

维生素 K₂ (20) 的两相合成工艺 及其营养剂量对增加骨密度的研究^{*1}

雷 泽, 方瑞斌, 朱洪友

(云南大学 化学科学与工程学院, 教育部自然资源药物化学重点实验室, 云南 昆明 650091)

摘要:在以 BF₃ · OEt₂ 作催化剂及 45~47 °C 的反应条件下, 将大过量的 2-甲基-1,4-萘二酚循环与香叶基香叶醇(每次保持摩尔比为 10:1)在 CH₃NO₂-正己烷两相反应体系中进行 Friedel-Crafts 烷基化反应合成维生素 K₂(20) 的氢醌, 再在催化量的 FeCl₃ · 6H₂O 作用下经空气氧化, 以满意的收率及较高的化学选择性合成了维生素 K₂(20)。同时, 利用去卵巢致大鼠骨质疏松模型, 参考维生素 K₂ 人体低端推荐摄入量(50 μg/d)进行了动物实验剂量设计并进行了维生素 K₂(20) 增加骨密度的营养剂量的量效关系研究, 结果表明: 每天给药 25~100 μg/(kg · d), 均能防止去势大鼠的骨流失, 使股骨中点及远心端骨密度明显增加(P < 0.05), 并呈现出相应的量效关系。研究为维生素 K₂(20) 的工业生产提供了可能的工艺, 也为提高骨密度以预防骨质疏松的人体营养补充剂量(50~100 μg/d) 提供了可行性依据。

关键词: 维生素 K₂(20); 付-克反应; 两相合成; 骨密度; 量效关系

中图分类号: O 621.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-7971(2011)02-0196-05

骨质疏松症是以骨量减少、骨组织显微结构退化、骨的脆性增高及骨折危险性增加为特征的全身性疾病, 其发病率已跃居常见病、多发病的第 7 位, 绝经妇女及中老年人是其主要发病人群, 我国骨质疏松患者已达 9000 万, 潜在骨质疏松患者 6 300 万^[1]。人体内源性活性物质维生素 K₂ 优良的安全性及显著增加骨密度功效得到了深入的研究与广泛的认可。规模人群研究表明: 维生素 K(K₁, K₂) 摄入量与骨密度之间呈正相关, 膳食维生素 K 的低摄入是造成骨质疏松及髌部骨折发生率升高的一个独立风险因素^[2], 高剂量(15~45 mg/d) 的维生素 K₂(20) (MK-4) 已成为新型的骨质疏松预防及治疗药物^[3]; 低剂量的维生素 K₂(1.5 mg/d) 短期人体介入实验^[4] 及动物实验(100 μg ~ 1 mg/(kg · d))^[5] 也已证明具有显著的抗骨质疏松功效; 但对于补充营养剂量以预防骨质疏松的最低剂量的公开报道不多, 人群规模实验^[6] 表明的维护

骨健康的人体维生素 K 摄入的“门槛效应”(109 μg/d) 为本文探讨补充最低营养性剂量范围提供了很好的启发。

本文在实现香叶基香叶醇^[7] 合成的基础上, 利用两相 Friedel-Crafts 烷基化反应高效实现了 MK-4 的化学合成, 并利用去卵巢致大鼠骨质疏松模型, 对营养剂量(8.33~100 μg/(kg · d)) 的维生素 K₂ 抗骨质疏松的量效关系进行了初步的研究。

1 MK-4 的两相合成

1.1 合成路线 以 2-甲基-1,4-萘二酚(1) 与香叶基香叶醇(2) 为原料, 以 BF₃ · Et₂O 催化下的 CH₃NO₂-正己烷两相中进行的 Friedel-Crafts 烷基化反应作为关键反应步骤, 利用催化量 FeCl₃ · 6H₂O 存在下的空气氧化体系, 以简捷、满意的收率实现了 MK-4 的合成(图 1)。

