



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103012231 B

(45) 授权公告日 2015. 08. 05

(21) 申请号 201210541873. 4

(22) 申请日 2012. 12. 14

(73) 专利权人 沈阳药科大学

地址 110136 辽宁省沈阳市沈北新区道义大街 168 号

专利权人 辽宁药联制药有限公司

(72) 发明人 王钝 于航 毕璟璐 陶润红 毕洪书

(74) 专利代理机构 沈阳杰克知识产权代理有限公司 21207

代理人 李宇彤

(51) Int. Cl.

C07D 207/12(2006. 01)

A61K 31/40(2006. 01)

A61P 1/04(2006. 01)

(56) 对比文件

US 20020173536 A1, 2002. 11. 21, 说明书第 1 页右栏第 0007 段第 1-5 行, 第 4 页右栏第 0050 段-第 5 页 0055 段, 第 9 页右栏第 0120 段, 第 10

页左栏第 0124 段, 第 0128 段, 第 0132 段.

US 20020173536 A1, 2002. 11. 21,

WO 0023414 A2, 2000. 04. 27, 说明书第 14 页 实施例 1.

CN 1188471 A, 1998. 07. 22, 说明书第 53 页 第 4-15 行.

CN 101759619 A, 2010. 06. 30, 说明书第 4 页 第 0039、0042、0047 段, 实施例 1-3.

US 2956062 A, 1960. 10. 11, 表 1.

WO 2006003078 A1, 2006. 01. 12, 实施例.

US 20070123557 A1, 2007. 05. 31,

Wu, W.-M 等. Stereoisomers of N-substituted soft anticholinergics and their zwitterionic metabolite based on glycopyrrolate syntheses and pharmacological evaluations. 《Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences》. 2008, 第 63 卷 (第 3 期),

审查员 李小宏

权利要求书1页 说明书14页 附图6页

(54) 发明名称

格隆溴铵手性对映体的制备方法和应用

(57) 摘要

本发明属于医药技术领域,公开了一种毒蕈碱受体拮抗剂外消旋药物格隆溴铵的(3S,2'S)、(3S,2'R)、(3R,2'R)及(3R,2'S)型四种手性单体的制备方法,以L-酪氨酸甲酯、(R)-α-苯乙胺为拆分试剂,采用化学拆分法对消旋α-环戊基扁桃酸进行拆分,分别制得(S)-α-环戊基扁桃酸、(R)-α-环戊基扁桃酸,酯化反应后分别得到手性中间体(S)/(R)-α-环戊基扁桃酸甲酯。分别以L/D-苹果酸为原料,采用手性合成的途径,经缩合、羰基还原、催化氢化或转移氢化还原脱苄、还原烃化或卤代烷烃化,共四步反应制得另一重要手性中间体(S)/(R)-N-甲基-3-羟基吡咯烷。以上手性中间体再经酯交换、季铵化反应分别制得四种(3S,2'S)、(3S,2'R)、(3R,2'R)及(3R,2'S)型格隆溴铵手性单体。结果表明(3R,

2'S)-格隆溴铵具有最强的胆碱能拮抗作用。

1. 格隆溴铵手性对映体的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 手性 α -环戊基扁桃酸的制备;

以消旋 α -环戊基扁桃酸为原料,采用化学拆分法制备手性 α -环戊基扁桃酸;其步骤如下:

(a) 以消旋 α -环戊基扁桃酸为原料,以L-酪氨酸甲酯为拆分试剂,采用的手性助剂为乙腈、丙腈、丁腈,经化学拆分得到(S)- α -环戊基扁桃酸-L-酪氨酸甲酯配合物粗品,重结晶后得到的(S)- α -环戊基扁桃酸-L-酪氨酸甲酯配合物;

消旋 α -环戊基扁桃酸与L-酪氨酸甲酯的比为1:0.5~5;

(b) 将步骤(a)得到的(S)- α -环戊基扁桃酸-L-酪氨酸甲酯配合物溶解于水中,然后再加入无机酸调pH值至酸性,抽滤得到白色固体(S)- α -环戊基扁桃酸;

(c) 步骤(a)中的拆分母液用无机酸调pH值至酸性,抽滤得固体(R)- α -环戊基扁桃酸粗品,以R-(+)- α -苯乙胺为拆分试剂进行化学拆分,采用甲苯为手性助剂,经化学拆分得到(R)- α -环戊基扁桃酸-(R)-苯乙胺配合物;

(R)- α -环戊基扁桃酸粗品(R)- α -环戊基扁桃酸-L-酪氨酸甲酯配合物游离产物与R-(+)- α -苯乙胺的比为1:1~5;

(d) 将步骤(c)得到的(R)- α -环戊基扁桃酸-(R)-苯乙胺配合物悬浮在乙醚中,无机酸调pH值至酸性,分出有机相,将有机相用碳酸钠水溶液萃取,合并水相,用无机酸调节pH值至酸性,得到白色固体(R)- α -环戊基扁桃酸;

(2) 手性N-甲基吡咯烷-3-醇的制备;

采用手性(L/D)-苹果酸为原料,与苄胺发生环合反应,继而还原、脱苄、烃化,制得(R/S)-N-甲基吡咯烷-3-醇;其具体反应过程如下:

以L-苹果酸、苄胺为起始原料,经缩合反应制得(S)-N-苄基-3-羟基丁二酰亚胺,采用硼烷或金属复氢化合物制得(S)-N-苄基吡咯烷-3-醇,采用催化氢化或转移氢化制得(S)-3-羟基吡咯烷,最后采用还原烃化或卤代烷烃化反应制得(S)-N-甲基吡咯烷-3-醇;相应地,制备(R)-N-甲基吡咯烷-3-醇;

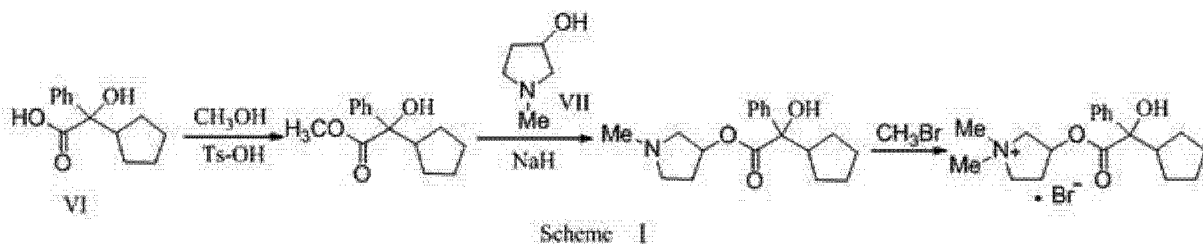
L/D-苹果酸与苄胺的摩尔配比为1:0.5~3;

还原烃化反应的试剂为多聚甲醛,(S)/(R)-3-羟基吡咯烷:多聚甲醛=1:(1~15);

卤代烷烃化反应的试剂,选自氯甲烷、溴甲烷或碘甲烷,(S)/(R)-3-羟基吡咯烷:卤代烷=1:(1~5);

(3) 格隆溴铵手性对映体的制备:

采用制得的(R)/(S)- α -环戊基扁桃酸、(R)/(S)-N-甲基吡咯烷-3-醇为原料,经甲酯化、酯交换、季铵化制得;



格隆溴铵手性对映体的制备方法和应用

技术领域

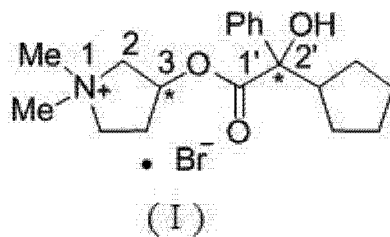
[0001] 本发明属于医药技术领域,涉及外消旋药物毒蕈碱受体拮抗剂格隆溴铵四种手性对映体的制备及它们对毒蕈碱受体拮抗作用的研究。

背景技术

[0002] 格隆溴铵 (Glycopyrronium Bromide) 为季铵类抗胆碱药,美国药典收载品种,是毒蕈碱型受体 (M 受体) 拮抗剂。M 受体拮抗剂又称 M 受体阻断剂,它能阻断神经节后胆碱能神经支配的效应器上的胆碱受体,竞争性的拮抗中枢和外周的 M 受体,通过阻断乙酰胆碱或胆碱受体激动剂与受体结合而产生拮抗作用。M 受体拮抗剂的药理作用主要作用在心脏、眼部、腺体、胃肠道、呼吸道、内脏平滑肌等主要器官。

[0003] 格隆溴铵口服给药后,具有抑制胃液分泌及调节胃肠蠕动作用,适用于胃及十二指肠溃疡、慢性胃炎、胃液分泌过多等症;在手术麻醉前静注或肌注给药,则用于抑制术中腺体分泌,作用可以持续约 7 小时,国内上市剂型为片剂,商品名叫胃长宁。临床研究表明,本品具有比阿托品更强的抗唾液分泌作用,同时因结构为季铵盐,不能通过血脑屏障,故无中枢性抗胆碱活性。格隆溴铵结构中含有两个手性碳原子,存在两对对映异构体 ((3R, 2' R)/(3S, 2' S), (3S, 2' R)/(3R, 2' S)), 即四个手性对映体,国内外已上市产品均为各对映体的混合物,即为外消旋药物,其结构如 (I) 所示。

