文章编号：1001-8689(2019)12-1377-09

分离纯化与化学合成

FK409 类 NO 供体型他汀衍生物合成及活性评价

陈宇瑛[1,2] 薛雨[1] 艾林[3] 曾其炀[1]
(1 抗生素研究与再评价四川省重点实验室，四川抗菌素工业研究所，成都大学，成都 610052；2 四川抗菌素工业研究所金华分所，金华 321000；3 浙江海森药业股份有限公司，金华 322104)

摘要：目的 合成系列 FK409 类 NO 供体型他汀衍生物并进行体外活性评价。**方法** 本文选用 FK409 类 NO 供体与阿托伐他汀、匹伐他汀及瑞舒伐他汀 3 种他汀药物分别通过酯化进行偶联。**结果** 设计合成了 2 个 FK409 类 NO 供体和 6 个该类 NO 供体型他汀衍生物。**结论** 通过体外活性测定，目标化合物具有良好的 NO 释放活性。

关键词：他汀；FK409；合成；NO 释放

中图分类号：R914.5 **文献标志码：**A

Synthesis and activity assay of novel FK409 NO-donating statin derivatives

Chen Yu-ying[1,2], Xue Yu[1], Ai Lin[3] and Zeng Qi-yang[1]
(1 Antibiotics Research and Re-evaluation Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan Industrial Institute of Antibiotics, Chengdu University, Chengdu 610052; 2 Jinhua Branch of Sichuan Industrial Institute of Antibiotics, Jinhua 321000; 3 Zhejiang Haisen Pharmaceutical Co., Ltd., Jinhua 322104)

Abstract **Objective** To synthesize a series of novel FK409 NO-donating statin derivatives and evaluate their NO release activities *in vitro*. **Methods** In this study, we used esterification reaction to couple FK409 NO-donors and three statins, respectively. **Results** Two FK409 NO-donors and six FK409 NO-donating statin derivatives were designed and synthesized. **Conclusion** The target compounds showed good NO release activity *in vitro*.

Key words Statin; FK409; Synthesis; NO release

当前，心脑血管疾病已成为危害人类健康的头号大敌，其病理基础是动脉粥样硬化 (Atherosclerosis, AS)，而脂肪代谢紊乱、高脂血症以及高血压等正是 AS 形成和病变过程的决定性因素。具有强效调脂作用的他汀类药物在心脑血管疾病的预防及治疗中发挥着举足轻重的作用。

20 世纪 90 年代以来，由于一氧化氮 (NO) 在医学方面所显示的巨大潜力而逐渐成为医药研究和生命科学的热点和前沿之一，为新药的发现开辟了一条新途径。

NO 作为信使物质和效应分子，在心血管、神经及免疫等系统中发挥着极其重要的作用，如舒张血管平滑肌、抑制血小板黏附和聚集、抑制血管平滑肌的增生和迁移、抗炎、抗氧化等作用。21 世纪以来，有关 NO 的研究可谓方兴未艾，其发展趋势也从单纯的基础研究逐渐向应用方面转化。从最早研究的有机硝酸酯类 NO 供体以来，迄今为止有数十类 NO 供体被研发出来，并广泛用于各种生物学研究，按其结构分类主要有以下几类：有机硝酸酯类、亚硝基硫醇类、呋咱氮氧类、偶氮鎓二醇盐类、N- 芳基 -N'-

收稿日期：2019-01-18

基金项目：成都市科技项目 (No. 2016-XT00-00023-GX)

作者简介：陈宇瑛，女，生于 1965 年，研究员，主要从事药物研究与开发，E-mail: 770204344@qq.com

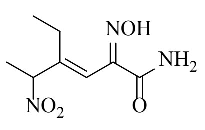
羟基胍类、亚硝胺类、金属卟啉配合物类、无机亚硝酸盐类、FK409 衍生物类等 [1-2]

心脑血管疾病诸如 AS、心肌梗塞等常因内皮功能的损伤，使得体内 NO 的释放量降低。采用偶联得到 NO 供体型他汀类药物有望通过引入外源性 NO 来弥补内皮细胞释放 NO 的不足，从而在发挥他汀类药物降血脂作用的同时，能够发挥协同作用，增强药理活性，起到前药性质的作用。

本研究选择的 FK409 类 NO 供体，目前在国内未见相关研究报道。该类供体是在 20 世纪 90 年代前后，由日本大阪藤泽药业株式会社 (Fujisawa harmaceutical Co Ltd. Osaka Factory in Japan) 研究开发[3]。

FK409 化学名为 (E)-4- 乙基 -2- 肟基 -5- 硝基 -3- 烯 - 己酰胺，结构如图 1。文献报道显示 [1-4]，FK409 代谢分解的同时，通过释放 NO，在体外表现出良好的舒张血管、抗血小板聚集作用。FK409 类似物结构通式如图 2，其中 X 可为 O、N、S，R^1、R^2 和 R^3 为取代基团，FK409 类似物结构中需含有硝基、烯键、肟基 3 个参与活性物质释放的官能团，通过增长主链长度、改变取代基类型而得到的一系列 FK409 衍生物。

FK409 类似物释放 NO 的限速步骤 [1,7] 是硝基 α 位质子被夺去，这主要取决于两个因素：一是 α-H 酸性的大小；二是质子旁空间位阻的大小。如具有给电子效应的基团如烷氧基或烃基，作为的取代 R^1、R^2，会使硝基 α-H 酸性减小，可降低 NO 的释放速率；用大位阻基团如异丙基、叔丁基取代 R^1、R^2，或者 R^1 和 R^2 连接成环状，增加 α-H 空间位阻，从而使其不易被夺走，也可达到缓慢释放NO的目的；以上两方面的结构修饰都可增长 FK409 类似物在体内的半衰期，从而有望延长该潜在药物的作用时间。



FK409

图 1　FK409 的结构

Fig. 1　The structure of FK409

图 2　FK409 类似物结构通式

Fig. 2　The structure of FK409 analogues

R^3 取代基选择电负性较强的或空间位阻较大的基团来修饰，也一定程度对该类供体化合物释放 NO 的速率具有影响，但相比 R^1 和 R^2 的取代对其释放 NO 的影响要弱的多。R^3 位结构修饰的价值在于选择一些具有药理活性的化合物来取代，在保证原有药物药效的基础上，通过 FK409 类似物释放 NO 来增强或辅助原有药物的药理活性。

他汀类药物即羟甲基戊二酰单酰辅酶 A(HMG-CoA) 还原酶抑制剂类药物，能够强效抑制 HMG-CoA 还原酶的活性，降低总胆固醇和低密度脂蛋白的含量，具有调脂作用强、安全性高、毒副作用小的特点，是目前临床应用最广泛、疗效最好的调脂类药物。

