

灯盏乙素苷元 4'-L-氨基酸酯前药的合成*

张伟, 邢凤晶, 傅晓钟, 兰燕宇**, 王爱民, 王永林, 吴春高, 李靖, 周雯, 刘影

(贵阳医学院药学院, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 合成具有较强神经细胞氧化损伤保护作用及较好理化性质的灯盏乙素苷元 4'-L-氨基酸酯衍生物。方法: 以灯盏乙素苷元与 *N*-Boc L-氨基酸为原料, 在偶联剂 DCC/DMAP 的作用下缩合制备 6,7-二苯缩酮保护灯盏乙素苷元 4'-*N*-Boc L-氨基酸酯(4 a~4 c), 后者经过酰氯/甲醇体系脱保护基, 获得目标化合物灯盏乙素苷元 4'-L-氨基酸酯(5 a~5 c)。结果: 合成的化合物及中间体均经过¹H NMR, ESI-MS 进行了结构表征, 确证结构与目标产物一致。结论: 采用的合成方法具有较好的实用性, 能用于灯盏乙素苷元 4'-L-氨基酸酯的制备。

[关键词] 灯盏乙素; 前药; 合成; L-氨基酸

[中图分类号] R916; R943 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2011)02-0115-04

Synthesis of L-amino Acid Ester Prodrug of Scutellarin

ZHANG Wei, XING Fengjing, FU Xiaozhong, LAN Yanyu*, WANG Aimin,
WANG Yonglin, WU Chungao, LI Jing, ZHOU Wen, LIU Ying
(School of Pharmacology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To synthesize 4'-L-amino acid ester derivatives of scutellarin aglycone which would have stronger neuroprotective effect and better physiochemical properties. **Methods:** Scutellarin and *N*-Boc L-amino acid were used as starting materials to synthesize 4'-L-amino acid ester derivatives of scutellarin(4 a~4 c) protected by 6, 7-diphenyl ketal in the presence of DCC/DMAP. The protective group was then removed by using acetic acid chloride / methanol system and target compounds(5 a~5 c) were obtained. **Results:** The structure of synthesized compounds 5 a~5 c and intermediate were confirmed by methods of ¹H NMR, ESI-MS. **Conclusion:** This synthetic method is practical and can be used in synthesizing of scutellarin 4' L-amino acid ester derivatives.

[Key words] scutellarin; prodrug; synthesis; L-amino acid

灯盏乙素[scutellarin, 图 1(1)]具有扩张血管、增加动脉血流量、降低血液黏度及外周阻力、减少血小板计数和抑制血小板凝集等作用, 临床上主要用于心脑血管等疾病的治疗^[1~3]。但由于其溶解性差(0.056 g/L), 口服绝对生物利用度低(0.4% beagle 犬), 严重影响了其口服应用的效果^[4, 5]。现代药效学与药代动力学研究结果表明, 口服灯盏乙素后其体内真正的吸收与药效形式是

灯盏乙素苷元[scutellarein, 图 1(2)], 但是灯盏乙素苷元存在绝对生物利用度低(7%, 鼠), 不易透肠吸收等缺陷^[5, 6]。研究显示, 以灯盏乙素苷元为先导化合物进行结构修饰具有重要意义, 但目前为止未见这方面报道, 本研究以灯盏乙素苷元为先导化合物进行结构修饰, 合成灯盏乙素苷元 4'-L-氨基酸酯衍生物[图 1(3)], 以期达到改善其理化性质与提高抗氧化活性的目的。

*[基金项目] 国家自然科学基金(No. 81060359), 贵州省科技厅攻关计划[No. 黔科合 GY 字(2008)3028], 贵州省中药现代化科技产业研究开发专项[No. 黔科合社字(2010)5019], 贵州省科技厅科技计划[No. 黔科合计工字(2009)4001]资助项目; 贵阳市科技局大学生创业基金[No. ZKFHTZ(2009)1]。

