

去氢骆驼蓬碱衍生物的合成和抗肿瘤活性研究

郭亮^{1,2}, 孙洁², 范文奎², 马芹^{2*} (1.石河子大学药学院, 新疆 石河子 832002; 2.华世丹药物研究有限责任公司, 乌鲁木齐 830011)

摘要: 目的 合成去氢骆驼蓬碱衍生物并研究其抗肿瘤活性。方法 以去氢骆驼蓬碱为原料, 在 NaH 催化下先用卤代烷烃对 9 位氮原子进行烷基化, 然后用溴化苄将 2 位氮原子进行季铵化, 得到一系列去氢骆驼蓬碱衍生物, 用 MTT 法考察其对肿瘤细胞的抑制作用。结果 合成了 6 个新的去氢骆驼蓬碱衍生物, 结构经 ¹H-NMR、MS 和红外光谱确证。与去氢骆驼蓬碱相比, 所合成的化合物均有明显的抗肿瘤活性。结论 初步药理实验结果表明去氢骆驼蓬碱 9-苯丙基取代能够明显提高抗肿瘤效果。

关键词: 去氢骆驼蓬碱; 合成; 抗肿瘤活性

中图分类号: R284.3

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)05-0385-04

Synthesis and Antitumor Activities of Harmine Derivatives

GUO Liang^{1,2}, SUN Jie², FAN Wenxi², MA Qin^{2*} (1.College of Pharmaceutical, Shihezi University, Shihezi 832002, China; 2.Huashidan Pharmaceutical Research Co., Ltd., Urumqi 830011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To synthesize a series of harmine derivatives and determine their antitumor activity. **METHODS** The target compounds were synthesized from the starting material harmine by reaction with halogenated hydrocarbon in the presence of sodium hydride in DMF, and then quaternarized with benzyl bromide in ethyl acetate. The antitumor activity of the target compounds was studied by MTT method. **RESULTS** Six novel harmine derivatives were synthesized, and their structures were characterized by ¹H-NMR, MS and IR spectra. All compounds had more potent cytotoxic activities *in vitro* than harmine. **CONCLUSION** The preliminary results showed that the phenylpropyl substituent at position-9 increased antitumor activity.

KEY WORDS: harmine; synthesis; antitumor activity

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09102-004)

作者简介: 郭亮, 男, 硕士生 Tel: (0991)6683568 E-mail: guoliang_xj@163.com *通信作者: 马芹, 女, 硕士, 副主任药师 Tel: (0991)6655598 E-mail: mq7895@163.com

去氢骆驼蓬碱(Harmine)是一种 β -咔啉类生物碱, 从蒺藜科植物骆驼蓬的种子中提取得到, 结构式见图 1。骆驼蓬在我国西北地区尤其是新疆资源丰富, 是蒙古族、维吾尔族的习用药材, 主要用于消化道肿瘤的治疗^[1-4]。我国于 20 世纪 80 年代在新疆首次将骆驼蓬种子总碱制剂用于治疗消化道肿瘤 21 例, 有效率为 85.7%^[5], 其抗肿瘤作用引起了国内的广泛重视。本研究通过合成一系列的衍生物, 并进行抗肿瘤评价, 对于更好地开发利用新疆的植物药资源具有实际意义。本实验以自行提取、分离的去氢骆驼蓬碱(1)为原料, 在氢化钠作用下, 用卤代烃对其仲胺氮进行烷基化, 生成中间体 2a~7a, 然后再用溴化苄对 2 位氮原子进行季铵化得到目标产物 2~7, 结构均经 $^1\text{H-NMR}$, IR 和 MS 确认。用 MTT 法对所合成化合物进行初步的体外抗肿瘤活性评价。设计化合物的合成路线见图 2。