通过成酯或酰胺的形式将 FK409 类 NO 供体的 R^3 端与他汀类药物进行拼接，可以得到一类具有前药性质的化合物，通过体内酶的作用，分别代谢水解成各自成分，有望在发挥他汀类药物调脂及非调脂药理作用的基础上，利用 FK409 类 NO 供体释放一定量的 NO 来增强他汀类药物的药理活性，诸如舒张血管、抗炎、抗氧化等作用。

1　设计与合成

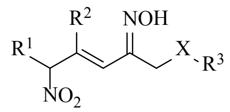
1.1　FK409 类 NO 供体型他汀衍生物的设计

在上述讨论的基础上，设计了以下 3 种 FK409 类 NO 供体衍生物 **M**、**P** 和 **M'**，如图 3 所示，R^3 基团选择 4- 氯丁酰氯作为他汀与供体的连接链，当 X 为 O 时，R^1 为甲基、R^2 为乙基定义为 M 供体；R^1 为正丙基、R^2 为乙基定义为 **P** 供体；当 X 为 N 时，R^1 为甲基、R^2 为乙基定义为 **M'** 供体。通过 R^1 基团大小的不同以及 X 电负性的差异，来控制硝基 α-H 的酸性，从而考查 R^1 基团大小与 NO 释放活性的关系。

本文选用阿托伐他汀 (Ato)、匹伐他汀 (Pita) 及瑞舒伐他汀 (Rosu)3 种他汀药物，通过与供体 **M**、**P** 偶联设计以下 6 个目标物。其中，目标物 **M-Ato**、**M-Pita** 和 **M-Rosu** 是 **M** 供体分别与上述 3 种他汀药物通过中间连接链 4- 氯丁酰氯偶联得到的 FK409 类 NO 供体型他汀衍生物，目标物 **P-Ato**、**P-Pita** 和 **P-Rosu** 是 P 供体分别与上述 3 种他汀药物通过中间连接链 4- 氯丁酰氯偶联得到的 FK409 类 NO 供体型他汀衍生物，各目标物结构如图 4 所示。

1.2　FK409 类 NO 供体型他汀衍生物的合成设计

当 X 为 O 时，即 **M** 和 **P** 两种 NO 供体型他汀目标化合物的合成方法如图 5 所示。



$R^3 = —COCH_2CH_2CH_2Cl$

M { X=O; $R^1 = —CH_3$; $R^2 = —CH_2CH_3$ }

P { X=O; $R^1 = —CH_2CH_2CH_3$; $R^2 = —CH_2CH_3$ }

M' { X=N; $R^1 = —CH_3$; $R^2 = —CH_2CH_3$ }

图 3 设计的 FK409 类 3 种 NO 供体衍生物

Fig. 3 Design three types of FK409 NO donor derivatives

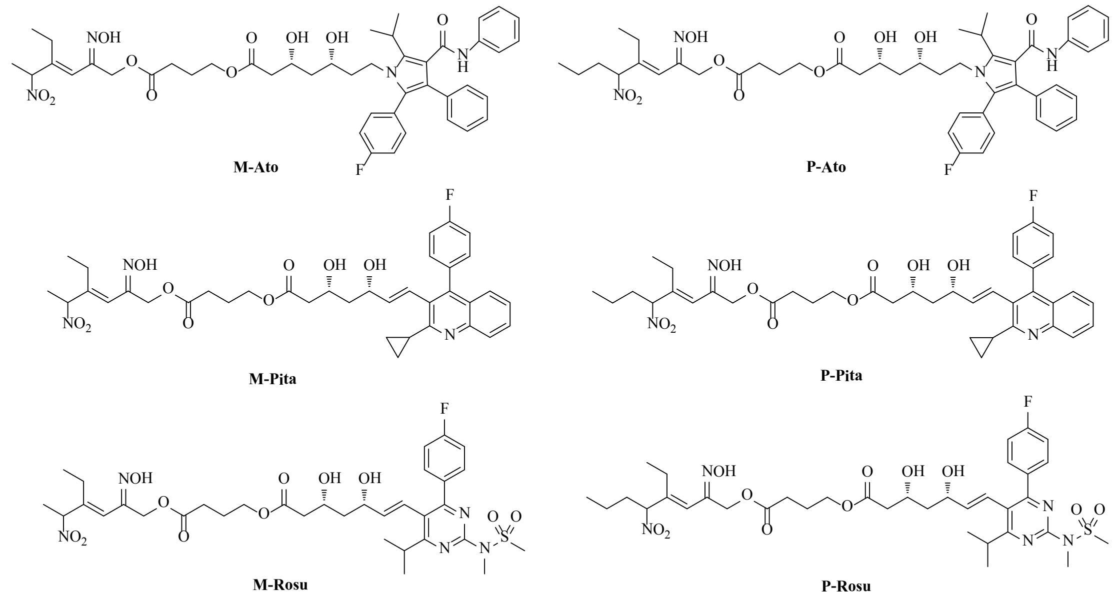


图 4 设计的 FK409 类 NO 供体型他汀目标化合物

Fig. 4 Design FK409 NO donor target compounds for statins

以购买得到的两类烯醛即 (E)-2- 乙基 -2- 丁烯醛和 (E)-2- 乙基 -2- 己烯醛为原料，按文献报道方法 [1,3,4,8]，在氢化钠强碱作用下，将烯醛与磷酰基乙酸三乙酯通过 Wittig-Horner 烯化反应合成得到烯化产物 1；再以乙醚为溶剂，氢化锂铝为还原剂，还原反应得中间体 2。

中间体 2 在碱性条件下与中间连接链 4- 氯丁酰氯发生取代反应得氯代物 3；然后他汀类化合物以盐的形式与氯代物 3 在碘化钾催化作用下生成化合物 4；最后，通过硝化 - 亚硝化 [8-9] 反应生成目标产物 5。

