

· 论著 ·

巯基化阿霉素的两种合成方法的比较

吴 珊¹, 张叶叶¹, 郭海霞², 刘俊杰¹, 孙治国¹, 钟延强¹, 邹 豪¹ (1. 第二军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433; 2. 解放军 266 医院, 河北 承德 067000)

[摘要] 目的 探索合成供金纳米粒载药系统研究用模型药物巯基化阿霉素的可行方法。方法 分别采用 2-亚氨基硫烷盐酸盐(2-IT)法和琥珀酰亚胺-S-乙酰基硫代乙酸酯(SATA)法合成巯基阿霉素,通过高效液相色谱(HPLC)、飞行时间质谱(MS-ESI)及核磁共振氢谱(¹H NMR)验证巯基阿霉素的合成,并考察反应物摩尔比、反应时间等因素对合成巯基阿霉素的影响。结果 ¹H NMR 确证 DOX-SATA 出现了与硫酯基团相连的质子信号,表明新合成的化合物中含有硫酯基团。HPLC 及 MS-ESI 结果显示,两种方法均能合成巯基阿霉素,2-IT 法生成的巯基阿霉素随着反应时间延长易发生环化,形成环化巯基阿霉素。SATA 试剂法合成巯基阿霉素过程中不易发生副反应,合成的巯基阿霉素较为稳定。结论 通过两种方法的比较,SA-TA 法合成巯基阿霉素的方法较为可行。

[关键词] 巯基化阿霉素; 2-亚氨基硫烷盐酸盐(2-IT); 琥珀酰亚胺-S-乙酰基硫代乙酸酯(SATA)

[中图分类号] O621.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2014)06-0428-06

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2014.06.008

A comparison study of synthesizing methods of thiolated doxorubicin

WU Shan¹, ZHANG Yeye¹, GUO Haixia², LIU Junjie¹, SUN Zhiguo¹, ZHONG Yanqiang¹, ZOU Hao¹ (1. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. NO. 266 Hospital of PLA, Chengde 067000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the optimal method for synthesizing thiolated doxorubicin. **Methods** Thiolated doxorubicin was synthesized through two different methods. Doxorubicin was reacted with 2-iminothiolane (2-IT) and S-acetylthioglycolic acid N-hydroxysuccinimide ester (SATA), respectively. The synthesized thiolated doxorubicin was further characterized by HPLC and MS-ESI techniques. Several factors including molar ratios as well as reaction time were evaluated. **Results** The results showed that thiolated doxorubicin could be synthesized via both of the two methods successfully. Thiolated doxorubicin could be stable when doxorubicin was reacted with SATA. But the crude thiolated doxorubicin could be cyclized easily when doxorubicin was reacted with 2-IT. **Conclusion** Thiolated doxorubicin prepared with SATA is more feasible than that with 2-IT.

[Key words] thiolated doxorubicin; 2-iminothiolane (2-IT); S-acetylthioglycolic acid N-hydroxysuccinimide ester (SATA)

阿霉素(DOX)为放线菌(*Streptomyces varcaes-ius*)产生的蒽环类抗生素,是一种作用于 DNA 的药物,抗菌谱广,对多种肿瘤都有作用,广泛用于化学治疗。但长期使用阿霉素产生的蓄积性心脏毒性和肿瘤细胞对阿霉素产生的多药耐药性限制了阿霉素在临床上的应用^[1]。

纳米载药系统具有增强肿瘤的 EPR 效应、减少游离药物的非特异毒性及延长药物的体循环时间,增强药物在作用部位的蓄积,提高药效等优点而成为逆转肿瘤多药耐药的有效逆转策略之一^[2]。近

年来基于阿霉素的纳米载药系统主要包括阿霉素脂质体^[3]、阿霉素胶束^[4]、阿霉素聚合物纳米粒^[5]等,其中,以 Au-S 键为基础的谷胱甘肽还原响应型纳米载药系统^[6]成为研究热点。