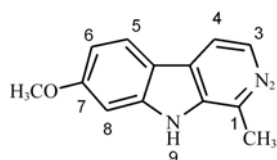


图 1 去氢骆驼蓬碱的结构式
Fig 1 The structure of harmine

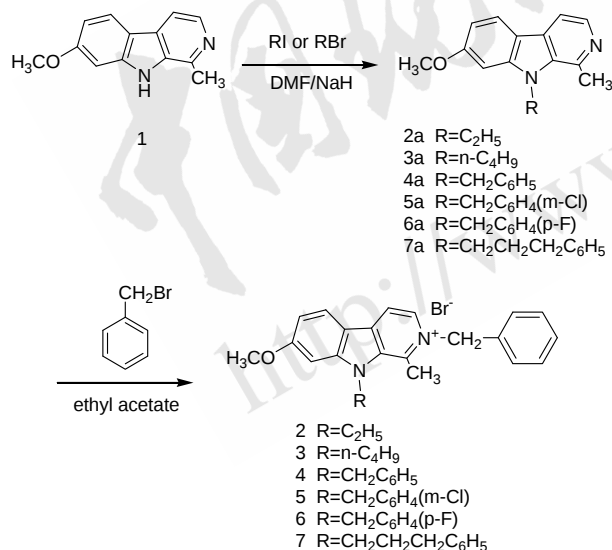


图 2 去氢骆驼蓬碱衍生物的合成路线
Fig 2 The synthesis route of harmine derivatives

1 仪器与试剂

RE-52AA 旋转蒸发仪(上海亚荣生化设备有限公司); JM-3102 型电子天平(余姚纪铭设备有限公司); ZF-1 型紫外分析仪(上海顾村电光仪器厂);

X-4 熔点测定仪(河南巩义予华仪器厂), 温度未校正; 红外干燥箱(河南巩义予华仪器厂); UV757CRT 紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); bruker equinox 55 型红外光谱仪(德国产); Varian Saturan 2000 型质谱仪; inova-400 型核磁共振仪, TMS 为内标。超净工作台(苏净集团安泰公司); 酶标仪(BIO-RAD); 倒置显微镜(重庆光电仪器有限公司); 液氮罐(成都金凤液氮容器有限公司); AR 测定仪(上海精密科学仪器有限公司); 离心机(江苏省金坛市医疗仪器厂); 恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器厂); 灭菌锅(上海佳胜实验设备有限公司实验设备厂)。

碘乙烷(分析纯, 中国医药集团上海试剂公司); 碘代正丁烷(分析纯, 上海金山亭新化学试剂厂); 溴化苄(分析纯, 美国 ACROS 有机试剂公司); 4-氟溴苄(分析纯, 美国 ACROS 有机试剂公司); 其余试剂均为国产分析纯或化学纯。

细胞株: 实验共用 6 株肿瘤细胞株。Bel-7402(肝癌, 购自中科院上海细胞库); MCF7(乳腺癌, 购自中科院上海细胞库); 786-0(人肾透明细胞腺癌, 购自中科院上海细胞库); Blu-87(膀胱癌, 购自武汉中国典型培养物保藏中心); 769-P(肾癌, 购自武汉中国典型培养物保藏中心); BGC-823(胃癌, 新疆医科大学赠送)。

2 合成方法

2.1 中间体 2a~7a 的合成

取去氢骆驼蓬碱(2.12 g, 10 mmol), N,N-二甲基甲酰胺(30 mL), 氢化钠(0.30 g, 12 mmol)加入反应管中, 待溶解后加入相应的卤代烷烃(12~20 mmol)。反应完全后倒入水中, 用乙酸乙酯萃取。有机相水洗, 饱和氯化钠洗, 无水硫酸钠干燥, 活性炭脱色, 柱层析, 乙酸乙酯为洗脱剂, 收集洗脱液, 浓缩至干, 即得产物 2a~7a。

