

5-氟尿嘧啶修饰卟啉的合成及抗肿瘤活性

任丽磊* 彭晚霞 赵秀丽 祝红梅

(廊坊师范学院化学与材料科学学院 河北 廊坊 065000)

摘 要 合成了一种5-氟尿嘧啶修饰的自由卟啉(5-[2-(5-氟尿嘧啶-3-基)乙氧基苯基]-10,15,20-三(4-甲氧基苯基)卟啉)及其2种金属卟啉配合物:5-[2-(5-氟尿嘧啶-3-基)乙氧基苯基]-10,15,20-三(4-甲氧基苯基)锰卟啉和5-[2-(5-氟尿嘧啶-3-基)乙氧基苯基]-10,15,20-三(4-甲氧基苯基)锌卟啉。通过紫外可见光谱(UV-Vis)、红外光谱(IR)和核磁共振谱氢谱(^1H NMR)对目标化合物进行了结构表征。用噻唑蓝法(MTT法)测定了自由卟啉、锰卟啉及锌卟啉分别对肺腺癌细胞株 A549、肝癌细胞株 Bel7402 和人结肠癌细胞株 HCT-8 的抑制活性。其中,锰卟啉对人结肠癌细胞株 HCT-8 的半抑制浓度为 IC_{50} 为 17.8 mg/L,具有一定的细胞毒作用。

