

## • 实验研究 •

## 苯氧基磷酰氮芥取代的槐定碱衍生物的合成及其抗肿瘤活性研究

代霖霖, 李冬冬\*, 支 爽, 赵秀梅

天津市医药科学研究所, 天津 300020

**摘要:** **目的** 设计合成苯氧基磷酰氮芥取代的槐定碱衍生物, 并对其进行体外抗肿瘤活性研究。**方法** 以槐定碱为起始原料, 经开环、酯化、磷酰化等反应合成目标化合物 **2a~2e**, 采用 MTT 法测定其对 S180、H22、K562、MCF-7、SMMC-7721、LoVo 肿瘤细胞的抑制活性。**结果** 设计并合成了 5 个目标化合物, 其结构经  $^1\text{H-NMR}$  和 ESI-MS 确证。体外细胞测试结果显示所有化合物对 S180 和 H22 细胞株活性较强, 且对正常细胞 L929 毒性小, 部分化合物活性高于阳性对照药多柔比星。**结论** 目标化合物具有较强的抗肿瘤活性, 化合物 **2b** 为有潜力的候选化合物。

**关键词:** 苯氧基磷酰氮芥; 槐定碱; 抗肿瘤活性

**中图分类号:** R914.2

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1674-5515(2018)01-001-04

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2018.01.001

## Synthesis of phenoxy-phosphoramidate mustard substituted sophoridinic derivatives and their antitumor activities

DAI Lin-lin, LI Dong-dong, ZHI Shuang, ZHAO Xiu-mei

Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China

**Abstract:** **Objective** To design and synthesize phenoxy-phosphoramidate mustard substituted sophoridinic derivatives, and to study their antitumor activities. **Methods** Sophoridine was used as the starting material to synthesize the target compounds **2a — 2e** via ring-opening, esterification and phosphorylation reaction. The inhibitory activity against S180, H22, K562, MCF-7, SMMC-7721, and LoVo tumor cells was determined by MTT assay. **Results** Five targeted compounds were designed and synthesized, and their chemical structures were confirmed by  $^1\text{H-NMR}$  and ESI-MS. The cell test results *in vitro* showed that all these compounds were more sensitive to S180 and H22 cells, and were less toxic to normal cells L929. The activities of some compounds were higher than positive control drug doxorubicin. **Conclusion** The targeted compounds have good antitumor activities *in vitro*, and compound **2b** is considered to be a promising candidate.

**Key words:** phenoxy-phosphoramidate mustard; sophoridine; antitumor activities

槐定碱是从苦豆子 *Sopora alopecuroides* L. 中提取的一种喹诺里西啶类生物碱, 具有广泛的药理学作用, 如抗肿瘤、抗心律失常、抗炎、抗病毒<sup>[1]</sup>。国家食品药品监督管理局 2005 年批准盐酸槐定碱注射液为我国自主研发的一类抗癌新药, 用于治疗恶性滋养细胞肿瘤<sup>[2]</sup>。作为抗肿瘤药物, 槐定碱具有安全性高、水溶性好、无骨髓抑制毒性等多种优点, 但其抗肿瘤活性不高, 抗癌谱窄, 故而限制

了该药物在临床的广泛应用, 仅作为化疗的辅助用药。本课题组前期研究中以槐定碱为先导化合物, 进行修饰改造, 合成了一系列以酰胺键或酯键连接的槐定碱衍生物<sup>[3-5]</sup>, 得到数个活性较好的目标化合物。环磷酰胺是临床上广泛使用的强效抗肿瘤药物, 其体内活性代谢物为磷酰胺氮芥<sup>[6]</sup>, 基于此, 本文以磷酰胺氮芥为药效基团, 将其与槐定碱进行拼合, 经开环反应、酯化反应、磷酰化反应等合成苯氧基

收稿日期: 2017-09-21

基金项目: 天津市自然科学基金资助项目 (17JCQNJC13600)