为使阿霉素能与金纳米粒通过 Au-S 键形成金纳米粒载药系统,首先需要对游离的阿霉素进行化学修饰,合成具有含有游离巯基的巯基阿霉素(DOX-SH)。本研究采用两种不同方法合成了模型药物 DOX-SH,并通过高效液相色谱(HPLC)、飞行时间质谱(MS-ESI)及核磁共振氢谱(¹H NMR)比较了这两种方法的可行性,为进一步构建金纳米粒载药系统奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 材料 盐酸阿霉素(DOX·HCl)(大连美仑生物技术有限公司); 2-亚氨基硫烷盐酸盐(2-IT)、琥

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30801441); 科技部重大新药创制专项(2014ZX09J14107-01B)。

[作者简介] 吴 珊, 硕士。Tel: 13817291343; E-mail: wushan_1012@163.com。

[通讯作者] 邹 豪, 副教授。Tel: (021) 81871287; E-mail: haozou@smmu.edu.cn。

珀酰亚胺-S-乙酰基硫代乙酸酯(SATA)(美国 Sigma 公司);N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、三乙胺(TEA)、乙酸乙酯(Ethyl acetate)、氯化钠(NaCl)、盐酸羟胺(NH₂OH·HCl)、碳酸钠(Na₂CO₃)(上海国药集团化学试剂有限公司);三氟乙酸(TFA)(美国 Tedia 公司);乙腈、甲醇均为色谱纯(德国默克公司)。实验用水均为去离子水。

1.2 仪器 85-2 恒温磁力搅拌器(中国国华电器有限公司),Nanopure Diamond™ 纯水机(美国 Barnstead 公司),AL104 电子天平[METTLER TOLEDO 仪器(上海)有限公司],分液漏斗(上海和器公司),浓缩仪(德国 Eppendorf 公司),高效液相色谱仪 LC-20A(日本岛津公司 SHIMADZU),十万分之一天平[METTLER TOLEDO 仪器(上海)有限公司],超声波清洗器 SK 3300LH(上海市科导超声仪器有限公司),核磁共振仪 Avane II 600 MHz(瑞士 Bruker 公司),飞行时间质谱仪 G6220A TOF(美国 Agilent Technologies)。

2 方法

2.1 2-IT 试剂法合成 DOX-SH^[7]

2.1.1 制备方法 精密称取 DOX·HCl 和 2-IT 按 1:10、1:20、1:30 的摩尔比混合后溶于适量甲醇中,加入适量三乙胺,调节反应体系的 pH 值为 8~10,在 N₂ 保护避光的条件下,室温搅拌 2 h 或 24 h 后,纯化干燥得到 DOX-SH。

将反应后的产物进行 HPLC 色谱分析,考察不同反应物摩尔比及不同反应时间对 DOX-SH 合成的影响。

2.1.2 HPLC 检测 DOX-SH 色谱条件 色谱柱: ODS 色谱柱;柱温: 30°C;流动相: 乙腈和水(0.2% TFA)(35:65, V/V);流速: 1.0 ml/min;紫外检测波长: 490 nm;进样量: 20 μl;保留时间: 20 min。

2.1.3 不同反应摩尔比对 DOX-SH 的合成影响 反应摩尔比是影响反应进程的关键因素之一,本研究考察 DOX·HCl 与 2-IT 摩尔比分别为 1:10、1:20、1:30 对合成 DOX-SH 的影响,反应时间为 2 h,计算不同反应摩尔比阿霉素的转化率。

2.1.4 不同反应时间对 DOX-SH 的合成影响 根据“2.1.3”确定的最优反应摩尔比按照“2.1.1”的反应流程进行反应,分别在 2 h 和 24 h 对产物进行 HPLC 色谱分析,考察不同反应时间对 DOX-SH 合成的影响。

2.2 SATA 试剂法合成 DOX-SH

2.2.1 制备方法^[8] 精密称取 10.5 mg DOX·HCl 和 25.2 mg SATA 于 10 ml 试管中,用 3 ml DMF 溶

解,加入 6 μl 三乙胺于磁力搅拌器上搅拌 3 h 得到乙酰硫代乙酸酯取代的阿霉素(DOX-SATA),反应后的溶液用 5 ml 水稀释,分别用 8、7 ml 乙酸乙酯进行萃取,合并乙酸乙酯层,依次用 1% 盐酸、饱和碳酸钠、饱和食盐水洗涤 3 次,旋转蒸发浓缩得到第一步反应产物 DOX-SATA。取纯化后的 DOX-SATA 适量溶于 DMF 中,加入 3.4 mg 0.5 mol/L 盐酸羟胺、2 μl 三乙胺继续反应 1 h 后,纯化干燥得到 DOX-SH。

