 2018-06-14; DOI: 10.13550/j.jxhg.20180250

基金项目: 贵州省科技厅国际合作基金 [G(2014)7013]

作者简介: 杨家强(1979—), 男, 教授, 硕士, 电话: 0851-28609461, E-mail: yjqcn@126.com。

等排原理等药物设计理念,设计合成了多系列磷酸酯衍生物并进行了抗肿瘤活性研究^[6-11]。结果表明:不同系列的磷酸酯衍生物均表现出潜在的抗肿瘤活性,进一步分析不同结构类型化合物的构效关系,发现含 α -对氟苯基甲基磷酸二乙酯和 α -邻氟苯基甲基磷酸二乙酯的衍生物具有更优秀抗肿瘤活性,呈现出潜在的抗肿瘤药效功能基团,值得进一步结构优化与深入研究。

糖作为自然界中分布最为广泛的一类有机化合物,种类繁多,结构复杂多样,糖类直接作为功能基团存在于许多以 DNA 为靶点的抗肿瘤化疗药物中,糖链作为分子的一部分可以调节脂水分配系数、增加水溶性、调节血浆半衰期、改善药动学性能等^[12]。近年来有关糖衍生物在抗肿瘤药物研究中扮演着重要角色,研究发现在含有糖基片段的抗肿瘤药物中,其糖基片段上的丰富羟基对 DNA 等作用靶点具有特异性的识别与结合功能^[13],在抗肿瘤中发挥关键作用,如抗肿瘤药物阿糖胞苷及含糖片段的新型抗癌药物 PI-88 等。

基于上述理论研究和文献依据,本文拟在前期研究工作基础上,采用基于片段的药物发现(FBDD)方法,在已研究的抗肿瘤活性片段 α -对氟苯基甲基磷酸二乙酯和 α -邻氟苯基甲基磷酸二乙酯结构中引入不同种类的六碳糖,设计合成系列磷酸酯糖苷衍生物,进一步评价其抗肿瘤活性,寻找高活性抗肿瘤候选化合物。

1 实验部分

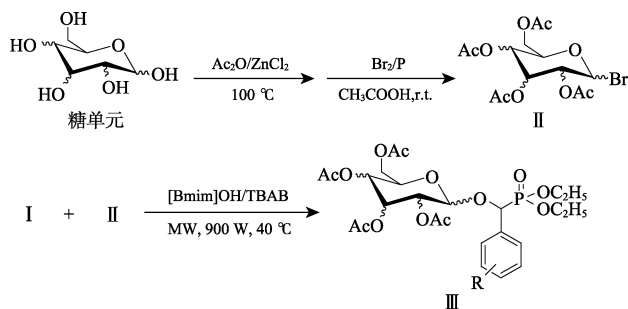
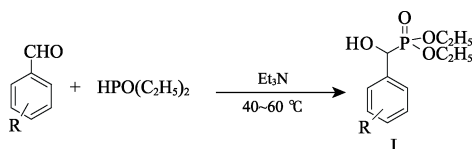
1.1 试剂与仪器

葡萄糖、半乳糖、甘露糖,分析纯,国药集团化学试剂有限公司;四丁基溴化铵(TBAB)、红磷、溴水、乙酸、三乙胺,分析纯,安耐吉化学公司;亚磷酸酯为自制^[2],反应溶剂用前需经无水干燥处理;[Bmim]OH,化学纯,艾康生物医药;其余试剂与溶剂均为市售分析纯。

X-4 型数显熔点测定仪,上海精密仪器仪表有限公司;Varian 红外光谱仪(KBr 压片)、Varian 400 MHz 核磁共振仪(溶剂 CDCl_3 , 内标 TMS),美国瓦里安技术公司;ELX800 通用酶标仪,美国伯腾仪器公司。

1.2 方法

目标化合物磷酸酯糖苷衍生物的合成路线如下所示:



