

老年痴呆症药物石杉碱甲类似物研究 VI.

(-)-14-去甲基石杉碱甲的不对称全合成及其乙酰胆碱酯酶抑制活性

何煦昌, 于更立, 白东鲁*

(中国科学院 上海生命科学院, 上海药物研究所, 上海 200031)

摘要: 目的 (-)-14-去甲基石杉碱甲的合成及其抑制乙酰胆碱酯酶活性研究。方法 从 β -酮酯 **3** 与 2-亚甲基-1,3-丙二醇双醋酸酯 **4** 在手性膦配体钯催化下, 对映选择性的形成双环化合物 **5**, 双键移位后得到关键中间体 **6**, 进而复结晶富集后, 得到光学纯 **6**。经 Wittig 反应, 得双键化合物 **7**, 酯基水解后, 得到相应酸 **8**。经改良的 Curtius 重排, 产生氨基甲酸酯 **9**。除去保护后, 得目标化合物 **2**。结果 (-)-14-去甲基石杉碱甲仅是天然(-)-石杉碱甲抑制乙酰胆碱酯酶活性 1/8。结论 由电镜乙酰胆碱酯酶与(-)-石杉碱甲复合物 X 射线衍射结构分析揭示, 14-甲基与酶形成氢键是(-)-石杉碱甲高抑制活性的一个必要基团。

关键词: (-)-石杉碱甲; 不对称合成; 乙酰胆碱酯酶抑制剂; 手性二茂铁膦配体

中图分类号: R914.5 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2003)05 - 0346 - 04

Studies on analogues of huperzine A for treatment of senile dementia VI. Asymmetric total synthesis of 14-nor-huperzine A and its inhibitory activity of acetylcholinesterase

HE Xu-chang, YU Geng-li, BAI Dong-lu*

(Shanghai Institute of Materia Medica, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract: **Aim** To study asymmetric total synthesis of 14-nor-huperzine A **2** and its inhibitory activity on acetylcholinesterase. **Methods** Highly enantioselective synthesis of compound **5** from β -keto-ester **3** and 2-methylene-1,3-propanediol diacetate **4** by palladium-catalyzed bicycloannulation was carried out using new chiral ferrocenylphosphine ligands, such as **10**, **11**, followed by regioselective double-bond migration to produce compound **6**. Optically pure **6** was obtained after enantio-enrichment recrystallization. Then, according to similar procedures of huperzine A synthesis, the target compound 14-nor-huperzine A **2** was prepared. The inhibitory activity was tested with rat erythrocyte membrane acetylcholinesterase. **Results** The inhibitory activity of synthetic (-)-14-nor-huperzine A was 8 fold less potent than that of (-)-huperzine A. **Conclusion** A hydrogen bond between 14-methyl group of (-)-huperzine A and the main-chain oxygen of His 440 is necessary for the highly acetylcholinesterase inhibitory activity of huperzine A.

Key words: huperzine A; asymmetric synthesis; acetylcholinesterase inhibitor; chiral ferrocenylphosphine ligands

(-)-石杉碱甲(huperzine A, **1**)是我国科学工作者从中草药千层塔[*Huperzia serrata* (Thunb.) Trev.]

中提取分离的一种高效、可逆和高选择性的乙酰胆碱酯酶抑制剂^[1]。在国内1996年已被批准为用于治疗早老性痴呆症的五类新药。

由于(-)-石杉碱甲的生物活性及其有限的天然资源,国内外药物化学工作者对它的全合成及类似物和衍生物的合成作了大量的工作,但至今仅有个别类似物,如10位取代的石杉碱甲能达到天然

收稿日期: 2002-06-10.

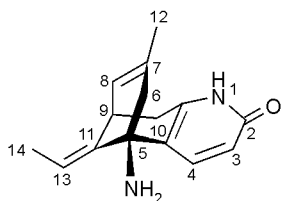
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070865).

