

文章编号:1000-582X(2002)05-0157-04

叠氮法合成谷氨酰胺类化合物及其抗肿瘤活性*

李勤耕¹, 骆永鹏¹, 陈捷¹, 吉庆刚¹, 杨善彬², 金初熔²

(1. 重庆医科大学药理学系, 重庆 400016; 2. 四川大学药学院, 四川成都 610001)

摘要: 研究发现抗癌酮(Antineoplaston A₁₀)降解物中谷氨酰胺与异谷氨酰胺类衍生物显示出抗肿瘤活性。为此, 设计并合成了一系列苯乙酰谷氨酰胺类化合物供抗肿瘤活性筛选。采用合成酰基叠氮化合物, 再与胺类于低温下反应生成酰胺类目标化合物, 该方法反应条件温和, 收率好, 而且手性中心不发生消旋化。所合成化合物结构经 IR、¹HNMR、MS 及元素分析方法鉴定。对所合成目标化合物做抗肿瘤活性评价, 采用 MTT 法对 L1210 细胞进行了测试, 初步结果显示有一定的抑制肿瘤细胞存活的作用。

关键词: 叠氮法; 谷氨酰胺; 抗肿瘤

中图分类号: R914

文献标识码: A

目前利用肿瘤细胞生理过程中所必需的活性物质作为抗肿瘤药物研究中的先导化合物是一个重要方向。肿瘤细胞生长过程中合成蛋白质所必需的物质谷氨酰胺必须依赖宿主供给, 而人体正常细胞则能够自己合成谷氨酰胺。研究表明, 癌细胞利用谷氨酰胺需要谷氨酰胺酶的参与。如果化合物能选择性地抑制谷氨酰胺酶的活性, 则可能特异性地抑制癌细胞生长, 而对正常细胞危害较小^[1]。据文献报道, 谷氨酰胺及异谷氨酰胺类化合物可能具有抑制谷氨酰胺酶的作用^[2-6]。但目前所报道的数目及种类有限, 不便于系统研究, 我们合成了几种异谷氨酰胺类化合物, 初步研究显示有一定的活性。笔者拟对谷氨酰胺类化合物的

合成进行研究。

我们设计并合成了一类新的苯乙酰谷氨酰胺类衍生物图 1, 目标化合物采用叠氮法合成, 并进行了初步的药理学研究。

1 合成路线

对于目标化合物的合成, 可采用先合成取代的谷氨酸酐, 然后再与胺反应来制备, 但此法可能引起产品的外消旋化; 另一种方法是采用 N-取代谷氨酸与多聚甲醛在酸性条件下缩合生成恶唑烷酮衍生物, 再与胺反应生成 γ 酰胺谷氨酸的衍生物, 然后碱性水解, 开环制备, 但这种方法也存在产品的消旋化问题, 并且谷氨酸的 α 酯不易得到。为得到的目标化合物的光学活性, 我们采用叠氮法来制备。此路线各步的反应条件温和, 收率好, 其中叠氮化制得的中间体不经分离纯化可直接与胺反应。此法的最大特点是具有光学活性的化合物在反应过程中不发生消旋化, 但酰胺化过程中放出的叠氮酸气体有毒性, 并且酰基叠氮物不稳定, 受热易分解或发生 Curtius 重排副反应, 所以反应宜在通风橱中, 于低温下进行。合成路线如图 2。