**通讯作者 E-mail: lanyanyu@gmail.com

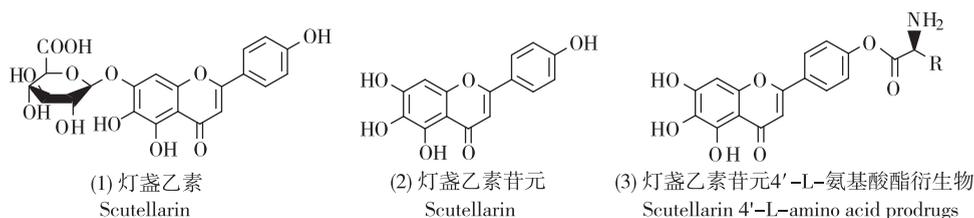


图1 灯盏乙素,灯盏乙素苷元及灯盏乙素苷元4'-L-氨基酸酯结构

Fig. 1 Structures of scutellarin, scutellarin aglycone and scutellarein aglycone4'-L-amino acid ester prodrugs

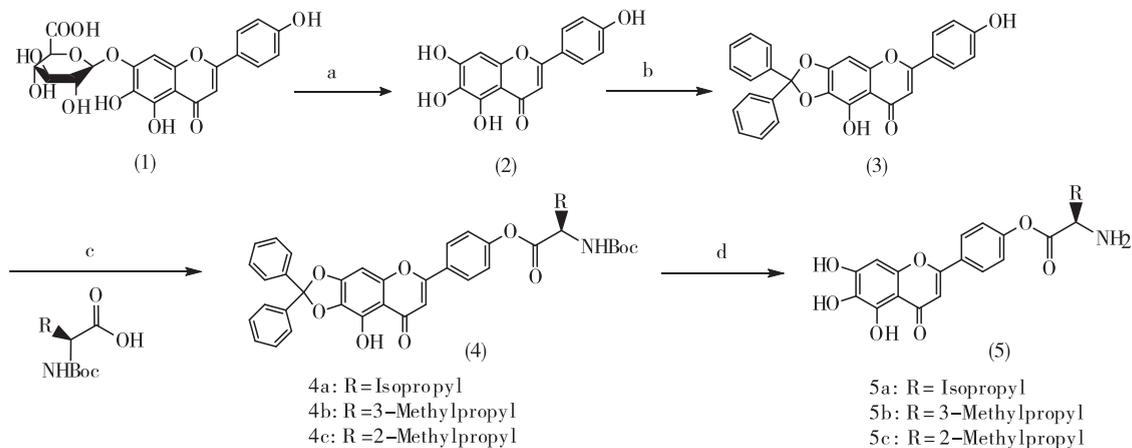
1 方法与材料

1.1 材料

核磁共振用 Varian Mercury 400 型核磁共振仪记录, TMS 内标;质谱用 Waters ACQUITY TQD system 高效液相色谱-质谱联用仪测定;LC-10AVP 高效液相色谱仪 (Shimadzu, Japan) 测定, 色谱柱 Heder ODS-2(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。灯盏乙素(以灯盏细辛药材为原料提取, HPLC 纯度 90%), *N*-Boc L-氨基酸(纯度 98%) 购自上海吉尔生化有限公司, 二氯二苯甲烷(纯度 98%) 南京康满林化工有限公司, DMAP、DEME 购自国药集团上海化学试剂有限公司, 分离用硅胶为 200 ~ 300 目, 其余试剂为分析纯。

1.2 合成方法

灯盏乙素(1)为原料经过稀硫酸回流水解, 冷却、抽滤, 不溶物干燥后用溶剂提取, 获得高纯度的灯盏乙素苷元(2), 所得物与二氯二苯甲烷经缩合反应, 获得 6,7-二苯缩酮缩酮保护灯盏乙素苷元(3)^[7, 8]。将(3)与等摩尔量的 *N*-Boc-L-氨基酸溶于四氢呋喃 (THF) 中, 加入等摩尔量的 DMAP 与 *N,N'*-二环己基碳酰亚胺 (DCC), 常温搅拌反应 5 h, 反应体系蒸干, 柱层析得缩酮保护灯盏乙素苷元 4'-*N*-Boc-L-氨基酸酯(4)。将所得的缩酮保护灯盏乙素苷元 4'-*N*-Boc-L-氨基酸酯经乙酰氯/甲醇体系在低温下(0 ~ 5 °C)脱去二苯缩酮及 *N*-Boc 保护基得目标化合物(5 a ~ 5 c)^[9, 10]。合成化合物经 ¹H NMR, ESI-M 结构鉴定表明合成的化合物与目标产物结构一致。



试剂及反应条件:a) 8% dilute sulfuric acid aqueous 90 °C, 20 h;b) diphenyl dichloromethane, DMAP, DEME, 170 °C, 2 h;c) DMAP/DCC, rt 12 h;d) CH₃COCl/ MeOH, 0°C-rt, 12 h

