

二氢卟吩 P₆-6-(N-乙基)酰胺-7,γ-二甲酯锌的合成及对 吲哚美辛诱发大鼠胃溃疡的保护作用

姚建忠, 章玲, 郑红, 张万年, 周有骏, 朱驹, 吕加国*
(第二军医大学药学院, 上海 200433)

摘要: 目的 研究二氢卟吩 P₆-6-(N-乙基)酰胺-7,γ-二甲酯锌(I)的合成及抗胃溃疡活性。方法 蚕沙糊状叶绿素经酸、碱降解反应制得紫红素-18(III), III经乙胺解后重氮甲烷甲基化制得二氢卟吩 P₆-6-(N-乙基)酰胺-7,γ-二甲酯(II), II与醋酸锌络合制得I;以0.2%吲哚美辛(20 mg/kg) ip大鼠制备胃溃疡模型,并测定溃疡指数和溃疡个数。结果 I的结构经UV、IR、¹H NMR、FAB-MS及元素发射光谱确证。ip I 80 mg/kg有极显著降低吲哚美辛诱发的大鼠溃疡指数($P < 0.01$)和溃疡个数($P < 0.01$)。结论 I为新化合物,II的波谱数据系首次报道。I对吲哚美辛诱发的大鼠胃溃疡具有显著的保护作用,提示I是一种有开发前景的抗溃疡候选化合物,值得深入研究。

关键词: 蚕沙;叶绿素;合成;二氢卟吩 P₆-6-(N-乙基)酰胺-7,γ-二甲酯锌;溃疡

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)06-0487-03

Synthesis and protective effect of zinc chlorin P₆-6-N-ethylamide-7, γ-dimethylester on indomethacin-induced gastric ulcer in rats

YAO Jian-zhong, ZHANG Ling, ZHENG Hong, ZHANG Wan-nian, ZHOU You-jun, ZHU Ju, LÜ Jia-guo
(School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract Object To study the synthesis and experimental antagastric ulcer activity of zinc chlorin P₆-6-N-ethylamide-7, γ-dimethylester (I). **Methods** Purpurin-18 (III) was prepared through alkaline oxidation of pheophorbide a (IV), which was synthesized by acid degradation using silkworm excrement crude chlorophyll extracts, and then I was synthesized by Zn(OAc)₂ complex reaction with chlorin P₆-6-N-ethylamide-7, γ-dimethylester (II), which was formed *via* methylation as well as acetamide ammonification of III. Gastric ulcer model was made by ip 0.2% indomethacin at 20 mg/kg in rats and then the indexes and numbers of ulcer in gastric mucosa were measured. **Results** I was identified by UV, IR, ¹H NMR and FAB-MS spectra. Compared with the control group, ip I at 80 mg/kg was found to significantly reduce the index ($P < 0.01$) and the number ($P < 0.01$) of gastric ulcer induced by indomethacin in rats. **Conclusion** I is a new compound and the spectral data of II were reported for the first time. The preliminary pharmacodynamic results showed that I has a significant protective effect against indomethacin-induced gastric mucosa lesion in rats, and it is suggested that I may be developed as a potential antagastric ulcer drug and it is worthy to further study.

Key words silkworm excrement; chlorophyll; synthesis; zinc chlorin P₆-6-N-ethylamide-7, γ-dimethylester; ulcer

叶绿素衍生物具有可靠的抗胃溃疡活性^[1],其中,铜叶绿素钠(sodium copper chlorophyllin)是一种叶绿素降解产物二氢卟吩铜络合物的混合物,已报道用于治疗胃及十二指肠溃疡、传染性肝炎和慢

性再生障碍性贫血等疾病^[2,3],但几乎所有的报道都是以组成不定的多组份叶绿素衍生物的混合物包括未知结构的化合物为研究对象,从而影响到实验和临床研究结果的可重现性。1987年,日本绿十字株

* 收稿日期: 2002-01-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39522003)

作者简介: 姚建忠(1966-),男,江苏昆山人,第二军医大学药学院药物化学教研室任助理研究员,博士生,主要从事卟啉及二氢卟吩类光敏抗肿瘤和保肝抗溃疡新药研究,参加国家自然科学基金及军队九五基金课题各1项,已发表论文20余篇。Tel (021) 25070248 E-mail Yaojz@public9.sta.net.cn

