

顺式-没食子酸-氨, 2-甲基吡啶合铂(II)的合成、 表征及抗肿瘤活性

王庆琨¹, 周利民², 普绍平^{1*}, 彭娟¹, 张琪¹, 刘凉萌¹, 廖云星¹, 晋杰¹

(1. 昆明贵研药业有限公司 云南省铂族金属抗肿瘤药物工程技术研究中心, 昆明 650106;

2. 贵研铂业股份有限公司 稀贵金属综合利用新技术国家重点实验室, 昆明 650106)

摘要: 为合成新的铂配合物顺式-没食子酸-氨, 2-甲基吡啶合铂(II), 以氯亚铂酸钾为起始原料, 先后与碘化钾、2-甲基吡啶、氨水、硝酸银和没食子酸反应合成目标化合物。采用元素分析、质谱、核磁共振氢谱和红外光谱分析其组成和结构, 利用 MTT 体外检测法进行了初步的体外活性评价。结果显示合成的化合物结构与理论值一致, 具有一定的体外肿瘤生长抑制活性。

关键词: 有机化学; 铂配合物; 没食子酸; 合成; 抗癌活性

中图分类号: O614.82⁺6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0676(2013)01-0055-04

Synthesis, Characterization and Antitumor Activities of *Cis*-ammine Gallic Acid (2-Methylpyridine) Platinum(II)

WANG Qingkun¹, ZHOU Limin², PU Shaoping^{1*}, PENG Juan¹, ZHANG Qi¹,
LIU Liangmeng¹, LIAO Yunxing¹, JIN Jie¹

(1. Yunnan Engineering and Technology Center of Platinum-based Anti-tumor Drug, Kunming Gui Yan Pharmaceutical Co. Ltd., Kunming 650106, China; 2. State Key Laboratory of Advanced Technologies for Comprehensive Utilization of Platinum Metals, Sino-Platinum Metals Co. Ltd., Kunming 650106, China)

Abstract: In order to obtain a gallic acid platinum complex, the title compound was synthesized by potassium tetrachloroplatinate successively reacting with potassium iodide, 2-methylpyridine, ammonia, silver nitrate and gallic acid. The complex structure and component were characterized by elemental analysis, ESI-MS, ¹H-NMR and IR and the anticancer activity was measured by MTT method. The results shows that its structure was consistent with the title compound and had inhibiting effect on the growth of tumor cell lines in vitro.

Key words: organic chemistry; platinum complex; gallic acid; synthesis; antitumor activity

铂类抗肿瘤药物在临床上的成功应用极大地鼓舞了各国学者研发高效、低毒和无交叉耐药性的新型铂类抗肿瘤药物的积极性。近年来多种铂配合物被设计合成,以期得到具有更高生物活性的化合物。研究表明当铂配合物的配体具有一定的空间位阻

时,其在体内的离解以及与DNA的作用将受很大的影响^[1],含有2-甲基吡啶的配合物ZD0473的发展促使人们去关注具有空间位阻的铂配合物的研究。另外由于某些配体基团本身就具有一定的生物活性,一些文献报道将这类配体与铂配位以期找到

收稿日期: 2012-03-14

基金项目: 国家科技型中小企业技术创新基金(11C26215305898)、云南省重点科技计划项目(2010DH021)资助。

第一作者: 王庆琨,男,硕士。研究方向: 功能性铂配合物的合成。E-mail: jrss1979@163.com

*通讯作者: 普绍平,男,博士,教授级高工。研究方向: 铂族金属抗肿瘤药物的研究与开发。E-mail: Pushaoping@163.com

低毒、高活性的化合物, 最近几年来一些以氨基酸类^[2-5]、葡萄糖类^[6]、胆汁酸^[7]、乙内酰胺^[8-9]以及樟脑酸^[10-11]等化合物或衍生物与铂配位并对体外活性进行了初步的筛选, 其中部分化合物具有较好的生物活性。