* 收稿日期: 2010-04-29

基金项目: 国家科技部创新基金资助项目(05C26215301427)。

作者简介: 雷 泽(1968-), 男, 四川人, 工程师, 主要从事药物合成方面的研究。

通讯作者: 朱洪友(1968-), 男, 重庆人, 教授, 硕士生导师, 主要从事药物合成方面的研究, E-mail: hongyouzhu@sohu.com。

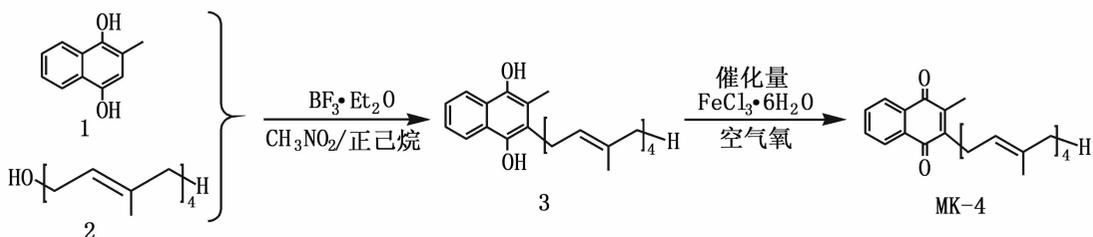


图1 MK-4的合成

Fig. 1 Synthesis of MK-4

1.2 实验仪器与试剂 X-6型显微熔点测定仪(温度未校正);BrukerDRX500核磁共振仪(CDCl_3 作溶剂,TMS为内标);Aglient G3250AA LC/MSD TOF高分辨质谱仪;其余的试剂和溶剂均为化学纯或分析纯.

1.3 合成方法

1.3.1 香叶基香叶醇的合成 以香叶醇为原料依专利^[7]进行合成,得淡黄色油状液体,经HPLC检测 $w \geq 98\%$.

1.3.2 MK-4的合成 在氮气保护下,向特制具有高速剧烈搅拌装置的20 L玻璃反应釜中,加入2-甲基-1,4-萘二酚(1742 g, 10.0 mol),用6 L硝基甲烷溶解,加入香叶基香叶醇(290 g, 1.0 mol)与3 L正己烷形成的溶液,水浴加热至45℃,在高速及剧烈搅拌下,快速加入15.0 mL三氟化硼乙醚,在冰水浴中使温度控制在45~47℃之间反应10~12 min,TLC检测至香叶基香叶醇消耗完全,静置分液,将上层(正己烷层)分出,下层(硝基甲烷)再用3 L正己烷提取,合并正己烷相,下层再加入2-甲基-1,4-萘二酚(174 g, 1.0 mol)并加热至45℃后,加入预热至45℃的香叶基香叶醇(290 g, 1.0 mol)、10.0 mL三氟化硼乙醚及3 L正己烷形成的溶液,如此重复第一次的操作5次,共计6次反应,投入2-甲基-1,4-萘二酚15.0 mol及香叶基香叶醇6.0 mol.

将上述得到的正己烷溶液浓缩约7.5 L,向其中加入7.5 L异丙醇与54 g(0.2 mol) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 形成的溶液,平稳地鼓入空气,搅拌下反应约2 h,TLC检测反应完全后,将反应混合物倾入冰水中,分出正己烷相,下层再用正己烷提取(3×5 L),合并有机相,用饱和食盐水洗涤2次,无水硫酸钠干

燥,减压浓缩得棕黄色油状残余物,经硅胶柱层析及丙酮重结晶得淡黄色结晶粉末(1891 g, 4.26 mol),收率71.0%. 所得目标产物的 ^1H NMR、 ^{13}C NMR及 FAB^+ -MS与文献[8]一致, m. p.: 36.5~37.5℃,产物经HPLC检测^[9] $w \geq 98\%$. 硝基甲烷溶液经浓缩及氧化后回收2-甲基-1,4-萘二酚的氧化产物2-甲基-1,4-萘二醌1608 g,回收率85.0%.

2 MK-4抗骨质疏松量效关系研究

2.1 药品与试剂 MK-4按上述合成方法制备($w \geq 98\%$);其余试剂均为分析纯.

2.2 动物 3月龄雌性SD大鼠,体质量210~260 g.

