

4-硫-5-氯尿苷的合成及最优条件探索

干苗苗¹, 张 杨¹, 郭天宇¹, 梁 露¹, 包 颖¹, 张晓辉², 闫德峰^{1*}

¹新疆医科大学厚博学院, 新疆 克拉玛依

²大连大学环境与化学工程学院, 辽宁 大连

收稿日期: 2021年11月1日; 录用日期: 2021年11月17日; 发布日期: 2021年11月29日

摘 要

核苷类似物在抗肿瘤活性方面应用极大, 为获得具有潜在抗肿瘤活性药物4-硫-5-氯尿苷, 以尿苷为原料, 经乙酰化、氯代、硫代、脱乙酰化等步骤首次合成4-硫-5-氯尿苷, 并探索了反应过程中温度、剂量、时间对产品收率的影响, 并使用¹H-NMR及¹³C-NMR对所得产品的结构进行了表征。

关键词

4-硫-5-氯尿苷, 抗肿瘤, 有机合成, 硫代反应

Synthesis and Optimum Conditions of 4-Thio-5-Chlorouridine

Miaomiao Gan¹, Yang Zhang¹, Tianyu Guo¹, Lu Liang¹, Ying Bao¹, Xiaohui Zhang², Defeng Yan^{1*}

¹Houbo College of Xinjiang Medical University, Karamay Xinjiang

²College of Environment and Chemical Engineering, Dalian University, Dalian Liaoning

Received: Nov. 1st, 2021; accepted: Nov. 17th, 2021; published: Nov. 29th, 2021

Abstract

Nucleoside analogues are widely used in antitumor activity. In order to obtain 4-thio-5-chlorouridine with potential antitumor activity, 4-thio-5-chlorouridine was synthesized from Uridine by acetylation, chlorination, thiolation and deacetylation for the first time. The effect of temperature, dose and time on the yield of the product was explored, and the structure of the product was characterized by ¹H-NMR and ¹³C-NMR.

*通讯作者。

Keywords

4-Thio-5-Chlorouridine, Antitumor, Organic Synthesis, Thio Reaction

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 研究背景

1.1. 核苷类似物在抗肿瘤方面的应用

在日常生活中,癌症让所有人胆战心惊。根据世界卫生组织国际癌症研究机构(IARC)统计,2020年,全世界新增癌症病例1929万例,死亡病例996万例。而我国的情况也不容乐观:2020年新增癌症病例457万例,死亡病例300万例,占全球发病率的23.7% [1]。恶性肿瘤已成为本世纪人类的第一杀手,对人类生存构成了严重的威胁,也对人类的生活造成了巨大的负担[2]。

恶性肿瘤的预防和治疗是医学领域防治的主题。抗肿瘤药物最显著的特征是种类繁多,在作用机制及临床应用中具有很强的针对性和差异性。大多数抗肿瘤药的作用机制是阻止脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)或蛋白质的合成,或直接作用于大分子,从而抑制肿瘤细胞的分裂和增殖,使之死亡[3]。随着科研人员对核苷类药物抗肿瘤作用机理研究的不断深入,其研究也取得了巨大进展[4]。

核苷是一类特别重要的生物大分子,由于其结构和核酸构成相似,在抗癌新药的研究中显示出巨大的优势,特别是碱基的结构,对核苷酸类似物的生物活性起着决定性的作用,通过修饰嘧啶而得到的核苷酸类似物,其主要作用机制是通过特异性干扰DNA在肿瘤细胞中的合成、影响RNA的转录过程或者蛋白质合成,或作用于生物大分子,然后遏制肿瘤细胞的生长,使之死亡[4] [5] [6]。

美国药理学家 Gertrude Belle Elion 合成了抗疱疹病毒药物 - 阿昔洛韦(Aciclovir),在1988年得到了诺贝尔生理学奖和医学奖。被很多知名的相关研究人员所关注,经过持续不断地深入研究,发现了十分多的修饰后的核苷类似药物。比如说,司他夫定(D4T)与恩曲他滨(NRTIs)等药物[7]。