式会社成功上市了抗胃溃疡新药二氢卟吩 δ -钙维生素 B₆ 复合物 (midoriamin)^[4]。1990年,陶海鹏等^[5]报道了锌叶绿酸 a 制剂治疗切口感染、口腔粘膜溃疡及浅度烫伤 74 例效果显著。

鉴于锌离子不仅是人体所必需的微量元素,也是目前较为看好的抗溃疡因子,临床上也出现了多种含锌抗胃溃疡药物,如醋氨己酸锌、雷尼替丁锌盐和西咪替丁锌盐,作者以蚕沙叶绿素为原料,参照文献^[6]方法制得紫红素-18(III),III经乙胺解及 $\text{C}_2\text{H}_5\text{N}_2$

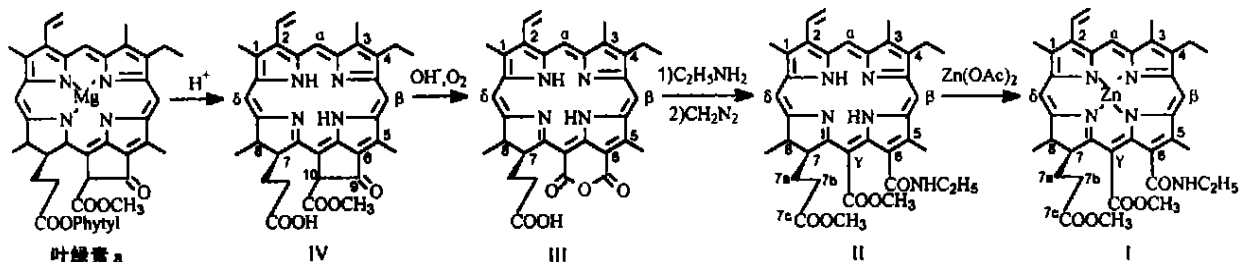


图 1 二氢卟吩 P₆-6-(N-乙基)酰胺-7,γ-二甲酯锌(I)的合成

蚕沙糊状叶绿素由浙江省海宁市天然色素厂提供。柱层析硅胶 H(60型)由青岛海洋化工集团公司出品。Wistar大鼠(180~220 g)由第二军医大学动物实验中心提供。吲哚美辛(indomethacin)由上海第十七制药厂提供;西咪替丁(cimetidine)由上海第六制药厂提供;两者均用 0.5% CMC 分别配成 0.2% 及 1% 的混悬液。测定 HPLC 用 Water-600 型高效液相色谱仪(美国),分离柱: ZORBAX ODS 柱(0.46 cm×25 cm),流动相: 60% 四氢呋喃水溶液+10% 0.2 mol/L HOAc-NaOAc 缓冲液,流速: 1 mL/min,检测波长: 400 nm,灵敏度: 0.1 AUFS。测定 ¹H NMR 用 DMX-500 型核磁共振谱仪(德国, Bruker)。测定 FAB-MS 用 4510-GC-MS-DS 质谱仪(美国, Finnigan MAT)。测定 UV 用 UV-160A 紫外分光光度计(日本,岛津)。测定 IR 用 270-50 型红外分光光度计(日本,日立),KBr 压片。实验用其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 脱镁叶绿酸 a(IV)和紫红素-18(III): 参照文献^[6]方法制备。

2.2 二氢卟吩 P₆-6-(N-乙基)酰胺-7,γ-二甲酯(II): III(2 g, 3.55 mmol)溶于四氢呋喃(200 mL),加 63% 乙胺水溶液(50 mL),搅拌反应至 UV 检测 698 nm 处吸收峰消失,加水(250 mL),用 10% H₂SO₄ 中和至 pH 5~6,乙醚萃取(300 mL×3),无水 Na₂SO₄ 干燥。醚液在冰盐浴上加入新配制的 2.8% C₂H₅N₂ 乙醚液(20 mL),搅拌反应 5 min,水洗

甲基化制得二氢卟吩 P₆-6-(N-乙基)酰胺-7,γ-二甲酯(II),II 与 Zn(OAc)₂ 络合反应制得二氢卟吩 P₆-6-(N-乙基)酰胺-7,γ-二甲酯锌(I)(图 1),其中, I 为新化合物,初步药理结果显示, I 能显著降低吲哚美辛诱发的大鼠溃疡指数和溃疡个数,从而表明 I 对吲哚美辛诱发的大鼠胃溃疡具有显著的保护作用,作用至少与西咪替丁相当(表 1),提示 I 是一种有发展前途的抗胃溃疡新药苗子,值得深入研究。

