

新型肾靶向脂质体配体葡萄糖-胆固醇偶联物的合成^Δ

李 勋*, 屈博毅, 海 俐, 吴 勇[#](四川大学华西药学院, 成都 610041)

中图分类号 R94;R914.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)25-2316-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.25.05

摘要 目的:合成一种新型的肾靶向脂质体配体葡萄糖-胆固醇偶联物。方法:以胆固醇为原料,将其与对甲苯磺酰氯作用后,以丁二醇取代甲苯磺酰氧基,再经甲磺酰氯磺酰化制得化合物4-(5-胆甾烯-3-氧基)-1-甲磺酰氧基丁烷,再与1,2,3,4-四-O-乙酰基-1-硫基-吡喃葡萄糖在碘化钾作用下偶合,经甲酸钠脱保护得到目标化合物。经红外光谱(IR)、核磁共振氢谱(¹H-NMR)、质谱(MS)确证其化学结构。结果:目标化合物经确证为葡萄糖-胆固醇偶联物,总收率为63.45%,纯度为98%。结论:该方法合成目标化合物路线简单,收率较高。

关键词 肾靶向脂质体配体;胆固醇;葡萄糖;合成;葡萄糖-胆固醇偶联物

Synthesis of Glucosyl Cholesterol Conjugation for Novel Kidney Targeting Liposome Ligand

LI Xun, QU Bo-yi, HAI Li, WU Yong (West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To synthesis a glucosyl cholesterol conjugation for novel kidney targeting liposome ligand. METHODS: Cholesterol as raw material and toluene sulfochloride were coupled, substituted with butanediol and then sulfonated to furnish 4-(5-cholestene-3-oxyl)-1-methylsulfonyl-oxyl butane. The coupling reaction of 4-(5-cholestene-3-oxyl)-1-methylsulfonyl-oxyl butane and 1,2,3,4-tetra-O-acetyl-1-sulf-hydril glucopyranose with potassium iodide afforded compound, which was released deprotection by sodium methoxide to obtain the target compound. The chemical structure of compound was confirmed by IR, ¹H-NMR and MS. RESULTS: The target compound was glucosyl cholesterol conjugation with a yield rate of 63.45% and a purity of 98%. CONCLUSIONS: The target compound is synthesized through a facial way with high yield.

KEY WORDS Kidney targeting liposome ligand; Cholesterol; Glucose; Synthesis; Glucosyl cholesterol conjugation

肾脏是维持机体内环境相对稳定的重要器官之一,如果肾功能发生障碍,会引起新陈代谢紊乱,严重时将危及生命。由于治疗肾脏疾病需长期用药,且所用药物存在不同程度的肾外效应,靶向性不强,因此,药物的肾靶向研究很有必要,用

以增加药物的安全性和有效性^[1]。近年来研究^[2-4]证明,肾小管细胞基底膜和上部存在糖分子介导的主动转运过程,尤其是巯基化葡萄糖化合物,与肾膜的亲和性较其他器官的亲和性高,是肾靶向的合适载体。以巯基葡萄糖为载体制备的前体

3 讨论

GY3是非噻唑烷二酮类胰岛素增敏剂中效果较为突出的一种新化合物,是吡嗪美辛(消炎痛)的衍生物。笔者对其溶解性作了考察,结果显示GY3在甲醇、乙醇及醚类溶剂中溶解良好,故配制GY3标准液时使用甲醇为溶剂,且在实验过程中尽量避光、冷藏。

笔者就血浆样品的预处理方法分别考察了蛋白沉淀法(以甲醇为蛋白沉淀剂)和萃取法(以甲基叔丁基醚为萃取溶剂)的提取回收率。实验结果显示,萃取法提取回收率明显高于蛋白沉淀法,且操作简便、快速,故本实验采用萃取法。

在研究其定量分析方法时,笔者参考了文献报道的血浆中吡嗪美辛的测定方法^[6-10],色谱条件流动相选择甲醇-0.1%磷酸(76:24),以吡嗪美辛为内标,出峰时间和分离度均较好。

参考文献

- [1] 刘星,王亚楼. II型糖尿病治疗药物的现状和开发动态[J]. 药学实践杂志, 2004, 22(1): 1.
- [2] 史可吟,刘长义. 糖尿病新靶点药物的研发进展[J]. 中国

