



张秋霞,程晓东,李振兴,等. 梓醇全丙酰化产物的微波辅助合成及其神经保护作用初探[J]. 轻工学报, 2021, 36(4): 78-85.

ZHANG Q X, CHENG X D, LI Z X, et al. Microwave-assisted synthesis of catalpol perpropionylated product and its neuroprotective effect[J]. Journal of Light Industry, 2021, 36(4): 78-85. DOI: 10. 12187/2021. 04. 010

中图分类号: TP393 文献标识码: A 文章编号: 2096-1553(2021)04-0078-08

梓醇全丙酰化产物的微波辅助合成及其神经保护作用初探

Microwave-assisted synthesis of catalpol perpropionylated product and its neuroprotective effect

张秋霞^{1,2}, 程晓东¹, 李振兴¹, 董春红³, 蒋士卿³, 孙雨安¹, 王国庆¹

ZHANG Qiuxia^{1,2}, CHENG Xiaodong¹, LI Zhenxing¹, DONG Chunhong³, JIANG Shiqing³, SUN Yu'an¹, WANG Guoqing¹

- 1. 郑州轻工业大学 材料与化学工程学院, 河南 郑州 450001;
- 2. 平顶山学院 化学与环境工程学院, 河南 平顶山 467000;
- 3. 河南中医药大学 中医药科学院, 河南 郑州 450002

- 1. College of Materials and Chemical Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;
- 2. School of Chemical and Environmental Engineering, Pingdingshan University, Pingdingshan 467000, China;
- 3. Academy of Chinese Medicine Science, He'nan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China

关键词:
微波辅助合成; 梓醇全丙酰化产物; 神经保护剂

Key words:
microwave-assisted synthesis; catalpol perpropionylated product; neuroprotective agent

摘要:以梓醇、丙酸酐为原料,吡啶为溶剂和缚酸剂,利用微波辅助法合成梓醇全丙酰化衍生物(CP-6),通过正交试验对其合成条件进行优化,并采用四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法对其神经保护活性进行初步筛查.结果表明:当丙酸酐与梓醇物质的量比为18:1,反应温度为80℃,反应时间为6h,梓醇在吡啶中的质量浓度为25g/L时,梓醇全丙酰化产物的相对含量可达98.51%;CP-6具有神经保护作用,是一种潜在的神经保护剂.

收稿日期:2020-07-20

基金项目:国家自然科学基金国际合作与交流基金项目(8151101082);河南省高等学校重点科研项目(20A350004)

作者简介:张秋霞(1971—),女,河南省平顶山市人,郑州轻工业大学硕士研究生,平顶山学院高级实验师,主要研究方向为化学合成与分析.

通信作者:董春红(1974—),女,河南省焦作市人,河南中医药大学教授,博士,主要研究方向为药物合成化学.

Abstract: Using catalpol and propionyl anhydride as raw materials, pyridine as solvent and acid binding agent, catalpol perpropionyl product (CP-6) was synthesised by microwave-assisted method. The synthesis conditions were optimized by orthogonal test, and the neuroprotective activity was initially screened by the colorimetric method of the tetramethylazolylzol salt trace enzyme reaction. The test results showed that when the molar ratio of propionic anhydride to catalpol was 18:1, the reaction temperature in the microwave reactor was 80 °C, the reaction time was 6 h, and the mass concentration of catalpol in pyridine was 25 g/L, the relative content of CP-6 in the reaction system could reach 98.51%. MTT method was used to screen the neuroprotective activity of CP-6, and the results showed that CP-6 had neuroprotective effect and may be a potential neuroprotective agent.

0 引言

梓醇(catalpol)是从玄参科植物地黄的新鲜或干燥块根中提取的小分子环烯醚萜苷类化合物^[1],在心脑血管系统、中枢神经系统,以及抗肿瘤、抗骨质疏松、抗炎、提高免疫等方面均有较强的药理活性^[2-8].随着全球人口老龄化趋势的加剧,人们对抗衰老药物的需求逐渐增大,而梓醇独特的药理活性,受到越来越多专家学者的关注.研究发现^[9],梓醇作为一种小分子药物,水溶性较高、易口服,但存在脂溶性较低、不易透过血脑屏障、半衰期较短等缺陷,需对其进行结构修饰以提高药理活性.

