

20(S)-原人参二醇氨基酸衍生物的合成

刘继华¹, 刘金平¹, 卢丹¹, 李平亚^{1*}, 王莹² (1. 吉林大学药学院, 长春 130021; 2. 中国生物技术发展中心, 北京 100036)

摘要: 目的 对 20(S)-原人参二醇进行结构修饰, 合成其氨基酸衍生物, 从而提高药物的水溶性。方法 以二环己基碳化二亚胺为催化剂、吡啶为溶剂进行反应, 合成 20(S)-原人参二醇的氨基酸衍生物。结果 得到 20(S)-原人参二醇的氨基酸衍生物 14 个, 其结构通过 ¹H-NMR、¹³C-NMR 图谱进行确证, 同时总结了 20(S)-原人参二醇的氨基酸衍生物的合成规律。结论 本方法合成工艺简单易行, 操作简便, 适合工业化生产, 所得产物的水溶性较合成前有所提高, 有利于提高生物利用度。

关键词: 20(S)-原人参二醇; 氨基酸衍生物; 结构修饰

中图分类号: R916.696

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2010)10-0916-05

The Synthesis of 20(S)-Protopanaxadiol Amino Acid Derivatives

LIU Jihua¹, LIU Jinping¹, LU Dan¹, LI Pingya^{1*}, WANG Ying² (1. College of Pharmacy, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. China National Center for Biotechnology Development, Beijing 100036, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To improve the water solubility of 20(S)-protopanaxadiol (PPD) by synthesized with a few kinds of amino acids. **METHODS** In the synthetic reaction, dicyclohexyl carbodiimide was used as the accelerant and pyridine was the solvent. **RESULTS** Fourteen derivatives had been synthesized and their chemical structures were identified by ¹H-NMR and ¹³C-NMR. Then the rule of this reaction was summarized. **CONCLUSION** The method is simple, effective, and reproducible, which is benefit to improve the bioavailability of the drug, and the derivatives have better water solubility than PPD.

KEY WORDS: 20(S)-protopanaxadiol; amino acid derivatives; chemical structure modification

对中药的有效成分进行结构修饰, 可以改善药物的理化性质, 有利于制剂学的研究, 提高生物利用度, 获得新化合物, 从而开发出创新药物。组合化学是近 20 年来新兴起的一门学科, 被广泛用于材料科学、新药筛选等领域^[1-3], 对中药的有效成分用组合化学的方法进行结构修饰, 可以快速获得大批的结构修饰物, 提高了新药研发的速度。20(S)-原人参二醇(PPD)是从人参中分离得到的皂苷类成分, 近年来研究表明, PPD 具有抗肿瘤活性, 能够促进肿瘤细胞凋亡, 进而抑制肿瘤生长^[4-6]。PPD 属于脂溶性皂苷元, 几乎不溶于水, 很难制成注射剂进行应用, 使它的临床应用受到限制。本试验利用组合化学的方法对 PPD 进行结构修饰, 选用多个不同性质的氨基酸分别与 PPD 进行合成, 建立了 PPD 的氨基酸衍生物的合成方法, 力求制备出水溶性较好的 PPD 的衍生物, 为 PPD 的临床应用提供先导化合物。

1 仪器与试剂

AV-600 核磁共振仪(美国 Bruker 公司); RE-52CS 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); Waters 515 高效液相色谱仪(半制备型, 美国 Waters 公司); FA1104N 型分析天平(上海民桥精密科学仪器有限公司); HJ-6 型多头磁力加热搅拌器(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司)。

薄层层析、柱层析用硅胶 G、H(青岛海洋化工厂); 高效薄层层析板(北京军事医学科学院); 二环己基碳化二亚胺(DCC)、Boc-氨基酸均购自吉尔生化公司; 20(S)-原人参二醇(PPD), 自制, 纯度>98.5%; 甲醇(色谱纯), 二次蒸馏水, 其余试剂均为分析纯; 各氨基酸[吉尔生化(上海)有限公司]。

2 氨基酸衍生物的合成

2.1 合成方法的建立

2.1.1 氨基酸的选择 本试验选用多种氨基酸分

基金项目: 吉林省科技发展重大项目(20096039)