2.3 主要仪器 AA-670型原子吸收分光光度计(日本岛津公司);M-525 SII型马孚炉(美国NEY公司);QDR-4000双能X射线骨密度测量仪(美国HOLOGIC公司).

2.4 分组与剂量

2.4.1 分组 大鼠经适应性饲养后分组,实验动物按体质量随机分为假手术组、切除卵巢对照组、切除卵巢+A剂量受试组、切除卵巢+B剂量受试组、切除卵巢+C剂量受试组、切除卵巢+D剂量受试组、切除卵巢+E剂量受试组,每组5只动物.

2.4.2 卵巢切除术及术后筛查 大鼠经腹腔注射30 mg/kg的戊巴比妥钠溶液麻醉,腹位固定后于腹中线距阴道口3~4 cm处去毛,分别用碘酒和酒精消毒,待稍干后切开皮肤和腹肌约2~3 cm,拨开脂肪层后,轻轻将一侧子宫角拉出,在其末端可见被脂肪团包裹的卵巢.分离脂肪团,用止血钳夹卵巢,然后将卵巢下输卵管用丝线结扎,剪除卵巢,

子宫角放回腹腔中,同法剪除另侧卵巢,经腹肌、皮肤分层缝合及消毒,最后经后肢肌肉注射 20 000 U 青霉素. 大鼠摘除卵巢后 5 d,进行阴道涂片检查,每天 1 次连续 7 d,以检查大鼠卵巢是否完全摘除,如涂片呈动情反应,表明卵巢切除不完全,应弃去不用. 假手术组按同法手术,以去除一小块脂肪代替卵巢.

2.4.3 剂量设计 文献[10]表明:即使低剂量(50 $\mu\text{g}/\text{d}$)维生素 K_2 补充也可能有利于维护健康骨密度及预防动脉钙化. 按上述维生素 K_2 人体较低推荐量(50 $\mu\text{g}/\text{d}$,60 kg)由低至高设 A~E 5 个剂量组 8.33,16.67,25.00,50.00,100.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (分别相当于人体较低推荐用量的 10,20,30,60 和 120 倍). MK-4 先溶于吐温 80,再加双蒸水稀释至质量浓度分别为 1.67,3.33,5.00 和 10.00 和 20.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$,其中吐温 80 终质量分数最大为 0.5%,模型对照组和假手术组以双蒸水代替. 各剂量组动物每日 1 次灌胃给予相应浓度的受试样品,灌胃量为 5 mL/kg,连续灌胃 3 个月后测试骨

密度指标.

2.5 实验方法及股骨骨密度测定 按《保健食品检测与评价技术规范》(2003 年版)中增加骨密度功能检测方法中的方案二进行,用双能 X 线骨密度仪测定股骨中点和股骨远心端骨密度.

2.6 统计学处理 用方差分析处理数据. 先经方差齐性检验,符合要求的数据用单因素方差分析方法中多个实验组与一个对照组间均数的两两比较方法处理,对非正态分布或方差不齐数据经适当变量转换,满足正态或方差齐要求后再进行统计处理,对转换后仍不符合要求的,用秩和检验进行统计处理.

2.7 结果 经口给予大鼠不同剂量的维生素 K_2 (20)3 个月,对股骨中点骨密度及股骨远心端骨密度进行方差齐性检验,满足方差齐性要求,经单因素方差统计处理. 表 1 结果中,假手术组的股骨中点骨密度及股骨远心端骨密度显著高于模型对照组($P < 0.05$),表明本实验骨密度低下动物模型建立成功.