笔者前期采用油浴控温的方式合成了梓醇丙酰化产物,并利用分子对接技术对其抗衰老效果进行了预测,发现其可能具有抗衰老效果^[10-11].但文献[10]报道梓醇全丙酰化衍生物的合成方法存在反应时间较长、合成效率较低等缺点.微波辅助合成法作为一种简单、高效的加热技术广泛应用于材料合成领域,具有快速、均匀、环保等优点^[12-13].目前,未见有关采用微波辅助合成法制备梓醇酰化衍生物的报道.鉴于此,本文拟以梓醇和丙酸酐为原料,吡啶为溶剂和缚酸剂,采用微波辅助法合成梓醇全丙酰化产物,利用电喷雾离子化-高分辨质谱(ESI-MS)法监控梓醇丙酰化过程,对梓醇全丙酰化产物的合成条件进行优化,并通过四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT法)对其神经

保护活性进行筛查,以期得到合成效率高且环保的梓醇全丙酰化产物的合成条件.

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

主要试剂与材料:梓醇为地黄中提取,纯度为98%;丙酸酐、吡啶、NaHCO₃、乙酸乙酯、无水Na₂SO₄、CH₂Cl₂,均为分析纯,上海阿尔法化工有限公司产;乙腈(色谱纯),天津四友精细化学品有限公司产;甲基硅油(食品级),常州龙城有机硅有限公司产;超纯水,郑州轻工业大学实验室自制.

主要仪器与设备:Thermo Fisher-Exactive Orbitrap型质谱仪、Nicolet iS5型傅里叶红外变换光谱仪,美国赛默飞世尔科技有限公司产;DD2400-MR型核磁共振波谱仪,美国安捷伦科技有限公司产;SpectraMax i3x型酶标仪,美国美谷分子仪器有限公司产;RE-2000B型旋转蒸发器、DLSB-5/20型低温冷却液循环泵、SHB-III型真空泵、MCR-3型常压微波反应器,郑州凯鹏实验仪器有限公司产;AR224CN型电子天平(精度0.0001g),奥豪斯仪器(上海)有限公司产;KQ-500DE型数控超声波清洗机,昆山舒美公司产;10~100 μL、20~200 μL、100~1000 μL规格移液枪,德国Eppendorf公司产;MiLL-Q Advantage A10型超纯水仪,美国Millipore公司产.

1.2 实验方法

1.2.1 梓醇全丙酰化产物的合成与纯化 在三口圆底烧瓶中加入一定量的梓醇,用一定量

的吡啶充分溶解,然后按照 $n(\text{丙酸酐}):n(\text{梓醇}) = 12:1$ 的投料比加入丙酸酐;将三口圆底烧瓶置于微波反应器中,设置反应温度为 $70\text{ }^\circ\text{C}$,输出功率为 900 W ,合理调节搅拌速率进行反应;在反应过程中,每隔一段时间用微量进样针从反应液中抽取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 反应液至进样瓶中,利用 ESI-HRMS 法对其进行检测^[11,14];反应终止后,用 $10\text{ mL CH}_2\text{Cl}_2$ 稀释反应液洗涤三口圆底烧瓶并将反应液倒入 50 mL 圆底烧瓶中,将稀释的反应液在旋转蒸发仪上真空浓缩除去吡啶;然后加入乙酸乙酯萃取 3 次,萃取过程中需加入 40 mL 饱和 NaHCO_3 溶液以除去体系中的丙酸,静置分层,收集有机相乙酸乙酯溶液并加入适量无水 Na_2SO_4 进行干燥处理,静置分层,过滤浓缩有机相后得梓醇丙酰化产物粗品。产物粗品采用柱层析(填料:中性 Al_2O_3 ,洗脱剂 $V(\text{二氯甲烷}):V(\text{甲醇}) = 5:1$)纯化得到淡黄色固体梓醇全丙酰化产物。

1.2.2 基于 ESI-HRMS 法的合成过程分析

合成过程中,梓醇的 6 个羟基可部分或全部生成丙酰化产物。将所取样品通过高分辨质谱仪的自动进样器加入到质谱仪中,根据在正、负离子扫描模式下,梓醇及其丙酰化产物电离后的不同离子质荷比,对其进行分析。