1-甲基-9-乙基-7-甲氧基- β -咔啉(2a): 得白色晶体, 收率 76.5%, mp 98~100 $^{\circ}\text{C}$ (文献[6]: 99~101 $^{\circ}\text{C}$)。

1-甲基-9-丁基-7-甲氧基- β -咔啉(3a): 得浅黄色晶体, 收率 85.3%, mp 103~105 $^{\circ}\text{C}$ (文献[6]: 104~105 $^{\circ}\text{C}$)。

1-甲基-9-苄基-7-甲氧基- β -咔啉(4a): 得白色晶体, 收率 81.7%, mp 131~133 $^{\circ}\text{C}$ (文献[6]: 131~132 $^{\circ}\text{C}$)。

1-甲基-9-(3-氯苄基)-7-甲氧基- β -咔啉(5a): 得

白色晶体, 收率 82.4%, mp 99~101℃; MS $m/e=337$ (M+1); IR(cm^{-1}) 2 952.2, 1 620.8, 1 567.8, 1 499.0, 1 450.6, 1 407.0, 1 256.2, 1 227.0, 1 192.8, 1 171.5, 1 046.8, 820.5, 778.3. $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, 400 \text{ MHz})$ δ : 8.33~8.35(1H, d, $J=5.2 \text{ Hz}$, H-3); 8.04~8.06(1H, d, $J=8.8 \text{ Hz}$, H-4); 7.81~7.83(1H, d, $J=5.2 \text{ Hz}$, H-5); 7.20~7.26(2H, m, Ar-H); 7.06(1H, s, Ar-H); 6.94~6.96(1H, dd, $J=8.8 \text{ Hz}, 2.0 \text{ Hz}$, H-6); 6.85~6.87(1H, d, $J=7.2 \text{ Hz}$, Ar-H); 6.744~6.749(1H, d, $J=2.0 \text{ Hz}$, H-8); 5.72(2H, s, NCH_2Ar); 3.88(3H, s, OCH_3); 2.87(3H, s, CH_3).

1-甲基-9-(4-氟苄基)-7-甲氧基- β -咔啉(6a): 得白色晶体, 收率 77.3%, mp 130~132℃; MS $m/e=321$ (M+1); IR(cm^{-1}) 2 966.8, 1 619.6, 1 563.7, 1 510.8, 1 499.4, 1 451.9, 1 406.1, 1 255.9, 1 222.9, 1 194.9, 1 171.3, 820.4. $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, 400 \text{ MHz})$ δ : 8.31~8.32(1H, d, $J=5.2 \text{ Hz}$, H-3); 8.01~8.03(1H, d, $J=8.8 \text{ Hz}$, H-4); 7.79~7.80(1H, d, $J=5.2 \text{ Hz}$, H-5); 6.96~6.98(4H, d, $J=7.2 \text{ Hz}$, Ar-H); 6.91~6.93(1H, dd, $J=8.8 \text{ Hz}, 2.0 \text{ Hz}$, H-6); 6.741~6.746(1H, d, $J=2.0 \text{ Hz}$, H-8); 5.69(2H, s, NCH_2Ar); 3.86(3H, s, OCH_3); 2.85(3H, s, CH_3).

1-甲基-9-苄丙基-7-甲氧基- β -咔啉(7a): 得白色晶体, 收率 80.2%, mp 117~118℃(文献^[6]: 117~119℃).

2.2 化合物 2~7 的合成

9-取代去氢骆驼蓬碱(2a~7a)(10 mmol), 加适量乙酸乙酯使其完全溶解, 加入相应的溴化苄(15~30 mmol), 加热回流 1~8 h, 冷却至室温, 过滤析出的固体。固体用少量乙酸乙酯洗涤后溶于无水乙醇中, 加热回流至澄清, 趁热过滤, 滤液冷却析晶, 抽滤得黄色晶体产物。

