



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103694133 B

(45) 授权公告日 2016. 05. 25

(21) 申请号 201310698464. X

(22) 申请日 2013. 12. 09

(73) 专利权人 青岛大学

地址 266071 山东省青岛市崂山区香港东路 7 号

(72) 发明人 李子超 李群 李晓雯 赵昔慧 王越 倪偲

(56) 对比文件

CN 103265452 A, 2013. 08. 28,
WO 0127074 A1, 2001. 04. 19,
US 2008293951 A1, 2008. 11. 27,
孔德源等. 氨基酸类 Schiff 碱稀土配合物的合成及其抗肿瘤活性 I. 《中国药物化学杂志》. 1998, 第 8 卷 (第 4 期), 第 245-249 页.

审查员 吴昊

(51) Int. Cl.

- C07C 251/08(2006. 01)
- C07C 251/24(2006. 01)
- C07C 249/02(2006. 01)
- C07D 213/53(2006. 01)
- A61K 31/205(2006. 01)
- A61K 31/4402(2006. 01)
- A61P 35/00(2006. 01)
- A61P 35/02(2006. 01)

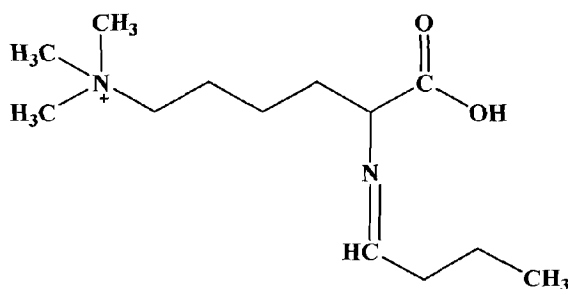
权利要求书2页 说明书8页 附图2页

(54) 发明名称

具抗癌活性的昆布氨酸希夫碱的合成及其药物组合物

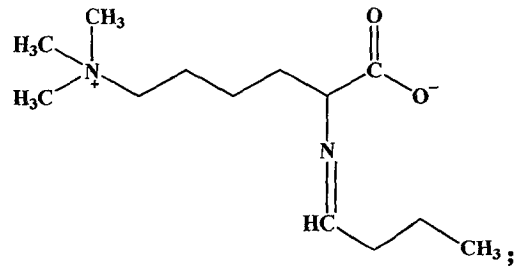
(57) 摘要

本发明涉及具抗癌活性的昆布氨酸希夫碱及其药物组合物的合成方法,具体包括:(1) 昆布氨酸缩丙醛希夫碱的合成;(2) 双昆布氨酸缩乙二醛希夫碱的合成;(3) 昆布氨酸缩 3, 5- 二溴水杨醛希夫碱的合成;(4) 昆布氨酸缩 2- 羟基 -1- 萘醛希夫碱的合成;(5) 昆布氨酸缩 2- 吡啶甲醛希夫碱的合成。针对上述化合物进行药理学分析研究,具体包括:(1) 化合物与 DNA 相互作用的研究,包括紫外吸收光谱滴定和荧光猝灭光谱滴定;(2) 化合物与 BSA 相互作用的研究,包括色氨酸荧光猝灭光谱滴定;(3) 体外细胞毒试验使用 SRB 检测。本发明技术适合在抗癌领域中推广应用,具有一定的医学价值,为抗癌药物的推广提供了一定依据。

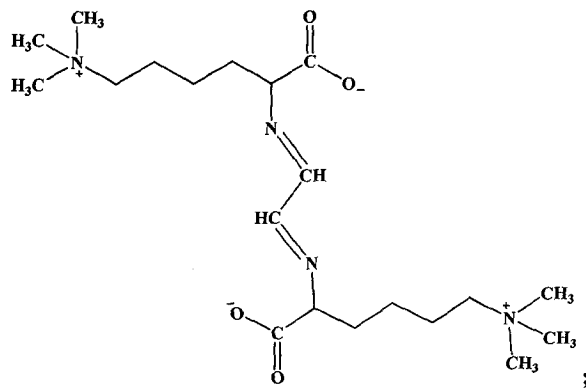


1. 一种具抗癌活性的昆布氨酸希夫碱类化合物,其特征在于,包括昆布氨酸缩丙醛希夫碱、双昆布氨酸缩乙二醛希夫碱、昆布氨酸缩3,5-二溴水杨醛希夫碱、昆布氨酸缩2-羟基-1-萘醛希夫碱和昆布氨酸缩2-吡啶甲醛希夫碱;其中:

