# 阿魏酰胍丁胺类似物的设计、合成及 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交换器-1 抑制活性

李家明<sup>1\*</sup>,何勇<sup>1</sup>,周鹏<sup>1</sup>,徐云根<sup>2</sup>,彭家志<sup>1</sup>,盛日正<sup>1</sup>

(1. 安徽中医学院药学院安徽省现代中药重点实验室,安徽 合肥 230031;2. 中国药科大学药物化学教研室,江苏 南京 210009)

摘要:为了寻找新结构类型的 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交换器-1 (NHE-1) 抑制剂,以阿魏酸、胍丁胺为先导化合物,设计并合 成了 9 个阿魏酰胍丁胺类似物。其结构经 <sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 和 MS 确证,其中化合物 5f~5i 为新化合物。初步 的药理实验结果表明,部分目标化合物显示出较好的 NHE 抑制活性,其中化合物 5a、5b 和 6c 对 NHE-1 的抑制 活性明显优于阳性对照药卡立泊来德 (cariporide)。

关键词: 阿魏酰胍丁胺; 心肌缺血再灌注损伤; NHE-1 抑制剂; 合成

中图分类号: R916 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2011) 08-0936-06

# Design, synthesis and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform-1 inhibitory activity of feruloylagmatine analogues

LI Jia-ming<sup>1\*</sup>, HE Yong<sup>1</sup>, ZHOU Peng<sup>1</sup>, XU Yun-gen<sup>2</sup>, PENG Jia-zhi<sup>1</sup>, SHENG Ri-zheng<sup>1</sup>

 (1. Anhui Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine, Department of Pharmacy, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China;
 2. Department of Medicinal Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**Abstract**: In order to search for novel inhibitors of  $Na^+/H^+$  exchanger isoform-1 (NHE-1), nine feruloylagmatine analogues were designed and synthesized from ferulic acid and agmatine. The structures of the synthesized compounds were confirmed by <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR and mass spectra, among which compounds **5f**–**5i** were novel compounds. The results of preliminary pharmacological test showed that some of the compounds possessed strong NHE-1 inhibitory activity, among which compounds **5a**, **5b** and **6c** were more potent than cariporide in NHE-1 inhibition.

Key words: feruloylagmatine; myocardial ischemic-reperfusion injury; NHE-1 inhibitor; synthesis

目前,缺血性心脏病已成为威胁人类健康的重 大疾病之一。缩短组织缺血时间、尽早恢复血流是 防治缺血损伤最有效的措施,溶栓、经皮冠状动脉成 形术和冠状动脉旁路移植术等血管再通术可有效地 恢复缺血组织的供血,但上述疗法都存在一个心肌 缺血再灌注损伤的问题<sup>[1]</sup>。大量实验表明, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交换

收稿日期: 2011-01-24.

器-1 (NHE-1) 在心肌缺血及再灌注过程中起着重要作用<sup>[2]</sup>。到目前为止,已有 10 种 NHE 亚型 (NHE-1~ NHE-10) 被确证,其中 NHE-1 是哺乳动物心肌中最主要的亚型<sup>[3,4]</sup>,其在心力衰竭、冠心病、高血压、先天性心脏病以及心律失常等疾病的发生、发展及演变过程中起重要作用。主要是由于 NHE-1 的过分激活参与形成一系列的病理过程所导致<sup>[5]</sup>。NHE-1 抑制剂通过抑制 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交换,避免过多 Na<sup>+</sup>进入细胞内,进而使 Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交换减少,防止 Ca<sup>2+</sup>过度增加引起细胞挛缩、坏死,显示出对心肌缺血再灌注损伤有良好

基金项目: 安徽高校省级自然科学研究重点项目 (KJ2010A206). \*通讯作者 Tel: 86-551-5169321, E-mail: lijiaming2004@sina.com

的保护作用<sup>[6]</sup>。第一代 NHE 抑制剂阿米洛利<sup>[7]</sup>被证实 对心肌缺血再灌注损伤有保护作用以来,许多特异 性 NHE-1 抑制剂被陆续发现,已报道的 NHE-1 选择 性抑制剂化学结构类型主要为酰基胍类,动物实验 结果显示它们对心肌缺血和再灌注损伤具有良好的 保护作用,能够降低心肌梗死病死率,减少梗死面积 和减少心律失常的发生<sup>[8]</sup>。其中 cariporide、eniporide、 sabiporide (图 1) 已进入临床研究阶段,但 cariporide 和 eniporide 的临床研究并未获得人们的预期结果<sup>[9]</sup>。 因此,寻找新结构类型的 NHE-1 抑制剂就成为很有 意义的工作。