[0004]



[0005] 手性是自然界的一种普遍现象,构成生物体的基本物质如氨基酸、糖类等都是手性分子。手性异构体 (对映体) 在药物中占有很大的比例,据统计,已知药物中约有 30%-40% 是具手性的,但经由化学合成得到的药物往往是消旋体,且不经拆分直接给药。当药物分子存在手性中心时,其光学异构体的物理化学性质基本相同,但是由于药物分子所作用的受体或靶位是氨基酸、核苷、膜等组成的手性蛋白质和核酸大分子等,它们对与其结合的药物分子的空间立体构型有一定要求,即手性药物与生命体中的药物靶点发生作用时具有显著的立体选择性,因此,对映体药物在体内往往呈现很大的药效学、药动学的差异,毒理作用的表现也会不同甚至完全相反。随着人们对手性药物对映体之间生物活性差异的认识,逐渐意识到发展单一对映体药物的重要性,现在世界上各大制药公司对单一对映体药物的日益重视不仅反映在新药开发上,也包括对已上市外消旋药物进行外消旋转换,也就是将已上市的外消旋药物再开发成为单一异构体药物。由于在外消旋体药物的基础上再开发单一对映体药物,比开发一个全新药物更省时省钱,且单一对映体药物可能疗效更好、安全性更

高、毒副反应较少,有可能使销售额大大增加。因此,外消旋转换为手性药物开发最具前景的途径。

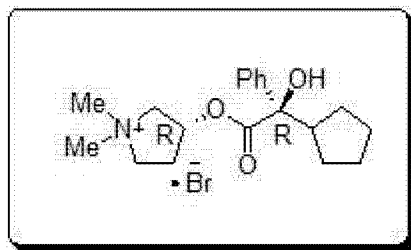
[0006] 本专利针对外消旋药物格隆溴铵展开研究,探讨它的四个手性对映体的制备方法,考察各手性对映体对 M 受体拮抗作用的差异,尝试发现优势对映体,探索格隆溴铵作为手性单一药物开发的可能性。

发明内容

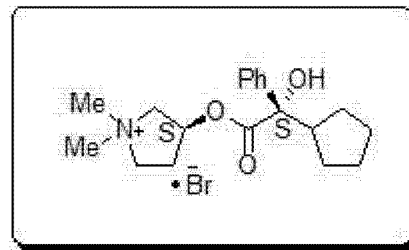
[0007] 本发明的目的是提供外消旋药物毒蕈碱受体拮抗剂格隆溴铵四个手性对映体及其制备方法和应用。

[0008] 本发明所述的格隆溴铵手性对映体,其结构通式如下(II)-(V)。

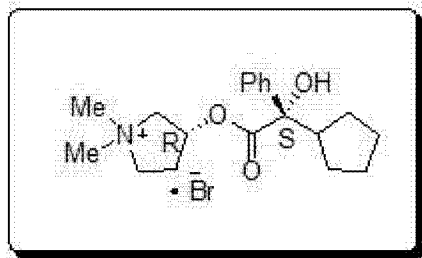
[0009]



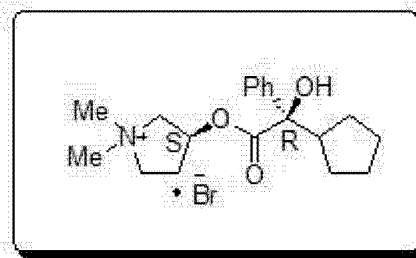
II (3R, 2'R)



III (3S, 2'S)



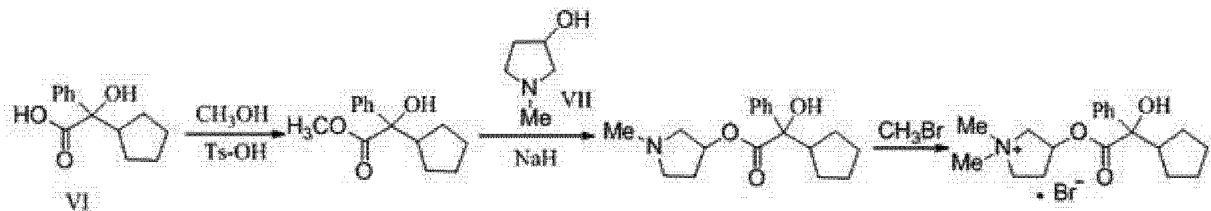
IV (3R, 2'S)



V (3S, 2'R)

[0010] 根据已有的文献(US 2956062),格隆溴铵可以采用 α -环戊基扁桃酸(VI)、*N*-甲基吡咯烷-3-醇(VII)为原料,经酯化、酯交换、季铵化制得,路线如 scheme I 所示。

[0011]



Scheme I

[0012] α -环戊基扁桃酸(VI)和 *N*-甲基吡咯烷-3-醇(VII)的结构中各含有一个手性碳原子,故均由一对对映体异体组成,这两个手性碳原子构成了格隆溴铵结构中的两个手性中心。因此,针对格隆溴铵手性对映体的制备,首先分别制得手性 α -环戊基扁桃酸,即(R)- α -环戊基扁桃酸(R-VI)和(S)- α -环戊基扁桃酸(S-VI),手性 *N*-甲基吡咯

烷-3-醇,即(R)-*N*-甲基吡咯烷-3-醇(R-VII)和(S)-*N*-甲基吡咯烷-3-醇(S-VII),再经由 scheme I 所示的路线完成目标手性对映体的制备。详细叙述如下:

[0013] I. 手性 α -环戊基扁桃酸的制备

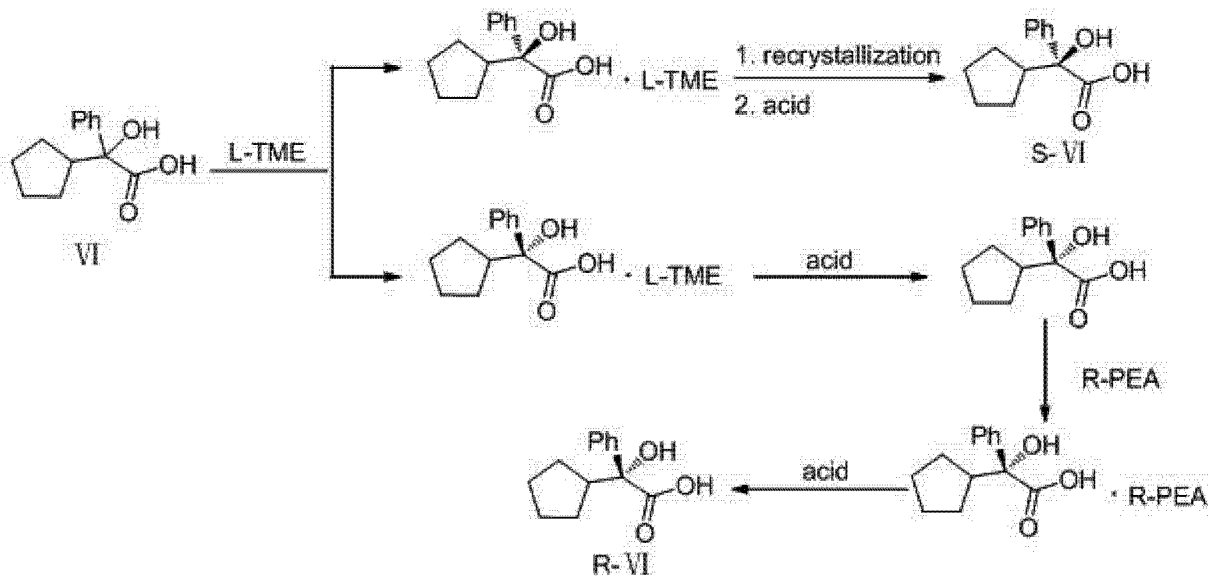
[0014] 以消旋 α -环戊基扁桃酸(VI)为原料,采用化学拆分法制备手性 α -环戊基扁桃酸,拆分用的手性试剂是L-酪氨酸甲酯(L-TME)、R-(+)- α -苯乙胺(R-PEA),拆分用的手性助剂有乙腈、丙腈、丁腈、异丁腈、甲苯等。

[0015] 第一步,以消旋 α -环戊基扁桃酸为原料,其中消旋 α -环戊基扁桃酸(VI)、L-酪氨酸甲酯的配比为1:0.5~5,消旋 α -环戊基扁桃酸溶于手性助剂中,加入L-酪氨酸甲酯,回流搅拌反应,反应结束后,冷却析晶,抽滤,得到固体,滤液备用。可采用的手性助剂可以是乙腈、丙腈、丁腈、异丁腈。

[0016] 第二步,将以上得到的固体用乙腈重结晶,得到的(S)- α -环戊基扁桃酸-L-酪氨酸甲酯配合物,将其溶解于水中,然后再加入无机酸调pH值至酸性,抽滤得到白色固体(S)- α -环戊基扁桃酸。