2.2.2 HPLC 验证不同时间各步反应产物及产物稳定性 取“2.2.1”中反应生成的第一步产物 DOX-SATA 及终产物 DOX-SH 分别溶于流动相后, HPLC 分析各步产物。将制备的 DOX-SATA 和 DOX-SH 室温放置 24 h 后, HPLC 分析各产物的稳定性。

2.3 飞行时间质谱 MS-ESI 验证 DOX-SH 的合成 将“2.1”及“2.2”中制得的 DOX-SH 分别溶于甲醇,于飞行时间质谱仪 G6220A TOF 进行测定,检测两种方法合成的 DOX-SH 的分子量。

质谱条件: 检测模式为负离子模式;雾化器压力 0.34 MPa;毛细管电压 3 600 V;碎片器电压 120 V;氮气流量 10 L/min;氮气温度 300.0°C。

2.4 核磁共振氢谱(¹H NMR)验证 DOX-SATA 的合成 称取 10 mg DOX、DOX-SATA 粉末,分别溶于 MeOD-d₄,用 600 MHz 核磁共振仪(Avane II 600 MHz, Bruker)鉴定化合物的分子结构。

3 结果

3.1 2-IT 试剂法合成 DOX-SH 2-IT 试剂法合成 DOX-SH 的反应机制如图 1 所示, 2-IT 为伯胺的硫醇化试剂, DOX 上的伯胺与 2-IT 试剂反应初期快速形成含有游离巯基和不稳定的亚氨基的 DOX-SH, 但是 DOX-SH 在 pH 值为 7.8 的条件下, 分子内部的亚氨基极易与游离巯基的氢原子结合脱去氨气, 形成环化巯基阿霉素(cyc-DOX)。

3.1.1 不同反应摩尔比对合成 DOX-SH 的影响 用 2-IT 试剂法合成 DOX-SH, 其合成的转化率受到反应物的摩尔比的影响。图 2A 中 DOX 的保留时间为 7.1 min, 图 2B~2D 中 3 份色谱图均出现了保留时间分别为 12.7 min 的 DOX-SH 和 10.6 min 的 cyc-DOX 的色谱峰。由图可知, 增大反应摩尔比, DOX-SH 和 cyc-DOX 的色谱峰峰面积增大, 表明增大反应产物的摩尔比, DOX-SH 的产率增加。图 2D 表示, DOX 与 2-IT 试剂反应 2 h, DOX 基本反应完全。以 DOX 的浓度为横坐标, 色谱峰面积值为纵坐标进行线性回归得到标准曲线方程为: $A = 14\ 587C - 15\ 620$ ($r = 0.999\ 6$)。根据标准曲线计算得到不同反应摩尔比 DOX 的转化率如表 1 所示。