我国传统中草药当归、川芎、酸枣仁等均含有的 有效成分阿魏酸 (ferulic acid, 图 2),为非肽类内皮 素受体拮抗剂,具有保护血管内皮、扩张小血管、抗 氧化、清除氧自由基、抑制血小板聚集和血栓形成等 药理作用<sup>[10]</sup>。药理学研究表明,阿魏酸钠能够减少心 肌丙二醛 (MDA) 含量,能够显著增强超氧化物歧 化酶 (SOD) 活性,并且能够明显减轻心肌超微结构 损伤,对缺血性心肌具有保护作用<sup>[11]</sup>。

胍丁胺 (agmatine, 图 2) 是 *L*-精氨酸的脱羧基 产物,现代药理学研究表明胍丁胺能减少心肌细胞 膜钙内流,减轻心肌内 Ca<sup>2+</sup>超载<sup>[12]</sup>;另外,胍丁胺参 与调控内皮松弛因子 (NO),后者可以通过调节血管 内皮舒张,改善心肌缺血<sup>[13]</sup>。

本文以具有心肌保护作用的阿魏酸和胍丁胺为 先导化合物,根据药物化学拼合原理,将阿魏酸等苯 丙烯酸与胍丁胺或胍丙胺进行拼合,设计并合成了 9 个目标化合物 (合成路线 1)。采用体外血小板肿胀模 型 (PSA),以卡立泊来德为阳性对照药,对所合成的 目标化合物进行 NHE-1 抑制活性初步筛选,并对其 构效关系进行分析和讨论。所合成的 9 个目标化合 物中,化合物 5a、5b、5e、6c 和 6d 均已见文献报道。 其中,文献<sup>[14, 15]</sup>报道了 5a、6c 从冬小麦根部中提取 得到,具有抗真菌作用;文献<sup>[16]</sup>报道了化合物 5b、6d 对激肽原酶的抑制活性;文献<sup>[17]</sup>报道了化合物 5e 在 化妆品领域的应用。化合物 5f~5i 为新化合物。所 合成的 9 个目标化合物的 NHE-1 抑制活性研究均未 见文献报道。



Figure 2 The structures of ferulic acid and agmatine

# 结果与讨论

# 1 目标化合物的合成

本文合成了9个阿魏酰胍丁胺类似物,其物理性 质及光谱数据见表1。

阿魏酰胍丁胺类化合物的合成报道较少, 文献<sup>[14]</sup> 报道化合物 5a 的合成是以阿魏酸为起始原料, 先与 SOCl<sub>2</sub> 反应制备阿魏酰氯, 再与硫酸胍丁胺反应, 经 制备色谱进行分离制得阿魏酰胍丁胺, 收率仅为 9%。该方法收率低, 操作繁琐, 且需要用制备色谱柱 进行分离, 难以实现该类化合物规模化合成。作者以 乙酰基阿魏酰氯与 Boc 保护的胍丁胺 (8) 反应制备 中间体 4a 时, TLC检测发现副产物较多, 可能与反应 过程中生成的盐酸会导致化合物 8 脱 Boc 保护基团 有关。因此, 重新设计了合成路线, 以阿魏酸为起始 原料, 先合成乙酰基阿魏酸, 然后与对甲苯磺酰氯反 应得到混酐后, 再与 Boc 保护的胍丁胺反应得到中 间体 4a, 中间体 4a 经脱乙酰基、脱 Boc 得到目标产 物 5a。该方法具有操作简单、反应条件温和、收率 较高的优点。

在脱除 Boc 保护基团反应中,部分化合物脱去 Boc 基团后,得到的化合物盐酸盐极易吸湿,在空气 中迅速液化,不易于保存,所以用碳酸钾将部分化合 物水溶液调至 pH 11~12,得到良好的固体,易于保 存和计量,在药理实验中,再用等摩尔的盐酸调制成 化合物盐酸盐。

