

## 侧链含5-氟尿嘧啶甲壳胺的合成及其 抗肿瘤活性的研究\*

杨福顺 卓仁禧

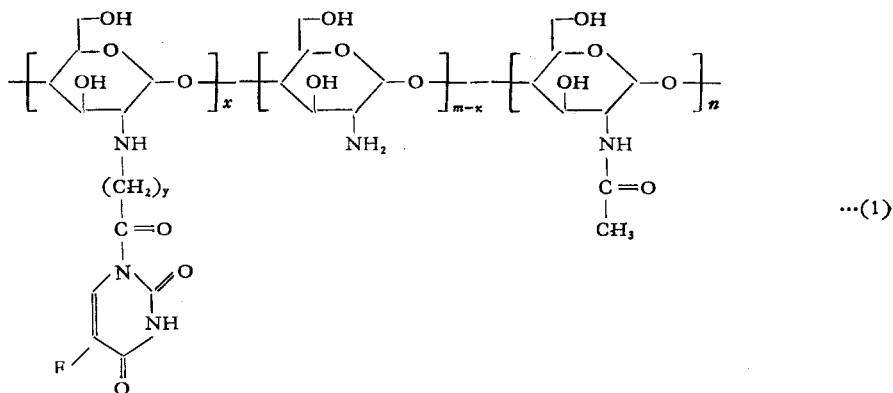
(武汉大学化学系)

### 摘 要

本文报道了以不同分子量的甲壳胺为载体, 制备了侧链含5-氟尿嘧啶的一系列高分子载体药物;通过定氮分析测定了H<sub>2</sub>N-基的反应率;由IR、UV和<sup>13</sup>C-NMR确定了载体药物的结构;模拟生理条件考查了在不同pH的缓冲溶液中5-氟尿嘧啶或其衍生物的水解释放率。体外初步实验结果表明,具有I和II结构的载体药物对艾氏腹水癌细胞有较强的杀伤作用。

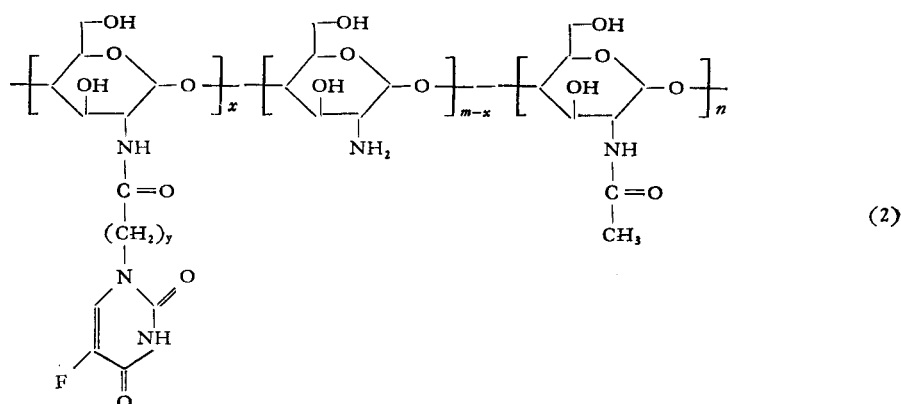
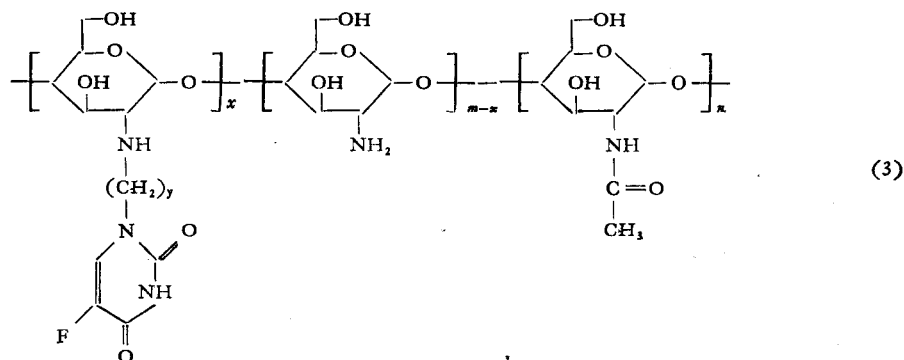
**关键词** 甲壳胺、5-氟尿嘧啶、高分子载体药物、抗肿瘤活性