ESI-HRMS 分析条件:流动相 $V(\text{乙腈}):V(\text{质量分数为 } 0.1\% \text{ 的甲酸水溶液}) = 90:10$;流速 $200\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$;毛细管温度 $250\text{ }^\circ\text{C}$;毛细管电压 60 V ;tube 电压 120 V ;进样量 $0.1\text{ }\mu\text{L}$;辅助气为 $\text{N}_2(10\text{ L}/\text{min})$;鞘气 $40\text{ L}/\text{min}$;skimmer 电压 22 V ;扫描时间 2 min ;扫描范围 $360\sim 800\text{ amu}$;电子传输管温度 $275\text{ }^\circ\text{C}$;分别采用正、负离子扫描模式对反应液中梓醇丙酰化产物的电离方式进行确认,考查各扫描模式下梓醇丙酰化产物分析结果的差异。

1.2.3 梓醇全丙酰化产物的合成条件优化

在前期实验的基础上,以丙酸酐和梓醇的物质

的量比(A)、反应温度(B)、反应时间(C)、梓醇质量浓度(梓醇在吡啶中的质量浓度)(D)为考查对象,以梓醇全丙酰化产物的产率为考查指标,设计 $L_9(3^4)$ 正交试验,正交试验因素与水平如表 1 所示。

表 1 正交试验因素与水平表

Table 1 Orthogonal test factors and levels table

水平	因素			
	A	B/ $^\circ\text{C}$	C/h	D/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
1	6:1	60	5	15
2	12:1	70	6	20
3	18:1	80	7	25

根据正交试验直观分析结果,确定最佳合成条件,并在最佳合成条件下进行 3 次平行验证试验。

1.2.4 表征方法 FT-IR 测试条件:采用衰减全反射附件(ATR),扫描范围 $400\sim 4000\text{ cm}^{-1}$,扫描次数 16 次。

HRMS 测试条件:离子源 ESI,分别采用正、负离子扫描模式,扫描范围 $360\sim 800\text{ amu}$,毛细管温度 $250\text{ }^\circ\text{C}$,毛细管电压 60 V ,tube 电压 120 V ,辅助气为 $\text{N}_2(10\text{ L}/\text{min})$,鞘气 $40\text{ L}/\text{min}$,skimmer 电压 22 V ,电子传输管温度 $275\text{ }^\circ\text{C}$ 。

采用 $^1\text{H NMR}$ (溶剂为 CDCl_3)、 $^{13}\text{C NMR}$ (溶剂为 CDCl_3)对合成产物的结构进行表征,以确定其是否为梓醇全丙酰化产物。

1.2.5 神经保护活性的 MTT 法初步筛查

SH-SY5Y(人骨髓神经母细胞瘤细胞株)与衰老有关,其细胞活力可通过 MTT 法进行检测^[10]。将 SH-SY5Y 以每孔 10^5 个细胞接种于 96 孔培养板,每孔体积 $100\text{ }\mu\text{L}$;待细胞过夜贴壁后,将 $20\text{ }\mu\text{mol}/\text{L}$ CP-6 和链脲佐菌素(STZ, $0.8\text{ mmol}/\text{L}$)放在一起培养 24 h ;除去培养基后,每孔加入 $20\text{ }\mu\text{L}$ 质量浓度为 $0.5\text{ mg}/\text{mL}$ 的 MTT 溶液;在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下孵育 4 h 后,每孔加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 二甲基亚砜(DMSO),低速振摇 15 min 以使甲瓚晶体完全溶解,使用酶标仪在 490 nm

波长处测定各孔的光吸收值。

2 结果与讨论

2.1 梓醇丙酰化产物电离模式的确认

利用 ESI-HRMS 法监测反应过程中生成的梓醇丙酰化衍生物^[14]。图 1 和图 2 分别是在正、负离子扫描模式下梓醇与丙酸酐反应 0.5 h 的质谱图。

对比图 1 和图 2 可以看出,在正离子扫描模式下可以较全面地观察到梓醇 0~6 个羟基参与反应后梓醇丙酰化产物的信息,该模式下产物理论计算的离子化信息如表 2 所示。本文

选择正离子扫描模式作为质量扫描离子模式,在实际利用 HRMS 进行定性定量确认时,考虑到实验误差,在梓醇丙酰化产物的 4 个理论计算正离子化峰误差范围(± 0.5)同时出现时,对其进行分析确认。