# 2 阿魏酰胍丁胺类似物的 NHE-1 抑制活性

胍丁胺衍生物的体外血小板肿胀模型 (PSA) 实



Figure 1 The structures of cariporide, eniporide and sabiporide



 $e R_2 = H; f R_2 = 4-OCH_3; g R_2 = 4-Cl; h R_2 = 4-NO_2; i R_2 = 2-NO_2$ 

Reagents and conditions: (a)  $(AcO)_2O$ ,  $H_2SO_4$ ; (b) Tosyl chloride,  $K_2CO_3$ , TEBACl,  $CH_2Cl_2$ , rt; (c) **8** or **9**,  $CH_2Cl_2$ , rt; (d) (I) NaOH, MeOH,  $H_2O$ , rt; (II)  $CO_2$ , rt; (III) HCl, MeOH, reflux; (e)  $K_2CO_3$ ,  $H_2O$ ,  $C_2H_3OH$ ; (f) propanedioic acid,  $C_6H_6$ , pyridine, piperidine, reflux; (g) HCl, MeOH, EtOAc reflux; (h) Boc anhyhidride, NaOH,  $CH_2Cl_2$ ,  $H_2O$ , rt; (i) Butane-1, 4-diamine or 1, 3-diaminopropane,  $CH_2Cl_2$ , reflux

Scheme 1 Synthetic routes of the target compounds

验结果 (表 2) 表明, 大部分目标化合物显示出较好的 NHE-1 抑制作用, 其中, 化合物 5a、5b 和 6c 有明显的 NHE-1 抑制活性, 且其抑制活性优于阳性对照药卡立泊来德, 显示出良好的新药开发前景。

#### 3 阿魏酰胍丁胺类似物的构效关系讨论

从实验结果可以分析得到化合物的生物活性与 其分子的结构具有一定的相关性,初步获得如下构 效关系:① 苯环上酚羟基同时存在的情况下,空间 位阻较大时,抑制活性较好,如 5a 的抑制活性高于 6c,5b 的抑制活性高于 6d。② 同系物进行比较时, 含4个碳脂肪链的化合物活性优于含3个碳脂肪链的 化合物,如5a抑制活性高于5b,6c抑制活性高于6d。 ③ 碳链长度相同的情况下,苯环上若有酚羟基的存 在,抑制活性较好,如 5a、6c 的抑制活性高于 5e~ 5i。综上所述,在目标化合物结构中,苯环上酚羟基 存在与否以及脂肪链的长度是影响 NHE-1 抑制活性 的主要因素。

#### 实验部分

# 1 仪器和试剂

WRS-1B 数字熔点仪 (上海精密科学仪器有限公司), 温度未校正; LCQ ADVANTAGE MAX 液质联用 质谱仪 (FINNIGAN 公司); Bruker 300、400 MHz 超 导核磁共振仪, TMS 为内标, D<sub>2</sub>O、CDCl<sub>3</sub>和 DMSO-*d*<sub>6</sub> 为溶剂; Multiscan Spectrum 酶标仪 (Thermo)。阿魏酸、 对羟基肉桂酸、对氯苯甲醛、对硝基苯甲醛、邻硝基 苯甲醛、苯甲醛 (四川西亚化工股份有限公司); 对甲 氧基苯甲醛、丙二酸 (天津市光复精细化工研究所); 二碳酸二叔丁酯 (上海卓锐化工有限公司), 卡立泊来 德 (cariporide) 由中国药科大学提供; ACD 溶液 (65 mmol·L<sup>-1</sup>柠檬酸, 85 mmol·L<sup>-1</sup>柠檬酸钠, 2%葡萄糖); 标准介质 (氯化钠 140 mmol·L<sup>-1</sup>, 葡萄糖 10 mmol·L<sup>-1</sup>, 氯化钾 5 mmol·L<sup>-1</sup>, 氯化镁 1 mmol·L<sup>-1</sup>, 氯化钙 1 mmol·L<sup>-1</sup>, HEPEs 缓冲液 20 mmol·L<sup>-1</sup>, pH = 7.4); 丙 酸钠介质 (丙酸钠 140 mmol·L<sup>-1</sup>, 葡萄糖 10 mmol·L<sup>-1</sup>,