甲壳胺是富含于蟹壳和虾壳中的聚糖胺。据文献报道,甲壳胺具有很好的生物相容性<sup>[1]</sup>,并具有一定的抗肿瘤作用<sup>[2]</sup>和抗细菌作用<sup>[3]</sup>。Hirano<sup>[4]</sup>曾报道了菸酸和甲壳胺连接的载体药物,其降血脂作用不仅没有减弱,而且作用时间延长十多倍。考虑到甲壳胺具有很好的生物相容性,我们将早已用于临床化疗的抗癌药物5-氟尿嘧啶(5-FU)与不同分子量的甲壳胺的胺基连接,制得了下列三类侧链含5-FU的载体药物(I<sub>a,b</sub>、II<sub>a,b</sub>和III<sub>a-d</sub>):



I<sub>a,b</sub> a, Y = 1; b, Y = 2

\* 1989年1月3日收到。

II<sub>a,b</sub> a, Y = 1; b, Y = 2III<sub>a-d</sub> a, Y = 3; b, Y = 4; c, Y = 5; d, Y = 6

水解实验表明, 具有 I 和 II 结构的载体药物可在中性和碱性介质中缓慢释放出具有药理活性的 5-FU 或其衍生物。而具有结构 III 的则不能。体外生物活性实验表明, I 和 II 结构的载体药物对艾氏腹水癌细胞有较强的杀伤作用, 并且前者大于后者, 而 III 的杀伤效果则较差。

## 实 验 部 分

### 1. 仪器与试剂

元素分析用 Perkin 240B 元素分析仪测定; IR 用 Nicolet 170SX 红外光谱仪测定; UV 用岛津 UV-240 紫外分光光度计测定; <sup>1</sup>H-NMR 和 <sup>13</sup>C-NMR 分别用 Varian EM-360L 和 Varian XL-200 核磁共振仪测定。

5-氟尿嘧啶 (5-FU), MP281-282°C; 甲壳胺, H<sub>2</sub>N-含量 80% (即 I<sub>a,b</sub>、II<sub>a,b</sub> 和 III<sub>a-d</sub> 中的 n = 20%, m = 80%), 用前降解精制; 1-(氯代乙酰)-5-氟尿嘧啶 (1a)<sup>[5]</sup>, MP126-128°C; 5-氟尿嘧啶-N<sup>1</sup>-乙酸对硝基苯酯 (2a)<sup>[6]</sup>, MP198-200°C; 5-氟尿嘧啶-N<sup>1</sup>-丙酸对硝基苯酯 (2b)<sup>[6]</sup>, MP202-204°C; 1-(3'-溴代丙基)-5-氟尿嘧啶 (3a)<sup>[7]</sup>, MP115-116°C; 1-(4'-溴代丁基)-5-氟尿嘧啶 (3b)<sup>[7]</sup>, MP129-130°C; 1-(5'-溴代戊基)-5-氟尿嘧啶 (3c)<sup>[7]</sup>, MP113-114°C; 1-(6'-溴代己基)-5-氟尿嘧啶 (3d)<sup>[7]</sup>, MP106-107°C。其它试剂和溶剂均为分析纯。

## 2. 合成部分

甲壳胺的降解和精制<sup>[9]</sup>: 称取 50g 甲壳胺, 加入 100g 过硼酸钠 ( $\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) 和 730ml 水,  $70^\circ\text{C}$  下恒温搅拌反应数小时, 过滤。将固体溶于 700ml 1% 的乙酸水溶液中, 滤去不溶物。搅拌下将滤液慢慢加入 1000ml 10% 的  $\text{NaOH}$  溶液中, 得粉末状沉淀, 过滤。固体用 200ml 水浸泡 24h, 用 2N 的盐酸调 pH 至中性, 过滤。用水洗涤, 再用 300ml 丙酮浸泡 48h, 过滤,  $50^\circ\text{C}$  下真空干燥。得到不同分子量的甲壳胺 (表 1)。