1.2. 5-取代核苷类似物的研究

在核苷衍生物的生物活性中,5-取代胸苷类似物已被广泛应用于临床作为抗肿瘤和抗病毒药物,例如5-碘脱氧尿苷(IdU)、5-溴脱氧尿苷(BrdU)和5-氟脱氧尿苷(FdU) [8]。研究表明,在尿嘧啶碱基5-位上引入吸电子基团、强极性基团或不饱和基团且这些基团与碱基杂环共轭时,所得衍生物往往具有较好的生物活性[9]。5位可作为引入官能团的理想修饰位点,通过不同官能团取代后,可能具有抗肿瘤和抗病毒活性[10] [11] [12]。

调查显示,在美国国家癌症中心所准许的抗癌先导化合物中,有五分之二的分子包含Cl、Br和I,通过对嘧啶环、嘌呤环和核糖的修饰,卤素使核酸衍生物表现出更强的抗病毒、抗代谢作用,抗菌等特性,这表明卤素在药物研发中起着重要的作用[13]。

如5-碘-2'-脱氧尿苷(碘苷),从1962年开始就用于牛痘病毒、单纯疱疹病毒的治疗[14]。还有一线抗癌药物5-氟尿嘧啶(Fluorouracil, 5-FU),已经作为抗肿瘤代谢药物广泛用于临床,常用于治疗肝癌,头颈部癌症、结肠癌等。

Federico 等以 NIS (N-碘代琥珀酰亚胺)为碘化试剂,在 DMF (N,N-二甲基甲酰胺)中微波加热 3 分钟,

完成对嘧啶环 5 位的碘代反应。Ganguly 等采用 NBS (N-溴代琥珀酰亚胺)作为溴代试剂, 在 n-Bu₄NBr (TBAB, 四丁基溴化铵)中微波加热 4 分钟, 完成了对嘧啶环 5 位的溴代反应, 产率达到 90% 以上[15]。

1.3. 研究意义

当今世界, 肿瘤是一种难以治疗的疾病。在抗癌药的市场中, 核苷类药物占有不小的比重并且发挥着非常重要的作用, 并且发展迅速。而由核苷类药物衍生出的类似物也被证实具有很大的抗肿瘤潜力。但近些年来, 核苷类药物仍旧存有大量的问题, 如不良反应多、代谢快等。因此, 扩展研究核苷类似物具有重要意义。

基于硫代碱基的特点, 徐耀忠与 Peter Kann 博士提出了“近紫外光/4-硫胸苷(UVA/Thiothymidine)光动力疗法” [16], 可定向的杀死肿瘤细胞, 对非肿瘤细胞的伤害轻微, 缓解了肿瘤患者在治疗中的疼痛, 为恶性肿瘤的治疗提供了一个新的方法[17]。有研究显示: 4-硫-5-碘脱氧尿苷 345 nm 处有最大吸收并且可以消灭口腔癌细胞; 同样 4-硫-5-溴脱氧尿苷在 340 nm 处有最大吸收并且可以消灭肺癌细胞。有研究成果显示在 4 位和 5 位都有取代的 5-取代胸苷类似物, 能够进入到细胞的 DNA 中, 使细胞对近紫外光敏感然后死亡。此重大发现阐明了其余的双修饰核苷(如 5-取代-4-硫胸苷类似物)可能会具有进入细胞的本领, 让细胞更加容易受到近紫外光伤害致死[18]。

本文探索 4-硫-5-氯尿苷的合成方法, 为此类化合物的合成提供了一种简便易行的方法。对于开发多功能新药具有一定的理论意义及潜在的研究价值, 为抗肿瘤药物的研究奠定一定的理论基础。

2. 研究内容与方法

2.1. 实验仪器与试剂

如下表 1、表 2 所示。

Table 1. Experimental instruments

表 1. 实验仪器

仪器名称	型号	生产厂家
暗箱三用紫外分析仪	ZF-20C	上海骥辉科学分析仪器有限公司
旋转蒸发器	N-1300	上海爱明仪器有限公司
循环水式多用真空泵	SHB-III	郑州长城科工贸有限公司
手提紫外分析仪	ZF-5	上海仪电物理光学仪器有限公司
电子天平	YP202N	上海菁海仪器有限公司
电热恒温鼓风干燥箱	BGZ-70	上海博讯医疗生物仪器股份有限公司
电热恒温水浴锅	DK-98-II	天津市泰斯仪器有限公司
数控超声波清洗器	KQ-700DE	昆山市超声仪器有限公司
IKA 磁力搅拌器	RCTB5025	艾卡(广州)仪器设备有限公司