2 实验部分

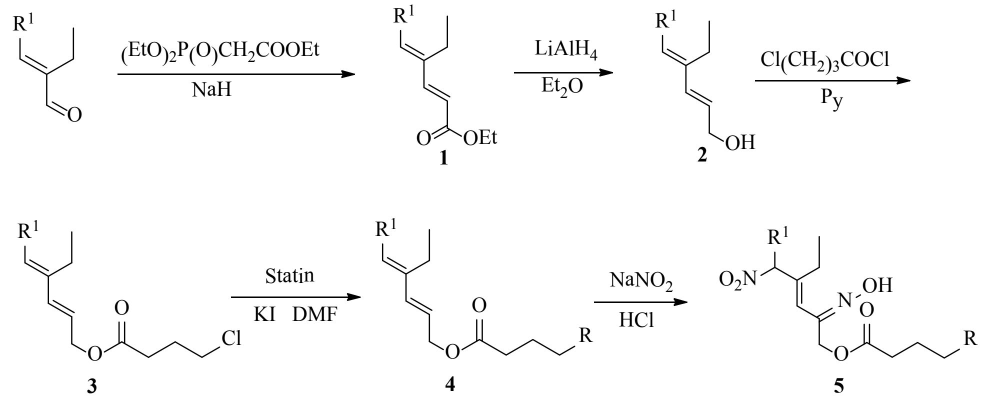
2.1 仪器和试剂

Agilent 1100LC/MSD 质谱仪 (美国 Agilent 公司)；INOVA400 高分辨超导核磁共振仪 (Unity)；旋转蒸发仪 (Rotavapor, R-114)；WRS-1A 数字熔点仪 (上海物理光学仪器厂)；81-2 型恒温磁力搅拌器 (上海司乐仪器厂)。所用原料中间体购自 Astatech 及 TCI 试剂公司；所用试剂购自成都科龙化工试剂厂，均为分析纯或化学纯；反应溶剂四氢呋喃和乙醚均作无水处理。

2.2 FK409 类 NO 供体的制备

2.2.1 (E,E)-4- 乙基 -2,4- 二烯 - 己酸乙酯 (**M**1) 的合成 [3]

冰浴、氮气保护下，向 150mL 的无水 THF 溶液中加入 60% 的 NaH(4.80g, 120mmol)，搅拌均匀，再向里逐滴加入磷酰基乙酸三乙酯 (20.16g, 90mmol)、(E)-2- 乙基 -2- 烯 - 丁醛 (5.00g, 51.00mmol)、20mL 无水 THF 的混合溶液，搅拌 15min 后，撤出冰浴，室温条件下搅拌 4.5h。反应液倾入冰水中，用乙酸乙酯萃取，有机相用饱和食盐水洗后，无水硫酸镁干燥，浓缩，硅胶柱层析 (洗脱剂：乙酸乙酯 / 正己



R^1=—CH_3　　R^1=—$CH_2CH_2CH_3$

M-Ato: R=Ato　　**P-Ato**: R=Ato

M-Pita: R=Pita　　**P-Pita**: R=Pita

M-Rosu: R=Rosu　　**P-Rosu**: R=Rosu

图 5　M 和 P 类 NO 供体型他汀衍生物合成路线

Fig. 5　The synthesis route of M and P-type NO donor for statin derivatives

烷 =1/30) 得 5.00g 无色具有酯香味油状物 (理论量为 8.58g，收率为 58.30%)。

2.2.2　(E,E)-4- 乙基 -2,4- 二烯 -1- 己醇 (**M**2) 的合成 [3]

室温、避光条件下，向加入氢化锂铝 (0.74g, 19.52mmol) 的无水乙醚混悬液中，逐滴加入 (E,E)-4- 乙基 -2,4- 二烯 - 己酸乙酯 (5.00g, 29.76mmol) 的乙醚溶液，搅拌 2h 后，TLC 显示仍有原料存在，故又补加了约 0.40g 氢化锂铝，搅拌 3h 后处理。用乙酸乙酯淬灭反应，过滤，有机层用无水硫酸镁干燥，浓缩得粗品，采用硅胶柱层析 (洗脱剂：乙酸乙酯 / 环己烷 =1/4) 得 2.71g 无色透明油状物。

2.2.3　[(E,E)-4- 乙基 -2,4- 二烯 -1- 基]-4- 氯 - 丁酸己酯 (**M**3) 的合成 [3]

冰浴中，向 (E,E)-4- 乙基 -2,4- 二烯 -1- 己醇 (2.87g, 22.78mol)、三乙胺 100mL、二氯甲烷 150mL 的混合液中，滴加 4- 氯 - 丁酰氯 (6.80g, 48.20mmol)，冰浴搅拌 4h，反应液用二氯甲烷萃取，二氯甲烷层用饱和食盐水洗后，无水硫酸镁干燥，浓缩，浓缩液用硅胶柱层析 (洗脱剂：乙酸乙酯 / 环己烷 =1/30)，得 4.30g 无色透明油状物。ESI-MS(*m/z*)：231.7$[M+H]^+$, $C_{12}H_{19}ClO_2$(MW=230.1)。^1H NMR(400MHz, $CDCl_3$, 25　℃)δ(ppm)：6.18(1H, *J*=15.6Hz, d); 5.68~5.52(2H, m); 4.62(2H, *J*=6.8Hz, d); 3.60(2H, *J*=5.1Hz, t); 2.51(2H, *J*=5.8Hz, t); 2.23(2H, *J*=6.5Hz, q); 2.13~2.06(2H, m); 1.72(3H, *J*=14.8Hz, d); 0.99(3H, *J*=4.2Hz, t)。

2.2.4　(4- 乙基 -2- 肟基 -5- 硝基 -3- 烯 -1- 基)-4- 氯 - 丁酸己酯 (**M**) 的合成 [1,3-6]

将 [(E,E)-4- 乙基 -2,4- 二烯 -1]-4- 氯 - 丁酸己酯 (0.41g, 1.80mmol)、$NaNO_2$(0.74g, 10.70mmol)、甲醇 15mL、水 10mL 混合，向上述混合液中缓慢滴加 6mol/L HCl(1.22mL, 7mmol)，室温搅拌 30min，反应液用乙酸乙酯萃取，有机层用饱和食盐水洗后，无水硫酸镁干燥，浓缩，浓缩液用硅胶柱层析 (洗脱剂：乙酸乙酯 / 环己烷 =1/4)，得 0.16g 黄色油状物。^1H NMR(400MHz, $CDCl_3$, 25 ℃)δ(ppm): 6.00(1H, s); 5.17(1H, *J*=6.8Hz, q); 4.77(2H, s); 3.61(2H, *J*=9.2Hz, t); 2.54(2H, *J*=11.2Hz, t); 2.23~2.08(4H, m); 1.73(3H, *J*=16Hz, d); 1.07(3H, *J*=8.7Hz, t)。

2.2.5　(E,E)-4- 乙基 -2,4- 二烯 - 辛酸乙酯的 (**P**1) 合成 [3]

氮气保护、冰浴条件下，向 30mL 的无水 THF 溶液中加入 60% 的 NaH(1.20g, 30mmol)，搅拌均匀，再向里逐滴加入磷酰基乙酸三乙酯 (4.48g, 20mmol)、(E)-2- 乙基 -2- 烯 - 己醛 (1.50g, 11.90mmol)、10mL 无水 THF 的混合溶液，搅拌 15min 后，撤出冰浴，室温条件下搅拌 5h。反应液倾入冰水中，用乙酸乙酯萃取，有机层用饱和食盐水洗后，无水硫酸镁干燥，浓缩，硅胶柱层析 (洗脱剂：乙酸乙酯 / 环己烷 =1/30) 得 0.29g 无色具有酯香味油状物。ESI-MS(*m/z*)：197.1$[M+H]^+$, $C_{12}H_{20}O_2$(MW=196.1)。^1H NMR(400MHz, $CDCl_3$, 25　℃)δ(ppm)：7.17(1H, *J*=16Hz, d); 5.96(1H, *J*=7.4Hz, t); 5.84(1H, *J*=16Hz, d); 4.13(2H, *J*=8.2Hz, q); 2.25(2H, *J*=9.6Hz, q); 2.16(2H, *J*=11.2Hz, q); 1.48~1.38(2H, m); 1.25~1.18(3H, m); 0.98~0.85(6H, m)。