表 1 维生素 K_2 对大鼠骨密度的影响($\bar{x} \pm s$)($n = 5$)

Tab. 1 The effect of vitamin K_2 on bone mineral density in ovariectomized rats

组别	剂量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)	股骨中点骨密度/ ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)	P	股骨远心端骨密度/ ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)	P
假手术组	0	0.199 \pm 0.012	0.000	0.198 \pm 0.009	0.007
模型组	0	0.160 \pm 0.027	—	0.181 \pm 0.012	—
A	8.33	0.166 \pm 0.035	0.920	0.185 \pm 0.009	0.823
B	16.67	0.168 \pm 0.031	0.235	0.187 \pm 0.018	0.462
C	25.00	0.181 \pm 0.022	0.041	0.191 \pm 0.013	0.046
D	50.00	0.188 \pm 0.020	0.019	0.194 \pm 0.010	0.023
E	100.00	0.195 \pm 0.019	0.001	0.196 \pm 0.015	0.015

从表 1 可知,股骨中点及远心端骨密度, A, B 组与模型组差异无统计学意义($P > 0.05$), C, D, E 组与模型组差异有统计学意义($P < 0.05$),股骨中点及远心端骨密度显著高于模型组,并呈现量效关系.

3 讨论

醇在酸(含路易斯酸)催化作用下进行 Friedel

-Crafts 烷基化是向芳环引入侧链的常用方法^[11],反应属正碳离子历程,侧链易发生醇脱水及双键的异构化,收率通常较低. 本文采用两相溶剂体系,通过大大提高母体与侧链的浓度比,增加了正碳离子与母体反应的机会,降低了正碳离子生成烯的几率,明显提高了反应收率;同时利用 FeCl_3 催化下的绿色空气氧化体系,提高了反应的环境友好度;

该工艺具有较好的工业使用价值。

骨质疏松症与营养密切相关,营养对骨丢失的速率起关键作用^[12]。维生素 K₂ 是人体重要营养素,是骨和钙代谢的必须物质。一项针对 72 327 名妇女的规模人群研究^[6]表明,膳食维生素 K 摄入量较高的人群髌部骨折发生率明显低于摄入量较低人群(相对危险度:0.70),维护骨健康的人体维生素 K 摄入具有“门槛效应”(109 μg/d)。纳豆含有丰富的维生素 K₂,纳豆的食用量与髌部骨折发生率呈明显的负相关;膳食维生素 K 摄入不足无法确保骨钙素的正常羧化,健康成人大约 10% ~ 30% 的骨钙素处于低羧化状态^[13]。膳食维生素 K 主要为源于绿色蔬菜的维生素 K₁,而对骨健康具有更高活性的维生素 K₂ 还不到膳食维生素 K 摄入总量的 20%,维生素 K₁ 的有效生物利用率很低,其作用通常被高估^[2],大部分人均无法通过膳食获得充足的维生素 K₂,维生素 K₂ 是维生素 K 补充的首选^[10],但目前就维生素 K₂ 的营养补充摄入量的研究报道较少。本文利用去卵巢致大鼠骨质疏松模型,由低至高设置 5 个剂量组进行骨密度试验,结果显示 C ~ E 组(25.00 ~ 100.00 μg/(kg · d))的股骨中点及远心端骨密度与模型组相比具有显著的统计学意义($P < 0.05$),根据大鼠实验与人体摄入有效性的对应关系,表明人体摄入低剂量(50 μg/d, 60 kg)的维生素 K₂ 也有益于增加骨密度,维护骨健康。同时,剂量反应研究表明,补充摄入维生素 K ≤ 100 μg/d 时对抗凝治疗效果没有明显的影响^[2,14],因此,可以初步确定,中老年人群维生素 K₂ 摄入 50 ~ 100 μg/d 有利于减少骨流失,增加骨密度,有效预防骨质疏松,同时具有良好的安全性。

参考文献:

- [1] 刘忠厚. 骨矿与临床[M]. 北京:中国科学技术出版社,2006.
- [2] BURCKHARDT P, DAWSON - HUGHES B, HEANEY

R P. Nutritional aspects of osteoporosis(骨质疏松营养学)[M]. 裴福兴,刘洋主,译. 北京:人民卫生出版社,2009.