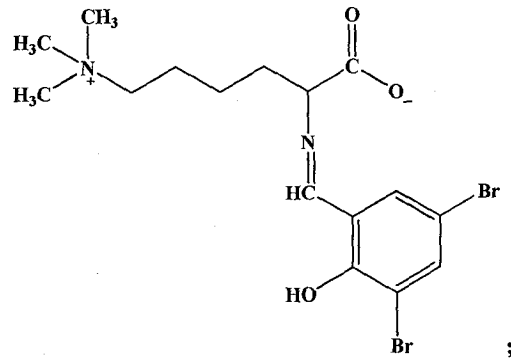
所述昆布氨酸缩丙醛希夫碱的结构式为:



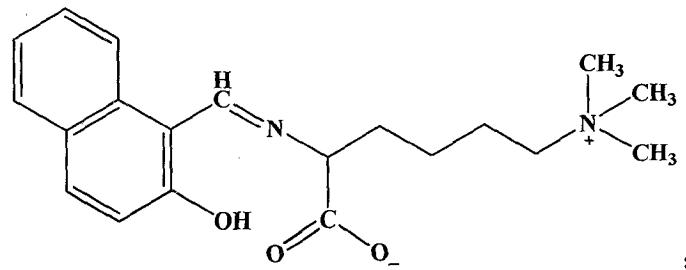
所述双昆布氨酸缩乙二醛希夫碱的结构式为:



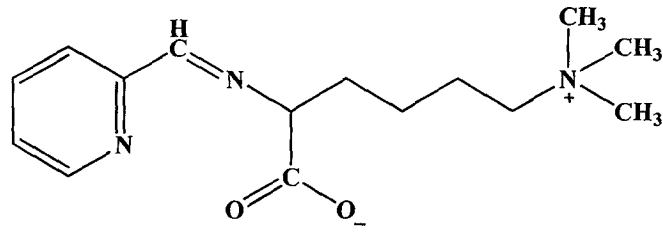
所述昆布氨酸缩3,5-二溴水杨醛希夫碱的结构式为:



所述昆布氨酸缩2-羟基-1-萘醛希夫碱的结构式为:



所述昆布氨酸缩2-吡啶甲醛希夫碱的结构式为:



具抗癌活性的昆布氨酸希夫碱的合成及其药物组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及具抗癌活性的昆布氨酸希夫碱的合成及其药物组合物,属于药物合成技术领域。

背景技术

[0002] 2012年,世界卫生组织指出,癌症已是导致人类死亡的一个主要原因,目前每年在全球夺去700多万人的生命,预计全世界癌症死亡人数将继续上升,到2030年可能将超过1310万。据全国肿瘤登记中心发布的《2012中国肿瘤登记年报》显示,我国每年新发肿瘤病例约为312万例,平均每天8550人,全国每分钟有6人被诊断为癌症。专家预计,2020年,因癌死亡人数将超过400万。

[0003] 尽管目前抗癌药物已有生物烷化剂(Bioalkylating Agents)、天然产物药物、金属铂配合物等类型,如专利CN1569862A中提出了一种由甲氧基乙酸根Pt(II)胺配合物用于癌症的治疗,但这与癌症种类的多样性、多发性相比较还是急切寻求选择性强、毒副作用小、具有独特构效关系的抗癌新药,这已成为人类当今生命科学和化学科学中急迫而重大的前沿研究课题之一。

[0004] 昆布氨酸是源自海洋植物海带中的一种具有独特生物活性的非蛋白质氨基酸,用其合成抗癌新药具有天然无毒、可水溶性、生物相容性好的优点,是目前尚待开发的医药宝库。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种具抗癌活性的昆布氨酸希夫碱及其组合物的合成方法,并进行药理学分析,以表征该化合物的具抗癌活性作用。

[0006] 为了实现上述目的,本发明的技术方案如下。

[0007] 具抗癌活性的昆布氨酸希夫碱及其组合物的合成方法,具体包括:

[0008] (1)昆布氨酸缩丙醛希夫碱的合成:

[0009] 将40mmol(2.88g)丙醛用10mL无水乙醇稀释,缓慢滴加到溶解有40mmol(7.56g)昆布氨酸的40mL乙醇溶液中。滴加完毕后温度缓慢升至70℃,继续反应4小时。蒸发溶液至余下约5mL,加入冰乙醇20mL,有大量沉淀生成。将溶液过滤,分别用冰乙醇、乙醚洗涤多次,真空干燥,得白色目标产物。室温下目标产物很稳定,难溶于四氯化碳、氯仿和苯,微溶于甲醇、乙醇,在水中溶解性良好。