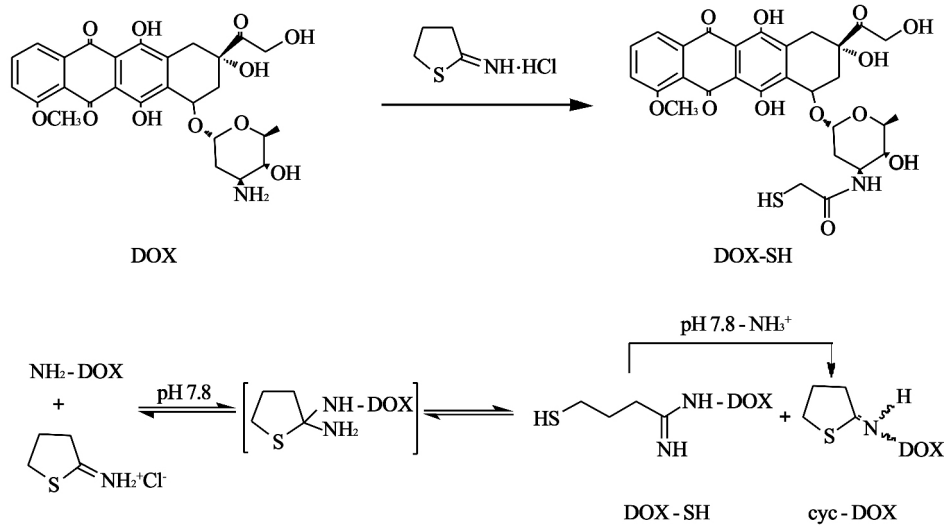


图1 2-IT 试剂法合成 DOX-SH 反应机制

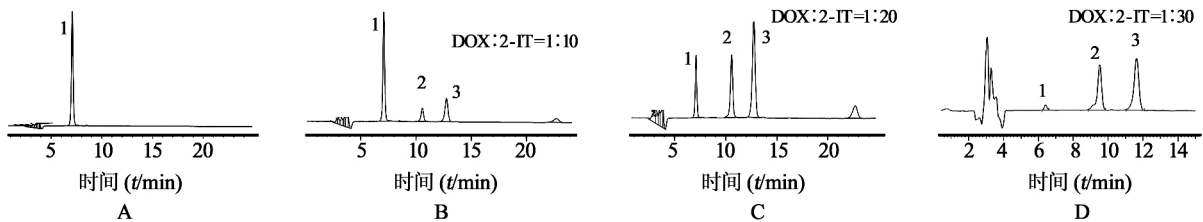


图2 不同反应摩尔比合成 DOX-SH 的 HPLC 色谱图

1. DOX; 2. cyc-DOX; 3. DOX-SH

表1 2-IT 试剂法合成 DOX-SH 不同反应摩尔比 DOX 的转化率

反应摩尔比 (DOX : 2-IT)	DOX 转化率
1 : 10	60.4%
1 : 20	86.5%
1 : 30	95.2%

研究进一步利用 HPLC 法考察了不同反应时间对 DOX-SH 合成的影响。图 3A、图 3B 为 DOX 与 2-IT 试剂反应 2 h 和 24 h 后的 DOX-SH 色谱图。图 3B 与图 3A 相比, DOX 的色谱峰峰面积减小, 甚至消失, 表明反应时间延长, DOX 反应完全。但是与此同时, DOX-SH 色谱峰也消失, 表明该 DOX-SH 不稳定, cyc-DOX 明显增加。

3.1.2 不同反应时间对合成 DOX-SH 的影响 本

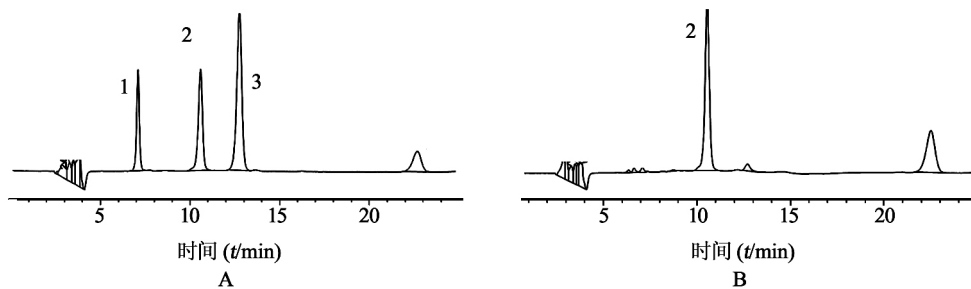


图3 不同反应时间合成 DOX-SH 的 HPLC 色谱图 A(2 h)、B(24 h)

1. DOX; 2. cyc-DOX; 3. DOX-SH

3.2 SATA 试剂法合成 DOX-SH

3.2.1 HPLC 色谱分析合成 DOX-SH 各步反应产物 合成 DOX-SH 也可采用双异官能团交联剂 SA-TA 试剂法 ,该方法合成 DOX-SH 的反应机制如图 4 所示。琥珀酰亚胺-S-乙酰基硫代乙酸酯 SATA 与伯

胺反应添加保护性巯基。DOX 的伯胺和 SATA 上琥珀酰亚胺在一定摩尔比下反应生成中间产物 DOX-SATA ,DOX-SATA 的乙酰基硫代乙酸酯在盐酸羟胺的作用下脱去乙酰基团 ,最终在 DOX 分子上引入游离巯基基团。