作者简介: 代霖霖, 男, 硕士, 研究方向为药物化学。E-mail: abcdll@whu.edu.cn

\*通信作者 李冬冬, 副研究员。E-mail: lidongdong2010@163.com

磷酸氮芥取代的槐定碱衍生物 **2a~2e**, 其结构经  $^1\text{H-NMR}$  和 ESI-MS 确证, 合成路线见图 1。并采用

MTT 法测定其对 S180、H22、K562、MCF-7、SMMC-7721、LoVo 肿瘤细胞的抑制活性。

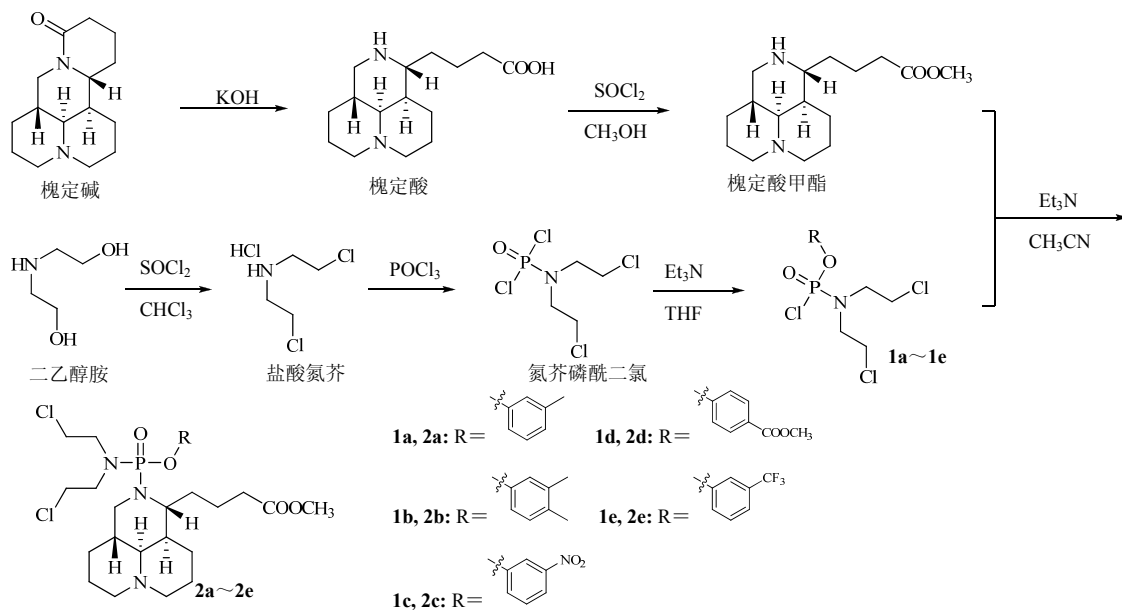


图 1 目标化合物的合成路线

Fig. 1 Synthetic route of target compounds

## 1 仪器与试剂

瑞士 Bruker AC-P400 型核磁共振仪; VGZAB-HS 型质谱仪[岛津(中国)有限公司]; BB5060 CO<sub>2</sub> 培养箱(德国贺利氏公司); 瑞士 Tecan Infinite M200 酶联免疫检测仪; 槐定碱(西安林禾生物技术有限公司, 质量分数 98%); 多柔比星(北京偶合科技有限公司, 质量分数 97%); 槐定酸、槐定酸甲酯、盐酸氮芥、氮芥磷酸二氯均按照参考文献合成<sup>[6-7]</sup>(质量分数均>97%); 其余所用试剂均为分析纯; S180、H22、K562、MCF-7、SMMC-7721、LoVo、L929 细胞购自军事医学科学院细胞库; 6RPMI 1640 培养基(Hyclone); MTT(Sigma-Aldrich); 新生牛血清(浙江天杭生物科技有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 合成部分