[0010] (2)双昆布氨酸缩乙二醛希夫碱的合成:

[0011] 将40mmol(2.32g)乙二醛用10mL无水乙醇稀释,缓慢滴加到溶解有80mmol(15.12g)昆布氨酸的40mL乙醇溶液中。滴加完毕后温度缓慢升至70℃,继续反应4小时。蒸发溶液至余下约10mL,加入冰乙醇20mL,有大量沉淀生成。将溶液过滤,分别用冰乙醇、乙醚洗涤多次,真空干燥,得微黄色目标产物。室温下目标产物很稳定,难溶于四氯化碳、氯仿和苯,微溶于甲醇、乙醇,在水中溶解性良好。

[0012] (3)昆布氨酸缩3,5-二溴水杨醛希夫碱的合成:

[0013] 按(1)所示方法合成,将方法中的丙醛用3,5-二溴水杨醛代替,获得预期产物。

[0014] 室温下目标产物很稳定,难溶于四氯化碳、氯仿和苯,微溶于甲醇、乙醇,在水中溶解性良好。

[0015] (4)昆布氨酸缩2-羟基-1-萘醛希夫碱的合成:

[0016] 按(1)所示方法合成,将方法中的丙醛用2-羟基-1-萘醛代替,获得预期产物。

[0017] 室温下目标产物很稳定,难溶于四氯化碳、氯仿和苯,微溶于甲醇、乙醇,易溶于水。

[0018] (5)昆布氨酸缩2-吡啶甲醛希夫碱的合成:

[0019] 按(1)所示方法合成,将方法中的丙醛用2-吡啶甲醛代替,获得预期产物。

[0020] 室温下目标产物很稳定,难溶于四氯化碳、氯仿和苯,微溶于甲醇、乙醇,易溶于水。

[0021] 针对上述化合物进行药理学分析研究,具体包括:

[0022] (1)化合物与DNA相互作用的研究:

[0023] 本发明化合物与DNA相互作用能力研究,应用鲑鱼鱼精DNA(HS-DNA)作为研究对象。鲑鱼鱼精DNA(HS-DNA)用NaCl/Tris-HCl(pH=7.16)缓冲溶液配制成 10^{-4} M的溶液,测量260nm和280nm处的吸光度(A), A_{260}/A_{280} 在1.8~1.9的范围内,说明HS-DNA溶液符合实验要求。测量HS-DNA在260nm处的吸光度,根据朗姆-比尔定律计算DNA的浓度(以DNA碱基对的摩尔浓度计, $\epsilon_{260}=6600\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)。

[0024] 紫外吸收光谱滴定:化合物用NaCl/Tris-HCl缓冲溶液配成 10^{-3} M的溶液,然后稀释到 10^{-5} M的浓度;以NaCl/Tris-HCl缓冲溶液作为空白对照液,测定200~800nm波长范围内的紫外光谱。每次加样,分别向空白和配体样品中加入等量配制好的HS-DNA溶液(10^{-3} M),充分混合然后静止10min后再进行扫描。键合常数由以下公式确定:

[0025] $[\text{DNA}]/(\epsilon_a-\epsilon_f)=[\text{DNA}]/(\epsilon_a-\epsilon_f)+1/K_b(\epsilon_a-\epsilon_f)$

[0026] 其中[DNA]代表DNA的浓度, ϵ_a , ϵ_f 和 ϵ_b 分别代表在各DNA浓度下的、游离的和与DNA键合饱和的配体的摩尔吸光系数。以 $[\text{DNA}]/(\epsilon_a-\epsilon_f)$ 对[DNA]作图,键合常数 K_b 为直线的斜率和截距之比。

[0027] 荧光猝灭光谱滴定:EB-DNA复合体系的配制:将5 μL EB($1\times 10^{-3}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)溶液加入到1mL HS-DNA(10^{-3} M)溶液中置于10mL比色管中,常温下避光保存2h。然后加入NaCl/Tris-HCl缓冲溶液稀释至5mL,混合均匀后。以522nm的波长激发,记录EB-DNA复合体系在584nm处的荧光发射波长及强度。每次加样,向样品中加入等量配制好的配体样品溶液(10^{-3} M),记录不同浓度配体对EB-DNA复合体系的荧光猝灭光谱。猝灭系数由Stern-Volmer公式确定:

[0028] $I_0/I=1+K_{sv}[Q]$

[0029] 其中 I_0 和 I 分别代表不加化合物和加化合物时EB-DNA复合体系的的荧光强度;[Q]表示猝灭剂(化合物)的浓度。以 I_0/I 对[Q]作图,斜率即为猝灭常数 K_{sv} 。