7-甲氧基-9-乙基-1-甲基-2-苄基- β -咔啉溴盐(2): 得黄色晶体, 收率 89.2%, mp 232~234℃; MS $m/e=331.18$ (M+1); IR(cm^{-1}) 3 050, 1 650, 1 621.8, 1 579.5, 1 516.9, 1 495.1, 1 452.7, 1 332.7, 1 258.0, 1 225.3, 1 135.9, 1 038.8, 830.3. $^1\text{H-NMR}(\text{DMSO}-d_6, 400 \text{ MHz})$ δ : 8.77~8.79(1H, d, $J=6.4 \text{ Hz}$, H-3), 8.62~8.64(1H, d, $J=6.4 \text{ Hz}$, H-4), 8.39~8.41(1H, d, $J=8.8 \text{ Hz}$, H-5), 7.36~7.45(5H, m, Ar-H), 7.19~7.21(1H, d, $J=8.0 \text{ Hz}$, H-6), 7.10~7.13(1H, dd, $J=2.4 \text{ Hz}, J=8.8 \text{ Hz}$, H-8), 6.05(2H, s, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{Ar}$), 4.73(2H, q, $J=7.2 \text{ Hz}$, $\text{N-CH}_2\text{CH}_3$); 4.00(3H, s,

OCH_3); 3.11(3H, s, CH_3); 1.40(3H, t, $J=7.2 \text{ Hz}$, $\text{N-CH}_2\text{CH}_3$).

7-甲氧基-9-丁基-1-甲基-2-苄基- β -咔啉溴盐(3): 得浅黄色晶体, 收率 93.1%, mp 239~241℃; MS $m/e=359.21$ (M+1); IR(cm^{-1}) 3 028, 1 651, 1 621.8, 1 513.9, 1 451.1, 1 343.0, 1 248.0, 1 163.7, 1 137.2, 1 071.8, 831.9; $^1\text{H-NMR}(\text{DMSO}-d_6, 400 \text{ MHz})$ δ : 8.87~8.89(1H, d, $J=6.4 \text{ Hz}$, H-3), 8.26~8.28(1H, d, $J=6.4 \text{ Hz}$, H-4), 8.12~8.14(1H, d, $J=6.4 \text{ Hz}$, H-5), 7.31~7.42(3H, m, Ar-H), 7.02~7.22(2H, m, Ar-H), 7.00~7.02(1H, d, $J=8.0 \text{ Hz}$, H-6), 6.871~6.877(1H, d, $J=2.4 \text{ Hz}$, H-8), 6.35(2H, s, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{Ar}$), 4.45~4.49(2H, t, $J=8.0 \text{ Hz}$, $\text{N-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.95(3H, s, OCH_3), 3.27(3H, s, CH_3), 1.81~1.87(2H, m, $\text{N-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.41~1.47(2H, m, $\text{N-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.96~1.00(3H, t, $J=7.2 \text{ Hz}$, $\text{N-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).

7-甲氧基-2,9-二苄基-1-甲基- β -咔啉溴盐(4): 得浅黄色晶体 1.9 g, 收率 80.9%, mp>270℃; MS $m/e=393.22$ (M+1); IR(cm^{-1}) 3 400, 3 006, 2 839, 1 621, 1 576, 1 492, 1 461, 1 369, 1 255, 1 208, 1 138, 1 034, 830, 734; $^1\text{H-NMR}(\text{DMSO}-d_6, 400 \text{ MHz})$ δ : 8.84~8.85(1H, d, $J=6.4 \text{ Hz}$, H-3), 8.70~8.72(1H, d, $J=6.4 \text{ Hz}$, H-4), 8.47~8.49(1H, d, $J=8.8 \text{ Hz}$, H-5), 6.98~7.42(12H, m, H-6, H-8, ArH), 6.39(2H, s, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{Ar}$), 5.98(2H, s, NCH_2Ar), 3.91(3H, s, OCH_3), 2.85(3H, s, CH_3).