作者简介: 刘继华, 女, 博士, 讲师 Tel: 13654399568
E-mail: lipy@jlu.edu.cn

E-mail: jljh@sina.com

*通信作者: 李平亚, 男, 教授, 博导 Tel: 13804350648

别与 PPD 进行反应。选用的氨基酸可以分为中性氨基酸、碱性氨基酸、酸性氨基酸和含有杂原子的氨基酸，中性氨基酸包括甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和脯氨酸，碱性氨基酸包括精氨酸、赖氨酸，酸性氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸，含有杂原子的氨基酸包括组氨酸、蛋氨酸和半胱氨酸。为了避免反应中氨基酸自缩合的发生，选用叔丁氧羰基作为保护基的氨基酸进行反应。

2.1.2 催化剂的选择 为了加快反应合成速度及减少反应的副产物，催化剂是常用的方法之一^[7-10]，由氨基酸经过脱水反应合成小分子肽类化合物时常用二环己基碳化二亚胺(DCC)和二甲胺基吡啶(DMAP)作催化剂进行反应，反应低温下即可进行，DCC 反应后转化为二环己基脲(DCU)，从溶液中沉淀出来可以过滤除去，回收的 DCU 经过化学处理脱去水后，可以转化为 DCC 进行循环使用。在实验过程中，先后比较了单独用 DCC 或 DMAP 作催化剂，以及 DCC 和 DMAP 联合使用的情况，结果表明单独使用 DCC 作催化剂较合适。

2.1.3 溶剂系统的选择 PPD在吡啶、四氢呋喃、丙酮和乙酸乙酯等溶剂中溶解度均较好，由于吡啶对皂苷类化合物的溶解性较大，并且对该酯化反应有一定的催化作用，所以选择吡啶为反应进行的溶剂系统。

2.1.4 合成方法 根据参考文献[7-10]及结合实验结果，确定合成方法：将 PPD 与 Boc-氨基酸按

1：3 的比例混合，溶于吡啶中，加入 DCC 适量，于常温下反应 8 h，反应产物于酸性条件下脱掉 Boc 保护基，再经过硅胶柱层析分离即得。

2.2 氨基酸衍生物 1~10 的合成

称取20(S)-原人参二醇1 mmol和Boc-氨基酸3 mmol置于100 mL具塞锥形瓶中，加入吡啶20 mL，振摇使溶解，于冰水浴中加入DCC 2.06 g(10 mmol)，0℃反应30 min后，置于室温继续反应8 h，过滤，滤液减压回收溶剂至干，干法上硅胶柱(2.0 cm×20 cm)层析，以氯仿-甲醇-乙酸乙酯-水(2：2：4：1)洗脱，分离即得。产物的结构经¹H-NMR和¹³C-NMR图谱确证，结构式见图1，¹³C-NMR图谱数据见表1，各化合物产率见表2。

2.3 氨基酸衍生物 11~14 的合成

称取20(S)-原人参二醇 1 mmol和 Boc-氨基酸 3 mmol置于100 mL具塞锥形瓶中，加入吡啶20 mL，振摇使溶解，于冰水浴中加入DCC 10 mmol，0℃反应30 min后，置于室温继续反应8 h，过滤，滤液减压回收溶剂至干，残渣加入30%三氟乙酸、二氯甲烷溶液20 mL，振摇，反应1.0 h，饱和的NaHCO₃水溶液萃取3次，二氯甲烷层加入无水硫酸钠干燥，而后减压回收溶剂至干，所得样品干法上硅胶柱(2.0 cm×20 cm)层析，以氯仿-甲醇-水(65：35：10)洗脱，分离即得。产物的结构经¹H-NMR和¹³C-NMR图谱确证，结构式见图1，¹³C-NMR图谱数据见表1，各化合物产率见表2。

表 1 PPD 氨基酸衍生物的 ¹³C-NMR 数据(150 MHz, 氘代吡啶)

Tab 1 The ¹³C-NMR Data of PPD amino acid derivatives (150 MHz, C₅D₅N)