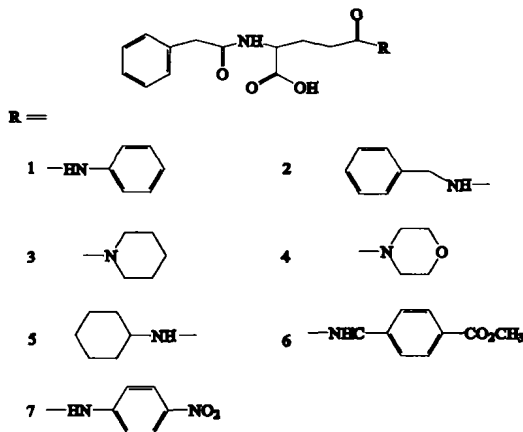


图 1 苯乙酰谷氨酰胺类化合物的分子结构

* 收稿日期: 2002-01-16

作者简介: 李勤耕(1954-), 男, 重庆人, 重庆医科大学副教授, 硕士, 主要从事药物合成研究。

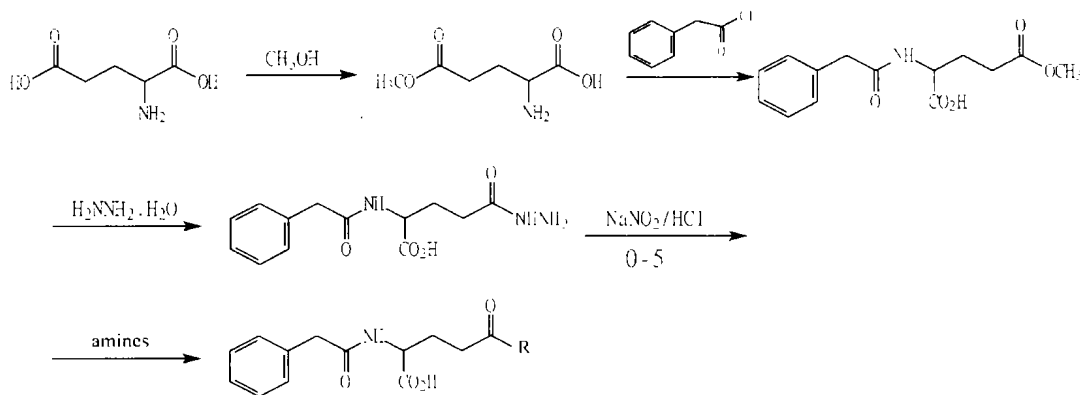


图2 苯乙酰谷氨酸胺类化合物合成路线

2 实验部分

2.1 苯乙酰氯的合成

在 100 mL 圆底烧瓶中,加入苯乙酸 54.4 g(0.40 mol),氯化亚砷 60 mL(0.83 mol),装上带有氯化钙干燥管的回流冷凝管,搅拌,油浴加热,反应完毕后,回收过量氯化亚砷,减压蒸馏,收集 98 ~ 102 °C/1.3 kPa(9 mmHg)的馏分,得苯乙酰氯(微黄色),收率 97.1%,文献报道收率 89.5%^[5]。

2.2 L-谷氨酸 γ -甲酯的制备

在 500 mL 圆底烧瓶中,加入甲醇 250 mL,乙酰氯 20 mL,室温搅拌 0.5 h,再缓缓加入 L-谷氨酸 36.8 g,溶解后,静置 48 h。用吡啶中和,放置 20 h 后过滤,固体用乙醇、乙醚洗涤后抽干,干燥,得粗品。粗品用 70% 的甲醇重结晶,得精制品 21 g,收率 52.1%,熔点 180 ~ 181 °C(文献报道,熔点 182 °C,粗品收率 42.0% ~ 54.7%)。元素分析: C:44.52%; H:7.02%; N:8.51%(计算值: C:44.72%; H:6.88%; N:8.69%)。IR: ν_{N-H} 3 460 cm^{-1} , ν_{O-H} 3 140 cm^{-1} ; $\nu_{C=O}$ 1 730 cm^{-1} , 1 640 cm^{-1} , 1 620 cm^{-1} 。

2.3 N-苯乙酰-L-谷氨酸 γ -甲酯的制备

在 500 mL 的三颈瓶中,加入 L-谷氨酸 γ -甲酯 23.0 g(1.43×10^{-2} mol),蒸馏水 310 mL,碳酸氢钠 42.0 g(0.5 mol),搅拌,冰浴冷却下,加入苯乙酰氯 32.8 g。反应完成后,用二氯甲烷萃取(2×25 mL),调节 pH = 2,在冰箱中放置 3 h,过滤结晶,用蒸馏水洗涤 3 次,干燥,得粗品 33.2 g,收率 83%。粗品在乙酸乙酯中重结晶,精制品熔点 134.5 ~ 135.0 °C, $[\alpha]_D^{27} = -9.37^\circ$ (EtOH, C = 1.6),元素分析 C:60.42%; H:6.29%; N:4.91%(计算值 C:60.21%, H:6.14%; N:5.02%)。IR: ν_{N-H} 3 336 cm^{-1} ; $\nu_{C=O}$ 1 720 cm^{-1} , 1 702 cm^{-1} 。