其中, III a: R=*o*-F, 糖单元=葡萄糖; III b: R=*p*-F, 糖单元=葡萄糖; III c: R=*o*-F, 糖单元=半乳糖; III d: R=*p*-F, 糖单元=半乳糖; III e: R=*o*-F, 糖单元=甘露糖; III f: R=*p*-F, 糖单元=甘露糖。

中间体 I 的制备方法参照文献[5-6], 中间体 II 的制备方法参照文献[14]。

以 III a 的合成例, 将 0.820 g (2.0 mmol) 溴代葡萄糖中间体 II、0.156 g (1.0 mmol) [Bmim]OH 离子液体加入反应瓶中, 再加入 0.644 g (2.0 mmol) 四丁基溴化铵(TBAB)、0.556 g (2.0 mmol) 中间体 I、50 mL 氯仿及 50 mL 纯化水。于微波合成仪中, 设定微波功率 900 W、反应温度 40 °C, 反应 60 min, 停止反应, 分液漏斗分液, 浓缩氯仿, 得粗品, 柱层析分离纯化, 得目标化合物 III a。再按照上述方法合成 III b~III f。

产物 *O,O'*-二乙基- α -(邻-氟苯基)- α -(2',3',4',6'-四-*O*-乙酰基- β -D-吡喃葡萄糖基)-甲基磷酸酯(III a): 淡黄色黏稠液体, 产率 84.1%, IR (KBr), ν/cm^{-1} : 3045, 2963, 2930, 2821, 1751, 1681, 1640, 1533, 1427, 1382, 1248, 1226, 1074, 1031. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ : 6.95~7.36 (m, 4H, ArH), 5.52 (d, 1H, J =10.8 Hz, OCHO), 4.97~5.38 (m, 4H, 4OCH), 4.13~4.16 (m, 1H, PCH), 4.10~4.12 (m, 6H, 3OCH₂), 1.89~2.08 (m, 12H, 4COCH₃), 1.09~1.18 (m, 6H, 2CH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3), δ : 170.5, 169.9, 169.5, 169.2, 161.9, 136.5, 130.1, 129.9, 119.6, 115.7, 85.8, 73.2, 69.9, 67.8, 63.6, 63.5, 61.5, 20.7, 20.6, 20.5, 20.2, 16.5, 16.4。

产物 *O,O'*-二乙基- α -(对-氟苯基)- α -(2',3',4',6'-四-*O*-乙酰基- β -D-吡喃葡萄糖基)-甲基磷酸酯(III b): 淡黄色黏稠液体, 产率 80.3%, IR (KBr), ν/cm^{-1} : 3038, 2962, 2931, 2823, 1746, 1685, 1651, 1532, 1430, 1377, 1246, 1231, 1062, 1022; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ : 6.90~7.26 (m, 4H, ArH), 5.58 (d, 1H, J =11.2 Hz, OCHO), 4.95~5.40 (m, 4H, 4OCH), 4.12~4.15 (m, 1H, PCH), 4.09~4.11 (m, 6H, 3OCH₂), 1.89~2.07 (m, 12H, 4COCH₃), 1.11~1.17 (m, 6H, 2CH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3), δ : 170.4, 169.9, 169.7, 169.6, 161.8, 130.1, 129.5, 124.6, 115.7, 115.5, 83.1, 73.3, 70.4, 68.2, 63.7, 63.6, 62.2, 20.9, 20.8, 20.7, 16.6, 16.5。

产物 *O,O'*-二乙基- α -(邻-氟苯基)- α -(2',3',4',6'-

四-*O*-乙酰基- β -D-吡喃半乳糖基)-甲基磷酸酯 (IIIc): 淡黄色黏稠液体, 产率 79.6%, IR (KBr), ν/cm^{-1} : 3041, 2966, 2934, 2823, 1758, 1685, 1651, 1531, 1426, 1379, 1251, 1230, 1063, 1025; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ : 7.12~7.26 (m, 4H, ArH), 5.55 (d, 1H, $J=9.6$ Hz, OCHO), 4.98~5.44 (m, 4H, 4OCH), 4.12~4.16 (m, 1H, PCH), 4.02~4.10 (m, 6H, 3OCH₂), 1.90~2.06 (m, 12H, 4COCH₃), 1.10~1.18 (m, 6H, 2CH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3), δ : 170.4, 170.3, 169.6, 169.5, 130.1, 129.5, 128.8, 128.6, 127.7, 127.5, 83.3, 73.3, 70.5, 68.0, 63.4, 63.3, 62.1, 20.9, 20.8, 16.5, 16.4。