- [3] 雷泽,付正启,朱洪友,等. 维生素 K₂——新型骨质疏松防治药物[J]. 中国骨质疏松杂志,2010,16(1):60-63.
- [4] KOITAYA N, EZAKI J, NISHIMUTA M, et al. Effect of low dose vitamin K₂ (MK - 4) supplementation on bioindices in postmenopausal Japanese women [J]. J Nutr Sci Vitaminol, 2009, 55: 15-21.
- [5] 闫鸿丽, 雷泽, 沈志强, 等. 维生素 K₂ 对维甲酸致大鼠骨质疏松症的抑制作用[J]. 中国骨质疏松杂志, 2009, 15(9): 664-667.
- [6] FESKANICH D, WEBER P, WILLETT W C, et al. Vitamin K intake and hip fracture in women: a prospective study [J]. Am J Clin Nutr, 1991, 69: 74-79.
- [7] 朱洪友, 雷泽, 付正启, 等. 全反式长链萜烯伯醇的合成方法 [P]. ZL 200710066045. 9.
- [8] 杨超文. 若干醌类药物的合成 [D]. 昆明: 云南大学, 2005.
- [9] 木晓云, 董跃伟, 温晓江, 等. 反相高效液相色谱法测定维生素 K₂ (20) 含量 [J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2008, 30(4): 405-407.
- [10] WILLIAM D. Protecting bone and arterial health with vitamin K₂ [J/OL]. LifeExtension (<http://www.lef.org/>), 2008, 3: 1-8.
- [11] 刷锦亮, 董晓丽, 吴文忠. 维生素 K₂ 的合成新工艺 [J]. 大连工业大学学报, 2008, 27(3): 232-234.
- [12] LOWE N M, FRASER W D, JACKSON M J. Is there a potential therapeutic value of copper and zinc for osteoporosis? [J]. Proc Nutr Soc, 2002, 61(2): 181-185.
- [13] Cees Vermeer, SHEARER M J, Armin Zittermann, et al. Beyond deficiency: Potential benefits of increased intakes of vitamin K for bone and vascular health [J]. Eur J Nutr, 2004, 43(6): 325-335.
- [14] LEON J, SCHURGERS M J, SHEARER K H, et al. Effect of vitamin K intake on the stability of oral anticoagulant treatment: dose - response relationships in healthy subjects [J]. Blood, 2004, 104: 2 682-2 689.

The two - phase synthesis of menatetrenone and its dose - effect relationship of anti - osteoporosis activity in ovariectomized rats

LEI Ze, FANG Rui-bin, ZHU Hong-you

(College of Chemical Science and Engineering, Key Laboratory of Medicinal Chemistry for Natural Resource of Ministry of Education, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: With the two - phase reactive system of $\text{CH}_3\text{NO}_2/n$ - hexane, the hydroquinone of menatetrenone was prepared at 45—47 °C by $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ catalyzed Friedel - Crafts alkylation of 2 - methyl - 1,4 - naphthohydroquinone and gernaylgeraniol. Then menatetrenone was synthesized in good yield and high selectivity by treating the hydroquinone with the catalytic amount of $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and the oxygen of air. The dose - effect relationship of anti - osteoporosis activity of menatetrenone in ovariectomized rats was investigated. Our results suggest that low - dose menatetrenone could prevent the bone loss in ovariectomized young rats, thus nutritional dose of menatetrenone may be beneficial in the prevention of osteoporosis in the elderly.

Key words: menatetrenone; Friedel - Crafts reaction; osteoporosis; bone mineral density; dose - effect relationship

* * * * *

(上接第 195 页)

Abstract: Liquid phase oxidation of cyclohexane was carried out under mild reaction conditions catalyzed by $\text{Mn}_x\text{O}_y/\text{SBA} - 3$, using aqueous hydrogen peroxide as oxidant and acetic acid as solvent without adding any initiator. The effects of different solvents, reaction temperature and reaction time on cyclohexane oxidation were investigated. A reasonable substrate conversion (60.2%) and product (cyclohexanone/cyclohexanol) selectivity (72.2%/27.1%) were obtained under the optimum reaction conditions, which were 50 mg catalyst, 5 mL H_2O_2 (30%), acetic acid as solvent, reaction temperature 373 K; reaction time 10 h.

Key words: $\text{Mn}_x\text{O}_y/\text{SBA} - 3$; selective oxidation; cyclohexane; cyclohexanone; cyclohexanol