2.2 梓醇丙酰化产物的半定量分析

样品中不同化合物的相对含量与其对应的质谱峰强度和质谱峰面积成正比。合成过程中,梓醇分子结构中的 6 个—OH 可部分或全部生成丙酰化产物,利用特定产物积分面积占全部产物积分面积的比值可计算特定丙酰化产物的相对含量。图 3 为正离子扫描模式下反应 0.5 h

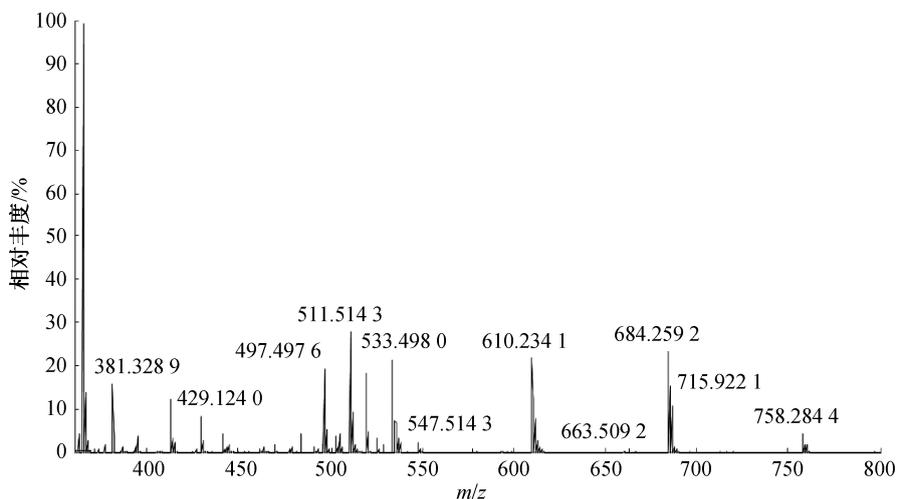


图 1 正离子模式下梓醇与丙酸酐反应 0.5 h 的质谱图

Fig. 1 Mass spectra of catalpol and propionic anhydride reaction in positive ion scanning mode for 0.5 h

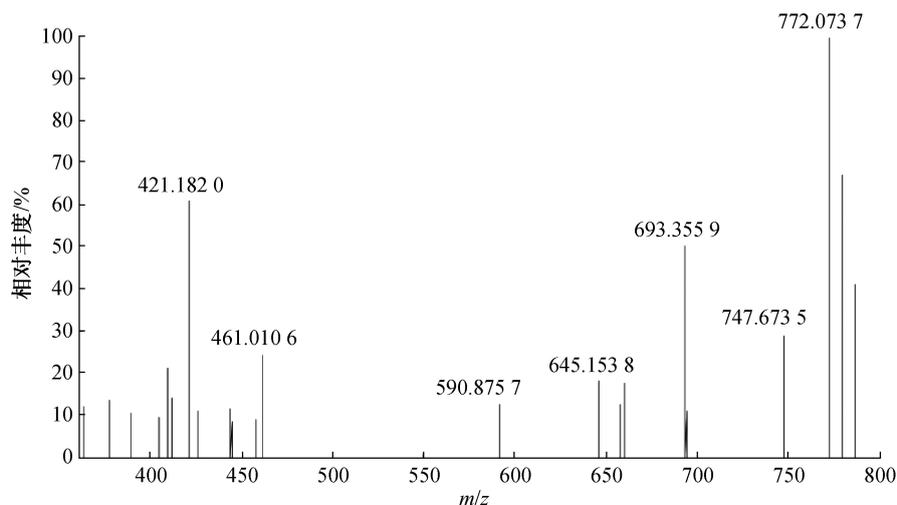


图 2 负离子模式下梓醇与丙酸酐反应 0.5 h 的质谱图

Fig. 2 Mass spectra of catalpol and propionic anhydride reaction in negative ion scanning mode for 0.5 h

表2 梓醇与不同丙酰化产物正离子扫描模式下理论计算的质荷比
Table 2 Theoretical calculation of mass-charge ratio of catalpol with different propionylated products under positive ionization mode

产物	$[M+H]^+$	$[M+NH_4]^+$	$[M+Na]^+$	$[M+K]^+$
CP-0	363.121 3	381.155 7	385.111 1	401.085 0
CP-1	419.155 3	436.181 9	441.137 3	457.111 2
CP-2	475.181 6	492.208 1	497.163 5	513.137 4
CP-3	531.207 8	548.234 3	553.189 7	569.163 6
CP-4	587.234 0	604.260 5	609.215 9	625.189 9
CP-5	643.260 2	660.286 7	665.242 1	681.216 1
CP-6	699.286 4	716.313 0	721.268 4	737.242 3