图2 灯盏乙素苷元4'-L-氨基酸酯的合成路线

Fig. 2 The synthesis route of scutellarin glycone 4'-L - amino acid ester prodrugs

1.2.1 灯盏乙素苷元4'-L-缬氨酸酯的制备

1.2.1.1 灯盏乙素苷元(2)的制备 将灯盏乙素 5 g 溶于新配制的 8% 的硫酸溶液中, 加热搅拌至回流, 反应 18 h, 抽滤, 将滤饼用蒸馏水洗涤至中性后, 用丙酮溶解, 60 °C 减压蒸出水分, 后用丙酮提

取 3 次, 合并取上清液, 提取液减压蒸除溶剂, 残余物经硅胶柱层析分离纯化, 洗脱(丙酮:石油醚 = 3:7 V/V)得灯盏乙素苷元, 纯度 97% (HPLC), 见图 2(2)。

1.2.1.2 6,7-二苯缩酮保护灯盏乙素苷元(3)的

制备 将灯盏乙素苷元 0.2 g (0.7 mmol) 溶于 10 ml 二甘醇二甲醚 (DME) 中, 加入 DMAP 0.1 g (0.81 mmol), 加入二氯二苯甲烷 0.49 g (21 mmol), 180 °C 条件下, 回流反应 2 h。溶剂减压蒸尽, 残余物经硅胶柱层析分离洗脱剂 (氯仿: 甲醇 = 80:1, V/V) 得浅棕黄色粉末状固体目标产物, 见图 2 (3)。

1.2.1.3 6,7-羟基缩酮保护灯盏乙素苷元 4'-N-Boc L-缬氨酸酯(4a)的制备 缩酮保护的灯盏乙素苷元(30 mg, 67 μmol)溶于 5 ml 四氢呋喃(THF)中, 后加入 N-Boc-L-缬氨酸(18.6 mg, 81 μmol)和 4-二甲胺基吡啶(DMAP, 4 mg, 33 μmol)。然后加入 3 ml *N,N*-二环己基碳二亚胺(DCC, 17 mg, 81 μmol)的四氢呋喃溶液, 室温搅拌条件下反应 14 h。TLC 监测至原料转化完全后, 减压浓缩残余物以石油醚: 乙酸乙酯: 二氯甲烷 = 7:1:5 为洗脱剂, 硅胶柱层析分离得黄色油状缩酮保护的灯盏乙素苷元 4'-L-缬氨酸酯衍生物, 见图 2(4a)。6,7-羟基缩酮保护灯盏乙素苷元 4'-N-Boc L-缬氨酸酯, 4'-N-Boc L-亮氨酸酯(4b), 4'-N-Boc L-异亮氨酸酯(4c)成分, 以 *N*-Boc-L-亮氨酸、*N*-Boc-L-异亮氨酸以及 6,7-羟基缩酮保护灯盏乙素苷元为原料按照化合物 4a 的制备方法合成。

1.2.1.4 灯盏乙素苷元 4'-L-缬氨酸酯(5a)的制备 冰盐浴条件下, 依次将甲醇(27 μl, 667 μmol)和乙酰氯(39 μl, 556 μmol)加入到 2 ml 的乙酸乙酯中, 保持冰盐浴搅拌反应 3 h, 将之前得到的缩酮保护的灯盏乙素苷元 4'-N-Boc L-缬氨酸酯衍生物(30.6 mg, 55.6 μmol)溶于 1.5 ml 乙酸乙酯后, 加至上述反应体系中, 继续保持冰盐浴反应 2 h 后, 逐渐将反应温度升至室温, 反应 12 h, 有橘黄色沉淀附壁, 反应体系经超声、离心后, 所得沉淀用乙酸乙酯洗涤 3 次得橘黄色油状目标产物。灯盏乙素苷元 4'-L-亮氨酸酯(5b)灯盏乙素苷元 4'-L-异亮氨酸酯(5c)的制备, 按照化合物 5a 的方法合成。

2 实验结果

2.1 6,7-二苯缩酮保护灯盏乙素苷元(3)

浅棕黄色粉末状固体 0.22 g, 收率 68.4%。mp 250 ~ 252 °C。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 12.57 (brs, 1H, 5-OH), 10.41 (brs, 1H, 4'-OH), 7.92 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, Ar'-H_{3,5}), 7.56 ~ 7.53 (m, 4H, Ph-H), 7.46 ~ 7.44 (m, 6H, Ph-