**2.1.1 3-甲基苯基二(2-氯乙基)氨基磷酸氯(1a)的合成** 在带有氯化钙干燥管的反应瓶中加入氮芥磷酸二氯(2.60 g, 10 mmol)、间甲基苯酚(1.08 g, 10 mmol)和 20 mL 无水四氢呋喃, 三乙胺(1.21 g, 12 mmol)溶于 30 mL 无水四氢呋喃, 于冰浴条件下滴加到上述反应瓶中, TLC 监测反应至完全, 滤过, 减压蒸馏除去溶剂, 石油醚-醋酸乙酯(2:1)洗脱, 柱色谱分离得到化合物 **1a** (2.65 g), 收率 80.15%。 $^1\text{H-NMR}$

(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.27 (t,  $J=7.7$  Hz, 1H, ArH), 7.07 (d,  $J=7.4$  Hz, 3H, ArH), 3.79~3.53 (m, 8H, CH<sub>2</sub>), 2.37 (s, 3H, ArCH<sub>3</sub>)。

化合物 **1b~1e** 参照上法合成, 结果如下:

**2.1.2 3,4-二甲基苯基二(2-氯乙基)氨基磷酸氯(1b)的合成** 氮芥磷酸二氯(2.60 g, 10 mmol)、3,4-二甲基苯酚(1.22 g, 10 mmol)、三乙胺(1.21 g, 12 mmol)反应得化合物 **1b** (2.83 g), 收率 82.20%。 $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.12 (d,  $J=8.1$  Hz, 1H, ArH), 7.07~6.90 (m, 2H, ArH), 3.74~3.52 (m, 8H, CH<sub>2</sub>), 2.25 (d,  $J=10.7$  Hz, 6H, ArCH<sub>3</sub>)。

**2.1.3 3-硝基苯基二(2-氯乙基)氨基磷酸氯(1c)的合成** 氮芥磷酸二氯(2.60 g, 10 mmol)、3-硝基苯酚(1.39 g, 10 mmol)、三乙胺(1.21 g, 12 mmol)反应得化合物 **1c** (3.09 g), 收率 85.70%。 $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.26~8.08 (m, 2H, ArH), 7.72 (d,  $J=7.3$  Hz, 1H, ArH), 7.63 (t,  $J=8.2$  Hz, 1H, ArH), 3.80~3.66 (m, 8H, CH<sub>2</sub>)。

**2.1.4 4-甲氧基苯基二(2-氯乙基)氨基磷酸氯(1d)的合成** 氮芥磷酸二氯(2.60 g, 10 mmol)、4-羟基苯甲酸甲酯(1.52 g, 10 mmol)、三乙胺(1.21 g, 12 mmol)反应得化合物 **1d** (2.82 g), 收率 75.32%。 $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.08 (d,  $J=8.6$  Hz,

2H, ArH), 7.34 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H, ArH), 3.91 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.76~3.58 (m, 8H, CH<sub>2</sub>)。

**2.1.5** 3-三氟甲基苯基二(2-氯乙基)氨基磷酰氯 (**1e**) 的合成 氮芥磷酰二氯 (2.60 g, 10 mmol)、3-三氟甲基苯酚 (1.62 g, 10 mmol)、三乙胺 (1.21 g, 12 mmol) 反应得化合物 **1e** (3.05 g), 收率 79.48%。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.54 (ddd,  $J=17.7$ 、9.2、2.6 Hz, 4H, ArH), 3.89~3.54 (m, 8H, CH<sub>2</sub>)。