注:CP-0~CP-6 分别代表梓醇中 0~6 个羟基丙酰化产物,下同。

梓醇丙酰化产物质谱峰积分面积图。由图 3 可知,该扫描方式下 CP-0~CP-6 的相对含量分别为 6.52%、11.81%、26.21%、25.14%、12.40%、9.74%和 8.18%。

2.3 梓醇全丙酰化产物的表征

将纯化后的 CP-6 分别进行 FT-IR、HRMS、 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 测试,结果如图 4—7 所示。

由图 4 可以看出,1 740.8 cm^{-1} 处为 C=O 的伸缩振动峰,1 655.2 cm^{-1} 处为 C=C 的伸缩振动峰,1 460.9 cm^{-1} ,1 420.7 cm^{-1} ,1 377.5 cm^{-1} ,1 347.2 cm^{-1} 处为饱和 C—H 的弯曲振动峰,1 159.9 cm^{-1} 处为 C—O 的伸缩振动峰,由此可初步推断梓醇的—OH 与酸酐发生反应生成了酯。

由图 5 可以看出, $m/z = 699.341 5$ 为 CP-6

的 $[M+H]^+$ 峰, $m/z = 716.368 9$ 为 CP-6 的 $[M+NH_4]^+$ 峰,737.299 4 为 CP-6 的 $[M+K]^+$ 峰,这进一步表明所得产物可能为梓醇全丙酰化产物。

由图 6 可知, δ : 6.30 (1H, dd, $J = 1.7$, 6.0 Hz, H-3), 5.25 (1H, m, H-3'), 5.16 (1H, t, $J = 9.7$ Hz, H-4'), 4.95~5.00 (2H, m, H-1', 2'), 4.93 (1H, dd, $J = 4.5, 6.0$ Hz, H-4), 4.81~4.86 (2H, m, H-10a, 6), 4.80 (1H, d, $J = 5.6$ Hz, H-1), 4.10~4.26 (2H, m, H-6'), 4.07 (1H, d, $J = 12.8$ Hz, H-10b), 3.73 (1H, m, H-5'), 3.65 (1H, s, H-7), 2.61 (1H, dd, $J = 7.8, 9.4$ Hz, H-9), 2.54 (1H, m, H-5), 2.23~2.44 (12H, m, $\text{CH}_2 \times 6$), 1.02~1.21 (18H, m, $\text{CH}_3 \times 6$)。结合图 7 的表征结果可知,合成物质即为梓醇丙酰化产物。

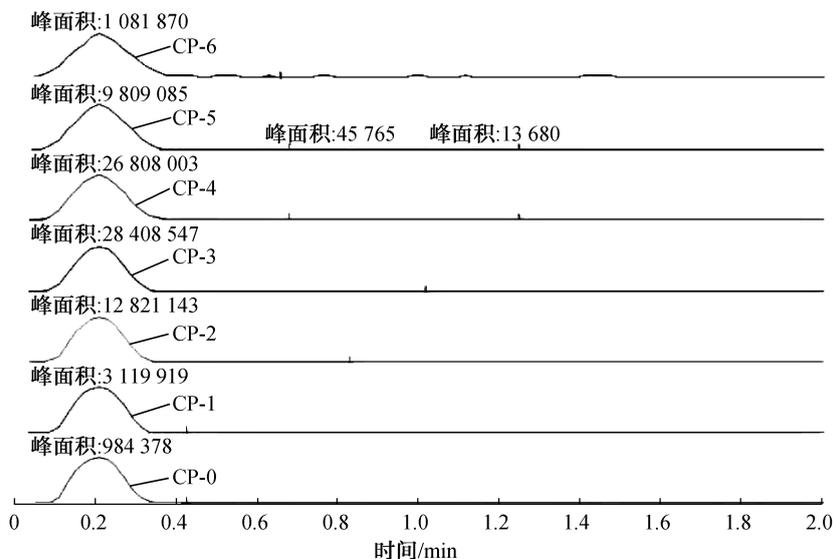


图3 正离子扫描模式下反应 0.5 h 梓醇丙酰化产物质谱峰积分面积图

Fig. 3 Integral graph of various mass spectra peaks of each catalpol perpropionylated product in reaction solution after 0.5 h under positive ion scanning mode