Table 2. Experimental reagents

表 2. 实验试剂

试剂	级别	生产厂家
尿苷	超纯 99%	源叶生物
无水吡啶	AR	天津市鑫铂特化工有限公司
五硫化二磷	AR	国药集团化学试剂有限公司

Continued

劳森试剂	99%	百灵威科技有限公司
乙酸酐	AR	成都市科龙化工试剂厂
无水乙醇	AR	天津市风船化学试剂科技有限公司
甲苯	AR	天津市鑫铂特化工有限公司
N-氯代琥珀酰亚胺	纯度 98%	源叶生物
石油醚	AR	天津市风船化学试剂科技有限公司
乙酸乙酯	AR	天津市鑫铂特化工有限公司
甲醇	AR	天津市鑫铂特化工有限公司

2.2. 实验路线的设计

在设计合成 4-硫-5-氯尿苷路线时, 硫代步骤尤为重要, 该步骤往往产率较低, 反应条件较苛刻, 也是整个反应的重点和难点, 因此分别使用五硫化二磷和劳森试剂作为硫代试剂。探索劳森试剂的最优反应条件(反应温度, 试剂使用量以及反应时间), 并对比在其最优条件下的反应产率, 设计路线如下图 1 所示。

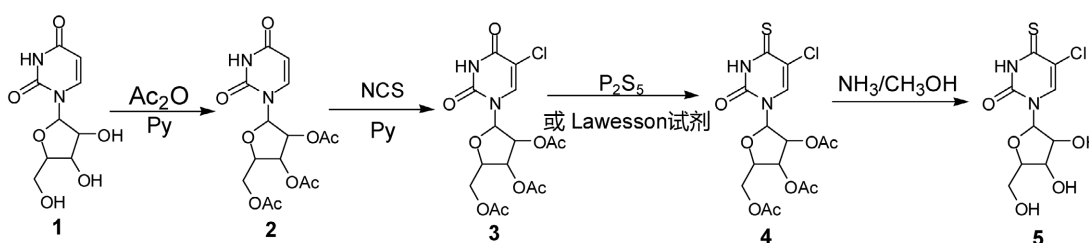


Figure 1. Synthesis route of 4-thio-5-chlorouridine

图 1. 4-硫-5-氯尿苷的合成路线

2.3. 具体合成步骤

2.3.1. 2',3',5'-O-三乙酰基尿苷的合成

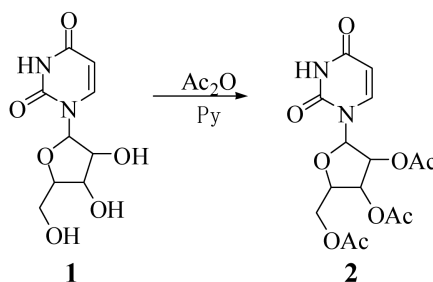


Figure 2. Synthesis of 2',3',5'-O-three acetyl uridine

图 2. 2',3',5'-O-三乙酰基尿苷的合成

将尿苷(1) (2.00 g, 8.20 mmol), 溶于 30 mL 的无水吡啶中, 搅拌使其充分溶解, 加入乙酸酐(6.0 mL, 64 mmol), 0℃冰浴条件下持续搅拌, 通过 TLC 监测反应情况。约 5 h, 原料点消失。证明反应完全, 减压 75℃条件下蒸出溶剂(可用甲苯共沸带出吡啶)。取出粘稠状液体, 使用无水乙醇重结晶, 放入冰箱过夜, 有大量白色晶体析出, 抽滤干燥后得到大量白色固体, 即 2',3',5'-O-三乙酰基尿苷(2) 2.79 g, 收率为 92% (路

线如图 2 所示)。

m. p. 126°C~129°C. ¹HNMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.48 (s, 1H, -NH), 7.72 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 6-H), 5.89 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, 1'-H), 5.73 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, 5-H), 5.45 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, 2'-H), 5.32 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, 3'-H), 4.25 (m, 3H, 4'-H, 5'-H), 2.07 (d, *J* = 12.7 Hz, 9H, 3 × -CH₃).