 Table 1
 Physical constants and spectral data of target compounds

Compd.	mp/°C	<sup>1</sup> H NMR (300/400 MHz)	<sup>13</sup> C NMR (75/100 MHz)	ESI-MS $(m/z)$ $[M+H]^+$
5a	177.2-177.3	(DMSO- $d_6$ ) 8.11 (s, 1H, NH), 7.84 (s, 1H, OH), 7.31 (d, $J = 16.0$	(DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) 165.9, 157.5, 148.7, 148.2,	$C_{15}H_{22}N_4O_3$
		Hz, 1H, ArCH=), 7.11 (d, J = 1.6 Hz, 1H, ArH), 6.98 (dd, J = 8.0,	139.2, 126.8, 121.9, 119.5, 116.1, 111.2,	307.12
		1.6 Hz, 1H, ArH), 6.81 (d, J = 8.0 Hz, 1H, ArH), 6.48 (d, J = 16.0	56.0, 40.8, 38.5, 26.8, 26.5	
		Hz, 1H, CH=), 3.79 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 3.18-3.12 (m, 4H, NCH <sub>2</sub> ), 1.48		
		$(s, 4H, CH_2CH_2)$		
5b	173.5-174.2	(DMSO- $d_6$ ) 8.26 (s, 1H, NH), 7.89 (s, 1H, OH), 7.33 (d, $J = 15.6$	$(DMSO-d_6)$ 166.0, 157.5, 148.7, 148.2,	$C_{14}H_{20}N_4O_3$
		Hz, 1H, ArCH=), 7.11 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, ArH), 6.99 (dd, $J = 8.4$ ,	139.3, 126.8, 121.8, 119.4, 116.1, 111.3,	293.13
		1.6 Hz, 1H, ArH), 6.83 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, ArH), 6.53 (d, $J = 15.6$	56.0, 38.9, 36.5, 29.2	
		HZ, IH, CH=), $3./8$ (s, $3H$ , OCH <sub>3</sub> ), $3.21-3.14$ (m, $4H$ , NCH <sub>2</sub> ),		
60	<u></u>	1.00-1.03 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ) (DMSO d) 7.00 (c, 1H, OH) 7.46 (c, 1H, NH) 7.10 (d, $L = 15.0$	(DMSO(d)) = 170.7 + 167.4 + 157.5 + 141.4	CHNO
UL	222.0 223.2	$(DMSO-a_0)$ 7.50 (s, 111, 011), 7.40 (s, 111, 111), 7.19 (d, $J = 15.9$ Hz 1H ArCH=) 7.08 (d $I = 8.4$ Hz 2H ArH) 6.11 (d $I = 8.4$ Hz	$(DMSO-a_6)$ 170.7, 107.4, 137.5, 141.1, 130.1 110.1 110.0 113.5 $AO.0.38A$	277.20
		2H ArH) 6 05 (d $I = 15.9$ Hz 1H CH=) 3 16 (br s 2H NCH <sub>2</sub> )	26.9.26.4	211.2)
		3 09 (br s. 2H, NCH <sub>2</sub> ), 1.46 (s. 4H, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> )	20.9, 20.1	
6d	176.9-177.6	$(DMSO-d_6)$ 9.82 (s, 1H, OH), 8.04 (s, 1H, NH), 7.38 (d, $J = 8.0$	(DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) 165.8, 163.7, 159.2, 139.1,	C13H18N4O2
		Hz, 2H, ArH), 7.32 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, ArCH=), 6.78 (d, $J = 8.0$	129.6, 126.3, 119.1, 116.1, 38.0, 36.5,	263.19
		Hz, 2H, ArH), 6.38 (d, J = 16.0 Hz, 1H, CH=), 3.19–3.13 (m, 4H,	29.9	
		NCH <sub>2</sub> ), 1.59 (s, 2H, CH <sub>2</sub> )		
5e	203.2-204.5	(D <sub>2</sub> O) 7.32–7.19 (m, 5H, ArH, 1H, CH=), 6.31 (d, $J = 15.9$ Hz,	$(D_2O)  170.6,  159.1,  143.2,  136.8,  132.6, $	$C_{14}H_{20}N_4O$
		1H, CH=), 3.02 (s, 2H, NCH <sub>2</sub> ), 2.94 (s, 2H, NCH <sub>2</sub> ), 1.35 (s, 4H,	131.5, 130.4, 122.7, 43.4, 41.5, 28.4,	261.20
		CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> )	28.0	
5f	166.9-168.5	(D <sub>2</sub> O) 7.38 (s, 2H, ArH), 7.25 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H, CH=), 6.83 (s,	$(D_2O)  168.6,  168.5,  160.2,  140.3,  129.6,$	$C_{15}H_{22}N_4O_2$
		2H, ArH), 6.27 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H, CH=), 3.66 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 3.10	127.2, 117.6, 114.2, 55.5, 40.7, 39.3,	291.22
-	228 7 220 2	$(s, 4H, 2 \times NCH_2), 1.42 (s, 4H, CH_2CH_2)$	25.9, 25.4 (D. O) 168 4 146 2 120 6 125 1 122 0	
5g	228.7-229.3	$(D_2O)$ /.35 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, AfH), /.25-/.18 (m, 2H, AfH, 1H, CH-) (24 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H, CH-) 2.11 (a, 2H, NCH-) 2.01 (a)	$(D_2O)$ 168.4, 146.2, 139.6, 135.1, 132.9, 120.2, 128.0, 120.4, 40.6, 28.0, 25.5	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> CIN <sub>4</sub> O
		CH-), 0.54 (d, $J$ = 15.0 HZ, 1H, CH-), 5.11 (S, 2H, NCH <sub>2</sub> ), 5.01 (S, 2H, NCH <sub>2</sub> ), 1.42 (s, 4H, CH, CH)	129.2, 128.9, 120.4, 40.0, 38.9, 23.3,	293.27
5h	265 7-266 9	$(D_2O) = 8.53 \text{ (s 1H NH)} + 8.24 \text{ (d } I = 8.7 \text{ Hz 2H ArH)} + 7.88 \text{ (s 1H)}$	$(D_2O)$ 164 7 157 5 147 8 142 0 136 5	Cu HuaNaOa
511	203.7 200.9	NH) 7 81 (d $J = 8.4$ Hz 2H ArH) 7 53 (d $J = 15.9$ Hz 1H CH=)	$(B_20)$ 104.7, 107.5, 147.6, 142.6, 150.5, 128.9 127.1 124.5 40.8 38.7 26.6	306.28
		6.93 (d J = 15.9 Hz 1H CH=) 3.20-3.13 (m 4H 2×NCH2) 1.50	26 5	500.20
		(s, 4H, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> )	2010	
5i	178.3-178.9	(D <sub>2</sub> O) 7.90 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, ArH), 7.64–7.42 (m, 3H, ArH, 1H,	(D <sub>2</sub> O) 167.2, 156.6, 147.4, 136.0, 134.1,	C14H19N5O3
		CH=), 6.34 (d, <i>J</i> = 15.6 Hz, 1H, CH=), 3.17 (s, 2H, NCH <sub>2</sub> ), 3.07 (s,	130.2, 129.9, 128.9, 124.8, 124.5, 40.7,	306.26
		2H, NCH <sub>2</sub> ), 1.48 (s, 4H, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> )	38.9, 25.6, 25.3	