H), 7.04 (s, 1 H, Ar-H₈), 6.90 (d, *J* = 8.8 Hz, 2 H, Ar'-H_{2,6}), 6.83 (s, 1 H, Ar-H₃); ESI-MS (*m/z*): 449.1 [M-H]⁻。

2.2 6,7-羟基缩酮保护灯盏乙素苷元 4'-N-Boc L-缬氨酸酯(4a)

黄色油状物 30.6 mg, 收率 56%。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.93 (d, *J* = 8.8 Hz, 2 H, Ar'-H_{3,5}), 7.62 ~ 7.60 (m, 4H, Ph-H), 7.42 ~ 7.40 (m, 6 H, Ph-H), 6.98 (d, *J* = 8.8 Hz, 2 H, Ar'-H_{2,6}), 6.62 (s, 1 H, Ar-H₈), 6.57 (s, 1 H, Ar-H₃), 5.08 (d, *J* = 6.4 Hz, 1 H, NHBoc), 4.21 ~ 4.18 (m, 1H, CHNH), 2.34 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1.47 (s, 9 H, 3 × CH₃), 1.11 (d, *J* = 6.4 Hz, 3 H, CH₃), 0.95 (d, *J* = 7.2 Hz, 3 H, CH₃); ESI-MS (*m/z*): 645.1 [M-H]⁻。

2.3 灯盏乙素苷元 4'-L-缬氨酸酯(5a)

黄色油状物 12 mg, 产率 56.1%。(400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.59 (brs, 1 H, 5-OH), 10.61 (brs, 1 H, 7-OH), 8.65 (brs, 1 H, 6-OH), 8.18 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H, Ar'-H_{3,5}), 7.42 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H, Ar'-H_{3,6}), 6.95 (s, 1 H, Ar-H₈), 6.65 (s, 1 H, Ar-H₃), 4.20 (d, *J* = 4.4 Hz, 1 H, COCHNH₂), 2.38 ~ 2.33 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1.12 (d, *J* = 7.2 Hz, 3 H, CH₃), 1.08 (d, *J* = 7.2 Hz, 3 H, CH₃)。ESI-MS (*m/z*): 384.2 [M-H]⁻。

2.4 灯盏乙素苷元 4'-L-亮氨酸酯(5b)

黄色油状物, 收率 41.44%。(400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.57 (brs, 1 H, 5-OH), 10.76 (brs, 1 H, 7-OH), 8.74 (brs, 1 H, 6-OH), 8.17 (d, *J* = 8.8 Hz, 2 H, Ar'-H_{3,5}), 7.42 (d, *J* = 8.8 Hz, 2 H, Ar'-H_{3,6}), 6.93 (s, 1 H, Ar-H₈), 6.71 (s, 1 H, Ar-H₃), 4.27 (m, 1H, COCHNH₂), 1.96 - 1.79 (m, 3 H, CH₂CH(CH₃)₂), 1.05 - 1.01 (m, 6 H, 2 × CH₃)。ESI-MS (*m/z*): 398.1 [M-H]⁻。

2.5 灯盏乙素苷元 4'-L-异亮氨酸酯(5c)

黄色油状物, 收率 40.20%。(400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.57 (brs, 1 H, 5-OH), 10.78 (brs, 1H, 7-OH), 8.76 (brs, 1 H, 6-OH), 8.17 (d, *J* = 8.8 Hz, 2 H, Ar'-H_{3,5}), 7.41 (d, *J* = 8.8 Hz, 2 H, Ar'-H_{3,6}), 6.94 (s, 1 H, Ar-H₈), 6.65 (s, 1 H, Ar-H₃), 4.25 (m, 1H, COCHNH₂), 2.07 (m, 1H, CH(CH₃)C₂H₅), 1.62 ~ 1.59 (m, 1H, CH₂CH₃-1 H), 1.41 ~ 1.37 (m, 1H, CH₂CH₃-