- 新药杂志, 2008, 17(12): 994.
- [3] 王智峰,朱峰,李秋梅. 我国2型糖尿病的发病现状、原因及防治探讨[J]. 亚太传统医药, 2010, 9(6): 151.
- [4] 陈秋,夏永鹏,邱宗荫. 胰岛素增敏剂的研究进展[J]. 国外医学药学分册, 2005, 32(1): 28.
- [5] Li YY, Wu HS, Tang L, *et al.* The potential insulin sensitizing and glucose lowering effects of a novel indole derivative in vitro and in vivo[J]. *Pharmacol Res*, 2007, 56(4): 335.
- [6] 汤磊,李煜,王建塔. 2-甲基-1-(4-氯苯甲酰基)-5-苄氧基-1H-吡啶-3-乙酸的合成[J]. 化学试剂, 2008, 30(5): 351.
- [7] Si M, Yan Y, Tang L, *et al.* A novel indole derivative compound GY3 improves glucose and lipid metabolism via activation of AMP-activated protein kinase pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 698(1/3): 480.
- [8] 庞家莲,谈恒山. 高效液相色谱法同时测定人血浆中阿西美辛及其代谢物吡嗪美辛的浓度[J]. 中国医院药学杂志, 2004, 24(4): 246.
- [9] 董薇,肇丽梅,张彩霞,等. 荷瘤与正常小鼠血浆及瘤体中吡嗪美辛药动学研究[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(1): 48.
- [10] 胡玉钦,刘会臣,马锐,等. 高效液相色谱法测定人血清中阿西美辛和吡嗪美辛[J]. 色谱, 1999, 17(6): 586.

(收稿日期:2012-12-06 修回日期:2013-03-10)

Δ 基金项目:国家自然科学基金项目(No.81072532)

* 硕士研究生。研究方向:靶向药物和手性药物。电话:028-85503235。E-mail:245082567@qq.com

通信作者:教授,博士。研究方向:靶向药物和手性药物。电话:028-85503666。E-mail:tgxx903@163.com

药物,虽然显示了一定的肾靶向性^[5],但这种前药是药物通过化学键与载体连接的,在体内易被降解,且连接的药物可干扰载体巯基葡萄糖对靶标的识别,从而影响肾靶向性,因此此类前药的肾靶向性还不够理想。研究^[6]表明,虽脂质体包封药物具有一定的肾靶向性,但由于脂质体对网状内皮细胞丰富的肝、脾和骨髓等也有靶向性,其选择性并不理想,即肾靶向性差,解决的方法之一是对脂质体进行修饰。基于以上分析,结合本实验室前期关于葡萄糖介导的脑靶向脂质体配体的研究成果^[7-8],笔者设计并合成了一种新型的肾靶向脂质体配体葡萄糖-胆固醇偶联物(L),其可将脂质体葡萄糖化。在这一偶联物结构中,巯基葡萄糖通过丁二醇与脂溶性胆固醇相接,一方面,其脂溶性的胆甾部分嵌入脂质体双分子层中;另一方面,水溶性的葡萄糖残基暴露于脂质体表面,从而使修饰后的脂质体更加稳定,同时可以识别靶标,进而具有肾靶向性,因此可以解决脂质体肾靶向性不理想的难题。

1 材料

Perkin-Elmer 983 型红外光谱(IR)仪测定(美国 Perkin-Elmer 公司); Varian INOVA 400 型核磁共振(NMR)仪[美国 Varian 公司,以四甲基硅烷(TMS)为内标]; Agilent 1946 BE51 质谱(MS)仪(美国 Agilent 公司)。

乙酰巯基葡萄糖(本院实验室自制);胆固醇(上海生物生命科学技术有限公司,纯度:≥95%);葡萄糖(山东西王药业有限公司,纯度:≥99%);1,4-丁二醇(江苏海企国际有限公司,纯度:≥99%);其余试剂均为市售分析纯。