[0030] (2)化合物与BSA相互作用的研究:

[0031] 本发明化合物与蛋白相互作用能力研究,应用牛血清白蛋白(BSA)作为研究对象。紫外吸收光谱滴定:将配制好的BSA储备液(100 μM)稀释到10 μM ,以NaCl/Tris-HCl缓冲溶液

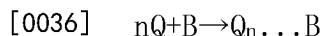
作为空白对照,测定200~350nm波长范围内的紫外光谱,每次加样分别向空白和BSA样品中加入等量配制好的化合物溶液(10^{-3}M),充分混合然后静止10min后再进行扫描。

[0032] 色氨酸荧光猝灭光谱滴定:将配制好的BSA储备液($100\mu\text{M}$)稀释到 $10\mu\text{M}$,以295nm的波长激发,记录BSA溶液在584nm处的荧光发射波长及强度。每次加样,向样品中加入等量配制好的化合物样品溶液(10^{-3}M),记录不同浓度化合物对BSA溶液的荧光猝灭光谱。猝灭系数由Stern-Volmer公式确定:

$$[0033] \quad I_0/I = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + K_q\tau_0[Q]$$

[0034] 其中 I_0 和 I 分别代表不加化合物(配合物)和加化合物(配合物)时的荧光强度; $[Q]$ 表示化合物(配合物)的浓度; K_{sv} 为动态猝灭常数; K_q 为动态猝灭速率常数; τ_0 为无猝灭剂是荧光分子的平均寿命(10^{-8}s^{-1})。以 I_0/I 对 $[Q]$ 作图,斜率即为 K_{sv} 。各类荧光猝灭剂对生物大分子的最大动态荧光猝灭速率常数约为 $2.0 \times 10^{10} \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。通过 $K_{sv} = K_q\tau_0$,求得 K_q 。

[0035] 在静态猝灭过程中,假设在生物大分子上有两到三个相似又彼此独立的结合位点,则荧光强度与猝灭剂之间的关系可表示为公式:



[0037] 其中 B 表示发荧光的生物大分子, Q 是猝灭剂分子, $Q_n \dots B$ 表示生成的无荧光强度的生物分子,其生成常数可表示为:

$$[0038] \quad K = [Q_n \dots B] / [Q]^n [B]$$

[0039] 如果生物大分子的总浓度为 B_0 ,则 $[B_0] = [Q_n \dots B] + [B]$, $[B]$ 表示未结合的生物大分子的浓度,则荧光强度和未结合的生物大分子的浓度的关系为 $[B] / [B_0] = F / F_0$, F_0 和 F 分别表示未加猝灭剂和加入猝灭剂时生物大分子的荧光强度。从以上关系中可推出公式:

$$[0040] \quad \log[(F_0 - F) / F] = \log K + n \log [Q]$$

[0041] 其中 K 表示猝灭剂和生物大分子的结合常数, n 表示猝灭剂和生物大分子的结合位点数,以 $\log[(F_0 - F) / F]$ 对 $\log [Q]$ 作图,斜率即为 n ,由截距求得结合常数 K 。

[0042] (3)本发明化合物的体外细胞毒试验使用SRB检测法,测定了加入上述合成的化合物后,培养基在515nm处的OD读数,由测得的OD值,通过如下公式计算待测样品对人肝癌细胞株(SMMC-7721)、肺腺癌细胞株(A549)细胞、人急性早幼粒白血病(HL-60)和正常小鼠角质细胞(Pam212)的抑制率:

$$[0043] \quad \text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{加药组OD值} - \text{本底对照组OD值}}{\text{正常组OD值} - \text{本底对照组OD值}} \right) \times 100$$

[0044] 以被测样品浓度对抑制率做线性回归,求出其48h内的半数抑制浓度(IC_{50})。以顺铂作为阳性对照。

[0045] 该发明的有益效果在于:本发明提供了一种具抗癌活性的昆布氨酸希夫碱及其药物组合物的合成方法,并进行了药理学分析,证明该化合物的具抗癌活性作用,适合在抗癌领域中推广应用,且找到了一种新的药物合成方法,具有一定的医学价值,为抗癌药物的开发、推广提供了一定依据。