 Table 2
 The inhibitory activity of agmatine derivatives on NHE-1

Compd	$IC_{so}/mol \cdot L^{-1}$
Carinarida	$2.12 \times 10^{-7}$
Camponde	5.13~10
5a	$9.28 \times 10^{-9}$
5b	$8.67 \times 10^{-8}$
6c	$8.46 \times 10^{-8}$
6d	$2.63 \times 10^{-6}$
5e	$6.21 \times 10^{-6}$
5f	$1.43 \times 10^{-5}$
5g	$2.40 \times 10^{-6}$
5h	$3.08 \times 10^{-5}$
5i	>1×10 <sup>-3</sup>

氯化钾 5 mmol·L<sup>-1</sup>, 氯化镁 1 mmol·L<sup>-1</sup>, 氯化钙 1 mmol·L<sup>-1</sup>, HEPEs 缓冲液 20 mmol·L<sup>-1</sup>, pH = 6.7); 其他试剂均为市售分析纯, 薄层和柱色谱用硅胶均为烟台德信生物科技有限公司产品。

# 2 化学合成

**2.1** *N*, *N*-双叔丁氧羰基-甲基异硫脲 (7) 的合成 参 照文献[17]方法合成 7 (白色固体), 收率 87.2%, mp

121.5~123.3 ℃ (文献值<sup>[18]</sup> 127 ℃)。

**2.2 1-胺基-4-(N<sup>2</sup>, N<sup>3</sup>-双叔丁氧羰基)-胍基-丁烷 (8)** 的合成 参照文献[19]制得无色油状物 8, 收率 77.8%。同法制得化合物 9。

2.3 对乙酰氧基阿魏酸 (2a) 的合成 在 100 mL 烧瓶中依次加入乙酸酐 10 mL,浓硫酸 2 滴,室温搅拌反应 5 min,加入阿魏酸 (9.7 g, 50 mmol), TLC [石油 醚-乙酸乙酯 1 : 2 (*v/v*)] 检测显示反应基本完全,加水 100 mL 抽滤,滤饼用 50 mL 碳酸钠饱和水溶液溶解,抽滤,滤液加稀盐酸至 pH 3~4,白色固体析出,抽滤、洗涤、干燥,得白色固体 (2a) 10.0 g,收率 84.7%, mp 192.3~194.2 ℃ (文献值<sup>[20]</sup> 192~194.5 ℃)。