没食子酸是一种有机酸, 可见于五倍子、漆树、茶等植物中, 具有抑菌、抗病毒、清除自由基、抗氧化等作用, 还对多种肿瘤细胞增殖有明显的抑制作用^[12-14]。

为提高抗肿瘤活性和避免交叉耐药性, 本文将没食子酸做为离去基团与铂配合, 设计合成了一种具有空间位阻的新的铂配合物, 并对其体外活性进行初步评价。

1 实验部分

1.1 化合物的结构与制备路线

本文以没食子酸作为离去基团, 以氨、2-甲基吡啶作为伴随基团设计合成了一种新的铂配合物, 其结构如图 1 所示, 采用图 2 的合成路线。

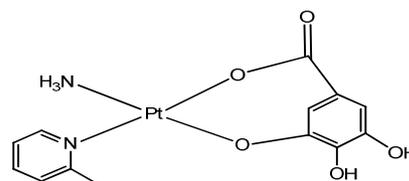


图 1 标题化合物的分子结构

Fig. 1 Single molecular structure of title compound

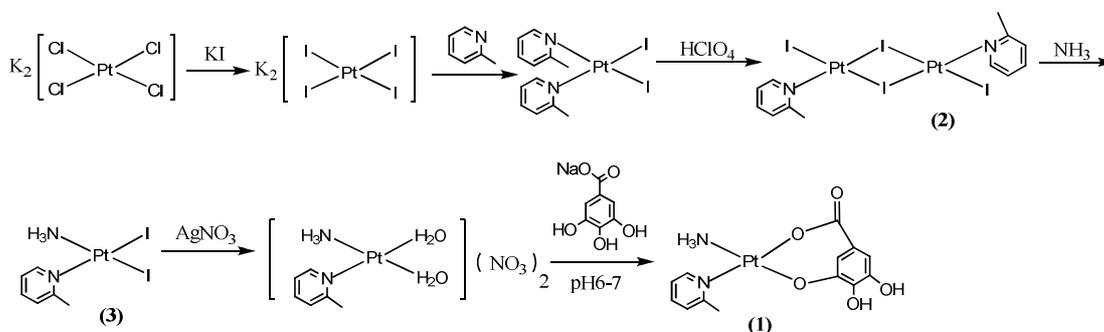


图 2 标题化合物的合成路线

Fig.2 Synthesis of the title compound

1.2 I(2-甲基吡啶)Pt(u-I)₂Pt(2-甲基吡啶)I(II) (2)的合成

称取 K_2PtCl_4 8.3 g (20 mmol) 用水溶解后滤去不溶物, 称取 KI 15.9 g (95.7 mmol) 溶解后在避光搅拌条件下滴加到 K_2PtCl_4 溶液中, 在室温下反应 1 h 得到黑色 K_2PtI_4 悬浊液。量取 2-甲基吡啶 4.7 mL (48 mmol) 用水稀释后在避光搅拌条件下滴加到 K_2PtI_4 悬浊液中, 在 60℃ 水浴中反应 1.5 h, 将得到的固体过滤用水洗至中性后烘干, 得到 12 g 浅黄色顺-二碘-二-2-甲基吡啶合铂(II)固体。经高温失重检测铂的质量分数为 30.65% ($C_{12}N_2H_{14}PtI_2$ 铂的质量分数理论值为 30.71%)。

称取 9.5 g (15 mmol) 顺-二碘-二-2-甲基吡啶合铂(II), 加入纯水搅成悬浊液, 用 $HClO_4$ 调成强酸性, 在 50℃ 水浴中反应至浅黄色固体完全变为深棕色固体后停止, 将得到的固体过滤用水洗至中性后烘干得到 7 g 深棕色 I(2-甲基吡啶)Pt(u-I)₂Pt(2-甲基吡啶)I(II) 固体。经高温失重检测铂的质量分数为 35.49% ($C_{12}N_2H_{14}PtI_4$ 中含铂的理论值为 35.98%)。

1.3 顺-二碘-氨, 2-甲基吡啶合铂(II) (3)的合成

称取 I(2-甲基吡啶)Pt(u-I)₂Pt(2-甲基吡啶)I(II) 7 g (6.5 mmol), 用纯化水搅成悬浊液, 量取 20 mL 氨水, 加入到悬浊液中, 在室温下反应至深棕色固体完全变为黄色固体后停止反应, 将得到的固体用水洗至中性后烘干得到 6 g 黄色顺-二碘-氨, 2-甲基吡啶合铂(II)固体。经高温失重检测铂的质量分数为 34.51% ($C_6N_2H_{10}PtI_2$ 中含铂的理论值为 34.88%)。