[0017] 第三步,第一步得到的滤液用无机酸调pH值至酸性,析出固体,抽滤,固体用甲苯溶解,加入R-(+)- α -苯乙胺,其中消旋 α -环戊基扁桃酸(VI)、R-(+)- α -苯乙胺的配比为1:1~5,搅拌下加热溶解,冷却析晶,将析出的固体悬浮在乙醚、正己烷、石油醚、乙酸乙酯任一种溶剂或任两种溶剂的混合溶剂中,加入无机酸调pH值至酸性,分出有机相,将有机相用碳酸钠水溶液萃取,合并水相,用无机酸调节pH值至酸性,得到白色固体(R)- α -环戊基扁桃酸。具体工作路线如 Scheme II 所示:

[0018]



Scheme II

[0019] II. 手性 *N*-甲基吡咯烷-3-醇的制备

[0020] 采用手性(L/D)-苹果酸为原料,与苄胺发生环合反应,继而还原、脱苄、烃化,制得(R/S)-*N*-甲基吡咯烷-3-醇。

[0021] 第一步,以L-苹果酸为原料,其中L-苹果酸与苄胺的摩尔配比为1:0.5~3。将上述两种物质加入到适量甲苯中,回流搅拌反应,反应结束后,蒸除溶剂,用二氯甲烷或甲

苯重结晶得白色晶体。

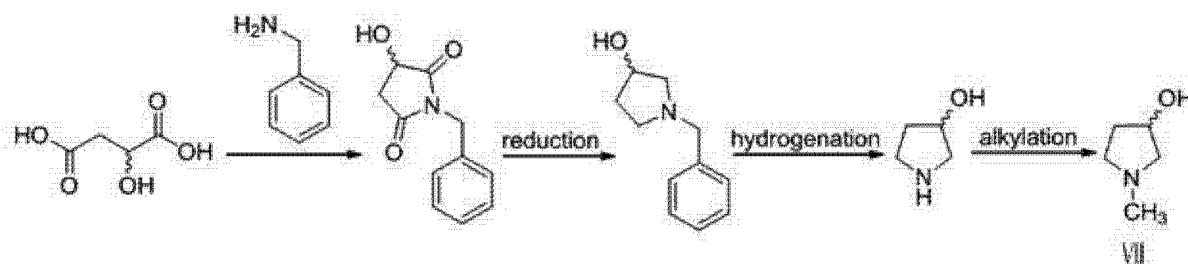
[0022] 第二步,上述所得固体,进行还原反应,采用的还原剂可以是乙硼烷和金属复氢化合物,金属复氢化合物包括但不限于氢化锂铝、硼氢化钠-乙酸、硼氢化钠-三氯化铝、氨基硼氢化钠等。

[0023] 第三步,将上步得到的还原产物溶于适量甲醇中,通入氢气,进行催化氢化反应,脱去苄基,采用的催化剂有钨/碳、钨黑、钨硫酸钡、氧化钨、氯化钨/碳、铂/碳、铂黑、二氧化铂、铑/碳、兰尼镍、瑞乃镍、载体镍、还原镍、硼化镍、亚铬酸铜等;或进行转移氢化反应脱去苄基,供氢体可采用甲酸铵、甲酸、环戊烯、环戊二烯、环己烯、环己二烯、四氢化萘、 α -蒎烯、乙醇、异丙醇、环己醇等。氢化还原反应结束后抽滤得到淡黄色油状物。

[0024] 第四步,将上步得到的油状物,以多聚甲醛为烃化试剂,以1:(1~15)的配比进行还原烃化反应,可采用的适宜的供氢体有:氢气、甲酸铵、甲酸、环戊烯、环戊二烯、环己烯、环己二烯、四氢化萘、 α -蒎烯、乙醇、异丙醇、环己醇;或者将上步得到的油状物与卤代烷以1:(1~5)的配比进行烃化反应,适宜的卤代烷有:氯甲烷、溴甲烷、碘甲烷。反应结束后经后处理得到目标产物。

[0025] 以上反应路线如 scheme III所示:

[0026]



[0027] III. 格隆溴铵手性对映体的制备

[0028] III-1. (3R, 2' R)-格隆溴铵(II)的制备

[0029] 采用以上制得的(R)- α -环戊基扁桃酸、(R)-N-甲基吡咯烷-3-醇为原料,按照Scheme I所示的路线,经甲酯化、酯交换、季铵化制得。

[0030] 第一步,甲酯化反应中,采用质子酸及路易斯酸为催化剂,可采用的质子酸包括但不限于:浓硫酸、氯化氢气体、多聚磷酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、三氟甲磺酸等,路易斯酸包括但不限于:三氯化铝、三氟化硼、三溴化硼、三氯化铁、五氯化铌等。

[0031] 第二步,酯交换反应中,采用碱性催化剂,适宜的催化剂有:金属钠、氢化钠、氨基钠、甲醇钠。

[0032] 第三步,季铵化反应中,采用卤甲烷,包括氯甲烷、溴甲烷、碘甲烷来制备季铵盐。

[0033] III-2. (3S, 2' S)-格隆溴铵(III)的制备

[0034] 采用以上制得的(S)- α -环戊基扁桃酸、(S)-N-甲基吡咯烷-3-醇为原料,按照Scheme I所示的路线,经酯化、酯交换、季铵化制得。

[0035] 第一步,甲酯化反应中,采用质子酸及路易斯酸为催化剂,可采用的质子酸包括但不限于:浓硫酸、氯化氢气体、多聚磷酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、三氟甲磺酸等,路易斯酸包括但不限于:三氯化铝、三氟化硼、三溴化硼、三氯化铁、五氯化铌等。

[0036] 第二步,酯交换反应中,采用碱性催化剂,适宜的催化剂有:金属钠、氢化钠、氨基

钠、甲醇钠。

[0037] 第三步,季铵化反应中,采用卤甲烷,包括氯甲烷、溴甲烷、碘甲烷来制备季铵盐。

[0038] III-3. (3R, 2' S)-格隆溴铵(IV)的制备

[0039] 采用以上制得的(S)- α -环戊基扁桃酸、(R)-N-甲基吡咯烷-3-醇为原料,按照 Scheme I 所示的路线,经酯化、酯交换、季铵化制得。

[0040] 第一步,甲酯化反应中,采用质子酸及路易斯酸为催化剂,可采用的质子酸包括但不限于:浓硫酸、氯化氢气体、多聚磷酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、三氟甲磺酸等,路易斯酸包括但不限于:三氯化铝、三氟化硼、三溴化硼、三氯化铁、五氯化铌等。

[0041] 第二步,酯交换反应中,采用碱性催化剂,适宜的催化剂有:金属钠、氢化钠、氨基钠、甲醇钠。

[0042] 第三步,季铵化反应中,采用卤甲烷,包括氯甲烷、溴甲烷、碘甲烷来制备季铵盐。

[0043] III-4. (3S, 2' R)-格隆溴铵(V)的制备

[0044] 采用以上制得的(R)- α -环戊基扁桃酸、(S)-N-甲基吡咯烷-3-醇为原料,按照 Scheme I 所示的路线,经酯化、酯交换、季铵化制得。

[0045] 第一步,甲酯化反应中,采用质子酸及路易斯酸为催化剂,可采用的质子酸包括但不限于:浓硫酸、氯化氢气体、多聚磷酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、三氟甲磺酸等,路易斯酸包括但不限于:三氯化铝、三氟化硼、三溴化硼、三氯化铁、五氯化铌等。

[0046] 第二步,酯交换反应中,采用碱性催化剂,适宜的催化剂有:金属钠、氢化钠、氨基钠、甲醇钠。

[0047] 第三步,季铵化反应中,采用卤甲烷,包括氯甲烷、溴甲烷、碘甲烷来制备季铵盐。

附图说明

[0048] 图 1-6 为消旋、市售格隆溴铵、(3S, 2' S)、(3R, 2' S)、(3R, 2' R) 及 (3S, 2' R) 豚鼠回肠加药前后 ACh 的累积量效曲线图 (n=6)。

[0049] 图 7 为豚鼠回肠加入六种药物 pA2 值比较。

[0050] 图 8-13 为消旋、市售格隆溴铵、(3S, 2' S)、(3R, 2' S)、(3R, 2' R) 及 (3S, 2' R) 豚鼠气管加药前后 ACh 的累积量效曲线图 (n=6)。

[0051] 图 14 为豚鼠气管加入六种药物 pA2 值比较。

具体实施方式

[0052] 实施例 1

[0053] 下面就发明内容举例说明,发明内容包括所举实例但不限于以下实例:

[0054] (S)-N-苄基-3-羟基丁二酰亚胺的制备

[0055] 33.50 g L-苹果酸悬浮于 300 mL 甲苯中,滴加 26.80 g 苄胺,加热回流反应,反应结束后,减压蒸除甲苯,用 50 mL 二氯甲烷重结晶得白色晶体 40.82 g (收率 79%), mp 104~106 °C; MS (m/z): 228 (M+H⁺); ¹H NMR (CD₃OD) δ : 2.48 (dd, 1H), 3.05 (dd, 1H), 6.13 (d, 1H), 7.25 (d, 3H), 7.32 (t, 2H)。