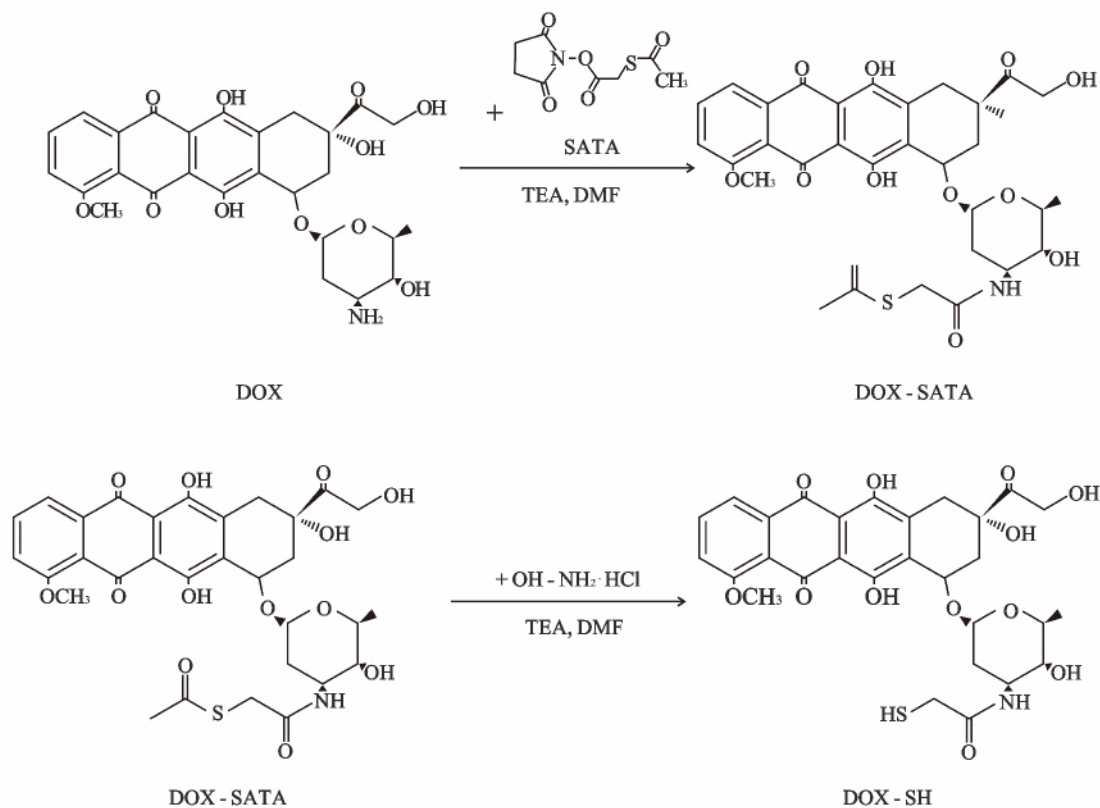


图 4 SATA 试剂法合成 DOX-SH 的反应流程图

将该方法合成 DOX-SH 过程中的各部分产物按照“2.1.2”项下色谱条件进行色谱分析。图 5A 保留时间为 6.4 min ,反应 3 h 后生成的 DOX-SATA 的