附图说明

[0046] 图1是本发明实施例1中所合成的昆布氨酸缩丙醛希夫碱结构式。

[0047] 图2是本发明实施例2中所合成的双昆布氨酸缩乙二醛希夫碱结构式。

- [0048] 图3是本发明实施例3中所合成的昆布氨酸缩3,5-二溴水杨醛希夫碱结构式。
 [0049] 图4是本发明实施例4中所合成的昆布氨酸缩2-羟基-1-萘醛希夫碱结构式。
 [0050] 图5是本发明实施例5中所合成的昆布氨酸缩2-吡啶甲醛希夫碱结构式。

具体实施方式

[0051] 下面结合附图对本发明的具体实施方式进行了描述,以便更好地理解本发明。

[0052] 实施例1:

[0053] 昆布氨酸缩丙醛希夫碱的合成:

[0054] 将40mmol(2.88g)丙醛用10mL无水乙醇稀释,缓慢滴加到溶解有40mmol(7.56g)昆布氨酸的40mL乙醇溶液中。滴加完毕后温度缓慢升至70℃,继续反应4小时。蒸发溶液至余下约5mL,加入冰乙醇20mL,有大量沉淀生成。将溶液过滤,分别用冰乙醇、乙醚洗涤多次,真空干燥,得白色目标产物。图1是本发明实施例1中所合成的昆布氨酸缩丙醛希夫碱结构式。

[0055] 室温下目标产物很稳定,难溶于四氯化碳、氯仿和苯,微溶于甲醇、乙醇,在水中溶解性良好。IR峰位及元素微量分析结果见表1和表2。

[0056] 表1:实施例1目标物IR峰位

[0057]	IR	3334 cm^{-1}	v(O-H)
	峰	2901-2842 cm^{-1}	v(C-H)
	位	1669 cm^{-1}	v(C=O)
		1625- 1612 cm^{-1}	v(C=N)

[0058] 表2:实施例1目标物元素微量分析

[0059]

元素微量分析:	C%	H%	N%
计算值	64.16	11.18	11.51
实测值	64.71	11.25	11.26

[0060] 实施例2:

[0061] 双昆布氨酸缩乙二醛希夫碱的合成:

[0062] 将40mmol(2.32g)乙二醛用10mL无水乙醇稀释,缓慢滴加到溶解有80mmol(15.12g)昆布氨酸的40mL乙醇溶液中。滴加完毕后温度缓慢升至70℃,继续反应4小时。蒸发溶液至余下约10mL,加入冰乙醇20mL,有大量沉淀生成。将溶液过滤,分别用冰乙醇、乙醚洗涤多次,真空干燥,得微黄色目标产物。图2是本发明实施例2中所合成的双昆布氨酸缩乙二醛希夫碱结构式。

[0063] 室温下目标产物很稳定,难溶于四氯化碳、氯仿和苯,微溶于甲醇、乙醇,在水中溶解性良好。IR峰位及元素微量分析结果见表3和表4。

[0064] 表3:实施例2目标物IR峰位

[0065]	IR	3327 cm^{-1}	$\nu(\text{O-H})$
	峰	2900-2872 cm^{-1}	$\nu(\text{C-H})$
	位	1702-1672 cm^{-1}	$\nu(\text{C=O})$
		1614- 1597 cm^{-1}	$\nu(\text{C=N})$

[0066] 表4:实施例2目标物元素微量分析

[0067]

元素微量分析:	C%	H%	N%
计算值	59.97	10.07	13.99
实测值	60.07	10.14	13.58

[0068] 实施例3:

[0069] 昆布氨酸缩3,5-二溴水杨醛希夫碱的合成:

[0070] 按实施例1所示方法合成,将方法中的丙醛用3,5-二溴水杨醛代替,获得预期产物。图3是本发明实施例3中所合成的昆布氨酸缩3,5-二溴水杨醛希夫碱结构式。

[0071] 室温下目标产物很稳定,难溶于四氯化碳、氯仿和苯,微溶于甲醇、乙醇,在水中溶解性良好。元素微量分析结果见表5。

[0072] 表5:实施例3目标物元素微量分析

[0073]

元素微量分析:	C%	H%	N%
计算值	42.59	5.14	6.21
实测值	42.44	5.33	6.39

[0074] 实施例4:

[0075] 昆布氨酸缩2-羟基-1-萘醛希夫碱的合成:

[0076] 按实施例1所示方法合成,将方法中的丙醛用2-羟基-1-萘醛代替,获得预期产物。图4是本发明实施例4中所合成的昆布氨酸缩2-羟基-1-萘醛希夫碱结构式。

[0077] 室温下目标产物很稳定,难溶于四氯化碳、氯仿和苯,微溶于甲醇、乙醇,易溶于水。元素微量分析结果见表6。

[0078] 表6:实施例4目标物元素微量分析

[0079]