[0056] (S)-N-苄基吡咯烷-3-醇的制备

[0057] 7.10 g 氢化锂铝悬浮于 250 mL 无水四氢呋喃中,滴加 15.00 g (S)-N-苄基-3-羟

基丁二酰亚胺的 150 mL 无水四氢呋喃溶液,滴加完毕后加热回流。反应结束后将反应液冷却至 0 °C,滴加 7 mL 水,7 mL 4mol/L 氢氧化钠溶液,19 mL 水,抽滤,收集滤液,滤液用二氯甲烷萃取,收集有机相,无水硫酸钠干燥,减压蒸除溶剂得淡黄色油状物 9.86 g (收率 76 %),MS (m/z) : 178(M+H⁺) ;¹H NMR(*d*₆-DMSO) δ : 1.52-1.58 (m, 1H), 1.93-2.04 (m, 1H), 2.29-2.42 (m, 2H), 2.49-2.68 (m, 2H), 3.53 (d, 2H), 4.20 (s, 1H), 4.67 (s, 1H), 7.22-7.35 (m, 5H)。

[0058] (S)-3-羟基吡咯烷的制备

[0059] 16.00 g (S)-N-苄基吡咯烷-3-醇溶于 100 mL 甲醇中,加入 3.20 g 10 % 钯碳,脱入氢气室温搅拌反应,反应结束后,抽滤,减压蒸除溶剂得无色油状物 7.38 g (收率 93 %),MS (m/z) :88(M+H⁺) ;¹H NMR(*d*₆-DMSO) δ : 1.47-1.53 (m, 1H), 1.64-1.73 (m, 1H), 2.53-2.88 (m, 4H), 4.10-4.15 (m, 1H)。

[0060] (S)-N-甲基吡咯烷-3-醇(S-VII)的制备

[0061] 9.10 g (S)-3-羟基吡咯烷溶于 150 mL 四氢呋喃中,加入 3.50 g 多聚甲醛和 14.60 g 甲酸,回流反应,反应结束后将反应液冷却至 0 °C,加入 40 mL 10 mol/L 氢氧化钠溶液,用 100 mL 乙醚萃取,收集有机相,无水硫酸钠干燥,减压蒸尽溶剂得无色油状物 9.18 g (收率 87 %), $[\alpha]_D^{25} = +0.76^\circ$ (neat);MS (m/z) :102(M+H⁺) ;¹H NMR(CDCl₃) δ : 1.67-1.76 (m, 1H), 2.16-2.33 (m, 2H), 2.40 (s, 3H), 2.46-2.51 (dd, 1H), 2.62-2.66 (dd, 1H), 2.82-2.88 (m, 1H), 3.31 (brs, 1H), 4.29-4.35 (m, 1H)。

[0062] (R)-N-甲基吡咯烷-3-醇(R-VII)的制备

[0063] 以 D-苹果酸为起始原料制备,具体操作步骤与 (S)-N-甲基吡咯烷-3-醇(S-VII)的制备相同。

[0064] $[\alpha]_D^{25} = -0.80^\circ$ (neat);MS (m/z) :102(M+H⁺) ;¹H NMR(CDCl₃) δ : 1.46-1.56 (m, 1H), 1.92-2.03 (m, 1H), 2.22 (s, 3H), 2.23-2.25 (dd, 1H), 2.27-2.34 (m, 1H), 2.44-2.52 (dd, 1H), 2.57-2.62 (dd, 1H), 4.14-4.18 (m, 1H), 4.66 (brs, 1H)。

[0065] (S)-α-环戊基扁桃酸-L-酪氨酸甲酯配合物的制备

[0066] 14.50 g α-环戊基扁桃酸溶于加热至 60 °C 的 300 mL 乙腈中,加入 15.40 g L-酪氨酸甲酯(L-TME),升温至回流反应,反应结束后,冷却至室温后析出大量白色固体,抽滤后得白色固体 13.73 g,母液备用,白色固体用 930 mL 乙腈重结晶得 11.51 g (收率 84 %),mp. 144~ 146 °C。

[0067] (S)-α-环戊基扁桃酸(S-VI)的制备

[0068] 11.50 g (S)-α-环戊基扁桃酸-L-酪氨酸甲酯配合物溶于加热至 60 °C 的 575mL 水中,停止加热,待稍冷却后滴加盐酸,调至 pH 值至酸性,析出大量白色固体,冷却后抽滤,水洗,干燥得白色固体 5.77 g (收率 95 %),mp. 119~ 121 °C, $[\alpha]_D^{25} = +2.0^\circ$ (c=3.0 g/100 mL, MeOH)。HPLC 纯度为 99.7 % [Astec Cyclobond I 2000;流动相为 :1 mol/L 醋酸三乙铵-乙腈-水配比 1:150:49;检测波长为 230 nm]。

[0069] (R)-α-环戊基扁桃酸(R-VI)的制备

[0070] (S)-α-环戊基扁桃酸-L-酪氨酸甲酯配合物的制备中所得母液减压浓缩,得 16.50 g 油状物,溶于 575 mL 60 °C 水中,停止加热待稍冷却后滴加盐酸,调至 pH 值至酸

性,析出大量固体,冷却后抽滤,滤饼水洗,干燥得 5.80 g (R)- α -环戊基扁桃酸粗品。将粗品溶于 43 mL 甲苯中,室温下滴加 3.40 g (R)-(+)- α -苯乙胺,滴加完毕后,升温至 60 °C 反应,反应结束后,将反应液冷却至室温,有大量固体析出,抽滤,滤饼用 20 mL 石油醚洗涤,干燥得 8.10 g (R)- α -环戊基扁桃酸-(R)- α -苯乙胺配合物粗品。上述粗品用甲苯重结晶,得白色固体 7.47 g, $[\alpha]_D^{25} = -6.6^\circ$ ($c=3.0$ g/100 mL, 乙醇)。

[0071] 38.00 g (R)- α -环戊基扁桃酸-(R)- α -苯乙胺配合物悬浮于 150 mL 乙醚中,搅拌下缓慢滴加盐酸,至固体完全溶解,搅拌 0.5 小时,分出有机相,水层用 50 mL 乙醚洗涤,合并有机相,用饱和碳酸钠水溶液 200 mL、100 mL 萃取醚层,合并水层,抽滤,用盐酸调节 pH 值至酸性,有白色固体析出,静置,抽滤,减压干燥,得白色固体 20.19 g (收率 86.42 %), mp. 121~122 °C, $[\alpha]_D^{25} = -2.0^\circ$ ($c=3.0$ g/100 mL, 甲醇); HPLC 纯度为 99.9 % [Astec Cyclobond I 2000; 流动相为: 1 mol/L 醋酸三乙胺-乙腈-水配比 1:150:49; 检测波长为 230 nm]。

[0072] (S)- α -环戊基扁桃酸甲酯的制备

[0073] 3.30 g (S)- α -环戊基扁桃酸溶于 20 mL 甲醇中,加入 0.33 g 对甲苯磺酸,加热回流反应,反应结束后,减压蒸除甲醇,加入 10 mL 水,搅拌滴加饱和碳酸钠溶液,调节 pH 值至碱性,加入正己烷 (10 mL \times 2) 萃取,合并有机相,无水硫酸钠干燥,减压蒸除溶剂,得微黄色油状物 2.62g (收率 75 %), MS (m/z): 235 ($M+H^+$)。

[0074] (R)- α -环戊基扁桃酸甲酯的制备

[0075] 以 (R)- α -环戊基扁桃酸为原料,具体操作步骤与 (S)- α -环戊基扁桃酸甲酯的制备相同。

[0076] (3S, 2'S)-格隆溴铵(III)的制备

[0077] 安装有蒸馏装置的 100 mL 三颈瓶中加入 0.04 g 氢化钠,20 mL 正己烷,搅拌下加入 1.8 g (S)- α -环戊基扁桃酸甲酯,升温蒸馏,待有馏分蒸出时,滴加 20 mL 的 3.50 g (S)-N-甲基吡咯烷-3-醇(S-VII)正己烷溶液,滴毕加热至回流,反应过程中始终保持有馏份均匀馏出,并分三次加入 0.10 g 氢化钠,每次间隔 1h,同时不断补加正己烷以保持溶剂量不变。反应结束后,降温至室温,加入 20 mL 盐酸,抽滤,滤液分出水层,有机层加 10 mL 盐酸萃取,合并水层,用饱和碳酸钠水溶液调至 pH 碱性,析出油状物,用乙醚 (20 mL, 10 mL) 萃取,合并乙醚相,无水硫酸钠干燥,减压蒸除溶剂得浅黄色油状物 (3S, 2'S)- α -环戊基扁桃酸-N-甲基吡咯烷-3-酯 3.4 g (收率 75 %)。MS (m/z): 304 ($M+H^+$)。