表 1 甲壳胺分子量与降解时间的关系

No	1	2	3	4	5
反应时间 (h)	0	1	3	5.5	8
$[\eta]^*(\text{ml/g})$	20.15	12.43	7.32	5.97	3.92
$\bar{M}_n^* \times 10^{-4}$	6.0	4.1	2.3	1.6	1.0

\*  $C = 0.0011\text{g/ml}$ ; 溶剂: 1% 乙酸水溶液;  $T = 20 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 。

\*\*  $[\eta] = 0.0161 \times \bar{M}_n^{0.6116(8)}$ 。

1-(3'-溴代丙酰)-5-氟尿嘧啶 (1b): 称取 1.38g (0.05mol) 2,4-二(三甲基硅氧基)-5-氟尿嘧啶<sup>[9]</sup>与 8.9g (0.052mol) 3-溴代丙酰氯混合, 室温下搅拌反应 0.5h, 得淡黄色沉淀, 过滤, 固体用丙酮溶解, 滤去不溶物, 将滤液慢慢滴入石油醚中, 得白色棒状结晶, 过滤,  $50^\circ\text{C}$  下真空干燥, 得 14.04g。产率 75%。MP 145—147 $^\circ\text{C}$ 。元素分析值: C, 31.84; H, 2.40; N, 10.32; 计算值 ( $\text{C}_7\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_3\text{BrF}$ ): C, 31.71; H, 2.26; N, 10.57。<sup>1</sup>H-NMR

(DMSO- $d_6$ ): ppm, 3.50(t, 2H,  $\text{Br}-\text{CH}_2-$ ); 4.50(t, 2H,  $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$ ); 8.27(d, 1H, 5-FU 中  $\text{C}_6$  位); 11.60(s, 1H, 5-FU 中  $\text{N}_3$  位)。

5-氟尿嘧啶- $\text{N}^1$ -烷基甲壳胺 ( $\text{I}_{a,b}$ ): 称取 0.3g 分子量不同的甲壳胺和一定量的 1a 或 1b, 加入 50ml DMSO 和 1.2ml 三乙胺,  $80^\circ\text{C}$  下恒温搅拌反应 12h。减压浓缩至约 20ml, 加入 30ml 丙酮得淡棕色沉淀, 过滤。固体用水洗涤, 再用丙酮于索氏提取器中提取 48h 以除去未反应的 1a 或 1b, 固体产物于  $50^\circ\text{C}$  下真空干燥 (结果见表 2)。

5-氟尿嘧啶- $\text{N}^1$ -羧烷基甲壳胺 ( $\text{II}_{a,b}$ ) 称取 0.3g 不同分子量的甲壳胺和一定量的 2a 或 2b, 加入 50ml DMSO,  $70^\circ\text{C}$  下恒温搅拌反应 12h, 反应混合物减压浓缩至约 20ml, 加入 30ml 氯仿, 得黄色沉淀, 过滤。固体用丙酮于索氏提取器中提取 48h 以除去 2a 或 2b。  $50^\circ\text{C}$  下真空干燥产物 (结果见表 2)。

5-氟尿嘧啶- $\text{N}^1$ -烷基甲壳胺 ( $\text{III}_{a-d}$ ) 的制备方法与  $\text{I}_{a,b}$  相同 (见表 2)。