关键词 卟啉; 氟尿嘧啶; 抗肿瘤活性

中图分类号: O626

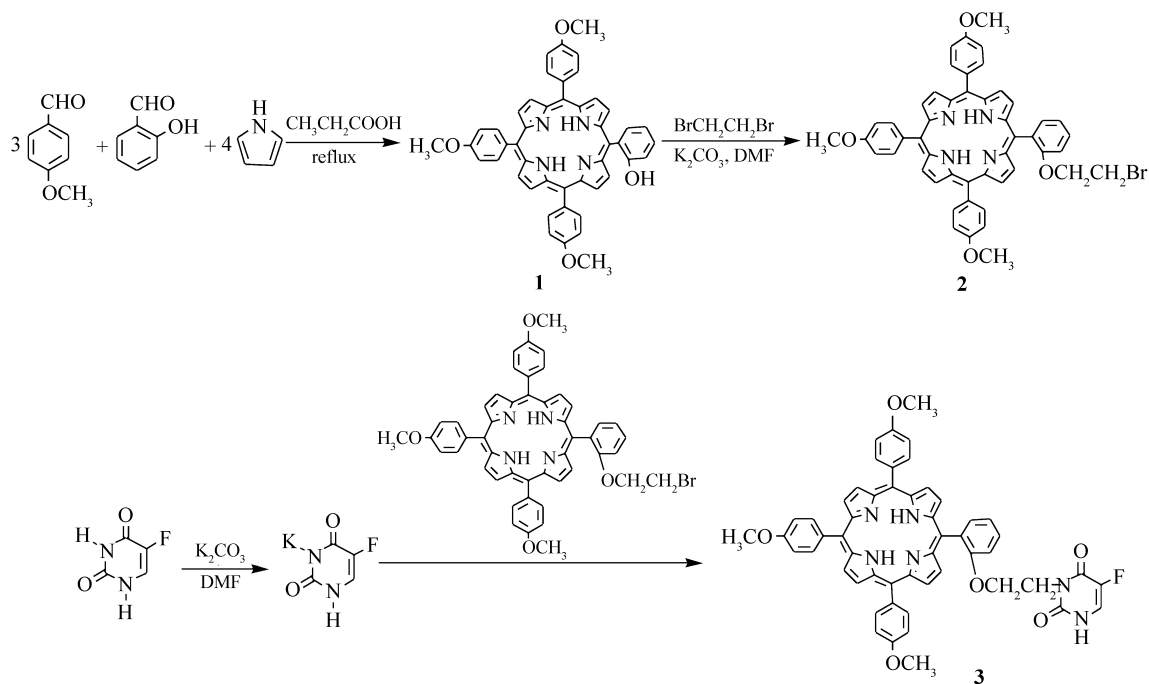
文献标识码: A

文章编号: 1000-0518(2016)12-1415-05

DOI: 10.11944/j.issn.1000-0518.2016.12.160054

5-氟尿嘧啶(5-FU)是临床应用的广谱抗肿瘤药物,其主要缺点是服药有效剂量与中毒剂量相近,在杀死癌细胞的同时正常细胞损伤也较严重。为此,科研工作者对5-FU进行了大量的化学修饰并取得显著效果^[1-3]。利用卟啉对癌细胞有特殊的亲合性,能够在癌细胞中有选择性地滞留^[4-5],本文将卟啉与5-FU连接起来,合成了一种卟啉-5-氟尿嘧啶(**3**)及金属锰卟啉(**3a**)和锌卟啉(**3b**),并通过紫外可见光谱(UV-Vis)、红外光谱(IR)和核磁共振谱氢谱(^1H NMR)确证了产物的结构。初步测试了它们对肺腺癌细胞株 A549、肝癌细胞株 Bel7402 和人结肠癌细胞株 HCT-8 的抑制活性,得出了一些有意义的结论。

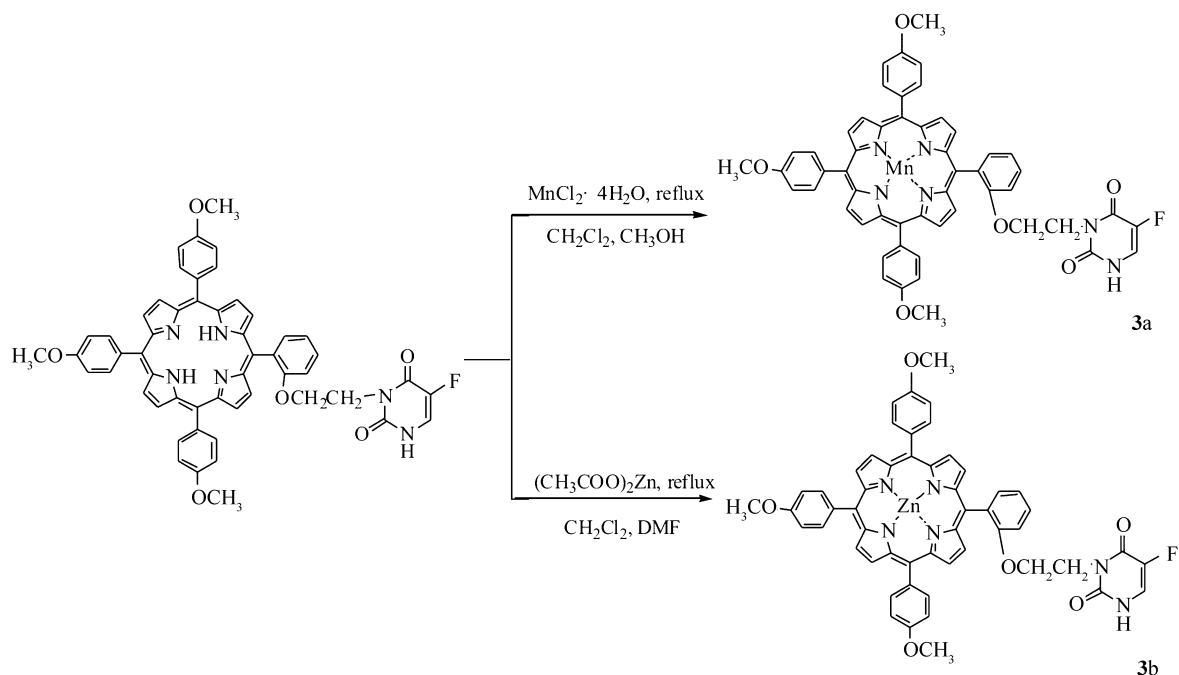
合成路线如 Scheme 1 所示。



2016-02-01 收稿, 2016-04-12 修回, 2016-05-11 接受

河北省教育厅青年基金(QN2014117)和廊坊师范学院青年基金(LSZQ201204)资助项目

通讯联系人: 任丽磊, 讲师; Tel: 0316-2188370; E-mail: renll1409@163.com; 研究方向: 有机合成



Scheme 1 The synthetic route of the inter mediates and target compounds

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

UV-2501(PC)S 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);FTIR8900 型傅里叶变换红外光谱仪(日本岛津公司);Mercury-400 型核磁共振仪(美国 Varian 公司)。