2 方法

2.1 合成路线

所有反应都在氩气保护下进行。以胆固醇为原料,将其与对甲苯磺酰氯(TsCl)作用得到对甲苯磺酸酯(化合物1);以丁二醇取代化合物1中的甲苯磺酰氧基得到4-(5-胆甾烯-3-氧基)-1-丁醇(化合物2);化合物2再经甲磺酰氯磺酰化制得4-(5-胆甾烯-3-氧基)-1-甲磺酰氧基丁烷(化合物3);在*N,N*-二异丙基乙基胺(DIPEA)和碘化钾(KI)的作用下将化合物3与1,2,3,4-四-*O*-乙酰基-1-巯基-吡喃葡萄糖(化合物4)^[6]偶合得到关键中间体4-(5-胆甾烯-3-氧基)-1-(2',3',4',6'-四-*O*-乙酰基-1-硫代-β-D-吡喃葡萄糖基)-丁烷(化合物5);随后化合物5经甲醇钠溶液脱保护后得到目标化合物L。合成路线详见图1。

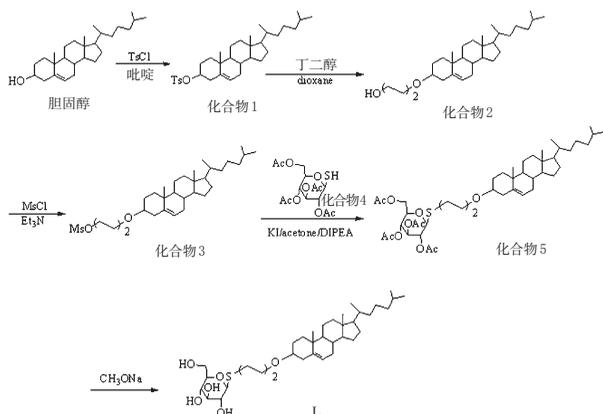


图1 葡萄糖-胆固醇偶联物的合成路线

Fig 1 Synthesis route of Glucosyl cholesterol conjugation

2.2 验证方法

合成的目标化合物经IR、核磁共振氢谱(¹H-NMR)、MS 验证其化学结构。

2.3 合成与验证

2.3.1 化合物1的合成。以胆固醇为原料,按文献^[9]方法,合成白色固体(化合物1),收率为85%,熔点为129~131℃(文献^[9]中收率为87%,熔点:130~132℃)。

2.3.2 化合物2的合成。将化合物1(4.8 g, 8.9 mmol)和丁二醇(4.0 g, 44 mmol)在1,6-二氧六环(Dioxane)中回流8 h,反应完全后旋蒸除去溶剂,用50 ml 二氯甲烷和40 ml 水萃取,二氯甲烷层用无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩,残余物用硅胶快速柱层析,得无色油状化合物2(2.1 g, 收率为67%)。IR: 3 390、2 928、1 450、1 375、1 096 cm⁻¹。¹H-NMR(400 MHz CDCl₃): δ5.35[m, 1H, 胆甾(chol) H-6], 3.64(t, 2H, CH₂O-1), 3.51(t, 2H, CH₂O-4), 3.18(m, 1H, chol H-3), 2.40~0.66[其余的胆甾质子和CH₂-2, 3, 其中0.99(s, 3H, CH₃-19), 0.92(d, 3H, CH₃-21), 0.87(d, 6H, CH₃-26 and CH₃-27), 0.67(s, 3H, CH₃-18)]。MS(*m/z*): 459.3[M+H]⁺。

2.3.3 化合物3的合成。冰浴下,向化合物2(1.7 g, 3.7 mmol)的四氢呋喃(10 ml)和三乙胺(Et₃N, 1 ml)的溶液中,滴加甲磺酰氯(MsCl)(0.43 ml, 5.5 mmol),室温搅拌过夜后,减压浓缩得油状物,随后快速硅胶柱层析纯化,得无色油状化合物3(2.4 g, 收率为87%)。IR: 2 928、1 462、1 350、1 166、1 109 cm⁻¹。¹H-NMR(400 MHz CDCl₃): δ5.34(m, 1H, chol H-6), 3.80(t, 2H, CH₂O-1), 3.50(t, 2H, CH₂O-4), 3.12(m, 1H, chol H-3), 3.00(s, 3H, S-CH₃), 2.40~0.66[其余的胆甾质子CH₂-2, 3, 其中1.01(s, 3H, CH₃-19), 0.92(d, 3H, CH₃-21), 0.88(d, 6H, CH₃-26, CH₃-27), 0.69(s, 3H, CH₃-18)]。MS(*m/z*): 575.5[M+K]⁺。