元素微量分析:	C%	H%	N%
计算值	69.96	7.92	8.16
实测值	69.74	7.68	7.97

[0080] 实施例5:

[0081] 昆布氨酸缩2-吡啶甲醛希夫碱的合成:

[0082] 按实施例1所示方法合成,将方法中的丙醛用2-吡啶甲醛代替,获得预期产物。图5是本发明实施例5中所合成的昆布氨酸缩2-吡啶甲醛希夫碱结构式。

[0083] 室温下目标产物很稳定,难溶于四氯化碳、氯仿和苯,微溶于甲醇、乙醇,易溶于水。元素微量分析结果见表7。

[0084] 表7:实施例5目标物元素微量分析

[0085]

元素微量分析:	C%	H%	N%
计算值	64.72	8.69	15.10
实测值	64.55	8.82	15.27

[0086] 实施例6:

[0087] 化合物与DNA相互作用的研究:

[0088] 本发明化合物与DNA相互作用能力研究,应用鲑鱼鱼精DNA(HS-DNA)作为研究对象。鲑鱼鱼精DNA(HS-DNA)用NaCl/Tris-HCl(pH=7.16)缓冲溶液配制成 10^{-4} M的溶液,测量260nm和280nm处的吸光度(A),A260/A280在1.8~1.9的范围内,说明HS-DNA溶液符合实验要求。测量HS-DNA在260nm处的吸光度,根据朗姆-比尔定律计算DNA的浓度(以DNA碱基对的摩尔浓度计, $\epsilon_{260}=6600\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)。

[0089] 紫外吸收光谱滴定:化合物用NaCl/Tris-HCl缓冲溶液配成 10^{-3} M的溶液,然后稀释到 10^{-5} M的浓度;以NaCl/Tris-HCl缓冲溶液作为空白对照液,测定200~800nm波长范围内的紫外光谱。每次加样,分别向空白和配体样品中加入等量配制好的HS-DNA溶液(10^{-3} M),充分混合然后静止10min后再进行扫描。键合常数由以下公式确定:

$$[0090] \quad [\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f) = [\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f) + 1/K_b(\epsilon_a - \epsilon_f)$$

[0091] 其中[DNA]代表DNA的浓度, ϵ_a , ϵ_f 和 ϵ_b 分别代表在各DNA浓度下的、游离的和与DNA键合饱和的配体的摩尔吸光系数。以 $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ 对[DNA]作图,键合常数 K_b 为直线的斜率和截距之比。

[0092] 本发明所获得的代表化合物的作用结果列于表8中:

[0093] 表8:本发明所获得的代表化合物的紫外吸收光谱滴定作用结果

[0094]

化合物	$K_b \times 10^{-3} (\text{M}^{-1})$
实施例1	1.22
实施例2	1.31
实施例3	2.45
实施例4	6.65
实施例5	2.38

[0095] 荧光猝灭光谱滴定:EB-DNA复合体系的配制:将 $5\mu\text{LEB}(1 \times 10^{-3}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$ 溶液加入到1mL HS-DNA(10^{-3} M)溶液中置于10mL比色管中,常温下避光保存2h。然后加入NaCl/Tris-HCl缓冲溶液稀释至5mL,混合均匀后。以522nm的波长激发,记录EB-DNA复合体系在584nm处的荧光发射波长及强度。每次加样,向样品中加入等量配制好的配体样品溶液(10^{-3} M),记录不同浓度配体对EB-DNA复合体系的荧光猝灭光谱。猝灭系数由Stern-Volmer公式确定:

$$[0096] \quad I_0/I = 1 + K_{sv}[Q]$$

[0097] 其中 I_0 和 I 分别代表不加化合物和加化合物时EB-DNA复合体系的的荧光强度;[Q]表示猝灭剂(化合物)的浓度。以 I_0/I 对[Q]作图,斜率即为猝灭常数 K_{sv} 。

[0098] 本发明所获得的代表化合物的作用结果列于表9中:

[0099] 表9:本发明所获得的代表化合物的荧光猝灭光谱滴定作用结果

[0100]

化合物	$K_{sv} \times 10^{-3}$
实施例1	5.02
实施例2	3.78
实施例3	3.12
实施例4	10.12
实施例5	4.61

[0101] 实施例7:

[0102] 化合物与BSA相互作用的研究:

