

石杉碱甲-亚油酸酯的合成及其性质的初步研究

刘 莉, 龚 涛, 张志荣*

(四川大学华西药学院, 四川 成都 610041)

摘要: 目的 合成石杉碱甲(huperzine A, HUP)亚油酸(linoleic acid, LA)酯(HUP-LA), 并对其性质进行初步探讨。方法 利用二环己基碳酰二亚胺(DCC)法制备 HUP-LA; 考察了其在不同 pH值、不同温度的缓冲液及小鼠血浆和不同脏器组织匀浆中的降解情况。结果 HUP-LA经¹H-NMR, ¹³C-NMR, IR, MS, UV 证实为目标化合物。目标化合物在不同的体外环境中稳定性差异大。结论 该研究对于石杉碱甲的结构改造有参考意义。

关键词: 石杉碱甲; 亚油酸; DCC法; 稳定性

中图分类号: R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2004)03-0253-03

Primary studies on synthesis of HUP-LA and its characteristics

LIU Li, GONG Tao, ZHANG Zhi-tong

(West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Key words huperzine A; linoleic acid; DCC method; stability

石杉碱甲(HUP)是从千层塔 *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev. 的酚性生物碱部分分得的一种化合物, 药理研究表明^[1] HUP是高效的可逆性乙酰胆碱酯酶(AchE)抑制剂, 通过抑制 AchE对乙酰胆碱的水解作用而提高突触前乙酰胆碱的水平。具有提高记忆效率、增强学习^[2]、改善空间记忆障碍的作用^[3], 是一个较有发展前途的、用以治疗阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的药物^[4]。

亚油酸(LA)是 ω -6系列多不饱和脂肪酸(PUFA), 在中药紫苏子中含量丰富, 为人体必需脂肪酸。LA通过血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)上的亚油酸通道(linoleic acid passage)^[5]透过 BBB 同时 LA又有间接恢复神经功能的作用^[6], 对 AD有一定的改善作用。

设计将上述两种治疗 AD的药物通过化学键连接在一起, 希望利用亚油酸通道使药物更多的透过 BBB 进入大脑, 在脑内水解成 HUP和 LA, 并通过二者对大脑神经系统的协同作用, 提高药物的疗效。本研究采用二环己基碳酰二亚胺(DCC)法^[7], 合成了 HUP-LA, 并对其性质进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 仪器: 85-2型恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器厂); SARTORIUS电子天平(德国); VECTOR22红外光谱仪(液膜法); UNITYINOV A型核磁共振

仪(400 Hz作氢谱, 200 Hz作碳谱, TMS做内标, CDCl₃为溶剂); VG7070E质谱仪(英国); UV-2201紫外分光光度计(日本岛津); Shimadzu LC-10A_{vp}高效液相色谱仪。

1.2 药品与试剂: HUP购于浙江万邦药业; 4-N, N-二甲氨基吡啶(DMAP), LA为色谱纯(购于 Fluka); DCC, 二氯甲烷, 环己烷, 醋酸乙酯, 硅胶 H均为分析纯。

1.3 HUP-LA的合成: 取 HUP 24.2 mg (0.1 mmol), 加入 1500 mL无水二氯甲烷, 冰浴搅拌下, 依次加入 LA(112 mg, 0.4 mmol, 溶于 500 μ L无水二氯甲烷), DMAP(7.26 mg, 0.06 mmol), DCC(90.6 mg, 0.44 mmol, 溶于 500 μ L无水二氯甲烷), 在 N₂保护下, 冰浴 2 h, 再移至油浴[(40 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C], 回流状态, N₂保护下反应 15 h, 停止反应。反应液滤过, 用二氯甲烷洗涤, 滤液浓缩至约 1.5 mL, 上硅胶 H柱, 洗脱液(环己烷: 醋酸乙酯=4:1), 收集洗脱液, 点板, 合并含产物的洗脱液, 真空抽干得无色油状 HUP-LA。合成路线见图 1。

1.4 含量测定的色谱条件^[8]: 岛津 Shim-Pack C₁₈反相柱(150 mm $\times$ 6 mm), 柱温 35 $^{\circ}$ C, 流速 1 mL/min, 检测波长 310 nm, 流动相: 甲醇: 0.1 mol/mL醋酸铵缓冲液(pH6.0)=1:1, 进样量: 20 μ L。