2.2.6　(E,E)-4- 乙基 -2,4- 二烯 -1- 辛醇 (**P**2) 的合成 [3]

室温条件下，向加入氢化锂铝 (18.54mg,

0.49mmol) 的无水乙醚混悬液中，逐滴加入 (E,E)-4- 乙基 -2,4- 二烯 - 辛酸乙酯 (0.12g, 0.61mmol)，搅拌 2h。用乙酸乙酯淬灭反应，过滤，有机层用无水硫酸镁干燥，浓缩得粗品，硅胶柱层析 (洗脱剂：乙酸乙酯 / 环己烷 =1/4) 得 0.07g 无色透明油状物。^{1}H NMR(400MHz, $CDCl_3$, 25 ℃)δ(ppm)：6.05(1H, *J*=15.6Hz, d); 5.69~5.63(1H, m); 5.36(1H, *J*=16Hz, t); 4.67(1H, *J*=16.2Hz, t); 3.99(2H, *J*=14.6Hz, t); 2.20~2.03(4H, m); 1.40~1.31(2H, m); 0.98~0.81(6H, m)。

2.2.7 [(E,E)-4- 乙基 -2,4- 二烯 -1- 基]-4- 氯 - 丁酸辛酯 (**P**3) 的合成 [1,3]

冰浴、氮气保护条件下，向 (E,E)-4- 乙基 -2,4- 二烯 -1- 辛醇 (0.14g, 0.88mmol)、碳酸氢钠 (0.13g, 1.54mmol)、二氯甲烷 10mL、水 2mL 的混合液中，滴加 4- 氯 - 丁酰氯 (0.18g, 1.30mmol)，搅拌过夜后，pH 检测反应液呈较强酸性，用碳酸氢钠调反应液至中性。反应液用二氯甲烷萃取，二氯甲烷层用饱和食盐水洗后，无水硫酸镁干燥，浓缩，浓缩液用乙酸乙酯 / 环己烷 =1/30 的洗脱剂进行硅胶柱层析，得到 0.13g 无色透明油状物 (理论量为 0.23g，收率为 55.6%)。^{1}H NMR(400MHz, $CDCl_3$, 25℃)δ(ppm)：5.93(1H, *J*=15.6Hz, d); 5.72~5.64(1H, m); 5.26(1H, *J*=7.4Hz, t); 4.11(2H, *J*=7.0Hz, t); 3.60(2H, *J*=3.0Hz, t); 2.54~2.20(6H, m); 2.15~2.05(4H, m); 1.06~0.99(6H, m)。

2.2.8 (4- 乙基 -2- 肟基 -5- 硝基 -3- 烯 -1- 基)-4- 氯 - 丁酸辛酯 (**P**) 的合成 [1,3]

将 [(E,E)-4- 乙基 -2,4- 二烯 -1]-4- 氯 - 丁酸辛酯 (0.77g, 3.00mmol)、$NaNO_2$(1.33g, 19.20mmol)、甲醇 30mL、水 20mL 混合，向上述混合液中缓慢滴加 6mol/L HCl(2mL, 11.52mmol)，室温搅拌 30min，反应液用乙酸乙酯萃取，有机层用饱和食盐水洗后，无水硫酸镁干燥、浓缩，浓缩液用硅胶柱层析 (洗脱剂：乙酸乙酯 / 环己烷 =1/4)，得 0.12g 黄色油状物。ESI-MS(*m/z*)：357.1[M+Na]$^+$, 373.0[M+K]$^+$, $C_{14}H_{23}ClN_2O_5$(MW=334.1)。^{1}H NMR(400MHz, $CDCl_3$, 25 ℃)δ(ppm)：6.03(1H, s); 5.01(1H, *J*=4.4Hz, t); 4.76(2H, s); 3.60(2H, *J*=6.2Hz, t); 2.53(2H, *J*=7.0Hz, t); 2.25~2.04(1H, m); 2.22~2.02(4H, m); 1.96~1.82(1H, m); 1.42~1.24(2H, m); 1.06(3H, *J*=5.7Hz, t); 0.98(3H, *J*=6.4Hz, t)。

2.3 FK409 类 NO 供体型他汀衍生物的合成

2.3.1 [(E,E)-4- 乙基 -2,4- 二烯 -1- 基]-4-{(3R, 5R)-7-[2-(4- 氟苯基)-5- 异丙基 -3- 苯基 -4-(苯胺羰基) 吡咯 -1- 基]-3,5- 二羟基庚酯基 }- 丁酸己酯 (**M**3-**Ato**) 的合成

将 [(E,E)-4- 乙基 -2,4- 二烯 -1]-4- 氯 - 丁酸己酯 (0.21g, 0.91mmol)、阿托伐他汀钙 (1.16g, 1.00mmol)、25mL 的 DMF 混合，加入适量催化剂 KI，室温搅拌 30h，反应液用乙酸乙酯萃取，有机层用饱和食盐水洗后，无水硫酸镁干燥，浓缩，浓缩液用硅胶柱层析 (洗脱剂：乙酸乙酯 / 环己烷 =1/1)，得 64.40mg 油状物。ESI-MS(*m/z*)：753.3[M+H]$^+$, $C_{45}H_{53}FN_2O_7$(MW=752.4)。^{1}H NMR(400MHz, $CDCl_3$, 25℃)δ(ppm)：7.20~7.14(9H, m); 7.06(2H, *J*=8.0Hz, d); 7.02~6.96(3H, m); 6.87(1H, s); 6.18(1H, *J*=16.0Hz, d); 5.67~5.53(2H, m); 4.62(2H, *J*=16.0Hz, d); 4.15~4.04(4H, m); 4.00~3.91(1H, m); 3.78~3.68(1H, m); 3.69~3.62(1H, m); 3.61~3.55(1H, m); 2.48~2.36(2H, m); 2.41(2H, *J*=7.2Hz, t); 2.23(2H, *J*=7.6Hz, q); 2.05~1.95(2H, m); 1.75~1.60(2H, m); 1.72(3H, *J*=6.8Hz, d); 1.59-1.42(2H, m); 1.53(6H, *J*=7.2Hz, d); 0.99(3H, *J*=7.4Hz, t)。