保留时间为 14.8 min(图 5B) 经盐酸羟胺脱去乙酰基团后生成 DOX-SH 的色谱图如图 5C 所示 ,保留时间改变为 9.9 min。

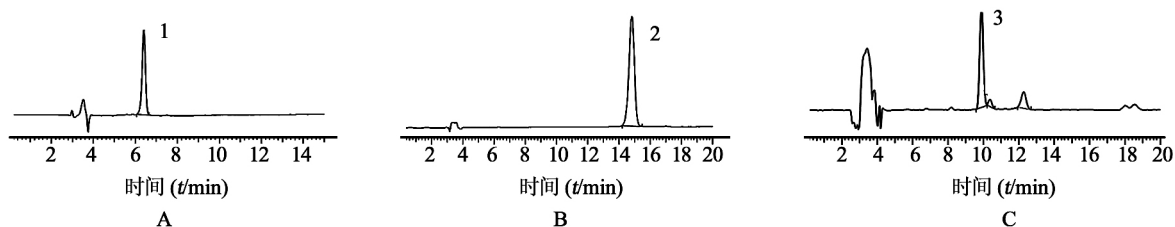


图 5 SATA 试剂法合成 DOX-SH 的各步反应产物的 HPLC 色谱图

1. DOX; 2. DOX-SATA; 3. DOX-SH

3.2.2 HPLC 验证 DOX-SATA 及 DOX-SH 的稳定性 SATA 试剂法合成 DOX-SH 各步反应产物的稳定性如图 6 所示 ,从图 6A 可以看出 ,放置 24 h 后

DOX-SATA 的保留时间(15.26 min) 变化不大 ,表明 DOX-SATA 比较稳定。与反应初生成的 DOX-SH 相比 ,也并未发生明显变化 ,表明该方法合成的 DOX-

SH 较为稳定(图 6B)。

3.3 MS-ESI 验证两种方法 DOX-SH 的合成 通过 MS-ESI 考察了两种合成 DOX-SH 的分子量,图 7A 为未发生反应的 DOX 的质谱图,阿霉素的分子离子峰为 544.18,经 2-IT 试剂法巯基化之后的 DOX-SH 的分子离子峰为 645.21(图 7B),分子量为 628.18 的分子离子峰与化合物的相对摩尔质

量 645.21 相比,分子量减少了 17,结合“3.1.1”中 2-IT 试剂与阿霉素反应的机制可知,628.18 为 cyc-DOX 的分子离子峰,该结果与 HPLC 色谱图结果一致。SATA 试剂法合成的 DOX-SH 如图 7C 所示,分子离子峰为 616.15,两种方法合成的 DOX-SH 的分子量均与理论值相符,表明两法均能成功合成 DOX-SH。

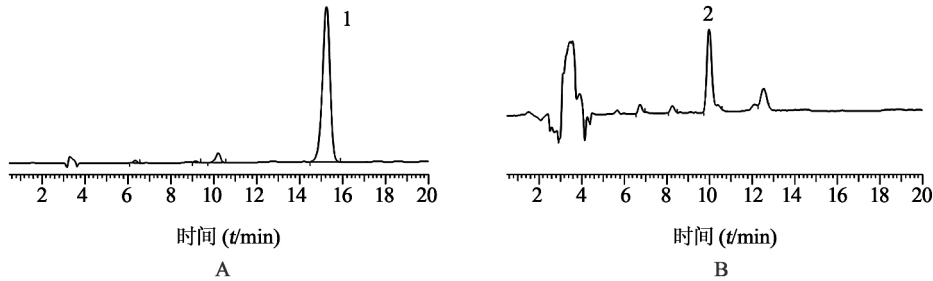


图 6 SATA 试剂法合成 DOX-SH 各步反应产物放置 24 h 后的稳定性

1. DOX-SATA; 2. DOX-SH

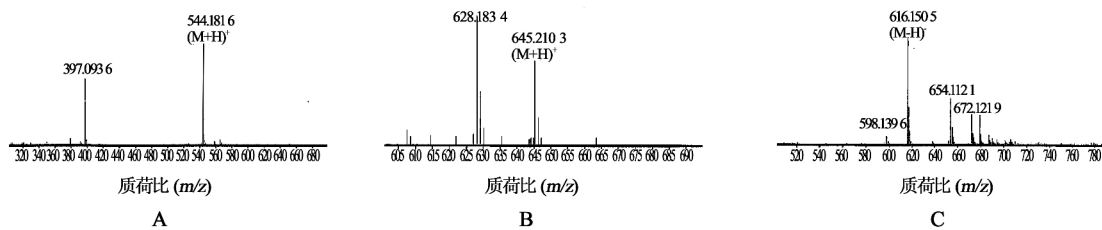


图 7 DOX (A)、DOX-SH (B 2-IT 试剂法)、DOX-SH (C SATA 试剂法) 的 MS-ESI 谱图

3.4 ^1H NMR 验证 DOX-SATA 的合成 采用 600 M^1H NMR 和 HPLC 法对 DOX 的巯基化反应产物进行鉴定。如图 8 所示,与 DOX 相比,DOX-SATA