1.5 合成药物在不同 pH值缓冲溶液中的稳定性

* 收稿日期: 2003-08-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(30171116); 国家杰出青年科学基金项目(399250390)

* 通讯作者 Tel: (028) 85501566 Fax: (028) 85456898 E-mail: zrzzl@vip.sina.com

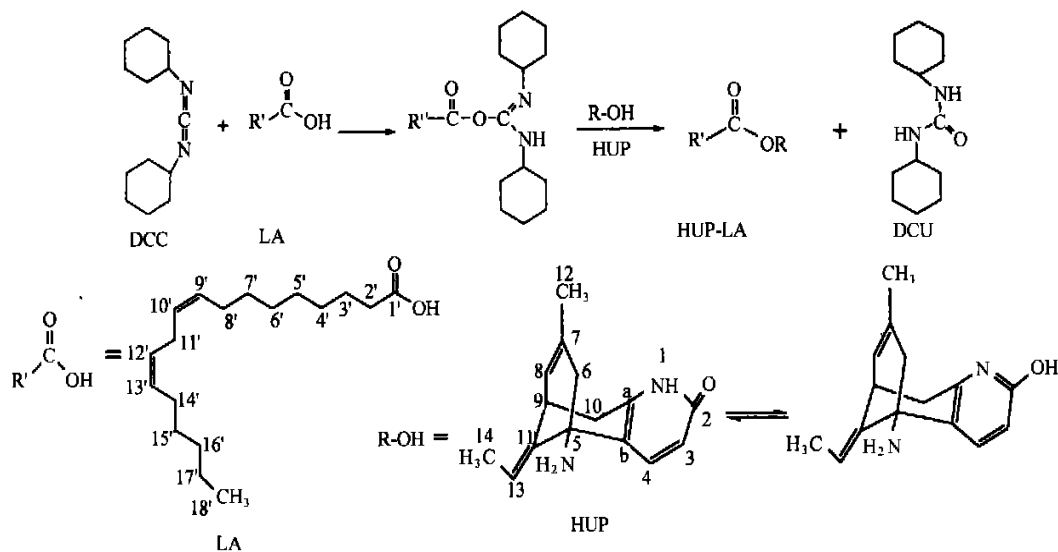


图 1 HUP-LA的合成路线图

Fig. 1 Synthetic route of HUP-LA

研究^[9]: 精密吸取 0.5 mL 合成药物的过饱和溶液, 再用在 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温箱预热的不同 pH 值缓冲溶液补加至 10 mL, 混匀 (溶液仍为过饱和溶液), 置 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温箱中于不同时间点取样, 用 HPLC 法测定其降解产物 (HUP) 的浓度变化情况。

1.6 合成药物在不同温度缓冲溶液中的稳定性研究: 精密吸取 0.5 mL 合成药物的过饱和溶液, 再用分别在 $(65 \pm 1)^\circ\text{C}$, $(80 \pm 1)^\circ\text{C}$ 烘箱中预热的不同 pH 值缓冲溶液补加至 10 mL, 混匀 (溶液仍为过饱和溶液), 置 $(65 \pm 1)^\circ\text{C}$, $(80 \pm 1)^\circ\text{C}$ 烘箱中, 于不同时间点取样, 用 HPLC 法测定其降解产物 (HUP) 的浓度变化情况。

1.7 合成药物在小鼠血浆及不同脏器的组织匀浆中稳定性研究: 精密吸取 0.5 mL 合成药物的过饱和溶液 (0.8 mg/mL), 用在 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温箱预热的血浆或组织匀浆补加至 10 mL, 混匀, 置 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温箱中, 不同时间点取样, 甲醇沉淀蛋白后, 用 HPLC 法测定其降解产物 (HUP) 的浓度变化情况。