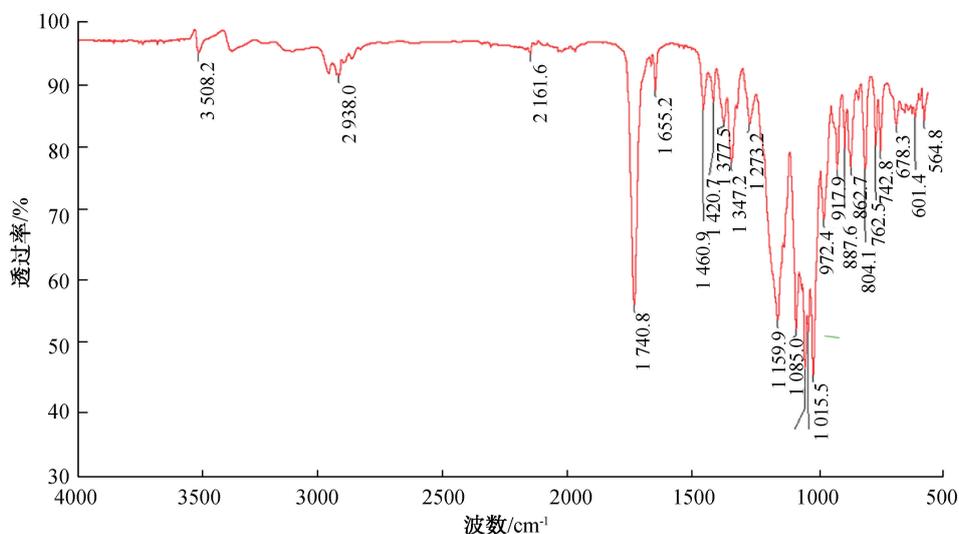


图4 CP-6的FT-IR谱图
Fig. 4 FT-IR spectra of CP-6

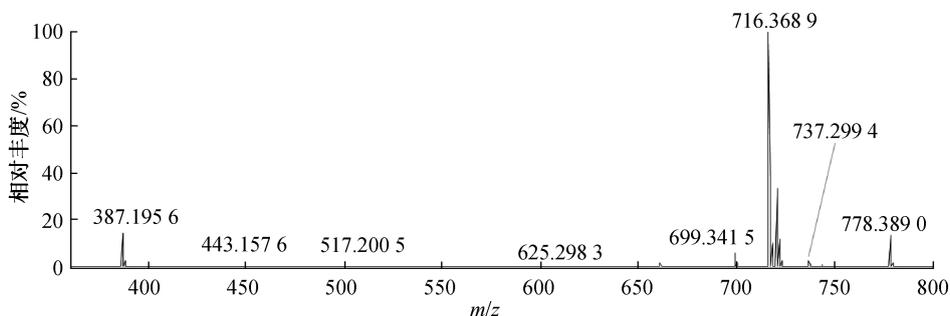


图5 CP-6的高分辨质谱图
Fig. 5 HRMS spectrum of CP-6

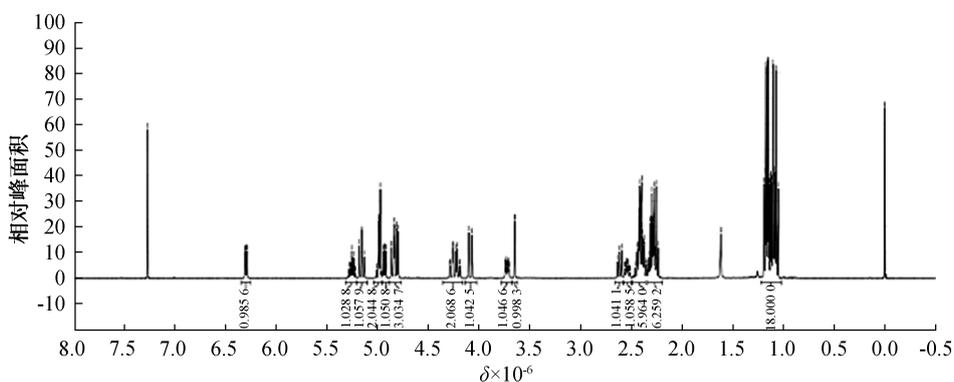


图6 CP-6的¹H NMR谱图
Fig. 6 ¹H NMR spectra of CP-6

2.4 梓醇全丙酰化产物合成条件的优化结果

正交试验结果如表3所示。由极差 R 值的大小可以判断各因素对试验结果的影响,极差 R 值越大,表明因素对试验结果的影响越大。由表3可知,影响梓醇丙酰化反应的因素大小顺序为