2.3.2 [(E,E)-4- 乙基 -2,4- 二烯 -1- 基]-4-{(3R, 5R, 6E)-7-[2- 环丙基 -4-(4- 氟代苯基) 喹啉 -3- 基]-3,5- 二羟基 -6- 庚烯酯基 }- 丁酸己酯 (**M**3-**Pita**) 的合成

将 [(E,E)-4- 乙基 -2,4- 二烯 -1] -4- 氯 - 丁酸己酯 (0.58g, 2.50mmol)、匹伐他汀钙 (2.00g, 2.27mmol)、25mL 的 DMF 混合，加入适量催化剂 KI，室温搅拌 30h，反应液用乙酸乙酯萃取，有机层用饱和食盐水洗后，无水硫酸镁干燥，浓缩，浓缩液用硅胶柱层析 (洗脱剂：乙酸乙酯 / 环己烷 =1/1)，得 0.50g 油状物。ESI-MS(*m/z*)：616.2[M+H]$^+$, $C_{37}H_{42}FNO_6$ (MW=615.3)。^{1}H NMR(400MHz, $CDCl_3$, 25 ℃)δ(ppm)：7.95(1H, *J*=8.0Hz, d); 7.60~7.56 (1H, m); 7.35~7.28(2H, m); 7.24~7.13(4H, m); 6.63(1H, *J*=16.4Hz, d); 6.19(1H, *J*=15.6Hz, d); 5.68~5.53 (3H, m); 4.63(2H, *J*=6.4Hz, d); 4.45~4.35(1H, m); 4.19~4.06(1H, m); 4.17(2H, *J*=6.4Hz, t); 2.49~2.37(2H, m); 2.42(2H, *J*=3.2Hz, t); 2.24(2H, *J*=7.6Hz, q); 2.04~1.97 (2H, m); 1.72(3H, *J*=6.8Hz, d); 1.58~1.29 (2H, m); 1.39~1.26 (1H, m); 1.05~0.95 (4H, m); 0.99 (3H, *J*=7.6Hz, t)。

2.3.3 [(E,E)-4- 乙基 -2,4- 二烯 -1- 基]-4-{(3R, 5R, 6E)-7-[4-(4- 氟苯基)-6- 异丙基 -2-(N- 甲基 -N- 甲磺酰胺基)-5- 嘧啶]-3,5- 二羟基 -6- 庚烯酯基 }- 丁酸己酯 (**M**3-**Rosu**) 的合成

将 [(E,E)-4- 乙基 -2,4- 二烯 -1] -4- 氯 - 丁酸己酯 (1.15g, 4.90mmol)、瑞舒伐他汀钠 (5.00g, 9.93mmol)、 25mL 的 DMF 混合，加入适量催化剂 KI，室温搅拌 30h，反应液用乙酸乙酯萃取，有机层用饱和食盐水洗后，无水硫酸镁干燥，浓缩，浓缩液用硅胶柱层析 (洗脱剂：乙酸乙酯 / 环己烷 =1/1)，得 0.56g 油状物。^{1}H NMR(400MHz, $CDCl_3$, 25℃)δ(ppm)：7.66~7.62(2H, m); 7.09(2H, *J*=8.6Hz, t); 6.63(1H, *J*=16Hz, d); 6.19(1H, *J*=15.6Hz, d); 5.66~5.42(3H, m); 4.62(2H, *J*=6.8Hz, d); 4.46(1H, s); 4.19~4.15(3H, m); 3.75(1H, s); 3.62(1H, s); 3.57(3H, s); 3.52(3H, s); 3.38~3.34(1H, m); 2.47~2.40(2H, m); 2.42(2H, *J*=4.8Hz, t); 2.23(2H, *J*=7.6Hz, q); 2.03~1.97(2H, m); 1.72(3H, *J*=6.8Hz, d); 1.57~1.42(2H, m); 1.26(6H, *J*=6.8Hz, d); 0.99(3H, *J*=7.6Hz, t)。

2.3.4　[(E,E)-4- 乙基 -2,4- 二烯 -1- 基]-4-{(3R, 5R)-7-[2-(4- 氟苯基)-5- 异丙基 -3- 苯基 -4-(苯胺羰基) 吡咯 -1- 基]-3,5- 二羟基庚酯基 }- 丁酸辛酯 (**P**3-**Ato**) 的合成

合成方法参照“2.3.1”项。

2.3.5　[(E,E)-4- 乙基 -2,4- 二烯 -1- 基]-4-{(3R, 5R, 6E)-7-[2- 环丙基 -4-(4- 氟代苯基) 喹啉 -3- 基]-3,5- 二羟基 -6- 庚烯酯基 }- 丁酸辛酯 (**P**3-**Pita**) 的合成

合成方法参照“2.3.2”项。

2.3.6　[(E,E)-4- 乙基 -2,4- 二烯 -1- 基]-4-{(3R, 5R, 6E)-7-[4-(4- 氟苯基)-6- 异丙基 -2-(N- 甲基 -N- 甲磺酰胺基)-5- 嘧啶]-3,5- 二羟基 -6- 庚烯酯基 }- 丁酸辛酯 (**P**3-**Rosu**) 的合成

合成方法参照“2.3.3”项。

2.3.7　(4- 乙基 -2- 肟基 -5- 硝基 -3- 烯 -1- 基)-4-{(3R, 5R)-7-[2-(4- 氟苯基)-5- 异丙基 -3- 苯基 -4-(苯胺羰基) 吡咯 -1- 基]-3,5- 二羟基庚酯基 }- 丁酸己酯 (M-Ato) 的合成

将 [(E,E)-4- 乙基 -2,4- 二烯 -1- 基]-4-{(3R,5R)-7-[2-(4- 氟苯基)-5- 异丙基 -3- 苯基 -4-(苯胺羰基) 吡咯 -1- 基]-3,5- 二羟基庚酯基 }- 丁酸己酯 (0.66g, 0.88mmol)、$NaNO_2$(0.36g, 5.28mmol)、甲醇 15mL、水 10mL 混合，向上述混合液中缓慢滴加 6mol/L HCl(1.13mL, 6.50mmol)，室温搅拌 30min，反应液用乙酸乙酯萃取，有机层用饱和食盐水洗后，无水硫酸镁干燥，浓缩，浓缩液用硅胶柱层析 (洗脱剂：乙酸乙酯 / 环己烷 =1/1)，得 104.20mg 浅黄色油状物。ESI-MS(*m/z*)：829.9$[M+H]^+$, $C_{45}H_{53}FN_4O_{10}$ (MW=828.4)。^{1}H NMR(400MHz, $CDCl_3$, 25 ℃)δ(ppm)：7.27~7.12(9H, m); 7.06(2H, *J*=8Hz, d); 7.02~6.96(3H, m); 6.87(1H, s); 6.02(1H, s); 5.15(1H, *J*=6.8Hz, q); 4.75(2H, *J*=5.2Hz, t); 4.22~4.06(4H, m); 3.98~3.92(1H, m); 3.80~3.65(2H, m); 3.56(2H, *J*=7.2Hz, t); 2.48~2.36(4H, m); 2.22~2.18(2H, m); 1.98~1.94(2H, m); 1.75~1.60(2H, m); 1.72(3H, *J*=6.8Hz, d); 1.59~1.42(2H, m); 1.53(6H, *J*=7.2Hz, d); 1.06(3H, *J*=7.6Hz, t)。