1 H), 1.06 (d, $J = 6.8$ Hz, 3 H, CH(CH₃)), 0.97 (t, $J = 7.6$ Hz, 3 H, CH₂CH₃). ESI-MS(m/z): 398.1 [M-H]⁻.

3 讨论

6,7-二羟基缩酮保护灯盏乙素苷元(3)制备中,由灯盏乙素酸解获得的灯盏乙素苷元应水洗至中性,并且在溶剂提取后充分干燥,否则由于水分与酸的存在将使缩酮保护灯盏乙素苷元制备时产物收率降低。6,7-羟基缩酮保护灯盏乙素苷元4'-N Boc L-氨基酸酯合成反应中最适合的溶剂为四氢呋喃(THF),在该溶剂条件下6,7-羟基缩酮保护灯盏乙素苷元与4'-N Boc L-氨基酸缩合反应的收率(56-74%)高于用其它溶剂,如二氯甲烷、乙酸乙酯等的反应收率。

6,7-羟基缩酮保护灯盏乙素苷元4'-N Boc L-氨基酸酯脱保护的最终产物时,选择乙酰氯/甲醇体系低温下反应能一步脱去二苯缩酮与N Boc保护基,若采用其它脱保护试剂如三氟乙酸,85%磷酸则目标化合物收率明显降低,杂质增加。

4 参考文献

- [1] Liu H, Yang XL, Wang Y, et al. Protective effects of scutellarin on superoxide-induced oxidative stress in rat cortical synaptosomes [J]. Acta Pharmacol Sin, 2003 (24): 1113-1117.
- [2] Chen XX, He B. Effects of breviscapine on the changes in antioxidant enzyme activity induced by cerebral ischemia

reperfusion in rats [J]. J Chin Pharm Sci, 1998(7): 91-93.

- [3] Xu QY, Li XX. Influence of DZXX injection on blood viscosity in patients with high blood viscosity [J]. New Drugs Clin Rem, 1995(14): 233.
- [4] Cao F, Guo JX, Ping QN, et al. Prodrugs of scutellarin: Ethyl, benzyl and N, N-diethylglycolamide ester synthesis, physicochemical properties, intestinal metabolism and oral bioavailability in the rats [J]. Eur J Pharm Sci, 2006(29): 385-393.
- [5] Ge QH, Zhou Z, Zhi XJ, et al. Pharmacokinetics and absolute bioavailability of breviscapine in beagle dogs [J]. Chi J Pharm, 2003(34): 618-620.
- [6] Birger B, Nielsen CU, Steffansen B, et al. Transport of Peptidomimetic Drugs by the intestinal di/tri-peptide transporter PepT1 [J]. Pharmacol Toxicol, 2002(90): 285-296.
- [7] Che QM. A method for preparation of scutellarein CN, 1683357A [P]. 2005-10-19.
- [8] Chen ZW, Hu YZ, Wu HH, et al. Synthesis and vasorelaxation action of flavonoid [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2005(40): 1001-1007.
- [9] Li D, Yang HS, Xie LG, et al. Synthesis of N-[2-(1H-Indol-3-yl)ethyl]-2-acetylthiazole-4-carboxamide and its analogues [J]. Chinese J Org Chem, 2010(30): 238-243.
- [10] Fu XZ, Jiang SH, Li C, et al. Design and synthesis of novel bis(L-amino acid) ester prodrugs of 9-[2-(phosphono methoxy)ethyl]adenine (PMEA) with improved anti-HBV activity [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2007(17): 465-470.

(2010-12-13 收稿, 2011-03-04 修回)

· 文摘 ·

脑通复方对血管性痴呆大鼠海马尼古丁受体的影响

肖雁¹, 王晓亮¹, 邓婕¹, 闫秀明¹, 黄勇², 况时祥³, 官志忠¹

(1. 贵阳医学院分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵阳医学院, 贵州 贵阳 550004;

3. 贵阳中医学院附属第二医院, 贵州 贵阳 550001)

[摘要] 目的: 观察脑通复方制剂对拟血管性痴呆(VaD)模型大鼠脑组织神经型尼古丁受体(Nicotinic acetylcholine receptors, nAChR)的影响, 分析脑通复方制剂改善血管性痴呆学习记忆能力的作用机制。方法: 采用改良 Pulsinelli 四血管阻断(Pulsinelli's-vessel occlusion, 4-VO)法复制大鼠血管性痴呆模型, 脑通复方制剂治疗后观察学习记忆能力, Western-blot 法测定脑组织神经型尼古丁受体蛋白水平。结果: 脑通复方制剂可缩短实验大鼠逃避潜伏期, 增加跨越平台次数, 上调海马组织神经型尼古丁受体的表达。结论: 脑通复方制剂可通过上调 nAChR 表达, 从而改善血管性痴呆大鼠的学习记忆能力。

全文刊登于《时珍国医国药》2010(6):1305