## 结果与讨论

### 1. 反应条件对甲壳胺中 $\text{H}_2\text{N}$ -基反应率及其特性粘度的影响

从表 2 可以看出, 随着甲壳胺分子量的降低, 其  $\text{H}_2\text{N}$ -基反应程度增高。比较同一

表 2 甲壳胺与 5-FU 衍生物反应数据

No	甲壳胺 分子量 ( $\times 10^4$ )	反应投料(g)		产率 <sup>a)</sup> (%)	元素分析(%) <sup>b)</sup>			$H_2N$ <sup>c)</sup> 反应率 (%)	[ $\eta$ ] <sup>d)</sup> (ml/g)
		甲壳胺	5-FU 衍生物		C	H	N		
I <sub>a1</sub>	6.0	0.3	1.6(1a)	62.8	47.81	6.34	8.81	7.34	19.40
I <sub>a2</sub>	4.1	0.3	1.6(1a)	66.0	47.50	6.22	9.32	14.99	11.01
I <sub>a3</sub>	2.3	0.3	1.6(1a)	65.8	47.18	5.98	9.65	20.18	6.89
I <sub>a4</sub>	1.6	0.3	1.6(1a)	69.2	47.25	5.87	9.81	22.91	5.28
I <sub>a5</sub>	1.0	0.3	1.6(1a)	74.6	46.62	5.71	10.37	33.09	2.95
I <sub>b1</sub>	6.0	0.3	1.6(1b)	57.3	45.60	6.50	8.67	7.13	19.34
I <sub>b2</sub>	4.1	0.3	1.6(1b)	62.7	45.33	6.34	9.06	14.90	11.04
I <sub>b3</sub>	2.3	0.3	1.6(1b)	64.5	45.26	6.19	9.26	19.23	6.91
I <sub>b4</sub>	1.6	0.3	2.2(1b)	67.8	45.28	6.02	9.52	25.42	5.15
I <sub>b5</sub>	1.0	0.3	2.0(1b)	71.9	45.09	5.85	9.63	28.13	2.93
II <sub>a1</sub>	6.0	0.3	1.5(2a)	63.4	47.56	6.37	8.88	10.20	19.01
II <sub>a2</sub>	4.1	0.3	1.5(2a)	68.7	47.01	5.69	9.79	29.90	10.64
II <sub>a3</sub>	2.3	0.3	1.5(2a)	74.1	46.64	5.43	9.94	33.30	6.57
II <sub>a4</sub>	1.6	0.3	1.5(2a)	78.5	46.58	5.11	10.33	42.71	4.36
II <sub>a5</sub>	1.0	0.3	1.5(2a)	82.4	45.96	4.98	10.95	61.72	2.23
II <sub>b1</sub>	6.0	0.3	1.2(2b)	61.3	45.52	6.39	8.69	7.50	19.61
II <sub>b2</sub>	4.1	0.3	1.2(2b)	65.9	45.09	6.12	9.31	20.42	10.88
II <sub>b3</sub>	2.3	0.3	1.2(2b)	68.3	45.17	5.99	9.42	22.91	6.89
II <sub>b4</sub>	1.6	0.3	1.2(2b)	72.7	45.24	5.83	9.87	34.86	4.85
II <sub>b5</sub>	1.0	0.3	1.2(2b)	79.0	45.30	5.67	10.21	44.73	2.68
III <sub>a1</sub>	6.0	0.3	1.8(3a)	60.8	45.61	6.62	8.65	5.43	19.59
III <sub>a2</sub>	1.6	0.3	1.8(3a)	65.7	45.72	6.38	9.06	15.41	5.49
III <sub>b1</sub>	4.1	0.3	2.5(3b)	65.8	46.20	6.48	9.34	16.30	11.13
III <sub>b2</sub>	2.3	0.3	2.5(3b)	68.1	46.15	6.37	9.61	21.55	7.02
III <sub>b3</sub>	1.6	0.3	2.5(3b)	70.2	46.38	6.42	9.64	22.60	4.99
III <sub>b4</sub>	1.0	0.3	2.5(3b)	70.9	46.63	6.26	9.86	26.88	3.00
III <sub>c1</sub>	4.1	0.3	2.2(3c)	60.0	46.09	6.84	8.70	7.69	12.10
III <sub>c2</sub>	2.3	0.3	1.8(3c)	61.4	46.31	6.55	8.78	10.28	7.21
III <sub>d1</sub>	4.1	0.3	2.5(3d)	63.2	47.13	6.79	8.94	15.81	10.86
III <sub>d2</sub>	1.0	0.3	2.5(3d)	66.0	47.68	6.54	9.09	22.12	3.01

a) 以甲壳胺计; b) 甲壳胺的元素分析值: C, 45.31; H, 6.68; N, 8.26; c) 从N分析值计算; d) 用乌氏粘度计, 采用外推法测定。