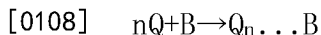
[0103] 本发明化合物与蛋白相互作用能力研究,应用牛血清白蛋白(BSA)作为研究对象。紫外吸收光谱滴定:将配制好的BSA储备液(100 μ M)稀释到10 μ M,以NaCl/Tris-HCl缓冲溶液作为空白对照,测定200~350nm波长范围内的紫外光谱,每次加样分别向空白和BSA样品中加入等量配制好的化合物溶液(10^{-3} M),充分混合然后静止10min后再进行扫描。

[0104] 色氨酸荧光猝灭光谱滴定:将配制好的BSA储备液(100 μ M)稀释到10 μ M,以295nm的波长激发,记录BSA溶液在584nm处的荧光发射波长及强度。每次加样,向样品中加入等量配制好的化合物样品溶液(10^{-3} M),记录不同浓度化合物对BSA溶液的荧光猝灭光谱。猝灭系数由Stern-Volmer公式确定:

$$[0105] \quad I_0/I = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + K_q \tau_0 [Q]$$

[0106] 其中 I_0 和 I 分别代表不加化合物(配合物)和加化合物(配合物)时的荧光强度; $[Q]$ 表示化合物(配合物)的浓度; K_{sv} 为动态猝灭常数; K_q 为动态猝灭速率常数; τ_0 为无猝灭剂是荧光分子的平均寿命(10^{-8} s $^{-1}$)。以 I_0/I 对 $[Q]$ 作图,斜率即为 K_{sv} 。各类荧光猝灭剂对生物大分子的最大动态荧光猝灭速率常数约为 2.0×10^{10} L \cdot mol $^{-1} \cdot$ s $^{-1}$ 。通过 $K_{sv} = K_q \tau_0$,求得 K_q 。

[0107] 在静态猝灭过程中,假设在生物大分子上有两到三个相似又彼此独立的结合位点,则荧光强度与猝灭剂之间的关系可表示为公式:



[0109] 其中 B 表示发荧光的生物大分子, Q 是猝灭剂分子, $Q_n \dots B$ 表示生成的无荧光强度的生物分子,其生成常数可表示为:

$$[0110] \quad K = [Q_n \dots B] / [Q]^n [B]$$

[0111] 如果生物大分子的总浓度为 B_0 ,则 $[B_0] = [Q_n \dots B] + [B]$, $[B]$ 表示未结合的生物大分子的浓度,则荧光强度和未结合的生物大分子的浓度的关系为 $[B]/[B_0] = F/F_0$, F_0 和 F 分别表示未加猝灭剂和加入猝灭剂时生物大分子的荧光强度。从以上关系中可推出公式:

$$[0112] \quad \log[(F_0 - F)/F] = \log K + n \log [Q]$$

[0113] 其中 K 表示猝灭剂和生物大分子的结合常数, n 表示猝灭剂和生物大分子的结合位点数,以 $\log[(F_0 - F)/F]$ 对 $\log [Q]$ 作图,斜率即为 n ,由截据求得结合常数 K 。

[0114] 本发明所获得的代表化合物的作用结果列于表10中:

[0115] 表10:本发明所获得的代表化合物的色氨酸荧光猝灭光谱滴定作用结果

[0116]

化合物	$K_{sv} \times 10^{-3} (M^{-1})$	$K_q \times 10^{-11} (L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1})$	n	$K \times 10^{-3} (M^{-1})$
实施例1	2.47	2.47	0.95	1.02
实施例2	4.61	4.61	1.10	15.4

实施例3	4.23	4.23	1.07	11.0
实施例4	16.8	16.8	1.36	786
实施例5	6.39	6.39	1.16	34.2

[0117] 实施例8:

[0118] 本发明化合物的体外细胞毒试验使用SRB检测法,加入从上述实施例中得到的化合物后,培养基在515nm处的OD读数,由测得的OD值,通过如下公式计算待测样品对人肝癌细胞株(SMMC-7721)、肺腺癌细胞株(A549)细胞、人急性早幼粒白血病(HL-60)和正常小鼠角质细胞(Pam212)的抑制率:

$$[0119] \quad \text{抑制率(\%)} = \left(1 - \frac{\text{加药组OD值} - \text{本底对照组OD值}}{\text{正常组OD值} - \text{本底对照组OD值}} \right) \times 100$$

[0120] 以被测样品浓度对抑制率做线性回归,求出其48h内的半数抑制浓度(IC₅₀)。以顺铂作为阳性对照。本发明所获得的代表化合物的IC₅₀结果列于表11中。