1 仪器与试剂

(250 mL×3),回收乙醚后粗品经硅胶 H 柱色谱分离得黑色粉末 II(1.35 g, 59.8%),纯度 99%(HPLC)。UVλ_{max} nm 665, 528, 498, 398(soret)(THF)。IR(KBr)cm⁻¹: 3300(NH), 2950~2880, 1740(C=O), 1640(C=O), 1610(C=C), 1540(chlorin skeleton), 1280, 1060¹HNMR(CDCl₃)δ 9.58(1H, s, H_β), 9.54(1H, s, H_α), 8.76(1H, s, H-δ), 7.98(1H, dd, J=17.9, 11.5 Hz, H_{2a}), 6.33(1H, t, 6-CONH), 6.28(1H, dd, J=17.9, 1.8 Hz, H_{2b}), 6.11(1H, dd, J=11.5, 1.8 Hz, H_{2c}), 5.05(1H, m, H-7), 4.44(1H, q, J=7.2 Hz, H-8), 4.21(3H, s, 10-OMe), 3.75(2H, m, NHCH₂CH₃), 3.62(2H, q, J=7.5 Hz, 4a-CH₂), 3.58(3H, s, 5-Me), 3.44(3H, s, 7c-OMe), 3.43(3H, s, 1-Me), 3.20(3H, s, 3-Me), 2.38(2H, m, 7a-CH₂), 2.12(2H, m, 7b-CH₂), 1.89(3H, d, J=7.2 Hz, 8-Me), 1.65(3H, t, J=7.5 Hz, 4b-Me), 1.43(3H, t, J=7.5 Hz, NHCH₂CH₃), 1.59(2H, s, 环内 NH<2)。MS(FAB)m/z 639(M⁺+2)(21%), 638(M⁺+1)(66%), 637(M⁺)(100%), 606(M⁺-OMe)(13%), 593(M⁺-C₂H₅NH)(18%), 578(M⁺-COOMe)(13%)。

2.3 二氢卟吩 P₆-6-(N-乙基)酰胺-7,γ-二甲酯锌(I): II(2 g, 3.14 mmol)溶于氯仿(250 mL),加 1% 醋酸锌甲醇液(60 mL),水浴回流 30 min,水洗(100 mL×3),回收氯仿,干燥后经硅胶 H 柱色谱分离得到草绿色粉末 I(1.5 g, 68.3%),纯度 98%

(HPLC)。I 极易溶于稀碱和冰醋酸,易溶于氯仿、四氢呋喃,微溶于丙酮、乙醚、甲醇,不溶于水;熔点 300℃不熔;经灼烧有残留物,示有特殊金属元素,灼烧灰分经发射光谱分析确认为锌。UVλ_{max} nm: 638, 507, 408(soret) (CHCl₃) IR (KBr) cm⁻¹: 2 950~ 2 850(C-H), 1 730(C=O), 1 600(C=C), 1 560(chlorin skeleton), 1 450, 1 200, 1 095¹HNM R(CDCl₃) δ 9.41(1H, s, Hβ), 9.05(1H, s, Hα), 8.76(1H, s, H-δ), 8.09(1H, dd, J= 17.9, 11.4 Hz, H-2a), 6.23(1H, t, 6-CONH), 6.20(1H, d, J= 17.9 Hz, Hβ-2b), 6.04(1H, d, J= 11.4 Hz, Hα-2b), 5.11(1H, m, H-7), 4.65(1H, q, J= 7.2 Hz, H-8), 4.21(3H, s, 10-OMe), 3.90~ 3.65(4H, m, NCH₂CH₂ and 4a-CH₂), 3.55(3H, s, 5-Me), 3.39(3H, s, 7c-OMe), 3.32(3H, s, 1-Me), 3.23(3H, s, 3-Me), 2.67(2H, m, 7a-CH₂), 2.29(2H, m, 7b-CH₂), 1.85(3H, d, J= 7.0 Hz, 8-Me), 1.67(3H, t, J= 7.5 Hz, 4b-Me), 1.44(3H, t, J= 7.5 Hz, NCH₂

CH₂)。MS(FAB) m/z 702(M⁺ + 3)(47%), 701(M⁺ + 2)(75%), 698(M⁺ - 1)(100%)