5-氟尿嘧啶,生化试剂,购自百灵威试剂公司,其它试剂均为分析纯,购自天津北方天医化学试剂公司;吡咯和 1,2-二溴乙烷使用前重蒸;5-氟尿嘧啶,用水重结晶,mp 281 °C;碳酸钾使用前焙干;5-邻羟基苯基-10,15,20-三(对甲氧基苯基)卟啉(**1**)和 5-邻(2-溴乙氧基)苯基-10,15,20-三(对甲氧基苯基)卟啉(**2**)参照文献[6]方法合成。

1.2 5-[2-(5-氟尿嘧啶-3-基)乙氧基苯基]-10,15,20-三(4-甲氧基苯基)卟啉(**3**)的合成

加入 5-氟尿嘧啶 130 mg(1 mmol)和 *N,N'*-二甲基甲酰胺(DMF)30 mL 于 100 mL 干燥圆底烧瓶中,加热搅拌,促进 5-氟尿嘧啶溶解。再加入焙烧过的无水 K_2CO_3 166 mg(1.2 mmol),油浴 80 °C 电磁搅拌反应 1 h,使 5-氟尿嘧啶生成钾盐,然后向其中加入 100 mg(0.12 mmol) 5-邻(2-溴乙氧基)苯基-10,15,20-三(4-甲氧基苯基)卟啉(**2**),升温至 120 °C,10 h 后停止反应。冷却,用饱和 NaCl 溶液盐析,抽滤,水洗,干燥得紫色晶体。粗产品用柱色谱分离,用氯仿与丙酮体积比为 10:1 的混合液淋洗,收集第二色带,旋转蒸发浓缩,干燥得 17 mg 紫色晶体化合物 **3**,产率为 16%。

1.3 金属卟啉-5-氟尿嘧啶 **3a**、**3b** 的合成

称取化合物 **3** 49.6 mg(0.056 mmol)溶于 20 mL 二氯甲烷中,加入 110.8 mg(0.56 mmol)氯化锰溶于 DMF 制成的饱和溶液,电磁搅拌下回流,反应 2 h。冷却,水洗,分液。水浴蒸干。粗产品用氯仿与丙酮体积比为 5:1 的混合液洗脱。收集最浓绿色带,旋转蒸发蒸去溶剂,干燥得绿色固体 **3a** 41.8 mg,产率为 80.4%。按上述方法,用 102.9 mg(0.56 mmol)乙酸锌代替氯化锰,得紫红色固体 **3b** 35.7 mg,产率为 67.9%。

1.4 抗癌活性实验

初步筛选:将传代培养的肺腺癌细胞株 A549、肝癌细胞株 Bel7402 和人结肠癌细胞株 HCT-8,用胰酶消化后,用含体积分数 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液配成浓度为 1.5×10^4 个/mL 的细胞悬液。接种于 96 孔培养板内,每孔接种 180 μL (含 2700 个肿瘤细胞),37 °C 下 5% CO_2 环境培养 24 h。实验组

加样品 20 μL , 每种样品平行 3 个孔, 每孔终体积为 200 μL , 用 1640 培养液补足, 使得样品终浓度为 10 mg/L , 另设阳性对照组。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 5% CO_2 环境培养 48 h。后弃上层清液, 每孔加入 100 μL 新鲜配制的 0.5 g/L MTT 无血清培养液(用 RPMI-1640 配制, 避光保存于 -20°C)。37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 4 h, 小心弃去上层清液, 并加入 150 μL 二甲基亚砜(DMSO)溶解甲臌(formazon)沉淀, 用微型超声振荡器混匀, 在酶标仪上测定波长 570 nm 处的光密度值(OD)。以无肿瘤细胞培养为对照组, 计算药物对肿瘤细胞的抑制率:

$$\text{肿瘤细胞的生长抑制率}/\% = \frac{\text{OD 对照} - \text{OD 实验}}{\text{OD 对照} - \text{OD 空白}} \times 100$$