[0121] 表11:本发明所获得的代表化合物的IC₅₀结果

化合物	IC ₅₀ (μM)			
	SMMC-7721	A549	HL-60	Pam 212
实施例 1	89±2	99±2	83 ±2	>300
实施例 2	94±2	88±2	91±2	>300
[0122] 实施例 3	98±2	85±2	92±2	>300
实施例 4	81±2	72±2	77±1	>300
实施例 5	63±1	74±2	87±2	>300
顺铂	4±0.5	7±0.5	3±0.5	114±3

[0123] 以上所述是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也视为本发明的保护范围。

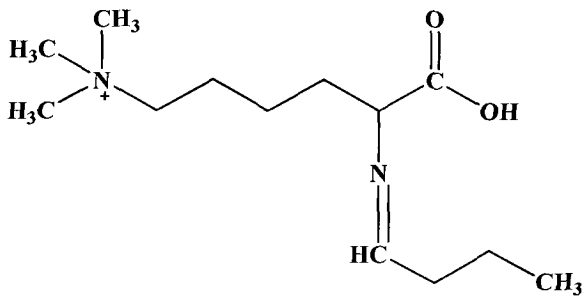


图1

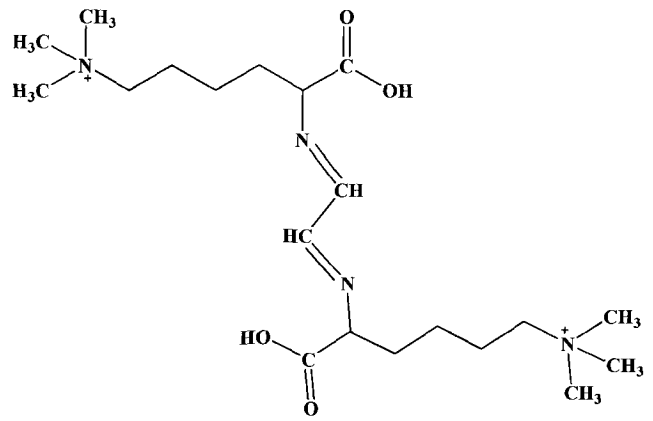


图2

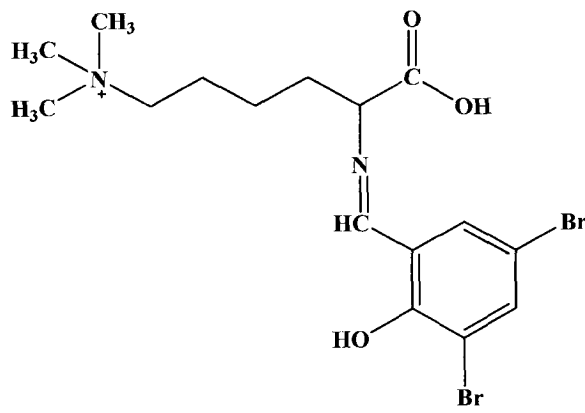


图3

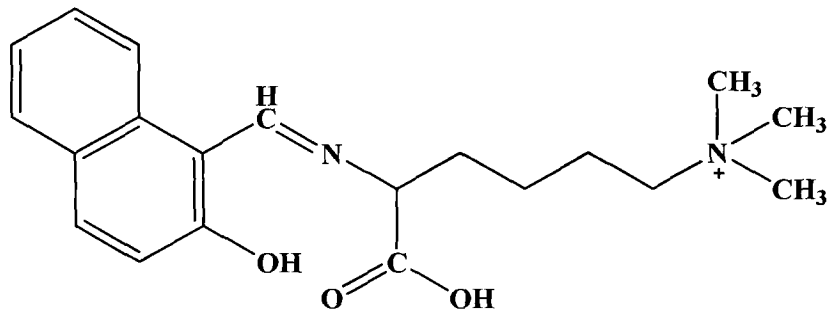


图4

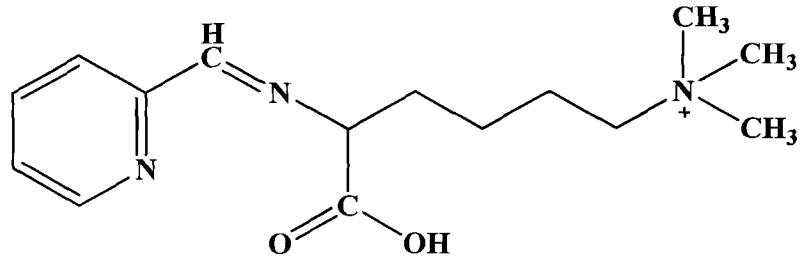


图5