**2.1.6** 槐定碱-磷酰胺氮芥拼合物 (**2a**) 的合成 在带有氯化钙干燥管的反应瓶中加入槐定酸甲酯 (3.80 g, 12 mmol)、三乙胺 (1.21 g, 12 mmol) 和 80 mL 无水乙腈, 室温搅拌, 将化合物 **1a** (3.31 g, 10 mmol) 溶于 20 mL 无水乙腈中, 滴加到上述反应瓶中, TLC 监测反应至完全, 滤过, 减压蒸馏除去溶剂, 石油醚-二氯甲烷 (1:1) 洗脱, 柱色谱分离得到化合物 **2a** (4.96 g), 收率 86.25%。ESI-MS  $m/z$ : 574.33 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.21 (td,  $J=7.8$ 、3.4 Hz, 1H, ArH), 7.14~6.94 (m, 3H, ArH), 3.66 (d,  $J=1.9$  Hz, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.62~3.39 (m, 8H, CH<sub>2</sub>), 3.24~3.12 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.02~2.72 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 2.53 (ddd,  $J=31.1$ 、18.2、11.7 Hz, 2H, CH、CH<sub>2</sub>), 2.35 (s, 3H, CH<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>), 1.82~1.05 (m, 15H, CH、CH<sub>2</sub>)。

化合物 **2b**~**2e** 参照上法合成, 结果如下:

**2.1.7** 槐定碱-磷酰胺氮芥拼合物 (**2b**) 的合成 槐定酸甲酯 (3.80 g, 12 mmol)、三乙胺 (1.21 g, 12 mmol)、化合物 **1b** (3.44 g, 10 mmol), 反应得到化合物 **2b** (4.73 g), 收率 80.32%。ESI-MS  $m/z$ : 588.40 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.03 (ddd,  $J=28.5$ 、15.0、6.2 Hz, 3H, ArH), 3.68 (d,  $J=1.5$  Hz, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.63~3.38 (m, 8H, CH<sub>2</sub>), 3.19 (ddd,  $J=13.4$ 、9.3、4.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.06~2.74 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 2.61~2.31 (m, 4H, CH、CH<sub>2</sub>), 2.29~2.20 (m, 6H, CH<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>), 2.03 (ddd,  $J=25.9$ 、13.1、3.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 1.96~0.68 (m, 15H, CH、CH<sub>2</sub>)。

**2.1.8** 槐定碱-磷酰胺氮芥拼合物 (**2c**) 的合成 槐定酸甲酯 (3.80 g, 12 mmol)、三乙胺 (1.21 g, 12 mmol)、化合物 **1c** (3.61 g, 10 mmol), 反应得到化合物 **2c** (5.00 g), 收率 82.62%。ESI-MS  $m/z$ : 605.40 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.07 (dd,  $J=22.7$ 、8.8 Hz, 2H, ArH), 7.68 (dd,  $J=34.8$ 、8.8 Hz, 1H, ArH), 7.53 (td,  $J=8.2$ 、3.4 Hz, 1H,

ArH), 3.67 (d,  $J=5.2$  Hz, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.61~3.48 (m, 5H, CH<sub>2</sub>), 3.30~3.21 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.10~2.89 (m, 4H, CH、CH<sub>2</sub>), 2.42 (qdd,  $J=34.6$ 、26.2、13.8 Hz, 7H, CH<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>), 1.76 (dtd,  $J=23.1$ 、16.3、12.3 Hz, 10H, CH、CH<sub>2</sub>), 1.52~1.22 (m, 5H, CH、CH<sub>2</sub>)。

**2.1.9** 槐定碱-磷酰胺氮芥拼合物 (**2d**) 的合成 槐定酸甲酯 (3.80 g, 12 mmol)、三乙胺 (1.21 g, 12 mmol)、化合物 **1d** (3.74 g, 10 mmol), 反应得到化合物 **2d** (5.47 g), 收率 88.55%。ESI-MS  $m/z$ : 618.40 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.07 (dd,  $J=8.6$ 、2.7 Hz, 2H, ArH), 7.41~7.32 (m, 2H, ArH), 3.95 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.70 (d,  $J=2.8$  Hz, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.65~3.44 (m, 8H, CH<sub>2</sub>), 3.24 (t,  $J=9.3$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.02~2.82 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 2.52 (ddd,  $J=70.3$ 、35.5、6.9 Hz, 7H, CH<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>), 1.86~1.29 (m, 15H, CH、CH<sub>2</sub>)。