产物 *O,O'*-二乙基- α -(对-氟苯基)- α -(2',3',4',6'-四-*O*-乙酰基- β -D-吡喃半乳糖基)-甲基磷酸酯 (III d): 淡黄色黏稠液体, 产率 83.8%, IR (KBr), ν/cm^{-1} : 3036, 2958, 2920, 2833, 1764, 1681, 1630, 1523, 1437, 1369, 1266, 1232, 1054, 1019. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ : 6.87~7.18 (m, 4H, ArH), 5.43 (d, 1H, $J=9.2$ Hz, OCHO), 4.88~5.12 (m, 4H, 4OCH), 4.17~4.21 (m, 1H, PCH), 4.06~4.14 (m, 6H, 3OCH₂), 2.10~2.36 (m, 12H, 4COCH₃), 1.15~1.43 (m, 6H, 2CH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3), δ : 171.2, 169.3, 130.1, 129.8, 128.4, 128.3, 127.5, 127.4, 127.0, 84.2, 72.5, 70.3, 68.1, 63.2, 63.1, 22.5, 22.4, 16.3, 16.2。

产物 *O,O'*-二乙基- α -(对-氟苯基)- α -(2',3',4',6'-四-*O*-乙酰基- β -D-吡喃甘露糖基)-甲基磷酸酯 (III e): 淡黄色黏稠液体, 产率 81.5%, IR (KBr), ν/cm^{-1} : 3034, 2966, 2932, 2829, 1755, 1690, 1645, 1529, 1422, 1387, 1251, 1220, 1063, 1026. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ : 7.17~7.32 (m, 4H, ArH), 5.56 (d, 1H, $J=10.0$ Hz, OCHO), 4.95~5.41 (m, 4H, 4OCH), 4.12~4.14 (m, 1H, PCH), 4.09~4.11 (m, 6H, 3OCH₂), 1.95~2.02 (m, 12H, 4COCH₃), 1.13~1.16 (m, 6H, 2CH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3), δ : 174.5, 169.9, 169.6, 169.4, 130.2, 128.8, 128.6, 128.5, 128.4, 128.1, 127.3, 85.9, 73.2, 71.6, 69.9, 67.9, 63.6, 63.5, 61.7, 20.7, 20.6, 20.5, 20.3, 16.6, 16.4。

产物 *O,O'*-二乙基- α -(对-氟苯基)- α -(2',3',4',6'-四-*O*-乙酰基- β -D-吡喃甘露糖基)-甲基磷酸酯 (III f): 淡黄色黏稠液体, 产率 80.7%, IR (KBr), ν/cm^{-1} : 3036, 2960, 2935, 2832, 1750, 1683, 1639, 1545, 1428, 1371, 1235, 1220, 1065, 1021. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ : 6.99~7.26 (m, 4H, ArH), 5.41 (d, 1H, $J=12.0$ Hz, OCHO), 4.92~5.10 (m, 4H, 4OCH), 4.13~4.16 (m, 1H, PCH), 4.01~4.10 (m, 6H, 3OCH₂), 2.05~2.31 (m, 12H, 4COCH₃), 1.19~1.41 (m, 6H, 2CH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3), δ : 170.5, 169.8, 129.6, 129.4, 128.9, 128.6, 127.7, 127.1, 127.5, 84.5, 72.6, 70.5, 68.0, 63.2, 63.1, 22.6, 22.5, 16.4, 16.3。