2.3.4 化合物5的合成。将化合物3(107 mg, 0.2 mmol), KI(332 mg, 2 mmol), 化合物4(145 mg, 0.4 mmol)混合溶于5 ml 丙酮(Acetone)中,加入催化量的DIPEA,室温搅拌36 h后,减压浓缩,残余物经快速硅胶柱层析纯化,得无色油状化合物5(118 mg, 收率为85%)。IR: 2 936、1 748、1 226、1 040 cm⁻¹。¹H-NMR(400 MHz CDCl₃): δ5.35(m, 1H, chol H-6), 5.22(t, 1H, H-3'), 5.09(t, 1H, H-2'), 5.03(t, 1H, H-5'), 4.49(d, 1H, H-1'), 4.27~4.12(m, 2H, AcOCH₂), 3.74(m, 1H, H-4'), 3.45(t, 2H, CH₂O), 3.12(m, 1H, chol H-3), 2.74~2.61(m, 2H, SCH-a, SCH-b), 2.08, 2.07, 2.03, 2.01(4×s, 12H, 4×CH₃ acetyl), 2.37~0.68[其余的胆甾质子和CH₂-2, 3, 其中1.02(s, 3H, CH₃-19), 0.93(d, 3H, CH₃-21), 0.89(d, 6H, CH₃-26, CH₃-27), 0.68(s, 3H, CH₃-18)]。MS(*m/z*): 843.7[M+K]⁺。

2.3.5 L的合成。将化合物5(113 mg, 0.14 mmol)溶于二氯甲烷与甲醇(3:7, V/V)中,加入0.1 mol/L的甲醇钠(CH₃ONa)-甲醇溶液0.8 ml,室温搅拌3 h后,用稀盐酸调至中性,二氯甲烷萃取,无水硫酸钠干燥,减压浓缩后经硅胶柱层析纯化,得到无色油状物L(80 mg, 收率为95%)。IR: 3 384、2 934、1 376、1 107 cm⁻¹。¹H-NMR(400 MHz CDCl₃): δ5.33(m, 1H, chol H-6), 4.39(d, 1H, H-1'), 3.92~3.35[8H, 葡萄糖质子(glc. protons)和CH₂O-4], 3.15(m, 1H, chol H-3), 2.71~2.62(m, 2H, SCH-a, SCH-b), 2.36~0.67[其余的胆甾质子和CH₂-2, 3, 其中1.03(s, 3H, CH₃-19), 0.92(d, 3H, CH₃-21), 0.87(d, 6H, CH₃-26 and CH₃-27), 0.66(s, 3H, CH₃-18)]。MS(*m/z*): 675.5[M+K]⁺。

3 讨论

丁二醇的取代和葡萄糖偶合是合成中的一个难点。在合成化合物2时,丁二醇的投料量过低会增加取代的副产物,从而影响反应的收率。试验发现当化合物1与丁二醇的投料物质的量之比为1:5时,收率在50%以上。

在合成化合物5过程中,先将化合物3制成碘化物,再与乙酰巯基葡萄糖偶合,收率低且步骤烦琐。因此,笔者考虑将

左卡尼汀对表柔比星诱导新生乳鼠心肌细胞损伤的保护作用研究^Δ

李雅静*,高宁,王晨[#](天津医科大学附属肿瘤医院/天津市“肿瘤防治”重点实验室,天津 300060)

中图分类号 R965;R979.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)25-2318-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.25.06

摘要 目的:研究左卡尼汀对表柔比星(EPI)诱导新生乳鼠心肌细胞损伤的保护作用。方法:将培养5 d的新生乳鼠心肌细胞随机分为正常对照组,模型(1.75 μg/ml EPI)组,低、中、高质量浓度(10、20、30 μg/ml)左卡尼汀组,低、中、高质量浓度(10、20、30 μg/ml)左卡尼汀+1.75 μg/ml EPI混合组,每组6个平行孔,加药后继续培养24 h。测定各组细胞的存活率、乳酸脱氢酶(LDH)释放量、丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性。结果:与正常对照组比较,左卡尼汀组心肌细胞的存活率明显增加,且与质量浓度呈正相关;模型组细胞存活率和SOD活性明显降低,LDH释放量和MDA含量明显增加($P<0.05$)。与模型组比较,低、中、高剂量混合组细胞存活率和SOD活性明显增加,LDH释放量和MDA含量明显降低($P<0.05$),且与质量浓度呈正相关。结论:左卡尼汀体外具有抗氧化损伤的能力,可提高自由基清除酶活性,减轻表柔比星所诱导的心肌细胞损伤。