[0078] 4.00 g (3S, 2'S)- α -环戊基扁桃酸-N-甲基吡咯烷-3-酯溶于 30 mL 丁酮中,冷却至 0 °C,冰盐浴冷却下,滴加质量分数为 50 % 的 5.02 g 溴甲烷-丁酮溶液,滴毕,搅拌至有白色固体析出,室温放置 24~36 小时,抽滤,干燥,得白色粗品,经乙腈重结晶得白色粉末状结晶 (3S, 2'S)-格隆溴铵 2.67 g (收率 51 %)。 $[\alpha]_D^{25} = -2.05^\circ$ ($c=3$ g/100 mL, H₂O); ¹H NMR(D₂O) δ : 1.13-1.24 (m, 1H), 1.48-1.68 (m, 7H), 2.26-2.36 (m, 1H), 2.68-2.77 (m, 1H), 2.84 (s, 3H), 3.05-3.18 (m, 4H), 3.45-3.60 (m, 3H), 3.66 (dd, 1H), 5.47 (m, 1H), 7.35 (t, 1H), 7.42 (t, 2H), 7.60 (dd, 2H)。

[0079] (3R, 2'R)-格隆溴铵(II)的合成

[0080] 以 (R)- α -环戊基扁桃酸甲酯和 (R)-N-甲基吡咯烷-3-醇为原料,具体操作步骤与 (3S, 2'S)-格隆溴铵的制备相同。

[0081] $[\alpha]_D^{25} = +2.00^\circ$ ($c=3$ g/100 mL, H_2O) ; 1H NMR(D_2O) δ : 1.13-1.26 (m, 1H), 1.45-1.70 (m, 7H), 2.28-2.33 (m, 1H), 2.68-2.76 (m, 1H), 2.84 (s, 3H), 3.10-3.18 (m, 4H), 3.45-3.60 (m, 3H), 3.66 (dd, 1H), 5.47 (m, 1H), 7.34 (t, 1H), 7.42 (t, 2H), 7.61 (dd, 2H)。

[0082] (3R, 2' S)-格隆溴铵(IV)的合成

[0083] 以(S)- α -环戊基扁桃酸甲酯和(R)-N-甲基吡咯烷-3-醇为原料,具体操作步骤与(3S, 2' S)-格隆溴铵的制备相同。

[0084] $[\alpha]_D^{25} = -15.0^\circ$ ($c=3$ g/100 mL, H_2O) ; 1H NMR(D_2O) δ : 1.19-1.23 (m, 1H), 1.50-1.69 (m, 7H), 2.04-2.12 (m, 1H), 2.60-2.70 (m, 1H), 3.00 (s, 3H), 3.07-3.12 (m, 1H), 3.16 (s, 3H), 3.52 (t, 2H), 3.69 (d, 1H), 3.81 (dd, 1H), 5.46 (m, 1H), 7.32-7.44 (m, 3H), 7.59 (dd, 2H)。

[0085] (3S, 2' R)-格隆溴铵(V)的合成

[0086] 以(R)- α -环戊基扁桃酸甲酯和(S)-N-甲基吡咯烷-3-醇为原料,具体操作步骤与(3S, 2' S)-格隆溴铵的制备相同。

[0087] $[\alpha]_D^{25} = +14.8^\circ$ ($c=3$ g/100 mL, H_2O) ; 1H NMR(D_2O) δ : 1.19-1.32 (m, 1H), 1.51-1.67 (m, 7H), 2.06-2.15 (m, 1H), 2.62-2.69 (m, 1H), 2.99 (s, 3H), 3.07-3.10 (m, 1H), 3.15 (s, 3H), 3.52 (t, 2H), 3.69 (d, 1H), 3.80 (dd, 1H), 5.46 (m, 1H), 7.33-7.44 (m, 3H), 7.59 (dd, 2H)。

[0088] 实施例 2

[0089] M受体激动剂乙酰胆碱(Ach)激动平滑肌上的M胆碱受体,产生平滑肌收缩效应,本研究选择豚鼠盲肠和气管作为对象,研究格隆溴铵手性对映体体外竞争性拮抗乙酰胆碱(Ach)对平滑肌毒蕈碱受体的激动作用,并以市售格隆溴铵及消旋格隆溴铵作为对照药物。市售格隆溴铵是(3R, 2' S)和(3S, 2' R)混合物,消旋药物为(3S, 2' S)、(3R, 2' S)、(3R, 2' R)和(3S, 2' R)混合物。

[0090] 本研究采用以上毒蕈碱受体拮抗药物筛选体系,拟初步筛选出具有最强的胆碱能拮抗作用的格隆溴铵手性对映体。具体实施方案如下:

[0091] (1). 抗胆碱作用-抑制豚鼠肠收缩作用(抗M作用)

[0092] 豚鼠,雄性,实验前禁食24 h,自有饮水。击头处死,立即剖开腹腔,找到盲肠,在距此8-10 cm处,取回肠一段,置盛有4℃台式液的培养皿中,分离去除肠系膜,用台式液液将内容物冲洗干净,然后将回肠剪成数段(每段长1.5~2 cm)备用。在麦氏浴槽加入30 mL新鲜的台式液,恒温水浴调至 $37 \pm 0.5^\circ C$,取上述制备好的回肠一段,将肠管标本两端用医用缝合针各穿一线,一端打一空结(直径约1 cm小套),另一端穿上长线打结(长度约1.5 cm),用眼科镊钳住空结固定于通气钩上,放入麦氏浴槽中,将另端长线的空结,挂在张力换能器的小钩上,通气钩的另一端与供氧器相连,通入95% O_2 和5% CO_2 混合气,调节放出气泡至2-3个气泡/s,张力换能器与RM6240CD型多道生理信号采集处理仪相连,给予1 g前负荷,标本稳定30 min,每隔20 min换一次营养液。进入“记录状态”,先描记一段正常曲线,然后按照下列顺序给药。

[0093] 向麦氏浴槽中加入 3×10^{-3} mol/L的Ach,观察曲线变化,检查肠管是否有兴奋作用,然后冲洗肠管,使其恢复正常。

[0094] 按 Table. 1 所给的剂量累积加 ACh, 制作 ACh 的累积量效曲线。具体做法: 先加小剂量 ACh, 若有反应则当反应达到最高峰时立即加下一个剂量 ACh, 直至曲线上升至最高峰不再升高为止。用台式液冲洗肠管 3 遍, 稳定标本 15 min, 使恢复正常。向浴槽中加入相应浓度的药物, 过 1 min 后再一次制作 ACh 的累积浓度量效曲线。

[0095]

Table.1

编号	配制的 ACh 浓度 (mol/L)	ACh 加入量 mol/30mL	浴槽中 ACh 的浓度 (mol/L)
1	3×10^{-5}	0.10	10^{-7}
2	3×10^{-5}	0.20	3×10^{-7}
3	3×10^{-4}	0.07	10^{-6}
4	3×10^{-4}	0.20	3×10^{-6}
5	3×10^{-3}	0.07	10^{-5}
6	3×10^{-3}	0.20	3×10^{-5}
7	3×10^{-2}	0.07	10^{-4}
8	3×10^{-2}	0.20	3×10^{-4}

Table.2 六种药物的作用浓度

药物编号	作用浓度(mol/L)	药物编号	作用浓度(mol/L)
消旋药物	3×10^{-8}	(3R, 2'S)	10^{-9}
市售格隆溴铵	3×10^{-8}	(3R, 2'R)	3×10^{-8}
(3S, 2'S)	10^{-7}	(3S, 2'R)	10^{-6}

[0096] 豚鼠回肠加入六种药物前后制作 ACh 的量效曲线, 张力百分率变化见 Table. 3 所示。

[0097] Table. 3 豚鼠回肠加入六种药物前后对各剂量 ACh 反应百分率

[0098]

	Ach -logC	7.0	6.5	6.0	5.5	5.0	4.5	4.0	3.5
消旋	加药前	8.792±5.094	26.292±22.518	35.039±21.260	44.970±24.442	62.458±24.316	77.356±20.127	87.521±18.354	98.592±2.191
	加药后	7.287±3.330	8.646±5.652	16.473±10.270	27.769±16.905	36.706±20.871	53.364±27.932	71.041±14.190	88.118±17.441
市售 氯溴铵	加药前	6.867±5.631	13.886±9.465	23.947±21.027	31.222±23.839	42.201±23.513	57.787±25.707	81.673±22.058	99.767±0.570
	加药后	4.582±3.101	8.477±5.895	12.745±9.647	14.888±10.066	22.262±16.351	31.784±21.257	46.845±20.339	75.679±35.772
(3S, 2S)	加药前	18.624±10.043	28.473±12.707	50.703±18.482	64.327±18.277	76.191±17.160	89.664±9.974	94.516±3.856	95.968±5.912
	加药后	9.137±5.430	14.637±7.877	27.657±10.304	42.369±20.094	61.894±24.905	83.224±19.799	93.670±13.675	95.688±13.260
(3R, 2S)	加药前	5.651±4.594	14.163±5.145	40.273±20.906	53.979±21.656	70.524±17.204	85.225±11.312	93.935±7.021	100.000±0.000
	加药后	2.443±1.693	5.659±2.296	16.326±9.868	28.963±19.235	40.425±16.149	54.656±13.466	72.292±12.335	94.265±6.588
(3R,2R)	加药前	4.415±2.145	8.819±6.565	37.195±38.182	49.283±39.809	54.165±33.504	61.214±27.692	74.672±21.456	97.891±5.166
	加药后	3.896±3.522	4.956±4.279	12.971±20.154	19.865±31.672	23.159±26.031	24.207±22.975	38.401±22.922	72.298±24.359
(3S, 2R)	加药前	7.156±3.608	11.378±5.290	27.672±5.904	42.940±13.330	58.459±22.063	73.123±19.346	79.011±16.415	95.986±9.832
	加药后	5.642±3.525	7.307±2.881	11.645±7.123	12.991±6.611	16.214±7.861	25.846±12.046	48.404±19.754	91.601±27.249