分子量的甲壳胺和 5-FU 衍生物的反应结果可以发现, 5-氟尿嘧啶对硝基苯活性酯与甲壳胺的胺解反应活性大于 5-氟尿嘧啶卤代烷烃与甲壳胺的烷基化反应活性。并且, 由于烷基的给电子和羰基的吸电子效应, 烷基链越长, 其 5-FU 衍生物的反应活性越小。另外, 比较表 1 和表 2 可以看出, 甲壳胺中的  $H_2N$ -基连有 5-FU 后, 其特性粘度变小。

## 2. 侧链含 5-FU 甲壳胺的化学结构

在甲壳胺与 1a、1b 或与 3a-d 的反应过程中, 我们发现极易溶于水的细毛状结晶物(三乙胺卤化盐)析出。并且 I<sub>a,b</sub> 和 III<sub>a-d</sub> 在 1% 的乙酸水溶液中的溶解度比相应分子量的甲壳胺明显变小。它们在紫外区 270nm 附近均有明显的尿嘧啶环的特征吸收峰(图 1)。从它们的  $^{13}C$ -NMR 可以看出仲 C 原子(39ppm)和叔 C 原子(78ppm)以及

季 C 原子(包括尿嘧啶环, 118ppm) 的吸收峰(图 3)。另外, 从它们的 IR 图(图 2)可以

看到, 由于在甲壳胺中引入了一  $\text{C}=\text{O}$  (包括尿嘧啶环) 基,  $1640\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰明显变强, 而  $3280\text{cm}^{-1}$  处的 N-H 伸缩振动吸收峰变弱。以上数据可以证明侧链含 5-FU 的甲壳胺载体药物的化学结构即如(1)–(3)式所示。

3. 5-FU 或其衍生物的水解释放

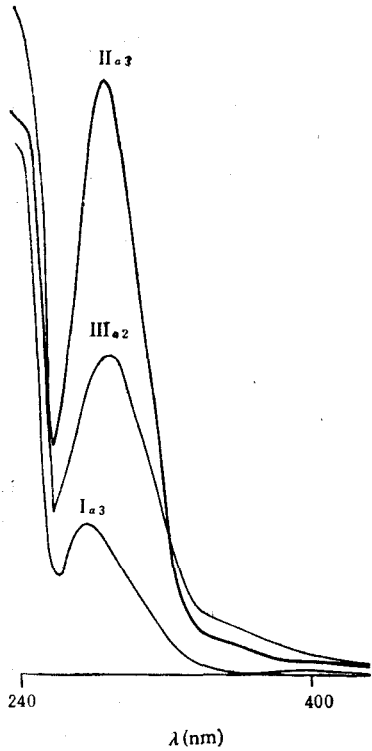


图 1 侧链含 5-FU 甲壳胺的 UV 吸收 (1% 乙酸水溶液)

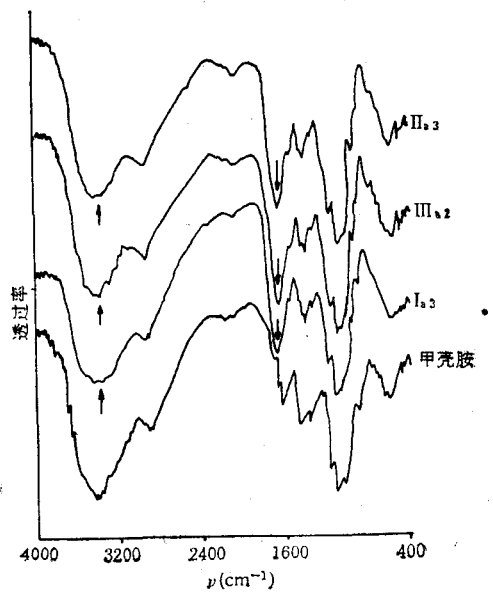


图 2 甲壳胺和三种侧链含 5-FU 甲壳胺的 IR 图 (KBr)