2.4 对乙酰氧基阿魏酸与对甲苯磺酸混酐 (3a)的 合成<sup>[21]</sup> 在 250 mL 三颈瓶中依次加入 2a (6.0 g, 25 mmol)、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40 mL)、无水碳酸钾 (5.5 g, 40 mmol)、 苄基三乙基氯化铵 (TEBACl) 0.1 g、对甲苯磺酰氯 (4.8 g, 25 mmol), 室温搅拌反应 5 h 后, TLC [石油醚-乙酸乙酯 2:1 (v/v) 为展开剂] 检测显示对甲苯磺酰 氯基本消失,得溶液A,备用。

2.5 (E)-4-(N<sup>2</sup>, N<sup>3</sup>-双叔丁氧羰基胍基)-1-(4-乙酰氧 基-3-甲氧基桂皮酰胺基) 丁烷 (4a) 的合成<sup>[21]</sup> 将 8 (7.0 g, 21 mmol) 与 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40 mL) 溶液加入 A 中, 室温搅拌4h, TLC [石油醚-乙酸乙酯1:1(v/v) 为展 开剂]检测显示反应基本完全,加水 50 mL,分取有 机相, 水相用 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL×3) 萃取, 合并 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 层,用水 (20 mL×2) 洗涤后,经无水硫酸钠干燥, 减压回收 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 后得油状物, 经硅胶柱分离, 石油 醚-乙酸乙酯 3:2 (v/v) 为洗脱剂, 收集产物, 减压 回收溶剂后得白色固体 (4a) 7.1 g, 收率 61.2%; mp 112.2~112.7 °C, <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 11.48 (s, 1H, NH), 8.42 (s, 1H, NH), 7.57 (d, J = 16.0 Hz, 1H, ArCH=), 7.09 (d, J = 8.0 Hz, 1H, ArH), 7.07 (s, 1H, ArH), 7.02 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, ArH), 6.86 (s, 1H, NH), 6.45 (d, J = 16.0 Hz, 1H, CH=), 3.84 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.48~3.42 (m, 4H, 2×NCH<sub>2</sub>), 2.32 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 1.62 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.50 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.48 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ: 168.8, 165.2, 163.4, 156.4, 153.2, 151.2, 140.7, 139.6, 134.1, 123.0, 121.5, 120.4, 111.5, 83.2, 79.4, 55.8, 40.3, 39.5, 28.2, 28.0, 27.2, 25.7, 20.6; ESI-MS m/z: 548.97  $[M+H]^{+}$ .

2.6 (E)-1-(4-羟基-3-甲氧基桂皮酰胺基)-4-胍基丁 烷盐酸盐 (5a) 的合成<sup>[22]</sup> 在 100 mL 三颈瓶中依次 加入 4a (6.6 g, 12 mmol)、甲醇 (10 mL)、氢氧化钠 (0.6 g, 15 mmol)、水 (10 mL)。室温搅拌 12 h, TLC [石油醚-乙酸乙酯 1:2 (v/v) 作为展开剂] 检测显示 反应完全, 然后通 CO<sub>2</sub>调至 pH 8~9, 减压回收溶剂, 加水 30 mL, 用乙酸乙酯 (30 mL×3) 萃取, 合并乙 酸乙酯层, 用水 (20 mL×2) 洗涤后, 经无水硫酸钠 干燥, 减压至 10 mL, 加入甲醇约 20 mL, 通入氯化 氢气体调至 pH 2~3, 回流搅拌 4 h 后, TLC [甲醇-氯 仿 1:3 (v/v)] 检测显示反应基本完全, 减压回收溶 剂, 冷却得黄色固体 2.5 g, 收率 60.9%。

2.7 (E)-1-(4-羟基桂皮酰胺基)-4-胍基丁烷 (6c) 的 合成 5c (2.2 g, 7.0 mmol) 溶于盛有 20 mL 水的烧 杯中, 50% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液调至 pH 11~12, 大量白色沉 淀生成, 抽滤, 70%乙醇洗涤, 烘干, 得黄色固体 (6c) 1.8 g, 收率 92.8%。

**2.8 桂皮酸 (2e) 的合成**<sup>[23]</sup> 在圆底烧瓶中依次加入吡啶 10 mL、苯 60 mL、1e (2.1 g, 20 mmol)、丙二酸 (3.1 g, 30 mmol) 及哌啶 0.1 mL, 装上油水分离器, 回流反应 6 h (及时除去反应过程生成的水), TLC [乙酸乙酯-甲醇 4:1 (*v/v*) 为展开剂] 检测显示反应基

本完全。冷却至室温,加入饱和 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液 15 mL, 搅拌 15 min 后分出水相。水相用 3 mol·L<sup>-1</sup>盐酸调至 pH 4 左右,析出白色沉淀。过滤,滤饼用无水乙醇重 结晶,干燥得白色晶体 (2e) 2.3 g,收率 79.3%。