2.3.2. 5-氯-2',3',5'-O-三乙酰基尿苷的合成

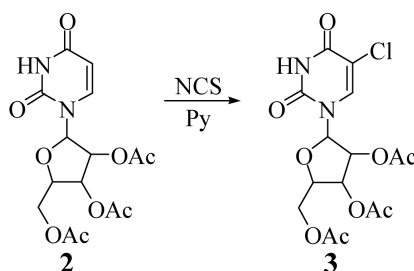


Figure 3. The synthesis of chlorine-2',3',5'-O-three acetyl uridine
图 3. 5-氯-2',3',5'-O-三乙酰基尿苷的合成

将 2',3',5'-O-三乙酰基尿苷(**2**) (1.00 g, 2.70 mmol), 溶于 40 mL 的无水吡啶中, 加热至 85°C, 搅拌使其充分溶解, 随后加入 NCS (0.55 g, 4.12 mmol), 通过 TLC 监测反应情况。约 2 h 原料点消失, 证明反应完全。减压 75°C 条件下蒸出溶剂(可用甲苯带出吡啶)。粗产品进行柱分离(PE:EA = 4:1; 3:1), 再用无水乙醇和石油醚混合重结晶, 抽滤干燥后得固体 5-氯-2',3',5'-O-三乙酰基尿苷(**3**) 0.83 g, 收率为 76% (路线如图 3 所示)。

m. p. 50°C~52°C. ¹HNMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.02 (s, 1H, -NH), 8.16 (s, 1H, 6-H), 5.89 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H, 1'-H), 5.48 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, 2'-H), 5.35 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, 3'-H), 4.35 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, 4'-H), 4.25 (m, 2H, 5'-H, 5'-H), 2.07 (d, *J* = 3.9 Hz, 9H, 3 × -CH₃).

2.3.3. 4-硫-5-氯-2',3',5'-O-三乙酰基尿苷的合成

方法一: 五硫化二磷法

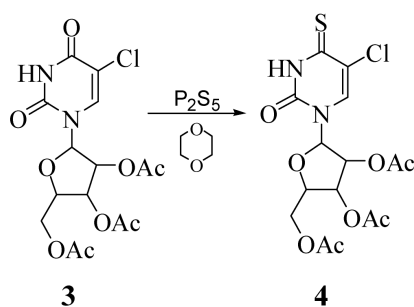


Figure 4. The synthesis of 4-thio-5-chlorine-2',3',5'-O-three acetyl uridine (Route of P₂S₅)
图 4. 4-硫-5-氯-2',3',5'-O-三乙酰基尿苷的合成(五硫化二磷法)

取 5-氯-2',3',5'-O-三乙酰基尿苷(**3**) (1.05 g, 2.60 mmol)放入三口烧瓶中, 加入无水 1,4-二氧六环 55 mL 至全部溶解, 加入五硫化二磷(1.13 g, 5.09 mmol), 升温至 105°C, 通过 TLC 监测反应情况, 6 h 反应完全, 冷却过滤蒸干溶剂, 柱分离(PE:EA = 4:1; 3:1; 2:1)得到黄色固体 4-硫-5-氯-2',3',5'-O-三乙酰基尿苷(**4**) 0.47 g, 收率为 43% (路线如图 4 所示)。

方法二：劳森试剂法

首先，筛选劳森试剂反应的最优条件，参考五硫化二磷反应条件再将其扩大范围，反应温度设计为 85℃、90℃、95℃、100℃、105℃、110℃，反应底物与试剂用量的比值设计为 1:0.5、1:1、1:1.5、1:2，反应时间设计为 2 h、3 h、3.5 h、4 h、5 h、6 h。具体实验过程如下：

取 5-氯-2',3',5'-O-三乙酰基尿苷(**3**) (1.05 g, 2.60 mmol)放入三口烧瓶中，加入无水 1,4-二氧六环 55 mL 至全部溶解，加入劳森试剂(1.10 g, 2.73 mmol)，升温至 95℃，通过 TLC 监测反应情况，柱分离(PE:EA = 3:1)得到黄色固体 4-硫-5-氯-2',3',5'-O-三乙酰基尿苷(**4**) (路线如图 5 所示)。