7-甲氧基-9-(3-氯苄基)-1-甲基-2-苄基- β -咔啉溴盐(5): 得浅黄色晶体, 收率 86.7%, mp 259~260℃; MS $m/e=411.19$ (M+1); IR(cm^{-1}) 3 050, 1 651, 1 621.2, 1 576.6, 1 518.0, 1 461.3, 1 349.8, 1 255.6, 1 160.1, 1 139.6, 1 077.3, 832.6; $^1\text{H-NMR}(\text{DMSO}-d_6, 400 \text{ MHz})$ δ : 8.85~8.87(1H, d, $J=6.4 \text{ Hz}$, H-3), 8.72~8.74(1H, d, $J=6.4 \text{ Hz}$, H-4), 8.47~8.49(1H, d, $J=8.8 \text{ Hz}$, H-5), 7.31~7.41(6H, m, Ar-H), 7.11~7.18(4H, m, Ar-H, H-6), 6.87~6.88(1H, d, $J=2.4 \text{ Hz}$, H-8), 6.03(2H, s, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{Ar}$), 5.99(2H, s, NCH_2Ar), 3.91(3H, s, OCH_3), 2.82(3H, s, CH_3).

7-甲氧基-9-(4-氟苄基)-1-甲基-2-苄基- β -咔啉溴盐(6): 得白色晶体, 收率 92.1%, mp 248~250℃; MS $m/e=427.16$ (M+1); IR(cm^{-1}) 3 050, 1 655, 1 625.5, 1 579.9, 1 511.4, 1 461.8, 1 324.9, 1 256.1,

1 158.9, 1 138.3, 1 077.4, 825.3; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 8.85~8.87(1H, d, $J=6.4$ Hz, H-3); 8.71~8.73(1H, d, $J=6.4$ Hz, H-4); 8.47~8.49(1H, d, $J=8.8$ Hz, H-5); 7.34~7.41(4H, m, Ar-H); 7.10~7.17(5H, m, H-6, Ar-H); 7.01~7.04(2H, m, Ar-H, H-8); 6.14(2H, s, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{Ar}$); 5.84(2H, s, NCH_2Ar), 3.91(3H, s, OCH_3); 2.83(3H, s, CH_3).

7-甲氧基-9-苯丙基-1-甲基-2-苄基- β -咔啉溴盐(7):得浅黄色晶体,收率86.2%,mp:226~227 $^\circ\text{C}$; MS $m/e=421.23(\text{M}+1)$; IR(cm^{-1})3 050, 1 655, 1 622.4, 1 578.8, 1 515.3, 1 453.4, 1 348.0, 1 249.6, 1 154.2, 1 134.3, 1 031.5, 823.1; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 8.83~8.85(1H, d, $J=6.4$ Hz, H-3); 8.25~8.27(1H, d, $J=6.4$ Hz, H-4); 8.07~8.09(1H, d, $J=8.8$ Hz, H-5); 7.28~7.33(5H, m, Ar-H); 7.17~7.24(5H, m, Ar-H); 6.96~6.98(1H, dd, $J=2.4$ Hz, $J=8.8$ Hz, H-6), 6.523~6.529(1H, d, $J=2.4$ Hz, H-8); 6.28(2H, s, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{Ar}$); 4.44(2H, t, $J=8.4$ Hz, $\text{N-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ar}$); 3.82(3H, s, OCH_3); 3.14(3H, s, CH_3); 2.75~2.79(2H, t, $J=6.8$ Hz, $\text{N-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ar}$); 2.17~2.20(2H, m, $\text{N-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ar}$).