在此基础上, 进一步筛选: 样品抑制率大于 50% 的样品进行半数抑制率(IC_{50})实验, 即将待测样品以 0.08、0.4、2、10 和 50 mg/L 不同浓度加入 96 孔培养板内, 每个浓度平行 3 个孔, 实验方法同上, 测定波长 570 nm 处的光密度值(OD), 通过 Excel 中的 Forecast 计算 IC_{50} 值。

2 结果与讨论

2.1 目标化合物的结构表征

化合物 **3**: UV-Vis(CHCl_3), $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$: Soret band 421.4, Q band 517.5, 553.8, 592.3, 648.8; IR(KBr), σ/cm^{-1} : 3473.80(N—H), 2922.16, 2850.79(C—H, —CH₂—), 1637.56(C=O in 5-FU), 1506.41, 1465.90(benzene ring and porphyrin ring C=C), 1379.10(C—N), 1246.02(C—O—C); ^1H NMR(CDCl_3 , 400 MHz), δ : 2.714(s, 2H, porphyrin N—H), 4.082(m, 9H + 2H, 3OCH₃ + OCH₂), 4.309 ~ 4.322(m, 2H, —NCH₂), 7.289 ~ 7.421(m, 6H + 4H, 3Ar-*m*-H + ArO-*o*, *m*, *p*-H), 7.759(s, 1H, C—H in 5-FU), 7.997 ~ 8.230(m, 6H, 3Ar-*o*-H), 8.683 ~ 8.860(m, 8H, pyrrole-H)。

化合物 **3a**: UV-Vis(CHCl_3), $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$: Soret band 480.4, Q band 585.0, 622.0; IR(KBr), σ/cm^{-1} : 3423.65(N—H), 2920.23(C—H, —CH₂—), 1637.56(C=O in 5-FU), 1415.15, 1492.90(benzene ring and porphyrin ring C=C), 1380.10(C—N), 1248.02(C—O—C), 1006.84(Mn—N)。

化合物 **3b**: UV-Vis(CHCl_3), $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$: Soret band 422.6, Q band 549.8, 589.4; IR(KBr), σ/cm^{-1} : 3448.72(N—H), 2920.23, 2850.79(C—H, —CH₂—), 1653.00(C=O in 5-FU), 1458.18, 1516.05, 1568.13(benzene ring and porphyrin ring C=C), 1381.03(C—N), 1244.09(C—O—C), 995.27(Zn—N); ^1H NMR(CDCl_3 , 400 MHz), δ : 4.025 ~ 4.069(m, 9H + 2H, 3OCH₃ + OCH₂), 4.314 ~ 4.328(m, 2H, —NCH₂), 7.208 ~ 7.385(m, 6H + 4H, 3Ar-*m*-H + ArO-*o*, *m*, *p*-H), 7.745(s, 1H, C—H in 5-FU), 7.923 ~ 8.191(m, 6H, 3Ar-*o*-H), 8.732 ~ 8.937(m, 8H, pyrrole-H)。