1.4 顺-没食子酸-氨, 2-甲基吡啶合铂(II) (1)的合成

称取顺-二碘-氨, 2-甲基吡啶合铂(II) 5.6 g (10 mmol), 用纯化水搅成悬浊液, 称取 $AgNO_3$ 3.4 g (20 mmol), 用纯化水溶解后加入到顺-二碘-氨, 2-甲基吡啶合铂(II)悬浊液中, 在 60℃ 水浴中反应 3 h, 过滤 AgI 后得到浅黄色水解溶液。

称取一水合没食子酸 1.9 g (10 mmol), 用纯化水搅成悬浊液, 称取 $NaOH$ 0.4 g (10 mmol), 用水溶解后加入到没食子酸悬浊液中, 搅拌至固体完全溶解, 将得到的溶液加入到水解溶液中, 用 $NaOH$ 溶液调节并保持 $pH=6\sim7$, 在室温下反应 5 h, 将得

到的黄色固体烘干后用二甲基亚砷、纯化水混合溶液重结晶后得到 2.1 g 黄色固体, 经高温失重检测铂的质量分数为 40.95%($C_6N_2H_{10}PtC_7H_4O_5$ 铂的质量分数理论值为 41.23%)。

2 结果与讨论

2.1 化合物的元素分析

化合物的元素分析采用 Vario EL III 元素分析仪, 分析结果见表 1。从表 1 可以看出化合物的 C、N 和 H 的含量分析结果与分子式 $C_6N_2H_{10}PtC_7H_4O_5$ 的计算值符合较好。

表 1 化合物的元素分析结果

Table 1 Element analysis results of the compound

测定元素	C	N	H
理论值/%	32.98	5.92	2.96
测量值/%	32.67	6.01	3.11

2.2 化合物的质谱分析

化合物的质谱分析采用 AutoSpec 3000 质谱仪, 以甲醇为溶剂, 测得的 ESI-MS(m/z)数据: 496, $[M+Na]^+$, 数据与标题化合物 $C_6N_2H_{10}PtC_7H_4O_5$ 计算的理论分子量一致。

2.3 化合物的 1H 核磁共振分析

化合物的 1H 核磁共振分析采用 Bruker DRX-500 核磁共振仪(DMSO, 500 MHz), 从分析结果可以看出, 不同环境的 H 在 1H -NMR 图中都有清楚的体现, 具体归属如下: 2.44~2.74(m, 3H, CH_3); 3.41~3.43(m, 3H, NH_3); 6.78~6.85(d, 2H, OH); 7.22~7.27(m, 2H, $CHCCH$ of Gallic acid); 7.49~7.51(d, 1H, $CHCHN$ of 2-methylpyridine); 7.81~7.84(m, 2H, $CHCHCCH_3$ of 2-methylpyridine); 8.95~8.96(d, 1H, $CHCHN$ of 2-methylpyridine)。

2.4 化合物的红外光谱分析

化合物的红外光谱分析采用 TJ270-30 型红外分光光度计, 结果如图 3 所示。化合物在 3254 cm^{-1} 附近出现的强峰为 N-H 的伸缩振动峰, 较游离的 V_{NH}/V_{NH_3} 发生了红移, 表明胺与 Pt(II)发生了配位, 在 480 cm^{-1} 附近出现了 V_{Pt-N} 伸缩振动, 进一步证实了 Pt(II)与氨/2 甲基吡啶配位。化合物在 1620 cm^{-1} 和 1370 cm^{-1} 附近出现了 2 个强吸收峰, 为羧酸根离子的反对称伸缩振动 $V_{as(COO)}$ 与对称伸缩振动 $V_{s(COO)}$ 峰, 且 $\Delta V(V_{as(COO)} - V_{s(COO)})$ 在 $238\sim 318\text{ cm}^{-1}$ 范围内,

表明没食子酸中的羧基以单齿形式与铂离子配位, 在 590 cm^{-1} 附近出现了 V_{Pt-O} 伸缩振动, 进一步证实了 Pt(II)与没食子酸的羧基配位。