碳原子编号	PPD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	39.52	38.41	38.23	38.50	38.29	38.27	38.33	38.24	38.34	38.27	38.31	38.34	38.37	38.37	38.36
2	28.40	27.95	27.58	27.35	28.20	28.25	28.22	28.11	28.37	28.23	28.31	28.68	28.22	28.20	28.20
3	78.13	84.14	81.42	81.70	81.51	78.99	81.92	81.77	81.07	81.98	82.07	82.16	81.01	81.62	78.22
4	39.70	38.72	38.23	38.91	38.81	38.40	38.60	38.60	38.63	38.36	38.64	38.48	38.81	38.67	38.76
5	56.52	56.23	56.02	56.39	56.18	56.12	56.19	56.52	56.26	56.06	56.17	55.98	56.17	56.16	56.18
6	18.92	18.40	18.40	18.75	18.57	18.45	18.53	18.49	18.54	18.43	18.53	18.39	18.54	18.54	18.55
7	35.37	35.19	34.68	35.34	35.14	35.15	35.12	35.08	35.13	34.75	35.13	35.04	35.31	35.16	35.06
8	40.19	40.17	39.89	40.32	40.00	39.99	40.12	40.11	40.14	39.97	40.12	40.28	40.39	40.18	40.18
9	50.66	50.42	50.04	50.57	50.36	50.33	50.34	50.33	50.34	50.20	50.35	50.74	50.64	50.70	50.35
10	37.52	37.31	37.07	37.46	37.67	37.66	37.88	37.24	37.28	37.17	37.24	37.32	37.38	37.29	37.27
11	32.25	32.21	28.99	32.28	32.76	31.68	32.20	32.17	32.21	34.05	32.18	32.46	32.36	32.22	32.03
12	71.16	71.05	75.25	71.18	71.05	75.83	71.04	71.01	71.06	76.02	71.02	75.46	69.64	71.04	80.06
13	48.75	48.70	45.83	48.81	48.71	45.91	48.68	48.69	48.71	45.85	48.67	44.82	51.31	48.77	49.34
14	51.86	51.86	52.53	52.00	51.84	52.74	51.91	51.82	51.84	52.63	51.82	50.58	51.04	51.86	51.12
15	31.35	31.53	31.22	31.66	31.50	30.11	31.48	31.46	31.50	31.49	31.48	30.13	32.78	31.57	32.85
16	26.99	27.00	25.96	27.14	26.75	27.22	26.98	26.95	26.99	27.08	26.97	23.89	24.10	27.01	26.75
17	54.95	54.93	53.66	55.02	54.96	54.93	54.95	54.91	54.96	54.99	54.91	50.58	51.08	54.86	52.58
18	16.03	16.00	15.74	16.16	15.77	15.80	15.94	15.92	15.96	15.80	15.94	15.80	15.95	15.97	15.81

续表1

碳原子编号	PPD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
19	16.44	16.44	16.12	16.63	16.46	16.34	16.39	16.38	16.40	16.21	16.36	16.37	16.48	16.41	16.51
20	73.08	73.13	73.51	73.33	73.81	73.80	73.09	73.12	73.11	73.70	73.10	138.05	139.68	73.51	74.01
21	27.23	27.25	26.97	27.35	27.17	27.79	27.25	27.21	27.26	27.74	27.23	12.71	13.21	19.29	27.35
22	36.03	36.02	36.12	36.71	36.03	37.19	36.02	35.97	36.03	36.55	35.99	125.45	125.76	36.68	36.76
23	23.14	23.16	23.21	23.28	24.11	23.36	23.16	23.13	23.17	23.28	23.13	23.67	23.83	24.04	16.85
24	126.47	126.49	126.45	126.59	126.48	126.54	126.48	126.42	126.48	126.50	126.45	44.82	44.42	45.89	34.40
25	130.87	130.90	130.89	131.05	130.96	131.01	130.93	130.53	130.94	130.98	130.89	69.54	72.61	69.82	70.50
26	25.95	26.00	23.94	26.20	25.98	26.05	25.99	25.91	25.98	25.99	25.96	29.89	30.13	30.35	25.43
27	17.19	17.22	17.54	17.38	17.18	17.77	17.17	17.15	17.19	17.82	17.83	29.19	29.91	30.06	24.11
28	28.82	28.26	28.06	28.37	28.20	28.25	28.22	28.63	28.88	28.92	28.66	28.72	28.90	28.20	28.27
29	16.59	16.93	16.75	17.03	16.92	16.90	16.69	16.78	16.93	16.84	16.90	16.71	16.88	16.87	16.66
30	17.82	17.89	17.88	18.06	17.85	18.01	17.85	17.82	17.85	18.00	17.83	17.19	17.19	17.20	18.06
3-Amino Acid-		Boc-Ala	Boc-Gly	Boc-Gly	Boc-Arg		Boc-As	Acetyl-	Acetyl-	Boc-Me	Boc-Cys	Ala	Ala	Ala	
1'		173.54	170.89	171.23	173.10		173.77	178.10	172.91	171.47	171.87	176.35	176.47	175.45	
2'		50.65	43.46	43.59	49.65		37.24	56.06	59.49	53.08	54.98	49.92	50.76	50.41	
3'		152.96	157.19	157.27	30.09		23.97	23.89	25.23	34.31	34.02	20.95	21.21	20.24	
4'		78.86	78.84	78.99	25.48		172.40	29.94	22.31	36.81	36.46				
5'		28.68	28.59	28.08	38.67		156.70	176.01	47.92	21.11	136.95				
6'		18.40			156.92		79.14	173.42	168.90	156.67	129.73				
7'					131.64		28.65	19.35	24.08	79.17	129.60				
8'					126.82					28.62	156.71				
9'					129.66						79.18				
10'					21.30										
11'					158.38										
12'					78.99										
13'					28.67										
12-Amino Acid-		Boc-Ala	Boc-Gly	Boc-Gly		Boc-Arg				Boc-		Ala			Ala
1''		177.54	171.10	171.81		173.07				53.64		171.66			176.75
2''		53.22	44.02	46.48		54.82				36.48		49.74			52.28
3''		24.11	157.19	157.27		28.66				37.44		16.93			21.46
4''		157.22	28.63	28.86		24.01				21.11					
5''		81.36				34.80				156.73					
6''		28.75				156.91				79.17					
7''						131.43				28.62					
8''						126.82									
9''						129.66									
10''						21.29									
11''						158.37									
12''						78.99									
13''						28.66									
20-Amino Acid-				Boc-Gly											
1				173.57											
2				47.89											
3				157.31											
4				81.69											
5				28.88											