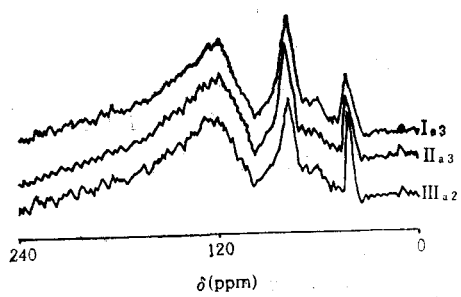


图 3 侧链含 5-FU 甲壳胺的  $^{13}\text{C}$ -NMR 谱图(固, 200MHz)

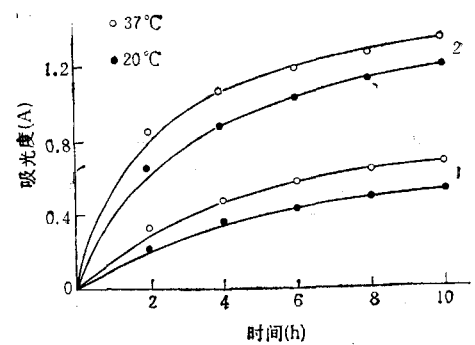
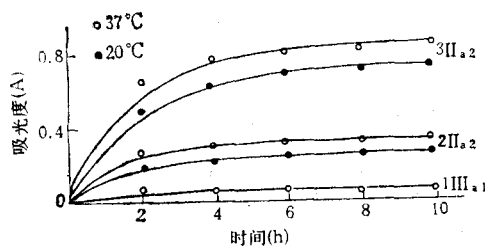


图 4  $\text{I}_{a3}$  中 5-FU 的水解释放  
 1. pH9.0( $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{HCl}/\text{NaOH}$ ),  $\lambda = 270\text{nm}$   
 2. pH7.0( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ ),  $\lambda = 270\text{nm}$

图5 II<sub>a2</sub> 中 5-FU 丙酸的水解释放

1 pH9.0(H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>, HCl/NaOH),  $\lambda = 270\text{nm}$ ; 2 pH7.0(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH),  $\lambda = 267\text{nm}$ ;  
3 pH9.0(H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>, HCl/NaOH),  $\lambda = 267\text{nm}$

用紫外分光光度法分别在 270nm 和 267nm 波长下测定 I<sub>a3</sub>、II<sub>a2</sub> 和 III<sub>a1</sub> 在不同 pH 的缓冲溶液中的吸光度值(A)随时间的变化(图 4 和图 5), 由 A 值的变化可以定性地描述载体药物中小分子药物 5-FU 或其衍生物的缓释规律。由图 4 和图 5 可以看出, I 和 II 类高分子载体药物在中性和碱性介质中分别可释放出 5-FU (最大吸收 270nm) 和 5-FU 的烷基羧酸 (最大吸收 265nm), 并且 37°C 下的释放率大于 20°C, 碱性介质