**2.1.10** 槐定碱-磷酰胺氮芥拼合物 (**2e**) 的合成 槐定酸甲酯 (3.80 g, 12 mmol)、三乙胺 (1.21 g, 12 mmol)、化合物 **1e** (3.84 g, 10 mmol), 反应得到化合物 **2e** (4.94 g), 收率 78.65%。ESI-MS  $m/z$ : 628.47 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.56~7.33 (m, 4H, ArH), 3.62 (d,  $J=9.9$  Hz, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.59~3.35 (m, 8H, CH<sub>2</sub>), 3.15 (qd,  $J=13.8$ 、4.1 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.94~2.65 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 2.59~1.88 (m, 6H, CH<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>), 1.82~0.95 (m, 16H, CH、CH<sub>2</sub>)。

## 2.2 体外抗肿瘤活性

取对数生长期的 S180、H22、K562、MCF-7、SMMC-7721、LoVo 及 L929 细胞, 经 0.25% 胰酶消化后, 吹打成单细胞悬液, 用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 液调整细胞浓度为  $1 \times 10^5$ /mL, 接种于 96 孔板上, 每孔 100  $\mu$ L, 于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 下孵育 24 h。另取接种了肿瘤细胞 6~8 d 生长良好的 S180 荷瘤小鼠 1 只, 在无菌条件下抽取腹水, 用 PBS 洗涤 2 次。用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 液调整细胞浓度至  $1 \times 10^6$ /mL 单细胞悬液, 接种于 96 孔板上, 每孔 100  $\mu$ L, 加入梯度稀释的 **2a**~**2e** 溶液 (浓度梯度分别为 0.61、1.22、2.44、4.88、9.76、19.53、39.06、78.12、156.25、312.50  $\mu$ mol/L), 每孔 100  $\mu$ L; 对照组中加入 100  $\mu$ L RPMI 1640 液, 在 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 孵育箱中培养 72 h, 培养结束后, 每孔中加入 10  $\mu$ L MTT 溶液, 再继续培养 4 h, 弃

去上清液, 每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO, 震荡 1 min, 使生成的甲磺颗粒完全溶解, 在酶标仪上测定 570 nm 处的吸光度 ( $A$ ), 计算抑制率, 以抑制率对浓度作图, 得回归方程, 抑制率为 50% 的浓度即为  $\text{IC}_{50}$ 。多柔比星为阳性对照物, 非肿瘤细胞 L929 作为选择性毒性参考。目标化合物 **2a**~**2e** 的体外抗肿瘤

瘤活性见表 1。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

从表 1 可以看出, 对于所测试的 7 种细胞株, 目标化合物 **2a**~**2e** 均对 S180 和 H22 细胞株具有很强的选择性且都优于阳性对照药多柔比星, 综合  $\text{IC}_{50}$  值在 2.10~7.00  $\mu\text{mol/L}$ 。

表 1 目标化合物 **2a**~**2e** 的体外抗肿瘤活性

Table 1 Antitumor effect of target compounds **2a**—**2e** *in vitro*

化合物	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$						
	S180 细胞	H22 细胞	K562 细胞	MCF-7 细胞	SMMC-7721 细胞	LoVo 细胞	L929 细胞
<b>2a</b>	2.34	2.63	12.72	26.68	26.44	23.06	66.56
<b>2b</b>	2.13	2.16	18.32	20.58	29.56	24.26	32.93
<b>2c</b>	6.86	7.00	26.86	63.44	86.24	44.87	94.55
<b>2d</b>	3.87	5.21	41.09	66.38	49.46	18.99	122.24
<b>2e</b>	2.13	4.14	20.42	23.03	25.60	18.75	32.61
多柔比星	29.20	36.51	17.23	0.44	1.22	0.15	0.23