* 通讯作者 Tel: 86 - 21 - 64311833 X412,

Fax: 86 - 21 - 64370269,

E-mail: dlbai@mail.shnc.ac.cn

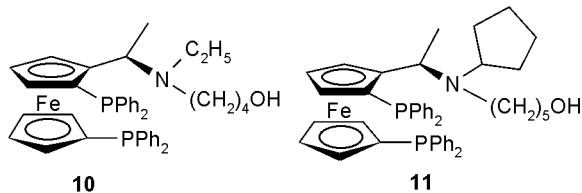
(-)-石杉碱甲的活性,它们需要化学全合成才能达到目标化合物^[2,3]。



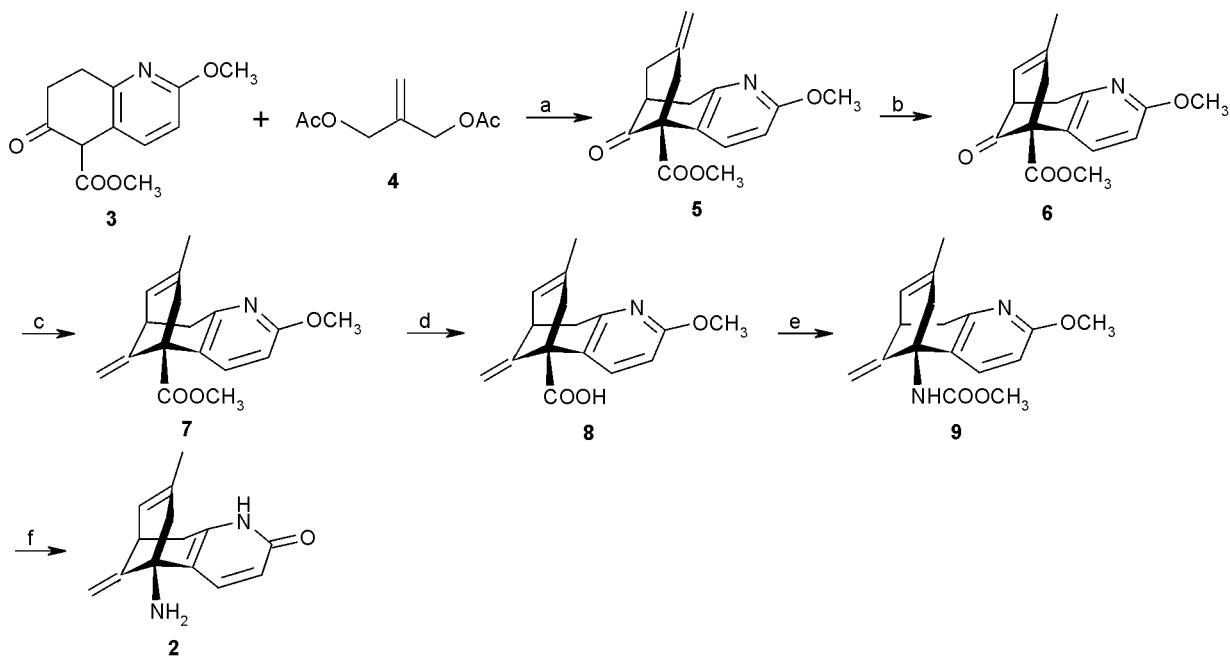
Structure of huperzine A (1)

1997年,Sussman等^[4]报道了用X射线衍射方法研究(-)-石杉碱甲与电鳐乙酰胆碱酯酶复合物的晶体结构,并据此解释了石杉碱甲及其类似物的抑制活性。石杉碱甲14位的甲基通过超共轭效应与酶活性中心His 440的主链氧有一个异常的短氢键,而14-去甲基石杉碱甲和C-13不可能通过氢键与His 440相互作用,因此活性降低。文献报道的14-去甲基石杉碱甲仅是外消旋体^[5],手性药物对映体之间的药理作用通常是不同的^[6],因此,合成14-去甲基石杉碱甲的光学活性形式,以单一异构体进行药理试验,才能得到较准确的结果。