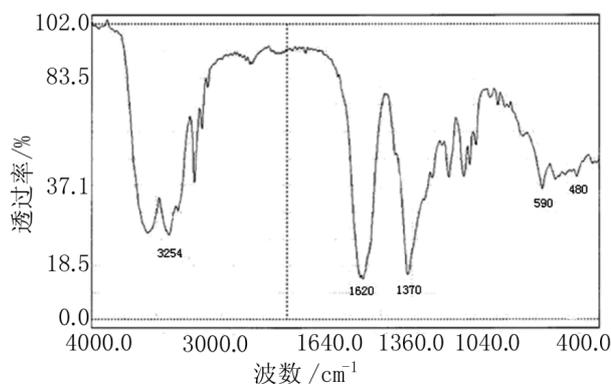


图 3 化合物的红外光谱图

Fig.3 IR of the compound

2.5 体外活性初步评估

采用 MTT^[15]法测定化合物的体外活性, 接种细胞: 用含 10% 胎牛血清的培养液(DMEM 或者 RPMI 1640)配成单个细胞悬液, 以每孔 5000~10000 个细胞接种到 96 孔板, 每孔体积 100 μL , 贴壁细胞提前 12 h 接种培养。加入待测化合物溶液(固定浓度 40 $\mu\text{mol/L}$ 初筛, 在该浓度对肿瘤细胞生长抑制在 50%附近的化合物设 5 个浓度进入梯度复筛, 每孔终体积 200 μL , 每种处理均设 3 个复孔。显色: 37°C 培养 48 h 后, 每孔加 MTT 溶液 20 μL 。继续孵育 4 h, 终止培养, 吸弃孔内培养上清液, 每孔加 200 μL 的 SDS 溶液(10%), 过夜孵育(温度 37°C), 使结晶物充分溶解。比色: 选择 595 nm 波长, 酶联免疫检测仪(Bio-Rad 680)读取各孔光吸收值, 记录结果, 以浓度为横坐标, 细胞存活率为纵坐标绘制细胞生长曲线, 应用两点法(Reed and Muench 法)计算化合物的 $IC_{50}(\mu\text{m})$ 值。对白血病(HL-60)、肝癌(SMMC-7721)、肺癌(A-549)、乳腺癌(MCF-7)、结肠癌(SW480)细胞株的 $IC_{50}(\mu\text{m})$ 值见表 2。

表 2 化合物的体外抗肿瘤活性

Table 2 The antitumour activity of the title compound in vitro

化合物	$IC_{50}/\mu\text{m}$				
	HL-60	SMMC-7721	A-549	MCF-7	SW480
顺铂	3.97	4.96	8.19	10.78	11.56
标题化合物	7.34	9.88	8.97	13.79	10.13

从结果可以看出化合物对被测细胞株的 IC_{50} 值均小于 $40 \mu\text{m}$, 具有一定的体外肿瘤生长抑制活性, 其中对 HL-60、A-549 和 SMMC-7721 细胞株的 IC_{50} 值小于 $10 \mu\text{m}$, 具有较强的体外肿瘤生长抑制活性。

3 结论

本研究设计并制备了一种新的铂配合物, 顺式-没食子酸-氨, 2-甲基吡啶合铂(II), 其结构主要特点为: 引进了具有一定空间位阻的 2-甲基吡啶和氨做为化合物的伴随基团, 文献[16]报道具有相同伴随基团的铂配合物能克服与其他已上市的铂类药物的交叉耐药性; 采用具有抑菌、抗病毒、清除自由基、抗氧化及对多种肿瘤细胞增殖有明显抑制作用的没食子酸作为离去基团, 有利于增强抗肿瘤活性、降低药物的毒性。采用元素分析、质谱、核磁共振氢谱和红外光谱分析了合成化合物的组成和结构, 结果表明合成的化合物结构与标题化合物一致。

体外抗肿瘤活性数据显示: 在选用的 5 个细胞株中, 化合物的 IC_{50} 值均小于 $40 \mu\text{m}$, 具有一定的体外肿瘤生长抑制活性, 部分细胞株的 IC_{50} 值小于 $10 \mu\text{m}$, 具有较强的体外肿瘤生长抑制活性。