1.3 生物活性测试

采用 MTT 法^[15], 以顺铂为对照, 测定目标化合物对肿瘤细胞 A-549 和 SGC-7901 的增殖抑制作用, 两点法 (Reed and Muench 法) 计算其 IC₅₀ 值。

2 结果与讨论

2.1 反应条件的考察

2.1.1 催化剂对反应的影响

以目标化合物 III a 的制备为例, 考察不同碱性介质对反应的影响, 结果见表 1。

表 1 不同催化剂对反应产率的影响
Table 1 Effects of different catalysts on the reaction yield

	NaOH	K ₂ CO ₃	Et ₃ N	[Bmim]OH	[Emim]Cl-AlCl ₃
产率/%	0	12.7	10.2	31.3	28.9

由表 1 可以看出, 无机碱 NaOH 由于碱性太强, 不能促进该反应的进行; 在弱碱碳酸钾、三乙胺、[Bmim]OH、[Emim]Cl-AlCl₃ 参与反应的条件下, 能促进该亲电取代反应的进行, 其中两种碱性离子液体更是能提高目标物的产率, 尤以 [Bmim]OH 催化, 有更好的产率, 达到 31.3%, 可能因为 [Bmim]OH 作为一种接受质子的 Brønsted 碱性离子液体更容易与氢结合, 促进该反应的发生。因此, 说明碱性离子液体对该亲电取代反应有促进作用, 应选用 [Bmim]OH 为催化剂。

2.1.2 离子液体摩尔分数对反应的影响

以化合物 III a 的制备为例, 考察碱性离子液体 [Bmim]OH 摩尔分数对反应的影响, 如表 2 所示。

表 2 催化剂的用量对反应产率的影响
Table 2 Effects of amount of catalyst on the reaction yield

产率/%	$x([\text{Bmim}]\text{OH})/\%$				
	20	30	40	50	60
	20.3	31.3	39.1	42.7	41.0

由表 2 可看出, 当 [Bmim]OH 摩尔量从 20% 增加至 50%, 目标物的产率从 20.3% 提高到 42.7%, 但当其用量增至 60%, 反应收率反而有一定降低, 原因可能是过多碱性离子液体的存在, 影响了产物的纯化, 降低了产率。因此, 虽然离子液体摩尔量可以改善其收率, 但需要在一定范围控制使用量, 催化剂的摩尔分数在 50% 为最佳。

2.1.3 微波条件对反应的影响

为了进一步优化合成条件, 提高反应收率, 以化合物 III a 的制备为例, 考察了在离子液体催化作用下, 微波辐射时间、辐射功率、反应温度对产品收率的影响, 结果见表 3。

由表 3 可知, 微波辅助合成能促进该反应的发生, 使得目标物的产率大幅提高, 当反应时间从 10 min 增加至 60 min, 产率由 22.5% 提高到 58.1%, 但是, 随着反应时间进一步延长至 70 min, 产率无

明显提高,表明微波反应时间的增加能提高产率,也需控制反应在合理的时间范围;其次,微波功率对反应也有一定影响,随着反应功率从 500 W 上升到 1000 W,产率从 58.1% 提高到 74.0%,由于从 900 W 到 1000 W,产率变化较小,因此,选择 900 W 为该反应的最优反应功率;最后,从表 3 中也可以看出,温度对该反应的发生也有影响,当反应温度增加至 40 °C,产率能到达 84.1%,但是,进一步升高温度至 50 °C,产率仅 21.5%,TLC 跟踪显示,较高的反应温度可能引起了更多副反应的发生,具体副产物有待进一步确认。另外,最优微波条件为反应温度 40 °C、功率 900 W、时间 60 min。