作者已经在不对称合成(-)-石杉碱甲及其衍生物的研究中,合成了光学活性的(-)-1-甲基石杉碱甲衍生物^[7]。用类似方法,从5,6,7,8-四氢-2-甲氧基-6-氧代-5-喹啉羧酸甲酯3(通常它以无手性烯醇式存在)与2-亚甲基-1,3-丙二醇双醋酸酯4,在催化量手性配体钨(0)催化下,对映选择性地形成双环化合物5。作者自行设计合成的手性二茂铁的膦配体,如10和11,使5的对映过量值达到80~90%^[8]。



双键位移后,在正己烷中复结晶,对映体富集使关键中间体(+)-6达到光学纯。由(+)-6经Wittig反应得到双键化合物(+)-7,然后酯基水解后得到相应酸(+)-8。最后经改良的Curtius重排,产生氨基甲酸酯(+)-9,用三甲基碘硅烷去保护后,得到目标化合物(-)-14-去甲基石杉碱甲2(Scheme 1)。



a: $(\eta^3\text{-C}_3\text{H}_5)_2\text{PdCl}$ dimer, (*R,S*)-**11**, tetramethyl-guanidine, toluene, -20 °C (82%); b: TFOH, 1,4-dioxane, 93 °C (90%); recrystallization from *n*-hexane; c: $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CH}_2$, THF, 0 °C-rt (68%); d: 20% NaOH, THF, MeOH, reflux (93%); e: DPPA, Et₃N, CH₂Cl₂, rt; MeOH, reflux (~100%); f: TMSI, CHCl₃, reflux; CH₃OH, reflux (71%)

Scheme 1 Route of synthesis of compound 2

用大鼠红细胞膜制剂测定^[10](-)-14-去甲基石杉碱甲2的乙酰胆碱酯酶抑制活性IC₅₀为475 nmol·L⁻¹,其抑酶活性约为天然(-)-石杉碱甲(IC₅₀

为61.4 nmol·L⁻¹)的1/8。

这证明了乙酰胆碱酯酶与(-)-石杉碱甲复合物的X射线衍射分析的结构生物学的结论,即14

位甲基通过超共轭效应与酶活性中心 His 440 形成氢键是(-)-石杉碱甲高活性作用点之一。

实验部分

熔点用 Buchi 510 和 Fisher-Johns 熔点仪测定, 温度未校正。红外光谱经液膜法或溴化钾压片法用 Nicolet Magna IR 750 型仪记录。核磁共振氢谱和碳谱用 Bruker AMX-400 型和 Gemini-300 型记录。质谱用 Varian MAT-711 型和 MAT-95 型高分辨质谱仪记录。元素分析用意大利 1106 型元素分析仪测定。比旋光由 Perkin-Elmer 241 型自动旋光仪测定。所有反应溶剂均按照常规方法进行纯化。一般反应均在氮气保护下进行。色谱柱用硅胶(200~300目)为青岛海洋化工厂生产。薄层色谱用烟台化工研究所生产的 GF254 高效板。

1 (5*S*, 9*S*)-7-亚甲基-2-甲氧基-5-甲氧羰基-11-酮-5,9-甲撑环辛并吡啶(5)

(η^3 -C₃H₅)PdCl 二聚体 10.2 mg(0.028 mmol) 和 42 mg(0.056 mmol) (*R*, *S*)-11 溶于甲苯 15 mL, 室温下搅拌 1 h, 再加入 1.14 mL(6.9 mmol) 2-亚甲基-1,3-丙二醇二醋酸酯(4), 继续搅拌 0.5 h 后备用; 1.10 g(4.7 mmol) β -酮酯 3 溶于甲苯 60 mL 中, 加入 TMG 1.63 mL(13.0 mmol), 室温搅拌 1 h 后, 冷却至 -50 °C, 慢慢加入上面制备的溶液, 约需 10 min, 加毕后于 -20 °C 反应 48 h, 再升至室温反应 6 h。减压蒸除溶剂, 残余物用乙酸乙酯 100 mL 溶解, 滤除不溶物, 减压蒸除溶剂, 残余物柱色谱(石油醚-乙酸乙酯 4:1), 得无色粘稠液体 1.10 g, 产率 82%。¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ : 6.95(d, 1H, J=8.8 Hz), 6.56(d, 1H, J=8.5 Hz), 4.81(m, 1H), 4.47(m, 1H), 3.87(s, 3H), 3.80(s, 3H), 3.45(dd, 1H, J=18.1, 6.8 Hz), 3.08~3.20(m, 2H), 2.96(m, 1H), 2.75~2.82(m, 1H), 2.55~2.62(m, 2H)。