$A>D>B>C$,最佳合成条件为 $A_3B_3C_2D_3$,即 n (丙酸酐): n (梓醇)=18:1,反应温度为 $80\text{ }^\circ\text{C}$,反应质即为梓醇全丙酰化产物。时间为 6 h ,梓醇在吡啶中的质量浓度为 25 g/L 。

表4为优化条件下的平行验证试验结果。

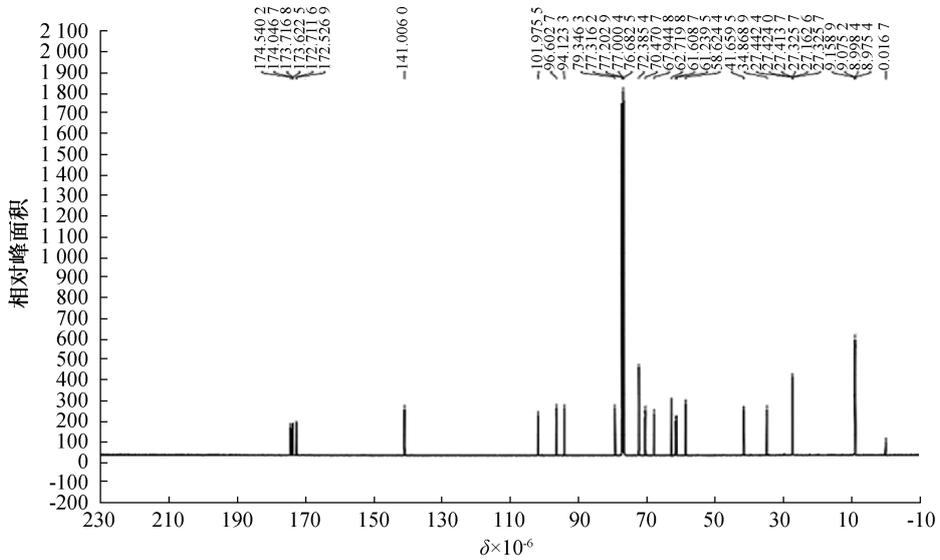


图7 CP-6 ¹³C NMR 谱图
Fig. 7 ¹³C NMR spectra of CP-6

表3 正交试验结果

Table 3 Orthogonal test results

序号	A	B	C	D	相对含量/%
1	1	1	1	1	15.19
2	1	2	1	2	21.16
3	1	3	3	3	34.26
4	2	1	1	3	83.24
5	2	2	3	1	71.89
6	2	3	1	2	92.54
7	3	1	3	2	90.20
8	3	2	1	3	97.00
9	3	3	1	1	90.02
K ₁	70.61	188.63	194.42	177.10	
K ₂	247.67	190.05	204.73	203.90	
K ₃	277.22	216.82	196.35	214.50	
R	206.61	28.19	10.31	37.40	

表4 优化条件下的平行验证试验结果

Table 4 Parallel verification experimental results under optimal conditions

序号	CP-0	CP-1	CP-2	CP-3	CP-4	CP-5	CP-6	%
1	0.36	0.06	0.17	0.00	0.39	0.47	98.55	
2	0.30	0.08	0.47	0.01	0.36	0.19	98.59	
3	0.44	0.20	0.09	0.00	0.37	0.51	98.38	

由表4可知,在优化条件下,3组试验条件下梓醇全丙酰化的相对含量变化不大,虽然中间产物的相对含量有一定的变化,但梓醇全丙酰化过程总体稳定可靠;优化试验条件下CP-6平均相对含量可达98.51%,高于9次正交试验中最高值,说明正交试验得到了优化的合成条件。

2.5 CP-6 神经保护活性初步筛查结果

采用MTT筛查法评价CP-6的抗神经细胞凋亡活性,筛查结果如图8所示.由图8可以看出,0.8 mmol/L STZ可诱导SH-SY5Y活性下降33.21%,而加入20 μmol/L CP-6与STZ共同孵育,SH-SY5Y活性下降29.94%,CP-6的存在有