2.9 (E)-1-桂皮酰胺基-4-胍基丁烷盐酸盐 (5e) 的合成 在 100 mL 三颈瓶中依次加入 4e (4.6 g, 10 mmol)、甲醇 (20 mL)、乙酸乙酯 (10 mL), 通入氯化 氢气体调至 pH 2~3, 回流搅拌 4 h, TLC [甲醇-氯 仿 1:5 (v/v)] 检测显示反应基本完全, 减压回收溶 剂, 乙酸乙酯洗涤, 冷却得白色固体 (5e) 2.4 g, 收 率 81.3%。

用类似方法合成得到其余目标化合物 5b、6d 和 5f~5i。

#### 3 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交换器-1 抑制活性测试

药理筛选所用动物为 SD 大鼠, 雌雄各半, 体重 160~250 g。由于 NHE-1 为血小板中占主导地位的 NHE 亚型<sup>[24]</sup>, 通过其他机制作用于 Na<sup>+</sup>载体的药物 分子不会产生血小板肿胀效应,故采用血小板肿胀 模型 (PSA)。以卡立泊来德为阳性对照药, 对所合成 的 9 个目标化合物进行体外 NHE-1 抑制活性初步筛 选。其中大鼠血小板的肿胀由丙酸钠缓冲液 (pH 6.7) 所诱导。实验方法参照 Rosskopf 等<sup>[25]</sup>报道的方法, 每只大鼠取眼底血 5 mL, 加入含有 0.25 mL ACD 溶 液的试管中。室温下离心 10 min。取上 2/3 血浆 (血 小板富集血浆, PRP) 备用。准备好的血小板须在4h 内使用。PSA 试验在配有 96 孔板 (1cm path length) 的多扫描分光光度计中进行。样品用 DMSO 溶解, 加入标准介质稀释, 最终 DMSO 含量均小于 1×10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup>。待测孔中加入 175 μL 丙酸钠介质及 25 μL 受试样品或标准介质 (阴性对照), 预热至 37 ℃时加 入 50 µL PRP。测定在 550 nm 处的光密度 (OD) 值 变化,每隔 7.5 s 记录由于血小板肿胀引起的透光率 变化, 共测试 2 min。

计算方法: OD 值的变化符合单指数曲线, 方程 为 OD<sub>(t)</sub> = OD<sub>(t=0)</sub> $e^{-kt}$ 。其中 t 表示时间, 单位为 s; k 为 OD 下降速率常数, 即膨胀速率常数。未加药的对照 组  $k_{max}$  值为最大肿胀速率常数。用 1×10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup> 卡 立泊来德所得  $k_{min}$  值作为基线, 来表征非 NHE 激活 引起的 OD 值变化, 认为该浓度下 NHE-1 的活性达 到完全抑制。

对测得的 OD 值取自然对数, 以 lnOD 为 Y 轴, 时间为 X 轴做散点图, 取前 42 s 进行线性回归, 所得 斜率的绝对值即为 k。扣除 k<sub>min</sub> 后的 k'与 k<sub>max</sub>'相比得 到百分速率常数 (k%)。以受试药物在不同浓度下的 k%值为 Y 轴, 与其相应的浓度为 X 轴进行非线性回归分析拟合 S 曲线, 对曲线进行计算得 IC<sub>50</sub> 值。