在手性位移试剂 Eu(hfc)₃ 存在下, ¹H NMR 分析表明其 e.e. 值约为 84%。

2 (+)-(5*S*, 9*R*)-2-甲氧基-5-甲氧羰基-7-甲基-11-酮-5,9-甲撑环辛-7-烯并吡啶(6)

将 0.512 g(1.78 mmol) 5 溶于干燥 1,4-二氧六环 11 mL 中, 加入无水三氟甲磺酸 0.25 mL, 在 95 °C 封管反应 20 h。冷却后向反应液加入饱和碳酸氢钠溶液 10 mL, 用乙酸乙酯萃取, 合并有机相, 有机相用饱和食盐水洗一次, 无水硫酸钠干燥。减压蒸除溶剂后, 残余物柱色谱(石油醚-乙酸乙酯 4:1), 得白色固体 0.460 g, 产率 90%。所得白色固体用正己烷

重结晶, 得无色晶体 0.318 g。

在 Eu(hfc)₃ 存在下, ¹H NMR 分析表明为单一对映异构体。mp 135~137 °C; [α]_D¹⁷ +77.7°(c 1.04, CHCl₃); (ref. mp 139~140 °C, [α]_D²⁰ +67.8°(c 0.52, CHCl₃)^[9])。 ¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ : 7.12(d, 1H, J=8.5 Hz), 6.63(d, 1H, J=8.5 Hz), 5.42(m, 1H), 3.92(s, 3H), 3.76(s, 3H), 3.35~3.44(m, 2H), 3.18(dd, 1H, J=16.2, 1.9 Hz), 3.14(m, 1H), 2.53(d, 1H, J=17.6 Hz), 1.62(s, 3H); 元素分析 C₁₆H₁₇NO₄: 多元素的质量分数为: 理论值 C 66.89, H 5.96, N 4.88; 实验值 C 67.07, H 5.69, N 5.00。

3 (+)-(5*R*, 9*R*)-2-甲氧基-5-甲氧羰基-7-甲基-11-亚甲基-5,9-甲撑环辛-7-烯并吡啶(7)

将溴化甲基三苯基膦 1.67 g(4.6 mmol) 悬浮于无水四氢呋喃 20 mL 中, 搅拌下慢慢加入 2.3 mol·L⁻¹ *n*-BuLi 0.86 mL(1.98 mmol), 约需 10 min, 室温继续反应 70 min。然后冰水浴冷却, 慢慢滴加 0.250 g(0.856 mmol) 6 于无水四氢呋喃 6 mL 的溶液, 约需 15 min, 加毕, 反应液再在室温搅拌 3 h。在冰水浴冷却和搅拌下加入水 10 mL 淬灭反应后, 混合物用乙酸乙酯萃取, 合并有机相, 用饱和食盐水洗一次, 无水硫酸钠干燥。减压蒸除溶剂所得残余物经柱色谱(石油醚-乙酸乙酯 10:1), 得无色固体 0.170 g, 产率 68%。mp 106~107 °C; [α]_D²¹ +32.4°(c 0.17, CHCl₃); IR cm⁻¹: 1724, 1599, 1479, 1479, 1321, 1305, 1265, 1027, 891, 833, 646; ¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ : 7.10(d, 1H, J=8.5 Hz), 6.54(d, 1H, J=8.5 Hz), 5.41(m, 1H), 4.97(s, 1H), 4.55(s, 1H), 3.88(s, 3H), 3.75(s, 3H), 3.05~3.02(m, 3H), 2.87(d, 1H, J=17.6 Hz), 2.19(d, 1H, J=17.0 Hz), 1.54(s, 3H); 元素分析 C₁₇H₁₉NO₃ 各元素的质量分数为: 理论值 C 71.56, H 6.71, N 4.91, 实验值 C 71.41, H 6.61, N 5.0; EIMS(*m/z*): 285(M⁺), 226(基峰), 211, 196。