2.3.8　(4- 乙基 -2- 肟基 -5- 硝基 -3- 烯 -1- 基)-4-{(3R, 5R, 6E)-7-[2- 环丙基 -4-(4- 氟代苯基) 喹啉 -3- 基]-3,5- 二羟基 -6- 庚烯酯基 }- 丁酸己酯 (**M-Pita**) 的合成

将 [(E,E)-4- 乙基 -2,4- 二烯 -1- 基]-4-{(3R,5R,6E)-7-[2- 环丙基 -4-(4- 氟代苯基) 喹啉 -3- 基]-3,5- 二羟基 -6- 庚烯酯基 }- 丁酸己酯 (0.52g, 0.85mmol)、$NaNO_2$(0.35g, 5.10mmol)、甲醇 24mL、水 9mL 混合，向上述混合液中缓慢滴加 6mol/L HCl(0.68mL, 4.08mmol)，室温搅拌 30min，反应液用乙酸乙酯萃取，有机层用饱和食盐水洗后，干燥，浓缩，浓缩液用硅胶柱层析 (洗脱剂：乙酸乙酯 / 环己烷 =1/1)，得 62.10mg 浅黄色油状物。ESI-MS(*m/z*)：692.2$[M+H]^+$, $C_{37}H_{42}FN_3O_9$ (MW=691.3)。^{1}H NMR(400MHz, $CDCl_3$, 25 ℃)δ(ppm)：7.96(1H, *J*=7.6Hz, d); 7.59(1H, *J*=7.0Hz, t); 7.36~7.28(2H, m); 7.21~7.13(4H, m); 6.63(1H, *J*=16.0Hz, d); 6.03(1H, s); 5.57(1H, *J*=16.0Hz, 6.4Hz, dd); 5.16(1H, *J*=6.8Hz, q); 4.76(2H, *J*=5.2Hz, t); 4.40(1H, s); 4.24~4.09(4H, m); 3.82(1H, s); 3.32(1H, s); 2.50~2.24(2H, m); 2.44(2H, *J*=8.6Hz, t); 2.20(2H, *J*=1.2Hz, q); 2.05~1.98(2H, m); 1.72(3H, *J*=6.8Hz, d); 1.64~1.42(2H, m); 1.35~1.24(1H, m); 1.08~0.95(4H, m), 1.07(3H, *J*=7.2Hz, t)。

2.3.9　(4- 乙基 -2- 肟基 -5- 硝基 -3- 烯 -1- 基)-4-{(3R, 5R, 6E)-7-[4-(4- 氟苯基)-6- 异丙基 -2-(N- 甲基 -N- 甲磺酰胺基)-5- 嘧啶]-3,5- 二羟基 -6- 庚烯酯基 }- 丁酸己酯 (M-Rosu) 的合成

将 [(E,E)-4- 乙基 -2,4- 二烯 -1- 基]-4-{(3R, 5R, 6E)-7-[4-(4- 氟苯基)-6- 异丙基 -2-(N- 甲基 -N- 甲磺酰胺基)-5- 嘧啶]-3,5- 二羟基 -6- 庚烯酯基 }- 丁酸己酯 (0.40g, 0.60mmol)、$NaNO_2$(0.50g, 7.20mmol)、甲醇 24mL、水 9mL 混合，向上述混合液中缓慢滴加 6mol/L HCl(0.96mL, 5.76mmol)，室温搅拌 30min，反应液用乙酸乙酯萃取，有机层用饱和食盐水洗后，无水硫酸镁干燥，浓缩，浓缩液用硅胶柱层析 (洗脱剂：乙酸乙酯 / 环己烷 =1/1)，得 84.30mg 浅黄色油状物。ESI-MS(*m/z*)：752.8$[M+H]^+$,

$C_{34}H_{46}FN_5O_{11}S$ (MW=751.3)。^1H NMR(400MHz, $CDCl_3$, 25 ℃)δ(ppm)：7.63(2H, *J*=8.0Hz, t); 7.08(2H, *J*=8.6Hz, t); 6.62(1H, *J*=15.6Hz, d); 6.00(1H, s); 5.44(1H, *J*=17.3Hz, 9.2Hz, dd); 5.17~4.94(3H, m); 4.46(1H, s); 4.19(1H, s); 4.17(2H, *J*=9.2Hz, t); 3.56(3H, s); 3.51(3H, s); 3.39~3.32(1H, m); 2.54~2.20(6H, m); 2.15~1.95(2H, m); 1.73(3H, *J*=7.2Hz, d); 1.61~1.44(2H, m); 1.25(6H, *J*=6.4Hz, d); 1.14~1.02(3H, m)。

2.3.10 (4- 乙基 -2- 肟基 -5- 硝基 -3- 烯 -1- 基)-4-{(3R, 5R)-7-[2-(4- 氟苯基)-5- 异丙基 -3- 苯基 -4-(苯胺羰基) 吡咯 -1- 基]-3,5- 二羟基庚酯基 }- 丁酸辛酯 (**P-Ato**) 的合成

将 [(E,E)-4- 乙基 -2,4- 二烯 -1- 基]-4-{(3R, 5R)-7-[2-(4- 氟苯基)-5- 异丙基 -3- 苯基 -4-(苯胺羰基) 吡咯 -1- 基]-3,5- 二羟基庚酯基 }- 丁酸辛酯 (1.60g, 2.05mmol)、$NaNO_2$(0.85g, 12.30mmol)、甲醇 30mL、水 20mL 混合，向上述混合液中缓慢滴加 6mol/L HCl(1.67mL, 10mmol)，室温搅拌 30min，反应液用乙酸乙酯萃取，有机层用饱和食盐水洗后，无水硫酸镁干燥，浓缩，浓缩液用硅胶柱层析 (洗脱剂：乙酸乙酯 / 环己烷 =1/1)，得 0.24g 浅黄色油状物。ESI-MS(*m/z*)：857.9$[M+H]^+$, $C_{47}H_{57}FN_4O_{10}$ (MW=856.4)。^1H NMR(400MHz, $CDCl_3$, 25℃)δ(ppm)：7.20~7.12(9H, m); 7.06(2H, *J*=8.0Hz, d); 7.02~6.97(3H, m); 6.87(1H, s); 6.05(1H, s); 5.00(1H, *J*=6.0Hz, q); 4.74(2H, s); 4.22~4.06(4H, m); 3.98~3.90(1H, m); 3.79~3.66(2H, m); 3.57~3.53(2H, m); 2.46~2.38(2H, m); 2.43(2H, *J*=8.8Hz, t); 2.29~2.16(3H, m); 1.98~1.90(2H, m); 1.92~1.82(1H, m); 1.73~1.62(2H, m); 1.59~1.42(2H, m); 1.53(6H, *J*=7.2Hz, d); 1.38(2H, m); 1.05(3H, *J*=7.6Hz, t); 0.98(3H, *J*=7.4Hz, t)。