[0099] 豚鼠回肠加入六种药物前后 ACh 的累积量效曲线图 (见图 1-6 所示)。

[0100] 六种药物 pA₂(使激动剂提高到原来的 2 倍时,可产生与原来浓度相同效应所需的

拮抗剂克分子浓度的负对数。)值见 Table. 4 所示。

[0101] Table. 4

[0102]

药物编号	pA2 值	药物编号	pA2 值
消旋药物	8.28±0.34	(3R, 2' S)	9.67±0.27
市售格隆溴铵	8.64±1.23	(3R, 2' R)	8.92±0.67
(3S, 2' S)	7.50±0.60	(3S, 2' R)	6.90±0.69

[0103] 在抗胆碱作用 - 抑制豚鼠肠收缩作用的测试中,六种受试药物均有抑制豚鼠盲肠收缩作用的趋势。比较上述六种药物,其中(3S, 2' R)-格隆溴铵的胆碱能拮抗作用最差,而(3R, 2' S)-格隆溴铵具有最强的胆碱能拮抗作用(见图7所示)。

[0104] (2). 抗胆碱作用 - 抑制豚鼠气管收缩作用(抗M作用)

[0105] 豚鼠,雄性,体重 250 g 以上。击头处死,立即剖开气管外皮毛,找到气管,取气管一段,置盛有 4 °C K-H 氏液并通有 95 %O₂和 5 %CO₂混合气的培养皿中,分离去除气管外膜,然后将气管剪成 1.5 cm 备用。在麦氏浴槽加入 30 mL 新鲜的 K-H 氏液,恒温水浴调至 37±0.5 °C,取上述制备好的气管,剪成螺旋条,将气管标本两端用医用缝合针各穿一线,一端打一空结(直径约 1 cm 小套),另一端穿上长线打结(长度约 1.5 cm),用眼科镊钳住空结固定于通气钩上,放入麦氏浴槽中,将另端长线的空结,挂在张力换能器的小钩上,通气钩的另一端与供氧器相连,通入 95 %O₂和 5 %CO₂混合气,调节放出气泡至 2-3 个气泡 / s, 张力换能器与 RM6240CD 型多道生理信号采集处理仪相连,给予 1.5 g 前负荷,标本稳定 2 h,每隔 15 min 换一次营养液。进入“记录状态”,先描记一段正常曲线,然后按照下列顺序给药。

[0106] 向麦氏浴槽中加入 3×10^{-3} mol/L 的 Ach,观察曲线变化,检查气管是否有兴奋作用,然后冲洗气管,使其恢复正常。

[0107] 按 Table. 5 所给的剂量累积加 Ach,制作 Ach 的累积量效曲线。具体做法:先加小剂量 Ach,若有反应则当反应达到最高峰时立即加下一个剂量 Ach,直至曲线上升至最高峰不再升高为止。用 K-H 氏液冲洗气管 2 遍,稳定标本 15 min,使恢复正常。向浴槽中加入相应浓度的药物,过 1 min 后再一次制作 Ach 的累积浓度量效曲线。

[0108] Table. 5

[0109]

编号	配制的 Ach 浓度 (mol/L)	Ach 加入量 mol/30mL	浴槽中 Ach 的浓度 (mol/L)
1	3×10^{-5}	0.10	10^{-7}
2	3×10^{-5}	0.20	3×10^{-7}
3	3×10^{-4}	0.07	10^{-6}
4	3×10^{-4}	0.20	3×10^{-6}
5	3×10^{-3}	0.07	10^{-5}
6	3×10^{-3}	0.20	3×10^{-5}
7	3×10^{-2}	0.07	10^{-4}
8	3×10^{-2}	0.20	3×10^{-4}

[0110] Table. 6 六种药物的作用浓度

[0111]

药物编号	作用浓度(mol/L)	药物编号	作用浓度(mol/L)
消旋药物	3×10^{-8}	(3R, 2'S)	10^{-9}
市售格隆溴铵	3×10^{-8}	(3R, 2'R)	3×10^{-8}
(3S, 2'S)	10^{-7}	(3S, 2'R)	10^{-6}

[0112] 豚鼠气管加入六种药物前后制作 ACh 的量效曲线,张力百分率变化见 Table. 7 所示。

[0113]

	Ach,logC	7	6.5	6	5.5	5	4.5	4	3.5
消旋	加药前	2.514±2.169	7.684±4.910	12.018±7.977	21.901±7.257	50.244±11.135	44.510±17.420	67.889±14.514	100
	加药后	1.936±3.004	2.286±2.277	6.651±5.776	10.430±4.735	11.665±5.429	23.104±8.354	44.637±11.304	87.258±11.483
市格隆溴	加药前	2.380±2.941	5.757±7.300	10.541±7.855	16.857±4.890	28.103±7.988	44.043±9.009	69.092±5.791	100
	加药后	1.951±2.335	3.211±4.088	4.537±6.532	7.197±7.338	12.000±9.563	23.054±11.191	43.558±15.010	92.604±17.179
(3S, 2'S)	加药前	1.487±1.427	2.916±2.008	15.251±11.043	19.505±11.624	25.258±13.798	37.566±12.250	65.643±11.250	100
	加药后	0.426±0.743	0.426±0.743	2.077±2.114	9.520±7.989	15.074±8.184	25.203±10.841	50.822±12.744	88.923±5.471
(3R, 2'S)	加药前	7.591±6.830	9.661±8.146	14.443±8.877	21.289±9.183	33.125±10.490	50.161±14.717	72.213±13.854	100
	加药后	1.530±1.797	3.757±1.139	5.456±1.849	10.453±2.243	17.500±3.122	34.704±7.785	61.755±8.791	104.633±13.862
(3R, 2'R)	加药前	3.773±1.302	4.660±1.144	9.340±3.665	14.860±4.737	22.359±3.858	35.796±4.501	59.794±7.379	100
	加药后	1.870±1.631	1.870±1.631	4.080±2.805	6.570±3.159	10.010±2.894	16.488±4.639	42.296±8.539	99.633±12.455
(3S, 2'R)	加药前	3.899±3.795	5.679±3.377	9.618±2.649	17.321±5.426	24.332±7.600	40.139±12.932	63.895±15.239	100
	加药后	1.492±2.627	3.547±3.403	5.878±2.600	9.209±2.308	15.495±2.227	27.543±3.728	52.038±8.342	102.717±22.027

[0114] Table. 7 豚鼠气管加入六种药物前后对各剂量 ACh 反应百分率

[0115] 豚鼠气管加入六种药物前后 ACh 的累积量效曲线图 (见图 8-13 所示)。

[0116] 六种药物 pA₂ 值见 Table. 8 所示。

[0117] Table. 8

[0118]

药物编号	pA ₂ 值	药物编号	pA ₂ 值
消旋药物	8.19±0.347	(3R, 2' S)	9.19±0.552
市售格隆溴铵	8.50±0.435	(3R, 2' R)	7.91±0.309
(3S, 2' S)	7.40±0.278	(3S, 2' R)	6.16±0.366

[0119] 在抗胆碱作用 - 抑制豚鼠气管收缩作用的测试中, 六种受试药物均有抑制豚鼠气管收缩作用的趋势。比较上述六种药物, 四者均具有胆碱能拮抗作用, (3S, 2' R)-格隆溴铵的胆碱能拮抗作用最差, 而 (3R, 2' S)-格隆溴铵具有最强的胆碱能拮抗作用 (见图 14 所示)。