4 (+)-(5*R*, 9*R*)-2-甲氧基-5-羧基-7-甲基-11-亚甲基-5,9-甲撑环辛-7-烯并吡啶(8)

将 0.16 g(0.561 mmol) 7 溶于四氢呋喃 6 mL 中, 搅拌下加入 20% 氢氧化钠溶液 6 mL 和甲醇 12 mL, 加热回流 48 h。反应液减压蒸除溶剂, 残余物用水 10 mL 溶解, 冰醋酸中和至 pH 5。混合物用乙酸乙酯萃取, 合并有机相用饱和食盐水洗一次, 无水硫酸钠干燥, 减压蒸除溶剂, 残余物经柱色谱(乙酸乙酯) 得无色无定形固体 0.142 g, 产率 93%。mp 96~99 °C; [α]_D²¹ +62.4°(c 0.58, CHCl₃); IR cm⁻¹:

3 429, 1 705, 1 599, 1 477, 1 430, 1 321, 1 257, 1 026, 818; ¹HNMR(300 MHz, CDCl₃) δ: 7.27(d, 1H, J = 8.5 Hz), 6.59(d, 1H, J = 8.5 Hz), 5.42(m, 1H), 5.06(s, 1H), 4.81(s, 1H), 3.90(s, 3H), 3.27(m, 1H), 3.03 ~ 3.20(m, 2H), 2.90(d, 1H, J = 16.8 Hz), 2.16(d, 1H, J = 17.1 Hz), 1.56(s, 3H); HRMS C₁₆H₁₇NO₃; 理论值 271.1218, 实验值 271.1213。

5 (+)-(5R,9R)-2-甲氧基-5-甲氧甲酰氨基-7-甲基-11-亚甲基-5,9-甲撑环辛-7-烯并吡啶(9)

将 0.113 g(0.42 mmol) 8 溶于干燥的二氯甲烷 6 mL 中, 搅拌下先后加入三乙胺 0.2 mL(1.66 mmol) 和二苯基磷酰叠氮 0.22 mL(1.02 mmol), 混合物室温反应 20 h。减压蒸除溶剂, 加入甲醇 10 mL, 加热回流 24 h。反应混合物减压蒸除甲醇, 残余物柱色谱(石油醚-乙酸乙酯 2:1), 得无色油状物 0.136 g, 产率几乎定量。[α]_D¹⁹ + 41.7°(c 0.59, CHCl₃); IR cm⁻¹: 3 327, 1 716, 1 597, 1 475, 1 421, 1 321, 1 259, 1 031, 760; ¹HNMR(300 MHz, CDCl₃) δ: 7.60(d, 1H, J = 8.5 Hz), 6.58(d, 1H, J = 8.5 Hz), 5.45(m, 1H), 5.07(br, 1H), 4.96(s, 1H), 4.83(s, 1H), 3.89(s, 3H), 3.61(s, 3H), 3.35(m, 1H), 3.19(m, 1H), 1.51(s, 3H); HRMS C₁₇H₂₀N₂O₃; 理论值 300.1476, 实验值 300.1475。

6 天然 HupA 类似物(-)-(5R,9R)-5-氨基-7-甲基-11-亚甲基-5,9-甲撑环辛-7-烯并吡啶-2-酮(2)