2 结果

2.1 HUP-LA 的结构鉴定: HUP 经 DCC 法与 LA 反应得到产物, 为无色油状液体, 收率为 50% ~ 60%, 化合物经 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, IR, MS, UV 初步证实为目标产物。 δ_{H} : 8.22 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3), 6.91 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-4), 5.54 (1H, q, $J = 6.4, 13.4$ Hz, H-13), 5.45 (1H, d, $J = 4.8$ Hz, H-8), 5.39 (4H, m, H-9', 10', 12', 13'), 3.696 (1H, s, H-9), 2.99 (1H, m, H-10), 2.78 (2H, m, H-2'), 2.585 (2H, m, H-11'), 2.22 (2H, q, H-6), 2.06 (4H,

m, H-8', 14'), 1.75 (5H, m, H-14, 3'), 1.36 (17H, m, H-12, 3', 4', 5', 6', 7', 15', 16'), 0.985 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, H-18') δ_{C} : 171.976 (C-1'), 155.979 (C-2), 155.588 (C-a), 142.822 (C-12), 139.020 (C-4), 137.420 (C-b), 133.179 (C-7), 130.154 (C-9'), 129.975 (C-10'), 128.009 (C-12'), 127.861 (C-13'), 124.912 (C-8), 113.774 (C-3), 111.338 (C-13) IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 3384.17 (w, ν_{NH}), 3010.72 (m, ν_{CH}), 2929.47 (s, ν_{CH_3}), 2858.42 (s, ν_{CH_2}), 1764.31 (s, $\nu_{\text{C=O}}$), 1580.72 (m, β_{NH}), 1451.66 (s, α_{CH_3}), 1120.06 (s, 六元环骨架振动) m/z : 504 (M^+ , 11.99%), 242 (HUP $^+$, 100%), 227 ([HUP-CH $_3$] $^+$, 42.47%), 213 ([HUP-C $_2$ H $_5$] $^+$, 18.5%), 210 ([LA-C $_3$ H $_7$ CO] $^+$, 7.54%), 187 ([HUP-C $_4$ H $_9$] $^+$ - 1, 27.76%), 67 ([CH=CH-CH $_2$ -CH=CH] $^+$ + 1, 17.82%), 17 ([NH $_2$] $^+$ + 1, 30.98%) λ_{max} (nm): 232, 296.2.

2.2 合成药物在不同 pH 值缓冲溶液及不同温度缓冲溶液中的稳定性研究: 利用 2 mol/L 的盐酸分解合成药物发现, 合成药物的降解产物经 HPLC 法检测均为 HUP 不同 pH 值缓冲溶液中的稳定性比较, 合成产物在酸性环境中最不稳定, 而在中性及弱碱性环境中相对较稳定。不同温度缓冲溶液中的稳定性比较, 合成药物随温度的升高降解加速。结果见图 2, 3。