2.3.11 (4- 乙基 -2- 肟基 -5- 硝基 -3- 烯 -1- 基)-4-{(3R, 5R, 6E)-7-[2- 环丙基 -4-(4- 氟代苯基) 喹啉 -3- 基]-3,5- 二羟基 -6- 庚烯酯基 }- 丁酸辛酯 (**P-Pita**) 的合成

将 [(E,E)-4- 乙基 -2,4- 二烯 -1- 基]-4-{(3R,5R,6E)-7-[2- 环丙基 -4-(4- 氟代苯基) 喹啉 -3- 基]-3,5- 二羟基 -6- 庚烯酯基 }- 丁酸辛酯 (1.40g, 2.18mmol)、$NaNO_2$(0.90g, 13.06mmol)、甲醇 30mL、水 20mL 混合，向上述混合液中缓慢滴加 6mol/L HCl(1.67mL, 10mmol)，室温搅拌 30min，反应液用乙酸乙酯萃取，有机层用饱和食盐水洗后，无水硫酸镁干燥，浓缩，浓缩液用硅胶柱层析 (洗脱剂：乙酸乙酯 / 环己烷 =1/1)，得 0.34g 浅黄色油状物。ESI-MS(*m/z*)：720.8$[M+H]^+$, $C_{39}H_{46}FN_3O_9$ (MW=719.3)。^1H NMR(400MHz, $CDCl_3$, 25 ℃) δ(ppm)：7.96(1H, *J*=8.4Hz, d); 7.59(1H, s); 7.36~7.28(2H, m); 7.21~7.13(4H, m); 6.63(1H, *J*=12Hz, d); 6.06(1H, s); 5.57(1H, *J*=15.8Hz, 6.2Hz, dd); 5.00(1H, *J*=8.8Hz, q); 4.75(2H, s); 4.40(1H, s); 4.24~4.09(4H, m); 3.82(1H, s); 3.32(1H, s); 2.53~2.24(4H, m); 2.30~2.12(3H, m); 2.04~1.94(2H, m); 1.96~1.82(1H, m); 1.64~1.42(2H, m); 1.42~1.24(3H, m); 1.08~0.95(4H, m); 1.07~0.85(6H, m)。

2.3.12 (4- 乙基 -2- 肟基 -5- 硝基 -3- 烯 -1- 基)-4-{(3R, 5R,6E)-7-[4-(4- 氟苯基)-6- 异丙基 -2-(N- 甲基 -N- 甲磺酰胺基)-5- 嘧啶]-3,5- 二羟基 -6- 庚烯酯基 }- 丁酸辛酯 (**P-Rosu**) 的合成

将 [(E,E)-4- 乙基 -2,4- 二烯 -1- 基]-4-{(3R,5R,6E)-7-[4-(4- 氟苯基)-6- 异丙基 -2-(N- 甲基 -N- 甲磺酰胺基)-5- 嘧啶]-3,5- 二羟基 -6- 庚烯酯基 }- 丁酸辛酯 (0.60g, 0.85mmol)、$NaNO_2$(0.35g, 5.11mmol)、甲醇 15mL、水 10mL 混合，向上述混合液中缓慢滴加 6mol/L HCl(0.84ml, 5.00mmol)，室温搅拌 30min，反应液用乙酸乙酯萃取，有机层用饱和食盐水洗后，无水硫酸镁干燥，浓缩，浓缩液用硅胶柱层析 (洗脱剂：乙酸乙酯 / 环己烷 =1/1)，得 38.60mg 浅黄色油状物。ESI-MS(*m/z*)：780.8$[M+H]^+$, $C_{36}H_{50}FN_5O_{11}S$ (MW=779.3)。^1H NMR(400MHz, $CDCl_3$, 25 ℃) δ(ppm)：7.65(2H, *J*=8.4Hz, t); 7.09(2H, *J*=8.6Hz, t); 6.64(1H, *J*=16Hz, d); 6.03(1H, s); 5.45(1H, *J*=7.8Hz, d); 5.01~4.89(1H, m); 4.46(1H, s); 4.40~4.08(3H, m); 3.77~3.58(2H, m); 3.57(3H, s); 3.52(3H, s); 3.40~3.34(1H, m); 2.52~2.39(2H, m); 2.46(2H, *J*=13.2Hz, t); 2.43~2.41(2H, m); 2.40~2.16(2H, m); 2.05~1.98(1H, m); 1.82~1.74(1H, m); 1.61~1.44(2H, m); 1.39~1.30(2H, m); 1.26(6H, *J*=6.4Hz, d); 1.15~0.92(6H, m)。

3 NO 释放活性测定

目标化合物通过亚硝酸盐 - 硝酸盐法进行体外 NO 释放活性测定。有机硝酸酯类 NO 供体需在含巯基化合物如 L- 半胱氨酸或谷胱甘肽等的参与下才能释放 NO，因其释放 NO 的机制是在助释剂的作用下通过巯基对硝酸酯基团的 N 原子进行亲核进攻，从而释放 NO[9]。与有机硝酸酯类或其他类 NO 供体不同，根据以上讨论的 FK409 类供体 NO 释放机制，

目标化合物的 NO 释放无需在含巯基化合物的参与下进行，仅需在弱碱性条件即可。释放出的 NO 化学性质活泼，在水溶液或富氧条件下很容易被氧化成亚硝酸盐，再发生重氮化、偶合反应产生玫瑰红色的化合物，该偶联产物在 548nm 波长处具有特定强吸收峰，根据测定的紫外吸收数据，从而间接计算出目标化合物释放 NO 的量。

分别测试 6 个目标化合物，测试浓度为 0.10mmol/L，将测得紫外吸收数据，通过标准溶液回归方程换算成 NO 浓度见表 1。

从表 1 可以看出 FK409 类 NO 供体型他汀衍生物释放 NO 具有一定的梯度，在 1~5h 内随时间的增长，释放 NO 的总量在增加。选取释放 NO 量适当的目标物 M-Rosu 作图 (图 6)。