计算公式:  $k\% = (k - k_{\min}) / (k_{\max} - k_{\min}) \times 100\%$ 

## References

- Liu WC, Sun XL, Ji LL, et al. Synthesis and cardioprotective effect of a novel anti-ischemic/reperfused injury compound [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2009, 44: 321-326.
- [2] Xu YG, Zhang R, Hua R. Research and development of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger inhibitors [J]. Prog Pharm Sci (药学进展), 2003, 27: 262-269.
- [3] Lee SH, Kim T, Park ES, et al. NHE10, a novel osteoclastspecific member of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger family, regulates osteoclast differentiation and survival [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 369: 320–326.
- [4] Xu WT, Jin N, Xu J, et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel substituted benzoylguanidine derivatives as potent Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger inhibitors [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2009, 19: 3283–3287.
- [5] Zhang R, Lei L, Xu YG, et al. Benzimidazol-2-yl or benzimidazol-2-ylthiomethyl benzoylguanidines as novel Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger inhibitors, synthesis and protection against ischemic-reperfusion injury [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2007, 17: 2430-2433.
- [6] Jiang XM, Du P, Xu YG, et al. Synthesis and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1 inhibitory activity of 4-[4-(2, 3, 4-trimethoxybenzyl)-piperazin-1-ylmethyl]benzoylguanidine derivatives [J]. Chin J Org Chem (有机化学), 2008, 28: 2142-2148.
- [7] Msaereel B, Pochet L, Laeckmann D. An overview of inhibitors of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger [J]. Eur J Med Chem, 2003, 38: 547–554.
- [8] Lee BH, Seo HW, Yi KY, et al. Effects of KR-32570, a new Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger inhibitor, on functional and metabolic impairments produced by global ischemia and reperfusion in the perfused rat heart [J]. Eur J Pharmacol, 2005, 511: 175– 182.
- [9] Avkiran M, Cook AR, Cuello F. Targeting Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulation for cardiac protection: a RSKy approach [J]. Curr Opin Pharmacol, 2008, 8: 133–140.
- [10] Li JM, Zhao YH, Ma FS, et al. Synthesis of ligustrazinearomatic acid derivatives and their inhibitory effect on platelet aggregation [J]. Chin J Org Chem (有机化学), 2008, 28: 1578-1583.
- [11] Li YQ, Zhang JS, Cai HW. Influence of sodium ferulate on MDA, SOD, ET and NO during myocardial ischemia and reperfusion injury [J]. Chin J Anesthesiol (中华麻醉学杂 志), 1998, 18: 688-690.

- [12] Li Q, He RR. Cardioprotective effect of agamatine on myocardial ischemia-reperfusion injury in anesthetized rabbits
  [J]. J Hebei Med Univ (河北医科大学学报), 2001, 22: 196– 199.
- [13] Kim JH, Yenari MA, Giffard RG, et al. Agmatine reduces infarct area in a mouse model of transient focal cerebral ischemia and protects cultured neurons from ischemia-like injury [J]. Exp Neurol, 2004, 189: 122–130.
- [14] Jin S, Yoshida M. Antifungal compound, feruloylagmatine, induced in winter wheat exposed to a low temperature [J]. Biosci Biotech Biochem, 2000, 64: 1614–1617.
- [15] Jin S, Yoshida M, Nakajima T, et al. Accumulation of hydroxycinnamic acid amides in winter wheat under snow [J]. Biosci Biotech Biochem, 2003, 67: 1245–1249.
- [16] Michael S, Michael ED, Michael DJ. Preparation of peptide analogs as kininogenase inhibitors: WO, 9507291 [P]. 1995-03-16.
- [17] Tatsuya H. Amidoalkylguanidine derivatives as UV absorbers for cosmetics: WO, 2004005422 [P]. 2004-01-15.
- [18] Gers T, Kunce D, Markowski P, et al. Reagents for efficient conversion of amines to protected guanidines [J]. Synthesis, 2004, (1): 37–42.
- [19] Carmignani M, Volpe AR, Botta, B, et al. Novel hypotensive agents from *Verbesina caracasana*. 8. Synthesis and pharmacology of (3, 4-dimethoxycinnamoyl)-N<sup>1</sup>-agmatine and synthetic analogues [J]. J Med Chem, 2001, 44: 2950–2958.
- [20] Zhang CT, Gong XY, Liu JL, et al. Optimum synthesis of acetylferuloyl chloride by orthogonal design [J]. Chin Pract Med (中国实用医药), 2008, 3: 22-23.
- [21] Jaszay ZM, Petnehazy I, Toke L. Phase-transfer catalyzed synthesis of amides and esters of carboxylic acids [J]. Synthesis, 1989, (10): 745–747.
- [22] Wang G, Li CJ, Li L, et al. Catalyst-free water-mediated *N*-Boc deprotection [J]. Tetrahedron Lett, 2009, 50: 1438–1440.
- [23] Zhao YH, Ma FS, He Y, et al. Synthesis of (E)-3-{4-[(3, 5, 6-trimethylpyrazin-2-yl)methoxy] aryl} acrylic acid [J]. Chin J Synth Chem (合成化学), 2008, 16: 487–489.
- [24] Park JW, Roh HY, Jung IS, et al. Effects of [5-(2-methoxy-5-fluorophenyl) furan-2-ylcarbonyl] guanidine (KR-32560), a novel sodium/hydrogen exchanger-1 inhibitor, on myocardial infarct size and ventricular arrhythmias in a rat model of ischemia/reperfusion heart injury [J]. J Pharm Sci, 2005, 98: 439-449
- [25] Rosskopf D, Morgenstern E, Scholz W, et al. Rapid determination of the elevated Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange in platelets of patients with essential hypertension using an optical swelling assay [J]. J Hypertension, 1991, 9: 231–238.