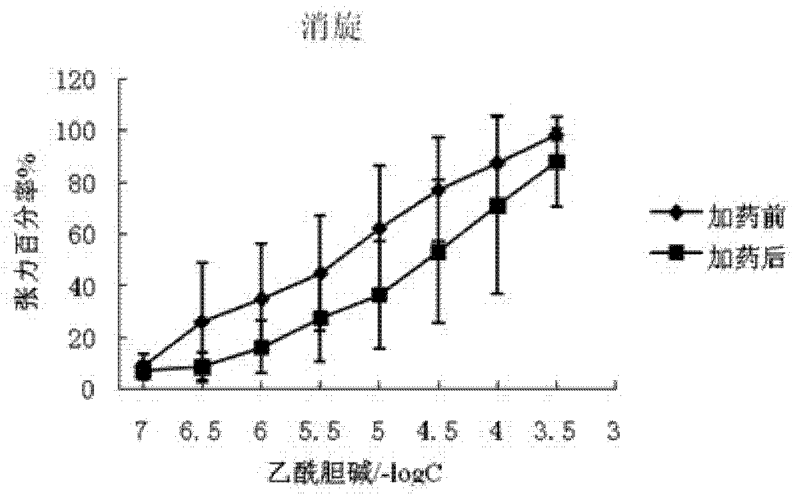


图 1

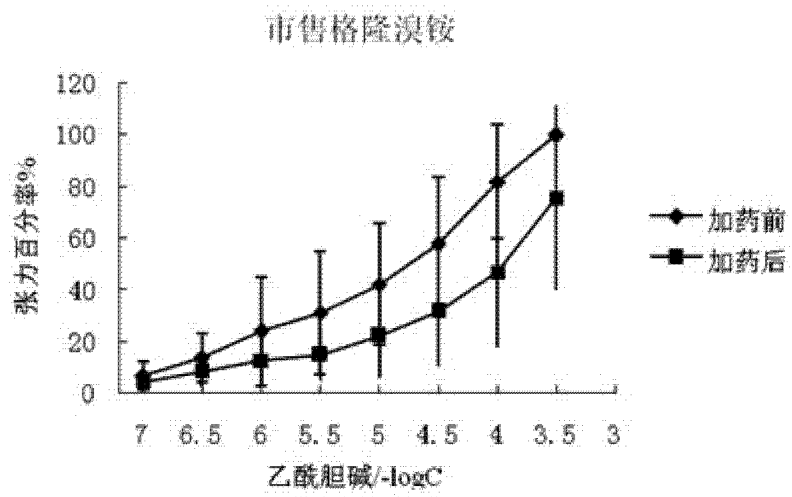


图 2

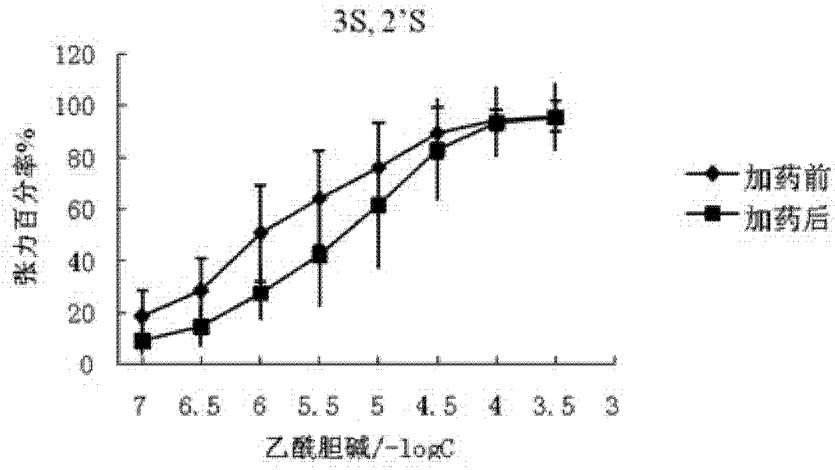


图 3

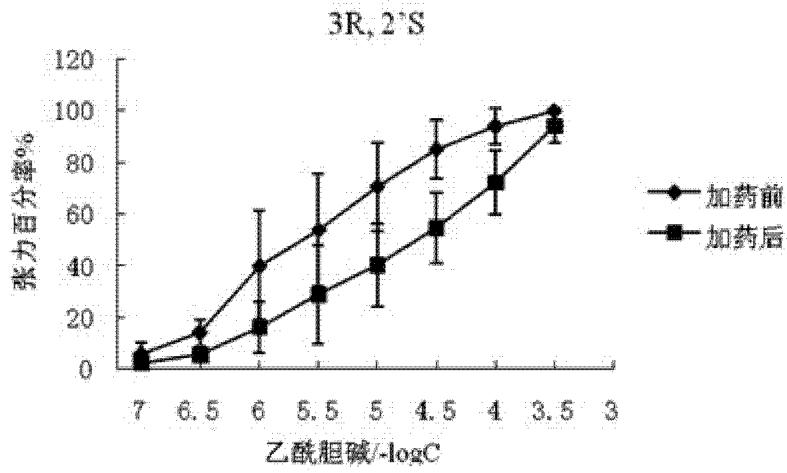


图 4

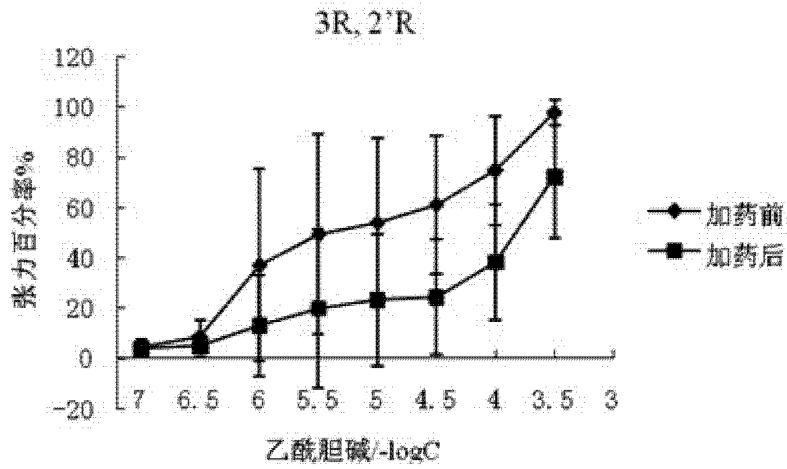


图 5

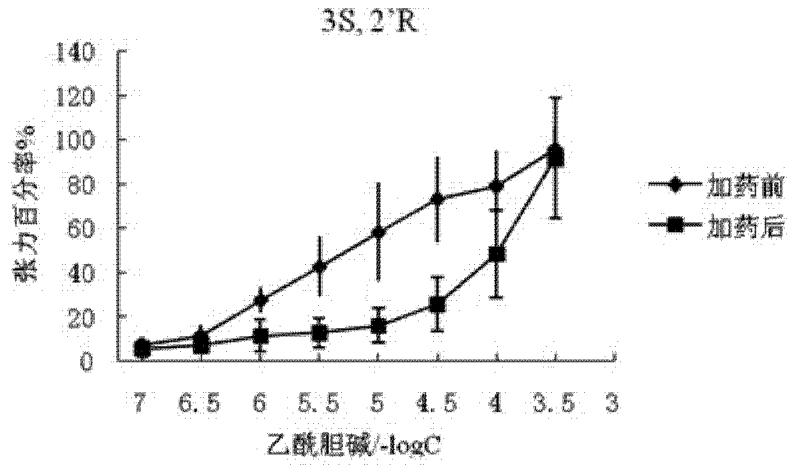


图 6

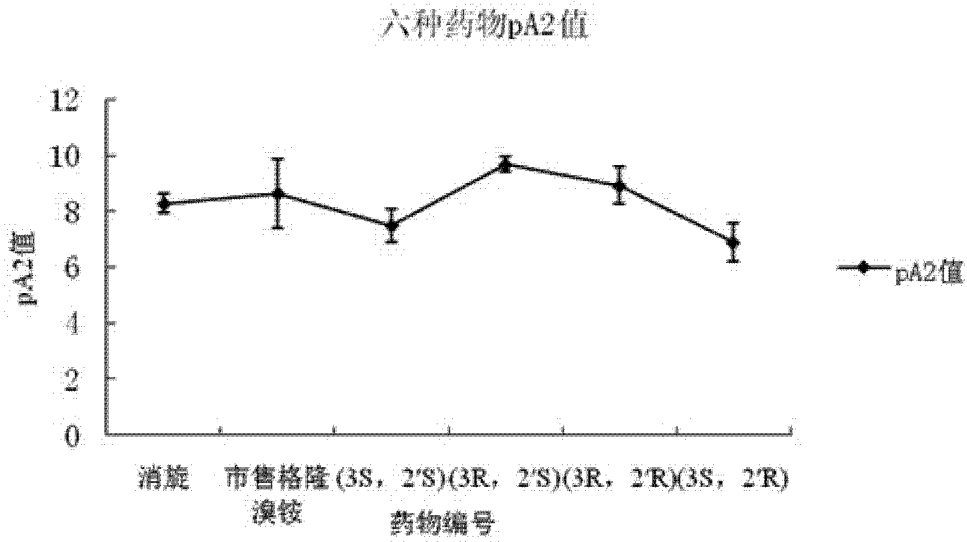


图 7