从上述紫外可见光谱数据可以看出: 1) 化合物 **3** 的紫外光谱有一个 Soret 带和 4 个 Q 带。根据 Gouterman 的四轨道模型^[7], 在 421.4 nm 处的吸收带是 Soret 带, 由 $\text{a}1\mu(\pi) \rightarrow \text{eg}(\pi^*)$ 电子跃迁产生, 归属为卟啉环内 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁的第二电子激发态; 吸收光谱在 500 ~ 650 nm 之间的是 Q 带, 由 $\text{a}2\mu(\pi) \rightarrow \text{eg}(\pi^*)$ 电子跃迁产生, 归属为卟啉环内 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁的第一电子激发态; 2) 化合物 **3** 配合金属离子形成化合物 **3a** 和 **3b** 后, 紫外光谱中 QI、QIV 带消失。分析原因是, Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 是 d_{10} 组态的金属离子, 当与自由卟啉配位后, 形成 N—M 键, 配合物的对称性发生变化, 且能级靠近, 分子轨道的分裂程度减少, 简并度增加, Q 带数目相应减少, 表现为 QI、QIV 谱带消失^[8]; 3) 与化合物 **3b** 相比, 化合物 **3a** 的 Soret 带明显红移至 480.4 nm。分析原因为: 两种金属离子的相对离子半径大小顺序为 Mn^{2+} (88 pm) > Zn^{2+} (74 pm), 而电负性 Mn^{2+} (1.5) < Zn^{2+} (1.6), 因此锰对外层价电子的束缚能力较弱, 使得电子更容易流向卟啉环, 从而引起整个卟啉环的电子云密度升高, 降低卟啉环的电子跃迁所需要的能量, 使得 Soret 带红移较多, 因此, 化合物 **3a** 具有锰卟啉的结构特征^[9]。

从上述红外光谱数据可以看出: 在化合物 **3** 中, 羰基的特征吸收峰出现在 1637.56 cm^{-1} , 在 1246.02 cm^{-1} 处有醚键的典型特征吸收峰^[10], 表明 5-FU 是以醚键的形式与卟啉侧端的乙氧链相连。再观察化合物 **3a** 和 **3b** 的红外光谱数据, 分别在 1006.84 和 995.27 cm^{-1} 处出现了新的强伸缩振动吸收峰, 该峰归属于 N—Mn 键和 N—Zn 键的特征吸收峰, 这些数据均表明, 合成了稳定的金属卟啉配合物。

参照文献[6]对化合物 **3** 和 **3b** 的核磁共振氢谱进行了归属,由上述数据可以看出:化合物 **3** 中卟啉环内N—H键的化学位移在 δ -2.714 处,这是由于卟啉环的大环 π 电子体系,在外磁场作用下,会产生一个对抗的感应磁场,而卟啉环内的 NH 处于很强的屏蔽区,因此 NH 的化学位移向高场移动,移到了参考峰 TMS(δ 0.00)的高场,故 δ 为负值。而在化合物 **3b** 中该峰消失,说明生成了新的金属卟啉配合物;而 5-FU 中的N—H由于没有处在屏蔽区,故它的 δ 为正,应在 9 以上^[10]。但由于受溶剂的影响,积分比又小,该峰未显示出来。

2.2 目标化合物对肿瘤细胞的抑制活性

分别测试了化合物 **3**、**3a** 和 **3b** 对肺腺癌细胞株 A549、肝癌细胞株 Bel7402 和人结肠癌细胞株 HCT-8 的抑制活性,抑制率见表 1。结果表明:1)样品浓度为 10 mg/L 时,除化合物 **3** 对 A549 抑制率为负值外,3 种样品对上述 3 种细胞株均有一定的抑制作用。但抑制活性均低于阳性对照药 5-氟尿嘧啶,也未达到文献^[5]的数值,分析原因可能是卟啉-5-FU 化合物对细胞株有很强的选择性,对上述 3 种细胞株选择性较差,对其它细胞株的抑制活性将在后续工作中进行;2)卟啉配体 **3a** 对 3 种细胞株的抑制率明显高于化合物 **3** 和 **3b**,抑制率分别为 50.15%、55.35% 和 31.27%,说明卟啉化合物的抗肿瘤活性与中心金属离子有关,锰卟啉对癌细胞的抑制活性较锌卟啉和自由卟啉要高很多;3)化合物 **3a** 对人结肠癌细胞株 HCT-8 的抑制率最高,为 55.35%,也表明卟啉化合物的抗肿瘤活性具有一定的选择性,对不同的肿瘤细胞的作用机理可能不一样^[11]。此外,对抑制率大于 50% 的化合物 **3a** 进行半数抑制率 IC₅₀ 实验,结果表明,锰卟啉对人结肠癌细胞株 HCT-8 的半抑制浓度 IC₅₀ 为 17.8 mg/L,具有一定的细胞毒作用。有关取代基的不同以及碳链长短对抗肿瘤活性的影响正在研究中。