2.3 去氢骆驼蓬碱衍生物的体外抗肿瘤实验

2.3.1 样品溶液的配制 取样品约5 mg,精密称定,用200 μL DMSO溶解,再用蒸馏水定容至5 mL.配制加样所需浓度梯度的样品溶液是将之前配制好的样品溶液用4% DMSO溶液进行稀释,浓度倍数比为2,即1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

2.3.2 MTT法测定 IC_{50} 值 取对数生长期细胞以约 1×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的密度接种于96孔板,每孔接种100 μL (96孔板右下角3个孔为空白对照),置 CO_2 培养箱中培养24 h.加入60 μL 培养液,然后按预设的浓度梯度加入待测样品40 μL ,每一梯度6个重复.对照组加入等体积的4%DMSO溶液.继续培养48 h后,每孔加入20 μL 的MTT($5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),然后置于37 $^\circ\text{C}$ 温育4 h.小心除去上清后,每孔加入100 μL 的DMSO,振荡约10 min溶解沉淀,随后用酶标仪检测OD值,波长490 nm.用下式求出每一样品浓度下的细胞存活率:

存活率%=(样品组平均OD值-空白空)/(对照组平均OD值-空白孔) $\times 100\%$

以细胞存活率对药物浓度对数作图,按作图

法求出每个样品的 IC_{50} 值。

3 结果与讨论

以去氢骆驼蓬碱为原料,经过两步合成的去氢骆驼蓬碱衍生物,结构经过 $^1\text{H-NMR}$ 、质谱和红外图谱确证.初步的药理研究结果表明化合物2~7均具有良好的体外抗肿瘤活性,尤以对Bel-7402和786-0两个细胞株的活性最好。

表1 去氢骆驼蓬碱衍生物对不同肿瘤细胞株的 IC_{50} 值

Tab 1 Cytotoxicity of harmine derivatives *in vitro*(IC_{50})

化合物	$\text{IC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$					
	Bel-7402	MCF7	786-0	Blu-87	769-P	BGC-823
Harmine	102.0	>201.2	>201.2	76.3	43.1	142.1
2	12.8	102.0	5.97	48.7	11.4	13.7
3	6.2	6.1	8.9	18.3	102.2	4.8
4	4.51	13.1	10.9	2.6	5.9	101.8
5	4.31	6.2	6.7	61.8	9.7	14.3
6	7.14	10.11	7.1	20.6	6.9	14.1
7	3.47	4.1	3.8	10	2.5	6.8

4 结论

从体外抗肿瘤结果可以看出,所合成的6个目标化合物对6株肿瘤细胞株体外效果强于先导化合物去氢骆驼蓬碱,当2位为苄基取代时,活性规律如下:9-苯丙基>9-苄基(取代苄基)>9-脂肪烷基。去氢骆驼蓬碱9位和2位取代对抗肿瘤活性的影响因素,详细构效关系在进一步的研究之中。

REFERENCES

- [1] SONG Z Y, LIU J R, LU X L, et al. Harmine induces apoptosis in human SGC-7901 cells [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2006, 29(6): 571-574.
- [2] TIAN X L, SUN D J, ZHU N S. Studies on the antitumor or activity constituents of Xin Jiang Peganum Harmala [J]. J Xin Jiang Med Univ(新疆医科大学学报), 2003, 26(2): 113-115.
- [3] CAO J, PAN Q C. The effectiveness of total alkaloids of Peganum Harmala on mice sarcoma a reticulated L-II cell ultramicrostructure [J]. Chin J Cancer(癌症), 1993, 12(3): 214-216.
- [4] YANG X P, PAN Q C, LI C J, et al. The antitumor or activity and synergistic antitumor activity of total alkaloids of Peganum Harmala [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 1998, 29(9): 609-611.
- [5] WANG Y, SUN D J, ZHU Q H. Study on release characteristic of Harmine Hydrochloride bioadhesive suppository [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2007, 24(3): 212-214.
- [6] CAO R H, CHEN Q, HOU X R, et al. Synthesis, acute toxicities, and antitumor effects of novel 9-substituted β -carboline derivatives [J]. Bioorg Med Chem, 2004, 12(17): 4613-4623.

收稿日期: 2011-09-08