将 0.126 g(0.414 mmol) 9 溶于干燥氯仿 16 mL 中, 搅拌下加入三甲基碘硅烷 0.65 mL(4.6 mmol), 混合物加热回流 8 h。冷却, 加入甲醇 14 mL, 继续加热回流 20 h。减压蒸除溶剂, 残余物用氯仿 50 mL 溶解。有机层用饱和碳酸氢钠溶液洗 1 次, 水洗两次, 饱和食盐水洗 1 次, 无水硫酸钠干燥。减压蒸除溶剂, 残余物中加入两滴浓氨水经柱色谱(氯仿-甲醇 10:1) 分离, 得微黄色产物 0.067 g, 产率 71%。mp 196 ~ 198 °C; [α]_D²¹ - 117°(c 0.525, CHCl₃); IR cm⁻¹: 3 425, 1 657, 1 610, 1 552, 1 458, 1 122, 833, 658; ¹HNMR(300 MHz, CDCl₃) δ: 12.9(br, 1H), 7.89(d, 1H, J = 9.3 Hz), 6.42(d, 1H, J = 9.6 Hz), 5.39(m, 1H), 4.90(d, 2H, J = 8.5), 3.29(m, 1H), 2.92(dd,

1H, J = 17.0, 4.7), 2.74(d, 1H, J = 16.8 Hz), 2.16(s, 2H), 1.53(s, 3H); ¹³CNMR(300 MHz, CDCl₃) δ: 165.3, 152.8, 142.8, 140.2, 133.9, 124.5, 121.9, 117.4, 102.6, 54.2, 49.6, 40.1, 36.4, 22.5; HRMS C₁₄H₁₆NO₂; 理论值 228.1259, 实验值 228.1261。

致谢: 本研究得到我所新药研究国家重点实验室资助。光谱分析由本所分析室承担, 药理测试工作由本所药理学唐希灿教授研究组完成。

References:

- [1] Tang XC, He XC, Bai DL. Huperzine A: a novel acetylcholinesterase inhibitor [J]. *Drugs Future*, 1999, **24**(6): 647 - 663.
- [2] Bai DL, Tang XC, He XC. Huperzine A, a potential therapeutic agent for treatment of Alzheimer's disease [J]. *Cur Med Chem*, 2000, **7**(3): 355 - 374.
- [3] Kozikowski AP, Tückmantel W. Chemistry, pharmacology, and clinical efficacy of the Chinese nootropic agent huperzine A [J]. *Acc Chem Res*, 1999, **32**(8): 641 - 650.
- [4] Raves ML, Harel M, Pan YP, et al. Structure of acetylcholinesterase complexed with the nootropic alkaloid, (-)-huperzine A [J]. *Nat Struct Biol*, 1997, **4**(1): 57 - 63.
- [5] Kozikowski AP, Xia Y, Reddy ER, et al. Synthesis of huperzine A and its analogues and their anticholinesterase activity [J]. *J Org Chem*, 1991, **56**(15): 4636 - 4645.
- [6] He XC. Chiral drugs development [J]. *Chin J Pharm* (中国医学工业杂志), 1997, **28**(11): 519 - 524.
- [7] Wang B, He XC, Bai DL. Studies on analogues of huperzine A for treatment of senile dementia V. synthesis of optically active (-)-1-methyl huperzine A [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1999, **34**(6): 434 - 438.
- [8] He XC, Wang B, Yu GL, et al. Studies on the asymmetric synthesis of huperzine A. Part 2: highly enantioselective palladium catalyzed bicycloannulation of the β-keto-ester using new chiral ferrocenyl-phosphine ligands [J]. *Tetrahedron*, 2001, **12**(23): 3213 - 3216.
- [9] Kaneko S, Yoshino T, Katoh T, et al. Synthetic studies of huperzine A and its fluorinated analogues. 1. novel asymmetric syntheses of an enantiomeric pair of huperzine A [J]. *Tetrahedron*, 1998, **54**(21): 5471 - 5484.
- [10] Liu J, Zhang HY, Tang XC, et al. Effect of synthesis (-)-huperzine A on cholinesterase activities and mouse water maze performance [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1998, **19**(5): 413 - 416.