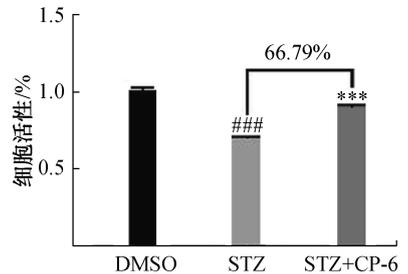


图8 CP-6 抗神经细胞凋亡活性筛查结果
Fig. 8 Screening results of antiapoptotic activity of CP-6

效逆转了STZ诱导的SH-SY5Y活性下降.初筛结果表明,CP-6对神经元具有保护作用,是潜在的神经保护剂。

3 结论

本文以梓醇与丙酸酐为原料,吡啶为溶剂和缚酸剂,通过微波辅助法合成了梓醇全丙酰化产物,并采用正交试验对合成条件进行优化,得出:当丙酸酐与梓醇物质的量比为18:1,反

应温度为 80 ℃,反应时间为 6 h,梓醇在吡啶中的质量浓度为 25 g/L 时,CP-6 的平均相对含量可达 98.51%。采用 MTT 筛查法对 CP-6 的抗神经细胞凋亡活性进行评价可知,CP-6 具有神经保护活性,是一种潜在的神经保护剂。鉴于梓醇是多种中药的重要活性成分,基于梓醇的结构修饰优化研究,对今后研发新型具有神经保护、抗抑郁、抗肿瘤、降糖、抗衰老等多种生物活性功能的药物具有重要的现实意义。

参考文献:

- [1] 吉雪琪,孙鹏,祁建军,等.地黄生长期根叶中梓醇及总环烯醚萜苷含量变化[J].中国中药杂志,2014,39(3):466.
- [2] HUANG C L, CUI Y L, JI L L, et al. Catalpol decreases peroxynitrite formation and consequently exerts cardioprotective effects against ischemia/reperfusion insult[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2013, 51(4):463.
- [3] 谭灵莉,崔丹丹,祝慧凤,等.梓醇对脑缺血后神经血管单元构筑的影响[J].中国药理学通报,2014,30(1):44.
- [4] LEONG P K, CHEN J H, KO K M. Natural products and drug discovery: an integrated approach[M]. Netherlands: Academic Press, Elsevier, 2018:73-104.
- [5] WAN D, YANG X, WANG Y, et al. Catalpol stimulates VEGF production via the JAK2/STAT3 pathway to improve angiogenesis in rats' stroke model[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2016, 191:169.
- [6] LIU L, GAO H W, WANG H B, et al. Catalpol promotes cellular apoptosis in human HCT116 colorectal cancer cells via microRNA-200 and the down regulation of PI3K-Akt signaling pathway[J]. *Oncology Letters*, 2017, 14(3):1168.
- [7] LIN C, LU Y, YAN X J, et al. Catalpol protects glucose-deprived rat embryonic cardiac cells by inducing mitophagy and modulating estrogen receptor[J]. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2017, 89:973.
- [8] WANG J H, XIE H, ZHAO T K, et al. Catalpol regulates cholinergic nerve system function through effect on choline acetyl-transferase not M receptor affinity[J]. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2015, 69:291.
- [9] PUNGITORE C R, LEÓN L G, GARCÍA C, et al. Novel antiproliferative analogs of the *Taq* DNA polymerase inhibitor catalpol[J]. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2007, 17(5):1332.
- [10] DONG C H, LIU S L, CHENG X D, et al. Design, synthesis, and preliminary biological evaluation of catalpol propionates as antiaging drugs[J]. *BMC Chemistry*, 2019, 13(109):1.
- [11] 王国庆,褚铭林,李振兴,等.ESI-HRMS法在梓醇丙酰化产物合成过程分析中的应用[J].轻工学报,2018,33(3):1.
- [12] GAN S, ZAKARIA S, CHIA C H, et al. Synthesis of kenaf cellulose carbamate using microwave irradiation for preparation of cellulose membrane[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 106(15):160.
- [13] ZHANG W S, LU P, WANG Z M, et al. Microwave-assisted suzuki coupling reaction for rapid synthesis of conjugated polymer poly(9,9-dihexylfluorene)s as an example[J]. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2013, 51(9):1950.
- [14] 河南中医药大学.一种丙酰化的梓醇衍生物及其制备方法和应用:201810734124.0[P].2018-02-07.