2.3 合成药物在小鼠血浆及不同脏器的组织匀浆中的稳定性研究: 合成药物在不同组织酶的作用下均能降解得到 HUP, 其降解速率为在血浆中降解最

快,肝、肾中次之,在脑中降解最慢 结果见图 4

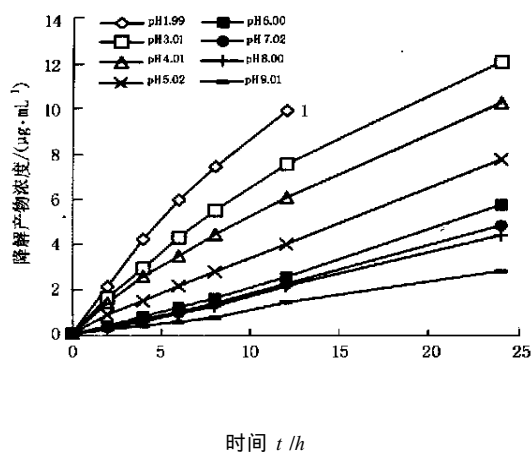


图 2 合成药物 (37 ± 1) °C 在不同 pH 值缓冲溶液中的稳定性

Fig. 2 Stability of synthetic drug in buffer of various pH value at (37 ± 1) °C

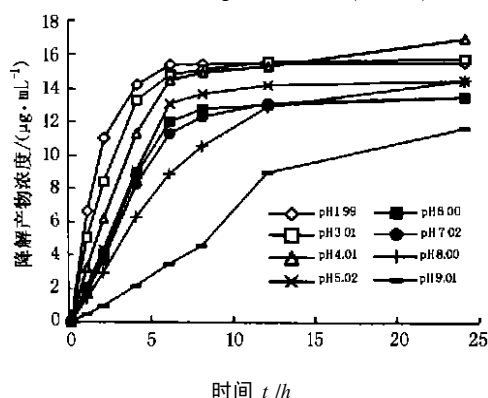


图 3 合成药物 (65 ± 1) °C 在不同 pH 值缓冲溶液中的稳定性

Fig. 3 Stability of synthetic drug in buffer of various pH value at (65 ± 1) °C

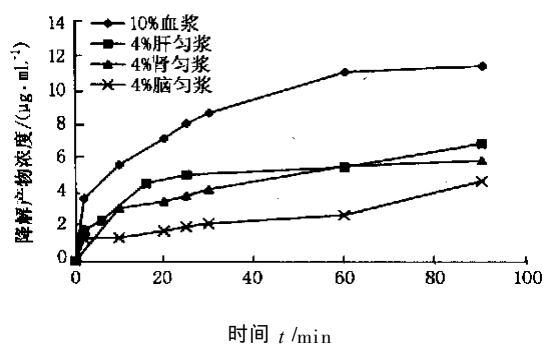


图 4 合成药物在小鼠血浆及不同脏器的组织匀浆中的降解情况

Fig. 4 Stability of compound in plasma or different tissue homogenate

3 讨论

3.1 HUP 结构中的内酰胺与共轭烯烃相邻,很容易通过互变异构为烯醇形式,形成稳定的大 π 键,2

位羰基变为羟基,则 HUP 的结构中就有 5 位氨基和 2 位羟基两个基团可与 LA 反应。考虑到 5 位氨基空间位阻较大,反应较困难,而 2 位羟基的空间位阻相对较小,故推测其优先与 LA 反应,形成酯键。结构解析证明我们的设想是正确的, HUP 互变异构后的 2 位羟基与亚油酸形成酯键

3.2 由于原药 HUP 具有特殊空间结构,空间位阻较大;而且 LA 又是长链多不饱和脂肪酸,其稳定性较差,酸性弱。这需要反应能克服空间位阻,又需要反应条件比较温和。所以本试验采用 DMAP 作为催化剂的 DCC 法。其中 DCC 可以增加亚油酸羰基的亲电活性, DMAP 既提供了反应应具备的碱性条件,又促进了吡啶酮环的互变异构体的形成及保持其稳定,有利于反应向正方向进行。

3.3 合成药 HUP-LA 是一种无色油状物,体外研究表明,其稳定性差,不宜长期贮藏,本实验中一般采用通氮气后冷冻储藏。也尝试测定过合成产物的脂水分配系数,但由于 LA 的脂溶性很大,其与 HUP 相连后,所得产物脂溶性也相应增大;再有由于产物的体外不稳定性,使测定很难达到准确可行。

3.4 由于合成产物 HUP-LA 的强脂溶性,普通注射用溶液无法将其溶解,我们尝试了用 PEG400 丙二醇等作溶剂,均达不到理想效果。初试用微乳溶解合成药物,能达理想效果。关于合成产物在微乳中的理化性质及其药理学实验数据,有待进一步的研究。

References

- [1] Wang Y E, Yue D X, Tang X C. Anticholinesterase activity of huperzine A [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 1986, 7(2): 110-113.
- [2] Tang X C, Han Y F, Chen X P, et al. Effects of huperzine A on learning and retrieval process of discrimination performance in rats [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 1986, 7(6): 507-511.
- [3] Xiong Z Q, Cheng D H, Tang X C. Effects of huperzine A on nucleus basalis magnocellularis lesion spatial memory deficit [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 1998, 19(2): 128-132.
- [4] Tang X C. Huperzine A (Shuangyiping): a promising drug for Alzheimer's disease [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 1996, 17(6): 481-484.
- [5] Avellini L, Ternacina L, Gaiti A. Linoleic acid passage through the blood-brain barrier and a possible effect of age [J]. *Neurochem Res*, 1994, 9(2): 129-133.
- [6] Fernstrom J D. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on neuronal function [J]. *Lipids*, 1999, 34(2): 161-169.
- [7] Keiichi N, Kozo A, Mikio A, et al. An efficient method for 3(C)-acylation of tetrone acids [J]. *Chem Pharm Bull*, 1986, 34(12): 5188-5190.
- [8] Jiang Y, Cheng S F, Cao Q S. HPLC determination of huperzine A capsules [J]. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 1998, 18(11): 499-500.
- [9] Zhang Z R, Luo W Z, Nagai T. Hydrolysis kinetics and photolysis kinetics of N_1 -retinoyl-5-fluorouracil [J]. *STP Pharma Sci*, 2001, 11(3): 243-246.