表 3 侧链含 5-FU 甲壳胺的体外抗艾氏腹水癌活性<sup>a)</sup>

No	浓度 (mg/2ml)	细胞死亡率(%)		No	浓度 (mg/2ml)	细胞死亡率(%)	
		4h	8h			4h	8h
I <sub>a1</sub>	20	87	99	II <sub>b1</sub>	15	30	70
I <sub>a2</sub>	20	90	100 <sup>b)</sup>	II <sub>b2</sub>	15	35	89
I <sub>a3</sub>	15	100 <sup>b)</sup>		II <sub>b3</sub>	18	61	95 <sup>b)</sup>
I <sub>a5</sub>	15	100 <sup>b)</sup>		II <sub>b5</sub>	15	70	95 <sup>b)</sup>
I <sub>b1</sub>	15	61	99	III <sub>a1</sub>	20	20	40
I <sub>b2</sub>	20	80	100 <sup>b)</sup>	III <sub>a2</sub>	20	61	85
I <sub>b3</sub>	30	89	100 <sup>b)</sup>	III <sub>b1</sub>	12	2	47
II <sub>b5</sub>	15	87	100 <sup>b)</sup>	III <sub>b3</sub>	17	5	56
II <sub>a1</sub>	15	32	76	III <sub>c1</sub>	15	10	15
II <sub>a2</sub>	15	50	90 <sup>b)</sup>	III <sub>c2</sub>	20	15	40
II <sub>a3</sub>	15	64	95 <sup>b)</sup>	III <sub>d1</sub>	12	22	24
II <sub>a5</sub>	15	70	98 <sup>b)</sup>	III <sub>d2</sub>	15	15	48

a) 癌细胞浓度  $1.2 \times 10^6$  个/ml; 1% 生理盐水做空白: 4h, 5%, 8h, 11%; b) 形成结团。

大于中性介质, 随着时间的延长释放速度变慢。而 III 类载体药物几乎不能释放出 5-FU 或其衍生物。

#### 4. 载体药物的体外抗癌活性

表 3 列出了部分甲壳胺载体药物体外抗艾氏腹水癌活性数据。I 和 II 类载体药物对艾氏腹水癌细胞有较强的杀伤作用, 并且 I 类载体药物的抗癌细胞活性大于 II 类, 而 III 类则较差。这可能与前二类载体药物可以释放出 5-FU 或其烷基羧酸衍生物有关。由表 3 还可以看出, 随着甲壳胺分子量的降低, 其载体药物的活性有所增强。

致谢 抗肿瘤细胞活性实验由湖北省肿瘤研究所史宗杰先生协助完成, 特此致谢。

## 参 考 文 献

- [1] Hirano, Shigehiro, *Sen'i Gakkaishi*, **1986**, 42 (6), 226; C.A., 105, 120547s.  
[2] 铃木茂生, 公开特許公報(日), **1984**, 昭 59—27826.  
[3] 铃木茂生, 公开特許公報(日), **1984**, 昭 59—27827.  
[4] Hirano, Shigehiro, Ohe, Yasuo and Matsuda, Noriaki, *Carbohydr. Res.*, **1978**, 60 (2), 404.  
[5] ZHOU Chaohua and YANG Fushun, *Chem. J. Chinese Univ.*, **1987**, 3(1), 90.  
[6] 赵儒林, 武汉大学博士论文, **1987**.  
[7] 周念恩, 武汉大学博士论文, **1987**.  
[8] 倉橋五男, 公开特許公報(日), **1986**, 昭 61—40303.  
[9] Duschinsky, R. and Gabriel, T.F., U.S. Patent, **1967**, 3, 354, 360.

## SYNTHESIS AND ANTITUMOR ACTIVITY OF CHITOSAN CONTAINING 5-FLUOROURACIL

YANG Fushun and ZHUO Renxi

(Department of Chemistry, Wuhan University, Wuhan)

### ABSTRACT

A series of polymeric carrier drugs were prepared by linking 5-fluorouracil to chitosan as a carrier. The conversion of  $H_2N$ - group in chitosan was estimated by the determination of nitrogen content, and the structure of polymeric carrier drugs was confirmed by IR, UV and  $^{13}C$ -NMR. Hydrolytic release of 5-fluorouracil or its derivatives from these new polymeric carrier drugs was also investigated. The preliminary results of the in vitro testing against Ehrlich Ascites Carcinoma cell showed that I and II type of polymeric drugs have good antitumor activity.

**Key words** Chitosan, 5-Fluorouracil, Polymeric carrier drugs and Antitumor activity