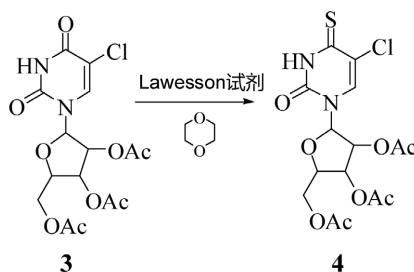


Figure 5. The synthesis of 4-thio-5-chloro-2',3',5'-O-three acetyl Uridine (Route of Lawesson reagent)
图 5. 4-硫-5-氯-2',3',5'-O-三乙酰基尿苷的合成(劳森试剂法)

m. p. 48℃~50℃. ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 13.16 (s, 1H, NH), 8.28 (s, 1H, 6-H), 5.85 (d, 1H, $J = 5.86$ Hz, 1'-H), 5.48 (s, 1H, $J = 5.53$ Hz, 2'-H), 5.35 (t, 1H, 3'-H), 4.35 (m, 3H, 4'-H, 5'-H), 2.06 (m, 9H, $3 \times -\text{CH}_3$).

2.4. 4-硫-5-氯尿苷的合成

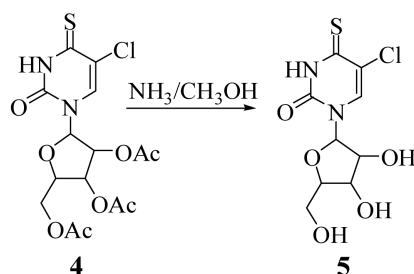


Figure 6. The synthesis of 4-thio-5-chlorine uridine
图 6. 4-硫-5-氯尿苷的合成

取黄色固体 4-硫-5-氯-2',3',5'-O-三乙酰基尿苷(**4**) (0.50 g, 1.19 mmol)，用饱和氨气甲醇溶液 100 mL，室温搅拌至完全溶解。通过 TLC 监测反应情况，约 6 h 停止反应。减压条件下除去溶剂，柱分离($\text{CHCl}_2:\text{CH}_3\text{OH} = 20:1$)，得到黄色固体 4-硫-5-氯尿苷(**5**) 0.16 g，收率为 46% (路线如图 6 所示)。

m. p. 54℃~57℃。

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 13.12 (s, 1H, -NH), 8.57 (s, 1H, 6-H), 5.68 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, 1'-H), 5.52 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H, 2'-OH), 5.35 (t, $J = 4.3$ Hz, 1H, 3'-OH), 5.08 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H, 5'-OH), 4.08 (m, 1H, 2'-H), 4.01 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H, 3'-H), 3.89 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H, 4'-H), 3.74 (m, 1H, 5'-H), 3.60 (m, 1H, 5'-H).

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 185.36 (4-C), 147.07(2-C), 134.71 (6-C), 116.81 (5-C), 89.36 (1'-C), 84.57 (4'-C), 74.13 (2'-C), 68.72 (3'-C), 59.63 (5'-C).

3. 结果与讨论

通过两种不同的方法成功合成了 4-硫-5-氯尿苷及 3 种最终硫代产物, 并通过实验发现劳森试剂法的最优反应条件是: 温度 95℃, 与底物的比值为 1:1, 反应时间 3.5 h (具体数据见下表 3~5)。与五硫化二磷法比较, 其具有反应条件温和、时间更短, 收率更高的特点。最终产物通过 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 进行了表征。这将有利于该类化合物作为药物的前期研究提供了方向和理论基础。

Table 3. The relation between the temperature and the reaction yield of Lawesson reagent in the synthesis of 4-thio-5-chlorine uridine

表 3. 劳森试剂法在 4-硫-5-氯尿苷的合成中反应温度与收率的关系

温度(℃)	85	90	95	100	105	110
收率(%)	59	66	70	70	70	70

Table 4. The relation between the quantity and the reaction yield of Lawesson reagent in the synthesis of 4-thio-5-chlorine uridine