2.4 N-苯乙酰-L-谷氨酸 γ -酰肼的制备

在 50 mL 三颈瓶中,加入 5.5 g N-苯乙酰-L-谷氨酸 γ -甲酯和 8 mL 50% 水合肼,于 20 ~ 30 °C 搅拌

反应 9 h 后,用 25 mL 水稀释,滴加浓盐酸调节 pH 值至 1 ~ 1.5,过滤后滤液 pH 值调至 3 左右,搅拌下析出白色固体,冰箱中放置过夜后过滤,水洗,抽干,干燥,得粗品 6.32 g,粗品用稀盐酸溶解,活性炭脱色后,滤液调 pH 值至 3 左右,静置得白色绒毛状晶体,过滤得产品 4.85 g,收率 88.2%, mp 176 ~ 177 °C, $[\alpha]_D^{25} = -3.04^\circ$ (DMF, C = 1.22),元素分析: 实测值: C:56.05%; H:5.94%; N:15.08%; 计算值: C:55.90%; H:6.14%; N:15.05%。IR: ν_{N-H} 3 294 cm^{-1} 3 284 cm^{-1} 3 234 cm^{-1} ν_{O-H} 3 069 cm^{-1} $\nu_{C=O}$ 1 706 cm^{-1} 1 650 cm^{-1} 。

2.5 N-苯乙酰-L-谷氨酸 γ -叠氮化物的制备

将 1.0 g N-苯乙酰-L-谷氨酸 γ -酰肼溶于 2 mL 浓盐酸和 10 mL 水中,与 10 mL 乙酸乙酯一起搅拌并冷却至 0 °C 后,滴加 7.14×10^{-3} mol/L 亚硝酸钠水溶液 2 mL,搅拌反应 20 min 后,分出乙酸乙酯层,水层用 10 mL 乙酸乙酯提取,乙酸乙酯合并后用冷蒸馏水洗 3 次,无水硫酸镁干燥,过滤后即得含 N-苯乙酰-L-谷氨酸 γ -叠氮化物的乙酸乙酯溶液(可直接供下步反应应用)。

2.6 N-苯乙酰-N-苯基-L-谷氨酸的制备

在 50 mL 三颈瓶中加入 1.0 mL(0.11 mol)苯胺及 3 mL 乙酸乙酯,冰浴冷至 0 °C 后,搅拌下滴加新鲜制得的含 N-苯乙酰-L-谷氨酸 γ -叠氮化物的乙酸乙酯溶液(步骤 2.5 制得),反应温度维持 0 ~ 5 °C,加料完毕,室温搅拌反应 3 h,再加 1 mL 浓盐酸及 2 mL 水酸化并搅拌 0.5 h 后,减压浓缩,过滤得白色固体,固体用乙酸乙酯,水洗涤两次,抽干,干燥得产品 0.85 g,收率 69.7%, mp 193 ~ 198 °C。粗品用乙酸乙酯-甲醇重结晶得白色针状固体, mp 196 ~ 198 °C, $[\alpha]_D^{25} = +14.43$ (甲醇, C = 0.69)。

用类似的方法和不同的后处理可制得其它目标化合物,其元素分析及光谱数据如表 1、表 2。

表 1 目标化合物的理化数据

编号	收率/%	熔点/°C	[α] _D ²⁵ (mol/L)	元素分析(括号内为计算值)/%		
				C	H	N
1	69.7	196 - 198	+ 14.43 (MeOH 0.69)	66.92(67.05)	5.87(5.92)	8.25(8.23)
2	92.9	154 - 155	- 0.60 (MeOH 0.83)	67.45(67.78)	5.89(6.26)	7.76(7.90)
3	65.5	112 - 114	+ 9.77 (CHCl ₃ 0.87)	65.07(65.04)	7.46(7.28)	8.36(8.43)
4	46.8	142 - 144	+ 13.40 (CHCl ₃ 1.24)	60.70(61.06)	6.78(6.63)	8.30(8.38)
5	68.5	177 - 178	- 3.96 (DMF 0.91)	65.08(65.87)	7.36(7.56)	8.12(8.09)
6	57.5	185 - 186		63.94(64.06)	5.93(5.87)	7.15(6.79)
7	43.4	213 - 215				

表 2 部分目标化合物的 IR、NMR 及 MS 数据

编号	ν/cm^{-1} (IR)				δ/ppm				MS(m/z) (主要碎片离子)				
	C=O	N-H	C=N	O-H									
1	1 698	3 315	1 557	3 078	9.75	8.25	7.45	7.10	340	322	306	220	171
	1 665	3 278	1 534		4.20	3.45	2.35	2.10	155	148	130	93	91
2	1 746	3 343	1 543	2 930	8.42	7.41	4.26	3.46	355	337	263	219	191
	1 654	3 293				2.26	2.06		118	106	91	84	65
3	1 740	3 220	1 565	3 066	10.15	7.20	1.00	4.30	333	332	278	169	140
	1 638				3.50	3.25	2.75	1.50	127	112	91	86	84
4	1 729	3 269	1 557	3 094	7.30	7.15	4.34	3.59	335	334	171	142	130
	1 625				3.74	3.43	2.98		88	87	86	84	70
5	1 701	3 331	1 542	3 081					374	346	255	183	141
	1 642	3 281							130	118	100	98	91
6	1 725	3 290	1 552	3 096					413	412	289	164	149
	1 643								133	118	106	91	84
7					12.30	8.36	7.80	4.18					
					3.31	2.78	1.86						