出现了与硫酯基团相连的质子信号,表明新合成的化合物中含有硫酯基团。

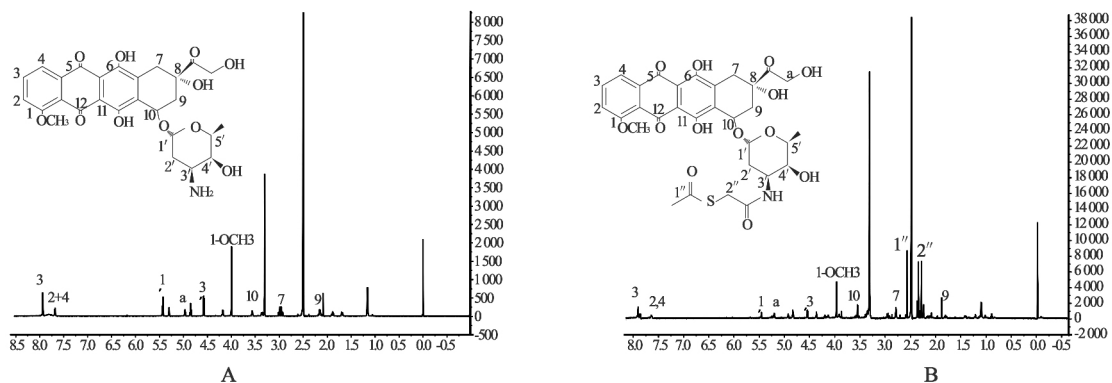


图 8 DOX (A)、DOX-SATA (B) 的 600 M^1H NMR 谱图

4 讨论

阿霉素分子结构中具有活性氨基,较易与其他

试剂形成共价键从而被修饰成具有特定官能团的阿霉素衍生物,并且被修饰的阿霉素抗肿瘤活性没有

明显改变。本研究探索了对阿霉素进行巯基化修饰的两种化学合成方法 通过 HPLC 和 MS-ESI 等手段对合成的巯基阿霉素进行表征和鉴定。

¹H NMR 确证 DOX-SATA 出现了与硫酯基团相连的质子信号 表明新合成的化合物中含有硫酯基团。HPLC 和 MS-ESI 结果显示 两种方法均能合成巯基阿霉素。然而 2-IT 试剂法中 由于接枝到阿霉素游离氨基上的 2-IT 试剂中含有活性较大的亚胺基 亚胺基极易与反应初始阶段形成的游离巯基上的氢结合形成氨气 而母环最终形成环化巯基阿霉素。因此 该方法合成的巯基阿霉素不稳定 随着时间延长巯基阿霉素转变为环化巯基阿霉素 不能满足用作模型药物的游离巯基的要求。SATA 试剂法合成巯基阿霉素的反应过程中 首先形成稳定的乙酰硫代乙酸酯取代的阿霉素 然后再在盐酸羟胺的作用下脱去乙酰基团 形成含有游离巯基的巯基阿霉素 该过程中不存在其他易发生的副反应。我们的研究表明 SATA 试剂法合成含有游离巯基的巯基阿霉素的方法更为可行。

【参考文献】

[1] Li PY ,Lai PS ,Hung WC , *et al.* Poly(l -lactide)-vitamin E TPGS nanoparticles enhanced the cytotoxicity of doxorubicin in

drug-resistant MCF-7 breast cancer cells [J]. *Biomacromolecules* 2010 ,11(10) :2576-2582.