关键词 左卡尼汀;表柔比星;心肌细胞;乳鼠;乳酸脱氢酶;丙二醛;超氧化物歧化酶

Protective Effect of Levocarnitine on Epirubicin-induced Myocardial Cell Injury in Neonatal Rats

LI Ya-jing, GAO Ning, WANG Chen (The Affiliated Cancer Hospital of Tianjin Medical University/Tianjin Key Laboratory of “Tumor Prevention and Therapeutics”, Tianjin 300060, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the protective effect of levocarnitine on epirubicin-induced myocardial cell injury in neonatal rats. METHODS: Myocardial cell of 5 d neonatal rats were randomized into normal control group, model group (1.75 μg/ml EPI), levocarnitine low-dose, medium-dose and high-dose groups (10, 20, 30 μg/ml), and low-dose, medium-dose, high-dose mixture groups (10, 20, 30 μg/ml levocarnitine+1.75 μg/ml EPI). Each parallel bore was 6 bores, and cultured for 24 h after application of levocarnitine. Cell viability, release amount of LDH, MDA content and SOD activity were determined in each group. RESULTS: Compared with normal control group, levocarnitine can significantly improve the survival rate of myocardial cells, which was positively related to drug dosage; the survival rate of myocardial cells was decreased significantly in model group, while release amount of LDH and MDA content were increased significantly ($P<0.05$). Compared with model group, the survival rate of myocardial cells and SOD activity were increased significantly in mixture groups, while release amount of LDH and MDA content were decreased significantly ($P<0.05$), which was positively related to drug dosage. CONCLUSIONS: Levocarnitine has the ability of antioxidant, it can improve the activity of free radical scavenging enzymes and relieve myocardial cell injury induced by epirubicin.

KEY WORDS Levocarnitine; Epirubicin; Myocardial cell; Neonatal rats; Lactate dehydrogenase; MDA; SOD

两步反应一起进行,并加催化量的KI,但反应时间较长,且随着时间的延长副产物增多,分离较困难。当加大KI用量为化合物3的10倍时,反应时间明显缩短,收率显著提高到70%以上。

参考文献

- [1] Meifer DKF, Jansen RW, Molema G. Drug targeting systems for antiviral agents: options and limitations[J]. *Antiviral Res*, 1992, 18(3):215.
- [2] 郑强,张志荣.肾靶向给药研究进展[J]. *药学学报*, 2005, 40(3):199.
- [3] Suzuki K, Susaki H, Okuno S, et al. Renal drug targeting using a vector “alkylglycoside”[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999, 288(1):57.
- [4] Shirota K, Kato Y, Suzuki K, et al. Characterization of novel kidney-specific delivery system using an alkylglucoside vector[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 299(2):459.

- [5] Suzuki K, Susaki H, Okuno S, et al. Specific renal delivery of sugar-modified low-molecular-weight peptides[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999, 288(2):888.
- [6] Singh M, Ghose T, Faulkner G, et al. Targeting of methotrexate-containing liposomes with a monoclonal antibody against human renal cancer[J]. *Cancer Res*, 1989, 49(14):3976.
- [7] Fan L, Wei F, Xian KL, et al. Design, synthesis and preliminary bio-evaluation of glucose-cholesterol derivatives as ligands for brain targeting liposomes[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2011, 22(7):831.
- [8] Fan W, Yan CY, Qian S, et al. Design, synthesis and *in vivo* evaluation of sulfhydryl-D-glucose cholesterols as ligands for brain targeting liposomes[J]. *Lett Drug Des Discovery*, 2010, 4(9):281.
- [9] Cha SW, Jin J, Kim DC, et al. Combined type liquid crystalline poly(oxy-1,4-phenyleneoxyterephthaloyl)s bearing cholesterol pendants attached through polymethylene spacers[J]. *Macromolecules*, 2001, 34(15):5342.

(收稿日期:2012-09-03 修回日期:2012-11-28)

Δ 基金项目:2010年天津市卫生局科技基金项目(No.2010KZ75)

* 主管药师。研究方向:医院药学。电话:022-23340123-5105。

E-mail:liyajing919@163.com

通信作者:主任药师。研究方向:医院药学。电话:022-23340123-5105。E-mail:jiyei789@126.com