### 3 讨论

对于化合物 **1a**~**1e** 的合成, 因氮芥磷酰二氯结构中供电子基团氮芥的引入, 使磷酰基的反应活性降低, 需要加入缚酸剂才能使反应进行, 研究发现三乙胺和吡啶均合适, 但是三乙胺较吡啶环境友好, 更易后处理分离, 本研究选择三乙胺作碱; 三氯甲烷作溶剂使反应成分复杂, 选择四氢呋喃作溶剂, 反应产生的三乙胺盐酸盐在四氢呋喃溶液中以沉淀形式析出, 使反应向右推进且后处理简单。该步骤中, 含有对位或间位取代基的酚较易反应, 而含有邻位取代基的酚几乎不反应, 可能原因是空间位阻效应对该步反应的影响较大。

对于 S180 细胞株, 3,4-二甲基取代物 **2b** 与 3-三氟甲基取代物 **2e** 具有同等的抑制活性。对于 H22 细胞株, 化合物 **2b** 的活性约为多柔比星的 18 倍。对于 K562 细胞株, 3-甲基取代物 **2a** 的活性优于多柔比星, 化合物 **2b** 与多柔比星活性相当。虽然多柔比星对 MCF-7、SMMC-7721 及 LoVo 细胞具有很强的抑制活性 ( $\text{IC}_{50}$  值分别为 0.44、1.22、0.15  $\mu\text{mol/L}$ ), 但多柔比星对正常细胞 L929 同样具有很强的抑制活性 ( $\text{IC}_{50}$  值为 0.23  $\mu\text{mol/L}$ ), 这说明多柔比星对于正常细胞 L929 没有选择性; 而 **2a**~**2e** 却能选择性抑制肿瘤细胞, 而对正常细胞 L929 抑制作用很弱 ( $\text{IC}_{50} > 32 \mu\text{mol/L}$ ), 其中 4-甲酸甲酯取代物 **2d** 对 L929 毒性最弱 ( $\text{IC}_{50}$  值为 122.24  $\mu\text{mol/L}$ )。

双甲基取代物 **2b** 和单甲基取代物 **2a** 相比, 化合物 **2b** 对于 S180 和 H22 的活性优于化合物 **2a**。

本文设计合成了 5 个苯氧基磷酰氮芥取代的槐定碱衍生物, 并对其进行了体外抗肿瘤活性研究。体外细胞活性测试结果表明所有化合物对 S180 和 H22 细胞株更敏感, 且对正常细胞 L929 毒性小于阳性对照药多柔比星, 部分化合物抑制活性高于多柔比星, 综合考虑, 化合物 **2b** 为有潜力的候选化合物。

### 参考文献

- [1] 田真真, 万红娇, 杨翠萍. 槐定碱的药理研究综述 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(11): 219-221.
- [2] 李学梅, 吴运光, 潘达鑫, 等. 新型抗肿瘤药槐定碱 [J]. 中国新药杂志, 2006, 15(8): 654-657.
- [3] Li D D, Dai L L, Zhang N, *et al.* Synthesis, structure-activity relationship and biological evaluation of novel nitrogen mustard sophoridinic acid derivatives as potential anticancer agents [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25(19): 4092-4096.
- [4] 闫国瑞, 郑晓辉, 陶遵威, 等. 氮芥型槐定碱衍生物的合成及抗肿瘤活性 [J]. 化学试剂, 2014, 36(2): 109-113.
- [5] Liu K, Li D D, Zhao X M, *et al.* Synthesis, cytotoxicity, topoisomerase I inhibition and molecular docking of novel phosphoramidate mustard sophoridinic acid analogues [J]. *Appl Org Chem*, 2017, 31(2): e3565.
- [6] 龙启才. 五例老年恶性肿瘤患者环磷酰胺的药代动力学 [J]. 癌症, 1991, 10(6): 457-459.