2.4 I 对吡啶美辛诱发大鼠胃溃疡的保护作用: 参照文献^[7]方法,健康 Wistar 大鼠(180~ 220 g),雌雄各半,禁食不禁水 24 h 后,按体重随机分组,以 ip 0.5% CMC(10 mL/kg)为阴性对照组;ip 1% 西咪替丁的 0.5% CMC混悬液(100 mg/kg)为阳性对照组;试药组 ip 0.8% I 的 0.5% CMC混悬液(80 mg/kg) 给药 30 min 后 ip 0.2% 吡啶美辛的 0.5% CMC混悬液(20 mg/kg),5 h 后断颈处死大鼠,取出胃,用 10% 甲醛溶液灌注,置 10% 甲醛溶液固定 1 h,沿胃大弯剪开冲净内容物,测定每只胃所有溃疡长径总和(溃疡指数)和溃疡个数,计算每组大鼠的溃疡指数和溃疡个数的平均值,与阴性对照组比较算出溃疡指数和溃疡个数抑制率,并作统计学 t 检验,结果见表 1

3 结果与讨论

表 1 结果显示,ip 吡啶美辛(20 mg/kg) 5 h

表 1 I 对吡啶美辛诱发的大鼠胃溃疡的保护作用

组别	给药剂量 (mg/kg)	鼠数(只)	溃疡指数(mm)	溃疡个数(个)	抑制率(%)	
					溃疡指数	溃疡个数
I	80	7	1.71± 1.52*	2.29± 1.98*	86.1	81.7
西咪替丁	100	10	2.64± 3.31†	2.70± 3.71†	78.5	78.4
0.5% CMC	-	12	12.29± 10.68	12.50± 8.59	-	-

与 0.5% CMC 组对照: * P < 0.05 ** P < 0.01

后,阴性对照组大鼠胃粘膜损伤较严重,溃疡指数和溃疡个数分别为(12.29± 10.68) mm 和(12.50± 8.59)个,经预先 ip I (80 mg/kg)的大鼠,溃疡指数和溃疡个数分别为(1.71± 1.52) mm 和(2.29± 1.98)个,与阴性对照组相比,分别降低了 86.1% 和 81.7%;预先 ip 西咪替丁(100 mg/kg)的大鼠,溃疡指数和溃疡个数分别为(2.64± 3.31) mm 和(2.70± 3.71)个,与阴性对照组相比,分别降低了 78.5% 和 78.4%。统计学 t 检验表明,试药组溃疡指数和溃疡个数均数与阴性对照组差别均具有极显著性意义;阳性对照组溃疡指数和溃疡个数均数与阴性对照组差别也均具有极显著性意义,因此,可以认为 I 能显著降低吡啶美辛诱发的大鼠胃溃疡指数和溃疡个数,提示 I 对吡啶美辛诱发的大鼠胃溃疡具有显著的保护作用,且作用至少与西咪替丁相当。

致谢:样品的 FAB-MS 谱由中国科学院上海有

机化学研究所测定,¹HNM R 谱由复旦大学化学系分析测试中心测定,IR 由上海市医药工业研究院分析室测定,UV 谱由本院分析测试中心测定。

参考文献:

- [1] 胡龙勤. 叶绿素衍生物在医药上的应用 [J]. 国外药学-合成药、生化药、制剂分册, 1987, 8(3): 146-153.
- [2] 华南农学院蚕桑系. 蚕粪的综合利用 [J]. 化学通报, 1978, 6: 28-31.
- [3] 原毅. 糊状叶绿素、叶绿素铜和叶绿素铜钠的制备 [J]. 化学世界, 1989, 1: 38-40.
- [4] 日本药事研究会. 抗溃疡剂 [J]. 月刊药事, 1988, 30(3): 69-70.
- [5] 陶海鹏, 孙振贤, 刘明蓉, 等. 锌叶绿素 a 的合成及初步临床应用 [J]. 华西医科大学学报, 1990, 21(3): 341-343.
- [6] 姚建忠, 许德余, 陈文晖, 等. 蚕沙中叶绿素 a 降解过程的化学研究 [J]. 中草药, 1999, 30(8): 568-571.
- [7] 张守仁, 邵金莺, 於毓文. 呋喃唑酮和一些常用抗溃疡药对四种大鼠胃溃疡模型的影响 [J]. 药学报, 1987, 19(1): 5-11.