表 1 化合物 **3**、**3a**、**3b** 对 A549、Bel7402、HCT-8 的抑制率
Table 1 Inhibition rates of compound **3**, **3a** and **3b** to A549, Bel7402 and HCT-8

Compound	Inhibition rates to Bel7402/%	Inhibition rates to A549/%	Inhibition rates to HCT-8/%
3	7.60	1.36	-5.06
3a	50.15	55.35	31.27
3b	4.75	4.90	0.41
5-FU	70.57	70.38	68.32

3 结 论

合成了一种 5-氟尿嘧啶修饰的自由卟啉及其 2 种金属卟啉配合物:锰卟啉和锌卟啉,并对 3 种化合物结构和性能进行了表征。与自由卟啉和锌卟啉相比,锰卟啉对 HCT-8 肿瘤细胞的半抑制浓度 IC₅₀ 为 17.8 mg/L,具有较好的抗肿瘤活性,在人结肠癌治疗领域具有潜在的应用前景。

致谢:抑制活性由中国医学科学院药物研究所国家药物筛选中心测试,特此感谢。

参 考 文 献

[1] Li M,Zhang J,Feng L,*et al.* The *In Vitro* Anti-tumor Efficacy and the Pharmacokinetics of N3-*o*-toluylfluorouracil Loaded Nanosuspension(TFu-LNS)[J]. *J Biomed Nanotechnol*,2013,**9**(5):801-810.

[2] Sun W T,Zhang N,Li X. Release Mechanism Studies on TFu Nanoparticles-in-microparticles System[J]. *Colloids Surf B*, 2012,**95**(6):115-120.

[3] TONG Chunyi,TANG Fengxia,LIU Bin,*et al.* Preparation of Micro-spheres Co-carried Anti-tumor Drug and Sensitizer(5-Fu-COS/SeNP) and Their Inhibiting Tumorous Cellular Growths Activity[J]. *Chem J Chinese Univ*,2014,**35**(7):1603-1607(in Chinese).

童春义,唐凤霞,刘斌,等. 氟尿嘧啶-壳寡糖/硒纳米微球的制备及抑制肿瘤细胞生长活性[J]. 高等学校化学学报,2014,**35**(7):1603-1607.

[4] LIU Yanqin,ZHANG Huijuan,HAN Shitian. Synthesis and Antitumor Activity of 5-Fluorouracil-porphyrin Compounds[J]. *Chinese J Org Chem*,2002,**22**(4):279-282(in Chinese).

刘彦钦,张慧娟,韩士田. 5-氟尿嘧啶-卟啉化合物的合成及抗癌活性[J]. 有机化学,2002,**22**(4):279-282.

[5] HAN Junxing,LIU Yanqin,HAN Shitian. Synthesis of *m*-Chlorophenyl Mn-porphyrin-5-Fluorouracil Complexes and Their Inhibition Activity to Cancer Cells[J]. *Chinese J Appl Chem*,2012,**29**(6):718-720(in Chinese).