表 4. 劳森试剂法在 4-硫-5-氯尿苷的合成中试剂量与收率的关系

底物与试剂的比值	1:0.5	1:1	1:1.5	1:2
收率(%)	38	70	70	70

Table 5. The relation between the time and the reaction yield of Lawesson reagent in the synthesis of 4-thio-5-chlorine uridine

表 5. 劳森试剂法在 4-硫-5-氯尿苷的合成中反应时间与收率的关系

时间(h)	2	3	3.5	4	5	6
收率(%)	45	66	70	70	70	70

基金项目

克拉玛依市创新环境建设(创新人才)项目(2020CXRC0061)资助。

参考文献

- [1] 于千舒. 谈癌不色变透视我国抗肿瘤药物现状[N]. 中国医药报, 2021-05-12(002).
- [2] 刘宗超, 李哲轩, 张阳, 等. 2020 全球癌症统计报告解读[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2021, 7(2): 1-14.
- [3] 刘洋, 李明花, 邢向红. 核苷类抗肿瘤药物研究进展[J]. 中国新药杂志, 2012, 21(21): 2493-2498.
- [4] 李伟, 秦汤, 温新民. 具有抗肿瘤活性核苷类似物研究进展[J]. 济宁医学院学报, 2016, 39(1): 53-57.
- [5] 蒋革, 罗锋, 徐耀忠, 等. 近紫外光辅助 4-硫脱氧胸苷抗癌作用的研究[J]. 化学进展, 2016, 28(8): 1224-1237.
- [6] 张志广. 微波辅助核苷及其衍生物的快速绿色合成[D]: [硕士学位论文]. 新乡: 河南师范大学, 2007.
- [7] 葛晓斌, 张晓辉. 核苷类及 5'位磷酸酯修饰药物的研究进展[J]. 大连大学学报, 2018, 39(6): 28-34.
- [8] 闫德峰, 赫玲爽, 马克东, 等. 4-硫胸苷的合成新方法[J]. 合成化学研究, 2016, 36(12): 2989-2996.
- [9] 张新迎, 王洋洋, 冯东, 等. 5-取代嘧啶核苷类似物的设计、合成及生物活性研究进展[J]. 有机化学, 2010, 30(6): 797-808.
- [10] Romeo, R., Giofrè, S.V., Iaria, D., *et al.* (2011) Synthesis of 5-Alkynyl Isoxazolidinyl Nucleosides. *European Journal of Organic Chemistry*, **2011**, 5690-5695. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201100767>
- [11] Agrofoglio, L.A., Gillaizeau, I. and Saito, Y. (2003) Palladium-Assisted Routes to Nucleosides. *Chemical Reviews*, **103**, 1875-1916. <https://doi.org/10.1021/cr010374q>
- [12] Pawar, M., *et al.* (2013) Heavy Atom Containing Fluorescent Ribonucleoside Analog Probe for the Fluorescence Detection of RNA-Ligand Binding. *Bioconjugate Chemistry*, **24**, 1367-1377. <https://doi.org/10.1021/bc400194g>

-
- [13] 陈行, 刘春冬, 王建华. 卤素对核酸类药物的修饰与影响研究进展[J]. 应用化学, 2018, 35(5): 491-499.
- [14] 渠桂荣, 张志广, 夏然, 等. 微波辅助下 5-碘尿嘧啶衍生物的绿色合成[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2007, 35(2): 101-103.
- [15] 夏然. 微波辅助下碱基修饰合成核苷类化合物的研究[D]: [硕士学位论文]. 新乡: 河南师范大学, 2008.
- [16] Massey, A., Xu, Y.Z. and Karran, P. (2002) Ambiguous Coding Is Required for the Lethal Interaction between Methylated DNA Bases and DNA Mismatch Repair. *DNA Repair*, **12**, 275-286.
[https://doi.org/10.1016/S1568-7864\(02\)00004-6](https://doi.org/10.1016/S1568-7864(02)00004-6)
- [17] 句媛, 李德鹏. 5-(2-溴乙烯基)-4-硫代尿苷合成工艺的改进[J]. 大连大学学报, 2018, 39(6): 24-27+57.
- [18] 王健, 郑学仿, 曹洪玉, 等. 4-硫-5-碘尿苷的合成及其与人血清白蛋白间的相互作用[J]. 发光学报, 2013, 34(3): 361-368.