3 目标化合物的初步抗肿瘤活性分析

目标化合物体外抗肿瘤活性采用 MTT 法进行测试,测得含不同浓度目标化合物体外培养 L1210 细胞成活率,结果如表 3 所示。

表 3 Antineoplaston A₁₀ 衍生物体外培养

样品	L1210 中的活性 (MTT - Assay) %			
	肿瘤细胞成活率			
	250 mg/L	25 mg/L	2.50 mg/L	0.25 mg/L
1	60.04	78.25	95.41	95.69
2	43.78	58.02	72.83	76.13
3	40.37	50.21	70.00	70.51
4	75.18	80.60	86.52	106.80
5	58.43	69.56	70.33	85.94
6	65.85	70.55	72.30	90.01
7	52.07	60.26	65.29	72.66

结果表明,除化合物 4 以外,其余化合物均有一定抑制瘤细胞存活的能力,有待进一步研究并探讨构效

关系。

参考文献:

- [1] EAGLE H. Amino acid requirement of normal and malignant human cell in tissue culture[J]. Arch Biochem Biophys, 1957, 67:432.
- [2] 赵德谦, 李士谔. 淋巴肉瘤组织中谷氨酰胺酶的性质以及谷氨酰胺衍生物对此酶活性的抑制作用[J]. 生物化学与生物物理学报, 1962, 2(1):49.
- [3] SELIGMAN A M. Preliminary clinical trial of a new possible cancer chemotherapeutic agent based upon enzymatic detoxification by normal epithelial tissue [J]. Proc AM Ass Cancer Res, 1959, 6:63.
- [4] BURZYNSKI S R. Antineoplaston AS2 - 5[J]. Drugs Exptl Clin Res, 1986, 12 (Suppl. 1): 11 - 36.
- [5] 李勤耕, 付渝滨, 金初熔, 等. 抗肿瘤药物 Antineoplaston A₁₀ 新合成方法的研究[J]. 药物化学杂志, 1997, 7(2): 112 - 114.
- [6] KHALID M. N', N' - disubstituted l - isoglutamines as novel cancer chemotherapeutic agents[J]. Drugs Exptl clin Res, 1987, 13(suppl. 1): 57 - 60.

Azide Method Applied in the Synthesis of Antineoplastic Active Materials – N' – Phenylacetyl – N – Substituted Glutamine

LI Qin-geng¹, LUO Yong-peng¹, CHEN Jie¹, JI Qing-gang¹,
YANG Shan-bin², JIN Chu-rong²

(1. Dept. Pharmacy, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China;
2. School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610001, China)

Abstract: The results of studies of Antineoplastic A10 show its degradation products, such as glutamines and isoglutamines, having antitumor activity. According to these, some N' – phenylacetyl – N – substituted glutamines are designed and synthesized for researching their antitumor activity. In the syntheses of these compounds, the acid azides are prepared first, which then react with amines at low temperature to transform to the target molecules. The mild reaction conditions and good yields and the optical activity maintaining are the merits of this method. Evaluation of antitumor activity of the target molecules is carried out by MTT method to L1210 cell strain. The result shows some compounds can inhibit growth of the cancer cells.

Key word: azide; glutamine; antitumor

(责任编辑 张 苹)

~~~~~  
(上接第 147 页)

## Improvement of Alkaline Fillers on Anti – stripping Properties of Asphalt Concrete

LI Ai-meí, XIAO Jun

(School of Civil & Structural Engineering, Southwest University of Science & Technology, Mianyang, Sichuan 62100, China)

**Abstract:** Anti-stripping is an important objective of asphalt concrete engineering. Effects of acidic and alkaline fillers on anti-stripping of asphalt concrete, and the possibilities of solid powder wastes added into asphalt concrete as the filler, have been explored. The result shows that additions of alkaline filler such as limestone and EF material into asphalt concrete as the filler, compared to acidic fillers such as siliceous mineral filler and fly ash, can effectively enhance the Marshall stability, resilient modulus and split tensile strength for this mixture. Meanwhile, the anti – stripping ability of asphalt concrete would be greatly improved.

**Key words:** asphalt concrete; filler; anti – stripping

(责任编辑 姚 飞)