以 6 个目标化合物在 6h 内释放 NO 的总量计算释放百分率见表 2。从表 2 可看出化合物 **M-Pita** 释放 NO 百分率比其他衍生物要高，能在较长时间内仍具有 NO 释放活性。

另外，通过以上 FK409 类 NO 供体型他汀衍生物 NO 释放结果的比较，R^3 位置的结构修饰对 NO 的释放发挥着至关重要的作用。

该类 NO 供体型他汀衍生物虽然释放 NO 百分率有差异，但在较长时间内均具有释放活性，这种特性对于延长潜在药物在体内代谢的半衰期，延长作用时间具有重要的研究意义。

NO 释放机制 [1,8,10]：本文合成的 6 个目标化合物，其 NO 供体部分在体内释放 NO 具有明确的机制，该类供体结构中，因硝基的强吸电子诱导效应而使 α-H 具有一定的酸性，在碱性 (RS^-, OH^-) 条件下 α-H 容易被夺去，生成一对互变异构体，再经过生物转化释放 NO(图 7)。根据以上机制，该类供体化合物设计主要是增大 R^1 和 R^2 位的空间位阻来控制 α-H 的酸性，从而延长供体在体内的半衰期，即延长作用时间。FK409 类似物的构效关系决定了该类供体释放 NO 具有一定可控性。

表 1　不同时间内 (min) 释放的 NO 的浓度

Tab.1　The concentration of the NO which target chemicals release in different time

目标	不同时间内 (min) 释放 NO 的浓度 /(10^{-5}mol/L)											
化合物	20	60	80	120	140	160	180	200	240	280	320	360
M-Ato	0.09	0.31	0.57	0.94	1.19	1.42	1.64	1.82	2.23	3.00	3.67	3.67
M-Pita	0.34	0.60	0.75	1.01	1.45	1.57	1.75	1.86	2.93	3.67	4.11	4.30
M-Rosu	0.23	0.53	0.64	1.05	1.23	1.34	1.50	1.67	1.97	2.38	2.49	2.52
P-Ato	0.20	0.34	0.49	0.66	0.82	0.90	1.01	1.05	1.05	1.05	1.16	1.16
P-Pita	0.01	0.20	0.38	0.64	0.79	0.94	1.05	1.08	1.16	1.16	1.27	1.27
P-Rosu	0.31	0.50	0.60	0.86	0.97	1.01	1.01	1.05	1.05	1.08	1.08	1.08

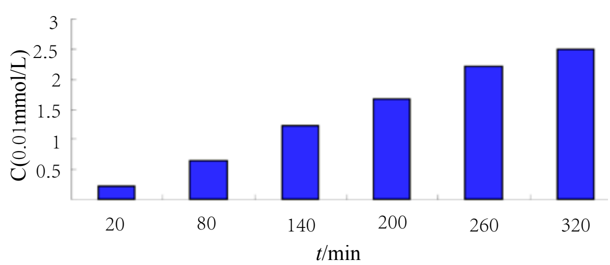


图 6　化合物 M-Rosu(7) 释放 NO 总量随时间变化图

Fig. 6　The figure that the total amount of NO released by the compound M-Rosu (7) change over time

表 2　目标化合物体外释放 NO 百分率

Tab. 2　The percentage of NO released by the target compound *in vitro*

实施例化合物	NO 释放百分率 (以 6h 计)/%
M-Ato	36.70
M-Pita	43.00
M-Rosu	25.20
P-Ato	11.60
P-Pita	12.70
P-Rosu	10.80

4　结论

本文选择 FK409 类 NO 供体，设计其与他汀类降血脂药物 (阿托伐他汀、匹伐他汀和瑞舒伐他汀) 进行偶联的 6 个全新的 NO 供体型他汀类衍生物，并成功合成得到 6 个目标产物，部分中间体及目标产物的结构经 ESI-MS、^{1}H NMR 确证。体外 NO 释放活性评价结果表明：目标化合物具有良好的 NO 释放活性，通过结构修饰可使其 NO 释放具有一定的可控性，为进一步研究新型 NO 供体型他汀药物提供参考。

参考文献

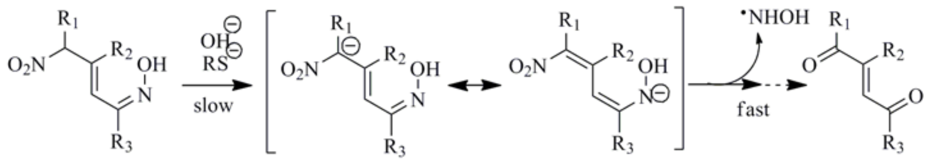


图 7 NO 释放机制

Fig.7 The mechanism of NO release

[1] Shinichi F, Yoshimi H, Yasuko K. Structure activity relationships of spontaneous nitric oxide releasers, FK409 and its derivatives[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997, 282(1): 236-242.

[2] 张奕华 , 彭司勋 . 一氧化氮供体型创新药物的研究进展 [J]. 中国药科大学学报 , 2006, 37(5): 387-396.

[3] Masayuki K, Shlgetaka N, Mitsuko O. New reagents for controlled release of nitric oxide, structure-stability relationships[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 1996, 6(1): 33-38.

[4] Kato M, Nishino S, Hamano M, *et al*. Nitro compounds having vasodilator activity: WO, 9310097[P]. 1993-05-27.

[5] Hino M, Iwami M, Okamoto M, *et al*. FK409, A novel vasodilator isolated from the acid-treated fermentation broth of streptomyces griseosporeus Ⅰ. Taxonomy, fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics[J]. *J Antibiot*, 1989, 42(11): 1578-1583.

[6] Hino M, Ando T, Takase S, *et al*. FK409, A novel vasodilator isolated from the acid-treated fermentation broth of streptomyces griseosporeus Ⅱ. Structure of FK409 and its precursor FR-900411[J]. *J Antibiot*, 1989, 42(11): 1584-1588.

[7] Fukuyama S, Kita Y, Hirasawa Y, *et al*. A new nitric oxide (NO) releaser: spontaneous NO release from Fk409[J]. *Free Rad Res*, 1995, 23(5): 443-452.

[8] Kita Y, Ohkubo K, Hirasawa Y, *et al*. FR144420, a novel, slow, nitric oxide-releasing agent[J]. *Eur J Pharmacol*, 1995, 275(2): 125-130.

[9] 薛雨 , 曾其炀 , 陈宇瑛 . NO 供体及偶联药物研究进展 [J/OL]. 中国抗生素杂志 : 1-11[2019-01-17]. https://doi.org/10.13461/j.cnki.cja.006381.

[10] Keizo Y, Yasuhiro K. Hydroxyimine NO-Donors; FK409 and Derivatives[J]. *Curr Top Med Chem*, 2005, 5(7): 675-685.