表2 各化合物的产率

Tab 2 The production rates of compounds

化合物	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
产率/%	87	82	8	79	12	73	47	52	57	41	35	32	37	32

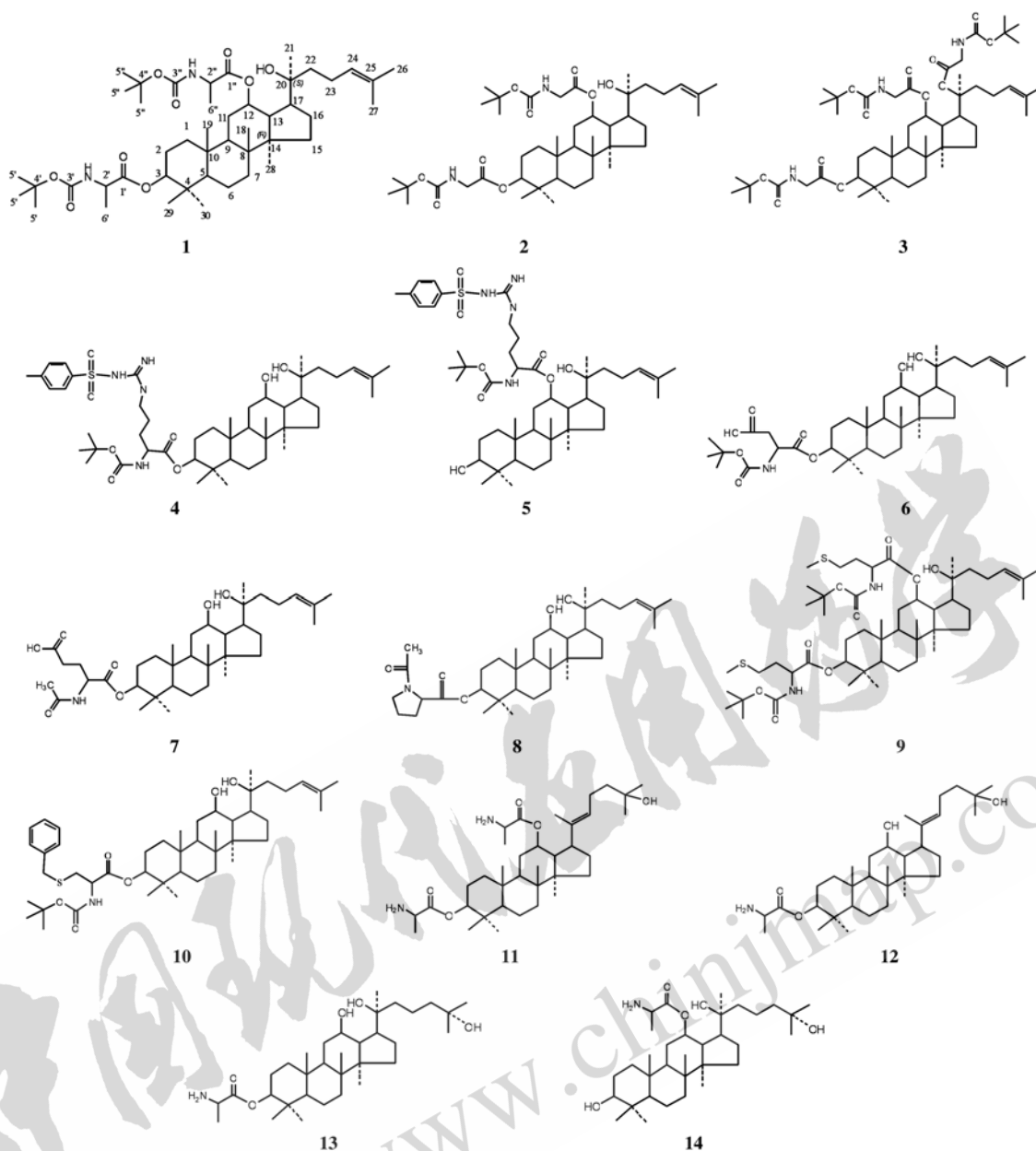


图1 PPD氨基酸衍生物的结构式

Fig 1 Chemical structures of 20(S)-protopanaxadiol amino acid derivatives

3 结论

本试验选用了多种不同的氨基酸进行反应,实验结果表明,中性和碱性氨基酸比较容易与PPD发生反应,反应产物比较容易分离纯化;酸性氨基酸与PPD反应之后容易产生异构化的产物,在反应的时候需要严格控制氨基酸的加入量,同时因反应产物呈弱酸性,分离纯化步骤繁琐。

在20(S)-原人参二醇分子结构中,在C-3、C-12和C-20位存在3个羟基,由反应结果可知,C-20位羟基由于空间位阻较大,较难与氨基酸反应,而C-3和C-12位易与氨基酸反应,二者反应速

度较接近,产物比例相当。另外分子量较小的氨基酸(甘氨酸、丙氨酸、蛋氨酸),可同时连接在C-3和C-12位上,如衍生物1, 11。对于分子量较大的氨基酸,通常仅连接于C-3位,如衍生物7, 10等。

PPD与氨基酸的合成产物中,氨基酸衍生物11, 12, 13和14的水溶性与PPD相比明显提高,有利于提高其生物利用度。

在合成氨基酸衍生物11~14时,脱掉Boc-保护基时容易导致双键的加成,其作用机制仍有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] ZHENG G P, LIU W. Combinatorial chemistry and its application [J]. J Hubei Univ Edu(湖北第二师范学院学报), 2009, 26(2): 7-9.
- [2] ZHOU N. An introduction to combinatorial chemistry [J]. J Shanghai Chem Ind(上海化工), 1999, 24(20): 4-5.
- [3] ZHOU C H, YANG A N, LI M, et al. Combinatorial Synthesis of 1, 3, 5-triazine derivatives and evaluation on their antimicrobial activity [J]. World Notes Antibiot(国外医药抗生素分册), 2009, 30(1): 1-4.