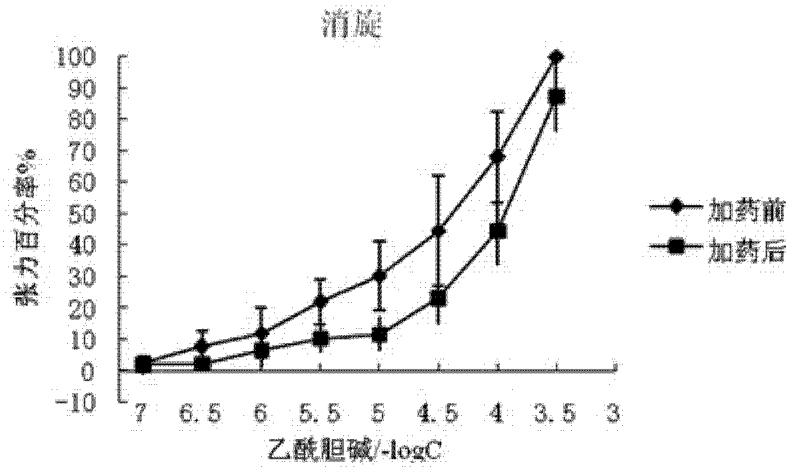


图 8

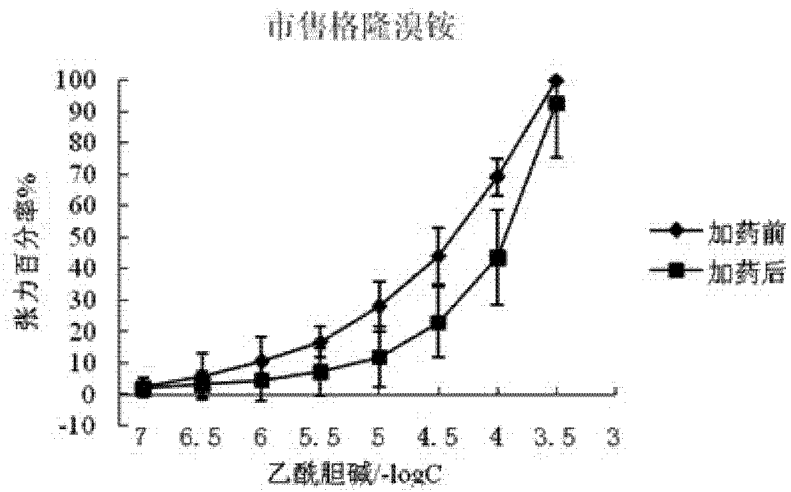


图 9

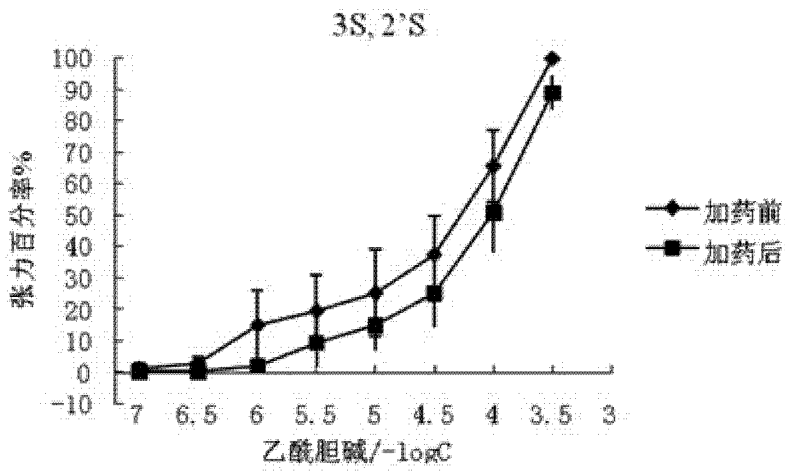


图 10

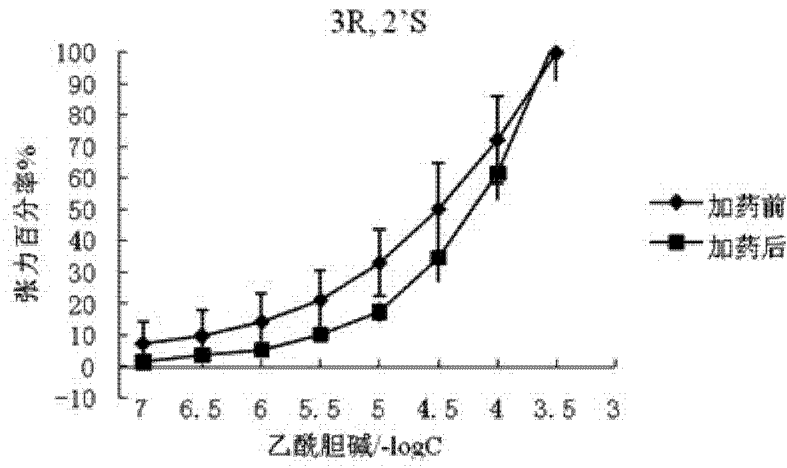


图 11

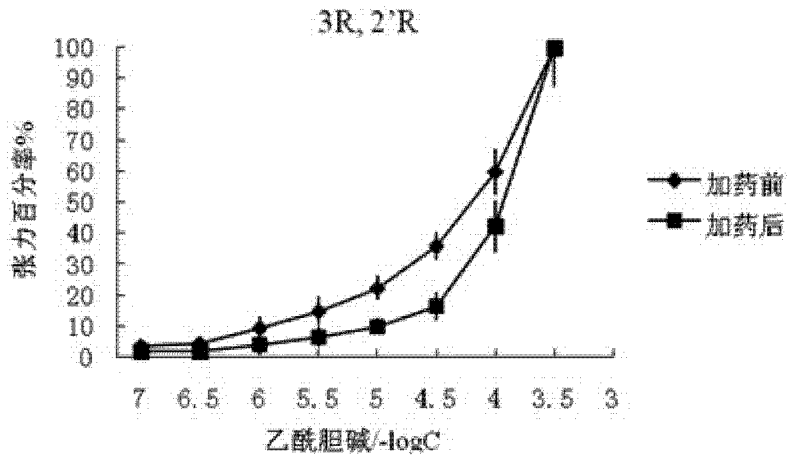


图 12

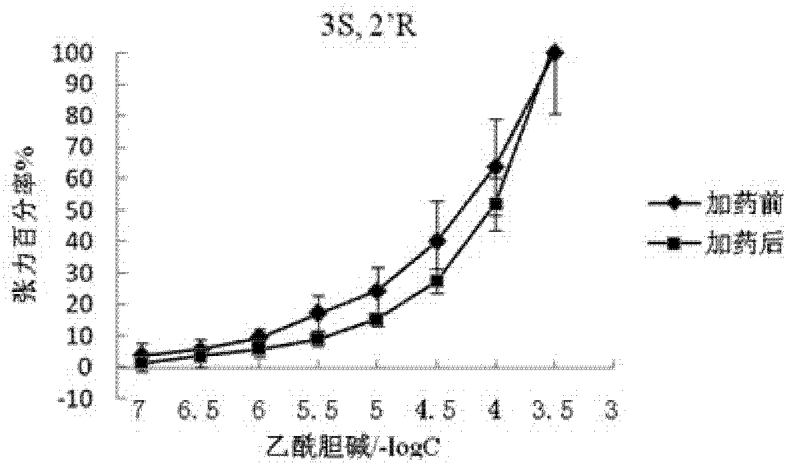


图 13

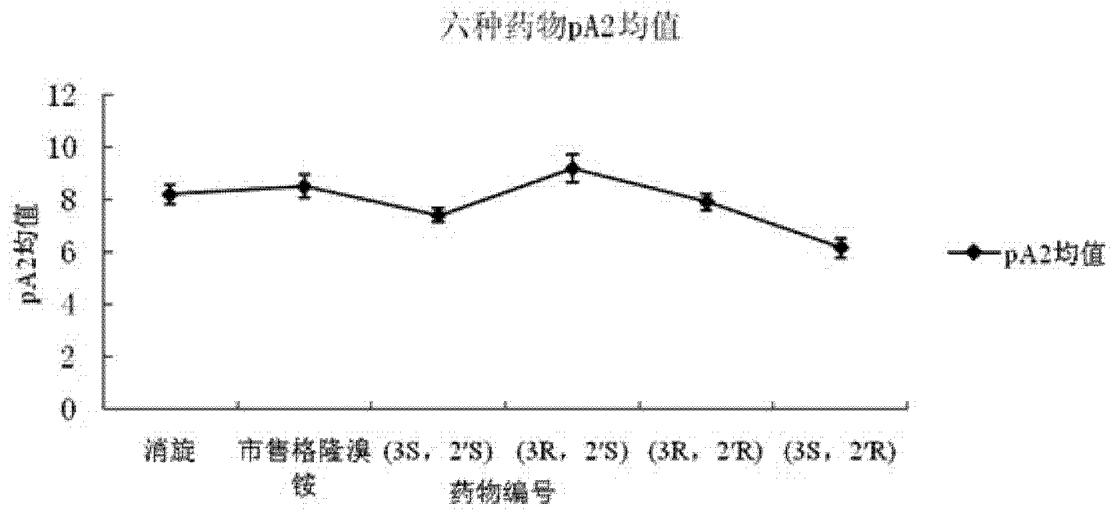


图 14