参考文献:

- [1] Holford J, Beale P J, Boxall F E, et al. Mechanisms of drug resistance to the platinum complex ZD0473 in ovarian cancer cell lines[J]. Eur J Cancer, 2000, 36(15): 1984-1990.
- [2] Kim Y S, Song R, Chung H C, et al. Coordination modes vs. antitumor activity: synthesis and antitumor activity of novel platinum(II) complexes of *N*-substituted amino dicarboxylic acids[J]. J Inorg Biochem, 2004, 98(1): 98-104.
- [3] Furin A, Guiotto A, Baccichetti F, et al. Synthesis, characterization and preliminary cytotoxicity assays of poly(ethylene glycol)-malonato-Pt-DACH conjugates[J]. Eur J Med Chem, 2003, 38(7/8): 739-749.
- [4] Moradell S, Lorenzo J, Rovira A, et al. Platinum complexes of diamminocarboxylic acids and their ethyl ester derivatives: the effect of the chelate ring size on antitumor activity and interactions with GMP and DNA[J]. J Inorg Biochem, 2003, 96(4): 493-502.
- [5] Galanski M, Slaby S, Jakupec M A, et al. Synthesis, characterization, and in vitro antitumor activity of osteotropic diam(m)ineplatinum(II) complexes bearing a *N,N*-bis(phosphonomethyl) glycine ligand[J]. J Med Chem, 2003, 46(23): 4946-4951.
- [6] Mikata Y, Shinohara Y, Yoneda K, et al. Unprecedented sugar-dependent in vivo antitumor activity of carbohydrate-pendant *cis*-diamminedichloroplatinum(II) complexes[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2001, 11(23): 3045-3047.
- [7] Criado J J, Domínguez M F, Medarde M, et al. Structural characterization, kinetic studies, and in vitro biological activity of new *cis*-diamminebis-cholyl-glycinate(O,O')-Pt(II) and *cis*-diamminebis-ursodeoxycholate(O,O')-Pt(II) complexes[J]. Bioconjug Chem, 2000, 11(2): 167-174.
- [8] Kushev D, Gorneva G, Enchev V, et al. Synthesis, cytotoxicity, antibacterial and antitumor activity of platinum(II) complexes of 3-aminocyclo-hexanespiro-5-hydantoin[J]. J Inorg Biochem, 2002, 89(3/4): 203-211.
- [9] Bakalova A, Buyukliev R, Tcholakova I, et al. Synthesis, physicochemical investigation and cytotoxic activity of new Pt(II) complexes with hydantoin ligands[J]. Eur J Med Chem, 2003, 38(6): 627-632.
- [10] 王联红, 刘芸, 袁阜平, 等. 1R,3S-1,2,2-三甲基-1,3-环戊二胺为配体的铂(II)配合物的合成、表征和抗肿瘤活性[J]. 无机化学学报, 2004, 20(7): 775-780.
- [11] Kim Y S, Kim K M, Song R, et al. Synthesis, characterization and antitumor activity of quinolone- platinum(II) conjugates[J]. J Inorg Biochem, 2001, 87(3): 157-163.
- [12] 李沐涵, 殷美琦, 冯靖涵, 等. 没食子酸抗肿瘤作用研究进展[J]. 中医药信息, 2011, 28(1): 109-111.
- [13] 何文飞, 何大维, 马超, 等. 没食子酸抑制人神经母细胞瘤增殖作用的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(2): 107-110.
- [14] 郑曙明, 黄建军, 吴青, 等. 复方五倍子有效成分的分离鉴定及抑菌活性研究[J]. 水生生物学报, 2010, 34(1): 57-64.
- [15] 汤为学, 骆云鹏, 王瑞雪. 人实体瘤抗癌药物敏感试验 MTT 法的建立[J]. 重庆医科大学学报, 1992, 20(2): 40-42.
- [16] 贾木欣, 曲雯雯, 陈光巨, 等. 铂类抗肿瘤药物 ZD0473 与双链及单链 DNA 作用差异的理论研究[J]. 高等学校化学学报, 2004, 25(8): 481-484.