- [4] QIN J J, LI Y J, FU J, et al. The effect of 20(S)-protoginsenoside inhibiting growth of liver cancer and making cells apoptosis [J]. Chin J Gerontol(中国老年学杂志), 2006, 9(26): 1257-1258.
- [5] ZHANG R, XU H L, YU X F, et al. Enhancing effect of chemotherapy and reducing toxicity of 20(S)-protopanaxadiol on tumor-bearing nude mice [J]. J Jilin Univ: Med Ed(吉林大学学报: 医学版), 2009, 35(2): 195-200.
- [6] LENG J Y, FU J, WANG J P. Influences of protopanaxdiol to vascular endothelial growth factor and basofibroblast growth factor protein expression of liver [J]. Chin J Clin Hepatol(临床肝胆病杂志), 2008, 24(1): 42-43.
- [7] LIU L Y, CUI F X, ZHAO G Q, et al. Liquid phase synthesis of active peptide [J]. Chem Reagent(化学试剂), 2006, 28(1): 55-56.
- [8] LI M L, XU Y J, JIANG L Q, et al. Synthesis of tripeptide N-o-Ns-Gly-N-Me-D-Phe-L-Pro-OMe [J]. Chem Bull(化学通报), 2006, 69(3): 179-183.
- [9] SHAKIR M, VARKEY S P. A new synthetic route for the preparation of a new series of 14-22 membered tetraoxomacrocyclic tetraamines and their transition metal complexes [J]. Polyhedron, 1995, 14(9): 1117-1127.
- [10] LI Q R, GU C Z, YIN H, et al. Synthesis of menthyl esters of *N*-benzoxycarbonylaminoacid Using DCC/DMAP [J]. Chin J Org Chem(有机化学), 2005, 25(11): 1416-1419.

收稿日期: 2009-11-19