- 韩军兴,刘彦钦,韩士田. 间氯苯基锰卟啉-5-氟尿嘧啶配合物的合成及其对癌细胞的抑制活性[J]. 应用化学, 2012, **29**(6):718-720.
- [6] PENG Yuling, WANG Shujun, FU Li, *et al.* Synthesis of Tailed Porphyrin Modified with Nicotinic Acid and Interactions with Human Serum Albumin[J]. *Acta Phys-Chim Sin*, 2012, **28**(5):1054-1062 (in Chinese).
彭玉苓,王树军,傅丽,等. 烟酸修饰尾式卟啉的合成及其与人血清白蛋白的相互作用[J]. 物理化学学报, 2012, **28**(5):1054-1062.
- [7] Gouterman M. Spectra of Porphyrins[J]. *J Mol Spectrosc*, 1961, **6**:138-163.
- [8] SUN Erjun, WANG Dong, CHENG Xiuli, *et al.* Preparation and Properties of 5, 10, 15, 20-Tetra(4-myristylimidophenyl) Porphyrin and Its Zn and Mn Complexes[J]. *Chem J Chinese Univ*, 2007, **28**(7):1208-1213 (in Chinese).
孙二军,王栋,程秀丽,等. 5,10,15,20-四(对-十四酰亚胺基苯基)卟啉及其锰、锌配合物的合成及性质[J]. 高等学校化学学报, 2007, **28**(7):1208-1213.
- [9] ZHAO Shengfang, CHEN Nianyou, XIA Jingping, *et al.* Microwave Synthesis and Spectroscopic Property of Tetra(2-hydroxyphenyl) Porphyrin and Its Metal Complexes[J]. *J Wuhan Univ Technol*, 2013, **35**(11):43-46 (in Chinese).
赵胜芳,陈年友,夏静平,等. 四(2-羟基苯基)卟啉及系列金属配合物的微波合成和光谱性质[J]. 武汉理工大学学报, 2013, **35**(11):43-46.
- [10] YANG Qiuqing, HAN Shitian, ZHANG Huijuan. Spectral and Antitumor Activity Studies of Tail-porphyrin-5-Fluorouracil and Their Metallic Manganese Complexes[J]. *Chinese J Anal Chem*, 2001, **29**(12):1379-1383 (in Chinese).
杨秋青,韩士田,张慧娟. 尾式卟啉-5-氟尿嘧啶及其金属络合物的光谱分析[J]. 分析化学, 2001, **29**(12):1379-1383.
- [11] LI Meirong, CAI Xiaoqing, ZHU Yifeng, *et al.* Synthesis and Biological Evaluation of Novel Coupling Derivatives of Photosensitizer and 5-Fluorouracil as Antineoplastic Agents[J]. *Acta Chim Sin*, 2011, **69**(4):425-430 (in Chinese).
李美容,蔡晓庆,朱易峰,等. 5-氟尿嘧啶光敏性偶联衍生物的合成、表征及抗癌活性研究[J]. 化学学报, 2011, **69**(4):425-430.

Synthesis and Antitumor Activity of Porphyrin Modified with 5-Fluorouracil

REN Lilei*, PENG Xiaoxia, ZHAO Xiuli, ZHU Hongmei

(Faculty of Chemistry and Material Science, Langfang Teachers University, Hebei, Langfang 065000, China)

Abstract The porphyrin modified with 5-fluorouracil (5-[2-(5-fluorouracil-3-yl)-ethoxyphenyl]-10,15,20-tri(4-methoxyphenyl) porphyrin) and its two metal porphyrin complexes: 5-[2-(5-fluorouracil-3-yl)-ethoxyphenyl]-10,15,20-tri(4-methoxyphenyl) Mn porphyrin and 5-[2-(5-fluorouracil-3-yl)-ethoxyphenyl]-10,15,20-tri(4-methoxyphenyl) Zn porphyrin were synthesized. The structures of the three compounds were characterized by ultraviolet visible spectroscopy (UV-Vis), infrared spectroscopy (IR) and proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H NMR). The antitumor activities of these compounds to A549, Bel7402, HCT-8 were tested using the methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method. The results show that the IC_{50} value of Mn porphyrin to HCT-8 is 17.8 mg/L.

Keywords porphyrin; fluorouracil; antitumor activity

Received 2016-02-01; Revised 2016-04-12; Accepted 2016-05-11

Supported by the Youth Foundation of Hebei Province Education Department (No. QN2014117), the Youth Foundation of Langfang Teachers University (No. LSZQ201204)

Corresponding author: REN Lilei, lecturer; Tel: 0316-2188370; E-mail: renll1409@163.com; Research interests: organic synthesis