表 3 微波条件对产率的影响

Table 3 Effects of microwave conditions on the reaction yield

时间/min	功率/W	温度/°C	产率/%
10	500	20	22.5
20	500	20	29.0
30	500	20	35.3
40	500	20	42.6
50	500	20	55.9
60	500	20	58.1
70	500	20	58.8
60	600	20	60.4
60	700	20	64.0
60	800	20	69.7
60	900	20	73.3
60	1000	20	74.0
60	900	30	80.2
60	900	40	84.1
60	900	50	21.5
800	0	40	24.7

综上,以碱性离子液体[Bmim]OH 为催化剂,控制其摩尔分数为反应物的 50%,反应温度为 40 °C,反应功率为 900 W,反应时间为 60 min,是该反应的最佳反应条件。

2.2 波谱分析

在 IR 谱图中,目标化合物在 1745~1765 cm^{-1} 之间有强的 C=O 伸缩振动峰,表明有糖基存在;在 1500 cm^{-1} 左右的中强峰则为苯环的 C=C 骨架振动;在 1200 cm^{-1} 附近有较强的吸收峰,则说明有 P=O 的存在。在 ^1H NMR 谱图中,化学位移在 δ : 6.87~7.36 左右出现了苯环氢的质子峰,与一般苯取代的质子吸收规律一致;在 δ : 5.50 附近出现的四重峰,则为糖基的端基 CH 质子峰; δ : 2.00 左右的则为乙酰基的甲基质子峰。

2.3 抗肿瘤活性

采用溴化噻唑蓝四氮唑 (MTT) 法对目标化合物进行了体外抗肿瘤活性测试。结果如表 4 所示。

表 4 目标化合物对不同肿瘤细胞的 IC_{50} 值Table 4 IC_{50} values of target compounds for different tumor cells

化合物	IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)	
	A-549	SGC-7901
III a	53.5±1.8	12.9±0.9
III b	46.0±2.6	14.3±1.1
III c	15.9±0.9	49.3±2.1
III d	14.2±1.3	55.8±2.3
III e	30.3±0.7	27.8±1.2
III f	28.1±1.0	22.6±0.9
顺铂	5.6±0.7	5.2±0.8

由表 4 可看出,目标物对肿瘤细胞 A-549、SGC-7901 有一定的增殖抑制活性,略低于对照药物顺铂。由葡萄糖基片段组合的目标物 III a 和 III b 对 SGC-7901 呈现较优的抗肿瘤活性, IC_{50} 分别为 (12.9±0.9) $\mu\text{mol/L}$ 、(14.3±1.1) $\mu\text{mol/L}$; 化合物 III c 和 III d 结构中含有半乳糖基片段,对 A-549 有较好的增殖抑制作用, IC_{50} 分别为 (15.9±0.9) $\mu\text{mol/L}$ 、(14.2±1.3) $\mu\text{mol/L}$; 而含甘露糖基片段的目标物 III e 和 III f 对所测试肿瘤细胞 A-549、SGC-7901 的增殖抑制活性均不显著。

3 结论

在前期研究基础上,根据活性片段组合原理,在微波条件下,以碱性离子液体[Bmim]OH 为催化剂,设计合成了 6 个磷酸酯糖苷化合物;体外抗肿瘤活性筛选实验表明:目标化合物对所测肿瘤细胞有一定增殖抑制活性,其中含葡萄糖基片段的目标物对 SGC-7901 的抗肿瘤活性较显著,含半乳糖基片段的目标物对 A-549 的增殖抑制活性较显著。该类衍生物的结构优化与抗肿瘤作用有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Zhao Yufen (赵玉芬), Yan Xiaomei (颜晓梅), Yang Chaoyong (杨朝勇), *et al.* Research progress in bioorganic phosphorus chemistry, bioanalysis and biosensing [J]. Journal of Xiamen University (Natural Science) (厦门大学学报: 自然科学版), 2011, 50(2): 319-327.
- [2] Ning L H, Wang W, Liang Y J, *et al.* Synthesis and cytotoxicity of *O*, *O'*-dialkyl {[2- (substituted phenoxy) acetamido](substituted phenyl) methyl}phosphonates[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2012, 48: 379-384.

(下转第 2097 页)