- [2] Kibria G ,Hatakeyama H ,Harashima H. Cancer multidrug resistance: mechanisms involved and strategies for circumvention using a drug delivery system [J]. *Arch Pharm Res* ,2014 ,37(1) : 4-15.
- [3] Thierry AR ,Vige D ,Coughlin SS , *et al.* Modulation of doxorubicin resistance in multidrug-resistant cells by liposomes [J]. *FASEB J* ,1993 ,7(6) :572-579.
- [4] Kumar SA ,Peter YA ,Nadeau JL. Facile biosynthesis , separation and conjugation of gold nanoparticles to doxorubicin [J]. *Nanotechnology* 2008 ,10(49) :495101.
- [5] Barraud L ,Merle P ,Soma E , *et al.* Increase of doxorubicin sensitivity by doxorubicin-loading into nanoparticles for hepatocellular carcinoma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Hepatol* 2005 ,42(5) :736-743.
- [6] Ma P ,Mumper RJ. Anthracycline nano-delivery systems to overcome multiple drug resistance: a comprehensive review [J]. *Nano Today* 2013 ,8(3) :313-331.
- [7] Wang X ,Cai X ,Hu J , *et al.* Glutathione-triggered "off-on" release of anticancer drugs from dendrimer-encapsulated gold nanoparticles [J]. *J Am Chem Soc* 2013 ,135(26) :9805-9810.
- [8] Gu YJ ,Cheng J ,Man CW , *et al.* Gold-doxorubicin nanoconjugates for overcoming multidrug resistance [J]. *Nanomedicine* , 2012 ,8(2) :204-211.

【收稿日期】 2014-08-02 【修回日期】 2014-10-13

【本文编辑】 李睿曼

(上接第 427 页)

4 结论

本研究利用细胞膜色谱技术、在线全二维技术和 HPLC-TOFMS 技术联用 实现了对中药鸦胆子活性成分的在线全二维筛选 筛选和分离结果快速、准确 共鉴定出两个潜在的有效成分 其药理活性和作用还需进一步研究。该方法充分利用了细胞膜色谱的生物学活性、全二维技术的分离效能和质谱技术的鉴定能力 改善了传统细胞膜色谱分离效果差的现状 实现了在线的活性成分筛选和鉴定 操作简便、节省时间、分离效果良好 可以为天然产物活性成分的分离分析提供一个良好的解决途径。

【参考文献】

[1] 杨兴鑫 张艳利 李晓妮. 细胞膜色谱法及其在药物研究中的应用进展 [J]. *中国药学杂志* 2010(18) :1361-1364.

[2] He L ,Wang S ,Geng X. Coating and fusing cell membranes onto a silica surface and their chromatographic characteristics [J]. *Chromatographia* 2001 ,54(1-2) : 71-76.

[3] 林宏英 吴建梅 张文生. 鸦胆子油的研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志* 2006 ,12(4) :65-69.

- [4] 丁晨旭 索有瑞. 中药鸦胆子化学成分及药理学研究进展 [J]. *中成药* 2006 ,28(1) :117-120.
- [5] He L ,Yang G ,Geng X. Enzymatic activity and chromatographic characteristics of the cell membrane immobilized on silica surface [J]. *Chin Sci Bull* ,1999 ,44(9) : 826-831.
- [6] Chen X ,Cao Y ,Lv D , *et al.* Comprehensive two-dimensional HepG2/cell membrane chromatography/monolithic column/time-of-flight mass spectrometry system for screening anti-tumor components from herbal medicine [J]. *J Chromatogr A* ,2012 ,1242: 67-74.
- [7] 任牡丹 胡雅楠 和水祥 等. 丹参酮 II a 对人肝癌细胞 ang-2 及其受体 tie-2 表达的影响 [J]. *西安交通大学学报(医学版)* 2012(2) :203-210.
- [8] 齐永 庄乾元 彭鄂军 等. 富含亮氨酸重复序列和免疫球蛋白样结构域基因 1 对人肝癌细胞株 Hep-G2 恶性表型的影响及其作用机制 [J]. *中华实验外科杂志* ,2012 ,29(10) : 1906-1909.
- [9] Jatoi A ,Dakhil S R ,Sloan J A , *et al.* Prophylactic tetracycline does not diminish the severity of epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor - induced rash: results from the North Central Cancer Treatment Group (Supplementary N03CB) [J]. *Support Care Cancer* ,2011 ,19(10) : 1601-1607.

【收稿日期】 2014-09-04 【修回日期】 2014-10-08

【本文编辑】 陈静